

动物病毒 microRNA 的研究进展

薛 白^{1,2}, 王树芬^{1,2}, 鲍登克², 邓瑞广², 李学伍^{2*}

(1. 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003;

2. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室/河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: MicroRNAs(miRNAs)是一种含有约 22~25 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,广泛存在于人类及其他各种生物中。它通过与靶 mRNA 特异性的碱基互补配对,引起靶 mRNA 降解或者抑制其翻译,从而调节基因的转录后表达水平。病毒 microRNA 是新发现的一类 miRNA,综述了近年来病毒 microRNA 的产生、作用机制、生物学功能及其在动物上的研究进展。

关键词: 病毒; microRNA; 基因调控; 动物疾病

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0015-04

Progress on the Research of Viral MicroRNAs Involved in Animal Disease

XUE Bai^{1,2}, WANG Shu-fen^{1,2}, BAO Deng-ke², DENG Rui-guang², LI Xue-wu^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: MicroRNAs(miRNAs)are a class of non-coding small RNA in length of 22-25 nt and distribute extensively in human and other organism genomes. They regulate gene expression through sequence specific interactions with target mRNAs resulting in translational repression or mRNA degradation. Viral microRNAs are a class of newly discovered miRNA. This paper introduces the progress on the researches of the generation, functions and mechanisms of viral microRNAs and its function involved in animal diseases.

Key words: virus; microRNA; gene regulation; animal disease

microRNA 是一类长度介于 22~25 个碱基的非编码小分子 RNA,在细胞发育与分化、细胞凋亡、脂肪代谢、组织器官形成、肿瘤发生、病毒感染等许多生物学过程中发挥重要的转录后基因调控功能^[1]。1993 年,在秀丽隐杆线虫中首次发现 22 个碱基的 RNA 小分子,该分子能够时序性调控其细胞发育过程,这是人类发现的第一个 miRNA 分子^[2]。此后,一系列的 miRNA 分子在动物、植物和部分病毒基因组中得以发现和鉴定。作为 21 世纪生命科学领域的重大发现之一,越来越多的研究证

明,miRNA 在动物的基因表达调控、细胞生长及分化等过程中发挥着重要的作用。2004 年,人们从艾伯斯坦-巴尔病毒感染的动物细胞内首次发现了由疱疹病毒基因组编码的 miRNA^[3],截至目前,通过克隆鉴定和生物信息学预测发现的病毒 miRNA 已有上百种,其中部分已经完成了序列鉴定和功能分析。对于动物病毒而言,其编码的 miRNA 不仅广泛参与病毒蛋白表达、基因组复制、病毒颗粒组装等自身基因表达的调节,而且也能够直接靶向调控许多宿主基因的表达,以利于自身的潜伏生存和逃避

收稿日期:2012-01-15

基金项目:国家自然科学基金项目(3117234)

作者简介:薛 白(1989-),男,河南周口人,在读硕士研究生,研究方向:动物分子病毒学。E-mail: xuebai34@yahoo.com.cn

* 通讯作者:李学伍(1964-),男,河南通许人,研究员,博士,主要从事动物分子病毒学及免疫学检测研究。

E-mail: lixuewu2002@126.com

宿主免疫系统对其的清除,甚至某些病毒还能够调控宿主固有免疫功能相关 miRNA 的表达而达到免疫逃逸的目的。动物机体具有多种不同途径抵抗病毒的入侵,如通过编码自身的 miRNA 对病毒繁殖过程的每个环节进行阻断,也是动物机体清除病毒的途径之一。这种抗病毒过程广泛存在于动物体内,对某些病毒而言,动物机体的这种抗病毒作用更为直接、高效。

1 病毒 miRNA 的特征及产生

miRNA 是一类长约 22~25 个核苷酸(nt)的内源性非编码单链小分子 RNA,在其 3'端有 1 个或者 2 个碱基长度变化,它本身不具有开放阅读框,不编码蛋白质。成熟的 miRNA 5'端有 1 个磷酸基团,3'端为羟基,是与其他相同长度的功能 RNA 降解片段区分的标志,5'端第 1 个碱基对 U 有较强的倾向性,而对 G 却有抗性,但第 2 到第 4 个碱基缺乏 U,一般来讲,除第 4 个碱基外,其他位置碱基通常都缺乏 C。成熟 miRNA 可以和上游或下游的序列不完全配对形成茎环结构^[4-5]。

病毒 miRNA 产生过程与宿主细胞的 miRNA 类似,所以病毒成熟的 miRNA 大小和结构也与其他生物的 miRNA 一样。首先,病毒 miRNA 基因在宿主细胞核内在 RNA 聚合酶 II 或 III (Pol II 或 Pol III) 的作用下转录为初级转录本 (pri-miRNA),pri-miRNA 在细胞核内被 RNase III 核酸酶 Drosha 加工生成长约 70 nt 的发夹状前体 miRNA (pre-miRNA),然后在核转运因子 5 (exportin5) 的作用下,pre-miRNA 从核内转运到细胞质。胞质中的 pre-miRNA 在 Dicer 酶的作用下被切割成互补的 miRNA 双链,最后成熟的一条 miRNA 单链被解链,进入核糖蛋白复合体 miRNP (也叫 RNA 诱导沉默复合物, RNA induced silencing complex, RISC),与 Ago 蛋白结合,组成 miRNA 效应器复合物。miRNA 通过与靶基因的 3'-UTR 或其他区域互补配对,指导 miRNP 复合体对靶基因 mRNA 进行切割或者翻译抑制,而另一条 miRNA 单链一般被降解^[6-8]。目前已知的病毒编码 miRNA 几乎均来源于双链 DNA 病毒,主要是疱疹病毒,另外也包括猴多瘤病毒、人腺病毒及逆转录病毒。这些 miRNA 有的是通过从病毒感染的细胞中分离 miRNA 进行 cDNA 克隆的方法获得,另外的则是先通过计算机预测,然后再通过实验的方法验证其表达^[9]。

2 病毒 miRNA 的基因分布及表达特点

目前已知的 miRNA 基因是以单拷贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中,而且绝大部分在基因间隔区,其转录过程独立于其他基因。miRNA 不被翻译成蛋白质,而是在体内代谢过程中起多种调控作用。总体上看,病毒 miRNA 在基因分布和表达等方面与其他生物的 miRNA 大致相同。到目前为止,发现的大部分病毒 miRNA 的基因分布特点是比较集中的,即集中于某一区域内,如已知 EBV 和卡波济肉瘤相关疱疹病毒编码的 miRNA 都成簇分布,是由多顺反子转录而成,它们受共同的上游调控序列调控;而人巨细胞病毒编码的 14 种 miRNA 分散地存在于整个基因组内,它们彼此间隔较远,由不同的转录机制调控。病毒 miRNA 基因大多位于编码基因的间隔区,但也有相当数量的 miRNA 基因位于编码区的内含子内,如 EBV 的 miR-BART1~miR-BART14 就分别位于 BART 基因的 2 个内含子上^[11-12],也有个别病毒的 miRNA 位于 mRNA 非翻译区(UTR),如 EBV 的 miR-BHRF1-1 位于 5'-UTR,而 miR-BHRF1-2 和 miR-BHRF1-3 则位于 3'-UTR^[3]。

在 miRNA 的表达方面,大多生物体的 pre-miRNA 通常由聚合酶 Pol II 转录而来,而一些病毒的 pre-miRNA 是由 Pol III 转录的,如人腺病毒和鼠疱疹病毒,这在 miRNA 生物合成中较为特殊。此外,与细胞编码的 miRNA 不同,病毒编码的 miRNA 不具有高度同源性,即使是同一病毒家族成员内部或具有相同宿主的病毒也是如此。相对于真核生物而言,这主要是由于病毒的高突变率和高速进化。虽然对病毒自身来说,这是进化的一个优势,能够对宿主和外界环境的变化快速适应,但同时这也是对生物学家提出的又一挑战。由于基因序列的保守性差,缺乏高度的同源性,导致难以通过计算机软件程序预测大多数病毒 miRNA 的生物合成和作用靶点。为解决这一难题,生物信息学家必须针对病毒 miRNA 的这一特性重新开发新的算法^[13]。

3 病毒 miRNA 的调节作用

病毒编码 miRNA 对病毒而言意义重大,这主要在于病毒 miRNA 在宿主细胞内对宿主及病毒自身 mRNA 的调节作用。miRNA 的相对分子质量小,无免疫原性,不会刺激机体产生免疫反应,半衰期长,而且它的进化速度要比蛋白质快得多,能通过进化调节自身从而靶向新的基因和通过降低宿主某

些关键基因的表达创造有利于病毒复制的环境。

病毒 miRNA 首先作用于自身 mRNA,对病毒蛋白编码区基因产生调控作用,特异性调控自身某些基因的表达。研究证明,1 个 HIV *nef* 基因编码的 miRNA 能够在体外特异性下调 *nef* 基因表达,提示 HIV 在人体内可能是通过这一机制维持长期低病毒血症的状态。同一研究小组随后又发现:通过 5'LTR 负反应元件,*nef* 基因编码的 miRNA 也能降低 HIV-1 启动子的活性进而抑制转录^[14]。这又从另一层面揭示了病毒通过 miRNA 进行自身调节作用。另外 Barth 等^[15]研究发现,EBV miR-BART2 通过靶向编码病毒 DNA 聚合酶的基因 BALF5 的 3'-UTR,从而下调其表达。这是第 1 个发现病毒编码的能够与其靶基因 3'非翻译区精确互补的 miRNA。

病毒 miRNA 一方面精确地调节自身基因的表达,另一方面也调控一些宿主细胞 mRNA,形成有利于自身繁衍的环境,同时达到有效的生存能力。研究发现,卡波济肉瘤相关疱疹病毒编码的 11 种 miRNA 在静止期的病毒感染细胞中表达上调,据推测,它们能与宿主的某些基因的 mRNA 结合,可能会通过调节宿主某些基因的表达,使病毒感染状态长期维持^[15]。进一步研究发现,它们能够靶向下调宿主细胞的某种抗肿瘤因子的表达,进而促进疾病的发生。所以两方面的调控并非相互独立,而是相互作用、有紧密联系的。在对人巨细胞病毒编码 miRNA 的研究中发现,人巨细胞病毒编码的 miRNA 能够与人类 MHC I 类链相关分子 mRNA 的 3'端非编码区结合,特异性下调被感染细胞膜表面分子 MICB 的表达,进而降低由其受体介导的 NK 细胞对病毒感染细胞的识别和杀伤,帮助被感染细胞的逃逸。该结果进一步证实了病毒可以通过编码 miRNA 直接靶向宿主免疫防御基因,削弱宿主免疫防御功能^[16]。生物信息学分析还发现,人免疫缺陷病毒感染细胞后,某些亚群淋巴细胞表面分子及胞内细胞因子的 miRNA 水平则发生不同程度的变化,而这些 miRNA 中很多与人免疫缺陷病毒前基因组序列的某些区段有很高的相关性,提示该病毒具有通过病毒 miRNA 调节宿主某些基因的功能,特别是调节免疫相关基因表达,进而降低宿主免疫防御的能力。诱导对固有免疫应答有负调节作用的 miRNA 亦是病毒逃避机体清除的一种手段,人疱疹病毒 IV 型编码的潜伏感染膜蛋白 LMP1,不仅能够受到自身 miRNA 的调节促进病毒的潜伏感染,而且能够通过活化宿主细胞内的信号通路,上调

miRNA 的表达,从而增强 miRNA 对许多干扰素反应基因的抑制能力,降低机体抗病毒应答的强度。

4 病毒 miRNA 对动物疾病发生的影响

目前关于 miRNA 的研究主要集中在人及其他一些真核生物,而病毒 miRNA 的研究远远落后,特别是关于动物疾病中病毒 miRNA 的研究刚刚起步,但还是取得了一些成果。一些动物病毒在宿主基因组中编码 miRNA,这些病毒在感染细胞中通过编码病毒 miRNA 来调控自身及宿主基因表达以优化感染。Sullivan 等^[17]的研究表明,猴病毒(SV) miRNA 会在感染晚期积累,且与病毒早期的 mRNA 完全互补,而靶向那些 mRNA,从而通过减少 T 抗原的表达来维持病毒的复制效率,降低宿主对 T 抗原的免疫效应,达到躲避免疫细胞监视和攻击的目的。但是,SV40 的突变型 SM 毒株 T 抗原 mRNA 发生突变,病毒 miRNA 不能识别其作用位点,基因表达正常,宿主 T 抗原表达量也不会减少,结果诱发机体正常的免疫应答反应,病毒受到毒性 T 淋巴细胞攻击而被宿主清除。

近期有试验对 MDV-2 编码的 22 种 miRNA 在宿主体内的动态基因表达谱进行了系统研究,发现在感染宿主体内,MDV-1 miRNA 成熟体分子的表达具有明显的时序性和组织特异性,对早期或晚期表达的 MDV-1 miRNA 在体内的动态表达谱的研究表明,它们在 MDV 的入侵、复制、潜伏、诱导肿瘤发生以及肿瘤转移中可能具有不同的调控作用^[14]。猪伪狂犬病毒与 MDV 一样也属于疱疹病毒,伪狂犬病毒编码的 miRNA 在致病过程中发挥巨大的调控作用,有关研究表明,PRV miRNA 可能与病毒逃逸及潜伏机制有关。

5 小结

病毒 miRNA 的研究已经成为生命科学特别是 RNA 研究领域的一个重要方向,它揭示了非编码区提供给机体的一种新的重要调节机制。目前,动物病毒 miRNA 的研究还处于起步阶段,发现的病毒 miRNA 还很少,但已引起极大的兴趣,相信随着病毒 miRNA 研究工作的深入及新的试验方法、生物信息学等研究手段的不断更新,必将发现更多动物病毒的 miRNA,并且不断发掘出它们的生物学功能,最终探明其表达调控机制,这对于认识动物病毒与动物机体相互作用机制、预防和治疗疾病等具有十分深远的意义。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-297.
- [2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. Cell, 1993, 75: 843-854.
- [3] Pfeffer S, Zavolan M, Grasser F A, et al. Identification of virus-encoded microRNAs [J]. Sci, 2004, 304: 734-736.
- [4] Lagouintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human [J]. RNA, 2006, 38(2): 175-179.
- [5] Lagouintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. Science, 2001, 294: 853-858.
- [6] Sullivan C S, Ganem D. microRNAs and viral infection [J]. Mol Cell, 2005, 20: 3-7.
- [7] Neilson J R, Sharp P A. Herpesviruses throw a curve ball: New insights into microRNA biogenesis and evolution [J]. Nat Methods, 2005, 2: 252-254.
- [8] 姚成果, 金由辛. miRNA 的生物合成过程 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(8): 707-711.
- [9] Gottwein E, Cullen B R. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity [J]. Cell Host Microbe, 2008, 3(6): 375-387.
- [10] Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family [J]. Nat Methods, 2005, 2: 269-276.
- [11] Cai X Z, Schafer A, Lu S H, et al. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed [J]. PLoS Pathog, 2006, 2: 236-247.
- [12] Krol J, Sobczak K, Wilczynska U, et al. Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design [J]. J Biol Chem, 2004, 279(40): 42230-42239.
- [13] Omoto S, Fujii Y R. Regulation of human immunodeficiency virus transcription by *nef* microRNA [J]. J Gen Virol, 2005, 86(3): 751-755.
- [14] Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, et al. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5 [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(2): 666-675.
- [15] Cai X Z, Lu S H, Zhang Z H, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus express an array of viral microRNAs in latently infected cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 5570-5575.
- [16] Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, et al. Host immune system gene targeting by a viral microRNA [J]. Sci, 2007, 317: 376-381.
- [17] Sullivan C S, Grundhoff A T, Tevethia S, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells [J]. Nature, 2005, 435: 682-686.