

基于 microRNA 的抗流感病毒研究进展

沃恩康 王怡婷 郭潮潭

摘要 microRNA(miRNA)作为一种重要的基因表达调控分子,在宿主与病毒相互作用时发挥重要作用。研究发现,宿主感染流感病毒后 miRNA 表达发生改变,多种 miRNA 影响流感病毒复制和宿主的抗病毒反应,这类 miRNA 及其靶点有望成为基因药物和减毒活疫苗研发的重要突破口。除此之外,植物来源的 miRNA 和主动设计的人工 miRNA 也体现出抗流感作用。本文就 miRNA 在抗流感病毒方面的研究进展做一综述。

关键词 MicroRNA 流感病毒 宿主 抗病毒

中图分类号 R373.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.041

microRNA 是一类长度约 22 个核苷酸的单链非编码低分子 RNA,在动植物和病毒中均有发现。不同物种之间,部分 miRNA 的基因位置和基因序列都呈现高度保守性。miRNA 以序列互补的方式,通过直接降解靶基因 mRNA 和抑制靶基因翻译两种机制起到转录后调控作用,参与生命体分化、发育、凋亡、病原体感染和肿瘤等重要生命活动^[1]。最早被确认的 miRNA 是线虫的 lin-4 和 let-7,随着深度测序技术的不断发展,大量新的 miRNA 不断涌现,截止至 2014 年 6 月,在 miRBase 数据库中有不同物种来源的 miRNA 登陆序列 28645 条(miRBase Release 21)。迄今为止,除反转录病毒 HIV-1 以外,未发现 RNA 病毒可编码 miRNA,流感病毒基因组能否表达 miRNA 目前尚无定论。自 2005 年首次发现宿主 miRNA 具有抗病毒效应后,许多抗病毒 miRNA 被陆续鉴定出来。流感病毒多个基因的保守区与宿主 miRNA 高度同源,是 miRNA 的潜在靶点,利用这类 miRNA 及其靶点为基因药物设计以及疫苗研发提供了新的思路^[2]。

一、宿主 miRNA 的抗流感病毒作用

宿主 miRNA 除了在细胞内行使调控功能外,还可以通过识别外源基因而起到抗病毒的作用。关于 miRNA 参与流感病毒感染和致病的研究还处于初级

阶段,相关机制尚需进一步研究阐明。目前已经鉴定出若干宿主 miRNA 能够抑制病毒的复制增殖。

1. 宿主 miRNA 直接抑制流感病毒基因表达:多项研究已经证实,宿主 miRNA 能够直接靶向流感病毒的基因,来抑制其复制增殖。Song 等^[3]以 A/WSN/33 毒株为对象,证明了宿主 miR-323、miR-491 和 miR-654 能靶向病毒 PB1 基因的同一个保守区段。虽然上述 miRNA 和靶序列并非完全匹配,但 miRNA 仍然通过降解 PB1 mRNA 的方式来抑制病毒在 MDCK 细胞中的复制增殖。Ma 等^[4]发现 A549 细胞感染流感病毒后 let-7c 表达水平显著上调,let-7c 能靶向结合病毒 M1 基因 cRNA 的 3'端非翻译区。转染有 let-7c 前体分子的 A549 细胞感染病毒后, M1 的 cRNA 和蛋白表达水平均显著下调,病毒增殖能力降低。宿主 miRNA 往往靶向流感病毒基因的保守片段,因此 miRNA 抑制病毒可以突破亚型局限性,如人 miR-3145 能同时靶向 H1N1、H5N1、H3N2 等多个亚型病毒的 PB1 基因,在高表达 miR-3145 的 A549 细胞中,病毒增殖受到抑制^[5]。上述研究结果表明靶向流感保守片段的 miRNA 可以作为流感防控的新手段。

如今,利用生物信息学软件预测 miRNA 的靶基因,是人们在 miRNA 数据库中寻找抑制病毒复制的宿主 miRNA 的有效途径。Zhang 等^[6]通过改进软件算法对 H1N1 亚型流感病毒基因组进行分析,在人 miRNA 数据库中筛选出 miR-489、miR-325、miR-876-3p 和 miR-2117 等 4 个 miRNA,分别靶向 HA、PB2、MP 和 NS 基因。Scaria 等^[7]利用计算机发现人基因组编码的 miR-507 和 miR-136 分别靶向 H5N1 亚型流感病毒的 PB2 和 HA 基因,而且靶序列

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81272511);国家卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(WKJ-2J-1508);国家中医药管理局基金资助项目(JDZX2012174);浙江省科技计划项目(2014F10032);浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYB072);浙江省医学重点学科群项目生物医药重点学科群(XKQ-010-001)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所

通讯作者:郭潮潭,研究员,电子信箱:gchaotan@163.com

在不同毒株之间高度保守。值得注意的是,这两个 miRNA 在鸡当中并不存在,很可能是鸡对 H5N1 病毒易感的原因之一。除了哺乳动物外,在家禽中也具有靶向病毒基因的 miRNA。计算机分析显示,鸡的 mir-133c、mir-1710 和 mir-146c * 靶向高致病性 H5N1 禽流感病毒 PB1 基因,具有抑制 PB1、PB1-F2 和 N40 蛋白的潜在能力^[8]。虽然利用计算机能够高效地从数据庞大的 miRNA 库中筛选到有用信息,但筛选结果具有一定的局限性,因为软件的算法和参数设置有待进一步改进,其结果必须通过生物学实验来验证。

2. 宿主 miRNA 调节自身蛋白而间接抑制病毒增殖:病毒感染宿主细胞后,宿主 miRNA 除了直接抑制病毒基因表达外,还能通过调节自身蛋白及抗病毒免疫,来抵抗流感病毒的入侵。高致病性禽流感病毒 HA 蛋白前体的切割活化主要依赖宿主细胞的弗林蛋白酶(furin),靶向 furin 的 miR-24 成为抑制 H5 和 H7 亚型高致病性禽流感病毒的关键因子。转染人工合成的 miR-24 后,A549 细胞中 furin mRNA 的表达量和 furin 活性急剧降低,感染高致病性 H5N1 病毒后,病毒复制受阻,并完全阻止了病毒在细胞间的传播^[9]。Fang 等^[10]研究发现,A549 细胞感染流感病毒后 miR-29 的表达上调 50 倍,流感患者外周血单核细胞 miR-29 比正常人群高 10 倍。进一步研究证实 miR-29 能抑制 DNA 甲基转移酶的活性,进而诱导环氧化酶 2 的表达,环氧化酶 2 促进 NF- κ B 与增强子结合来增加 IFN- λ 1 的表达,从而加强宿主细胞的抗病毒的作用。在细胞感染流感病毒早期,miRNA-4276 显著下调,而细胞色素 C 氧化酶 VIC(COX6C)的 mRNA 在肺泡和支气管上皮细胞中则上升 2 倍。进一步人为抑制 miRNA-4276 后,COX6C 的 mRNA 表达量显著上调,并通过凋亡蛋白 caspase-9 来抑制病毒复制^[11]。同样在感染早期,miRNA-548an 也出现下调,而 miRNA-548an 能引起 NS1 结合蛋白过度表达。转染 miRNA-548an 抑制剂后,NS1 结合蛋白在 mRNA 和蛋白水平都出现表达量降低,细胞凋亡增加,病毒复制数减少,表明 NS1 结合蛋白在维持病毒增殖中起到重要作用^[12]。上述研究结果提示,miRNA-4276 和 miRNA-548an 有望成为控制病毒早期感染的一个重要靶标。

人体中多个蛋白酶和蛋白激酶是流感病毒复制所必需的,miRNA 可以通过调节这些酶类来调控病毒复制^[13,14]。Bakre 等^[14]鉴定出 6 个人蛋白激酶

(HPK)是流感毒株 A/WSN/33 和 A/New Caledonia/20/99 复制所必需的,而且 HPK 受到宿主 miRNA 的调节,其中 miR-149 * 调节丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 NEK8 表达,miR-548d-3p 调节丝裂原活化蛋白激酶 1 表达,miR-1228 和 miR-138 调节细胞周期蛋白依赖性激酶 13 表达。上调 miR-34c 能诱导丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PLK4 转录和表达,从而增强流感病毒复制,抑制 miR-34c 则降低病毒复制,表明 miRNA 能通过调节 HPK 的表达水平来影响病毒复制。

二、植物来源的 miRNA 抑制流感病毒

南京大学张辰宇团队发现,金银花中的 MIR2911 能靶向流感病毒 PB2 和 NS1 基因,抑制其表达。由于 MIR2911 特殊的稳定性,能在金银花煎剂中富集,小鼠饮用后,MIR2911 进入外周血和肺部组织,抑制病毒感染。而且人工合成的 MIR2911 与金银花煎剂中的 MIR2911 都能有效保护小鼠免受 H1N1 亚型病毒感染,这种保护作用依赖于 MIR2911 在 PB2 和 NS1 基因上的结合位点。MIR2911 还能有效抑制 H5N1 和 H7N9 亚型病毒的复制,降低 H5N1 对小鼠的致死率,显示其抗流感效果具有一定的广谱性^[15]。植物来源的 MIR2911 不仅是首个被证实可直接靶向甲型流感病毒的传统中药活性成分,也很可能代表一类可有效并直接抑制病毒感染的天然产物。该研究结果还能支持他们先前的一项发现,即外源性 miRNA 可通过饮食被哺乳动物胃肠道有效吸收,实现跨物种调控,而这种调控机制的发现和进一步阐明将为抗流感病毒药物研发提供新的途径^[16]。然而最新的小鼠实验显示,外源 miRNA 不被胃肠道吸收进入体内发挥基因调节功能,而是被降解为体内 RNA 合成提供原料^[17]。外源 miRNA 能否从食物中吸收而产生生理学作用的问题一直存在争议,这也许与 miRNA 的来源及其自身的稳定性有关。

三、人工 miRNA 抑制流感病毒

除了对宿主细胞直接转染化学合成的 miRNA 和 miRNA 表达载体外,利用病毒载体来表达人工 miRNA(amiRNA)成为的一种新的选择。amiRNA 指的是将自然界存在的 miRNA 的成熟序列替换为人为设计的靶向某个基因的反义序列。这是因为在不破坏 miRNA 茎环结构茎起始区碱基序列的情况下,miRNA 的生物合成途径就不会受到影响,因此人们就可以设计靶向任何序列的 amiRNA,进行基因功能和疾病防治方面的研究。基于 miR-30、miR-126 表达

框的慢病毒载体表达靶向 NP、PB1 等基因的 amiRNA,并采取多个 amiRNA 串联表达策略,能有效抑制病毒复制,这种抑制效果在人、鼠、猴、狗等多个物种的细胞中得以实现^[18,19]。上海巴斯德研究所 Zhang 等^[20]通过软件设计和细胞体外筛选等方法获得 7 条针对流感保守基因 NP、M1 和 M2 的 amiRNA,将筛选获得的 miRNA 克隆至复制缺陷型腺病毒载体 AdC68 的 E1 区,获得了 7 株表达不同流感特异性 amiRNA 的腺病毒。以剂量为 10^{11} vp 的重组腺病毒免疫小鼠后,产生了较好的免疫保护作用,对同亚型的 H1N1 病毒感染有 100% 的保护率,对于 H5N1 和 H9N2 亚型病毒感染也有部分保护效果。

四、宿主 miRNA 在流感病毒载体及疫苗研究中的应用

除了寻求各类能有效抑制病毒的药物外,疫苗研发也是抗病毒的一个重要方面。已有研究表明,将宿主 miRNA 的靶点序列插入到流感病毒基因序列中,能够显著抑制病毒的基因表达以及病毒的感染能力,这对流感病毒载体和减毒活疫苗研发提供了新的思路^[21,22]。目前,结合计算机技术来分析宿主 miRNA 的靶点,大大提高了研究效率。利用分析软件在流感病毒基因组中寻找人 miRNA 可能结合位点,在不额外增加 miRNA 靶序列的前提下,对候选结合位点进行突变,综合考虑结合自由能、同源性、以及碱基改变而引起的病毒蛋白物理性质的改变等因素,筛选出最优的结合位点^[23]。同时也可以设计引入多个 miRNA 结合位点去降低活疫苗株的毒力,减少由突变引起的逃逸现象,这为减毒活疫苗的设计提供了新的策略。例如在新甲流毒株 A/Nanjing/108/2009 的 PB1 基因的 83~107bp 处,通过一系列突变引入 miR-let-7b 的靶序列,重组毒株在小鼠中的毒力明显降低,并显示出减毒活疫苗候选株的各项特性^[24]。Li 等^[25]设计构建了携带靶向自身 NP 的 amiRNA 的流感 PR8 毒株,在 NS 基因中插入 miR-93 的表达框架,来表达靶向 NP 的 amiRNA,构建的重组病毒在小鼠中的毒力下降 10^4 倍,小鼠鼻内接种病毒后获得的免疫保护作用能够抵抗多个亚型毒株的攻击。

不同物种的 microRNA 表达谱不同,miR-93 广泛存在于哺乳动物中,在禽鸟中不表达。通过点突变的方法在 H1N1 和 H5N1 亚型流感病毒 NP 蛋白保守区引入 miR-93 靶序列,重组毒株毒力显著降低,即使高剂量感染小鼠,仍不能使小鼠致病。同时,重组毒株免疫原性好,小鼠感染后出现较高水平的体液免

疫应答,对野毒株的攻击产生完全的免疫保护。由于 miR-93 在鸡胚中含量极低,重组毒株仍可采用鸡胚大量制备^[26]。Langlois 等^[22]研究发现,miR192 存在于人呼吸道上皮细胞和小鼠肺部,而雪貂肺部并不表达。将 miR-192 的靶序列插入到 HA 基因的编码区和包装信号序列之间,重组病毒在 A549 细胞(表达 miR-192)中的复制能力下降近 100 倍,对小鼠的致病率显著降低,至少能抵御 10 倍于野生株的致死攻毒剂量。然而重组病毒在雪貂中依然保持与野生株类似的感染和传播能力,雪貂仍然可以作为此类病毒研究的动物模型。虽然目前并不能保证这种重组病毒对人类无害,但至少在研究过程中所涉及的安全方面多了一份保障,也为其他高致病性病毒的研究提供借鉴。

五、展 望

miRNA 作为宿主体内一种重要的基因表达调控分子,在宿主与病毒之间发挥重要作用,miRNA 及其靶点目前已经成为基因药物设计的新亮点。当前研究最为成功的 miRNA 药物靶标是肝特异的 miR-122,已在丙型肝炎治疗的 II 期临床获得重大突破。但是,病毒与宿主 miRNA 之间的关系错综复杂,1 个基因由多个 miRNA 来共同调控,一种 miRNA 又可能会作用于多个基因。对于目前鉴定出的对流感病毒具有抑制作用的宿主 miRNA,亟需进一步明确其在宿主体内的天然靶标及其他生物学功能,对于主动设计的 amiRNA 要明确其是否存在预期外的生理效应,以确保在利用这些 miRNA 抗病毒效应的同时又不会影响正常的细胞生理功能,这对其能否实现临床应用至关重要。

同时,流感病毒感染后会起宿主 miRNA 表达谱改变,这些表达异常的 miRNA,特别是与流感流行以及重症相关的特异性 miRNA 的鉴定和深入研究,将有助于开发新的抗病毒药物。miRNA 在生物进化上较为保守,作用途径专一,通过体外递送抗病毒 miRNA 或调控抗病毒 miRNA 表达,这种策略能快速高效抑制病毒。由于 miRNA 靶点通常位于病毒基因的保守区,因此基于 miRNA 的抗流感病毒有望突破亚型的局限性。尽管 miRNA 在抗流感药物和减毒疫苗方面的研究和应用尚处于探索阶段,相信新的 miRNA 不断发现,作用机制进一步阐明,有助于 miRNA 类药物在流感防治领域实现新的突破。

参考文献

- 1 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and

- function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297
 - 2 Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, *et al.* A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells[J]. *Science*, 2005, 308(5721): 557–560
 - 3 Song L, Liu H, Gao S, *et al.* Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells[J]. *J Virol*, 2010, 84(17): 8849–8860
 - 4 Ma YJ, Yang J, Fan XL, *et al.* Cellular microRNA let-7c inhibits M1 protein expression of the H1N1 influenza A virus in infected human lung epithelial cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(10): 2539–2546
 - 5 Khongnomnan K, Makkoch J, Poomipak W, *et al.* Human miR-3145 inhibits influenza A viruses replication by targeting and silencing viral PB1 gene[J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240(12): 1630–1639
 - 6 Zhang H, Li Z, Li Y, *et al.* A computational method for predicting regulation of human microRNAs on the influenza virus genome[J]. *BMC Syst Biol*, 2013, 7(Suppl 2): S3
 - 7 Scaria V, Hariharan M, Maiti S, *et al.* Host-virus interaction: a new role for microRNAs[J]. *Retrovirology*, 2006, 3: 68
 - 8 Kumar A, Vn MA, Raut AA, *et al.* Identification of chicken pulmonary miRNAs targeting PB1, PB1-F2, and N40 genes of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in Silico[J]. *Bioinform Biol Insights*, 2014, 8: 135–145
 - 9 Loveday EK, Diederich S, Pasick J, *et al.* Human microRNA-24 modulates highly pathogenic avian-origin H5N1 influenza A virus infection in A549 cells by targeting secretory pathway furin[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 1): 30–39
 - 10 Fang J, Hao Q, Liu L, *et al.* Epigenetic changes mediated by microRNA miR29 activate cyclooxygenase 2 and lambda-1 interferon production during viral infection[J]. *J Virol*, 2012, 86(2): 1010–1020
 - 11 Othumpangat S, Noti JD, Beezhold DH. Lung epithelial cells resist influenza A infection by inducing the expression of cytochrome c oxidase VIc which is modulated by miRNA 4276[J]. *Virology*, 2014, 468–470: 256–264
 - 12 Othumpangat S, Noti JD, Blachere FM, *et al.* Expression of non-structural-1A binding protein in lung epithelial cells is modulated by miRNA-548a on exposure to influenza A virus[J]. *Virology*, 2013, 447(1–2): 84–94
 - 13 Meliopoulos VA, Andersen LE, Brooks P, *et al.* MicroRNA regulation of human protease genes essential for influenza virus replication[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37169
 - 14 Bakre A, Andersen LE, Meliopoulos V, *et al.* Identification of host kinase genes required for influenza virus replication and the regulatory role of microRNAs[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66796
 - 15 Zhou Z, Li X, Liu J, *et al.* Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses[J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 39–49
 - 16 Zhang L, Hou D, Chen X, *et al.* Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA[J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 107–126
 - 17 Title AC, Denzler R, Stoffel M. Uptake and function studies of maternal milk-derived microRNAs[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(39): 23680–23691
 - 18 Chen SC, Stern P, Guo Z, *et al.* Expression of multiple artificial microRNAs from a chicken miRNA126-based lentiviral vector[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22437
 - 19 Xu F, Liu G, Liu Q, *et al.* RNA interference of influenza A virus replication by microRNA-adapted lentiviral shRNA[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(10): 2971–2981
 - 20 Zhang H, Tang X, Zhu C, *et al.* Adenovirus-mediated artificial MicroRNAs targeting matrix or nucleoprotein genes protect mice against lethal influenza virus challenge[J]. *Gene Ther*, 2015, 22(8): 653–662
 - 21 Perez JT, Pham AM, Lorini MH, *et al.* MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(6): 572–576
 - 22 Langlois RA, Albrecht RA, Kimble B, *et al.* MicroRNA-based strategy to mitigate the risk of gain-of-function influenza studies[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 844–847
 - 23 Wichadakul D, Mhuantong W, Jongkaewwattana A, *et al.* A computational tool for the design of live attenuated virus vaccine based on microRNA-mediated gene silencing[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13 Suppl 7: S15
 - 24 Feng C, Tan M, Sun W, *et al.* Attenuation of the influenza virus by microRNA response element in vivo and protective efficacy against 2009 pandemic H1N1 virus in mice[J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 38: 146–152
 - 25 Li J, Arévalo MT, Diaz-Arévalo D, *et al.* Generation of a safe and effective live viral vaccine by virus self-attenuation using species-specific artificial microRNA[J]. *J Control Release*, 2015, 207: 70–76
 - 26 Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, *et al.* miR-122-a key factor and therapeutic target in liver disease[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(2): 448–457
- (收稿日期: 2015-10-13)
(修回日期: 2015-10-13)
-
- (上接第 157 页)
- 20 Frisard MI, Wu Y, McMillan RP. Low levels of lipopolysaccharide modulate mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle[J]. *Metabolism*, 2015, 64(3): 416–427
 - 21 Kesharwani V, Chavali V, Hackfort BT, *et al.* Exercise ameliorates high fat diet induced cardiac dysfunction by increasing interleukin 10[J]. *Front Physiol*, 2015, 22(6): 124:1–7
 - 22 Shang Q, Bai Y, Wang G, *et al.* Delivery of adipose-derived stem cells attenuates adipose tissue inflammation and insulin resistance in obese mice through remodeling macrophage phenotypes[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(17): 2052–2064
 - 23 Cavallera M, Wang J, Frangogiannis NG. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. *Transl Res*, 2014, 164(4): 323–335
 - 24 Glenn DJ, Cardema MC, Ni W, *et al.* Cardiac steatosis potentiates angiotensin II effects in the heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(4): 339–350
- (收稿日期: 2015-07-30)
(修回日期: 2015-10-11)