

modified citrullinated vimentin in early rheumatoid arthritis and very early arthritis[J]. J Rheumatol, 2011, 38(7): 1265-1272.

[13] Damjanovska L, Thabet MM, Levarth EW, et al. Diagnostic value of anti-MCV antibodies in differentiating early inflammatory arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(4): 730-732.

[14] Mansour HE, Metwaly KM, Hassan IA. Antibodies to mutated citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: diagnostic value, association with radiological damage and axial skeleton affection [J]. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord, 2010, 3: 33-42.

[15] Wagner E, Skoumal M, Bayer PM, et al. Antibody against mutated citrullinated vimentin: a new sensitive marker in the diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Int, 2009, 29(11): 1315-1321.

[16] Qin X, Deng Y, Xu J, et al. Meta-analysis: diagnostic value of serum anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in patients with rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Int, 2011, 31(6): 785-794.

[17] Bang H, Egerer K, Gauliard A, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(8): 2503-2511.

[18] Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, et al. Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2007, 34(8): 1658-1663.

[19] Nicaise Roland P, Grootenboer Mignot S, Bruns A, et al. Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(6): R142.

[20] Besada E, Nikolaisen C, Nossent H. Diagnostic value of antibodies against mutated citrullinated vimentin for rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2011, 29(1): 85-88.

[21] Lima I, Oliveira RC, Atta A, et al. Antibodies to citrullinated peptides in tuberculosis[J]. Clin Rheumatol, 2013, 32(5): 685-687.

[22] Luime JJ, Colin EM, Hazes JM, et al. Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis? A systematic review[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(2): 337-344.

[23] Dejaco C, Klotz W, Larcher H, et al. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(4): R119.

[24] Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, et al. Evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies, anti-cyclic citrullinated Peptide antibodies and rheumatoid factor in omani patients with rheumatoid arthritis [J]. Int J Rheumatol, 2012, 2012: 285854.

[25] Maraina CJ, Nurdyayana AL, Rusni D, et al. Diagnostic value of anti-modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis [J]. Int J Rheum Dis, 2010, 13(4): 335-339.

[26] Sghiri R, Bouajina E, Bargaoui D, et al. Value of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis [J]. Rheumatol Int, 2008, 29(1): 59-62.

[27] Keskin G, Inal A, Keskin D, et al. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-modified citrullinated vimentin antibodies in rheumatoid arthritis[J]. Protein Pept Lett, 2008, 15(3): 314-317.

[28] Innala L, Kokkonen H, Eriksson C, et al. Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides[J]. J Rheumatol, 2008, 35(6): 1002-1008.

[29] van der Linden MP, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, et al. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(8): 2232-2241.

[30] Syversen SW, Goll GL, van der Heijde D, et al. Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(2): 345-351.

(收稿日期:2013-09-17)

• 综述 •

长链非编码 RNA 在免疫系统中的研究进展*

杨敏, 杨再兴 综述, 仲人前[△] 审校

(第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

关键词: 长链非编码 RNA; 分子机制; 免疫系统; 免疫性疾病

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.051

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)24-3373-03

新一代高通量测序技术的发展发现基因组中具有编码蛋白质功能的基因仅占全基因组序列的 1.5% 左右^[1], 绝大部分序列被转录成非编码 RNA(ncRNA), 根据片段长度大小分为小非编码 RNA(small ncRNA) 和长链非编码 RNA(lncRNA)。近年对 miRNA 和 siRNA 的研究已取得突破性进展, 而对 lncRNA 的研究才刚起步, 起初认为其不具有生物学功能, 是基

因组转录的“噪音”。但越来越多的研究表明, lncRNA 以 RNA 的形式在表观遗传学、转录及转录后水平调控基因的表达, 广泛参与机体各种生理和病理过程。

1 lncRNA 的结构特征

lncRNA 是一类转录本长度大于 200 nt 的非编码 RNA, 在真核细胞中普遍表达, 大多由 RNA 聚合酶 II 转录形成, 缺

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072479); 卫生部卫生公益性行业科研专项(201202004)。作者简介: 杨敏, 女, 在读硕士, 主要从事自身免疫性疾病发病机制的研究。△ 通讯作者, E-mail: rqzhong@yahoo.com。

乏明显的开放阅读框,无蛋白质编码功能,主要存在于细胞核中,与 mRNA 类似,具有 5'帽状结构和 3'端多聚腺苷酸尾(polyA 尾)^[2],但最近也有研究表明有将近 40% 的 lncRNA 无 polyA 尾^[3]。

目前的研究认为 lncRNA 来源有多种途径,例如,编码基因 mRNA 开放阅读框发生突变或者部分区域结构断裂后形成;染色质重组,如两个非转录基因与另一个独立的基因串联在一起,形成含多个外显子的 lncRNA;局部的复制子重复串联;或者转座成分插入基因中产生有功能的非编码 RNA^[4]。虽来源不一,但其在基因表达的调控过程中发挥的作用相似。根据 lncRNA 在基因组相对于编码基因的位置,通常分为五类:正义 RNA(sense RNA)、反义 RNA(anti-sense RNA)、双向 RNA(bidirectional RNA)、基因间 RNA(intergenic RNA)、基因内 RNA(intronic RNA)。

lncRNA 一级结构保守性较差,经折叠后形成特定的空间结构,与多种分子相互作用。Clark 等^[5]利用 RNA 芯片研究小鼠 Neuro-2a 细胞系发现,尽管 lncRNA 的平均半衰期比 mRNA 短,但各种 lncRNA 降解的时间跨度极广,说明其代谢的复杂性和作用的广泛性。此外,Clark 等^[5]和 Tani 等^[6]还发现基因间 RNA 和反义 RNA 相对于基因内 RNA 更稳定,这或许是由于基因内 RNA 通常需经过多次剪切形成^[5-6]。

2 lncRNA 的作用方式

越来越多的研究表明 lncRNA 在基因表达调控中发挥重要作用,分子水平的研究显示 lncRNA 可能的作用方式如下:(1)与染色质相互作用。在编码基因的上游启动子区转录,介导染色质重构和组蛋白修饰,影响相关基因的表达。(2)与蛋白质相互作用。作为结构组分与蛋白形成核蛋白复合体,如端粒酶 RNA TERC;结合在特定蛋白质上,调节相应蛋白的活性,或者改变蛋白质的胞内定位。(3)与其他 RNA 相互作用。作为小分子 RNA 如 miRNA、piRNA 的前体分子;或与 miRNA 结合抑制其结合至目标 mRNA 发挥作用;与编码基因的 mRNA 形成互补双链,在 Dicer 酶作用下产生内源性 siRNA,或干扰 mRNA 的选择性剪切,形成不同的剪切形式;或者增强其稳定性,防止 mRNA 被 miRNA 降解。

3 lncRNA 的生理学作用

长链非编码 RNA 与许多生理过程紧密相关,例如 X 染色体失活、基因印记、干细胞全能性的维持、细胞的增殖、定向分化,细胞内特定结构(如核旁斑)的形成,染色质修饰重构,mRNA 的剪切、降解,胞内蛋白质的转运等。

3.1 X 染色体失活 X 染色体上存在许多与免疫相关的基因,许多自身免疫性疾病均为女性多发,或许和 X 染色体失活机制的改变有关^[7]。雌性哺乳动物胚胎发育早期,为保证两性之间基因表达水平剂量平衡,其中一条 X 染色体功能失活,Xist lncRNA 在此过程中发挥重要作用^[8]。X 染色体失活中心(X inactivation center, Xic)可转录多种非编码 RNA。在 X 染色体失活过程中,首先在 Xist 基因 5'端转录一条长约 1.6 kb 的非编码 RepA RNA,招募多梳蛋白复合物(polycomb repressive complex 2, PRC2)至 Xist 启动子区,使组蛋白 H3K27 三甲基化,形成异染色质状态,诱导 Xist 转录。随着 Xist 表达不断增多,募集更多的 PRC2 和染色体修饰蛋白,像“外套”一样包裹 X 染色体,最终抑制整条染色体的基因表达。Tian 等^[9]研究发现,重叠反义 lncRNA Tsix 通过顺式作用抑制 Xist 的

表达,而 lncRNA Jpx 则可激活 Xist 的表达。Xist RNA 在失活中心的积聚离不开 hnRNP U 蛋白,干扰或消耗 hnRNP U 蛋白,Xist RNA 会从 Xi 处解离,散布于细胞浆中^[10]。

3.2 lncRNA 与免疫细胞分化 CD4⁺ T 细胞通过分化为不同亚型的效应细胞,如 Th1、Th2、Th17 和调节性 T 细胞(Treg)启动机体适应性免疫应答过程。过去一直认为这些细胞是稳定的终末分化细胞,然而越来越多的研究表明在不同的时间和空间活化 T 细胞可以诱导其向不同的效应细胞分化^[11]。非编码 RNA 在免疫细胞的分化发育过程中发挥重要的调控作用,其中 microRNAs 的作用已被许多实验证实。例如,miR-181 调节 TCR 的敏感性^[12],miR-150 调节转录因子 c-Myb 活性^[13],miR-155 影响 CD4⁺ T 细胞分化为 Th1 和 Treg 细胞以及炎症组织中各种类型 T 细胞的聚集^[14-16]。

研究表明 lncRNA 在免疫系统中同样发挥重要作用。芯片分析小鼠脾脏初始 T 细胞和记忆 CD8⁺ T 细胞 lncRNA 表达谱发现有 96 种 lncRNA 只在特定组织或细胞中表达,其中 29 种只在 CD8⁺ T 细胞中表达,81 种在效应细胞活化过程中表达发生变化^[17],这表明 lncRNA 在细胞分化和活化过程中发挥枢纽作用。例如,LncRNA Tmevpg1 在外周血 NK 细胞、T 细胞中都有表达,当受到 IFN-γ 刺激活化时表达下调^[18]。在 IgH 远端可变区转录形成的 lncRNA 可影响原 B 细胞在该位点的三维空间结构,从而影响细胞分化。类似的作用也可见于 T 细胞前体 VDJ 重排过程^[19]。

4 lncRNA 与自身免疫性疾病

目前对 lncRNA 的研究主要集中在肿瘤领域,尽管其作用靶点或机制尚不完全清楚,但已经发现许多肿瘤中 lncRNA 的表达谱或其基因序列存在异常;有些 lncRNA 在肿瘤中明显上调,而有些明显下调,发挥着类似癌基因和抑癌基因的作用。现有的证据表明 lncRNA 的表达异常、相应位置的 SNP 或碱基的突变或许与自身免疫性疾病的发生发展高度相关。

最初在小鼠模型中的数据显示 lncRNA GAS5 与 SLE 的易感性有关,GAS5 启动子区 Sp1 蛋白结合位点的缺失,导致 GAS5 表达下调,抑制细胞进入凋亡途径,自身抗原暴露,从而引起自身抗体的产生。此外,遗传学研究也表明人类 SLE 的发生与 GAS5 在染色体 1q25 位点具有一定的关系^[20]。

另外一项研究表明染色体 14q32.2 父源印记基因 DLK1/MEG3 的 SNP 位点 rs941576 与 I 型糖尿病高度相关,而该位点母亲来源的基因突变未呈现出相关性^[21]。研究人员还发现染色体 19p13.2 的 TYK2 基因位点 rs2304256 突变也与该病有关,而这一位点之前被证明与 SLE 和多发性硬化症的发生有关^[22]。Tyk2 基因特定位点的突变,影响了 Tyk2 分子的活动,进而影响 Jak 家族分子所参与的信号转导过程,导致多种细胞激素分泌异常,影响人类正常的免疫反应。

Christensen 等^[23-24]研究 Graves' 病患者外周血单个核细胞中 foxp3 的表达时发现一个 lncRNA Heg,其基因位于 1 号染色体,与 Nucks 基因部分重叠,由 Nucks 基因反义链转录而成,无 polyA 结构。研究发现在未治疗的疾病组中 Heg RNA 的浓度和 TSH 受体抗体(TRAb)的浓度呈负相关。而在正常对照组及经过治疗的疾病组中发现,Heg RNA 浓度与 CD14 mRNA 的浓度呈负相关,而与 TRAb 无明显关系。通过进一步的转染实验推测 Heg RNA 可能通过活化 TLR7 和 IFN-γ 降低 CD14 mRNA 的表达,导致 IL-12 的生成减少,单核树突

状细胞信号转导受抑制,自身抗体产生减少。该研究还发现经过药物治疗的患者其 CDK1 mRNA 表达明显下调,而 Heg RNA 无明显变化,这说明患者 TRAb 浓度的下降或许和 CDK1 基因的表达下调有关。Heg 和 CDK1 调节 TRAb 浓度变化的具体机制,以及 Heg 是否还在其他自身免疫病中发挥同样的抑制自身抗体产生的作用,还有待证实。

5 展望

疾病的发生往往是细胞内多个分子环节作用失调的结果,目前研究显示许多疾病与 lncRNA 表达异常有关,特别是肿瘤,许多 lncRNA 与肿瘤的增殖、转移、侵袭等作用有关,并可作为肿瘤临床分期、预后、复发的独立预测因子。美国 FDA 已批准将尿液中 PCA3 含量作为前列腺癌的辅助诊断指标^[25],尽管其具体的作用机制尚不完全清楚。而这也是首个作为标志物应用于临床诊断的 lncRNA。然而导致 lncRNA 表达异常的始动因素是什么? lncRNA 是如何与其他分子相互作用? 影响细胞信号转导的哪些环节? 能否成为疾病早期诊断的分子标志物? 能否预测疾病的进展和治疗效果? 能否成为新的治疗靶点? 这些都有待进一步的研究证实。

随着芯片技术的发展,大规模 lncRNA cDNA 文库的建立,新一代高通量测序技术的广泛应用以及生物信息学的蓬勃发展,将筛选出大量的 lncRNAs,然后通过转染过表达或干扰抑制表达的方法研究其调控机制及功能。这势必为疾病的预防、诊断和靶向治疗提供新的思路和方向,为广大医生和患者带来福音。

参考文献

- [1] Mattick JS. The genetic signatures of noncoding RNAs[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(4): e1000459.
- [2] Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription[J]. *Science*, 2007, 316(5830): 1484-1488.
- [3] Lee C, Kikyo N. Strategies to identify long noncoding RNAs involved in gene regulation[J]. *Cell Biosci*, 2012, 2(1): 37.
- [4] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.
- [5] Clark MB, Johnston RL, Inostroza-Ponta M, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability[J]. *Genome Res*, 2012, 22(5): 885-898.
- [6] Tani H, Mizutani R, Salam KA, et al. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals[J]. *Genome Res*, 2012, 22(5): 947-956.
- [7] Bianchi I, Lleo A, Gershwin ME, et al. The X chromosome and immune associated genes[J]. *J Autoimmun*, 2012, 38(2/3): 187-192.
- [8] Pontier DB, Gribnau J. Xist regulation and function explored[J]. *Hum Genet*, 2011, 130(2): 223-236.
- [9] Tian D, Sun S, Lee JT. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation[J]. *Cell*, 2010, 143(3): 390-403.
- [10] Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, et al. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA [J]. *Dev Cell*, 2010, 19(3): 469-476.
- [11] Pagani M, Rossetti G, Panzeri I, et al. Role of microRNAs and long-non-coding RNAs in CD4(+) T-cell differentiation[J]. *Immunol Rev*, 2013, 253(1): 82-96.
- [12] Li QJ, Chau J, Ebert PJ, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection[J]. *Cell*, 2007, 129(1): 147-161.
- [13] Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb[J]. *Cell*, 2007, 131(1): 146-159.
- [14] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 608-611.
- [15] Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 604-608.
- [16] O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development[J]. *Immunity*, 2010, 33(4): 607-619.
- [17] Pang KC, Dinger ME, Mercer TR, et al. Genome-wide identification of long noncoding RNAs in CD8⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2009, 182(12): 7738-7748.
- [18] Collier SP, Collins PL, Williams CL, et al. Cutting edge: influence of Tmevpg1, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of Ifng by Th1 cells[J]. *J Immunol*, 2012, 189(5): 2084-2088.
- [19] Lutz J, Heideman MR, Roth E, et al. Pro-B cells sense productive immunoglobulin heavy chain rearrangement irrespective of polypeptide production[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(26): 10644-10649.
- [20] Haywood ME, Rose SJ, Horswell S, et al. Overlapping BXSB congenic intervals, in combination with microarray gene expression, reveal novel lupus candidate genes[J]. *Genes Immun*, 2006, 7(3): 250-263.
- [21] Wallace C, Smyth DJ, Maisuria-Armer M, et al. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(1): 68-71.
- [22] Suarez-Gestal M, Calaza M, Endreffy E, et al. Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case-control study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(3): R69.
- [23] Christensen NJ, Habekost G, Bratholm P. A RNA transcript (Heg) in mononuclear cells is negatively correlated with CD14 mRNA and TSH receptor autoantibodies[J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154(2): 209-215.
- [24] Christensen NJ, Habekost G, Bratholm P. Decrease in TSH receptor autoantibodies during antithyroid treatment: relationship with a long noncoding heg RNA and Cdk1 mRNA in mononuclear cells [J]. *ISRN Endocrinol*, 2011, 2011: 287052.
- [25] Durand X, Moutereau S, Xylinas E, et al. Progensa PCA3 test for prostate cancer[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2011, 11(2): 137-144.

(收稿日期:2013-09-10)