

分枝杆菌感染巨噬细胞中 miRNA 表达谱及其功能

贾平平^{1*}, 张义², 彭世泽², 赵倩倩¹, 武笑笑¹, 沈方琪¹, 孙凯¹, 岑山^{2*}

(1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 结核分枝杆菌与宿主细胞的相互作用及对宿主的某些信号通路调节与其在巨噬细胞内保持潜伏有关。microRNAs (miRNAs) 可以调控基因表达, 调节机体的许多生物功能, 在细菌感染中发挥调节作用。但是, 宿主的 miRNA 是否也参与结核分枝杆菌感染尚未深入研究。本研究将致病性结核分枝杆菌 H37Rv 和低毒株 H37Ra 感染巨噬细胞, 通过鉴定感染后宿主细胞中 miRNA 的表达谱, 发现在强致病性 H37Rv 株 (Rv)、H37Rv 灭活株 (Rv-) 和低致病 H37Ra (Ra) 株分别感染人巨噬细胞 THP-1 中有 17 种 miRNA 的表达水平发生显著性变化 ($P < 0.05$), 表明宿主 miRNA 可能参与结核分枝杆菌-宿主的相互作用。同时, 发现了 10 种 miRNA 在致病性和非致病性结核分枝杆菌感染的细胞中存在显著差异, 提示宿主 miRNA 可能在结核分枝杆菌的致病性和细胞内生存中发挥重要作用。进一步研究发现, miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 在海分枝杆菌感染的细胞中下调, 过表达这 3 种 miRNA 后的细胞对海分枝杆菌的生长具有明显抑制作用, 表明 miRNA 在宿主与分枝杆菌的相互作用中发挥重要作用。本研究为结核分枝杆菌致病性机制及治疗结核病方法提供新思路。

关键词: 结核分枝杆菌; 感染宿主; miRNA; 胞内生存; 调控

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)06-1674-06

Expression profile and function of miRNAs in macrophages infected with *Mycobacterium*

JIA Ping-ping^{1*}, ZHANG Yi², PENG Shi-ze², ZHAO Qian-qian¹, WU Xiao-xiao¹, SHEN Fang-qi¹, SUN Kai¹, CEN Shan^{2*}

(1. Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and host, as well as the regulation of some signaling pathways in the host, were involved in pathogen latency in macrophages. microRNAs (miRNAs) regulate the gene expression and biological functions, indicating that miRNAs played a regulatory role in bacterial infections. However, whether the host's miRNAs were also involved in the process of *Mycobacterium tuberculosis* infection had not been thoroughly studied. This study infected macrophages with pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv and low virulence strain H37Ra to explore the functional miRNAs. By identifying the expression profile of miRNAs in host cells after infection, the expression of 17 miRNAs significantly changed ($P < 0.05$) in the human macrophage THP-1 infected with highly pathogenic H37Rv strain (Rv), H37Rv inactivated strain (Rv-), and non-pathogenic H37Ra (Ra) strains respectively, indicating that host miRNAs may be involved in the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and host. Meanwhile, 10 types of miRNAs showed significant

收稿日期: 2024-03-27; 修回日期: 2024-04-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82273940); 国家重点研发计划项目 (2022YFC2010100, 2022YFC2010101).

*通讯作者 Tel: 86-10-63926536, E-mail: pingpingj@ccmu.edu.cn;

Tel: 86-10-63037279, E-mail: shancen@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0278

differences in cells infected with pathogenic and non-pathogenic *Mycobacterium tuberculosis*, suggesting that host miRNAs may play an important role in the pathogenicity and intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*. Further study had found that miR-449a, miR-502-5p, and miR-708 were downregulated in cells infected with *Mycobacterium marinum*. Overexpression of these three miRNAs displayed the significant inhibitory effect on the growth of *Mycobacterium marinum*, indicating that miRNAs played a pivotal role in the interaction between the host and *Mycobacterium marinum*. This study provided the new insights into the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* and the treatment of tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; infecting host; miRNA; intracellular survival; regulation

由结核分枝杆菌感染引起的结核病是传播较广、死亡率较高的传染病之一。人体感染结核菌后,巨噬细胞作为免疫清除的主要效应细胞,会通过一些机制来杀灭或抑制结核分枝杆菌,参与机体的免疫保护。如结核分枝杆菌通过胞吞作用进入巨噬细胞内,形成吞噬体-溶酶体复合物;通过自身凋亡杀死巨噬细胞内的结核分枝杆菌;产生多种细胞因子如白介素-1、白介素-6、白介素-10、肿瘤坏死因子- α 、干扰素- γ 等参与并调节免疫过程,发挥其抗结核分枝杆菌作用^[1]。尽管大多数结核分枝杆菌病原体能够被巨噬细胞通过以上机制有效清除,但仍有部分结核菌能够在胞内长期存活,处于一种潜伏感染 (latent tuberculosis infection) 状态,即宿主感染结核菌后尚未发病的一种特殊状态^[2],任何造成机体免疫力下降的因素都可以使潜伏期结核菌恢复生长繁殖活力,导致活动性结核的发生。

结核菌之所以能够在巨噬细胞内保持这种潜伏状态,与其和宿主细胞的相互作用,对宿主某些信号通路的调节密不可分。它通过抑制吞噬体与溶酶体融合,分泌宿主样信号分子干扰宿主信号转导,利用宿主细胞中某些分子帮助自身躲避巨噬细胞的免疫清除^[1]等多种方式来逃避巨噬细胞的杀灭。结核分枝杆菌感染宿主细胞后,会引起巨噬细胞内环境的改变。将强致病性结核分枝杆菌和弱毒株分别感染巨噬细胞,强毒株所感染的巨噬细胞凋亡率明显低于弱毒株^[3,4]。这一方面是由于强致病性结核分枝杆菌感染巨噬细胞后,通过改变细胞内环境,抑制促凋亡物质释放,使细胞凋亡受到抑制;另一方面,它可以抑制一些蛋白的磷酸化来下调 caspases 3 活性,从而抑制细胞凋亡^[5,6]。此外,结核分枝杆菌感染巨噬细胞后,还可以通过改变细胞内一些代谢通路来创造适合其生存的环境,抑制细胞凋亡。

随着研究的深入, RNA 干扰技术被逐步应用到结核分枝杆菌致病性的研究中。如通过对宿主基因组 siRNA 筛选的方法,鉴定对结核分枝杆菌感染有调节作用的宿主因子,推测结核杆菌主要通过通过对宿主因子的调控防止宿主细胞自噬^[7];利用针对鼠巨噬细胞所

有已知激酶和磷酸酶的 siRNA,筛选出多种与结核分枝杆菌生存密切相关的宿主因子^[8]。尽管大量的研究表明结核分枝杆菌在宿主细胞内的生存并产生致病性需要调节宿主蛋白的表达,但其具体机制并不清楚。

microRNAs (miRNAs) 是一种内源性大小约为 21~23 个碱基的单链非编码小分子 RNA,由具有发夹结构约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体 (pri-miRNA) 组成,在核内由核糖核酸酶 Drosha 加工处理成为前体 miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA) 后,被核输出蛋白 exportin 5 转运入胞质,经过 Dicer 酶加工后成为 miRNA,与 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合,并与靶标 mRNA 的 3'非编码区互补结合,降解 mRNA,或者通过改变靶 mRNA 上核糖密度或特异性降解新合成的多肽来抑制 mRNA 翻译^[9]。

研究表明, miRNAs 可以参与基因表达调控,进而调节机体许多生物功能。由于 miRNA 序列、结构、丰度和表达方式的多样性,其可能作为蛋白质编码 mRNA 的强有力调节因子,进而影响细胞内有生物学功能的蛋白质表达,从而实现对细胞生长、增殖、分化和凋亡等生命过程调控^[10],因此对 miRNAs 功能研究一直是热点问题。

研究发现,宿主 miRNA 也参与到病原体感染过程,如与丙型肝炎病毒相关的 miR122 参与肝脂代谢,并发挥调控功能^[11]; miR-200b 和 miR-429 调控 Epstein-Barr virus 的潜伏及溶解复制^[12];受 HIV 病毒 Vpr 调节的 miR-34a/b^[13],抑制 HIV 病毒 Nef 蛋白表达和长末端重复转录,从而抑制 Nef 功能的 miR-N367^[14];鼠伤寒沙门氏菌感染后, miR-21、miR-146 和 miR-155 对宿主巨噬细胞内环境的调节表明,在细菌感染过程中, LPS 和 NF- κ B 的作用与 miRNA 调节是密不可分的^[15]。

上述研究表明, miRNA 无论是在病毒还是在细菌感染中均发挥调节作用,但是,宿主 miRNA 是否也参与结核分枝杆菌感染过程尚未深入研究。因此,本研究将致病性结核分枝杆菌 H37Rv 和低毒株 H37Ra 感染巨噬细胞,通过鉴定感染后宿主细胞的 miRNA 表达

谱,找出在结核分枝杆菌的潜伏感染和滞留过程中发挥重要调节作用的miRNA,并对其进行功能验证,为结核分枝杆菌致病性机制及结核病治疗提供新思路。

材料与方法

菌株及试剂 结核分枝杆菌 H37Rv 及结核分枝杆菌 H37Ra 由北京市结核病胸部肿瘤研究所惠赠; 7H9 液体培养基 (用于分枝杆菌的培养) 购自 BD 公司; mirVana™ miRNA isolation kit、nuclease-free water 购自 Ambion 公司; miScript reverse transcription kit、miScript SYBR green PCR kit 购自 QIAGEN 公司; 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 购自 Sigma-Adrich 公司, 配成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 贮存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

THP-1 细胞培养及结核分枝杆菌感染 将 2×10^5 个 THP-1 细胞接种于 6 孔板, 加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 给予 $40\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMA 刺激 24 h, 促进悬浮 THP-1 的成熟分化和贴壁。弃培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 以去除未贴壁细胞。将结核分枝杆菌 H37Rv、H37Ra 株及 H37Rv 灭活株超声分散后, 使用含 0.05% Tween-80 的灭菌 PBS 洗涤 2 次, 离心弃上清, 用无抗生素的 PMI1640 重悬, 将菌浓度调至 $10^7\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按细菌与细胞个数 (MOI) 比约 10:1, 分别将上述 3 种菌株加入到 THP-1 细胞中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h, 弃去培养基, PBS 洗涤 3 次, 加入含 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 庆大霉素培养基作用 2 h, 以除去未感染的菌, 弃上清, PBS 洗涤 3 次, 此时作为感染的初始时间。感染 24 h 后, 收集 6 孔板中细胞。

THP-1 细胞中总 RNA 提取 将上述收集到的 THP-1 细胞, 使用 mirVana™ miRNA isolation kit 进行总 RNA 提取, 具体提取步骤见试剂盒说明书。将提取到的 RNA 进行浓度测定后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。基于 real-time PCR 原理, 在 384 孔板上对 Sanger 数据库中人的所有 miRNA 进行精确定量。实验流程: 组织或细胞样品的 RNA 提取→RNA 荧光标记→芯片杂交/洗涤→图像采集→荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法→结果验证。

qRT-PCR 对 microRNA 在宿主细胞表达验证 用 qRT-PCR 检测感染分枝杆菌的 THP-1 细胞中 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 相对表达水平。miRNA 与 mRNA 不同, 在它的末端不包含 polyA。因此, 在反转录进行过程中, 首先要将其末端加上 polyA, 然后使用 oligo-dT 引物和随机引物进行逆转录。随后以通用引物和特异引物分别为上下游引物进行 qRT-PCR 扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对目的基因相对表达水平进行计算。

过表达 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 细胞系构建 设计带有 EcoRI 和 BamHI 酶切位点的引物扩

增 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 的片段, 切胶回收后连入经双酶切 (EcoRI 和 BamHI) 的 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopRFP 载体。转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆并进行测序。测序正确代表 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopRFP-miR-449a、pCDH-CMV-MCS-EF1-CopRFP-miR-502-5p、pCDH-CMV-MCS-EF1-CopRFP-miR-708 的质粒构建成功。以上含有正确质粒的大肠杆菌经扩大培养后用质粒抽提试剂盒抽提质粒, 用于细胞转染。提取的质粒用核酸测定仪测定浓度, 并进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定质粒大小、完整性和有无 RNA, 质粒 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将构建成功的质粒使用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂 ($10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 递送至 THP-1 细胞, 转染后 48 h, 准备细胞用于分析。

海分枝杆菌感染巨噬细胞 按感染复数为 2 的比例, 使海分枝杆菌感染 THP-1-miR-449a、THP-1-miR-502-5p 和 THP-1-miR-708 细胞, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度、5% CO_2 条件下感染 3 h, 将 24 孔板中的一孔细胞用胰酶消化后, 取细胞悬液制成细胞涂片, 用预冷的甲醇-醋酸 (3:1) 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min, 做抗酸染色。显微镜下观察到细胞内有抗酸染色阳性的海分枝杆菌后, 吸出原有细胞培养液, 用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次, 更换含有 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 庆大霉素的新鲜培养液, 以除去未被吞噬的海分枝杆菌, 无菌 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 1 mL 含不同药物浓度的 DMEM 完全培养基, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

统计学处理 采用 SPSS26.0 软件分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 对于独立样本的均值, 两组间比较采用 student's *t* test 检验, $P < 0.05$ 表示在统计学上具有意义。

结果

1 结核分枝杆菌感染巨噬细胞中 miRNAs 的表达差异

为了研究宿主 miRNAs 在结核分枝杆菌与宿主巨噬细胞相互作用中是否发挥作用, 以及结核杆菌致病性、细胞内滞留、免疫逃避过程是否与 miRNAs 调节作用有关, 本研究将强致病 H37Rv 株 (Rv)、H37Rv 灭活株 (Rv-) 和低致病 H37Ra (Ra) 株分别感染人巨噬细胞 THP-1, 然后利用 miRNA 芯片技术, 研究被感染巨噬细胞中 754 条人源的 microRNAs 的表达谱。通过将整个 miRNAs 表达谱以 THP-1 为对照进行统计学分析, 选取变化趋势差异 2 倍以上 ($P < 0.05$) 的 microRNA 分子作为候选分子, 找到强毒株 H37Rv 株 (Rv)、H37Rv 灭活株 (Rv-) 和弱毒株 37Ra (Ra) 感染 THP-1 后, Ra 变化的 miRNA 5 条 (hsa-miR-143、hsa-miR-224、hsa-miR580、hsa-miR590-3p、hsa-miR-99b), Rv- 表达变化的 4 条

(hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-576-3p、hsa-miR-582-5p、hsa-let-7e#), Rv 变化的 3 条 (hsa-miR-519-3p、hsa-miR-576-3p、hsa-miR-582-5p)。在这 3 株中都同时发生变化的 miRNA 只有 1 条 (hsa-miR-146), Rv 与 Ra 共同变化的 3 条 (hsa-miR-151-5p、hsa-miR-196-1*、hsa-miR-776), Rv 与 Rv-共同变化的 1 条 (hsa-miR-213), 未找到 Rv-与 Ra 均变化的 miRNA (表 1)。以 THP-1 为对照, miRNA 的表达差异提示宿主 miRNA 参与了病原 (结核分枝杆菌) 与宿主的相互作用。

Table 1 Differential miRNA in THP-1 cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* [pathogenic strain H37Ra (Ra), non-pathogenic strain H37Rv (Rv) and inactivated H37Rv (Rv-)]. (+) represents changed miRNA; (-) represents non-changed miRNA

miRNA name	Rv	Ra	Rv-
hsa-miR-519-3p	+	-	-
hsa-miR-576-3p	+	-	-
hsa-miR-582-5p	+	-	-
hsa-miR-143	-	+	-
hsa-miR-224	-	+	-
hsa-miR-580	-	+	-
hsa-miR-590-3p	-	+	-
hsa-miR-99b	-	+	-
hsa-miR-519b-3p	-	-	+
hsa-miR-576-3p	-	-	+
hsa-miR-582-5p	-	-	+
hsa-let-7e#	-	-	+
hsa-miR-151-5p	+	+	-
hsa-miR-196-1*	+	+	-
hsa-miR-213	+	-	+
hsa-miR-766	+	+	-
hsa-miR-146	+	+	+

2 基因芯片 miRNAs 筛选结果与 qRT-PCR 结果表达趋势相关性验证

既然 miRNAs 可能会参与结核分枝杆菌与宿主的相互作用, 本研究又进一步对 miRNAs 在致病性和非致病性结核分枝杆菌感染的细胞中表达情况进行分析, 结果发现, 致病性和非致病性结核分枝杆菌感染细胞中 miRNA 表达存在显著差异, 提示宿主 miRNA 可能在结核分枝杆菌的致病性和细胞内生存中发挥重要作用。为了对芯片结果的可靠性进行验证, 本研究选取相对非致病性的结核分枝杆菌 Ra 而言, 致病性结核分枝杆菌 Rv 表达差异大于 2 倍的 miRNAs, 进行 qRT-PCR (图 1), 以排除芯片分析的假阳性结果。结果显示, 无论是用 miRNAs 芯片筛选还是 qRT-PCR 的方法验证, has-miR-449a、has-miR-502-5p 和 has-miR-708 表达量都一致下调。因此, 本研究选取 has-miR-449a、has-miR-502-5p 和 has-miR-708 进行后续研究。

3 下调的 miRNAs 在巨噬细胞中的稳定过表达

为了探究 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 的功

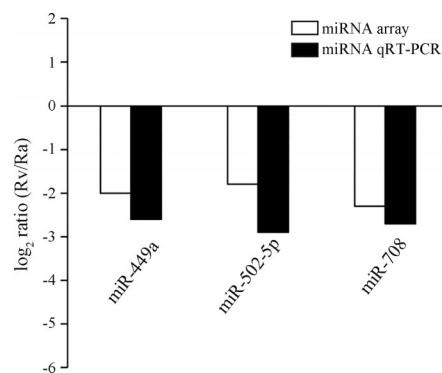


Figure 1 Correlation between microarray analysis and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) results

能, 将 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 转染 THP-1 细胞以达到过表达目的。结果显示, 转染 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 后, 3 种 miRNA 在细胞中显著上调, 其中 miR-449a 的表达水平最高, miR-502-5p 表达水平最低 (图 2)。最终得到 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 过表达 THP-1 细胞系。

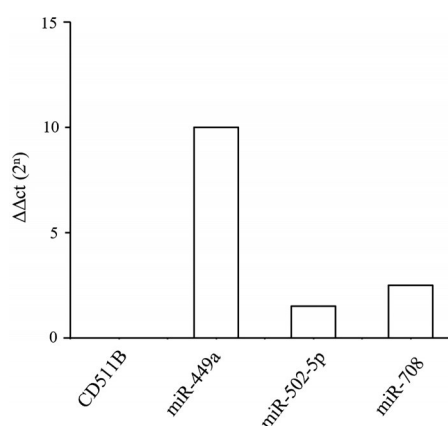


Figure 2 Stable overexpression of miRNAs in THP-1

4 过表达 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 抑制海分枝杆菌细胞内存活

结核病产生耐药或者难以治疗的原因是因为结核杆菌在细胞内长期存活, 在机体免疫力下降的情况下, 潜伏感染菌转化成活性致病菌。本研究在稳定表达 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 的 THP-1 细胞中感染海分枝杆菌 927, 对海分枝杆菌 927 在细胞中存活情况分析发现, 稳定表达 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 的 THP-1 中海分枝杆菌 927 存活显著被抑制 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 其中, 稳定表达 miR-708 的 THP-1 中海分枝杆菌 927 存活被抑制最明显 (图 3A)。为进一步验证上述结果的可靠性, 本研究用海分枝杆菌 M 株同样感染稳定过表达 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 的细胞, 与海分枝杆菌 927 感染细胞的结果相同, 稳定

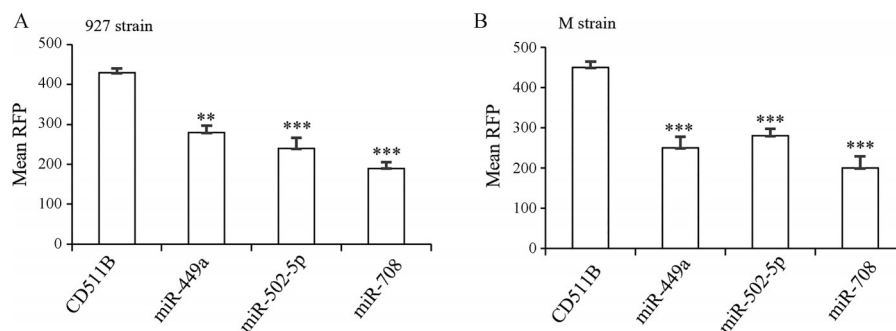


Figure 3 The growth of *Mycobacterium marinum* in miRNAs overexpressed THP-1. A: *Mycobacterium marinum* 927 strain; B: *Mycobacterium marinum* M strain. The ratio was calculated. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the CD511B control group

表达 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 的 THP-1 中海分枝杆菌 M 株存活也明显减少 ($P < 0.001$, 图 3B), 这些结果表明, miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 在海分枝杆菌 927 和 M 株感染过程中影响分枝杆菌在巨噬细胞内的存活, miRNAs 参与了宿主与分枝杆菌的相互作用过程。

讨论

miRNA 参与基因表达调控, 进而调节机体许多生物学功能。在结核分枝杆菌感染的过程中, 宿主 miRNA 是否参与病原感染与机体防御这一病原宿主相互作用, 目前尚不清楚。本研究利用 miRNA 芯片技术, 发现在强致病性 H37Rv 株 (Rv)、H37Rv 灭活株 (Rv-) 和低致病 H37Ra (Ra) 株分别感染人巨噬细胞 THP-1 后, 17 种 miRNA 的表达水平发生显著性变化 ($P < 0.05$), 这一结果表明宿主 miRNA 参与了病原 (结核分枝杆菌) 宿主的相互作用, 即病原的感染机制和机体的保护机制。同时, 本研究还发现 10 种 miRNA 在致病性和非致病性结核分枝杆菌感染细胞中存在显著差异, 提示宿主 miRNA 还可能在结核分枝杆菌致病性和细胞内生存中发挥重要作用, 病原可能通过调节宿主 miRNA, 实现对细胞生长、增殖、分化和凋亡等生命过程调控, 使结核分枝杆菌在宿主细胞中逃避巨噬细胞清除、潜伏、滞留, 发挥致病性。

初步分析上述结果发现, miR-146a 在 3 种病原菌感染的情况下都明显下调, 表明 miR-146a 的改变与结核分枝杆菌的生长无关, 而与结核杆菌菌体成分相关。值得关注的是, 通过对结核病患者和健康人群的研究中发现, miR-146a 前体的多态性与结核病的易感相关, 这进一步提示 miR-146a 在结核感染过程中可能发挥重要功能^[16]。

已有研究表明, miR-146a 在适应性免疫和天然免疫中都起着重要作用。通过对 T 细胞中 miRNAs 表达研究分析发现, 在鼠 Th1 和 Th2 细胞中只有少数

miRNA 表达不同, 而 miR-146a 在这两种细胞中表达存在着显著差异^[17]。进一步对人 T 细胞研究发现, miR-146a 在天然 T 淋巴细胞中表达量很少, 但是在记忆性 T 淋巴细胞中却丰富表达, 并且它的上调依赖于 NF- κ B 诱导和 T 细胞抗原受体 (TCR) 刺激^[18,19]。巨噬细胞对于感染产生炎症反应与一些 miRNA 上调有关, 如 miR-155、miR-146、miR-147、miR-21 和 miR-9^[20-23]。在 NF- κ B 途径中, LPS 刺激会引起 miR-146a 表达, 以及靶向作用于 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 和 IL-1 受体相关激酶-1 (IRAK1), 它们通过负性调节机制在细胞信号转导中发挥着重要作用^[18]。此外, miR-146a 不但与单核细胞内毒素耐受有关, 并且参与 TNF- α 产生调节和功能发挥^[24]。miR-146a 除了与适应性免疫和天然免疫有关, 还与病毒感染和肿瘤发生时在巨噬细胞中调节作用有关。研究表明, 疱疹性病毒 (VSV) 感染, 会上调 miR-146a 表达, 通过下调 TRAF6、IRAK1 和 IRAK2 抑制 I 型干扰素产生, 从而刺激 VSV 在巨噬细胞中复制^[25]。当在乳腺癌细胞中过表达 miR-146a 后, 会引起 IRAK1 和 TRAF6 表达减少, 进而使 NF- κ B 活性降低。另外, 在宫颈癌细胞中也发现 miR-146a 表达增加^[26]。尽管, miR-146a 与细胞增殖相关具体机制还不是很清楚, 但是其表达变化与癌症发生是密切相关的。

已有研究表明, miR-449a 低表达水平与晚期肿瘤分期、转移相关^[27]。乳腺癌中 miR-708 在淋巴结转移和远端转移表达减少, 表明 miR-708 与肿瘤转移有关^[28]。本研究发现, miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 在海分枝杆菌感染细胞中下调, 过表达这 3 种 miRNA 后, 细胞对海分枝杆菌生长具有明显抑制作用, 表明 miR-449a、miR-502-5p 和 miR-708 在宿主与分枝杆菌相互作用中发挥重要作用。本研究通过对结核分枝杆菌致病性相关的宿主内 miRNA 分子的分析, 研究宿主与病原相互作用, 为研究结核分枝杆菌致病性机制并为基因治疗结核病及抗结核药物研发提供新思路。

作者贡献: 贾小平负责实验研究、文章撰写与修改; 张义、彭世泽负责实验研究; 赵倩倩、武笑笑、沈方琪、孙凯负责实验指导与文章修改; 岑山负责实验方案设计、实验指导、文章撰写、修改与审核。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突。

References

- [1] Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3: 399-407.
- [2] Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Trends Microbiol*, 1998, 6: 107-112.
- [3] Spira A, Carroll JD, Liu G, et al. Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated *Mycobacterium tuberculosis*: a pivotal role for tumor necrosis factor [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29: 545-551.
- [4] Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 164: 2016-2020.
- [5] Behar SM, Martin CJ, Nunes-Alves C, et al. Lipids, apoptosis, and cross-presentation: links in the chain of host defense against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microbes Infect*, 2011, 13: 749-756.
- [6] Adekambi T, Ibegbu CC, Cagle S, et al. High frequencies of caspase-3 expressing *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ T cells are associated with active tuberculosis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1481.
- [7] Behr M, Schurr E, Gros P. TB: screening for responses to a vile visitor [J]. *Cell*, 2010, 140: 615-618.
- [8] Jayaswal S, Kamal MA, Dua R, et al. Identification of host-dependent survival factors for intracellular *Mycobacterium tuberculosis* through an siRNA screen [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000839.
- [9] Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 5451-5465.
- [10] Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 6249.
- [11] Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting [J]. *Cell Metab*, 2006, 3: 87-98.
- [12] Ellis-Connell AL, Iempridee T, Xu I, et al. Cellular microRNAs 200b and 429 regulate the Epstein-Barr virus switch between latency and lytic replication [J]. *J Virol*, 2010, 84: 10329-10343.
- [13] Mukerjee R, Chang JR, Del Valle L, et al. Dereglulation of microRNAs by HIV-1 Vpr protein leads to the development of neurocognitive disorders [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 34976-34985.
- [14] Omoto S, Fujii YR. Cloning and detection of HIV-1-encoded microRNA [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 342: 255-265.
- [15] Schulte LN, Eulalio A, Mollenkopf HJ, et al. Analysis of the host microRNA response to *Salmonella* uncovers the control of major cytokines by the let-7 family [J]. *EMBO J*, 2011, 30: 1977-1989.
- [16] Li D, Wang T, Song X, et al. Genetic study of two single nucleotide polymorphisms within corresponding microRNAs and susceptibility to tuberculosis in a Chinese Tibetan and Han population [J]. *Hum Immunol*, 2011, 72: 598-602.
- [17] Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, et al. microRNA profiling of the murine hematopoietic system [J]. *Genome Biol*, 2005, 6: R71.
- [18] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 12481-12486.
- [19] Curtale G, Citarella F, Carissimi C, et al. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes [J]. *Blood*, 2010, 115: 265-273.
- [20] Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 5282-5287.
- [21] Liu G, Friggeri A, Yang Y, et al. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 15819-15824.
- [22] Abdalla AE, Alanazi A, Abosalif KOA, et al. microRNA-155, a double-blade sword regulator of innate tuberculosis immunity [J]. *Microb Pathog*, 2023, 185: 106438.
- [23] Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, et al. Negative regulation of TLR4 *via* targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21 [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 141-147.
- [24] Stafa K, Rella A, Eagle W, et al. miR-146a is a critical target associated with multiple biological pathways of skin aging [J]. *Front Physiol*, 2024, 15: 1291344.
- [25] Hou J, Wang P, Lin L, et al. microRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2 [J]. *J Immunol*, 2009, 183: 2150-2158.
- [26] Wang X, Tang S, Le SY, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth [J]. *PLoS One*, 2008, 3: e2557.
- [27] Chen J, Zhou J, Chen X, et al. miRNA-449a is downregulated in osteosarcoma and promotes cell apoptosis by targeting BCL2 [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 8221-8229.
- [28] Ryu S, McDonnell K, Choi H, et al. Suppression of miRNA-708 by polycomb group promotes metastases by calcium-induced cell migration [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23: 63-76.