

炎症反应中的 microRNAs 及其在 TLR 信号通路中的调控作用

方 静,杜 丽,付 辉,李菲菲,韩立坤,毛建平*

军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850

[摘要] MicroRNAs(miRNAs)在炎症反应中发挥重要的调节作用,其作用机制及调节特点在免疫系统中具有独特性。近年大量研究发现,miRNA 能与 Toll 样受体/核因子 κ B(TLR/NF- κ B)信号通路中众多靶基因 mRNA 结合,在免疫识别和炎症反应中发挥调控作用。本文就 miRNA 在炎症反应中的特点,特别是 miRNA 对 TLR/NF- κ B 信号通路的调控作用进行了综述。

[关键词] 微 RNAs;炎症;Toll 样受体;NF- κ B

[中图分类号] R 392.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)07-0782-05

MicroRNAs in inflammatory response and their regulatory roles in TLR signaling pathway

FANG Jing, DU Li, FU Hui, LI Fei-fei, HAN Li-kun, MAO Jian-ping*

Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

[Abstract] MicroRNAs (miRNAs) play important roles in regulating inflammatory responses, and the related mechanism and regulation characteristics are unique in immune system. In recent years, a large number of studies have showed that miRNAs can target mRNAs of many target genes in Toll-like receptor/nuclear factor- κ B (TLR/NF- κ B) signaling pathway, and play regulatory roles in immune recognition and inflammatory responses. In this paper we reviewed the characteristics of miRNA in inflammatory reactions, with special attention on the regulatory roles in TLR/NF- κ B signaling pathway.

[Key words] microRNAs; inflammation; Toll-like receptors; NF- κ B

[Acad J Sec Mil Med Univ,2013,34(7):782-786]

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类具有多重功能的非编码 RNA,能够在转录后水平调控基因的表达,从而在器官发育、细胞分化和癌变等多种生物过程中发挥非常重要的作用^[1]。目前 miRNA 序列数据库中已有 1 400 多种人类 miRNAs^[2]。MiRNA 通过核酸序列互补与靶 mRNA 分子结合并使之降解或抑制其翻译,从而影响蛋白质的合成,最终达到调控基因表达的目的。研究表明,miRNA 参与了炎症发生等多种生理病理过程,miRNA 调控的免疫反应在应对刺激因子和病原过程中存在复杂的调控网络^[3],如 miR-146a 参与了炎症反应的负向调控^[4]。Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)是一种模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs),可以识别病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),进而活化胞内信号转导级联反应,使炎性介质转录表达,引起

炎症反应,以清除病原体和被感染的细胞。多种 miRNAs 对 TLR 信号通路具有调控作用。本文简要概述了 miRNA 在炎症反应中的功能特点,着重介绍了其在 TLR 信号通路中的调控作用。

1 MiRNA 的合成和作用机制

MiRNA 在细胞核内编码,并经以下两种途径合成:(1)经典合成途径,由 RNA 聚合酶 II 转录,并在核内经核糖核酸酶 Drosha/DGCR8 加工处理后转运到胞质,经核糖核酸内切酶 Dicer 进一步加工^[5],裂解其环形末端,形成短小双链 RNA,组装成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)并与靶向序列结合^[6];(2)非 Dicer 酶依赖途径,该途径中 miRNA 的加工不依赖于 Dicer 酶,而是依赖于 RISC 中的 Argonaute 蛋白 Ago2^[7]。

RISC 中的 miRNA 通过一个 6 核苷酸“种子”序

[收稿日期] 2013-01-16 **[接受日期]** 2013-06-07

[基金项目] 国家自然科学基金(81072565,30900381)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81072565,30900381)。

[作者简介] 方 静,实验师。E-mail: fj0058@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 010-66930260, E-mail: maojp99@sina.com

列与靶 mRNA 的 3'-端非翻译区(untranslated region, UTR)互补配对结合,使 mRNA 降解或抑制其翻译,从而发挥其抑制靶 mRNA 的作用:对互补配对程度高的靶 mRNA 主要进行降解,而对互补配对程度低的靶 mRNA 主要进行翻译抑制^[8]。这种通过一个简短的“种子”序列介导的抑制作用,使 miRNA 可以靶向细胞内几十至几百个 mRNAs。因此,miRNA 的靶向多样性使其可以调节多种基因,从而对基因表达产生影响。

在炎症反应中,miRNA 的合成还可以在加工水平受到调节,一些在炎症过程中诱导的蛋白质可以调节 miRNA 的加工。如作用于 RNA 的腺苷脱氨酶(adenosine deaminases acting on RNA, ADAR)能够在炎症反应中上调,在 miRNA 前体内插入突变,从而改变 miRNA 的特异性靶点^[9]。在某些类型的炎性反应中上调的肿瘤抑制蛋白 p53 可以促进大量 miRNA 的转录,发挥其抑制肿瘤生长的作用^[10]。此外,氧化应激和 I 型干扰素能够抑制 Dicer 的表达,而干扰素 γ (IFN- γ)则使 Dicer 的表达水平增高,表明应激反应和干扰素能诱导 Dicer 水平的改变^[11]。

2 炎症反应中 miRNA 的特点

2.1 MiRNA 具有时序表达特异性 某些 miRNAs 在接受刺激 2 h 后即产生(如 miR-155),而其他 miRNAs 在刺激后经过一段延迟才产生(如 miR-21),这种时序表达特性对于 miRNAs 在炎症反应中发挥调节功能具有十分重要的作用。针对这一特性,目前存在两种明显不同的观点。一种认为与蛋白转录抑制因子相比,miRNA 在较短时间内发挥作用。由炎症引起的 miRNA 转录,由于其不需要翻译和转位入核,因此其加工激活比蛋白转录因子快^[12]。这对于固有免疫反应中(如 miR-155)短时间内清除病原微生物非常重要。另一种观点则认为尽管 miRNA 的作用比转录调节因子迅速,但与直接定位和灭活靶分子的蛋白因子相比,其发挥作用要慢得多^[13]。由于 miRNAs 在 RNA 水平发挥作用,而已经产生并激活的蛋白质在 miRNA 下调抑制新蛋白质产生之前仍保持活性,因此 miRNA 在免疫反应的负反馈调节中起到“延迟开关”的作用。如 miR-21 可导致核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)诱导的促炎因子——程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death-4, PDCD4)的抑制延迟^[14]。这两种观点

在特定的细胞/功能背景下都有着特殊的意义。

2.2 MiRNA 在不同类型的细胞中有不同的功能 尽管 miRNA 在不同的细胞中作用机制相同,但特定细胞类型的转录程序限制了 miRNA 相关靶点的数量。因此,在炎症过程中处于转录激活的细胞中存在特定 miRNA 调控的一系列不同靶分子。另外,对于一个特定的 miRNA 来说,不同发育谱系的细胞将会有不同的靶基因。例如,miR-146a 在骨髓细胞的靶基因主要是 TNF 受体相关因子 6(TNF receptor-associated factor-6, TRAF6)和白介素 1 受体相关激酶 1(IL-1 receptor-associated kinase-1, IRAK1),而其在调节性 T 细胞中的靶基因主要是信号转导子和转录激活子 1(signal transducer and activator of transcription-1, STAT1),因此在这两个不同系的细胞中 miRNA 表达的功能性结果截然不同^[15-16]。

2.3 MiRNA 对于靶向 mRNAs 的抑制作用不会导致基因的完全敲除 与转录因子的“开关”作用不同,miRNAs 是基因表达的“精细调节器”。在细胞功能中,miRNAs 可对细胞的基因表达模式起到“修复”或“缓冲”的作用,从而引起许多基因的微小改变。但是 miRNAs 同样可以通过调整一个关键转录因子的微小改变从而使基因表达模式发生彻底改变。如 miR-150 对 c-Myb 抑制的增加可导致造血系统产生 B 淋巴细胞发生戏剧性的变化^[17]。因此,依据其表达背景的不同,miRNAs 可稳定细胞的基因表达模式(表型),或是导致细胞分化。

此外,miRNAs 能与其他机制一同下调 mRNA。已有研究表明,富含 AU 碱基元件的 mRNA 序列在指导 mRNA 的降解中发挥重要作用。这种富含 AU 碱基的元件可以招募 RNA 结合蛋白(如 tristetraprolin)导致 RNA 降解,如编码 TNF- α 和 IL-10 的 mRNA 序列分别包含 miR-16 和 miR-106 的结合位点,同时也富含 AU 碱基。因此,RNA 结合蛋白 tristetraprolin 可以与 miR-106/miR-16 同时结合,使得这些 mRNAs 被清除^[18]。此外,El Gazzar 等^[19]也发现 miR-221、miR-579 和 miR-125b 能与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的 mRNA 相互作用,表明 miRNAs 能与富含 AU 碱基元件一同影响关键炎症因子的降解。

3 TLR/NF- κ B 信号通路中的 miRNA

TLR 信号在免疫识别和炎症反应中具有重要

作用,其信号异常会导致许多免疫和炎症相关疾病的发生^[13,20]。TLR 信号通路的激活依赖于细胞内或细胞表面的 TLRs 识别不同病原体的病原体相关分子模式。TLR 信号通路按是否需要接头蛋白髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor-88, MyD88) 的介导,主要分 MyD88 依赖和非依赖的信号通路。在 MyD88 依赖的通路中,TLR 通过 MyD88 募集和活化下游 IRAK4、IRAK1、IRAK2 和 TRAF6,进而激活丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、干扰素调节因子 5 (interferon regulatory factor-5, IRF5) 和 NF-κB 通路完成相关炎症因子的转录、释放;在非 MyD88 依赖的信号通路中,TLR 直接或间接通过一种 Mal 蛋白、Toll 样受体相关分子(Toll-like receptors associated molecule, TRAM)或 TIR 域含适配器诱导干扰素 β(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β, TRIF) 等接头蛋白募集 TRAF6、TRAF3 和肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域蛋白(TNF receptor-associated death domain, TRADD), TRAF3 激活下游 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase-1, TBK1)、MAPK、NF-κB 和 IRF3,进而激活下游相关细胞因子的表达^[21]。MyD88 介导的信号导致“炎症反应”,而 TRIF 介导的信号则有助于“抗病毒反应”。在 TLR/NF-κB 信号通路中,多种 miRNAs 可对通路中的蛋白具有负性调控作用(图 1),包括 TLR 通路中的信号分子、NF-κB 转录因子及细胞因子等^[22]。

3.1 MiRNAs 对 TLR 的负性调控作用 虽然靶区扫描算法的结果显示鲜有 miRNAs 以 TLRs 为靶标,但研究证实,在小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 中 TLR4 为 let-7e 的靶点,let-7e 的表达可以明显降低细胞表面 TLR4 水平;而当 TLR4 mRNA 的 3'UTR 与 let-7e 结合部位的基因序列发生突变时,这种负性调控就会消除^[23]。在口腔角蛋白细胞中,miR-105 可调节 TLR2;因此在炎症反应过程中,miR-105 可以通过衰减 TLR2 通路减轻炎症损伤^[24]。miR-223 在粒细胞生成过程中具有重要的作用,在单核细胞向粒细胞分化的过程中,miR-223 的表达水平较高,而 TLR3 及其 mRNA 和 TLR4 均呈低水平表达,推测 miR-223 可能对 TLR3 和 TLR4 有负性调节作用^[25]。

3.2 MiRNAs 对 TLR 信号通路中信号分子的负性调控作用 在 TLRs 下游,miR-145 和 miR-146a 以

TLR 接头蛋白 TRAF6 和 IRAK1 为靶标,miR-146a/b 通过与其 3'UTR 结合使其表达受抑制,导致下游的信号分子不能被激活或激活不足,发挥对 TLR 信号通路的负性调控作用^[26]。

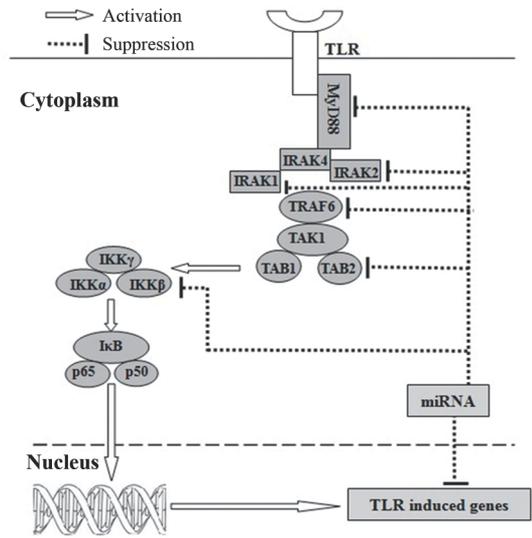


图 1 MiRNAs 对 TLR 信号通路的负性调控

Fig 1 MiRNAs negatively regulating TLR signaling pathway

TLR: Toll-like receptor; MyD88: Myeloid differentiation factor-88; IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase; TRAF6: TNF receptor-associated factor-6; TAK1: Transforming growth factor-β activated kinase-1; TAB: TAK1-associated binding protein; IKK: I-kappa B kinase

3.3 MiRNAs 对 NF-κB 转录因子的负性调控作用 NF-κB 的激活是 TLR 信号通路发挥作用的重要环节。NF-κB 由 4 个亚基组成,亚基被激活后发生同二聚体化或异二聚体化,转移入核。在非活动期,这些亚基与 IκB 结合存在于细胞质,而 IκB 的活性受 IκB 激酶(IKKs)的调节。MiRNAs 可以调节这些蛋白以影响 NF-κB 的活性。MiR-155 和 miR-199 以 IKKs 为靶标,调控 NF-κB 的活性^[27-28]。MiR-223 以 IKK-α 为靶标,在巨噬细胞分化过程中 miR-223 下调,导致巨噬细胞中 IKK-α 表达增加,进而抑制细胞中 NF-κB 靶基因的表达,从而抑制巨噬细胞的过度活化,使其对促炎刺激有明确反应^[29]。研究发现,激活 NF-κB 通路可引起 miR-9 的表达上调;同时,NF-κB 本身即 Nfkb1/p50 亚基又是 miR-9 的靶标,miR-9 可以与 NF-κB mRNA 3'UTR 结合抑制其翻译,使 NF-κB 表达减少^[30]。MiR-9 由 NF-κB 通路激活产生,又对 NF-κB 有抑制作用,因此 miR-9 在 NF-κB 通路中有负反馈调节作用,起到了一定的防止机体炎症反应过度的作用。

3.4 MiRNAs 对细胞因子的负性调控作用 MiRNA 也可直接作用于细胞因子的 mRNA, 从而减缓炎症反应, 维持机体的免疫平衡。Liu 等^[31]将 miR-147 的类似物转染小鼠巨噬细胞, 用脂多糖(LPS)刺激该细胞后产生的 IL-6、TNF- α 明显减少, 而敲除 miR-147 基因后得到了与之相反的结果。表明 miR-147 能减弱 TLR 介导的炎症因子的产生。细胞因子 IL-6 是 Let-7 家族 miRNAs 的靶标, 同时由于 Let-7 本身被 TLR/NF- κ B 负调控, 这使得促炎症反应调节更为精细^[32]。

此外, Sheedy 等^[14]的研究表明 TLRs 可连续上调不同 miRNAs 以利于免疫反应的暂时调节: 最初的 TLR 信号激活 miR-155, 并下调其靶标含 SH2 域的肌醇 5'-磷酸酶 (Src homology-2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1, SHIP1, 一种炎症抑制剂) 以促进炎症发展。随后产生的 miR-21 可抑制 PDCD4 (可抑制 IL-10 的产生), 由此去除对 IL-10 的抑制。与 miR-21 的诱导产生相比, PDCD4 抑制的时间延迟, 从而推测 miRNA 可作为一种延迟的负反馈调节器起作用。而后 IL-10 抑制 miR-155, 允许 SHIP1 脱抑制并抑制 TLR 信号, 从而在 TLR4 通路中建立负反馈的调节机制。

4 结 语

综上所述, miRNA 对炎症反应的调控作用复杂而微妙。miRNAs 对炎症反应的重要通路 TLR/NF- κ B 信号通路的调控, 如 miR-155 促进炎症进展的正反馈回路和 miR-21、miR-146a 的负反馈调节环路等, 对于调节炎症反应具有重要意义。此外, miRNAs 与靶蛋白之间相互调节, 形成复杂的调节网络。一个 miRNA 可以作用于多个靶点, 一个靶点也可以受多个 miRNA 调控, 使调控网络更加复杂。然而, 在单细胞谱系中单一 miRNA 的功能依然不明确, 如 miR-155 除了能够抑制 TLR 信号通路中的信号分子, 还能通过抑制 SHIP1 发挥促炎效应。因此, 利用免疫细胞中 miRNAs 或 miRNA 靶标缺失的模型进行深入研究, 将有助于理解 miRNAs 在炎症反应中功能。

除对 miRNA 功能的细致研究, 目前已有 miRNAs 的治疗应用研究^[33-34]。但是在不同的免疫细胞中, 特定的 miRNA 可能发挥不同的作用, 因此对于疾病的治疗需要针对不同的调节机制, 制定特异的治疗方案。深入研究 miRNA 在炎症反应中的作用

特点和机制, 将有助于感染性疾病的防治。

5 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Amiel J, de Pontual L, Henrion-Caude A. miRNA, development and disease [J]. *Adv Genet*, 2012, 80: 1-36.
- [2] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: D152-D157.
- [3] O'Connell R M, Rao D S, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 295-312.
- [4] Quinn S R, O'Neill L A. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling [J]. *Int Immunol*, 2011, 23: 421-425.
- [5] Ketting R F, Fischer S E, Bernstein E, Sijen T, Hannon G J, Plasterk R H. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* [J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 2654-2659.
- [6] Czech B, Hannon G J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 19-31.
- [7] Cheloufi S, Dos Santos C O, Chong M M, Hannon G J. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis [J]. *Nature*, 2010, 465: 584-589.
- [8] Doench J G, Sharp P A. Specificity of microRNA target selection in translational repression [J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 504-511.
- [9] Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 321-349.
- [10] Suzuki H I, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53 [J]. *Nature*, 2009, 460: 529-533.
- [11] Wiesen J L, Tomasi T B. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46: 1222-1228.
- [12] Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs [J]. *Science*, 2008, 319: 1785-1786.
- [13] O'Neill L A, Sheedy F J, McCoy C E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 163-175.
- [14] Sheedy F J, Palsson-McDermott E, Hennessy E J, Martin C, O'Leary J J, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor sup-

- pressor PDCD4 by the microRNA miR-21[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 141-147.
- [15] Boldin M P, Taganov K D, Rao D S, Yang L, Zhao J L, Kalwani M, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice[J]. *J Exp Med*, 2011, 208: 1189-1201.
- [16] Lu L F, Boldin M P, Chaudhry A, Lin L L, Taganov K D, Hanada T, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses [J]. *Cell*, 2010, 142: 914-929.
- [17] Xiao C, Calado D P, Galler G, Thai T H, Patterson H C, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb [J]. *Cell*, 2007, 131: 146-159.
- [18] Lai W S, Carballo E, Strum J R, Kennington E A, Phillips R S, Blackshear P J. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 4311-4323.
- [19] El Gazzar M, McCall C E. MicroRNAs distinguish translational from transcriptional silencing during endotoxin tolerance [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 20940-20951.
- [20] Troutman T D, Bazan J F, Pasare C. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11: 3559-3567.
- [21] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 373-384.
- [22] Contreras J, Rao D S. MicroRNAs in inflammation and immune responses [J]. *Leukemia*, 2012, 26: 404-413.
- [23] Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, et al. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs [J]. *Immunity*, 2009, 31: 220-231.
- [24] Benakanakere M R, Li Q, Eskan M A, Singh A V, Zhao J, Galicia J C, et al. Modulation of TLR2 protein expression by miR-105 in human oral keratinocytes [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 23107-23115.
- [25] Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2000, 164: 5998-6004.
- [26] Taganov K D, Boldin M P, Chang K J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12481-12486.
- [27] Chen R, Alvero A B, Silasi D A, Kelly M G, Fest S, Visintin I, et al. Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 4712-4723.
- [28] Eis P S, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez M F, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3627-3632.
- [29] Li T, Morgan M J, Choksi S, Zhang Y, Kim Y S, Liu Z G. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 799-805.
- [30] Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 5282-5287.
- [31] Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park Y J, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15819-15824.
- [32] Asirvatham A J, Magner W J, Tomasi T B. miRNA regulation of cytokine genes [J]. *Cytokine*, 2009, 45: 58-69.
- [33] DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 8800-8805.
- [34] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev K G, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs' [J]. *Nature*, 2005, 438: 685-689.