

· 中青年学者论坛 ·



王品 博士，海军军医大学（第二军医大学）基础医学院免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室副教授，硕士生导师，国家优秀青年科学基金获得者，入选上海市“青年科技启明星”计划。长期从事非编码基因功能挖掘和免疫调控机制研究。作为第一作者或通信作者发表多篇颇具影响力的研究论文，其中有2篇论文发表于 *Science*；累计 SCI 收录论文他引 1 000 多次；研究论文 2 次入选学术索引（Web of Science）高被引论文（Top 1%），1 次入选中国百篇最具影响力研究论文（2015 年）。承担多项国家自然科学基金项目和国家重点研发项目。申请国家发明专利 3 项，已授权 1 项。重要成就：（1）在免疫细胞分化成熟方面，发现并鉴定了人类树突状细胞分化成熟过程中特异的调控分子——长链非编码 RNA（lncRNA）*lnc-DC*，阐明 lncRNA 在细胞质内直接调控信号转导的新模式；（2）在免疫应答调控方面，发现病毒感染可诱导产生干扰素非依赖的 *lncRNA-ACOD1*，阐明 *lncRNA-ACOD1* 通过直接调控代谢酶促进病毒复制的新通路。研究项目 2014 年入选中国高等学校十大科技进展，2015 年获上海市自然科学奖一等奖，2017 年入选中国十大医学进展。

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.04.0349

长链非编码 RNA 在天然免疫中的功能效应及分子机制

徐博文，王品*

海军军医大学（第二军医大学）基础医学院免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室，上海 200433

[摘要] 在哺乳动物的基因组转录本中，长链非编码 RNA（lncRNA）绝对数量大、种类多，是一个重要的类群。lncRNA 可以通过碱基互补配对或折叠成特殊三维空间结构等方式，与蛋白质、RNA、DNA 等其他生物分子相互作用，发挥着多种生物学功能，共同构成了一个复杂而精细的调控网络。越来越多的研究表明 lncRNA 在天然免疫中有重要的调控作用，如调控免疫细胞分化、调节炎症细胞因子的分泌以及参与病毒等病原体 and 宿主的相互作用等。笔者结合近年来天然免疫相关 lncRNA 的研究发现，讨论 lncRNA 相关生物学效应，着重阐述其分子机制，并讨论天然免疫相关的 lncRNA 研究策略和技术进展。

[关键词] 长链非编码 RNA；天然免疫；免疫调节；机制

[中图分类号] R 392 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)04-0349-09

Functional effects and molecular mechanisms of long non-coding RNA in innate immunity

XU Bo-wen, WANG Pin*

Institute of Immunology & National Key Laboratory of Medical Immunology, College of Basic Medical Sciences, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] In genomic transcripts of mammals, long non-coding RNA (lncRNA) is an important group due to its considerable absolute number as well as numerous types. By means of base complementary pairing or spatial conjunction with certain three-dimensional structures, different lncRNAs interact with other biological molecules such as proteins, RNAs and DNAs to exert different biological functions. Together, they constitute a regulatory network both intricate and delicate. More and more researches show that lncRNAs play important roles in the regulation of innate immunity, such as determining differentiation of innate immune cells, adjusting expression of inflammatory factors and participating in host-virus interaction. In this review, we described the biological effects of lncRNAs in innate immunity, and further illuminated the molecular mechanisms. Finally, we discussed the strategies and technologies for carrying out researches on innate immunity-related lncRNAs.

[收稿日期] 2018-01-24 **[接受日期]** 2018-04-08

[作者简介] 徐博文，硕士生。E-mail: supernova.no1@hotmail.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-65382502, E-mail: wangp@immunol.org

[Key words] long non-coding RNA; innate immunity; immune regulation; mechanism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(4): 349-357]

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是指长度超过 200 nt 且通常不具备蛋白质编码功能的 RNA (近年来的研究发现, 部分 lncRNA 可以编码一些短肽, 它们的具体功能尚不清楚^[1])。得益于高通量测序技术的进步, 近年来大量的 lncRNA 被发现, 目前已知它们在生物界中普遍存在, 根据最新的 lncRNA 数据库网站 NONCODE 第 5 版^[2]资料, 在包括真菌、植物、昆虫、线虫、脊椎动物在内的 17 种生物中已鉴定出超过 54 万个 lncRNA 转录本。在人类, 无论就转录本的绝对数量还是种类多少而言, lncRNA 都是一个庞大的类群。由于 lncRNA 是按长度定义的, 因此它并不像 tRNA、rRNA、mRNA 那样有相对固定的功能模式, 不同 lncRNA 在各细胞系中的表达以及在亚细胞层面的定位都呈现出特异性^[3-5], 提示其具有不同的生物学功能和作用机制, 因此直接对特定 lncRNA 进行功能预测较为困难。为了充分了解这一群体在生理、病理过程中的作用, 必须通过一系列独立实验探索各种 lncRNA 的功能并详细注释, 而目前被有效注释的 lncRNA 只占一小部分^[6]。在免疫学研究领域, 对 lncRNA 如何参与天然免疫过程的理解正随着越来越多 lncRNA 功能的发现而不断深化。Guttman 等^[7]于 2009 年发现脂多糖刺激的小鼠骨髓来源树突状细胞诱导多种 lncRNA 的转录, 率先揭示了 lncRNA 与天然免疫之间的联系。随着微阵列芯片和高通量 RNA 测序的广泛应用以及各种功能验证实验体系的建立与完善, 已证明在不同细胞系中多种 lncRNA 对天然免疫具有重要的调控作用, 包括决定天然免疫细胞分化、调控炎性细胞因子的表达以及参与病毒和宿主的相互作用等^[8-14]。本文从 lncRNA 的特点、受调控的天然免疫效应、分子机制 3 个方面介绍 lncRNA 在天然免疫中的作用, 并讨论天然免疫相关的 lncRNA 研究策略和技术进展。

1 lncRNA 的特点

与 mRNA 类似, 大多数 lncRNA 也需要剪接, 并且具有 5' 端帽和多聚腺苷酸尾结构^[15]。但 lncRNA 与 mRNA 在生物学特性上差异明显, 除了无蛋白编码能力, lncRNA 还有以下 4 个方面特点。

(1) lncRNA 的数量和种类繁多。过去大量

的转录组分析表明, 人类基因组中大约有 2/3 的基因会被转录, 而其中大部分为非编码 RNA, 只有 2% 的 RNA 翻译蛋白^[16]。据估计人类基因组中有 20 000~25 000 种蛋白编码基因^[17], 而 NONCODE 数据库收录的人类细胞 lncRNA 基因有 90 000 多个^[2]。研究发现, 越复杂和高级的生物体内 lncRNA 的种类越多, 说明非编码 RNA 调控对生物有重要的进化学意义^[18]。

(2) lncRNA 具有众多生物学功能。lncRNA 通过长度和编码能力定义, 没有固定的功能模式, 通过各种不同的机制发挥作用。已经发现的功能有: ①转录前调控。调节信号通路, 影响目标基因的表达^[19]或影响转录因子与启动子结合, 调节下游基因^[11]。②转录后调控。参与对前体 mRNA 的剪接^[20]、翻译^[21]和降解^[22]。③翻译后调控。特异性地与蛋白酶结合, 改变其催化活性^[23]。④表观遗传学修饰。参与基因印迹^[24]、染色质重塑^[25]等生物学过程。

(3) lncRNA 可以折叠形成具有功能的高级结构。众所周知, mRNA 编码区的一级结构是决定其编码能力的关键, 突变可能导致翻译错误; 而 lncRNA 一级结构保守性不强, 因此曾有学者据此认为非编码 RNA 是转录过程中无生物学意义的“噪声”^[26]。深入研究发现, lncRNA 虽然总体保守性不强, 但有一些保守性较强的元件, 比如 *THCAT126* 含有存在于所有脊椎动物的保守元件^[27], 提示其功能和特定结构之间存在联系。目前认为 lncRNA 既能够通过碱基互补配对与核酸序列结合, 也能通过二级或更高级的折叠结构与蛋白质相互作用^[28]。

(4) lncRNA 的分布在细胞和亚细胞层面均具有特异性。在细胞层面, 许多 lncRNA 在特定的细胞系中高表达: 有学者对人类 15 种细胞系进行转录组学分析发现, 多达 29% 的 lncRNA 特异性地表达于一个细胞系, 只有 10% 的 lncRNA 在所有细胞系中表达, 而 mRNA 上述 2 个比例分别为 7% 和 53%^[3]; Liu 等^[4]的研究也得出同样结论, 他们检测了 7 个人类细胞系中的 1 329 个 lncRNA 基因, 筛选出 499 个生长关键基因, 绝大多数 (89%) 只影响 1 种细胞的生长, 并且所有检测的 lncRNA 没有一个存在于所有细胞系中。在亚细胞

层面,对于相同种类的细胞, lncRNA 同样呈现出特异的亚细胞定位,例如中性粒细胞中 *Morrbid* 定位于核内^[29]、树突状细胞中 *lnc-DC* 定位于细胞质^[10]。LncATLAS 是专门提供 lncRNA 亚细胞定位检索的数据库,通过该数据库能够查阅到更多相关信息^[5]。目前在筛选功能性 lncRNA 过程中必须考虑其亚细胞定位,因为定位往往为潜在功能提供了线索。

基于上述特点,不同的 lncRNA 和其他生物分子相互作用,共同构成一个复杂而精密的调控网络。

2 lncRNA 在天然免疫中的效应

目前认为, lncRNA 广泛参与多种天然免疫效应,包括诱导天然免疫细胞的分化、调节炎症细胞因子的分泌、参与病毒等病原体和宿主的相互作用等^[30-33]。

通过对不同分化阶段细胞转录组学差异倍数的比较,筛选出一些对天然免疫细胞的分化具有关键作用的 lncRNA,例如促进单核细胞向巨噬细胞分化的 *lnc-MC*^[34],维持中性粒细胞、嗜酸性粒细胞存活的 *Morrbid*^[29],促使单核细胞分化为成熟树突状细胞的 *lnc-DC*^[10],分别维持 1 型和 3 型天然免疫淋巴细胞 (innate lymphoid cell, ILC) 谱系特征和功能的 *Rroid*^[35] 和 *lncKdm2b*^[36] 等。

在天然免疫调控方面,各种炎症相关 lncRNA 参与了对炎症细胞因子网络的精密调控。有的 lncRNA 起正向调控作用,例如 *PACER* 介导环氧酶 2 (cyclooxygenase 2, COX-2) 表达升高^[37]、*THRIL* 促进以肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 为主的多种细胞因子及趋化因子的产生^[8]、*NEATI* 使 *IL-8* 表达上升^[38]、*AS-IL-1a* 促进 *IL-1a* 的转录^[39] 等;还有一些 lncRNA 起负反馈抗炎作用,例如 *lincRNA-Cox2* 的缺失将导致 500 多种炎症因子表达上调^[11]、*Lethe* 负反馈抑制 *NF-κB* 的表达^[9]、*lncRNA-CMPK2* 下调数个干扰素刺激相关基因^[40]、*AS-IL-1β* 抑制 *IL-1β* 的表达^[41] 等。

功能性 lncRNA 参与了病毒^[42]、细菌^[43]、寄生虫^[44] 等病原体与宿主之间的作用。这种作用是相互的,以病毒为例,某些 lncRNA 帮助宿主发挥抗病毒的功能,例如 *NeST*^[43,45]、*NEATI*^[46]、*HULC*^[47-48]、*EBER*^[49] 等;而另一些 lncRNA 由病原体诱导宿主高表达或者直接由病原体编码,它们帮助病毒复制、削弱免疫系统或者逃避免疫防御^[50],例如卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus,

KSHV) 诱导的多聚腺苷酸化核 (polyadenylated nuclear, PAN) RNA^[51-52]、疱疹性口炎病毒感染时表达升高的 *lncRNA-ACOD1*^[23] 等。另外,病毒也可以编码 lncRNA,有几项独立的研究分别观察到一种由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 编码的反义 lncRNA^[53-55]。Saayman 等^[56] 进一步研究发现这种 lncRNA 能够招募内源的染色体重塑蛋白 Dnmt3a、HDAC1 和 EZH2.65 使病毒染色体沉默、转录停止,而干扰该 lncRNA 能重新激活病毒的转录。病毒编码一种抑制自身的 lncRNA 似乎违背常理,但是研究者认为这可能与 HIV 的潜伏有关。无论如何,这个发现表明人们对于病毒和 lncRNA 相互作用的了解还不充分。表 1 列举了已证实具有天然免疫效应的部分 lncRNA 的生物学功能及其分子作用机制。

3 lncRNA 在天然免疫系统中发挥功能的分子机制

为了更好地阐明 lncRNA 如何参与上述生物学效应,必须深入了解其分子机制。综合 lncRNA 的研究报道,目前 lncRNA 发挥功能的分子机制有以下 8 种 (图 1)。

3.1 分子诱饵 lncRNA 与具有调节功能的蛋白通过类似“化学滴定中和”的方式结合后使其失去活性,产生抑制效果。例如 *PACER* 通过结合 p50-p50 二聚体,使后者对 *COX-2* 启动子区的抑制作用消失,启动 *COX-2* 基因的转录^[37]; *Lethe* 与 *PACER* 的调控作用相反,通过结合 p65-p65 二聚体,阻断其在 *NF-κB*、*IL-6*、*IL-8* 等目标基因启动子区的聚集,从而限制这些炎症基因的表达^[9]; *NEATI* 不仅参与形成染色体旁斑^[57],同时也是一种诱饵分子,当 *NEATI* 表达升高时其结合脯氨酸/谷氨酰胺富含性剪切因子 (splicing factor proline/glutamine-rich, SFPQ) 形成旁斑,使得 SFPQ 对 *IL-8* 启动子的抑制作用消失,从而增强 *IL-8* 的表达^[38]。

3.2 MicroRNA 分子海绵 与分子诱饵功能类似,分子海绵特指 lncRNA 结合大量的 microRNA,使其衰竭而失去作用。例如 *lnc-MC* 通过大量吸收 *miR-199a-5p* 阻断 *miR-199a-5p* 对 1B 型激活素 A 受体 (activin A receptor type 1B, ACVR1B) 的抑制作用,由于 ACVR1B 是单核细胞分化的关键受体,因此 *lnc-MC* 间接激活了 ACVR1B,使单核细胞向巨噬细胞分化^[34]。

表1 天然免疫相关 lncRNA 生物学功能及其分子作用机制

Tab 1 Biological functions and molecular mechanisms of innate immunity-related lncRNA

LncRNA	Function/mechanism	Reference
<i>Lnc-MC</i>	Promotes monocyte/macrophage differentiation of THP-1 cells and CD34 ⁺ HSPCs Soaks up miR-199a-5p and release ACVR1B expression (ACVR1B is an important regulator of monocyte/macrophage differentiation)	[34]
<i>Morrbid</i>	Modify myeloid cells' (neutrophils, eosinophils, etc.) lifespan by increasing cell death	[29]
<i>Lnc-DC</i>	Inhibits transcription of <i>Bcl2l11</i> by interacting with the <i>Bcl2l11</i> promoter-repressive PRC2 complex Crucial in maintaining DC differentiation	[10]
<i>Rroid</i>	Blocks dephosphorylation of STAT3 to strengthen the STAT3 signal pathway	[35]
<i>LncKdm2b</i>	Maintains homeostasis of NKs/ILC1s Promotes <i>Id2</i> expression specifically by interacting with STAT5 and modifying chromatin accessibility	[36]
<i>PACER</i>	Sustains the maintenance of ILC3s by promoting their proliferation Recruits Satb1 and the NURF complex onto the <i>Zfp292</i> promoter to initiate its transcription	[37]
<i>THRIL</i>	Promotes <i>COX-2</i> expression Binds to NF-κB p50/p50 homodimers, which are transcription repressors that target <i>COX-2</i> promoter	[8]
<i>NEAT1</i>	Is required for induction of expression of multiple immune-response genes, especially <i>TNF</i> , when monocyte-macrophage lineage is stimulated by Pam3CSK4 Associates with hnRNPL to form THRIL-hnRNPL complex which can binds to the <i>TNF</i> promoter to increase <i>TNF</i> gene expression	[38, 46]
<i>AS-IL-1α</i>	Regulates IL-8 synthesis after immune stimulation Alters localization of the <i>IL-8</i> repressor SFPQ from <i>IL-8</i> promoter by sequestering it in paraspeckles	[39]
<i>LincRNA-Cox2</i>	Induced by Pam3CSK4, LPS, and poly (I:C) in BMDM to regulate <i>IL-1α</i> levels Promotes <i>IL-1α</i> expression by recruiting polymerase II to the <i>IL-1α</i> promoter	[11]
<i>Lethe</i>	Negatively regulates hundreds of inflammatory gene sets Interacts with hnRNP-A/B, hnRNP-A2/B1, and SWI/SNF to suppress expression of hundreds of inflammatory genes in transcriptional level	[9]
<i>LncRNA-CMPK2</i>	Negatively regulates NF-κB-related inflammation Competitively binds to the p65-p65 homodimers (p65 is also named as RelA) to inhibit their binding to promoters of NF-κB-dependent inflammatory genes such as <i>IL-6</i> , <i>IL-8</i> , etc.	[40]
<i>AS-IL-1β</i>	Is strongly upregulated in HCV-infected human hepatocytes Suppresses expression of several antiviral IFN-stimulated genes, which favors HCV replication	[41]
<i>NeST</i>	Significantly suppresses LPS-induced <i>IL-1β</i> expression in RAW264.7 cells Regulates RNA polymerase II recruitment to the <i>IL-1β</i> locus	[43, 45]
<i>HULC</i>	Promotes the expression of <i>IFN-γ</i> in Th1 cells downstream of <i>Stat4</i> , <i>Tbet</i> , <i>NF-κB</i> , and <i>Ets1</i> Recruits H3K4 methyltransferases at the <i>IFN-γ</i> promoter	[47-48]
<i>EBER</i>	A genetic variant in <i>HULC</i> lncRNA leads to the risk of developing HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population Suppresses miRNAs including miR-372. MiR-372 is important to reduce the translation of PRKACB, which induces CREB phosphorylation in human liver	[49]
<i>PAN</i>	Encoded by EB virus; highly expressed in EB virus-infected cells; induces DCs to form a mature phenotype, which enables them to have the antigen presenting capability Can be specifically recognized by TLR3, which induces the production of IFNs and inflammasomes	[51-52]
<i>LncRNA-ACOD1</i>	Encoded by KSHV to facilitate its duplication Promotes transcription by inducing separation between virus coating and genome; regulates epigenomic modification to increase virus replication by recruiting demethylase UTX and JMJD3 to DNA	[23]
	Upregulated during different virus infections both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Directly binds to GOT2, of which conformation is then altered and thus enhances its catalytic activity. This results in a great change of metabolic pathway, which facilitates virus duplication	

lncRNA: Long non-coding RNA; LincRNA: Long intergenic non-coding RNA; HSPC: Hematopoietic stem progenitor cell; ACVR1B: Activin A receptor type 1B; Bcl2l11: B-cell lymphoma 2-like protein 11; PRC2: Polycomb repressive complex 2; DC: Dendritic cell; STAT: Signal transducer and activator of transcription; NK: Natural killer cell; ILC: Innate lymphoid cell; Satb1: Special AT-rich sequence-binding protein 1; NURF: Nucleosome remodeling factor; COX-2: Cyclooxygenase 2; NF-κB: Nuclear factor κB; TNF: Tumor necrosis factor; Pam3CSK4: Pam3CysSerLys4; hnRNPL: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L; THRIL: TNF and hnRNPL related immunoregulatory long non-coding RNA; IL: Interleukin; SFPQ: Splicing factor proline/glutamine-rich; LPS: Lipopolysaccharide; BMDM: Bone marrow-derived macrophage; hnRNP: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; SWI/SNF: SWIth/sucrose non-fermentable; HCV: Hepatitis C virus; IFN: Interferon; Tbet: T-box expressed in T cell; Ets1: E26 transformation-specific proto-oncogene 1; HULC: Hepatocellular carcinoma up-regulated long non-coding RNA; HBV: Hepatitis B virus; PRKACB: Protein kinase cAMP-activated catalytic subunit β; CREB: cAMP response element-binding protein; EB virus: Epstein-Barr virus; TLR3: Toll-like receptor 3; KSHV: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; UTX: Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, X chromosome; JMJD3: Jumonji domain-containing protein 3; GOT2: Glutamic-oxaloacetic transaminase 2

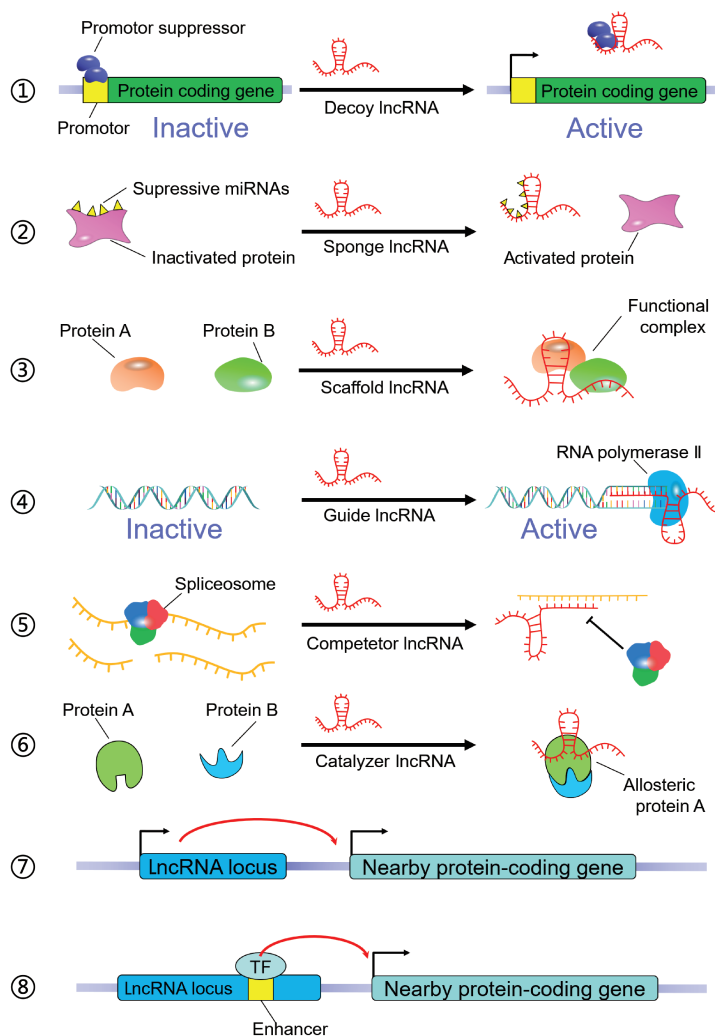


图1 LncRNA 发挥功能的分子机制

Fig 1 Molecular mechanisms of functional lncRNA

① Decoy: lncRNA combines biological molecules such as proteins in a titration manner, thus hinder their function; ② Sponge: lncRNA absorbs miRNAs, making them exhausted; ③ Scaffold: lncRNA connects two different proteins to make them a functional complex; ④ Guide: lncRNA recruits other molecules to a target to exert their functions; ⑤ Interacts with mRNA: lncRNA specifically connects with certain mRNA to interfere with its splicing activity; ⑥ Changes protein's structure: lncRNA directly connects with enzymes, changing their catalytic activities through allosteric effect; ⑦ Transcription of lncRNA locus: Transcription and splicing of lncRNA is necessary to induce expression of nearby protein-coding genes in some circumstances; ⑧ lncRNA locus may contains functional elements: The enhancers imbedded within lncRNA locus may be key to expression of nearby protein-coding genes. lncRNA: Long non-coding RNA; TF: Transcription factor

3.3 分子骨架 lncRNA 可以作为连接 DNA、RNA、蛋白等生物分子的骨架, 使它们组成有复杂活性的复合物。例如 lncRNA *RMRP* 可以促进 T 细胞 RAR 相关的孤儿核受体 γ (RAR-related orphan receptor γ in thymocytes, ROR γ t) 与死亡盒蛋白 5 (DEAD-box protein 5, DDX5) 结合, *RMRP*-ROR γ t-DDX5 复合体促使 Th17 细胞相关基因转录、原始 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化并发挥功能, 如表达 IL-17a、IL-17f 和 IL-22 等细胞因子^[58]。

3.4 分子向导 lncRNA 还可以招募其他分子到作用靶点以发挥功能。例如 *Morrbid* 靠近 *Bcl2l11* 启动子区, 结合并募集重要的组蛋白修饰复合物多梳蛋白抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2), 在 *Bcl2l11* 启动子上沉积 H3K27^{me3} 组蛋白标记, 下调 *Bcl2l11* 的表达^[29]; *AS-IL-1a* 在 *IL-1a* 启动子区募集 RNA 聚合酶 II, 引起 *IL-1a* 转录^[39]; *lincRNA-p21* 能够招募核内不均一核糖核蛋白 K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNP-K), 结合到多种基因的启动子区, 起到

转录抑制作用,其中包括一些细胞存活关键基因,因此促使细胞凋亡^[59]。

3.5 与 mRNA 相互作用 LncRNA 参与了 mRNA 剪切、翻译、降解等生物学过程的调控。在剪切层面,一种被称为肺腺癌转移相关转录物 1 (metastasis-associated in lung adenocarcinoma transcript 1, *MALAT1*) 的 lncRNA 在多种癌症中高表达,主要位于剪接斑点 (splicing speckle)^[60],它通过调控剪接因子在剪接斑点中的分布和磷酸化水平,改变前体 mRNA 的选择性剪接模式^[61];在翻译层面,*lincRNA-p21* 通过特异性结合 Jun B、 β 连环蛋白 (β -catenin) 等蛋白的 mRNA 序列,形成 RNA-RNA 二聚体,阻止这些 mRNA 被翻译成蛋白质^[21];在降解层面,一种被称为半 Stau1 (一种 mRNA 降解因子^[62]) 结合位点 RNA (half-Stau1-binding site RNA, *1/2-sbsRNA*) 的 lncRNA 通过与 mRNA 3' 端非翻译区的 Alu 元件不完全配对形成 Stau1 结合位点,促进 Stau1 与 mRNA 结合,导致 mRNA 降解^[63]。

3.6 蛋白变构效应 LncRNA 与多种酶类直接结合,包括代谢酶、激酶和各种表观修饰酶等,改变其催化活性,从而发挥多种调控功能。2017 年 12 月本研究团队发现,在多种病毒诱导下一个特异的 lncRNA *lincRNA-ACOD1* 表达显著升高,其直接结合细胞质中的天冬氨酸转氨酶 2 (glutamic-oxaloacetic transaminase 2, GOT2),使得底物的作用位点的构象改变,进一步提高酶催化活性,显著影响细胞的代谢通路,从而促进病毒的复制^[23]。

3.7 跨 lncRNA 基因座转录具有功能作用 有学者指出,转录或剪接 lncRNA 的过程会影响和它在空间上最接近基因的表达,而与该 lncRNA 无关^[64]。Engreitz 等^[65]认为,lncRNA 基因 *Blustr* 的转录和剪接能够使得邻近的 *Sfmbt2* 表达升高,并且这一现象是由于转录剪接过程中所招募的多聚酶、染色体修饰酶作用的关系,而不受 *Blustr* 序列的影响。这一现象是不是影响基因表达的普遍作用模式尚待进一步研究。

3.8 lncRNA 基因座可能含有影响邻近基因的功能元件 有研究发现,删除 lncRNA *Bendr* 基因座的启动子区会显著降低邻近蛋白编码基因 *Bend4* 的转录和表达;但是在 *Bendr* 的第 1 个内含子中插入多聚腺苷酸信号,使得 *Bendr* 过早地终止转录,却并不影响 *Bend4* 的表达^[65]。对 *lincRNA-p21* 功能的深入研究也发现了类似现象:即使在无法检测到 *lincRNA-p21* 表达的野生型小鼠组织中,敲

除 *lincRNA-p21* 基因座同样会显著影响邻近基因 *Cdkn1a* 的表达^[66]。以上研究提示 lncRNA 可能存在一种全新的调控机制:lncRNA 基因座通过其中含有的特殊功能元件,比如增强子,发挥对邻近基因的顺式调控作用,而与 lncRNA 本身的序列和是否转录无关。这一假说的更多细节和普适性也需要更深入地研究。

4 天然免疫相关非编码 RNA 的研究策略

在天然免疫领域,得益于近年来诸多新实验技术体系的出现与完善,非编码 RNA 相关的研究正日趋深入,未来进一步探索功能性非编码 RNA 及其作用机制仍将是主要的研究方向。目前,其在功能和机制方面的探索主要采用 2 个策略:(1)以非编码 RNA 为对象入手;(2)从某个分子作用模式入手。

4.1 以非编码 RNA 为对象入手 从不同刺激或处理的转录组或表达组入手,寻找差异表达的非编码 RNA。通过差异倍数和显著性及非编码 RNA 的基因组定位信息等筛选功能性候选 RNA 分子。然后通过后续干扰 siRNA 或 Cas9^[58,67] 进行功能筛选,锁定功能比较显著的 RNA 分子。最后进行 RNA 功能的分子机制研究,包括确定其相互作用分子、作用结合位点和作用的分子机制等。主要用到的技术有 RNA-pulldown^[68]、RIP^[36]、ChIRP^[69] 等蛋白与 RNA、DNA 与 RNA 相互作用实验技术^[10]。该策略是非编码 RNA 研究的常规套路,稳定可靠、风险较小,而后期分子机制研究一般是课题进展的难点,比较适用于大规模临床样品的课题和独特实验模型的课题。

4.2 从某个分子作用模式入手 与第 1 种策略相反,该策略先靶向一个重要的蛋白分子^[70],可以是信号转导分子、酶类或者转录因子等,或者是一个细胞亚结构,如线粒体、核内旁斑^[71]、外泌体等,通过 RIP-seq^[72] 或者 RNA-seq 检测其结合的或者包含的 RNA,按照富集的倍数和显著性筛选候选 RNA 分子,之后通过 siRNA 或者高表达的方法筛选功能 RNA^[73]。该策略的优点是从课题设计开始就有明确指向的功能分子机制,在后续分子机制研究中比较方便展开;而难点是前期如何做好 RIP-seq 和细胞亚结构的有效分离,这是后续实验可靠性和可行性的保障。

2 种策略在实验技术上有部分重叠,但也有各自独特的实验技术需求或数据分析策略。不同策略适应于不同的课题和实验室背景,在选择时可以根据

据课题特点和实验室技术体系进行取舍。当然, 2 种策略也可以同时应用, 相得益彰, 相互印证, 获得更好验证效果。

5 小 结

LncRNA 在调控免疫细胞分化发育、调节炎症性细胞因子的产生以及参与病毒和宿主的相互作用等天然免疫过程中具有重要的调控作用。目前 lncRNA 的研究方向主要集中在探索不同 lncRNA 的功能及其分子机制, 近年来随着高通量测序和芯片技术的广泛应用, 生物信息学算法的进步以及诸如 RNA-pulldown、RIP、ChIRP、Crispr 基因编辑、单细胞测序等新实验技术体系的出现与完善, 筛选 lncRNA 的成功率与效率都不断提高, 发现并注释了大量的 lncRNA, 出现了许多相对完善或别具特色的 lncRNA 数据库, 例如 NONCODE、GENCODE、lncRNAdb、CHIPbase、lncRNome、Starbase、lncRNADisease、lncATLAS 等, 为 lncRNA 生物功能的预测奠定了基础。同时, 其他一些研究方向如 lncRNA 的可变剪接、lncRNA 在转录后的编辑、lncRNA 的表观修饰、lncRNA 的高级结构和生物功能预测、lncRNA 的转运、lncRNA 在细胞自噬中的作用、lncRNA 与外泌体的生成和转运等成为新的研究热点。我们相信随着研究的广泛开展与深入, lncRNA 相关生物学效应及其分子机制将进一步得到阐明, 并为疾病的诊断和治疗提供新的思路和靶点。

[参 考 文 献]

- [1] LI L J, LENG R X, FAN Y G, PAN H F, YE D Q. Translation of noncoding RNAs: focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 361: 1-8.
- [2] NONCODE. <http://www.noncode.org/analysis.php>.
- [3] DJEBALI S, DAVIS C A, MERKEL A, DOBIN A, LASSMANN T, MORTAZAVI A, et al. Landscape of transcription in human cells[J]. *Nature*, 2012, 489: 101-108.
- [4] LIU S J, HORLBECK M A, CHO S W, BIRK H S, MALATESTA M, HE D, et al. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells[J/OL]. *Science*, 2017, 355. pii: aah7111. doi: 10.1126/science.aah7111.
- [5] lncATLAS. <http://lncatlas.crg.eu/>.
- [6] ZHAO Y, LI H, FANG S, KANG Y, WU W, HAO Y, et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D203-D208.
- [7] GUTTMAN M, AMIT I, GARBER M, FRENCH C, LIN M F, FELDSER D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals[J]. *Nature*, 2009, 458: 223-227.
- [8] LI Z, CHAO T C, CHANG K Y, LIN N, PATIL V S, SHIMIZU C, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 1002-1007.
- [9] RAPICAVOLI N A, QU K, ZHANG J, MIKHAIL M, LABERGE R M, CHANG H Y. A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti-inflammatory therapeutics[J/OL]. *Elife*, 2013, 2: e00762. doi: 10.7554/eLife.00762.
- [10] WANG P, XUE Y, HAN Y, LIN L, WU C, XU S, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation[J]. *Science*, 2014, 344: 310-313.
- [11] CARPENTER S, AIELLO D, ATIANAND M K, RICCI E P, GANDHI P, HALL L L, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. *Science*, 2013, 341: 789-792.
- [12] PENG X, GRALINSKI L, ARMOUR C D, FERRIS M T, THOMAS M J, PROLL S, et al. Unique signatures of long noncoding RNA expression in response to virus infection and altered innate immune signaling[J/OL]. *MBio*, 2010, 1. pii: e00206-10. doi: 10.1128/mBio.00206-10.
- [13] DAVE R K, DINGER M E, ANDREW M, ASKARIAN-AMIRI M, HUME D A, KELLIE S. Regulated expression of PTPRJ/CD148 and an antisense long noncoding RNA in macrophages by proinflammatory stimuli[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8: e68306. doi: 10.1371/journal.pone.0068306.
- [14] GARMIRE L X, GARMIRE D G, HUANG W, YAO J, GLASS C K, SUBRAMANIAM S. A global clustering algorithm to identify long intergenic non-coding RNA—with applications in mouse macrophages[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6: e24051. doi: 10.1371/journal.pone.0024051.
- [15] YANG Y, WEN L, ZHU H. Unveiling the hidden function of long non-coding RNA by identifying its major partner-protein[J/OL]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 59. doi: 10.1186/s13578-015-0050-x.
- [16] FATICA A, BOZZONI I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 7-21.
- [17] BUNCH H. Gene regulation of mammalian long non-coding RNA[J]. *Mol Genet Genomics*, 2018, 293: 1-15.
- [18] TAFT R J, PHEASANT M, MATTICK J S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity[J]. *Bioessays*, 2007, 29: 288-299.
- [19] ZHANG J, TAO Z, WANG Y. Long non-coding RNA DANCR regulates the proliferation and osteogenic differentiation of human bone-derived marrow mesenchymal stem cells via the p38 MAPK pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41: 213-219.
- [20] JOLLY C, LAKHOTIA S C. Human sat III and Drosophila hsr omega transcripts: a common paradigm for regulation of nuclear RNA processing in stressed cells[J]. *Nucleic Acids*

- Res, 2006, 34: 5508-5514.
- [21] YOON J H, ABDELMOHSEN K, SRIKANTAN S, YANG X, MARTINDALE J L, DE S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation[J]. *Mol Cell*, 2012, 47: 648-655.
- [22] MAQUAT L E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 89-99.
- [23] WANG P, XU J, WANG Y, CAO X. An interferon-independent lncRNA promotes viral replication by modulating cellular metabolism[J]. *Science*, 2017, 358: 1051-1055.
- [24] LEE J T. The X as model for RNA's niche in epigenomic regulation[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2: a003749. doi: 10.1101/cshperspect.a003749.
- [25] TSAI M C, MANOR O, WAN Y, MOSAMMAPARAST N, WANG J K, LAN F, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes[J]. *Science*, 2010, 329: 689-693.
- [26] BROSIUS J. Waste not, want not—transcript excess in multicellular eukaryotes[J]. *Trends Genet*, 2005, 21: 287-288.
- [27] IYER M K, NIKNAFS Y S, MALIK R, SINGHAL U, SAHU A, HOSONO Y, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome[J]. *Nat Genet*, 2015, 47: 199-208.
- [28] LI R, ZHU H, LUO Y. Understanding the functions of long non-coding RNAs through their higher-order structures[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17. pii: E702. doi: 10.3390/ijms17050702.
- [29] KOTZIN J J, SPENCER S P, McCRIGHT S J, KUMAR D B U, COLLET M A, MOWEL W K, et al. The long non-coding RNA *Morrbid* regulates *Bim* and short-lived myeloid cell lifespan[J]. *Nature*, 2016, 537: 239-243.
- [30] ZHANG Y, CAO X. Long noncoding RNAs in innate immunity[J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13: 138-147.
- [31] MURPHY M B, MEDVEDEV A E. Long noncoding RNAs as regulators of Toll-like receptor signaling and innate immunity[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99: 839-850.
- [32] AUNE T M, SPURLOCK C F 3rd. Long non-coding RNAs in innate and adaptive immunity[J]. *Virus Res*, 2016, 212: 146-160.
- [33] CARPENTER S. Long noncoding RNA: novel links between gene expression and innate immunity[J]. *Virus Res*, 2016, 212: 137-145.
- [34] CHEN M T, LIN H S, SHEN C, MA Y N, WANG F, ZHAO H L, et al. PU.1-regulated long noncoding RNA *lnc-MC* controls human monocyte/macrophage differentiation through interaction with microRNA 199a-5p[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35: 3212-3224.
- [35] MOWEL W K, McCRIGHT S J, KOTZIN J J, COLLET M A, UYAR A, CHEN X, et al. Group 1 innate lymphoid cell lineage identity is determined by a cis-regulatory element marked by a long non-coding RNA[J/OL]. *Immunity*, 2017, 47: 435-449.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.012.
- [36] LIU B, YE B, YANG L, ZHU X, HUANG G, ZHU P, et al. Long noncoding RNA *lncKdm2b* is required for ILC3 maintenance by initiation of *Zfp292* expression[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18: 499-508.
- [37] KRAWCZYK M, EMERSON B M. p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF-κB complexes[J/OL]. *Elife*, 2014, 3: e01776. doi: 10.7554/eLife.01776.
- [38] IMAMURA K, IMAMACHI N, AKIZUKI G, KUMAKURA M, KAWAGUCHI A, NAGATA K, et al. Long noncoding RNA *NEAT1*-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli[J]. *Mol Cell*, 2014, 53: 393-406.
- [39] CHAN J, ATIANAND M, JIANG Z, CARPENTER S, AIELLO D, ELLING R, et al. Cutting edge: a natural antisense transcript, *AS-IL1α*, controls inducible transcription of the proinflammatory cytokine *IL-1α*[J]. *J Immunol*, 2015, 195: 1359-1363.
- [40] KAMBARA H, NIAZI F, KOSTADINOVA L, MOONKA D K, SIEGEL C T, POST A B, et al. Negative regulation of the interferon response by an interferon-induced long non-coding RNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 10668-10680.
- [41] LU J, WU X, HONG M, TOBIAS P, HAN J. A potential suppressive effect of natural antisense *IL-1β* RNA on lipopolysaccharide-induced *IL-1β* expression[J]. *J Immunol*, 2013, 190: 6570-6578.
- [42] TYCOWSKI K T, GUO Y E, LEE N, MOSS W N, VALLERY T K, XIE M, et al. Viral noncoding RNAs: more surprises[J]. *Genes Dev*, 2015, 29: 567-584.
- [43] GOMEZ J A, WAPINSKI O L, YANG Y W, BUREAU J F, GOPINATH S, MONACK D M, et al. The *NeST* long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon- γ locus[J]. *Cell*, 2013, 152: 743-754.
- [44] AMIT-AVRAHAM I, POZNER G, ESHAR S, FASTMAN Y, KOLEVZON N, YAVIN E, et al. Antisense long noncoding RNAs regulate *var* gene activation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E982-E991. doi: 10.1073/pnas.1420855112.
- [45] COLLIER S P, COLLINS P L, WILLIAMS C L, BOOTHBY M R, AUNE T M. Cutting edge: influence of *Tmevpg1*, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of *Irfng* by Th1 cells[J]. *J Immunol*, 2012, 189: 2084-2088.
- [46] ZHANG Q, CHEN C Y, YEDAVALI V S, JEANG K T. *NEAT1* long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression[J/OL]. *MBio*, 2013, 4: e00596-12. doi: 10.1128/mBio.00596-12.
- [47] LIU Y, PAN S, LIU L, ZHAI X, LIU J, WEN J, et al. A genetic variant in long non-coding RNA *HULC* contributes to risk of HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e35145. doi: 10.1371/journal.pone.0035145.
- [48] WANG J, LIU X, WU H, NI P, GU Z, QIAO Y, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, *HULC* expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 5366-5383.

- [49] IWAKIRI D, ZHOU L, SAMANTA M, MATSUMOTO M, EBIHARA T, SEYA T, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3[J]. *J Exp Med*, 2009, 206: 2091-2099.
- [50] LI Y, WANG C, MIAO Z, BI X, WU D, JIN N, et al. ViRBase: a resource for virus-host ncRNA-associated interactions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D578-D582.
- [51] CAMPBELL M, KUNG H J, IZUMIYA Y. Long non-coding RNA and epigenetic gene regulation of KSHV[J]. *Viruses*, 2014, 6: 4165-4177.
- [52] ROSSETTO C C, PARI G. KSHV PAN RNA associates with demethylases UTX and JMJD3 to activate lytic replication through a physical interaction with the virus genome[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002680. doi: 10.1371/journal.ppat.1002680.
- [53] LUDWIG L B, AMBRUS J L Jr, KRAWCZYK K A, SHARMA S, BROOKS S, HSIAO C B, et al. Human immunodeficiency virus-type 1 LTR DNA contains an intrinsic gene producing antisense RNA and protein products[J/OL]. *Retrovirology*, 2006, 3: 80. doi:10.1186/1742-4690-3-80.
- [54] LANDRY S, HALIN M, LEFORT S, AUDET B, VAQUERO C, MESNARD J M, et al. Detection, characterization and regulation of antisense transcripts in HIV-1[J]. *Retrovirology*, 2007, 4: 71.
- [55] KOBAYASHI-ISHIHARA M, YAMAGISHI M, HARA T, MATSUDA Y, TAKAHASHI R, MIYAKE A, et al. HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period[J]. *Retrovirology*, 2012, 9: 38.
- [56] SAAYMAN S, ACKLEY A, TURNER A W, FAMIGLIETTI M, BOSQUE A, CLEMSON M, et al. An HIV-encoded antisense long noncoding RNA epigenetically regulates viral transcription[J]. *Mol Ther*, 2014, 22: 1164-1175.
- [57] CLEMSON C M, HUTCHINSON J N, SARA S A, ENSMINGER A W, FOX A H, CHESS A, et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles[J]. *Mol Cell*, 2009, 33: 717-726.
- [58] HUANG W, THOMAS B, FLYNN R A, GAVZY S J, WU L, KIM S V, et al. DDX5 and its associated lncRNA RMRP modulate TH17 cell effector functions[J]. *Nature*, 2015, 528: 517-522.
- [59] HUARTE M, GUTTMAN M, FELDSER D, GARBER M, KOZIOL M J, KENZELMANN-BROZ D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response[J]. *Cell*, 2010, 142: 409-419.
- [60] WILUSZ J E, FREIER S M, SPECTOR D L. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA[J]. *Cell*, 2008, 135: 919-932.
- [61] TRIPATHI V, ELLIS J D, SHEN Z, SONG D Y, PAN Q, WATT A T, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation[J]. *Mol Cell*, 2010, 39: 925-938.
- [62] KIM Y K, FURIC L, DESGROSEILLERS L, MAQUAT L E. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3' UTRs so as to elicit mRNA decay[J]. *Cell*, 2005, 120: 195-208.
- [63] GONG C, MAQUAT L E. LncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements[J]. *Nature*, 2011, 470: 284-288.
- [64] EBISUYA M, YAMAMOTO T, NAKAJIMA M, NISHIDA E. Ripples from neighbouring transcription[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 1106-1113.
- [65] ENGREITZ J M, HAINES J E, PEREZ E M, MUNSON G, CHEN J, KANE M, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing[J]. *Nature*, 2016, 539: 452-455.
- [66] GROFF A F, SANCHEZ-GOMEZ D B, SORUCO M M L, GERHARDINGER C, BARUTCU A R, LI E, et al. *In vivo* characterization of linc-p21 reveals functional cis-regulatory DNA elements[J]. *Cell Rep*, 2016, 16: 2178-2186.
- [67] RAN F A, CONG L, YAN W X, SCOTT D A, GOOTENBERG J S, KRIZ A J, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520: 186-191.
- [68] ATIANAND M K, HU W, SATPATHY A T, SHEN Y, RICCI E P, ALVAREZ-DOMINGUEZ J R, et al. A long noncoding RNA lincRNA-EPS acts as a transcriptional brake to restrain inflammation[J]. *Cell*, 2016, 165: 1672-1685.
- [69] CHU C, QUINN J, CHANG H Y. Chromatin isolation by RNA purification (ChIRP)[J/OL]. *J Vis Exp*, 2012(61). pii: 3912. doi: 10.3791/3912.
- [70] LIEPELT A, NAARMANN-DE VRIES I S, SIMONS N, EICHELBAUM K, FÖHR S, ARCHER S K, et al. Identification of RNA-binding proteins in macrophages by interactome capture[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15: 2699-2714.
- [71] ADRIAENS C, STANDAERT L, BARRA J, LATIL M, VERFAILLIE A, KALEV P, et al. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity[J]. *Nat Med*, 2016, 22: 861-868.
- [72] VAN NOSTRAND E L, PRATT G A, SHISHKIN A A, GELBOIN-BURKHART C, FANG M Y, SUNDARARAMAN B, et al. Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP)[J]. *Nat Methods*, 2016, 13: 508-514.
- [73] XING Y H, YAO R W, ZHANG Y, GUO C J, JIANG S, XU G, et al. SLERT regulates DDX21 rings associated with Pol I transcription[J/OL]. *Cell*, 2017, 169: 664-678.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.011.