

重视母乳中的一种新成分: microRNA

余章斌 综述 郭锡熔 审校

(南京医科大学附属南京妇幼保健院儿科, 江苏 南京 210004)

[摘要] MicroRNA(miRNA)是一类内源性非编码小分子RNA,存在于人类的多种体液中,近年来母乳中检测到多种miRNA,其中部分miRNA与婴儿免疫器官发育和免疫功能调节有关。本文阐述了母乳中microRNA的功能、临床循证证据及母乳与牛乳microRNA含量、种类的差异等。对母乳中新成分miRNA作用的解析,可以给儿童营养相关研究带来新的机遇,值得儿科营养学者的重视。 [中国当代儿科杂志,2012,14(9):719-723]

[关键词] 母乳;成分;microRNA;儿童

[中图分类号] R151 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)09-0719-05

A new component of breast milk: microRNA

YU Zhang-Bin, GUO Xi-Rong. Department of Pediatrics, Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China (Guo X-R, Email: xrguo@njmu.edu.cn)

Abstract: MicroRNA (miRNA) is a class of non-coding endogenous small molecule single strand RNA which is found in human body fluids. In recent years, miRNAs have been found in breast milk and parts of miRNAs are related to immune organ development and regulation of the immune function in infants. This article summarizes the functions of miRNA in breast milk and evidence-based clinical practice, and the differences between microRNA content and species in breast milk and cow milk. Understanding the role of miRNA can bring new opportunities for childhood nutrition research.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(9):719-723]

Key words: Breast milk; Component; microRNA; Child

对母乳成分的研究不断给人带来惊喜,母乳中大量的活性物质不断被人们发现:如对婴儿的视力和认知能力的发育有促进作用的多不饱和脂肪酸二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)^[1],具有抗感染活性能提升机体的免疫力的乳铁蛋白(lactoferrin, LF)等^[2]。婴儿配方乳以母乳为标准,尽可能地模仿母乳,在配方乳中添加DHA、LF等活性成分^[3-4],使其组分尽可能接近母乳,但母乳中含有的活性成分物质还远远没有被人们所解析,新的母乳成分不断被发现,如具有肠道保护作用的胰腺分泌胰蛋白酶抑制剂(pancreatic secretory trypsin inhibitor, PSTI)^[5],能杀死癌细胞的“哈姆雷特(human α -lactalbumin made lethal to tumor cells, HAMLET,为母乳中 α -白蛋白和脂肪酸结合后形成的混合物)”^[6],这些新的母乳成分的发现及随之发展起来的母乳类似物的添加研究极大地推动了婴儿营养医学的内涵,同时也使人们更加认识到母乳是一个营养成分的宝库,继续发掘母乳中新的成分并对其功

能研究显得十分必要。

1 microRNA的发现及功能

1993年, Lee等^[7]在秀丽新小杆线虫中发现了第一个可时序调控胚胎后期发育的基因lin-4;2000年, Reinhart等^[8]又在该线虫中发现第二个异时性开关基因let-7。2001年10月研究者分别从线虫、果蝇和人体内找到几十个类似的微小RNA基因,将其命名为微小RNA(microRNA, miRNA)^[9]。目前根据miRNA Registry公布的数据,仅仅在人体内就大约存在1658个miRNA(Release 18; November 2011),大约覆盖了3%的人类基因组序列。

miRNA大小长约20~25个核苷酸。成熟的miRNA是由较长的初级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工而产生的,随后组装进RNA诱导的沉默复合体,通过与靶mRNA的互补配对而在转录后水

[收稿日期]2012-04-24; [修回日期]2012-05-02

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30973231);江苏省自然科学基金资助项目(BK2011107);江苏省医学创新团队项目(LJ201108)。

[作者简介]余章斌,男,博士研究生。

平上对基因的表达进行负调控,导致 mRNA 的降解或翻译抑制^[10]。miRNA 参与生命过程中一系列的重要进程,包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢、肿瘤发生等^[11],可作为疾病的诊断标志物或干预治疗靶标^[12]。

2 母乳中 miRNA 的筛选检测及分析

miRNA 不仅存在于实体组织中,也存在于体液中,研究者已经在人体的 12 种体液中均检测到 miRNA^[13],如人的外周血清与血浆^[14-15]、唾液^[16]、尿液^[17]、孕妇的羊水等^[18],这些 miRNA 是人体生理与病理状态时的真实反应,可以作为疾病的诊断标志物 and 治疗的干预靶标^[19]。

2.1 人 miRNA 芯片筛选母乳中 miRNA 及其功能分析

Weber 等^[13]采用人 miRNA 检测芯片(Human miScript Assay panel,德国 Qiagen 公司,可检测 714 个人 miRNA)筛选检测人母乳中 miRNA,结果检测到母乳中 429 个 miRNA,其中 miR-335*、miR-26a-2*、miR-181d、miR-509-5p、miR-524-5p、miR-137、miR-26a-1*、miR-595、miR-580 及 miR-130a 含量最丰富,而 miR-193b、miR-10a、miR-28-5p、miR-924、miR-150*、miR-518c* 及 miR-217 是母乳中特有的 miRNA,在其他 11 种体液中均没有发现,并且 miR-518c* 特异高表达于胎盘中^[20],对这些 miRNA 功能的深入研究将揭示它们在母乳中的作用。

在对母乳 miRNA 功能的深入研究中, Kosaka 等^[21]采用 miRNA 芯片(Human Microrna Microarrays Version 1.5,美国 Agilent 公司,可检测 723 个人 miRNA)筛选人母乳中 miRNA,结果检测到母乳中 miRNA 281 个,发现 11 个 miRNA 与婴儿免疫器官发育和免疫功能的调节有关。其中 miR-181a、miR-181b、miR-155、miR-17、miR-92a、miR-150 与 T 和 B 细胞介导的细胞免疫应答有关;miR-125b、miR-146a、miR-146b 与固有免疫反应有关;miR-223 与粒细胞分化、非特异性免疫反应有关;Let-7i 与胆管细胞免疫反应有关。

通过对这些母乳中 miRNA 作用的靶基因来分析它们与婴儿免疫器官发育和免疫功能调节的关系,其中 miR-181a 通过调节 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)的强度和阈值,进而影响 T 细胞对抗原的敏感性。过度表达 miR-181a 可使成熟 T 细胞对抗原敏感性增加,弱抗原就能有效诱导 TCR 信号;而沉默 miR-181a 则降低 TCR 信号的强度^[22];miR-

181a 还可调节淋巴细胞的多个磷酸酶,如胞质蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP-2)、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 22(PTPN22)、双特异性磷酸酶 5(DUSP5),增强 TCR 信号分子 Ick 和 erk 的活性,从而影响 T 细胞和 B 细胞发育^[22]。

母乳中 miR-181b、miR-155 均可以作用于 B 细胞活化诱导激活的胞嘧啶核苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID),它是一种有效的 DNA 诱变物,是实现 B 细胞的抗体多样化的重要分子。B 细胞在 AID 的诱导下开始进行体细胞阶段的高度突变,产生编码不同抗体的 B 细胞,进而完成抗体种类转换重组(class-switch recombination, CSR)过程,最后在生发中心接受筛选,对病原体具有高亲和力且不会产生自身免疫的 B 细胞才能最终胜出。miR-181b、miR-155 均可以抑制 AID 的活性从而阻止 B 细胞的恶性转化^[23-24]。进一步的研究还表明 miR-155 能够抑制 AID 在活化 B 细胞中的表达,去除该抑制效应会导致 B 细胞形成缺陷^[25]。

miR-17、miR-92a 是 miR-17-92 基因簇的 2 个因子,与细胞免疫也密切相关。Xiao 等^[26]构建淋巴细胞过表达 miR-17-92 的小鼠,小鼠出现了淋巴细胞过度增生,出现自体免疫性疾病后死亡;敲除 miR-17-92 基因簇的小鼠出现免疫功能损害而死亡^[27],进一步的研究发现基因 PTEN、BIM 是 miR-17-92 的靶基因,它们在 T 细胞的发育过程中起到重要作用。因而,研究者认为 miR-17、miR-92a 可能通过靶基因 PTEN、BIM 而发挥免疫效应。miR-150 可以抑制 B 细胞的形成,其靶基因为 c-Myb,miR-150 可抑制 c-Myb 而影响 B 细胞活化,调控体液免疫应答^[28-29]。

通过生物信息学分析表明,TNF- α 是 miR-125b 的靶基因,过表达 miR-125b 可降低 TNF- α 转录,下调 TNF- α 诱导的免疫细胞的活性^[30]。炎症细胞因子肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)与白细胞介素 1 受体相关激酶 1(IL-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1)为 miR-146a 与 miR-146b 的靶基因,是 Toll 样受体通路的下游基因。miR-146a 与 miR-146b 可抑制 TRAF6 与 IRAK1 的表达,负反馈调控 Toll 样受体而参与炎症反应^[31]。miR-223 可调控脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),LPS 诱导脾细胞产生干扰素- γ 而发挥抗感染效应,敲除 miR-223 小鼠更容易发生肺损伤和多器官组织损伤^[32]。Toll 样受体 4(Toll-like receptors, TLR4)是 Let-7i 的靶基因,Let-7i 能调控胆

管细胞 TLR4 的表达,参与上皮细胞免疫反应,对短棒状杆菌有拮抗作用^[33]。

2.2 下一代测序技术筛选母乳中 miRNA 及其功能分析

Zhou 等^[34]采用下一代测序技术(美国 Illumina 公司测序仪,测序比对 1424 个 miRNA, miRBase 17.0)筛选人母乳中 miRNA,结果检测到母乳中 miRNA 602 个,59 个 miRNA 与婴儿免疫器官发育和免疫功能的调节有关,其中 miRNA(miR-148a-3p、miR-30b-5p、let-7f-1-5p、miR-146b-5p、miR-29a-3p、let-7a-2-5p、miR-141-3p、miR-182-5p、miR-200a-3p、miR-378-3p)含量最丰富,占合计检测到的 602 个 miRNA 总量的 62.3%。

其中 4 个含量丰富的 miRNA(miR-30b-5p、miR-146b-5p、miR-29a-3p、miR-182-5p)与婴儿免疫器官发育和免疫功能的调节有关。对这些 miRNA 的靶基因进行分析,发现 miR-30b-5p 的靶基因为氨基半乳糖转移酶(N-acetylgalactosaminyl transferases, GalNAc transferases),与细胞的侵袭与免疫抑制有关^[35]。miR-146b-5p 的靶基因为核转录因子 κ B(nuclear transcription factor kappaB, NF- κ B),参与固有免疫反应^[36]。miR-29a-3p 的靶基因为干扰素- γ ,能抑制细胞内病原体的免疫反应^[37]。miR-182-5p 可以诱导 IL-2 的生成参与 T 细胞介导的细胞免疫应答^[38]。

3 母乳中 miRNA 的研究展望

3.1 母乳中与免疫器官发育和免疫功能调节相关 miRNA 的深入研究

对于母乳中 miRNA 的筛选及其功能研究才刚刚起步,目前研究主要集中在母乳中 miRNA 与婴儿免疫器官发育和免疫功能调节的关系,由于新生儿的免疫系统尚不成熟,容易发生各种感染性疾病,而这些母乳中具有免疫保护作用的 miRNA 的发现,无疑将对研究感染性疾病的预防提供新的希望。

近年的研究表明,miR-146a 和 miR-223 可以作为败血症的诊断标志物,其中受试者工作特征曲线(ROC 曲线)下面积分别为 0.858 和 0.804^[39];而 miR-150、miR-574-5p 的水平和败血症的严重程度密切相关,可以作为败血症病人预后评价的标志物^[40-41]。这些 miRNA(miR-146a、miR-223、miR-150 和 miR-574-5p)在败血症病人体内明显降低,而母乳中这 4 种 miRNA 含量均较高,我们认为给患儿进行母乳喂养,可以增加婴儿体内这些 miRNA 的水平

而起到抗感染的作用。它们在炎症感染时具有抗御病原体入侵的能力,如采用脂多糖刺激新生儿的脐血,发现 miR-146a 在 24 h 内明显升高,通过负反馈调控 Toll4 而发挥抗炎作用^[42]。但尚没有动物实验表明在炎症感染时添加这些 miRNA 可以起到抗感染的作用,这方面的临床应用前动物实验和机理研究急需开展。总之,这些母乳中具有抗感染作用的 miRNA 将为我们预防和治疗感染性疾病提供新的干预靶标,同时可以作为配方乳添加物质使其成分更接近母乳。

3.2 母乳中 miRNA 的其他生物学功能

目前除对母乳中与免疫器官发育和免疫功能调节相关的 miRNA 进行了初步研究外,母乳中发现的其他 miRNA 尚没有进行深入的生物学功能分析。现有研究分别采用芯片和下一代测序技术筛选均发现组织特异性的 miRNA 在母乳中含量较高^[21,34],如肌肉特异性的 miR-1 和 miR-206;肝脏特异性的 miR-122;胰腺特异性的 miR-216 和 miR-217 等,这些 miRNA 在心脏、肝脏和胰腺的发育中起到重要的作用,母乳中含有的这些 miRNA 是否与婴儿器官的发育和功能保护有关,目前尚未有实验数据评估,迫切需要开展相关研究进行证实。

Zhou 等^[34]还发现脂肪组织特异的 miR-642a 在母乳中含量较高,而 miR-642a 在脂肪生成过程中起到重要作用^[43],母乳喂养的婴儿 miR-642a 摄入增加,是否对婴儿脂肪的生成、体重的增加有一定的促进作用,目前无实验研究评估,这些方面的深入研究将开辟从 miRNA 的角度研究儿童营养的新思路。总之,母乳中目前检测到的 miRNA 有 602 种,对它们在母乳中的作用与功能的深入研究非常必要。

3.3 母乳中 miRNA 含量的影响因素

母乳的成分随着泌乳期的变化而变化,母乳的成分也受到乳母膳食营养、饮食习惯、民族、文化和地域等因素的影响。目前没有研究对母乳中 miRNA 随着泌乳期的变化情况的数据发表,也没有研究表明母乳中 miRNA 受民族、文化和地域的影响情况。Kosaka 等^[21]研究表明母乳中 miRNA 存在个体差异,受到乳母膳食营养、饮食习惯的影响。食物中含有的 miRNA 能通过饮食摄入哺乳动物体内,如一种大米中大量存在 miRNA(miR-168a),用这种大米喂食小鼠后,研究人员在小鼠的血液、肺、小肠和肝脏中均发现 miR-168a 浓度显著上升,其中低密度脂蛋白受体连接蛋白 1 基因(low-density lipoprotein receptor adapter protein 1 gene, LDLRAP1)为其靶基因,当 miR-168a 被人体胃肠道黏膜上皮细胞摄取,

包装到微囊泡中,然后分泌到血液,进入肝脏结合到 LDLRAP1 上,抑制体内 LDLRAP1 蛋白表达,增加血液中的 LDL 和胆固醇水平,从而增加代谢综合征的风险,这为基于外源性 miRNA 加强或抑制表达来开发新的治疗疾病的策略提供可能^[44]。同理,乳母可通过膳食的调整来弥补某些 miRNA 的缺陷,从而增加母乳中特定 miRNA 的含量来达到营养或免疫的作用。

3.4 母乳与配方乳中 miRNA 的差异表达研究

研究者对母乳与牛乳中 miRNA 的种类和含量进行比较,在对配方乳的来源:奶牛不同泌乳期的牛乳进行 miRNA 筛选发现,其中含有 245 种 miRNA,与母乳中 miRNA 种类及含量相比,3 种与婴儿免疫器官发育和免疫功能调节有关的 miRNA (miR-146a, miR-142-5p, miR-155) 含量比母乳低,3 种与婴儿免疫器官发育和免疫功能调节有关的 miRNA (miR-181a, miR-223, miR-150) 含量与母乳相当,部分母乳中存在的与婴儿免疫器官发育和免疫功能调节有关的 miRNA (miR-181b, miR-17, miR-92a, miR-125b, miR-146b) 在牛乳中缺乏。此外,牛乳中肌肉特异性的 miR-1、miR-206 和肝脏特异性的 miR-122 较母乳含量低;胰腺特异性的 miR-216 和 miR-217 缺乏,而母乳中含量较高^[21, 45]。所以,母乳中存在的 miRNA 较配方乳更全面,其成分更接近婴儿生理需要。

研究还发现奶牛不同泌乳期牛乳中的 miRNA 成分不同,初乳中与免疫和组织分化相关的 miRNA (miR-18a, miR-19a, miR-140-5p, miR-219-5p) 含量较高,成熟乳中与肌肉和感觉组织相关的 miRNA (miR-10b, miR-9) 含量较高^[45],这和人体生后不同时期对营养成分需求是一致的,因而,对不同时期母乳成分的研究,可以对婴儿阶段性营养的差异研究提供依据。

总之,母乳中新成分 miRNA 的发现,给儿童营养相关研究带来新的机遇,对配方乳的生产研发和质量评价起到一定的推动作用,但母乳中 miRNA 的组分、含量及其生物学功能的相关研究才刚起步,值得儿科营养学者的重视。

【参 考 文 献】

[1] Gibson RA, Neumann MA, Makrides M. Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants[J]. Eur J Clin Nutr, 1997, 51(9): 578-584.
[2] Sokolov AV, Pulina MO, Zakharova ET, Susorova AS, Runova OL,

Kolodkin NI, et al. Identification and isolation from breast milk of ceruloplasmin-lactoferrin complex [J]. Biochemistry (Mosc), 2006, 71(2): 160-166.
[3] Rodriguez A, Raederstorff D, Sarda P, Lauret C, Mendy F, Descomps B. Preterm infant formula supplementation with alpha linolenic acid and docosahexaenoic acid[J]. Eur J Clin Nutr, 2003, 57(6): 727-734.
[4] Yen MH, Chiu CH, Huang YC, Lin TY. Effects of lactoferrin-containing formula in the prevention of enterovirus and rotavirus infection and impact on serum cytokine levels: a randomized trial [J]. Chang Gung Med J, 2011, 34(4): 395-402.
[5] Marchbank T, Weaver G, Nilsen-Hamilton M, Playford RJ. Pancreatic secretory trypsin inhibitor is a major motogenic and protective factor in human breast milk [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(4): G697-G703.
[6] Mossberg AK, Puchades M, Halskau O, Baumann A, Lanekoff I, Chao Y, et al. HAMLET interacts with lipid membranes and perturbs their structure and integrity [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9384.
[7] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
[8] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
[9] Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world [J]. Science, 2001, 294(5543): 797-799.
[10] Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes [J]. Science, 2003, 299(5612): 1540.
[11] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610.
[12] Sandhu S, Garzon R. Potential applications of microRNAs in cancer diagnosis, prognosis, and treatment [J]. Semin Oncol, 2011, 38(6): 781-787.
[13] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids [J]. Clin Chem, 2010, 56(11): 1733-1741.
[14] Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.
[15] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogossova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.
[16] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17): 5473-5477.
[17] Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer [J]. Urol Oncol, 2010, 28(6): 655-661.
[18] Montenegro D, Romero R, Pineles BL, Tarca AL, Kim YM, Draghici S, et al. Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human chorioamniotic membranes [J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 197(3): 289.e1-6.
[19] Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool [J]. Commun Integr Biol, 2010, 3(5): 478-481.