

microRNA与急性移植物抗宿主病研究进展

胡彬 黄斯勇 梁英氏

Advances in microRNA and graft-versus-host disease Hu Bin, Huang Siyong, Liang Yingmin
Corresponding author: Liang Yingmin, Institute of Hematology, the Fourth Military Medical University, Tang Du Hospital, Xi'an 710038, China. Email: liangym@fmmu.edu.cn

急性移植物抗宿主病(aGVHD)是异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后的常见并发症之一,重度aGVHD患者病死率高。HLA全相合患者allo-HSCT aGVHD发生率为40%~60%,HLA不全相合患者发生率更高^[1]。aGVHD发病机制复杂,通常认为与免疫激活、炎症因子释放、细胞数量的改变和影响GVHD中的特定蛋白质水平有关。目前临床上诊断aGVHD主要根据临床特征及病理学证据,仍然缺乏监测、诊断aGVHD的生物标志物。最近,许多文献报道microRNA(miRNA)在aGVHD及肿瘤方面有重要作用。本文将miRNA在aGVHD中的研究进展进行综述。

一、miRNA的生物学特性

miRNA是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA,由20~25个核苷酸构成^[2]。miRNA通过与靶信使核糖核酸(mRNA)特异结合,从而抑制转录后基因的表达。miRNA在调控基因表达、细胞周期、生物体发育时序等方面起重要作用。根据多种疾病和miRNA功能联系的研究,已经建立起强大的数据库,它可以帮助预测miRNA的靶基因、分析数据的表达、信号通路之间的联系、解释在疾病中的作用。miRNA的数据库包括DIANALAB^[3]、microRNA.org^[4]、TargetScan^[5]。类似的数据库还有AGIA^[6],用户通过提交mRNA和miRNA的表达情况,再通过特殊的算法,可以预测miRNA的靶基因。

miRNA成熟经历以下阶段^[7]:①RNA聚合酶Ⅱ转录miRNA基因,产生具有帽子结构和多聚A尾巴的pri-miRNA;②pri-miRNA在核内被Drosha RNaseⅢ切割加工成大约70个核苷酸组成的miRNA前体pre-miRNA;③pre-miRNA在转运蛋白exportin5的作用下,由细胞核向胞质转运;④在Dicer酶作用下,pre-miRNA被切割成约22个核苷酸长度的双链miRNA,然后解链产生成熟的miRNA。单链miRNA与RNA介导的沉默复合体结合后形成复合物,称为miRNP。miRNA通过与靶基因的3'端非翻译区互补配

对,指导miRNP复合体对靶基因mRNA进行切割或者翻译抑制。

二、不同组织器官miRNA的表达谱

目前已经证明miRNA在细胞或组织器官中存在特异性^[2]。Allantaz等^[8]已经证实正常人全血中特异的miRNA。他们研究了miRNA在B细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、NK细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、骨髓树突细胞、浆细胞样树突细胞、单核细胞9种不同类型免疫细胞中的表达。其中miR-378、miR-31、miR-143、miR-935存在于特定的免疫细胞中;miR-362-5p、miR-532-5p、miR-500*、miR-663、miR-125a-5p、miR-150、miR-223、miR-652存在于两种或两种以上免疫细胞中。组织中也有特异的miRNA:miR-1是心脏特异的miRNA^[9];miR-122主要在肝脏中表达^[10];表皮和毛囊高度表达miRNA对皮肤的正常发育至关重要^[11-12],例如miR-199家族、miR-205、miR-27b、miR-203、miR-125b、miR-16、miR-21、miR-126、miR-143。研究表明皮肤特异的miR-203与皮肤的形态形成有关^[13-14]。但是,肝脏、皮肤、胃肠组织中特异的miRNA在aGVHD中表达是否存在差异,尚未见相关报道。

三、miRNA表达与免疫反应

miRNA在各种免疫疾病及肿瘤方面也有重要作用。Du等^[15]发现miR-326在多发硬化患者的CD4⁺T细胞中特异性上调,其表达水平与这些细胞中的IL-17的表达水平呈正相关。他们证实实验性自身免疫脑脊髓炎小鼠(多发硬化模型小鼠)中提高miR-326水平会加重自身免疫脑脊髓炎病情,而抑制该小RNA水平则能显著减轻病情。他们的研究发现miR-326通过直接抑制负转录调控因子Ets-1的表达,促进小鼠外周淋巴结以及中枢病灶部位Th17细胞的分化。该项研究不仅揭示了非编码小RNA在多发硬化发生过程中的新机制,并且为包括多发硬化在内的自身免疫疾病治疗提供了可借鉴的新策略。Sonkoly等^[16]研究表明miR-146a、miR-203、miR-21在银屑病中过表达,而miR-125b低表达;上调TNF- α 时miR-125b低表达。类似的实验还有促炎因子IL-6可促进miR-21的表达^[17]。miR-21已经被证明是致癌基因,存在于各种癌症组织^[18-19]。miR-155与T细胞的活化有关^[20],提示miR-155可能与aGVHD有关。综上所述,越来越多的证据表明miRNA与免疫及肿瘤疾病的有关。

四、miRNA与aGVHD发病机制、诊断及治疗的研究

1. miRNA与aGVHD发病机制:GVHD发生的一个重要机制是供者移植物中的T细胞对宿主的主要和次要组织相容性抗原的差异识别。基于microRNA-155(miR-155)在T细胞活化时上调,Ranganathan等^[21]研究结果显示allo-HSCT

后发生 aGVHD 小鼠的 T 细胞中 miR-155 上调;接受缺乏 miR-155 供者的淋巴细胞的小鼠, aGVHD 显著减少;然而 T 细胞中过度表达 miR-155 的小鼠, 致命的 aGVHD 发展迅速;他们用一种合成的抗 miR-155 的寡核苷酸抑制 miR-155, 可减轻 aGVHD 严重程度, 同时延长小鼠的生存期。在人体内, miR-155 在肠道 aGVHD 中上调。他们的研究提示, miR-155 在 aGVHD 中有着至关重要的调控作用。miR-155 可能通过下面几种机制调控 aGVHD: ① miR-155 在 allo-HSCT 后调控 aGVHD 的严重程度, 因为 miR-155 在人类很多疾病中有促炎作用, 它促进 T 细胞炎症的发展, 其中包括 Th17 和 Th1 亚群; ② 接受缺乏 miR-155 的供者 T 细胞移植术后, 趋化因子 (CCR5) 的 mRNA 和蛋白下调, 可能是通过减少 IL-12R 和通过 STAF-4 抑制下游信号通路; ③ 接受缺乏 miR-155 的供者移植术后, SIP1 显著下调。SIP1 下调是通过调控 FTY720, 隔离二级淋巴器官的 T 细胞, 减少淋巴细胞的迁移和组织浸润; ④ 接受缺乏 miR-155 的供者 T 细胞移植术后, 下调 CXCR4 减少炎症细胞的功能和炎症细胞的表型和迁移; ⑤ 在 aGVHD 中 miR-155 上调, 可能维持 TNF- α 的高水平, 维持了炎症的持续状态。相似的实验, Leonhardt 等^[22]研究表明, miR-100 在小鼠的肠道 aGVHD 中是下调的, miR-100 在参与阻断炎症新生血管的形成有重要作用, 他们的研究提示 miR-100 在 aGVHD 中是一个保护因素。同样, miR-34a 在发生 aGVHD 的 Fanconi 贫血患者的移植前后做了相关研究, 结果显示 miR-34a 在 II~IV 度肠道 aGVHD 较 0~I 度肠道 aGVHD 和未移植的患者高表达^[23]。miR-34a 高表达与上皮细胞凋亡数目相关, 提示肠道 aGVHD 导致肠道上皮细胞大量凋亡。其机制可能是 DNA 损伤后, miR-34a 诱导上皮细胞凋亡。最近研究表明, miR-146a 在 aGVHD 小鼠 T 细胞中高表达。移植 miR-146a^{-/-} T 细胞小鼠 aGVHD 严重程度增加, 同时血清 TNF 水平上升^[24]。TRAF6 是 miR-146a 的靶基因, 小鼠在接受同种异体抗原刺激后, miR-146a^{-/-} T 细胞中 TRAF6 上调, 高水平的 TRAF6 增加 NF- κ B 和 TNF 的产生; 相反, 化学合成的 miR-146a 或 miR-146a 的类似物过表达可减轻 GVHD 的严重性。在人类, 供者体内单个核苷酸基因 rs2910164 可减低 miR-146a 的表达, 导致严重的 aGVHD。

2. miRNA 与 aGVHD 的诊断: miRNA 已经被证实具有细胞或组织器官特异性^[25], 例如 miR-1 是心脏特异的 miRNA^[9]; miR-122 主要在肝脏中表达^[10]。当组织或细胞损伤时, miRNA 可能就会释放入血或从细胞中分泌, Mitchell 等^[25]已经证明 miRNA 稳定存在循环中血浆及血清中。Xiao 等^[26]报道, 4 个 miRNA 组成的模板 (miR-423、miR-199a-3p、miR-93*、miR-377) 在发生 aGVHD 的患者较未发生 aGVHD 患者高表达, 并且在 aGVHD 临床诊断 (16 d) 前已经高表达。他们后期的工作大样本验证 4 个 miRNA 联合诊断 aGVHD 的方程, 同时为每一例患者计算预测概率及计算发生 aGVHD 的阈值。这为诊断和预测 aGVHD 打下了基础, 提供了途径。相关研究表明, sIL-2R 可作为 aGVHD 的蛋白生物学标志, AUC 值达到最高的一组蛋白质生物学标志包

括 sIL-2Ra、IL-8、肝细胞生长因子、肿瘤坏死因子受体-1^[27]。但是 Xiao 等^[26]发现在 HSCT 后 6 周 sIL-2Ra 在发生 aGVHD 与未发生 aGVHD 的患者之间差异无统计学意义。这些提示 miRNA 有望成为诊断 aGVHD 的无创的生物标志物。这些 miRNAs 在调控炎症、细胞增殖、凋亡和自噬方面有重要的作用, 但是这项研究未指出 miRNA 对应靶器官组织, 推测可能是激活 T 细胞后分泌的 miRNA。

在第十八届欧洲血液学年会上, Efebera 等^[28]分析了 allo-HSCT 后血清中的 miRNA 的差异表达, 在 10 例 aGVHD 患者中, 7 个 miRNA (miR-146a、miR-323-b、miR-34c、miR-363、miR-4245、miR-29a、miR-181a) 上调, 3 个 miRNA (miR-3168、miR-662、miR-550a) 下调。更进一步分析发现, 在 5 例肠道 aGVHD 的患者中, 3 个 miRNA (miR-146a、miR-4295、miR-181a) 上调, 4 个 microRNA (miR-3168、miR-582、miR-193a、miR-662) 下调。他们还发现, 在 5 例有皮肤 aGVHD 的患者中, 5 个 miRNA (miR-323b、miR-34c、miR-3940、miR-3674、miR-4258) 上调, 2 个 miRNA (miR-3168、miR-3678) 下调。

Xie 等^[29]研究中也证明 miR-146a、miR-181a 在 aGVHD 中是上调的, 与 Efebera 等^[28]结果一致, 同时也发现 miR-155 在 aGVHD 中上调。他们同时检测血清中 IFN- γ 、IL-17、IL-9 水平, 发现这些细胞因子与 aGVHD 患者中 miR-155 水平呈正相关; 同时 Th17 和 Th9 细胞的比例与 aGVHD 的患者 miR-155 水平呈正相关。之所以各研究机构之间 miRNA 表达不同, 可能与患者的年龄、种族、疾病的类型和预处理方案有关。综上所述, miRNA 有望成为 aGVHD 新的标志, 用于监测和诊断 aGVHD, 指导临床医生用药。

3. miRNA 与 aGVHD 的治疗: miRNA 可通过以下两种模式用于治疗疾病: ① miRNA 抗体可以抑制病变组织过表达的 miRNA; ② miRNA 类似物不像基因治疗那样困难, 需要导入大量质粒到病变组织, 这个可以用 RNA 沉默技术。在 Ranganathan 等^[21]的研究中, 用一种合成的抗 miR-155 的寡核苷酸抑制 miR-155, 可减轻 aGVHD 严重程度, 同时延长小鼠的生存期。目前一项为建立 miR-155 在 aGVHD 中重要作用的临床试验正在进行 (临床试验号 NCT01521039)。Leonhardt 等^[22]报道用 miR-100 抗体抑制 miR-100, 增加小鼠的 GVHD 同时缩短了小鼠的寿命, 提示 miR-100 是 aGVHD 的一个保护因素。但文献中没有涉及用 miR-100 的类似物是否会减轻 aGVHD。Stickel 等^[24]研究表明 miR-146a 负向调节供者 T 细胞在 aGVHD, 通过靶向 TRAF6, 降低 TNF 转录。我们可以外源性补充 miR-146a 目标分子的方法来减轻 GVHD, 这为 aGVHD 的治疗提供新的策略。目前, miRNA 用于治疗人类 aGVHD 还处于临床试验阶段, 在动物实验中, miRNA 似乎有很重要的作用, miRNA 在治疗 aGVHD 还是有很广阔的前景, 需要我们进一步深入研究。

五、展望

虽然 miRNA 在 aGVHD 中诊断还处于初期阶段, 但最近的研究表明 miRNA 在诊断、预后和治疗标志有巨大潜力。

将来临床应用中利用 miRNA 功能的知识在 GVHD 的管理和治疗可能发挥重要作用。一旦 miRNA 表达谱建立, miRNA 的功能实验将会评估 miRNA 作为治疗靶点的特异性。这将会给 aGVHD 诊断、治疗带来新的机遇。

参考文献

- [1] Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study[J]. *Blood*, 2005, 106(4):1495-1500.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [3] Alexiou P, Maragkakis M, Papadopoulos GL, et al. The DIANA-mirExTra web server: from gene expression data to microRNA function[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9171.
- [4] Betel D, Wilson M, Gabow A, et al. The microRNA.org resource: targets and expression[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36 (Database issue): D149-D153.
- [5] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1):15-20.
- [6] Sales G, Coppe A, Bisognin A, et al. MAGIA, a web-based tool for miRNA and Genes Integrated Analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue):W352-W359.
- [7] Atarod S, Dickinson AM. MicroRNAs: The Missing Link in the Biology of Graft-Versus-Host Disease? [J]. *Front Immunol*, 2013, 4:420.
- [8] Allantazl F, Cheng DT, Bergauer T, et al. Expression profiling of human immune cell subsets identifies miRNA-mRNA regulatory relationships correlated with cell type specific expression[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e29979.
- [9] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2001, 294(5543):862-864.
- [10] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(9):735-739.
- [11] Banerjee J, Sen CK. MicroRNAs in skin and wound healing[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 936:343-356.
- [12] Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(3):356-362.
- [13] Yi R, Poy MN, Stoffel M, et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness' [J]. *Nature*, 2008, 452(7184):225-229.
- [14] Sand M, Gambichler T, Sand D, et al. MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ [J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 53(3):169-175.
- [15] Du C, Liu C, Kang J, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(12):1252-1259.
- [16] Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2008, 33(3):312-315.
- [17] Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer[J]. *Blood*, 2007, 110(4):1330-1333.
- [18] 刘琳, 王月玲, 王江芬. miR-21、miR-126、miR-143 和 miR-373 在正常宫颈组织、宫颈癌组织及 HeLa 细胞中的表达差异[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2012, 43(4):536-539.
- [19] Yang M, Shen H, Qiu C, et al. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(3):604-615.
- [20] Haasch D, Chen YW, Reilly RM, et al. T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC [J]. *Cell Immunol*, 2002, 217(1-2):78-86.
- [21] Ranganathan P, Heaphy CE, Costinean S, et al. Regulation of acute graft-versus-host disease by microRNA-155 [J]. *Blood*, 2012, 119(20):4786-4797.
- [22] Leonhardt F, Grundmann S, Behe M, et al. Inflammatory neovascularization during graft-versus-host disease is regulated by alpha v integrin and miR-100 [J]. *Blood*, 2013, 121(17):3307-3318.
- [23] Wang L, Romero M, Ratajczak P, et al. Increased apoptosis is linked to severe acute GVHD in patients with Fanconi anemia [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2013, 48(6):849-853.
- [24] Stickel N, Prinz G, Pfeifer D, et al. MiR-146a regulates the TRAF6/TNF-axis in donor T cells during GVHD [J]. *Blood*, 2014, 124(16):2586-2595.
- [25] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, 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.
- [26] Xiao B, Wang Y, Li W, et al. Plasma microRNA signature as a noninvasive biomarker for acute graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2013, 122(19):3365-3375.
- [27] Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2009, 113(2):273-278.
- [28] Efebera Y, Ranganathan P, Yu XY, et al. Serum microRNAs signatures in acute graft versus host disease (aGVHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) *Haematologica* [C]. 18th Congress of the EHA, 2013, 98(S1): P882.
- [29] Xie LN, Zhou F, Liu XM, et al. Serum microRNA155 is increased in patients with acute graft-versus-host disease [J]. *Clin Transplant*, 2014, 28(3):314-323.

(收稿日期:2015-02-05)

(本文编辑:董文革)