

微小 RNA 在脓毒症中的免疫调控

蔡国龙(综述) 严静(审校)

【关键词】 微小 RNA; 炎症; 脓毒症; 免疫麻痹

关于脓毒症的研究在过去的几十年里取得了巨大的进展,但脓毒性休克的病死率仍然居高不下。脓毒症的发生发展机制极其复杂,近些年研究提示其与调节失控的炎症反应有密切关系。美国学者 Bone 提出了著名的代偿性抗炎反应综合征(CARS)假说,指出脓毒症的发生发展是机体促炎与抗炎机制失衡所致,但在脓毒症患者中往往还存在免疫抑制。

尽管关于脓毒症的发生发展机制有诸多的学说,但都仅仅解释了脓毒症的部分发病机制,对临床指导治疗所起的作用有限,所以我们寻找比蛋白水平更加上游的阶段,通过炎症因子的 DNA 转录和 RNA 翻译水平来探索脓毒症机体炎症和免疫失衡的发病机制。微小 RNA (microRNA, miRNA) 已经被证实可在转录后水平调节生物蛋白质表达。研究发现 miRNA 可通过转录后水平下调炎症因子和炎症因子信号通路的受体来调控失衡的炎症反应,有望成为治疗脓毒症的一条更加上游的途径。现就 miRNA 在脓毒症炎症和免疫失衡调节中作用的研究近况进行综述。

1 脓毒症的发病机制

1.1 核转录因子- κ B(NF- κ B)的过度激活:肿瘤坏死因子- α (TNF- α)被认为是引起脓毒症的关键因子之一^[1]。NF- κ B 是多种促炎基因高度转录的必需因子,可以促进与 TNF- α 等炎症因子有关的多种基因转录。脓毒症患者存在明显的 NF- κ B 活化和 TNF- α 过量表达^[2],同时还参与促进细胞凋亡的作用,TNF- α 的大量释放与肾小管细胞凋亡的增加密切

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2010.09.019

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2080662);浙江省医药卫生科研项目(2008A011);浙江省中医药重点项目(2009ZA011)

作者单位:310009 杭州,浙江医院

通信作者:严静,Email:zjicu@vip.163.com

com

相关^[3]。

1.2 失衡的炎症反应:在脓毒症病程的早期,机体释放促炎介质,如 TNF- α 、白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、IL-6、 γ -干扰素(IFN- γ)等,引起机体以炎症反应为主,表现为促炎反应。抗炎介质如 IL-4、IL-10、可溶性 TNF 受体及蛋白激酶 C 可拮抗促炎介质的释放,防止过度炎症反应。若二者的拮抗作用弱,机体表现为过度炎症反应,引起全身炎症反应综合征(SIRS)及血管内皮损伤,进一步发展则出现多器官功能障碍。

1.3 免疫麻痹:部分脓毒症患者可出现低水平的炎症反应,即免疫麻痹,由此可迅速出现难以控制的继发性感染,也是引起脓毒症患者死亡的原因之一。美国学者 Bone^[4]1996 年就提出脓毒症的发展是机体促炎和抗炎机制失衡所致。但人们采用抗内毒素抗体、TNF 拮抗剂、IL-1 受体拮抗剂等治疗脓毒症,并未取得预期的效果^[5]。进一步深入研究表明,当致病微生物侵入或损伤组织后可迅速激活机体非特异性免疫系统,释放大量的糖皮质激素、儿茶酚胺和 TNF- α 、IL-1 等促炎细胞因子。而与此同时,还存在特异性免疫功能障碍,即免疫麻痹。林洪远等^[1]研究证明了单核细胞人白细胞 DR 抗原(HLA-DR/CD14)具有鉴别脓毒症免疫麻痹的作用,同时还显示了 5-胸腺肽可能具有对抗免疫麻痹的作用。

2 miRNA

miRNA 是一类含有 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA,通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区(3'UTR)不完全性互补配对,介导转录后基因的调控,能够在转录后水平调节 mRNA,使之降解或抑制其翻译,从而调节蛋白质的合成,达到调控基因表达的目的。miRNA 的表达具有空间和时间上的特异性,是调控其他功能基因表达的重要物质,同时与人类多种疾病有密切关系,如肿瘤^[6]、心脏病^[7]。近来研究显示,miRNA 广泛参与 SIRS 及脓毒性休克的免疫调控机制。

2.1 miRNA 的发现和定位:1993 年, Lee 等^[8]在秀丽新小杆线虫中发现了第 1 个可时序调控胚胎后期发育的基因 lin-4;2000 年,Reinhart 等^[9]又在该线虫中发现第 2 个异时性开关基因 let-7;2001 年 10 月 Science 报道了 3 个实验室分别从线虫、果蝇和人体内找到的几十个类似于 lin-4 的小 RNA 基因,称之为 miRNA。到目前为止,根据 miRNA Registry(miRNA 数据登记库)公布的数据,仅仅在人体内就大约存在有 851 个 miRNA (Release 13.0, March, 2009),而通过某些计算机手段预测出来的 miRNA 数目更远远大于此,约多达 1 000 个甚至可能更多,大约覆盖了 3% 人类基因组序列^[10-12]。在人和小鼠,某些 miRNA 具有独立的启动子和增强子,能够独立完成自身的转录过程,另外,还有大约 40% 和 10% 的 miRNA 基因分别定位于已知的蛋白编码与非蛋白编码基因的内含子区域和外显子区域,这些 miRNA 大多是通过相同的启动子和调控元件与宿主基因共转录,后再从宿主基因上剪切下来^[13]。

2.2 miRNA 的生物合成、作用机制及功能:目前人们对动物体内 miRNA 的生物合成过程已经有了较为详尽的了解。miRNA 大多数是在 RNA 聚合酶 I 作用下首先合成 miRNA 初级转录产物(pri-miRNA),然后经过核糖核酸内切酶 III Drosha 进行第一步剪切后形成长度约 60~80 个碱基、含茎环结构的前 miRNA (pre-miRNA),再通过依赖 Exportin-5 的转运机制将 pre-miRNA 转运出核,而后在另一类核糖核酸内切酶 III Dicer 的进一步切割作用下产生长度约 22 个碱基的成熟 miRNA,这些成熟的 miRNA 可与其他蛋白质一起组成 RNA 诱导沉默复合体(RISC),通过核酸序列互补与靶基因 mRNA 结合,发挥抑制靶基因 mRNA 翻译或降解靶基因 mRNA 的作用^[14]。

目前已有研究结果显示,miRNA 广泛参与了人体生长、分化、免疫应答及炎

症反应等生理过程^[15],而且其表达及功能失调可能导致肿瘤、白血病和 SIRS 等多种病理现象的发生^[15-16]。

3 miRNA 在炎症反应及免疫调节中的作用

在脓毒症发生过程中,miRNA 参与调控多种致炎基因、转录因子的表达与抑制;多种炎性细胞的增殖、分化、凋亡;各种细胞因子及炎症介质的产生、释放和各种炎症因子受体的表达。通过实验研究人们已经认识到,miRNA 在调节脓毒症炎症反应中起到了重要的作用。当机体通过 Toll 样受体(TLR)识别病原体后,体内 miRNA-146、miRNA-155 和 miRNA-223 升高可以调节急性炎症反应;同样,miRNA-16 在炎性细胞及组织中也呈高表达^[17-19];而 miRNA-155、miRNA-181 主要是通过调节 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的功能来实现免疫调节的作用^[20-21]。还有一些 miRNA 通过调控靶蛋白和靶通道,显示出直接的抗病毒作用^[22]。

3.1 miRNA-146:有研究证明 NF- κ B 在脂多糖(LPS)、TNF、IL-1 β 刺激后 miRNA-146 诱导与表达中起十分重要的作用,此外还确定了肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)和白细胞介素受体(IRAK1)的 mRNA 是 miRNA-146 潜在的靶分子。Taganov 等^[17]根据软件预测发现,用 LPS 刺激人单核细胞株白血病细胞(THP-1)后,以芯片技术检测了 200 个成熟 miRNA 的表达,发现 3 个 miRNA (miRNA-132、miRNA-146、miRNA-155)表达水平升高。观察 miRNA-146 对其他 TLR 配体和一些细胞因子刺激的反应情况,结果显示 TLR2、TLR4 和 TLR5 的配体可以明显刺激 miRNA-146 表达上调,负向调节 IRAK1 或 TRAF6 而下调 IL-1 β 诱导的 IL-8 和趋化因子(RANTES),从而达到负向调节炎症反应的作用^[22]。而这种负向调节作用只有在 IL-1 β 表达很高时才会出现,因此,可以认为,在严重的炎症反应作用下才会刺激 miRNA-146 表达来负向调节炎症反应,所以这样的反应在严重感染导致的脓毒症中具有重要的作用。miRNA-146 对于炎症反应的负向调节系统是细菌及其分解代谢产物通过 MYD88 复合途径激活 NF- κ B 启动炎症反应,一方面,可使各种炎症介质表达分泌增加以扩大炎症反应,另一方面,

NF- κ B 使 miRNA-146 表达增多以下调 TRAF6 和 IRAK1 蛋白水平,从而负向调节炎症反应;同时还发现,哺乳动物细胞中 miRNA-16 能够直接结合 TNF- α mRNA 的 ARE 区域,降低 mRNA 的稳定性并促进其降解,转染 miRNA-16 序列特异性互补寡核苷酸片段则能逆转这种作用^[20]。

3.2 miRNA-16:研究显示 miRNA-16 在发生炎症的组织 and 细胞中高表达,如巨噬细胞、中性粒细胞、B 淋巴细胞、T 淋巴细胞,根据这种在炎性细胞中的高表达现象,推测 miRNA-16 可能具有防止炎症“瀑布反应”过度扩大的作用^[18]。有文献报道 miRNA-16 对于加速降解多种炎症介质是必须的^[18]。

3.3 miRNA-155:miRNA-155 系 BIC 基因的表达产物,其主要产生于活化的 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞、树突细胞等。miRNA-155 在转基因 B 淋巴细胞瘤的小鼠细胞中过度表达,推测其可能与 B 淋巴细胞的增殖和分化有关。Rodriguez 等^[21]利用转基因技术敲除了小鼠体内的 BIC 基因,结果发现 BIC/miRNA-155 基因缺失的小鼠淋巴结生发中心内成熟 B 淋巴细胞生成明显减少,同时抗原刺激后抗体水平明显降低。进一步研究证实,miRNA-155 能够促进 B 淋巴细胞增殖及细胞因子如 TNF- α 的表达。体外实验还证实,miRNA-155 能够影响辅助性 T 细胞(Th1、Th2)的功能,对活化 T 淋巴细胞分泌的细胞因子具有一定的调节作用^[21]。

3.4 miRNA-181:2004 年 Chen 等^[23]将 miRNA-181a 转入造血前体祖细胞,观察其在体外的分化过程,结果显示 miRNA-181a 过表达后,B 淋巴细胞数目显著上升,推测 miRNA-181a 可能是 B 淋巴细胞分化的阳性调节因子。将上述过表达的 miRNA-181a 前体祖细胞转入经致死性放射治疗的小鼠体内,发现 miRNA-181a 不仅促使了 B 淋巴细胞的分化,同时伴随有外周血 T 淋巴细胞数目降低,尤其是 CD8⁺ T 淋巴细胞,提示 miRNA-181a 在体内环境下同时参与了 T 淋巴细胞的发育过程。进一步的研究显示 miRNA-181 还可能参与控制抗体的产生^[19]。

3.5 其他:还有一些 miRNA 参与调控炎症、免疫系统。miRNA-150 基因的缺失可引起 B 淋巴细胞的扩增水平下降,

miRNA-150 在病原微生物刺激自然免疫系统后可增加血清中免疫球蛋白水平,同时也可以增强独立 T 淋巴细胞的免疫反应^[24]。miRNA-223 是骨髓特异性 miRNA,它的缺失引起中性粒细胞前体细胞的增加和中性粒细胞的成熟障碍,也减弱了中性粒细胞对真菌感染的反应^[25]。以上这些说明 miRNA 对骨髓系和自然免疫系统的成熟与免疫细胞的功能有十分重要的作用。

4 可能的临床作用及展望

4.1 通过早期预防性给予高危脓毒症风险的患者调节免疫的 miRNA,在上游阶段调节炎症免疫的平衡,以防止炎症“瀑布效应”的扩大。

4.2 在已发生脓毒性休克的患者中,可以通过给予患者负向调节炎症细胞因子的 miRNA (如 miRNA-146、miRNA-16、miRNA-132),从转录后水平来减少各种炎症细胞因子的产生与释放,抑制过度炎症反应。

4.3 给予有免疫麻痹的脓毒症患者补充促进免疫细胞分化与成熟的 miRNA (如 miRNA-155),以促进 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞的成熟,可以对抗脓毒症中出现的特异性免疫抑制,从整体角度来调节免疫平衡。

综上所述,miRNA 有可能从脓毒症发生前高危患者的预防、发生后的各种炎症细胞因子表达下调及整体炎症免疫调节方面使患者炎症反应趋于平衡。miRNA 对人类炎症与免疫影响的研究还处在初级阶段,应该还有更多的脓毒症相关 miRNA 参与炎症免疫的调节。目前已发现的脓毒症相关 miRNA 还没有完全精确地定位其靶部位;对下游表达产物的变化有哪些影响,各个 miRNA 之间如何相互作用、相互影响等问题都处在起步阶段。相信随着对 miRNA 了解的不断深入,对脓毒症的治疗将开辟一条在蛋白表达上游更为早期的分子生物学治疗方法,为脓毒症患者带来新的希望。

参考文献

- [1] 林洪远,郭旭生,姚咏明,等. CD14⁺ 单核细胞人类白细胞抗原-DR 预测脓毒症预后及指导免疫调节治疗的初步临床研究. 中国危重病急救医学, 2003, 15:135-138.
- [2] 李志军. 菌毒炎并治与多器官功能障碍综合征. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11:381-383.

[3] 张斌,任延波,蒋丽. 脓毒症早期大鼠肾脏细胞凋亡及炎症细胞因子的变化. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 89-91.

[4] Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit Care Med, 1996, 24: 1125-1128.

[5] Warren HS. Strategies for the treatment of sepsis. N Eng J Med, 1997, 336: 952-953.

[6] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-27 microRNA family. Cell, 2005, 120: 635-647.

[7] Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 18255-18260.

[8] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 1993, 75: 843-854.

[9] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature, 2000, 403: 901-906.

[10] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. Nat Genet, 2005, 37: 766-770.

[11] Berezhikov E, Guryev V, van de Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. Cell, 2005, 120: 21-24.

[12] Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. Cell, 2006, 126: 1203-1217.

[13] Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. Trends Biochem Sci, 2007, 32: 189-197.

[14] Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D, et al. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. Immunity, 2007, 26: 133-137.

[15] Du T, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development, 2005, 132: 4645-4652.

[16] Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. Semin Oncol, 2006, 33: 167-173.

[17] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappa B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 12481-12486.

[18] Linsley PS, Schelter J, Burchard J, et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. Mol Cell Biol, 2007, 27: 2240-2252.

[19] Li QJ, Chau J, Ebert PJ, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. Cell, 2007, 129: 147-161.

[20] Jing Q, Huang S, Guth S, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. Cell, 2005, 120: 623-634.

[21] Rodriguez A, Vigorito E, Ciare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. Science, 2007, 316: 608-611.

[22] Perry MM, Moschos SA, Williams AE, et al. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. J Immunol, 2008, 180: 5689-5698.

[23] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science, 2004, 303: 83-86.

[24] Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. Cell, 2007, 131: 146-159.

[25] Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. Nature, 2008, 451: 1125-1129.

(收稿日期: 2009-12-01)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅 2010 年《中国中西医结合急救杂志》

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办的全国性科技期刊(为中国中西医结合学会系列杂志之一,由《中西医结合实用临床急救》杂志更名),是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊,已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊,64 页,16 开大版本,80 克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2010 年的订阅手续,邮发代号:6-93,定价:每期 10.00 元,全年 60.00 元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。

《中国中西医结合急救杂志》已经进入美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)、美国《乌利希期刊指南》(UPD)、万方数据网络系统(China Info)万方网医学网、中国期刊网、中国知网(CNKI)、em120.com 危重病急救在线以及国家中医药管理局中国传统医药信息网(<http://www.MedicineChina.com>)。投本论论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者亲笔在版权转让协议和投稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。

《中国中西医结合急救杂志》开设有述评、专题讨论、博士论坛、论著、研究报告、经验交流、病例报告、治则·方剂·针灸、基层园地、临床病理(病例)讨论、消息、读者·作者·编者等栏目,欢迎广大作者踊跃投稿。同时,本刊倡导学术争鸣,对所投稿件将予以重视,优先考虑。

2010 年以前的合订本和单行本请在杂志社发行部电话订阅:022-23197150。

地址:天津市和平区睦南道 122 号;邮编:300050。

(期刊编辑部)