

miRNA在肠道病毒71型手足口病诊断及治疗中的应用

邹容容¹ 张国良² 李建明² 刘映霞¹

【摘要】 自2008年以来,手足口病(HFMD)疫情在我国多个地区流行,给我国公共卫生局面带来巨大挑战,而肠道病毒71型(EV71)是引起手足口病的主要病原体之一。微小RNA(microRNA)作为一种非编码单链RNA分子,通过调节病毒复制和基因表达在多种病毒感染性疾病的发生、发展和预后中发挥重要作用。本文就miRNA分子在EV71型HFMD诊断、治疗中的作用和研究进展作以综述。

【关键词】 微小RNA; 肠道病毒71型; 手足口病

The application of miRNA in the diagnosis and treatment of hand, foot and mouth disease with EV71 infection Zou Rongrong¹, Zhang Guoliang², Li Jianming², Liu Yingxia¹. ¹Department of Infectious Diseases, Shenzhen The Third People's Hospital, University of South China, Shenzhen 518112, China; ²The Third Affiliated Clinical College of Shenzhen University, Shenzhen 518112, China

Corresponding author: Liu yingxia, Email: yingxialiu@hotmail.com

【Abstract】 Hand, foot and mouth disease (HFMD) is widely spread in China since 2008 and gives challenge to public health, and Enterovirus 71 (EV71) is one of the main pathogens of HFMD. As a non-coding, single stranded RNA, the miRNA (microRNA) plays important roles in virus infected diseases through regulating virus replication and gene expression. This paper reviewed about the application of miRNA in the diagnosis and treatment of HFMD with EV71 infection.

【Key words】 miRNA; Enterovirus 71 (EV71); Hand, mouth and foot disease (HFMD)

肠道病毒71型(EV71)是引起手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)的主要病原体之一^[1]。由于EV71引起的HFMD神经系统并发症(如无菌性脑膜炎、脑干脑炎和神经源性肺水肿等)甚至死亡较其他肠道病毒更为多见^[2];在过去20年里, EV71在东南亚暴发流行,已被认为是在根除脊髓灰质炎后对人类影响最大的肠道病毒^[3-4];另外,由于尚无有效的疫苗和抗病毒药物治疗EV71感染,故EV71型HFMD已引起人们的广泛关注。

microRNA(miRNA)是一种高度保守的长约21~23个核苷酸的非编码单链RNA分子,广泛存在于各种原核和真核生物中^[5]。已有研究表明,miRNA在调节病毒复制和基因表达方面扮演着重要角色^[6-7]。且miRNA作为一种新的分子标识用于疾病诊断已经在感染性疾病中有深入研究^[8-9]。现就EV71感染诱导/抑制miRNA表达及机制以及miRNA在诊断、治疗EV71型HFMD中的应用作以综述。

一、EV71感染诱导/抑制miRNA表达及机制

EV71可以诱导或抑制miRNA的表达,如Lui等^[10]研究发现DGCR8是miRNA的重要辅助因子,在EV71发病机理中发挥重要作用。在抑制DGCR8基因表达的人结直肠腺癌细胞系HT29细胞中, EV71不能有效地复制。EV71感染后可以改变宿主细胞miRNA的构成,特别是EV71可以上调miR-548为病毒复制提供舒适的细胞微环境。EV71感染后, EV71能调节宿主细胞miRNA的转录及加工处理,故EV71可能通过下调抑制其复制的宿主细胞miRNA和上调增强其复制的宿主细胞miRNA来增强其在宿主细胞中的复制能力。在EV71感染的抑制DGCR8基因表达的HT29细胞中,宿主细胞的先天性免疫反应及信号通路会改变,如Toll样受体信号通路、Nod样受体信号通路、RIG-1样受体信号通路和I型干扰素(type I interferon, type I IFN)信号通路。与EV71感染的正常HT29细胞相比,这些抗病毒信号通路均明显增强,而这些通路中的CASP1、OAS2、DDX58、DHX58、CCL5、CXCL10、CXCL11、IRF7、IFBB1、ISG15、MX1和STAT1基因表达升高更为显著。提示EV71通过抑制先天性免疫反应及信号通路,特别是抑制相关基因的表达上调miR-548。Xu等^[11]研究发现EV71感染后通过干扰素调节因子依赖机制上调巨噬细胞中miR-526a的表达。miR-526a

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.01.002

基金项目: 广东省医学科研基金(No. A2014519); 深圳市新发传染病重点专科基金(No. 201161); 深圳市科技计划项目(No. JCYJ20140411112047888)

作者单位: 518112 深圳市, 南华大学深圳市第三人民医院感染科¹; 深圳大学附属第三临床学院感染科²

通讯作者: 刘映霞, Email: yingxialiu@hotmail.com

可以促进type I IFN的产生进而抑制EV71复制,其机制为miR-526a抑制肿瘤抑制因子CYLD的表达从而增强维A酸诱导的基因1 K63泛素化。同时表明, EV71的3C蛋白可以阻碍EV71诱导的miR-526a上调和CYLD下调。提示EV71通过干扰素调节因子依赖机制上调巨噬细胞中miR-526a的表达,而其本身的3C蛋白可以阻碍miR-526a上调。Zheng等^[12]研究发现在EV71感染的人横纹肌肉瘤细胞和人神经母细胞瘤细胞中miR-296-5p表达显著增高; Xu等^[13]研究发现在EV71感染的人神经母细胞瘤细胞中miR-1246特异性表达增高; Zhang等^[14]研究发现在EV71感染的细胞中miR-27a表达显著降低; Wen等^[15]发现在细胞感染EV71病毒后miR-23b表达明显降低; Ho等^[16]发现肠道病毒诱导miR-141的表达; Ho等^[17]发现EV71感染后可以上调miR-146a的表达; 而其对EV71诱导或抑制miRNA表达的机制尚未研究。总之, EV71感染后可以诱导/抑制miRNA表达,其机制可能是抑制先天性免疫反应及信号通路如Toll样受体信号通路、Nod样受体信号通路、RIG-I样受体信号通路type I IFN信号通路,特别是抑制相关基因的表达如CASP1、OAS2、DDX58、DHX58、CCL5、CXCL10、CXCL11、IRF7、IFBB1、ISG15、MX1、STAT1和干扰素调节因子; 而EV71的3C蛋白可以抑制miRNA的表达。

二、miRNA在EV71手足口病诊断及鉴别诊断中的应用

对于病毒感染,使用最普遍的分子诊断方法就是RT-PCR,该方法基于特定病原体的基因序列进行反转录,再PCR扩增,最后用探针进行qPCR测定,然而病毒基因突变可以造成假阴性。miRNA作为一种新的非侵蚀生物标志已经在诊断EV71感染中被研究,如江苏省疾病预防控制中心王华课题组^[18]使用ROC曲线分析表明6个miRNA(miR-148a、miR-143、miR-324-3p、miR-628-3p、miR-140-5p和miR-362-3p)能有效地从健康对照中区分肠道病毒感染者,且曲线下面积达0.828~0.934。Logistic回归分析表明,联合这6个miRNA分子不仅诊断肠道病毒感染的敏感性和特异性分别为97.1%和92.7%,且还能从其他微生物感染者中明显区分肠道病毒感染。CoxA16感染者中5个miRNA(miR-148a、miR-143、miR-324-3p、miR-545和miR-140-5p)表达水平显著高于EV71感染者($P < 0.05$)。联合miR-545、miR-324-3p和miR-143能有效地区分CoxA16和EV71感染,曲线下面积为0.761。不同亚型肠道病毒感染者的血清miRNA表达谱不同,血清miRNA表达谱有可能作为有效的生物标记诊断不同亚型的肠道病毒感染。该课题组的另一篇研究也表明EV71感染Hep2细胞后, Hep2细胞miRNA表达谱会改变^[19]。Bian等^[20]研究表明在EV71感染人横纹肌肉瘤细胞后宿主miRNA会特异性改变。因此,寻找特异性miRNA分子有望用于EV71感染的诊断,进一步或可用于重症EV71感染的诊断或预警标志。

三、miRNA可以作为预测EV71治疗转归的生物标记

miRNA在抑制EV71复制以及机制探讨方面已经有较深入的研究,如Zheng等^[12]发现在EV71感染的人横纹肌肉瘤细胞和人神经母细胞瘤细胞中miR-296-5p表达显著增高,人横纹肌肉瘤细胞中过表达miR-296-5p抑制EV71复制,而抑制miR-296-5p表达促进EV71复制;同时发现miR-296-5p以病毒基因作为靶点阻止EV71的复制,而病毒突变可以逃避细胞miRNA对病毒的抑制作用。Xu等^[13]研究发现在EV71感染的人神经母细胞瘤细胞中miR-1246特异性表达增高,然而抑制miR-1246的表达并不影响EV71复制。基于人类V2.0全基因组寡核苷酸微阵列芯片同时分析mRNA和miRNA发现DLG3基因与神经功能障碍有关,进一步序列分析和荧光素酶报告实验表明miR-1246直接作用于DLG3基因的3'-端非编码区,在EV71感染人神经母细胞瘤细胞中下调miR-1246导致DLG3基因表达明显改变。以上结果表明, EV71感染神经母细胞瘤细胞中miR-1246通过调节DLG3基因在EV71神经系统发病机制中扮演重要角色。Zhang等^[14]研究发现在EV71感染的细胞中miR-27a表达显著降低,而过表达miR-27a抑制EV71复制,通过生物信息学分析和荧光素酶报告实验表明miR-27a的靶基因是EGFR的mRNA,进一步发现miR-27a通过降低Akt和ERK的磷酸化阻碍EGFR的表达而这可以促进EV71病毒复制。Wen等^[15]研究发现在细胞感染EV71后miR-23b表达显著降低,进一步发现过表达的miR-23b通过作用于EV71 3'-端保守序列阻止EV71的复制,总之miR-23b通过下调EV71 VP1蛋白阻止EV71的复制。Li等^[21]研究发现miR-548的靶点是IFN- λ 1基因的3'-端非编码区, miR-548可下调IFN- λ 1的表达,而miR-548抑制剂可上调IFN- λ 1及IFN相关基因表达。同时发现miR-548促进EV71感染,抑制miR-548表达明显抑制EV71复制, EV71感染后miR-548水平显著降低。这些结果表明miR-548直接作用于IFN- λ 1基因的3'-端非编码区调节宿主抗病毒反应。杨倬等^[22]发现miR-373和miR-542-5p通过作用于5'-端非编码区基因抑制EV71的复制,同时表明miRNA在宿主与病原体相互作用中起重要作用。Li等^[21]研究发现肠道病毒诱导miR-141的表达, miR-141通过作用于真核起始因子eIF4E阻止宿主蛋白合成。抑制miR-141的表达可以减少病毒增殖,而沉默eIF4E基因可以完全逆转抑制miR-141的表达所带来的抑制病毒增殖方面的影响。提示上调miR-141通过作用eIF4E阻止宿主蛋白合成进而促进EV71增殖,而下调miR-141抑制EV71增殖。Ho等^[17]研究发现在EV71感染后可以上调miR-146a的表达, miR-146a的靶点是白细胞介素-1受体相关激酶1 (IRAK1) 和泛素连接酶TRAF6,而IRAK1和TRAF6参与Toll样受体信号通路和I型干扰素的产生。进一步研究发现EV71的核转录因子激活蛋白-1 (AP1) 可以诱导miR-146a的表达,抑制miR-146a或通过特异性的抑制

剂中和病毒引导的miR-146a可以恢复IRAK1和TRAF6的表达、增加干扰素 β 的产生、抑制病毒增殖和增加小鼠的存活率。肠道病毒引导的miR-146a通过抑制干扰素的产生促进EV71的复制。以上研究表明,miRNA可以通过多种机制抑制EV71的复制,未来有望作为预测EV71治疗转归的生物标记。

四、结语

目前EV71型HFMD的防控情势仍然严峻,严重威胁着儿童的生命健康。对于miRNA作为EV71感染的诊断标记,江苏省疾病预防控制中心王华课题组仅检测了血浆中miRNA的表达水平,而PBMC中的表达水平或单一免疫细胞中的表达水平并未检测,有可能更适合作为诊断EV71感染的诊断标记。EV71感染后可以诱导/抑制miRNA表达,其机制可能是抑制先天性免疫反应及信号通路如Toll样受体信号通路、Nod样受体信号通路、RIG-1样受体信号通路和type I IFN信号通路,特别是抑制相关基因的表达如CASP1、OAS2、DDX58、DHX58、CCL5、CXCL10、CXCL11、IRF7、IFBB1、ISG15、MX1、STAT1和干扰素调节因子;而EV71的3C蛋白可以阻碍miRNA的表达。通过抑制相关基因可以诱导/抑制miRNA表达,而miRNA通过以病毒基因、DLG3基因3'-端非编码区、EV71 3'-端保守序列、IFN- λ 1基因的3'-端非编码区、5'-端非编码区、真核起始因子eIF4E、IRAK1和泛素连接酶TRAF6等作为靶点,或通过降低Akt和ERK的磷酸化阻碍EGFR的表达等抑制EV71的复制,而这些靶点可能作为潜在的治疗靶点用于EV71型HFMD的治疗。随着miRNA在EV71型HFMD研究的深入,miRNA在诊断和治疗EV71方面必将发挥重要作用。

参 考 文 献

- 1 Yang F, Zhang T, Hu Y, et al. Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in China, 2009[J]. J Virol, 2011,8(1):508-511.
- 2 Chang LY, Lin TY, Hsu KH, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot and mouth disease[J]. Lancet, 1999,354(9191):1682-1686.
- 3 Shimizu H, Utama A, Yoshii K, et al. Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998[J]. Jpn J Infect Dis, 1999,52(1):12-15.
- 4 Yang F, Ren L, Xiong Z, et al. Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008[J]. J Clin Microbiol, 2009,47(7):2351-2352.
- 5 Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe[J]. Nat Rev Genet, 2009,10(2):94-108.
- 6 Berkhout B, Jeang KT. RISCy business: microRNAs, pathogenesis, and viruses[J]. J Biol Chem, 2007,282(37):26641-26645.
- 7 Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections[J]. Nat Rev Genet, 2005,6(3):206-220.
- 8 Li S, Zhu J, Zhang W, et al. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection[J]. Circulation, 2011,124(2):175-184.
- 9 Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis[J]. PLoS One, 2009,4(10):e7405.
- 10 Lui YL, Tan TL, Woo WH, et al. Enterovirus 71 (EV71) utilise host microRNAs to mediate host immune system enhancing survival during infection[J]. PLoS One, 2014,9(7):e102997.
- 11 Xu C, He X, Zheng Z, et al. Downregulation of microRNA miR-526a by enterovirus inhibits RIG-I-dependent innate immune response[J]. J Virol, 2014,88(19):11356-11368.
- 12 Zheng Z, Ke X, Wang M, et al. Human microRNA hsa-miR-296-5p suppresses enterovirus 71 replication by targeting the viral genome[J]. J Virol, 2013,87(10):5645-5656.
- 13 Xu LJ, Jiang T, Zhao W, et al. Parallel mRNA and microRNA profiling of HEV71-infected human neuroblastoma cells reveal the up-regulation of miR-1246 in association with DLG3 repression[J]. PLoS One, 2014,9(4):e95272.
- 14 Zhang L, Chen X, Shi Y, et al. miR-27a suppresses EV71 replication by directly targeting EGFR[J]. Virus Genes, 2014,49(3):373-382.
- 15 Wen BP, Dai HJ, Yang YH, et al. MicroRNA-23b inhibits enterovirus 71 replication through downregulation of EV71 VP1 protein[J]. Intervirology, 2013,56(3):195-200.
- 16 Ho BC, Yu SL, Chen JJ, et al. Enterovirus-induced miR-141 contributes to shutoff of host protein translation by targeting the translation initiation factor eIF4E[J]. Cell Host Microbe, 2011,9(1):58-69.
- 17 Ho BC, Yu IS, Lu LF, et al. Inhibition of miR-146a prevents enterovirus-induced death by restoring the production of type interferon[J]. Nat Commun, 2014,5:3344.
- 18 Cui L, Qi Y, Li H, et al. Serum microRNA expression profile distinguishes enterovirus 71 and Cocksackievirus 16 infections in patients with hand-foot-and-mouth disease[J]. PLoS One, 2011,6(11):e27071.
- 19 Cui L, Guo X, Qi Y, et al. Identification of microRNAs involved in the host response to enterovirus 71 infection by a deep sequencing approach[J]. J Biomed Biotechnol, 2010,2010:425939.
- 20 Bian L, Wang Y, Liu Q, et al. Prediction of signaling pathways involved in enterovirus 71 infection by algorithm analysis based on miRNA profiles and their target genes[J]. Arch Virol, 2015,160(1):173-182.
- 21 Li Y, Xie J, Xu X, et al. MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN- λ 1[J]. Protein Cell, 2013,4(2):130-141.
- 22 杨倬, 田波. miR373和miR542-5p调控肠道病毒71型在人横纹肌肉瘤细胞中的复制[J]. 生物工程学报, 2014,30(6):943-953.

(收稿日期: 2015-03-27)

(本文编辑: 孙荣华)

邹容容, 张国良, 李建明, 等. miRNA在肠道病毒71型手足口病诊断及治疗中的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2016,10(1):10-12.