

MicroRNA在同种及异种移植免疫排斥监测中的研究进展及应用前景

林善 陆赢 蔡志明 戴一凡 牟丽莎

【摘要】 细胞、组织及器官移植是治疗器官功能衰竭、癌症等重大疾病直接有效的治疗策略。免疫排斥是同种及异种移植研究领域难以彻底攻克的难题，因此对移植受体免疫排斥反应的实时监测尤为重要，针对同种及异种移植开发具有特异度高、早期灵敏度高、非侵入、快速等优点的生物标志物及其监测方法非常迫切。微小核糖核酸（miRNA）在免疫细胞的生成、发育以及免疫性功能中发挥重要的作用。本文对常规免疫排斥监测方法的局限性、miRNA的生物学特性以及miRNA在同种和异种移植免疫排斥中的应用进行总结，以探讨miRNA在同种和异种移植免疫排斥监测中的应用前景。

【关键词】 同种移植；异种移植；器官功能衰竭；免疫排斥；生物标志物；微小核糖核酸（miRNA）；免疫细胞

【中图分类号】 R617, R392.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2018) 03-0001-05



作者简介：蔡志明，主任医师、教授、博士研究生导师。现任深圳大学泌尿生殖研究所所长，国家泌尿生殖肿瘤中心副主任，国家地方联合肿瘤工程实验室主任，广东省泌尿生殖肿瘤重点实验室主任，国家“973”计划首席科学家，教育部“长江学者计划”、中共中央组织部“千人计划”等高层次人才评审专家，享受国务院特殊津贴。作为负责人先后承担国家“973”计划、“863”计划、国家自然科学基金、博士点基金等研究项目15项；发表SCI论文170多篇，总影响因子超过1100分，他引频次超过6500次，在《Nature》、《Nature Genetics》、《Nature Biotechnology》和《Cell》等国际著名刊物发表论文7篇；出版著作4部，获得国家、省、市奖项9项；培养硕士、博士（后）100多名。获全国先进工作者、全国优秀院长、深圳市科技奖市长奖等荣誉称号。

细胞、组织及器官移植是治疗器官功能衰竭、癌症等重大疾病直接有效的治疗策略。目前，同种移植在临床上应用广泛，然而我国乃至全世界都面临着供体严重短缺的局面^[1]。异种移植是解决人类供体短缺较为有效的途径，可挽救大量因器官功能衰竭而死亡的患者^[2-5]。近期研究指出，将基因改造猪的心

脏移植到狒狒体内后，移植心脏最长可存活945 d^[6]；将猪的肾脏移植到狒狒体内后，移植肾可存活约10个月^[7]；将猪的胰岛移植到糖尿病灵长类动物体内后，可维持血糖稳定超过804 d^[8]。尽管如此，免疫排斥反应仍然是同种及异种移植中难以彻底攻克的问题，因此对移植宿主免疫排斥反应的实时监测尤为

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.03.001

基金项目：国家重点研发计划（2017YFC1103704）；深圳市医疗卫生三名工程（SZSM201412020）；深圳市高水平医学学科建设专项基金（2016031638）；深圳市科技计划（JCJY20160229204849975、GJHZ20170314171357556）；深圳市卫生计生系统科研项目（SZXJ2017021）

作者单位：510275 广州，中山大学（林善、陆赢、牟丽莎）；深圳市第二人民医院（林善、陆赢、蔡志明、牟丽莎）；南京医科大学（戴一凡）

作者简介：林善，男，1989年生，博士，助理研究员，研究方向为异种胰岛移植，Email: biotechlin@foxmail.com

通讯作者：蔡志明，男，1956年生，博士，主任医师，研究方向为异种胰岛移植，Email: caizhiming2000@163.com；牟丽莎，女，1983年生，博士，副研究员，研究方向为异种胰岛移植，Email: molly__molly@163.com

重要。目前,对同种及异种移植免疫排斥反应的监测方法较为缺乏,针对同种及异种移植免疫排斥开发具有特异度高、早期灵敏度高、非侵入、快速、稳定等优点的生物标志物及其监测方法具有实际迫切性。

近年来发现,微小核糖核酸(microRNA, miRNA, miR)是一类免疫调控因子,它能够通过参与固有性免疫应答以及炎症反应的调控,在免疫细胞的生成、发育以及免疫性功能中发挥重要的作用。因此,miRNA作为一种新的同种及异种移植免疫排斥标志物具有广阔的应用前景。

1 常规免疫排斥监测方法的局限性

移植免疫排斥反应的临床诊断主要依赖于患者临床症状、病理学活组织检查(活检)及实验室检查等,但其具有各自明显的局限性。患者临床症状具有非特异性、主观性强以及相对滞后性等缺点。病理学活检是诊断免疫排斥反应的“金标准”^[9-10],但其具有侵入性、检测费用高等缺点。实验室检查可反映患者的免疫状态,但其有灵敏度及特异度低等缺点^[11-12]。

2 miRNA 的生物学特性

理想的生物标志物应具有易获取、高灵敏度和特异度、无创性等特点。机体衰老细胞、肿瘤细胞、异体(种)细胞在免疫效应细胞和细胞因子等的共同作用下发生凋亡或坏死^[13],可释放 miRNA 等细胞组分。miRNA 是一类长度大约为 23 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它们在 RNA 沉默和转录后调控基因表达中发挥着重要作用,并参与动物和植物的转录后基因表达调控。由于 miRNA 具有稳定性、器官组织特异性以及参与免疫反应的特点,因此它可用于监测同种及异种移植免疫排斥反应^[14-16]。

2.1 miRNA 易于被检测

2008 年, Lawrie 等^[17]发现人类血清中含有 miRNA,并发现血清 miR-21 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者中的表达水平上调。另有研究表明,miRNA 水平的波动可以间接反映人体的生理状况,并早于疾病的临床诊断,因而能在疾病的诊断和预测中发挥重要的作用^[18]。目前 miRNA 的主要检测手段包括高通量测序、miRNA 芯片以及微滴数字聚合酶链反应(droplet digital PCR, ddPCR)等。

2.2 miRNA 具有稳定性

多数情况下,miRNA 在血液或血清中比较稳定。

miRNA 可以被包裹在外泌体、微囊或凋亡体中,而这些膜结构能有效地保护 miRNA^[19]。研究表明,外周血中的 miRNA 通常被包裹在细胞分泌的微泡中,可避免被周围环境中的 RNA 酶降解,从而在血液中以较稳定的形式存在^[20]。另有研究表明,尽管外周血温度以及 pH 值变化剧烈,miRNA 还是能长时间稳定存在其中,其机制可能是 miRNA 通过与 AGO 蛋白结合的形式存在于外周血中^[21]。

2.3 miRNA 具有组织器官特异性

不同器官的肿瘤组织中,miRNA 的表达水平存在较大差别,提示 miRNA 在不同肿瘤组织中存在显著差异这一特性可为临床诊断提供有价值的信息^[15]。Tian 等^[22]研究发现除肾脏中的 miRNA 和其他器官存在显著差异外,肾皮质与髓质间的 miRNA 也存在显著差别,表明 miRNA 具有显著的组织器官特异性。

2.4 miRNA 具有免疫相关性

miRNA 与免疫反应的进程密切相关,不仅在获得性免疫和固有性免疫中发挥重要作用,还能在调节免疫应答以及免疫细胞的生长发育中发挥重要作用^[20]。研究发现 miRNA 在血小板和外周血单核细胞中均能表达,表明 miRNA 是造血功能以及免疫应答调节中的重要作用因子^[16]。此外,miRNA 可以调节自然杀伤细胞的功能和生长,激活后的自然杀伤细胞通过刺激炎症趋化因子的分泌参与急性免疫排斥反应。因此,通过 miRNA 监测同种及异种移植的免疫排斥反应具有理论可行性。

3 miRNA 在监测同种和异种移植免疫排斥中的应用

近年来,越来越多的研究表明 miRNA 与移植后免疫排斥反应存在较为密切的关联^[23-30]。急性免疫排斥反应主要由细胞免疫引起,可以通过辅助性 T 细胞和细胞毒 T 淋巴细胞介导免疫应答,促进机体 B 细胞分化,从而产生抗外来移植物抗体,最终导致移植器官损伤的发生。miRNA 可以通过调控细胞凋亡的进程以及炎症因子的释放,在免疫排斥反应中发挥重要作用。

3.1 miRNA 在监测同种肝移植免疫排斥中的应用

miRNA 可长期并稳定存在于肝移植术后受体的外周血中,可用于评估和预测肝移植术后受体的免疫耐受状态,并为进一步研究移植免疫耐受机制以及指导抗排斥治疗提供重要的理论依据^[23]。研究发现,

miR-206 在大鼠肝移植免疫排斥组和无排斥组间存在显著表达差异,术后第3日免疫排斥组外周血 miR-206 表达水平显著高于无排斥组,表明 miR-206 可用于大鼠肝移植急性免疫排斥反应的监测^[24]。

钟克波等^[25]通过检测肝移植受体外周血单核细胞的 miRNA 表达谱,发现与肝移植术后急性排斥组相比,无排斥组中 12 种 miRNA 表达下调。因此,外周血中特定的 miRNA 具有高特异度、早期、稳定等优势,是一种优于肝功能指标以及病理学检查的早期急性免疫排斥反应诊断方法。

3.2 miRNA 在监测同种肾移植免疫排斥中的应用

有文献报道了 miRNA 参与大鼠肾移植术后急性免疫排斥反应进程,肾移植术后急性排斥组血液中 miR-192 以及 miR-320 的表达水平显著高于肾移植术后无排斥对照组,表明 miRNA 可用于早期诊断急性免疫排斥反应^[26]。此外,miR-146-5b、miR-142-5p、miR-223 以及 miR-155 表达水平在肾移植术后急性免疫排斥反应进程中均显著上调,与急性免疫排斥反应的发生、发展存在密切关联^[27]。另有研究发现,miR-10b 可通过促进炎症趋化因子的释放以及内皮细胞的凋亡,从而参与急性免疫排斥反应进程^[28]。Danger 等^[29]研究发现外周血单核细胞中的 miR-142-5p 的表达水平与机体的免疫紊乱密切相关,可参与肾移植术后慢性排斥反应的发生和发展。因此,miRNA 可用于监测肾移植术后免疫排斥反应的进程。

3.3 miRNA 在监测同种肺移植免疫排斥中的应用

近年来,miRNA 被认为是人类肺移植免疫排斥反应的调节器,与同种肺移植术后的免疫排斥反应进程密切相关。Gharib 等^[30]检测了排斥组和对照组肺移植受体呼吸道上皮细胞 miRNA 的表达水平,发现 117 种 miRNA 的表达水平在排斥组中显著下调。Xu 等^[31]发现,在重度原发性移植物功能障碍(primary graft dysfunction, PGD)患者中,miR-21 的表达显著下调,进一步研究表明 miR-21 可通过激活 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)信号通路的关键组分参与肺移植术后 PGD 进程。因此,特定的 miRNA 与肺移植免疫排斥反应存在相关性,它可以作为一种敏感和微创的生物标志物用于监测肺移植受体的预后,并为研究移植免疫排斥反应的发病机制提供相关依据。

3.4 miRNA 在监测异种移植免疫排斥中的应用

由于同种器官移植供体的严重短缺,异种移植

越来越受关注。在原位异种移植模型中的研究发现,miR-30e* 的过表达可以导致核因子(NF)- κ B 的超活化以及 NF- κ B 调控基因的表达增强,并与免疫应答密切相关,miR-30e* 可以作为异种移植中免疫排斥的潜在标志物^[32]。

有文献通过建立小鼠-大鼠的异种异位心脏移植模型,研究了移植 miRNA 的表达图谱,发现 miR-146a、miR-155 以及 miR-451 与异种免疫排斥反应有关,可以作为异种移植免疫排斥反应的诊断标志物^[33]。另有研究报道了 miR-146a 和 miR-155 在用免疫抑制剂治疗的异种心脏移植模型中的表达水平,发现它们可调节免疫反应,在排斥反应中起重要作用^[34]。因此,miRNA 可用于监测异种移植免疫排斥反应,并具有广阔的应用前景。

4 展 望

miRNA 作为一类小分子的单链非编码 RNA,文献已报道了 100 多种与免疫反应相关的 miRNA^[35],外周血 miRNA 由于具有高特异度、稳定性以及高灵敏度等生物学特性,有望成为肝移植、肾移植、肺移植等移植术后免疫排斥反应的潜在生物标志物。理论上相对于同种移植及癌症组织等,异种移植因宿主免疫系统造成的细胞凋亡与细胞坏死强度更高,利用 miRNA 监测免疫排斥反应具有更高的可行性。然而,由于异种移植研究样本量的局限性,目前仍需结合临床反复试验进一步验证 miRNA 监测异种移植免疫排斥反应的特异度。

参考文献:

- [1] EKSER B, COOPER DKC, TECTOR AJ. The need for xenotransplantation as a source of organs and cells for clinical transplantation[J]. Int J Surg, 2015, 23(Pt B): 199-204. DOI: 10.1016/j.ijsu.2015.06.066.
- [2] EKSER B, MARKMANN JF, TECTOR AJ. Current status of pig liver xenotransplantation[J]. Int J Surg, 2015, 23(Pt B):240-246. DOI: 10.1016/j.ijsu.2015.06.083.
- [3] REARDON S. New life for pig-to-human transplants[J]. Nature, 2015, 527(7577): 152-154. DOI: 10.1038/527152a.
- [4] YANG L, GÜELL M, NIU D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs) [J]. Science, 2015, 350(6264): 1101-1104. DOI: 10.1126/science.aad1191.
- [5] NIU D, WEI HJ, LIN L, et al. Inactivation of porcine

- endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-1307. DOI: 10.1126/science.aan4187.
- [6] MOHIUDDIN MM, SINGH AK, CORCORAN PC, et al. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:11138. DOI: 10.1038/ncomms11138.
- [7] IWASE H, HARA H, EZZELARAB M, et al. Immunological and physiological observations in baboons with life-supporting genetically engineered pig kidney grafts[J]. *Xenotransplantation*, 2017, 24(2). DOI: 10.1111/xen.12293.
- [8] DUFRANE D, GOEBBELS RM, GIANELLO P. Alginate macroencapsulation of pig islets allows correction of streptozotocin-induced diabetes in primates up to 6 months without immunosuppression[J]. *Transplantation*, 2010, 90(10): 1054-1062. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181f6e267.
- [9] RACUSEN LC, SOLEZ K, COLVIN RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology[J]. *Kidney Int*, 1999, 55(2):713-723.
- [10] SARWAL M, CHUA MS, KAMBHAM N, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(2):125-138.
- [11] GOLDSTEIN BN, WESLER J, NOWACKI AS, et al. Investigations of blood ammonia analysis: test matrices, storage, and stability[J]. *Clin Biochem*, 2017, 50(9): 537-539. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.01.002.
- [12] CALAROTA SA, CHIESA A, DE SILVESTRI A, et al. T-lymphocyte subsets in lung transplant recipients: association between nadir CD4 T-cell count and viral infections after transplantation[J]. *J Clin Virol*, 2015, 69:110-116. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.06.078.
- [13] SCHWARZENBACH H, NISHIDA N, CALIN GA, et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3):145-156. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.5.
- [14] CHEN X, BA Y, MA L, 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. DOI: 10.1038/cr.2008.282.
- [15] VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7):2257-2261.
- [16] HUNTER MP, ISMAIL N, ZHANG X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3694. DOI: 10.1371/journal.pone.0003694.
- [17] LAWRIE CH, GAL S, DUNLOP HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(5):672-675. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x.
- [18] HEEGAARD NH, SCHETTER AJ, WELSH JA, et al. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(6): 1378-1386. DOI: 10.1002/ijc.26153.
- [19] LO YM, CHIU RW. Plasma nucleic acid analysis by massively parallel sequencing: pathological insights and diagnostic implications[J]. *J Pathol*, 2011, 225(3): 318-323. DOI: 10.1002/path.2960.
- [20] 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. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
- [21] TURCHINOVICH A, WEIZ L, LANGHEINZ A, et al. Characterization of extracellular circulating microRNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 7223-7233. DOI: 10.1093/nar/gkr254.
- [22] TIAN Z, GREENE AS, PIETRUSZ JL, et al. MicroRNA-target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis[J]. *Genome Res*, 2008, 18(3): 404-411. DOI: 10.1101/gr.6587008.
- [23] MURAKAMI Y, TAMORI A, ITAMI S, et al. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:99. DOI: 10.1186/1471-2407-13-99.
- [24] 钟克波, 杨定华, 李湘玟, 等. MicroRNA 在大鼠肝移植急性排斥反应中的表达 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2013, 19(10): 771-776. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2013.10.014.
- ZHONG KB, YANG DH, LI XH, et al. MicroRNA expression in the acute rejection of liver transplantation in rats[J]. *Chin J Hepatol Surg*, 2013, 19(10): 771-776. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2013.10.014.
- [25] 钟克波, 张鹏, 何晓顺, 等. 肝移植术后稳定生存者外周血中差异表达 miRNA 及其功能预测 [J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(11): 1557-1563. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.11.08.
- ZHONG KB, ZHANG P, HE XS, et al. Differential expressions of microRNAs and their predicted targets

- in liver transplant recipients with long-term stable survival[J]. J South Med Univ, 2015, 35(11): 1557-1563. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.11.08.
- [26] 黄金球. MiRNAs 在大鼠肾移植急性排斥反应中的早期诊断作用 [D]. 南方医科大学, 2013.
- [27] 段斌, 高妍婷, 罗永康, 等. 肾移植术后急性排斥反应期外周血中 miRNA 表达 [J]. 贵阳医学院学报, 2012, 37(6): 632-634. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2707.2012.06.014.
- DUAN B, GAO YT, LUO YK, et al. MicroRNA expression in peripheral blood of patients with acute rejection[J]. J Guiyang Med Univ, 2012, 37(6): 632-634. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2707.2012.06.014.
- [28] LIU X, DONG C, JIANG Z, et al. MicroRNA-10b downregulation mediates acute rejection of renal allografts by derepressing BCL2L11 [J]. Exp Cell Res, 2015, 333(1): 155-163. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.01.018.
- [29] DANGER R, PAUL C, GIRAL M, et al. Expression of miR-142-5p in peripheral blood mononuclear cells from renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60702. DOI: 10.1371/journal.pone.0060702.
- [30] GHARIB SA, EDELMAN JD, GE L, et al. Acute cellular rejection elicits distinct microRNA signatures in airway epithelium of lung transplant patients[J]. Transplant Direct, 2015, 1(10): e44.
- [31] XU Z, SHARMA M, GELMAN A, et al. Significant role for microRNA-21 affecting toll-like receptor pathway in primary graft dysfunction after human lung transplantation[J]. J Heart Lung Transplant, 2017, 36(3): 331-339. DOI: 10.1016/j.healun.2016.08.028.
- [32] JIANG L, LIN C, SONG L, et al. MicroRNA-30e^{*} promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF- κ B/I κ B α negative feedback loop[J]. J Clin Invest, 2012, 122(1):33-47. DOI: 10.1172/JCI58849.
- [33] LI C, LIU T, QI F, et al. Analysis of intragraft microRNA expression in a mouse-to-rat cardiac xenotransplantation model[J]. Microsurgery, 2014, 34(1): 44-50. DOI: 10.1002/micr.22139.
- [34] ZHAO Z, QI F, LIU T, et al. Effect of miR-146a and miR-155 on cardiac xenotransplantation[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(6): 3972-3978. DOI: 10.3892/etm.2016.3867.
- [35] NASSIRPOUR R, RAJ D, TOWNSEND R, et al. MicroRNA biomarkers in clinical renal disease: from diabetic nephropathy renal transplantation and beyond[J]. Food Chem Toxicol, 2016, 98(Pt A): 73-88. DOI: 10.1016/j.fct.2016.02.018.

(收稿日期: 2018-03-22)
(本文编辑: 石梦辰 吴秋玲)