

MicroRNA 与肠易激综合征的相关性研究进展

赵泓舒, 陈民利

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 肠易激综合征(IBS) 是一种常见的病因不明的紊乱性疾病。在 IBS 患者的血液微泡和结肠组织中存在一些失调的 microRNA(miRNA)。对于 miRNA 的研究, 最初阶段可能作为一种新的途径用来进一步了解 IBS 的病理生理学特征, 而最终将使用 miRNA 作为新的策略思考 IBS 的诊断和治疗方法。目前, miRNA 在 IBS 发病机制中的作用的研究报道甚少。本文主要对 miRNA 在 IBS 方面的研究进行综述。

【关键词】 肠易激综合征; MicroRNA

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)09-0068-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.009.015

Overview of Relevance between MicroRNA and Irritable Bowel Syndrome

ZHAO Hong-shu, CHEN Min-li

(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 The irritable bowel syndrome (IBS) is a common disorder of unknown etiology. A group of dysregulated microRNAs (miRNAs) in blood microvesicles and in colon tissue have been identified in IBS patients. Research on miRNA, first phase may serve as a new way to further understand the pathophysiology of IBS characteristics, and eventually will leads us to use new strategy for diagnosis and treatment of IBS method by using miRNAs. Currently, there is not a lot of study with the role of miRNA in IBS. This paper summarize the work about miRNA on IBS.

【Key words】 Irritable bowel syndrome; MicroRNA

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种由个体生理、心理、社会等多方面因素综合作用导致机体功能和心理的异常,表现为腹痛与排便异常为主症伴有躯体多部位不适和多脏器功能不正常的功能性胃肠疾病,而今尚无法证实具有病理学形态异常^[1]。近年来,IBS 的研究已深入到了分子水平。由于肠屏障结构和功能的破坏,导致选择性运输蛋白和结构蛋白的错误表达,使得腹泻型肠易激综合征(IBS-D)患者肠道通透性增加或引起轻微黏膜炎症,从而导致肌间神经元敏感,引起持

续性炎症,导致腹痛、腹泻和腹胀^[2]。肠道通透性增加的动物模型表明,这种肠道过敏可能是通过相关干扰素产生和肌球蛋白轻链激酶在肠上皮细胞的活化机制引起的^[3-4]。然而,用乳酸杆菌治疗通透性,防止应激所致内脏高敏感和增加结肠旁通透性,则是通过与上皮细胞骨架收缩的相互作用而起作用^[5]。

最新研究表明, microRNA(miRNA)参与一些慢性疾病的进程,也可能参与调节胃肠疾病。一些特异性的 miRNA 存在于肠道通透性增加的 IBS-D 患

【基金项目】 浙江省教育厅重大科技攻关项目(ZD2009004);浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目。

【作者简介】 赵泓舒(1987-),女,在读硕士生,研究方向:中药药理。

【通讯作者】 陈民利(1963-),女,教授、硕士,研究方向:实验动物与比较医学, E-mail: minlichen01@yahoo.com.cn。

者的血液微泡和结肠活检中^[6]。其他研究也表明,在 IBS 和炎症性肠病中特异性表达的 miRNA 改变血清素信号^[7-8]。因此提出几个重要问题:在胃肠道疾病中,什么是 miRNA 介导的基因调控机制?它可以是一个独特的诊断及预后的工具吗?在未来,特定的 miRNA 能否在治疗 IBS 中发挥作用?对 miRNA 功能的更好理解将揭示 IBS 患者肠道失调的途径。由于目前在 IBS 治疗领域中缺乏有效的治疗方法,模仿或抑制特定 miRNA 的靶基因表达将会成为一种新的预防和治疗 IBS 的方法。

1 microRNA

miRNAs 是一类长约 19~25 个核苷酸的内源性非编码 RNA,普遍存在于各个物种中。不编码蛋白质,但可调控基因表达。miRNA 是由 70~100 核苷酸的发夹 pre-miRNA 前体裂解,然后通过部分序列互补结合靶 mRNA 的 3'-UTR,导致翻译抑制以及某种程度的 mRNA 降解。通过与靶 mRNA 蛋白编码基因的不完全配对发挥 miRNA 的具体职能^[9]。miRNA 的表达具有组织特异性和阶段特异性,即在不同组织中表达有不同类型的 miRNA,在生物发育的不同阶段里有不同的 miRNA 表达。哺乳动物中大约三分之一的基因表达可能受到 miRNA 的调控^[10]。由于 miRNA 已被证实参与和调控包括细胞发育、细胞凋亡、脂肪代谢、神经元发育、细胞分化、激素分泌等在内的多种生理过程。miRNA 的表达差异可能与疾病的发生和发展有关。同时也发现了一些良性疾病如炎症,与正常组织相比也存在 miRNA 表达的差异。其在一些良性疾病发生机制中也可能起着重要的作用,而对于这方面的研究相对较少。

2 血液微泡

血液微泡是球形的膜碎片,大多数散布在细胞表面,承担着细胞与细胞,细胞和器官之间交流的任务^[11]。几乎所有的细胞都可以从质膜(微粒)或细胞内吞小泡(外来体)释放血液微泡^[12]。越来越多证据表明血液微泡在细胞与细胞之间的沟通中发挥着举足轻重的作用。它们可能是通过受体介导的相互作用直接刺激靶细胞,或者从起源细胞转移各种生物活性分子,包括细胞膜受体、蛋白质、mRNAs、miRNAs 和细胞器。有研究还表明,脱落的膜微泡伴随细胞活化^[11-13]。微泡作为一种生理媒

介物提供不同的分子信号,如在一定距离的细胞和器官中改变 miRNA 的表达谱。分子信号和血液微泡数量的改变可能被用来描述某些疾病的进程,并可作为疾病诊断的新策略。

3 miRNA 与 IBS 的关系

最近一项研究中统计了 IBS 患者的血液微泡 miRNA 表达谱数据,发现了 miR-29a 的表达上调^[6]。这也证明了外源性 miR-29a 具有调节 IBS-D 患者肠道通透性的潜在作用。除了 miR-29a 可以合成谷氨酰胺,对于 miR-29a 的靶向问题还有其他的预测。因此,对全身血液微泡的 miRNA 谱进行分析,miRNA 可能被作为 IBS 患者肠道通透性增加的有用的分子标记方法,并成为新的治疗检验方法。这项研究是唯一的,并暗示一些 IBS-D 患者肠道通透性增加和 miR-29a 在血液中超微小泡和结肠组织的超表达有关^[6]。事实上,改变胃肠道 miR-29a 的表达可能会调解 IBS 患者肠道通透性是通过依赖谷氨酰胺机制,并以证实 miR-29a 和谷氨酰胺基因之间的功能互动。

在肠道组织中,Zhou 等人^[6]通过很多重要的观察说明了 miRNA 在 IBS 发病和诊断中的角色。(1)他们表明,与正常的通透性相比,IBS-D 患者的小肠和结肠组织中肠道通透性增加,miR-29a 的增加和谷氨酰胺合成酶的下降。(2)在试管内证明了 miR-29a 通过谷氨酰胺合成酶调节肠道通透性的能力,笔者推测:miR-29a 的表达变化和上皮通透性一致;谷氨酰胺合成酶和上皮通透性的变化相反;小干扰 RNA 分解谷氨酰胺合成酶后肠屏障与 miR-29a 会中和反应。(3)证明了仅仅肠道通透性增加的 IBS-D 病人血液超微小泡中的 miR-29a 会过表达。(4)也表明,与 miR-29a 一样,在增加膜通透性的 IBS-D 病人的血液和细胞样本中发现许多其他的 miRNA 也被调控。不同的 miRNA 调节不同的肠道途径最终导致诸多表观遗传和遗传现象产生。值得注意的是,带有溃疡性结肠炎(UC)的结肠癌病人中,miR-29a 的表达增加了 2~4 倍。尽管对比发现,它的表达在 IBS 病人对照组中没有重大改变,但肠屏障通透性的增加确实导致了失调。

这些事实说明了 miR-29a 对肠炎和通透性的控制作用。但也带来了适用范围的问题,这个事实只是高通透性 IBS-D 患者的诊断依据和治疗目标。在血浆和血清中,它们的规模很小,相对稳定,可以抑

制核糖核酸酶的分解,随着检测灵敏度的提高,使血液里的 miRNA 成为非入侵疾病生物标记的一个良好特征。

迄今已有六千余种 miRNAs 被发现,只有一小部分的 miRNA 的详细功能已经被描述。这些分子具有影响细胞生存到凋亡的能力,并且能进一步与体内的生理机制相协调。很明显,这些分子如果出现问题则会导致严重的细胞失调,最终影响到病理学层次。有评论认为,miRNA 是免疫、炎症和宿主细胞对微生物感染的调控器^[14]。据临床调查,约三分之一的 IBS 患者患病之前有胃肠道的感染史,免疫系统与 IBS 的关系早已引起人们的注意,大多数人认为活性免疫细胞参与了 IBS 的发病机制^[15]。免疫系统的细胞表达了超过 100 种不同的 miRNA。代表性的分子,如 miR-106a、miR-150、miR-181a、miR-326、miR-221 和 miR-222。不仅调节了先天免疫细胞的功能,也对前炎性信号、抗炎性信号和细胞因子与趋化因子释放带来的影响有所反应。

其他 miRNA,如 miR-132,在啮齿动物小肠中通过抑制乙酰胆碱酯酶产生达到抗炎效果。Wu 等描述了一个独特的分子结构,在乙状结肠溃疡性结肠炎中影响 11 个 miRNA 的表达^[7]。

还有,Bazett M 等通过比较囊胞性纤维症肠病的小鼠,即 CFTR(肠粘膜电导调整器)缺乏的小鼠 BALBc/JCfr(tm 1UNC)的肠组织与同窝出生的野生型小鼠的肠组织,发现有 24 个 miRNAs 高表达,且被 RT-PCR 所验证。原有报道 BALB × C57BL/6JF2 囊胞性纤维症小鼠的肠道有一系列基因低表达,与所验证的通过靶基因软件预测的 24 个 miRNAs 靶基因的表达比较,发现 759 个基因中有 155 个重叠,高于原有所猜想的 100 个基因。通路的分析鉴定了这些普遍的基因在这些磷酸酶和张力蛋白、蛋白激酶 A、磷酸肌醇-3 激酶/AKT 信号通路中的功能,并通过 RT-PCR 验证这些通路的基因在 BALB 囊胞性纤维症小鼠肠组织中呈低表达。因此推测 miRNA 的表达能影响新陈代谢的异常和组织内环境成分的平衡^[16]。

特别值得注意的是参与炎症过程的 miR-192,UC 组织中的巨噬细胞炎性缩氨酸与健康组织相比,miRNA 表达和目标基因具有逆相关性。观察 IBS 等慢性炎症性疾病以及对对照的黏膜组织通过基因芯片、定量 PCR 和原位杂交进行分析,检测结肠上皮细胞(HT29)的 miRNA 表达,应用原位杂交的方

法检测表达降低的 miR-192 作用的靶基因。在结肠上皮细胞,被 TNF- α 诱导的 MIP-2 α 的表达减少伴随 miR-192 表达的减少,miR-192 可以调节 MIP-2 α 的表达。这些发现扩展了我们对 miRNAs 作用的认识,提示慢性炎症性疾病可能存在 miRNAs 表达的改变。这些发现也证实 miRNAs 可以调节结肠上皮细胞来源的趋化因子的表达。虽然没有进一步的探索研究,但 5 个 IBS 患者的结肠标本表明它的模式与未激活的 UC 组织类似(UC 组织标记为 miR-375、miR-422b 和 miR-23a 的表达)。除了免疫细胞,miRNA 也参与了生物学的上皮细胞的微环境,如 miR-217、miR-122 和 miR-145,促进上皮细胞及斑马鱼肠道平滑肌的成熟^[17]。这些研究将有助于确定 miRNA 在解释增长的 T 淋巴细胞原因中的作用,也可以探索肥大细胞中 miRNA 在 IBS 发病机制中和其他人类肠炎紊乱中的作用。

在 IBS-D 的研究中,还有其他的 miRNA 的报道,如由于酒精的影响引起肠道通透性患者的 miR-212 过表达^[18]。紧密连接蛋白-1(ZO-1)水平下降增强了 Caco-2(结肠癌细胞)单层的细胞旁通透性渗透率。在这个条件下,相对于健康的人,带有酒精肝的结肠癌患者有高含量的 miR-212,但 ZO-1 蛋白含量降低。结果与最近的研究观察一致,IBS 中 ZO-1 的降低伴随着细胞旁通透性渗透率的提高,结果假设了 miR-212 在肠道渗透率调整中的重要作用。miRNA 的肠黏膜免疫调节通过上皮细胞的 T 细胞的功能也有报道。

IBS 是与 5-HT 系统功能失调有关的综合征。作为一种顺式调节变体,5-HT₃受体亚单位 HTR3A 和 HTR3E 的非翻译区可能参与了疾病的发生机制。有学者对英国的 200 例 IBS 患者和 100 例健康对照者的标本进行了初步研究,发现女性 IBS-D 患者 HTR3E 的 3'非翻译区变体 C 端 76 位碱基出现 G 的几率大于 A。这种联系在包含 119 例 IBS-D 患者的和 195 例对照的德国的一项重复研究中得到证实。两组样本综合分析得出 C 端 76 位碱基出现 G 的几率大于 A 与女性 IBS-D 患者显著相关。在报告基因中,C 端 76 位碱基出现 G 的几率大于 A,影响 miR-510 与 HTR3E 3'-UTR 区域的结合,导致荧光素酶的高表达。原位杂交和 RT-PCR 显示 HTR3E 和 miR-510 共同位于肠上皮细胞。这是首次发现 miRNA 通过顺式调节变体影响 5-HT 受体基因的表达,这种调节作用与女性 IBS-D 患者相关^[8]。

4 展望

尽管将 miRNA 技术作为治疗 IBS 是令人兴奋的,但同时也面临着许多挑战,包括潜在的脱靶效应和传递问题^[19]。最大的挑战之一是体内的 miRNA 如何在细胞内准确的传递足够高浓度的合成寡核苷酸分子,以达到对特定组织中的分子进行抑制或激活的目的^[20]。第二个挑战是,许多这些寡核苷酸在体内不稳定,大多会在血清或组织被蛋白酶降解。最后,寡核苷酸的大小和负电会成为横跨各种细胞膜内吞作用的障碍。微泡可能会携带 RNA、miRNA 或小分子物质通过细胞膜以克服这些传递障碍。微泡可作为一种生理的传播媒介传递不同的分子信号,如传递 miRNA 或寡核苷酸的改变,到有一定距离的细胞和具体组织中。在 IBS-D 患者中发现了独特的微泡和 miR-29a 超表达的联系,这就证明了应用微泡传递信息的可行性^[6]。

随着对 miRNA 的不断探索 and 了解,更多的研究是集中在恶性肿瘤等方面,而对其在消化系统良性疾病的发生、发展中的重要性报道很少。所以,对 IBS 的研究,我们认为尚有两个问题有待解决:(1)找到最适合的 IBS 动物模型。引用 Naliboff^[21]的一句话:建立一种“综合的”IBS 模型,这种模型集合了 IBS 有关的生理、认知、应激等各个组成部分,可以更好的使人认识 IBS 这一复杂的功能性肠道疾病,这也将是最符合人类发病机制的 IBS 模型。(2)通过 IBS 动物模型找出最全面的特异性 miRNAs。而这方面的研究报道甚少,还处于起步阶段。另外,IBS 中究竟有多少种 miRNA 参与其中,都是哪些 miRNA,各个 miRNA 作用的靶基因是哪些,通过哪些具体的途径来与靶基因发生作用,这些问题还有待进一步研究。所以不断发掘出它们的生物学功能,最终探明其表达调控机理,对更好的了解 IBS 具有十分深远的意义。因此,我们未来努力的方向就是应用体内微泡作为一种有效的传递介质为以 miRNA 为基础(使用特定的 miRNA 抑制剂或模仿靶基因的表达)治疗 IBS 提供帮助。

参考文献:

- [1] Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, *et al.* Functional bowel disorders and functional abdominal pain[J]. Gut, 1999, 45 Suppl 2: II 43-47.
- [2] Spiller RC. Role of infection in irritable bowel syndrome[J]. J Gastroenterol, 2007, 42 Suppl 17:41-47.
- [3] Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, *et al.* Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice[J]. Gastroenterology 2003, 125(3): 795-804.
- [4] Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, *et al.* Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase[J]. Pain, 2005, 113(1-2):141-147.
- [5] Ait-Belgnaoui A, Han W, Lamine F, *et al.* Lactobacillus farciminis treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction[J]. Gut, 2006, 55(8): 1090-1094.
- [6] Zhou Q, Souba WW, Croce CM, *et al.* MicroRNA-29a Regulates Intestinal Membrane Permeability in Patients with Irritable Bowel Syndrome[J]. Gut, 2010, 59(6):775-784.
- [7] Wu F, Zikusoka M, Trindade A, *et al.* MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 α [J]. Gastroenterology, 2008, 135(5):1624-1635.
- [8] Kapeller J, Houghton LA, Mönnikes H, *et al.* First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome [J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(19):2967-2977.
- [9] Kim J, Krichevsky A, Grad Y, *et al.* Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(1):360-365.
- [10] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease [J]. Physiol Rev, 2011, 91(3):827-828.
- [11] Valadi H, Ekström K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNA and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 654-659.
- [12] Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages[J]. Curr Opin Cell Biol, 2004, 16(4):415-421.
- [13] Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, *et al.* Activated platelets release two types of membrane vesicles: micrivesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules [J]. Blood, 1999, 94(11):3791-3799.
- [14] O'Hara SP, Mott JL, Splinter PL, *et al.* MicroRNA: key modulators of posttranscriptional gene expression [J]. Gastroenterology, 2009, 136(1):17-25.
- [15] Thabane M, Kottachchi DT, Marshall JK. Systematic review and meta-analysis: The incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2007, 26(4):535-544.
- [16] Bazett M, Paun A, Haston CK. MicroRNA profiling of cystic

饲料需供给全价营养饲料。对于某些特殊动物模型,应使用特殊饲料。如 BALB/c 遗传背景的模式小鼠喜食高蛋白饲料,可加喂高压灭菌鸡蛋,但量要适中。如饲育载脂蛋白 E 基因敲除动脉粥样硬化小鼠时,常给予高脂饲料,但饲料较酥,小鼠可能会得不到及时磨牙,牙会长长,可在鼠盒中加入一消毒木块,防止小鼠因牙齿过长吃不到食物的现象。苯丙酮尿症小鼠喜含脂类饲料,在饲喂过程中每周加 5 粒灭菌瓜子,对动物生长有帮助^[4]。

3.2 疾病小鼠模型的繁育保种

疾病小鼠模型在繁育保种过程中,可能会出现癫痫、毛发脱落、皮肤松弛、反应迟钝、早衰、白内障、视网膜变性、溃疡、皮疹、脱肛等众多症状。而这些症状往往都是品系本身的固有特征。饲养管理人员要注意观察不应把具有品系特征的早发症状视为异常而淘汰。

疾病小鼠模型在选种、育种时要特别注意不能一味地选择繁殖能力强、体格健壮的个体,这种个体往往丢掉了原来特定的基因,或者可能是转进的基因丢失,或是敲除的基因复位,或是突变基因发生回复突变。因此在繁殖过程中,常选择 2~4 胎作为选种、育种的对象,同时要考虑在对其繁殖力无影响或影响较小的情况下,尽可能选择胎次多的仔鼠育种。

对于 6~8 月龄年龄较大的模型鼠若要进行繁殖,应抓紧在繁殖末期的繁殖机遇,寻找同期提前 1~2 d 产仔且母性强的品系作为代乳母,最好代乳

母的颜色与模型鼠的颜色不一致,并需在代乳母预产期前 1 周转运到与该模型鼠生长环境一致的饲养室,一旦错过繁殖末期则无补救措施。

疾病小鼠模型的母性较弱,易惊吓,常会吃掉几乎所有头胎仔鼠。另外,因哺乳能力较差,出生后 1 周内的仔鼠的死亡率较高。因此应将妊娠后期的孕鼠换窝后,加足水,添足料,1 周内不再惊动它,则能有效提高哺乳仔鼠的成活率^[5]。

综上所述,从国外引进疾病小鼠模型对拓宽国内科研工作思路很有必要,同时在饲育模型小鼠的过程中注意观察各品种品系特征,应尽可能确保维持疾病小鼠模型遗传稳定,保证种群稳定繁殖,为科学研究奠定良好基础。

参考文献:

- [1] 林祥梅,李志辉. 实验动物与出入境检验检疫[J]. 中国比较医学杂志,2011,21(10,11):34-38.
- [2] 孙德明,李根平,陈振文,等. 实验动物从业人员上岗培训教材[M]. 北京:中国农业大学出版社,2011. 76-80.
- [3] 郑振辉,周淑佩,彭双清. 实用医学实验动物学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2008. 370.
- [4] 周淑佩,郑振辉,贾光. 人类疾病动物模型管理要点[J]. 中华医学科研管理杂志,2012,25(2):129-130,封四.
- [5] 郑振辉,周淑佩,彭双清. 实用医学实验动物学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2008. 371.

[修回日期]2012-08-25

(上接第 71 页)

- fibrosis intestinal disease in mice[J]. Mol Genet Metab, 2011, 103(1):38-43.
- [17] Zeng L, Carter AD, Childs SJ. miR-145 directs intestinal maturation in zebrafish[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(42):17793-17798.
 - [18] Tang Y, Banan A, Forsyth CB, et al. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2008, 32(2):355-364.
 - [19] Garson R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges[J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(10):775-789.
 - [20] Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(2-3):75-86.
 - [21] Naliboff BD, Chang L, Munakata J, et al. Towards an integrative model of irritable bowel syndrome[J]. Prog Brain Res, 2000, 122:413-423.

[修回日期]2012-08-18