

· 综 述 ·

# miRNAs 与类风湿关节炎炎症因子相关性及中药对其干预的研究进展

何奕坤 杨光辉 郑玥琪 吴辉辉 潘 新 胥晓芳

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种累及关节滑膜、软骨以及骨组织的炎症性疾病,可导致关节破坏、致残以及全身多器官的受损。RA 的发病过程涉及复杂的细胞因子信号转导通路网络,这个网络通过免疫炎症过程来调控 RA,炎症性细胞因子参与免疫炎症过程,包括肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-1、IL-6、IL-17、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)等与 RA 的发生、发展密切相关,如何控制 RA 炎症、阻止病情进展,从而达到改善 RA 患者病情的作用是目前研究的重点。从新近研究中可以发现多种微小 RNAs (microRNAs, miRNAs) 在 RA 中呈现异常表达,同时 miRNAs 能够影响 RA 炎症因子的分泌,并且在疾病的不同阶段都会有不同特异性 miRNAs 介导不同的因子产生,炎症因子也可反向影响 miRNAs 的产生。中医药具有多靶点、多途径的特点,是 RA 治疗的手段之一,近年来研究证实中药复方及单味中药中的有效成分能够抑制 RA 炎症,并对 miRNAs 具有调控作用。针对国内外研究,笔者就 miRNAs 与 RA 主要炎症因子的相关性及中药对其干预做一综述。

## 1 miRNAs

miRNAs 首次在秀丽隐杆线虫中发现<sup>[1]</sup>,这类 RNA 分子能够通过反义 RNA-RNA 的相互作用调控发育时序。miRNAs 是一群非编码单链小分子 RNA,其在进化上高度保守,长度大约有 22 个核苷酸<sup>[2]</sup>,miRNAs 能够在基因转录后水平抑制翻译或对靶基因进行降解<sup>[3]</sup>,同时,可通过碱基互补配对的方式识别信使 RNAs,并根据互补程度的不同指导信使 RNAs 沉默复合体降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译<sup>[4,5]</sup>。研究表明,miRNAs 能够负责调控不同

蛋白水平的表达,在免疫系统中起着重要作用,通过 miRNAs 调节细胞信号通路可参与人类疾病的发生、发展,如癌症、内分泌系统疾病、血液系统疾病及自身免疫病等<sup>[6]</sup>。与此同时,越来越多的研究发现 miRNAs 参与 RA 的发病过程<sup>[7,8]</sup>,对于 miRNAs 与其调节的炎症因子越来越受到关注,因此 miRNAs 有望成为 RA 治疗目标。

## 2 miRNAs 与 RA 炎症因子

### 2.1 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  属于 II 型膜蛋白,以三聚体的形式发挥作用,是重要的致炎因子之一,可刺激多种细胞分泌。TNF- $\alpha$  来源广泛,包括单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、T 细胞、成纤维细胞等。该细胞因子存在两种表达形式:一种是可溶性的 TNF,另一种则为膜相关的 TNF。膜相关的 TNF 是可溶性的 TNF 的前体,它可经过膜金属蛋白酶的作用,从膜上裂解,脱落成为可溶性的 TNF<sup>[9]</sup>。在 RA 中,TNF- $\alpha$  分泌能够促进炎症反应<sup>[10]</sup>。研究显示多种 miRNAs 显著调节 TNF- $\alpha$  的表达水平,其中多项实验证明 miRNA-146a 表达增高,与 TNF- $\alpha$ 、IL-17 含量呈现明显的正相关<sup>[11,12]</sup>。Nakasa T 等<sup>[13]</sup>研究发现 miRNA-146a 前体与成熟的 miRNA-146a 均可在 RA 患者滑膜组织中明显表达,并且 RA 滑膜经过 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  刺激后 miRNA-146a 水平明显上调。Semaan N 等<sup>[14]</sup>指出在 RA 中 miRNA-346 能够维持 TNF- $\alpha$  的释放并使其 mRNA 稳定,研究者们还发现在脂多糖(LPS)刺激下的 RA 成纤维滑膜细胞中 miRNA-125b 和 miRNA-939 能够上调 TNF- $\alpha$  mRNA 的 3'非转译区(3' UTR)。Pauley KM 等<sup>[15]</sup>采用实时定量 PCR 方法观察 RA 患者外周血细胞中多种 miRNAs 的表达水平,包括 miRNA-146a、miRNA-155、miRNA-132、miRNA-16、和 miRNA let-7a,并发现 miRNA-146a 可直接影响 TNF- $\alpha$  的产生。Li X 等<sup>[16]</sup>研究了在 RA 中 miRNA-155 的表达升高与 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的高表达之间的关系,发现 miRNA-155 可能抑制细胞因子信号传导抑制蛋白 1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS 1),而 SOCS 1 能够引起 TNF- $\alpha$  和

作者单位:上海中医药大学附属曙光医院风湿科(上海 200021)

通讯作者:杨光辉, Tel: 021-53827285, E-mail: dryanggh@

126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180119.097

IL-1 $\beta$ 的上调。

**2.2 IL-1** IL-1 是另一种重要的炎性细胞因子,可诱导趋化因子、炎性蛋白、黏附因子的表达,在免疫调节及炎症进程中扮演着重要的角色。IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  是 IL-1 家族中两种主要的细胞因子。事实上,这两种细胞因子仅共享 2% ~ 27% 的氨基酸同源性<sup>[17]</sup>,它们所介导的炎症信号转导机制比 TNF- $\alpha$  更为复杂。IL-1 $\beta$  的合成与 IL-1 $\alpha$  相关,此外,在先天免疫细胞中,IL-1 $\beta$  的生物活性表达通过 NF- $\kappa$ B 调节起到先天免疫和炎症刺激作用<sup>[18,19]</sup>,Kuno K 等<sup>[20]</sup>指出 IL-1 在 RA 的发病过程中起着重要作用。在 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  两个细胞因子中,大多数研究表明 miRNAs 能够调控 IL-1 $\beta$  的表达水平。由 TNF- $\alpha$  诱导的 RA 成纤维滑膜细胞中 miRNA-146a/b 影响 IL-1 $\beta$  的表达<sup>[13]</sup>。miRNA-146a 不仅在 RA 中升高,在其他关节病变中如骨性关节炎(osteoarthritis, OA)中也可见明显升高。研究者在体外培养的软骨细胞中发现在 IL-1 $\beta$  刺激下 miRNA-146 明显上调<sup>[21]</sup>。另有研究观察 miRNAs 可调控的 IL-1 $\beta$  表达。Dai L 等<sup>[22]</sup>发现在 OA 的软骨细胞中 miRNA-101 可影响 IL-1 $\beta$  的表达,下调 miRNA-101 能够阻止 IL-1 $\beta$  诱导的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解。另一项研究显示 miRNA-145 也能够影响 IL-1 $\beta$  诱导的 ECM 降解,并且 miRNAs 可以控制信号传导蛋白 Smad3 的表达,而 Smad3 是通过其下游靶基因的表达从而保护软骨细胞稳态的重要因素<sup>[23]</sup>。近期研究证实,RA 患者中 miRNA-16 的表达水平明显增高,表明 miRNA-16 可能参与 RA 病情,史栋梁等<sup>[24]</sup>研究证明 miRNA-16 通过下调 MMP3/13 及 IL-1 $\beta$  的表达,从而抑制 RA、SFs 的增殖和侵袭。

**2.3 IL-6** IL-6 由单核细胞、巨噬细胞、T 细胞以及滑膜成纤维细胞产生,它是一种多效性炎症细胞因子<sup>[25]</sup>。IL-6 能够刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能,另一方面,过多的蛋白级联能够引起免疫反应从而导致不同疾病的发生,例如 RA。有报道在 RA 患者的血清样本中 IL-6 水平升高<sup>[26]</sup>。研究显示在 RA 中 miRNA 可能调节 IL-6 基因表达。Stanczyk J 等<sup>[27]</sup>表明 miRNA-203 可以通过 NF- $\kappa$ B 通路直接增加 RA 中 MMP-1、IL-6 水平。miRNA-16 能快速降解在 3'非编码区含有 Au 的调控元件,包括 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等,推测 miRNA-16 可抑制过度的炎症反应<sup>[28]</sup>。目前 IL-6 与 miRNA 的相关性研究较少,基于 IL-6 在 RA 炎症反应中的重要性,今后需要更多的研究关注 miRNA 在 IL-6 所介导的炎症反应中的

作用。

**2.4 IL-17** IL-17 是一种促炎因子,由 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌,该家族包括 6 个成员的配体,其中 IL-17A 和 IL-17F 的生物学功能和炎症反应了解的最为深入<sup>[29]</sup>。IL-17 能够诱导上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞合成分泌 IL-6、IL-8、GM-CSF、前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>),促进 ICAM-1 的表达。因此,IL-17 在免疫炎症性疾病中发挥着重要作用。研究表明 miRNA 在 IL-17 的产生中起着作用。Niimoto T 等<sup>[30]</sup>发现 6 种 miRNA (i. e., let-7a, miRNA-26, miRNA-146a/b, miRNA-150, miRNA-155) 在 IL-17 产生的 T 细胞中表达过量,此外,在 RA 患者外周血单个核细胞(PB-MCs)中 IL-17 和 miRNA-146a 升高,通过免疫组织化学发现滑膜组织中的 miRNA-146a 较 OA 患者升高,与滑膜增生肥大、高水平的 IL-17 以及疾病活动性密切相关,经原位杂交复染后证实 miRNA-146a 是由分泌 IL-17 的细胞产生。Zhu S 等<sup>[31]</sup>发现 IL-17 通过抑制 miRNA-23b 参与免疫性疾病的发病机制。Dong L 等<sup>[32]</sup>报道在 RA 患者中促炎细胞(如 IL-17、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等)增生,则会在这些细胞中观察到 miRNA-21 的低表达。

**2.5 GM-CSF** GM-CSF 是一种促炎细胞因子,由 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞和内皮细胞产生,这种细胞因子也被称为造血生长因子,它可刺激外周单核细胞及中性粒细胞生长。GM-CSF 也参与了 RA 炎症反应的进展过程<sup>[33]</sup>。O'Connell RM 等<sup>[34]</sup>研究者利用 miRNA-155 缺失(miRNA-155<sup>-/-</sup>)小鼠体内实验发现 miRNA-155 可上调由 GM-CSF 介导的树突状细胞从而发挥促进炎症细胞生长的功效,他们进一步推断 miRNA-155 可能成为免疫系统疾病治疗的靶点。

### 3 中药干预 miRNAs 与 RA 炎症因子的研究

有研究发现,人体中的 miRNAs 与植物中的 miRNAs 结构相似,植物中的 miRNAs 进入人体能够调控组织细胞,表明 miRNAs 可能是植物药中的活性成分之一,进一步提示中草药中的 miRNAs 可能具有调节人体 miRNAs 的功能<sup>[35]</sup>。值得注意的是,miRNAs 具有疾病特异性,与多种炎症因子的调节密切相关,在 RA 中扮演重要角色。因此,中药及其活性成分调节 miRNAs 与 RA 炎症因子已成为越来越多的中医研究者探索的方向。

**3.1 中药复方** 朴雪梅等<sup>[36]</sup>研究发现益气清络方(桂枝 9 g 生白术 9 g 附子 6 g 防己 12 g 黄芪 30 g 知母 12 g)能够上调 RA 患者 PBMCs 中 miRNA-146a 的表达;刘喜德等<sup>[37]</sup>研究表明温化蠲

痹方(防风、威灵仙、蜈蚣、白芥子、全蝎、白芷、僵蚕、忍冬藤)通过下调胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠 PBMCs miRNA-146a 的表达水平,影响下游 IRAK1 mRNA 表达等而治疗 CIA。朱亚梅等<sup>[38]</sup>进行了清络通痹方调控 miRNA 网络干预 RA 的研究,结果显示清络通痹方通过干预 miRNA-143 影响 RA 的免疫、炎症、疼痛等多种病理过程。

3.2 单药及其有效成分 冯知涛研究青藤碱在 RA 中的相关作用,发现青藤碱可有效抑制 RA 患者外周血树突状细胞中 TLR2 和 TLR4 mRNA 和蛋白表达,抑制细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 的表达及分泌,同时,青藤碱制剂联合 MTX 可下调 miRNA-146a、miRNA-16 的表达水平,说明青藤碱制剂和 MTX 或青藤碱制剂可能通过上述途径抑制 miRNA-146a 的表达<sup>[39]</sup>。刘锋<sup>[40]</sup>通过实验表明,白芍总苷能诱导滑膜细胞凋亡并通过抑制 CIA 鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 的水平抑制炎症反应,同时白芍总苷能够增加 miRNA-15a 的表达水平。彭桢平等<sup>[41]</sup>研究发现雷公藤内酯醇通过抑制 miRNA-155 表达而释放其靶标 SHIP1,从而抑制 LPS 诱导的 RA 来源的单核细胞炎症反应。缪成贵等<sup>[42]</sup>发现白头翁皂苷通过上调佐剂性关节炎大鼠中 miRNA-375 表达抑制人卷曲蛋白 8(FZD8)的表达,从而减少 IL-1、IL-6、IL-8 的释放。

#### 4 展望

多种 miRNAs 在 RA 中表达异常,与炎症因子相互作用,影响着 RA 的病情发生、发展。然而目前对于 miRNAs 在 RA 中的研究刚刚起步,miRNAs 在调节 RA 细胞炎症因子的具体作用机制仍需要大量的试验数据进行挖掘,相信随着科学技术的发展和研究不断的深入,miRNAs 可成为 RA 治疗的新靶点,由此开发出治疗 RA 有效的药物。近年来以 miRNAs 为靶点对抗 RA 炎症的中药研究越来越多,中医学研究者已开始探索中药以及中药单药有效活性成分对于 miRNAs 的调节,这也将成为未来研究的重点。

#### 参 考 文 献

[1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.

[2] Bartel DP. microRNAs: Target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.

[3] Shukla GC, Singh J, Barik S. microRNAs: Processing, maturation, target recognition and regulatory functions[J]. Mol Cell Pharmacol, 2011, 3(3): 83-92.

[4] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science, 2001, 294(5543): 853-858.

[5] Cho WC. Grand challenges and opportunities in deciphering the role of non-coding RNAs in human diseases[J]. Front Genet, 2011, 2: 1.

[6] Cho WC. microRNAs in cancer—from research to therapy[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1805(2): 209-217.

[7] Salehi E, Eftekhari R, Oraei M, et al. microRNAs in rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol, 2015, 34(4): 615-628.

[8] Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4): 1001-1009.

[9] Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor-alpha from cells[J]. Nature, 1997, 385(6618): 729-733.

[10] Li P, Schwarz EM. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis[J]. Springer Semin Immunopathol, 2003, 25(1): 19-33.

[11] 荀春华, 胡志坚, 韩峰, 等. 类风湿性关节炎患者 miRNA-146a 的表达及与血清学指标的相关性[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(5): 529-530.

[12] Abou-Zeid A, Saad M, Soliman E. microRNA 146a expression in rheumatoid arthritis: Association with tumor necrosis factor-alpha and disease activity[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2011, 15(11): 807-812.

[13] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(5): 1284-1292.

[14] Semaan N, Frenzel L, Alsaleh G, et al. miR-346 controls release of TNF-alpha protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraprolin stabilization[J]. PLoS One, 2011, 6(5): 19827.

[15] Pauley KM, Satoh M, Chan AL, et al. Up-regulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): 101-110.

[16] Li X, Tian F, Wang F. Rheumatoid arthritis-associated microRNA-155 targets SOCS1 and up-reg-

- ulates TNF-alpha and IL-1beta in PBMCs [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12): 23910 - 23921.
- [17] Nicklin MJ, Barton JL, Nguyen M, et al. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster [J]. *Genomics*, 2002, 79(5): 718 - 725.
- [18] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651 - a001660.
- [19] Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: Back to the future [J]. *Immunity*, 2013, 39(6): 1003 - 1018.
- [20] Kuno K, Matsushima K. The IL-1 receptor signaling pathway [J]. *J Leukoc Biol*, 1994, 56(5): 542 - 547.
- [21] Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(4): 1035 - 1041.
- [22] Dai L, Zhang X, Hu X, et al. Silencing of microRNA-101 prevents IL-1beta-induced extracellular matrix degradation in chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(6): 1 - 11.
- [23] Yang B, Kang X, Xing Y, et al. Effect of microRNA-145 on IL-1beta-induced cartilage degradation in human chondrocytes [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(14): 2344 - 2352.
- [24] 史栋梁, 史桂荣. MicroRNA-16 对类风湿关节炎患者滑膜成纤维细胞增殖、侵袭及细胞因子分泌的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(10): 1868 - 1872.
- [25] Kishimoto T. Interleukin-6: Discovery of a pleiotropic cytokine [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8 (Suppl2): 1 - 11.
- [26] Madhok R, Crilly A, Watson J, et al. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: Correlations with clinical and laboratory indices of disease activity [J]. *Ann Rheum Dis*, 1993, 52(3): 232 - 234.
- [27] Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, et al. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(2): 373 - 381.
- [28] Jing Q, Huang S, Sabine G, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated immunity [J]. *Cell*, 2005, 120(5): 623 - 634.
- [29] Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 2(9): 1 - 5.
- [30] Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11(1): 1 - 11.
- [31] Zhu S, Pan W, Song X, et al. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-alpha [J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1077 - 1086.
- [32] Dong L, Wang X, Tan J, et al. Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(11): 2213 - 2224.
- [33] Park HJ, Kim DH, Lim SH, et al. Insights into the role of follicular helper T cells in autoimmunity [J]. *Immune Netw*, 2014, 14(1): 21 - 29.
- [34] O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, et al. microRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development [J]. *Immunity*, 2010, 33(4): 607 - 619.
- [35] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168 specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 107 - 126.
- [36] 朴雪梅, 薛鸾, 胡建东. 益气清络方对类风湿关节炎患者外周血单个核细胞中 miR-146a 表达的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2015, 29(1): 37 - 40.
- [37] 刘喜德, 冯莹莹, 蔡龙, 等. 温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠外周血单个核细胞微小 RNA-146a 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(8): 1830 - 1834.
- [38] 朱亚梅, 周玲玲, 彭孝武, 等. 清络通痹方调控 miRNA 网络干预类风湿关节炎的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(4): 495 - 499.
- [39] 冯知涛. RA 患者外周血 miR-146a、miR-16 表达与疾病活动、中医证型相关性及其干预的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2011.
- [40] 刘锋. 白芍总苷对胶原诱导小鼠关节炎作用的基础研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2011: 1 - 78.
- [41] 彭桢平, 黄宪章, 刘瑞萍, 等. 雷公藤内酯醇调控 miR-155 抑制类风湿性关节炎患者单核细胞促炎反应 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(6): 635 - 638.
- [42] 缪成贵, 周国梁, 秦梅颂, 等. 白头翁皂苷对佐剂性关节炎大鼠 FZD8 表达的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(20): 4063 - 4067.

(收稿: 2016-08-01 在线: 2018-05-02)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶