

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.038

· 专论与综述 ·

microRNAs 与流感病毒感染*

张 森 户 义 李 靖 康晓平 姜 涛[△]

(军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物与生物安全国家重点实验室病毒学专业实验室 北京 100071)

摘要: MicroRNAs 是一类数目庞大,而且可以广泛参与到生命活动各个进程的非编码 RNA 分子,在病毒感染宿主过程中存在着复杂的 microRNAs 与病毒的相互作用。流感病毒感染可以引起宿主 microRNAs 表达谱的明显变化,流感病毒能通过调控某些 microRNAs 的表达来实现免疫逃逸等增强其感染能力;同时,宿主也可以通过某些 microRNAs 的变化启动相应的抗流感病毒反应。本文主要针对流感病毒感染过程中宿主-病毒二者在 microRNA 水平的相互作用进行综述,以期更好的了解流感病毒的致病机制,为抗流感病毒的新药研制提供新的思路。

关键词: 流感病毒; MicroRNAs; 宿主细胞

中图分类号: Q52; R34; R373.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)05-965-04

MicroRNAs and Influenza Virus Infection*

ZHANG Sen, HU Yi, LI Jing, KANG Xiao-ping, JIANG Tao[△]

(Laboratory of Virology, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing, 100071, China)

ABSTRACT: MicroRNAs are a class of non-coding RNA molecules that are widely involved in various biological processes. There are complex interactions between host cellular microRNAs and viruses during viral infections. The expression of host cellular microRNAs is significantly altered in the influenza virus infection. The virus can utilize some microRNAs to achieve immune escape, while the host can also trigger a series of anti-influenza virus responses through changes in microRNAs expression. This article mainly reviews on the interaction between host and virus at the microRNAs level, in order to better understand the pathogenesis of the influenza virus and provide a new idea for the development of novel anti-influenza virus drugs.

Key words: Influenza virus; MicroRNAs; Host cells

Chinese Library Classification (CLC): Q52; R34; R373.13 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)05-965-04

前言

microRNAs(miRNAs)是一类在转录后发挥调控作用的非编码单链 RNA 分子,一般长度为 19 - 24nt,其广泛存在于真核生物以及某些病毒的基因组中,序列具有高度保守性^[1]。miRNAs 参与调节机体的许多重要生理活动,比如细胞的增殖、分化、凋亡,肿瘤的发生、发展,以及病原体感染时的免疫调控进程^[2],其靶点的多样性及作用范围的广泛性正日益受到研究人员的重视。在病毒感染过程中,某些病毒(如人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)^[3],疱疹病毒^[4]等)在侵入宿主细胞后,可以利用宿主胞内的酶及其他辅助因子等直接编码并合成病毒 miRNAs,来实现免疫逃逸等抵抗宿主的抗病毒反应;同时,病毒感染也会改变宿主 miRNAs 的表达,这种改变往往对病毒的复制有正或负的调节作用:病毒通过干扰宿主 miRNAs 来改变胞内环境从而增强其致病性;抑或宿主通过某

些 miRNAs 来启动机体的抗病毒反应^[5-7]。本文主要针对流感病毒感染宿主过程中与 miRNAs 的相互作用进行简要概述,以期揭示 miRNAs 在流感病毒前期预防、诊断以及后期治疗中的潜在应用价值,为 miRNAs 类药物在流感病毒防治领域的研发提供理论支持。

1 miRNAs 的生物合成及作用机制

miRNAs 的生物合成起始于细胞核内的转录过程。在真核生物体内,有的编码 miRNAs 的基因组序列有自己专门的启动子,位于染色体中基因间隔区,独立进行转录;而有的 miRNAs 位于编码蛋白的基因或其他转录原件的内含子区域,与宿主基因共用一套启动子进行转录,转录后的 mRNA 经过特定的剪接过程而形成不同的 miRNAs^[8]。在 RNA 聚合酶 II 的作用下,miRNAs 的编码区域首先转录成较长的初级 miRNAs(Primary miRNAs, Pri-miRNAs),Pri-miRNAs 往往包含 5' 帽子结构和 3'

* 基金项目:国家重大传染病专项(2017ZX10305501-010);病原微生物生物安全重点实验室重点课题(SKLPBS1408)

作者简介:张森(1991-),博士研究生,主要研究方向:呼吸道病毒致病机制,电话:010-66948472, E-mail: zhangsen2260@163.com

△ 通讯作者:姜涛,副研究员,主要研究方向:呼吸道病毒致病机制, E-mail: jiangtao@bmi.ac.cn

(收稿日期:2018-03-28 接受日期:2018-04-23)

腺苷酸尾巴。接着, RNA 酶 III Droscha 在辅助因子 DGCR8(Di-George Syndrome Chromosomal Region 8)的协同作用下, 识别 Pri-miRNAs 并切割成约 60nt 的 miRNAs 前体 (Precursor miRNAs, Pre-miRNAs), Pre-miRNAs 一般在 3' 端有 2 个核苷酸的突出。Exportin-5 转运蛋白可以识别这些 Pre-miRNAs 并将其从细胞核运输到细胞质, 然后会进一步被另一种 RNA 酶 III Dicer (Tar RNA Binding Protein 蛋白协同作用 (TRBP)) 切割加工变成 miRNAs 双链中间体, 其结构不稳定, 最终只有一条成熟的 miRNA 会被整合到 RNA 诱导的沉默复合体发挥作用^[9]。

成熟 miRNAs 的 5' 端第 2-8 位的碱基一般被称之为种子序列, 这是与靶标 mRNA 的 3' 非编码区互补结合的主要位点。根据互补的程度不同, miRNAs 对其靶基因的抑制作用往往也分为两种方式: 完全的互补配对可以使靶基因 mRNA 被切割破坏而降解, 而不完全的互补配对可以阻断 mRNA 的翻译过程从而抑制靶基因的表达^[10]。由于这种不完全互补配对的模糊性, 使得一种 miRNA 可以抑制多种不同基因的表达, 反过来讲, 同一个基因也往往受到多种 miRNAs 的共同调控。到目前为止, 人类基因组中共鉴定出 2700 多种不同的 miRNA 分子, 它们可以调控 >60% 编码蛋白基因的表达^[11]。

2 流感病毒感染对宿主 miRNAs 表达的影响

流感病毒属于正粘病毒科, 核酸为分节段的单负链 RNA^[12]。流感病毒只能在活细胞中增殖, 一旦感染过程启动, 病毒会将自身复制所需的基因和蛋白转运到宿主细胞中, 并利用宿主内的细胞组分和细胞器等为自身的复制和感染过程服务; 同时, 宿主细胞内也会激发一系列抗病毒反应来主动应对病毒入侵过程^[13-15]。考虑到 miRNAs 能够广泛的参与到机体内一系列的生命活动, 在流感病毒和宿主的博弈过程中, miRNAs 必然也发挥着必不可少的作用。

除逆转录病毒 HIV-1 外, 目前并未发现有其他 RNA 病毒可以编码 miRNAs, 因此参与到流感病毒感染过程的主要是宿主 miRNAs 的改变。目前大量文献明确报道宿主细胞内的 miRNAs 表达谱在流感病毒感染中发生显著改变, 并且能够参与病毒复制以及宿主抗病毒反应等过程。pH1N1、H3N2 和 H5N1 是三种不同型别、不同毒力的流感病毒毒株, 对这三种毒株感染的 A549 细胞进行高通量测序的结果表明, 在感染早期细胞内的 miRNAs 表达均发生明显改变, 并且不同型别毒株引起的 miRNAs 改变存在差异, hsa-miR-128、hsa-miR-130a、hsa-miR-181c、hsa-miR-301a、hsa-miR-127-3p 和 hsa-miR-769-5p 表达量只在 H3N2 和 H5N1 感染中上升, 而 let-7e 和 hsa-miR-15b 只在 pH1N1 和 H5N1 感染中上升等等^[16], 这提示我们宿主 miRNAs 的表达差异可能与不同流感病毒的毒力有关, 对以后流感病毒毒力差异研究指明一定方向。流感病毒感染宿主后对不同组织的易感性存在差异, 低致病性禽流感病毒 H5N3 可以感染鸡肺部和气管, 深度测序结果表明, 感染 H5N3 的鸡肺部和气管组织分别可以检测出 73 种和 36 种差异表达的 miRNAs^[17], 这提示我们流感病毒组织嗜性的不同可能是引起组织差异表达 miRNAs 变化的原因之一; 并且这些差异表达的 miRNAs 有许多是已经报道过的可以参与某些免疫反应信号通路, 比如 miR-146^[18]、miR-181a^[19]等, 它们可能参与到宿主 -

病毒的相互作用中, 值得进一步研究。新发禽源 H7N9 流感病毒的感染能引起病人血清 miRNAs 表达量的变化, 感染 H7N9 的 21 位病人与 36 位正常人血清样本的芯片分析结果表明, 有 153 种 miRNAs 表达量上升, 7 种 miRNAs 表达量下降, 其中 miR-20a、miR-17、miR-376c 和 miR-106c 上升显著^[20], 这可能为将来寻找流感病毒分子诊断的新型生物标记物提供一个思路。

3 流感病毒对宿主 miRNAs 的利用

宿主 miRNAs 除了能够参与机体的抗病毒免疫反应过程外, 还有相当一部分的 miRNAs 可以为病毒所用, 来逃避宿主的免疫调节。比如, miR-144 可以抑制 TRAF6 蛋白的表达, 从而削弱 TRAF6-IRF7 信号通路, 这一通路是宿主抗病毒反应的重要过程之一, 从而导致病毒在机体的复制能力大大增强, 包括流感病毒、脑心肌炎病毒以及水疱性口炎病毒等^[21]。MCPIP1 蛋白是可以降解病毒 RNA 的 PIN 样 RNA 酶, 能够抑制流感病毒 M 和 NP 片段基因的表达, miRNA-9 在流感病毒感染宿主过程中表达量显著提高, 并且可以靶向并抑制 MCPIP1 蛋白的表达, 从而创造对病毒复制有益的胞内环境, 来增强其在胞内的复制能力^[22]。NF- κ B 是流感病毒感染激活的重要转录因子, NF- κ B 抑制剂 β (NFKBIB, 又称为 I κ B β) 能够参与到对 NF- κ B 的调控, miR-4776 可以直接靶向 NFKBIB, 流感病毒感染可以在一定程度上通过对 miR-4776 表达的调节来实现对 NF- κ B 信号通路的调控, 从而有利于病毒在胞内的复制过程^[23]。这些研究表明在流感病毒感染过程中, 某些宿主 miRNAs 可以直接受病毒调控, 进而通过不同的靶基因参与流感病毒的感染过程, 拮抗宿主的抗病毒免疫反应, 为流感病毒感染提供更有力的环境, 这可能也是流感病毒与宿主长期相互作用进化出的一种自我保护机制。

4 宿主 miRNAs 的抗流感病毒作用

数量庞大的宿主 miRNAs 可以对超过半数的蛋白编码基因进行调控, 复杂的调控网络使得 miRNAs 在宿主与病毒抗争的过程中也会发挥关键作用。宿主 miRNAs 的抗流感病毒作用主要分为两个方面: 第一种是 miRNAs 直接靶向流感病毒的 RNA 片段, 直接降解病毒 mRNA 或抑制关键蛋白的合成, 从而抑制病毒复制。miR-323、miR-491 和 miR-654 能够与 H1N1 病毒的 PB1 蛋白编码基因 mRNA 结合并且使之降解, 从而抑制病毒复制^[24]。同样的, miR-1249 和 miR-584-5p 可以靶向 H1N1 和 H5N1 的 PB2 蛋白编码基因 mRNA 并且下调 PB2 蛋白的表达, 从而抑制病毒在 A549 细胞中的复制能力, 并且这两种 miRNAs 的表达在流感病毒感染过程中是下调的, 也揭示了流感病毒通过干扰宿主 miRNAs 的表达实现免疫逃逸的一种机制^[25]。第二种是 miRNAs 以流感病毒增殖过程中的某个关键分子为靶基因, 从而阻断或抑制病毒的复制过程。ARCN1 蛋白是一种在在流感病毒侵入宿主细胞过程中发挥重要作用的分子, miR-33a 可以以 ARCN1 为靶标, 在病毒感染过程中抑制 ARCN1 蛋白的表达, 从而抑制流感病毒的感染过程, 此外 miR-33a 还能够削弱流感病毒复制过程中 vRNP 活性, 也会干扰病毒的复制能力^[26]。流感病毒感染宿主后主要侵袭肺部, 近期, Peng SX 等^[27] 对肺上皮细胞中高丰度表达的 297 个 miR-

NAs 进行了高通量筛选,发现其中大部分的 miRNAs 具有抗流感病毒感染的作用,进而他们挑选 5 种对流感病毒抑制作用最明显的 miRNAs 进行深入研究后发现,其抗病毒作用也是通过以上两种方式,而且这些 miRNAs 的组合保护可以很好的增强小鼠的抗流感病毒能力。这些研究都表明,越来越多能够参与宿主抗流感病毒免疫过程的 miRNAs 正被人们所发现,提示 miRNAs 可以作为宿主-病毒相互作用的中间媒介,而有潜力成为抗流感病毒研究的新型候选药物。

有趣的是,还有一些 miRNAs 在流感病毒感染过程中发挥着双重作用,miR-485 是一种被 H5N1 诱导表达的宿主 miRNA,在感染初期,病毒量比较少时,miR-485 可以靶向编码 RIG-I 蛋白的 mRNA,抑制其蛋白表达水平,从而下调依赖于 RIG-I 的 I 型和 III 型干扰素的表达以及破坏其他依赖于 RIG-I 的炎症反应;而当病毒大量增殖后,miR-485 又会以病毒 PB1 蛋白的 mRNA 为靶基因,抑制病毒的复制^[29]。这表明部分 miRNAs 在维持宿主-病毒相互作用的稳态过程中可能发挥重要作用,在病毒利用 miRNAs 抵抗宿主免疫反应,产生大量子代病毒颗粒时,这种免疫逃逸会被宿主识别并破坏,来抑制病毒的进一步增殖。

5 其他来源 miRNAs 的抗流感病毒作用

除了流感病毒感染宿主激活宿主内某些 miRNAs 的抗病毒作用之外,还有其他宿主之外的 miRNAs 也被发现有抗流感病毒作用。MiR-2911 是来源于传统中药金银花中的 miRNA 分子,其可以靶向 H1N1、H5N1 和 H7N9 编码 PB2 和 NS 的基因,通过抑制其表达来抑制病毒的复制^[29]。在小鼠饮用金银花熬制的汤药 3 天后,对小鼠肺部组织和外周血的 miR-2911 表达进行检测,发现有明显上升,并且可以抑制 H1N1 在小鼠体内的增殖。这是首次报道的来源于中药中的 miR-2911 可以直接靶向流感病毒,并且具有一定的广谱作用(H1N1、H5N1、H7N9),表明宿主之外的天然产物也有存在抗病毒感染的潜力^[29]。

除此之外,还有很多人工合成的 miRNAs 分子及 miRNAs 表达载体,可以直接转染到宿主细胞中发挥抗病毒作用。比如,通过软件预测和细胞内验证的方法,Zhang H 等^[30]筛选出了可以直接靶向流感病毒基因片段保守区的 miRNAs 分子,并构建了表达 miRNAs 的腺病毒载体,可以较好的保护小鼠使其对流感病毒感染有一定的免疫反应。

miRNAs 在近几年成为抗病毒药物研究的新热点,不止是流感病毒,miRNAs 在其他病毒感染中的作用也正在被广泛的研究^[31,32]。到目前为止,以 miRNAs 分子作为抗病毒药物研究的最为成功的是肝特异性 miRNA-122,它可以与丙型肝炎病毒 RNA 的 5' 非编码区的两个保守区域结合后形成复合体,保护 RNA 免于核酸酶的水解,因此有益于丙型肝炎病毒的复制^[33,34]。抑制 miR-122 可以作为丙型肝炎的治疗策略,它是基于锁核酸技术的反义药物,可以与 miR-122 特异性结合且亲和力较高,目前该药物的研发已进入 II 期临床。虽然相关的研究在流感病毒中并未取得突破进展,但这依然可以成为未来研究的一个很好的思路。

6 总结与展望

随着对 miRNAs 越来越深入的研究,人们发现 miRNAs 分子广泛参与到生命活动的各个过程,并且也鉴定出越来越多的新发现 miRNAs。在病毒感染过程中,miRNAs 也成为宿主细胞和病毒相互作用、相互联系的重要纽带。流感病毒感染可以引起宿主 miRNAs 表达量的变化,宿主 miRNAs 也可能对病毒的进化有一定的选择压力,组织特异性表达的 miRNAs 可能影响病毒的组织易感性。对 miRNAs 与病毒感染相互作用的研究,也可以更好的理解流感病毒逃避宿主免疫反应以及致病的分子机制,对不同亚型流感病毒毒力的研究提供一定帮助。以 miRNAs 为策略的抗病毒药物研究也将持续成为未来的热点,由于 miRNAs 发挥作用的种子序列具有不需要严格互补配对的特性,使得 miRNAs 有应对一定的病毒变异的能力,而且多数抗流感病毒的 miRNAs 是具有一定广谱性的。但是这一思路依然是处于起步阶段,面临着许多问题。miRNAs 参与病毒感染过程是一个复杂的调控网络,单一的 miRNA 的靶点并不单一,如何明确有抗流感作用的 miRNAs 在其他生命过程中的作用,如何减小对正常生理活动的影响等都是需要解决的问题。希望随着研究的不断深入以及技术的不断更新,可以使得 miRNAs 在抗流感病毒感染的作用中发挥其应有的价值。

参 考 文 献 (References)

- [1] Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology [J]. *Seminars in Liver Disease*, 2015, 35(1): 3-11
- [2] Hammond SM. An overview of microRNAs[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 87: 3-14
- [3] Fruci D, Rota R, Gallo A. The role of HCMV and HIV-1 microRNAs: processing, and mechanisms of action during viral infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 689-696
- [4] Virtanen E, Pietilä T, Nieminen P, et al. Low expression levels of putative HPV encoded microRNAs in cervical samples [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 1856-1864
- [5] Skalsky RL, Cullen BR. Viruses, microRNAs, and host interactions[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64(1): 123-141
- [6] Naveed A, Ur-rahman S, Abdullah S, et al. A concise review of microRNA exploring the insights of microRNA regulations in bacterial, viral and metabolic diseases [J]. *Molecular Biotechnology*, 2017, 59 (11-12): 518-529
- [7] Tahamtan A, Inchley CS, Marzban M, et al. The role of microRNAs in respiratory viral infection: friend or foe?[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2016, 26(6): 389-407
- [8] Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease [J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51(4): 759-774
- [9] Lenkala D, Gamazon ER, Lacroix B, et al. MicroRNA biogenesis and cellular proliferation [J]. *Translational Research*, 2015, 166 (2): 145-151
- [10] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355
- [11] Christian W, Adam L, Alexandra D, et al. Novel microRNA discovery using small RNA sequencing in post-mortem human brain [J]. *Bmc Genomics*, 2016, 17(1): 776-785
- [12] Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza [J]. *Lancet*, 2003, 362(9397): 1733-1745

- [13] Smith AE, Helenius A. How viruses enter animal cells [J]. *Science*, 2004, 304(5668): 237-242
- [14] König R, Stertz S, Zhou Y, et al. Human host factors required for influenza virus replication[J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 813-817
- [15] Zhao M, Wang L, Li S. Influenza A virus-host protein interactions control viral pathogenesis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(8): 1673-1688
- [16] Makkoch J, Poomipak W, Saengchoowong S, et al. Human microRNAs profiling in response to influenza A viruses (subtypes pH1N1, H3N2, and H5N1)[J]. *Experimental Biology & Medicine*, 2016, 241(4): 409-420
- [17] Wang Y, Brahmakshatriya V, Zhu H, et al. Identification of differentially expressed miRNAs in chicken lung and trachea with avian influenza virus infection by a deep sequencing approach [J]. *Bmc Genomics*, 2009, 10(1): 512-532
- [18] Lee HM, Kim TS, Jo EK. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation [J]. *Bmb Reports*, 2016, 49(6): 311-318
- [19] Kozloski GA, Jiang X, Bhatt S, et al. MiR-181a negatively regulates NF- κ B signaling and affects activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma pathogenesis[J]. *Blood*, 2016, 127(23): 2856-2866
- [20] Zhu Z, Qi Y, Ge A, et al. Comprehensive characterization of serum microRNA profile in response to the emerging avian influenza A (H7N9) virus infection in humans[J]. *Viruses*, 2014, 6(4): 1525-1539
- [21] Rosenberger CM, Podyminogin RL, Diercks AH, et al. MiR-144 attenuates the host response to influenza virus by targeting the TRAF6-IRF7 signaling axis [J]. *Plos Pathogens*, 2017, 13(4): e1006305
- [22] Dong C, Sun X, Guan Z, et al. Modulation of influenza A virus replication by microRNA-9 through targeting MCPIP1[J]. *Journal of Medical Virology*, 2016, 89(1): 41-48
- [23] Othumpangat S, Bryan NB, Beezhold DH, et al. Upregulation of miRNA-4776 in influenza virus infected bronchial epithelial cells is associated with downregulation of NFKBIB and increased viral survival[J]. *Viruses*, 2017, 9(5): 94-112
- [24] Song L, Liu H, Gao S, et al. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(17): 8849-8860
- [25] Wang R, Zhang YY, Lu JS, et al. The highly pathogenic H5N1 influenza A virus down-regulated several cellular microRNAs which target viral genome [J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2017, 21(11): 3076-3086
- [26] Hu Y, Jiang L, Lai W, et al. MicroRNA-33a disturbs influenza A virus replication by targeting ARCNI and inhibiting viral ribonucleoprotein activity[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(1): 27-38
- [27] Peng SX, Wang J, Wei ST, et al. Endogenous cellular microRNAs mediate antiviral defense against influenza A virus [J]. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 2018, 10.[Epub ahead of print]
- [28] Ingle H, Kumar S, Raut AA, et al. The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication[J]. *Science Signaling*, 2015, 8(406): ra126
- [29] Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses [J]. *Cell Research*, 2015, 25(1): 39-49
- [30] Zhang H, Tang X, Zhu C, et al. Adenovirus-mediated artificial microRNAs targeting matrix or nucleoprotein genes protect mice against lethal influenza virus challenge [J]. *Gene Therapy*, 2015, 22(8): 653-662
- [31] Foo CH, Rootes CL, Cowley K, et al. Dual microRNA screens reveal that the immune-responsive miR-181 promotes henipavirus entry and cell-cell fusion[J]. *Plos Pathogens*, 2016, 12(10): e1005974
- [32] Chen Z, Liang H, Chen X, et al. An ebola virus-encoded microRNA-like fragment serves as a biomarker for early diagnosis of ebola virus disease[J]. *Cell Research*, 2016, 26(3): 380-383
- [33] Grimm D. All for one, one for all: new combinatorial RNAi therapies combat hepatitis C virus evolution[J]. *Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2012, 20(9): 1661-1663
- [34] Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA [J]. *New England Journal of Medicine*, 2013, 368(18): 1685-1694