

[7] Englert DL, Manson MD, Jayaraman A. Investigation of bacterial chemotaxis in flow-based microfluidic devices [J]. Nat Protoc, 2010, 5(5):864-872.

[8] Saadi W, Wang SJ, Lin F, et al. Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 8(2):109-118.

[9] Haessler U, Kalinin Y, Swartz MA, et al. An agarose-based microfluidic platform with a gradient buffer for 3D chemotaxis studies [J]. Biomed Microdevices, 2009, 11(4):827-835.

[10] Clausell-Tormos J, Griffiths AD, Merten CA. An automated two-phase microfluidic system for kinetic analyses and the screening of compound libraries [J]. Lab Chip, 2010, 10(10):1302-1307.

[11] Chapin SC, Pregibon DC, Doyle PS. High-throughput flow alignment of barcoded hydrogel microparticles [J]. Lab Chip, 2009, 9(21):3100-3109.

[12] Chung S, Sudo R, Vickerman V, et al. Microfluidic platforms for studies of angiogenesis, cell migration, and cell-cell interactions [J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38(3):1164-1177.

[13] Jeon NL, Baskaran H, Dertinger SK, et al. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(8):826-830.

[14] Wang SJ, Saadi W, Lin F, et al. Differential effect of EGF gradient profiles on breast cancer cell chemotaxis [J]. Exp Cell Res, 2004, 300(1):180-189.

[15] Irimia D, Liu SY, Sharp WG, et al. Microfluidic system for measuring neutrophil migratory responses to fast switches of chemical gradients [J]. Lab Chip, 2006, 6(2):191-198.

[16] Mao H, Cremer PS, Manson MD. A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(9):5449-5454.

[17] Walker GM, Sai J, Richmond A, et al. Effects of flow and diffusion on chemotaxis studies in a microfabricated gradient generator [J]. Lab Chip, 2005, 5(6):611-618.

[18] Chung S, Sudo R, Vickerman V, et al. Microfluidic platforms for studies of angiogenesis, cell migration, and cell-cell interactions [J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38(3):1164-1177.

[19] Abhyankar VV, Lokuta MA, Huttenlocher A, et al. Characterization of a membrane-based gradient generator for use in cell-signaling studies [J]. Lab Chip, 2006, 6(3):389-393.

[20] Wu HK, Huang B, Zare RN. Generation of complex, static solution gradients in microfluidic channels [J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(13):4194-4195.

[21] Rosoff WJ, McAllister R, Esrick MA, et al. Generating controlled molecular gradients in 3D gels [J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 91(6):754-759.

[22] Cheng SY, Heilman S, Wasserman M, et al. A hydrogel-based microfluidic device for the studies of directed cell migration [J]. Lab Chip, 2007, 7(6):763-769.

[23] Yuta N, Takashi Y. Cell differentiation guidance using chemical stimulation controlled by a microfluidic device [J]. Sensor Actuator A, 2007, 139(1/2):252-258.

(收稿日期:2012-02-07)

• 综 述 •

miRNA 定量检测中内参基因的选择

陈 旭¹综述, 史 菊², 蒋 敏¹, 顾国浩¹审校

(1. 苏州大学附属第一医院检验科, 江苏苏州 215006; 2. 江苏省宿迁市泗洪县人民医院检验科 223900)

关键词: 微 RNA; 内参基因; 基因芯片; 聚合酶链反应

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 11. 026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1338-03

近年来,微小 RNA(miRNA)功能与疾病发生、发展和诊断治疗的关系研究备受关注。miRNA 在体液中可稳定存在,在疾病分类中其表达谱已被证实比 mRNA 的表达谱更准确。然而,至今在有关 miRNA 定量研究的数据分析中缺乏标准化,因而导致研究数据重复性较差、结论不统一,很难真正应用于临床诊疗工作中。为有效解决此类问题,本文就不同样本 miRNA 定量检测中 miRNA 内参基因的选择综述如下。

miRNA 是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,其长度约 22 个核苷酸。它通过互补或不完全互补的方式与信使 RNA(mRNA)相应区域结合,抑制蛋白质翻译^[1]。最近有证据表明,miRNA 也可影响 mRNA 的稳定性。miRNA 自身表达具有高度保守性、时序性和组织特异性。研究表明,miRNA 参与了几乎所有生命活动,包括细胞发育、造血、脂肪代谢、器官生成、凋亡和细胞增殖。miRNA 的调节网络既可通过一个 miRNA 来调控多个基因的表达,也可通过几个 miRNA 的组合来精细调控某个基因的表达。miRNA 异常表达调控与肿瘤、心脑血管疾病的发生有关。miRNA 既可作为抑癌基因下调原癌基因活性,也可作为癌基因下调抑癌基因活性,还可调节肿瘤相关基因的表达,其自身突变、缺失、易位及相互调控异

常等还可导致相关基因异常表达。准确选定 miRNA 内参基因用于 miRNA 精准定量检测则是研究 miRNA 与疾病发生、发展和临床诊疗等相关性的关键点。

1 miRNA 检测技术与 miRNA 内参基因的选择

目前,用于 miRNA 检测的方法主要有 Northern 印迹、基因芯片、液态生物芯片和实时定量 PCR(qRT-PCR)。

Northern 印迹是首先被用于半定量检测 miRNA 的实验技术,至今仍被视为是检测 miRNA 的金标准^[2]。其原理是通过探针与目标 miRNA 杂交从而检测 miRNA。Northern 印迹的主要缺点是:要求的样本量大、灵敏度低、操作耗时,且不适用于高通量检测。因此在 miRNA 检测时,Northern 印迹通常用于结果的验证。

基因芯片技术又称微阵列(microarray),是当前广泛用于检测 miRNA 水平的高通量技术。该技术也是通过杂交反应检测 miRNA,微阵列可一次性对大量样本进行持续、快速、有效的检测,但同样也存在不足:如检测所需样本量较大,耗费较高,不同实验室之间结果可重复性差等^[3]。这些缺点均限制了基因芯片技术的广泛应用。在科研工作中,基因芯片技术一般多用于 miRNA 的初筛,得到的结果通常需经过 Northern 印迹

和 RT-PCR 的验证。

液态生物芯片技术是一种以微球为基础的多指标数据采集和分析平台,通过一束激光识别高分子(如聚苯乙烯)微球所产生的特异性荧光,另一束激光识别微球表面发生生物学反应后所产生的荧光信号,荧光编码不同的微球来实现检测指标的分类,进而实现高通量生物样品的分析,而通过生物学反应所产生的荧光信号可以实现分析的特异性^[4]。此方法快速、灵敏度高,能进行 miRNA 的定量检测,但由于此法检测 miRNA 时更多依赖于信号的下降而不是上升,所以重复性较差。

qRT-PCR 是生物医学领域中较常用的 miRNA 检测方法。通过反应体系中荧光强度变化,对目标 miRNA 片段的扩增进行实时检测。RT-PCR 可检出样本中微量 miRNA,具有灵敏度高、准确度高、方法简单等优点,但操作要求高。

在基因表达研究中有各种因素可导致样品偏差,比如 RNA 的数量和质量,但是表达数据能通过内参基因的校正来修正这种偏差。miRNA 内参基因的选择非常重要。因为不恰当的对照会错误地影响实验结果。Northern 印记初期常使用肌动蛋白基因(actin)作为 miRNA 研究的内参,但是目的基因与 actin 的大小有足够的差异,在校正 miRNA 数据时并不理想。有研究者推荐使用双探针同时杂交,但探针的比例 actin 的信号很强,曝光容易控制不好,导致研究人员误以为目的基因没有表达。目前多数研究者通常使用 U6 基因作为 Northern 印记 miRNA 检测的内参。基因芯片所需 RNA 量较大,重复性较差,不能进行 miRNA 的准确定量,一般多用于 miRNA 的初筛。液态生物芯片因在液相中杂交,反应快速充分,极大地减少了固态中可能的交叉性结合,特异性、重复性相对较好。研究者认为在液态生物芯片 miRNA 定量检测时,最好选用在不同类型样本中表达偏差最小的 miRNA 作为内参,miR-103 被推荐使用。常规用于 qRT-PCR 技术的内参管家基因不同于 miRNA,不适合作为 qRT-PCR miRNA 检测的内参。有研究显示小分子核仁 RNA(snoRNA)和转运 RNA(tRNA)是可靠的内参基因^[5]。

2 组织 miRNA 定量检测的 miRNA 内参基因选择

理想的 miRNA 内参基因就是单个核酸在所有样本中无差异的表达,其表达受目的细胞的制约,显示了目的片段在保存、提取及量化中的效率。事实上,这样的内参基因是不存在的,研究者只能尽量减少不必要的差异^[6]。内参基因的选择至少应满足以下条件^[7]:(1)miRNA 必须在所有样本中都能高度表达,如果不能,至少也应在大多数样本中高表达;(2)在 Z 分数修正后,miRNA 的表达必须高度一致;(3)在既定的 miRNA 家族中,有且只有一个 miRNA 分子能被认为是内参基因;(4)此 miRNA 必须是市售的。目前在 RT-PCR 的相对定量中,最常用的内参基因是 5S rRNA 和 U6 核内小分子 RNA(snRNA)。rRNA 作为内参基因近来一直饱受争议,因为其表达水平远远高于某些低表达的目的 miRNA。此外,在细胞凋亡和肿瘤发生方面,rRNA 表达已被证实都有改变。snRNA 和 snoRNA 长度与 miRNA 相近,200 bp 左右,在多种组织细胞中高表达,不涉及 miRNA 的调节途径,且与 miRNA 探针设计方法相同,所以许多研究者认为 snRNA 和 snoRNA 是很好的内参选择。在人类组织中,常用的 snoRNA 内参基因包括:U6、RNU48、RNU44、U47、RNU6B。在各种组织(包括骨髓)的 miRNA 研究中,U6 作为内参几乎随处可见。但在 miRNA 内参选择的验证研究中,U6、RNU48 等在各组织中的表达均被证明是不稳定的,有研究者在验证各正常组织的 miRNA 内参

基因时发现 U6 在各组织中的表达是不稳定的,其结果所导致的差异将近 62 倍,其作为内参并不可取^[7]。Wotschovsky 等^[8]在验证透明细胞肾癌组织样本 miRNA 内参基因的实验中也有类似的发现,所以后续研究者在运用 miRNA 内参基因时,不应盲目地使用 U6 等未经严格验证的 snRNA 分子。

虽然公认 miRNA 内参基因应选用同一种属的 RNA,即同是 miRNA^[9]。然而现今,关于 miRNA 内参基因的选择却鲜有报道,至今仍没有统一的规范。有研究者在结直肠癌的荧光实时定量反转录 PCR(RT-qPCR)研究中,使用 let-7a 作为内参基因^[10],然而 let-7a 对结直肠癌的抑癌作用已有报道^[11],所以 let-7a 并不适合作为内参。国内外一些研究者对人体某些组织进行了 miRNA 内参基因的研究,运用基因芯片技术、qRT-PCR 等方法,利用已知的癌性微小 RNA(oncomiR)为对照基因,通过 geNorm 软件和 Normfinder 软件分析,力图找出合适的内参基因。值得一提的是,有多项研究报道表明使用多个内参基因的组合比使用单一内参基因更加准确^[9]。Schaefer 等^[12]对前列腺癌组织样本进行了相关实验,建议在前列腺癌组织中使用 miR-130b 作为内参基因,同时认为将 miR-130b 和 RNU6-2 的几何平均数作为内参基因是极有优势的。Wotschovsky 等^[8]的研究结果指出,作为透明细胞肾癌研究的 miRNA 内参基因如果只应用一种 miRNA 内参来进行标准化,那么 miR-28 是最佳选择;而 miR-28 与 miR-103 或 miR-28、miR-103 与 miR-106a 的组合则更佳。子宫颈组织^[13]、结直肠癌组织^[14]、乳腺癌组织^[15]以及肺癌组织^[7]的 miRNA 定量检测所选用的 miRNA 内参基因都有相应报道,各种组织 miRNA 内参基因的选择结果显示,miR-191 是多种正常人类组织中最稳定的 miRNA,miR-103 在肿瘤组织中表达最稳定。

不同的保存方法也会影响 miRNA 的稳定,有研究者用冰冻以及福尔马林浸泡(FFPE)这两种不同的方法保存了肺癌/癌旁组织,发现冰冻组织样本 miR-191 被确定为最稳定的单一的 miRNA 内参基因,而 miR-103 和 let-7a 为组合内参基因^[7]。FFPE 组织样本最稳定的单一内参基因为 miR-103,其次是 miR-191,最稳定的组合为 miR-17-5P 和 miR-24。

3 体液 miRNA 定量检测的 miRNA 内参基因选择

体液是存在于细胞外及组织间隙中的液体成分,包括血液、唾液、尿液、乳汁、脑脊液等。唾液、尿液、乳汁等体液通过无创便捷的方式便可收集,而血液及脑脊液等只需微创即可获得。体液检测具有减轻取样过程中患者的疼痛和术后反应,大大缩短临床采集样本的时间,以及检测一种体液可同时得出多项与疾病有关的参数等优点。体液中的 miRNA 因常与蛋白质等构成复合物存在,因此具有良好的抗 RNA 酶降解能力,能稳定地发挥生物学作用。Gilad 等^[16]将血清样本置于室温 4 h 后检测其 miRNA,发现与即刻检测样本相比 miRNA 量并未发生显著改变;而且即便血清经过 2 次冻融处理,miRNA 量只是稍有变化,也并不影响对疾病的诊断。Chen 等^[17]也探索了极端条件下血清 miRNA 的稳定性,发现将 miRNA 置于 pH 为 1 和 13 的环境中处理 3 h,血清中的 miRNA 仍表现出良好的稳定性。对于体液 miRNA 定量检测,目前尚未找到合适的细胞外管家基因作为内参。有研究认为 miR-16 在个体外周血中表达差异不大,可用作内参基因^[18],但另有研究认为 miR-16 作为体液 miRNA 检测的内参基因,结果反而增加了检测变异,外源性添加的 miRNA 对照也未能降低检测的误差。也有研究者尝试采用体液中生物分子进行标准化,比如血液和尿液中采用肌酐进行标准化^[19],值得进一步深入研究。Zhu 等^[20]

对乙型肝炎患者血液中 miRNA 内参基因选择做了相关研究,并以 miR-122 作为对照 miRNA,结果显示 miR-26a 和 miR-22 是最稳定的 miRNA,而将 miR-26a、miR-221 和 miR-22 三者共同作为内参基因时,其结果差异有统计学意义($P < 0.05$),但差异并不明显。

综上所述,各种类型标本中,多个内参基因的组合比使用单一内参基因更加准确。但多个内参基因的组合在实际运用过程中较复杂,且在不同类型标本中组合选用的差异较大,尚不能在所有类型标本中选用统一的某一种组合,所以单一内参基因仍被推荐使用。如果能将分析前质量控制尽量做到一致,在尚不能确定某种类型标本 miRNA 内参基因,且无法查到相关文献时,首推选用 miR-103 为 miRNA 内参基因,其次为 miR-191。

4 展 望

随着对于 miRNA 作用机制的进一步深入研究,以及利用最新的技术手段对于 miRNA 和疾病之间的关系进行研究,将会使人们对于基因表达调控网络的理解提高到一个新的水平。这也将使 miRNA 可能成为疾病诊断的新的生物学标记,还可能使其成为药靶,或是模拟这一分子进行新药研发,这将可能会给人类疾病的治疗提供一种新的手段。随着样本保存、miRNA 内参基因的准确选择和 miRNA 检测技术的规范化与标准化,miRNA 检测将在临床疾病的诊断和预后判断方面不断显示出优势。相信随着研究的不断深入,miRNA 检测和研将会为疾病诊断及预后判断带来新的发展。

参 考 文 献

[1] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(7): 522-531.

[2] Cissell KA, Deo SK. Trends in microRNA detection[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 394(4): 1109-1016.

[3] Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction[J]. Clin Chem, 2010, 56(7): 1183-1185.

[4] 王亚南, 顾国浩. 生物芯片在肺癌研究和诊疗中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 230-231.

[5] Finnegan EJ, Matzke MA. The small RNA world[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 23): 4689-4693.

[6] Szabo A, Perou CM, Karaca M, et al. Statistical modeling for selecting housekeeper genes[J]. Genome Biol, 2008, 9(8): R59.

[7] Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays; Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tis-

sues[J]. RNA, 2008, 14(5): 844-852.

[8] Wotschovsky Z, Meyer HA, Jung M, et al. Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases[J]. Anal Biochem, 2011, 417(2): 233-241.

[9] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biol, 2002, 3(7): 1-11.

[10] Monzo M, Navarro A, Bandres E, et al. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer[J]. Cell Res, 2008, 18(8): 823-833.

[11] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers[J]. Oncol Rep, 2006, 16(4): 845-850.

[12] Schaefer A, Jung M, Miller K, et al. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer[J]. Exp Mol Med, 2010, 42(11): 749-758.

[13] Shen YM, Li Y, Ye F, et al. Identification of miR-23a as a novel microRNA normalizer for relative quantification in human uterine cervical tissues[J]. Exp Mol Med, 2011, 43(6): 358-366.

[14] Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, et al. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 173.

[15] Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, et al. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer[J]. BMC Molecular Biology, 2008, 9(76): 1471-2199.

[16] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. PLoS One, 2008, 3(9): e3148.

[17] 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.

[18] Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: association with disease and potential use as biomarkers[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2011, 80(2): 193-208.

[19] Etheridge A, Lee I, Hood L, et al. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers[J]. Mutat Res, 2011, 717(1/2): 85-90.

[20] Zhu HT, Dong QZ, Wang G, et al. Identification of suitable reference genes for qRT-PCR analysis of circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients[J]. Mol Biotechnol, 2012, 50(1): 49-56.

(收稿日期: 2012-02-06)

• 综 述 •

血氨检测在临床肝脏疾病中的应用价值

李晓光, 于永光, 王丽艳 综述, 郭 欣, 王连明 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院检验科, 哈尔滨 150001)

关键词: 血氨; 肝病; 监测; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1340-03

氨对于人体是一种有害的物质, 肝脏是其主要代谢场所, 健康人血内有少量游离氨存在^[1]。血液中氨的来源主要为体内蛋白质代谢过程中产生的氨基酸, 以及经脱氨作用分解而来

的内源性氨; 另一来源是蛋白质类食物在肠道内经细菌分解而成的外源性氨。在正常情况下, 肝脏能将氨通过鸟氨酸循环的特殊酶系、鸟氨酸氨基甲酰转移酶、氨基甲酰磷酸合成酶等作