

asymptomatic atherosclerosis in healthy men of primary prevention[J]. Eur J Clin Invest, 2011, 41(8):846-853.

[19] Okan T, Izzet T. Gamma-glutamyltransferase to determine cardiovascular risk: shifting the paradigm forward[J]. J Atheroscler Thromb, 2011, 18(3):177-181.

[20] Ruttman E, Brant LJ, Concin H, et al. [gamma]-Glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality; an epidemiological investigation in a cohort of 163 944 Austrian adults [J]. Circulation, 2005, 112(14):2130-2137.

[21] Franzini M, Corti A, Martinelli B, et al. Gamma-glutamyltransferase activity in human atherosclerotic plaques-biochemical similarities with the circulating enzyme[J]. Ather Osclerosis, 2009, 202(1):119-127.

[22] Chuang SY, Chen JH, Yeh WT, et al. Hyperuricemia and increased risk of ischemic heart disease in a large Chinese cohort [J]. International Journal of Cardiology, 2012, 154(3):316-321.

[23] Chen JH, Chuang SY, Chen HJ, et al. Serum uric acid level as an independent risk factor for all-cause, cardiovascular, and ischemic stroke mortality: a Chinese cohort study[J]. Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research), 2009, 61(2):225-232.

[24] Mazza A, Zamboni S, Rizzato E, et al. Serum uric acid shows a J-shaped trend with coronary mortality in non-insulin-dependent diabetic elderly people. The Cardiovascular Study in the ELderly (CASTEL)[J]. Acta Diabetol, 2007, 44(3):99-105.

(收稿日期:2012-01-05)

• 综 述 •

miRNA 及其多态性与肝癌的相关性研究分析

余莉华 综述, 张莉萍 审校

(重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

关键词: 肝肿瘤; 微 RNA; 多态性, 单核苷酸; 致癌基因; 抑癌基因

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 13. 038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)13-1625-03

肝癌是最常见的肿瘤之一, 在中国的发病率及死亡率均高, 严重危害着人们的健康, 其发生、发展是多因素、多步骤的复杂过程^[1]。miRNA 是一类短序列 RNA 分子, 已有研究证实, 单核苷酸多态性(SNP)可以影响 miRNA 对靶基因的调控过程, 参与许多疾病如神经系统疾病、感染性疾病、心血管疾病等的发生、发展, 且若干 miRNA 序列在各种肿瘤组织(如乳腺癌、肺癌、甲状腺癌、肾母细胞癌、宫颈癌、膀胱癌等)中的表达水平也有不同程度上调或下调^[2-3]。这一现象初步揭示了 miRNA 及其多态性与肿瘤的发生存在相关性。有学者提出“癌 miRNA”(OncomiRs)的观点, 即认为某些 miRNA 的异常表达在肿瘤的发生、发展过程中充当了类似癌基因的角色。miRNA 作为一类新的分子靶标, 应用于肝癌等肿瘤的诊断和生物治疗, 具有广阔的前景。

1 miRNA 简介

miRNA 是一类内源性短序列、非编码、具有调控功能的单链小分子 RNA, 大约由 19~25 个核苷酸构成, 是由 500~3 000 碱基对长的 pri-miRNA 经 Drosha / Pasha 裂解为一段具有发夹样环状结构的单链 RNA 前体, 然后经 Dicer 酶加工后生成的^[4]。它广泛存在于真核生物中, 本身不编码蛋白, 但具有开放阅读框架(ORF), 可通过序列特异性翻译抑制或 mRNA 裂解来调控基因表达, 在转录或翻译水平调节相关基因表达, 参与发育、增殖、分化、凋亡等多种生物学过程^[5-6]。

2 miRNA 的单核苷酸多态性(miRNA-SNP)

单核苷酸的多态性(SNP)是染色体基因组水平上单个核苷酸变异引起的序列多态性, 即在基因组上单个核苷酸的变异包括置换、颠换、缺失和插入。一般而言, SNP 是指变异频率大于 1% 的单核苷酸变异。近年大规模全基因组扫描结果显示, SNP 不仅是遗传标记, 而且可通过调控基因表达影响个体在生理病理上的表现差异, 导致个体对疾病不同的易感性, 与许多疾病都存在显著的相关性。编码合成人类 miRNA 的基因(包括 pri-miRNA、pre-miRNA 和成熟 miRNA)以及 miRNA 的靶基因结合序列内也存在 SNP^[7]。这些 SNP 可通过影响

miRNA 的合成和成熟, 导致新的 miRNA 形成, 影响与靶序列识别, 从而影响相关疾病的易感性或药物的反应性。

3 miRNA-SNP 与癌症的相关研究

基因组不稳定性是恶性肿瘤的基本特征, 在癌症发生、发展过程中常伴随染色体的扩增或缺失, 从而导致癌基因的激活或抑癌基因的失活。许多 miRNA 分子定位于癌染色体变异区内, 在 miRNA 水平及其调节靶点上细微的变化可能导致细胞的重大改变^[8]。Meiri 等^[9]从 23 例乳腺癌、膀胱、结肠癌和肺癌样本中鉴定了 49 种新型 miRNA 序列变异的存在, 即证明 miRNA 相关的单核苷酸多态性存在, 并进一步运用微阵列和逆转录聚合酶链反应技术(RT-PCR)两种平台验证了 miRNA-SNP 在肿瘤组织、癌旁组织及正常组织间的表达有明显差异, 在不同的肿瘤分期、肿瘤类型之间亦有不同。近年研究显示, 3'-非翻译区单核苷酸多态性的遗传标记增加癌症易感性, 其机制为 miRNA 参与转录后调控。作用模式主要有两种: 一种是与靶标基因 3'-非翻译区不完全互补结合, 进而抑制翻译而不影响 miRNA 的稳定性; 另一种是与靶标基因 3'-非翻译区完全互补结合, 作用方式和功能与 miRNA 非常类似, 最后导致靶基因碱基序列的降解^[10]。

4 致癌基因与抑癌基因

原癌 miRNA 组学(Oncomirs): 如果 miRNA 在肿瘤中表达上调, 就属于有致癌基因作用的 miRNA, 它通过负性抑制肿瘤抑癌基因和(或)控制细胞的分化或凋亡途径来促进肿瘤的发展; 而有些 miRNA 的表达是下调的, 则这些 miRNA 起抑癌基因的作用^[11]。

miRNA-21 是研究较多的致癌基因, Volinia 等^[12]用芯片技术分析了 6 种实体瘤(肺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌、胰管癌)的 miRNA 表达谱, 发现 miR-21 均显著过表达。霍学云等^[13]采用聚合酶链反应-单链构象多态性分析法(PCR-SSCP)在 119 例肺癌中检测了 miR-125b 的突变情况, 结果显示在肺癌组织中 miR-125b 的突变率为 34%, 而癌旁及正常肺组织中未发现异常。罗婷婷等^[14]通过构建 miR-146 真核表达

质粒,探讨其在宫颈癌 HeLa 细胞株恶性表型的影响,结果证实了构建的 miR-146 重组质粒能够有效感染肿瘤细胞株并表达目的基因。

首个肿瘤抑制基因 miRNA 是在慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 患者的 B 细胞中被发现的。大约 40% 的 CLL 患者中有染色体 13q14 的缺失,而 miR-15a 和 miR-16-1 基因正好位于该缺失位点 LEU2 内含子内,导致约 68% 的 CLL 患者中这两个基因的表达缺失或下调^[15]。Sellmann 等^[16]证实了这一理论,并通过深入研究认为在 CLL 患者的 miR-15a 和 miR-16-1 基因缺失存在基因剂量效应。Dou 和 Wu^[17]调查中国人群中单核苷酸多态性等位基因频率与神经胶质瘤的关系,结果表明在中国人群中 miR-196a(rs11614913) 的 CC 基因型可减低神经胶质瘤发生的风险。上述研究提示在肿瘤形成过程中 miRNA 可通过抑制抑癌基因或控制细胞的分化和凋亡来促进肿瘤的发生,也可以通过抑制原癌基因或促进细胞凋亡从而诱发肿瘤。

5 与肝癌相关的致癌性和抑癌性 miRNA-SNP

近年来许多研究报道,miRNA 基因多态性与肝癌的发生、发展密切相关^[18]。Akkz 等^[19]通过分析 185 例土耳其肝细胞肝癌 (HCC) 患者及健康对照者的 miRNA 表达,证明了 miR-196a-2 中 rs11614913 的 CC 基因型可增加患肝癌的风险。相比 TT 基因型,CC 及 CT 基因型并没有增加女性患肝癌的风险,提示携带 C 等位基因的男性患肝癌的风险性比女性大。Qi 等^[20]用聚合酶链反应研究了在中国地区 361 例慢性 HBV 感染的肝癌患者,199 例非肝癌乙肝和 391 例健康对照者,同样发现 miR-196a(rs11614913) 与肝癌发生有关。相比 TT 基因型,在男性中 miR-196a 的 CC 基因型会显著增加肝癌风险;而在男性肝癌患者中伴有淋巴转移者,T 等位基因分布频率明显增加。Chen 等^[21]将 miR-221 抑制因子及其类似物转染至肝 HepG2 细胞,并通过 RT-PCR 方法检测 miR-221 的表达。结果发现,miR-221 抑制因子可以导致肝癌细胞的凋亡,进一步推测 miR-221 可能促进肝癌的发生、发展。Wang 和 Lee^[22]通过对肝癌细胞株的研究发现,miR-224 在肝癌组织中的表达较正常组织升高为肝癌的治疗提供了新的可能靶点。

p53 是研究较多的抑癌基因,p53 因为其特殊的多态性形式,可直接诱导 miRNA 分子的表达,从而通过抑制靶基因的表达延缓细胞的生长。Chen 等^[23]运用 Mantel-Haenszel 方法分析了 1 115 例肝癌病例和 1 778 例健康对照中 p53 与肝癌的相关性,结果表明,p53 与肝癌的发生有一定的相关性,但进一步证明了与家族性肝癌的发展无明显联系。miR-520b 已经被证实与乳腺癌易感性相关,Zhang 等^[24]研究了肝癌细胞株并建立小鼠移植瘤模型,结果发现 miR-520b 可以戏剧性地抑制肝细胞株的生长,而 miR-520b 的异位表达能抑制小鼠移植瘤模型肝癌细胞的生长,这为肝癌的治疗提供了又一思路。张明等^[25]使用实时定量 PCR 技术在原发性肝细胞癌和癌旁组织中发现 miR-200a 下调明显,且表达差异与患者血清 AFP 水平呈正相关。另外,胎肝细胞和肝癌细胞间 miRNA 差异表达谱的研究结果显示,miR-200a 的表达在肝癌细胞中是明显下调的,利用生物信息学方法预测 miR-200a 在转录后或翻译水平的靶基因,发现其中包括 AFP。这说明 miR-200a 在 HCC 组织中表达下调有可能在转录后水平参与了 AFP 基因的表达调控,且 miR-200a 的下调可能早于血清 AFP 水平发生变化,这将有助于探索新的肝癌早期诊断标志。

miRNA-SNP 可通过影响 miRNA 的合成、与靶基因结合

等方式参与基因功能的调节,是目前生命科学领域的研究热点。近年来,研究人员在 miRNA 及其多态性与肝细胞癌等肿瘤发生领域的研究取得了较大进展,完善和丰富了肿瘤发生、发展的分子生物学与遗传学机制,为肝细胞癌等肿瘤的基因诊断、治疗提供了新的线索。每个 miRNA 有许多靶点,在其表达过程中轻微的变化可能导致重要的后果,甚至不同程度地参与肿瘤恶性转变过程,其表达的精密调节、遗传效应及多态性表达都比较隐匿,miRNA-SNP 对肿瘤的病因、诊断及预后判断的影响程度在很大程度上还是未知数。所以,进一步研究 miRNA 基因及其靶点的多态性,将促进人类单核苷酸多态性功能的研究,可能探索到肝癌等肿瘤早期诊断的新标志,并为肝癌等肿瘤的病因、治疗和预后提供新的思路。

参考文献

- [1] Fengju S, Kexin CH. Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: big effects on cancer [J]. Chinese Journal of Cancer, 2011, 30(6): 381-391.
- [2] Nicoloso MS, Sun H, Spizzo R. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility [J]. Cancer Res, 2010, 70(7): 2789-2798.
- [3] Despierre E, Lambrechts D, Neven P, et al. The molecular genetic basis of ovarian cancer and its roadmap towards a better treatment [J]. Gynecol Oncol, 2010, 117(2): 358-365.
- [4] 姜昌丽, 王惠萱. 微小 RNA 在结直肠癌中的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(21): 2481-2483.
- [5] Dillhoff M, Wojcik SE, Bloomston M. microRNAs in solid tumors [J]. J Surg Res, 2009, 154(2): 349-354.
- [6] Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [7] Bandiera S, Hatem E, Lyonnet S, et al. microRNAs in diseases: from candidate to modifier genes [J]. Clin Genet, 2010, 77(4): 306-313.
- [8] Varol N, Konac E, Gurocak OS. The realm of microRNAs in cancers [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(2): 1079-1089.
- [9] Meiri E, Levy A, Benjamin H, et al. Discovery of microRNAs and other small RNAs [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(18): 1-13.
- [10] Loh YH, Yi SV. Evolution of microRNAs and the diversification of species [J]. Genome Biol Evol, 2011, 3(1): 55-65.
- [11] Manikandan J, Aarehi JJ. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer [J]. Bioinformatics, 2008, 2(8): 330-334.
- [12] 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 USA, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [13] 霍学云, 苏琳, 郑永明. 肺癌组织中 miR-125b-1 基因的突变及其临床意义 [J]. 实用医药杂志, 2010, 27(1): 1-3.
- [14] 罗婷婷, 陈彦, 文阳安. 真核表达载体的构建及其对肿瘤细胞恶性增殖的影响 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 32(9): 934-935.
- [15] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [16] Sellmann L, Scholtysik R, Kreuz M, et al. Gene dosage effects in chronic lymphocytic leukemia [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 203(2): 149-160.
- [17] Dou T, Wu Q. A polymorphism of microRNA196a genome region

was associated with decreased risk of glioma in Chinese population [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(12):1953-1959.

[18] Banaudha KK, Verma M. The role of microRNAs in the management of liver cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 863:241-251.

[19] Akkz H, Bayram S, Bekar A, et al. A functional polymorphism in pre-microRNA-196a-2 contributes to the susceptibility of hepatocellular carcinoma in a Turkish population: a case control study [J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 2011, 18(7):399-407.

[20] Qi P, Dou TH, Geng L, et al. Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Human Immunology*, 2010, 71(6):621-626.

[21] Chen G, Dang YW, Luo DZ. Effect of miR-221 on the viability and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi*, 2011, 19(8):582-587.

[22] Wang Y, Lee CG. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: a tool for possible therapeutic intervention[J]. *Epigenomics*, 2011, 3(2):235-243.

[23] Chen X, Liu F, Li B, et al. p53 codon 72 polymorphism and liver cancer susceptibility: a meta-analysis of epidemiologic studies[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(9):1211-1218.

[24] Zhang W, Kong G, Zhang J, et al. MicroRNA-520b inhibits growth of hepatoma cells by targeting MEKK2 and cyclin D1 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e31450.

[25] Zhang M, Lin F. Differential expressions of seven microRNAs between primary hepatocellular carcinoma and adjacent nontumorous tissues and their correlations with levels of tumor markers in serum[J]. *Chin J Bases Clin General Surg*, 2010, 17(6):562-565.

(收稿日期:2012-01-10)

• 综 述 •

心肌肌钙蛋白 T 检测方法及其临床应用

吕 星, 蔡小慧 综述, 卿之驹[△] 审校

(中南大学湘雅二医院检验科, 长沙 410011)

关键词: 肌钙蛋白 T; 检测方法; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 13. 039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)13-1627-04

心肌肌钙蛋白 T(cTnT)是调节心脏肌肉收缩的肌钙蛋白复合体组成之一,健康人血液中含有量很低^[1],在心肌损伤时释放入血。cTnT 是心肌损伤的特异性标志物,并具有灵敏度高,在血中出现时间早,诊断窗口时间长等优点。1987 年首次报道了以外周血中心肌肌钙蛋白来诊断急性心肌梗死^[2]。1994~1995 年美国国家食物和药品管理局(FDA)批准检测心肌肌钙蛋白 T 和心肌肌钙蛋白 I 作为心肌梗死新的诊断方法。2007 年欧洲心脏病学会(ESC)、美国心脏病学会基金会(ACCF)、美国心脏协会(AHA)和世界心脏联盟(WHF)在心肌缺血/梗死心电图诊断新标准中指出心脏生物标志物优选 cTn(T 或 I)。要求入院后的 3 次检测(首次、6~9 h 后、必要 12~24 h)中,至少有 1 次升高超过正常上限的 99%^[3]。

1 cTnT 的基本特性

cTnT 是横纹肌分子结构中的多肽链,相对分子质量 37×10^3 ,在人的心脏有 4 种肌钙蛋白 T 异构体。以两种形式存在:游离形式存在于胞浆中,占 6%~8%,结合形式存在于心肌收缩单位的细肌丝上,占 92%~98%^[4]。cTnT 负责使复合体与肌凝蛋白结合,协调肌丝的 Ca^{2+} 浓度依赖性 ATP 酶活性,在肌肉收缩中起重要作用。在心肌细胞膜完整的情况下 cTnT 不能透过细胞膜,正常血清中几乎测不到。当缺血缺氧造成心肌细胞损伤时,细胞膜结构遭破坏,细胞通透性增加,可导致大量 cTnT 释放入血液循环中,使血清浓度迅速升高。急性心肌梗死时可增加 30~200 倍。cTnT 在心肌损伤后 2~8 h 释放入血,12~24 h 达高峰,在血中可维持 14 d 左右,因此它的最大有效诊断窗口期宽 2 h 至 14 d^[5]。

2 cTnT 的检测方法进展

2.1 酶联免疫吸附分析法(ELISA) Katus 等^[6]首先建立了第一代 cTnT ELISA,采用生物素-抗-cTnT 捕获性 M7 抗体,1B10 为标志过氧化物酶抗体,共检测了 25 例健康志愿者,35 例确诊的急性心肌梗死患者。结果显示此法的检测限为 0.18 $\mu\text{g/L}$,与骨骼肌肌钙蛋白 T 交叉反应率小于 1%,在 25 例健康人中并没有检出阳性结果。而在心肌梗死组患者,除开 2 例,其他 cTnT 浓度均大于 0.18 $\mu\text{g/L}$ 。此法敏感性高,检测的灵敏度强。但所用时间过长,需要 90 min。

第二代 cTnT ELISA 商品化试剂于 1997 年面市。与第一代不同的是用 1B10 被亲和力更高的 M11.7 抗体替代, M7 为标志抗体,检测时间也减少到 45 min。Katus 等^[7]用第二代 cTnT 方法发现与纯化的骨骼肌肌钙蛋白 T(1 000 $\mu\text{g/L}$)、43 例马拉松运动员、24 例横纹肌溶解症患者的血样没有出现交叉反应,检测限提高到 0.012 $\mu\text{g/L}$,在 4 955 例没有心肌损伤的患者中,99.6%的 cTnT 小于 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。此法相对于第一代敏感性大大提高,检测时间缩短,且不会因为心肌肌钙蛋白在晚期肾脏病患者骨骼肌中的重表达而产生假阳性,从而排除了交叉反应。第三代 cTnT ELISA 运用重组人基因技术代替第二代的牛血清,在增加特异性和灵敏度的同时,分析时间缩短到小于 20 min^[8]。

2.2 电化学发光法 电化学发光法是近年来发展起来的最新的心肌肌钙蛋白 T 的高敏感测定方法,又称为高敏肌钙蛋白 T(hs-cTnT),以三明治模式应用两个 cTnT 特异性鼠单克隆抗体作为抗原结合片段(FAB),抗体识别位于 cTnT 分子中部的表达位(氨基酸位 125~131 和 135~147),应用钌的三联吡啶金属络合物(II)作为标志^[9]。James 等^[10]随机选取了 3 546 例年龄

[△] 通讯作者, E-mail: qingzhiju@126.com。