

[48] Koga M, Kasayama S, Kanehara H, et al. CLD (chronic liver disease)-HbA1c as a suitable indicator for estimation of mean plasma glucose in patients with chronic liver disease[J]. Diabetes Res

Clin Pract, 2008, 81(2): 258-262.

(收稿日期: 2012-01-09)

• 综 述 •

血清 microRNA 作为肿瘤生物标志物的研究进展*

许欣宜 综述, 杜冀晖[△] 审核

(广东医学院附属深圳南山医院中心实验室, 广东深圳 518052)

关键词: 微 RNAs; 肿瘤; 生物学标记; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)18-2229-03

microRNA (miRNA) 作为一类独特的小分子非编码 RNA, 能够在转录后水平调控蛋白合成, 参与多种生物学信号通路的调节^[1]。肿瘤患者血液循环中存在源自肿瘤的 miRNA, 且组织或血清中 miRNA 的异常表达与多种恶性肿瘤的发生和发展密切相关。由于 miRNA 在不同肿瘤中具有特定的表达模式, 且 miRNA 在血液中有较高的稳定性和特异性, 血清 miRNA 有望成为新兴的肿瘤诊断和预后的生物标志物。本文对血清 miRNA 作为循环生物标志物在肿瘤诊断中的应用研究进展作一综述。

1 miRNA 与肿瘤的发生、发展相关

miRNA 是一类长度为 18-24 nt 的非编码单链小分子, 是基因表达的重要调节分子。miRNA 可结合 mRNA 的 3' 端非编码区 (UTR), 通过降解 mRNA 或抑制翻译影响 RNA 稳定性和蛋白质翻译效率。目前已知的人 miRNA 达到 2 148 个 (Sanger miRBase 18.0 数据库)^[2]。每个 miRNA 可调节数百个靶基因, 涉及细胞生命活动中众多的信号转导途径, 在细胞增殖、分化、凋亡、免疫反应及血管生成等过程中发挥作用^[3]。miRNA 表达异常会使细胞增殖和分化失去控制, 最终导致肿瘤的发生。

miRNA 具有较好的组织特异性, 在不同肿瘤中具有特定的表达模式, 并在肝癌、肺癌、肠癌、卵巢癌和白血病等多种恶性肿瘤中得到了证实^[4]。采用 miRNA 芯片对来自 6 种实体瘤 (乳腺、结肠、肺、胰腺、前列腺和胃) 的共 540 个样本 (363 个肿瘤样本, 177 个相应的正常组织样本) miRNA 表达谱的研究结果提示, 存在一组包含 21 种 miRNA 差异表达的 miRNA 标记谱, 在至少 3 种不同类型的肿瘤中表达有差异, 其中 miR-21 在 6 种肿瘤中均为过表达, miR-17-5p 和 miR-191 在 5 种肿瘤中为过表达^[5]。miRNA 表达还具有肿瘤发生的阶段特异性, 同一种肿瘤在不同分期具有不同的 miRNA 表达谱。miR-31 在结肠癌中的表达水平高于正常结肠黏膜, 且与晚期 TNM 分期及肿瘤浸润程度呈正相关^[6]。不同类型及不同进展期的肿瘤有不同组合的、表达异常的 miRNA 表达谱, 使得 miRNA 有望成为肿瘤诊断新的生物学标志物和治疗药物作用靶标。

2 血清游离 miRNA 的来源与特性

2008 年 Lawrie 等^[7]首次证实可从血清中提取并确定游离 miRNA 的含量, Chen 等^[8]则应用 Solexa 高通量测序技术亦证实分离自血清的小 RNA 主要成分是 miRNA。

2.1 血清游离 miRNA 的来源 过滤和差速离心证实 miR-

NA 并非来源于循环血细胞^[9]。目前有关循环 miRNA 的来源主要有两种观点: (1) 来源于组织损伤后的被动释放, 如 miRNA-208 在心脏组织特异性表达, 当心肌组织损伤后可在血清中检测到^[10]。肿瘤组织因快速增殖和细胞溶解死亡, 大量 miRNA 也会被动释放到循环中。(2) 成熟的 miRNA 在细胞内被脂质或脂蛋白包被成外切体或超微小泡后分泌至胞外并进入血液, 可经内吞作用进入受体细胞并去包被, 释放 miRNA 发挥生物学功能^[11]。有研究发现, 外周血中源自肿瘤细胞的外切体数量与卵巢癌分期高度相关, 而且其内含的 miRNA 与原始肿瘤细胞中的 miRNA 含量相关, 提示外切体内含的 miRNA 在肿瘤发生、发展中可能发挥重要作用^[12]。

2.2 血清游离 miRNA 的特性 内源性循环 miRNA 在血清中非常稳定, 可能与其能和蛋白等结合形成复合体有关, 从而能有效抵抗 RNase 的降解^[13]。体液中的游离 miRNA 可耐受煮沸、高/低 pH、RNase 等处理, 在反复冻融 8 次、室温放置 24 h 等情况下, 其含量仍保持相对稳定^[8-9], 说明血清 miRNA 具有作为理想的生物标志物所需的某些特性, 为血清 miRNA 作为生物标志物用于临床检测提供了可能。

3 血清 miRNAs 作为肿瘤诊断标志物的应用研究

尽管肿瘤组织 miRNA 表达谱与肿瘤发病及预后相关, 但由于肿瘤组织检测技术复杂、创伤大, 难以真正应用于临床诊断。外周血检测具有无创伤、可重复、多指标同时检测等优点, 因此更适于临床应用。

Lawrie 等^[7]最早报道肿瘤特异性血清 miRNA 表达异常, 与健康者相比, 弥漫性 B 细胞淋巴瘤患者血清 miRNA-21 含量明显升高。为验证血清中是否存在来自肿瘤的游离 miRNA 分子, Mitchell 等^[9]将人前列腺癌细胞 22Rv1 接种至 NOD/SCID 小鼠体内, 在小鼠血浆中可检测到源自人肿瘤细胞、而在小鼠中没有同源基因的 miR-629* 和 miR-660, 且含量与移植瘤大小有关, 证实来源于上皮细胞肿瘤的 miRNA 也可以进入血液循环; 进一步的小样本病例对照研究 (25 例患者和 25 例健康者) 发现, 前列腺癌患者血清 miR-141 含量明显增高, 对前列腺癌的诊断特异度为 100% 时, 其灵敏度为 60%, 与前列腺特异性抗原具有较好的相关性。Ng 等^[14]用定量 PCR 分析结肠癌 (CRC) 患者癌组织、癌旁组织、血浆及健康者血浆 miRNA 表达谱, 发现 5 种 miRNA 在 CRC 组织和患者血浆中均升高, 其中 miR-92 和 miR-17-3p 在 CRC 患者血浆中显著升高, 并在肿瘤切除后显著降低; 更大样本的验证研究显示, miR-92

* 基金项目: 广东省深圳市科技计划项目 (201002167)。△ 通讯作者, E-mail: jihuidu@163.com。

对 CRC 的诊断特异度为 70%，灵敏度为 89%，可作为 CRC 的诊断标志物。

有学者分析了 miRNA 用于肿瘤早期诊断的可行性。Huang 等^[15]研究显示, miR-29a 和 miR-92a 联合检测能有效诊断进展期结肠腺瘤, 具有 73% 的灵敏度和 79.7% 的特异性, 说明血清 miRNA 对肿瘤的早期诊断具有一定的应用价值。血清 miRNA 与传统肿瘤血清诊断标志物的对比研究表明, 通常用于女性卵巢癌发病风险评估的血清 CA-125 筛查检测灵敏度仅 40%, 无法作为卵巢癌早期诊断的有效指标。miR-21、92、93、126、29a 则在卵巢癌患者血清中显著高表达, 且 CA-125 正常的部分卵巢癌患者血清中 miR-21、92、93 也明显升高, 提示血清 miRNA 有助于补充、完善现有的临床诊断方法^[16]。

在选择肿瘤标志物时, 仅仅选择一种血清 miRNA 作为肿瘤标志物往往特异性较低, 若测定多种 miRNA 组合或 miRNA 表达谱, 可提高诊断的准确性。迄今为止, 已有多项研究对肿瘤患者血清或血浆 miRNA 的表达谱进行筛选, Chen 等^[8]研究显示, miR-134、146a、221、222、23a 在 CRC 和肺癌患者血清中均升高, 提示不同类型肿瘤可能具有某些相同的 miRNA 表达谱。Lodes 等^[17]采用高通量微阵列芯片分析 5 种实体肿瘤(前列腺癌、大肠癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌)患者血清 miRNA 表达谱, 发现可通过血清 miRNA 表达谱区分不同的实体肿瘤, 表明不同肿瘤组织具有特异 miRNA 表达谱的变化特征。这些研究为血清 miRNA 表达谱用于肿瘤诊断提供了依据。

4 血清 miRNA 与肿瘤预后的相关性

血清 miRNA 与肿瘤分期、病理分级及预后的相关性也受到关注。Brase 等^[18]对比分析了高侵袭性和局限性前列腺癌患者血浆 miRNA 表达谱, 发现恶性患者血浆 miR-375 和 miR-141 水平明显升高。Hu 等^[19]用 Solexa 测序比较了非小细胞肺癌短期与长期生存时间患者血清 miRNA 表达谱, 筛选出 13 种升高的 miRNA, 然后用 qPCR 对 243 例患者血清进行了验证, 确定 miR-486、30d、1、499 与患者预后有关, 且血清中有两种或以上高风险 miRNA 升高的非小细胞肺癌患者生存时间更短, 联合检测特定的 miRNA 比单一检测灵敏度更高。这些研究结果提示血清 miRNA 在肿瘤预后判断中具有一定的应用价值。

5 血清 miRNA 检测技术的进展与挑战

目前研究 miRNA 表达谱的常用技术主要有 Northern 杂交、表达芯片、实时荧光定量 PCR 和 Solexa 测序等, 应根据研究目的和样品来源的不同选择最适合的检测方法。实时荧光定量 PCR 是目前检测血清 miRNA 最适用和有效的方法, 可精确地定量分析 miRNA 的表达, 适用于临床样本的高通量检测^[16]。

miRNA 定量检测是循环 miRNA 分析的关键问题。血清 miRNA 含量很低, 无法用常规 RT-PCR 检测。目前广泛采用的实时荧光定量茎-环反转录聚合酶链反应(stem-loop RT-PCR)灵敏度高, 稳定性好。微阵列 miRNA 芯片虽然具有高通量、高灵敏度的优点, 但对样本 RNA 的检测用量较大^[20]。近年来, 大规模深度测序技术(large-scale miRNA deep sequencing)的应用, 使得发现新 miRNA 的速度得到明显提高^[17]。用户可在 miRBase 数据库中检索不同疾病的组织和阶段特异性 miRNA, 并与自己的实验结果作比较, 以发现有意义的 miRNA 表达谱。这种测序方法对于识别新的生物标志物具有

很好的应用前景。

由于实验中存在技术误差和样本差异, 如何进行 miRNA 数据标准化也是 miRNA 定量分析所需解决的问题。因此, 需要寻找合适的内参以标准化样品间 RNA 含量的差异及 RNA 提取过程中存在的误差, 而且内参的稳定性决定了检测结果的可靠性。目前常用于血清样本数据标准化的 miRNA 有 RNU6B 和 miR-16。这两种 miRNA 在不同个体的血浆中均可检测到, 且表达水平无显著性差异^[14]。虽然血浆 RNU6B 含量比 miR-16 低, 但却具有更高稳定性和较低变异度。研究显示, 前列腺癌患者血清 miR-16 含量明显升高^[18], 说明 RNU6B 可能更适合作为内参。此外, 可通过加入外源性的、与已知人 miRNA 无同源序列的 miRNA(如线虫 miRNA, cel-miR-39、54、238 等)监控提取、纯化过程中的技术误差, 用于 miRNA 检测数据的标准化^[11、21-22]。不同研究者在 miRNA 检测分析过程中采用的 miRNA 提取、定量及数据处理方法有所不同, 可能造成研究结果的明显差异。因此, 确定最佳的 miRNA 标准化方法非常必要。

6 小 结

miRNA 能够游离于细胞外, 稳定存在于血浆或血清中, 具备疾病分子生物标志物的某些特点, 已在肿瘤诊断和预后评估中显示了独特的应用价值。血清 miRNA 作为肿瘤标志物的研究仍存在许多问题, 如: 通常在小样本试验中得到的肿瘤相关 miRNA 表达谱尚需在大规模、独立研究中得到验证; 如何将研究发现转化为临床常规有待更深入研究; 血清 miRNA 所发挥的生物学和细胞学功能尚未明确, 血清和组织 miRNA 水平的相关性仍存在争议; 尚未明确在肿瘤发生、发展进程中血清 miRNA 表达改变出现的时间, 年龄、健康状况对血清 miRNA 表达谱的影响及其动态变化亦未见报道; 尚未明确药物治疗是否会导致血清 miRNA 表达谱改变。相信相关研究的深入和上述问题的阐明, 将有助于加快血清 miRNA 作为肿瘤生物标志物向临床转化的应用进程, 为肿瘤早期诊断、预后评估提供新思路。

参考文献

- [1] Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum[J]. Pathology, 2007, 39(2): 197-207.
- [2] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al. miRBase: tools for microRNA genomics[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(1): 154-158.
- [3] Bethke A, Fielenbach N, Wang Z, et al. Nuclear hormone receptor regulation of microRNAs controls developmental progression[J]. Science, 2009, 324(5923): 95-98.
- [4] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857-866.
- [5] 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.
- [6] Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer[J]. Dis Markers, 2009, 26(1): 27-34.
- [7] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. Br J Haematol, 2008, 141(5): 672-675.
- [8] 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.

- [9] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30):10513-10518.
- [10] Ji X, Takahashi R, Hiura Y, et al. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury[J]. Clin Chem, 2009, 55(11):1944-1949.
- [11] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6):654-659.
- [12] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(1):13-21.
- [13] Jan CB, Daniela W, Ruprecht K, et al. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer[J]. Molecular Cancer, 2010, 9(2):306-314.
- [14] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer; a potential marker for colorectal cancer screening[J]. Gut, 2009, 58(10):1375-1381.
- [15] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 127(1):118-126.
- [16] Resnick KE, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1):55-59.
- [17] Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, et al. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray[J]. PLoS One, 2009, 4(7):e6229.
- [18] Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer[J]. Int J Cancer, 2011, 128(3):608-616.
- [19] Hu Z, Chen X, Zhao Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(10):1721-1726.
- [20] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20):e179.
- [21] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data[J/OL]. Nucleic Acids Res, 2010-10-30 [2012-06-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037258>.
- [22] Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)[J]. Methods, 2010, 50(4):298-301.

(收稿日期:2012-01-09)

• 综 述 •

缺血性脑卒中生物标志物研究进展

张春和¹, 金 艳¹综述, 代国军²审校

(1. 河北省沧州市人民医院检验科, 河北沧州 061000;

2. 河北省沧县疾病预防控制中心检验科, 河北沧县 061000)

关键词: 卒中; 生物学标记; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)18-2231-03

脑卒中(CS)是导致 60 岁以上人群死亡的第二大疾病。中国 CS 患者的年死亡率达 1.57%, 已成为致死率最高的疾病, 其主要类型是缺血性脑卒中(CIS), 约占 43%~79%。CIS 生物标志物检测可用于疾病诊治及疗效、风险评估。现就 CIS 生物标志物的临床研究进展综述如下。

1 脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)

Lp-PLA2 是相对分子质量 50×10^3 , 不依赖钙离子的丝氨酸脂肪酶, 能水解氧化磷脂, 释放促进炎症的溶血卵磷脂, 并能氧化脂肪酸^[1]。氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)作为一种危险因素, 通过促进炎症而引起动脉粥样硬化(AS)。Lp-PLA2 在 ox-LDL 的促炎效应和引起 AS 的过程中起着重要作用, 是介导 ox-LDL 产生以上生物学效应的关键酶。Lp-PLA2 可损伤血管内皮细胞, 具有促进 AS 的作用, 是诱发急性缺血性脑卒中(ACIS)的重要因素之一^[2]。在 AS 早期阶段, 损伤、感染及 ox-LDL 均可促使单核细胞吞噬脂质相继形成巨噬细胞、泡沫细胞, 而激活的巨噬细胞、T 淋巴细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞释放各种炎性介质, 从而促进 AS 的发生与发展。血清 Lp-PLA2 浓度与动脉粥样硬化斑块(AP)稳定性有关, 可反映脂质斑块的稳定程度及斑块局部的炎症程度。临床试验证实, Lp-PLA2 是 CIS 的独立预测指标^[3]。有学者对近 8 000 名平均年龄 55 岁以上的受试者进行了回顾性和前瞻性研究, 结果

显示血浆 Lp-PLA2 浓度与 CIS 发病风险呈正相关; 队列研究显示, 有 110 人在中位随访时间 6.4 年内发生 CIS^[4]。

2 非对称二甲基精氨酸(ADMA)

ADMA 是内源性一氧化氮合酶(NOS)竞争性抑制剂, 正常低浓度 ADMA 不足以抑制 NOS 活性; 当 ADMA 浓度升高至一定水平时, 即可产生抑制效应, 导致 NO 产生减少及血管内皮功能紊乱。ADMA 可通过诱发氧化应激反应诱导生成多种炎症因子, 促进平滑肌细胞凋亡而促进 AS 发生和发展。ADMA 亦可增强巨噬细胞诱导型 NOS 的表达, 促进巨噬细胞转化为泡沫细胞。

有研究指出, 包括内皮细胞在内的多种细胞都可以产生 ADMA^[5]。Bopez-Jaramillo 等^[6]的研究显示, NO 可以调节白细胞黏附和血小板聚集, 与血小板聚集存在明显相关性。可见 ADMA 血液浓度升高与血管性疾病密切相关, 提示 ADMA 是血管内皮功能失调的危险因子和 AS 诱发因子, 有可能成为血管疾病新的标志物。另有研究显示, 血浆 ADMA 浓度升高可促进 AS 进展, 是导致 ACIS 的危险因素, 与 ACIS 发病风险呈正相关^[7-8]。

3 基质金属蛋白酶-9(MMP-9)

基质金属蛋白酶(MMPs)是一类 Zn^{2+} 依赖的中性蛋白酶, 参与体内多种生理和病理过程, 正常情况下与金属蛋白酶