

• 综 述 •

外周血 miRNA 诊断肝细胞癌的研究进展*

曹芳芳 综述, 鲍依稀[△] 审校

(重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

关键词: 肝肿瘤; 微 RNAs; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0987-03

肝细胞癌(HCC)是全世界最常见的恶性肿瘤之一^[1],患者通常在疾病早期无特异症状,一旦出现明显症状多数已进入晚期,此时缺乏有效的治疗方法,预后较差。故早期诊断及治疗对肝癌预后尤为重要。微小 RNA(miRNA)作为潜在的肝癌诊断指标具有较大的应用前景。本文就近年外周血 miRNA 对肝癌诊断的研究进展作如下综述。

1 miRNA 概述

miRNA 广泛存在于真核生物中,是一类内源性表达的非编码单链小分子 RNA,由 19~25 个核苷酸分子组成。miRNA 不编码蛋白,通过与靶基因序列发生特异的相互作用,在转录后或翻译水平调节相关基因的表达,其在肿瘤发生、发展及转移等过程具有重要作用^[2-5]。另外,相关学者研究^[6-8]也表明,外周血中 miRNA 的表达具有肿瘤特异性和高度稳定性。

2 肝细胞癌外周血中 miRNAs

2.1 miR-21 miR-21 被认为具有类似癌基因的作用,通过调控抑癌基因 PTEN 及抗凋亡等途径促进肿瘤细胞分化、异常增殖、侵袭迁移^[9-10]。大量研究发现 miR-21 高表达于肝癌组织, Xu 等^[11]发现 miR-21 同样也高表达于肝癌患者血清中。Tomimaru 等^[12]提出将血液循环中的 miR-21 作为一种新型的肝癌诊断标志物,认为肝癌患者血浆 miR-21 是一个相对独立的因子,在鉴别肝癌患者和慢性肝炎患者时,其敏感度和特异度分别为 61.1%、83.3%,受试者工作曲线下面积(AUC)达到 0.773,具有中等程度的诊断效能,但其敏感度较 AFP 并无明显优势,对小肝癌的诊断也并不优于 AFP。另外,miR-21 异常表达在几乎所有类型的恶性肿瘤,例如乳腺癌、宫颈癌、胰腺癌、及白血病、淋巴瘤等,故 miR-21 对肝癌的早期诊断价值及鉴别诊断价值有待进一步探索。

2.2 miR-224 miR-224 多次被报道在肝细胞癌组织中呈高表达^[13-16],其通过直接与靶基因结合影响肝癌细胞增殖、迁移、侵袭及抗凋亡过程。miR-224 在血浆与肝癌组织表达量呈正相关。研究显示 miR-224 在肝细胞癌患者血浆中的平均表达量约为健康人的 10 倍^[17],充分说明肝癌患者血浆 miR-224 表达水平明显增高,血浆 miR-224 作为肝癌新的血清学标志物值得进一步研究。

2.3 miR-223 Wong 等^[18]发现 miR-223 在肝细胞癌组织及肝癌细胞株中明显下调,检测组织中的 miR-223 能明确地区分肝癌组织及癌旁组织,并且不同的病毒感染状态对其检测无影响。同时研究还发现 Stathmin 1 为 miR-223 下游作用靶点, STMN1 mRNA 与 miR-223 呈负性调节关系,由此揭示 miR-223 与肝细胞癌的发生发展有着密切的关系。Xu 等^[11]进一步研究显示血清 miR-223 水平能用于鉴别肝细胞癌及健康志愿者(AUC:0.86),但在肝细胞癌及慢性肝炎患者之间其差异无

统计学意义。

2.4 miR-122 miR-122 在肝脏组织中特异性表达,其表达量占成人肝脏表达的总 miRNA 的 70%^[19-21],其作用靶点为细胞周期蛋白 G1(Cyclin G1)。miR-122 可负性调节 Cyclin G1 从而影响着癌细胞增殖^[22]。多项研究显示 miR-122 在肝细胞癌组织中低表达,这可能与肿瘤发生、转移及复发有关^[23-24]。另有研究发现 miR-122 水平变化可能与 AFP 水平及肝细胞癌侵袭性有关^[25]。Qi 等^[26]运用 RT-PCR 技术探讨了血清 miRNA 作为肝癌标志物的可行性。结果发现肝癌患者血清 miR-122 水平明显高于健康对照者,其受试者工作曲线下面积为 0.773,当临界值为 0.475 时,敏感度和特异度分别为 61.1%、83.3%,并且肝癌患者术后 miR-122 水平明显低于术前。由此认为血清 miR-122 可以作为一种非侵入性肝癌标志物用以诊断及预测预后。Xu 等^[11]再次证实血清 miR-122 对肝细胞癌及健康对照的鉴别能力,其敏感度达到 70.7%,但有趣的是,血清 miR-122 水平在慢性肝炎患者明显高于肝细胞癌患者($P<0.01$)。最终得到血清 miR-122 是反映肝损害的指标,而非肝癌的特异指标,不能用于鉴别肝细胞癌及慢性肝炎。

2.5 miR-375 血清 miR-375 被认为是乙肝病毒特异性 miRNA,作为乙肝相关性肝癌的标志物,其很可能在乙肝发展为肝癌过程中起着重要的作用。在鉴别乙肝相关性肝癌和健康对照时,其敏感度和特异度分别达到 100%、96%,受试者工作曲线下面积达到 0.96^[27],具有较高的诊断效能。但目前还没有 miR-375 用于鉴别肝癌和肝硬化、肝炎的相关报道。虽然有研究报道肝硬化的 miRNA 谱不同于肝癌的 miRNA 谱,但是否 miR-375 可用于鉴别肝细胞癌及肝硬化患者还有待进一步探索。

2.6 miR-500 miR-500 在人类肝癌细胞株和肝癌组织中均高表达,更重要的是 miR-500 在肝癌患者血清中含量也明显增加,当手术切除肿瘤后,其血清中 miR-500 水平下降并可恢复正常^[28-29]。miR-500 这种特殊的表达差异可能在肝癌的诊断和预后中有重要的临床价值。由于当前关于 miR-500 用于肝癌诊断的研究较少,样本量偏小,研究面欠窄,故仍需深入的大样本试验对 miR-500 用于肝癌的诊断及鉴别价值进行验证,同时可与肝癌传统的诊断指标相比较,以分析其相对的优势和劣势。

2.7 miR-16 研究数据显示肝癌患者血清 miR-16 水平低于慢性肝病及健康个体^[30]。单独检测 miR-16 用于鉴别肝癌及慢性肝病所得灵敏度及特异度分别为 72.1%、88.8%,与传统指标 AFP、AFP-L3%、DCP 相比,具有最高的敏感度。而对于肿瘤小于 3cm 的患者,其诊断敏感度更是增至 79.1%。联合检测 miR-16、AFP、AFP-L3%、DCP 诊断肝癌敏感度达

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81274144)。 作者简介:曹芳芳,女,在读研究生,主要从事肿瘤的实验室诊断研究。 [△] 通讯作者, E-mail: yixibao@163.com。

92.4%, 特异度达 78.5%, 其敏感度明显高于联合检测 AFP、AFP-L3%、DCP 的敏感度。即便针对肿瘤小于 3 cm 的患者, 联合以上 4 个指标得到的敏感度仍高于联合传统的 3 个指标 (AFP、AFP-L3%、DCP)。由此可见 miR-16 对小肝癌的鉴别具有较高的诊断价值, 有利于肝癌的早期诊断, 将其与传统的诊断指标联合检测, 其诊断敏感度能得到明显的提高。Qu 等^[30]指出 miR-16 可用于传统指标检测阴性患者的进一步筛查, 从而减少肝癌患者的漏诊率。但 miR-16 作为肝癌诊断指标也具有一定局限性, 因为 miR-16 在肝癌血清中呈低表达, 而为了提高检测的准确性, 研究应倾向于高表达的 miRNA 而非低表达的 miRNA。

2.8 miR-199a Murakami 等^[13]报道 miR-199a 的表达水平在肝癌组织低于癌旁组织, 且 miR-199a 的表达水平与分化程度呈正相关。Qu 等^[30]发现血清中 miR-199a 水平在健康对照、慢性肝病及肝癌中逐渐降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。血清 miR-199a 诊断肝癌的敏感度为 62.9%, 特异度为 93.5%, 对肿瘤小于 3 cm 的患者, 其诊断敏感度更低, 故将其用作肝癌诊断指标时可考虑与其他指标联合以弥补其敏感度较低的缺陷。

2.9 miRNAs 组合 当联合检测血浆中 7 个与肝癌相关的指标 (miR-122、miR-192、miR-21、miR-223、miR-26a、miR-27a 和 miR-801) 时, 其诊断敏感度和特异度分别达到 81.8%、83.5%, 受试者工作曲线下面积为 0.888。根据 AFP 水平评价其诊断肝癌的准确性, 针对 AFP 小于 400 ng/mL 的人群, 该组合得到的受试者工作曲线下面积可达到 0.879 (95%CI, 0.839~0.912), 而敏感度及特异度分别为 77.7%、84.5%^[31]。可见该组合对 AFP 阴性肝癌患者也具有较高的诊断价值。Li 等^[27]通过对比乙肝患者及健康对照血清中 miRNA 含量, 筛选出含量在前者较后者高 3 倍及以上的 miRNAs, 即 miR-375、miR-92a、miR-10a、miR-223、miR-423、miR-23b/a、miR-342-3p、miR-99a、miR-122a、miR-125b、miR-150 和 let-7c, 构成不同的 miRNAs 组合。该组合不仅能区分乙肝、丙肝和健康对照, 而且能够鉴别乙肝相关性肝癌和乙肝。当联合检测血清 miR-10a 和 miR-125b 时, 能很好地区别乙肝及乙肝相关性肝癌, 从而得到较高的诊断准确性 [AUC (99.2±0.6)%], 敏感度和特异度均可达到 98.5%; 而联合检测 miR-23b、miR-423、miR-375、miR-23a 和 miR-342-3p, 则可用于乙肝相关性肝癌和健康对照的鉴别, 此时敏感度和特异度分别为 96.9%、99.4%, 而受试者工作曲线下面积可达到 (99.9±0.1)%。

3 小 结

外周血 miRNA 作为肝细胞癌诊断的新指标, 其研究正处于起始阶段, 目前尚缺乏大样本、多中心的研究数据。但其作为肝癌潜在标志物具有明显的优势, 如在疾病中的变化先于蛋白类标记物; 在血清中表达很稳定, 即便予以反复冻融, 极端 pH 处理和 RNA 酶处理, 其完整性几乎没有影响^[6-7]。故 miRNA 作为肝癌诊断标志物具有很大的临床应用前景。今后的研究应重视外周血 miRNA 的产生机制, 完善健康人、慢性肝病及肝癌的 miRNA 谱, 建立 miRNA 与肝癌的关系图等。除了以上介绍的 miRNAs, let-7a、let-7f、miR-98、miR-885-5p 等也出现在肝癌患者外周血中, 但其诊断价值尚需进一步探索。

参考文献

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
[2] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and

function in cancer[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(12):580-587.
[3] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11):857-866.
[4] 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 U S A, 2006, 103(7):2257-2261.
[5] Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way[J]. Cell, 2009, 136(4):586-591.
[6] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30):10513-10518.
[7] 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.
[8] Lodes MJ, Caraballo M, Succi D, et al. Detection of cancer with serum microRNAs on an oligonucleotide microarray [J]. PLoS One, 2009, 4(7):e6229.
[9] Haybaeck J, Zeller N, Heikenwalder M. The parallel universe: microRNAs and their role in chronic hepatitis, liver tissue damage and hepatocarcinogenesis [J]. Swiss Med Wkly, 2011, 141: w13287.
[10] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. Gastroenterology, 2007, 133(2):647-658.
[11] Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis[J]. Mol Carcinog, 2011, 50(2):136-142.
[12] Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2012, 56(1):167-175.
[13] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. Oncogene, 2006, 25(17):2537-2545.
[14] Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2008, 47(3):897-907.
[15] Wang Y, Lee AT, Ma JZ, et al. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target[J]. J Biol Chem, 2008, 283(19):13205-13215.
[16] Liu ZR, Chen XW, Qiao XH, et al. Detection of miR-122a and miR-224 expression in hepatocellular carcinoma by real time fluorescence quantitative RT-PCR[J]. Southern Medical University, 2009, 29(4):751-753.
[17] 高军平, 向邦德, 倪航航, 等. microRNA-224 在肝细胞癌组织和血浆中表达的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(32):4012-4016.
[18] Wong QW, Lung RW, Law PT, et al. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1[J]. Gastroenterology, 2008, 135(1):257-269.
[19] Kutay H, Bai S, Datta J, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas[J]. J Cell Biochem, 2006, 99(3):671-678.
[20] Chang J, Nicolas E, Marks D, et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from her mRNA and may down-regulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1 [J]. RNA Biol, 2004, 1(2):106-113.
[21] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver[J]. J Hepatol, 2008, 48

- (4):648-656.
- [22] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (13): 6092-6099.
- [23] Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, et al. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (14): 5761-5767.
- [24] Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1571-1582.
- [25] Kojima K, Takata A, Vadnais C, et al. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2011, 2(1): 338.
- [26] Qi P, Cheng SQ, Wang H, et al. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *PLoS One*, 2011, 6 (12): 28486-28491.
- [27] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9798-9807.
- [28] Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M et al. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Biomarkers*, 2009, 14 (7): 529-538.
- [29] Tian Q, Liang L, Ding J, et al. MicroRNA-550a acts as a pro-metastatic gene and directly targets cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 in hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48958.
- [30] Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating MicroRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45 (4): 355-360.
- [31] Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36): 4781-4788.

(收稿日期:2012-12-12)

• 综 述 •

蛋白质芯片构建技术的研究进展*

陈艺心 综述,赵树铭[△]审核

(第三军医大学西南医院输血科/中国人民解放军重庆血站,重庆 400038)

关键词:蛋白质芯片; 构建技术; 检测方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)08-0989-03

蛋白质芯片是指将蛋白质或多肽等固定于支持介质表面,用于样品成分和蛋白质之间相互作用的分析,亦称蛋白质微阵列。该技术最早是作为基因芯片功能的补充,用于生物功能基因组学研究。由于其具有高通量平行分析、信噪比高、所需样品量少、可直接关联 DNA 序列和蛋白质信息等特点^[1-2],逐渐受到生物、医学领域的关注,现已广泛应用于疾病诊断、药物开发及蛋白质组学等领域的研究。相比 DNA,蛋白质的结构和功能更为复杂多变,因而相关的构建技术和芯片检测方法成为研究热点和难点,发展尤为迅速,获得很多重大进展。

1 芯片载体的选择

1.1 玻璃载片 玻片具有廉价易得、表面光滑不渗透、性能稳定、荧光背景较低等优点,广泛应用于生物芯片的制作。为了使蛋白质稳定地固定于玻片载体的表面,常常需要对玻璃表面进行物理化学修饰。

常用的玻片表面修饰方法包括氨基、醛基、环氧基、聚赖氨酸、链霉亲和素修饰等。这类载体大部分是通过共价键或特殊分子间的高亲和力来固定蛋白质,结合牢固且构象变化较少,有利于保持蛋白质的天然活性。醛基修饰玻片是利用醛基和蛋白质上的氨基形成 Schiff 碱而使探针共价结合到玻片表面,由于蛋白质通常含有多个氨基,因此这类固定是无序的。MacBeath 等^[3]在醛基修饰的玻片表面构建蛋白质微阵列,成功地在 10 799 个 G 蛋白样点中清晰分辨出唯一一个 FKBP12-rapamycin 复合物结合位点 (FRB) 的样点。聚赖氨酸通过 -COOH 基团与玻片表面的 Si-OH 发生脱水反应从而连接于玻

片表面,并且其结构中含有多个氨基可与蛋白质偶联,因此这类基片具有稳定、点密度高、探针针对性强的特点。Angenendt 等^[4]通过比较 11 种不同载体及其表面修饰方法发现,聚赖氨酸修饰玻片上的样点形态比较均一,点间变异系数(11%)较小,检测限相对较低。环氧基修饰玻片是一种较新的蛋白质芯片载体,环氧基活性很强,可以和蛋白质表面的多种基团如羟基、巯基、羧基等反应。Kusnezow 等^[5]对 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、 γ -巯丙基三甲氧基硅烷(MPTS)、多聚赖氨酸(PLL)和丙基三甲氧基硅烷(GPTS)与不同交联剂修饰的 700 多张玻片进行了抗体微阵列的构建,分析比较了它们的检测效果,判定经 GPTS 处理的环氧基玻片效果最好。综上所述,此类二维修饰的玻片载体制作简单,点样均一,应用较为广泛,但对蛋白质固定量仍不理想,且蛋白质易失活。

与微流控式基因芯片类似,通过在玻片或硅片上制作各种微泵、微阀、微电泳以及微流路形成的蛋白质微流体芯片,可将生化实验室的分析功能浓缩固化到蛋白质微阵列中。微流体芯片吸附表面大,分析敏感度高,检测速度快,且可重复多次使用。Gerber 等^[6]利用原位微流亲和实验技术和自组装蛋白质合成技术等,建立了一种体外高通量筛选蛋白质相互作用的微流实验平台,并成功构建出肺炎链球菌 43 个蛋白质的相互作用网。

1.2 凝胶膜 将聚丙烯酰胺或琼脂糖等凝胶包被于玻片或滤膜表面,再引入可与蛋白质结合的活性基团,从而形成一种三维立体结构的载体。聚丙烯酰胺和琼脂糖都是有孔的亲水性

* 基金项目:重庆市科委攻关课题资助项目(CSTC,2011AC5039)。 作者简介:陈艺心,女,在读研究生,主要从事输血相关研究。

[△] 通讯作者,E-mail:shumingzhao@yahoo.com。