

· 综 述 ·

# 血清 MicroRNA 在重症肌无力研究中的意义\*

姜 超 综述, 刘 萍 审校

(上海中医药大学龙华医院, 上海 200032)

**关键词:** 微 RNAs; 血清; 重症肌无力; 综述

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.032

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2013)13-1707-03

重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 是一种主要由乙酰胆碱受体抗体 (acetylcholine receptor antibody, AchR-Ab) 介导, 补体参与、细胞免疫依赖、针对神经肌肉接头处 (neuromuscular junction, NMJ) 突触后膜上 AChR 的自身免疫性疾病。据估计, MG 的年发病率约为每 10 万人中有 0.25~2 人, 多发于成人, 女性多见<sup>[1-3]</sup>。目前对于 MG 发病机制的研究, 主要涉及体液免疫、细胞免疫研究, 其具体发病机制尚未完全阐明, 治疗亦缺乏实质有效的手段<sup>[4-6]</sup>。探寻 MG 的发病机制, 已成为从根本上治愈该病的重要前提。MicroRNA (miRNA) 是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<sup>[7]</sup>, 亦有研究表明, miRNA 在免疫应答和疾病发展中发挥着重要的调控作用<sup>[8]</sup>; 而组织或血清中的 miRNA 在不同疾病中具有特定的异常表达与多种恶性疾病的发生和发展密切相关, 且 miRNA 在血液中有较高的稳定性和特异性<sup>[9-12]</sup>, 故血清 miRNA 有望成为新兴的判定神经免疫疾病 MG 疗效和预后的生物标志物, 其与 miRNA 作用相关的某些分子作用机制的阐明亦将会填补有关神经免疫系统调节方面的未知领域<sup>[13]</sup>, 从而有助于建立有效的 miRNA 新疗法攻克 MG。

## 1 MiRNA 的研究概况

miRNA 是一种长约 22 个核苷酸的单链小分子 RNA, 本身不编码蛋白质, 但转录后能够水平调控靶基因表达, 调节细胞功能, 属于表观遗传学范畴<sup>[14]</sup>。1993 年, Lee 等<sup>[15-16]</sup>对秀丽隐杆线虫的研究首次发现了 miRNA, 随后又发现在人体中亦存在 miRNA, 该类分子可与靶基因 3' 非编码区 (3'-Untranslated Reion, 3'-UTR) 结合, 下调靶基因表达水平, 亦有研究发现 miRNA 也可与 miRNA 的 5'-UTR 结合调节靶基因的后转录水平, 最终通过这一生物作用来调节细胞的增值、分化与凋亡, 在生物体生长发育的不同阶段发挥不同的生物调节作用<sup>[17]</sup>。近年, Evavan Rooi 对 miRNA 的研究的通用模式做一总结, 首先应用 miRNA 芯片筛选、深度测序、实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) RNA 印迹和原位杂交等技术进行 miRNA 表达筛选, 其次应用生物信息分析、UTR 分析、转录组/蛋白组分析和 pull-down 研究等技术对 miRNA 靶基因进行确证; 最后应用离体 miRNA 调节、基因 miRNA 调节、在体 miRNA 抑制和在体 miRNA 模拟等技术进行 miRNA 干预研究<sup>[18]</sup>。目前已知的人 miRNA 达到 2 148 个 (Sanger miRBase18.0 数据库), 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<sup>[19-20]</sup>。miRNA 表达异常会使细胞增殖和分化失去控制, 最终导致疾病的产生。目前对于 miRNA 的研究还处于初级阶段, 更多潜在的关系疾病的 miRNA 还有待进一步研究。

## 2 血清 miRNA

2008 年, 血清 miRNA 首次被 Lawrie 等<sup>[21]</sup>证实, 亦被 Chen 等<sup>[22]</sup>通过应用 Solexa 高通量测序技术所证实, 但通过过滤和差速离心可证实 miRNA 并非来源于循环血细胞<sup>[23]</sup>, 目前认为循环的 miRNA 可能源于组织损伤后的被动释放, 或者源于成熟的 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, 进入血液, 经内吞作用进入受体细胞并去包被, 释放 miRNA 发挥生物学作用<sup>[24-25]</sup>。有研究证明, 内源性循环 miRNA 在血清中非常稳定, 经煮沸、高/低 pH、RNase 等处理, 即使反复冻融 8 次、室温放置 24 h 等情况下, 其含量仍保持相对稳定, 有效抵抗 RNase 的降解, 可能与其结合形成的蛋白复合体有关<sup>[22-23, 26]</sup>。可看出血清 miRNA 具有较高的稳定性和特异性, 具备作为理想的生物标志物用于临床检测所需的条件。故而临床上检测外周血中的血清 miRNA 就可对某些疾病的诊治、预后做出较早而准确的判定, 如 Huang 等<sup>[27]</sup>研究显示, 血清 miR-29a 和 miR-92a 联合检测能灵敏而特异的有效诊断进展期结直肠癌, Lodes 等<sup>[28]</sup>采用高通量微阵列芯片分析 5 种实体瘤患者血清 miRNA 表达谱, 发现可通过血清 miRNA 表达谱区分不同的实体瘤, Hu 等<sup>[29]</sup>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, 用 qPCR 对筛选出的患者血清 miRNA 进行了验证, 确定与患者预后有关的血清 miRNA 表达谱, 得出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, 联合检测特定的血清 miRNA 比单一检测灵敏度、特异性更高。由此可以看出, 将检测外周血清 miRNA 运用到临床研究中意义重大。

## 3 血清 miRNA 与神经免疫性疾病 MG 研究

MG 是一种 T 细胞依赖, 以乙酰胆碱受体抗体 (AchR-Ab) 为主要自身抗体的自身免疫性疾病, 其发病机制复杂。目前认为 T 淋巴细胞免疫异常在 MG 的发病机制中占有重要作用<sup>[30]</sup>, 然而关于 MG 的具体发病机制目前尚未明确, 治疗亦处于瓶颈; 作为自身免疫性疾病, MG 的免疫应答中多个环节都有 miRNA 的参与, Rodriguez 等<sup>[31]</sup>发现小鼠体内 miR2155 被敲除后可出现与人身自身免疫性疾病临床表现类似的性状。因此, 可推测, miRNA 表达和功能异常会导致机体免疫系统稳态发生变化, 从而发生 MG 这一系列自身免疫性疾病。目前针

\* 基金项目: 上海市科委基础研究重点项目 (10JC1414500); 上海市卫生局中医药科研基金项目 (2010J002B)。 作者简介: 姜超, 男, 主治医师, 主要从事中西医结合治疗神经系统疾病研究。

对 miRNA 的研究,在肿瘤领域研究得较为深入,而在自身免疫性疾病 MG 研究领域,报道尚少, Jiang 等<sup>[32]</sup>利用分子生物学方法研究 MG 患者外周血清 miRNA 发现,与健康对照组相比, MG 患者 let-7 家族外周血单个核细胞(PBMC)明显减少,诱导的 IL-10 水平与 let-7c 中的水平呈负相关,揭示出 miRNA 的异常表达/调节可能与 MG 的发病机制密切相关; Cheng 等<sup>[33]</sup>首次通过 MG 患者外周血清 miRNA 发现其 miR-320a 的显著下调,下调的 miR-320a 通过促进 COX-2 的表达诱导促炎细胞因子的过度表达,验证了 MG 患者的促炎性细胞因子为过度表达。故而,基于血清 miRNA,可深入探索 MG 的发病机制,尽早明确其病机,为寻求更为有效的 MG 治疗方法奠定基础。特此,笔者认为可按照以下图示思路进行血清 miRNA 与神经免疫性疾病 MG 研究。

#### 4 总结与展望

miRNA 可游离于细胞外,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,目前已在肿瘤诊断、预后评估中显示了其独特的应用价值,但运用在神经免疫性疾病 MG 的研究很少,鉴于 MG 独特的免疫机制,运用血清 miRNA 作为生物标志物进行临床研究,探索 MG 的发病机制无疑具有很大意义;然而运用其到 MG 的研究尚属探索阶段,仍存在许多问题,如:如何避免不同研究者在血清 miRNA 检测分析过程中采用的不同的 miRNA 提取、定量及数据处理方法所造成的研究结果的差异?如何确定最佳的血清 miRNA 标准化方法?如何将小样本试验中得到的相关血清 miRNA 表达谱在大规模、独立研究中得到验证?如何将研究发现转化为临床常规?如何进一步明确血清 miRNA 所发挥的生物学和细胞学功能?以及血清和组织 miRNA 水平的相关性联系等均需要进一步去研究;而且目前尚未明确在疾病发生、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;尚未明确药物治疗是否会导致血清 miRNA 表达谱改变。相信随着这些相关的研究方向的深入,将有助于加快血清 miRNA 作为神经免疫学生物标志物在 MG 临床研究转化的进程,为 MG 的病机阐明、寻求有效的治疗手段提供一种新的思路。

#### 参考文献

- [1] Vincent A, Palace J, Hilton-Jones D. Myasthenia gravis[J]. *Lancet*, 2001, 357(20): 2122-2128.
- [2] Oosterhuis H. Myasthenia gravis: A survey[J]. *Neurol Neurosurg*, 1981, 83: 105-135.
- [3] Oosterhuis H, Baets M, Oosterhuis H, et al. Myasthenia gravis [J]. Boca Raton, CRC, 1993, 24(1): 13-42.
- [4] Drachman DB, Angus DW, Adams RN, et al. Myasthenia antibodies cross-link AchR to accelerate degradation[J]. *N Engl Med*, 2002, 298(10): 1116-1122.
- [5] Drachman DB, Adams RN, Josifek LF, et al. Functional activities of autoantibodies to AchR and the clinical severity of myasthenia gravis[J]. *N Engl Med*, 2000, 307(6): 769-775.
- [6] Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: Past, Present, and future[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(11): 2843-2854.
- [7] Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum[J]. *Pathology*, 2007, 39(2): 197-207.
- [8] Calin GA, Sev Ignan IC, Dum Itru CD, et al. Human miRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [9] Calin GA, Croce CM. MiRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857-866.
- [10] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of miRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006.
- [11] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating miRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [12] Jan CB, Daniela W, Ruprecht K, et al. Serum miRNAs as noninvasive biomarkers for cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2010, 9(2): 306-314.
- [13] Lian S, Jakymiw A, Eystathioy T, et al. GW bodies miRNAs and the cell cycle [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(3): 242-245.
- [14] Silaharolu A, Stenvan J. MiRNAs eienetics and disease[J]. *Essays Biochem*, 2010, 48(1): 165-185.
- [15] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [16] Barrinhaus KG, Zamore PD. MiRNAs: Regulating a change of heart[J]. *Circulation*, 2009, 119(16): 2217-2224.
- [17] Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al. MiRNA expression in zebrafish embryonic development[J]. *Science*, 2005, 309(5732): 310-311.
- [18] van Rooij E. The art of miRNA research [J]. *Circ Res*, 2011, 108(2): 219-234.
- [19] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al. MiRBase: tools for miRNA genomics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(1): 154-158.
- [20] Bethke A, Fielenbach N, Wang Z, et al. Nuclear hormone receptor regulation of miRNAs controls developmental progression[J]. *Science*, 2009, 324(5923): 95-98.
- [21] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated miRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(5): 672-675.
- [22] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of miRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006.
- [23] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating miRNAs as stable blood based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [24] 许欣宜. 血清 miRNA 作为肿瘤生物标志物的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(18): 2229-2230.
- [25] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and miRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659.
- [26] Jan CB, Daniela R, Ruprecht K, et al. Serum miRNAs as non invasive biomarkers for cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2010, 9(2): 306-314.
- [27] Huang Z, Huang J, Li S, et al. Plasma miRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127: 118-126.
- [28] 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.
- [29] Hu Z, Chen X, Zhao Y, et al. Serum miRNA signatures identified in a genome-wide serum miRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(10): 1721-1726.

- [30] Balandina A, Lecart S, Darteville P, et al. Functional defect of regulatory CD4+ CD25+ T-cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis[J]. *Blood*, 2005, 105(6):735-741.
- [31] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/miRNA 155 for normal immune function [J]. *Science*, 2007, 316(5824):608-611.
- [32] Jiang L, Cheng Z, Qiu S, et al. Altered let-7 expression in Myasthenia gravis and let-7c mediated regulation of IL-10 by directly

targeting IL-10 in Jurkat cells[J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 14(2): 217-223.

- [33] Cheng Z, Qiu S, Jiang L, et al. MiR-320a is downregulated in patients with Myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1 [J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2012, 11, (30):2573-2592.

(收稿日期:2013-01-18)

• 综 述 •

## 微流控芯片即时检验技术的应用研究进展

王 韧, 王 婷 综述, 张蕾蕾 审校

(江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏镇江 212003)

**关键词:** 微流控芯片; 床旁诊断化验信息系统; 血液化学分析

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.033

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2013)13-1709-03

微型化和集成化是当今生物化学分析发展的重要方向,而微流控芯片(Microfluidic chips)则是其中的前沿领域之一。该技术以微机电加工为依托,以微通道网络为结构特征,其目标是将生化分析等领域中所涉及的取样、预处理、分离、混合、反应、检测等操作单元部分或全部集成于一块几平方厘米大小的芯片上,通过对芯片微通道网络内微流体的操控实现常规生化实验室的各种功能,故又被称为芯片实验室(Lab on a chip)。微流控芯片在样品分析方面具有快速、高通量和低消耗的特点,同时兼具操作灵活和便携化的优势,使其在检验医学方面展现出巨大的发展潜力和应用价值<sup>[1-2]</sup>。尤其在即时检验(Point of care testing, POCT)领域,已成为其重要发展方向,受到世界范围内的普遍关注<sup>[3-4]</sup>。本文从微流控芯片 POCT 的特点出发,对其近年来的应用研究现状进行了介绍,并就其今后发展和应用中可能存在的问题作了一定分析展望,以期能够与其他研究者提供参考和借鉴。

### 1 微流控芯片 POCT 概况

POCT 是现代医学检验发展的一种新模式,美国国家临床生化科学院将其定义为“在接近患者治疗处,由未接受临床实验室学科训练的临床人员或者患者(自我检测)进行的临床检验。POCT 是在传统或中心实验室以外进行的一切检验”。笼统地说,POCT 是指在中心实验室之外,靠近检测对象,并能及时报告结果的一个可移动的微型检测系统。POCT 在提高医学诊断效率和改进诊断结果方面具有明显的优势,使其在诞生之初就成功应用于 HIV(艾滋病)和血糖检测领域,并陆续在其他检验和疾病诊断方面得到广泛应用<sup>[5]</sup>。

微流控芯片固有的快速、灵敏特点和取代常规生化实验室的潜力使其成为实现 POCT 的理想载体,并已公认为 POCT 发展的重要方向<sup>[6-7]</sup>,在包括临床分析(血气分析、葡萄糖/乳酸分析等)、DNA 分析(包括核酸序列分析)、蛋白质组学分析(蛋白质和肽)、综合分析、免疫测定、毒性检测和法医鉴定等一系列生化分析领域具有广阔的应用前景。微流控芯片 POCT 装置在尺寸规模和检测灵活性方面与中心实验室相比有着明显优势,检测设备投入和样品/试剂消耗大幅减小,并且更加快速、简便和经济,尤其适用于缺少昂贵大型检测设备的发展中国家和偏远地区<sup>[8-9]</sup>。

### 2 微流控芯片 POCT 的应用研究现状

微流控芯片 POCT 继承了微流控技术的诸多特征,其研究覆盖生物工程、微机电、材料、化学和物理等众多学科。在免疫测定方面,微流控芯片 POCT 的研究主要集中于病原检测(细菌、病毒、寄生虫等)和分子诊断(寡核苷酸)等方面<sup>[10]</sup>;同时,血液分析<sup>[11-13]</sup>、核酸提取<sup>[14-15]</sup>、细胞分析<sup>[16]</sup>等领域的研究也不断涌现。各部分研究既有所独立、又相互交融,共同推动着微流控芯片 POCT 技术的发展。

以现代生命科学和医学研究领域的核酸提取为例,微流控芯片 POCT 在其研究过程中表现出独特的魅力。传统技术在对细胞 DNA 提取方面相当费时,操作过程中用到的有毒试剂还会给测试结果带来不利影响。而借助微流控芯片从生物样品细胞内提取和隔离核酸则为基因分析带来了革命,并成为当前 DNA 检测分析的重要步骤。Wolfe 等<sup>[17]</sup>利用微流控芯片,通过固相萃取(SPE)方法从细胞溶解物中获得核酸,该方法主要包括三个步骤:(1)在离液盐环境下 DNA 的吸附;(2)通过酒精水溶液清除杂质;(3)对少量含有吸附 DNA 缓冲液的洗脱处理。由于 SPE 依赖于 DNA 和固相载体(通常为二氧化硅或功能磁性微粒)之间的结合性能<sup>[18-19]</sup>,增强芯片材料和核酸之间的亲和性曾引起大家的关注<sup>[14,20]</sup>,但由于其对 pH 值、温度和缓冲液成分极为敏感,使分析过程中难以保留完整的 DNA,易造成部分片段的缺失。同时,除 DNA 之外的其他细胞溶解物还可能对期望的结合反应造成阻碍(例如细胞溶解物中带负电荷的蛋白会通过芯片表面正电荷之间的相互作用削弱提取效率),致使目前的提取效率普遍停留在 60%~90%<sup>[21]</sup>,因此需开发新技术以弥补其不足。

最近, Benitez 等<sup>[22]</sup>借助 PDMS 微流控芯片在单细胞水平上对人体染色体 DNA 进行了提取、纯化和拉长处理。该方法与借助核酸与功能表面间生化和静电相互作用的传统方法不同,人体细胞在微通道内被大量无规则排列的微柱捕获后,通过细胞溶解处理使 DNA 链缠绕拉伸固定于微柱间,即可获得 100% 的完整基因组 DNA,然后可对 DNA 进行下游和离片(off-chip)分析。该技术使从少量细胞和单细胞中隔离和分析完整基因组 DNA 能为可能,将为 DNA 测序和基因分析提供新的途径。