中国科学 C辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 1 期: 64 ~ 68
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

循环 microRNA 与肿瘤诊断

铁轶, 付汉江, 郑晓飞*

军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

* 联系人, E-mail: xfzheng100@126.com

收稿日期: 2008-09-22; 接受日期: 2008-11-28

国家自然科学基金(批准号: 30870529 和 30873008)和“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”重大科技专项(批准号: 2008ZX10002-016)资助项目

摘要 miRNA 是一类小分子调控 RNA, 在肿瘤的发生与控制方面发挥着重要的作用. 已经发现在肿瘤患者的循环核酸中存在源自肿瘤的 miRNA 分子, 这一现象提示循环 miRNA 分子可能成为无创诊断癌症的一个有效的方法. 本文综述了循环 miRNA 作为循环生物标志物在肿瘤诊断中的应用, 以及该领域的最新研究进展.

关键词
循环 miRNA
肿瘤
诊断

半个多世纪前, Mandel和Metais[1]发现血浆和血清中存在循环核酸(circulating nucleic acids, CNAs). 循环核酸属于细胞外核酸(extracellular nucleic acids, ENAs), 细胞外核酸按照种类可以分为DNA和RNA. 其中细胞外RNA按照其所处位置可以分为细胞膜结合RNA(cell bound RNA)、循环RNA (circulating RNA)和细胞外基质RNA(RNA in the extracellularmatrix). 研究揭示, 正常人血浆内存在RNA, 细胞外普遍存在RNA[2]. 从发现循环核酸开始, 人们就一直致力于循环核酸用于临床疾病的无创诊断预警方面的应用研究中. 随着检测技术方法的不断进步, 对于循环核酸在疾病诊断中的应用研究有了实质性的进展, 在循环RNA作为肿瘤诊断和预后、器官移植监测、急性疾病诊断、产前遗传疾病的诊断等领域都取得了一些重要成果[3,4]. 对肿瘤的研究发现, 患者血浆中RNA的含量明显增加. 瘤细胞基因表达模式与正常组织有明显的不同, 可以通过检测肿瘤病人循环RNA中的肿瘤特异的mRNA来进行肿瘤的诊断, 因此血浆RNA分子用作癌症的诊断标志分子显示了良好的应用前景[5,6]. 近年来新发现的microRNA (miRNA)与肿瘤的发生和发展有着极为密切的关系. 基于miRNA在肿瘤中的表达往往是失调的, 且具有组织特异性, miRNA在血液中有异常高的稳定性这些事实, 研究者推测miRNA可能是一个理想的基于血液的肿瘤检测生物标志物. 最近在这一应用研究领域取得了重要进展, 本文将对此给予介绍.

1 miRNA 与肿瘤

miRNA是一类长约 19~24 nt的非编码单链小RNA分子, 在动物中, 绝大多数miRNA可以通过与靶基因 3 ′UTR区互补结合, 抑制靶基因翻译成蛋白质, 进而在细胞、组织或个体水平上影响生物体的生长发育, 并参与多种疾病过程[7,8]. 一系列的研究表明miRNA在细胞生长和凋亡、血细胞分化、同源异形盒基因调节、神经元的极性、胰岛素分泌、大脑形态形成、心脏发生、胚胎发育和脂肪代谢等过程中发挥重要作用. 虽然对已发现的miRNA分子的功能和作用靶基因了解的还很少, 但是对miRNA在不同组织和疾病中的表达谱分析发现, miRNA的表达谱具有明显的组织特异性, 在一些疾病中miRNA的表达谱改变具有明显的特征, 尤其是在肿瘤疾病中. 正常组织和肿瘤组织中miRNA表达明显改变. miRNA

在不同肿瘤中具有特定的表达模式. miRNA在肿瘤中表达的这些特点在肝癌、肺癌、肠癌、卵巢癌和白血病等多种恶性肿瘤中得到了证实[9]. 这些特点也使miRNA有可能成为肿瘤诊断的新的生物学标记和治疗药物作用的靶标. 鉴于血清中循环RNA在肿瘤诊断和预后应用研究中取得了重要进展, 国内外的多家实验室开展了循环miRNA作为肿瘤无创诊断生物学标志物的研究, 并取得了重要成果.

2 循环 miRNA 的存在

目前已经发现并被miRBase数据库[10]收录的人类miRNA分子有 695 种. 其中绝大部分的miRNA分子在不同病理和生理状况下进行表达, 并且多数miRNA能够在人体液中检出. Chen等人[11]应用Solexa测序技术对正常的中国人血清miRNA进行测序分析, 在男性和女性血清中分别发现了 100 种和 91 种miRNA分子. Taylor和Gercel-Taylor[12]分析了来自同一卵巢癌患者的癌细胞和分离自血清的外来体(exosome)中的miRNA, 在被分析的 467 种miRNA中有 218 种呈阳性. Mitchell等人[13]为了证实人体血浆中是否存在miRNA分子, 分离了健康人血浆中的18~24 nt的RNA, 构建了小RNA文库, 对得到的 125 个DNA克隆进行测序分析, 在所采用的血浆样本中克隆到了 37 种miRNA分子, 其中包括let-7a, miR-16和miR-15b等. 对其中克隆到的中等丰度的miR-16 和miR-24, 低丰度的miR-15b采用qRT-PCR方法进行检测, 在 3 位正常人血浆中 3 种miRNA分子表达量在每微升血浆 8,910~133,970 拷贝之间. 已有的对正常人和不同疾病人血清和血浆中miRNA检测结果表明, miRNA分子同已知的循环核酸(DNA和RNA)一样, 广泛存在于正常人和不同种病人的血清和血浆中, 并且随着生理状况、疾病的种类和病程的不同, miRNA分子在血清和血浆中存在的种类和数量将发生变化. 循环miRNA在体液中的存在量虽然高低不同, 但是完全可以采用基因扩增技术进行检测. 这一事实为循环miRNA作为疾病无创诊断和预后的生物标志物提供了潜在的可能.

循环miRNA是如何产生的? 其生物学功能又是什么? 一系列的问题还有待阐明. 对于循环miRNA的来源目前主要观点有: 循环RNA来自于凋亡或坏死的细胞, 细胞的主动释放, 以及循环细胞的裂解. 但对于特定循环miRNA的真实来源还存在许多未知的因素. 研究表明, 内源循环miRNA分子多数不是以游离形式存在的, 常与蛋白等构成颗粒存在, 因而内源性的循环RNA分子具有良好的抗RNase降解能力, 有较高的稳定性. 这一特点也为循环RNA发挥生物学功能提供了前提保证. Benner[14,15]早在 1988 年就曾提出“细胞外通讯RNA(extracellular communication RNA)”假说, 并认为细胞外RNA在细胞增殖和分化中起重要作用. Valadi等人[16]最近在研究人和小鼠的肥大细胞系(HMC-1 和MC/9)外来体时发现其中存在mRNA和miRNA分子, 体外翻译证明外来体mRNA是有功能的. 实验还发现外来体RNA可以实现在细胞间的转移, 小鼠外来体mRNA转移到人肥大细胞中后, 在受体人细胞中可已检测到鼠蛋白的表达, 这表明外来体mRNA和miRNA可以从一个细胞转移到另外的细胞中, 并且在新的细胞中发挥功能. Valadi等人将这种RNA命名为外来体穿梭RNA(exosomal shuttle RNA, esRNA). 已有的部分研究结果已经充分说明细胞外的循环RNA分子并不是“垃圾RNA”(junk RNA), 循环RNA可能在生物体中具有重要的生物学功能. 对细胞外RNA的了解, 将丰富对RNA生物学功能的认识, 这对全面阐释生命的本质, 提高人类的健康水平具有重要意义.

3 循环 miRNA 检测方法

RNA分子易于降解, 循环RNA的含量一般较低, 在一定程度上限制了体液中RNA分子作为生物标志物的应用. 但是, 最近研究结果表明循环miRNA在血清和血浆中通常是与蛋白质结合在一起, 具有良好的稳定性. 这就为循环miRNA作为生物标记物进行检测提供了可能. 目前已经发展了多种有效的miRNA检测方法, 根据研究目的和样品来源的不同可以选择最适合的检测方法. 对于发现新的miRNA分子, 克隆测序仍是首选方法[17,18]. Northern blot是验证和确认miRNA的重要方法, 但该方法繁琐并且灵敏度较低, 不适用于临床样本的高通量检测[19]. RT-PCR方法是检测miRNA表达的一种常用方法, 实时定量PCR(quantitative real-time PCR)可以很精确地定量分析miRNA的表达. 基于PCR原理的miRNA检

测方法有多种, 常用的有基于茎-环的RT-PCR方法(stem-loop RT-PCR)[20], 基于polyA加尾的RT-PCR方法[21], 以及其他类似的方法. 实时定量PCR是循环miRNA定量检测最常用的有效方法. 另外芯片技术(microarray)检测方法可以实现快速、高通量的检测[22]. 目前已有多种类型的miRNA检测芯片可以选用. 但是基因芯片检测方法的重现性和准确性比较差, 一般多用于初筛, 对获得的结果通常需要采用Northern blot和实时定量PCR进行验证. 最近, Driskell等人[23]建立了表面增强拉曼光谱法(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)用于miRNA检测和分类. Kato[24]建立了一种新的采用荧光DNA探针检测成熟miRNA的技术. 目前miRNA检测限已经可以达到fM水平. 随着研究的深入, miRNA检测方法将会不断完善和规范化, 最终将建立一套高灵敏度、高精确度的循环miRNA检测方法.

循环miRNA检测过程中, 样品的处理和RNA制备十分重要. Mitchell等人[13]采用EDTA作为血液抗凝剂, 血清和血浆miRNA提取采用*mir*Vana PARIS试剂盒, 与常规提取RNA所不同的是, 用等体积酸性酚-氯仿抽提样品两次以更好地去除蛋白成分. Chen等人[11]采用Trizol方法提取血清中的miRNA分子, 为了去除血清中的蛋白, 也增加了酚-氯仿抽提步骤. Gilad等人[25]采用了不同方法制备血清miRNA, 首先用蛋白酶K消化血清, 然后用酸性酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, 水溶解, DNase消化, 再次用酸性酚-氯仿抽提.

Mitchell等人[13]的检测结果表明血浆室温放置24 h, 或经过8次冻融, 采用基于茎-环的RT-PCR方法检测, 内源miRNA的量没有明显变化, 证明血浆中的内源miRNA分子是稳定的. 采用基于茎-环的RT-PCR方法, 即使不提取血清中的miRNA, 直接以血清为模板也能够检测到miRNA分子. 对不同极端条件下血清miRNA稳定性研究表明, 经过多次冻融, 极端pH(pH 1和pH 13)处理3 h, 血清miRNA仍有极好的稳定性. Gilad等人[25]对miRNA检测采用的方法是首先进行polyA加尾, 然后用带有锚定引物的oligodT进行反转录, 之后进行PCR反应, 用探针进行检测, 同样获得了良好的结果. 检测结果表明解冻的血清室温放置4 h对不同miRNA的量没有明显的改变, 但血清经过两次冻融会稍有影响, 但是不影响血清miRNA作为生物标志物的检测. 在血浆和血清中, 同一种miRNA的检测结果具有极好的相关性, 说明血清和血浆miRNA都适合用于生物标记检测.

上述研究结果表明, 血清中的miRNA分子有良好的稳定性, 采用常规RNA提取方法就可以获得满足实验要求的miRNA. 对于血清中miRNA分子的检测, 实时定量PCR是最适用和有效的方法. 这些便利条件为临床大规模检测奠定了基础. 今后需要建立和形成一套标准化的血液样本采集、运输保存、RNA提取制备和实时定量PCR检测技术体系, 以及数据处理系统, 确保miRNA检测结果标准化.

4 循环 miRNA 在肿瘤检测中的应用

理想的循环miRNA标志物是在肿瘤细胞中等或高水平表达, 在健康人血浆中检测不到或低水平存在. Mitchell等人[13]为了验证血清中是否存在来自肿瘤的循环miRNA分子, 设计了一个精巧的实验, 将人前列腺癌细胞22Rv1接种到NOD/SCID免疫缺陷小鼠体内, 在接种癌细胞的小鼠血浆中检测到了源自人肿瘤细胞, 而在小鼠中没有同源基因的miR-629*和miR-660, 并且miR-629*和miR-660丰度与移植瘤小鼠肿瘤的大小有一定的相关性. 这一实验结果表明源自肿瘤的miRNA能够进入血液循环, 循环miRNA的量一定程度可以反映肿瘤的大小. 随后, 选择了miR-100, miR-125b, miR-141, miR-143, miR-205和miR-296作为人前列腺癌候选标志物, 并进行了深入研究. 对25个转移性前列腺癌和25个健康人血清进行分组检测, 结果miR-141在前列腺癌患者血浆中含量明显高于对照组, 并且与前列腺特异抗原(prostate-specific antigen, PSA)水平有一定的相关性. 上述结果表明, miR-141可以成为检测前列腺癌的循环miRNA标志物.

Chen等人[11]采用Solexa测序方法对健康人血清、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和肠癌(colorectal cancer, CCS)患者血清中的小RNA分子进行测序分析. 与对照血清相比, 肺癌血清miRNA谱明显不同, 28种正常血清中存在的miRNA没有检出, 但是新检测出了63种在正常血清中没有的miRNA分子. 而且肺癌血清miRNA谱与肺癌血细胞(lung cancer blood cell, LCC)miRNA谱也存在明显的

差别, 有 57 种miRNA在肺癌血清和肺癌血细胞中共有, 但有 76 种miRNA仅在肺癌血清中检出. 这一点与健康人也不同, 健康人血清和血细胞的miRNA谱基本相同. 随后对差别最大的miR-25 和miR-223 进行了验证, 检测了 152 例肺癌血清和 75 例健康人血清, miR-25 和miR-223 在肺癌患者血清中高表达得到了验证. Chen等人[11]采用同样的方法分析了肠癌血清miRNA, 结果在肠癌血清中检测出了 69 个正常血清中没有的miRNA. 但是却发现肠癌血清与肺癌血清中的miRNA有相当数量的重叠, 这提示癌症患者血清中可能存在共同的miRNA分子.

卵巢癌的早期诊断对于提高生存率十分重要, 但是大多数患者被确诊时已进入晚期. Taylor和Gercel-Taylor[12]对卵巢癌肿瘤释放到血液中的外来体中的miRNA进行了检测, miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-200b, miR-203, miR-205 和miR-214 等 8 种miRNA在卵巢癌细胞和外来体中水平相当, 而来自良性卵巢疾病和卵巢癌患者的EpCAM阳性的外来体中miRNA谱明显不同. 这一结果表明, 循环肿瘤外来体中miRNA谱可能用于卵巢癌的筛查.

5 循环 miRNA 与其他临床诊断

Chen等人[11]还采用Solexa测序方法对糖尿病(diabetes)患者血清中的小分子RNA进行测序分析. 糖尿病患者血清miRNA谱与正常血清相比也有明显的不同, 虽然没有肿瘤血清与正常血清的差别大. 有意思的是, 糖尿病血清与肺癌血清共有大量正常血清中没有的miRNA. 糖尿病血清与糖尿病血细胞共有 84 种相同的miRNA, 它们分别独有 17 和 27 种miRNA. 泊松相关散点图显示, 血清miRNA改变比血细胞miRNA改变能更敏感地反映糖尿病患者的病情.

Gilad等人[25]采用实时定量PCR方法检测了 10 名非孕妇、10 名妊娠早期和 10 名妊娠晚期孕妇血清miRNA谱, 共检测了 28 种miRNA分子, 其中包括在胎盘中表达的miRNA. 结果所有胎盘表达miRNA在孕妇血清中高表达. 其中血清中miR-526a和miR- 527 水平在妊娠晚期显著上升. 研究发现, 胎盘miR-526a, miR-527 和miR-520d-5p可以用来准确地辨别是否妊娠. 可见, 循环miRNA还可以反映特定的生理变化.

对于循环 miRNA 与肿瘤及其他疾病的关系研究尚处于起步阶段, 但现有研究结果已为疾病的无创诊断研究开辟了一条新的道路.

6 展望

miRNA 分子广泛参与基因表达调控、生物应激和非生物应激反应. miRNA 分子不仅自身作为功能分子发挥作用, 还广泛参与和决定基因表达调控和蛋白质翻译, 进而影响细胞的新陈代谢等所有生命过程. miRNA 标志物将成为疾病发生发展相关基因标志物、蛋白质标志物和代谢物标志物整体“网络”中的“结点”, 可以实现从蛋白质、DNA 和 RNA 三大生物分子方面对肿瘤的发生和发展进行预警和预后. 因此, 循环 miRNA 分子标志物, 将改变和补充对肿瘤发生发展的传统认识, 整合血清基因组、蛋白质组、多肽组和代谢组等研究结果发现的肿瘤生物标志物, 将全方位认识肿瘤发生和发展的分子机制, 有可能提供肿瘤诊断和治疗的组合生物标志物. 随着循环 miRNA 检测方法的标准化, 以及对循环 miRNA 的生成机制、生物学功能和与相关肿瘤的关系的逐步阐明, 可以相信循环 miRNA 在未来的临床无创疾病诊断和预后中将展示出广阔的临床应用前景.

参考文献

1 Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez 1' Homme. C R Acad Sci Paris, 1948, 142(3): 241—243

2 Kamm R C, Smith A G. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. Clin Chem, 1972, 18(6): 519—522

3 Tsang J C, Lo Y M. Circulating nucleic acids in plasma/serum. Pathology, 2007, 39(2): 197—207[DOI]

4 焦虎平, 郑晓飞. 细胞外RNA的研究进展. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(3): 272—275

5 Chan K C, Lo Y M. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. Br J Cancer, 2007, 96(5): 681—685[DOI]

6 Anker P, Mulcahy H, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer time for large-scale clinical studies. Int J Cancer, 2003, 103(2): 149—152[DOI]

7 Kloosterman W P, Plasterk R H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. Dev Cell, 2006, 11(4): 441—450 [DOI]

8 Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs: microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259—269[DOI]

9 Calin G A, Croce M C. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857—866[DOI]

10 Griffiths-Jones S, Saini H K, van Dongen S, et al. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res, 2008, 36: D154—158[DOI]

11 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. Cell Res, 2008, 18(10): 997—1006[DOI]

12 Taylor D D, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecol Oncol, 2008, 110(1): 13—21[DOI]

13 Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10513—10518[DOI]

14 Benner S A. Extracellular communicator RNA. FEBS Lett, 1988, 233(2): 225—228[DOI]

15 Benner S A. The return of pancreatic ribonucleases. TIBS, 1989, 14(10): 396—397

16 Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 654—659[DOI]

17 Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, et al. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. Methods, 2008, 44(1): 3—12

18 Fu H, Tie Y, Xu C, et al. Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. FEBS Lett, 2005, 579(17): 3849—3854[DOI]

19 Pall G S, Hamilton A J. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1077—1084

20 Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20): e179[DOI]

21 Fu H J, Zhu J, Yang M, et al. A novel method to monitor the expression of microRNAs. Mol Biotechnol, 2006, 32(3): 197—204[DOI]

22 Liu C G, Calin G A, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(26): 9740—9744[DOI]

23 Driskell J D, Seto A G, Jones L P, et al. Rapid microRNA(miRNA) detection and classification via surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). Biosens Bioelectron, 2008, 24(4): 923—928[DOI]

24 Kato Y. An efficient fluorescent method for selective detection of mature miRNA species. Nucleic Acids Symp Ser(Oxf), 2008, 52(1): 71—72[DOI]

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