

[6] Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system[J]. Thromb Haemost, 2005, 93(16): 647-654.

[7] Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, et al. Suppressed intrinsic fibrinolytic activity by monoclonal anti-beta-2 glycoprotein I autoantibodies: possible mechanism for thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome[J]. Br J Haematol, 2002, 119(68): 781-788.

[8] Jurado M, Páramo JA, Rocha E. Fibrinolytic potential and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and other connective tissue disorders[J]. Thromb Haemost, 1992, 68(13): 516-520.

[9] Ames PR, Tommasino C, Iannaccone L, et al. Coagulation activation and fibrinolytic imbalance in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies crucial role for acquired free protein S deficiency[J]. Thromb Haemost, 1996, 76(14): 190-194.

[10] Atsumi T, Khamashta MA, Andujar C, et al. Elevated plasma lipoprotein (a) level and its association with impaired fibrinolysis in patients with antiphospholipid syndrome[J]. J Rheumatol, 1998, 25(1): 69-73.

[11] Li XN, Grenett HE, Benza RL, et al. Genotype-specific transcriptional regulation of PAI-1 expression by hypertriglyceridemic VLDL and Lp(a) in cultured human endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(62): 3215-3223.

[12] Chen PP, Yang CD, Ede K, et al. Some antiphospholipid antibodies bind to hemostasis and fibrinolysis proteases and promote thrombosis[J]. Lupus, 2008, 17(7): 916-921.

[13] Yang CD, Hwang KK, Yan W, et al. Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin[J]. J Immunol, 2004, 172(94): 5765-5773.

[14] Lu CS, Horizon AA, Hwang KK, et al. Identification of polyclonal and monoclonal antibodies against tissue plasminogen activator in the antiphospholipid syndrome[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(13): 4018-4027.

[15] Cugno M, Cabibbe M, Galli M, et al. Antibodies to tissue-type plasminogen activator (t-PA) in patients with antiphospholipid syndrome: evidence of interaction between the antibodies and the catalytic domain of t-PA in 2 patients[J]. Blood, 2004, 103(28): 2121-2126.

[16] Ippolito S, Simone N, Nicuolo F, et al. Antiphospholipid antibodies: effects on trophoblast and endothelial cells[J]. Am J Reprod Immunol, 2007, 58(22): 150-158.

[17] 王艳华, 陈阿梅, 刘庆平. β_2 -GPI 在抗磷脂综合征中的作用[J]. 内蒙古医学院学报, 2006, 12(28): 83-87.

[18] Horbach DA, van Oort E, Lisman T, et al. Beta2-glycoprotein I is proteolytically cleaved in vivo upon activation of fibrinolysis[J]. Thromb Haemost, 1999, 81(21): 87-95.

[19] Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, et al. Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis[J]. Blood, 2004, 103(83): 3766-3772.

[20] López-Lira F, Rosales-León L, Martínez VM, et al. The role of beta2-glycoprotein I (beta2GPI) in the activation of plasminogen[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1764(162): 815-823.

[21] Ieko M, Ichicawa K, Atsumi T, et al. Effects of beta 2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin on extrinsic fibrinolysis[J]. Semin Thromb Haemost, 2000, 26(19): 85-90.

[22] Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, et al. Suppressed intrinsic fibrinolytic activity by monoclonal anti-beta-2 glycoprotein I autoantibodies: possible mechanism for thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome[J]. Br J Haematol, 2002, 119(64): 781-788.

[23] Bu C, Gao L, Xie W, et al. Beta2-glycoprotein i is a cofactor for tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(14): 559-568.

[24] Hajjar KA. The endothelial cell tissue plasminogen activator receptor[J]. J Biol Chem, 1991, 266(36): 21962-21970.

[25] Ling Q, Febbraio M, Deora B, et al. Annexin II is a key regulator of fibrin homeostasis and neoangiogenesis[J]. J Clin Invest, 2004, 113(19): 38-48.

[26] Ma K, Simantov R, Zhang JC, et al. High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II[J]. J Biol Chem, 2000, 275(43): 15541-15548.

[27] Cesarman-Maus G, Rios-Luna NP, Deora AB, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor annexin 2, in antiphospholipid syndrome[J]. Blood, 2006, 107(14): 4375-4382.

(收稿日期: 2011-09-09)

• 综 述 •

临床诊断中的微阵列基因组 DNA 分析技术的发展与应用

姚如恩 综述, 傅启华 审校
(上海儿童医学中心 200127)

关键词: 基因组; DNA; 微阵列
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 19. 025 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2011)19-2220-04

目前, 在科研和临床实验室中涉及的各种主要微阵列技术及平台的发展和平台, 虽然还没有标准化的操作平台, 但是综合的寡核苷酸微阵列平台, 包括相对基因杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 和基因型杂交阵列 (genotyping hybrid arrays), 因其灵活性和设计与升级的个体化、生产制造过程的相对简单和检测基因组不平衡的高效性, 正逐步成为众多方法中的首选。拷贝数变化 (CNVs), 是一类可通过微阵列基因组 DNA 分析 (microarray-based genomic DNA profiling,

MGDP) 检测到的基因组缺失或复制的现象, 是一种常见的基因型。目前正在进行的大量健康人群的 CNVs 自然分布的调查, 结合临床患者的资料和研究, 将会提高人们对 CNVs 自然分布的了解, 成为更多新发现的来源。

人类 DNA 突变包括从单个核苷酸的改变到整个染色体的改变。新发生的单个核苷酸突变概率约为每代 1.7×10^{-8} 个, 因此估计每个新生儿都带有 2 个引起氨基酸改变的点突变, 而整个染色体发生改变并引起非整倍体的现象在新生儿中

占 0.3%^[1]。大小介于这两者之间的基因组变化包括了许多微观和亚微观的异常,即涉及一个基因的若干外显子或者数个基因的变化。新生儿中 CNVs 缺失和复制的发生率分别为 1/8 和 1/50,介于点突变和染色体倍数变化的概率之间^[2]。

对于点突变,可以通过针对目的片段的 PCR 反应和 Sanger 测序技术进行有效检测。而染色体的重排和非整倍体现象则归属于传统细胞遗传学的检测范围。荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)代表了细胞遗传学技术和分子遗传学技术的一种融合。这类技术是临床上检测和某些临床表现相关的基因组亚微观变化(微缺失综合征和微复制综合征)的最佳选择,但是此类技术的局限性在于每次只能检测一个预先选定的区域。其他用来检测 CNVs 的技术,如多重连接依赖的探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)和实时 PCR 等,是对 DNA 直接测序技术和 FISH 技术的补充。但上述所有技术都有着共同的局限性:低信息含量、低通量和必须在检测前确定候选基因和目的片段。

MGDP 技术能够在一次分析过程中同时检测到整个基因组微观和亚微观的 CNVs。该技术敏感性极高,平均成本低,并且能检测到传统检测方法所漏检的突变。该技术可以成为在细胞遗传学检测之前的第一种检测手段。

1 MGDP 技术的发展

在过去的十年中,微阵列技术已被广泛应用于基因表达分析,两种主要的技术平台:CGH 阵列和基因型杂交阵列,除了芯片制造和探针种类的不同之外,原理基本相同,都是依赖于探针和目的片段的特异性杂交。CGH 阵列采用一种双色系统,通过与参照标本的对比来显示待测样本的 CNVs;基因型杂交阵列技术无参照样本,而直接通过杂交信号的强度来显示 DNA 的拷贝数量。此外,基因型杂交阵列还能提供 SNP 信息。

1.1 CGH 微阵列技术从低分辨率的 BAC 阵列发展到高密度的寡核苷酸阵列 CGH 技术于 1992 年由 Kallioniemi 等^[3]首次报道,用中期染色体作为探针检测癌基因 DNA。该研究的基础是针对癌细胞 DNA 和健康参考细胞 DNA 标记两种不同的荧光染料,再将已标记的样品和健康参考细胞的中期染色体杂交。两种不同荧光强度的比值即反映了癌细胞和正常细胞中拷贝数的不同。由于这项技术使用中期染色体作为杂交探针,因此也被称为“染色体 CGH”。实质上,染色体 CGH 和 FISH 原理相似,都使用整个基因组的标记 DNA 作为探针,这样就可以进行全基因范围的检测和针对特定染色体不同区域的检测。虽然染色体 CGH 技术在检测癌基因中的大型基因不平衡时效果较好,但其检测能力也由于使用中期染色体作为探针而大大受限。

CGH 技术的主要突破性进展和微阵列技术与十年前的出现紧密相关。新技术采用克隆基因组 DNA 来取代标记中期染色体作为杂交探针。新的以微阵列为基础的 CGH 技术所展示的分辨率,完全取决于探针的大小和密度。微阵列技术和 CGH 的结合使得检测分辨率大大提高,是 CGH 发展中一个极其重要的进步。

第 1 代 CGH 微阵列技术,也叫做矩阵 CGH(matrix CGH),由 Solinas 等^[4]于 1997 年研发,使用黏粒和质粒人工染色体克隆作为探针。随后,又有使用细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)和 cDNA 克隆作为探针的 CGH 微阵列技术。此后针对该项技术的主要改进方向为增加探针

的密度和覆盖范围,并逐步降低检测过程中的信噪比。CGH 技术上最新的突破是采用寡核苷酸序列作为探针^[5]。与使用 BAC 作为探针的 CGH 技术相比,寡核苷酸探针 CGH 拥有更好的重复性、特异性和敏感性。

1.2 基因型阵列技术从低分辨率的 SNP 阵列发展到高分辨率整合 SNP 和 CNV 探针的杂交阵列技术 SNP 阵列技术为基础的基因型阵列,起初是用于测序、基因分型和基因表达的研究中。Affymetrix 公司通过其专利光刻技术(photolithographic technology)开发出寡核苷酸 SNP 阵列技术^[6]。此后,SNP 阵列技术的密度不断提高。与此同时,Agilent 公司通过其喷墨技术(ink-jet)研发出基于长序列寡核苷酸的全基因组 CGH 阵列技术^[7]。Affymetrix 的 SNP 阵列在基因分型外还有检测基因组拷贝数变化的能力。类似的 Illumina 公司也通过其他的技术研发出商业化的 Beadchips,用于基因分型和 CNVs 分析^[8]。这些技术平台成本控制较好,检测能力强,客户自助设计和修正探针的便捷性高,使得其在基础研究和转化医学研究中的应用越来越广泛。

基因型杂交阵列技术在基因分析上最大的进展是混合基因阵列技术的研发,如 Affymetrix 公司的全基因组人类 SNP 阵列 5.0 和 6.0 版本,该技术平台将检测 SNP 的探针和检测拷贝数变化的 CNVs 探针相结合^[9]。SNP 阵列 6.0 版本包括了 906 600 个 SNP 探针和 740 000 个 CNVs 探针,平均分布于整个基因组,并有另外的 202 000 个针对已知的 5 700 个 CNVs 区域的探针。由此可知,SNP 阵列 6.0 版本有同时针对 SNP 分型、CNVs 分析和杂合性缺失检测的 180 万个探针。混合阵列技术所同时提供的大量基因分型信息和 CNVs 数据更能体现该平台的价值所在。混合阵列技术最长足的进展在于通过杂合性缺失分析检测拷贝数不变的基因重排,也叫做单亲二体型(uniparental disomy, UPD)。

2 针对患者标本的微阵列基因组 DNA 分析技术转化研究与应用

MGDP 技术目前已经被大量应用于转化医学的研究中,而这些研究所产生的重要信息将为该技术走向临床诊断做出巨大的贡献。目前有研究采用低分辨率 BAC 阵列检测畸形、发育迟缓和先天性智力发育落后的患者^[10]。根据不同技术平台和受检人群的研究数据显示,多种先天异常、发育迟缓、智力发育落后的患者中,致病性基因不平衡检出率为 12%~18%,而这其中只有 3%~5%能通过 G 带染色体核型分析同时检出,其余的 9%~13%必须通过微阵列技术检测到^[10]。在另一项针对染色体非整倍体现象的研究中,SNP 阵列技术展示出相对于 FISH 技术的优越性^[11]。正如人们所预计的,定向基因分析的检出率总是低于覆盖全基因组的分析,大量的实验数据证实了 CGH 阵列技术相对于染色体核型分析和 FISH 有着更高的敏感性和特异性。

CGH 阵列在 2004 年已经达到商业化生产的程度,目前能生产该平台技术的包括 Agilent、Nimblegen、Affymetrix 和 Illumina。现在国外已经有诊断实验室利用寡核苷酸阵列技术大规模应用于临床诊断之中。寡核苷酸阵列技术在临床诊断的最初应用是针对确定的致病基因区域。有研究利用 Agilent 公司开发的寡核苷酸阵列技术平台对 179 例患者相关基因区域进行检测,阵列技术的结果表明 100%与 BAC 阵列技术吻合,敏感性极高;同时也能稳定检测到 BAC 阵列技术所遗漏的小型基因组不平衡,在整个过程也同步展示了寡核苷酸阵列技术设计和制造过程的便利^[12]。为了进一步对比 BAC 阵列和

寡核苷酸阵列的优劣, Aradhya 和 Cherry^[13] 以 20 例畸形、发育迟缓和智力发育异常的患者为对象, 分别用分辨率为 1 Mb 的全基因组 BAC 阵列和分辨率为 35 kb 的全基因组寡核苷酸阵列 (Agilent) 进行检测, 结果证明, 寡核苷酸阵列能检出全部 10 个临床上有意义的基因组不平衡, 而 BAC 阵列只能检出其中的 6 个。此项研究更加充分地说明了寡核苷酸阵列技术具有更加优越的检测能力。由于 BAC 克隆相对较大, 和 CNV 是自然分布的存在, BAC 阵列技术在检测 CNVs 时的效率较低; 而寡核苷酸阵列技术通过在探针设计时避免了重复序列, 从而提高了 CNVs 的检测能力。

亚端粒区域基因不平衡现象与发育迟缓、智力发育落后等疾病联系密切, 因此寡核苷酸阵列技术也逐渐发展到检测能力覆盖亚端粒染色体区域。Toruner 等利用现成的 Agilent 全基因组 CGH 阵列平台 (44 000 探针), 将其中的三分之一 (14 000) 替换为亚端粒探针, 改造后的阵列平台对亚端粒区域和其他区域的分辨率分别为 5 kb 和 125 kb。另一项以寡核苷酸阵列为基础的新技术——分子尺 (molecular ruler) 技术, 亚端粒区和其他区域分辨率分别达到 50 kb 和 75 kb。这些在现有 CGH 阵列技术基础上新出现的技术平台, 使得其在特殊区域的检出效率适合于临床诊断应用, 同时也保留了对于常规片段的检测效率。

相对于寡核苷酸 CGH 序列, 基因分型杂交阵列技术的临床应用研究相对较少。Friedman 等^[14] 利用 Affymetrix 100K SNP 阵列平台来研究基因组不平衡性。该研究设立 8 个对照组, 每组包括以确定存在染色体异常或单亲二体的患者和其未发病的父母。Affymetrix 阵列平台成功检测到所有已知的基因异常, 包括单亲二体现象; 该平台也在 100 例先天性智力发育迟缓的患者中检测出大小为 187 kb 的缺失。虽然这些研究可部分证实基因分型阵列技术的检测能力, 但还需要更多的研究来确立该平台用于检测拷贝数不改变的单亲二体现象的阈值。

3 MGD 技术的临床验证研究和诊断应用

3.1 敏感性与特异性的临床验证 对于任何一项 MGD 新技术在适用于临床之前, 都必须通过系统性的验证, 其中最重要的就是敏感性和特异性。敏感性和特异性的验证主要是通过阳性患者中被目前公认的金标准证实的已知突变进行检测。就 MGD 而言, 常用的比对标准为 FISH 和染色体核型分析技术。在微阵列技术中, 基因组中拷贝数的变化通过探针点位信号强度或者颜色的改变来显示。该技术的关键步骤之一是确定分析过程中的有效分辨率, 即能稳定检测的 CNVs 的大小。由于实验使用的技术平台和探针密度的不同, 每次实验都必须确定分析的有效分辨率, 而实验的敏感性和特异性会因为每次使用连续性探针数量不同而改变, 通常情况下, 连续性探针使用越多, 实验的敏感性和特异性越高。此外, 检测缺失和复制的信噪比会因为使用平台、标记方法和实验方案的不同而也有所偏差, 因此必须对每一个临床阵列实验设计合适的阈值。

3.2 S 平台缺陷的临床验证 对于阵列技术可能遗漏的重要点位, 必须进行验证。如某些商业化的阵列平台不覆盖 XY 染色体的假染色体区域。此外, 也要排除定位不良或者杂交效率低的探针, 这一点在 BAC 阵列技术中尤其要引起警惕, 因为单个克隆的劣质探针会明显地影响到实验的敏感性和特异性^[15]。而单核苷酸探针的问题大多为存在异常的二级结构。在实验前准确排除劣质探针, 将极大地提高阵列技术的检测能

力^[12]。

3.3 对 CNVs 的理解 阵列技术在临床基因检测时, 重要任务之一就是探讨 CNVs 出现的机制^[16]。CNVs 主要分为 3 类: 明确致病性的 CNVs (pCNVs), 即与已知疾病相关基因片段的缺失或者复制; 良性 CNVs (bCNVs), 即在健康人群中发现的基因序列的缺失与复制; 未知 CNVs (uCNVs), 即尚未证明与已知明确的致病基因有某种联系的 CNV。由于大量检出的 CNVs 属于 bCNVs 和 uCNVs, 因此, 在阵列平台设计的过程中, 一般避开这些区域, 但在实际实验过程中, 仍会发现大量新的、有待证实的 CNVs 位点。在健康人群 CNVs 数据 (如位点、分布和频率等) 越来越充足的情况下, 现在的 uCNVs 将会逐步归入 bCNVs 或者 pCNVs 之中, 因此 uCNVs 可能成为确定各种致病基因异常机制的重要来源, 而 CNVs 区域的大量研究和资料也为确定更多疾病的基因风险奠定了基础^[17]。

3.4 临床诊断的应用 第 1 代在临床上使用的阵列技术平台是 Baylor 医学院和 Signature 基因实验室开发的定向 BAC CGH 阵列平台^[18]。在实际的使用过程中证明 CGH 阵列技术和 FISH 在临床诊断上符合率为 100%。CGH 阵列技术也检测到之前的核型分析以及 FISH 所遗漏的某些基因改变。寡核苷酸阵列技术还未在大型临床实验中进行验证, 但目前的实验数据证明其检测效率高于 BAC 阵列技术。在一些研究中, 高分辨率全基因组寡核苷酸阵列技术已经在智力发育迟缓和自闭症患者中检测到位于 16p11.2 区域微缺失和微复制的存在^[19]。

目前国外, MGD 为基础的诊断技术, 主要用于检测发育迟缓、多种先天性异常、畸形、无法解释的智力发育落后、突发性疾病、房间隔缺损和其他神经性和心理性的疾病 (如精神分裂症), 也有部分应用于产前检查, 如自发性流产和死胎, 最近也有应用该技术诊断黑色素瘤的研究^[20]。

4 结论和展望

微阵列作为基础的临床分子诊断技术已经逐步超越 FISH 检测的能力范围, 发展到可以检测杂合性缺失和甲基化分级的阶段。目前 MGD 技术可以检测到任何大小的基因不平衡现象, 但缺点是无法提供定位信息。FISH 分析技术很大一部分负责提供定位信息。FISH 可以检测先证者中发现的 CNVs 在其父母中的易位现象, 而 MGD 技术相对 FISH 技术而言, 分辨率大大提高是其最显著的优势。如果能有一项技术结合 FISH 的定位功能和寡核苷酸阵列技术的高分辨率, 将会在基因诊断领域做出极大的贡献。随着第 3 代测序平台的开发和应用, 能同时数字化分析拷贝数变化和进行定位分析, 以微阵列技术为基础的基因诊断技术将会发生从类比分析到数字化分析的大飞跃。

参考文献

- [1] Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human; the genesis of human aneuploidy[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(9): 280-291.
- [2] Ommen GJ. Frequency of new copy number variation in humans[J]. Nat Genet, 2005, 37(17): 333-334.
- [3] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Hang W, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors[J]. Science, 1992, 258(34): 818-821.
- [4] Solinas TS, Lampel S, Swith A, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization; biochips to screen for genomic imbalance genes[J]. Chromosomes Cancer, 1997, 20(16): 399-407.
- [5] Lucito R, Healy J. Representational oligonucleotide microarray a-

analysis; a high-resolution method to detect genome copy number variation[J]. *Genome Res*, 2003, 13(9): 2291-305.

[6] Fordor SP, Read JL. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis[J]. *Science*, 1991, 251(28): 767-773.

[7] Barrett MT, Scheffer A. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(83): 17765-17770.

[8] Peiffer DA, Le JM. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping[J]. *Genome Res*, 2006, 16(4): 1136-1148.

[9] Mccarroll SA, Kuruvilla FG. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(22): 1166-1174.

[10] Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(8): 182-192.

[11] Nathan RT, Brynn L, Zhong Y, et al. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH[J]. *Molecular Hum Reproduction*, 2010, 16(6): 583-589.

[12] Shen Y, Irons M, Yang H, et al. Development of a focused oligonucleotide-array comparative genomic hybridization chip for clinical diagnosis of genomic imbalance[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(21): 2051-2059.

[13] Aradhya S, Cherry AM. Array-based comparative genomic hybridization: clinical contexts of targeted and whole-genome designs[J]. *Genet Med*, 2007, 9(2): 533-539.

[14] Friedman JM, Baross A, Wang H, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(4): 500-513.

[15] Thorland EC, Gonzales PR. Comprehensive validation of array comparative genomic hybridization platforms: How much is enough? [J]. *Genet Med*, 2007, 9(5): 632-641.

[16] Lee C, Lafrate AJ. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 48-54.

[17] Christian V, Leo G. Microarray-based maps of copy number variant regions in European and sub-Saharan populations[J]. *PLOS One*, 2010, 5(1): 12.

[18] Bejjani BA, Saleki R. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance[J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 134: 259-267.

[19] Kumar RA, Kara MS, et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(2): 628-638.

[20] Christopher V, Neil T. Comparative genomic hybridization for the diagnosis of melanoma[J]. *Eur J Plast Surg*, 2010, 33(12): 45-48.

(收稿日期: 2011-02-18)

• 综 述 •

miRNA 在消化管癌中的研究进展

孟宪琴 综述, 刘庚勋 审校

(中国人民解放军第一六三医院老干科, 湖南长沙 410003)

关键词: 微 RNAs; 肿瘤; 消化管
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.026 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2011)19-2223-03

microRNA(miRNA)是真核生物中一类长度约为 22 个核苷酸的非编码小分子单链 RNA,通过与靶标 mRNA 的 3'-UTR 完全或不完全配对而抑制蛋白质的合成,引起靶 mRNA 降解或介导其翻译抑制,具有调节基因表达活性的功能,参与机体多种生理和病理过程^[1-3]。研究表明,miRNA 基因在人类癌症的发病机制中发挥着重要作用。现就近年来 miRNA 在消化管癌中的研究进展作一综述。

1 miRNA 的生理功能和作用机制

miRNA 是通过 RNA 聚合酶 II 或聚合酶 III 转录合成初级 miRNA(pri-miRNA),随后 pri-miRNA 被 Drosha 及 DGCR8 剪切成具有发夹环结构的前体 miRNA(pre-miRNA),在输出蛋白 5(exportin-5)和 Ran 复合物协助下转运出核,然后在细胞质内被 Dicer/TRBP 剪切成成熟的 miRNA^[4]。成熟的 miRNA 与其他蛋白一起组成 RNA-诱导沉默复合体(RISC),引起靶 miRNA 的降解或者翻译抑制改变靶蛋白的表达水平,从而发挥其生物学作用。

2 miRNA 与肿瘤发生

研究表明,约有 50%已阐明的人类 miRNA 位于与癌症相关的染色体脆性位点(fragile sites)或癌症相关区域,可能对癌症的发展起重要作用^[5]。最近的研究进一步证明 miRNA 与肿瘤的转移和耐药也有密切关系。miRNA 既可以作为抑癌基

因下调原癌基因活性;也可作为癌基因下调抑癌基因活性;还可以调节肿瘤相关基因的表达。其自身突变、缺失、易位及相互调控异常等,还可导致相关基因异常表达^[6]。作为原癌基因起作用的 miRNA 主要有 miR-17-92、miR-18、miR-372、miR-373、miR-221、miR-222、miR-155 和 miR-21 等,其可能的机制是通过取消 P53 介导的 CDK 抑制作用,或者直接抑制基因 LATS2 促进肿瘤细胞的增殖和发生。有抑癌基因作用的 miRNA 主要有 miR-15a、miRNA-16-1、miR-143、miR-145、miR-147 和 miRNA let-7 家族等,其可能的机制是这些基因的缺失导致 bcl-2 的过表达,使受损细胞不能凋亡,导致肿瘤的形成。

另一个重要的抑癌基因 PTEN,可抑制 PT3K-Akt 信号通路的激活,介导细胞凋亡。已证明 miRNA 可通过调控 PI3K2A、KtARF-P53 和 MAPK 等通路中的 Ras、C-myc、E2F1、PTEN 和 FoxO 等蛋白影响肿瘤细胞的增殖、凋亡和细胞周期。miR-19 下调 PTEN 的表达,并通过 PIP23、PKB/AKT 及其下游靶信号对细胞的增殖和存活进行调控,miR-214 靶向 PTEN,导致 PTEN 蛋白低表达,AKT 通路过度激活而促进细胞增殖。最新研究发现 let-7 通过与 Ras、HMGA2 和 C-myc3、UTR 结合,负调控靶基因的表达,抑制肿瘤的发生和发展^[7]。