

• 综 述 •

结直肠肿瘤遗传易感性的研究进展

易珂¹综述,高维寅^{2△}审校

(1. 成都军区机关医院检验科, 成都 610011; 2. 南昌大学附属第二医院, 南昌 330006)

关键词: 结直肠肿瘤; 遗传易感性; 基因突变**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.029**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)07-0833-04

结直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,全球每年新发结直肠癌病例大约是 875×10^3 例或更多^[1-2]。随饮食习惯和生活条件的改变,我国结直肠癌的发生也呈现高速上升的趋势,上海市区 1972~1999 年结肠癌的患病率上升 100% 以上^[3]。近年来全国结直肠癌有逐步取代胃癌成为消化道最常见的恶性肿瘤的趋势^[4-6]。

治疗结直肠癌预后的最重要因素是早期发现和治疗^[7-8]。Dukes A 期的结直肠癌手术治疗后的 5 年生存率可高达 90% 以上,而 Dukes D 期结直肠癌的 5 年生存率仅为 5% 左右^[9-12]。基因在结直肠癌的易感性及结直肠癌的发生、发展中起到关键作用,并且结直肠癌的基因发病机制在所有肿瘤中是研究最完善的肿瘤之一^[13-15]。结直肠癌是一个多因素交互作用并且多阶段发生、发展的过程,约 1/3 的结直肠癌具有明确的遗传背景^[16]。绝大多数结直肠癌的发生遵循“瘤癌序”的阶段性发展过程,即从隐窝细胞的异常增生到不典型增生到良性的腺瘤,再到原位癌,最后发展为进展期癌^[1,17]。整个过程涉及多种基因的参与,这些基因的参与多数情况下遵循一定的顺序,如先有 APC 基因(adenomatous polyposis coli)的突变,再有 Ras 基因家族成员的突变,继以 p53 基因的突变^[18-21]。结直肠癌的癌变过程可长达十余年,因此研究结直肠癌的遗传易感性为其早期诊断和防治提供了可能,其易感基因的研究有助于进行高危人群的筛选^[22-29]。鉴定与遗传易感有关的突变对进一步弄清结直肠癌的基因发病机制以及早期诊断、早期治疗和预防具有重要意义。

1 高外显率基因与遗传性结直肠癌

1.1 FAP 与 APC 基因种系突变 家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)的特点是结直肠出现成百上千个腺瘤,这些腺瘤通常开始出现于儿童期或青少年期, FAP 患者发生腺瘤的外显率几乎为 100%,多数患者在 50 岁以前发生结直肠癌^[14,30]。1986 年 Herrera 等^[31]首先发现 FAP 的发生与 5 号染色体长臂 5q21 的中间缺失有关,1992 年 Gorden 等^[32]证实 FAP 的发生与 APC(adenomatous polyposis coli)基因的种系突变有关。目前发现的与 FAP 发生相关的 APC 基因种系突变有 500 多种。最常见的突变热点是第 1 0611 309 密码子。对 176 例突变进行分析结果表明,这些突变 98% 均导致 APC 蛋白产物的截短。

APC 蛋白的主要作用是参与 β 连环蛋白和 E 钙黏附蛋白相互作用而细胞黏附及细胞间信号传递,是 β 连环蛋白的负性调节因子^[33]。APC 基因的突变可改变 APC 蛋白与 β 连环蛋白及 E 钙黏附蛋白之间的平衡,导致细胞细胞、细胞基质之间黏附作用以及接触抑制信号传递的改变,引起细胞分裂与细胞死亡之间的平衡失调,以致生长失控,成为结直肠癌的一个限速

的分子因素^[1]。

1.2 遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC, Lynch 综合征) Lynch 综合征不仅包括结直肠癌的遗传易感性升高,常常也发生其他器官的癌症^[34]。导致 Lynch 综合征的主要原因是错配修复基因 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 的种系突变,具有错配修复基因种系突变的携带者患结直肠癌的外显率为 80%, 子宫内腺癌的外显率 60%, 其他部位癌的外显率为 20%^[34-38]。目前诊断 Lynch 综合征主要依据 Amsterdam 标准, Lynch 综合征所导致的结直肠癌占结直肠癌的比例为 5% 左右。

随着分子生物学的发展,近年来先后证实有以下一些错配修复基因(hMLH1、hMLH3、hMSH2、hMSH6、hMSH6、hPMS1、hPMS2 及 hEXO1)与 Lynch 综合征的发生有关^[39-43]。与 Lynch 综合征相关的最常见错配修复基因主要有 MSH2、MLH1 及 MSH6, 占有错配修复基因突变的 80% 左右^[44-45]。

1.3 MYH 基因 新近发现 E. coli mutY 切除修复基因的同源基因 MYH 基因存在种系突变时(纯合子或复合型杂合子)可引起多发性结肠息肉病及结肠癌易感。MYH 基因是一个碱基切除修复基因(base excision repair, BER), 定位于 1p35 区域。MYH 基因功能的丧失导致 G:C 和 T:A 的碱基颠换发生率明显增加。在结直肠癌患者可以检测到 MYH 基因的无义突变及错义突变。当 MYH 基因两个位点均存在突变时, 其外显率(患癌率)相当高, 50% 的患者在确诊为 MAP 时即患有结直肠癌, 而另一项研究发现超过 70 岁的 MYH 双位点突变携带者 80% 患癌。Sieber 等报道, 具有 15~100 个息肉的患者中约有 30% 就具有 MYH 双位点突变; Sampson 报道 111 例息肉数目超过 10 个的息肉病患者中, 23% 的患者具有 MYH 双位点突变。Enholm 等^[46]检测了 1 042 结直肠癌患者及 424 例无癌对照人群的 MYH 基因突变情况, 发现 MYH 在结直肠癌易感性的作用与 FAP 相当。Fleischman 等检测年龄低于 55 岁结直肠癌患者发现, 2.8% 的发病年龄提前的结直肠癌患者存在 MYH 的双位点突变。Jenkins 等^[47]发现 MYH 单位点突变者罹患结直肠癌的概率较健康人群高 2.9 倍, 而超过 70 岁的突变携带者其患结直肠癌风险为 8%。

2 低外显率基因与遗传性结直肠癌

2.1 生物转化基因 机体的代谢状况在癌症的进展中发挥重要作用。流行病学研究证实, 环境因素在结直肠癌的归因危险度约占 50%, 主要与高脂肪、高热量和低纤维素饮食有关。机体代谢酶将机体摄入的外来物质活化或转化, 将前致癌物转变为致癌物而发挥作用。目前研究较多与结直肠癌易感性相关的基因主要包括: 细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP)、谷胱甘肽转移酶(glutathione-S-Transferases, GSTs)、N-乙酰基转移酶(N-acetyl transferases, NATs)和亚甲基四氢叶酸还原

酶(Methylenetetrahydrofolate, MTHFR),大量的研究显示外来物质代谢酶的多态性当与食物成分、饮食习惯等相连时种结直肠癌易感性相关,如 GSTA1、CYP2E1、NAT1、NAT2、GSTM1 等^[48-50]。

2.2 DNA 甲基化相关基因 在结直肠癌中常可见到 DNA 甲基化不平衡,并以种系基因的甲基化低下为特征,以及甲基化少见部位 CpG 岛的甲基化等现象。MTHFR 和 MTR 酶在叶酸和蛋氨酸的代谢中发挥重要作用,对 DNA 的甲基化以及 DNA 的合成非常重要。(1)MTHFR 基因 MTHFR:该基因定位于 1p36.3 区域,是调节叶酸和蛋氨酸代谢的限速酶^[51-54]。由于基因组 DNA 中的某些基因甲基化,特别是癌基因和抑癌基因的甲基化可直接影响癌症的发生,所以 MTHFR 基因的多态性有可能通过影响 DNA 的甲基化水平或影响 DNA 合成,改变不同基因型个体的癌症易感性。MTHFR 基因的多态性与腺瘤无关,而与腺癌有关,提示 MTHFR 在结直肠癌发生的后期发挥作用。当叶酸浓度足够时,纯合子携带者具有低结直肠癌风险。但当叶酸水平低时,DNA 的甲基化和 DNA 的合成均减弱,导致结直肠癌发病率增高。(2)MTR 基因:该基因最常见的多态性是 Asp919Gly 位点,该位点的多态性改变编码蛋白功能部位的氨基酸序列,但该多态性并不改变蛋白的生物学功能^[55-56]。

2.3 癌基因和抑癌基因 APC * I1307:多项研究显示这一突变增高结直肠癌的易感性^[49]。APC * I1307 杂合型主要见于德国犹太人,人群中 APC * I1307 杂合型的比例为 5%~7%,而在德国犹太人结直肠癌患者中 APC * I1307 杂合型的比例高达 8%~15%,T→A 的突变导致连续出现 8 个腺嘌呤,使 DNA 复制过程中发生错误,导致靠近 A8 区域发生单个核苷酸的插入或丢失,从而导致移码突变。TGF-βR1 * 6Ala:肿瘤抑制基因 TGF-β 的主要作用是抑制增殖和诱导凋亡,其功能在 80%以上的结直肠癌患者中被灭活。相关研究显示含至少 1 个 6Ala 的个体患结直肠癌的概率升高 20%,而 6Ala/6Ala 纯合型的结直肠癌风险尤其高于杂合型。人为表达 6Ala 位点的动物实验表明该位点的存在将导致 TGF-β 的抗增殖功能减弱。

2.4 细胞周期控制基因 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)基因^[57-58]:MMP 是一类依赖锌离子的蛋白水解酶,目前发现的亚型至少有 26 种之多,其功能是降解基质及基底膜,其过度表达是肿瘤浸润、转移及血管生成的关键因素。徐恩萍等发现 MMP2 1306CC 基因型频率在结直肠癌组中显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),在浆膜浸润的患者中 1306CC 基因型的频率更高。这可能与 MMP2 启动子区 21306C→T 的改变破坏了转录因子 Sp1 的结合位点,从而降低了 MMP2 基因的启动子活性有关。

细胞周期素 D1(Cyclin D1, CCND1)基因^[59]:CCND1 基因位于 11q13,编码细胞周期素 D1,后者的功能主要是参与细胞的 G1→S 期检查点的调节。Lewis 检测了美国人群 CCND1 基因 G870A 多态性位点与结直肠癌的关系,发现 CCND1 的 A 型纯合型可能增加结直肠癌的风险性,其原因可能为 G870A 多态性位点位于 CCND1 基因第 4 个外显子的转录剪接供给区,可导致转录剪接方式发生改变,最终产生半衰期更长的 CCND1 蛋白。而在新加坡人群中携带 G870A 纯合型者发生结直肠癌的风险明显降低,不到健康人群的一半,并且男性 GG 基因型与 AA 或 AG 基因型携带者相比存活的可能性更小。

3 结 语

随着后基因时代的到来,对基因易感性的研究代表了现在遗传研究的方向,而结直肠癌已是现代肿瘤的代表。越来越多研究表明,生物遗传易感性研究对肿瘤的治疗具有重要的作用,也是未来肿瘤诊断和治疗的发展趋势。与传统的检查和治疗相比,生物遗传易感性研究具有前瞻性和预防性的特点,可有效减少肿瘤恶变概率,有效地提高患者的生存率,并可降低患者的心理和经济负担。因此,随着结直肠癌的生物遗传易感性研究的深入必将推动肿瘤治疗更进一步,最终为肿瘤的诊断和治疗提供一种具有决定性的方式。

参考文献

- [1] Laghi L. Genetics of colorectal cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2000, 47(32): 315-322.
- [2] Valle L, Serena AT, Liyanarachchi S, et al. Germline allele-specific expression of TGFBR1 confers an increased risk of colorectal cancer[J]. Science, 2008, 321(5894): 1361-1365.
- [3] 刘恩菊, 项永兵, 金凡, 等. 上海市区恶性肿瘤发病趋势分析(1972~1999 年)[J]. 肿瘤, 2004, (1): 11-15.
- [4] 郑永兰, 周海龙, 王正松. 重庆市某区 2001~2004 年恶性肿瘤发病率分析[J]. 检验医学与临床, 2006, 6(4): 148-149.
- [5] 项永兵, 张薇, 高立峰, 等. 恶性肿瘤发病率的时间趋势分析方法[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 30(2): 86-90.
- [6] 祝伟星, 王启俊, 李玲, 等. 北京城区 1993~1997 年恶性肿瘤发病率分析[J]. 肿瘤防治杂志, 2003, 8(8): 785-787.
- [7] 江梅, 崔艳丽, 何利珍. 多肿瘤标志物在肺癌诊断检测中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1458-1459.
- [8] 姜昌丽, 王惠萱. 微小 RNA 在结直肠癌中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 355-357.
- [9] Sanchez ML, Ventura I, Papaldo P, et al. Colorectal cancer after breast cancer: a case-control study[J]. Cancer Epidemiol, 2011, 35(1): 44-47.
- [10] He J, Wilkens LR, Stram DO, et al. Generalizability and epidemiologic characterization of eleven colorectal cancer GWAS hits in multiple populations[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(1): 70-81.
- [11] Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, et al. Variation in the CYP19A1 gene and risk of colon and rectal cancer[J]. Cancer Causes Control, 2011, 22(7): 955-963.
- [12] Gao Y, Hayes RB, Huang WY, et al. DNA repair gene polymorphisms and tobacco smoking in the risk for colorectal adenomas[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(6): 882-887.
- [13] Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers[J]. N Engl J Med, 2008, 359(20): 2143-2153.
- [14] Rowley PT. Inherited susceptibility to colorectal cancer[J]. Annu Rev Med, 2005, 56(21): 539-554.
- [15] Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(10): 769-780.
- [16] Khedri A, Nejat A, Salek R, et al. Association of the colorectal cancer and MDR1 gene polymorphism in an Iranian population[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(5): 2939-2943.
- [17] Menko FH, Griffioen G, Wijnen JT, et al. Genetics of colorectal cancer II hereditary background of sporadic and familial colorectal cancer[J]. Ned Tijdschr Geneesk, 1999, 143(23): 1207-1211.
- [18] Talseth-Palmer BA, Brenne IS, Ashton KA, et al. Colorectal cancer susceptibility loci on chromosome 8q23.3 and 11q23.1 as modifiers for disease expression in Lynch syndrome[J]. J Med Genet,

- 2011,48(4):279-284.
- [19] Salazar R,Roepman P,Capella G,et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer[J]. J Clin Oncol,2011,29(1):17-24.
- [20] Wu Y,Jin M,Liu B,et al. The association of XPC polymorphisms and tea drinking with colorectal cancer risk in a Chinese population[J]. Mol Carcinog,2011,50(3):189-198.
- [21] Yang XD,Ai W,Asfaha S,et al. Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b+Ly6G+ immature myeloid cells[J]. Nat Med,2011,17(1):87-95.
- [22] Rivera B,Gonzalez S,Sanchez-Tome E,et al. Clinical and genetic characterization of classical forms of familial adenomatous polyposis;a Spanish population study[J]. Ann Oncol,2011,22(4):903-909.
- [23] Yeh KY,Li YY,Hsieh LL,et al. The -174 G/C polymorphism in interleukin-6 (IL-6) promoter region is associated with serum IL-6 and carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancers in Taiwan[J]. J Clin Immunol,2010,30(1):53-59.
- [24] Chiang JM,Chen HW,Tang RP,et al. Mutation analysis of the APC gene in taiwanese FAP families;low incidence of APC germline mutation in a distinct subgroup of FAP families[J]. Fam Cancer,2010,9(2):117-124.
- [25] Phelps C,Bennett P,Jones H,et al. The development of a cancer genetic-specific measure of coping;the GRACE[J]. Psychooncology,2010,19(8):847-854.
- [26] Taylor DP,Burt RW,Williams MS,et al. Population-based family history-specific risks for colorectal cancer; a constellation approach[J]. Gastroenterology,2010,138(3):877-885.
- [27] Worthley DL,Whitehall VL,Buttenshaw RL,et al. DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer[J]. Oncogene,2010,29(11):1653-1662.
- [28] Forsti A,Li X,Wagner K,et al. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 pathway in relation to colorectal cancer progression[J]. Genes Chromosomes Cancer,2010,49(3):270-281.
- [29] Salcedo R,Worschech A,Cardone M,et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon;role of interleukin 18[J]. J Exp Med,2010,207(8):1625-1636.
- [30] Glaser EM. Inherited predisposition to colon cancer[J]. Cancer Nurs,1998,21(6):377-383.
- [31] Herrera L,Kakati S,Gibas L,et al. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q[J]. Am J Med Genet,1986,25(3):473-476.
- [32] Gordon A. APC mutations[J]. Nature,1992,358(6384):288.
- [33] Auranen A,Joutsiniemi T. A systematic review of gynecological cancer surveillance in women belonging to hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) families[J]. Acta Obstet Gynecol Scand,2011,90(5):437-444.
- [34] Ricciardiello L,Boland CR. Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer): current concepts and approaches to management[J]. Curr Gastroenterol Rep,2005,7(5):412-420.
- [35] Coura RS,Ashton-Prolla P,Prolla JC. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer; hereditary predisposition, diagnosis and prevention[J]. Arq Gastroenterol,2005,42(2):99-106.
- [36] Bouzourene H,Monnerat C. Hereditary non polyposis colon cancer-basic principle and ethical considerations[J]. Rev Med Suisse,2005,43(1):2791-2797.
- [37] Abdel-Rahman WM,Mecklin JP,Peltomaki P. The genetics of HNPCC;application to diagnosis and screening[J]. Crit Rev Oncol Hematol,2006,58(3):208-220.
- [38] Broadus RR,Lu KH. Women with HNPCC;a target population for the chemoprevention of gynecologic cancers[J]. Front Biosci,2006,11(4):2077-2080.
- [39] Durno CA,Gallinger S. Genetic predisposition to colorectal cancer;new pieces in the pediatric puzzle[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr,2006,43(1):5-15.
- [40] Fostira F,Thodi G,Konstantopoulou I,et al. Hereditary cancer syndromes[J]. J BUON,2007,12(1):13-22.
- [41] Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer[J]. Genes Dev,2007,21(20):2525-2538.
- [42] Lynch HT,Lynch JF,Lynch PM,et al. Hereditary colorectal cancer syndromes;molecular genetics,genetic counseling,diagnosis and management[J]. Fam Cancer,2008,7(1):27-39.
- [43] Lecuru F,Ansquer Y,Bats AS,et al. Endometrial cancer in HNPCC syndrome[J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris),2008,37(6):547-553.
- [44] Sukhni W,Aronson M,Gallinger S. Hereditary colorectal cancer syndromes;familial adenomatous polyposis and lynch syndrome[J]. Surg Clin North Am,2008,88(4):819-844.
- [45] Abdel-Rahman WM,Peltomaki P. Lynch syndrome and related familial colorectal cancers[J]. Crit Rev Oncog,2008,14(1):1-22.
- [46] Enholm S,Hienonen T,Suomalainen A,et al. Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients[J]. Am J Pathol,2003,163(3):827-832.
- [47] Jenkins MA,Croitoru ME,Monga N,et al. Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations;a population-based case-family study[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2006,15(2):312-314.
- [48] Lynch HT,Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer[J]. J Med Genet,1999,36(11):801-818.
- [49] Jong MM,Nolte IM,Mte GJ,et al. Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2002,11(11):1332-1352.
- [50] Fijneman RJ. Genetic predisposition to sporadic cancer; how to handle major effects of minor genes[J]. Cell Oncol,2005,27(6):281-292.
- [51] Hubner RA,Houlston RS. MTHFR C677T and colorectal cancer risk:A meta-analysis of 25 populations[J]. Int J Cancer,2007,120(5):1027-1035.
- [52] Chang SC,Lin PC,Lin JK,et al. Role of MTHFR polymorphisms and folate levels in different phenotypes of sporadic colorectal cancers[J]. Int J Colorectal Dis,2007,22(5):483-489.
- [53] Derwinger K,Wettersgren Y,Odin E,et al. A study of the MTHFR gene polymorphism C677T in colorectal cancer[J]. Clin Colorectal Cancer,2009,8(1):43-48.
- [54] Mokarram P,Naghibalhossaini F,Saberi FM,et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype affects promoter methylation of tumor-specific genes in sporadic colorectal cancer through an interaction with folate/vitamin B12 status[J]. World J Gastroenterol,2008,14(23):3662-3671.
- [55] Yamaji T,Iwasaki M,Sasazuki S,et al. Methionine synthase A2756G polymorphism interacts with alcohol and folate intake to influence the risk of colorectal adenoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers

Prev, 2009, 18(1): 267-274.

[56] Chen K, Song L, Jin MJ, et al. Association between genetic polymorphisms in folate metabolic enzyme genes and colorectal cancer: a nested case-control study[J]. Zhong Hua Zhong Liu Za Zhi, 2006, 28(6): 429-432.

[57] Elander N, Soderkvist P, Fransen K. Matrix metalloproteinase (MMP)-1, -2, -3 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2006, 26(1): 791-795.

• 综 述 •

[58] Decock J, Paridaens R, Ye S. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer[J]. Clin Genet, 2008, 73(3): 197-211.

[59] Le ML, Seifried A, Lum-Jones A, et al. Association of the cyclin D1 A870G polymorphism with advanced colorectal cancer[J]. JAMA, 2003, 290(21): 2843-2948.

(收稿日期: 2012-01-21)

体液中微小 RNA 检测用于疾病诊断的研究进展

拜红霞¹综述, 潘 杰²审校

(1. 江苏省无锡市锡山人民医院检验科 214011; 2. 上海市华东疗养院检验科, 江苏无锡 214065)

关键词: 微 RNA; 体液; 临床诊断; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)07-0836-04

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内生的、长度约为 19~24 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 1993 年由美国学者 Ambros 等在研究线虫发育过程中发现, 它通过与靶信使 RNA (mRNA) 3' 非翻译区完全或部分互补结合, 导致靶 mRNA 降解或翻译抑制从而对靶基因的表达进行调控^[1-2]。目前已发现并测序的人类 miRNA 已超过 700 种, 它们调节着 30% 人类基因的表达。研究发现, miRNA 在细胞发育、凋亡、分化、增殖等重要生理病理过程中发挥重要的作用^[3]。当机体处于疾病状态下 (如肿瘤、糖尿病、感染性疾病等) 时 miRNA 表达谱会发生特征性的改变, 通过对体液 (如血液、尿液、唾液、关节液等) 中 miRNA 表达谱的检测可对疾病进行诊断。由于其创伤小且可用于疾病的预测、诊断和预后, 有望成为一种新型的诊断标志物。现就 miRNA 的特性、常用的检测/分析方法以及各种体液中 miRNA 用于疾病诊断的最新进展作一综述。

1 miRNA 特性及作为疾病诊断标志物的可行性

Lawire 等^[4]于 2008 年在血清中首次发现了 miRNA 的存在, 随后 Mitchell 等^[5]对血浆样本中总 RNA 进行抽提, 并对 19~24 nt 的小 RNA 进行分离、克隆、测序及比对等分析, 发现 73% 的序列与已知的 miRNA 序列一致。随后的研究陆续在人类的其他体液样本, 包括尿液、唾液、羊水、胸水、关节液及脑脊液等均检测到 miRNA 的表达。体液中这些 miRNA 的来源以及与病变组织细胞的关系目前还不清楚。Chen 等^[6]对健康者及肝癌等疾病患者的血清中 miRNA 进行了分析, 发现健康者血清中 miRNA 的表达谱与血细胞存在高度的相关性 ($r=0.9214$), 而病理状态下两者的相关性明显减小 ($r=0.4492$)。提示机体正常状态下, 血清中 miRNA 可能主要来源于血细胞, 而在疾病状态下, 部分血清 miRNA 可能来源于病变的组织细胞。关于病变组织细胞中的 miRNA 进入体液中的确切机制还未被阐明, 推测可能是从破碎或凋亡的组织细胞中被动逸出, 也可能是患病组织细胞主动分泌游离 miRNA 进入体液中或者 miRNA 选择性地被包装在外泌体、微小体等膜性结构中并以包裹的形式主动分泌入体液中。研究发现不同的疾病状态下, 一些 miRNA 的表达水平可出现特征性的升高或下降, 呈现不同的 miRNA 表达谱, 显示了其作为疾病诊断标志物的潜能。

体液样本中 miRNA 的另一个特性是其具有足够的稳定

性。起初研究者认为, 由于体液中存在 RNA 酶 (RNase), miRNA 不能稳定存在其中, 但随后的研究发现血清/血浆样本中的 miRNA 相当稳定, 能够抵抗 RNase 的降解。另外, 血清中 miRNA 可长时间放置, 室温放置达 1 周, 反复冻融后或在强酸、强碱、煮沸等极端条件下, miRNA 含量均无显著变化。体液中 miRNA 如此稳定的原因尚不清楚, 推测可能是由于 miRNA 包裹在外泌体、微小体或凋亡小体中, 这些膜性结构保护了 miRNA 免受降解^[7-9]。体液 miRNA 的这一特性比成分复杂、易降解、易变性的蛋白类分子更具应用优势, 更适宜作为疾病诊断的生物标志物。

2 miRNA 常用的检测/分析方法

2.1 高通量测序技术 通过对体液样本中 miRNA 进行测序, 可确定样本中含有 miRNA 的种类, 该方法具有高通量的特性, 常用于体液中全部 miRNA 的分析。目前研究中使用较多的是 Solexa 测序技术, 该方法通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离出大小约 30 bp 以下的小 RNA, 然后在这些小 RNA 分子的 5' 和 3' 端分别加上 Solexa 接头 (Solexa adaptor), PCR 扩增后, 从琼脂糖凝胶电泳中分离出 90 bp 的 DNA 片段, 纯化后进行测序 (Illumina's Solexa Sequencer), 经 miRNA 数据库比对得出测序结果^[6]。

2.2 定量 PCR 定量 PCR 技术主要用于体液 miRNA 测序后对特定的 miRNA 进行验证和对其含量进行定量, 主要包括基于探针的定量检测技术和基于荧光染料的定量检测技术。基于探针的定量检测技术, 常用的方法有 Stem Loop、Key Like 及 Liagation Assay 等, 这三者均需特异性的探针。该方法特异性强, 可区分同一 miRNA 家族的不同变体, 但需探针的设计与合成, 成本较高^[10-11]; 而基于荧光染料的定量检测技术, 常用的方法有 polyA 聚合酶加尾法、引物延伸法、Multiplexed RT 法和 miR-Q 法等, 这些方法技术灵敏度较高、操作相对简单、设备和试剂要求较低, 便于一般实验室开展^[12-13]。

2.3 免疫印迹法 (Northern blotting) Northern blotting 是目前检测 miRNA 表达最主要的方法, 所有通过克隆手段和生物信息学分析得到的 miRNA 都需要通过 Northern blotting 来进行验证和确认。该方法的缺点在于操作较繁琐、灵敏度较低、不能对 miRNA 的含量进行定量分析且不能进行高通量的检测^[14]。