

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

[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)

• 综 述 •

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]。

2.4 基因芯片技术(microarray) 基因芯片技术是一种基于杂交的检测技术,其检测 miRNA 的原理与 Northern blotting 相同,广泛应用于 miRNA 表达的研究中,显示了良好的应用价值。该技术以其高通量的特点在基因信息分析中占据重要地位,但其信息质量的稳定性和实验的重现性比较差,且无法实现定量检测^[15]。

3 各种不同体液中 miRNA 与疾病的诊断

3.1 血清/血浆中 miRNA 与疾病诊断 血清/血浆样本由于其采集方便、创伤较小等特点,使其成为临床检验中使用最多样本。检测该样本中不同指标可以反映机体的健康状况、疾病的演化过程及用于疾病的诊断等。通过对血清/血浆中的 miRNA 的检测来对疾病进行诊断的研究已有大量的文献报道,疾病的类型包括肿瘤(血液系统肿瘤和其他系统肿瘤)、心血管疾病、肝脏疾病、炎性疾病等。

肿瘤诊断标志物研究中,Fang 等^[16]利用 qRT-PCR 的方法检测了弥漫性巨 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)患者和健康者血清中的 miRNA 水平,发现 DLBCL 患者血清中 miR-15a、miR-16-1、miR-29c 和 miR-155 水平较健康者显著升高,而 miR-34a 显著降低,提示这些 miRNA 分子可作为 DLBCL 的生物标志物。Chen 等^[6]首先应用 Solexa 测序的方法分析了非小细胞肺癌和健康者血清中 miRNA 表达水平,发现两者存在较大差异,并用 qRT-PCR 方法进行了验证,发现 miR-25 和 miR-223 在 152 例癌患者中的表达量显著升高,提示它们是非小细胞肺癌潜在的诊断标志物。血清/血浆样本中 miRNA 不仅可作为肿瘤诊断的潜在标志物,还可以用于肿瘤的早期诊断、转移及肿瘤的预后评价。肿瘤早期诊断标志物研究中,Liu 等^[17]评估了血浆中 miRNA 联合 CA-199 在胰腺癌早期诊断中的作用,发现 miR-16、miR-196a 联合 CA-199 检测具有很好的早期诊断胰腺癌的效能,可能成为胰腺癌的早期筛查指标;Bianchi 等^[18]利用血浆中 34 个 miRNA 分子来预测早期非小细胞肺癌的发生,结果显示在无症状的高危人群中预测的准确度达到 80%。肿瘤转移标志物研究中,Wang 等^[19]通过对结直肠癌肝脏转移患者和非转移患者血清 miRNA 进行分析,发现结直肠癌肝脏转移患者血清中 miR-29a 的表达水平显著高于非转移的结直肠癌患者,使其成为一个新型的肿瘤转移标志物。Roth 等^[20]进行了血清 miRNA 作为乳腺癌转移标志物的研究,发现血清中 miR10b、miR34a 和 miR155 水平与乳腺癌的转移显著相关,可作为乳腺癌转移的潜在标志物。肿瘤预后标志物研究中,Wang 等^[21]研究发现血清中 miR-21 的表达水平是非小细胞肺癌患者预后的重要指标,血清中低水平的 miR-21 患者的 3 年存活率(58.2%)要显著高于高水平 miR-21 患者(39.8%)。Hu 等应用 Solexa 测序和 qRT-PCR 方法,分析了非小细胞癌患者血清中 miR-496、miR-30d、miR-1 和 miR-499 这 4 种 miRNA 与存活时间之间的关系,该组合可作为非小细胞肺癌生存的预测标志物^[6]。

在闭塞性动脉硬化(arteriosclerosis obliterans, ASO)早期诊断标志物研究中,Li 等^[12]收集了 104 例 ASO 患者和 105 例年龄相一致的健康者血管内膜样本和血清样本,并检测了其中的 miRNA 的表达水平,结果显示 ASO 患者血管内膜样本中 miR-21、miR-130a、miR-27b、let-7f 及 miR-210 表达水平较健康者显著升高,而 miR-221 和 miR-222 表达水平显著降低;ASO 患者血清样本中 miR-130a、miR-27b 及 miR-210 水平显著升高,且血清中 miR-130a、miR-27b 水平与 ASO 患者的

Fontaine 期正相关。因此,血清中 miR-130a、miR-27b 及 miR210 水平具有早期诊断 ASO 的潜能。Wang 等^[23]分析了 33 例急性心肌梗死(AMI)患者、16 例非冠心病、17 例其他心血管病及 30 例健康者的血浆 miRNA 水平,发现 miR-208、miR-1、miR-133a 和 miR-499 在 AMI 患者中的水平显著高于非 AMI 患者和健康者,其在治疗后下降。Tijssen 等^[24]采用 Illumina 芯片阵列扫描和 qRT-PCR 验证相结合的方法发现心衰(HF)患者($n=30$)血浆 miR-423-5p 表达量显著高于健康对照者($n=30$),也明显高于非 HF 的呼吸困难患者($n=20$),提示血浆 miR-423-5p 对 HF 具有潜在的诊断价值。

炎性疾病研究中,Wang 等^[25]采用 RT-PCR 方法分析了 7 种与炎性或感染有关的 miRNA 在 50 例脓毒病患者血清中的表达水平,同时与 30 例系统性炎症反应综合征(SIR)患者以及 20 例健康对照者比较,结果显示血清 miR-146a 和 miR-223 脓毒病组的表达量显著低于其他两组,提示血清 miR-146a 和 miR-223 可作为脓毒病新的生物标志物。

肝脏疾病研究中,通过检测肝脏疾病(如肝硬化、慢性肝炎等)患者血清中 miR-855-5p 表达水平,提示该 miRNA 与肝脏的病变有关,可作为肝病的辅助诊断标志物^[26]。Cermeli 等^[27]分析了慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C disease, CHC)和非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者的 miRNA 表达水平,发现新型的非创伤性的生物标志物 miR-34a 和 miR-122。

3.2 尿液中 miRNA 与泌尿系统肿瘤诊断 尿液样本由于其具有采集方便、无创伤、患者的依从性高等特点,使其越来越受到研究人员的重视。另外,尿液样本中蛋白质水平要显著低于血清/血浆样本,减少了检测中蛋白质的干扰问题。研究发现,尿液中的 miRNA 水平可以反映泌尿系统肿瘤演化过程,具有很高的诊断价值。Hanke 等^[28]建立了一种准确测量尿液中 miRNA 的 qRT-PCR 的方法,并对膀胱癌患者尿液中 157 种 miRNA 的含量进行了分析,发现尿液中 miR-126 和 miR-182 显著高于健康者,将这两种 miRNA 组合起来对膀胱癌诊断的特异性和敏感性可分别达 82%和 72%。Weber 等^[29]发现,不同病期的泌尿道上皮癌患者尿液中 miRNA 表达谱存在差异,可作为检测和监控该病例过程的生物标志物。Yamada 等^[30]对 100 例膀胱上皮癌患者尿液中的 miRNA 表达谱进行了分析,发现 miR-96 和 miR-18 的表达水平在膀胱上皮癌患者中显著上升,采用这两种 miRNA 诊断膀胱上皮癌的敏感性和特异性可分别达 71.0%和 89.2%(miR-96)、74.0%和 77.3%(miR-183)。

3.3 唾液中 miRNA 与口腔肿瘤诊断 唾液由于其具有采集方便、无创伤等特点,近年来有关唾液检测与疾病诊断的研究日趋增多。唾液 miRNA 作为一种新的检测标志物也正进入研究的热点范围,目前的研究主要集中在口腔肿瘤中。Park 等^[31]在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)患者全唾液和唾液上清液中检测出稳定存在的约 50 种 miRNA,进一步分析发现 miR-125a 和 miR-200a 水平显著低于健康对照者。Liu 等^[32]检测到 OSCC 患者唾液上清液中 miR-31 表达明显高于健康者,而在 OSCC 患者接受肿瘤手术切除后,唾液上清液中 miR-31 表达量下降,提示唾液 miRNA 检测也许可用于 OSCC 的诊断和预后判断。

3.4 脑脊液中 miRNA 与中枢神经疾病诊断 脑脊液对中枢神经疾病具有很高的诊断价值,既往的研究主要集中在细胞水平及生化指标的检测中。近年来研究发现脑脊液也稳定地存

在 miRNA, 且其表达谱也可反映脑的病理状态。Cogswell 等^[33]采用 PCR 方法从阿尔茨海默氏痴呆患者脑脊液中检测到 201 种 miRNA, 发现其中有 60 种在 Brrak 5 期和 1 期患者中的表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。一些与免疫细胞功能和 T 细胞活化及分化有关的 miRNA (如 miR-146b、miR-181a 和 miR-142) 在 Brrak 5 期患者脑脊液中表达受到抑制。该结果提示这些 miRNA 在脑脊液中的表达量能将 Brrak 5 期和 1 期阿尔茨海默氏痴呆患者区别开来。Baraniskin 等^[34]发现了在原发性中枢神经系统淋巴瘤 (primary central nervous system lymphoma, PCNSL) 患者的脑脊液中存在 miRNA, 通过定量反转录 PCR 检测发现 PCNSL 患者脑脊液中 miR-19、miR-21 以及 miR-92a 的水平显著高于健康者及其他中枢神经系统病变, 显示了很好的诊断潜能。

3.5 关节液中 miRNA 与关节炎诊断 关节液又称滑液, 由关节滑膜细胞分泌而成。正常关节腔内滑液很少, 在关节疾病状态下关节液含量明显增加。Murata 等^[35]在人的关节滑液中检测到 miRNA, 并发现滑液中的 miRNA 与血浆 miRNA 同样稳定, 但滑液 miRNA 表达谱与血浆 miRNA 有较大差异, 原因可能是滑液 miRNA 主要来自滑液组织, 类风湿关节炎 (RA) 和骨关节炎 (OA) 患者血浆 miR-132 水平明显低于健康对照者, RA 患者滑液 miR-16、miR-146、miR-155 和 miR-223 表达量则显著高于 OA 患者, 并且 RA 患者血浆 miRNA 与 RA 患者的活动度相关。因此关节滑液和血浆 miRNA 有助于 RA 和 OA 的诊断和病理分析。

4 小 结

综上所述, 体液 (包括血清/血浆、尿液、唾液、关节液及脑脊液等) 中的 miRNA 作为一种新型的疾病诊断标志物, 已进行了大量的研究, 并显示了很好的应用前景。然而, 该项研究尚处于起步阶段, 一些基本的问题如体液 miRNA 的来源、变化及作用的机制还不清楚, miRNA 作为新型的疾病标志物真正应用于临床还言之尚早。今后的研究, 应在扩大检测的病例数、改善和优化 miRNA 检测方法的基础上, 建立各种疾病的 miRNA 的特征表达谱、各种疾病的评判标准以及对检测指标和检测手段进行标准化等。相信在不久的将来, 体液 miRNA 检测将成为一种新型、无创、能更好诊断疾病的生物标志物, 为疾病的诊断提供一种更为精确和有效的方法。

参考文献

[1] Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[2] He L, Hannon GJ. microRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(7): 522-531.

[3] Calin GA, Croce CM. microRNA signatures in human cancers [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857-866.

[4] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. Br J Haematol, 2008, 141(5): 672-675.

[5] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10513-10518.

[6] 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.

[7] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles [J]. PLoS One,

2008, 3(11): 3694-3696.

[8] Skog J, Wurdinger T, Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(12): 1470-1476.

[9] Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool [J]. Commun Integr Biol, 2010, 3(5): 478-481.

[10] Chen CF, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20): 179-184.

[11] Yang H, Schmuke JJ, Flagg LM, et al. A novel real-time polymerase chain reaction method for high throughput quantification of small regulatory RNAs [J]. Plant Biotech J, 2009, 7(7): 621-630.

[12] Wang XW. A PCR-based platform for microRNA expression profiling studies [J]. RNA, 2009, 15(4): 716-723.

[13] Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Bergbauer R, et al. miRQ: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample [J]. BMC Mol Biol, 2008, 9(1): 34-36.

[14] Lagos QM, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human [J]. RNA, 2003, 9(2): 175-179.

[15] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA) [J]. RNA, 2006, 12(5): 913-920.

[16] Fang C, Zhu DX, Dong HJ, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma [J]. Ann Hematol, 2011, 11(6): 216-218.

[17] Liu J, Gao J, Du Y, et al. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer [J]. Int J Cancer, 2011, 12(8): 66-69.

[18] Bianchi F, Nicassio F, Marzi M, et al. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer [J]. EMBO Mol Med, 2011, 3(8): 495-503.

[19] Wang LG, Gu J. Serum microRNA-29a is a promising novel marker for early detection of colorectal liver metastasis [J]. Cancer Epidemiol, 2011, 4(11): 87-89.

[20] Roth C, Rack B, Müller V, et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(6): 90-93.

[21] Wang ZX, Bian HB, Wang JR, et al. Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer [J]. J Surg Oncol, 2011, 104(7): 847-851.

[22] Li T, Cao H, Zhuang J, et al. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans [J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(2): 66-70.

[23] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans [J]. Eur Heart J, 2010, 31(6): 659-666.

[24] Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MIR423-5p as a circulating biomarker for heart failure [J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1035-1039.

[25] Wang JF, Yu ML, Yu G, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(11): 184-188.

[26] Gui J, Tian Y, Wen X, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies [J]. Clin Sci (Lond), 2011, 120(5): 183-193.

[27] Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, et al. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease[J]. PLoS One, 2011, 6(8):23937-23939.

[28] Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker; microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer[J]. Urol Oncol, 2010, 28(6):655-661.

[29] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids[J]. Clin Chem, 2010, 56(11):1733-1741.

[30] Yamada Y, Enokida H, Kojima S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma; correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology[J]. Cancer Sci, 2011, 102(3):522-529.

[31] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization and clinical utility for oral cancer detection[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17):5473-5477.

[32] Liu CJ, Kao SY, Tu HF, et al. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer[J]. Oral Dis, 2010, 16(4):360-364.

[33] Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yield putative biomarkers and insights into disease pathways[J]. J Alzheimers Dis, 2008, 14(1):27-41.

[34] Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system[J]. Blood, 2011, 117(11):3140-3146.

[35] Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(3):86-89.

(收稿日期:2012-01-22)

• 综 述 •

端粒酶与人类 T 淋巴细胞病毒-I 诱导的 T 细胞白血病的关系研究

张 鹏 综述, 李小宁 审校

(皖南医学院弋矶山医院检验科, 安徽芜湖 241001)

关键词: 白血病, T 细胞; 端粒酶; 人端粒酶逆转录酶; 人类 T 淋巴细胞病毒-I

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 07. 031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)07-0839-04

急性白血病是较常见的血液系统疾病,严重影响患者的生活质量。近年来由于化疗药物的合理使用,对症支持治疗的不断改进和加强,大多数患者经诱导治疗可获得完全缓解,但 30%~40% 的患者仍可复发,因此早期积极有效地评估病情及检测疾病的进展对制定合理的治疗方案尤为重要。研究表明,肿瘤细胞端粒酶活性的表达在肿瘤发生、发展过程中起着重要作用。杜晓钟等^[1]研究发现睾丸端粒酶活性的缺乏可能是生殖细胞发育停滞的原因之一。张艳波和王军^[2]研究发现端粒与一些年龄相关疾病(如动脉粥样硬化)的形成及冠心病有关。现就有关端粒酶与人类 T 淋巴细胞病毒-I (HTLV-I) 诱导的 T 细胞白血病的关系进行综述。

1 肿瘤的发生和端粒酶

通常所说的末端复制问题是指由于缺乏 DNA 聚合酶模板,末端染色体不能被复制,导致 DNA 末端连续复制循环的缺陷,引起酶的减少,使细胞处于休眠状态或凋亡^[3]。这种正常的生理衰老过程确保细胞基因累积性缺陷并被新生、健康细胞替代,防止细胞癌变,然而这一过程需要被严格调控。因为短端粒可导致染色体的不稳定,如端融合、染色质错位、DNA 损伤反应等,加速了细胞病变的风险^[4]。在肿瘤细胞内,维持端粒长度这一机制的存在非常重要。端粒酶表达的上调和活性增加对于肿瘤基因有着重要的作用。事实上,接近 90% 的肿瘤都有端粒酶表达的增加,剩下 10% 利用端粒依赖途径改变端粒长度^[5-7]。

Harley 等认为端粒酶激活是细胞获得永生化的必须途径,是细胞恶变的关键步骤。Bodnar 等^[8]在正常人体细胞中导入端粒酶,细胞获得了永生化,形成肿瘤细胞,初步证明了端粒酶的激活与细胞的无限增殖有关,在肿瘤发生中起一定作用。Hiyama 等^[9]的统计资料表明不同恶性肿瘤的端粒酶阳性率达 80%~95.6%,而癌周组织和良性肿瘤中酶阳性率仅

0%~8.6%,可见端粒酶的激活是大多数肿瘤的普遍现象。另外也有研究端粒酶活性水平与肿瘤细胞遗传学的关系,发现其高活性水平常伴有提示预后不良的遗传学的改变。端粒酶是由人端粒酶 RNA(hTR)、451 个核苷酸组成的 RNA,此 RNA 为 RNA 依赖的 DNA 聚合酶的模板。RNA 通过绑定 hTR 形成人端粒酶逆转录酶(hTERT),hTERT 末端由 TTAGGG 构成,大小约为 10~15 bp,功能是保护和维持染色体末端。仅仅端粒酶表达不能够稳定端粒,作为一个能发挥功能的复合物,还需含有 DNA 结合蛋白 TRF1、TRF2、POT1 及其伴侣 TIN2、hRAP1 和 PTOP,一直以来它们在调节和保护端粒长度方面起着重要作用^[10-11]。这些端粒结合蛋白防止端粒结构被 DNA 损伤应答蛋白识别,可改变端粒 DNA 形状,保护端粒不被内切酶剪切。

端粒酶的作用仍在研究中,体外实验用端粒酶阴性细胞和人类内皮细胞重组,重组的细胞可介导 CD8⁺ T 细胞持久增生。在 CD8⁺ T 细胞中,重组细胞通过持续增长维持正常形态^[12-13]。但仅端粒酶表达不足以诱导正常细胞转变成肿瘤细胞。在裸鼠中,表达端粒酶的体细胞不能形成肿瘤,在琼脂中也不能增殖^[14]。近来有研究显示 hTERT、RasG12V 蛋白、SV40 的过度表达能够转变细胞^[15]。在缺乏 SV40 的情况下,若 RB、P53、Ras 和 C-myc 与 hTERT 同时过度表达,也能转变细胞。这一现象表明,端粒酶一次充分过度的表达可以提高细胞增殖的能力,使其连续增长。当转变过程进行中,需依赖宿主细胞蛋白和相关途径。

2 HTLV-I 引起 ATLL 细胞克隆增殖

成人 T 细胞白血病病原体是 HTLV-I,HTLV-I 可以破坏 CD4⁺ T 细胞从而引起淋巴细胞增殖紊乱^[16]。潜伏 20~30 年后,小于 5% 的携带者会发展成 ATLL。HTLV-I 在已观察到的可变基因中是不寻常的,在 AZT 治疗 ATLL 时发现感染