

• 综 述 •

基于 SPR 技术的 miRNA 生物传感器及其在肿瘤检测中的应用

罗才会,王有为,黄文芳,袁 红 综述,雍 刚[△]审校
(四川省医学科学院·四川省人民医院检验科 成都 610072)

关键词:微小 RNA; 表面等离子体共振; 生物传感器; 肿瘤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)04-0525-03

生物传感器是一种新型的传感器,由生物分子识别元件和各类物理化学换能器组成,其中蛋白、组织、细胞、酶、核酸等生物活性物质可作为识别元件,换能器可分为光学型、电化学型、温度型、压电型等^[1-2]。生物传感器用于各类生命物质和化学物质的分析和检测,在食品、制药、临床检验、生物医学、环境监测等方面具有广泛的应用前景^[3]。研究发现人体内的某些微小 RNA(miRNA)与人类疾病紧密相关,通过对 miRNA 的检测可对疾病进行诊断。目前研究检测 miRNA 的方法有多种,本文就表面等离子共振(SPR)生物传感器检测 miRNA 的新进展进行综述,并对其发展前景进行展望。

1 miRNA

1.1 miRNA 的定义及生物学功能 miRNA 是一类保守的内源性非编码小分子单链 RNA,存在于多细胞动物、植物和病毒中^[4-6]。多数的 miRNA 具有高度保守性^[7-8],在不同的物种间起着相似的作用,但是近期的研究表明,miRNA 家族并非一成不变,随着物种的进化不断有新的 miRNA 产生^[9-10],在生物发育的不同阶段里表达不同类型的发育时序性和不同组织中表达不同类型的组织特异性。研究报道在生物体内经过一系列复杂过程产生的成熟 miRNA 结合到 RNA 诱导的基因沉默复合物(RISC)中,该复合物结合到目标靶 mRNA 上发挥其基因调控的作用^[11-12],miRNA 的基因调节功能参与了一系列的生命活动,包括细胞增殖和分化、凋亡和肿瘤的发生、发展等^[13]。近年来,越来越多的研究表明 miRNA 与肿瘤的发生、诊断、治疗和预后等密切相关,而且 miRNA 在细胞和组织的表达具有特异性,是组织分化程度的标志物,因此 miRNA 可作为肿瘤诊断和预后的标志物^[14]。Qi 等^[15]用 RT-PCR 技术检测肝癌患者和健康者血清 miR-122 水平,结果发现肝癌患者明显高于健康对照者,而且肝癌患者术后 miR-122 水平明显低于术前,因此血清 miR-122 可作为肝癌诊断、预后判断、疗效检测的标志物。

1.2 miRNA 的检测技术 目前 miRNA 的检测方法主要为 Northern 杂交、RT-PCR、基因芯片技术^[16]。Northern 杂交是最早用于检测 miRNA 的方法,可以半定量 miRNA,该方法设备要求简单,特异性好,应用广泛,被认为是检测 miRNA 的金标准,但是该方法有操作繁琐、耗时长、样品需要量大、灵敏度低及易产生假阳性等缺点。RT-PCR 技术则存在所需循环次数多、持续时间长、通量低、操作要求高、对引物设计要求高及温度较难控制等缺点。基因芯片技术是一种高通量、多组分同时检测的方法,在芯片上引入荧光基团可实现对 miRNA 的实时、定量检测,引入锁核酸(LNA)修饰的核苷酸探针可进行体内 miRNA 的原位杂交检测。但是该方法重复性较差、不能同时优化待测 miRNA 的杂交环境、难以区分高度相似的 miRNA,

使其难以在普通实验室推广应用。因此,发展快速、超灵敏、免标记、高通量的检测技术已成为目前 miRNA 检测分析的迫切需求。

2 SPR 生物传感器

2.1 SPR 生物传感器的原理及特点 SPR 是一种物理光学现象,当入射光以临界角入射到两种不同透明介质界面时将发生全反射,若在介质表面镀上一层金属银或金的薄膜后,此时入射光可引起金属自由电子的共振,电子吸收光能量后导致反射光在一定角度内大大减小,而其中使反射光完全消失的入射光角度称为共振角(SPR 角)。SPR 角随金属表面流过的液相折射率变化而变化,这一变化又和结合在金属表面的生物相对分子质量成正比,因此可以通过监测 SPR 角的动态变化来进行各方面的检测。近年来,SPR 这种原位、实时、动态的检测技术得到人们越来越多的研究,使成熟化的 SPR 传感器技术被广泛应用到各个领域,从蛋白、核酸、寡糖、脂类到小分子、噬菌体、病毒、细胞等各种生物体系^[17],为临床医药、食品检验及环境监测等各个领域提供有利的标准工具。

2.2 SPR 传感器的应用

2.2.1 生命科学中的应用 Nylander 等^[18]首次将 SPR 传感器技术应用于研究免疫传感器,用 SPR 传感器成功监测到人体免疫球蛋白 IgG 和抗-IgG 抗体的相互作用,随后 SPR 传感器受到众多科研工作者的重视,并得到了快速的发展,被广泛地用于分析生物分子,涉及到生命科学研究的各个领域,为生命科学的研究提供了一个重要的工具。

2.2.2 医药学中的应用 现代医学诊断的常用检测方法包括酶联免疫吸附法、化学发光法、放射检测等,这些方法有操作繁琐、诊断时间长以及对人体有害等缺点,因此迫切需要一种简便快速、高灵敏、无害、无污染、免标记的检测方法,而拥有这些优点的 SPR 传感器得到了科研工作者的关注,逐渐成为现代医学诊断的重要工具。药物在体内实现其作用一般是通过与特定的靶受体特异性结合而发挥作用,已有科研工作者将 SPR 传感器应用于药物与蛋白质相互作用的研究,而后将 SPR 传感器用于药物筛选以及药物残留等药物科学的研究,为新药的研发提供了有力的工具,为药物分析提供了快速灵敏的检测手段,推动了医药科学的快速发展^[19]。

2.2.3 食品安全中的应用 近年来,由于食品问题引起的突发事件频繁发生,食品安全问题引起了全社会的广泛关注,因此急需一种快速灵敏的检测食品中致病菌和污染物的检测技术来保证食品的质量,而 SPR 传感器所具有的优点使其成为食品安全研究中的一种理想工具。目前,用于蜂产品、肉制品、奶制品中微生物、抗菌药物及食源性药物残留检测的多种 SPR 传感器已被研制出来^[20]。

2.2.4 环境监测中的应用 随着工农业的发展,排放到环境中的有害物质及微生物等日益增多,给人类和动植物的健康造成了严重的危害,因此发展快速、有效的检测技术已经成为目前科研工作者面临的主要问题。目前常用的检测技术有色谱分析法、质谱分析法以及免疫分析法等,但是这些方法存在检测周期长、预处理过程复杂等缺点,因此拥有快速简便、实时检测等优点的 SPR 生物传感器可成为环境监测的理想工具。

3 基于 SPR 的 miRNA 生物传感器检测技术

miRNA 作为癌症的早期诊断、预后判断、疗效检测等方面的特异性标志物^[21-22],可以通过检测血液,以及其他体液、组织、细胞中的 miRNA 来提高肿瘤患者的生存率,对改善患者的生活质量具有很重要的实际意义。上文提及的 miRNA 传统检测方法存在耗时费力、样品预处理复杂、样本需要量大等缺点,因此发展简便快速、超灵敏、高通量多组分、免标记的检测方法已成为目前科研工作者面临的主要问题。

SPR 传感器技术用于 miRNA 的检测与传统方法相比较有很多优势:(1)高通量、高质量的分析数据;(2)检测过程方便快捷,实验周期短;(3)灵敏度高,特异性好;(4)实时监测反应动态过程;(5)不需要对样品进行复杂的预处理;(6)生物样品无需标记;(7)样品需要量极少;(8)无背景干扰;(9)芯片再生可重复多次使用。目前已有多种不同型号的商品化 SPR 生物传感器应用于各个领域,成为一种检测的标准工具,越来越多的科研工作者将 SPR 生物传感器应用于检测 miRNA 的研究。

Fang 等^[23]设计了一种基于表面聚核苷酸 A 聚合酶化学反应和金纳米粒子放大作用的 SPRI 传感器,用于检测多种 miRNAs。首先待检 miRNA 与微点阵上的 LNA 探针杂交,在聚核苷酸 A 聚合酶的作用下,miRNA 的 3'端形成一长段聚核苷酸 A 链,聚核苷酸 A 链与金纳米粒子上包被的聚核苷酸 T 杂交,SPRI 检查信号得到进一步放大,从而降低其检测限。在此方法中,研究员在微点阵上设计了三种锁核酸探针,能够同时检测从小鼠肝脏中提取出的混合 miRNAs,其中 miRNA-16、miRNA23b 和 miRNA122b 分别检测出 20、50、2 pmol/L,实现了高灵敏的多组分检测生物样本。

Sipová 等^[24]设计了一种基于 DNA-RNA-抗体结构的便携式 SPR 传感器检测 miRNA。其中捕获探针 DNA 与 miRNA 杂交形成 DNA-RNA 杂交结构,这种结构能够被一种抗体特异性地识别和结合,从而放大检测信号,提高检测灵敏度,结果表明能够检测到缓冲液中 2pM 的 miRNA。同时将该传感器用于检测从小鼠肝脏组织中提取出来的 miRNA,检测的 miRNA-122 量与同时用 qPCR 方法检测的量相一致。因此,该方法能够很好地用于实际样品的分析检测。

Nasheer 等^[25]设计了一种简单、快速的 SPR 传感器技术检测 miRNA,其最主要的特色是运用 P19 蛋白,该蛋白的主要特点是能够特异性地结合 RNA 双链结构。首先在芯片上固定针对 miRNA-122 的巯基化探针,待检 miRNA-122 与探针杂交形成双链 RNA,P19 蛋白特异性地结合 RNA 双链结构,芯片上的质量变化通过 SPR 的检测信号来反应。结果发现纯杂交技术的 SPR 检测 miRNA-122 的最低检测限为 40 nmol/L,运用 P19 蛋白结合双链 RNA 的 SPR 检测信号是直接杂交检测信号的 10 倍,最低检测限为 4 nmol/L。该方法无需酶催化反应来放大信号,只需一种简单的蛋白就能得到较好的灵敏度。

Zhou 等^[26]建立了一种新颖的硅纳米粒子放大信号 SPRI 传感器来检测 miRNA。首先在硅纳米粒子修饰上 5'端磷酸化

的短链 DNA,通过 T4 连接酶将待检 miRNA 与硅纳米粒子上的短链 DNA 相连接,被连接到硅纳米粒子上的 miRNA 与芯片上的捕获探针杂交,进而被 SPRI 检测。研究组还证明了通过在芯片上修饰不同组分的捕获探针,能够同时检测多种 miRNAs。该方法将 SPR 与成像技术相结合,实现对生物标本的高灵敏、高通量、多成分进行检测分析。

Zhang 等^[27]建立了一种简单的三明治杂交结构的 SPR 传感器检测 miRNA-122,其中利用生物素探针-链霉素亲生物素蛋白放大系统来增大信号 5 倍,从而提高检测的灵敏度,最低检测限达 1.7 fmol。研究组还对该方法的特异性进行了验证,结果得出该方法能够很好地识别出单碱基错配的 miRNA。因此,该方法能够高灵敏、高特异性地检测生物标本。同时,芯片通过一定的处理,能够很好地重复检测标本 30 次。

4 结论与展望

miRNA 在细胞分化、生物发育及疾病发生、发展过程中发挥着巨大的作用,引起越来越多研究人员的关注,特别是作为一种潜在的肿瘤标志物,迫切需要发展一种简便、快速、灵敏的检测方法。SPR 传感器检测具有实时、快速、免标记、高通量、重现性好、灵敏度高等优点,是一种非常具有发展前景的 miRNA 检测方法。如上文总结,越来越多的研究人员从事 SPR 传感器检测 miRNA 的研究,希望经过研究人员的不断努力,使 SPR 传感器技术能够用于临床实际标本的检测,为癌症患者的早期诊断、分期、治疗和预后评估提供强有力的工具。

参考文献

- [1] Liu S, Zheng Z, Li X. Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(1): 63-90.
- [2] Hamidi-Asl E, Raoof JB, Ojani R, et al. A new peptide nucleotide acid biosensor for electrochemical detection of single nucleotide polymorphism in duplex DNA via triplex structure formation [J]. J Iran Chem Soc, 2013, 10(6): 1075-1083.
- [3] Ngoepe M, Choonara YE, Tyagi C, et al. Integration of biosensors and drug delivery technologies for early detection and chronic management of illness [J]. Sensors (Basel), 2013, 13(6): 7680-7713.
- [4] Zhang X, Dong C, Sun X, et al. Induction of the cellular miR-29c by influenza virus inhibits the innate immune response through protection of A20 mRNA [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(1): 755-761.
- [5] Dong H, Lei J, Ding L, et al. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis [J]. Chem Rev, 2013, 113(8): 6207-6233.
- [6] Connelly CM, Deiters A. Control of oncogenic miRNA function by light-activated miRNA antagonists [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1165(1): 99-114.
- [7] Takane K, Fujishima K, Watanabe Y, et al. Computational prediction and experimental validation of evolutionarily conserved microRNA target genes in bilaterian animals [J]. BMC Genomics, 2010, 11(101): 1-13.
- [8] Catalano D, Pignone D, Sonnante GA. In-silico and in-vivo analyses of EST databases unveil conserved miRNAs from *Carthamus tinctorius* and *Cynara cardunculus* [J]. BMC Bioinformatics, 2012, 13(4): 12-23.
- [9] Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, et al. The expansion of the metazoan microRNA repertoire [J]. BMC Genomics, 2006, 7(1): 25.

- [10] Sempere LF, Cole CN, Mcpeek MA. The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs; insights into evolutionary complexity and constraint[J]. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2006, 306B(6):575-588.
- [11] Place RF, Noonan EJ. Non-coding RNAs turn up the heat; An emerging layer of novel regulators in the mammalian heat shock response[J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(2):159-172.
- [12] de Planell-Saguer M, Rodicio MC, et al. Analytical aspects of microRNA in diagnostics; a review[J]. Anal Chim Acta, 2011, 699(2):134-152.
- [13] Li JS, Yao ZX. MicroRNAs: novel regulators of oligodendrocyte differentiation and potential therapeutic targets in Demyelination-Related diseases[J]. Mol Neurobiol, 2012, 45(1):200-212.
- [14] Yin BC, Liu YQ, Ye BC. Sensitive detection of microRNA in complex biological samples via enzymatic signal amplification using DNA polymerase coupled with nicking endonuclease[J]. Anal Chem, 2013, 85(23):11487-11493.
- [15] Qi P, Cheng SQ, Wang H, et al. Serum MicroRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. PLoS One, 2011, 6(12):28486-28491.
- [16] Tran HV, Piro B, Reisberg S, et al. Antibodies directed to RNA/DNA hybrids; an electrochemical immunosensor for microRNAs detection using graphene-composite electrodes[J]. Anal Chem, 2013, 85(17):8469-8474.
- [17] Yanase Y, Hiragun T, Yanase T, et al. Application of SPR imaging sensor for detection of individual living cell reactions and clinical diagnosis of type I allergy[J]. Allergol Int, 2013, 62(2):163-169.
- [18] Bowen J, Noe LJ, Sullivan BP, et al. Gas-phase detection of trinitrotoluene utilizing a solid-phase antibody immobilized on a gold film by means of surface plasmon resonance spectroscopy[J]. Appl Spectrosc, 2003, 57(8):906-914.
- [19] Patching SG. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1838(1 Pt A):43-55.
- [20] 刘星, 黄庆. 表面等离子共振生物传感器的研究进展及发展趋势[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3):341-343.
- [21] Zhang W, Liu J, Wang G. The role of microRNAs in human breast Cancer progression[J]. Tumour Biol, 2014, 35(7):6235-6244.
- [22] Campuzano S, Pedrero M, Pingarrón JM. Electrochemical genosensors for the detection of cancer-related miRNAs[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(1):27-33.
- [23] Fang SP, Lee HJ, Wark AW, et al. Attomole microarray detection of MicroRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(43):14044-14046.
- [24] Sipová H, Zhang S, Dudley AM, et al. Surface plasmon resonance biosensor for rapid label-free detection of microribonucleic acid at subfemtomole level[J]. Anal Chem, 2010, 82(24):10110-10115.
- [25] Nasheri N, Cheng J, Singaravelu R, et al. An enzyme-linked assay for the rapid quantification of microRNAs based on the viral suppressor of RNA silencing protein p19[J]. Anal Biochem, 2011, 412(2):165-172.
- [26] Zhou WJ, Chen Y, Corn RM, et al. Ultrasensitive microarray detection of short RNA sequences with enzymatically modified nanoparticles and surface plasmon resonance imaging measurements[J]. Anal Chem, 2011, 83(10):3897-3902.
- [27] Zhang DC, Yan YR, Cheng W, et al. Streptavidin-enhanced surface plasmon resonance biosensor for highly sensitive and specific detection of microRNA[J]. Microchimica Acta, 2013, 180(5/6):397-403.

(收稿日期:2014-10-25)

• 综 述 •

miR-125 家族与肿瘤的相关性研究进展

潘 请^{1,2}, 丁 丁^{1,2} 综述, 马筱玲^{2△} 审校

(1. 蚌埠医学院, 安徽蚌埠 233000; 2. 安徽省立医院检验科, 合肥 230001)

关键词: 微小 RNA; miR-125 家族; 肿瘤

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 04. 040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)04-0527-03

微小 RNA(miRNA)是一类进化保守的非编码单链 RNA, 长约 20~22 个核苷酸, 主要通过降解靶 mRNA 或者抑制其翻译^[1], 调节细胞增殖、分化和凋亡^[2], 参与肿瘤的发生、发展。在众多 miRNA 家族中, miR-125 家族被广泛关注。miR-125 家族由 miR-125a, miR-125b-1, miR-125b-2 组成。miR-125a 位于染色体 19q13 上, 有 miR-125a-3p 和 miR-125a-5p 两种成熟体, 分别来自前体 pre-miR-125a 的 3'端和 5'端。miR-125b 由染色体 11q23 和 21q21 两个位点转录分别形成 miR-125b-1 和 miR-125b-2^[3]。越来越多的证据证明 miR-125 家族在肿瘤组织中存在异常表达, 且这种异常表达与肿瘤的发生、发展、转移和预后等有关。本文就 miR-125 家族与肿瘤的相关性进行综述。

1 miR-125 家族在实体肿瘤中的作用

大量研究显示 miRNA 表达失调参与多种癌症的发生和进展。据报道, 在不同类型癌症中 miR-125 家族不同成员的功能具有多面性, 他们可作为抑癌基因或癌基因发挥其相应的作用。

1.1 miR-125 家族发挥抑癌基因作用 miR-125 家族在很多实体肿瘤中发挥抑癌基因功能, 包括乳腺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤鳞状细胞癌、肺癌、骨肉瘤等。研究发现, 较之癌旁组织, 胃癌^[4]、肝癌^[5]、肺癌^[6]组织中 miR-125a 表达明显减少, 而且这种 miR-125a 的低表达与肿瘤的大小、侵袭、淋巴结转移等因素相关。Zhu 等^[6] 研究报道 miR-125a-5p 在非小细胞肺癌(NSCLC)患者血清标本中也呈低表达, 且在早期肺癌患者血