

[11] 郑红云,李艳,童永清,等. 200 例男性不育患者的 Y 染色体微缺失检测[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(7):42-43.

[12] 叶长烂,江悦华,王捷,等. Y 染色体微缺失与男性无精少精的相关关系[J]. 中国实验诊断学,2010,14(4):566-568.

[13] 慕明涛,霍满鹏,张静,等. 男性不育患者无精子因子微缺失的检测意义[J]. 医药论坛杂志,2011,32(2):4-5.

[14] 涂向东,谢飞,张宝珍,等. 男性生精障碍的细胞遗传学和分子遗传学检测[J]. 中国男科学杂志,2006,20(1):28-31.

[15] 邵晨,杨波,王禾,等. 基因芯片技术在 COX10 等无精症患者相关基因的分析[J]. 西安交通大学学报:医学版,

2003,24(4):345-347.

[16] Bor P, Hindkjaer J, Kolvraa S, et al. A new approach for screening for Y microdeletions: capillary electrophoresis combined with flu. htmlrescent multiplex PCR[J]. J Assist Reprod Genet, 2003, 20(1): 46-51.

[17] Kunej T, ZornB, Peterlin B. Y chromosome microdeletions in infertile men with cryptorchidism [J]. Fertil Steril, 2003, 79: 1559-1565.

[18] 刘海宁, 汤秀明, 李强, 等. 卵母细胞浆内单精子显微注射治疗男性不育的效果[J]. 齐鲁医学杂志, 2005, 20(1): 31-32.

(收稿日期:2012-06-26)

食管癌组织和外周血 miRNA 检测技术及其应用的研究进展

史 菊¹综述, 缪竞诚², 顾国浩³审校 (1. 江苏省宿迁市泗洪县人民医院检验科 223900; 2. 苏州大学, 江苏苏州 215000; 3. 苏州大学附属第一医院检验科, 江苏苏州 215000)

【关键词】 miRNA 检测技术; 食管癌; 外周血
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 21. 039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)21-2729-03

食管癌是人类常见的八大肿瘤之一^[1], 全世界每年约有 30 万人死于食管癌^[2], 其中 70% 发生在我国。食管癌起病隐匿, 大部分患者就诊时已是中晚期, 此时实施外科手术的 5 年存活率仅为 20%~30%^[3]。如何提高食管癌的早期诊断, 尽早治疗对提高食管癌患者生存率具有重要意义。目前用于食管癌筛查的首选方法是胃镜组织活检, 但是组织活检可能会导致肿瘤扩散, 且胃镜检查患者痛苦, 不能被无症状者接受^[1], 需要寻找一种无创性方法来替代。MicroRNA(miRNA) 是一类高度保守的内源性单链非编码 RNA, 通过与靶基因 3' 端非编码区发生不完全配对, 从而调节靶基因 mRNA 翻译、转录过程^[4-5], 参与转录后基因表达调控。microRNA 在组织、细胞、外周血中的表达有显著的肿瘤相关性、组织特异性和表达稳定性^[6-7], 作为致癌基因或抑癌基因参与肿瘤的发生、发展, 有望成为新的生物标志物。近年来, miRNA 是全世界学者研究的热点。现就食管癌组织和外周血 miRNA 检测技术及其应用的研究进展综述如下。

1 食管癌组织 miRNA 检测技术及其应用

Feber 等^[8]对食管癌手术时切取的冰冻保存的标本进行 miRNA 检测分析, 其中包括: 鳞癌 10 例、腺癌 10 例、正常上皮 9 例、Barrette 食管 5 例、高度不典型 1 例。他们先用 miRNA 提取试剂 (Ambion Inc, Austin, Tex) 提取总 RNA, 用分光光度计测量, 以作为质量控制, 然后用小 RNA 探针微阵列技术检测 miRNA。结果显示, 正常上皮样本 miRNA 接近于鳞癌样本, 而 Barrette 食管更接近于腺癌。Barrette 食管与食管腺癌 miRNA 表达谱接近, 证明了 Barrette 食管可能是食管腺癌的癌前病变, miRNA 可作为 Barrette 食管进展为食管腺癌的监测。各组织类型标本 miRNA 结果两两比较发现: (1) mir-203、mir-205 在食管肿瘤组织中低表达, 而 mir-21 高表达, 提示 miRNA 可以用于区分食管肿瘤组织与正常组织。(2) 食管鳞癌与食管腺癌 miRNA 的表达谱不同, 提示 miRNA 可用来预测食管癌的组织类型。Kan 等^[9]用微阵列芯片法研究发现, 食

管癌组织 mir-106b-25 有异常表达, 并用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)证实其存在。后来, 他们将 miR-106b-25 导入到人工培养的食管癌细胞株 OE33 中, 进一步研究发现, miR-106b-25 多顺反子具有促进细胞增殖和抗凋亡的作用, 在 Barrette 食管进展到食管腺癌的过程中通过激活 p21 和 Bim 2 个靶基因促进细胞癌变^[10]。至此, 人们对食管癌组织 miRNA 的研究提高到了靶基因的层面。此试验中利用了基因芯片技术、RT-PCR 技术和细胞信号转导技术。基因芯片可以直接测定一份标本的多种 miRNA, 但是此方法背景和杂信号干扰大, 重复性差, 不能区分差异小的 miRNA, 常被用于食管癌 miRNA 的筛选。RT-PCR 技术通过实时监测目标 miRNA 转录基因的扩增产物来推算目标基因的量, 灵敏度高, 精确度高, 但是多了转录步骤, 程序略复杂, 一次只能测定一种目标基因, 常被用于食管癌 miRNA 的确证实验。这两种方法都是检测 miRNA 的常用方法, 由于 RT-PCR 价格便宜, 精确度高, 被越来越多的研究者采用。细胞信号转导以细胞感受、转导机体内环境信息的分子通路、生物个体发育过程中调节基因表达和代谢生理反应等为其研究内容。细胞信号转导技术后来也成为研究食管癌 miRNA 功能的主要方法。Hiyoshi 等^[11]用 RT-PCR TaqMan 探针和原位杂交技术研究发现, mir-21 与食管鳞癌细胞程序性细胞死亡基因 4 呈负相关。mir-21 可能成为食管鳞癌治疗的新靶点。至此, 食管癌 miRNA 的研究进入治疗靶点的探索。本试验中用到的 TaqMan 荧光探针是一种寡核苷酸探针, 荧光基团连接在探针的 5' 末端, 而淬灭剂则在 3' 末端, 自身不发光, 当与靶基因结合后, 淬灭基团失活, 则发出荧光。原位杂交技术是经典的研究 miRNA 的方法, 可直观了解食管癌 miRNA 表达方式。近年来, miRNA 的检测技术也得到了迅猛发展, 出现了一大批高通量、高科技技术。xMAP 液态芯片技术是高通量检测技术的新亮点, 它采用了 DNA-RNA 嵌合探针, 该嵌合探针中, RNA 碱基序列部分与靶 miRNA 相互补, DNA 碱基序列部分与微球上的捕捉序列相互补, 形成微

球-嵌合探针-miRNA 复合物。xMAP 液态芯片技术是一种高效的筛选 miRNA 的方法。还有新一代高通量测序技术,可以一次完成数十万到数百万条 DNA、RNA 分子的序列测定,有分析结果准确、快速、高灵敏度和高自动化的特点,对 miRNA 的检测起着巨大的推动作用。目前常用的有罗氏公司的 454 测序、Illumina 公司的 Solexa 测序和 ABI 公司的 SOLID 测序。国内对食管癌组织 miRNA 的研究,多集中在食管癌组织特异性 miRNA 的探索发现。蔡惠^[12]用基因芯片筛查和 qRT-PCR 验证得出:食管鳞癌组织中 hsa-mir-126 高表达,而 hsa-mir-518b 低表达。hsa-mir-126 在食管癌中的作用可能是促进肿瘤血管生成。李高峰和李桂生^[13]用 RT-PCR 和 Western blot 法研究 mir-9 前体分子对食管癌细胞株 TE6 中核因子- κ B(NF- κ B)mRNA 表达的影响,研究表明 mir-9 前体分子可阻断食管癌细胞株中 NF- κ B 的生物活性,进一步研究表明 mir-9 前体分子能调控食管癌细胞株中 NF- κ B 1 的表达,为 miRNA 用于食管癌的生物治疗提供了理论依据。叶昱坪和刘真真^[14]发现 mir-129 在食管鳞癌组织和食管鳞癌细胞系中有高表达, mir-129 水平与临床分期和淋巴结转移存在相关性。

虽然,国内外对食管癌组织 miRNA 定量分析的方法很多,但是这些检测都只是相对定量,而不是绝对定量,因为(1)初始样本量不同:每克组织中的水分、癌细胞含量未知。(2)组织样本可能的 RNA 降解不同:标本离体时间、保存条件不同。(3)核酸回收率不同:总 RNA 的提取方法不同、试剂不同。(4)cDNA 合成效率不同:仪器、试剂不同。(5)扩增效率不同、内参基因不同。以上种种没有统一的标准,使结果的重复性较差,有的甚至出现截然相反的结论,严重阻碍着食管癌组织 miRNA 检测的发展和应用。再者,食管癌组织 miRNA 检测需要采集较多的新鲜组织(20~80 mg),不宜作为术前筛查,也阻碍着食管癌组织 miRNA 检测,理想的方法是从体液中检测到特异性 miRNA,监测食管癌的发生与发展。鉴于外周血易采集、创伤性小、可用于检测多项指标等优点^[15],在其中寻找合适的 miRNA 作为早期诊断标志物,对于降低食管癌的病死率具有重大实际意义。

2 食管癌外周血 miRNA 检测技术及其应用

一般认为若外周血 miRNA 可以成为食管癌新的生物标志物,则外周血 miRNA 必须满足下列 2 个条件:首先,食管癌患者外周血中存在稳定的 miRNA。Mitchell 等^[16]、Gilad 等^[17]和 Chen 等^[18]研究发现,血清和血浆中存在稳定的 miR-

NA,这为用血清、血浆检测食管癌患者 miRNA 提供了可行性依据;其次,食管癌患者外周血 miRNA 水平随着病情的发展而变化,简单地说,miRNA 水平能反映患者的临床状态,这是食管癌患者外周血 miRNA 能否成为潜在生物标志物的关键。Gilad 等研究怀孕早期、怀孕晚期和未怀孕者血清中 miRNA,发现有些 miRNA 不仅在怀孕者和未怀孕者之间有明显差异,而且晚期孕妇与早期孕妇血清中的水平也有明显差异,提示了血清 miRNA 水平能反映患者的临床状态。这为血清 miRNA 用于食管癌的早期诊断、肿瘤监测提供了可行性依据。Zhang 等^[19]用 solexa 筛查、qRT-PCR 验证研究了 290 例食管鳞癌患者血清 miRNA 的表达,发现与健康对照者相比,食管癌患者血清中 mir-10a、mir-22、mir-100、mir-148b、mir-223、mir-133a、mir-127-3p 有明显上升。这 7 种 miRNA 组合对食管鳞状细胞癌诊断的特异性为 96%,比癌胚抗原(CEA)(100%)稍低;敏感度为 78.5%,远远高于 CEA(13.4%)。结果表明,血清 miRNA 可作为食管癌早期筛查指标,不可作为食管癌监测的指标。本次试验 RT-PCR 技术中内参的选择是新问题:组织 miRNA 检测时使用的内参 U6 和 r5S 在本实验体系中均会被降解,未能找到合适的内参。不得不改用标准化样品及试剂来用绝对定量检测。

外周血的常规检测可以提取血浆、血清、单个核细胞,还有的用全血。全血中含有大量血细胞,更能反映肿瘤特异性 miRNA。Hausler 等^[20]用全血检测 miRNA 在卵巢癌患者中的表达,目前尚无全血检测食管癌患者 miRNA 的报道。血浆和血清去除了全血中的红细胞、白细胞和血小板,大大减少了血细胞的干扰,实验证明可以用于食管癌 miRNA 的检测,但是,单一 miRNA 的敏感性、特异性均不高,有待发现一些敏感性、特异性更高的 miRNA 作为食管癌早期筛查和肿瘤监测的指标。Mitchell 等^[16]研究发现血浆和血清中的 miRNA 具有正相关,为外周血 miRNA 检测样本的选择提供了方便。单个核细胞的主要成分是淋巴细胞,淋巴细胞是人体免疫监测的主力军,它可能与肿瘤的发生和发展密切相关。目前,有报道用单个核细胞检测乙型肝炎 miRNA 的表达,但是单个核细胞的收集有实效性(4 h 以内),且提取较繁琐,尚未见报道用于食管癌患者外周血单个核细胞 miRNA 的检测。

3 食管癌组织和外周血检测 miRNA 的不同标本的比较

miRNA 标本特点见表 1。

表 1 miRNA 标本的特点			
标本	成分	取材	miRNA
全血	含有血浆、白细胞、红细胞、血小板等	容易	肿瘤分泌的 miRNA 含量较高
血清	不含血细胞、含纤维蛋白	容易	稳定,但含量较少,可做定量分析
血浆	不含血细胞、纤维蛋白	容易	稳定,但含量较少,可做定量分析,与血清水平相关
单个核细胞	含有大量淋巴、单核细胞,不含纤维蛋白	较繁琐	含量高,但取材无法量化,无法做定量分析
组织	含有大量蛋白质	困难	含量高,重复性差,无法做绝对定量分析,只能与癌旁组织作比较分析

4 展 望

食管癌患者 miRNA 的检测将推动关于食管癌发生和发展的研究,可能为食管癌的治疗提供新的思路和方法。人们可根据 miRNA 的检测和环境的实际需要采用不同的样本,而血清标本无创且易获得,有望成为理想的食管癌生物标志物,用

于提高食管癌早期诊断、监测复发和转移,改善患者的生存率。

参考文献

[1] Roshandel GH, Semnani SH, Malekzadeh R. None-endoscopic screening for Esophageal Squamous Cell Carcino-

- ma-A review[J]. Middle East J Dig Dis, 2012, 4: 111-124.
- [2] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of mir-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis[J]. Mol Cell, 2007, 26(5): 745-752.
- [3] Chunni ZH. Expression profile of microRNAs in serum; a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Chem, 2010, 56(12): 1871-1879.
- [4] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269.
- [5] Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression[J]. Sci Stke, 2007, 367: re1.
- [6] HOW. OncomiRs; the discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 60.
- [7] Manikandan J, Aarthi JJ, Kumar SD, et al. Oncomirs; The potential role of noncoding microRNAs in understanding cancer[J]. Bioinformation, 2008, 2(8): 330-334.
- [8] Feber A, Xi L, Luketich JD, et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135: 255-260.
- [9] Kan T, Sato F, Ito T, et al. The mir-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim[J]. Gastroenterology, 2009, 136: 1689-1700.
- [10] Kan T, Meltzer SJ. MicroRNAs in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9: 727-732.
- [11] Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(6): 1915-1922.
- [12] 蔡惠. hsa-mir-126 和 hsa-mir-518b 在食管鳞癌中的表达[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(1): 23-27.
- [13] 李高峰, 李桂生. mir-9 前体分子抑制食管癌细胞株 TE6 中 NF- κ B1 的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 177-179.
- [14] 叶显坪, 刘真真. mir-129 的表达与食管鳞癌发生发展的关系[J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(10): 18-21.
- [15] Eur J, Intern Duffym J. Role of tumormarkers in patients with solid cancers; A critical review[J]. Eur J Intern Med, 2007, 18(3): 175-184.
- [16] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [17] Gilad S, Meiri E, Yegorov Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. PLoS One, 2008, 3(9): 3148-3151.
- [18] 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.
- [19] Zhang CN, Wang C, Chen X, et al. Expression profile of microRNAs in serum; A fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Chem, 2010, 56(12): 1871-1879.
- [20] Hausler SF, Keller A, Chandran PA, et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening[J]. Br J Cancer, 2010, 103: 693-700.

(收稿日期: 2012-06-23)

组织激肽释放酶-激肽系统及其与心血管疾病的关系

曹步清 综述, 刘铁牛 审校(解放军第三〇三医院检验科, 南宁 530021)

【关键词】 组织激肽释放酶; 缓激肽; 缓激肽受体; 心血管疾病

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.21.040 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)21-2731-03

组织激肽释放酶-激肽系统(KKS)广泛存在于动物体的各种组织中, 通过多条信号通路产生多种生物学作用, 参与多器官功能调节和多种病理生理过程, 如心血管、肾脏和神经系统的调节, 细胞增殖、炎症、凋亡等过程。

1 KKS 的组成和生物学活性

KKS 的组成包括激肽释放酶原、激肽释放酶(KLK)、激肽原、激肽和激肽受体。组织中存在的激肽释放酶原活化后成为激肽释放酶。激肽释放酶分为两种类型: 组织激肽释放酶和血浆激肽释放酶, 二者在其相对分子质量、底物特异性、免疫生物学特性、基因结构以及所释放的激肽类型等方面均存在明显差异。血浆激肽释放酶基因由 15 个外显子和 14 个内含子组成, 位于 4q35 染色体上, 具有丝氨酸蛋白酶活性, 可催化肝脏中合成的前体物激肽原降解, 释放缓激肽。血浆激肽释放酶由肝细胞特异性表达, 其功能是在调节血管收缩程度和炎症过程中通过释放缓激肽参加血液凝固、纤维蛋白溶解^[1]。此外, 血浆激肽释放酶在肾上腺、肾脏、胎盘和骨骼肌上也有表达。组织激

肽释放酶属于一组紧密联系的丝氨酸蛋白酶类, 相对分子质量 (24~45) $\times 10^3$, 等电点在 3.5~4.4, 它广泛存在于肾、胰腺、胃肠道黏膜及中枢神经系统等许多组织中, 以激肽原酶原的形式在组织中合成, 再经胰蛋白酶激活形成组织激肽释放酶, 并可释放至血液循环, 其活性能被抑肽酶或它的内源性抑制剂 kallistatin 所抑制。

长期以来, 人们一直认为 KLK 基因家族只有 3 个基因: KLK1、KLK2 和 KLK3。KLK1 对心血管、肾脏和中枢神经系统具有重要的保护作用, 而 KLK2 和 KLK3 (也称为前列腺特异性抗原) 则被认为是前列腺癌的标志物。目前的研究表明, 组织激肽释放酶基因家族至少有 15 个基因组成 (KLK1~15), 并且这 15 个激肽释放酶相关基因都处于 19q13.4 这条染色体上。系统进化分析法发现, Kallikrein 家族可分为 5 个亚系: 第 1 组 KLK4、KLK5、KLK14; 第 2 组 KLK9、KLK11、KLK15; 第 3 组 KLK10、KLK12; 第 4 组 KLK6、KLK13; 第 5 组 KLK8 和经典的 KLK1、KLK2、KLK3^[2]。