

血清/血浆microRNAs作为肺癌诊断标记物的研究进展

张辉 综述 陈晓峰 审校

【中图分类号】R734.2

Serum/Plasma MicroRNAs as Biomarkers for Lung Cancer

Hui ZHANG, Xiaofeng CHEN

Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Xiaofeng CHEN, E-mail: cxf229900@yahoo.com.cn

This study was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (to Xiaofeng CHEN)(No.30872553) and Basic Research Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (to Xiaofeng CHEN)(No.10JC1419200).

近年来随着肺癌发病率与死亡率的逐年上升,肺癌已成为最具有致命性的恶性肿瘤之一。据美国癌症学会发布的一项数据显示,2010年美国确诊肺癌患者约22.2万人,约15.7万人死于肺癌,位居因恶性肿瘤死亡人数的首位^[1]。在我国肺癌也已成为位居首位的癌症死因^[2]。在所有肺癌中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占85%^[3]。虽然目前仍没有非常有效的治疗手段,但早期NSCLC的治疗已取得较大的进步,其中以手术为主的综合治疗可以明显延长I期NSCLC患者的生存期,5年生存率达到45%-65%^[3]。因此早期发现肺癌可以减少肺癌的死亡率,但是目前还没有一种非常安全有效的方法对肺癌高危人群进行筛查,以往的肺癌标记物如细胞角蛋白21-1、肿瘤多糖、癌胚抗原诊断肺癌的敏感度较低^[4]。有研究^[5,6]报道影像学检查发现的肺部结节,大约50%是良性的,对减少肺癌死亡率作用有限。此外,超声气管内镜下活检、肺穿刺活检为有创检查方式。

MicroRNAs(简称miRNAs)是一类高度保守、长度很短的非编码调控单链RNA,约20 nt-24 nt,通过与目标mRNA互补配对导致mRNA降解或抑制转录后翻译诱导基因沉默^[7]。MiRNA参与生命过程中一系列的重要进程,包括发育、造血、器官形成、凋亡和细胞增殖,以及癌

症的发生、发展,其通过切割靶mRNA或抑制靶mRNA翻译实现miRNAs抑制基因表达^[8]。最近研究发现,血清/血浆中有大量稳定存在的miRNA,并且可作为肺癌的诊断标记物。

1 血清/血浆miRNA的稳定性

在血清/血浆中存在大量的核糖核酸酶,那么miRNA是否可以逃脱核糖核酸酶的消化?对此Chen等^[9]、Mitchell等^[10]2008年报道血清中的miRNA可以耐受核糖核酸酶的消化。Ho等^[11]报道血浆miRNA在100 °C的环境下也可保持稳定。他们将血浆煮沸20 min后提取miRNA,然后测量miRNA的表达量,发现与对照组相比miRNA表达量没有明显变化。此外Taylor^[12]、Huang^[13]、Gilad^[14]等报道在4 °C和室温下miRNA也可保持稳定。还有研究^[9-11,14]报道miRNA经反复冻融和在强酸(pH=1)、强碱(pH=13)的环境中也可稳定存在。

血清/血浆miRNA保持稳定性的机制仍不清楚,目前主要有两种观点。一种观点认为分泌到血液中的miRNA是以被膜包绕的囊泡状结构存在的,被称之为外核体(exosomes)或微泡(microvesicles),通过此结构可以有效保护血清/血浆中的miRNA不被核糖核酸酶消化,并且可以将miRNA运输到靶细胞,从而发挥调节功能^[15-17]。另一种观点认为血清/血浆miRNA以蛋白复合体的形式存在^[18]。Arroyo等^[19]报道,循环中的miRNA可以

本研究受国家自然科学基金(No.30872553)和上海市科委基础研究重点项目(No.10JC1419200)资助

作者单位:200433 上海,同济大学附属上海市肺科医院胸外科(通讯作者:陈晓峰, E-mail: cxf229900@yahoo.com.cn)

被蛋白酶破坏,失去稳定性,进一步研究发现Argonaute2 (Ago2)蛋白在该复合体中起着重要作用,因此将循环中的miRNA称之为Ago2-miRNA蛋白复合体。

目前关于血清/血浆miRNA的各种功能机制研究的仍比较少,关于血清/血浆miRNA是如何进入血液、在血液中如何运输以及如何进入靶细胞发挥作用仍不是很清楚,这一系列的问题需要进一步的研究。

2 血清/血浆miRNA的检测方法

目前许多研究^[20-23]通常使用75 μ L-1.5 mL的血清/血浆抽提miRNA。Kroh等^[24]报道用400 μ L的血清/血浆抽提miRNA,不仅方便操作,也可抽提出满意的miRNA浓度。目前主要有两种方法提取血清/血浆miRNA,一种是Trizol法,另一种是滤柱法。因Trizol中含有苯酚、异硫氰酸胍等物质,能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶,并且能在破碎和溶解细胞时保持RNA的完整性,可以用于直接从细胞或组织中提取总RNA。当前使用最多的是滤柱法,在使用滤柱法时因血清/血浆中含有大量的蛋白质,通常在抽提前需要使用苯酚-氯仿处理样本,以去除蛋白质,防止在抽提过程中大量蛋白阻塞滤柱而大量损耗miRNA。对于检测miRNA的表达量,Northern blot是金标准,但是由于其灵敏度较低并且操作方法较繁琐,一般不用于对临床样本的检测^[25]。实时荧光定量RT-PCR是检测血清/血浆miRNA表达量的常用方法。根据反转录引物的不同,实时荧光定量RT-PCR可以分为茎环状引物法和多聚腺嘌呤加尾法。研究报道使用茎环状引物法可以获得更高的反转录效率和特异度。此外,根据化学发光原理的不同,还可分为荧光染料法和探针法。探针法在检测的特异度和灵敏度方面优于染料法。此外高通量序列分析法^[28]和芯片法也用于对miRNA的检测,但由于高通量序列分析法价格较昂贵,一般只用于探寻新的miRNA,而芯片法由于重复性较差,一般只用于miRNA的初筛。

今后随着检测技术的不断发展,需要建立一套标准化的血液样本收集、运输保存以及miRNA提取制备和实时荧光定量RT-PCR检测技术体系以及数据处理系统,确保miRNA检测结果的标准化。

3 血清/血浆miRNA在肺癌诊断中的应用

Keller等^[29]报道肺癌患者的血清miRNA表达谱在确诊

为肺癌之前就已发生了改变。在此项研究中共收集到29份血清,其中6份来自6位健康志愿者,另外23份来自已确诊为肺癌的8例患者。在这23份血清中,有15份是在临床确诊为肺癌之前收集到的。他们使用芯片法分析了这29份血清miRNA的表达谱,发现血清miRNA表达谱可以在很长的时间里保持稳定,但越接近确诊为肺癌的时间点,miRNA的表达谱变化越明显。

此外,Boeri等^[6]将血浆miRNA与螺旋CT对肺癌的早期诊断进行了对比。研究者使用螺旋CT对吸烟者进行了肺癌筛查,并且收集了确诊为肺癌时以及确诊为肺癌之前的血浆。发现当螺旋CT未报告异常时,使用血浆miRNA对肺癌进行诊断,敏感度和特异度分别为80%和90%。而当螺旋CT报告异常时,血浆miRNA对肺癌诊断的敏感度和特异度达到75%和100%,研究还发现某些血浆miRNA与肺癌患者的预后相关。

Chen等^[4]报道使用10种血清miRNA联合诊断NSCLC的敏感度和特异度分别达到93%和90%。为了获得血清中差异表达的miRNA,研究者使用实时荧光定量RT-PCR技术检测了200例NSCLC患者和110位健康志愿者血清中的miRNA,筛选出10种miRNA,并在另外200例NSCLC患者和110位健康志愿者中对这些血清miRNA的表达差异情况进行了验证。发现使用这10种miRNA联合诊断NSCLC的敏感度和特异度分别为93%和90%。此外他们还使用这10种血清miRNA在2,000名体检者中进行了NSCLC筛查,发现使用这10种血清miRNA对NSCLC进行筛查,可以得到较好的检出率。

此外,Foss等^[23]报道血清miR-1254和miR-574-5p可以用于早期NSCLC的诊断,研究者使用芯片技术检测了11例NSCLC患者和11位健康志愿者的血清miRNA表达谱,发现有4种miRNA的差异表达倍数达到了1.54倍。然后在另外的22例NSCLC患者和31位健康志愿者中对这种差异表达情况进行了验证。发现血清miR-1254和miR-574-5p联合诊断早期NSCLC的价值最高,敏感度和特异度达到73%和71%。另外Shen等^[20]也报道了血浆miRNA-21、miRNA-126、miRNA-210、miRNA-486-5p可以联合诊断I期NSCLC。他们通过测定早期肺癌组织中的miRNA表达谱明确了12种miRNA与早期NSCLC有关,然后在28例I期NSCLC患者的肺癌组织和血浆中对这些miRNA进行了筛选,并在另外58例NSCLC患者和29例健康志愿者的血浆中对筛选得到的miRNA进行了验证,发现这12种miRNA中有5种差异表达水平在血浆与肺癌组织中是一致的,并且通过Logistic回归模型进一步发现有4种miRNA

(miR-21、miR-126、miR-210、miR-486-5p)对诊断I期NSCLC的敏感度和特异度达到最高(分别为73.33%和96.55%),并且还发现这些miRNA诊断肺腺癌的敏感度(91.67%)明显高于肺鳞癌(82.35%)。

Wei等^[22]报道血浆miRNA-21可以作为NSCLC的诊断标记物,并且还发现血浆miRNA-21的表达水平与肺癌的TNM分期相关,在T3-T4患者血浆中miRNA-21的表达水平高于T1-T2患者,III期-IV期患者的表达水平高于I期-II期患者的表达水平。使用血浆miRNA-21诊断NSCLC的敏感度和特异度分别为76.2%和70%。此外,还发现在使用以铂类药物为基础的化疗患者中,达到部分缓解的患者血浆中miRNA-21的表达水平明显低于达到稳定和进展患者的表达水平。

另外Roth等^[30]报道肺癌患者血清miRNA-10b、miRNA-34a、miRNA-141、miRNA-155的表达水平明显高于健康者,并且还发现肺癌患者血清miRNA-10b、miRNA-141、miRNA-155的表达水平高于肺部良性病变患者的表达水平,肺癌患者血清中miRNA-10b的高表达与肺癌的淋巴结转移相关。

4 问题与展望

综上所述,miRNA在血清/血浆中不仅可以稳定存在,并且可以耐受各种极端环境的影响。在其稳定性的基础上,利用它在肺癌患者和健康者中表达谱的不同,可以将肺癌患者筛选出来,以更早地诊断肺癌,降低肺癌的死亡率。但是目前看来,利用血清/血浆miRNA诊断肺癌还存在一个重要问题:血清/血浆中缺少合适的内参基因作为对照。对此已有学者提出疑问^[31],他们认为由于缺乏合适的内参基因作为对照,很可能造成实验组与对照组实验数据之间不具有可比性,因此利用血清/血浆中的miRNA诊断肺癌并不合适。此外,由于目前文献报道的用于抽提miRNA的血清/血浆量的不同以及抽提方法和定量方法的不同,造成了相关文献报道的用于诊断肺癌的miRNA不同。因此在后续的研究中希望可以找出合适的内参基因作为对照,并建立起使用血清/血浆miRNA诊断肺癌的标准化程序,促进血清/血浆miRNA在肺癌诊断中的应用。

参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al.* Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.

- 2 Chen WQ, Zhang SW, Zou XN, *et al.* Estimation and projection of lung cancer incidence and mortality in China. *Chin J Lung Cancer*, 2010, 13(5): 488-493. [陈万青, 张思维, 邹小农, 等. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(5): 488-493.]
- 3 Ettinger DS, Akerley W, Bepler G, *et al.* Non-small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 2010, 8(7): 740-801.
- 4 Chen X, Hu Z, Wang W, *et al.* Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel non-invasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis. *Int J Cancer*, 2011. [Epub ahead of print].
- 5 Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE, *et al.* CT screening for lung cancer: five-year prospective experience. *Radiology*, 2005, 235(1): 259-265.
- 6 Boeri M, Verri C, Conte D, *et al.* MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(9): 3713-3718.
- 7 Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011, 80(2): 193-208.
- 8 Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, *et al.* Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 7223-7233.
- 9 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. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006.
- 10 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513-10518.
- 11 Ho AS, Huang X, Cao H, *et al.* Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer. *Transl Oncol*, 2010, 3(2): 109-113.
- 12 Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1): 13-21.
- 13 Huang Z, Huang D, Ni S, *et al.* Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2010, 127(1): 118-126.
- 14 Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3148.
- 15 Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, *et al.* Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(1): 42-46.
- 16 Chen TS, Lai RC, Lee MM, *et al.* Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(1): 215-224.
- 17 Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, *et al.* Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4722.
- 18 Wang K, Zhang S, Weber J, *et al.* Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(20): 7248-7259.
- 19 Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(12): 5003-5008.
- 20 Shen J, Todd NW, Zhang H, *et al.* Plasma microRNAs as potential biomark-

- ers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest*, 2011, 91(4): 579-587.
- 21 Wang J, Chen J, Chang P, *et al.* MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009, 2(9): 807-813.
- 22 Wei J, Gao W, Zhu CJ, *et al.* Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer*, 2011, 30(6): 407-414.
- 23 Foss KM, Sima C, Ugolini D, *et al.* miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(3): 482-488.
- 24 Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, *et al.* Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 2010, 50(4): 298-301.
- 25 Pall GS, Hamilton AJ. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1077-1084.
- 26 Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- 27 Jamnikar Ciglenecki U, Grom J, Toplak I, *et al.* Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes. *J Virol Methods*, 2008, 147(2): 257-264.
- 28 Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, *et al.* Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*, 2008, 44(1): 3-12.
- 29 Keller A, Leidinger P, Gislefoss R, *et al.* Stable serum miRNA profiles as potential tool for non-invasive lung cancer diagnosis. *RNA Biol*, 2011, 8(3): 506-516.
- 30 Roth C, Kasimir-Bauer S, Pantel K, *et al.* Screening for circulating nucleic acids and caspase activity in the peripheral blood as potential diagnostic tools in lung cancer. *Mol Oncol*, 2011, 5(3): 281-291.
- 31 Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. Circulating miRNA signatures: promising prognostic tools for cancer. *J Clin Oncol*, 2010, 28(29): e573-e574.
- (收稿: 2011-10-07 修回: 2011-11-23)
(本文编辑 孙丹)

• 消息 •

2012年第3届欧洲肺癌大会 (ELCC) 会议通知

本次会议是有关医疗肿瘤学家, 放射治疗, 胸外科, 呼吸医生和其他医生参与和诊断的, 用于治疗肺癌患者的行动, 是在肺癌和胸部恶性肿瘤顶尖学术专家组织的。本次会议的学习目标就是为了有效的分析和解释新的临床数据的提供; 为了评估生物标志物、特定的基因突变, 能够起到对肺癌患者全身治疗的最佳治疗策略发展病理因素的作用。

会展名称: 2012年第3届欧洲肺癌大会 (ELCC)

布展时间: 2012年4月17日

展览时间: 2012年4月18日-2012年4月21日

撤展时间: 2012年4月22日

所在地址: 瑞士 日内瓦