

- torovaginoplasty in severely masculinized females with female pseudohermaphrodites[J]. J Urol, 1989, 142(2): 565-568.
- [19] Arianna L. Sexual function in adult life following passerini-glazel feminizing genitoplasty in patients with congenital adrenal hyperplasia[J]. J Urol, 2013, 191(1): 206-211.
- [20] Snyder HM. Feminizing genitoplasty: a proven technique[J]. J Craniofac Surg, 2013, 24(1): 41-43.
- [21] Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, et al. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson wilkins pediatric endocrine society and the European society for paediatric endocrinology[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(9): 408-453.
- [22] Lesma A, Boccardi A, Montorsi F, et al. Early feminizing genitoplasty: sexual function in adult life[J]. Abstract Urol, 2008, 4(suppl 1): 24-26.
- [23] Rigamonti W. Late revisions and outcomes of early passerini-glazel single stage clitorovaginoplasty. Presented at the international meeting on anomalies of sex differentiation[J]. Rome, 2006, 4: 24-26.
- [24] Lean WL, Deshpande A, Hutson J, et al. Cosmetic and anatomic outcomes after feminizing surgery for ambiguous genitalia [J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(12): 1856-1860.
- [25] Ricardo G, Barbara M. Ludwikowski should the genitoplasty of girls with CAH be done in one or two stages[J]. Front Pediatr, 2014, 10(1): 54-57.
- [26] Guarino N, Scommegna S, Majore S, et al. Vaginoplasty for disorders of sex development[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2013, 11(4): 29-33.
- [27] Baskin LS, Erol A, Li YW, et al. Anatomical studies of the human clitoris[J]. J Urol, 1999, 162(3): 1015-1020.
- [28] Creighton S, Minto C, Steele S. Objective cosmetic and anatomical outcomes at adolescence of feminizing surgery for ambiguous genitalia done in childhood[J]. Lancet, 2001, 358(14): 124-125.
- [29] Daniela G. Late prenatal dexamethasone and phenotype variations in 46, XX CAH: Concerns about current protocols and benefits for surgical procedures[J]. J Pediatr Urol, 2014, 10(5): 1-7.
- [30] Kregel S, Walz KH, Hauffa BP, et al. Long-term follow-up of female patients with congenital adrenal hyperplasia from 21-hydroxylase deficiency, with special emphasis on the results of vaginoplasty[J]. BJU Int, 2000, 86(3): 253-259.
- [31] Sarah M. Childhood surgery for ambiguous genitalia: glimpses of practice changes or more of the same[J]. Psych Sex, 2014, 5(1): 34-43.
- [32] Lina M. Practice changes in childhood surgery for ambiguous genitalia[J]. J Pediatr Urol, 2014, 10(5): 934-939.
- [33] Gastaud F, Bouvattier C, Bouvattier D, et al. Impaired sexual and reproductive outcomes in women with classical forms of congenital adrenal hyperplasia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(4): 1391-1396.
- [34] Anna N. Adult women with 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia, surgical and psychological aspects[J]. Curr Opin Pediatr, 2011, 23(4): 436-442.
- [35] Piaggio L. Congenital adrenal hyperplasia: review from surgeon's perspective in the beginning of the 21st. century[J]. Front Pediatr, 2014, 1(2): 50-53.
- [36] Crouch NS, Liao LM, Woodhouse CRJ, et al. Sexual function and genital sensitivity following feminizing genitoplasty for congenital adrenal hyperplasia[J]. J Urol, 2008, 179(2): 634-638.

(收稿日期: 2015-02-25 修回日期: 2015-03-15)

• 综 述 •

JWA 基因的研究进展

徐丽娟, 李 进 综述, 高 勇[△]审校(南京医科大学附属淮安第一医院肿瘤内科, 江苏淮安 223300)

【关键词】 JWA 基因; 恶性肿瘤; 细胞分化; 血管形成; 耐药

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 18. 067 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)18-2795-04

JWA 基因参与了细胞分化凋亡调控、氨基酸代谢、细胞骨架形成、DNA 损伤与修复、氧化应激等多种功能的调控, 研究显示 JWA 基因与恶性肿瘤发生、发展、预后等密切相关, 近期还发现 JWA 基因还参与了肿瘤血管生成、耐药等, 本文将对 JWA 基因作用及在恶性肿瘤中的研究现状进行综述。

1 JWA 基因和蛋白

JWA 基因是由周建伟教授 1998 年分离克隆的一个受维甲酸(RA)诱导的与细胞分化调节有关的细胞骨架样基因。JWA 基因定位 3p14, 3 个外显子和 2 个内含子, JWA 启动子

区含有多种顺式反应元件(应激反应元件、佛波酯反应元件、高铁血红蛋白反应元件和热休克反应元件等), 参与细胞对多种环境理化因素的应答反应^[1]。JWA 基因存在多个单核苷酸多态性(SNPs)位点, SNPs 位点可能影响 JWA 基因对各种环境刺激产生的应答反应, 对 DNA 损伤和修复过程产生负面效应, 最终引发肿瘤的产生^[2]。JWA 基因编码蛋白 188 个氨基酸, 相对分子质量为 21.5×10^3 。该编码蛋白为 3 次跨膜蛋白, 膜外侧有 2 个丝氨酸残基的蛋白激酶 C(PKC)磷酸化位点(SDR-SLR)。JWA 蛋白在细胞内与 α 、 β 微管蛋白结合, 在微

[△] 通讯作者, E-mail: hayy_gy@163.com。

管聚合和解聚过程中与微管蛋白在胞内分布平行,对微管的稳定和运动有调节作用,参与细胞有丝分裂。JWA 蛋白是细胞内氨基酸总量的一种重要负性调节蛋白,选择性地调节细胞内谷氨酸和牛磺酸水平,对细胞内氨基酸平衡起调节作用^[2-3]。

2 JWA 与细胞分化

JWA 编码蛋白广泛存在于多种组织、器官中,参与多种分化凋亡诱导剂涉及的信号通路,参与细胞对应激刺激的应答, JWA 蛋白在肿瘤细胞与非肿瘤细胞,高分化与低分化癌表达呈现明显差异, JWA 蛋白表达与肿瘤细胞分化程度有关^[4]。夏薇等^[4]在体外试验研究中提示,以佛波酯 TPA、ATRA 处理 K562 细胞株, JWA 基因表达呈反向变化,提示细胞恶性转化可能影响了 JWA 基因涉及的信号通路,即 JWA 基因参与细胞分化和凋亡的调控。沈群等^[5]在体外以 ATRA、AraC 及 TPA 诱导 HL-60 细胞,发现细胞向粒、单核、巨噬细胞样分化。分化剂阻止细胞进入 S 期,抑制增殖,促进分化。分析 JWA 基因表达发现 JWA 在 mRNA 及蛋白水平上均呈时间依赖性增加,认为诱导剂通过 TRE 和 RARE 直接调节 JWA 基因参与细胞分化和凋亡的共同信号途径。临床研究在白血病发病初期, JWA 基因对诱导分化剂不敏感,而经 ATRA 治疗 10 d 后, JWA 基因转录抑制,提示 HL60 细胞与原代白血病细胞在诱导分化机制方面可能不尽相同。热休克蛋白(Hsp)参与细胞生长、发育、分化和应激等,其中 Hsp70 与白血病细胞增殖分化有关。茆文革等^[6]使用多种分化诱导剂建立 K562 细胞诱导分化和热应激模型,检测 JWA、Hsp70、热休克转录因子(HSF1)、HSF2 蛋白表达水平,发现 JWA、Hsp70 蛋白表达水平增加,且变化趋势相似。朱婷等^[7]用 H₂O₂ 建立 K562 细胞损伤和凋亡模型,不同时间检测 K562 细胞中 JWA 蛋白、P53 蛋白、热休克蛋白的表达水平,结果在细胞损伤和凋亡中各蛋白表达都增高, JWA 基因活跃地参与了 H₂O₂ 诱导 K562 细胞氧化损伤应激和凋亡的信号通路。研究 HeLa 和 MCF-7 细胞发现 JWA 高表达促进微管聚合,增加细胞对 As₂O₃ 敏感性,通过 RNA 干扰 JWA 可以通过 p38 MAPK 通路抑制 As₂O₃ 诱导凋亡和微管聚集^[8]。这些表明证据均表明 JWA 参与多种诱导分化剂的调控,参与细胞分化、凋亡、氧化应激。

JWA 编码蛋白中有 2 个含丝氨酸残基的蛋白激酶(PKC)磷酸化位点(SDR-SLR),叶健等^[9]通过构建了含有这 2 个磷酸化位点突变的 JWA 表达载体转染 MCF-7 细胞,发现 TPA 诱导 MCF-7 细胞分化不是通过 JWA 蛋白 PKC 位点磷酸化实现的。随后研究证实 TPA 的抗细胞增殖至少部分是通过 PKC 激活 MAPK 信号通路促进 p21 合成,诱导细胞周期停滞、生长抑制及细胞分化, JWA 下调能抑制 MAPK/ERK 的磷酸化,提示 JWA 调控细胞分化的机制涉及 MAPK 信号通路。

常城等^[10]通过分离培养临床急性早幼粒细胞白血病(APL)患者全反式维甲酸(ATRA)治疗前后骨髓间充质干细胞(BMSC),检测 BMSC 黏附能力, ICAM-1、FN 表达及 JWA mRNA 表达。发现 ATRA 治疗后, JWA 上调表达影响患者 BMSC 黏附能力、黏附分子表达。认为 ATRA 至少部分通过上调 JWA 基因表达,介导的细胞分化和增殖改变,增强 BMSCs 功能。研究还发现 JWA 在细胞恶性转化中起到类似抑癌基因的作用,可能通过对突变型 P53 表达的下调来抑制细胞向恶性肿瘤细胞方向转变^[11]。

3 JWA 与肿瘤易感性

JWA 基因的 SNPs 与多种肿瘤发生相关。研究已发现,该基因多态性与中国汉族人群患膀胱癌、胃癌和食管癌、白血病等多种恶性肿瘤的危险性有关。其中 JWA 启动子

(-76G/C)与消化道肿瘤易感性显著相关,对 202 例消化道肿瘤患者外周血淋巴细胞基因组 DNA 标本检测发现 JWA 启动子-76G/C 变异时罹患消化道肿瘤的危险性增加,外显子 723T/G 多态性在消化道肿瘤患者和健康人群中无明显差异^[2,12]。对 93 例食管癌患者的 JWA 基因 G723T 多态性研究认为,与 T/T 基因型相比 T/G 和 G/G 型食管癌发生率增高,提示 JWA G723T 多态性与食管癌易感性有关^[13]。研究 202 例白血病患者 JWA 外显子 2 454 位点 c/A 多态性发现,与 454CC 型相比,表达为 454CA、AA、CA+AA 型发生白血病的风险增高,即 JWA 外显子 2 454 位点 c/A 多态性与白血病发生密切相关^[14]。而在 107 例胃癌标本发现 JWA G723T 多态性与胃癌易感性无明显相关性^[15]。

4 JWA 与肿瘤血管生成

以往研究认为 JWA 通过在 MAPK 信号通路以及肌动蛋白丝的重组过程抑制肿瘤迁移和转移,近期研究认为 JWA 还具有抑制肿瘤血管生成作用^[1,3]。肿瘤血管生成是恶性肿瘤发生浸润及转移的重要基础,多种信号分子及信号通路参与该过程。整合素连接激酶 ILK 是一种 Ser/Thr 蛋白激酶,能够通过与整合素 β_1 亚单位的结合介导细胞与胞外基质的连接,依赖 PI3K 的方式激活,使胞外信号得以向下游传递。研究认为 ILK 通过 NF- κ B/IL-6/STAT3/VEGF 通路促进黑色素瘤血管生成^[16]。

Bai 等^[17]研究黑色素瘤发现 JWA 可能通过转录因子 Sp1 调节整合素 α V β_3 ,抑制整合素相关激酶(ILK)信号通路活化,抑制黑色素瘤血管生成。试验构建 shJWA 质粒转染黑色素瘤细胞株,研究 JWA、ILK、整合素 α V β_3 蛋白及基因表达,发现 JWA 高表达伴有 ILK 和整合素 α V β_3 低表达, JWA 低表达另两者高表达, JWA 可以调节 ILK 表达,反之不能,说明 JWA 为 ILK 上游信号。整合素 α V β_3 通过促进 ILK 基因转录上调 ILK 表达, RNA 干扰沉默整合素 α V β_3 后, JWA 不能调节 ILK 表达。说明 JWA 通过整合素 α V β_3 调节 ILK 表达。以往研究认为, ILK 通过 NF- κ B/IL-6/STAT3/VEGF 通路促进黑色素瘤血管生成,但在该研究中发现 JWA 高表达抑制了 pIKB α 、p50、pSTAT3、VEGF 和 IL-6 蛋白表达, ILK 增加了这些蛋白表达, ILK 仅部分中和 JWA 导致的蛋白抑制^[16]。说明 JWA 可以通过 ILK 调节 NF- κ B/IL-6/STAT3/VEGF 通路,还存在其他调节方式。在对 370 例黑色素瘤患者随访中发现, JWA 是预后独立预测因素, JWA 高表达患者分期早, 5 年生存率高^[17]。有学者还发现在黑色素瘤中 JWA 参与了 ING4 抑制肿瘤血管生成过程, ING4 活化 JWA 启动子,促进 JWA 表达,且 JWA 表达水平与肿瘤的临床病理分期和预后相关^[18-19]。

Chen 等^[19]构建 pEGFP-C1-AsJWA 质粒转染胃癌细胞株模型,检测 JWA、MMP-2、MVD、Sp1 甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因和蛋白表达,发现胃癌组织中 JWA 表达抑制, MMP-2 和微血管密度(MVD)表达增高, JWA 和 MMP-2 表达负相关。沉默 JWA 表达可以诱导脐静脉内皮细胞血管形成,而抑制 MMP-2 表达可以抑制这一作用,提示 JWA 是通过 MMP-2 影响血管生成。对 82 例胃癌患者随访发现, MMP-2 低表达 JWA 高表达患者 5 年生存率最高, MMP-2 高表达 JWA 低表达预后最差。Sp1 是 MMP-2 转录因子,研究中发现抑制 JWA 上调 Sp1 表达, JWA 过表达抑制 Sp1 表达。电泳迁移实验证实,沉默 JWA 增加了 Sp1 的 DNA 结合能力,随后发现 JWA 不影响 Sp1 mRNA 表达,可能影响蛋白翻译后的稳定性负性调节 Sp1 蛋白表达水平。通过使用蛋白酶抑制剂证实 JWA 通过泛素蛋白酶通路抑制转录因子 Sp1 活性,抑制基质

金属蛋白酶 MMP-2 表达,抑制肿瘤血管生成。

5 JWA 与 DNA 损伤修复

Wang 等^[20]在氧化应激条件下,通过彗星试验证实 JWA 参与 DNA 链断裂修复,通过抑制 JWA 表达可以抑制 DNA 链再聚合,增加细胞对氧化应激的敏感性。细胞在氧化应急条件下导致内源性 H₂O₂ 释放, H₂O₂ 刺激 NF1 与 JWA 启动子结合,促进 JWA 转录和翻译,活化的 JWA 通过调节 E2F1 的表达激活 MAPK 信号通路,上调 XRCC1 表达, XRCC1 将 JWA 从胞质转运至胞核, JWA 抑制 XRCC1 泛素化,调节和稳定核 XRCC1 的功能,参与碱基切除修复 BER 和 DNA 单链损伤修复 SSBR。

Gong 等^[21]使用敲除 JWA 基因的小鼠构建化学物质致癌物 DMBA/TPA 诱导皮肤肿瘤的动物模型,发现敲除 JWA 基因小鼠皮肤肿瘤发生受到抑制, JWA 的缺失增加了 DMBA 诱导表皮细胞 DNA 损伤,抑制了 TPA 诱导的 MEK-ERK-MAPK 信号通路活化,以及细胞增殖和皮肤乳头状瘤的形成。这些证据提示 JWA 可能是 DNA 切除修复过程中不可或缺的信号分子。

6 JWA 与耐药

有报道,在人绒毛膜癌、乳腺癌、黑色素瘤、胃癌等多种肿瘤细胞中敲减 JWA 的表达后, P-糖蛋白(P-gp)表达上调^[22]。研究发现 JWA 敲减模型细胞中多药耐药基因(MDR1) mRNA、环氧化酶-2(COX-2)及 P-gp 表达水平上调。siRNA 可有效干涉 MDRI 表达,但不影响 JWA 表达水平。采用 siRNA 干涉 COX-2 的表达后, P-gp 的表达水平下调,认为 COX-2 是介于 JWA 和 P-gp 之间的分子, JWA 可通过 COX-2 调节 P-gp 的表达影响胃癌细胞的多药耐药性。Wang 等^[23]对 102 例胃癌病例研究发现 JWA 低表达的胃癌患者临床病理恶性程度高分期晚,生存时间短,但对化疗更敏感。汤唯艳等^[24]研究 64 例晚期胃癌患者化疗前检测 723 和 454 基因型,予含紫杉类药物方案治疗,观察化疗疗效与 723 和 454 位点多态性的关系。与 723TT 基因型相比,携带 723TG/GG 基因型者疗效好, 454A>C 多态性与疗效无关。认为 JWA 基因 723T>G 多态性位点与晚期胃癌对紫杉类药物的化疗疗效相关性有关联,提示 JWA 多态性可能成为预测胃癌化疗疗效的指标之一。有学者对 709 例胃癌术后患者研究中发现 FAK 高表达 JWA 低表达胃癌患者预后差, JWA 低表达患者可以从含顺铂化疗方案中获益^[25]。

7 展 望

尽管相关研究阐述了 JWA 基因通过多条信号通路参与了细胞功能的调控,但由于信号通路中 Cross-talk 存在,其在相关信号通路上的具体作用和调节机制仍有待进一步阐明。最近研究证据表明 JWA 具有参与调控血管生成,影响耐药等作用, JWA 是否能成为肿瘤治疗的新靶点,需要进一步深入的研究。

参考文献

- [1] 何正梅,陶善东,邓媛,等. JWA 在急性髓系白血病中的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(12): 1912-1915.
- [2] 汤唯艳,缪珩,李春平,等. JWA 基因多态性与消化道肿瘤易感性关系的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2006, 26(8): 640-644.
- [3] 陈海蓉,李爱群,李爱萍,等. JWA 蛋白与 α 微管蛋白结合和对微管稳定性的调节[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2004, 24(5): 519-521.

- [4] 夏薇,周建伟,曹海霞,等. JWA 参与调控细胞分化的结构和功能[J]. 科学通报, 2001, 46(9): 734-738.
- [5] 沈群,周建伟,盛瑞兰,等. JWA 基因在 HL-60 细胞定向分化中的表达及意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(5): 804-808.
- [6] 茆文革,李爱萍,叶健,等. 诱导分化剂和热应激对 K562 细胞 JWA 和热应激蛋白 70 表达的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21(4): 253-256.
- [7] 朱婷,李爱萍,刘起展,等. 过氧化氢处理 K562 细胞中 JWA 基因的表达及其与 DNA 损伤和凋亡的关系[J]. 中华预防医学杂志, 2005, 39(3): 182-186.
- [8] Shen LL, Xu WX, Li AP, et al. JWA enhances As₂O₃-induced tubulin polymerization and apoptosis via p38 in HeLa and MCF-7 cells [J]. Apoptosis, 2011, 16(11): 1177-1193.
- [9] 叶健,李爱萍,秋雯,等. JWA 编码区 PKC 磷酸化位点突变对佛波酯诱导 MCF-7 细胞分化的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(7): 398-401.
- [10] 常城,陆俊羽,孔佩艳,等. 全反式维甲酸对急性白血病骨髓基质细胞 JWA 基因表达及黏附功能的影响[J]. 西部医学, 2010, 22(7): 1186-1190.
- [11] Liu X, Wang S, Xia X, et al. Synergistic role between p53 and JWA: prognostic and predictive biomarkers in gastric cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52348.
- [12] 汤唯艳,缪珩,李春平,等. JWA 基因多态性与消化道肿瘤易感性关系的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2006, 26(8): 640-644.
- [13] 王卓,高长明,丁建华,等. JWAG723T 多态性与食管癌易感性[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2011, 3(2): 96-98.
- [14] Zhu YJ, Li CP, Tang WY, et al. Single nucleotide polymorphism of the JWA gene is associated with risk of leukemia: a case-control study in a Chinese population[J]. J Toxicol Environ Health A, 2007, 70(11): 895-900.
- [15] 王卓,高长明,吴建中,等. JWA G723T 多态性与胃癌易感性[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2012, 4(3): 148-150.
- [16] Lu J, Tang Y, Cheng Y, et al. JWA inhibits melanoma angiogenesis by suppressing ILK signaling and is an independent prognostic biomarker for melanoma[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(12): 2778-2788.
- [17] Bai J, Zhang J, Wu J, et al. JWA regulates melanoma metastasis by integrin α V β 3 signaling[J]. Oncogene, 2010, 29(8): 1227-1237.
- [18] Lu J, Tang Y, Cheng Y, et al. ING4 regulates JWA in angiogenesis and their prognostic value in melanoma patients[J]. Br J Cancer, 2013, 109(11): 2842-2852.
- [19] Chen Y, Huang Y, Huang Y, et al. JWA suppresses tumor angiogenesis via Sp1-activated matrix metalloproteinase-2 and its prognostic significance in human gastric cancer[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(2): 442-451.
- [20] Wang S, Gong Z, Chen R, et al. JWA regulates XRCC1 and functions as a novel base excision repair protein in oxidative-stress-induced DNA single-strand breaks [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(6): 1936-1950.
- [21] Gong ZL, Shi Y, Zhu Z, et al. JWA deficiency suppresses dimethylbenz[a]anthracene-phorbol ester induced skin

papillomas via inactivation of MAPK pathway in mice [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34154.

[22] 周健, 谈永飞, 葛志军, 等. 食管鳞癌组织中 JWA、FAK 表达变化及其与淋巴结转移的关系 [J]. 山东医药, 2011, 51(38): 16-17.

[23] Wang S, Wu X, Chen Y, et al. Prognostic and predictive role of JWA and XRCC1 expressions in gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(10): 2987-2996.

[24] 汤唯艳, 宋雪, 朱立伟, 等. JWA 基因多态性与紫杉类药物

物对晚期胃癌化疗疗效相关性的研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(23): 12-14.

[25] Chen Y, Xia X, Wang S, et al. High FAK combined with low JWA expression: clinical prognostic and predictive role for adjuvant fluorouracil-leucovorin-oxaliplatin treatment in resectable gastric cancer patients [J]. J Gastroenterol, 2013, 48(9): 1034-1044.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-04-21)

• 综 述 •

尿液中检测循环 miRNA 的研究进展

易浔飞 综述, 钟秋蓉 审校 (南京军区福州总医院全军临床检验医学研究所, 福州 350025)

【关键词】 miRNA; 尿液; 生物标志物
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.18.068 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)18-2798-04

MicroRNA(miRNA)是一类进化上保守的非编码小分子 RNA, 作为基因的内源性调节物, 可与特异的 mRNA 的 3' 非翻译区结合, 诱导 mRNA 降解干扰蛋白质合成或抑制翻译。目前已在人体的胞外环境确认了一系列 miRNA, 发现 miRNA 可由细胞和组织释放入循环系统, 稳定存在于血清、血浆、尿液和其他体液中, 可作为多种疾病和组织损伤的非侵入性生物标志物。本文总结了检测尿液中循环 miRNA 用于多种疾病筛查、诊断、分期的相关进展。

1 尿液循环 miRNA 检测的研究基础

人体内估计超过 1/3 的细胞转录组受 miRNA 调节, 虽然数目相对不多(少于 2 000 种), 但在常见的组织和体液中 miRNA 有很高的稳定性, miRNA 表达增殖的潜力可准确辅助定量分析与分散的组织类型和疾病状态有定位关系的 miRNA, 从而作为一个诊断新工具。

有研究认为外泌体是转运 miRNA 的细胞结构基础, 外泌体是纳米级别的细胞单层膜结构, 可由机体多种类型细胞释放, 并广泛分布于唾液、血浆、乳汁、尿液等体液中。外泌体可携带多种 mRNA、miRNA、蛋白质, 参与细胞间通讯, 重启免疫系统, 血管新生、肿瘤细胞生长等过程。在肿瘤或疾病中, 这些分子都可以作为生物标志物^[1]。miRNA 也是重要的调节分子, 涉及细胞生长全过程, 如时序发育、干细胞分化和凋亡, 可作为一种“肿瘤信号”^[2]。

研究显示 miRNA 在病理发展中会快速从组织中释放入血, 在血清、血浆、唾液和尿液中, 这些胞外 miRNA 与肿瘤的不同病理状态有关。Weber 等^[3]检测了 12 种来自于不同阶段怀孕妇女和不同泌尿道上皮细胞肿瘤患者的体液和尿液标本中的 miRNA, 应用定量 PCR 对这些体液中的 miRNA 做广谱分析。结果显示 miRNA 在所有体液中均存在, 在不同体液中构成比明显不同, 一些高水平的 miRNA 在多种体液中表达相同, 而一些 miRNA 在特定体液中富集, 还观察到不同生理状态的尿液标本具有独特的 miRNA 模式。提示使用特定 miRNA 水平可用作检测和监测不同病理生理学状态。

细胞坏死和凋亡过程产生的 miRNA 片段会大量释放到尿液中, 且尿液在临床上容易大量获得, 所含蛋白也比血液标本少, 所以 RNA 预处理和后续检测时蛋白干扰也较低。19~25 个核苷酸长度的 miRNA 可对抗核酶的降解而更加稳定, 敏

感性和特异性上都优于现有标志物^[4]。

2 尿液循环 miRNA 与泌尿系统肿瘤

miRNA 已经证实与一些肿瘤细胞增殖有关, 出现一类新级别的癌基因或是抑癌基因时多表现为异常表达。通过检测 miRNA 可确定肿瘤的分化程度, 特别是对低分化肿瘤分期的准确性高于以往的 mRNA 分期^[5]。

目前膀胱癌的诊断“金标准”是膀胱镜检, 但具有一定损伤和相对昂贵, 而普通的尿液镜检对低分化膀胱癌的敏感性较差。Yamada 等^[6]结合 miR-96、miR-183 与尿液镜检对膀胱癌患者标本进行了队列研究, 除发现 miRNA 上调, 两者联合检测从 78 例膀胱癌中诊断出 61 例, 敏感性从 43.9% 提升到 78.2%。还发现 miR-96 和 miR-183 表达量增加与肿瘤进展级别和病理分期同步, 在术后尿液中两者表达水平降低, 提示这两种 miRNA 可作为膀胱癌的标志物, miR-96 结合尿液镜检也可成为一个很好的诊断指标。另外应用数学预测模型优化尿液 miRNA 的结果分析也显示了比镜检显著改进的诊断正确度^[2]。另外常规保存的尿液细胞涂片也能用于 miRNA 表达谱分析, Simonato 等^[7]使用 qRT-PCR 在常规尿液细胞涂片中分析 miR-145、miR-20 所选的涂片标本均可抽提到满意的总 RNA, 而 20 ng 总 RNA 就可用于 miRNA 表达谱分析。结果提示, 膀胱癌患者标本中的 miR-145、miR-205 显著下调。

检测尿液中 RNA 类的肿瘤标志物还可以用于诊断其他泌尿系统的实体肿瘤, 而且这类循环 miRNA 的独特表达模式与特定的疾病相关, 特别是早期阶段, 其高特异性和敏感性的潜能可用于肿瘤分期和早期预测^[8]。Bryant 等^[9]使用含有 742 个 miRNA 的 Exiqon qRT-PCR 芯片分析了 78 例前列腺癌患者和 28 例健康对照血清标本, 确定了 12 个表达量差异的 miRNA。进而检测 135 份健康人与前列腺癌患者尿液标本中 5 个选定的 miRNA, 发现肿瘤患者尿液中 miR-107 和 miR-574-3p 水平显著高于健康对照, 均可诊断出前列腺癌患者, 并且准确性高于检测尿液前列腺特异性抗原(PSA)。Hanke 等^[10]建立了一种对尿液标本中小相对分子质量的 RNA 进行预处理和分子检测技术, 用于非侵入性的诊断泌尿道上皮膀胱癌。提取了来源于膀胱癌患者(低分化组和高分化组)和健康志愿者尿液标本中的小相对分子质量 RNA, 使用定量 RT-PCR 检测了 157 种 miRNA, 发现利用 miRNA-126/miRNA-152 的比值