

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.16.040

microRNA 作为传染性疾病标志物的研究进展 *

张少波¹ 谢伟东^{2△} 顾大勇³ 林裕龙¹ 许乃寒² 张雅鸥²

(1 南方医科大学 广东 广州 510282; 2 清华大学深圳研究生院生命与健康学部 广东 深圳 518055;

3 深圳市检验检疫科学研究院 广东 深圳 518033)

摘要: 传染性疾病往往具有较大的传染性,易于大面积流行,且难以控制,严重危害人们生命健康,快速准确的筛查成为预防及控制其传播的重要手段之一。MicroRNA(miRNA)是一类长度仅有约 22nt 的非编码单链微小 RNA,广泛存在于动植物真核细胞中,主要通过与靶 mRNA 分子的 3' 端非编码区域(3'-untranslated region, 3'UTR)完全或不完全互补配对,调控该 mRNA 分子的表达或转录后翻译;在细胞生长、发育、凋亡,肿瘤形成,病毒感染等多种生理病理过程中起重要作用。在病毒感染时,miRNA 调控病毒与宿主之间的相互作用,影响病毒感染的进程与结局;感兴趣的是,miRNA 其自身的表达对病毒感染具有一定的特异性。因此,miRNA 有望成为筛查病毒传染性疾病的临床标志物,目前已成为一热点研究领域。本文主要从循环体液中 miRNA 的稳定性,miRNA 在病毒感染中的特异性表达,以及 miRNA 检测技术方面做简要综述,并对 miRNA 作为传染病一种新型检测标志物的可行性进行了初步的分析。

关键词: microRNA; 传染性疾病; 病毒; 标志物; 检测技术

中图分类号: R446.5; R51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)16-3158-07

MicroRNAs as Biomarkers of Infectious Diseases*

ZHANG Shao-bo¹, XIE Wei-dong^{2△}, GU Da-yong³, LIN Yu-long¹, XU Nai-han², ZHANG Ya-ou²

(1 Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510282, China; 2 Life and Health Department, Graduate School of Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China; 3 Shenzhen Inspection and Quarantine Institution, Shenzhen, Guangdong, 518033, China)

ABSTRACT: Infectious diseases normally tend to have very strong infectivity, and be easy to widely spread in a large geographical area and difficult to control. Therefore, they cause serious harm to people's life and health. Rapid and accurate screening has become the urgent need for the prevention and control of their prevalence. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small noncoding RNAs (about 22 nucleotides, nt), commonly found in eukaryotic cells. MiRNAs play critical roles in a variety of physiological and pathological processes including cell growth, development and apoptosis, tumorigenesis and virus infection by regulating gene expression or post-transcriptional translation, which work by perfect or imperfect base pairing between short seed regions of miRNAs and 3' UTR of target mRNAs. During virus infection, miRNAs are documented to have crucial impact on the interaction between viruses and hosts. Interestingly, the specific expressions of miRNAs make them expected to become clinical markers for screening virus infectious diseases, which are emerging as a hot research field. This paper summarizes the stability of miRNAs in human body fluids, reviews the specificity of miRNAs expression in virus infection and the methods of miRNAs detection, and performs the feasibility analysis about miRNA as a group of novel and potential biomarkers of virus-related infectious diseases.

Key words: MicroRNAs; Infectious Diseases; Virus; Biomarkers; Detection Technology

Chinese Library Classification (CLC): R446.5; R51 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)16-3158-07

前言

microRNA 是一类长度约为 22 个核苷酸(nt)组成的非编码单链微小 RNA,最早发现于线虫中^[1]。miRNA 调控转录后基因的表达,在多种生理病理过程中起重要的调控作用,包括细胞生长、发育、凋亡,肿瘤形成,病毒感染等^[2]。miRNA 经典的作用机制是种子区域(seed region)与靶 mRNA 分子的 3' 端非编码

区域(3'-untranslated region, 3'UTR)互补,导致该靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译^[3]。miRNA 来源于细胞核内 miRNA 基因转录生成的非编码(non-coding) miRNA 前体转录本(pri-miRNA)。miRNA 前体(pre-miRNA)只有 70nt~80nt,是一类短的、不完全碱基配对的发夹结构,由含几百至几千个碱基的 pri-miRNA 片段所释放,该释放过程由 Drosha 介导;随后,由输出蛋白 5(exportin 5)转运进至细胞质中,经 Dicer 酶形成一个不完全的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373460,81072680);深圳市科技研发资金 - 深港协同创新资助(SGLH20121008144756945)

作者简介:张少波(1989-),男,硕士研究生,检验技师,主要研究方向:传染性疾病的标志物,电话:13590228117, E-mail:469263040@qq.com

△ 通讯作者:谢伟东,副教授,硕士生导师;电话:0755-26036086, E-mail:xiewdong@163.com

(收稿日期:2014-10-28 接受日期:2014-11-23)

RNA 双链二倍体, 最终与 Argonaute 蛋白家族一起组装为 RNA 诱导基因沉默复合体(RISC)^[3,4]。

目前关于 miRNA 的研究主要集中在癌症诊断、癌症分期以及疗效监测, 但近年来, miRNA 在病毒等传染性疾病中的作用越来越受到重视, 成为又一大研究热点。病毒入侵宿主, 病毒和宿主细胞基因均可编码 miRNA, 作用于宿主细胞和病毒, 导致一系列的病毒与宿主之间的相互作用, miRNA 对宿主免疫及病毒复制起着至关重要的作用; 图 1 表明了宿主或病毒编码 miRNA 与相应的宿主 mRNA 或病毒 RNA 之间的作用^[5,6]。

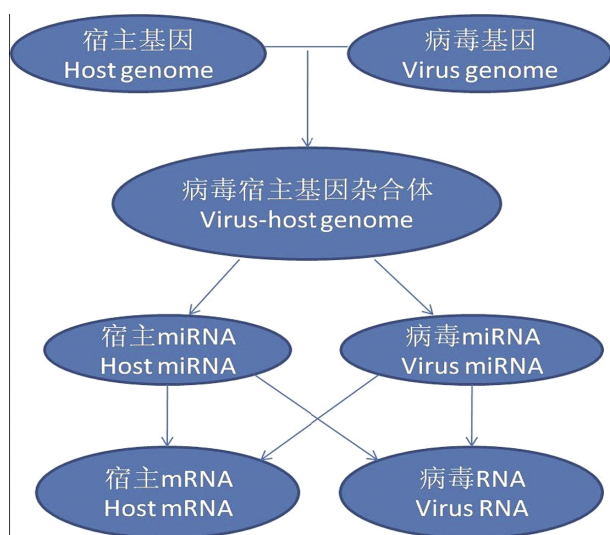


图 1 宿主细胞或病毒编码 miRNA 的作用(70%×)

Fig.1 Roles of miRNAs encoded by host cells or viruses

不仅如此, 一方面, miRNA 通过调节转录后基因表达调控宿主与病毒的相互作用; 但另一方面, miRNA 的自身表达也受到多种因素的调节, 致使 miRNA 在病毒感染中的时空特异性和病毒特异性表达, 这也为其作为病毒感染标志物提供了依据^[7,8]。作为临床检测标志物, 首先, 这个标志物是稳定的, 另外, 这个标志物应该是具有特异性, 最后, 这个标志物可以用相关的技术进行检测。在此, 本论文主要从 miRNA 稳定性, 病毒感染中的特异性表达, 以及 miRNA 检测技术方面做一综述, 以探讨其作为临床标志物的可行性。

1 miRNA 的稳定性

血清循环 miRNA 具有高度的稳定性。Mitchell 等分析血液中的循环 miRNA 分子的稳定性, 发现 miRNA 室温放置 24 h 和反复冻融 8 次仍保持稳定^[9]。甚至, miRNA 在干燥血斑中室温保存 5 个月或 37℃ 保存 4 个星期仍能够保持稳定^[10]。有研究表明, 血液循环 miRNA 大多不是以游离形式存在于血液中, 而是包裹于脂类、蛋白复合体、外核体或微小囊泡中, 因此可耐酸碱, 对抗 RNA 酶(RNase)降解, 解释了 miRNA 高度稳定性的本质^[11,12]。

此外, 其他体液中的 miRNA 也相当稳定。Mall 等将尿液标本分别放置在 4℃ 和室温 5 天, 并比较 -80℃ 冻融 10 次 miRNA 含量变化, 结果在各种实验条件下, 尿液 miRNA 有适量恒定的降解率, 含量相对稳定^[13]。人类乳汁中同样也存在 miRNA, 乳汁中的 miRNA 被证实也是以微泡包裹的形态存在; 这

些 miRNA 具有非常好的稳定性, 可耐受反复冻融、RNase 以及酸碱处理^[14,15]。可见, 一些特殊体液中 miRNA 与血液循环中 miRNA 一样可作为疾病发生、发展的重要标志物; 并且由于来源部位的关系, 可能对于某些特定部位的疾病更具相关性。

目前, 多种体液中的 miRNA 都被用于疾病的研究, 受到研究人员的广泛关注, 并取得了较大的进展, 研究表明 miRNA 在体液中是稳定的, 为我们实施常规临床监测提供了可能。

2 miRNA 在病毒感染中的特异性表达

病毒感染宿主过程中, 病毒与宿主之间相互作用可诱导 miRNA 的特异性表达, 近年来, 随着分子实验技术和生物信息学技术的不断发展, 各种病毒感染诱导的特异性 miRNA 的作用机理逐渐被人们认识, 构建病毒感染 miRNA 表达谱对于感染性疾病的筛查、治疗及疗效检测都具有深远意义。

2.1 肝炎病毒

2.1.1 丙肝病毒(HCV) HCV 感染引起人体内 miRNA 的异常表达及一些重要 miRNA 的功能已被证实。例如, 肝组织特异性高表达的 miR-122 可通过非经典作用方式靶向作用于丙肝病毒的 5' 非编码区, 促进丙肝病毒的复制^[16]; miRNA 对病毒复制的抑制同样受到研究者的关注, Pedersen 等研究则显示 miR-196 和 miR-296 可通过 IFN I 相关途径抑制 HCV 的复制^[17]; 同时, miR-199a 也被证实抑制 HCV 的复制^[18]。

对于循环 miRNA 在丙肝感染时的异常表达也进行了探索, Sidorkiewicz 等观察到 miR-155 前体在血清和外周血单核细胞中的表达量与 HCV RNA 存在密切相关, miR-155 前体高表达于含有 HCV RNA 的血清或外周血单核细胞中^[19]。另外, 有报道表明血清中 miR-134、miR-198、miR-320c 和 miR-483-5p 在不同个体和不同基因型丙肝病毒感染时均高表达, 可作为丙肝诊断的潜在标志物^[20]。但外周血中血清、血浆及单核细胞中的 miRNA 的相关性还比较模糊, 往往容易得出相悖的结论。

2.1.2 乙肝病毒(HBV) miRNA 也参与了 HBV 的复制: 有报道表明 miR-1 可通过多种途径促进 HBV 的复制^[21]; 肝内实验也表明 HBV 感染导致的 miR-122 低表达与 HBV 复制、病毒持续感染及癌变有关^[22]。

循环 miRNA 在诊断 HBV 感染性疾病方面同样具有巨大的潜力。Zhou 等采用基因芯片技术筛查大量 HBV 感染相关的肝癌、肝硬化患者, 建立了能够有效诊断早期肝细胞癌的血清 miRNA 平台^[23]; Chen 等首次证实了循环 miRNA 可作为隐匿性乙肝敏感而准确的标志, 他们研究了隐匿性乙肝的循环 miRNA 表达谱, 获得 4 个对于区分隐匿性乙肝和正常人具有高准确度的 miRNA^[24]; Winther 等通过筛选平均年龄小于 15 岁的慢性乙肝表面抗原阳性患者、表面抗原阴性及正常对照的血浆 miRNA, 发现并证明了 16 种 miRNA 异常表达, 且与 HBV-DNA 丰度有很强的正相关性^[25]。上述结果提示了建立适当的 miRNA 诊断平台对于临床隐匿性感染或疾病阶段性诊断具有重大意义。

2.2 艾滋病(HIV)

HIV 是一种感染人类免疫系统细胞的慢病毒(Lentivirus), 属反转录病毒的一种, 至今无有效治疗方法, miRNA 为人类攻克 HIV 提供了新的方向。有研究表明 miR-155 具有抵抗 HIV

感染的效应,有望成为治疗靶位^[26];同样,miR-326也能调控HIV在人类细胞中的复制^[27]。

循环miRNA的分析,一直是HIV感染的研究热点。Gupta等筛查HIV患者外周血单核细胞中miRNA的异常表达,首次证明了miRNA可以作为宿主细胞功能障碍的早期指标^[28]。Zhu等在HIV阳性全血中筛选出了56个异常表达的miRNA,为进一步研究HIV感染相关分子及感染的诊断打下基础^[29]。然而,全血中miRNA与外周血单核细胞中miRNA各自的来源尚不清楚,不能对结果做出确切的解释。Witwer等率先研究HIV-1感染的精英抑制(elite supressor,ES)与miRNA的表达关系,通过检测ES病毒血症的患者外周血单核细胞中miRNA的表达,发现体外实验已证明的抑制HIV-1的miRNA与病毒血症患者外周血病毒载量没有负性相关关系,外周血单核细胞中miRNA与组织中miRNA表达也有差异^[30]。尽管通过对miRNA在病毒感染过程中表达谱的筛查,得出很多有意义的结果,但由于实验条件、标本、操作等各种因素的影响,重复性还有待验证。

HIV-1感染人脑可导致HIV型脑膜炎,包括神经退行性病变,神经认知障碍。Noorbakhsh等通过对HIV脑膜炎患者的脑组织miRNA表达谱的分析,发现异常表达的miRNA可调控星形胶质细胞凋亡^[31]。Pacifi等第一次报道了HIV感染患者脑脊液miRNA的异常表达,在HIV脑膜炎患者脑脊液中,发现11种miRNA表达量显著升高,结果还需要进一步证明^[32]。

2.3 流感病毒(influenza virus)

流感病毒是属于正粘病毒科的RNA病毒,它会造成急性上呼吸道感染,并借由空气迅速的传播,引发周期性的大流行。前期研究工作中发现RNAi能够降解靶mRNA,进而抑制流感病毒的复制^[33]。Song等首次报道细胞内miRNA可通过降解流感病毒的基因,来调控病毒复制^[34]。随着研究的深入,各种miRNA在流感病毒感染中的重要功能相继被发现。Buggele等通过比较肺A549细胞的模拟感染A/Udm/72或A/WSN/33病毒株后miRNA表达的差异,发现A型流感病毒诱导miRNA的特异表达,证实了miR-449b能调控HADC1和干扰素 β 的表达^[35];有报道表明miR-141能够抑制转化生长因子 β 2(TGF- β 2)的表达,在调控炎症方面发挥作用^[36]。上述实验结果都证实了特定的miRNA可调控病毒与宿主之间的相互作用,但各种miRNA之间是否具有协同或拮抗调控作用需要进一步探索。此外,Loveday等分析H1N1危重患者外周血单核细胞中的miRNA特异表达,并通过ROC曲线发现,miR-31、miR-29a、miR-148a具有重要的潜在诊断价值,联合使用miRNA与传统诊断标志物将是临床感染诊断的一个新方向^[37]。

2.4 呼吸道合胞病毒(RSV)

miRNA在RSV感染中的作用机理有待进一步研究。Othupangat等首次筛查RSV感染人支气管上皮细胞miRNA的异常表达,发现24个miRNA表达下调,2个miRNA上调($P<0.01$)^[38]。并且,通过生物信息学分析得到6个在神经营养通路中发挥重要调节功能的miRNA,验证了RSV感染时通过下调miR-221的表达,从而增强NGF-TrKA功能通路,抑制感染细胞的凋亡,利于RSV的复制。刘峰等实验验证了RSV感染后下调miR-27a表达,激活NGF,从而参与气道炎症的发生^[39];

通过筛查miRNA的异常表达,发现重要功能的miRNA,预测并进行深入的验证其功能仍需大量的工作。

尽管各种传染病与miRNA的关系研究进程不一,许多传染性疾病研究尚处于初步阶段,有些还有待研究,但总的说来,我们已经获得了不少进展。目前,miRNA作为各种传染性疾病的潜在标志物的研究见表1。这些标志物的出现,为开展临床检测奠定了坚实的基础。

3 常用miRNA检测技术

由于miRNA序列短、相似度高,甚至仅差1-2个碱基,并且体液中miRNA丰度很低,使设计的分析探针与目标miRNA杂交的效率低,检测的灵敏度和特异性方面都受到严峻的挑战。目前miRNA的常用检测技术主要有克隆测序、Northern印迹技术、miRNA微阵列芯片(miRNA microarray)和实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)技术等。其中,Northern印迹、RT-qPCR、miRNA微阵列芯片都是基于探针杂交的技术。

3.1 克隆测序

众多的方法中,克隆是鉴定和分析miRNA表达、功能的强有力的技术,尤其在发现新miRNA方面有明显优势:Mishima等对成年小鼠睾丸和卵巢进行miRNA的克隆测序分析,不仅分析了性别生殖器官组织miRNA表达差异,而且还发现了2个新的miRNA^[64]。克隆测序全基因小分子RNA同样可以反映miRNA的表达丰度,便于挑选有意义的miRNA进行深入分析,但一般需要RT-qPCR的验证。

为了发现新miRNA或高通量测序,通常采用T4RNA连接酶分别进行5'和3'接头连接克隆来产生小RNA库。小分子RNA克隆的效通常率受到多种因素的影响,包括聚乙二醇8000的浓度、DMSO以及RNA连接酶等,其中最主要的因素是分子间的RNA杂交;而且miRNA克隆易产生RNA连接偏移,导致miRNA测序灵敏度下降及定量失准。目前优化RNA克隆测序技术的研究主要集中于RNA连接酶和适配器的修饰。有研究分析RNA连接酶的连接序列倾向,进而设计了一种高精确适配器(HD adapter),不仅提高了连接效率,而且减少了小RNA连接的偏移^[65];值得注意的是,要充分考虑到不同的RNA底物往往表现出不同的连接效率。最近,Zhang等利用热稳定的RNA酶或夹板适配原理很大程度上排除了5'适配器与3'连接RNA底物的分子间杂交,显著地降低了miRNA的克隆偏移;同时,在前人研究基础上优化反应条件,使近乎所有miRNA的克隆效率都提高到接近100%^[66]。

然而,克隆测序技术具有一些不足之处:1.样品准备步骤繁琐,文库构建仍需简化;2.需进一步优化反应条件,克服分子间RNA杂交的干扰3.海量数据提出挑战,信息平台尚未完善;4.目前测序费用仍然较昂贵^[67]。这些不足使其难以临床推广。

3.2 Northern印迹

Northern印迹是一种广泛应用于检测成熟或不成熟miRNA的有效技术,尤其在miRNA大小、定量及验证miRNA方面具有明显优势^[68]。Northern印迹是探针依赖性的检测技术,为了优化探针与靶miRNA的杂交性质(空间位阻,生物稳定性和亲和力),肽核酸(PNA)、磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)、3'

表 1 人类传染性疾病相关 miRNA 及其潜在生物标记物

Table 1 MiRNAs as potential biomarkers associated with human infectious diseases

病原体 Pathogens	潜在标志物 Potential biomarkers	参考文献 References
HCV	miR-134, miR-198, miR-32, miR-483-5p	[20]
	miR-155	[19]
	miRNA-449a	[40]
	miR-122	[41]
	miR-199a	[18]
	miR-196,miR-296	[17]
HBV	let -7c,miR-23b,miR-122,miR-150	[24]
	miR-199a,miR-125b,miR-122	[42]
	miR-25,miR-375,let-7f	[43]
	miR-122	[44]
	let-7f,miR-939,miR-638	[45]
HIV	miRNA-101	[46]
	miR-223	[47]
	miR-99a,-100a,-199a ,miR-200	[48]
	microRNA-155	[26]
	microRNA-9	[49]
	miR-326	[27]
	microRNA-29	[50]
Influenza A	miR-32	[51]
	miR-26a,miR-939	[52]
	miR-141	[36]
	miR-146a	[53]
	miR-449b	[35]
	microRNA let-7c	[54]
	miR-29	[55]
RSV	microRNA-29c	[56]
	miR-27a	[39]
	miR-221	[38]
HSV	miRNA-146a	[57]
HCMV	hcmv-miR-UL112-1	[58]
	hcmv-mir-UL148D	[59]
	hcmv-miR-UL36	[60]
	miR-US25-2-3p	[61]
Bacillus pertussis	miR-202, miR-342-5p, miR-206, miR-487b, miR-576-5p	[62]
Coronavirus	miR-9	[63]

修饰的寡核苷酸以及锁定核苷酸(LNA)等反义寡核苷酸衍生物常被用于探针的设计^[69];Valoczi 等采用 LNA 修饰 DNA 寡核苷酸,每三个核苷酸位置用 LNA 替代,将成熟 miRNA 检测的灵敏度提高了十倍以上,同时具有高特异性^[70];Maroney 等利

用夹板连接(splinted ligation)原理设计同位素探针,不仅简化了实验,而且提高了 miRNA 检测的灵敏度^[71]。Northern 印迹技术测定 miRNA 的关键在于探针的设计和标记物的选择。

虽然,Northern 印迹是当前 miRNA 分析的标准方法,但其

缺点也很明显:操作繁琐、耗时长,难以实现高通量检测,并且灵敏度较低;除此之外,分析检测时样品需要复杂前处理,容易造成 RNase 污染,对实验操作要求较高。因此,该技术也难以临床推广。

3.3 RT-qPCR

RT-qPCR 是高灵敏度、高特异性定量检测 miRNA 的主要方法。由于成熟的 miRNA 分子只有 20 个碱基左右,不能直接用 PCR 实现扩增反应,为了克服这个困难,目前开发了茎环 RT-qPCR(stem loop RT-qPCR)、miRNA 加尾 RT-PCR(poly A RT-PCR)、引物延伸 RT-qPCR 以及 miQPCR 等多种改进技术。

Chen 等设计特异的茎环逆转录引物与 miRNA 杂交进行逆转录,然后再用传统的 TaqMan PCR 进行定量检测 miRNA,茎环引物 RT-PCR 反应不受 miRNA 前体的干扰,相对于传统线性引物的灵敏度和特异性都有明显的提高^[72]。为了同样达到延长目的 miRNA 的逆转录 cDNA 的效果,Shi 等首先对 miRNA 加尾(poly A),并在含 poly(T) 适配器的体系中逆转录,最后使用 miRNA 特异性前向引物和 poly(T)互补的反式引物进行实时荧光 PCR 定量检测,建立了高特异度、高灵敏度 miRNA 检测新方法^[73]。此外,研究者也利用延伸引物将 miRNA 反转录成 cDNA,然后设计含 LNA 修饰碱基的引物,以 cDNA 为模板进行定量 PCR 反应,设计了一种 miRNA 检测新方法^[74]。总而言之,这几种改进技术都是最终延长了目的 miRNA 逆转录扩增后 DNA 的长度;由于各种方法的差异,导致检测的灵敏度和特异度等方面的差异。Mou 等首次评估了茎环 RT-qPCR、加尾 RT-PCR、miQPCR 这三种 miRNA 检测方法,研究发现茎环 RT-qPCR 可检测高或中等丰度的 miRNA,而加尾 RT-PCR 可检测到低丰度的 miRNA,但不能检测含发卡结构 miRNA,miQPCR 的灵敏度较低,其原因尚不清楚,且由于实验条件和操作的影响此结果还有待验证^[75]。

尽管 RT-qPCR 已具有足够的灵敏度、特异性,但 RT-qPCR 方法也有其缺点:需已知待测序列,难以实现高通量;价格仍较昂贵,临床推广困难;使用标准曲线定量时,可能产生差异,使批间的数据比较出现困难,不同实验室的数据也难以统一。

3.4 miRNA 芯片

miRNA microarray 是一种针对全基因组 miRNA 分析的寡核苷酸芯片,实现了 miRNA 表达谱分析和多种 miRNA 高通量同时检测,已成为研究 miRNA 的主流技术。

当前,普遍使用基于荧光标记的 miRNA 芯片,往往要求激光共焦扫描等昂贵检测系统。Li 等开发了一种基于酶联反应检测 miRNA 的芯片技术,利用固定于载体上寡核苷酸探针捕获生物素标记的 miRNA,然后加入亲和素标记的碱性磷酸酶,通过酶促反应产生紫黑色沉淀进行定量;虽然大幅度的降低了检测成本,但检测的灵敏度和精确度受到酶联反应的限制^[76]。Roy 等报道了一种新的微流控辅助基因芯片技术,利用微分干涉相差显微镜成像,此技术具有无与伦比的分辨率,但操作及成本要求较高,难以推广^[77]。由于血清或血浆中 miRNA 的量非常低(0.1-1 ng/mL),检测的重复性较差,Ichikawa 等联合 RNA 提取试剂与 DNA 芯片技术,实现了血清或血浆中 miRNA 高稳定性、高重复性的检测;在不增加成本的情况下,通过改进 RNA

提取技术,得到高纯度的 miRNA^[78]。

然而,微阵列芯片的费用相对昂贵;芯片上有效样品体积很小,导致灵敏度不高;miRNA 序列短,序列相似性高,检测的重复性较差;不能同时优化所有待测 miRNA 的杂交环境,技术性能改进是一大难题。因而该技术临床推广起来也较为困难。除以上介绍的最常用 miRNA 检测技术之外,经典遗传筛选^[1]、核糖核酸酶保护分析(RPA)^[79]、原位杂交(Hybridization in situ)^[80]和恒温滚环扩增(Rolling circle amplification)^[81]等技术也可用于 miRNA 的检测分析。

4 总结与展望

miRNA 调控转录后基因的表达,在多种生理病理过程中起重要的调控作用,越来越受到研究者的重视。随着 miRNA 研究技术的飞速发展,越来越多在体内起重要调控作用的 miRNA 被人们发现,并应用于疾病的诊断、治疗以及疗效的监测,miRNA 对于传染性疾病的筛查诊断,控制传染性疾病的大面积传播方面显示出广阔的应用前景。

体液中 miRNA 能作为一种新型生物标记物用于传染病的检测,其原因有以下几点:(1)在血液、尿液、乳汁等体液中 miRNA 表现出异常的稳定性;(2)在传染性疾病中体液中 miRNA 的表达往往异常,并且具有时空和株特异性;(3)样本的获得具有无创性与简便性;(4)miRNA 可用现有的分子生物学检测技术进行检测。体液中 miRNA 作为传染病筛查与诊断研究的一种新型生物标志物,理论上是可行的。

然而,miRNA 进入生物标记物领域或实际临床检测之前有一些关键问题还需解决,主要表现如下:

1)在生物学及功能等基础研究方面:循环体液中 miRNA 的来源及其作用机理尚不清楚;循环 miRNA 检测的稳定性和重复性受到多种因素的影响^[82,83]。

2)在分析检测技术方面:常用检测技术中,Northern 印迹、RT-qPCR 技术都难以实现高通量检测,虽然微阵列技术已可实现 miRNA 的表达谱高通量分析,多种新型芯片和改进技术不断涌现,但微阵列检测的灵敏度和特异性还需进一步提高;克隆测序技术也能高通量分析 miRNA 的表达,并且能达到单核苷酸的分辨率,但其步骤较为繁琐,相当昂贵。此外,Northern 印迹、RT-qPCR 及基因芯片都是基于分子标记的技术,其灵敏度和特异性都受到一定的影响。

因此,开发一种更加简便、低成本、微创或无创、无标记、高灵敏度、高特异性、高通量定量 miRNA 表达的检测技术,来应用于传染性疾病的快速筛查与诊断,将具有较大的临床应用前景。

参考文献(References)

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854
- [2] Min H, Chen CZ. Methods for analyzing microRNA expression and function during hematopoietic lineage differentiation [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 342: 209-227
- [3] Pager CT, Wehner KA, Fuchs G, et al. MicroRNA-mediated gene

- silencing[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2009, 90: 187-210
- [4] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-419
- [5] Hsu PW, Lin LZ, Hsu SD, et al. ViTa: prediction of host microRNAs targets on viruses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35 (Database issue): D381-385
- [6] Lu YD, Gan QH, Chi XY, et al. Roles of microRNA in plant defense and virus offense interaction[J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(10): 1571-1579
- [7] Loveday EK, Svinti V, Diederich S, et al. Temporal- and strain-specific host microRNA molecular signatures associated with swine-origin H1N1 and avian-origin H7N7 influenza A virus infection[J]. *J Virol*, 2012, 86(11): 6109-6122
- [8] Libri V, Miesen P, van Rij RP, et al. Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(19): 3525-3544
- [9] 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
- [10] Patnaik SK, Mallick R, Yendamuri S. Detection of microRNAs in dried serum blots[J]. *Anal Biochem*, 2010, 407(1): 147-149
- [11] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659
- [12] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles [J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3694
- [13] Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B, et al. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential[J]. *Biomark Med*, 2013, 7(4): 623-631
- [14] Kosaka N, Izumi H, Sekine K, et al. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk[J]. *Silence*, 2010, 1(1): 7
- [15] Zhou Q, Li M, Wang X, et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(1): 118-123
- [16] Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome[J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(1): 77-85
- [17] Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism[J]. *Nature*, 2007, 449 (7164): 919-922
- [18] Murakami Y, Aly HH, Tajima A, et al. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(3): 453-460
- [19] Sidorkiewicz M, Grek M, Jozwiak B, et al. Expression of microRNA-155 precursor in peripheral blood mononuclear cells from Hepatitis C patients after antiviral treatment[J]. *Acta Virol*, 2010, 54(1): 75-78
- [20] Shwetha S, Gouthamchandra K, Chandra M, et al. Circulating miRNA profile in HCV infected serum: novel insight into pathogenesis[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1555
- [21] Zhang X, Zhang E, Ma Z, et al. Modulation of hepatitis B virus replication and hepatocyte differentiation by MicroRNA-1 [J]. *Hepatology*, 2011, 53(5): 1476-1485
- [22] Wang S, Qiu L, Yan X, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1) -modulated P53 activity[J]. *Hepatology*, 2012, 55 (3): 730-741
- [23] Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36): 4781-4788
- [24] Chen Y, Li L, Zhou Z, et al. A pilot study of serum microRNA signatures as a novel biomarker for occult hepatitis B virus infection [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2012, 201(3): 389-395
- [25] Winther TN, Bang-Berthelsen CH, Heiberg IL, et al. Differential plasma microRNA profiles in HBeAg positive and HBeAg negative children with chronic hepatitis B[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58236
- [26] Swaminathan G, Rossi F, Sierra LJ, et al. A role for microRNA-155 modulation in the anti-HIV-1 effects of Toll-like receptor 3 stimulation in macrophages[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(9): e1002937
- [27] Houzet L, Klase Z, Yeung ML, et al. The extent of sequence complementarity correlates with the potency of cellular miRNA-mediated restriction of HIV-1 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(22): 11684-11696
- [28] Gupta A, Nagilla P, Le HS, et al. Comparative expression profile of miRNA and mRNA in primary peripheral blood mononuclear cells infected with human immunodeficiency virus (HIV-1)[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22730
- [29] Zhu LY, Zhu LY, Qiu C, et al. HIV-1 infection changes miRNA expression profile in the whole blood[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2013, 29(3): 323-329
- [30] Witwer KW, Watson AK, Blankson JN, et al. Relationships of PBMC microRNA expression, plasma viral load, and CD4+ T-cell count in HIV-1-infected elite suppressors and viremic patients [J]. *Retrovirology*, 2012, 9: 5
- [31] Noorbakhsh F, Ramachandran R, Barsby N, et al. MicroRNA profiling reveals new aspects of HIV neurodegeneration: caspase-6 regulates astrocyte survival[J]. *FASEB J*, 2010, 24(6): 1799-1812
- [32] Pacifici M, Delbue S, Ferrante P, et al. Cerebrospinal fluid miRNA profile in HIV-encephalitis[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(5): 1070-1075
- [33] Ge Q, Filip L, Bai A, et al. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(23): 8676-8681
- [34] Song L, Liu H, Gao S, et al. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells [J]. *J Virol*, 2010, 84 (17): 8849-8860
- [35] Buggele WA, Krause KE, Horvath CM. Small RNA Profiling of Influenza A Virus-Infected Cells Identifies miR-449b as a Regulator of Histone Deacetylase 1 and Interferon Beta [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9): e76560
- [36] Lam WY, Yeung AC, Ngai KL, et al. Effect of avian influenza A H5N1 infection on the expression of microRNA-141 in human respiratory epithelial cells[J]. *BMC Microbiol*, 2013, 13: 104
- [37] Loveday EK, Svinti V, Diederich S, et al. Temporal- and strain-specific host microRNA molecular signatures associated with swine-origin H1N1 and avian-origin H7N7 influenza A virus infection [J]. *J Virol*, 2012, 86(11): 6109-6122

- [38] Othumpangat S, Walton C, Piedimonte G. MicroRNA-221 modulates RSV replication in human bronchial epithelium by targeting NGF expression[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30030
- [39] 刘峰,秦厚兵,周瑶,等. RSV 感染调节 A549 细胞 NGF、miR-27a 的表达[J]. 江苏医药, 2013, 39(05): 522-524
- Liu Feng, Qin Hou-bing, Zhou Yao, et al. RSV infection regulates the expressions of NGF and miR-27a in A459 cells [J]. Jiangsu Medical Journal, 2013, 39 (05): 522-524
- [40] Sarma NJ, Tiriveedhi V, Subramanian V, et al. Hepatitis C virus mediated changes in miRNA-449a modulates inflammatory biomarker YKL40 through components of the NOTCH signaling pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50826
- [41] Norman KL, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance and the isoprenoid biosynthesis pathway by microRNA miR-122 involves distinct mechanisms[J]. J Virol, 2010, 84(1): 666-670
- [42] 贾音,张毅,费明钰,等. 慢性乙肝患者外周血 microRNAs 的表达变化[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(12): 1381-1383
- Jia Yin, Zhang Yi, Fei Ming-yu, et al. Changes of circulating microRNA profile in patients with chronic hepatitis B [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2010, 31(12): 1381-1383
- [43] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma[J]. Cancer Res, 2010, 70(23): 9798-9807
- [44] Waidmann O, Bihrer V, Pleli T, et al. Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. J Viral Hepat, 2012, 19(2): e58-65
- [45] Zhang X, Chen C, Wu M, et al. Plasma microRNA profile as a predictor of early virological response to interferon treatment in chronic hepatitis B patients[J]. Antivir Ther, 2012, 17(7): 1243-1253
- [46] Mishra R, Singh SK. HIV-1 Tat C modulates expression of miRNA-101 to suppress VE-cadherin in human brain microvascular endothelial cells[J]. J Neurosci, 2013, 33(14): 5992-6000
- [47] Sisk JM, Clements JE, Witwer KW. miRNA profiles of monocyte-lineage cells are consistent with complicated roles in HIV-1 restriction[J]. Viruses, 2012, 4(10): 1844-1864
- [48] Cheng K, Rai P, Plagov A, et al. Rapamycin-induced modulation of miRNA expression is associated with amelioration of HIV-associated nephropathy (HIVAN)[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(13): 2073-2080
- [49] Seddiki N, Phetsouphanh C, Swaminathan S, et al. The microRNA-9/B-lymphocyte-induced maturation protein-1/IL-2 axis is differentially regulated in progressive HIV infection [J]. Eur J Immunol, 2013, 43 (2): 510-520
- [50] Hu G, Yao H, Chaudhuri AD, et al. Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated neuronal dysfunction[J]. Cell Death and Disease, 2012, 3: e381
- [51] Mishra R, Chhatbar C, Singh SK. HIV-1 Tat C-mediated regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor-3 by microRNA 32 in human microglia[J]. Journal of Neuroinflammation, 2012, 9: 131
- [52] Liu H, Song L, Huang W. MiR26a and miR939 regulate the replication of H1N1 influenza virus in MDCK cell[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2010, 50(10): 1399-1405
- [53] Terrier O, Textoris J, Carron C, et al. Host microRNA molecular signatures associated with human H1N1 and H3N2 influenza A viruses reveal an unanticipated antiviral activity for miR-146a [J]. J Gen Virol, 2013, 94(Pt 5): 985-995
- [54] Ma YJ, Yang J, Fan XL, et al. Cellular microRNA let-7c inhibits M1 protein expression of the H1N1 influenza A virus in infected human lung epithelial cells[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(10): 2539-2546
- [55] Fang J, Hao Q, Liu L, et al. Epigenetic changes mediated by microRNA miR29 activate cyclooxygenase 2 and lambda-1 interferon production during viral infection[J]. J Virol, 2012, 86(2): 1010-1020
- [56] Guan Z, Shi N, Song Y, et al. Induction of the cellular microRNA-29c by influenza virus contributes to virus-mediated apoptosis through repression of antiapoptotic factors BCL2L2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425(3): 662-667
- [57] Hill JM, Zhao Y, Clement C, et al. HSV-1 infection of human brain cells induces miRNA-146a and Alzheimer-type inflammatory signaling[J]. Neuroreport, 2009, 20(16): 1500-1505
- [58] Huang Y, Qi Y, Ma Y, et al. The expression of interleukin-32 is activated by human cytomegalovirus infection and down regulated by hcmv-miR-UL112-1[J]. Virol J, 2013, 10: 51
- [59] Wang YP, Qi Y, Huang YJ, et al. Identification of immediate early gene X-1 as a cellular target gene of hcmv-mir-UL148D[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(4): 959-966
- [60] Huang Y, Qi Y, Ma Y, et al. Down-regulation of human cytomegalovirus UL138, a novel latency-associated determinant, by hcmv-miR-UL36[J]. J Biosci, 2013, 38(3): 479-485
- [61] Qi M, Qi Y, Ma Y, et al. Over-expression of human cytomegalovirus miR-US25-2-3p downregulates eIF4A1 and inhibits HCMV replication[J]. FEBS Lett, 2013, 587(14): 2266-2271
- [62] Ge Y, Zhao K, Qi Y, et al. Serum microRNA expression profile as a biomarker for the diagnosis of pertussis [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40 (2): 1325-1332
- [63] Lai FW, Stephenson KB, Mahony J, et al. Human Coronavirus OC43 Nucleocapsid Protein Binds microRNA miR-9 and Potentiates NF-kB Activation[J]. Journal of Virology, 2014, 88(1): 54-65
- [64] Mishima T, Takizawa T, Luo SS, et al. MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary[J]. Reproduction, 2008, 136(6): 811-822
- [65] Sorefan K, Pais H, Hall AE, et al. Reducing ligation bias of small RNAs in libraries for next generation sequencing [J]. Silence, 2012, 3 (1): 4
- [66] Zhang Z, Lee JE, Riemondy K. High-efficiency RNA cloning enables accurate quantification of miRNA expression by deep sequencing[J]. Genome Biol, 2013, 14(10): R109
- [67] 杨晓玲,施苏华,唐恬. 新一代测序技术的发展及应用前景 [J]. 生物技术通报, 2010, 0(10): 76-81
- Yang Xiao-ling, Shi Su-hua, Tang Tian. Research Progress and Application of Next-generation Sequencing [J]. Biotechnology Bulletin, 2010, 0(10): 76-81
- [68] Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, et al. Post-transcriptional regulation of microRNA expression[J]. RNA, 2006, 12(7): 1161-1167

- Endocrinol Invest, 2012, 3(5): 322-325
- [10] Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E, et al. The American Thyroid Association Taskforce on Thyroid Disease During Pregnancy and Postpartum Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum[J]. *Thyroid*, 2011, 21(10): 1081-1125
- [11] Altomare M, La Vignera S, Asero P, et al. High prevalence of thyroid dysfunction in pregnant women[J]. *J Endocrinol Invest*, 2013, 36(6): 407-411
- [12] Alkafajei A, Amarín Z, Alazaizh W, et al. Prevalence and risk factors for hypothyroidism in Jordanian women: comparison between different reference ranges[J]. *East Mediterr Health J*, 2012, 18(2): 132-136
- [13] Mannisto T, Mendola P, Grewal J, et al. Thyroid diseases and adverse pregnancy outcomes in a contemporary US cohort [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(7): 2725-2733
- [14] Yassa L, Marqusee E, Fawcett R, et al. Thyroid hormone early adjustment in pregnancy (the THERAPY) trial [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(7): 3234-3241
- [15] Khalid AS, Marchocki Z, Hayes K, et al. Establishing trimester-specific maternal thyroid function reference intervals [J]. *Ann Clin Biochem*, 2013, 17[Epub ahead of print]
- [16] Han SM, Han JH, Park JA, et al. Longitudinal evaluation of thyroid autoimmunity and function in pregnant Korean women[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(12): 2295-2301
- [17] Negro R, Schwam A, Gismml R, et al. Universal screening versus case finding for detection and treatment of thyroid hormonal dysfunction during pregnancy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(4): 1699-1707
- [18] Hemelichs J, Bongers-Sehokking JJ, Sehenk JJ, et al. Maternal thyroid function during early pregnancy and cognitive functioning in early childhood: the generation R study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(9): 4227-4234
- [19] Bahn RS, Burch HS, Cooper DS, et al. The Role of Propylthiouracil in the Management of Graves' Disease in Adults: report of a meeting jointly sponsored by the American Thyroid Association and the Food and Drug Administration[J]. *Thyroid*, 2009, 19(7): 673-674
- [20] 滕卫平, 段涛, 宁光, 等. 妊娠和产后甲状腺疾病诊治指南[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28(5): 354-367
- Teng Wei-ping, Duan Tao, Ning Guang, et al. Diagnosis and treatment of thyroid disease during pregnancy and postpartum Guide [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and metabolism*, 2012, 28 (5): 354-367
- [21] 李佳, 滕卫平, 单忠艳, 等. 中国汉族碘适量地区妊娠月份特异性 TSH 和 T4 的正常参考范围[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2008, 24(6): 605-608
- Li Jia, Teng Wei-ping, Shan Zhong-yan, et al. The specific reference range of TSH and T4 of Chinese Han in pregnancy in iodine sufficient area [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and metabolism*, 2008, 24 (6): 605-608

(上接第 3164 页)

- [69] Torres AG, Fabani MM, Vigorito E, et al. MicroRNA fate upon targeting with anti-miRNA oligonucleotides as revealed by an improved Northern-blot-based method for miRNA detection[J]. *RNA*, 2011, 17(5): 933-943
- [70] Valoczi A, Hornyik C, Varga N, et al. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(22): e175
- [71] Maroney PA, Chamnongpol S, Souret F, et al. A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation[J]. *RNA*, 2007, 13(6): 930-936
- [72] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179
- [73] Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR[J]. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519-525
- [74] Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engle P, et al. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs [J]. *RNA*, 2005, 11 (11): 1737-1744
- [75] Mou G, Wang K, Xu D, et al. Evaluation of three RT-qPCR-based miRNA detection methods using seven rice miRNAs [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(6): 1349-1353
- [76] Li W, Zhao B, Jin Y, et al. Development of a low-cost detection method for miRNA microarray [J]. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai), 2010, 42(4): 296-301
- [77] Roy S, Soh JH, Gao Z. A microfluidic-assisted microarray for ultrasensitive detection of miRNA under an optical microscope [J]. *Lab Chip*, 2011, 11(11): 1886-1894
- [78] Ichikawa M, Akiyama H. A combination of extraction reagent and DNA microarray that allows for the detection of global miRNA profiles from serum/plasma[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1024: 247-253
- [79] Mead EA, Tu Z. Cloning, characterization, and expression of microRNAs from the Asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi* [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 244
- [80] Li J, Li X, Li Y, et al. Cell-specific detection of miR-375 downregulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53582
- [81] Neubacher S, Arenz C. Rolling-circle amplification: unshared advantages in miRNA detection [J]. *Chembiochem*, 2009, 10 (8): 1289-1291
- [82] Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, et al. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20769
- [83] Cheng HH, Yi HS, Kim Y, et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e64795