

外泌体源性细胞外 microRNAs 在泌尿系统恶性肿瘤中的研究进展*

王爱香 综述 畅继武 审校

摘要 microRNAs(miRNAs)是一种内源性单链非编码微小RNAs分子,可通过碱基互补方式与靶mRNA的3'非翻译区(3'UTR)特异性结合诱导其降解或抑制其翻译,从而在转录后水平有效地沉默靶基因的蛋白表达。miRNAs因可以上述方式调节癌基因或抑癌基因表达,故其广泛参与了肿瘤的发生发展过程。本文概括了miRNAs的起源、功能及生物体液中外泌体(exosome)源性细胞外miRNAs的稳定性。同时对从尿液外泌体中寻找泌尿系统恶性肿瘤潜在miRNA标记物的现实可行性以及尿液中外泌体源性miRNAs在前列腺癌、膀胱癌及肾癌中作为生物标记物的潜能进行综述。

关键词 泌尿系统肿瘤 细胞外miRNAs 外泌体

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20150060

Research progress on exosomal microRNAs in urologic malignancies

Aixiang WANG, Jiwu CHANG

Correspondence to: Jiwu CHANG; E-mail: wax20030826@126.com

Tianjin Institute of Urology, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

This work was supported by a grant from the Application Base and Frontier Technology Project (No. 13JCQNJC11500) and the Science and Technology Foundation of Tianjin Public Health Bureau of China (No. 2013KZ110 and 2013KZ113)

Abstract Micro-ribonucleic acids (miRNAs) are endogenous single-stranded small non-coding RNAs. miRNAs bind to a complementary site in the 3' untranslated region of their target mRNAs through canonical base pairing, which can direct the degradation or translational repression of these transcripts. Thus, miRNAs can effectively silence the protein expression of target genes post-transcriptionally. miRNAs may also regulate the expression of oncogenes and tumor suppressor genes and could be involved in almost all known hallmarks of carcinogenesis. In this paper, we discuss the following in detail: (1) biogenesis and main functions of cellular miRNAs, (2) stability and detectability of exosomal miRNAs in biological fluids; and (3) feasibility of miRNAs as a potential new class of biomarkers derived from urinary exosome in the malignancy of urinary system. Finally, we summarize studies on urinary exosomal miRNAs as potential biomarkers of prostate, bladder, and kidney cancers.

Keywords: tumors of urinary system, extracellular miRNAs, exosome

miRNAs是一种内源性单链非编码微小RNAs分子,长度为19~23 nt,长期以来一直被认为是转录的副产品。目前的研究表明miRNAs在生理及病理过程中具有重要功能性意义,几乎参与所有已知肿瘤发生的相关过程,如细胞生长、分化、增殖、血管形成、凋亡、浸润及转移等^[1]。最近的研究显示体液中可检测到活性细胞释放的miRNAs,这些miRNAs统称为细胞外miRNAs,通常稳定存在于体液中而免于降解,微囊泡尤其是外泌体(exosomes)是细胞外miRNAs的一种主要保护机制且在细胞间通讯中发挥重要作用^[2],其在包括泌尿系统恶性肿瘤的各种人类肿瘤

中被作为有前景的疾病诊断与预后生物标记物。

膀胱癌、前列腺癌、肾癌是泌尿道三大恶性肿瘤。前列腺癌是美国男性最常见的癌症,每年新诊断的患者为240 000多例^[3]。膀胱癌在美国男性最常见的癌症中位居第3位,据统计2012年新发病例73 510例,死亡14 880例^[3]。在我国由于人们生活水平的不断提高及工业化进程的加快,泌尿道恶性肿瘤的发病率与死亡率逐年增加。尽管在治疗方面已经取得很大进步,但无创简便的恶性肿瘤检测方法的发展,疾病早期的诊断水平提高仍是泌尿外科医生需要面对的挑战,同时需要回避穿刺及其他传统诊

作者单位:天津医科大学第二医院天津市泌尿外科研究所(天津市300211)

*本文课题受天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目(编号:13JCQNJC11500)及天津市卫生局科技基金项目(编号:2013KZ110与2013KZ113)资助

通信作者:畅继武 wax20030826@126.com

断方法对患者的损伤。就上述问题,新近研究发现的分泌体源性 miRNAs 作为诊断及预后生物标记物给患者带来了曙光。

1 miRNAs 的生物起源与主要功能

细胞内 miRNA 分为内源性与外源性两种不同亚群。miRNA 生物起源遵循中心法则:在细胞核中 miRNA 基因被 RNA 聚合酶 II 转录为长度 >500 nt 的初级 miRNA 发夹 (pri-miRNAs); pri-miRNAs 被 Drosha/DGCR8 裂解为长度 65~75 nt 的前 miRNAs (pre-miRNAs), 由 Exportin 5 从细胞核转运至胞浆;在胞浆中 pre-miRNAs 被 Dicer 进一步修剪为长度 19~23 nt 的成熟 miRNAs^[4]。上述途径产生的 miRNAs 组成了细胞内大部分的 miRNAs。细胞内 miRNAs 的另一种来源为细胞外环境。目前研究者们普遍认为细胞可能释放包含 miRNAs 的复合物进入血液、唾液、尿液及乳汁等生物体液中^[5], 这些复合物包括 miRNAs 结合蛋白^[6]、高密度脂蛋白 (HDL)^[7]、或者微囊泡。当这些复合物在血液中循环时,可能被远隔的细胞捕获,实现 miRNAs 介导的细胞间通讯。

成熟 miRNAs 通过调节靶 mRNAs 对细胞功能具有显著影响。miRNAs 与 Ago 2 形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC), 然后以完全或不完整配对方式结合到靶 mRNAs 的 3' 非编码区 (3'UTR)。如果 miRNAs 与 mRNAs 之间完全配对,靶 mRNAs 被核酸内切酶裂解;如果二者间不完全匹配,靶 mRNAs 的翻译被抑制。据估计,约 1 000 个 miRNAs 调节着 30% 以上的人类基因^[8]。

2 生物体液中分泌体源性 miRNAs 的稳定性及可检测性

分泌体是细胞内多囊泡体 (multivesicular bodies, MVBs) 的腔内囊泡,在 MVBs 与细胞膜融合之后以胞吐的方式释放入细胞外环境中,直径为 50~100 nm。分泌体含有能反映其来源细胞生理及病理状态的多种蛋白质、mRNAs 及 miRNAs,在其形成过程中上述生物分子有一个选择性富集过程,因此分泌体携带有丰富的生理或病理生物标志物信息^[5]。研究显示分泌体被大量释放于生物体液中,包括血液、尿液、脑脊液、恶性胸腹水、羊水及滑液等^[9]。分泌体能够携带 RNA 分子循环于血液中进行长距离的细胞间通讯,鉴于此试图从各种体液中提取分泌体的 RNA 作为疾病诊断与预后标记物研究。

用于诊断和预测预后的理想生物标记物应满足以下标准:通过无创性方法易于获得,高度的敏感性及特异性,具有检测疾病早期阶段的能力,样本有较长的半衰期以及快速准确的检测方法等。其中无创性方式是最基本的获得要求,以无创性方法收集的

常见生物体液是血清与血浆,其中循环 miRNAs 近年来备受关注。与 mRNAs 相比较,循环 miRNAs 比较稳定,能耐受储存与冻融循环延长等物理降解,同时也能抵抗血清中核糖核酸酶 (RNase) 及体外 RNase A 等生物化学降解^[10]。在富于 RNase 的血液环境中,许多机制保护循环 miRNAs,其中分泌体被认为是一种主要的保护机制^[11]。分泌体的外膜对 RNA 提供了全面的保护,其将与易于消化的细胞外环境隔绝。以无创性方法收集的另一种常见生物体液是尿液,尿液不仅容易获得,而且收集简便、无创、数量大,因此尿液是一种反映泌尿系统疾病潜在 miRNAs 标志物的理想液体。由于排泄之前尿液通过泌尿系统恶性肿瘤的病灶,因此其 miRNAs 含量常常反映疾病的状态。存在于尿液中的 miRNAs 与循环 miRNAs 的保护机制大致相同,但由于尿液成分复杂,而且泌尿系统中存在大量的 RNase 活性,使得尿液中的裸 miRNAs 更易于降解,因此研究源于分泌体的 miRNAs 更具有现实意义。

尿液分泌体可来源于泌尿道肿瘤 (如前列腺癌、膀胱癌及肾癌)、正常泌尿上皮、肾小球或肾小管。一项肾脏疾病的研究中,在尿液分泌体 RNA 提取之前用 RNase A 对分泌体沉淀进行处理,结果显示处理组与未处理组均稳定表达 AQP2 及 CD24,且两组间 Ct 值无明显差异^[12]。另一项研究分别从全尿液,尿细胞沉淀,无细胞尿液,无分泌体尿上清液及尿液分泌体中提取 RNA,并对长度 <200 nt 的 miRNAs 进行了分析,结果仅在尿液分泌体中发现了富集完整的 miRNAs^[13]。尽管尿细胞沉淀中包含了一定数目的 miRNAs,但是大部分已降解。进一步的研究结果显示在 3 例不同受试者尿样中应用高通量深度测序法检测到 184 个分泌体相关 miRNAs,而其中仅 7 个 miRNAs 与无细胞尿液共有。上述结果表明尿液分泌体中不仅含有丰富完整的 miRNAs,而且对 RNAs 具有很好的保护作用。

3 泌尿系统恶性肿瘤分泌体源性 miRNAs 的诊断与预后意义

前列腺癌细胞外 miRNAs 的研究主要集中在血清与血浆。血液中存在两个有前景的 miRNAs,即 miRNA-141 与 miRNA-375。在转移性前列腺癌患者血浆中,miRNA-141 的水平是健康对照的 46 倍^[14]。血浆 miRNA-141 与 miRNA-375 表达水平可区别转移性与非转移性患者^[15],血清 miRNA-141 与 miRNA-375 表达水平与高 Gleason 评分及阳性淋巴结数目相关^[16]。通过从血清中分离分泌体 s 与微囊泡, Bryant 等^[15]进一步证明,与无复发患者比较转移性前列腺癌患者的 miRNA-141 与 miRNA-375 表达明显

上调,同时研究也显示前列腺癌患者尿沉淀与组织样本细胞内 miRNAs 中的 miRNA-141 表达上调,提示 miRNA-141 作为前列腺癌诊断与预后标记物的潜能。在另一项研究中,Huang 等^[17]在 23 例激素抵抗型前列腺癌患者筛查组中进行了 RNA 测序分析,并在随访组中对 100 例该类患者应用 qRT-PCR 技术进一步评估血浆外泌体源性 miRNAs 作为预后生物标记物的价值。结果在随访组中,miRNA-1290 与 miRNA-375 的高水平与较低的总生存率明显相关($P < 0.004$)。将 miRNA-1290/miRNA-375 与激素抵抗型前列腺癌分期模型中的假设临床预后因子合并后预测性能明显提高,时间依赖性曲线下面积从 0.66 增加到 0.73,提示血浆外泌体源性 miRNA-1290 与 miRNA-375 是激素抵抗型前列腺癌患者具有前景的预后生物学标记物。

miRNAs 水平的上述改变不仅可以发生在前列腺癌患者血清及血浆中,也可能发生在尿液中。有研究报道,墨西哥的前列腺癌患者尿细胞沉淀中证实了 21 个 miRNAs 存在明显的表达变化,miRNA-196b、miRNA-574-3p、let-7b、-7c、-7d、-7e、-7g、miRNA-200b、-149、-20b、-17、-184、-20a、-106a、-671-3p、-148a、-429、-31 和 miRNA-100 表达明显增加,miRNA-150 与 miRNA-328 表达下调^[18],但这些结果仍需要在更大的患者群体中进一步分析。另一研究为了探讨 miRNAs 作为前列腺癌非侵袭性生物标记物的潜能,对尿样中经芯片及 qRT-PCR 研究证实的前列腺癌组织中明显表达失调的 miRNAs 进行了分析,miRNA-205 与 miRNA-214 表达明显下调,二者联合使用能区别前列腺癌患者与健康对照,敏感性与特异性分别为 89% 与 80%,上述结果强调了 miRNA-205 与 miRNA-214 作为前列腺癌患者非侵袭性生物标记物的潜能^[19]。

膀胱癌诊断与预后的 miRNAs 标记物研究大部分采用尿液。Hanke 等^[20]在膀胱癌患者尿液中确定了 157 个 miRNAs 的表达图谱,鉴定出 miRNA-126、miRNA-182 与 miRNA-199a 的表达水平明显增加,同时也发现尿液中 miRNA-126 与 miRNA-152 的比值能够检测膀胱癌,敏感性、特异性及曲线下面积分别为 72%、82% 及 0.768。另一项研究表明,尿液中的 miRNA-96 与 miRNA-183 在区别膀胱癌与非癌患者方面均具有较高的敏感性与特异性,miRNA-96 分别为 71.0% 与 89.2%,miRNA-183 分别为 74.0% 与 77.3%。在该研究与健康对照者比较,膀胱癌患者尿液中 miRNA-96 与 miRNA-183 表达水平明显升高,但术后尿液中上述两种 miRNAs 的表达水平明显降低,此外 miRNA-96 与尿细胞学结合时,可将尿细胞

学的敏感性从 43.6% 提高到 78.2%,因此 miRNA-96 可以作为一个优良的诊断标记物^[21]。Wang 等^[22]行尿液离心分离后,分别对膀胱癌患者的尿液沉淀和上清液进行 miRNAs 表达研究,尿液沉淀中 miRNA-200 家族、miRNA-192 及 miRNA-155 低表达,尿液上清液中 miRNA-192 低表达,但 miRNA-155 高表达。该研究的肿瘤组织切除后尿液沉淀中 miRNA-200 家族表达增加。上述研究结果表明 miRNAs 在尿液中作为膀胱癌非侵袭性生物标记物的潜能。

肾细胞癌中关于 miRNAs 的研究主要描述了 miRNAs 在鉴别肿瘤组织与肾实质、肾细胞癌的组织学分类及预后判断方面的重要作用。其中仅一项研究^[23]是关于肾细胞癌患者尿液 miRNAs 的检测,miRNA-15a 作为一个肾细胞癌的抑制基因促进凋亡,同时通过与 α 同型蛋白酶 C (PKC α) 的紧密结合抑制细胞增殖,PKC α 直接通过分子相互作用抑制 miRNA-15a 的初级转录本 pri-miRNA-15a 的细胞核释放,降低的 PKC α 水平导致 miRNA-15a 表达增加。在活组织检查与尿液样本中,miRNA-15a 上调也可能是一种鉴别透明细胞肾细胞癌与良性肾肿瘤的重要生物标记物。

4 展望

体液中提取外泌体源性细胞外 miRNAs 作为泌尿系统肿瘤诊断与预后生物标记物的研究虽刚刚开始,但已经显示出巨大潜力。由于研究对象与方法的不同可能产生不同的结果,患者的招募、样本的收集、miRNAs 的提取及量化的标准化非常重要。目前的研究总体上基于小样本患者,大样本多中心研究亟需开展。

参考文献

- 1 Yang Y, Kang CS. Recent advances in the research on the relationship between miRNA-21 and cancer [J]. Chin J Clin Oncol, 2011, 38(6):357-360. [杨 咏, 康春生. miRNA-21 与肿瘤相关研究新进展[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(6):357-360.]
- 2 Huang X, Liang M, Dittmar R, et al. Extracellular microRNAs in urologic malignancies: chances and challenges[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7):14785-14799.
- 3 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1):10-29.
- 4 Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, et al. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review[J]. Eur Urol, 2011, 59(5):671-681.
- 5 Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(7):940-948.
- 6 Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(12):

- 5003–5008.
- 7 Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4):423–433.
 - 8 Schaefer A, Stephan C, Busch J, et al. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of microRNAs in urologic tumors[J]. Nat Rev Urol, 2010, 7(5):286–297.
 - 9 Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives[J]. Proteomics, 2008, 8(19):4083–4099.
 - 10 Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2011, 80(2):193–208.
 - 11 Huang X, Yuan T, Tschannen M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 319.
 - 12 Lv LL, Cao Y, Liu D, et al. Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery [J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(10):1021–1031.
 - 13 Cheng L, Sun X, Scicluna BJ, et al. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine[J]. Kidney Int, 2014, 86(2):433–444.
 - 14 Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer[J]. Tumour Biol, 2011, 32(3):583–588.
 - 15 Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer[J]. Br J Cancer, 2012, 106(4):768–774.
 - 16 Brase JC, Wuttig D, Kuner R, et al. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer[J]. Mol Cancer, 2010, 9:306.
 - 17 Huang X, Yuan T, Liang M, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer[J]. Eur Urol, 2015, 67(1):33–41.
 - 18 Ahumada-Tamayo S, Saavedra-Briones D, Cantellano-Orozco M, et al. MicroRNA determination in urine for prostate cancer detection in Mexican patients at the hospital general "Dr. Manuel Gea González"[J]. Rev Mex Urol, 2011, 71(4):213–217.
 - 19 Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, et al. MicroRNA profiling in prostate cancer—the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e76994.
 - 20 Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer[J]. Urol Oncol, 2010, 28(6):655–661.
 - 21 Yamada Y, Enokida H, Kojima S, et al. miR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology[J]. Cancer Sci, 2011, 102(3):522–529.
 - 22 Wang G, Chan ES, Kwan BC, et al. Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer[J]. Clin Genitourin Cancer, 2012, 10(2):106–113.
 - 23 von Brandenstein M, Pandarakalam JJ, Kroon L, et al. MicroRNA 15a, inversely correlated to PKC α , is a potential marker to differentiate between benign and malignant renal tumors in biopsy and urine samples[J]. Am J Pathol, 2012, 180(5):1787–1797.
- (2015-01-13 收稿)
(2015-03-27 修回)
(编辑:张侃)



作者简介

王爱香 专业方向为泌尿系统肿瘤分子病理学及发病机制。
E-mail: wangaixiang@tjmu.edu.cn

• 读者 • 作者 • 编者 •

关于常用统计变量的正确书写规范

科技类文章一般需要统计学处理与分析,在此对常用统计学变量的正确书写规范按GB3358-82《统计学名词及符号》的有关规定作一说明。书写时需特别注意这些字母是英文还是希文、是大写还是小写、字母顶端的标记及上下角标。常用统计变量如下:1)样本的算术平均数用英文Mean(中位数用Md);2)标准差用SD;3)标准误用大写SEM;4)t检验用英文小斜体 t ;5)F检验用英文大写斜体 F ;6)卡方检验用 χ^2 ;7)相关系数用英文小写斜体 r ;8)自由度用希文小写斜体 ν ;9)概率用英文大写斜体 P (P 前应给出具体检验值,如 t 值、 χ^2 值、 q 值等);10)在判断统计学处理的意义时,应给出具体的 P 值,如: $P=0.001$, $P=0.005$, $P=0.002$, $P<0.001$ 等。在差异是否有统计学意义的表述上,一般为“差异有/无统计学意义”和“有/无显著性差异”较妥,不宜为“有/无明显差异”。

——本刊编辑部