

孕妇外周血检测微小 RNA 行产前诊断的研究进展

李冬焕 综述 苏放明 审校

(暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院, 广州 深圳 518020)

【摘要】 寻找一种准确、无创的产前诊断方法取代目前的有创性检查, 提高人口出生质量, 是人们的追求目标。而检测孕妇外周血中胎儿细胞游离核酸物质逐渐发展成一种无创产前诊断新途径。本文综述了孕妇外周血中检测微小 RNA 行产前诊断的可行性及预测妊娠相关疾病的研究进展。

【关键词】 游离微小 RNA; 孕妇外周血; 无创性产前诊断; 妊娠相关性疾病

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.02.007

长期以来, 人们一直致力于寻找一种早期、安全、简便、准确的产前诊断方法, 以排查胎儿染色体异常疾病, 降低病残儿出生率, 提高人口质量。传统的产前诊断方法包括中孕期绒毛膜取样、羊膜腔或脐血穿刺, 因其为有创性操作而不被广大孕妇所接受。孕妇血液中胎儿有核红细胞因数量稀少且分选困难, 经宫颈取样收集胎儿滋养层细胞因收集方法并非完全无创从而限制了它们在临床中的应用。近年来, 检测孕妇外周血中胎儿细胞游离脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)物质逐渐发展成一种无创产前诊断新途径。与此同时, 母血中另外一种游离核酸分子即胎儿游离微小 RNA 作为一个新兴的研究领域、一种非侵入性的早期检测手段, 目前已显示出了良好的发展前景和巨大的应用潜力。本文就其研究进展做一综述。

1 miRNA 的生物学特性

微小 RNA(microRNA, miRNA, miR) 于 1993 年由 Lee 等人在线虫中发现, 长度为 18~25 个核苷酸, 为非编码小分子 RNA, 在基因转录后水平上通过与靶 mRNA 互补结合, 抑制 mRNA 的翻译或降解 mRNA, 发挥对约 30% 人类基因表达的调节作用, 参与调控个体发育、细胞凋亡、细胞增殖和分化等生命活动^[1]。

miRNA 分子同已知的循环核酸(DNA 和

RNA)一样, 广泛存在于正常人和不同种病人的血清和血浆中, 并且随着生理状况、疾病的类型和病程的不同而表达异常。miRNA 在组织和细胞中的表达具有严格的时空性和组织特异性, 在不同病理生理状况下呈特征性表达。

外周血 miRNA 具有稳定性, 在不同物种的血浆中均可检测到 miRNA, 其表达水平在同一物种不同个体间是一致的, 且能抵抗 4℃、-80℃ 低温冻融^[2,3]。Arroyo 等^[4]发现 miRNA 在血液中的稳定性并非由于 miRNA 能抵抗血浆核糖核酸酶(RNases), 而是因为大多数 miRNA 与蛋白复合体结合, 其中主要是 Argonaute2 蛋白复合体, 这些蛋白复合体对 miRNA 具有保护作用, 从而使 miRNA 具有稳定性。组织细胞内外的 miRNA 表达图谱是不一样的, miRNA 选择性地从组织细胞释放到外周血中。外周血中 miRNA 的稳定性及其选择性对其成为疾病诊断的潜在性无创生物标志物起着重要的作用^[5]。

2008 年 Chim 和同事率先开始将 miRNAs 作为妊娠并发症的生物标记的研究工作。当时已知的主要在胎盘表达的 miRNAs 大约有 100 种^[6], 但是不知道胎盘来源的 miRNAs 能否在母血循环中检测到并用于诊断。在这个里程碑式的研究中, Chim 等^[7]设想血浆中大部分 miRNAs 来源于造血系统而与妊娠并不相关, 所以他们比较了晚孕期胎盘组

织中和对应的母血细胞中的 157 种 miRNAs, 证明出现在胎盘中的 34 种 miRNAs 浓度高于孕母血细胞中的 10 倍。重要的是, 研究者验证了胎盘中 4 种极其丰富的 miRNAs(miR-141, miR-149, miR-299-5p, and miR-135b)可以在孕妇血浆中检测到, 但在产后母体血浆中检测不到, 进一步证实他们来源于胎盘。在妊娠妇女血浆中发现胎儿的循环 miRNA, 而且母亲血浆中的胎儿 miRNA 在分娩前具有稳定性, 故胎儿的循环 miRNA 可以作为产前诊断的分子标志。

随后, 几个研究也证实胎盘特异 miRNAs 存在孕母血浆和血清中。Gilad 等^[8]研究表明孕妇血清中的 miR-526a、miR-527、miR-520-5p 表达水平明显高于非妊娠妇女, 这种生理变化可用于判断女性是否怀孕。胎盘来源的核酸物质(DNA 和 RNA)最初设想是以凋亡小体的形式释放到母体循环中^[9], 而 Luo 等^[10]报道了 miRNAs 是由人类胎盘合体滋养细胞通过外质体运输到母血循环, 循环中的滋养细胞释放的 miRNAs 反映了妊娠的生理状态并可用于诊断。因为它们的浓度很可能反映组织特异的生理或病理状态, 就此推断相关的 miRNAs 可能对妊娠并发症做出预测。

2 外周血 miRNA 检测技术

目前已经发展了多种有效的 miRNA 检测方法, 根据研究目的和所取样本不同可以选择最适合的检测方法。RNA 印迹(northern blot)是验证和确认 miRNA 的经典方法, 但该方法繁琐并且灵敏度低, 不适于临床大规模的筛选实验^[11]。芯片技术(microarray)可以实现快速、高通量地检测, 且可用于多个 miRNA 的检测^[12], 但结果是半定量的, 灵敏度和重复性较差, 一般多用于初筛, 获得的结果通常需要 Northern blot 和实时定量 PCR 进行验证, 而芯片制作和检测所需的仪器设备也较昂贵。循环 miRNA 的定性检测可采用 miRNA 芯片技术。

实时 PCR(RT-PCR)作为半定量或定量检测 miRNA 表达的常用实验方法^[13], 在研究 miRNA 表达的过程中不断得到改进。实时荧光定量 PCR 可以很精确地定量分析 miRNA, 是循环 miRNA 定量检测最常用而有效的方法。茎环(stemloop)实时

定量 RT-PCR 是一项高特异性、敏感度的检测 miRNA 表达的实验技术, 包括设计具有茎环结构的反转录引物和用 miRNA 荧光标记的特异分子探针进行实时 PCR 2 个关键步骤^[14]。Mitchell 等^[15]采用茎环的 RT-PCR 方法直接以血清为模板也能检测到 miRNA 分子, 充分证明这种方法特异性和敏感性方面的优势。Gilad 等^[8]采用 polyA 加尾, 用带有锚定引物 RT-PCR, 然后再用探针进行检测, 同样获得稳定的 miRNA 分子。

3 miRNA 在产科领域的应用

基于“成人疾病胎儿起源”学说^[16], 成人疾病可能由早期生命过程所决定, 而寻找在孕期发现异常的方法即产前诊断或产前筛查对下一代健康有深远意义。孕妇血清中出现的生物标记如果相对无创且数量丰富, 是最有价值的。循环核酸在母体血浆中的发现为非侵入性的产前诊断开创了可能。但研究发现循环 DNA 检测率低, 特异性差, 存在大量母体 DNA 的背景干扰; 循环 RNA 虽易于检测, 但容易降解, 作为标记物缺乏稳定性。而循环 miRNA 有着作为临床标记物的足够的稳定性和特异性。最近几年对一些妊娠相关疾病的研究表明, 作为妊娠相关疾病的无创生物标记, miRNAs 是一种极有潜力的候选者。

为证明 miRNAs 与妊娠相关并发症有关, 研究者曾采用两种互补的方法。开始第一种方法为患有感兴趣疾病孕妇与健康对照组的胎盘中 miRNAs 的浓度比较。有疾病相关差异的候选胎盘 miRNAs 通过 miRNA 微阵列芯片或第二代基因测序鉴定, 然后由定量实时 PCR 确认。因为血浆和血清均为无创诊断样本, 研究者随后检验它们是否出现在孕母血浆或血清中。第二种方法开始直接检测孕母血浆或血清, 寻找与感兴趣妊娠并发症相关的 miRNAs 的基因表达模式。通过这些方法验证的 miRNAs 并不需要胎盘特异性表达, 只要这些 miRNAs 的差异表达能够反映孕母的妊娠相关生理或病理状态。大量候选 miRNAs 已经被识别, 它们中许多有希望成为特殊妊娠疾病的生物标记。

目前国内外文献报道的 miRNA 用于产前诊断研究, 尤其妊娠相关疾病预测取得了一定成果。本

文便作以介绍。

3.1 检测胎儿染色体异常 唐氏综合征(Down syndrome, DS) 胎儿表达其特异性的 miRNA^[17], 而部分 DS 胎儿特异性 miRNA 又在胎盘特异性表达。因此, 孕妇血浆中 miRNA 可作为胎儿 DS 无创产前诊断的标志物。国内李艳丽等^[18]选择在 DS 胎儿脑组织和心脏组织高表达的 miR-125b-2 作为研究目标, 分别检测正常孕妇和异常孕妇血清中 miR-125b-2 的水平。研究结果显示唐氏筛查高危孕妇血清 miR-125b-2 水平高于妊娠中期孕妇, 最终确诊为异常的孕妇血清 miR-125b-2 水平明显高于正常孕妇。因此, miR-125b-2 可以单独与其他检测指标联合使用, 用于无创产前诊断。此外, 10 例异位妊娠孕妇血清 miR-125b-2 的水平也明显高于正常孕妇。miR-125b-2 有可能成为区别正常妊娠与异位妊娠的一个有用分子标记物。

3.2 筛查胎儿结构异常 先天性心脏病是一种常见的婴儿出生缺陷。虽然目前反映胎儿先天性心脏病的筛查指标有多种, 如颈半透明度(NT)、 β -hCG 和 PAPP-A, 但这些指标有非特异且假阳性率高。而与心脏发生相关的特异性 miRNA 已被发现, 并且这些特异性 miRNA 与胎盘 miRNA 的表达有关, 而且还出现在妊娠妇女的外周血中, 这预示着妊娠妇女的外周血 miRNA 可作为胎儿先天性心脏病诊断的潜在性生物标志物^[19]。而中国医科大学一项研究^[20]首次将怀有神经管缺陷胎儿的孕妇与健康对照孕妇作比较, 其血清中 6 种 miRNAs 的表达不同, 这些 miRNAs 可作为产前监测胎儿有无神经管缺陷的早期无创分子标记。

3.3 预测子痫前期 研究表明, 子痫前期 (pre-eclampsia, PE) 发生时, 也会经历如细胞凋亡等病理生理过程。因此, 推测 miRNA 在 PE 的病理过程中可能发挥了至关重要的作用。2007 年, Pineles 等^[21]运用微阵列技术分析了 PE 患者与正常妊娠妇女胎盘组织中 157 种 miRNAs 的表达变化情况, 发现 miRNA 在这两组人群中存在明显差异。这一研究结果首次证实 miRNA 与产科疾病密切相关。Zhu 等^[22]用芯片技术和实时荧光定量 PCR 研究发现在先兆子痫孕妇胎盘中有 34 种 miRNAs 表达异常, 并且在先兆子痫孕妇胎盘中 miRNA 家族在人

染色体 19q13. 42, 13q31. 3, xq26. 2, xq26. 3 和 14q32. 31 表达异常, 表明先兆子痫和其它病理情况下涉及到的胎盘中 miRNA 的异常也可以在母体血浆中反映。而 Enquobahrie 等^[23]运用基因芯片技术对 20 例 PE 患者及 20 例正常妊娠妇女胎盘组织的 miRNA 进行检测发现, 相较于正常妊娠妇女, PE 患者胎盘组织中有 8 种 miRNA 表达异常: miRNA-210 上调, miRNA-328、-584、-139-5p、-500、-1247、-34c-5p、-1 下调, 此项结果与以前的研究相一致^[21]。同时 Enquobahrie 等^[23]认为, miRNA-210 主要参与内皮细胞对低氧状态的应答、毛细血管样结构的形成以及血管内皮生长因子(VEGF) 趋化的细胞迁移等过程, 其表达量增高可能主要与胎盘低氧状态相关。而 miRNA-1 主要通过钙调节蛋白 mRNA、Mef2a 以及 Gata4 的负相调控影响钙信号。这些证据均提示, miRNA 可以作为无创性产前诊断的分子标记物, 用于 PE 早期的预测。

3.4 预测胎儿生长受限 Mouillet 等^[24]发现胎盘滋养层 miRNA 是通过缺氧进行调节的, 而这些 miRNAs 与妊娠妇女血清中的胎儿 miRNAs 密切相关; 他们检测和比较正常妊娠妇女与胎儿生长受限(fetal growth restriction, FGR) 的妊娠妇女血清中的胎儿 miRNA, 发现后者的胎儿 miRNA 水平明显增高。最近, Maccani 等的研究报道了胎盘 miRNA 浓度下降与低出生体重直接相关^[25]。107 名足月初产妇的胎盘所表达的 6 种 miRNAs (miR-16、miR-21、miR-93、miR-135b、miR-146a 和 miR-182), 在低出生体重儿的胎盘中 miR-16 和 miR-21 的表达水平明显降低。此外, logistic 回归分析肯定了 miRNAs 的表达与小于胎龄儿 (small for gestational age, SGA) 之间的关系, 证明胎盘 miR-16 的低表达可预测超过 4 倍的机率为 SGA。如果胎盘中 miR-16 和 miR-21 均为低表达, 则为 SGA 的机率更大。进一步研究与胎儿生长有密切相关的 miRNAs 的表达, 将有助于理解其作为 FGR 标记的潜在机制及其临床的使用潜力。

3.5 预测妊娠期糖尿病 妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 与母儿结局密切相关, 对妊娠期糖尿病做出早期风险评估将有助于改

善母儿结局。Zhao 等完成了一个多级研究^[26],旨在调查 25~28 孕周时诊断 GDM 之前血清 miRNA 的预测能力,在初始阶段,他们使用低密度阵列芯片(taqman low density array chips),继以实时 PCR 来系统筛选 16~19 孕周之间收集的血清中的 miRNAs。结果显示将要发展为 GDM 的孕妇血液中有 3 种 miRNAs(mir-29a、mir-222 和 miR-132)浓度明显低于对照组。该研究阐明了 miRNAs 作为 GDM 预后指标的潜在能力,但其临床应用仍然需要进一步的调查和优化。

3.6 预测早产 早产(preterm delivery,PTD)定义为满 28 孕周而不足 37 孕周之前的分娩。早产症状为非特异性,并难以预测哪个孕妇会早产。最近两项研究证明早产孕妇的 miRNAs 表达不同。Montenegro 等用 miRNA 微阵列分析发现早产组与足月产组 39 种 miRNAs 在绒毛膜上的表达有差异性,实时 PCR 证实 miR-338、miR-449、miR-136、和 miR-199a 足月时是减少的^[27]。另一个研究显示早产组的胎盘一部分 miRNAs(如 miR-15b、miR-181a、miR-210、miR-296-3p、miR-483-5p 和 miR-493)的表达发生了变异^[28]。在血清中发现这些 miRNAs 并用于预测早产还有待观察。

3.7 预测复发性流产 复发性流产(recurrent pregnancy loss,RPL)发生在 0.4%~1% 的妊娠中,定义为在 3 次或以上临床可见的妊娠(异位妊娠、宫内妊娠,但不包括生化妊娠)20 孕周之前发生的流产。RPL 的病因经常不清楚,也缺乏诊断证据及治疗方法。基因异常是导致 RPL 的一个重要因素,某些单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms,SNPs)也与 RPL 相关。两项最近的研究调查了 miRNA 多态性与 RPL 的联系。一个研究比较了 217 个 RPL 患者和 431 个正常对照中初级 miRNA(pri-miR)-125a 上的 2 个不同的等位基因,miR-125a 的产物改变增加了中国汉族中一个人群发生 RPL 的风险^[29]。在另一个病例对照研究中,研究人员发现 4 个 miRNA 前体多态性(miR-196a2CC, miR-499AG + GG, miR-196a2CC/miR-499AG+GG combination)和韩国妇女 RPL 的发生有关^[30]。如果确定在不同种族人群中这些 miRNA 多态性和 RPL 之间存在的相似联系将会更有

意义。

4 结语与展望

miRNAs 广泛存在于外周血中,具有稳定性和释放的选择性,其与某些生理病理现象密切相关,对疾病的发生、发展起着重要作用,而且采集外周血的标本相对方便及具有无创性。因此,外周血 miRNA 可望成为新的疾病早期诊断、鉴别诊断及预后判断的无创性生物标志物。

miRNAs 作为一种新型的无创性产前诊断指标,发展前景良好。但是由于相关研究只是在小范围内进行,因此仍需要进行更多大规模的研究来提供证据。虽然对血清中含有许多来源于不同组织和器官 miRNAs 已经很明确,但循环 miRNAs 应用于产前诊断,肿瘤及其他疾病诊断方面还处于初级阶段,单个的 miRNA 标记物在不同的病理条件,即使是相同的疾病,使用一种标记物也是不可靠的方法;而且目前实验样本量较小,检测方法繁琐且价格昂贵,这些都不利于临床应用。如果建立一套标准 miRNA 标记物表达谱,随着技术的进步,在不久的将来,不仅血清或血浆中 miRNA,其它体液中的 miRNA,如尿液和唾液中的 miRNA 也可作为标记物应用于临床,甚至为临床多种疾病提供治疗靶点。

目前大部分研究只是从外周血 miRNA 的表达上调或下调来预测某种或某些疾病,对疾病诊断的特异性研究很少。如果能对其特异性、准确性和规范化方法等全面深入研究,外周血 miRNA 作为新的疾病诊断的无创性标志物的预测就将变为现实。相信随着分子生物学技术的不断发展,孕妇血浆及血清中的胎儿游离核苷酸,特别是 miRNA 必将成为无创性产前遗传病诊断最具临床应用价值的标记物。

参考文献

- [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] 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.
- [3] Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, et al. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray[J].

- PloS One, 2009, 4(7): e6229.
- [4] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. PNAS, 2011, 108(12): 5003-5008.
- [5] Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, et al. Selective release of MicroRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13515.
- [6] Liang Y, Ridzon D, Wong L, et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 166.
- [7] Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2008, 54(3): 482-490.
- [8] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. PLoS ONE, 2008, 3: e3148.
- [9] Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, et al. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 186(1): 158-166.
- [10] Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, et al. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes[J]. Biol Reprod, 2009, 81(4): 717-729.
- [11] Pall GS, Hamilton A J. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1077-1084.
- [12] Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(26): 9740-9744.
- [13] Resnik KE, Alde H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform[J]. Gynecologic Oncology, 2009, 112: 55-59.
- [14] Zhang HH, Wang XJ, Li GX, et al. Detection of let-7a microRNA by real time PCR in gastric carcinoma[J]. World Gastroenterol, 2007, 13(20): 2883-2888.
- [15] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [16] Morley R. Fetal origins of adult disease[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2006, 11(2): 73-78.
- [17] Kuhn DE, Nuovo GJ, Martin MM, et al. Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370(3): 473-477.
- [18] 李艳丽, 柳芳, 梁红艳, 等. 母体血清 miR-125b-2 直接检测应用于无创产前诊断的相关研究[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(15): 4328-4331.
- [19] Yu Z, Han S, Hu P, et al. Potential role of maternal serum microRNAs as a biomarker for fetal congenital heart defects[J]. Med Hypotheses, 2011, 76(3): 424-426.
- [20] Hui Gu, Hui Li, Li Zhang, et al. Diagnostic role of microRNA expression profile in the serum of pregnant women with fetuses with neural tube defects[J]. J Neurochem, 2012, 122: 641-649.
- [21] Pineles BL, Romero R, Montenegro D, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 196(3): 261. e1-6.
- [22] Zhu XM, Han T, Sarqent IL, et al. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies[J]. Am J Obstet Gynecol, 2009, 661: 1-7.
- [23] Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, et al. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 204(2): 178. e12-21.
- [24] Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, et al. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction[J]. Placent, 2010, 31(9): 781-784.
- [25] Maccani MA, Padbury JF, Marsit CJ. miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth[J]. PLoS One 2011; 6(6): e21210.
- [26] Zhao C, Dong J, Jiang T, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus[J]. PLoS One 2011; 6(8): e23925.
- [27] Montenegro D, Romero R, Kim SS, et al. Expression patterns of microRNAs in the chorioamniotic membranes: a role for microRNAs in human pregnancy and parturition[J]. J Pathol, 2009, 217(1): 113-121.
- [28] Mayor LK, Toloubeydokhti T, Cruz AC, et al. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor[J]. Reprod Sci, 2010, 18(1): 46-56.
- [29] Hu Y, Liu CM, Qi L, et al. Two common SNPs in pri-miR-125a alter the mature miRNA expression and associate with recurrent pregnancy loss in a Han-Chinese population[J]. RNA Biol, 2011, 8(5): 861-872.
- [30] Jeon YJ, Choi YS, Rah H, et al. Association study of microRNA polymorphisms with risk of idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women[J]. Gene, 2012, 494(2): 168-173.

编辑: 郁君

(收稿日期: 2014-05-06)