

· 综述 ·

循环 miRNA 检测方法研究进展及其临床应用

赵莹莹 邢卉春

microRNA (miRNA) 是一种保守的、非编码的小RNA, 长度约为22个核苷酸。首次发现于*Caenorhabditis*线虫体内, 现有的技术已发现1 000多种microRNA。miRNA存在于低级生物、植物、高等动物等多种生物中, 在正常与疾病状态下, 参与调节免疫、细胞周期、生物代谢和凋亡等多个生物过程^[1-4]。多数(保守进化的) miRNA由RNA聚合酶 II 指导转录, 通过miRNA特定的seed序列(5'-末端2~8个核苷酸)及其互补序列碱基来识别靶mRNA 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)末端的位点^[5], 从而阻断翻译, 使靶mRNA降解, 或负性调控靶基因的表达, 减弱蛋白翻译, 发挥靶mRNA的转录后调控作用^[6-8], 因此, 在生命过程中, 某些miRNA表达的缺失或过度表达, 会引起某些系统组织及细胞分化代谢及凋亡等异常^[5]。有些miRNA仅表达于特定组织、器官或高表达于某些组织、器官, 称为组织、器官特异性miRNA, 例如miRNA-122是肝脏组织特异性miRNA。近年来发现miRNA不仅存在于某些组织, 而且还存在于细胞外液体。大量研究表明循环miRNA(血浆或血清miRNA)在疾病诊断中的也具有一定参考价值。本文就循环miRNA在疾病诊断中的应用进行综述。

一、miRNA 的检测及分析方法

1. 荧光实时逆转录定量 PCR (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR): 该方法是定量检测 miRNA 的金标准, 可以对 miRNA 进行相对定量和绝对定量检测^[9], 可较直观地检测 miRNA 的表达水平。利用阳性梯度标准品的Ct值制成标准曲线, 在得到样本的Ct值后, 可在标准曲线上根据直线回归计算出待测样本的初始拷贝数。与传统的PCR方法相比, 简便、省时, 扩增后不需使用凝胶电泳、DNA测序和Southern blot等方法, 而是直接对待测样本实时定量; 同时, 从逆转录开始到完整的定量结束的整个过程都可实现自动化; 并且循环阈值的变异系数在2%以下(传统PCR的变异系数约为14%), 故测定偏差较小; 由于荧光素种类以及检测光源种类的局限性, 从而相对地限制实时定量RT-PCR的多重检测应用能力^[10-11]。总而言之, 该方法整合了荧光定量PCR

及逆转录PCR的优点, 可以精确测量和鉴别特异性核酸, 误差小, 而且具有灵敏度和特异性高、可重复性、高自动化、无污染、实时和准确等特点。

2. Northern blot方法及其改进方法: Northern blot方法在定量检测miRNA中发挥着重要作用, 其优点是可以鉴定miRNA的分子量大小, 可以同时显示多个miRNA的分子量大小及浓度; 传统的Northern blot杂交包括通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)分离到小RNA片段; 将分离的RNA转到尼龙膜上; 用带有³²P标记的探针与之杂交、并检测目的片段。但Northern blot也有其局限性, 操作过程复杂、耗费时间长, 增加了目的片段被RNA酶降解的风险; 同时miRNA不易结合于固相杂交膜上, 因此会浪费大量RNA标本, 敏感性很低, 经常会导致检测低丰度的miRNA时无结果。此外, 这种类型的杂交, 是基于放射性探针和甲醛的, 对人和环境都存在着很大的安全隐患。Wang等^[12]对传统Northern blot进行改进, 形成液相Northern blot杂交, 该方法检测miRNA简便、快捷、准确、费用少; 如果用多种荧光探针的话, 可以同时检测多种miRNA。与传统的Northern blot杂交不同, 液相Northern blot选用荧光素FITC或Cy3作为标记探针的标记物, 避免产生放射性物质; 在杂交过程中, 不使用尼龙膜, 使用磷酸钠缓冲液(30 mmol/L, pH = 8.0)、NaCl溶液(0.3 mmol/L)和EDTA(10 mmol/L)混合而成的杂交缓冲液; 然后杂交后的样本进行非变性10% TBE-聚丙烯酰胺凝胶或10% TAE-聚丙烯酰胺凝胶电泳(90 V, 电泳40 min); 最后用Quantity One软件根据荧光图像对miRNA进行定量分析。该方法可以检测到普通Northern blot杂交无法检测到的miRNA, 并且可以区分miRNA和普通mRNA; 该方法在定量分析方面, 结果显示荧光素与miR156的浓度有很好的线性关系($C = 2.35E-5 * Int. - 0.121$, $R^2 = 0.998545$), 并且能精确定量。Northern blot用RNA探针杂交的方法进行定量, 不需要反转录, 也可用来检测基因的组织特异性表达, 即基因在不同组织间表达差异等, 避免了逆转录过程导致的误差; 但是缺点如上所述, 过程较长、步骤繁琐、可能出现RNA的降解。

3. 原位杂交方法(in situ hybridization): 原位杂交技术可以观察细胞内相应的mRNA、rRNA和tRNA分子。基于荧光原位杂交技术(FISH)的miRNA的典型可视检测方法是使用锁核酸(locked nucleic acid,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.01.030

基金项目: 首都医学科学发展基金(No. 2007-3054); 国家自然科学基金(No. 81201160); 国家科技重大专项课题(No. 2014ZX10005001)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院肝病三科

通讯作者: 邢卉春, Email: hchxing@sohu.com

LNA) 探针。LNA是由一类新型的双环高亲和的RNA类似物组成, 其中的核糖环通过亚甲桥连接2'-O原子和4'-C原子而被锁定。桥锁定3'-内结构构象中的核糖, 该构象通常在A型DNA或RNA中出现。因此, LNA探针对RNA靶标有显著的热稳定性和杂交特异性。但LNA-FISH技术是不能提供精确的miRNA表达的定量信息, 仅限于提供miRNA定位类型和组织分布的定性信息。荧光标记的锁核酸LNA探针已经应用于定量检测不同组织miRNA的表达, 酶标记荧光技术联合LNA探针也可以检测单个细胞内miRNA的拷贝数。miRNA原位杂交技术(miRNA in situ hybridization, MISH)是指用2'-氟修饰的miRNA探针联合酶标记荧光(enzyme-labeled fluorescence, ELF)信号扩增技术^[13]。ELF是一种通过磷酸酶裂解产生荧光信号放大的技术, 磷酸酶产生黄绿色的荧光沉积物, 比单个荧光素的亮度要强40倍, 使得待鉴定的单个miRNA的明亮、耐光的荧光点被荧光显微镜成像简单地计算出来。该技术可以计算单一细胞内miRNA拷贝数的绝对定量。LNA-ELF-FISH是另一种改进的原位杂交技术, 可以看成是一种与传统的miRNA分析方法(如实时定量PCR)提供了互补方法。该技术可在原位的单一细胞中看见单个miRNA分子, 是传统FISH方法最小的扩展, 仅需要增加ELF信号方法, 使单个miRNA产生很亮的荧光信号。固体吸收光子(吸收)的能量将大于辐射光子(发光), 因此, 发光光谱与吸收光谱相比, 将向能量较低的方向偏移(红移), 两个光子能量的差值称为斯托克斯谱位移(Stokes shift)。由于荧光ELF沉积物存在斯托克斯谱位移, 因此背景荧光极小、光稳定性高; 可定量和重现miRNA的表达, 动态范围可扩大到3个数量级(即每个细胞内1~1 000个miRNA)。由于FISH不需要细胞裂解、miRNA纯化或样品富集过程, 所以细胞内的部分遗传、生物信息也能保留。LNA-ELF-FISH也可以提供miRNA的位置和miRNA在细胞间表达的差异^[14]。

4. miRNA微阵列/芯片(microRNA microarray): 常用的miRNA微阵列有Agilent、Ambion、Exiqon、Invitrogen和Toray共5种。miRNA芯片是一个初筛工具, 不仅可以检测miRNA表达的类型而且可以对其表达进行定量分析。应用芯片检测miRNA的表达有以下几个优点: ①可以1次在同一份样品中同时检测几百个基因的整体表达, 可以高通量分析miRNA表达的时空特异性、不同样本中miRNA的差异表达, 进而进行靶基因分析、功能注释、通路分析、网络分析等, 以了解miRNA在疾病发生中的作用。②通过仔细地设计寡核苷酸探针, 成熟和前体的miRNA分子都可以检测到。③与深度测序不同, miRNA芯片针对已知miRNA进行研究, 鉴定已知的miRNA, 不受温度的影响, 也不受表达相似的miRNA家族影响或转录后修饰的

影响, 但其缺点是操作繁琐、费用昂贵等^[15-16]。④与Northern blot方法相比, 芯片对miRNA检测需要量的待测标本量相对较小, 只需2.5 μg总RNA即可。该方法为分析已知miRNA在不同条件下跨物种的表达提供了可能性; 破译正常及疾病状态下miRNA组学的表达, 可能会揭示肿瘤发生过程中新的致病途径。靶标记(生物素-ddUTP)、杂交、处理过程与传统方法不同, 在载片处理过程中, 藻红蛋白链霉亲和素进行两次染色使总体信号水平增加了数倍, 因此, 可以轻易从背景噪音中区分出原始信号强度值^[17]。

二、循环 miRNA 与疾病的关系

近几年的研究发现, 除了特定的组织细胞存在着miRNA外, 其他组分也含有miRNA, 如血液成分、唾液、尿液和精液等^[18-19]也含有miRNA, 但是机体在不同状态下miRNA含量和分布各有不同, 如miR-105*、miR-449-3p和miR-514仅存在于正常人的体液中, 而miR-620和miR-125a-3p仅发现于癌症人群中^[20]。

血液中的miRNA又称为循环miRNA; 血浆miRNA很稳定, 不易被RNA酶分解。在固定的温度、湿度且无紫外线、无灰尘的储存条件下存满一年的血液标本不仅含有miR-185、miR-106a和miR-144, 而且与新鲜血液标本的绝对含量相差无几^[21]; 室温下放置24 h, 或反复冻融8次的血浆标本, 所含的miRNA量与新鲜血浆miRNA含量无显著性差别, 血清和血浆microRNA含量有相关性, 因此都可以作为基于血液检测上的疾病诊断标记物^[22], 不同疾病的循环miRNA对疾病诊断的敏感性和特异性也有其各自的特点^[23-24]。大量的研究提示循环miRNA有作为疾病诊断标记物的潜能。

1. 循环miRNA与呼吸系统疾病: 慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是由于炎症导致气管壁的损伤-修复过程反复发生, 导致气管结构重塑、胶原含量增加及瘢痕形成, 经证实COPD肺组织表达的miRNA与健康肺组织不同, Akbas等^[25]用定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)方法, 在20例患者及12例健康志愿者的血清样本中定量检测了72种血清miRNA的水平, 结果发现5种miRNA与健康对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$), 其中miR-20a、miR-28-3p、miR-34c-5p和miR-100的表达下调, 而miR-7表达却上调。

基因组血清miRNA表达分析发现非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者miR-1($P < 0.05$)和miR-499($P < 0.001$)表达水平降低, miR-30d($P < 0.001$)和miR-486的表达增加($P < 0.001$), 这4种miRNA的表达与患者的整体预后相关, 是预后的独立的相关因素, 而Let-7f($P = 0.038$)和

miR-30e-3p ($P = 0.009$) 则水平的低于健康人, 且与患者的整体的生存相关^[23], 尤其是较短的无病生存期 (disease-free survival)。

2. 循环 miRNA 与循环系统疾病: Zhu 等^[26] 研究了 33 例急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 患者的血浆 4 种 miRNA, 即 3 种肌肉相关性 miRNA (miR-1、miR-133a、miR-499) 及 1 种心肌特异性 miRNA (miR-208a), 其水平明显高于健康者 ($n = 30$, $P < 0.01$)、无 AMI 的冠状动脉心血管疾病的患者 ($n = 16$, $P < 0.01$) 及其他心血管疾病的患者 ($n = 17$, $P < 0.01$)。非 AMI 患者的血清检测不到 miR-208a, 但 90.9% 的 AMI 患者可以检测到, AMI 患者在症状出现 4 h 后, 100% 可检测到 miR-208a; ROC 曲线证明 miR-208a 诊断 AMI 有较高的准确性 ($AUC = 0.965$, 95%CI: 0.920 ~ 1.0000)。Tijssen 等^[27] 通过比较健康人、呼吸困难及呼吸功能正常的心衰 (heart failure, HF) 患者血清的 16 种 miRNA 水平, 结果表明 miR18b*、miR129-5p、miR1254、miR675、HS_202.1、miR622 和 miR423-5p 在心功能衰竭患者血液的表达都增加, 但仅 miR423-5p 最具有诊断价值, ROC 曲线分析表明 miR423-5p 是心功能衰竭的诊断标记物 ($AUC = 0.91$, $P < 0.001$, 95%CI: 0.84 ~ 0.98)。

3. 循环 miRNA 与消化系统疾病: Cheng 与美国德克萨斯州 Cogdell 等^[28] 在天津及美国德克萨斯州选取了年龄、性别相匹配的两组不同种族人群, 针对手术及治疗前留取每位受试者的血浆及肿瘤、癌旁组织标本, 检测表达 3 种候选 miRNA (miR-21、miR-92、miR-141) 水平与癌症分期 (I ~ IV 期) 的关系, 同时检测与之相对应的血浆 CEA 水平。Spearman 相关性检验表明 miR-141 与结肠癌分期密切相关 ($r = 0.605$, $P = 1.17 \times 10^{-8}$), IV 期结肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患者血浆 miR-141 的水平显著高于健康人及 I、II、III 期 CRC 患者; miRNA-141 鉴别不同分期的灵敏度、特异度分别为 66.7% 和 80%, Kaplan-Meier 生存曲线分析表明血浆 miRNA-141 与两个中心患者的不良预后相关 ($P < 0.05$), 是两个不同研究中心肿瘤切除术后生存率的独立相关因素 ($HR = 2.4$, 95%CI: 1.18 ~ 4.86)。

Wu 等^[29] 应用 miRNA 芯片及 qRT-PCR 检测人类相关的 miRNA 发现, 与健康人相比, 活动性克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 患者血清有 5 种 miRNA 显著增加, 2 种 miRNA (149*、miRplus-F1065) 显著下降; 溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 患者血液中 12 种 miRNA 增加、miRNA-505* 显著下降。与克罗恩病患者相比, UC 患者血液 10 种 miRNA 显著增加 ($P = 0.001$): miRplus-F1159、miR-3180-3p、miRplus-E1035、miRs-28-5p、miR-103-2*、miR-

149*、miR-151-5p、miR-340*、miR-532-3p 和 miR-plus-E1153; 1 种明显下降了 7.2 倍: miR-505* ($P = 0.001$)。血清 miR-18 可作为 HCC 的无创性筛选标记物。首先通过 qRT-PCR 分别检测 15 例 HBV、HCC 患者血清标记物 (miR-95、miR-18a、miR-10b、miR125a 和 miR-378) 的水平, 并在另外一组受试者 (86 例 HCC 患者、30 例肝炎或肝硬化、45 例健康志愿者) 血清样本进行验证, 结果发现 HBV 相关性 HCC 血清 miR-18a 水平显著增高 ($P < 0.01$), 血清 miR-378 水平显著降低 ($P < 0.05$), ROC 曲线分析表明, 于肝炎或肝硬化患者中, 血清 miR-18a 无创性诊断 HBV 相关性 HCC 敏感性为 86.1%、特异性为 75.0%, 可以在慢性肝炎、肝硬化患者及 HCC 患者中筛选出 HCC^[30]。

4. 循环 miRNA 与泌尿系统疾病: Neal 等^[31] 选取了 5 个肾脏相关性的 miRNA (miR-16、miR-21、miR-210、miR-638 和 miR-155), 应用 Mann-Whitney U 检验方法, 研究了上述循环 miRNA 在慢性肾脏疾病 (chronic kidney diseases, CKD) 及健康人体内表达的情况。结果发现, 循环 miRNA 水平的下降与肾小球滤过率估计值 (the estimation of glomerular filtrate rate, eGFR) 相关 ($P \leq 0.0001$; $r = 0.553$), 4 期 CKD 与肾功能衰竭终末期 (end-stage renal disease, ESRD) 患者 miRNA miR-210、miR-16 和 miR-155 的浓度较健康人的 miRNA 水平表达低, 差异具有统计学意义 ($P \leq 0.0001$, $P = 0.024$, $P = 0.002$)。健康人、CKD 及 ESRD 的患者体内, 上述 5 种血清 miRNA 表达水平依次降低, 差异具有统计学意义 ($P \leq 0.01$)。4 期 CKD 患者血清 miR-210、miR-16 和 miR-638 的表达水平高于 ESRD 患者, 差异具有统计学意义 ($P = 0.003$, $P \leq 0.0001$, $P = 0.036$)。

5. 循环 miRNA 与血液系统疾病: 我国学者应用微阵列基因芯片技术筛选典型急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 患儿样本中差异性表达的 miRNA, 并应用生物信息学预测、双报告基因检测、RT-PCR 和 Western blot 等方法, 在典型 ALL 患儿样本中检测的 2 006 个 miRNA 中, miR-708、miR-181b 和 miR-210 表达量与正常对照组相比表达均上调 ($P < 0.05$), miR-27a 和 miR-345 表达量较正常对照组下调 ($P < 0.05$), miR-708 和 miR-181b 在 ALL 高危组 (预后差) 患者中表达水平高于中危组和低危组 ($P < 0.05$), 发现其中 miR-708 是高危型典型 ALL 重要的调控因子, 参与 ALL 某些癌基因及凋亡抑制基因的表达调控^[32]。

我国学者应用 Solexa 测序法分析了急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 全基因组血清 miRNA 的表达情况, 对 140 例新确诊的 AML 及 135 例健康人进行研究, 结果发现, AML 患者有 6 种血

清miRNAs (miR-10a-5p、miR-93-5p、miR-129-5p、miR-155-5p、miR-181b-5p和miR-320d)的表达水平显著与健康人不同(是健康人的2.31~5.53倍);此外,血清miR-181b-5p的水平有作为AML患者整体生存期的可能预测因素:低表达的患者生存期长于高表达的患者($P = 0.042$)^[33]。有学者应用TaqMan miRNA芯片及qRT-PCR检测了AML患者血浆miRNA的表达情况^[34],研究发现与正常人相比,AML患者血浆let-7d、miR-150、miR-339和miR-342的水平下降,let-7b和miR-523表达增加,回顾性分析发现,ROC曲线证实miR-150及miR-342诊断AML的准确性分别为AUC = 0.835 (95%CI: 0.7119~0.9581, $P < 0.0001$)、AUC = 0.8125 (95%CI: 0.6796~0.9454, $P = 0.0005$);因此,联合应用血浆miR-150和miR-342有可能作为诊断AML的诊断标记物。

6. 循环miRNA与风湿性疾病:系统性红斑性狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种表现有多系统损害的慢性系统性自身免疫病,本病程以病情缓解和急性发作交替为特点,有内脏(肾、中枢神经)损害者预后较差;几乎所有患者的肾组织都有病理变化,活动性SLE中血红蛋白下降、白细胞和(或)血小板减少常见。Wang等^[35]研究发现,SLE患者血清miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-429、miR-205和miR-192水平低于健康对照组;肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)与血清miR-200b ($r = 0.411$, $P = 0.008$)、miR-200c ($r = 0.343$, $P = 0.030$)、miR-429 ($r = 0.347$, $P = 0.028$)、miR-205 ($r = 0.429$, $P = 0.006$)以及miR-192 ($r = 0.479$, $P = 0.002$)水平相关;蛋白尿与血清miR-200a ($r = -0.375$, $P = 0.017$)、miR-200c ($r = -0.347$, $P = 0.029$)水平负相关;SLE疾病活动性指数(SLE disease activity index, SLEDAI)与血清miR-200a ($r = -0.376$, $P = 0.017$)水平呈负相关关系;血清miR-200b ($r = 0.455$, $P = 0.003$)、miR-192 ($r = 0.589$, $P < 0.001$)与血小板计数相关,然而血清miR-205的水平与红细胞计数($r = 0.432$, $P = 0.005$)及血细胞比容($r = 0.370$, $P = 0.019$)相关。这些证明血清miRNA的水平与SLE疾病密切相关。

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)发病机制不尽相同,是慢性、进行性、侵蚀性疾病,早期诊断、早期治疗至关重要,应与骨关节炎(osteoarthritis, OA)相鉴别。Murata等^[36]研究了检测了RA患者、OA患者及健康人滑膜液及血浆的miR-16、miR-132、miR-146a、miR-155和miR-223水平,研究发现明确诊断为RA或OA患者的血浆miR-132水平低于健康人($P < 0.01$),血浆miR-132可以很好地鉴别RA或OA,血浆miR-132检测RA的临界值(cut-off value)为67.8 pmol/L,其敏感性和特异性分别为

83.8%和80.7%,检测OA的临界值为67.1 pmol/L,其敏感性和特异性分别为84.0%和81.2% (AUC > 0.90),表明准确性较高。因此,血浆的miRNA的表达情况对于鉴别RA及OA有些困难,但是回顾性分析发现,RA患者滑膜液miR-16、miR-146a、miR-155和miR-223高于OA患者,且差异具有统计学意义(分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.05$)。此外,滑膜液与血浆miRNA浓度的比值SF/PB也能区分RA与OA:RA患者的miR-16、miR-146a、miR-155和miR-223的SF/PB高于OA患者(分别为 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.01$)。因此,血浆miRNA可以作为RA及OA的诊断性标记物,用于分析其疾病进展。

总之,miRNA具有高度的保守性、时序性、组织特异和稳定性等特点,参与正常与疾病状态下的多种生物过程。随着分子生物学技术的发展,新的miRNA的检测技术不断更新,如miRNA基因芯片、实时定量逆转录PCR、深度测序等技术,为检测各种组织、液体的miRNA提供了可能。对miRNA的研究也不仅限于某个miRNA的家族,而是全体miRNA库。通过大规模的筛选,检测出不同组织、标本表达差异的miRNA,经RT-PCR验证,发现了很多miRNA有作为疾病诊断标记物的可能。正是因为循环miRNA的稳定、可检测、可预测、可靠、无创以及敏感性高等特点,因此,循环miRNA在疾病诊断方面可能有广阔的应用前景,但是可能也会存在一些不可避免的问题,如费用昂贵,因为目前还尚未有大规模的临床使用,故费用可能会相对较高;另外,不同的miRNA与不同疾病的相关性还需进一步验证;当某种特定的miRNA应用于疾病的诊断时,还需要进一步确定统一的量化标准或参考范围等。

参考文献

- 1 Catherine J. Liver-specific microRNA-122 Biogenesis and function[J]. RNA Biology, 2012, 9(2):137-142.
- 2 Berkhout B, Jeang KT. RISCy business: microRNAs, pathogenesis, and viruses[J]. J Biol Chem, 2007, 282(37):26641-26645.
- 3 Chen PY, Meister G. MicroRNA-guided posttranscriptional gene regulation[J]. Biol Chem, 2005, 386(12):1205-1218.
- 4 Masyuk T, Masyuk A, LaRusso N. microRNA in cholangiocarcinomas[J]. Cell Cycle, 2009, 8(9):1324-1328.
- 5 Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in Immunity and Disease[J]. Mol Biol Int, 2011(2011):437301.
- 6 Chen PY, Meister G. microRNA-guided posttranscriptional gene regulation[J]. Biol Chem, 2005, 386(12):1205-1218.
- 7 Li M, Marin-Muller C, Bharadwaj U, et al. MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease[J]. World J Surg, 2009, 33(4):667-684.
- 8 Carleton M, Cleary MA, Linsley PS, et al. MicroRNAs and cell cycle regulation[J]. Cell Cycle, 2007, 6(17):2127-2132.
- 9 Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang JR, et al. Real-time PCR quantification

- of precursor and mature microRNA[J]. *Methods*, 2008, 44(1): 31-38.
- 10 郭志伟, 钟照. MicroRNA的组织特异性表达及其检测方法[J]. *国际免疫学杂志*, 2010, 33(5): 367-370.
- 11 景花, 宋沁馨, 周国华. MicroRNA定量检测方法的研究进展[J]. *遗传*, 2010, 32(1): 31-40.
- 12 Wang XS, Tong YG, Wang SH. Rapid and accurate detection of plant miRNAs by liquid northern hybridization[J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(9): 3138-3148.
- 13 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.
- 14 LU J, Tsourkas A. 应用改进荧光原位杂交技术(FISH)定量分析单一细胞内miRNA的表达[J]. *生命科学仪器*, 2010, 8(6): 10-13.
- 15 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.
- 16 Sun Y, Koo S, White N, et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(22): e188.
- 17 Válczei 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.
- 18 Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers[J]. *Oral Dis*, 2010, 16(1): 34-38.
- 19 Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5473-5477.
- 20 Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA Spectrum in 12 Body Fluids[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(11): 1733-1741.
- 21 Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation[J]. *Int J Legal Med*, 2010, 124(3): 217-226.
- 22 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.
- 23 Cho WC. Circulating microRNAs as minimally invasive biomarkers for cancer theragnosis and prognosis[J]. *Front Genet*, 2011, 2: 7.
- 24 Wang G, Tam LS, Li EK, et al. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2011, 20(5): 493-500.
- 25 Akbas F, Coskunpinar E, Aynaci E, et al. Analysis of serum microRNAs as potential biomarker in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Exp Lung Res*, 2012, 38(6): 286-294.
- 26 Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease[J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2011, 1(2): 138-149.
- 27 Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure[J]. *Circ Res*, 2010, 106(6): 1035-1039.
- 28 Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, et al. Circulating plasma miR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17745: 1-16.
- 29 Wu F, Guo NJ, Tian H, et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(1): 241-250.
- 30 Li L, Guo Z, Wang J, et al. Serum miR-18a: a potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening digestive diseases and sciences[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(11): 2910-2916.
- 31 Neal CS, Michael MZ, Pimlott LK, et al. Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(11): 3794-3802.
- 32 李雪, 李栋, 庄泳, 等. miR-708在儿童普通急性淋巴细胞白血病中的表达及调控机制[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(2): 138-143.
- 33 Zhi F, Cao X, Xie X, et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56718.
- 34 Fayyad-Kazan H, Bitar N, Najjar M, et al. Circulating miR-150 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia[J]. *J Transl Med*, 2013, 11(31): 1-10.
- 35 Wang G, Tam LS, Li EK, et al. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2011, 20(5): 493-500.
- 36 Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3): R86.

(收稿日期: 2014-06-07)

(本文编辑: 孙荣华)

赵莹莹, 邢卉春. 循环miRNA检测方法研究进展及其临床应用[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2015, 9(1): 111-115.