

人体体液中细胞外 microRNA 的起源、功能及潜在诊疗价值

张甦洋¹⁾ 谢佳昀²⁾ 梁宏伟¹⁾ 陈 熹¹⁾ 张辰宇^{1)*}

(¹⁾ 南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093; ²⁾ 广东实验中学, 广州 510055)

摘 要 最近大量的研究表明 micro RNAs(miRNAs)是一类重要的调控因子。曾经被认为是非常不稳定的 RNA 分子——miRNA, 却可以稳定存在于血液和其他体液中。更加重要的是, 细胞外 miRNAs 被发现和多种疾病密切相关, 它们可以作为诸如肿瘤等各种疾病的非侵入性生物标志物。然而, 目前关于细胞外 miRNA 的来源以及生物学功能还不甚清楚。本文将总结最近细胞外 miRNA 的研究进展, 并将重点介绍细胞外 miRNA 在疾病诊断及治疗中的作用。

关键词 microRNA, 细胞外 microRNA, 分泌, 微囊泡, 胞外体, 脱落囊泡, HDL, 细胞间通讯

学科分类号 Q527

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00260

MicroRNAs(miRNAs)是一类长约 19~23 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA 分子^[1-3]。miRNAs 最早于 20 世纪 90 年代早期在秀丽隐杆线虫体内被鉴定^[4], 至今已发现它广泛存在于包括单细胞藻类、植物、动物等各种有机生物体内, 这提示 miRNA 是一种古老而极其重要的细胞调控元件。miRNA 序列以及 miRNA 生成过程在进化上的高度保守性进一步提示了 miRNA 在功能上的重要性。另外, 基因组中编码 miRNAs 的数量可能与进化过程的复杂性有关。miRNAs 的发现使真核生物的基因表达调控研究上升到了一个新的层面, 通过生物信息学预测发现, 在哺乳动物中 miRNAs 能调控超过 60%的基因^[5]。miRNAs 通过与靶 mRNA 分子的 3'非编码区域(3'-UTR)互补配对, 抑制靶 mRNA 的翻译或者特异性地切割靶 mRNA, 从而实现对靶基因的调控^[1-2]。目前发现 miRNA 在诸如细胞分化、迁移、增殖、凋亡、发育和新陈代谢等各种生理病理过程中都发挥了重要的调控作用^[1-2], 同时 miRNA 表达的紊乱也与人类的各种疾病息息相关^[5-7]。

先前的研究大多集中在细胞内的 miRNAs, 但最近的研究显示在血浆和血清中, 也同样稳定存在着 miRNAs。此外越来越多的研究表明, miRNAs

也能稳定存在于包括唾液^[8]、尿液^[9]、乳汁^[10]、精浆、眼泪、羊水、支气管肺泡灌洗液、脑脊髓液、腹膜液和胸膜液^[11-12]等各种体液中, 并且在不同种类的体液中, 细胞外 miRNAs 的含量与种类都存在明显不同^[13]。更重要的是, 细胞外 miRNA 在体液中的含量和组成与包括癌症、糖尿病和组织损伤在内的各种疾病也密切相关。这些结果不仅提示了细胞外 miRNA 可以作为疾病诊断的生物标志物, 而且也揭示了人体中一种新型的由细胞外 miRNA 介导的细胞间通讯方式。在这篇综述中, 我们将总结并探讨到目前为止关于细胞外 miRNAs 来源和功能的研究进展, 并将着重介绍细胞外 miRNA 的存在形式以及由其介导的细胞间通讯。

1 人类体液中细胞外 miRNAs 的来源

1.1 器官分泌的 miRNA 可以在体液中稳定存在

自从 2008 年在血清和血浆中鉴定出细胞外 miRNA 以来^[14-15], 到目前为止, 已有超过 600 篇文章报道这种血清/血浆内 miRNA 可以作为各种疾

* 通讯联系人。

Tel: 025-83686234, E-mail: cyzhang@nju.edu.cn

收稿日期: 2013-06-13, 接受日期: 2013-06-26

病的生物标志物. 但极少有研究探讨血清/血浆中 miRNA 的来源以及影响血清/血浆中 miRNA 种类及含量的因素. 在循环系统中检测到的血清/血浆中 miRNA 究竟是由于细胞破裂, 尤其是血细胞的破裂所释放出来的, 还是细胞主动分泌出来的, 这个问题到目前为止还没有明确的答案(图 1). 现在比较公认的理论是, 由于血清/血浆中存在大量血细胞, 所以血清/血浆中的 miRNA 绝大部分可能来自于血细胞. 目前支持这种假设的主要证据是只要血细胞的数量发生即使小小的一点波动甚至是溶

血都会造成血清/血浆中 miRNA 含量发生变化. 另外, 大量研究表明, 绝大多数实体瘤相关的血浆 miRNA 在血细胞中含量很高, 并且其表达水平也与血细胞数目相关^[16-18]. 这些结果都表明, 血浆和血清中的 miRNA 可能主要来源于血细胞. 然而, 其他的组织对于细胞外 miRNA 种类以及含量也有显著的影响, 其最明显的证据就是在血浆中也稳定存在着组织特异性的 miRNA, 例如肝脏特异的 miR-122、肌肉特异的 miR-133a、心脏特异的 miR-208a、脑组织特异的 miR-124^[18-22].

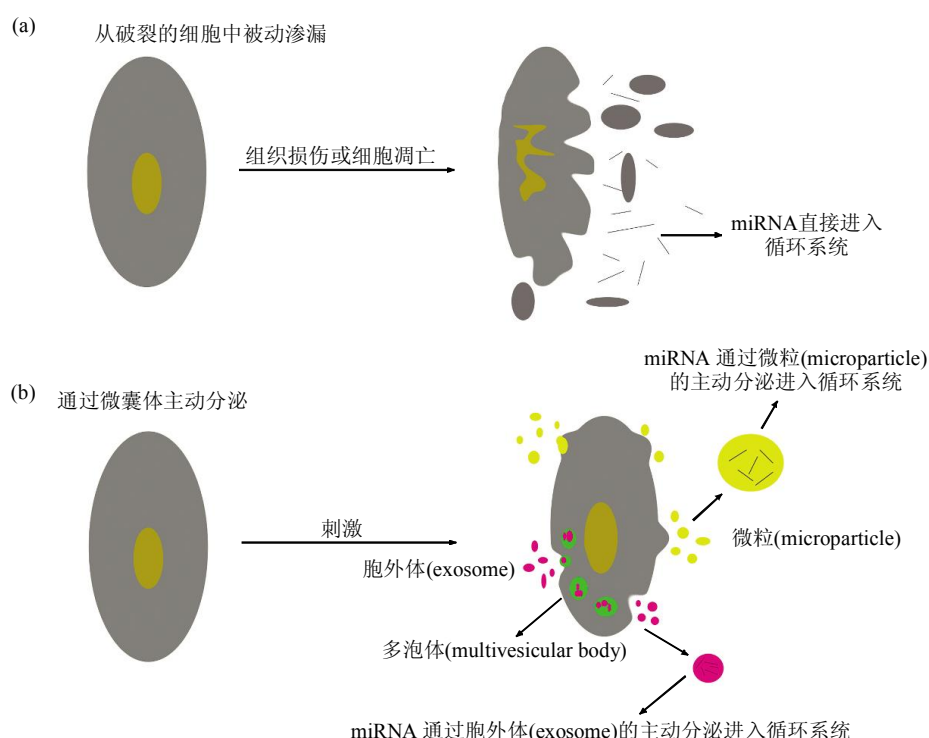


Fig. 1 The sources of circulating miRNAs

图 1 循环 miRNA 的可能来源

(a)从破裂细胞被动渗漏. (b)通过源自细胞的微囊泡的主动分泌.

此外, 肿瘤细胞也会主动释放 miRNA 进入血液循环系统. 在疾病发生的不同阶段, 很多肿瘤特异性的 miRNA 会在循环系统中被检测到, 并且大量的研究表明此时血浆或血清中的 miRNA 与肿瘤特异性 miRNA 有相同的变化趋势. 例如, Brase 等^[23]发现在前列腺癌患者体内, 血清和组织样本中都可以检测到 miR-375 和 miR-141 的高表达. 在前列腺癌患者血浆和组织样本中同样也能检测到 5 种 miRNA(miR-17-3p, miR-135b, miR-222, miR-92 和 miR-95)的高表达^[24]. 这些数据有力地证明了肿瘤细胞存在着一种机制, 能够适当地选择特定

miRNA 并主动释放到循环系统中. 然而, 无论在病理状态下还是正常状态下, 器官和组织对于血浆和血清内 miRNA 水平的影响能达到何种程度, 仍需要进一步的实验去阐明.

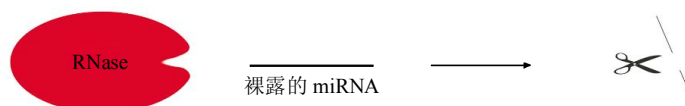
在血浆和血清中的 miRNA 得到广泛研究的同时, 也有研究集中于诸如唾液、尿液和乳汁等其他体液中 miRNA 的鉴定和功能. 尽管还没有被证实, 但有充分的理由相信唾液腺、肾脏和乳腺很可能分别是唾液、尿液和乳汁中细胞外 miRNA 的来源.

1.2 miRNA 进入细胞外介质的分子机制

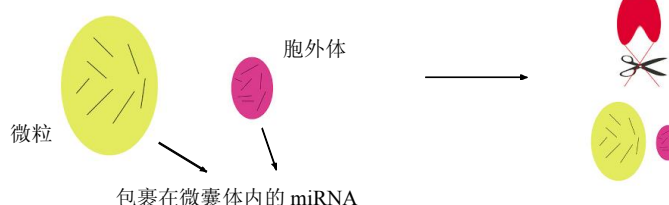
尽管核糖核酸酶在循环系统中无处不在, 但细胞外 miRNA 仍然能够以很高的浓度和高度的完整性在体液中进行循环. 这充分表明了细胞外 miRNA 存在某种机制以保护他们不被降解. 目前提出了几种关于细胞外 miRNA 稳定性和起源的模型(图 2): a. 细胞通过微囊泡(microvesicle)包裹分泌出的 miRNA, 这样使它们免受细胞外 RNA 酶的影响. 目前已发现的可以作为 miRNA 载体的囊泡包括胞外体(exosomes)和脱落囊泡(shedding vesicles)两种. Exosomes^[25-28]是一种由多泡体(MVB)产生, 通过胞吐释放, 大小在 30~100 nm 的囊泡. Shedding vesicles 大小在 100~1000 nm 之间, 主要通过质膜向外出芽或分裂产生并释放^[26, 29]. b. 细胞分泌的

miRNA 通过与某些蛋白结合, 形成蛋白质-miRNA 复合物从而包含 miRNA 不被降解. 例如, 最近的研究发现 miRNA 可以和高密度脂蛋白(HDL)结合, 形成脂蛋白-miRNA 复合体的形式来保护 miRNA 不被降解^[30]. AGO2 是一种 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)的执行元件, 在细胞中直接与 miRNA 结合并介导了 mRNA 抑制^[31-32]. 最近有研究表明, 大部分血浆/血清中 miRNA 和 AGO2 结合, 并且可以稳定存在, 由此推测 AGO2 可能在循环系统中避免了 miRNA 被 RNA 酶降解. 此外, 还有研究发现一种 RNA 结合蛋白 NPM1 也可以和细胞外 miRNA 结合^[33]. c. 研究表明组织和细胞中的 miRNA 可以通过甲基化^[34]、腺苷化^[35]、尿苷化^[36]等修饰方式趋向稳定, 因此, 有理由推测循环

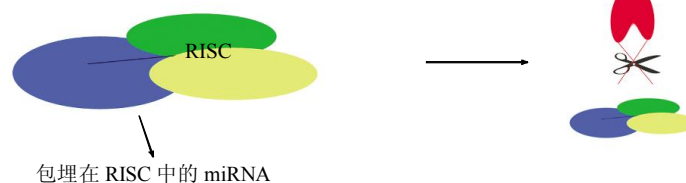
(a) 裸露的 miRNA 在恶劣条件下不稳定



微囊体对循环 miRNA 的保护



(b) RISC 对循环 miRNA 的保护



(c) 化学修饰对循环 miRNA 的保护

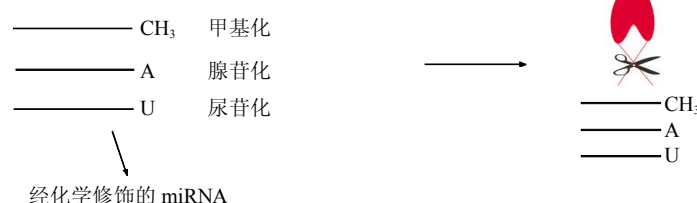


Fig. 2 Molecular basis of the high stability of circulating miRNAs

图 2 循环 miRNA 高稳定性的可能分子机制

(a)循环 miRNA 被包裹入微囊泡. (b)循环 miRNA 与蛋白分子结合. (c)循环 miRNA 被修饰.

miRNA 也通过化学修饰的方式增加其稳定性。但是, 目前仍没有确切的研究表明循环 miRNA 是否被甲基化、腺苷化或尿苷化。

由于细胞外 miRNA 具有不同的来源和形式, 对这些 miRNA 进行分类并且了解这些 miRNA 的功能是必要的。通过微囊泡和 HDL 分泌 miRNAs 是一个主动且依赖能量的过程, 同时这些分泌 miRNAs 能够被运输到靶细胞, 并作为一种信号分子影响受体细胞的表型。到目前为止, 微囊泡包裹的 miRNA 与脂蛋白相关的 miRNA 之间的不同之处在很大程度上仍处于未知阶段。MiRNA 不同的分泌机制提示了这些 miRNA 很可能起源于细胞生长的不同阶段, 并且因此有不同的命运和功能。目前还没有直接的证据表明 AGO2 或者 NPM1 结合的 miRNA 是由细胞主动释放的, 也没有证据表明它们会被受体细胞吸收。这些蛋白质结合的细胞外 miRNAs 究竟是起源于破损的细胞还是细胞分泌的微囊泡, 亦或是其他位置和途径, 仍然需要进一步的研究。

1.2.1 微囊泡包裹的细胞外 miRNAs.

已经发现微囊泡可以向靶细胞输送蛋白质和 mRNA。此外微囊泡还包裹了数目可观的 miRNAs, 它们可以有效地把这些 miRNA 运输到受体细胞, 在受体细胞内这些外源性 miRNAs 沉默特定靶基因并触发下游信号事件, 从而进一步影响靶细胞的功能和状态^[11-12, 30, 37-57]。尽管目前微囊泡包裹细胞外 miRNAs 的机制还不清楚, 但有研究表明 miRNAs 被包裹进微囊泡似乎是一个主动的过程。在某些病理或生理条件下, 某些特定的 miRNA 群体会被选择性地包裹进微囊泡之中^[37]。例如, 我们的研究表明, 在不同刺激条件下, 血细胞和人工培养的 THP-1 细胞会主动并有选择性地包裹 miRNAs 进入微囊泡中, 然后将其分泌到循环系统或培养液中^[37]。此外还有实验表明, exosomes 中的某些 miRNA 比在细胞中呈现出更高的浓度^[11-12, 38]。进一步的研究提示 miRNAs 装载进入微囊泡的过程可能受到 RISC 复合物中的某些特殊元件控制。GW182 是一种通过与 AGO2 结合使 miRNA 发挥功能所必需的蛋白质, 其在 exosomes 中的含量明显上升^[58]。与此相似的是, THP-1 细胞分泌出的 exosomes 中也能检测到 AGO2 蛋白^[37]。更加有趣的是, Li 等^[59]发现, 在细胞分泌的微囊泡中 miRNA 与 AGO2 蛋白的结合是有选择性的, 并且在被去垢剂破坏微囊泡结构及蛋白酶 K 去除所有蛋白质之后, 大部分

的 miRNA 都会被 RNA 酶降解。这项研究清楚地表明, 细胞外 miRNA 无论是处于被微囊泡包裹的还是与蛋白质形成复合物的, 都受到 AGO2 或者其他 RNA 结合蛋白的保护而不被降解。综上所述, 这些结果提示了微囊泡并不仅仅只是作为 miRNAs 的载体, 而且也可以保护 miRNA 不被降解。此外细胞分泌的微囊泡中包含的 RISC 功能元件不仅可以增强 miRNA 的功能, 而且其中的 AGO2 蛋白复合体可以为 miRNA 提供很好的保护以避免它被 RNA 酶降解。

经过大量的研究, 调控 miRNA 分泌的机制已经被部分揭示。一项研究表明, 一种神经酰胺依赖的分泌机制能够诱导内涵体被分选进入多泡体 (MVBs) 之中^[60], 主动调控 HEK293 细胞通过 exosomes 分泌 miRNAs^[39]。研究表明中性鞘磷脂酶 2 (nSMase2) 不仅可以控制神经酰胺的生物合成, 而且调控了包含大量 miRNA 的 exosomes 的分泌^[39]。有研究提示 nSMase2 很可能是决定 miRNAs 分选进入 exosomes 的关键因子。此外, 研究发现细胞内复合物的分选运输系统 (ESCRT) 对 exosomes 的积累具有十分重要的作用^[60-61], 而对 miRNA 的分泌却没有任何作用。这些结果表明由 exosomes 包裹的 miRNA 的分泌是一种神经酰胺触发的、ESCRT 独立的途径。到目前为止, 由脱落囊泡 (shedding vesicles) 包裹的 miRNAs 是如何分选并被分泌的还不清楚。

这个领域另一个重要问题是包含 miRNA 的微囊泡是如何特异性靶向受体细胞, 并且分泌的 miRNAs 是如何被吞入受体细胞的。目前比较认可的推测是被微囊泡包裹的 miRNAs 是通过胞吞作用、吞噬作用或直接与靶细胞膜融合的方式被吞入靶细胞内。微囊泡表面的细胞识别分子或者靶细胞膜上的特殊受体可能决定了吞入的特异性。

1.2.2 与 HDL 蛋白相关的细胞外 miRNAs.

HDL 微粒的平均大小为 8~12 nm, 比任何种类的微囊泡都要小很多。它们能携带脂类, 例如卵磷脂, 被认为能与核酸形成稳定的三元复合物^[62]。大量的研究证实, HDL 中的载脂蛋白 A-I 可以作为小分子干扰 RNA (siRNA) 全身给药的有效载体^[63]。最近, Vickers 等^[30]比较了从人血浆中纯化得到的 HDL、低密度脂蛋白和 exosomes 各组分中的 miRNAs, 发现在 HDL 粒子中存在一定数量的 miRNA。有趣的是, 从同样的血浆样本中分离出的 HDL 与 exosomes 中含有的 miRNA 是不同的。

此外, 家族性高胆固醇血症患者的 HDL 比健康受试者含有更高浓度的 miRNAs, 并且含有更多独特的 miRNAs. 他们进一步的研究表明, HDL 能和 exosomes 一样递送 miRNAs 到靶细胞. 但是与 exosomes 相比, 细胞输出 HDL 相关的 miRNA 与 nSMase2 呈现出负相关. 另外, HDL 介导的 miRNAs 递送依赖于 HDL 的细胞表面受体 (SR-BI)^[30]. SR-BI 介导的 HDL 相关 miRNA 转运可能防止了 miRNAs 进入溶酶体通路, 而是将其转运到细胞质中. HDL 是如何装载 miRNAs 的, 目前仍然是未知. 因为小分子 RNA 可以很容易地与两性脂质体结合, 所以很有可能 HDL 与细胞外血浆中 miRNAs 仅仅是通过简单的二价阳离子键结合^[30]. 因此, 原生的 HDL 与 miRNAs 结合的方式与人工基因载体相似, 作为一种血浆中细胞外 miRNAs 的载体与储存单位, 促进它们被转运和递送到受体细胞之中. 最后, 他们的研究还表明, HDL 运输的 miRNAs 不仅改变了靶细胞内相应 miRNAs 的水平, 而且能够直接与其靶基因的 mRNA 结合, 并调控靶基因表达^[30], 这表明 HDL 含有的 miRNAs 是具有生物学功能的. 但是 Wagner 等^[64]最近的一项研究表明, 脂质体结合的 miRNAs 无法有效进入上皮细胞、平滑肌和外周血的单核细胞. 从细节上来说, 他们分别分离了来自正常样本和冠状动脉疾病患者的高密度脂蛋白结合 miRNAs 和低密度脂蛋白结合 miRNAs, 观察了它们的作用机理和潜在生物学功能. 结果显示在低密度脂蛋白上检测到 miRNAs, 在高密度脂蛋白上仅有较低的含量. 但与从冠状动脉疾病患者体内分离的 HDL 相比, 其 miRNA “标签” 仅仅有微小的改变. 他们并未明显观察到 HDL 结合的 miRNAs 能够进入上皮细胞、平滑肌细胞或是外周血的单核细胞, 表明了脂质体结合的 miRNAs 并未对研究的细胞产生功能. 总的来说, 这些结果表明了作为细胞内胆固醇的载体, HDL 很可能具有作为细胞内生性 miRNAs 载体的功能. 然而, 仍需要进一步研究 HDL 介导的 miRNAs 转运能否在不同的细胞中普遍适用.

1.2.3 与蛋白复合体结合的细胞外 miRNAs.

很多研究表明很大一部分细胞外 miRNA 与 RNA 结合蛋白相关, 例如 AGO2 和 NPM1. Arroyo 等^[31-32]用差速离心法和尺寸排阻色谱法, 系统地鉴定了人类血浆和血清中的 miRNA 复合物. 这些结果表明了至少有两种形式的细胞外 miRNAs

存在: 囊泡结合的 miRNAs 和无囊泡结合的 miRNAs. 通过 RT-PCR 定量检测这些 miRNAs 之后, 他们发现囊泡相关的血浆 miRNAs 占了很小的一部分, 反之循环系统中大约有 90% 的 miRNAs 是以无膜结合的形式存在. 一旦在血浆中加入蛋白酶 K, 这些无囊泡结合的 miRNAs 就会特异性地失去稳定性, 这就说明了存在一种 miRNA 蛋白复合体机制来维持 miRNAs 在富含 RNA 酶的循环系统中的稳定性^[32]. 进一步的鉴定发现, 细胞外 miRNAs 中有很大部分是与 AGO2 蛋白结合. 与上述观点相同的是, Turchinovich 等^[32]同样报道了大多数血浆和细胞培养液中的细胞外 miRNAs 是以 AGO2 结合形式存在的, 而不是由 exosomes 包裹. 在另一项单独的研究中, Wang 等^[65]比较了细胞源生囊泡中的 miRNAs 和不含囊泡的 miRNAs, 发现大多数 miRNAs 是不依赖囊泡的. 为了检测这些不含囊泡的 miRNA 复合体的生化特性, 他们在人类纤维原细胞培养基上进行了质谱检测. 12 种 RNA 结合蛋白在培养基中被鉴定出来, 其中的核磷蛋白(NPM1)是一种已知与核糖体出核相关的蛋白^[66-67]. 随后的实验表明 NPM1 能完全保护人工合成的 miRNA 不被 RNA 酶 A 降解. 不含微囊泡并与蛋白质结合的细胞外 miRNAs 很可能是细胞死亡的副产品. 尽管这些 miRNAs 很可能作为一些疾病早期诊断的生物标志物, 但仍然不知道它们是否具有特殊的生物学功能.

2 人类体液中细胞外 miRNA 的功能

细胞外 miRNAs 在循环系统中的稳定性提示了这些细胞衍生的 miRNAs 存在着奇特的功能. 但是, 目前对于细胞外 miRNAs 的调查研究就像婴儿成长一样刚刚开始蓬勃发展. 虽然与蛋白质或 HDL 粒子结合的细胞外 miRNAs 功能尚不明确, 但由细胞释放的微囊泡中包裹的细胞外 miRNAs 已经被证实具有在细胞通讯系统中作为一种新型元件的功能^[68-69]. 在各种生理过程中分泌 miRNAs 的功能最近正在不断地被探索和发掘. 由 miRNAs 介导的细胞串话也为理解潜在的各种非正常情况下的机理提供了新的角度.

2.1 肿瘤发生过程中细胞外 miRNA 的作用

很多肿瘤细胞具有卓越的改变其生存微环境的能力, 使其更适合肿瘤细胞的生长和侵袭. 例如, 癌细胞能够影响正常细胞放弃它们原先稳定的细胞活动, 转而去支持肿瘤细胞的生长. 癌细胞与正常

细胞在微环境中的动态细胞串话对于肿瘤的发展来说是至关重要的。胞间串话可以通过分泌分子和旁分泌信号进行^[70]。分泌分子不再仅仅局限于细胞因子、趋化因子、生长因子和其他蛋白质分子，现在也包括了 miRNAs。Skog 等^[11]的研究表明，在初期人恶性胶质瘤细胞分泌的微囊泡中，一些特定的 mRNAs 和 miRNAs 会高度富集。包裹在微囊泡中来源于胶质母细胞瘤的 mRNA 是具有功能的，它能被人脑微血管内皮细胞系(HBMVEC)吸收和处理^[11]。这些结果表明了肿瘤细胞衍生的微囊泡可以通过改变翻译方式的形式来修饰周围的正常细胞。此外，他们还证明胶质母细胞瘤分泌的微囊泡能够刺激血管生成表型正常的脑血管内皮细胞，并能刺激其他神经胶质瘤细胞的增殖。此外，代表了胶质瘤特征的肿瘤特异性 mRNAs 和 miRNAs，例如 EGFRv III 和 miR-21，能够在胶质母细胞瘤患者的血清微囊泡中被检测到^[11]。这些发现引出了一种假设：肿瘤细胞利用微囊泡运送包括 miRNAs 在内的基因信息给周围的细胞，从而促进肿瘤的生长和发生。

最近的研究结果解释了癌细胞通过细胞外 miRNA 与周围细胞进行通讯的重要性。Kogure 等^[54]发现，肝细胞性肝癌(HCC)细胞能产生大量 exosomes，这些微囊泡能够运输大量 miRNAs 进入其他 HCC 细胞，通过抑制转化生长因子 β 活化激酶 1 (TAK1)及其下游信号通路来调节改变细胞生长和死亡。因此，exosomes 介导的 miRNA 转运是 HCC 细胞间通讯的一种重要机制，很可能潜在地有助于 HCC 的肝内转移或多灶性生长。Umez 等^[50]首先报道了白血病细胞通过 exosomes 包裹的 miRNA 与内皮细胞进行通讯。他们发现，白血病细胞株 K562 分泌的 miR-92a 可以通过 exosomes 运送到人脐静脉内皮细胞(HUVEC)，并通过抑制整合素 $\alpha 5$ 的表达，促进内皮细胞迁移和血管形成。这一结果证明了 exosomes 包裹的 miRNAs 在肿瘤细胞和内皮细胞的细胞间通讯中起到了重要作用。胞外的 miRNA 也有可能参与肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)和乳腺癌细胞之间的细胞串话。Yang 等^[50]利用与 IL-4 活化的巨噬细胞和乳腺癌细胞的共培养体系证实，miRNAs 从巨噬细胞中被转运到乳腺癌细胞。他们还进一步证明，miR-223，一种 IL-4 活化巨噬细胞所特有的 miRNA，能够被 exosomes 转运到共培养的乳腺癌细胞中，通过 MEK2C- β -catenin 信号通路促进乳腺癌细胞的侵袭。这项研

究首先提出了巨噬细胞通过递送 exosomes 介导的致癌 miRNAs 调控乳腺癌细胞的侵袭。综上所述，尽管其分子基础仍有待进一步的研究，但肿瘤细胞释放的分泌 miRNAs 确实在肿瘤发生过程中发挥了至关重要的作用，如抑制免疫反应、加速转移、或促进肿瘤微环境的形成。

2.2 免疫过程中细胞外 miRNAs 的作用

分泌 miRNAs 也正在成为免疫调节的一种新机制。Mittelbrunn 等^[38]提出了来自 T、B 和树突状免疫细胞的 exosomes 含有 miRNAs。他们提出抗原的存在驱动了 miRNAs 的单向运输，例如在 T 细胞与 APC 同源免疫相互作用过程中 miR-335 从 T 细胞向 APCs 的转运。在免疫突触形成中这个过程是由 CD63⁺递送的 exosomes 介导的^[38]。此外他们发现，在免疫突触形成过程中递送的 miRNAs 能够在受体细胞中发挥功能，这提示了 T 细胞来源的 miRNAs 调控了 APCs 中的特定靶基因。例如，SOX4 蛋白能够被 miR-335 下调^[38]。这些结果支持了一种涉及抗原依赖的、在免疫突触形成过程中细胞间由 exosomes 包裹的 miRNAs 单向运输的细胞间通讯机制。这意味着在免疫应答反应和增加免疫细胞之间通信复杂性的过程中，miRNA 的转运可能作为一种对基因表达进行微调的重要工具。在另一项研究中，Montecalvo 等^[53]证明了来自树突状细胞(DCs)的 exosomes 能够有效地递送到其他 DC 中。有趣的是，exosomes 运输的 miRNA 种类随着树突状细胞(DCs)的种类而发生相应的变化。通过 DCs 之间 exosomes 转运，他们发现 exosomes 包裹的 miRNAs 通过“注入”其包裹的内容物进入目标 DCs 细胞质的方式，保护递送到细胞中的 miRNAs 不被细胞外 RNA 酶降解。Exosomes 递送的 miRNAs 是具有功能的，因为它们抑制了受体 DCs 中的 mRNA。这一发现揭示了 exosomes 递送的 miRNAs 在 DCs 之间的传递机制，它们可以作为一种 DCs 之间细胞通讯的新型手段。

2.3 病毒相关传染性细胞外 miRNA 的作用

在一些传染病的发生过程中，已经发现了一些特征性的特殊细胞外 miRNAs，以增强它们在宿主-病原体相互作用中的病理生理学功能。例如，病毒编码的 miRNAs 能够劫持宿主细胞产生 exosomes 或是分泌囊泡的信号通路用来传播病毒的 miRNAs，或是导致受体细胞中免疫调节基因的沉默。EB 病毒(EBV)是一种潜在的致癌基因，并且是第一个已知能编码 miRNA 的病毒^[71]。分离纯

化 EBV 转化的 B 类淋巴母细胞(B-LCL), 得到其中的 exosomes, 对其中包裹的 RNA 进行表达谱分析, Pegtel 等^[45]发现 B-LCL 分泌的 exosomes 中高度富集了各种小 RNA, 并且包含了 EBV 编码的 miRNAs. 在共培养体系中, 通过荧光染料标记 B-LCL 分泌的 exosomes 及模拟 exosomes 由 B-LCL 转运到初级幼单核细胞来源树突状细胞(MODCs)的过程, 他们证明了通过不断吸收由邻近 B-LCL 分泌的 exosomes, EB 病毒编码的 miRNA 能被转运进入 MODCs 并且能够在 MODCs 中不断积累^[45]. 这些通过 exosomes 转运的外源性 EBV 编码 miRNAs 是具有一定功能的, 因为 MODCs 对 exosomes 的内吞作用导致了一种剂量依赖的、miRNA 介导的 CXCL11 抑制, 一种内源性的免疫调节基因已经被证实受到 EBV 编码的 miRNA BHRF1-3 的调控. 最后, 他们发现, EBV 编码的 miRNAs 能够从感染的 B 细胞转运到未感染的 T 细胞和单核细胞(均为 EBV-DNA 阴性), 支持了病毒 miRNAs 通过 exosomes 在人类之间能够横向转移的观点. 因此, exosomes 中包含病毒编码的 miRNA 可能通过递送这种 miRNAs 进入未受感染的反应性 T 细胞导致其失活或破坏的方式, 帮助维持持久性的病毒感染. 此外, 最近的两项研究报告了 EBV 阳性鼻咽癌细胞株释放的 exosomes 中含有病毒编码的 miRNAs. 使 HUVEC 细胞暴露在含有 EBV 编码 miRNA 的 exosomes 之中, 再提取细胞总 RNA, 能够在其中检测到 EBV 编码的 miRNAs^[46]. 此外, EB 病毒编码的 miRNAs 能够在鼻咽癌(NPC)患者和 NPC 异种移植的小鼠血浆中被检测到, 再次表明了细胞外细胞分泌的微囊泡包裹的 EBV 编码 miRNA 是稳定的, 并且可以达到循环血细胞^[73].

2.4 干细胞中细胞外 miRNAs 的作用

细胞间通讯是一种动态的调节机制, 能够通过释放相关因子影响细胞命运、功能和适应性. 通过干细胞分泌的微囊泡主动传递遗传信息已被描述成一种有效的调节机制, 可能会改变细胞命运, 防止组织损伤以及造血干细胞的重新编程^[73]. 最近, Yuan 等^[40]证明了在体外实验中, 由胚胎干细胞分泌的富含 miRNAs 的微囊泡能够被转运到小鼠胚胎的成纤维细胞中. 这项结果提出了一个有趣的可能性: 干细胞能够通过转运微囊泡包裹 miRNAs 进入邻近的细胞, 从而改变其基因表达. 在另一项研究中, Collino 等^[41]证明, 人骨髓来源的间质干细胞

及肝源干细胞释放的微囊泡中, 含有负责细胞内通路的核糖核蛋白的 RNAs 和 miRNAs, 暗示了一种微囊泡中 RNA 的区室化动态调控. 比较了微囊泡中含有的 miRNA 表达谱之后, 他们发现由这些干细胞分泌的微囊泡中含有干细胞来源的特有的 miRNAs^[41]. 此外, 一些 miRNAs 有选择性地在细胞释放的微囊泡中积累, 在微囊泡释放之后则在细胞内消失. 与此同时, 另外一些 miRNAs 则在细胞内保留而不被分泌到微囊泡中^[41], 再一次提示了在微囊泡释放过程中存在着一种 miRNAs 选择性包裹机制. 我们还需要进一步实验来鉴定干细胞来源的、通过微囊泡转运的 miRNAs 的生物学功能及影响.

2.5 脂肪细胞中细胞外 miRNAs 的作用

脂肪细胞现在被认为是一种内分泌细胞, 能够产生多种具有生物活性的分子, 统称为脂肪细胞因子或脂肪因子, 包括了瘦素、脂联素、抵抗素和肿瘤坏死因子 α . 大量的研究表明, 脂肪细胞也能释放微囊泡, 也称为脂肪细胞因子. 最近, Ogawa 等^[43]发现, 人工培养的 3T3-L1 脂肪细胞分泌的微囊泡中包含了大约 7 000 种转录子以及 140 种 miRNAs, 其中绝大多数都是脂肪细胞所特有而且与供体细胞中表达水平是充分相关的. 更有意思的是, 随着脂肪细胞分化的进程, 微囊泡中含有的脂肪细胞相关的 miRNAs 含量不断增加. Müller 等^[44]进行的另一项独立研究表明, 能够在来源于初级和已经分化的大鼠脂肪细胞的微囊泡中检测到多种 miRNAs, 在血清中也有同样的结果. 然而, 到目前为止来源于脂肪细胞微囊泡包裹的 miRNA 生物学意义仍不明朗.

2.6 血液中细胞外 miRNAs 的作用

血液中循环的微囊泡自被发现以来就被认为具有重要的生物学功能^[42, 74]. Hunter 等^[42]发现在健康的献血者之间, 血浆中的微囊泡、血小板和外周血单个核细胞(PBMC)的 miRNA 表达存在着显著差异. 他们发现了 52 种在血浆和血小板中都表达的 miRNAs, 同时分别有 36 种和 2 种 miRNAs 仅在血浆微囊泡或血小板中表达^[42]. 在微囊泡和 PBMC 分别表达的 104 种和 75 种 miRNAs 之中, 71 种 miRNAs 是共同表达的^[42]. 通过对 miRNAs 靶基因和生物通路的预测, 在血浆中微囊泡表达的 miRNA 大多数都预测靶向于调节代谢平衡的造血干细胞^[42]. 虽然 miRNAs 调节血细胞之间相互作用的功能还需要进一步的研究评估, 这项研究提示了

各亚群血浆中微囊泡包含的 miRNAs 是造血干细胞调节的一种重要潜在因素^[42].

2.7 中枢神经系统中细胞外 miRNAs 的作用

中枢神经系统中存在很多不同种类的细胞,包括神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞.近期,一些研究报道了中枢神经系统能够通过不同的通路释放 miRNAs,并且能够递送到神经元细胞与非神经元细胞中.一项最近的研究显示,多能间充质干细胞分泌的 miRNAs 能够进入神经细胞,并且促进神经突向外生长^[55]. 目前已知间充质干细胞(MSCs)对于神经性疾病和损伤具有潜在的治疗功能,并且 MSCs 能够与脑实质细胞相互作用并通过细胞间直接通讯和/或间接分泌的方式对其进行改变,从而促进其功能恢复. Xin 等^[56]在用 MSC 治疗大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)过程中发现 miR-133b 的水平在同侧半球有明显上升. 具体而言,miRNAs 首先被包裹于一种特殊的膜囊泡——突触小泡之中. 之后通过突触小泡与突触前膜的融合使 miRNAs 释放,这与神经递质的释放过程相似. 由突触分泌 miRNAs 的过程依赖于钙离子,并且胞外分泌抑制剂(冈田酸)能够抑制 miRNAs 的分泌. 进一步地,我们同样发现神经生长因子(NGF)或者红藻氨酸(KA)能够调节 miRNAs 的分泌^[75]. 在孵化过程中,NGF 增强了氯化钾刺激的 miRNAs 分泌过程,而不影响自发的 miRNAs 释放. 相反,KA 下调了氯化钾刺激的 miRNAs 分泌过程,提高了自发 miRNAs 的释放. 因为突触能够从溶液中吸收物质,我们有信心认为突触吸收了 miRNAs,且结果显示,分泌的 miRNAs 能够通过一种非选择性的内吞途径被突触吸收. 这是第一次报道 miRNAs 通过胞吐的途径分泌,并且神经活性分子能够在神经系统中调控 miRNAs 的分泌.

2.8 动脉粥样硬化中细胞外 miRNAs 的作用

最近, Hergenreider 等^[52]证明, Kruppel 样因子 2(KLF2), 一种由动脉粥样硬化诱导的、调控内皮细胞基因表达方式的关键剪切响应转录因子,能够在内皮细胞中与启动子结合,并且诱导 miR-143/145 显著上调. 他们的研究还表明,由 KLF2 转化或者压力刺激下的血管内皮细胞所分泌的细胞外囊泡中存在 miR-143/145 的富集,并且这些 miRNAs 能够被转运到平滑肌细胞中(SMCs). 在共培养的平滑肌细胞中,它们能够抑制 miR-143/145 靶基因的表达,并能使平滑肌细胞去分化. 由 KLF2 表达的内皮细胞所产生的细胞外囊泡同样可

以在主动脉的 ApoE 基因缺陷(APOE^{-/-})小鼠体内抑制动脉粥样硬化病变的形成. 这一发现提供了一个基本的原理,很好地解释了内皮生长限制的 KLF2 缺陷小鼠平滑肌功能受损严重这一意外的表型. 综上所述, exosomes 介导的内皮细胞与平滑肌细胞之间 miRNAs 的递送可以具有抗动脉粥样硬化的作用,其可能成为一种很有前途的新型动脉粥样硬化防治手段.

2.9 肾脏损伤中细胞外 miRNAs 的作用

Cantaluppi 等^[51]发现,由一种被发现能够通过旁分泌机制扭转急性肾损伤的内皮祖细胞(EPCs)释放的微囊泡,能够防止缺血再灌注大鼠模型的肾脏损伤. 为了测试 EPCs 分泌的微囊泡中包裹的 miRNAs 是否参与了这一过程,他们检测了 EPCs 分泌微囊泡总 RNA 中 miRNAs 的丰度. 在缺血再灌注之后的静脉注射后,肾小管周围毛细血管和肾小管上皮细胞周围局部发现了 EPCs 分泌的微囊泡. 这通过增强肾小管上皮细胞增殖、凋亡减少、白细胞浸润的方式对急性肾损伤赋予了功能和形态上的保护. 微囊泡也可以通过抑制毛细管稀疏、肾小球硬化症及肾小管间质纤维化来防止慢性肾损伤的恶化. 在 RNA 酶处理、祖细胞中敲除 Dicer 切割酶造成微囊泡中 miRNAs 非特异性缺失或转染促血管生成的 miR-126 和 miR-296 拮抗物之后,微囊泡对于肾脏损伤的保护作用便会丧失. 因此, EPCs 分泌的微囊泡能够保护,至少部分保护了肾脏不受缺血性急性肾损伤,通过 miRNAs 的转运使肾脏细胞重编程进入再生程序.

2.10 心脏疾病治疗中细胞外 miRNAs 的作用

Katara 等^[76]研究了在小鼠心肌梗死(MI)模型中针对内皮源性祖细胞(SVPS)治疗方法与机理的靶点. 他们发现,移植 SVPS 进入免疫缺陷 CD1/Foxn-1(nu/nu)或 CD1 免疫活性小鼠部分梗死区域,与 vehicle 相比能够使左心室扩张减弱,改善射血分数. 此外, SVP 能够减少心肌瘢痕,心肌细胞凋亡及间质纤维化,增加心肌血流量,促进血管新生,降低血管通透性. 除此之外他们还发现由 SVP 分泌的 miR-132 能够在心脏病治疗过程中通过旁分泌手段作为活化剂,已经验证的靶点表明 miR-132 通过抑制 Ras-GTP 酶激活蛋白和甲基-CpG 结合蛋白 2 发挥其功能^[76]. 进一步地, miR-132 受到 anti-miR-132 抑制之后,降低了 SVP 在梗死的心肌中改善收缩力、修复血管生成和间质纤维化的能力. 结果表明, SVP 移植通过一种新型涉及

miR-132 分泌并抑制其靶基因的旁分泌机制, 对心脏功能产生了一种长期的改善。

2.11 细胞外 miRNAs 作为一种母婴串话的新途径

最近的研究报道, 组成人类胎盘的主要细胞, 合体滋养层, 在整个怀孕期间持续释放微囊泡, 用来进行母婴串话, 使母体适应进一步的妊娠。Luo 等^[47]使用小 RNA 测序文库及 miRNA 组织化学方法, 使用人胎盘绒毛鉴定胎盘特异的 miRNAs。他们发现, 最具有胎盘特异性的 miRNA 与 19 号染色体上的 miRNA 基因簇关系紧密, 这些 miRNA 基因簇在胎盘发育过程中表达上调^[47]。同时, 作者证明了胎盘特异性的 miRNAs 能够在孕妇的血浆中存在, 并且在分娩后快速清除, 这暗示了合体滋养层能通过 exosomes 分泌 miRNAs^[47]。为了证明这个概念, 他们利用滋养细胞株 BeWo 作为发育中绒毛滋养层的模型, 从培养液上清中分离 exosomes。miR-517a 是一种胎盘特异性 miRNA, 已经被证明在 exosomes 中富集^[47]。蛋白质组学分析表明, miR-517a 可能参与了肿瘤坏死因子信号转导的调控^[47]。研究结果表明, 胎盘特异性的 miRNAs 很可能是由绒毛膜滋养层细胞通过 exosomes 释放到母体血液中的, 并且在怀孕期间能够特异性地靶向于母体组织细胞(例如孕妇的血管内皮细胞), 从而影响靶细胞的功能, 参与妊娠过程。然而, 胎盘特异的 miRNAs 在胎儿生存、母体细胞重编程以及受孕障碍过程中的作用仍需要进一步的研究。对于上述问题的揭示, 有助于研究和开发治疗不孕不育及产前诊断的新途径和新方法。

3 人体体液中细胞外 miRNA 对疾病诊断和治疗的潜在价值

3.1 细胞外 miRNA 作为疾病的生物标志物

一种理想的生物标志物应满足许多标准, 例如通过无创手段易于获得、高度的敏感性和特异性、具有检测到疾病早期阶段的能力、样本中较长的半衰期以及快速准确的检测能力。细胞外 miRNAs 很好地符合了这些标准中的很大一部分。miRNAs 在富含 RNA 酶的体液中具有很高的稳定性, 并且可检测 miRNAs 的方法简单易行(如定量 RT-PCR、基因芯片和深度测序), 因此将 miRNAs 作为临床诊断的生物标志物引起了人们极大兴趣。自 2008 年以来, 已经有越来越多的研究团队记录了将 miRNA 作为一种新型的非侵入性疾病诊断和预后的生物标志物, 特别是在疾病的早期阶段^[7]。目前

细胞外 miRNA 作为疾病诊断的生物分子标志物的研究已经形成了一个非常好的研究模式(图 3)。最近, Russo 等^[78]提出了一种综合的细胞外 / 循环 miRNAs 数据库——miRandola。该数据库提供给用户各种信息, 包括相关的疾病、样品、用于提取 miRNA 的方法和相关实验的描述。miRandola 是首个收集了在独特环境中 miRNAs 所有可用数据的网络资源。它作为一种参考工具, 提供了 miRNAs 作为生物标志物的功能以及它们的生理功能与参与的病理作用。尽管这些研究还需要独立研究团体的重复, 目前的结果显示一些细胞外 miRNA 具有极高的特异性, 不仅可以用于诊断和监测的目的, 也可能反映了某些器官和组织的生理状况。然而, 许多可能会影响到精确分析 miRNAs 的变量目前还未被仔细研究, 这些可能会成为细胞外 miRNAs 在临床得到广泛应用的阻碍。例如, 样品的收集、RNA 提取的效率以及酶的活性都会引入误差, 造成结果上的偏差。鉴于这些问题, 开发一种有效的、标准化的技术手段对于研究细胞外 miRNAs 来说是至关重要的。此外, 研究常见的干扰因素, 如溶血现象、样本的选择, 以及存在血小板或红细胞等细胞污染物对于结果的影响, 仍有待进一步探讨。如果不解决这些问题, 细胞外 miRNAs 从研究走向临床应用的过渡很可能失败。

3.2 细胞外 miRNA 作为药物

目前, 包括 siRNA 和 miRNA 在内的小分子 RNA 正逐渐成为一类能够对抗多种疾病的新型药物, 具有很大的应用前景^[79-80]。这些分子能够进行高效的递送, 是它们成功的临床应用的关键^[79-80]。目前的技术条件下, 作为小 RNA 转载体的一般是病毒或者合成的化合物。将这些载体替换为更加低毒性高效率的方式, 对于成功地进行基因治疗是必不可少的。由于微囊泡能够自由穿越生物屏障, 并具有在细胞之间递送小分子 RNA 的特性, 它们很可能代表了基因治疗领域一类令人欢欣鼓舞的新型药物递送载体。作为治疗用的递送载体, 微囊泡是由内源性细胞分泌的天然纳米载体, 对于免疫系统有更好的耐受性。因此, 由细胞分泌的预先设计表达 miRNAs 或者 siRNA 的微囊泡, 很可能能够将这些小分子递送到局部的细胞环境中。最近的研究已经表明, exosomes 可以用来装载和保护外源性小分子 RNA, 并且递送到靶细胞中。在 Alvarez-Erviti 等^[74]一项杰出的研究中, 在来自树突状细胞的 exosomes 上表达了 exosomes 膜融合蛋白

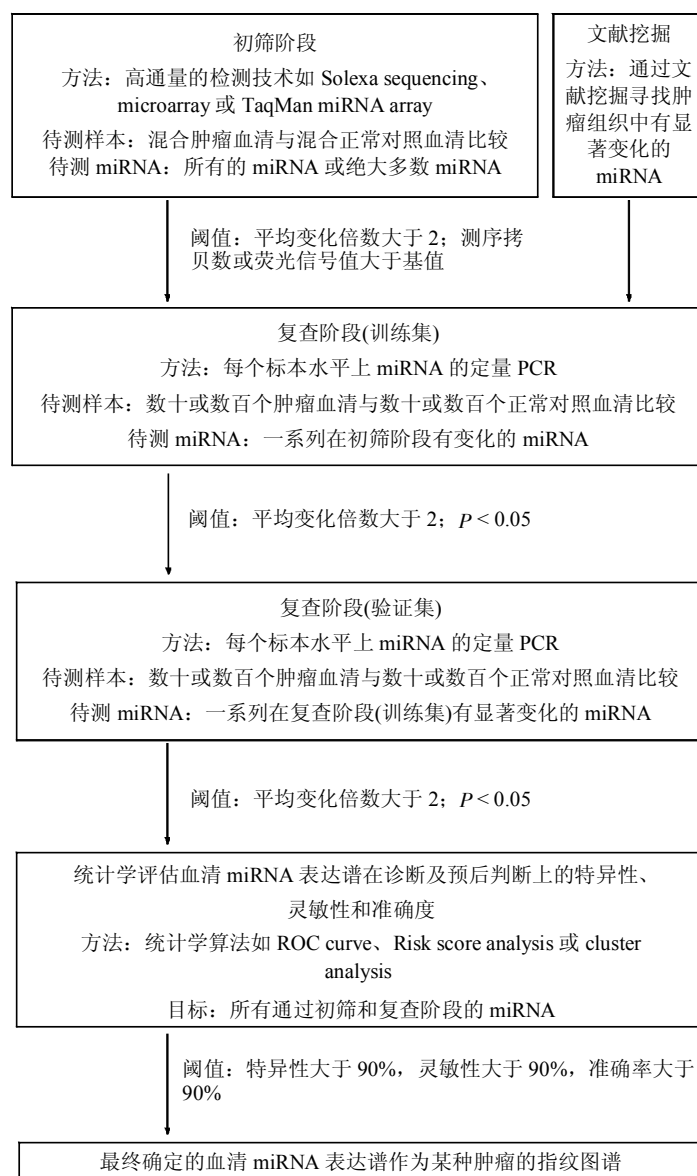


Fig. 3 Schematic description of the working model for identifying circulating miRNA-based biomarkers for disease

图 3 鉴定可用于肿瘤诊断的循环 miRNA 指纹图谱的实验流程

Lamp2b 和狂犬病毒糖蛋白(RVG)肽段(RVG 来源的肽段可以专门针对神经元细胞)。通过在 exosomes 表面表达这种特异性靶向神经元细胞的蛋白, exosomes 内包裹的 siRNA 在注射到小鼠血液中后, 特异性地将 siRNA 递送到了脑部, 而在其他组织中并未观察到非特异性的摄取^[74]。为了显示这种治疗方法的潜力, 他们递送了能抑制 BACE1 的 siRNA, 导致野生型小鼠的脑 β -淀粉样蛋白质水平显著下降, 因此为治疗阿尔茨海默症提

供了一个新的方向^[74]。Exosomes 介导的 siRNA 递送导致了野生型小鼠体内 BACE1 的 mRNA 和蛋白质含量急剧下降^[74]。这些结果指出了 exosomes 在递送小 RNA 方面的潜在应用, 为临床治疗应用开辟了一条新的渠道。在转化为临床应用之前, 这种纳米技术需要进一步发展精密的分选、纯化、装载、递送和靶向方式。因此, exosomes 介导的小 RNA 递送具有十分光明的前途, 很可能填补现有全身基因治疗方法在递送方式上的空白。

4 细胞外循环 miRNA 未来展望

miRNA 介导的细胞间通讯理论是十分吸引人的, 也被很多报道所支持。然而, 一些关于分泌 miRNAs 生物起源和功能的问题仍悬而未决, 还需进一步的实验研究: a. 最核心的问题是, miRNAs 是如何特异性靶向分泌与识别摄取的。特别是究竟是什么样的机制决定了特定的 miRNAs 被分拣进入微囊泡或是与 HDL 蛋白结合, 在不同细胞中是什么引发了 miRNAs 的释放, 是什么机制参与了 miRNAs 进入靶细胞, 这些问题仍需要深入研究。b. 细胞外 miRNA 的交流在体外培养的细胞模型中始终可以被观察到。但仍需要进一步阐明在体内这一过程是否广泛存在, 并且有多少种细胞不具有这种功能。需要直接的证据来证明分泌的 miRNA 在调节生理和病理过程的巨大影响, 以及加强细胞外 miRNA 在体内作为信号分子这一举足轻重角色的理论。c. 最关键是要阐明细胞外 miRNA 在对人类疾病的预测、预后和治疗上的价值。尽管在细胞外 miRNA 的生理意义和潜在的应用这一点上, 质疑的声音目前大于研究的成果, 但是这一新兴的研究领域前景是十分光明的。

5 结 论

细胞外 miRNAs 已经被观察到存在于各种体液之中。对于细胞外 miRNAs 非凡的稳定性已经开始专门的研究, 研究发现通过微囊泡包裹, 结合 HDL 蛋白或 AGO2 蛋白, 细胞外 miRNAs 得到了很好的保护。其他的实验结果明显支持了以下假说: 在调节受体细胞靶基因并激活受体细胞信号通路之前, 细胞外 miRNAs 经历了细胞主动分泌, 在细胞外环境中转运, 被受体细胞摄入这些过程。虽然细胞外 miRNAs 的临床应用以及分泌 miRNAs 这一令人兴奋的研究领域仍处于探索和延伸阶段, 但是我们相信未来在这一领域的研究将对我们理解细胞间通讯以及各种疾病的治疗方法产生革命性的影响。

参 考 文 献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281–297
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, **431**(7006): 350–355
- [3] Kim V N, Han J, Siomi M C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(2): 126–139
- [4] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 1993, **75**(5): 843–854
- [5] Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(4): 259–269
- [6] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(11): 857–866
- [7] Cho W C. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, **42**(8): 1273–1281
- [8] Park N J, Zhou H, Elashoff D, *et al.* Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*, 2009, **15**(17): 5473–5477
- [9] 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. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, 2010, **28**(6): 655–661
- [10] Kosaka N, Izumi H, Sekine K, *et al.* microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 2010, **1**(1): 7
- [11] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 2008, **10**(12): 1470–1479
- [12] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(6): 654–U672
- [13] Weber J A, Baxter D H, Zhang S, *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 2010, **56**(11): 1733–1741
- [14] 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. *Cell Res*, 2008, **18**(10): 997–1006
- [15] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(30): 10513–10518
- [16] Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, *et al.* Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*, 2011, **6**(6): e20769
- [17] McDonald J S, Milosevic D, Reddi H V, *et al.* Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*, 2011, **57**(6): 833–840
- [18] Pritchard C C, Kroh E, Wood B, *et al.* Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, **5**(3): 492–497
- [19] Laterza O F, Lim L, Garrett-Engele P W, *et al.* Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem*, 2009, **55**(11): 1977–1983
- [20] Corsten M F, Dennert R, Jochems S, *et al.* Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, **3**(6): 499–506
- [21] Lewis A P, Jopling C L. Regulation and biological function of the liver-specific miR-122. *Biochem Soc Trans*, 2010, **38**(6): 1553–1557

- [22] Zhang Y, Jia Y, Zheng R, *et al.* Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem*, 2010, **56**(12): 1830–1838
- [23] Brase J C, Johannes M, Schlomm T, *et al.* Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*, 2011, **128**(3): 608–616
- [24] Ng E K, Chong W W, Jin H, *et al.* Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 2009, **58**(10): 1375–1381
- [25] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**(8): 569–579
- [26] Mathivanan S, Ji H, Simpson R J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 2010, **73**(10): 1907–1920
- [27] Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, *et al.* Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 2006, **20**(9): 1487–1495
- [28] Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, **21**(4): 575–581
- [29] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 2009, **19**(2): 43–51
- [30] Vickers K C, Palmisano B T, Shoucri B M, *et al.* MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 2011, **13**(4): 423–433
- [31] Arroyo J D, Chevillet J R, Kroh E M, *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(12): 5003–5008
- [32] Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, *et al.* Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(16): 7223–7233
- [33] Wang K, Zhang S L, Weber J, *et al.* Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**(20): 7248–7259
- [34] Yu B, Yang Z Y, Li J J, *et al.* Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 2005, **307**(5711): 932–935
- [35] Vigneault F, Sismour A M, Church G M. Efficient microRNA capture and bar-coding via enzymatic oligonucleotide adenylation. *Nat Methods*, 2008, **5**(9): 777–779
- [36] Jones M R, Quinton L J, Blahna M T, *et al.* Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nature Cell Biology*, 2009, **11**(9): 1157–U1258
- [37] Zhang Y J, Liu D Q, Chen X, *et al.* Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular Cell*, 2010, **39**(1): 133–144
- [38] Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2011, **2**(9): 282
- [39] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, *et al.* Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, 2010, **285**(23): 17442–17452
- [40] Yuan A, Farber E L, Rapoport A L, *et al.* Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One*, 2009, **4**(3): e4722
- [41] Collino F, Deregibus M C, Bruno S, *et al.* Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One*, 2010, **5**(7): e11803
- [42] Hunter M P, Ismail N, Zhang X, *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 2008, **3**(11): e3694
- [43] Ogawa R, Tanaka C, Sato M, *et al.* Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported into macrophages and might be secreted into blood circulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **398**(4): 723–729
- [44] Müller G, Schneider M, Biemer-Daub G, *et al.* Microvesicles released from rat adipocytes and harboring glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins transfer RNA stimulating lipid synthesis. *Cell Signal*, 2011, **23**(7): 1207–1223
- [45] Pegtel D M, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson D A, *et al.* Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(14): 6328–6333
- [46] Meckes D G Jr, Shair K H, Marquitz A R, *et al.* Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(47): 20370–20375
- [47] Luo S S, Ishibashi O, Ishikawa G, *et al.* Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation *via* exosomes. *Biol Reprod*, 2009, **81**(4): 717–729
- [48] Hata T, Murakami K, Nakatani H, *et al.* Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **396**(2): 528–533
- [49] da Silveira J C, Veeramachaneni D N, Winger Q A, *et al.* Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, 2012, **86**(3): 71
- [50] Yang M, Chen J, Su F, *et al.* Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer*, 2011, **10**(117): 541–552
- [51] Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, *et al.* Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int*, 2012, **82**(4): 412–427
- [52] Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, *et al.* Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*, 2012, **14**(3): 249–256
- [53] Montecalvo A, Larregina A T, Shufesky W J, *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells *via* exosomes. *Blood*, 2012, **119**(3): 756–766
- [54] Kogure T, Lin W L, Yan I K, *et al.* Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*, 2011, **54**(4): 1237–1248
- [55] Xin H, Li Y, Buller B, *et al.* Exosome-mediated transfer of

- miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells*, 2012, **30** (7): 1556–1564
- [56] Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, *et al.* Leukemia cell to endothelial cell communication *via* exosomal miRNAs. *Oncogene*, 2012, **32**(22): 2747–2755
- [57] Sun Q, Chen X, Yu J, *et al.* Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum. *Protein Cell*, 2013, **4**(3): 197–210
- [58] Gibbings D J, Ciaudo C, Erhardt M, *et al.* Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(9): 1143–1149
- [59] Li L, Zhu D, Huang L, *et al.* Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e46957
- [60] Hurley J H. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, **20**(1): 4–11
- [61] Williams R L, Urbe S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(5): 355–368
- [62] Janas T, Yarus M. Specific RNA binding to ordered phospholipid bilayers. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(7): 2128–2136
- [63] Kim S I, Shin D, Choi T H, *et al.* Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I. *Mol Ther*, 2007, **15**(6): 1145–1152
- [64] Wagner J, Riwanto M, Besler C, *et al.* Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, **33**(6): 1392–1400
- [65] Wang K, Zhang S, Weber J, *et al.* Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(20): 7248–7259
- [66] Borer R A, Lehner C F, Eppenberger H M, *et al.* Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 1989, **56**(3): 379–390
- [67] Maggi L B, Kuchenruether M, Dadey D Y A, *et al.* Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the mammalian ribosome. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(23): 7050–7065
- [68] Chen X, Liang H, Zhang J, *et al.* Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*, 2012, **22** (3): 125–132
- [69] Chen X, Liang H, Zhang J, *et al.* Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell*, 2012, **3**(1): 28–37
- [70] Muralidharan-Chari V, Clancy J W, Sedgwick A. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Science*, 2010, **123**(10): 1603–1611
- [71] Pfeffer S, Zavolan M, Grassl F A, *et al.* Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 2004, **304**(5671): 734–736
- [72] Gourzones C, Gelin A, Bombik I, *et al.* Extra-cellular release and blood diffusion of BART viral micro-RNAs produced by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Virol J*, 2010, **7** (271): 1–12
- [73] Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 2006, **20**(5): 847–856
- [74] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(4): 341–345
- [75] Xu J, Chen Q, Zen K, *et al.* Synaptosomes secrete and uptake functionally active microRNAs *via* exocytosis and endocytosis pathways. *J Neurochem*, 2013, **124**(1): 15–25
- [76] Katare R, Riu F, Mitchell K, *et al.* Transplantation of human pericyte progenitor cells improves the repair of infarcted heart through activation of an angiogenic program involving micro-RNA-132. *Circ Res*, 2011, **109**(8): 894–906
- [77] Zen K, Zhang C Y. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev*, 2012, **32**(2): 326–348
- [78] Russo F, Di Bella S, Nigita G, *et al.* MiRandola: extracellular circulating microRNAs database. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e47786
- [79] Ryther R C, Flynt A S, Phillips J A, *et al.* siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther*, 2005, **12**(1): 5–11
- [80] Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease?. *Gene Ther*, 2006, **13**(6): 496–502

The Origin, Function and Diagnostic Potential of Extracellular microRNA in Human Body Fluids

ZHANG Su-Yang¹⁾, XIE Jia-Yun²⁾, LIANG Hong-Wei¹⁾, CHEN Xi¹⁾, ZHANG Chen-Yu^{1)*}

¹⁾ Jiangsu Engineering Research Center for MicroRNA Biology and Biotechnology, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

²⁾ Guangdong Experimental High School, Guangzhou 510055, China)

Abstract Recently, numerous studies have documented the importance of microRNAs (miRNAs) as an essential cornerstone of the genetic system. Once thought as unstable RNA molecules, miRNAs are now known to circulate in the bloodstream and other body fluids in a stable, cell-free form. Importantly, extracellular miRNAs are aberrantly present in plasma, serum and other body fluids during the pathogenesis of many diseases and, thus, are promising noninvasive or minimally invasive biomarkers to assess the pathological status of the body. However, the origin and biological function of extracellular miRNAs remains incompletely understood. In this review, we summarize the recent literature on the biogenesis and working models of extracellular miRNAs, and we highlight the impact of extending these ongoing extracellular miRNA studies to clinical applications.

Key words microRNA, extracellular microRNA, secretion, microvesicle, exosome, shedding vesicle, high-density lipoprotein, intercellular communication

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00260

*Corresponding author.

Tel: 86-25-83686234, E-mail: cyzhang@nju.edu.cn

Received: June 13, 2013 Accepted: June 26, 2013