

应用实时荧光定量 PCR 检测血清 miR-122 和 miR-22 及其在慢性乙型肝炎患者中的表达

姜跃炜 叶 瑾 朱小区

摘 要 **目的** 建立血清中 microRNA(miRNA)的实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)的检测方法,对慢性乙型肝炎患者血清中 miR-122 和 miR-22 的表达水平进行检测和分析,探讨其在慢性乙型肝炎患者血清中表达的意义。**方法** 茎环引物用于成熟型 miRNA 反转录,以建立 SYBR Green I PCR 筛选和定量检测 miRNA 的方法。同时,采用 10 倍梯度稀释的 miR-122 标准品 cDNA($1 \sim 10^9$ 拷贝/微升)评价其敏感度;采用熔解曲线评价其检测 miRNA 的特异性;通过对 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 拷贝/微升的 miR-122 标准品 cDNA 分别进行批内 20 次重复实验,以其循环阈值(Ct)的变异系数(CV)评价其精密度。采用建立的 qRT-PCR 技术检测慢性乙型肝炎患者及正常人血清中 miR-122 和 miR-22 的表达水平。**结果** 建立了茎环引物的 RT-PCR 法检测血清中的 miRNA,该方法的线性范围宽,敏感度高,重复性好,方法简便。在慢性乙型肝炎患者组中血清 miR-122 和 miR-22 的相对表达量分别为 17.88 和 5.35;与正常对照组中血清 miR-122 和 miR-22 的相对表达量(分别为 1.80 和 1.67)比较,差异有统计学意义(P 均 = 0.000)。**结论** 建立了茎环引物 RT-PCR 实时荧光定量 PCR 方法检测血清中的 miR-122 和 miR-22,血清 miR-122 和 miR-22 在慢性乙型肝炎患者的血清中表达显著升高。

关键词 miR-122 miR-22 慢性乙型肝炎

中图分类号 R512

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.034

Detection of Serum miR-122 and miR-22 in Patients with Chronic Hepatitis B by Using of a Quantitative Real-time PCR. Jiang Yuewei, Ye Jin, Zhu Xiaoqu. The Traditional Chinese Medical Hospital of Wenzhou, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To establish a real-time quantitative PCR (RT-PCR) assay for detecting serum miR-122, miR-22, and evaluate the clinical significance of miR-122 and miR-22 in patients with chronic hepatitis B (CHB) by using of this assay. **Methods** The mature miRNAs were reversely transcribed by using of stem-loop primers. SYBR Green I quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used for quantification of the miRNAs. The sensitivity of this assay was evaluated by using of the 10-fold-diluted miRNA-122 cDNA standards and the specificity was verified by using of melting curve assay. The accuracy was assessed by intra-assay coefficient of variation (CV) of threshold cycle (Ct value), which were calculated from a 20-times-repeat detection of the miR-122 cDNA (2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 copies/ μ l) standards. Using the established qRT-PCR assay, we detected the expression of serum miR-122 and miR-22 in the patients with CHB and healthy controls. **Results** The qRT-PCR assay exhibited good performances in the linear range, sensitivity and reproducibility while detecting miR-122 and miR-22. The relative level of miR-122 and miR-22 was 17.88 vs 5.35 in the CHB patients and 1.80 vs 1.67 in the controls ($P = 0.000$). **Conclusion** Using of stem-loop primers, we established a qRT-PCR assay for detection of serum miR-122 and miR-22. Serum miR-122 and miR-22 increased significantly in the CHB patients.

Key words miR-122; miR-22; Chronic hepatitis B

我国乙型肝炎病毒表面抗原携带者占全国人口的 7.18%^[1]。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是引起慢性肝炎、肝硬化和肝癌的最主要原因。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类高度保守、长度 20~24 个核苷酸的非编码单链小 RNA, miRNA 是一类在血清中稳定存在的短小核苷酸,已有报道证实 miRNA 可以作为肝脏损伤和妊娠的非常敏感的分

标志物^[2,3]。miR-122 是肝细胞内特异高表达的 miRNA。既往研究表明由 miR-122, miR-22 等 11 个 miRNA 组成的表达谱能预测干扰素治疗慢性乙型肝炎患者的疗效。但是检测乙型肝炎患者血清中的 miRNA 尚缺乏商品化的试剂盒,笔者利用茎环引物优化试验方法,建立 SYBR Green PCR 定量检测 miRNA,同时初步评价其检测性能。并利用建立的方法检测血清 miR-122 和 miR-22 在慢性乙型肝炎患者的血清中表达的意义。

材料与方法

1. 研究对象:按照 2010 年中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病分会制订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[4] 标准,筛选来自温州市中医院 2010 年 1 月~2012 年 12 月 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 43 例为研究对象,除外其他病毒重叠感染。其中男性 36 例(83.72%),女性 7 例(16.28%),患者平均年龄 29.31 ± 5.58 (19~41) 岁。正常对照者 40 例,为笔者医院保健科体检结果正常的人群。其中,男性 32 例,女性 8 例,患者年龄 26.22 ± 6.23 (20~44) 岁。两组年龄和性别差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 试剂及仪器:miRNA 提取试剂(北京天根);CDNA 第 1 链合成试剂(美国 Thermo);SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaRaKa);ABI 7900HT Fast real-time 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

3. 实验方法:(1)标本采集与处理:采集标本后 2h 内用离心机离心 12000g,4℃,15min,取上清,-80℃ 冻存。(2)血清 miRNA 富集部分的提取:用离心柱法提取血清 miRNA 富集部分。(3)合成 cDNA:采用美国 Thermo 公司生产的 Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,反应条件为:25℃ 5min;42℃ 60min;70℃ 5min 反应结束后,扩增好的 cDNA 模板用 DNase-free ddH₂O 稀释 10 倍作为定量 PCR 的模板。(4)miRNA 的荧光定量检测:采用 TaRaKa 公司生产的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒进行 real-time PCR 检测,所有反应采用 2 复孔。20μl 的反应体系:2μl 的 cDNA,10μl 的 SYBR Green Ex Taq,3.6μl 的 RNase-free water,2μl 的 PCR Forward Prime, 2μl 的 PCR reverse prime,0.4μl 的 ROX Reference Dye II, miR-122, miR-22 及 U6 引物由苏州金唯智公司合成,miR-122 引物序列为 5'-TGGAGTGTGACAATGGT-GTTTG-3', miR-22 引物序列为 5'-AAGCTGCCAGTT-GAAGAAGTGT-3', U6 引物序列为 5'-GCTTCGGCAGCA-CATATACTAAAAT-3'为:95℃ 30s,接着 95℃ 5s,60℃ 34s,40 个循环。采用 ABI 7900 实时定量 PCR 仪进行检测。(5)实验结果数据处理:检测 miRNA 的相对表达量时,以 U6 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行结果分析。以不同样本的相对表达量值进行比较。以 Fold = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示待测组血清中 miR-22 和 miR-122 相对于对照组中表达水平的表达倍数。其中 $\Delta\Delta Ct$ = 待测标本的 ΔCt - 对照样本 ΔCt , ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值。

4. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或者用中位数与四分位数范围 (IQR) 表示。两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 建立血清 miR-122 和 miR-22 表达水平的茎环 RT-PCR 检测:(1)血清 miRNA 检测条件的优化结果:1)miRNA 检测的最佳反转录茎环引物浓度:在茎环引物 RT 过程中,对 1~10μmol/L 反应终浓度

进行优化,发现 1μmol/L 的茎环引物可使基线下降,而且起始 Ct 值也提前 2 个循环出现(图 1)。提示 1μmol/L 反应浓度有较高的 PCR 效率。表明荧光值上升曲线斜率大,扩增效率高。2)实时荧光定量 PCR 的优化:PCR 引物所引发的非特异性扩增可通过降低引物浓度和提高扩增温度进行排除,引物反应终浓度在 0.1~1.0μmol/L 间进行优化,温度选择在 60~70℃。熔解曲线分析结果显示,0.1μmol/L 引物终浓度和 60~65℃ 的扩增温度可避免非特异性扩增;荧光基线降到 10^{-2} 时,荧光值上升斜率增大,扩增检测效率增加。对 PCR 扩增产物进行熔解曲线分析,曲线在高于 75℃ 出现单峰的定为特异性扩增。结果熔解曲线在 80℃ 出现单峰(图 2、图 3)。此外,本检测 95℃ 5s 解链和 60℃ 34s 的荧光采集已能满足实验需要,整个 PCR 在 60min 内完成。(1)血清 miRNA 茎环 RT-PCR 方法的线性范围和灵敏度评估:1)线性范围和灵敏度评估:将稀释的 miR-122 标准品(10^9 拷贝/毫升)分别采用茎环引物进行反转录。所得 cDNA 进行 10 倍梯度稀释($1 \sim 10^9$ 拷贝/毫升)后,检测 miR-122 标准品的最低稀释浓度,以确定该方法的灵敏度。结果在连续 6 次 10 倍稀释(10^3 拷贝/毫升)后,才出现检测结果的偏离,确定其最低检出 10^3 拷贝/毫升的稀释标本(图 4)。miR-122 cDNA 梯度浓度($10^3 \sim 10^9$ 拷贝/毫升)对数值与检测 Ct 值成线性关系,其线性范围为 $10^3 \sim 10^9$ 拷贝/毫升($r^2 = 0.993$,图 5)。2)精密度分析:将 miR-122 标准品稀释为 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 拷贝/毫升,在优化反应条件下同 1 天内(批内)对此 3 个浓度各进行 20 次检测,分别计算 3 个浓度 miR-122 荧光定量 PCR 的 Ct 变异系数(CV)。结果 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 拷贝/毫升的 miR-122 检测的 Ct 值($\bar{x} \pm s$)分别为 19.05 ± 0.29 、 22.72 ± 0.09 、 26.54 ± 0.34 。Ct 的 CV 分别是 2.10%、0.70% 和 2.20%,表明茎环引物法定量检测 miR-122 具有较高的精密度。

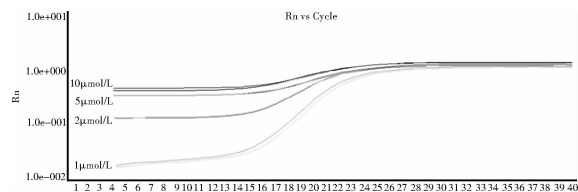


图 1 qRT-PCR 检测血清 miRNA 的条件优化

1μmol/L 浓度的茎环引物使 PCR 起跳点最明显,荧光值变化最显著;2μmol/L 以上引物浓度使 PCR 基线增高,荧光曲线扁平,PCR 扩增检测效率减弱

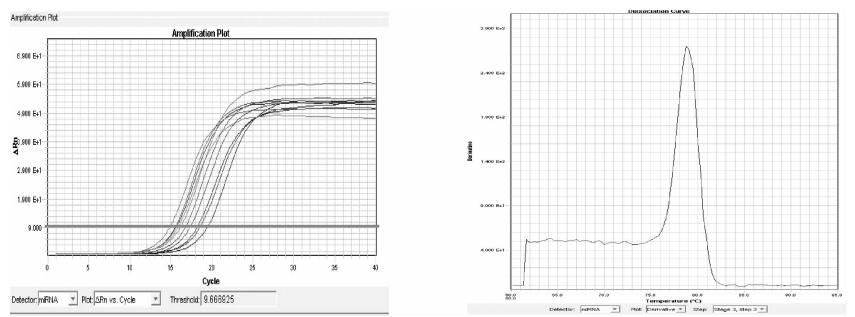


图 2 miR-122 扩增曲线图及熔解曲线图

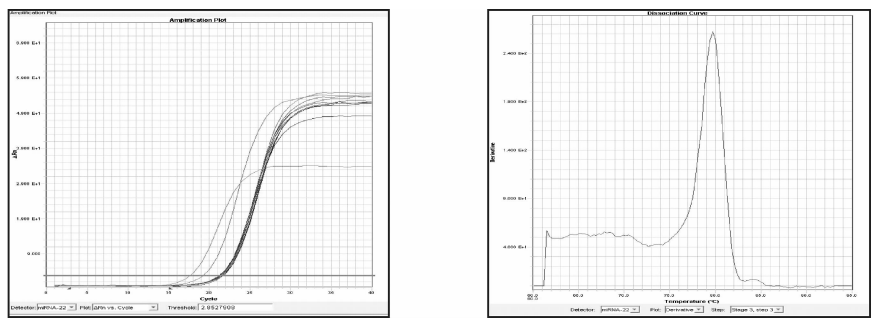


图 3 miR-22 扩增曲线图及熔解曲线图

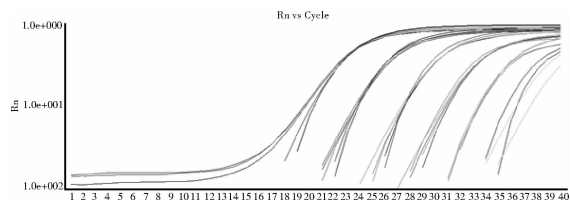


图 4 将 10⁹ 拷贝/毫升 miR-122 cDNA 标本稀释后进行检测
从左至右为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ 拷贝/毫升
miR-122 cDNA 扩增结果,仅在 10³ 拷贝/毫升时出现偏差

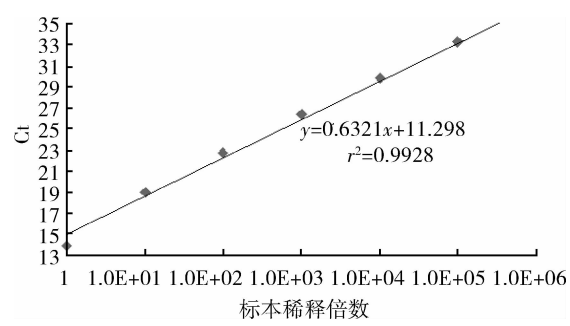


图 5 茎环引物 RT-PCR 法检测 miR-122 的线性方程

组中的血清 miR-122 和 miR-22 的相对表达量 (Fold = 2^{-ΔΔCt}) 都比正常对照组显著升高,采用 Mann-Whitney U 检验,两者比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.001, 表 1, 图 6)。

表 1 两组血清 miR-122 和 miR-22 的表达比较 M [(P25 ~ P75)]

组别	n	miR-122	miR-22
慢性乙型肝炎患者组	43	17.88 (14.90, 25.28)	5.35 (3.79, 5.22)
正常对照组	40	1.80 (1.39, 2.90)	1.67 (1.31, 2.32)

与正常对照组比较, P 均 < 0.001

讨 论

研究表明一定数量的循环 miRNA 可作为癌症检测或药物引起的肝损伤的一个稳定的标志物。作为起源于组织的在血清中的循环 miRNA 是复杂的^[3]。肝脏损伤是由宿主免疫攻击引起的,可能有助于乙型肝炎患者血清中 miRNA 的产生。Zhang 等^[5]在对慢性 HBV 感染者血清中的 miRNA 表达研究中发现, miR-122 可作为不同肝损伤的标志物,并且具有良好的敏感度和特异性。Zhang 等^[6]通过 94 例接受干扰素治疗的慢性乙型肝炎患者的血清样本做基因芯片分析,发现包括 miR-22 在内的 11 个血清 miRNA 表达谱能较好地预测干扰素治疗慢性乙型肝炎早期

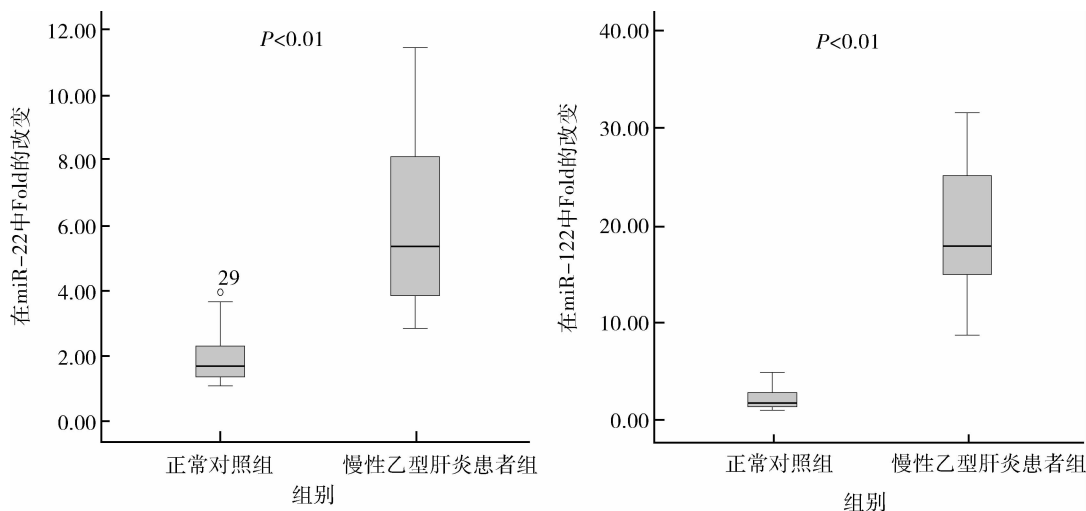


图6 慢性乙型肝炎患者组和正常对照组中血清 miR-122、miR-22 的表达比较

病毒学应答,有助于提高患者干扰素治疗的依从性和疗效。Hao 等^[7]发现 IFN- α 治疗能导致 miR-122 在肝细胞中表达减少。所以笔者选择了血清中 miR-22 和 miR-122 两个 miRNA 作为我们的研究对象。在笔者的研究中,建立了茎环引物的实时荧光定量 PCR 法检测血清中的 miRNA。并进行了该方法的线性范围和敏感度评估实验与重复性实验,结果表明该方法线性范围宽,敏感度高,重复性好,方法简便。用 RT-PCR 法检测血清 miR-122 和 miR-22 的表达水平,慢性乙型肝炎患者组比正常对照组显著升高。提示这两个 miRNA 在 HBV 感染后表达上调。因此,血清中 miR-122 和 miR-22 的表达水平有可能作为乙型肝炎病毒感染的有效指标。

参考文献

1 梁晓峰,陈园生,王晓军,等. 中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志,2005,26(9):655-658

- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. PLoS One 2008, 3(9):e3148
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, *et al.* Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA 2009, 106(11):4402-4407
- 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(1):1-13
- Zhang Y, Jia Y, Zheng R, *et al.* Serum microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases[J]. Clin Chem, 2010, 56(12):1830-1838
- Zhang X, Chen C, M Wu, *et al.* Serum microRNA profile as a predictor of early virological response to pegylated interferon treatment in chronic hepatitis B patients[J]. Antiviral Therapy, 2012, 17(7):1243-1253
- Hao JL, Jin WS, Li XH, *et al.* Inhibition of alpha pegylated interferon (IFN- α)-induced microRNA-122 negatively affects the anti-hepatitis B virus efficiency of IFN- α [J]. Journal of Virology, 2013, 87(1):137-146

(收稿日期:2015-01-29)

(修回日期:2015-02-10)

人参皂甙 Rg3 对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤血管生成拟态的研究

江丹丹 郭敬强 陈亮

摘要 目的 本实验通过建立胰腺癌 SW-1990 细胞株皮下移植瘤模型,探讨人参皂甙 Rg3 对胰腺癌皮下移植瘤血管生成拟态的影响。**方法** 首先建立人胰腺癌细胞裸鼠模型,后给予不同药物浓度的人参皂甙 Rg3 (0、5、10、20mg/kg) 处理裸鼠,观察人参皂甙 Rg3 对裸鼠移植瘤生长的影响,免疫组化-PAS 双染观察人参皂甙 Rg3 对裸鼠胰腺癌皮下移植瘤血管生成拟态和血

作者单位:314000 嘉兴市第一医院(江丹丹、陈亮);310012 丽水市中心医院(郭敬强)