

• 临床检验研究论著 •

茎环引物 fqRT-PCR 检测心肌梗死后重构患者血清 miRNA-21 的表达及其临床意义^{*}

何凤屏,徐新,张社宾,唐良秋,马占忠,刘凤莲,袁书国

(汕头大学医学院附属粤北人民医院心血管研究所,广东韶关 512026)

摘要:目的 建立茎环引物实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(fqRT-PCR)检测微小 RNA(miRNA)的定量检测方法。**方法** 选择 300 例心肌梗死患者作为心肌梗死组,心肌梗死组患者根据病情再分为急性组、亚急性组及慢性组;同期选取 100 例健康体检者作为对照组。采用茎环引物 fqRT-PCR、金纳米-分子信标 fqRT-PCR 检测其血清 miRNA-21 表达水平。**结果** 急性期、慢性期心肌梗死患者血清 miRNA-21 表达水平高于亚急性期和对照组($P < 0.05$),亚急性期患者的血清 miRNA-21 表达水平高于对照组($P < 0.05$)。茎环引物 fqRT-PCR 检测 miRNA-21,最低检出 10^2 copies/ μ L 的稀释标本,而金纳米-分子信标 fqRT-PCR 最低检出 10^5 copies/ μ L 的稀释标本。茎环引物 fqRT-PCR 与金纳米-分子信标 fqRT-PCR 检测 miRNA-21 比较,节约 464 个引物,节省时间 208 min。**结论** 茎环引物 fqRT-PCR 检测 miRNA 具有快速、灵敏、重复性好,可用于临床定量分析 miRNA。

关键词:逆转录聚合酶链反应; 荧光抗体技术; 心肌梗死

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3122-03

Stem-loop primers based fqRT-PCR detection for serum miRNA-21 expression of patients suffering myocardial remodeling after infarction and its clinical significance^{*}

He Fengping, Xu Xin, Zhang Shebin, Tang Liangqiu, Ma Zhanzhong, Liu Fenglian, Yuan Shuguo
(Institute of Cardiovascular Research, Yuebei People's Hospital Affiliated to Medical College of Shantou University, Shaoguan, Guangdong 512026)

Abstract: **Objective** To establish a quantitative detection method of stem-loop primer based real time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction(fqRT-PCR) for micro RNA (miRNA). **Methods** 300 patients with myocardial infarction were collected to serve as myocardial infarction group, which subdivided into acute, subacute and chronic group according to their condition. 100 healthy volunteers were selected as the control group in corresponding period. stem-loop primer based fqRT-PCR, gold nanoparticle-molecular beacon fqRT-PCR were used to detect serum miRNA-21 expression level. **Results** Serum miRNA-21 expression level of patients in acute and chronic group were higher than those in subacute and control group($P < 0.05$). Serum miRNA-21 expression level of patients in subacute group was higher than that in control group($P < 0.05$). The minimum of 10^2 copies/ μ L diluted specimen was detected by stem-loop primer based fqRT-PCR while 10^5 copies/ μ L by gold nanoparticle-molecular beacon fqRT-PCR. Compared with gold nanoparticle-molecular beacon fqRT-PCR, stem-loop primer based fqRT-PCR re-trenched 464 primers and 208 min. **Conclusion** Stem-loop primers fqRT-PCR detection for miRNA is rapid, sensitive and reproducible, which can be used in clinical quantitative analysis of miRNA.

Key words: reverse transcriptase polymerase chain reaction; fluorescent antibody technique; myocardial infarction

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类高度保守的非编码小 RNA,它通过降解 miRNA 或抑制蛋白质翻译而调控基因的表达。近期研究表明^[1],先后有多种 miRNA 在心肌细胞中被鉴定,如 miRNA-1、miRNA-21、miRNA-133、miRNA-280 等,它们在心血管病理、生理过程中起着十分重要的调控作用,参与心脏发育、心肌重构、心律失常、血管病变等过程^[2]。建立一种能够快速、灵敏、特异性检测 miRNA 的实验方法是国内、外学者急需解决的问题。本研究采用一种茎环引物的实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(fqRT-PCR)检测 miRNA,提供了快速、准确的检测,并节约了时间和试剂成本,现作如下总结。

1 资料与方法

1.1 一般资料 300 例来自 2009 年 3 月至 2012 年 9 月在粤北人民医院心内科住院的心肌梗死患者作为心肌梗死组,同期

选取 100 例粤北人民医院健康体检者作为对照组,所有研究者均签署知情同意书。心肌梗死的诊断根据心肌梗死全球统一定义的第 1 条诊断标准^[3]:心脏生化标志物(肌钙蛋白)增高或增高后降低,至少有 1 次数值超过参考值上限的 99 百分位值,并有以下至少 1 项心肌缺血证据:(1)缺血症状;(2)提示新的心肌缺血心电图变化,即新的 ST 段改变或左、束支传导阻滞;(3)心电图出现病理性 Q 波;(4)影像学资料提示新的活力心肌丧失或新的区域性心壁运动异常。心肌梗死组患者根据病情的不同时期再分为急性组(心肌梗死发病 1 周内)、亚急性组(心肌梗死发病 2 周内)、慢性组(包括陈旧性,心肌梗死发病 4~8 周)。由于目前心肌梗死的分期尚无统一标准,本文采用临床症状结合体外实验进行分期。排除标准:患者、慢性心功能衰竭、糖尿病、甲状腺功能亢进、肾小球肾炎、肝病、脑血管疾病的患者均被排除。

* 基金项目:广东省自然基金资助项目(9151008901000039)。 作者简介:何凤屏(1966~),女,博士,教授,主要从事心室重构分子诊断的研究工作。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:miRNA-21 和 miRNA-280 提取试剂 Trizol(美国 Invitrogen 公司)、dNTP(德国 Qiagen 公司)、Taq 酶[上海复星医药(集团)股份有限公司]、ReverTra Ace fqRT-PCR 试剂盒及 TaqMan PCR 试剂盒(日本 Toyobo 公司)。主要仪器:CFX96™ fqRT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、磁珠分离器(美国 Onelambda 公司)。

1.3 茎环引物和 miRNA-21 标准品

通用茎环引物为 3' 端 8 个随机序列及茎环结构。8 个随机序列可与所有成熟 miRNA 的 3' 端结合,利于合成 miRNA 谱的 cDNA。茎环结构对全长 69 个碱基引物起稳定作用。参考文献[4-5]的标准茎环引物设计通用茎环引物和 miRNA-21 的茎环引物,其引物序列如下:miRNA-21: UGA CAG AAG AGA GUG AGC AC; RT primer: GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAC CAA CGT GCT C; Forward primer: GCG GCG GTG ACA GAA GAG AGT。

1.4 fqRT-PCR 检测 miRNA-21

1.4.1 样品 RNA 准备 严格按照实验说明书进行操作,将分离所得血清,按每 200 μ L 血清中加入等体积裂解液 MZ,振荡器混匀 30 s,室温放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离。

1.4.2 RNA 质量检测 提取样本 RNA 1 μ L,1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)溶液 49 μ L,稀释 50 倍,加样器混匀后加入到比色皿中,点击样本检测,记录实验相关波长为 260 nm、280 nm 处的光密度(OD)值,并计算 OD_{260}/OD_{280} 值,结果在 1.8~2.0 之间表示 RNA 纯度高。

1.4.3 逆转录合成 cDNA 取血样本 RNA 1 μ L(0.5 pg~1 μ g),加 2 μ L 缓冲液、0.5 μ L 逆转录酶、1 μ L 通用逆转录引物(优化终浓度选择 1~10 μ mol/L)。补充水至 10 μ L。逆转录反应条件为:10 °C 5 min,16 °C 30 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min,4 °C 下保持。将合成 cDNA 按实验需要稀释后,用于 PCR 扩增。

1.4.4 fqRT-PCR 检测 miRNA-21

优化 fqRT-PCR 的实验条件,参考 Hurley 等[6]的报道,并在其基础上进行优化。10 μ L PCR 反应体系包括:0.67 μ L RT 产物,1 \times TaqMan Mix,0.3 μ mol/L 的 TaqMan 探针,1.5 mmol/L 正向引物和 0.7 μ mol/L 反向引物。以合成的 cDNA 作为模板进行 fqRT-PCR 扩增,扩增条件为:95 °C 30 s,60 °C~70 °C 40 s,40 个循环。以 U6 作为内参照,以校正上样误差。所有的反应一式三份。Ct 值为在荧光通过固定阈值的循环数。荧光定量 Ct 值转换成绝对数量的拷贝数,合成 miRNA 的标准曲线。

1.4.5 fqRT-PCR 检测 miRNA-21 的评价

(1) 灵敏度分析:将稀释的 miRNA-21 标准品(10⁹ copies/ μ L)分别用通用茎环引物和常规引物进行逆转录。所得 cDNA 进行 10 倍梯度稀释(1~10⁹ copies/ μ L)后,用本研究建立的茎环引物法检测 miRNA-21 标准品的最低稀释浓度,以确定方法的灵敏度。(2) 特异性分析:对 PCR 扩增产物进行溶解曲线分析,曲线在 78 °C 处出现单峰,定为特异性扩增。(3) 精密度分析:将 miRNA-21 标准品稀释为 2×10⁷、2×10⁶、2×10⁵ copies/ μ L,在优化反应条件下,同一天内(批内)对上述 3 个浓度各进行 20 次检测,分别计算 3 个浓度 miRNA-21 fqRT-PCR 的 Ct 变异系数(CV)。(4) 与金纳米-分子信标 fqRT-PCR 比较:按上述灵敏度分析法分别采用茎环引物和金纳米-分子信标 fqRT-PCR 检测 miRNA-21 Ct 值,并对 2 种方法检测结果进行相关分析,2 种方法检测结果的 Ct 值与浓度对数值呈线性相关。同时,分别计算、比较 2 种方法所需的 miRNA-21 引物、试剂成本和实验时间。

间。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,重复实验所得 Ct 值,用配对 t 检验;miRNA-21 定量 Ct 值呈偏态分布,用配对非参数检验;采用 Pearson 相关系数法和直线回归法分析 2 种检测方法的相关性,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 急性期、亚急性期、慢性期心肌梗死患者血清 miRNA-21 的表达 急性期、慢性期心肌梗死患者的血清 miRNA-21 表达水平高于亚急性期和对照组($P<0.05$),亚急性期患者的血清 miRNA-21 表达水平高于对照组($P<0.05$),见图 1。

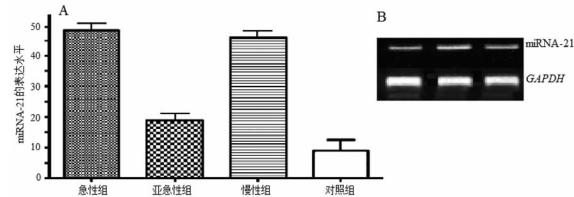


图 1 各时期血清 miRNA-21 的表达(A)及 PCR 产物(B)

2.2 miRNA-21 检测条件的优化结果 在茎环引物进行逆转录时,选择对引物反应终浓度进行优化,结果 1 μ mol/L 的茎环引物可使基线下降到最低(10⁻²),Ct 值提前 2 个循环出现。提示优化茎环引物可使荧光值上升,曲线斜率增大,扩增效率提高;1 μ mol/L 反应浓度有较高的 PCR 检测效率。

2.3 fqRT-PCR 设计通用茎环引物内的一段 PCR 引物位点,PCR 引物所引发的非特异性扩增可通过降低 PCR 引物浓度和提高扩增温度进行排除。对引物反应终浓度 1.0~0.1 μ mol/L 间进行优化,温度选择在 60 °C~70 °C 之间。溶解曲线分析结果显示:0.1 μ mol/L 引物浓度和 63 °C~66 °C 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。本检测 10 s 解链和 43 s 的荧光采集基本上能满足实验需要,整个 PCR 在 65 min 完成。

2.4 茎环 fqRT-PCR 检测 miRNA-21 的方法学评价 (1) 灵敏度评价:茎环 fqRT-PCR 检测 miRNA-21 标准品(10⁹ copies/ μ L)在连续 5 次 10 倍稀释(10² copies/ μ L)后,才出现结果偏离。确定其最低检出 10² copies/ μ L 的稀释标本,而金纳米-分子信标法最低检出 10⁵ copies/ μ L 的稀释标本。2 种实验方法比较,差异有统计学意义($P<0.001$),表明茎环 fqRT-PCR 检测 miRNA 优于金纳米-分子信标法。(2) 特异性和精密度分析:对 miRNA-21 PCR 扩增产物进行溶解曲线分析,结果溶解曲线在温度 78 °C 处出现单峰。而且 miRNA-21 cDNA 梯度浓度(10²~10⁹ copies/ μ L)对数值与检测 Ct 呈线性关系,证明为特异性 miRNA-21 扩增。优化的反应条件下,2×10⁷、2×10⁶、2×10⁵ copies/ μ L miRNA-21 检测的 Ct 分别为 21.2±0.11、28.7±0.16、33.4±0.19,上述 Ct 的批内 CV 分别为 2.1%、1.8%、1.67,表明茎环 fqRT-PCR 检测 miRNA-21 具有较高的精密度。

2.5 2 种方法的实验时间和试剂成本的比较 茎环 fqRT-PCR 检测 miRNA 的实验只需要设计 62 个茎环引物,采用金纳米-分子信标 fqRT-PCR 检测 miRNA 需要设计 526 个引物^[10]。茎环 fqRT-PCR 实验过程只需要 157 min,而采用金纳米-分子信标 fqRT-PCR 的实验过程却需要 365 min。因此,新建立的茎环 fqRT-PCR 技术较金纳米-分子信标 fqRT-PCR 技术明显节约 464 个引物费用和缩短实验 208 min 的操作时间。

2.6 茎环 fqRT-PCR 检测 miRNA 与液相芯片检测 miRNA 的比较 利用 miRNA 的液相芯片验证 300 例心肌梗死患者血清 miRNA-21 均为高表达,与对照组的差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。茎环 fqRT-PCR 检测 miRNA 与液相芯片检测 miRNA 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

本研究建立了一个新的 miRNA 的 fqRT-PCR 技术,应用茎环结构的引物来定量 miRNA。对于每一个 miRNA,设计了 3 条引物:一条反向引物用于反转录,一条正向引物,还有一条通用的反向引物,同时用于前 PCR 扩增步骤和 fqRT-PCR 步骤。特异的反向引物约 42~44 个核苷酸,其 5' 端的 36 个核苷酸序列是固定的,形成一个 8 核苷酸环和 20 核苷酸茎的结构,其 3' 端的 8 个核苷酸与 miRNA 互补。正向引物长约 25~32 个核苷酸,在 3' 端有 11~18 个核苷酸与相应的 miRNA 互补,而剩余 14 个核苷酸的熔解温度 (Tm) 值高于 65 °C。通用的反向引物为 23 nt,其中 18 个核苷酸对应特异反向引物的茎环结构部分,而 5' 端的 5 个核苷酸的 Tm 值高于 65 °C。

miRNA 是新发现的一类由 20~30 个核苷酸组成非编码 RNA 分子,它不编码蛋白质,但可通过 mRNA 调控生长、发育、分化和凋亡。有研究发现^[1-2], miRNA 在生物发育过程中存在组织特异性表达,参与形成并维持组织特异性。先后有数十种 miRNA 在心肌细胞中被鉴定,如 miRNA-1、miRNA-21、miRNA-133、miRNA-208、miRNA-499 等,它们在心血管系统疾病的发生、发展过程中起着非常重要的作用,提示 miRNA 可作为心肌损伤诊断标志物^[7-8]。由于 miRNA 序列很短,且同源,目前要建立特异性强、灵敏度高的快速检测 miRNA 的实验方法面临很大挑战性。Northern blot 及其衍生方法对 miRNA 的定量检测虽有很多优势,也是国际上公认的“金标准”,但此类方法检测必须事先准备大量的总 RNA 样本,操作技术复杂、繁琐,对检测人员专业程度和技术水平要求较高,限制了其临床应用。近年来人们提出基因芯片检测 miRNA 虽然具有高通量的特点,但价格昂贵,不适合在临上应用^[9]。本文采用液态芯片验证心肌梗死患者血清 miRNA-21 的表达,体现出本实验的可信程度。本文建立茎环 fqRT-PCR 实验过程只需 157 min,以往采用金纳米-分子信标 fqRT-PCR 的实验过程却需要 365 min。因此,新建立的茎环 fqRT-PCR 技术较金纳米-分子信标 fqRT-PCR 技术明显节约 464 个引物费用和缩短实验 208 min 的操作时间,适合在临上应用。

miRNA 在急性期、亚急性期、慢性期心肌梗死或梗死后重构的变化具有不同的特殊表达和临床意义^[10]。本研究显示 miRNA-21 在急性心肌梗死发生后 3~5 h 为高峰期,7 d 后下降到正常水平,与文献报道基本一致^[4,7,11]。而在急性心肌梗死发生 15 d 后血清 miRNA-21 表达上调,到梗死后 30 d 又出现另一个高峰期,本研究显示 miRNA-21 在亚急性期向慢性期演变过程发生特殊的变化,在这个时期 miRNA-21 表达上调可能在缺乏诱导的坏死心肌细胞和心肌梗死上发挥保护作用,其机制可能是通过靶基因 PDCD4 和 AP-1 的调控。研究显示 miRNA-21 能在缺血-再灌注诱导心肌损伤过程中起保护作用,并用热休克或预适诱导上调 miRNA-21,miRNA-21 通过抑制自杀相关因子配体 (FasL) 基因,激活抗凋亡基因 Bcl-2 表达,缺血-再灌注损伤后的梗死组织面积显著减少,提示

miRNA 在缺血-再灌注损伤中发挥保护作用^[12]。以上研究提示,血清 miRNA-21 在急性心肌梗死发生后 15~30 d 表达上调能明显缩小心肌梗死面积,有望作为治疗心肌梗死或梗死后重构的药物新靶点。因此,笔者认为 miRNA-21 可能是伴随急、慢性心肌梗死或梗死后重构变化的一个关键调控因子。在慢性心肌梗死时期显示心肌上 miRNA-21 的高表达和心肌结构好转,逆转心肌重构,在临上可作为预后评价的新型标志物。

通过溶解曲线分析、重复性和灵敏度实验,本研究建立的茎环 fqRT-PCR 检测 miRNA 具有快速、稳定、灵敏、节约实验时间和试剂成本等优点,为早期预测心肌梗死后重构演变提供新的检测手段。

参 考 文 献

- [1] Olivieri F, Antonicelli R, Capogrossi MC, et al. Circulating microRNAs (miRs) for diagnosing acute myocardial infarction: an exciting challenge[J]. Int J Cardiol, 2013, 167(6): 3028-3029.
- [2] Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, et al. The role of microRNAs in cardiovascular disease[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(16): 2605-2610.
- [3] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 推荐在我国采用心肌梗死全球统一定义[J]. 中华心血管病杂志, 2008, 36(10): 867-869.
- [4] Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction[J]. Cardiology, 2010, 115(3): 163-169.
- [5] Fernandes T, Magalhães FC, Roque FR, et al. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126[J]. Hypertension, 2012, 59(2): 513-520.
- [6] Hurley J, Roberts D, Bond A, et al. Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling[J]. Methods Mol Biol, 2012, 822: 33-52.
- [7] Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, et al. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2012, 14(2): 147-154.
- [8] Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? [J]. Circ Res, 2012, 110(3): 483-495.
- [9] 陈必成,王斯璐,白永恒,等.改良通用茎环引物筛查和定量检测微小 RNA 方法的建立[J].中华检验医学杂志,2011,34(10): 926-930.
- [10] Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, et al. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(6): 614-619.
- [11] Li C, Pei F, Zhu X, et al. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial infarction[J]. Clin Biochem, 2012, 45(10-11): 727-732.
- [12] 唐艳,王梦洪.微小 RNA-21 在心血管疾病方面的研究进展[J].临床心血管病杂志,2011,27(5): 323-326.

(收稿日期:2013-06-13)