

• 基础实验研究论著 •

用金纳米-分子信标的荧光定量 PCR 新技术研究 6 个 miRNAs 在心肌缺血患者中的表达*

何凤屏, 徐 新, 马绍椿, 唐良秋, 刘凤莲, 马占忠, 刘彦明

(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 探讨新建立金纳米-分子信标探针的实时荧光定量 PCR 技术及其分析不同程度心肌缺血患者的 6 个微小 RNA(microRNA, miRNA): miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133, miRNA-199, miRNA-208, miRNA-499 的表达水平。方法 用新构建金纳米-分子信标探针引入实时荧光定量 PCR 技术分析 200 例不同程度心肌缺血患者血清中的以上 6 个 miRNAs 的表达水平,并用 xMAP 液态芯片技术验证以上 miRNAs 的表达。结果 急性心肌缺血组:在急性心肌梗死(AMI)发病后 1~3 h 检测到 miRNA-21, miRNA-133, miRNA-199, miRNA-208, miRNA-499 的表达上调;慢性心肌缺血组:通过对原发性高血压并发心肌缺血患者研究显示 miRNA-21, miRNA-133, miRNA-199, miRNA-1 的表达上调,以上两组分别与健康对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.001$)。新构建的金纳米-分子信标探针检测的特异度为 86.7%,灵敏度为 90.2%,均高于常规分子信标(53.4%、66.8%),两种方法比较差异有统计学意义($P < 0.001$),与 xMAP 液态芯片技术比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 新建立的金纳米-分子信标探针的实时荧光定量 PCR 技术可作为早期检测 miRNAs 新的实验方法,为心肌梗死患者的早期诊断提供新的检测手段。

关键词:金纳米; 核酸探针; 微 RNAs; 聚合酶链反应; 心肌缺血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)04-0387-03

Quantitative detection of the expression of six miRNAs in patients with ischemic cardiovascular disease by using fluorescence real-time PCR utilizing molecular beacon and gold nanoparticles*

He Fengping, Xu Xin, Ma Shaochun, Tang Liangqiu, Liu Fenglian, Ma Zhanzhong, Liu Yanming
(Department of Cardiology, Institute of Cardiovascular Diseases, the Affiliated Yuebei People's Hospital of Medical College, Shantou University, Shaoguan, Guangdong 512026, China)

Abstract: Objective To investigate the usage of a novel fluorescence real-time polymerase chain reaction(RT-PCR) technology utilizing gold nanoparticle(AuNP) and molecular beacon(MB) probe for the quantitative detection of 6 microRNAs(miRNAs) in patients at different stage of ischemic cardiovascular disease. **Methods** The expression of the 6 miRNAs in 200 patients with ischemic cardiovascular disease were detected by using the sensitive detection method constructed in this study, and the results were validated by flexible multi-analyte profiling(xMAP). **Results** In patients group with acute myocardial ischemia, the serum levels of miRNA-21, miRNA-133, miRNA-199, miRNA-208 and miRNA-499 were significantly up-regulated in 1-3 hours after the onset of acute myocardial infarction. In patients group with chronic myocardial ischemia, the expression of miRNA-21, miRNA-133, miRNA-199 and miRNA-1 were significantly up-regulated in patients combined with primary hypertension and myocardial ischemia. And the expression levels of the miRNAs mentioned above were significantly higher in the two patients groups than those in control group($P < 0.05$, $P < 0.001$). The specificity was 86.7% and the sensitivity was 90.2% of AuNP-MB assay, which were higher than 53.4% and 66.8%, respectively, of MB assay. **Conclusion** Novel fluorescence RT-PCR assay using AuNP-MB technology, constructed in this study, could be used for the early detection of miRNAs and the early diagnosis of ischemic cardiovascular disease.

Key words: nucleic acid probes; microRNAs; polymerase chain reaction; myocardial ischemia

近年来,国内外报道 miRNAs 在心血管病理生理中发挥着重要的调控作用,miRNAs 的特异性表达使其可能成为心肌损伤的重要分子标志物^[1-2]。因此,建立一种特异性强、灵敏度高、成本较低检测 miRNAs 的实验方法是目前国内外研究热点。本文拟采用新构建金纳米-分子信标探针引入实时荧光定量 PCR 技术分析 200 例不同程度心肌缺血患者的 6 个 miRNAs: miRNA-1、miRNA-21、miRNA-133、miRNA-199、miRNA-208、miRNA-499 表达水平的变化以及建立早期诊断不同程度心肌缺血的实验方法,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 样本 选取 2010 年 3 月至 2011 年 10 月在粤北人民

医院心内科住院的心肌缺血患者 200 例[包括 100 例急性心肌梗死(AMI)组和 100 例原发性高血压并发心肌缺血组]作为研究组,年龄 45~65 岁,其中男 124 例,女 76 例;同时选取 100 例粤北人民医院健康体检人群作为对照组,所有受试者均签有知情同意书。以上受试者清晨空腹肘静脉采血 6 mL,其中 3 mL 用于检测心肌损伤标志物,另 3 mL 用于检测 6 个 miRNAs。

心肌梗死的诊断标准是根据心肌梗死全球统一定义的诊断标准^[3]。

原发性高血压诊断标准:根据 1999 年《WHO/国际高血压学会高血压防治指南》收缩压大于或等于 140 mmHg(21.3 kPa)和/或舒张压大于或等于 90 mmHg(12.6 kPa)定义为高

血压^[4]。

心肌缺血的诊断标准是根据典型心肌缺血的心电图诊断^[5]:(1)缺血性 ST 段改变,ST 段降低大于 0.05 mV,可表现为水平型、下垂型、弓背型、下陷型以及近似缺血(类水平)型;(2)QT 间期延长;(3)U 波导联,在 T 波直立的导联出现 U 波倒置,通常是心肌缺血的表现。

排除标准:凡是患有急性和慢性心功能衰竭、糖尿病、甲状腺功能亢进、肾小球肾炎、肝脏疾病、脑血管疾病的均被排除。

1.1.2 试剂 Taqman MicroRNA Assay(miRNA-1、miRNA-21、miRNA-133、miRNA-199、miRNA-208、miRNA-499)的茎环引物和 U6 RNA 引物(内参照引物)购自美国 GeneCopoeia 公司,微球(上海透景)。

1.1.3 仪器 CFX96 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),Laminex 200 仪器(美国 Laminex 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 总 miRNA 提取 取已备好的患者血清 300 μL ,按照 mirVana™ PARIS™ Kit 提取包括 miRNA 在内的总 RNA,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 miRNAs 引物设计 使用分子信标探针,以小核 RNA U6 为内参进行实时荧光定量 PCR 反应。

1.2.3 金纳米分子信标新型探针制备 参考王周平等^[6]和 Yin 等^[7]报道的实验方法进行改进,在分子信标核酸序列 3' 端标记纳米金,具体方法如下:胶体金溶液 200 μL , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 11 000 r/min 离心 13 min,弃上清液;加 5' 端标记有荧光纳米颗粒的 DNA 探针 50 μL ,混匀,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境,反应 12 h,11 000 r/min 离心 8 min,弃上清液,加 100 μL TE 缓冲液重悬后再次离心,弃上清液,以除去多余的游离寡核苷酸链;加 100 μL TE 缓冲液混匀,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境储存备用。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 测定 本项目将受试者血清的总 RNA($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$)用 DEPC 处理过的水稀释到 100 ng/ μL ,然后取浓度为 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的总 RNA 样品 5 μL 加到反应混合溶液中(包括 $10\times$ Taqman 缓冲液,正向引物 5 pmol/ μL ,反向通用引物 5 pmol/ μL ,dNTP Mixture 10 mmol/L, Taqman 酶 5 IU/ μL ,U6 引物 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和分子信标 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。热循环参数为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min \rightarrow $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s \rightarrow $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s,50 个循环。U6 作为内参。每个样本反应做 3 个复孔,所有反应均通过 CFX96 荧光定量 PCR 仪完成。

1.2.5 测定分子信标与目标 DNA 的浓度 采用荧光定量 PCR 仪的测定,当目标 RNA 与分子信标的终浓度比值为 20 时,分子信标的荧光强度增加最为明显。

1.2.6 特异性分析 按照标准的实验操作步骤,测定的目标链、单碱基错配链和随机对照链的荧光响应值。结果显示,若把目标链的相对荧光强度定为 100,则单碱基错配链的相对荧光响应值为 12.55,随机对照链的相对荧光响应值为 0.9。其原理为:当加入完全互补的目标链时,目标链与分子信标的探针序列杂交形成有一定刚性的双螺旋结构,导致分子信标的构象改变,茎环结构完全打开,发光基团荧光纳米颗粒与淬灭基团金纳米分开,二者之间的能量转移终止,在 485 nm 光激发下,发光基团金纳米粒子发射荧光,表现为荧光强度的大幅增加。当单碱基错配链加入反应体系时,分子信标茎环结构的热力学平衡仍然保持较好,使得单碱基错配链与分子信标不能很好地结合,分子信标茎环打开数量较少,导致荧光强度增加幅度较小。而当随机对照链加入时,其与分子信标的探针序列不能通过互补杂交形成刚性的双螺旋结构,分子信标的构象不会发生改变,茎环结构干部分也不会打开,发光基团荧光纳米颗

粒与淬灭基团金纳米颗粒仍然紧挨在一起。

1.2.7 灵敏度分析 将金纳米-分子信标与常规分子信标的 RNA 浓度以 1/10 梯度系列稀释,用实时荧光定量 PCR 检测 U6 和 6 个 miRNAs,并比较两种方法的灵敏度,重复 10 次时,金纳米-分子信标偏差为 2.6%,常规分子信标为 7.6%。金纳米-分子信标法检测目标 RNA 浓度在 1~500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,常规分子信标法检测目标 RNA 浓度在 12~33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。前者目标 RNA 浓度范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y=0.0034(\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{L})+1.394$,相关系数 $r^2=0.8917$,检测下限为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。金纳米-分子信标的 RNA 浓度 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 稀释到 0.1 pg/ μL ,而常规分子信标的 RNA 浓度 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 稀释到 1 pg/ μL 。

1.3 xMAP 液态芯片技术检测 6 种 miRNAs 表达及探针设计 xMAP 液态芯片体系是由微米级的聚苯乙烯荧光编码为主要基质,微球在实验过程中加入两种不同颜色的荧光染料,按不同比例混合,得到 100 多种不同光谱标记的编码微球。每一种微球表面都可共价结合一种寡核苷酸探针即捕捉序列。在液态芯片(xMAP)体系中,本项目采用了 RNA-DNA 嵌合探针,在嵌合探针中,RNA 碱基序列部分与 miRNA 相互补,DNA 碱基序列部分与微球上捕捉序列相互补,形成微球-嵌合探针-miRNA 复合物。

1.4 统计学处理 所得 C_t 值以相应标本的 U6 扩增标准化之后,与健康人比较相对较高或降价的 C_t 值,输入 SPSS 17.0 分析软件,采用 Kolmogorv-Smirnov 检验法做数据正态分布检验,因数据不符合正态分布,统计学方法采用秩和检验,两组比较和多组比较均采用 Wilcoxon 法,获得平均对数及其标准差、 P 值, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金纳米-新型分子信标与常规分子信标检测 200 例 AMI 和原发性高血压患者血清的 6 种 miRNAs 的表达水平 比较金纳米-分子信标与常规分子信标两种方法检测两组血清 miRNA-21、miRNA-133、miRNA-199、miRNA-208 和 miRNA-499 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 金纳米-分子信标与液相芯片检测 6 种 miRNAs 的比较 利用 miRNAs 的液相芯片验证 200 例 AMI 和原发性高血压并发心肌缺血患者血清中 6 的种 miRNAs 表达水平。比较金纳米-分子信标与液相芯片两种方法检测两组血清 miRNA-21、miRNA-133、miRNA-199、miRNA-208 和 miRNA-499 差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 金纳米-分子信标与液相芯片检测 4 种 miRNAs 的相关分析 金纳米-分子信标法与液相芯片法检测 miR-21、miR-208、miR-133 和 miR-499 表达的相关系数分别为 $r=0.810$ 、 $r=0.717$ 、 $r=0.631$ 、 $r=0.604$ ($P<0.05$)。

3 讨论

miRNAs 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 miRNAs 已成为心血管疾病发生、发展的主要调节因子,提示 miRNAs 有望成为心肌损伤诊断标志物^[8]。由于 miRNAs 序列很短且序列同源、组织特异性和发病阶段特异性表达等原因导致其检测技术具有很大的挑战性。虽然 Northernblot 和微阵列芯片技术曾是应用最广泛的 miRNAs 分析方法,但是这些方法的灵敏度和选择性都不能满足其检测的要求。近年来发展了一些新的检测方法^[9],如 RT-PCR、支化滚环扩增(RCA)、连接酶链式反应(LCR)等,这些方法灵敏度较高、miRNAs 序列的选择性也较好,但是要

求高级的信号检测系统,花费较高,且耗时耗力,难以推广应用。近年来,金纳米标记技术在各领域已得到广泛的应用。由于金纳米颗粒与生物大分子表面相结合的亲和力,可根据实验需要构建各种类型的探针。金纳米还具有制备过程简单、用量和被检测样本的用量极少、成本低等优点。近年来,荧光纳米颗粒在生物医学的应用方面发挥着越来越重要的作用。有文献报道,纳米金探针组成的分子信标检测单个碱基错配的效率是一般分子信标的 8 倍,灵敏度是一般分子信标的 100 倍^[10]。本文比较了采用金纳米-分子信标和传统分子信标检测 AMI 患者血清中 6 种 miRNAs 的表达量,金纳米-分子信标检测的灵敏度为 90.2%,后者为 66.8%;前者特异度为 86.7%,后者特异度为 53.4%;前者线性范围是 1~500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,明显大于后者的检测范围(12~35) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($P < 0.001$)。本文将金纳米-分子信标与常规分子信标的 RNA 浓度以 1/10 梯度系列稀释,金纳米-分子信标的 RNA 浓度 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 稀释到 0.1 $\text{pg}/\mu\text{L}$,而常规分子信标的 RNA 浓度 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 稀释到 1 $\text{pg}/\mu\text{L}$,用实时荧光定量 PCR 检测 U6 和 6 个 miRNAs 比较两种方法的灵敏度,重复 10 次时,金纳米-分子信标偏差为 2.6%,常规分子信标为 7.6%。以上结果显示金纳米-分子信标探针检测 miRNAs 具有很大的优势,实现 miRNAs 的高灵敏检测。

分子信标是一种新型荧光标记寡核苷酸探针,具有灵敏度高、特异性强、荧光背景极低的显著优势。本文用金纳米作为分子信标中的荧光淬灭团,相比于传统使用 DABCYL 的荧光淬灭效率高。能成功地引入金纳米分子信标技术检测 miRNAs 分子。本实验利用 T4 RNA 连接酶提高了成环的效率及特异性,在反应中加入 miRNAs 的反向引物,该反向引物可以结合到由许多重复序列组成的长链 RNA/DNA 产物上并产生延伸反应形成更多的 RNA/DNA 产物,进一步放大。在实验中需要加入分子信标核酸序列 3' 端标记纳米金,加 5' 端标记了荧光纳米颗粒的 DNA 探针,进行 miRNAs 的高灵敏的定量检测。此外,本文采用 miRNAs 的液相芯片验证 200 例急、慢性心肌缺血患者血清的 6 种 miRNAs 表达水平,显示金纳米-分子信标与液相芯片两种方法检测两组血清 miRNA-21、miRNA-133、miRNA-199、miRNA-208 和 miRNA-499 差异无统计学意义 ($P > 0.05$),体现出金纳米-分子信标检测 miRNAs 高特异度和灵敏度。

近年来,有研究发现 miRNAs 在循环血液中表达,并在血浆和血清中有良好的稳定性。循环 miRNAs 的水平和活性变化参与心血管疾病的病理过程,在检测中具有独特优势,在心血管疾病的诊断及治疗中具有非常重要的意义。本文结果显示 AMI 组 miRNA-21、miRNA-133、miRNA-199、miRNA-208 和 miRNA-499 表达上调,与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.001$);而在原发性高血压并发心肌缺血组的研究显示 miRNA-21、miRNA-133、miRNA-199、miRNA-1 表达上调,笔者认为以上两组 miRNAs 的差异表达与患病严重性和病程发展有密切相关。

Wang 等^[10]和 Corsten 等^[11]研究发现 AMI 患者中 miRNA-208、miRNA-499 急剧升高,其两种 miRNAs 的表达水平均与 In-I 相关,证实两种 miRNAs 与心肌细胞损伤有关,同时,发现 miRNA: miRNA-1、miRNA-133、miRNA-21、miRNA-

199 在心 AMI 患者血清中较未患病者明显升高。但是,另一些学者认为 miRNA-21 和 miRNA-208 在 AMI 患者显示为下调,不能作为心肌损伤标志物^[12-13]。还有研究发现 miRNA-21 能在缺血/再灌注诱导的心脏损伤上起保护作用,并且发现用热休克或预适应诱导上调的 miRNAs 包括 miRNA-21 能明显缩小心肌梗死面积^[14],成熟 miRNA-21 的序列在大多数脊椎动物上具有保守性,在人类和其他脊椎动物的基因组上 miRNA-21 的基因定位具有差异性,提示了 miRNAs 在心脏缺血、损伤中呈差异表达,其发病机制目前仍然不清楚,有待于今后进一步地研究和探讨。

参考文献

- [1] Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, et al. The role of microRNAs in cardiovascular disease[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(16):2605-2610.
- [2] 王小东, 张代富. MicroRNAs 与心肌梗死研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2011, 32(2):171-175.
- [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] Chalmers J. The 1999 WHO-ISH guidelines for the management of hypertension[J]. *Med J Aust*, 1999, 171(9):458-459.
- [5] 郭继鸿, 张萍. 动态心电图学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003.
- [6] 王周平, 徐欢, 段诺, 等. 基于分子信标荧光纳米探针的李斯特菌 DNA 均相检测方法[J]. *化学学报*, 2010, 68(9):909-916.
- [7] Yin H, Zhou Y, Zhang H, et al. Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 33(1):247-253.
- [8] 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.
- [9] Zhou Y, Huang Q, Gao J, et al. A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(15):156-158.
- [10] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans[J]. *Eur heart J*, 2010, 31(6):13-23.
- [11] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3(6):499-506.
- [12] Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, et al. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(11):3912-3916.
- [13] 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.
- [14] Duan X, Ji B, Wang XH, et al. Expression of microRNA-1 and microRNA-21 in different protocols of ischemic conditioning in an isolated rat heart model[J]. *Cardiology*, 2012, 122(1):36-43.

(收稿日期:2012-09-10)