

· 论 著 ·

荧光定量 PCR 检测宫颈癌患者血清中 miR-203 表达水平及意义*

杨春兰, 申娟娟, 鞠少卿, 苏建友[△]

(南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 建立 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测血清中 miR-203 的表达水平, 并检测宫颈癌患者、良性宫颈疾病及健康对照者血清 miR-203 的表达水平。方法 设计 miR-203、U6 茎环逆转录引物和 PCR 扩增引物进行荧光定量 PCR, 以 U6 为内参相对定量比较不同宫颈疾病患者血清中 miR-203 的表达水平。结果 该研究建立的方法能特异性检测到血清中 miR-203 的扩增信号, 溶解曲线单一, PCR 产物特异。宫颈癌患者血清中 miR-203 表达水平明显高于子宫肌瘤、宫颈炎等其他良性宫颈疾病, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 是一种快速简便、灵敏度高、特异度好的检测方法, 可能在宫颈癌辅助诊断中有较好的应用前景。

关键词: SYBR Green I 实时荧光定量 PCR; miR-203; 宫颈癌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)24-3552-02

Serum miR-203 expression level detected by fluorescence quantitative PCR in cervical cancer patients and its significance

Yang Chunlan, Shen Xianjuan, Ju Shaoqing, Su Jianyou[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: **Objective** To establish the method of the SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR for detecting the serum miR-203 expression level, and to detect the serum miR-203 expression levels in the patients with cervical cancer, cervical benign diseases and healthy controls. **Methods** The miR-203, U6 stem loop RT primers and the PCR amplification primers were designed for conducting fluorescence quantitative PCR, with U6 as the internal relative quantification, the serum miR-203 levels were compared among different cervical diseases. **Results** The established method could specifically detect the amplification signal of serum miR-203, the melting curve was single and PCR products were specific. The serum miR-203 level in the patients with cervical cancer was significantly higher than that in the patients with benign cervical diseases such as hysteromyoma and cervicitis, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR is a quick, simple detection method with high sensitivity and good specificity, which may have a better application prospect in cervical cancer auxiliary diagnosis.

Key words: SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR; miR-203; cervical cancer

microRNA (miRNA) 是一种内源性非编码单链小分子 RNA, 长度约为 21~25 个核苷酸, 可与特定的目标 mRNA 结合, 通过促进靶 mRNA 的降解和(或)抑制翻译过程而发挥负调控基因表达的作用, miRNA 对疾病的影响、致病机制正成为研究的热点^[1]。miR-203 是近年来发现的第一种皮肤特异性 miRNA, 不但参与调控胚胎期表皮分化、构建皮肤保护层, 并与银屑病和牛皮癣等皮肤性疾病有关, 而且作为抑癌或致癌因子与靶基因共同作用参与肿瘤细胞的增殖分化、侵袭转移和凋亡等^[2]。新近研究发现, miR-203 的异常表达与食管癌、结肠癌、前列腺癌、慢性粒细胞白血病等多种肿瘤的发生、发展相关。宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 在世界女性癌症发病率中排第 2 位, 病死率排第 5 位。宫颈癌的发生、发展和转归是一个极其复杂的多阶段、多基因调控异常的过程。研究表明对于在宫颈癌细胞中低表达或沉默表达的抑癌性 miRNA, 可通过 miRNA 表达载体系统或 miRNA 类似物导入外源 miRNA, 抑制肿瘤细胞生长, 以治疗和预防宫颈癌。研究发现 miR-199a, miR-143, miR-214 等 miRNA 分子的异常表达与宫颈癌发生和发展密切相关。

因此, 是否能将 miR-203 作为一个新标志物, 通过检测血清中 miR-203 的表达量来进行宫颈癌的早期诊断和预后判断成为此次研究的主要目的。

1 资料与方法

1.1 一般资料 宫颈癌患者 7 例、子宫肌瘤患者 5 例、宫颈炎患者 5 例及健康对照组 7 例, 年龄 41~65 岁, 平均 48 岁, 来自南通大学附属医院。

1.2 仪器与试剂 主要仪器有高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司), 紫外分光光度计(德国 Implen 公司), 7500 Real Time PCR System(美国 ABI 公司), -80 °C 低温冰箱(日本 Sanyo 公司), 荧光定量 PCR 八连管(美国 Axygen 公司)。试剂主要有总 RNA 提取试剂 Trizol(美国 Invitrogen 公司), miR-203 和 U6 RT Primer, Bulge-Loop™ miRNA Primer(广州锐博生物科技有限公司), Trizol(美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂, Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×)(立陶宛 Fermentas 公司), DNA 引物(大连 TakaRa 生物工程公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采用分离胶的真空采集管收集血液标本, 1 000 r/min 离心 10 min 后, 将上层血清分装于 Rnase-free 的 EP 管中, -80 °C 保存备用。

1.3.2 血清 RNA 提取 用 QIAGEN miRNeasy Mini kit 试剂盒内的 QIAzol、RWT、RPE 试剂以及吸附柱提取血清 RNA, 最终溶于 40 μL nuclease-free H₂O 中。用紫外分光光度

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271920, 81301498)。

作者简介: 杨春兰, 女, 副主任技师, 主要从事临床生化与免疫学工作。

[△] 通讯作者: E-mail: src85822584@sina.com。

计测得 RNA 浓度及纯度,取适量模板进行逆转录反应。

1.3.3 cDNA 的合成 逆转录反应体系:RNA 500 ng, 62.5 nmol/L 茎环状逆转录引物 1.6 μ L, 5 \times Reaction Buffer 4 μ L, dNTP(10 mmol) 2 μ L, RNase inhibitor (20 u/ μ L), Reverse Transcriptase(200 u/ μ L) 1 μ L, nuclease-free H₂O 补足至 20 μ L,混匀,瞬时离心。反应条件为 42 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 5 min。逆转录产物置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 反应体系为 SYBR Green I mix (Rox) 9 μ L, cDNA 5 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, miR-203 正向引物序列:5'-GUG AAA UGU UUA GGA CCA CUA G-3', 反向引物序列:5'-CCA GUG GUU CUU AAC AGU UCA AC-3'; U6 正向引物序列:5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 反向引物序列:5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。RNase-free H₂O 补足至 20 μ L, 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 min, 40 个循环, 60~95 $^{\circ}$ C 收集荧光绘制熔解曲线。

1.4 统计学处理 本次实验采用比较 Ct 值法, 首先将两项平行反应取平均 Ct 值, Δ Ct=Ct(miR-203)-Ct(U6snRNA), 基因相对表达量采用 2^{- Δ Ct} 方法计算。所有资料用 Graphpad Prism5 软件进行统计分析。

2 结 果

样品总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 左右, 见图 1, 提取纯度较好, 可进行下一步的荧光定量的反应。根据测得的浓度加入 5 μ L cDNA 模板扩增。

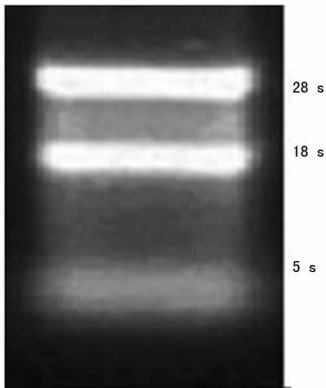


图 1 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量

从熔解曲线图上可以看出, miR-203、U6 的熔解曲线峰值单一, 略有差异, 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”), miR-203 熔解温度为 79.55 $^{\circ}$ C 左右, U6 熔解温度为 83.06 $^{\circ}$ C 左右。表明 PCR 参数选择适当, miR-203、U6 逆转录引物和扩增引物能够扩增出 miR-203、U6 片段, 产物特异度较好, 非特异产物对结果影响较小。

miR-203 的 real-time PCR 扩增曲线宫颈原位癌患者血清中 miR-203 与 U6 snRNA 反应曲线呈标准 S 型, 见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。在本试验中, U6 在所有标本中都有稳定表达, 且 Ct 值比较集中, 在 22 \pm 2 之间, 可作为该实验的内参照。

血清 miR-203 PCR 反应曲线呈标准 S 型, 通过计算得出 24 份样本的血清中 miR-203 检测结果: 7 位宫颈原位癌患者 Ct 值结果为 16.21、15.38、14.98、17.21、16.68、13.98、15.49; 5 位子宫肌瘤患者结果为 22.11、23.58、25.87、27.58、26.24; 5 位宫颈炎患者结果为 21.80、24.86、22.84、23.16、22.69; 7 位健康对照组结果为 24.30、25.64、23.24、26.14、23.54、22.57、25.47。经过统计学分析发现, 宫颈癌患者血清中 miR-203 表

达水平明显高于子宫肌瘤和宫颈炎患者 ($P < 0.05$)。子宫肌瘤和宫颈炎患者血清中 miR-203 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

早期宫颈癌大多数患者通过手术或放射治疗可以控制病情, 有一个相对有利的预后。但是, 仍有淋巴结转移的患者漏诊率很高。目前, 用于检测淋巴结转移的各种方法, 如 CT、MR 和 PET-CT, 均具有较低的敏感度和特异度。最近研究表明, 血清中含有大量来自不同组织的稳定 miRNA。

Chen 等^[3]首次研究证实血清 miRNA 可以作为潜在的肿瘤标志物, 研究结果显示弥漫性大 B 淋巴细胞瘤患者血清中 miR-155、miR-210、miR-21 表达量明显高于健康对照组, 而且 miR-21 的表达水平与患者存活率密切相关。随后有大量研究证实血清 miRNA 可作为多种肿瘤辅助诊断、鉴别诊断、预后判断、病程监测的标志物^[4]。如胰腺癌患者血清中 7 种 miRNA 分子 (miR-20a, miR-21, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-185, miR-191) 表达明显上调, 且 miRNA-21 表达水平与胰腺癌患者的存活率密切相关; 前列腺癌患者血清中 miRNA-375, miRNA-141 表达上调, 其表达水平和格里森指数、淋巴结转移等高度相关。目前, 通过对宫颈癌相关 miRNA 进行鉴定和功能分析, 已发现宫颈癌中有明确靶基因的 miRNA 差异表达谱, 如 miR-21、miR-34a、miR-143 等, 可能为宫颈癌诊断和鉴别诊断提供有价值的参考指标。

在多种肿瘤中, miR-203 的异常表达已经被多次指出。如肺癌、胰腺癌、膀胱癌患者 miR-203 的高表达。Cheung 等^[5]研究发现 miR-20a 和 miR-203 与宫颈癌的侵袭和转移密切相关。在本次研究中, 笔者建立了 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测血清 miR-203 的方法, 该方法快速简便、敏感度高、特异度好。并运用该方法检测发现宫颈癌患者血清中 miR-203 表达水平明显高于子宫肌瘤和宫颈炎患者, 子宫肌瘤和宫颈炎患者血清中 miR-203 表达水平没有显著差别, 其可能会对宫颈癌辅助诊断有一定作用。

由于标本量较少, 在建立了较成熟的方法后还需增加标本量的检测, 需要进一步说明试验的重复性和稳定性。此外, 由于 miR-203 在多种肿瘤组织中表达量都有升高, 是否可以通过两种或多种 miRNA 联合诊断宫颈癌也为日后的研究提供了一个方向。

参考文献

[1] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23: 175-205.
 [2] Viticchiè G, Lena AM, Cianfarani F, et al. MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization[J]. Cancer, 2012, 10(2): 435.
 [3] 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[J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.
 [4] 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.
 [5] Cheung TH, Man K-, Yu MY, et al. Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm[J]. Cell Cycle, 2012, 11(15): 2876-2884.

(收稿日期: 2015-06-22)

