

• 论 著 •

实时荧光定量聚合酶链反应检测食管癌患者血清 miR-100 表达的意义*

施秀英¹, 王 琪², 蒋钊钰², 徐 林², 吴 杰², 张 晨², 袁 杰², 鞠少卿¹

(1. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001; 2. 南通大学公共卫生学院医学检验系, 江苏南通 226019)

摘要:目的 检测食管癌患者与健康人血清中 miR-100 的表达量差异, 并探讨其作为食管癌分子诊断指标的可能性。方法 采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测 40 例食管癌患者(研究组)和 50 例体检健康者(对照组)血清中 miR-100 的表达量, 并进行统计学分析。结果 研究组及对照组血清中 miR-100 的表达量分别为 6.399 ± 3.541 、 2.625 ± 1.515 , 研究组明显高于对照组, 差异有统计学意义($t=9.07, P<0.05$)。用于食管癌患者诊断的 miR-100 的 ROC 曲线下面积为 0.832(95% 置信区间为 0.731~0.934), 当 Cut off 值为 5.285 时, miR-100 诊断食管癌的灵敏度和特异度分别为 65% 和 95%。结论 食管癌患者血清中 miR-100 表达较健康人高, 有望成为该疾病辅助诊断的新分子标志物。

关键词:食管癌; 微小 RNA; 实时荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)06-0738-03

Value of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction in detecting expression of miR-100 in patients with esophageal cancer*

Shi Xiuying¹, Wang Qi², Jiang Yanyu², Xu Lin², Wu Jie², Zhang Chen², Yuan Jie², Ju Shaoqing¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Inspection Department, Public Health School of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019, China)

Abstract: Objective To compare the expression of serum miR-100 in patients with esophageal cancer and healthy person, and explore the value of miR-100 in diagnosis for esophageal cancer. **Methods** Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was used to detecting miR-100 in 40 esophageal cancer patients(study group) and 50 healthy person(control group). **Results** The expression of miR-100 in the study group and control group were 6.399 ± 3.541 , 2.625 ± 1.515 respective, the expression in the study group was significant higher than that of the control group($t=9.07, P<0.05$). The under area of receiver operating characteristic curve of miR-100 in diagnosis for esophageal cancer was 0.832(95% confidence interval was 0.731-0.934), when the Cut off value was 5.285, the sensitivity and specificity of miR-100 in diagnosis for esophageal cancer were 65% and 95%. **Conclusion** Serum miR-100 in esophageal cancer patients is higher than that in healthy person, which might be a new molecular markers in diagnosis for esophageal cancer.

Key words: esophageal cancer; miR-100; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction

食管癌是一种常见的恶性肿瘤,其病死率在我国为恶性肿瘤疾病的第四位^[1]。由于缺乏早期诊断的灵敏指标,食管癌患者多数起病隐匿、预后较差,所以早期诊断、早期预防对患者的治疗及预后意义重大,但目前尚缺乏灵敏度及特异度高的血清检测指标。微小 RNA(miRNA)是一类内源性的、约 17~25 bp 大小的非编码单链小分子 RNA,主要通过降解靶基因 mRNAs 或抑制靶基因蛋白翻译参与转录后水平负调控,对细胞分化、增殖、凋亡等多个过程有着重要的调控作用,其表达异常可导致某些疾病的发生,甚至形成肿瘤^[2-3]。食管癌相关研究显示食管癌患者中有多种 miRNA 表达异常,miRNA 表达谱可区分正常组织和肿瘤,可作为患者的早期诊断,高危预警的指标^[4-7]。本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测 miR-100 在食管癌患者和健康人血清中的表达量,并探讨其在食管癌诊断方面的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 1~12 月南通大学附属医院的食管癌患者 40 例纳入研究组,其中男 24 例,女 16 例,年龄 40~67

岁,平均(56.8±8.9)岁,均未经过放疗或化疗,且按世界卫生组织(WHO)《病理组织学诊断标准(2007 年)》确诊。同期本院 50 例体检健康者纳入对照组,其中男 28 例,女 22 例,年龄 41~65 岁,平均(55.0±7.6)岁。2 组研究对象年龄及性别差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);高速冷冻离心机(日本日立公司);紫外分光光度计(德国 ImPlex 公司);U6 的逆转录引物,荧光定量 PCR 上、下游引物(广州锐博生物科技有限公司);逆转录试剂盒(美国赛默飞公司);RNA Master SYBR Green I(瑞士罗氏公司);mirVana PARIS Kit 试剂盒(美国生命技术公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集空腹静脉血 3 mL 于惰性分离胶促凝管中,1 000 r/min 离心 10 min,将上层血清分装至 RNase-free 的 EP 管中,冰盒运送,-80 ℃ 保存备用。

1.3.2 外周血总 RNA 的提取 按照 mirVana PARIS Kit 试剂盒说明书操作提取 RNA。用紫外分光光度计测得 RNA 浓

* 基金项目:南通大学大学生创新训练计划项目(201410304092X)。 作者简介:施秀英,女,副主任技师,主要临床血液学检验研究。

度和纯度,将提取完毕的总 RNA 标本冻于 -80 °C 保存待用。

1.3.3 引物处理 miR-100 与 U6 的逆转录引物、荧光定量 PCR 上、下游引物由广州锐博生物科技有限公司合成。

1.3.4 逆转录合成 cDNA 按照逆转录试剂盒说明书操作合成 miRNA 的 cDNA,收集逆转录产物,将其置于冰箱 -20 °C 保存。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 按照 miRNA 实时定量检测试剂盒说明书进行操作。每个扩增反应体系 20 μL,包含 SYBR Green I Mix 试剂 10 μL,cDNA 6 μL,上、下游引物各 1 μL,以 U6 为内参,反应条件为 95 °C 10 min,95 °C 15 s,58 °C 31 s,共 40 个循环。收集荧光,绘制溶解曲线,通过溶解曲线验证产物的特异性。以经过焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的不含 RNA 模板的重蒸水(ddH₂O)为阴性对照。每个标本做 3 个复孔,记录每个反应管中的荧光信号到达阈值时所经历的 PCR 循环(Ct)值,以 ROX 为参比染料、U6 为内参照,采用实时荧光定量 PCR 中的相对定量法,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 miR-100 基因表达的相对变化,即 $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = \text{研究组}(Ct_{miR-100} - Ct_{U6}) - \text{对照组}(Ct_{miR-100} - Ct_{U6})$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理及统计学分析,分析前进行正态性检验,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。通过 ROC 曲线下面积(AUC)及 Cut off 值计算 miR-100 对食管癌的诊断特异性及灵敏度。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 检测 miR-100 方法的建立

2.1.1 线性关系 取一份高值 miR-100 cDNA 作 10 倍梯度稀释(1 : 10,1 : 100,1 : 1 000,1 : 10 000),用实时荧光定量 PCR 检测 Ct 值,绘制标准曲线,标准曲线方程为 $Y = -3.462X + 19.612$, $R^2 = 0.995$,根据公式 $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ 计算得出扩增效率 $E = 0.983$,见图 1,说明该检测方法线性良好。

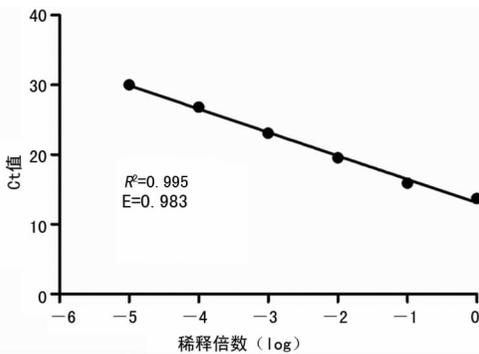


图 1 荧光定量 PCR 检测血清 miR-100 的标准曲线

2.1.2 重复性 选取同一份食管癌患者标本,在同批次荧光定量 PCR 中设置 10 个平行孔,进行 miR-100cDNA 和 U6 检测,根据 Ct 值得得批内变异系数(CV) = 0.43%。将同一标本连续进行 10 次实时荧光定量 PCR 检测,批间 CV = 3.89%。

2.2 miR-100 的血清相对表达量检测 实时荧光定量 PCR 检测食管癌患者血清 miR-100 的相对表达量为 6.399 ± 3.541 ,高于对照组的 2.625 ± 1.515 ,差异有统计学意义($t = 9.07$, $P < 0.05$)。

2.3 分析 miR-100 表达水平的诊断价值 根据 miR-100 的结果绘制 ROC 曲线,见图 2,miR-100 的 AUC 为 0.832[95%置

信区间(CI)为 0.731~0.934],Cut off 值取 5.285 时,其对食管癌辅助诊断的灵敏度和特异度分别为 65%和 95%。

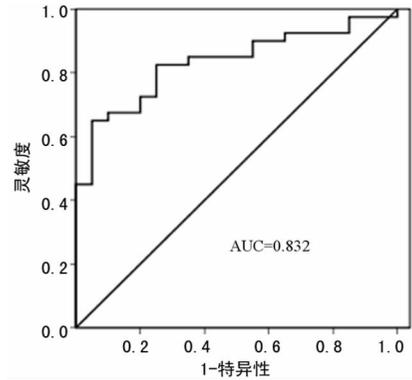


图 2 miR-100 ROC 工作曲线

3 讨 论

食管癌是发生在食管黏膜上皮组织的恶性肿瘤,是威胁我国民众健康最为常见的恶性肿瘤之一。由于缺乏灵敏度较高、检测方便的早期诊断指标,大多数患者就诊时已处于中晚期,导致食管癌的治疗及预后均不理想。

大量研究发现,miRNA 在多种肿瘤组织中具有不同的表达谱。管晓翠^[8]通过低密度芯片技术对食管癌患者和健康人血清中 768 种 miRNA 的表达量进行检测,筛选出了 21 种 miRNA 在食管癌患者血清中明显上调(2 倍以上),其中包括 miR-100 在内的 9 种 miRNA 尤为明显,变化倍数为 1.57~6.42)。于万涛等^[9]的研究显示 miR-100 不仅在多种肿瘤,如宫颈癌、前列腺癌、膀胱癌和肺癌等的发生、发展中发挥重要作用,而且还可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。Sun 等^[10]对食管癌组织和细胞系的研究分析中显示,术后恶性组织中 miR-100 的表达量明显下调,可能是由于肿瘤组织的切除导致 miR-100 的表达量明显下降。

miRNA 在血液中相对比较稳定,本研究利用血清中 miR-100 作为标志物,研究其在食管癌辅助诊断方面的意义。通过预实验对于每个环节条件的摸索,本研究建立了一个完整检测食管癌患者血清 miRNA 的荧光 PCR 体系。在提取食管癌患者血清总 RNA 后,选用 U6 作为内参,应用逆转录试剂盒合成 miRNA 的 cDNA,实时荧光定量 PCR 方法检测 miR-100,其扩增曲线平行性好,扩增效率高,溶解曲线呈特异单峰($T_m = 77.98$ °C),提示本研究扩增特异性高,基本无引物二聚体及非特异性产物形成,方法学评价显示本研究中的方法线性、重复性良好。食管癌患者中 miR-100 的表达量较对照组明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示血清 miR-100 对食管癌有一定的诊断准确性,血清 miR-100 有望成为食管癌诊断的有效分子标志物。在以后的研究中需扩大研究病例数,并对患者进行长期随访,以全面评估 miR-100 对食管癌的诊断、手术疗效、预后等方面的临床应用价值。

参考文献

[1] 赫捷,邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及未来对策[J]. 中国癌症杂志,2011,21(7):501-504.
 [2] Abba M, Mudduluru G, Allgayer H. MicroRNAs in cancer: small molecules, big chances[J]. Anti Cancer Agents Med Chem, 2012, 12(7):733-743.

两个亚型,并以 A1 为主,B 型也分为 B1、B2 两个亚型,并以 B2 为主。22 株 Ab 聚类分析见表 2。

3 讨 论

近年来,在微生物研究方面用 SELDI-TOF-MS 蛋白芯片技术已获得越来越多有意义的成果。通过比较待测微生物和其他微生物的蛋白指纹图谱,可以找到待测微生物的特异蛋白,通过比较某种细菌耐药和敏感菌株的蛋白指纹图谱可以分析该种细菌对某种药物产生耐药的蛋白质组学原因。解春宝等^[7]通过 SELDI-TOF-MS 技术建立铜绿假单胞菌蛋白指纹图谱诊断模型,快速鉴定铜绿假单胞菌。黄文芳等^[8]通过 SELDI-TOF-MS 技术为血流感染病原菌的快速鉴定提供了新思路。

余琳等^[9]对分离自呼吸重症监护病房(RICU)的多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)基因同源性进行流行病学分析,发现MDRAB曾在RICU有小范围的爆发流行。本研究采用 SELDI-TOF-MS 技术分析碳青霉烯类药物敏感与耐药 Ab 的蛋白表达,结果显示在相对分子质量为 $2\ 000 \times 10^3 \sim 20\ 000 \times 10^3$ 范围内的蛋白质峰中有 24 个差异具有统计学意义($P < 0.05$)。将差异蛋白经过聚类分析显示碳青霉烯类药物耐药的 Ab 分布以 A 型为主,B 型次之,A 型分为 A1 和 A2 两个亚型,并以 A1 为主,B 型也分为 B1、B2。从聚类表中看到 11 和 18 号标本系数最小,距离最近,蛋白质数据最接近,被同时归为 A1 型,查阅患者原始资料后发现 2 株 Ab 是在同一个月从同一科室患者痰液标本分离而得,说明 2 株 Ab 间亲缘最近,有可能来源于同一株 Ab。8 号和 19 号标本系数仅次于 11 和 18 号标本,蛋白质数据也很接近,聚类分析也被同时归为 A2 型,查阅患者原始资料,也是在同一个月从同一科室患者痰液标本分离而得,说明两次分离所得的细菌也可能来源于同一株 Ab。以上结果说明,本院临床分离 Ab 曾在小范围内发生爆发流行,临床医生可通过本研究尽早了解本科室感染患者的互相感染,并采取措施预防和控制碳青霉烯类耐药菌株的流行。

本研究利用 SELDI-TOF-MS 技术初步筛选了碳青霉烯类药物敏感和耐药的 Ab 差异蛋白,但能否将此差异蛋白分离、纯化及鉴定,然后作为 Ab 碳青霉烯类药物耐药和敏感的蛋白标志物,用于临床的诊断与鉴别诊断的可行性尚需进一步研究。虽然本试验只是一个初步研究,但为 Ab 碳青霉烯类药物耐药和敏感菌株的诊断与鉴别诊断方面的研究提供了新的方

法和思路。

综上所述,聚类分析碳青霉烯类抗菌药物耐药的 Ab 蛋白质谱结果能够判断细菌亲缘关系远近,可为 Ab 感染和临床流行病学调查提供理论依据。

参考文献

- [1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.
- [2] Manikal VM, Landman D, Saurina G, et al. Endemic carbapenem-resistant Acinetobacter species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage[J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(1):101-106.
- [3] Vanlaere E, Sergeant K, Dawyndt P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of Burkholderia cepacia complex[J]. J Microbiol Methods, 2008, 75(2):279-286.
- [4] 范铁男,邹积宏,卢行安,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术用于常见益生菌鉴定的初步研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 2010, 22(10):868-875.
- [5] 徐昕荣,朱斌,马瑜璐,等. MALDI-TOF-MS 鉴定生物脱氮细菌的方法研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(10):148-161.
- [6] 丁银环,胡琼英,梁双花. 运用内标校准法提高表面增强激光解吸电离飞行时间质谱检测中的重复性[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(3):337-339.
- [7] 解春宝,肖代雯,杨永长,等. 利用 Au 蛋白芯片技术快速鉴定铜绿假单胞菌的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(5):462-466.
- [8] 黄文芳,肖代雯,杨永长,等. 引起血流感染常见的革兰氏阴性杆菌蛋白指纹图谱的建立[J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(3):33-36.
- [9] 余琳,苏丹虹,江风茹,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因分析与同源性分析[J]. 实用医学杂志, 2013, 42(12):2018-2021.

(收稿日期:2015-12-28)



(上接第 739 页)

- [3] Pichler M, Calin GA. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients[J]. British J Cancer, 2015, 113(4):569-573.
- [4] 傅敏根,李硕,郁婷婷,等. miR-195 在食管癌中的表达及其对食管癌细胞增殖的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013, 33(5):575-578.
- [5] 向正凯,严宝国. 食管癌组织中 microRNA-21 的表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(8):902-905.
- [6] 蒋敏,顾国浩,张静,等. 食管癌患者外周血单个核细胞中 miR-21 的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(4):34-38.

(收稿日期:2015-12-20)

- [7] 孟宪琴,刘庚勋. miRNA 在食管癌中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(19):2223-2225.
- [8] 管晓翠. 血清 microRNA 作为食管鳞状细胞癌诊断及手术疗效评价指标的研究[D]. 南京:南京师范大学, 2013.
- [9] 于万涛,王朝霞. miR-100 与肿瘤关系的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(8):747-751.
- [10] Sun J, Chen Z, Tan X, et al. MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Med Onco, 2013, 30(1):411-420.