

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.24.006

子宫内膜癌患者血清 miR-205 检测方法的建立*

李 军¹, 蔡 虎^{2△}

(1. 陕西省药品技术审核查验中心, 陕西 西安 710065; 2. 陕西省医疗器械质量监督检验院, 陕西 西安 712046)

摘要:目的 建立检测子宫内膜癌患者血清中 miR-205 表达水平的实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法。方法 设计 miR-205 逆转录引物和 PCR 扩增引物进行 RT-PCR, 以 U6 为内参, 检测试验组和健康对照组患者血清中 miR-205 的表达水平; 采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测患者血清中 C 反应蛋白和基质金属蛋白酶 2(MMP-2)的含量。结果 试验组患者血清中 miR-205 的表达水平显著高于健康对照组($P < 0.05$); 试验组患者血清 CRP 的含量为 5.367 mg/L, 显著高于健康对照组的 2.432 mg/L($P < 0.05$); 两组 MMP-2 含量无显著差异($P > 0.05$)。结论 所建立 RT-PCR 法检测 miR-205 表达水平快速简便、灵敏度高、特异性好, 在子宫内膜癌的辅助诊断中有较好的应用前景。

关键词:实时荧光定量聚合酶链式反应; miR-205; C 反应蛋白; 子宫内膜癌

中图分类号: R979.1; R737.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)24-0020-03

Establishment of Detection Method of Serum miR-205 in Patients with Endometrial Cancer

LI Jun¹, CAI Hu²

(1. Shaanxi Center for Drug Inspection, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. Shaanxi Medical Device Quality Supervision and Inspection Institute, Xi'an, Shaanxi, China 712046)

Abstract: Objective To establish the method of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR) for detecting the expression level of serum miR-205 in patients with endometrial cancer. **Methods** miR-205 reverse transcription primers and PCR amplification primers were designed for RT-PCR. The expression level of miR-205 in the serum of patients in the experimental group and the healthy control group was detected with U6 as the internal reference. The contents of C-reactive protein(CRP) and matrix metalloproteinase-2(MMP-2) in the serum of patients were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** The expression level of miR-205 in the serum of patients in the experimental group was significantly higher than that in the healthy control group($P < 0.05$). The level of serum CRP in the experimental group was 5.367 mg/L, which was significantly higher than 2.432 mg/L in the control group($P < 0.05$). There was no significant difference in the content of MMP-2 between the two groups($P > 0.05$). **Conclusion** The established RT-PCR method is rapid, simple, sensitive and specific for detecting the expression level of miR-205, and it has a good application prospect in the auxiliary diagnosis of endometrial cancer.

Key words: real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; miR-205; C-reactive protein; endometrial cancer

*基金项目: 陕西省重点研发计划项目[2018ZDXM-SF-069]。

第一作者: 李军, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为分子物理学, (电子信箱)979914299@qq.com。

△通信作者: 蔡虎, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为分子生物学, (电子信箱)573387576@qq.com。

- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 96-97.
- [6] 匡海学, 吴高松, 刘 华, 等. 龙胆苦苷和龙胆碱的生物转化和药理活性研究进展[J]. 天津中医药, 2016, 33(7): 385-389.
- [7] 王彩君, 王智民, 王维皓, 等. 龙胆属植物中的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 2987-2994.
- [8] 董丽萍, 倪梁红, 赵志礼, 等. 龙胆属环烯醚萜类化学成分研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2116-2128.
- [9] 李光全, 刘慧敏, 崔鹤蓉, 等. 苕蓂胶囊对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 127-131.
- [10] 段雪琳, 韦燕飞, 廖 丹, 等. 白花丹水煎液对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的干预作用[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(7): 1059-1067.
- [11] 何丹丹, 徐梦丹, 曾白林, 等. 藏药印度獐牙菜抗四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的作用[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(10): 4680-4683.
- [12] 金明丽, 潘志华, 舒 健, 等. 四氯化碳不同注射方式诱导大鼠不同分期肝纤维化模型的研究[J]. 四川医学, 2018, 39(3): 270-272.
- [13] 李 曼, 李 涛, 刘振杰, 等. 以血清学指标比值为变量的肝纤维化诊断模型构建与评价[J]. 山东医药, 2018, 58(18): 17-20.
- [14] 高 雅, 李 豪, 钟明利, 等. 杠板归总黄酮抗肝纤维化大鼠的作用及其机制研究[J]. 华西药理学杂志, 2015, 30(2): 181-183.
- [15] 潘 凯, 赵 强, 陶艳艳, 等. 健脾补肾方加味调节调节性 T 淋巴细胞/辅助性 T 淋巴细胞平衡的抗肝纤维化作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(8): 1518-1524.
- [16] 王学敏, 崔亚钦, 王 静, 等. 六味地黄丸抑制巨噬细胞激活抗肝纤维化作用机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(1): 65-68.

(收稿日期: 2019-03-18; 修回日期: 2019-07-04)

MicroRNA(miRNA)是一种内源性非编码单链小分子RNA,其5'端为磷酸基团、3'端为羟基基团,长度为21~25个核苷酸。miRNA主要通过结合mRNA来抑制蛋白翻译过程或酶解切割mRNAs来调控基因的表达^[1]。最新研究表明,miR-205在许多类型的癌症中均异常表达,如头颈部肿瘤、鳞状细胞癌、膀胱肿瘤和子宫内膜癌等^[2-4]。子宫内膜癌为最常见的妇科肿瘤,占妇科恶性肿瘤的20%~30%,严重威胁女性健康。子宫内膜癌好发于绝经后妇女,但近年来发病人群有年轻化趋势,且其发病率不断上升。本研究中建立了荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法,检测miR-205在子宫内膜癌患者血清中的表达,探讨能否将miR-205作为新的肿瘤标志物,用于子宫内膜癌的早期诊断。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本血清、仪器与试剂

样本血清:以择期行妇科手术的8例子宫内膜癌患者为试验组,年龄36~65岁,平均44岁;以10例健康者为健康对照组,年龄38~52岁,平均45岁。上述研究对象均取外周静脉血3mL,常规分离血清,于-80℃贮存。

仪器:CFX384型荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(美国BioRad公司);DU700型紫外分光光度计(美国Beckman Coulter公司);CT15RE型高速冷冻离心机(日本Hitachi公司);MDF-U5412型-80℃低温冰箱(日本Sanyo公司);MX-S型涡旋振荡器(美国Scilogee公司);EPOCH型酶标仪(美国BioTek公司)。

试剂:Trizol(日本Takara公司,批号为9108);miR-205,U6 Primer(广州锐博生物科技有限公司);逆转录试剂和SYBR Green PCR reagents(日本Toyobo公司);C反应蛋白酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司,批号为XS01804);基质金属蛋白酶2(MMP-2)ELISA试剂盒(上海户实医药科技有限公司,批号为HS3345);氯仿、异丙醇、无水乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)、水(华美生物工程有限公司)。

1.2 方法

总RNA的提取:取样本血清300μL,加入Trizol试剂1mL,振荡裂解细胞,室温静置30min;加入氯仿200μL混匀,冰置10min;4℃下,12000r/min离心10min;取上清液200μL,加异丙醇200μL,上下颠倒混匀,冰置15min;4℃下,12000r/min离心10min;弃上清液,加DEPC水1mL配制的75%乙醇混匀,4℃下,12000r/min离心10min;弃上清液,冰上晾干5~10min,加入DEPC水20~30μL溶解RNA。在260nm和280nm波长处检测吸光度(OD)值,确定RNA的纯度和浓度。

cDNA的合成:逆转录反应体系为20μL,5×逆转录缓冲液4μL,dNTP 0.75μL,miR-205逆转录引物1.2μL,M-MLV逆转录酶0.2μL,总RNA样本5μL,DEPC水8.85μL。反应条件为16℃、30min,42℃、30min,85℃、5min。

血清中miR-205含量的检测:PCR反应体系(10μL)为SYBR 5μL,上下游引物各0.4μL,cDNA模板1μL,Taq DNA聚合酶0.1μL,DEPC水3.1μL。反应条件为95℃预变性3min,95℃变性12s,62℃退火50s,循环40次。反应结束后,定量分析PCR获得的熔解曲线和扩增曲线的可靠性,并设定循环阈值(C_t),以miR-205/U6比值代表其相对表达水平,2^{-ΔΔC_t}法计算其相对表达量。

血清中CRP和MMP-2含量的检测:取样本血清适量,各孔加入相应待测样本血清40μL及抗CRP和MMP抗体10μL,每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体50μL,以封板膜封住反应孔,37℃孵育1h;弃上清液,重复洗5次;每孔加入底物A、B各50μL,37℃避光孵育15min;每孔加入终止液50μL,15min内用酶标仪测定在450nm波长处的OD值。以OD值代表其相对含量。设立对照孔。

1.3 统计学处理

采用Graphpad Prism 5统计学软件分析。

2 结果

2.1 样品纯度

样品总RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.8~2.0之间(见表1),表明提取纯度较好,RNA几乎无降解,可进行下一步的实时荧光定量PCR。

表1 样品总RNA质量浓度(ng/μL)

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
健康对照组	177.2	178.4	180.4	183.5	190.6	174.5	285.4	169.2	190.1	192.3
试验组	204.8	198.3	185.9	356.4	247.9	305.1	189.5	346.1		

2.2 引物特异性

miR-205和U6的熔解曲线峰值单一,未见其他杂峰信号;miR-205熔解温度为75.4℃,U6熔解温度为80.3℃(见图1)。说明本试验中设置的RT-PCR参数合理,miR-205、U6逆转录引物和扩增引物能成功扩增出对应的片段,产物特异性较好,试验结果较可靠。

2.3 miR-25表达水平

健康对照组产生微弱的非特异性信号,且明显滞后于试验组。试验组患者血清中miR-205的表达水平显著高于健康对照组($P < 0.05$)。详见图2。

2.4 CRP和MMP-2含量

试验组患者血清CRP的含量为5.367mg/L,显著高于健康对照组的2.432mg/L($P < 0.05$),两组的

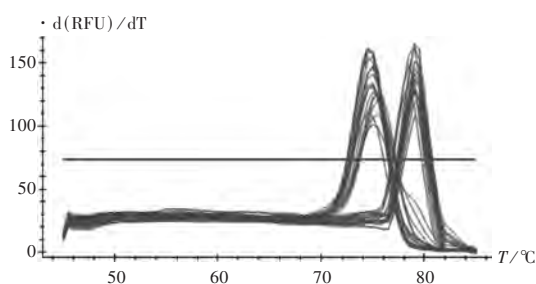
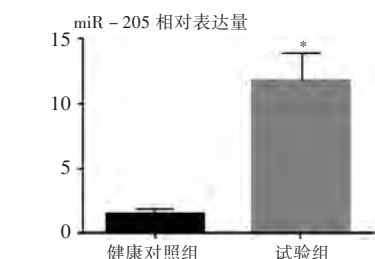


图1 溶解曲线



注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$ 。图3同。

图2 miR-205 表达水平

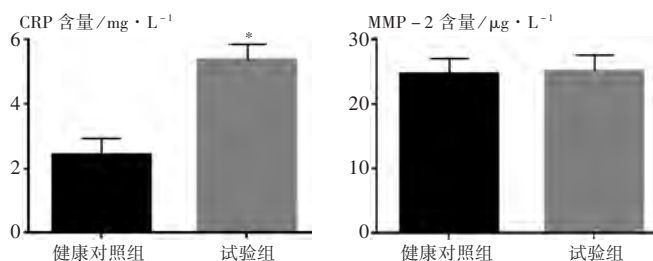


图3 CRP 和 MMP-2 含量

MMP-2 含量无显著差异($P > 0.05$)。详见图3。

3 讨论

子宫内膜癌的发病机制尚未明确,目前尚无有效的预防机制。miRNA 是一类非编码小分子 RNA,其通过碱基互补配对结合特异的靶向 mRNA,从而抑制靶向 mRNA 的翻译或降解靶向 mRNA,从而发挥其癌基因或抑癌基因的功能。

有研究利用 miRNA 芯片技术发现,子宫内膜癌患者的血清中有多个 miRNA 表达上调,其中 miR-205 的上调最显著^[5]。也有报道 miR-205 和 miR-342 可作为诊断三阴性乳腺癌的潜在生物标志物^[6],miR-205 通过靶向 ZEB1 和 Ubc13 作为肿瘤的放射致敏剂^[7-8]。miR-205 下调可明显抑制肿瘤细胞的增殖与迁移,且能促进抑癌基因 JPH4 的表达,从而抑制子宫内膜癌的发生及发展^[3-4]。也有研究发现,在子宫内膜癌细胞抑制靶向 Akt-mTOR 通路的 miR-205,为孕激素受体型子宫内膜癌提供了一种潜在的、新的治疗方法^[9],miR-205 通过靶向 PTEN 调控人子宫内膜癌^[10]。SU 等^[11]发现,miR-205 通过靶向子宫内膜癌中的抑癌基因 ESRG 促进了肿瘤的增殖和侵袭。

本研究建立了 RT-PCR 法检测血清中的 miR-

205,该方法快速便捷、灵敏度高、特异性好。但由于样本量较少,今后还需增加样本量进一步证明该方法的稳定性。同时,本研究中发现 CRP 在子宫内膜癌患者的血清中异常高表达。由于 miR-205 与肿瘤浸润相关,而 CRP 也与肿瘤浸润转移有关,因此推测子宫内膜癌患者 miR-205 的异常表达可能是由于 CRP 的高表达引起。由于 miR-205 在多种肿瘤中存在表达异常,能否通过两种或多种 miRNA 联合诊断子宫内膜癌的设计,也为今后的临床研究提供了新的思路。

参考文献:

- [1] CHUNG TK, CHEUNG TH, HUEN NY, et al. Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women[J]. Int J Cancer, 2009, 124(6): 1358-1365.
- [2] CHEN CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1768-1771.
- [3] GRÜNDKER C, GUNTHER AR, EMONS G. Hormonal heterogeneity of endometrial cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 630: 166-188.
- [4] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [5] 梁静,张贵宇,马本红,等. 子宫内膜癌样腺癌组织中 microRNA 差异表达谱分析[J]. 山东大学学报, 2011, 49(8): 90-95.
- [6] SAVAD S, MEHDIPOUR P, MIRYOUNESI M, et al. Expression analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in breast cancer in Iran[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012, 13(3): 873-877.
- [7] ZHANG P, WANG L, RODRIGUEZ-AGUAYO C, et al. miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5671.
- [8] VERDOODT B. MicroRNA-205, a novel regulator of the anti-apoptotic protein Bcl2, is downregulated in prostate cancer[J]. Int J Oncol, 2013, 43(1): 307-314.
- [9] ZHUO Z, YU H. miR-205 inhibits cell growth by targeting AKT-mTOR signaling in progesterone-resistant endometrial cancer Ishikawa cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 28042-28051.
- [10] XIN W, LIU X, DING J, et al. Long non-coding RNA derived miR-205-5p modulates human endometrial cancer by targeting PTEN[J]. American Journal of Translational Research, 2015, 7(11): 2433-2441.
- [11] SU N, QIU H, CHEN Y, et al. MiR-205 promotes tumor proliferation and invasion through targeting ESRG in endometrial carcinoma[J]. Oncology Reports, 2013, 29(6): 1048-1056.

(收稿日期:2019-08-05)