

· 论 著 ·

实时荧光定量 RT-PCR 检测原发性肝细胞癌中 Dicer mRNA 的表达

王玉兰¹, 王爱华¹, 陈允硕², 侯丽娜¹, 王华梁^{1*}

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院检验科, 上海 200438; 2. 上海市市东医院, 上海 200090)

[摘要] **目的:** 建立 Dicer mRNA 表达量检测的实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 系统, 检测肝癌细胞系与 20 例原发性肝细胞癌 (primary hepatocellular carcinoma, PHC) 组织中 Dicer mRNA 的表达水平。 **方法:** 根据 Dicer mRNA 的全序列设计特异性引物, 结合荧光染料 SYBR Green I, RT-PCR 扩增目的片段并实时检测产物的荧光强度, 进行熔解曲线分析排除非特异性扩增, 根据标准品绘制标准曲线, 由软件自动计算出待测样品 Dicer mRNA 的准确含量, 并以 Dicer mRNA 和 18S rRNA 含量的比值作为 Dicer 表达水平的指标。 **结果:** 该方法检测的线性范围为 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^9$ copies/ μ l, 样本的批内变异系数与批间变异系数为 4.13%~19.72% 和 6.25%~18.76%。 Dicer mRNA 在 HBV 阳性肝癌细胞系 HepG2.2.15 和 HBV 阴性肝癌细胞系 HepG2 的表达水平明显低于正常肝细胞系 WRL-68 ($P < 0.05$); 在 PHC 组织的表达水平明显低于癌旁配对组织 ($P < 0.05$)。 **结论:** 该方法具有较好的灵敏度、特异性和重复性。 Dicer mRNA 表达量在肝癌细胞系和 PHC 组织中的检测为以后更好的研究 PHC 的发病机制奠定了理论基础。

[关键词] Dicer; 癌, 肝细胞; 实时荧光定量 RT-PCR**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0842-03

Real time fluorescent quantitative RT-PCR in determination of Dicer mRNA in primary hepatocellular carcinoma

WANG Yu-lan¹, WANG Ai-hua¹, CHEN Yun-shuo², HOU Li-na¹, WANG Hua-liang^{1*} (1. Clinical Laboratory, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Shanghai Shidong Hospital, Shanghai 200090)

[ABSTRACT] **Objective:** To develop a real time fluorescent quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) system for determining the expression of Dicer mRNA in human hepatoma cell lines and 20 samples of primary hepatocellular carcinoma (PHC) tissues. **Methods:** The specific primers, designed according to the complete sequence of Dicer mRNA, and the fluorescence dye SYBR Green I were used for RT-PCR amplification. The fluorescence was monitored in a real time manner. The expression levels of Dicer mRNA in samples were calculated according to the standard curve and the nonspecific amplifications were excluded by melting curve analysis. The mRNA levels of Dicer were presented as the ratios of Dicer mRNA to 18S rRNA. **Results:** The linear detection range of this system was from 5×10^2 to 5×10^9 copies/ μ l and the coefficient of variation values for intra-experimental and inter-experimental reproducibility ranged from 4.13% to 19.72% and from 6.25% to 18.76%, respectively. The expression levels of Dicer mRNA in HBV positive hepatoma cell line HepG2.2.15 or in HBV negative hepatoma cell line HepG2 were significantly lower ($P < 0.05$) compared to those of the normal liver cell line WRL-68; and those in PHC tissues were lower compared to those in the corresponding adjacent tissues of PHC ($P < 0.05$). **Conclusion:** Real time fluorescent quantitative RT-PCR has good sensitivity, specificity and reproducibility in determining Dicer mRNA levels. Determination of Dicer mRNA levels in hepatoma cell lines and PHC tissues lays a good theoretical foundation for further studying the mechanism of PHC.

[KEY WORDS] Dicer; carcinoma, hepatocellular; real time fluorescent quantitative RT-PCR

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 842-844]

原发性肝细胞癌 (primary hepatocellular carcinoma, PHC) 是指肝细胞发生的肿瘤, 为我国常见恶性肿瘤之一, 其死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第三位, 仅次于胃癌和食管癌。本病可发生于任何年龄, 以 40~49 岁多见, 男女发病之比为 (2~5): 1。肝癌的致病因素因不同地区而异, 但大多有乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的背景。近年报道, 我国 PHC 患者中 HBsAg 阳性的约为 63.2%^[1], HBV 阳性

PHC 患者占多数。

在 RNase III Dicer 的酶切产物之中, 有一类 miRNA 约含有 22 个核苷酸, 这类 miRNA 数量很多并且高度保守, 构成一个调节 RNA 体系^[2], miRNA 的表达有一定特异性。越来越多的实验证明这

[作者简介] 王玉兰, 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: hlwang2@163.com

些调节 RNA 量的改变与人类肿瘤的发生有关^[3-5]: 如 miRNA let-7 与非小细胞肺癌有关, miR-15、miR-16 与慢性淋巴细胞白血病有关, miR-143、miR-145 与人结肠癌有关。在非小细胞肺癌当中 miRNA let-7 的表达量是下降的, 并且产生 miRNA let-7 的上游酶 RNase III Dicer 的表达量也是下降的, 这种患者预后差, 生存率低^[4]。本研究重点研究 PHC 患者中 RNase III Dicer 的表达量是否有异常, 为进一步研究 PHC 的发病机制提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 细胞 人正常肝细胞系 WRL-68 由本院分子肿瘤实验室馈赠, 培养基为含 10% 小牛血清(杭州四季青)的 RPMI 1640(Gibco); HBV 阴性肝癌细胞系 HepG2 由本院信号转导实验室馈赠, 培养基为含 10% 胎牛血清(Gibco)的 DMEM(Gibco); HBV 阳性肝癌细胞系 HepG2. 2. 15 引自上海中国科学院细胞库, 培养基为含 10% 胎牛血清、G418(Merk)的终浓度为 380 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 MEM(Gibco), 所有细胞均置于 5% CO₂ 培养箱中 37°C 培养。

1.2 PHC 组织的采集 PHC 组织标本来自本院手术患者, 分别取肿瘤的中央部位、及癌旁组织配对标本液氮速冻后置 -80°C 保存备用, 同时送病理切片。所有病例均经病理学证实, 并进行严格的病理诊断。癌与癌旁新鲜配对标本共 20 例, 男 16 例, 女 4 例, 年龄 35~55 岁, 均为 HBV 阳性 PHC 标本。

1.3 引物设计 根据目的产物 Dicer mRNA (No. NM177438 或 No. NM030621) 和内参照 18S rRNA (No. K03432 或 No. M10098) 的全序列, 应用在线引物设计软件 primer 3.0 设计, 采用 BLAST 进行比对, 由 Invitrogen 公司合成。Dicer-S: 5'-GTA CGA CTA CCA CAA GTA CTT C-3'; Dicer-AS: 5'-ATA GTA CAC CTG CCA GAC TGT-3'; 产物大小 253 bp。18S rRNA-S: 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3'; 18S rRNA-AS: 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'; 产物大小 187 bp。

1.4 RNA 提取和逆转录反应 3 种细胞系数数后传代于 6 孔板, 待细胞长满(约 $2.5 \times 10^6/\text{孔}$), 用 PBS 洗 3 遍后, 每孔加 1 ml TRIzol 试剂(Invitrogen)提取细胞总 RNA; 取 50~100 mg PHC 组织及癌旁配对组织加 1 ml TRIzol 试剂用同样方法提取组织 RNA; 紫外分光光度计检测 RNA 的质量和浓度。取 2 μg 总 RNA 进行逆转录反应, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 随机引物(Promega) 1 μl , 用 DEPC 水补足体系至 15

μl , 70°C 5 min, 后加 M-MLV 5 \times 逆转录反应缓冲液 5 μl , 200 U/ μl M-MLV 逆转录酶(Promega) 1 μl , 100 mmol/L dNTPs(上海申能博彩生物科技有限公司) 0.5 μl 再用 DEPC 水补足体系至 25 μl , 37°C 1 h。cDNA 分装, 置 -40°C 保存备用。

1.5 Dicer 和 18S rRNA 定量标准品质粒的构建 取上述 cDNA 1 μl 用引物 Dicer-S、Dicer-AS 和 18S rRNA-S、18S rRNA-AS, 进行 PCR 扩增。该 PCR 体系包括: 100 mmol/L dNTPs 0.5 μl , 10 \times PCR 缓冲液 5 μl , Taq DNA 聚合酶(上海申能博彩生物科技有限公司) 0.5 μl , 正反引物各 0.5 μl , 用 ddH₂O 补足体系至 50 μl 。PCR 产物电泳, 电泳后用胶回收试剂盒(TaKaRa 公司)回收电泳产物 3 μl (约 20 ng) 与 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司)连接 16°C 30 min。连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109(Promega), 在具 Amp 抗性的 L-琼脂平板培养基上培养, 37°C 12~16 h。经蓝白斑筛选, 阳性克隆进行测序分析, 筛选出的阳性菌株进一步扩增, 抽提质粒, 用紫外分光光度计准确定量, 并进行 10 倍稀释, 作为标准品 -40°C 保存。

1.6 Dicer mRNA 定量测定 取上述合成的 cDNA 模板 2 μl , Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix UDG (Invitrogen) 10 μl , 20 \times 牛血清白蛋白(Invitrogen) 1 μl , 上下游引物各 1 μl , 用 ddH₂O 补足体系至 20 μl , 混合后加入专用毛细管中, 并设阴性对照, 和质粒标准品 (5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 copies/ μl)。各反应管于荧光定量 PCR 仪(Roche Lightcycler)进行扩增, 50°C 预热 2 min, 95°C 预变性 2 min, 然后进入循环 94°C 变性 5 s, 50°C 退火 10 s(Dicer)/55°C 退火 10 s(18S rRNA), 72°C 延伸 10 s, 共 45 个循环, 最后降至 4°C。根据各自标准品建立标准曲线, 并计算待测样本中的 Dicer 和 18S rRNA mRNA 的准确含量。为了消除样本 RNA 的提取、逆转录和 PCR 反应的差异, 以 Dicer 和 18S rRNA 含量的比值作为评价 Dicer mRNA 表达水平的指标。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计分析软件对实验数据进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 Dicer mRNA 的灵敏度、特异性和重复性 将 10 倍系列稀释的质粒标准品, 用建立的该方法测定, 结果显示本方法具有较好的检测灵敏度 (5×10^2 copies/ μl)。Ct 值和模板起始拷贝数的对数 lg 值之间具有较好的

线性关系($r \approx -1.00, Y = -4.475X + 50.56$)。熔解曲线分析可见只有单峰值,排除了非特异性扩增(图1)。批内与批间的变异系数分别为4.13%~19.72%($n=3$)和6.25%~18.76%($n=3$)。

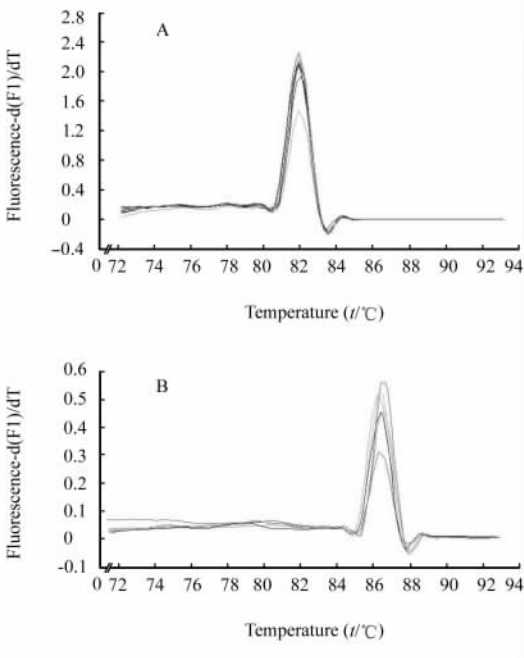


图1 Dicer(A)和18S rRNA(B)的熔解曲线

Fig 1 Melting curves of Dicer(A) and 18S rRNA(B)

A: Some folds serial dilutions of Dicer plasmid and some samples; B: Some folds serial dilutions of 18S rRNA plasmid and some samples

2.2 不同肝癌细胞系中 Dicer mRNA 的表达 与正常肝细胞系 WRL-68(0.026 ± 0.005)相比,HBV 阳性肝癌细胞系 HepG2.2.15 中 Dicer mRNA 的表达量(0.00026 ± 0.00004)是显著下降的($t = 10.34, P < 0.05$),HBV 阴性肝癌细胞系 HepG2 中 Dicer mRNA 的表达量(0.0016 ± 0.0002)也是显著下降的($t = 9.80, P < 0.05$)。

2.3 PHC 组织中 Dicer mRNA 的表达 与癌旁配对肝组织(0.0004 ± 0.0003)相比,PHC 组织中 Dicer mRNA 的表达量(0.0001 ± 0.00002)是显著下降的($t = 2.808, P < 0.05$)。

3 讨论

结合荧光染料 SYBR Green I 和相应的熔解曲线分析,实时荧光定量 RT-PCR 方法的优点是在 PCR 扩增的对数期对模板 mRNA 进行定量,结果更为可靠,扩增与检测同时进行,能减少交叉污染引

起的假阳性,具有较高的灵敏性、特异性。本研究通过实时荧光定量 RT-PCR 方法检测肝癌细胞系和 PHC 组织中 Dicer mRNA 的表达量,与正常肝细胞系对照,肝癌细胞系无论是 HBV 阳性还是阴性, Dicer mRNA 的表达量都是下降的;与癌旁配对肝组织相比,PHC 组织中 Dicer mRNA 的表达量同样也是下降的。人的 RNase III Dicer 是存在于胞质中的一种酶,属于 RNase III 这一大家族中分类中的第三大类,该酶的酶切产物之一 miRNA 与该酶及其他蛋白质形成的核酸蛋白复合物可以调节机体基因的表达,当 miRNA 与某一基因同源时,若可以与该基因 mRNA 的 3'端非翻译区不完全互补结合,此时 miRNA 所形成的复合物会阻止该基因 mRNA 翻译成相应的蛋白质,我们称之为翻译抑制;若可以与该基因 mRNA 完全互补结合,则在该复合物中的核酸内切酶 Dicer 的作用之下,该基因 mRNA 就会被切割降解,达到基因沉默效应,发挥类似于 siRNA 的作用^[6,7]。本实验仅从 mRNA 水平证明了肝癌细胞系和 PHC 组织中 Dicer 的表达量是下降的,为以后进一步从基因水平研究 PHC 的发病机制提供了基础。至于 Dicer 的下游产物 miRNA 的改变及 miRNA 的下游基因的改变,都有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Zhang J, Dai M, Wang X, et al. A case-control study of hepatitis B and C virus infection as risk factors for hepatocellular carcinoma in Henan, China[J]. Int J Epidemiol,1998,27:574-578.
- [2] Basyuk E, Suavet F, Doglio A, et al. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products[J]. Nucleic Acids Res,2003,31:6593-6597.
- [3] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. Cancer Res, 2004,64:3753-3756.
- [4] Karube Y, Tanaka H, Osada H, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients [J]. Cancer Sci,2005,96:111-115.
- [5] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res,2005,33:e179.
- [6] Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs[J]. Genes Dev,2003, 17:438-442.
- [7] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA[J]. Nature,2004,431:343-349.

[收稿日期] 2006-01-13

[修回日期] 2006-03-30

[本文编辑] 尹 荼