受性好等优点。本研究结果显示:ETV治疗CHB能使患者肝功能恢复,促进HBeAg、HBV DNA转阴,肝纤维化指标及腹部彩超检测指标均得到改善,表明其对HBV复制的抑制作用强大,与文献[8]报道一致。现代研究表明,肝纤维化发生的中心环节是HSC的增生和激活,HSC活化分启动与持续两个阶段,启动主要依赖旁分泌机制;持续除旁分泌外,还与活化HSC的自分泌有关[3]。单用西药抗病毒治疗不能完全阻断HSC活化的两个阶段,阻止CHB肝纤维化的发生、进展。我国的传统中药有多成分、多环节、多靶点的作用特点,对病理复杂的疾病可发挥综合治疗优势。复方鳖甲软肝片主要成分为鳖甲、莪术、赤芍、当归、三七、党参、黄芪、紫河车、冬虫夏草、板蓝根、连翘11味中药,可能通过以下途径抗纤维化:①增强金属基质蛋白酶(MMPs)的生物活性,达到降解过度沉积的ECM;②抑制HSC活化、增殖,促进其凋亡,降低活化的HSC数目;③抑制ECM生成转化生长因子-β(TGF-β)的作用;④抑制肝细胞脂质过氧化,清除自由基;⑤调节HSC的L型钙通道,抑制HSC中Ca^{2+}的升高;达到多靶位影响肝纤维化形成及逆转环节产生抗肝纤维化效果[3]。本研究证实:复方鳖甲软肝片能有效降低血清肝纤维化指标,缩小门静脉直径和脾脏的大小,减少门静脉血流量,降低门脉压,对CHB肝纤维化的治疗具有明显的辅助作用。采用中西药结合(复方鳖甲软肝片联合恩替卡韦)治疗CHB肝纤维化,优于西药治疗组,两者结合既可迅速治标(抑制HBV复制)以缓急,又能达到扶正而固本,可弥补不足,增强抗肝纤维化疗效,减少不良反应,近年来的研究报道也都证实了这一理论[9-10],值得临床广泛应用及进一步观察远期疗效。

参考文献:

[1] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南[J]. 中国肝脏病杂志:电子版, 2010, 2(4): 54-59.
[2] Laiw Y F, Kao J H, Piratvisuth T, *et al*. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update [J]. Hepatol Int, 2012, 6(3): 531-561.
[3] 雷娜, 郑仕中, 陆茵. 活血化瘀类中药防治肝纤维化的机制及研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2010,25(2): 265-268.
[4] 夏晖, 张宁, 周双男, 等. 复方鳖甲软肝片抗肝纤维化研究进展[J]. 医药导报, 2013, 32(4): 500-503.
[5] 曾荣城, 陈彪, 张仁品, 等. 复方鳖甲软肝片与安络化纤丸治疗肝纤维化的疗效比较[J]. 中国医药指南, 2012,10(33): 286-287.
[6] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 中国肝脏病杂志: 电子版, 2011,3(1): 40-56.
[7] Locarnini S. 慢性乙型肝炎抗病毒耐药及其处理[J]. 肝脏, 2007, 12(3): 161-163.
[8] 康健,马德强,张银华. 恩替卡韦治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者疗效观察[J]. 肝脏,2012,17(7): 529-530.
[9] 赵科孝. 恩替卡韦联合复方鳖甲软肝片治疗早期乙型肝炎肝硬化临床观察[J]. 实用肝脏病杂志, 2011,14(6): 461-462.
[10] 郭文强. 复方鳖甲软肝片联合恩替卡韦治疗乙肝后肝硬化随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2013,27(5): 111-112.

(**收稿**:2014-03-30;**修回**:2014-04-21)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2014)18-1963-03

短篇论著

利用超分支滚环扩增技术检测miR-21

郭仲莉[1,2],曾照芳[2],鲁卫平[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科[1];400016 重庆,重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室[2])

[**摘要**] **目的** 利用超分支滚环扩增(hyper-rolling cycle amplification,HRCA)技术建立一种检测microRNA的方法。**方法** 以miR-21为研究对象,设计特异的逆转录引物及锁式探针。通过对不同浓度的模板及不同的microRNA进行检测来研究本方法的灵敏度和特异性。**结果** 通过对反应条件进行优化,100 nmol/L的锁式探针在*Taq* DNA连接酶作用下46 ℃连接30 min,Bst DNA聚合酶作用下60 ℃反应50 min,可实现靶序列最大效率的扩增。该方法特异性好,最低检测浓度为10 pmol/L。**结论** HRCA技术灵敏度高、特异性好,无需特殊昂贵的仪器,且简单易操作,能够应用于microRNA检测。

[**关键词**] miR-21;超分支滚环扩增技术;锁式探针
[**中图法分类号**] R394-33 [**文献标志码**] A

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81171667);重庆市科委攻关课题(CSTC2011AC5033)
[**通信作者**] 鲁卫平,电话:(023)68757607,E-mail:ronnylu@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1453.022.html(2014-08-21)

microRNA是一类长度为21~23个碱基的内源性非编码单链小RNA分子,通过与靶mRNA的3′-非翻译区特异性结合,在转录后水平调控基因表达。随着对microRNA研究的不断深入,越来越多的证据表明microRNA分子与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。特别是microRNA-21(miR-21)在许多癌症中表达上调,并且其表达水平与癌症的临床分期、转移及预后存在着密切联系,有望成为癌症诊疗的新靶点[1]。但microRNA序列短,含量低,其低检测灵敏度和高检测成本已成为目前microRNA检测的主要问题。

滚环扩增技术是一种恒温核酸扩增技术,它以一条环形单链DNA为模板,一条线性单链DNA为引物,在具有链替代作用的DNA聚合酶的作用下进行延伸,形成1条具有大量串联与环形模板完全互补的重复序列的线性单链DNA分子[2]。产生的线性单链DNA分子的长度是亲代DNA分子长度的数千倍。超分支滚环扩增(hyper-rolling cycle amplification,HRCA)技术是在线性RCA的基础上增加1条引物,该引物序列与锁式探针部分序列相同,能与线性RCA产物结合,在Bst DNA聚合酶的作用下酶促延伸,同时置换掉下游引物的延伸产物,被置换掉的延伸产物又可作为线性RCA引物的模板进行延伸。该过程反复进行,扩增产物会在很短时间内成指数倍递增[3]。本研究利用HRCA技术检测miR-21,旨在为microRNA的检测提供一种新的分子生物学检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

锁式探针和茎环引物上海Invitrogen公司合成;miR-21的序列来自Sanger数据库,由大连TaKaRa公司合成;逆转录酶(ABI公司);*Taq* DNA连接酶,Bst DNA聚合酶(NEB公司);dNTPs,DL 2000 DNA标准(TaKaRa公司);常规PCR扩增仪(Mycycler,Bio-Rad,USA);凝胶成像系统VersarDoc1000(Bio-Rad,USA)。

1.2 方法

1.2.1 反应原理 首先,miR-21与逆转录引物结合,并在逆转录酶的催化下进行逆转录反应产生cDNA;然后与加入的锁式探针按照碱基互补配对原则进行结合,结合后的锁式探针5′端和3′端紧密相邻,在连接酶的作用下完成环化过程。环化后的探针在1对引物和Bst DNA聚合酶的作用下进行HRCA。最后,其扩增产物可用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 逆转录引物和锁式探针的设计 参照Chen等[4]方法设计特异性茎环逆转录引物,锁式探针的设计遵循Zhang等[5]的设计原则。引物及锁式探针序列见表1。

表1 引物及锁式探针序列

探针或引物	序列	片段长度(bp)
锁式探针	5′-p-*ATGTTGAGTCGTATCCAGTG*CCTCCTTCTAC-TATGTTGATCTGTCTATTCACCTTATGCTTAAC-TGTACACTTATT*AGCTTATCAGACTG*-3′	90
茎环引物	5′-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC-GCACTGGATACGACTCAACA-3′	50
引物2	5′-TCTGTCTATTCACCTTATGCT-3′	21
miR-21	5′-UAGCUUUAUCAGACUGAUGUUGA-3′	23

斜体部分表示锁式探针与靶序列互补结合的连接序列

1.2.3 逆转录反应 15 μL体系包含miR-21 5 μL、50 nmol/L茎环引物3 μL、0.25 mmol/L的dNTPs 0.15 μL、10×RT buffer 1.5 μL、20 U/μL的RNase inhibitor 0.19 μL、50 U/μL的Multi-Scribe™RT enzyme 1 μL、DEPC水4.16 μL。反应条件为:16 ℃ 30 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min。

1.2.4 锁式探针的连接环化 20 μL体系包含逆转录产物15 μL、锁式探针2 μL、40 U/μL的*Taq* DNA连接酶0.2 μL、10×*Taq* DNA连接酶缓冲液2 μL、ddH_2O 0.8 μL。反应温度为46 ℃。

1.2.5 HRCA反应 20 μL体积包含连接产物10 μL、10 mmol/L的dNTPs 1 μL、10 μmol/L支链引物2 μL、8 U/μL的Bst DNA聚合酶0.5 μL、10×Bst DNA聚合酶buffer 2 μL、ddH_2O 4.5 μL。反应温度为65 ℃。

1.2.6 锁式探针最适浓度的优化 以100 nmol/L的miR-21为模板,锁式探针浓度分别为1 μmol/L、100 nmol/L、10 nmol/L、1 nmol/L进行HRCA反应,产物行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.7 锁式探针连接时间的优化 以100 nmol/L的miR-21为模板,用100 nmol/L的锁式探针进行连接反应,反应时间分别为10、20、30、40、50、60 min,产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.8 扩增反应时间的优化 以100 nmol/L的miR-21为模板,用100 nmol/L的锁式探针进行连接反应30 min,进行滚环扩增反应,反应时间分别为10、20、30、40、50、60 min,产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.9 HRCA方法特异性和灵敏度的检测 同时对miR-21和2条各有1个碱基位点突变的microRNA(①3′端第7个碱基的A-C,②3′端第8个碱基的G-T)进行HRCA反应,以检测该方法的特异性,并在以miR-21为模板的同时分别做无逆转录酶、无*Taq* DNA连接酶、无Bst DNA聚合酶3个阴性对照,来排除该检测方法所出现的假阳性结果。取浓度分别为100 nmol/L、10 nmol/L、1 nmol/L、100 pmol/L、10 pmol/L的miR-21进行HRCA反应,以检测该方法的灵敏度。

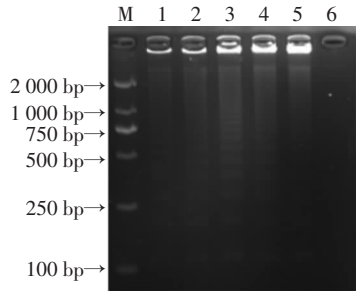
2 结果

2.1 HRCA反应条件的优化

锁式探针浓度为100 nmol/L,连接反应条件为46 ℃连接30 min,滚环扩增反应条件为65 ℃扩增50 min,即可获得理想的扩增效果。

2.2 HRCA反应的灵敏度

如图1所示,该方法最低能检测出10 pmol/L的miR-21。

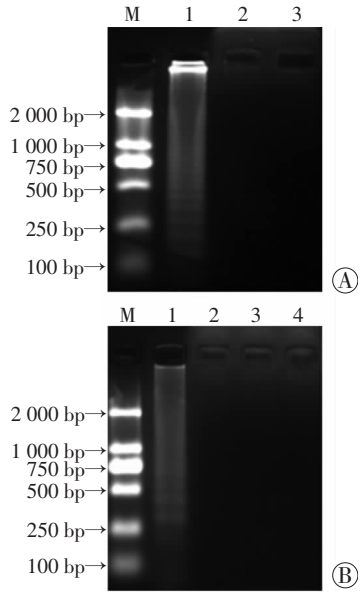


M：DL 2000 DNA 标准；1：10 pmol/L；2：100 pmol/L；3：1 nmol/L；4：10 nmol/L；5：100 nmol/L；6：ddH_2O

图1 HRCA 反应灵敏度检测琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 HRCA 反应的特异性

仅有在以 miR-21 为模板进行 HRCA 反应后结果明显，背景清晰，有典型的阶梯条带。电泳结果见图2。



A：miR-21 和突变序列 M：DL 2000 DNA 标准；1：miR-21；2，3：分别为合成的与 miR-21 有1和2个不同碱基的 RNA；B：阴性对照 M：DL 2000 DNA 标准；1：miR-21；2：无逆转录酶；3：无 *Taq* DNA 连接酶；4：无 Bst DNA 聚合酶

图2 HRCA 反应特异性检测琼脂糖凝胶电泳结果

3 讨论

目前用于 microRNA 检测的方法主要有 RT-PCR、Northern blot 以及基因芯片等，由于不同程度存在操作复杂、仪器设备昂贵、试剂成本高、敏感性和特异性较差等问题，限制了这些技术在临床上的应用。因此发展新型的 microRNA 检测方法，能灵敏、特异、低成本地检测 microRNA 十分必要。HRCA 是一种等温核酸扩增技术，具有操作简单，敏感性和特异性高的特点。

HRCA 反应中，锁式探针需要其5′末端和3′末端完全与模板互补配对结合，并且结合后紧密相邻[6]，才能完成环化过程。环化后的锁式探针是 HRCA 反应的模板，它在1对引物和 Bst DNA 聚合酶的作用下进行 HRCA 反应。由于引物2对下游引物的顶替作用使得产物序列在长度上分布不连续，从凝胶电泳图上看呈阶梯状分布，其中长度最小的带为两条引物之间的距离，其他带的长度是锁式探针长度的整数倍和最小带长度之和[7]。

本研究所设计的逆转录引物的3′末端6个碱基与 miR-21 5′末端的6个碱基完全互补配对，只有在模板为 miR-21 时，碱基才会互补配对结合并在逆转录酶的作用下进行逆转录反应产生 cDNA。新生成的 cDNA 作为锁式探针的模板，完成后续的 HRCA 反应。因此，只要模板不是 miR-21 或锁式探针的连接序列，和 cDNA 有不匹配的碱基就无法完成锁式探针的环化过程，保证了本检测方法的高特异性。本实验结果显示，以逆转录产物为模板，锁式探针浓度为 100 nmol/L，经过 30 min 连接反应和 50 min HRCA 反应后，能够检测到明显的扩增条带。利用 HRCA 技术对 microRNA 进行检测的方法，具有高特异性、高灵敏度，无需特殊昂贵仪器且简单易操作的优点。

参考文献：

[1] Wang F, Zheng Z, Guo J, *et al*. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor [J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(3): 586－593.

[2] Liu X H, Lu K H, Wang K M, *et al*. MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 348.

[3] Sun M, Liu X H, Li J H, *et al*. MiR-196a is upregulated in gastric cancer and promotes cell proliferation by downregulating p27(kip1)[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(4): 842－852.

[4] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, *et al*. Real-time quantification of micro RNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20): e179.

[5] Zhang D Y, Liu B. Detection of target nucleic acids and proteins by amplification circularizable probes[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3(2): 237－248.

[6] 李娟，张小燕，郜恒骏. microRNA 与结直肠癌关系的研究进展[J]. 胃肠病学，2010，15(9)：571－573.

[7] Tsui C K, Wang B, Khadempour L, *et al*. Rapid identification and detection of pine pathogenic fungi associated with mountain pine beetles by padlock probes [J]. J Microbiol Methods, 2010, 83(1): 26－33.

（**收稿**：2014-03-06；**修回**：2014-05-27）

（编辑 邓强庭）