

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.010

肝素对血浆和组织 microRNA 的 PCR 扩增效率的影响 *

陈心培¹ 张 瑜¹ 马永江² 吴 丹¹ 陈桂颖³ 孟 鹤³ 单兆亮^{1△}

(1 解放军总医院心内科 北京 100853; 2 解放军 304 医院心内科 北京 100037; 3 天津市胸科医院胸内科 天津 300151)

摘要 目的:研究肝素对血浆和组织 microRNA(miRNA)提取及 PCR 扩增效率的影响。**方法:**将杂种犬 9 只,雌雄不分,随机分为两组,对照组(n=5)和实验组(n=4),实验组静脉注射肝素十分钟后取静脉血(用不含肝素的真空采血管采集)及左心室组织,对照组注射相对应量的生理盐水后步骤同实验组,应用 miRNA 试剂盒分别提取实验组和对照组血浆和组织的 miRNA,逆转录成 cDNA 后进行实时定量 PCR 分析。**结果:**实验组与对照组比较血浆 miRNA Ct 值明显增高,其差异具有统计学意义(P<0.01),组织 miRNA Ct 值无明显变化。**结论:**静脉注射肝素短时间内对血浆 miRNA 的 PCR 扩增效率造成明显影响,对组织 miRNA 提取及 PCR 扩增效率无明显影响。

关键词:肝素;microRNA;PCR**中图分类号:**Q95-3;Q503 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)21-4041-03

Impact of Intravenous Heparin on the Amplification Efficiency of PCR on microRNAs in Plasma and Tissues*

CHEN Xin-pei¹, ZHANG Yu¹, MA Yong-jiang², WU Dan¹, CHEN Gui-ying³, MENG He³, SHAN Zhao-liang^{1△}

(1 Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China; 2 Department of Cardiology, the 304th Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100037, China; 3 Tianjin Chest Hospital Respiratory Department, Tianjin, 300151, China)

ABSTRACT Objective: To study the impact of intravenous heparin on the amplification efficiency of PCR on microRNAs in plasma and tissues. **Methods:** Nine dogs were randomly divided into control group (n=5) and intravenous heparin group (n=4). We collected venous blood, tissues of left ventricle 10 mins after heparin administration in intravenous heparin group, so as the control group except injected heparin. The extraction of miRNA was performed by specific miRNA kit. miRNA was converted into DNA for RT-PCR analysis. **Results:** Compared with control group, the intravenous heparin group Ct values of miRNA in plasma increased significantly (P<0.01). There was no statistical significance in tissues. **Conclusion:** Heparin has a significant influence on the amplification efficiency of PCR on microRNAs in plasma and has no obvious effect on that in tissues.

Key words: Heparinization; MiRNA; PCR**Chinese Library Classification:** Q95-3; Q503 **Document code:** A**Article ID:**1673-6273(2014)21-4041-03

前言

microRNAs 是一种 21~25 个碱基大小,高度保守的内源性小分子非编码 RNA,在转录后水平发挥调控作用,参与早期胚胎发育、细胞增殖、凋亡、分化等过程^[1,2]。近期许多研究表明 miRNA 与多种心脏疾病有关,并在组织和或血液中呈现特异性表达^[3-6],肝素是心血管疾病治疗中的常用药剂,尤其是在介入治疗中经常使用^[7],杨仁杰主编的《急症介入诊疗学》^[8]中提到,导管、导丝在血管内停留时间超过 15 min 以上应全身肝素化。既往有大量文献证明肝素会影响 DNA/RNA 的 PCR 扩增效率^[9-13],并且有文献表明用肝素抗凝管收集血液会使血浆中 miRNA 的提取及 PCR 扩增效率整体降低^[14],最近 Kaudewitz^[15]和 Boeckel^[12]通过利用人工合成外参 *Caenorhabditis elegans* miR-39(ce1-miR-39)作为参照分析比较静脉注射肝素后血浆内 miRNA 的变化情况,Kaudewitz^[15]认为肝素会显著影响血浆内

源性 miRNA 表达;Boeckel^[12]认为肝素只影响一部分血浆内源性 miRNA。本文将首次研究肝素对组织的 miRNA 影响,并进一步研究肝素影响血浆 miRNA 表达的机制并得出内源性 miRNA 与外源性 miRNA 相比可以一定程度上抵抗肝素的影响,而这种抵抗力在把 miRNA 从血浆中提取出来后依然存在。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 杂种犬 9 只,中国人民解放军总医院实验动物中心提供,雌雄不限。体重 21.8 ± 3.3 kg。

1.1.2 药品和试剂 肝素钠注射液(上海第一生化药业有限公司)血清/组织 Total RNA 提取试剂盒、Quanto-miR cDNA 合成试剂盒、Quanto-miR 检测试剂盒(由 Quantobio 公司提供)。

1.1.3 仪器 实时定量 PCR 仪 7900(美国 ABI)。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81270308);北京市自然科学基金项目(7122173)

作者简介:陈心培(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:循环 miRNA 的基础研究,E-mail:xinpei_chen@sina.com

△ 通讯作者:单兆亮,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:shanzl301@sina.com

(收稿日期:2013-12-08 接受日期:2013-12-31)

1.2 方法

1.2.1 肝素盐水的制备 6250 U 将肝素加入 500 mL 生理盐水中,制成肝素盐水用于导管的冲洗抗凝。

1.2.2 犬血浆和组织的制备 将杂种犬 9 只,雌雄不分,随机分为两组,实验组 (n=4) 和对照组 (n=5)。3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 前肢隐静脉缓慢注射,当犬出现睫毛反射消失、四肢肌张力下降时立即停止给药,建立静脉通道持续缓慢静滴平衡液,术中每 1 h 追加戊巴比妥钠 10 mg/kg。犬右侧大腿部脱毛备皮,手术区域碘伏消毒,铺洞巾。于右侧股静脉穿刺,穿刺后进入短导丝,将冲洗抗凝后导管套入导丝(此时导丝必须露出导管尾部)一同送入股静脉内,拔出导丝,实验组连接内盛肝素的注射器,回抽见血后推入肝素 1 mL 6000 U,再推入肝素盐水 2 mL;对照组连接内盛生理盐水的注射器,回抽见血后推入 3 mL 生理盐水。十分钟后用不含肝素的真空采血管采集股静脉血 6 mL,室温下 3000 转 / 分离心 15 分钟,取血浆放入无 RNase/DNase 管中, -80 ℃ 冰箱保存。后将犬气栓处死,快速取出心脏,分离左心室游离壁,冷生理盐水清洗,取部分组织无菌纱布擦干后液氮保存 20 分钟,后放入 -80 ℃ 冰箱保存。

1.2.3 RNA 的提取 按血清 / 组织 Total RNA 提取试剂盒说明书操作,按说明书加入 QuantoEC-1(EC-1)作为实验外参监测实验的所有步骤。

1.2.4 总 RNA 纯度和浓度的检测 使用紫外分光光度计测定

Total RNA 浓度和纯度,记录 OD₂₆₀ 值。RNA 纯度检测:RNA 溶液的 OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 的比值(比值范围为 1.8-2.1 纯度合格),变性琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。

1.2.5 cDNA 的合成 按 Quanto-miR cDNA 合成试剂盒说明书操作。按说明书加入 QuantoEC-3(EC-3)作为实验外参监测实验的所有步骤。

1.2.6 实时定量 PCR 按 Quanto-miR 检测试剂盒说明书操作,以 U6 为内参引物序列,基于本实验室已有研究,分离血浆后对 miR-133a 的表达水平进行了检测,三覆孔重复。

1.2.7 数据分析 CT 值的检测采用 SDS 相对定量分析软件,所有设置采用软件默认设置。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肝素对血浆 miRNA Ct 值的影响

两组比较发现血浆内参 U6,外参 EC-1,EC-3,及 miR-133a Ct 值相对于对照组有明显上升,其差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。外参 EC-1,EC-3 Ct 值增高幅度约为 7-8 个 Ct 值,内参 U6 及 miR-133a Ct 值增高幅度约为 4-5 个 Ct 值。外参 miRNA 受肝素影响程度大于内参。见表 1。

表 1 实验组与对照组血浆中 U6、EC-3、miR-133a 的 Ct 值
Table 1 Ct values of U6, EC-3, miR-133a in plasma in two groups

Item	Ct values		t	P
	Control group	Intravenous heparin group		
U6	19.23± 0.19	23.28± 1.46	-10.70	<0.001
EC-1	26.18± 0.56	33.67± 0.74	-29.90	<0.001
EC-3	15.61± 0.16	22.73± 1.02	-26.70	<0.001
miR-133a	24.61± 1.29	29.98± 0.69	-12.99	<0.001

2.2 肝素对组织 miRNA Ct 值的影响

两组比较发现组织内参 U6,外参 EC-1,EC-3,及 miR-133a

Ct 值无明显差异,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 实验组与对照组组织中 U6、EC-3、miR-133a 的 Ct 值
Table 2 Ct values of U6, EC-3, miR-133a in tissues in two groups

Item	Ct values		t	P
	Control group	Intravenous heparin group		
U6	18.47± 0.26	18.66± 0.29	-1.75	0.093
EC-1	17.12± 0.19	17.25± 0.34	-1.31	0.203
EC-3	15.50± 0.22	15.56± 0.24	-0.59	0.564
miR-133a	18.21± 0.37	18.48± 0.34	-1.96	0.062

3 讨论

近年来人们对 miRNA 的研究不断加深,很多研究结果提示 miRNA 未来会在心血管疾病的诊断,治疗中起到重要作用^[16-18]。肝素是治疗心血管疾病中应用最广泛试剂之一,并且可

以明显抑制 PCR 扩增效率^[9,10,14,15],对研究 miRNA 与心血管病的关系造成巨大阻碍,所以搞清楚肝素能影响 miRNA 的具体范围和机制对其研究具有重要意义。肝素是一种含多量硫酸基团的粘多糖硫酸酯,分子量在 5000~15000 之间,溶于水,不溶于有机溶剂,带有强大的负电荷^[19]。这些理化性质决定了肝

素在 miRNA 抽提过程中,不能被酚、氯仿去除,亦不能被乙醇沉淀、洗涤去除,从而不可避免地被带入 PCR 反应体系。这点从本实验中也能再次证明外参 EC-3 为含有 21 个碱基的人工合成 miRNA,其作用是检测 cDNA 合成及 qRNA 反应过程是否成功,是实验中间加入的,它受影响证明肝素在合成 cDNA 之前并没有被去除,还影响了之后 PCR 的表达。既往认为肝素可能通过下述机理影响 PCR 扩增效应。1. 肝素对 DNA 聚合酶具有强大的亲和力,PCR 扩增是通过 DNA 聚合酶与适当 Mg^{2+} 作用,活化后与引物模板复合体结合,形成精确构象把 dNTPs 按碱基配对装配到引物的 3' 端,但在肝素存在时,PCR 体系中的 DNA 聚合酶部分或全部错误活化成亲肝素型,不能与 Mg^{2+} 作用形成正确的亲引物-模板复合体的活性中心;2. 肝素影响 PCR 反应体系中 Mg^{2+} 的浓度。常见的扩增体系中, Mg^{2+} 最适浓度在 0.75 mmol/L 左右(0.75~1.25 mmol/L),低临界浓度与最佳浓度间的可变区限很窄。肝素的使用极易使 Mg^{2+} 过低,从而使 PCR 效率下降或失败^[20,21]。但根据 Boeckel^[12]的研究提高 Mg^{2+} 浓度并不能去除肝素对 PCR 反应的影响,同样 Kaudewitz^[15]通过外源性 miRNA 受肝素影响比内源性 miRNA 更加明显认为其机制并不完全是传统观念认为的肝素影响 PCR 反应中的聚合酶和 Mg^{2+} 浓度,所以肝素对影响 PCR 的反应机制尚不完全明确。本研究利用两个外参 EC 1 和 EC 3 进一步研究肝素对 miRNA 的影响程度,在实验开始时将血浆样本 4℃ 10,000 g 离心 5 min,取 200 μ L 上清至新的 1.5 mL RNase-Free 离心管,加入 1 μ L 外参 EC 1 至样本中,并在合成 cDNA 之前在 Total RNA 中加入 1 μ L EC 3 外参,实验结果提示 EC-1 和 EC-3 Ct 值增高幅度约为 7-8 个 Ct 值,内参 U6 及 miR-133a Ct 值增高幅度约为 4-5 个 Ct 值。这一点本研究与 Kaudewitz 得出的结论相同,即外源性 miRNA 受肝素影响比内源性 miRNA 更加明显。本研究利用两个外参添加的时间不同进一步得出这种差异在 miRNA 从血浆中提取出来后依然存在。Boeckel^[12]通过测试多种 miRNA 认为肝素只影响一部分血浆内源性 miRNA。通过 Boeckel^[12]和 Kaudewitz^[15]的研究结合本研究提出猜想:内源性 miRNA 与外源性 miRNA 相比较具有某种保护机制可以一定程度上抵抗肝素的影响,并且不同内源性 miRNA 之间的抵抗能力也有较大差别而这种保护机制在把 miRNA 从血浆中提取出来后依然存在。

本研究同时对组织 miRNA 受肝素影响程度进行研究,这也同研究血浆 miRNA 同样具有实际意义,例如在实际的临床工作中,若想要取得心脏组织标本则无法像动物实验直接处死实验对象获得,而是多数通过介入等方式;或者在做大型动物实验提取血浆和组织前,大多要进行如心室内压测量等介入检查。在选择这些介入方法时不可避免要对患者或实验对象注射肝素,从而避免血栓的形成。而在研究大多数有关心血管方面的组织内 miRNA 的前提条件就是肝素对组织 miRNA 无明显影响,本研究得出组织在短时间内用冷生理盐水清洗干净后测 miRNA 的 PCR 反应未见明显影响的结论对于研究与心血管有关的 miRNA 具有较大意义。在这样前提条件下可以帮助分析循环 miRNA 的来源,并进一步挖掘 miRNA 的功能和意义。综合本实验研究结果总结出:静脉注射肝素短时间内对血浆

miRNA 的 PCR 扩增效率造成明显影响,对组织 miRNA 提取及 PCR 扩增效率无明显影响。这一点在设计有关介入方面的动物实验上同样具有重要意义,提醒设计心血管与 miRNA 有关实验时应提前考虑肝素的影响,如果需从血浆中提取 miRNA,则需在介入手术进行肝素注射前进行取血,但无论是在术中,或者是手术结束时短时间内取组织对 miRNA 的研究无显著影响。

参考文献(References)

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [3] Van R E, Sutherland L B, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. Science, 2007, 316(5824): 575-579
- [4] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure [J]. Circulation, 2007, 116(3): 258-267
- [5] Naga P S V, Duan Z H, Gupta M K, et al. Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks [J]. J Biol Chem, 2009, 284(40): 27487-27499
- [6] 李青, 胡斌, 牛鑫, 等. MiR-30e 调控心肌肥厚的作用机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(20): 3804-3813
- [7] Li Qing, Hu Bin, Niu Xin, et al. Mechanism of cardiac hypertrophy regulates by miR-30e [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(20): 3804-3813
- [8] Kim D-J, Linnstaedt S, Palma J, et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation[J]. Mol Diagn, 2012, 14: 71-80
- [9] 杨仁杰, 李文华. 急诊介入诊疗学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 83
- [10] Yang Ren-jie, Li Wen-hua. Emergency Interventional Diagnosis and Therapeutics[M]. Beijing: Science Press, 2008: 83
- [11] Beutler E, Gelbert T, Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction[J]. Biotechniques, 1990, 9: 166
- [12] Holodniy M, Kim S, Katzenstein D. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin [J]. J Clin Micro, 1991, 29: 676
- [13] Kim D J, Linnstaedt S, Palma J, et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation [J]. J Mol Diagn, 2012, 14: 71-80
- [14] Boeckel J N, Thome C E, Leistner D, et al. Heparin selectively affects the quantification of microRNAs in human blood samples [J]. Clin Chem, 2013, 59(7): 1125-1127
- [15] Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, et al. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells [J]. Clin Lab Anal, 1999, 13: 133-140
- [16] 张晓娟, 董静, 马红霞, 等. 血清/血浆 microRNA 检测方法探讨与建立[J]. 南京医科大学学报, 2011, 31(4): 529-531
- [17] Zhang Xiao-juan, Dong Jing, Ma Hong-xia, et al. The discussion of testing method on serum/plasma microRNA [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing, 2011, 31(4): 529-531

- Seizure, 2013, 22(9): 703-707
- [13] Nakamura T, Yamada S, Yoshioka T. Brain hypothermic therapy dramatically decreases elevated blood concentrations of high mobility group box 1 in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Dis Markers, 2013, 35(5): 327-330
- [14] Lee JC, Park JH, Park OK, et al. Neuroprotective effects of tanshinone I from Danshen extract in a mouse model of hypoxia-ischemia[J]. Anat Cell Biol, 2013, 46(3): 183-190
- [15] Rosario M, McMahon K, Finelli PF. Diffusion-weighted imaging in acute hyperammonemic encephalopathy[J]. Neurohospitalist, 2013, 3(3): 125-130
- [16] Degraeuwe PL, Jaspers GJ, Robertson NJ, et al. Magnetic resonance spectroscopy as a prognostic marker in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a study protocol for an individual patient data meta-analysis[J]. Syst Rev, 2013, 2(1): 96
- [17] Jellema RK, Lima Passos V, Ophelders DR, et al. Systemic G-CSF attenuates cerebral inflammation and hypomyelination but does not reduce seizure burden in preterm sheep exposed to global hypoxia-ischemia[J]. Exp Neurol, 2013, 8(250): 293-303
- [18] Al-Salam Z. Erythropoietin may improve the Outcome in Infants with Moderate to Severe Hypoxic Ischemic Encephalopathy [J]. J Clin Neonatol, 2013, 2(1): 8-9
- [19] Savard A, Lavoie K, Brochu ME, et al. Involvement of neuronal IL-1 β in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy[J]. J Neuroinflammation, 2013, 10(1): 110
- [20] Kalay S, Oztekin O, Tezel G, et al. The effects of intraperitoneal pentoxifylline treatment in rat pups with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Pediatr Neurol, 2013, 49(5): 319-323

(上接第 4043 页)

- [15] Kaudewitz D, Lee R, Willeit P, et al. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. Thromb Haemost, 2013, 110(3): 609-615
- [16] Oerlemans M I, Mosterd A, Dekker M S, et al. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs [J]. EMBO Mol Med, 2012, 4: 1176-1185
- [17] Gao W, He H W, Wang Z M, et al. Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease[J]. Lipids Health Dis, 2012, 11: 55
- [18] Widera C, Gupta S K, Lorenzen J M, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51: 872-875
- [19] 陈新谦, 金有豫. 新编药理学[M]. (第十三版), 北京: 人民卫生出版社, 1991: 163
- Chen Xin-qian, Jin You-yu. New Pharmacology Thirteenth Edition [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991: 163
- [20] 陈朝红, 刘志红. 肝素抗凝对全血 DNA 提取及 PCR 扩增效率的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1997, 6(1): 87-88
- Chen Chao-hong, Liu Zhi-hong. Impact of Intravenous Heparin on the Amplification Efficiency of PCR on DNA in Blood [J]. Chinese Journal of Nephrology Dialysis & Transplantation, 1997, 6(1): 87-88
- [21] Satsangi J, Jewell D P, Welsh K, et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction[J]. Lancet, 1994, 343: 1509-1510