



## 研究报告

### Research Report

# 人乳汁中 microRNA 的稳定性

周琦<sup>1</sup>, 王晓艳<sup>2</sup>, 李青芝<sup>2</sup>, 王滔<sup>2</sup>, 蒋岸岸<sup>2</sup>

1 雅安职业技术学院护理系, 雅安, 625000;

2 四川农业大学动物科技学院, 雅安, 625014

✉通讯作者: zhouqiyaan@163.com; ✉作者

医学遗传学与疾病研究, 2012 年, 第 1 卷, 第 3 篇 doi: 10.5376/mgdr.cn.2012.01.0003

收稿日期: 2012 年 08 月 03 日

接受日期: 2012 年 09 月 12 日

发表日期: 2012 年 09 月 14 日

本文首次发表在《基因组学与医学生物学》(2012 年第 31 卷第 4 期 366-368 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

周琦等, 2012, 人乳汁中 microRNA 的稳定性, 医学遗传学与疾病研究(online) Vol.1 No.3 pp.15-18 (doi: 10.5376/mgdr.cn.2012.1.0003)

引用格式(英文):

Zhou et al., 2012, Studies on the Stability of miRNAs in Human Breast Milk, Yixue Yichuanxue Yu Jibing Yanjiu (online) Vol.1 No.3 pp.15-18 (doi: 10.5376/mgdr.cn.2012.2.0003)

**摘要** 为了研究人乳汁中的 microRNAs (miRNAs)在体外储存状态下的稳定性。本研究采用模拟体外乳汁储存条件, 对乳汁进行室温孵育 24 h, 反复冻融 6 次, 100℃孵育 10 min, 以及模拟体内消化环境(RNA 酶 A/T1 37℃孵育 1 h)的处理条件, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)方法检测处理前后乳汁中 9 个内源性免疫相关和 1 个外源性人工合成 miRNA 的相对表达量变化差异。研究结果显示: 处理前后乳汁中内源性 miRNAs 和外源性 miRNA 均显著降解(P<0.01)。内源性 miRNAs 降解为初始量的 25%~70%之间, 而外源性 miRNA 则急剧降解至初始量的 0.06%~0.96%。我们的实验表明人乳汁中内源性的 miRNAs 较外源性 miRNAs 在体外不同环境下具有更强的稳定性。

**关键词** 人乳汁, microRNA, 稳定性

## Studies on the Stability of miRNAs in Human Breast Milk

Zhou Qi<sup>1</sup>, Wang Xiaoyan<sup>2</sup>, Li Qingzhi<sup>2</sup>, Wang Tao<sup>2</sup>, Jiang An'an<sup>2</sup>

1 Department of Nursing, Ya'an Vocational College, Ya'an, 625000;

2 College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014

✉Corresponding author: zhouqiyaan@163.com; ✉Authors

**Abstract** In order to investigate the stability of microRNAs (miRNAs) in human breast milk, which is an important prerequisite for the hypothesis that the exosomal miRNAs are transferable genetic material from mother to infant. The raw breast milk was subjected to four types of treatment: (1) incubated at 26℃ for 0.5 to 24 hours; (2) subjected to six freeze-thaw cycles at -20℃; (3) treated with RNase A and RNase T1 for 60 min at 37℃; and (4) incubated at 100℃ for 10 min. We found that the exogenous synthetic miRNAs were rapidly degraded, whereas endogenous miRNAs in human breast milk remained relatively stable when milk was subjected to various harsh conditions. These results indicated that the endogenous miRNAs should have resistance to the harsh conditions to a certain extent.

**Keywords** Human breast milk, microRNA, Stability

人乳汁是婴儿最重要的食物来源, 对婴儿的健康发育特别是后天免疫的形成有着至关重要的作用。MicroRNAs (miRNAs)是一种内源性的非编码 RNA, 由 22 个左右的核苷酸组成, 通过在转录后水平抑制靶 mRNA 的翻译而广泛参与生理和病理反应过程的调节(Bartel, 2009)。Kosaka 等(2010)在人乳中发现了大量 miRNAs 的存在。由于乳汁的成分复杂, 在不同的存放环境中, 人乳汁中的 miRNA

的完整性和稳定性都会受到一定的影响。

为了探究乳汁中 miRNAs 的稳定性, 本研究对人乳汁作设计了 4 种处理: 室温孵育、反复冻融、煮沸和 RNA 酶处理, 利用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测 miRNAs 的相对表达量变化, 试图了解乳汁中内源性的 miRNAs 及外源性 miRNAs 在不同处理条件下的稳定性。



## 1 结果与分析

研究显示室温孵育 4 h 后, 乳汁中的内源性 miRNAs 稳定在初始量的在 37% 至 70% 范围内, 到 8 h 和 24 h 后分别降至初始量的 16% 和 8%; 而外源性 miRNA 在孵育 0.5 h 后就降到了初始量的 0.13% (图 1A)。在 -20℃ 冻融处理 1~6 次后, 乳汁中的内源性 miRNAs 稳定在 25%~46% 的水平, 但外源性 miRNA 在冻融 1 次后就降到了初始量的 0.95% (图 1B)。在 100℃ 处理 10 min 后, 乳汁中的内源性 miRNAs 的表达量降到初始量的 29%, 而外源性 miRNA 则降解到初始量的 0.63% (图 1C)。RNA 酶 A/T1 在 37℃ 消化 1 h 后, 乳汁中的内源性 miRNAs 降到了初始量的 49%, 而外源性 miRNA 在初始量的 0.69% (图 1D)。

上述结果表明, 在 4 种体外不同处理条件下,

性降解( $P < 0.01$ )。内源性 miRNAs 降解为初始量的 25%~70% 之间, 而外源 miRNA 则急剧降解至初始量的 0.06%~0.96%。研究结果说明人乳汁中内源性 miRNAs 较外源性 miRNAs 在体外不同环境中具有更好的稳定性。

## 2 讨论

本研究结果显示人乳汁在经过常温存放, -20℃ 反复冻融和煮沸处理后其内源 miRNAs 仍然存在较高的表达量, 这与 Mitchell 等(2008)在血液中证实 miRNAs 可以稳定表达的研究相似。我们的研究结果显示人乳汁中的内源 miRNAs 较外源 miRNAs 具有更强的抵御 RNA 酶 A/T1 降解的能力, 这与 Kosaka 等(2010)证明人奶 miRNA 可以抵抗 RNA 酶降解结果相同。根据 Pegtel 等(2010)的报道, 这些

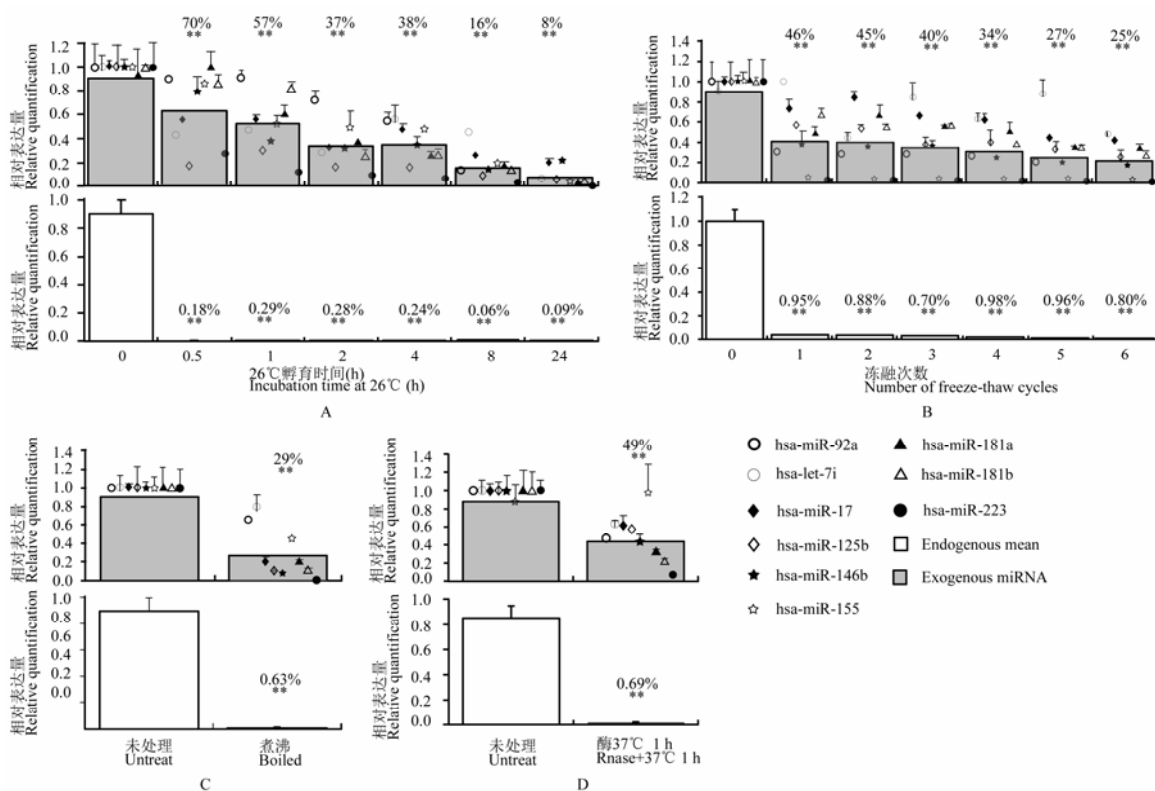


图 1 人乳汁中内源性 miRNAs 和外源性 miRNAs 在体外不同处理环境下的相对表达量变化

注: 人乳汁经 4 种不同处理前后 9 个内源性免疫相关 miRNAs 和 1 个外源性 miRNA (ath-miR-159a-3p) 的相对表达量; 人乳汁 (A) 26℃ 孵育 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h; (B) -20℃ 和室温冻融 1~6 次; (C) 100℃ 孵育 10 min; (D) RNA 酶 A/T1 37℃ 消化 1 h; \*\*表示处理前后的差异经 t 检验达极显著水平( $P < 0.01$ )

Figure 1 The changes of relative expression between endogenous miRNAs and exogenous synthetic miRNAs under various harsh conditions

Note: The expression changes of a spiked-in *Arabidopsis thaliana* miRNA (Exogenous ath-miR-159a-3p) and of the nine immune-related miRNAs under various harsh conditions; Breast milk was incubated at (A) 26℃ for 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h or 24 h; (B) subjected to six freeze-thaw cycles at -20℃, (C) incubated at 100℃ for 10 minutes, and (D) treated with RNase A and T1 for 60 minutes at 37℃; The statistical significance was calculated by Student's t-test (\*\* $p < 0.01$ ); Values are means  $\pm$  s.d



稳定存在的 miRNAs 可能包被于 Exosome 中。Exosome 是一类直径约 30~100 nm (张尧和吴小候, 2008)广泛存在各种体液中的小囊泡体(Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008), 可以保护其中包被的 miRNA、mRNA 和蛋白质, 还能参与细胞之间信息的传递和物质的交换(Mathivanan et al., 2010), 甚至在植物性食品和人体之间进行交流(Zhang et al., 2012)。显然, 婴儿喝下母乳后, 其中含有的免疫相关 miRNAs 很可能通过这种保护机制抵御胃肠道的消化而直接被机体吸收, 进而对婴儿自身免疫系统的完善发挥其调控作用。本研究结果进一步为核酸营养和母乳喂养重要性提供了佐证。

### 3 材料与方法

#### 3.1 样本采集

人乳汁(20~50 mL)取自 4 名产后 60 d 处于泌乳期的健康妇女((30±0.9)岁, 第一胎, 自然分娩), 用手动吸乳器收集乳汁于无菌离心管中。收集好的样品于-80℃冻存, 用于研究分析。

#### 3.2 样本处理

将人乳汁冰上解冻后混合均匀, 取等量样本分别模拟储存: (1) 26℃孵育 0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h 和 24 h; (2) -20℃和室温反复冻融 6 次; (3) 100℃孵育 10 min, 和模拟体内消化: (4) RNase A (0.16 μg/μL) 和 RNase T1 (0.4 U/μL) (美国 Fermentas 公司) 37℃孵育 1 h。样本在处理前都加入 100 fM 外源性 miRNA ath-miR-159a-3p (广州锐博公司人工合成的 miRNA, 与人体内 miRNA 无同源性), 作为内源性 miRNAs 的对照。样本处理结束后, 为校正不同样本在 RNA 抽提以及后续实验中的误差, 在乳汁变性后(RNA 抽提过程中加入裂解液后)加入 100 fM 外源参考基因 cel-miR-2-3p 和 cel-lin-4-5p。

#### 3.3 qRT-PCR 检测人乳汁中免疫相关 miRNAs

qRT-PCR 检测人乳汁中 9 个内源性的免疫相关 miRNAs 和一个外源 miRNA (ath-miR-159a-3p)的相对表达量, miRNAs 的引物即为其成熟体本身, 序列查自 miRBase 18.0 数据库(<http://www.mirbase.org/>)。荧光定量参照 SsoFast™ EvaGreen® Supermix 说明书(美国 Bio-Rad 公司)进行操作。qRT-PCR 反应体系为 10 μL: 5 μL SsoFast EvaGreen supermix, 0.5 μL 引物, 1 μL 的 cDNA 模板。PCR 循环参数为: 98℃ 30 s, 98℃ 1 s, 60℃ 5 s, 循环 45 次, PCR 扩增后进行熔解曲线分析, 温度以 0.2℃/s 的速度缓慢从 65℃递增到 95℃, 每个 miRNA 做 3 个技术重

复, 每板设置一个阴性对照。检测仪器为 Bio-Rad 的 CFX96™实时 PCR 检测系统(美国 Bio-Rad 公司)。以外源性的 miRNAs cel-miR-2-3p 和 cel-lin-4-5p 作为校正不同样品的参考基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miRNAs 相对表达量差异, 并采用 SigmaPlot 软件(美国 Systat 公司)进行 Student-t 检验。

#### 作者贡献

周琦负责试验设计和文章的写作; 王晓艳在实验操作中提供帮助和指导; 李青芝负责实验样本的采集工作; 王滔在本论文数据处理方面做了大量工作; 蒋岸岸在本论文写作及修改上面做了大量工作。

#### 致谢

本研究获得国家自然科学基金项目(30901024)资助。作者感谢四川农业大学动物遗传研究所为本试验开展提供实验室和仪器; 本论文的完成要感谢李明洲和官久强等的热情帮助。在此对他们表示感谢!

#### 参考文献

- Bartel D.P., 2009, MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions, *Cell*, 136(2): 215-233 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002> PMID: 19167326
- Kosaka N., Lzumi H., Sekine K., and Ochiya T., 2010, microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk, *Silence*, 1(1): 7 <http://dx.doi.org/10.1186/1758-907X-1-7> PMID: 20226005 PMCID: 2847997
- Lakkaraju A., and Rodriguez-Boulan E., 2008, Itinerant exosomes: Emerging roles in cell and tissue polarity, *Trends in Cell Biology*, 18(5): 199-209 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.03.002> PMID: 18396047
- Mathivanan S., Ji H., and Simpson R.J., 2010, Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication, *Journal of Proteomics*, 73(10): 1907-1920 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006> PMID: 20601276
- Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Brian K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S., Martin D.B., and Tewari M., 2008, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *PNAS*, 105(30): 10513-10518 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804549105> PMID: 18663219 PMCID: 2492472
- Pegtel D.M., Cosmopoulos K., Thorley-Lawson D.A.,



- Eijndhoven M.A.J.V., Hopmans E.S., Lindenberg J.L., Gruijl T.D.D., Würdinger T., and Middeldorp J.M., 2010, Functional delivery of viral miRNAs via exosomes, PNAS, 107(14): 6328-6333 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0914843107> PMID: 20304794 PMCID: 2851954
- Zhang L., Hou D., Chen X., Li D., Zhu L., Zhang Y., Li J., Bian Z., Liang X., Cai X., Yin Y., Wang C., Zhang T., Zhu D., Zhang D., Xu J., Chen Q., Ba Y., Liu J., Wang Q., Chen J., Wang J., Wang M., Zhang Q., Zhang J., Zen K., and Zhang C.Y., 2012, Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA, Cell Research, 22: 107-126 <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.174> PMID: 21931358
- Zhang Y., and Wu X.H., 2008, The biological characteristics of exosome and its role in immune regulation, Chongqing Yixue (Chongqing Medical Journal), 37(18): 2111-2113 (张尧, 吴小候, 2008, Exosome 的生物学特性及其在免疫调节中的作用, 重庆医学, 37(18): 2111-2113)