

乳腺癌差异表达的 MicroRNA 的筛选研究

黄秀芳^{1,2}, 邵建永^{1*}, 颜黎栩¹, 李晓霞¹, 杜紫明¹, 邓玲¹, 梁小曼¹
(1. 华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心病理科, 广东 广州 510060;
2. 江门市中心医院病理科, 广东 江门 529030)

摘要:【目的】应用 miRNA 芯片技术筛选乳腺癌及癌旁组织差异表达的 miRNA, 发现与乳腺癌相关的 miRNA, 为进一步阐明其在乳腺癌发病机制中的作用打下基础。【方法】收集 8 例新鲜的乳腺癌及其癌旁组织, 抽提总 RNA 并分离出小 RNA 进行 Cy3 荧光标记, 将标记的小 RNA 在 miRNA 芯片上进行杂交反应, 应用实时定量 RT-PCR 方法验证 miRNAs 芯片结果的可靠性。【结果】对芯片数据进行 SAM 分析, 结果筛选获得 16 个乳腺癌相关 miRNAs, 相对于癌旁组织, 在乳腺癌组织中 9 个 miRNAs 表达上调, 7 个 miRNAs 表达下调。其中显著上调的有 miR-21, miR-365, 显著下调的有 miR-497, miR-31。【结论】筛选得到乳腺癌 miRNA 差异表达谱, 其可能与乳腺癌的发生发展有关。

关键词: miRNA; 乳腺癌; miRNA 芯片; 实时定量 RT-PCR

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)01-0069-05

Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in Breast Cancer

HUANG Xiu-fang^{1,2}, SHAO Jian-yong^{1,2*}, YAN Li-xu^{1,2}, LI Xiao-xia^{1,2}, DU Zi-ming^{1,2},
DENG Ling^{1,2}, LIANG Xiao-man^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Oncology in Southern China;

2. Department of Pathology, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China;

3. Department of Pathology, Jiangmen Central Hospital, Jiangmen 529030, China)

Abstract: 【Objective】 To screen and identify the miRNA differential expression profile in breast cancer (BRCA) by the miRNA array technique to make further study on the function of miRNA in pathogenesis of BRCA. 【Methods】 Total RNA was extracted from 8 breast tumor samples and normal adjacent tissues. Small miRNA was isolated from total RNA, labeled with Cy3 and hybridized on miRNA array. Real time quantitative PCR was applied to verify the reliability of miRNA array results. 【Results】 By significance analysis of microarrays (SAM) based on microarray screening, 16 BRCA related miRNAs were obtained. In BRCA, 9 up-regulated and 7 down-regulated miRNAs were observed. The most significant up-regulated miRNAs were miR-21 and miR-365, while miR-497 and miR-31 were significantly down-regulated. 【Conclusion】 miRNA differential expression profile of human BRCA was obtained, which may be related to the pathogenesis and development of BRCA.

Key words: miRNA; breast cancer; miRNA array; real time quantitative PCR

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(1): 69-73; 77]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。全球每年约有 120 万新发乳腺癌病例, 50 万死亡病例。近年来, 我国乳腺癌的发病率呈逐年上升趋势, 严重危害女性的生命和健康^[1]。然而, 乳腺癌发生发展的分子机制至今仍不清楚。miRNAs 是一类长约

19~23 nt 的单链非编码 RNA, 广泛存在于植物和动物中^[2]。miRNA 与其靶 mRNA 的 3'-UTRs(3'非编码区)特异性结合, 引起靶 mRNA 的翻译抑制或切割降解, 调控基因的表达, 在细胞的生长、分化及死亡的过程中具有重要作用。miRNA 的表达异

收稿日期: 2008-06-30

基金项目: 国家重点基础研究规划项目("973"计划, 2004CB518708); 广东省科技计划项目(2003A3080202); 广州市科技计划项目(2003I-E0341)

作者简介: 黄秀芳, 硕士生; * 通讯作者: 邵建永, 研究员, 博士生导师, E-mail: shjiany@mail.sysu.edu.cn

常与多种肿瘤相关,其在肿瘤的发生过程中发挥癌基因或抑癌基因的作用^[3]。本研究采用 miRNA 芯片技术筛选乳腺癌与癌旁组织差异表达的 miRNA,探讨其与乳腺癌发生的关系,以期阐明乳腺癌发生的分子机制提供新的依据。

1 材料与方 法

1.1 采集标本

选取 2005 年 11 月至 2006 年 3 月在中山大学肿瘤防治中心行手术治疗的 8 例乳腺癌患者的手术标本,病理诊断均为乳腺浸润性导管癌。所取标本离体时间均小于 30 min,分别取癌旁组织(距癌组织大于 2 cm)及癌组织。所有患者术前均未接受放疗、化疗。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 抽提 采用液氮研磨法将组织磨成粉末,加入 Trizol 混合,按 Trizol 说明抽提总 RNA。

1.2.2 小 RNA 分离及标记 取 50~100ug 总 RNA,采用 Ambion's miRNA Isolation Kit (Ambion 公司产品)分离富集 miRNA,分离过程按照试剂盒说明。利用 T4 RNA 连接酶(Biolabs 公司产品)进行 Cy3 荧光标记,无水乙醇沉淀,晾干。

1.2.3 miRNA 芯片杂交 miRNA 芯片由北京国家工程研究中心点制(包含 509 条探针,针对人、大鼠及小鼠的成熟 miRNA,数据来自 2005 年 10 月 Sanger 数据库)。为保证结果的重复性和可靠

性,每个样本用两张芯片重复进行实验,芯片杂交实验及后续结果分析在生物芯片北京国家工程研究中心完成。已标记的 miRNA 与 16 μ L 杂交液(15%甲酰胺,0.2% SDS,3 \times SSC,50 \times Denhardt's)混合,将混合液加入放有 miRNA 芯片的杂交盒中,42 $^{\circ}$ C 杂交过夜;含 0.2% SDS、2 \times SSC 的溶液 42 $^{\circ}$ C 清洗 4 min;0.2 \times SSC 溶液室温清洗 4 min,甩干。

1.2.4 芯片扫描及数据处理 采用 LuxScan 10 K/A 双通道激光扫描仪扫描芯片;采用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件将图像信号转化为数字信号;对数据进行预处理:删除坏点(以信号值低于 1 000 为基准),进行片间校正;对每个 miRNA 的信号值取均值。用 Significance Analysis of Microarrays (SAM, version 2.1)软件挑选差异表达基因。用 Cluster 3.0 对差异表达 miRNA 进行聚类分析。

1.2.5 实时定量 RT-PCR 将 0.05 μ g 总 RNA 反转录为第一链 cDNA,以第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增:镁离子 3 mM,引物 0.25 μ M;95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,95 $^{\circ}$ C,15 s,60 $^{\circ}$ C,30 s,40 个循环;70 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C 绘制融解曲线,电泳检测 PCR 扩增情况。实时定量 PCR 引物序列见表 1。

1.2.6 生物信息学分析 应用互联网上 miRNA 靶基因预测软件(Pictar^[4]、Targetscan^[5]、MiRanda^[6])在线服务站点,输出差异表达 miRNA 的预测靶基因,取至少 2 个软件预测到的基因作为靶基因。

表 1 实时定量 RT-PCR 引物

Table 1 Primers used for real time quantitative PCR

Primer	Primer sequence(5'→3')
miR-21-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACTGGATACGACtcaaca
miR-21-F	GCCGCTAGCTTATCAGACTGATGT
miR-497-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACTGGATACGACacaaac
miR-497-F	TAGCCAGCAGCACACTGTGGT
miR-376a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACTGGATACGACacgtgg
miR-376a-F	CGCATCATAGAGGAAAATCCAC
miR-137-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACTGGATACGACctaecg
miR-137-F	CGCTTATTGCTTAAGAATACGC
miR-145-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACTGGATACGACaaggga
miR-145-F	GTCCAGTTTTCCAGGAATCC
miR-125b-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACTGGATACGACtcacaa
miR-125b-RT	CGTCCCTGAGACCCTAACTTGT
General downstream primers R	GTCCAGGGTCCGAGGT

F: forward primer; R: reverse primer

2 结果

2.1 miRNA 芯片结果

将校正后的 miRNAs 芯片数据导入 SAM2.1, 进行 SAM 分析。与相应癌旁组织比较, 共筛选出 16 个乳腺癌相关 miRNAs (上调 > 2 倍或下调 < 0.5 倍^[7]), 其中表达上调的 miRNAs 为 9 个, 分

别为 miR-21, miR-365, miR-181b, let-7f, miR-155, miR-29b, miR-181d, miR-98 和 miR-29c; 表达下调的 miRNAs 为 7 个, 分别为 miR-497, miR-31, miR-355, miR-320, rno-miR-140, miR-127 和 miR-30-3p (表 2)。应用聚类分析方法, 将 SAM 分析所得上述 16 种 miRNAs 芯片数据导入 Cluster 3.0^[4], 得到聚类图(图 1)。

表 2 miRNA 芯片所得乳腺癌差异表达 miRNA
Table 2 miRNA fold changes in BRCA detected by miRNA microarray

Gene name	Fold change	Regulation	Gene name	Fold change	Regulation
hsa-mir-21	2.84	up	hsa-mir-497	0.23	down
hsa-mir-365	2.56	up	hsa-mir-31	0.24	down
hsa-mir-181b	2.40	up	hsa-mir-335	0.29	down
hsa-let-7f	2.39	up	hsa-mir-320	0.29	down
hsa-mir-155	2.29	up	rno-mir-140 ¹⁾	0.29	down
hsa-mir-29b	2.27	up	hsa-mir-127	0.36	down
hsa-mir-181d	2.17	up	hsa-mir-30a-3p	0.42	down
hsa-mir-98	2.13	up			
hsa-mir-29c	2.06	up			

SAM was used for data analysis. 1) "rno-", *Rattus norvegicus* (rat)

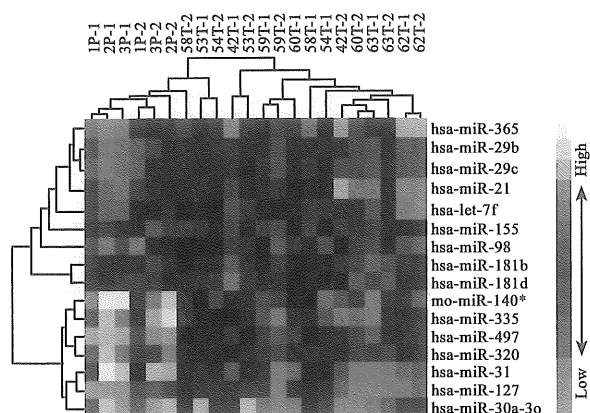


图 1 乳腺癌及癌旁组织中 16 种差异表达 miRNAs 的非监督分层聚类分析图

Fig.1 Unsupervised hierarchical cluster analysis of 16 differentially expressed miRNAs in BRCA vs. NAT, as determined by SAM analysis

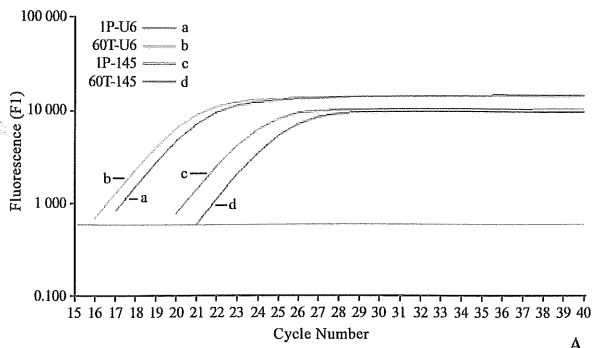
2.2 实时定量 RT-PCR 结果

在标本 60T 和 1P(60T 和 1P 是配对的乳腺癌及癌旁组织) 中进行 miR-21、miR-125b、miR-137、miR-145、miR-376a 和 miR-497 的实时定量 RT-

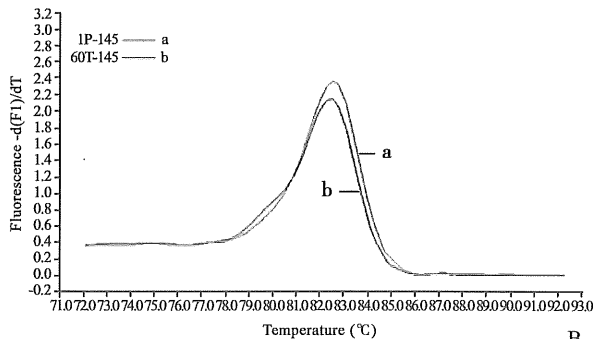
PCR 验证。扩增曲线、融解曲线及 PCR 产物电泳显示该方法具有良好的扩增效率及特异性。图 2A、2B 示 miR-145 的扩增曲线、融解曲线, 图 2C 示所有验证 miRNA 的实时定量 RT-PCR 产物的电泳检测情况。

2.3 实时定量 RT-PCR 与 miRNA 芯片结果比较

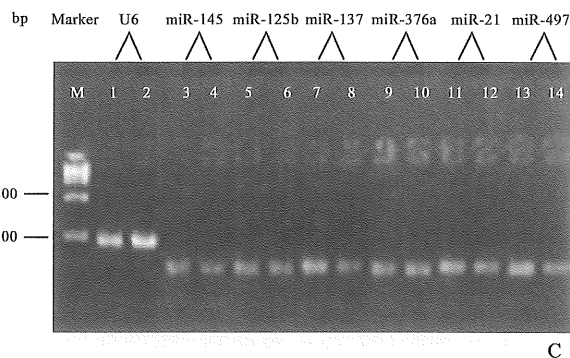
参照文献[8], 对芯片数据及实时定量 RT-PCR 数据进行归一化处理, 以使两者具有可比性, 即从 miRNA 芯片得到 60T 与 1P 中不同 miRNA 的信号平均值, 将 60T 的信号值除以 1P 的信号值, 得到比值 R_{array} ($60T/1P$)。定量 RT-PCR 计算公式^[9]: $R_{\text{PCR}} = E_{\text{miR-X}}^{\Delta\text{CP}(\text{对照}-\text{样本})} / E_{\text{U6}}^{\Delta\text{CP}(\text{对照}-\text{样本})}$ 。1P 为对照, 60T 为样本, U6 为内参; E 表示扩增效率; CP (crossing point) 表示实时荧光强度显著大于背景值时的循环数。得到两组比值 R_{array} 与 $R_{\text{RT-PCR}}$, 比值大于 1 表示上调, 比值小于 1 表示下调, 最后将两组比值转化为直方图(图 3)。如图所示, 相对于 U6, miR-145、miR-125b、miR-137 和 miR-497 的表达在芯片和实时定量 RT-PCR 均下调; miR-21 的表达在芯片和实时定量 RT-PCR 均上调, 结果表明



A



B



C

图 2 miR-145 扩增曲线、融解曲线及实时定量 RT-PCR 产物检测图

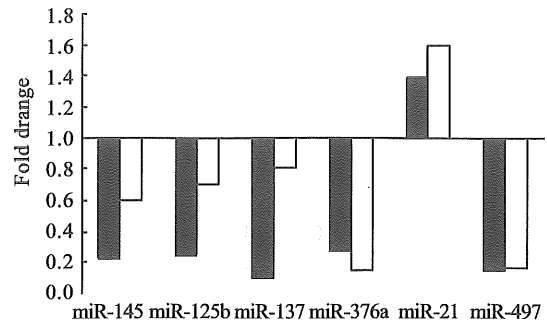
Fig.2 Amplification plot, melt curve of miR-145 and detection of real time PCR products

A: miR-145 amplification plot; B: miR-145 melting curve: single peak meant good specificity; C: 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 were from IP, while 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 were from 60T

实时定量 RT-PCR 与芯片结果相符。

2.4 差异表达 miRNAs 靶基因预测结果

选择乳腺癌表达上调大于 2.5 倍的 miR-21, miR-365 进行靶基因的预测。通过靶点预测软件 PicTar, TargetScan 和 miRanda 预测他们可能与肿瘤相关的靶基因。为了减少假阳性率,挑选至少出现在 2 个软件中的基因作为其可能的靶基因,其中 miR-21 共筛选出 8 个基因,miR-365 共筛选出 3 个基因(表 3)。



miRNA	RT-PCR	Microarray
miR-145	0.220	0.604
miR-125b	0.249	0.703
miR-137	0.096	0.803
miR-376a	0.268	0.141
miR-21	1.390	1.597
miR-497	0.147	0.165

图 3 实时定量 RT-PCR 与芯片结果比较

Fig.3 Comparison of miRNA fold-changes by miRNA microarray and real time PCR

表 3 miR-21, miR-365 肿瘤相关靶基因

Table 3 Putative tumor-related target genes of miR-21 and miR-365

miRNA	Target gene	Gene name
miR-21	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
	NTF3	neurotrophin 3
	PDCD4	programmed cell death 4
	RAB6A	Member RAS oncogene family
	RAB6C	Member RAS oncogene family
	TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
	TPM1	Tumor suppressor gene tropomyosin 1
	TGFβ	TGF-beta receptor type-2 precursor
miR-365	RAB1B	Member of RAS oncogene family
	RAB22A	Member of RAS oncogene family
	RASD1	Dexamethasone-induced Ras-related protein 1

Target prediction is based on TargetScan 4.0, PicTar, and miRanda. The listed genes are predicted by at least 2 prediction programs

3 讨论

miRNA 表达异常与人类肿瘤关系密切,在肿瘤发生过程中起到癌基因或抑癌基因的作用^[2]。Calin 等^[10]研究发现,在已确认的人类 miRNA 中,50%以上定位于基因组的脆性位点,而这些脆性位点常与肿瘤的发生有关。miR-15a 和 miR-16-1 在慢性淋巴细胞白血病(CLL)中常发生缺失或下调,二者均定位于染色体 13q14,而 65%以上 CLL 的病例中存在 13q14 的缺失,提示 miR-15a 和 miR-16-1 与 CLL 的发生关系密切^[11]。最近研究发

现 miR-15a 和 miR-16-1 还可负性调控 BCL-2^[12], BCL-2 的过表达已被证实与多种肿瘤的发生有关,包括白血病和淋巴瘤,因此认为 miR-15a 和 miR-16-1 的缺失或下调导致 BCL-2 的过表达,在白血病和淋巴瘤的发生中起到重要作用。

miRNA 芯片技术是一种快速有效的分析 miRNA 表达谱的方法。Liu 等^[13]首次用其检测 245 个哺乳动物的 miRNA,结果具良好重复性。我们应用 miRNA 芯片技术筛选得到乳腺癌与癌旁组织差异表达的 16 种 miRNAs,其中相对于癌旁组织,乳腺癌组织中 miR-21 和 miR-365 表达上调大于 2.5 倍,miR-497 和 miR-31 表达下调小于 0.25 倍。Iorio 等^[14]对乳腺癌的研究发现,相对于癌旁组织,在乳腺癌组织中 miR-21、miR-155 表达上调,miR-10b、miR-125b、miR-145 表达下调。我们的结果丰富了乳腺癌的 miRNA 差异表达谱,为进一步研究 miRNA 在乳腺癌发生中的作用及机制提供了更多依据。

miRNA 同通过对靶因的表达调控而发挥作用,因此我们对显著上调的 miR-21 和 miR-365 进行靶点预测,以求进一步认识其与乳腺癌发生的关系。结果表明,miR-21 的靶基因包括癌基因 RAB6A、RAB6C,抑癌基因 TPM1、TGF β ,凋亡相关基因 BCL2、DDCD4、NTF3,肿瘤转移相关基因 TIMP3 等;miR-365 的靶基因为 RAS 相关基因 RAB22A、RASD1 和 RAB1B。上述结果提示这些 miRNA 作用靶点广泛,涉及癌基因、抑癌基因、信号转导基因、细胞周期调控相关基因等。最近, Frankel^[15]研究发现,在乳腺癌细胞 MCF-7 中 tumor suppressor protein Programmed Cell Death 4 (PDCD4)是 miR-21 的一个重要靶点,此外,miR-21 与 P53 肿瘤抑制蛋白有密切的联系。该报道与靶基因预测结果相符,说明 miRNA 靶基因预测为进一步研究 miRNA 在乳腺癌发生中的作用机制提供重要线索。

由于 miRNA 长度只有 20 nt 左右,传统 PCR 方法不能对其进行检测。Chen 等^[16]设计出长约 60nt 带有茎环结构的反转录引物将 20 nt 左右的 miRNA 反转录成为 80 nt 左右的 cDNA,从而解决了 miRNA 的定量 RT-PCR 检测的难题。我们挑选了芯片结果中具有代表性、信号值存在升高或下调的 miR-21、miR-125b、miR-137、miR-145、miR-376a 和 miR-497,参照 Chen 的方法(RT 引物长约

60nt,后 4~6 个碱基与成熟 miRNA 互补,其余碱基均相同),设计出 RT 引物和 PCR 引物,进行实时定量 RT-PCR,扩增产物约 80 bp 左右。扩增曲线、融解曲线及 PCR 产物电泳图显示本方法具有良好的扩增效率和特异性,并且与 miRNA 芯片结果相符,证明 miRNA 芯片结果可靠。我们认为,相对于其它 miRNA 的检测方法如 Northern blot、液相杂交等,实时定量 PCR 具有操作简单、快捷、所需样本量少等优点,对于 miRNA 的研究来说不失为一种简单而有效的方法。

综上所述,本研究应用 miRNAs 芯片技术对乳腺癌 miRNA 差异表达谱进行研究,发现 9 个上调和 7 个下调的 miRNAs,实时定量 RT-PCR 验证结果表明该 miRNA 芯片技术可靠。靶点预测显示 miR-21 和 miR-365 的靶点非常广泛,涉及癌基因、抑癌基因、信号转导基因、细胞周期调控相关基因等,为进一步研究两者在乳腺癌发生发展过程中的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 魏矿荣,曾志灵,林建友,等. 中山市 1970-1999 年乳腺癌发病动态分析 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2004,25(3S):379-381.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004,116(2): 281-297.
- [3] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. Nature, 2006,6(4):259-269.
- [4] Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets [J]. Semin Liver Dis, 2005,25(2):212-225.
- [5] Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. Lancet, 2003,361(9361): 923-929.
- [6] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. Science, 2001,294(5543):853-858.
- [7] 李晓霞,李瑞平,杜紫明,等. 鼻咽癌差异表达 miRNAs 筛选研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2007,28(6):607-612.
- [8] Lanza G, Ferracin M, Gafa R, et al. mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer [J]. Molecular Cancer, (下转第 77 页 to page 77)