

· 论著 ·

下咽癌中 miRNA 的差异性表达

秦宇蓝, 卫来, 王立志, 王志强 (通讯作者)

(大连大学附属中山医院, 辽宁 大连 116601)

摘要: 目的 采用转录组测序筛选下咽鳞状细胞癌中的 miRNA 及其相关 mRNA, 分析明显上调和下调的 miRNA, 建立下咽癌的 miRNA 表达谱并分析其生物学功能。方法 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月在大连大学附属中山医院确诊为下咽癌的 5 例患者的癌组织和癌旁正常组织。提取总 RNA 并进行转录组测序。筛选在下咽癌中差异表达的 miRNA, 并进行功能分析。结果 筛选出 20 个与正常组织相比在下咽癌组织中差异表达的 miRNA, 其中上调表达的有 9 个, 下调表达的有 11 个。上调表达的 miRNA 的表达倍数均大于 4, 而上调表达最明显的是 MIR2117, 为 7.5315 倍。在下调表达的 miRNA 中, 下调倍数大于 2.0 倍的有 MIR101-1, MIR3671, MIR3188, MIR331, MIR3685, MIR29B1, MIR4305, MIR4265 及 MIR3157。其中, MIR3157 下调最明显, 为 5.98601 倍。位于这些 miRNA 20 kb 以内的 mRNA 有 32 个。结论 筛选出在下咽癌中差异表达的 miRNA, 并分析了其可能调控的靶基因, 为继续研究这些 miRNA 在下咽癌中的作用机制打下基础。

关键词: 下咽癌; 转录组测序; miRNA; 差异表达

中图分类号: R76 文献标识码: A DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2018.67.004

本文引用格式: 秦宇蓝, 卫来, 王立志, 等. 下咽癌中 miRNA 的差异性表达 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(67):6-7+9.

Differential Expression of MiRNA in Hypopharyngeal Carcinoma

QIN Yu-lan, WEI Lai, WANG Li-zhi, WANG Zhi-qiang (Corresponding Author)

(Dalian University Affiliated Zhongshan Hospital, Dalian Liaoning 116601)

ABSTRACT: Objective to screen miRNA and its related mRNA in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by transcriptional sequencing, and analyze obvious up and down regulated miRNA, establish miRNA expression profile of hypopharyngeal carcinoma and analyze its biological function. Materials and Methods choose cancerous tissue and normal tissue adjacent to cancer of 5 cases hypopharyngeal carcinoma patients diagnosed at Dalian University Affiliated Zhongshan Hospital from January 2014 to December 2015. Extract total RNA and carry on sequencing of transcriptional group. Screen miRNA with differential expression in hypopharyngeal carcinoma and carry on functional analysis. Results 20 differentially expressed miRNA were found in hypopharyngeal carcinoma tissues compared with normal tissues, of which 9 were up-regulated and 11 were down-regulated. Expression times of up-regulated miRNA were more than 4, and MIR2117 up-regulated expression was the most obvious, reaching 7.5315 times. Among downregulated miRNA, downregulated times of MIR101-1, MIR3671, MIR3188, MIR331, MIR3685, MIR29B1, MIR4305, MIR4265 and MIR3157 were more than 2.0. Among them, downregulation of MIR3157 was the most obvious, which was 5.98601 times. There were 32 mRNA within miRNA 20 kb. Conclusion screening miRNA with differential expression in hypopharyngeal carcinoma and analyzing possibly regulated target genes, lays foundation for continued study of miRNA mechanism in hypopharyngeal carcinoma.

KEY WORDS: Hypopharyngeal carcinoma; Transcriptome sequencing; MiRNA; Differential expression

0 引言

下咽癌占全身肿瘤的大约 0.5% 及头颈部肿瘤的 5%^[1], 是头颈部肿瘤中恶性程度最高的肿瘤之一。其病理呈现出易黏膜下浸润、易发生局部淋巴结转移的特点, 且容易侵犯颈部其他重要结构, 对基本生理功能(咀嚼、吞咽、呼吸等) 和言语功能产生较大破坏和影响。尽管目前下咽癌的治疗手段有手术、放疗、化疗及联合治疗方式, 下咽癌的预后仍不理想, 其平均 5 年生存率在 41.3% 左右^[2]。因此, 研究下咽癌的发生发展机制, 对今后制定下咽癌的个体化诊疗方案显得极其重要。

已有的研究表明, 在肿瘤的发生发展中, 除了蛋白质编码基因(mRNA), miRNA 也参与了调控肿瘤发生发展的重要生物学过程。它是一类长度约 21-25 个核苷酸的、短小的、不具备蛋白质编码功能的 RNA, 它们可以通过降解其靶基因及抑制翻译过程等发挥生物学作用。其已被证明参与了细胞的发育、分化、增殖及凋亡等过程^[3]。在乳腺癌^[4]、肺癌^[5]、食管癌^[6]等肿瘤中差异表达。目前与下咽癌相关的 miRNA 研究虽有报道^[7], 但以转录组为基础的表达谱筛选还是一个具有广阔前景的研究领域。

本文旨在通过转录组测序, 筛选出在下咽癌中差异表达

的 miRNA, 并分析位于这些 miRNA 上下游 20kb 以内的蛋白质编码基因, 进行生物信息学分析, 筛选出这些相关基因参与的基因通路, 为进一步研究这些 miRNA 在下咽癌中的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

选取 5 例 2014 年 1 月至 2015 年 12 月在大连大学附属中山医院耳鼻咽喉二科确诊为下咽癌并接受手术治疗的患者。每例患者均取其下咽癌组织及癌旁正常组织, 在离体 15 分钟内放入准备好的液氮罐中, 然后在半小时内移至 -80℃ 冰箱中保存至核酸提取。直接采用 DNA&RNA 提取试剂盒 (AllPrep®DNA/RNA/miRNA Universal Kit (德国 QIAGEN 公司)) 提取总 RNA, 核酸分析仪检测总 RNA 质量。采用 Illumina 公司的标准 RNA 建库及上机试剂盒进行测序 ((NextSeqTM 500, 美国 Illumina 公司))。即从每个样本中取用 0.1 至 1 微克的总 RNA 进行文库构建, 包括去除核糖体 RNA(rRNA)、合成 cDNA、富集 DNA 片段与文库测序。采用 OncoDecoder™ 系统 (基恩生物科技有限公司) 分析软件进行数据处理。该软件可进行质量控制、排序、局部重排、突变调用、小插入和删除标识、拷贝数变异分析和

覆盖计算。本研究以 $P < 0.05$ 为标准, 筛选 miRNA 及其 20 kb 以内的上下游 mRNA。

2 结果

2.1 提取的总 RNA 的质量测定结果。RNA 的质量主要检测及浓度和纯度。 A_{260}/A_{280} 比值是一种代表 RNA 纯度的检测方法, 该比值应该在 1.8-2.0 之间, 若纯度较低, 样本可能被 DNA 污染。总 RNA 浓度大于 300 ng/ul 为宜。通过表 1 可以看出, 这 5 对样本的总 RNA 质量符合要求。

表 1 提取的总 RNA 的质量检测结果

样本编号	A_{260}/A_{280} 比值	浓度 (ng/ul)
T0	1.84	710.4
T1	2.08	1793.4
T2	1.85	618.1
T3	1.90	518.4
T4	2.08	1787.2
N0	2.08	1876.2
N1	2.07	1552.4
N2	2.06	1586.3
N3	2.09	1273.9
N4	2.02	785.8

2.2 转录组测序筛选的差异表达的 miRNA 及其 20 kb 以内的 mRNA。以 $P < 0.05$ 为标准, 筛选与正常组织相比在下咽癌组织中差异表达的 miRNA, 如表 2 所示。

表 2 差异表达的 miRNA 及其 20 kb 以内的 mRNA 列表

miRNA	Log2(表达倍数)	20 kb 以内的 mRNA
MIR2117	7.53135	
MIR599	4.59439	ACHE, AGFG2, ANKS1B, CENPI, TFR2, ZIC2
MIR875	4.59439	ACHE, AGFG2, ANKS1B, CENPI, TFR2, ZIC2
MIR1185-1	4.50955	ANO4, NFKBIZ, NXPE3
MIR1185-2	4.50955	ANO4, NFKBIZ, NXPE3
MIR300	4.50955	ANO4, NFKBIZ, NXPE3
MIR376A1	4.50955	ANO4, NFKBIZ, NXPE3
MIR381HG	4.50955	ANO4, NFKBIZ, NXPE3
MIR654	4.50955	ANO4, NFKBIZ, NXPE3
MIR605	-1.36629	ERO1L, GCLC, ITIH3, ITIH4, MUSTN1, TMEM110, TMEM110-MUSTN1, KRT6C, KRT78, PTGDR, SPATA18, ZNF331
MIR22HG	-1.83113	
MIR101-1	-2.52477	
MIR3671	-2.52477	
MIR3188	-2.96338	
MIR331	-3.42666	MAL
MIR3685	-3.42666	MAL
MIR29B1	-3.44604	
MIR4305	-3.75803	BMF, ENTPD3, FCGBP, FSIP1, GPR176, MYRIP
MIR4265	-4.44492	KIAA1324, PAK3, PSRC1
MIR3157	-5.98601	OXGR1

注: 上调表达的 miRNA 共 9 个, 且上调表达倍数均大于 4.5; 下调表达的 miRNA 共 11 个, 其中下调倍数大于 2.5 的共 9 个。相关基因最多的是 MIR605。

通过表 2 可以看出, 上调表达最明显的是 MIR2117, 为 7.5315 倍。在下调表达的列表中, 下调倍数大于 2.0 倍的

有 MIR101-1, MIR3671, MIR3188, MIR331, MIR3685, MIR29B1, MIR4305, MIR4265 及 MIR3157。其中, MIR3157 下调最明显, 为 5.98601 倍。位于这些 miRNA 20 kb 以内的 mRNA 有 32 个。有 6 个 miRNA 暂未发现其 20 kb 以内存在相关 mRNA。

3 讨论

miRNA 是上世纪 80 年代末首次在线虫中被发现, 随后的研究表明, miRNA 是单链小 RNA, 虽然不具备蛋白质编码功能, 却能参与细胞的生长、发育等重要过程^[3], 尤其在肿瘤的发生、发展中起着重要的调控作用。它们可以参与转录后调控, 影响 mRNA 的翻译及稳定性。研究显示, miRNA 多通过作用于其靶基因来控制肿瘤的发生与发展, 如 MicroRNA-34a 可以通过作用于靶基因 TGIF2 来抑制胃癌的侵袭与转移^[8]。

本研究通过分析转录组测序结果, 发现了 20 个在下咽癌中差异表达的 miRNA, 其中上调倍数最高的是 MIR2117, 下调倍数最高的是 MIR3157。MIR605 的 20 kb 以内的相关基因最多。MRI2117 与 MRI3157 在肿瘤中的研究比较少, 而 MIR605 在前列腺癌^[9] 中低表达时可通过使控制生长的基因 EN2 的高表达而促进肿瘤细胞的增殖与浸润。

我们以 20 kb 为标准, 筛选出在转录组测序数据中存在差异表达的相关 mRNA。由于 miRNA 可以通过调控靶基因的表达来达到影响肿瘤发生发展的作用。而距离 miRNA 越近的 mRNA, 它们之间存在相关性的可能性就越大。这些 mRNA 可能是 miRNA 的靶基因。但是具体机制需进一步研究证实。我们的成果可以为今后的研究工作提供参考。

我们筛选出在下咽癌中差异表达的 miRNA, 并分析了其可能调控的靶基因, 为继续研究这些 miRNA 在下咽癌中的作用机制打下基础。

参考文献

- [1] Hong YM,Gan WG and Xu ZH.Significance of the expression of integrin $\beta 1$, VEGF and MVD in hypopharyngeal squamous cell carcinoma.Genetics & Molecular Research Gmr,2014,13(3):6455.
- [2] Newman JR,Connolly TM,Illing EA,Kilgore ML,Locher JL and Carroll WR.Survival trends in Hypopharyngeal cancer: A population-based review.Laryngoscope,2015,125(3):624-9.
- [3] Esquela-Kerscher A and Slack FJ.Oncomirs – microRNAs with a role in cancer.Nature Reviews Cancer,2006,6(4):259-69.
- [4] McGuire A,Brown JAL and Kerin MJ.Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring.Cancer & Metastasis Reviews,2015,34(1):145.
- [5] Feng B,Zhang K,Wang R and Chen L.Non-small-cell lung cancer and miRNAs: novel biomarkers and promising tools for treatment.Clinical Science,2015,128(10):619.
- [6] Hong L,Han Y,Zhang H,Zhao Q,Wu K and Fan D.Prognosis-related microRNAs in esophageal cancer.Expert Opinion on Biological Therapy,2014,14(4):483-9.
- [7] Nohata N,Sone Y,Hanazawa T,Fuse M,Kikkawa N,Yoshino H,Chiyomaru T,Kawakami K,Enokida H and Nakagawa M.miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma.Oncotarget,2011,2(1-2):29.
- [8] Hu Y,Pu Q,Cui B and Lin J.MicroRNA-34a inhibits tumor

(下转第 9 页)

后放入培养箱 24 h, 利用含 EDTA 胨蛋白酶消化 5 分钟, 离心收集细胞, 弃上清, 用预冷 PBS 洗两次, 加入 75% 乙醇, 加入 PI, 以 300, 目尼龙网过滤细胞, 进行细胞增值指数计算。2.8 统计分析。利用 SPSS 20.0 展开统计学处理, 使用单因素方差分析, 若 $P < 0.05$, 则差异具备统计学意义。

3 结果

3.1 转染率测定。利用荧光显微镜观察发荧光细胞, 其转染率为 86.8%。

3.2 测定干扰效率。计算相对表达量 RQ 值, 得出 RGN-homo-1035 为 $(43.52 \pm 10.64)\%$; RGN-homo-1413 为 $(8.25 \pm 1.96)\%$; RGN-homo-1681 为 $(65.58 \pm 12.69)\%$ 。干扰 48 小时后, 提取肝癌细胞内的总蛋白, 干扰效率 RGN-homo-1035 为 $(41.46 \pm 10.93)\%$; RGN-homo-1413 为 $(8.97 \pm 1.25)\%$; RGN-homo-1681 为 $(68.62 \pm 13.77)\%$ 。

3.3 MTT 检测肝癌细胞增值。检测三组肝癌细胞 OD 值, 具体信息如下表 1。

表 1 利用 MTT 法检测三组细胞不同时间点的吸光值

分组	时间段					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
空白组	1	1.56	3.12	5.63	8.87	13.08
对照组	1	1.65	2.99	5.74	8.98	12.76
实验组	1	1.77	4.64	8.85	13.96	18.55

3.4 细胞侵蚀实验。入室 2 天后, 结晶紫染色, 光镜下观察得知, 相比于对照组及空白组的穿膜细胞数量, 干扰组数量明显增加, 差别具备统计学意义 ($P < 0.05$), 空白组与对照组无显著性差异。

3.5 流式细胞仪测细胞凋亡。进行各实验组细胞收集, 加入 Annexin V-FITC 及碘化丙啶避光染色, 观察细胞凋亡率, 干扰组为 $(7.54 \pm 1.36)\%$, 高于其他两组。流式检测效果发现, 干扰组细胞凋零率为 $(45.45 \pm 11.36)\%$, 高于空白组及对照组。

3.6 测凋零相关蛋白 Bcl-2 与 Bax。通过 western-blot 法测试, 得知实验组、空白组、对照组的 Bcl-2 的相对表达量分别是

(24.33 ± 2.53) 、 (44.67 ± 2.76) 、 (47.25 ± 5.45) 。实验组的 bcl-2, 具备统计学差异 ($P < 0.05$)。测 Bax 蛋白, 计算相对表达量, 实验组、空白组、对照组 Bax 相对表达量分别为 (65.38 ± 5.46) 、 (45.13 ± 3.26) 、 (46.25 ± 5.45) 。实验组 Bax 表达明显提高。

3.7 流式细仪测细胞周期。流式检测结果得知, 实验组细胞增殖指数提高, 具备统计学差异。实验组、空白组、对照组的细胞增殖指数分别为 $(44.38 \pm 5.28)\%$ 、 $(25.45 \pm 3.89)\%$ 、 $(26.25 \pm 5.64)\%$ 。

4 讨论

RNAi 是一种基因沉默技术, 起到调节细胞内基因表达的作用。SiRNA 有效结合靶基因 mRNA 是 RNAi 的核心, 为了提升 siRNA 转染效率, 需要避免 RNA 酶受到污染, 所选用 Xfect 转染试剂不受血清感染, 得出 RGN-homo-1035 组及 RGN-homo-1681 组的干扰效率均高于 50%, 可以作为候选目标。RGN-homo-1681 组可以作为后续实验的干扰序列。SMP30 在 DNA、RNA、蛋白水平方面可以抑制大鼠肝细胞增殖, 对人肝癌细胞的增殖也有抑制作用^[3]。研究表明, 内源性 SMP30 对多种参与蛋白质代谢和信号传导的酶都具备抑制分泌的作用, SMP30 表达降低的结果导致细胞凋亡的增加, SMP30 可抑制紫外照射导致的肝癌细胞凋零, 对于生理状态下的肝癌细胞不具备调节凋亡作用。Bax/bcl-2 比值决定同源二聚体与异源二聚体的比值, 决定了细胞能否进入凋亡状态。

参考文献

- [1] 黄朋, 范升龙, 凌敏, 等. 肝癌相关抗原 SMP30 重组基因的构建、表达及分子伴侣共表达系统的探索 [J]. 生物技术通报, 2012(4):170–175.
- [2] 李月英. 小 G 蛋白 RhoA 在肿瘤细胞核内的分布及其影响因素 [D]. 江苏大学, 2011.
- [3] 滕晓英. 肝硬变组织中变异肝细胞结节的检出及其遗传学改变 [D]. 北京协和医学院, 2009.

(上接第 2 页)

- [6] 罗月婵. 血液灌流联合血液透析治疗尿毒症患者的综合护理 [J]. 护理实践与研究, 2017, 14(8):44–45.
- [7] 王淑萍. 血液透析联合血液灌流治疗尿毒症皮肤瘙痒患者的临床护理观察 [J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(4):71–73.
- [8] 魏莹. 血液灌流与血液透析联合治疗尿毒症皮肤瘙痒的护理方法 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(20):234–235.
- [9] Raine A, Cordonnier D, Ritz E. Effect of Hemodialysis Combined with Hemoperfusion on Insulin Resistance and Nutritional Status of Patients with End-Stage Diabetic Nephropathy [J]. 2015, 3(3).
- [10] 范转爱. 综合护理干预对尿毒症皮肤瘙痒患者的疗效观察 [J].

(上接第 7 页)

invasion and metastasis in gastric cancer by targeting Tgfr2 [J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(8):8921.

- [9] Zhou YJ, Yang HQ, Xia W, Cui L, Xu RF, Lu H, Xue Z, Zhang B, Tian ZN and Cao YJ. Down-regulation of miR-605 promotes the proliferation and invasion of prostate cancer cells by up-regulating EN2 [J]. Life Sciences, 2017, 190.
- [11] 高亚丽, 李艳玲, 钟健鹂. 综合护理对血液灌流串联血液透析治疗尿毒症皮肤瘙痒的影响 [J]. 当代医学, 2017, 23(5):160–161.
- [12] 董莉. 对行血液透析联合血液灌流治疗的尿毒症患者施行综合护理的效果分析 [J]. 当代医药论丛, 2016, 14(16):136–137.
- [13] 王晓丽, 聂忠, 曾健梅. 协同护理模式对维持性血液透析串联血液灌流治疗尿毒症皮肤瘙痒临床分析 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(2):160–161.
- [14] Zhi-Qiang O U, Lun L D, Xin-Lun L I, et al. Long-term clinical study of effects of hemodialysis combined with hemoperfusion on clearance of protein-bound uremic toxins in maintenance hemodialysis patients [J]. Military Medical Sciences, 2017, 32(3):78.