

肺癌组织中调控 PUMA 基因的 miRNA 筛查和 MiR-221 表达差异研究*

姜波, 王玉明, 段勇 (昆明医科大学第一附属医院, 昆明 650032)

摘要:目的 肺癌组织中调控 PUMA 基因的 miRNA 筛查并比较 MiR-221 的表达差异。方法 收集肺癌组织和肺良性病变组织作为研究对象, 利用生物学信息分析查询可能调控 PUMA 的 miRNA, 应用定制的试剂盒进行初步筛查, 并检测 miRNA-221 在两种组织中的表达情况。结果 根据生物学数据库的分析共筛选出可能调节 PUMA 的 miRNAs 有 96 个; 初步筛查结果显示有 10 种 miRNAs 在肺癌组织中表达上调。miR-221 进一步验证显示, 在肺癌组织和肺良性病变组织中表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 转移与非转移之间表达差异有统计学意义, 但与病理组织类型无关。结论 肺癌组织中与 PUMA 基因相关的 10 种 miRNAs 表达上调, 提示这些 miRNA 可能参与 PUMA 基因的表达调控及肺癌的发生发展有关。miRNA-221 在肺癌组织中表达与是否转移有关。

关键词:肺癌; PUMA 基因; MiR-221

中图分类号: R734.2; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)01-015-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.005

Study on the Differential Expression of miRNA Screening and MiR-221 Regulates Apoptosis by Targeting PUMA Gene in Lung Cancer

JIANG Bo, WANG Yu-ming, DUAN Yong

(the First Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the identification of MiR-221 regulates apoptosis by targeting PUMA in lung cancer. **Methods** The express levels of miRNAs that collected from lung cancer tissue and lung benign lesion were tested by the particular kit they made, analyzed the correlation between individual miRNA. **Results** 96 possible regulated PUMA related miRNAs had been screened through the bioinformatics database, then customized it into the special kit to test the expression with real time fluorescent PCR. The results showed that 10 types miRNAs were up expression in lung cancer tissue, miRNA-221 were selected for deep analyze. Results with rank sum test showed statistical significance ($P < 0.05$) in lung cancer and para cancer tissue. There were statistically significant differences in the expression between metastasis and nonmetastasis ($P < 0.05$), but had nothing to do with the pathological types. **Conclusion** Real time fluorescent PCR test showed several types of PUMA related miRNAs up-expressed in tissue lung, which indicate miRNA have relationship with PUMA in gene express regulation and cancer generation and development. Expression situation and clinic pathological parameters. Expression of miRNA-221 in lung cancer was associated with tumor metastasis.

Keywords: lung cancer; PUMA; MiR-221

肺癌是严重威胁人类健康和生命的恶性肿瘤之一, 2013 年全球癌症统计资料显示, 其发病率位于各种恶性肿瘤的前三位, 而死亡率居各种恶性肿瘤的首位^[1]。随着肿瘤分子生物学发展和研究的深入, 人们发现肺癌的发生发展与 PUMA 有关。PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) 是 bcl-2 家族 Bcl3-only 亚家族中的成员, 是 p53 介导的下游促凋亡基因, 在细胞凋亡中起着十分重要的作用。近年来, 有研究^[2,3]指出 PUMA 是某些 miRNA 调控的靶基因, 并且验证了 miRNA 与 PUMA 之间的调控关系, 但是目前 miRNAs 在肺癌中调控 PUMA 基因的相关研究鲜见, 我们利用分子生物学技术, 在肺癌组织中筛查可能对 PUMA 基因有调控作用的 microRNA 研究, 并比较筛

查出的 miRNA-221 在癌组织和癌旁组织的表达差异, 为肺癌患者的预后和治疗提供指导。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取 2010 年 1 月~2014 年 6 月来我院治疗的肺癌患者 46 例, 手术中留取癌组织作为研究组, 并选取同期肺良性病变手术切除的组织标本 46 例作为对照组。所有组织标本在离体 0.5 h 内分装于不同的冻存管中, 置于 -80°C 冰箱中保存备用。纳入标准: 年龄 18~70 岁; 符合 WHO1999 年肺癌病理学诊断和 YNM 分类标准 (对照组患者为良性肺疾病); 思维正常, 具有一定的沟通能力; 术前均未放疗和化疗。排除标准: 已发生转移者、严重慢性疾病者、精神病者、配合不佳者等。

* 作者简介: 姜波 (1982-), 女, 硕士, 主管检验师, 研究方向: 生物化学与分子生物学, Tel: 18687114001, E-mail: 0516base@163.com。
通讯作者: 王玉明, 男, 主任医师, E-mail: wangym992007@163.com。

1.2 试剂和仪器 miRNeasy Mini Kit, miScript Reverse Transcription Kit, miScript SYBR Green PCR Kit(美国 Qiagen 公司);人 miRNAs 核酸扩增(PCR)荧光筛查试剂盒(吉玛生物技术有限公司);实时荧光定量 PCR 扩增仪 7300(美国 ABI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 调控 PUMA 的 miRNA 的预测:利用生物学信息分析方法(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)查询所有可能的以 PUMA 为靶基因的 miRNA,并通过四个靶点预测软件(pictar, targetscan, raiRanda, miRBas)进一步挑选,至少出现在 3 个软件中的基因作为其可能的靶基因,尽可能减少假阳性率。最后挑选出 96 种可能调控 PUMA 表达的 miRNA,并定制成实时荧光定量 PCR 的筛查试剂盒。

1.3.2 miRNA 的初筛

1.3.2.1 总 RNA 的提取:从超低温冰箱中取出组织并制备匀浆,离心后用移液器小心吸取上清液 400 μ l 至新的经过 DEPC 处理过的 EP 管中,每管加入等体积预先置于 -20°C 冰箱预冷的异丙醇,充分混匀, 4°C 下 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清液,加入 70 μ l 的酒精(DEPC 水配制)500 μ l,颠倒混匀, 4°C 下 12 000 r/min 离心 5 min;离心后弃上清,使酒精充分挥发后加入 DEPC 水 50~100 μ l,溶解白色沉淀,备用。紫外分光光度计测定 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 光密度值及其浓度,所有样品的光密度比值均在 2.0 左右。

1.3.2.2 总 RNA 加尾及逆转录:按照筛查试剂盒说明书进行操作,把 46 个肺癌组织标本和 46 个肺良性病变组织提取的 RNA 分别合并成一份标本,备用。PolyA 加尾:取灭菌 0.2 ml EP 管,按以下要求配制反应体系(一个反应):反应液 I 4 μ l, PolyA 酶 1 μ l,模板 RNA 15 μ l,总反应体积 20 μ l。反应条件:置 37°C 20 min,随后立即将反应管放入冰中。逆转录反应:取灭菌 0.2 ml EP 管,按以下要求配制反应体系(一个反应):反应液 II

10.2 μ l,已加尾 RNA 4 μ l,总反应体积 14.2 μ l。反应条件:置 75°C 5 min,随后将反应管置于冰上继续加入下一个反应体系(一个反应):反应液 III 4 μ l,逆转录酶 1.8 μ l,总反应体积 20 μ l。反应条件:混匀离心后置 37°C 60 min, 95°C 3 min。

1.3.2.3 Real-time PCR 检测:PCR 反应条件为: 95°C 2 min 预变性,然后按 90°C 8s, 60°C 30s, 60°C 时检测荧光值,共进行 40 个循环。ABI Prism 7300 型荧光定量 PCR 仪采集待测基因和内参照基因 18S 扩增各循环荧光信号。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来表示基因表达的相对数值,对表达上调的 miRNA 重复进行检测。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 for windows 软件包,运用两独立样本的秩和检验分析方法进行数据统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 microRNA 生物信息学网站查询情况 利用生物信息学网站 <http://www.microrna.org/microrna/home.do> 查询到以 PUMA 为靶基因的 miRNA 有 96 种,结果见表 1。

表 1 调控 PUMA 的可能 miRNA

18a	24a	27a	27b	29a	29b
29c	125-5p	125b	144	148a	149
152	198	199a-5p	199b-5p	221	222
296-5p	361-3p	146-3p	148b	220b	323-5p
324-3p	326	328	339-3p	345	423-5p
423-3p	448	483-3p	484	485-5p	493
494	503	509-3p	513-3p	520-5p	597
600	608	622	625	18s	U6
634	638	642	647	654-5p	659
661	663	664	665	523-3p	541
548c-3p	579	588	675b	744	760
765	766	874	886-3p	887	939
940	1184	1200	1207-5p	1207-3p	1224-3p
1225-3p	1226	1233	1234	1236	1237
1247	1260	1266	1289	1291	1292
1294	1300	1301	1827	18s	U6

2.2 Real-time PCR 检测结果 见图 1,图 2。

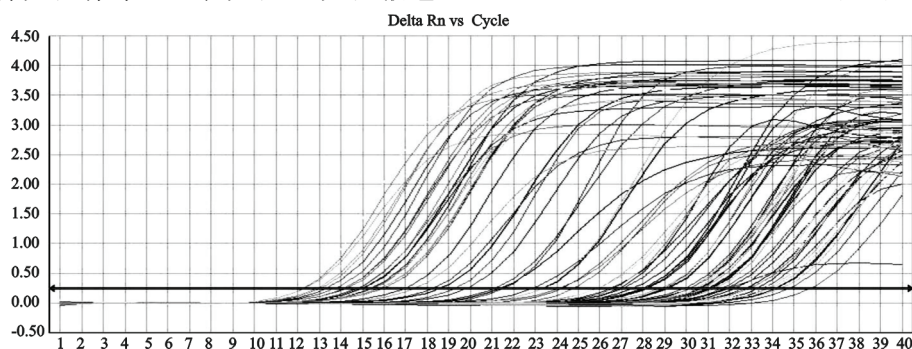


图 1 实时荧光定量 PCR 扩增结果

扩增曲线中可看到“S”型扩增曲线,表明扩增成功,有足够的 PCR 产物量。

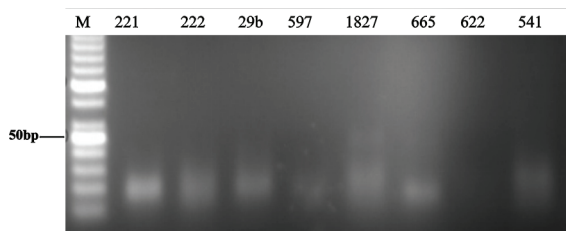


图2 实验组部分凝胶电泳图

PCR 产物进行 2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳,使用 Bio-Rad 紫外凝胶成像系统采集图像,验证扩增的有效性。

2.3 各 miRNA 表达情况的数据分析 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量分析方法。

$$F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$\Delta\Delta Ct = (\text{研究组目的 miRNA 平均 Ct 值} - \text{样品内参基因平均 Ct 值}) - (\text{对照组目的 miRNA 平均 Ct 值} - \text{对照内参基因平均 Ct 值})$

每个混样重复检测 3 次,首先计算各检测指标的平均 Ct 值,出现离群值则剔除,然后按照上述公式进行计算相应的 F 值,结果显示有 10 种 miRNA 的表达上调,分别为: miRNA-221, miRNA-222, miRNA-29b, miRNA-423-5p, miRNA-597, miRNA-1827, miRNA-665, miRNA-654-5p, miRNA-541 和 miRNA-760。

2.4 miRNA-221 在肺癌和肺良性病变组织中表达差异性比较 见表 2。

表2 肺癌组织中表达上调的 miRNA 平均 Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)

miRNA	肺癌组织	肺良性病变组织
miRNA-221	19.08±0.78	25.83±4.04
miRNA-222	24.36±1.64	26.45±0.61
miRNA-29b	30.71±3.39	32.36±2.47
miRNA-423-5p	28.02±0.67	35.99±0.91
miRNA-597	27.20±5.04	33.45±2.07
miRNA-1827	26.35±0.92	29.66±1.23
miRNA-665	23.87±0.82	25.88±1.04
miRNA-654-5p	25.37±0.63	28.96±0.89
miRNA-541	23.81±0.68	25.96±0.74
miRNA-760	28.36±0.86	31.74±0.96
U6	17.10±0.72	17.43±0.89

本研究挑选了 20 例肺癌组织和肺良性病变组织来进一步研究 miRNA-221 的表达情况,研究以 U6 作为内参,采用荧光定量分析方法,计算样本 Ct 值与内参 Ct 值的比值。因各组数据呈非正态

分布,故选用非参数统计学方法处理,该资料适合用多样本比较的秩和检验。与肺良性病变组织(Ct 比值 1.32~1.93, Median 1.57)相比,肺癌组织(Ct 比值 1.54~2.19, Median 1.91)中 miRNA 的表达均是上调的,miRNA221 在研究组和对照组中的表达差异具有统计学意义($P < 0.05$),结果与张春智等^[3]在神经胶质细胞瘤中的研究一致。

20 例肺癌组织中鳞癌 12 例,腺癌 8 例,miRNA-221 在两种不同病理类型肺癌组织中表达均上调,但是表达无明显差异($P > 0.5$)。经回顾性病例资料分析,实验组肺癌组织中 15 例发生转移,miRNA-221 表达明显上调,与未发生转移的 5 例相比差异有统计学意义($P < 0.5$)。

2.5 目的序列测序分析 见图 3、图 4。测序分析结果与基因 Bank 进行比对分析,结果与数据库结果一致。

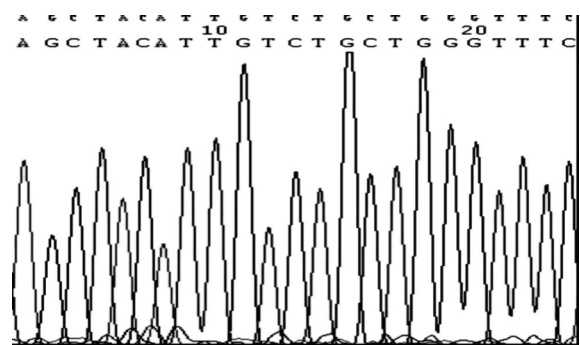


图3 miRNA221 测序峰值图

3 讨论 在我国,肺癌病死率正以每年 4.5% 的速度增长,农村上升速度高达 10%^[4],仅 2005 年就约有 50 万新发肺癌病例,其中男性约 33 万,女性约 17 万^[5]。近年来,随着医学技术发展和研究的深入,肺癌发生发展的机制在蛋白和基因水平上部分得到阐明^[6],针对肺癌的基因治疗在过去 10 年取得了一定的进展,但是肺癌的 5 年生存率并没有得到明显的改善(80%~85%)。主要原因可能是肺癌的发生发展是一个多因素作用、多基因参与、多阶段形成的复杂演进过程,不仅涉及到癌基因的激活和抑癌基因的失活,而且和凋亡失衡有着密切的关系。PUMA 是 p53 介导的下游促凋亡基因,在介导细胞凋亡中起着十分重要的作用。Gu 等^[7]在对 p53 腺病毒介导的肺癌肿瘤细胞的研究中发现,在肺癌细胞凋亡过程中,PUMA 的表达是显著上升的,然而,王玉明等^[8]对肺癌的研究提示,肺癌组织中 PUMA 基因没有发生有意义的突变和 BH-3 结构域的变异,PUMA mRNA 和蛋白表达没有明显的变化,非小细胞肺癌的发生发展与 PUMA mRNA 的表达量可能无直接关联。PU-

MA 在细胞凋亡中的作用是肯定的,而要使 PUMA 在实体组织中发挥促凋亡作用,就需要激活 PUMA 的过表达。因此需要寻找能导致 PUMA 激活的 DNA 元件、转录因子及其它无毒性小分子物质,不仅可以利用这些元件和因子激活 PUMA 在肿瘤细胞中的高表达,而且可以利用这些元件和因子特异性的阻断 PUMA 在放化疗损伤的

正常细胞内的表达,这样可能在肺癌的诊断、治疗及预后监测中发挥重要的作用^[9,10]。一类新型的非编码小分子 RNA (microRNA) 的出现,为人们的设想提供了理论依据。microRNA 是一类长约 19~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA,通过与靶 mRNA 的 3'UTR 结合,抑制 mRNA 翻译或影响其稳定性而发挥作用^[11,12]。

```
>gi|29125731|emb|AJ550425.1| G Homo sapiens microRNA mir-221
Length=23

GENE ID: 407006 MIR221 | microRNA 221 [Homo sapiens] (Over 10 PubMed links)

Score = 42.8 bits (46), Expect = 0.016
Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 2 AGCTACATTGCTGCTGGGTTTC 24
      |||
Sbjct 1 AGCTACATTGCTGCTGGGTTTC 23
```

图4 miRNA-221 测序结果与 gene bank 比对分析

研究 miRNAs 在正常组织和肿瘤组织中表达的差异,有助于阐明与人类肿瘤相关的 miRNAs 的作用机制。自从 Calin 等首次把 miRNAs 的表达变化和特定肿瘤的发生相联系以后,目前已经有许多关于肺癌中 miRNA 表达差异的比较研究,Volinia 等^[13]对 123 例肺癌组织与 123 例正常肺组织进行了研究,发现有 38 种 microRNA 存在表达差异,如 let-7 家族,miR-16-2, miR-21, miR-191, miR-17-5p 以及 miR-155 等。Rajeev 等^[14]对 104 例非小细胞肺癌组织与正常肺组织研究也发现,有 43 种 microRNA 有明显的表达差异,15 种 microRNA 发生上调及 28 种 microRNA 发生下调。

本课题利用生物信息学网站 <http://www.microrna.org/microranna/home.do> 筛选在肺癌组织中和对照非肿瘤组织中表达有差异的 miRNAs,进一步通过实时荧光定量 PCR 技术检测 miRNAs 在肺癌组织和非肿瘤对照组织中的表达情况,同时利用现代细胞和分子生物学技术,对表达产物进行克隆重组测序,验证其与目标序列的符合性,为进一步对肺癌中调控 PUMA 基因的功能研究提供科学的依据。本研究最后挑选出 96 种可以调控 PUMA 表达的 miRNA,然后利用实时荧光定量 PCR 检测 96 种 miRNA 的表达情况。结果显示,在筛查出的 96 种 miRNA 中,有 10 种 miRNA 表达显著上调。进一步选取肺癌组织和肺良性病变组织各 20 例对 miRNA-221 进行检测,结果显示在肺癌组织和肺良性病变组织中表达差异具有统计学意义 ($P <$

0.05),经过回顾性病例资料分析,进一步对 miRNA-221 在不同组织病理类型的肺癌组织中的表达情况进行统计分析,显示其在鳞癌和腺癌中表达无明显差异,而有肿瘤转移的病例和无转移病例相比较,miRNA-221 的表达具有差异性,可能和 miRNA 抑制原发病灶中的抑癌基因表达有关。结果为后续实验中 miRNA 和其靶基因在肺癌中的相互作用的研究奠定基础。研究结果与张春智等^[3]在神经胶质细胞瘤中的研究一致。他们认为 PUMA 是 miR-221 的靶基因,miR-221 直接作用于 PUMA 的 3'UTR 端,调节细胞凋亡,并且 PUMA 的表达和 miR-221 的表达呈负相关。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11-30.
- [2] Zhang CZ, Zhang JX, Zhang AL, et al. MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma[J]. Molecular Cancer, 2010(9):229.
- [3] 张春智, 康春生, 杨卫东, 等. 共抑制 miR-221/222 表达上调 PUMA 促进胶质瘤 U251 细胞凋亡的体外研究[J]. 中华神经外科杂志, 2010, 26(8):752-755.
Zhang CZ, Kang CS, Yang WD, et al. Co-suppressed mir-221/222 expression increase U251 glioblastoma cell apoptosis through up-regulating PUMA[J]. Chin J Neurosurg, 2010, 26(8):752-755.
- [4] 杨玲, 李连弟, 陈育德, 等. 中国肺癌死亡趋势分析及发病、死亡的估计与预测[J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(4):274-278.
Yang L, Li LD, Chen YD, et al. Mortality time trends and the incidence and mortality estimation and pro-

- jection for lung cancer in China[J]. Chin J Lung Cancer, 2005, 8(4): 274-278.
- [5] Yang L, Parkin DM, Ferlay J, et al. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(1): 243-250.
- [6] Meyerson M, Carbone D. Genomic and proteomic profiling of lung cancers: lung cancer classification in the age of targeted therapy[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(14): 3219-3226.
- [7] Gu J, Zhang L, Swisher SG, et al. Induction of p53 regulated genes in lung cancer cells: implications of the mechanism for adenoviral p53 mediated apoptosis [J]. Oncogene, 2004, 23(6): 1300-1307.
- [8] 王玉明, 金克炜, 李 娅, 等. 非小细胞肺癌中 PUMA 基因外显子突变和 mRNA 表达的分析[J]. 中华病理学杂志, 2009, 38(2): 121-122.
Wang YM, Jin KW, Li Y, et al. Gene mutation and mRNA expression of PUMA gene in non-small cell lung cancer[J]. Chinese Journal of Pathology, 2009, 38(2): 121-122.
- [9] 王 生, 王启鸣, 王慧娟, 等. microRNA-31 在原发性肺癌组织中的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(3): 281-284.
Wang S, Wang QM, Wang HJ, et al. Expression and clinical significance of microRNA-31 in primary lung cancer tumor tissues[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2012, 39(3): 281-284.
- [10] Liu X, Sempere LF, Ouyang H, et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(4): 1298-1309.
- [11] Xi SC, Yang MC, Tao YG, et al. Cigarette smoke induces C/EBP-beta-mediated activation of miR-31 in normal human respiratory epithelia and lung cancer cells[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13764.
- [12] Du L, Pertsemlidis A. MicroRNAs and lung cancer: tumors and 22-mers[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2010, 29(1): 109-122.
- [13] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [14] Kumar R, Xi Y. MicroRNA, epigenetic machinery and lung cancer[J]. Thoracic Cancer, 2011, 2(2): 35-44.