

乳腺癌细胞与乳腺上皮细胞 MicroRNAs 表达谱的 差异性分析

张 辉, 苏式兵, 周钱梅, 陆亦宇

Differential expression profiles of microRNAs between breast cancer cells
and mammary epithelial cells

Hui Zhang, Shi-Bing Su, Qian-Mei Zhou and Yi-Yu Lu

上海中医药大学
中医复杂系统研究中心,
上海 201203

Research Center for Traditional
Chinese Medicine Complexity System,
Shanghai University of Traditional
Chinese Medicine,
Shanghai, 201203,
P. R. China

通讯作者: 苏式兵

Correspondence to: Shi-Bing Su
Tel.: 86.21.51323013
Fax: 86.21.51323013
Email: shibingsu@yahoo.com

基金项目: 上海高校选拔培养优秀青
年教师科研专项基金项目 (No. Szy-
07031); 上海市教育委员会科研创新
项目 (No. 09YZ122, No. 08YZ54);
上海市教委 E-研究院中医内科建设
计划基金资助项目 (No. E03008)

Grants: Shanghai Municipal Special-
purpose Foundation for Outstanding
Young Teachers in Universities and
Colleges (No. Szy-07031); Scientific
Innovation Research Foundation of
Shanghai Municipal Education
Committee (No. 09YZ122, No.
08YZ54); Foundation from E-Institutes
of Shanghai Municipal Education
Committee (No. E03008)

收稿日期: 2008-09-01
修回日期: 2009-01-18

[Abstract] Background and Objective: Aberrant expression of microRNAs (miRNAs) is involved in the development of breast cancer. This study was to explore differential expression of miRNAs between breast cancer cells and mammary epithelial cells, and to predict potential targets of the differentially expressed miRNAs. Methods: Human breast cancer MCF-7 cells and normal human mammary epithelial HBL-100 cells were cultured. The total RNA was isolated and examined. The expression profiles of miRNAs in MCF-7 and HBL-100 cells were detected with a miRNA microarray chip and compared. Array results were confirmed by real-time polymerase chain reaction (PCR). Potential mRNA targets were predicted by MiRanda, TargetScan, PicTar, and DIANA-microT software. Results: The purification of total RNA from MCF-7 and HBL-100 cells was relatively high. According to a microarray-based screening, 173 breast cancer-related miRNAs were identified. Of the 173 miRNAs, 113 were up-regulated and 60 were down-regulated in MCF-7 cells ($P < 0.01$). Real-time PCR showed that mir-18a and mir-195 were highly expressed in MCF-7 cells. Sixty-eight potential target genes of mir-200b were predicted by informatics analysis. Conclusions: The miRNA expression profiles of breast cancer cells and mammary epithelial cells are obtained. Some miRNAs may be involved in the pathogenesis of breast cancer by regulating their target genes.

Key words: breast neoplasm, MCF-7 cell, microRNA, expression profile, differential analysis

【摘要】背景与目的: 已有研究表明, MicroRNAs (miRNAs) 的异常表达参与了乳腺癌的发生和发展, 常起到抑癌基因或癌基因作用。本研究旨在探讨乳腺癌细胞与乳腺上皮细胞 miRNAs 的差异性表达, 并预测异常表达的 miRNAs 可能调控的靶基因。方法: 培养乳腺癌细胞株 MCF-7 和正常乳腺上皮细胞株 HBL-100, 分别提取细胞总 RNA, 并进行质检; 利用 miRNAs 芯片技术, 检测乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞 miRNAs 的表达, 对其表达谱进行差异性分析; 采用实时定量 RT-PCR 进行验证; 运用 MiRanda、TargetScan、PicTar、DIANA-microT 软件预测 miRNAs 可能调控的靶基因。结果: 从 MCF-7 细胞与 HBL-100 细胞提取到的总 RNA 纯度较高, 其 A_{260}/A_{280} 为 1.90, A_{260}/A_{230} 为 2.0; 琼脂糖凝胶实验结果显示总 RNA 完整性好。通过 miRNAs 表达谱的差异性分析, 获得 173 个与乳腺癌相关的 miRNAs, 其中 113 个表达上调, 60 个表达下调; 实时定量 PCR 检测到 mir-18a 和 mir-195 在 MCF-7 细胞中高表达; 对乳腺癌细胞显著异常表达的 mir-200b 进行信息学分析, 共筛选出 68 个靶基因。结论: 获得了乳腺癌细胞与乳腺上皮细胞 miRNAs 的差异表达谱, 其中部分 miRNAs 可能通过调控其靶基因而参与乳腺癌的发病机制。

关键词: 乳腺肿瘤; MCF-7 细胞; miRNA; 表达谱; 差异性分析

中图分类号: R394-33; R394.3; R737.9 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2009)05-0493-07

MicroRNAs(miRNAs)是一类非编码的单链小分子 RNAs,长度为 20~24 个核苷酸,由高等真核生物基因组编码,在细胞核与细胞质中由 RNA 聚合酶通过序列加工而成^[1]。与靶基因 mRNA 通过碱基配对方式引导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)降解 mRNA 或阻碍其翻译,在转录后水平调节基因的表达。目前人体中已发现 695 个 miRNAs 分子(miRBase release 12.0),预测总数约有 1 000 种,占人体基因总数的 2%~3%,调控人体近三分之一基因的功能^[2-4]。这些研究结果表明 miRNA 分子是基因调控网络中的核心成分。

肿瘤的基本特征为细胞的失控性生长,其发生为一系列分子变化的结果,是肿瘤相关基因表达失常或肿瘤抑制基因失活所致。以往一直认为编码蛋白的癌基因和抑癌基因是肿瘤发生的原因^[5,6]。而随着非编码 RNA 的发现,传统观念正被改变。非编码 RNA 中的成员 miRNA 对于肿瘤的形成起着重要的调控作用。目前,大多数 miRNA 的功能尚不明确,但近期的研究表明,miRNA 异常表达参与了乳腺癌的发生和发展^[7,8],并与肿瘤相关的信号转导通路有密切联系^[9]。

本研究主要通过 miRNA 表达谱芯片技术,检测乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞中 miRNAs 表达的不同,筛选出与乳腺癌相关的 miRNAs,并预测异常表达的 miRNAs 可能调控的靶基因,为进一步深入研究 miRNAs 在乳腺癌发生和发展中的作用提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 miRNA 微阵列、细胞株和主要试剂

miRNA 表达谱芯片采用 μ Paraflo™ 微流体芯片,由美国 LC Sciences 生物技术公司提供,并由该公司完成检测。miRNA 探针序列信息来自于 Sanger miRBase Release 10.0 版本数据库,包含针对人设计的 711 个探针,每个探针重复 5 次。人乳腺癌细胞株 MCF-7 和正常乳腺上皮细胞株 HBL-100 购自 ATCC 公司;RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 PAA 公司;胰蛋白酶购

自 Amresco 公司;Trizol 试剂、DEPC 购自 BioDev;TaqMan® MicroRNA 检测试剂盒及 PCR 反应试剂盒为 ABI 公司产品。常规生物化学试剂购自上海鼎国生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 MCF-7 细胞和 HBL-100 细胞用 RPMI-1640 培养液(含 10%胎牛血清及 100 u/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,每 3 d 更换培养基,0.25%胰蛋白酶消化传代。取对数生长期的细胞用于后继实验。

1.2.2 样品总 RNA 的提取 取 5×10^6 个细胞样品,冷 PBS 清洗细胞 2 次,吸去 PBS 后用 Trizol 试剂一步法提取总 RNA。将 Trizol 试剂收集的细胞样品转入 1.5 mL 离心管中,12 000 $\times g$ 离心 10 min,收集上清至新离心管中,室温放置 5 min,加入 0.2 mL 氯仿,涡旋 15~30 s,室温放置 3 min,12 000 $\times g$ 离心 15 min,收集上清,加两倍上清体积的异丙醇,-20℃ 沉淀过夜,12 000 $\times g$ 离心 15 min,去上清,加 1 mL 含有 DEPC 水的 75%乙醇(预冷),7 500 $\times g$ 离心 5 min,倒尽液体,轻微离心,除去管底残液,自然干燥 3 min,沉淀重溶于 50 μ L DEPC·H₂O。

1.2.3 样品总 RNA 的质量检测 用紫外分光光度计分别测定波长为 230 nm、260 nm、280 nm 处吸光度值(A 值),确定总 RNA 样品的纯度和浓度;甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 样品中 28S 和 18S 的比例,以评估其纯度及完整性。

1.2.4 小分子 RNA 样品的分离与荧光标记 5 μ g 总 RNA 样品通过 YM-100 (Millipore)微离心过滤柱得到片段小于 300 nt 的小 RNA。Poly(A)聚合酶在分离到的小 RNA 3'端加上 poly(A)尾巴,再将一个寡聚核苷酸标记与这个 poly(A)尾巴连接,用于后续的荧光标记。在双样品实验中,用两个不同的标记物来标记两个 RNA 样品。

1.2.5 微阵列杂交及芯片扫描 杂交反应通过微循环泵杂交仪器在 μ Paraflo™ 微流体芯片上过夜。杂交使用含有 25%甲酰胺的 100 μ L 6 $\times$ SSPE 缓冲液(0.90 mol/L NaCl, 60 mmol/L Na₂HPO₄, 6 mmol/L EDTA, pH 6.8),杂交温度 34℃。杂交检测使用 Cy3 和 Cy5 特异性荧光标记、激光扫描仪(GenePix 4000B, Molecular Device)采集杂交图像、Array-Pro (Media Cybernetics)软件对杂交图像进行数字化转

换。

1.2.6 芯片数据处理及分析 数据处理和分析首先是扣除背景,计算重复点平均值和标准偏差,然后通过 LOWESS (Locally-Weighted Regression) 过滤,之后进行标准化。对于双色标记实验,将两种检测信号的比值进行对数($\log_2$)转换并计算 t -检验的 P 值。以 P 值 <0.01 定义有意义差异性表达。显著差异基因筛选标准:模型组信号和对照组信号比值的对数值 ≥ 1 或 ≤ -1 ,对数值为正表示上调,对数值为负表示下调。

1.2.7 实时定量 PCR 验证芯片结果 采用实时定量 PCR 技术检测本实验中筛选的乳腺癌相关 miRNAs 的表达。应用 TaqMan™ MicroRNA 检测试剂盒,具体按说明书操作。分别取 2 种细胞纯化后的总 RNA 各 50 ng 进行反转录,反应体系包括:50 ng 总 RNA,1×RT 缓冲液, dNTPs (0.375 mmol/L), 5 U/ μ L 反转录酶,50 nmol/L 茎环 RT 引物和 0.38 U/ μ L RNA 酶抑制剂。U6 作为内参照。反转录反应程序:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。实时定量 PCR 反应体系 (20 μ L):1.33 μ L 反转录产物,1 μ L 20×TaqMan miRNA 检测试剂盒混合液,10 μ L TaqMan 2×通用 PCR 反应混合液。采用罗氏 LightCycler 1.5 荧光定量 PCR 仪进行检测和数据分析。实验重复 3 次。

1.2.8 生物信息学分析 运用 MiRanda、TargetScan、PicTar、DIANA-microT 软件预测差异表达 miRNA 的靶基因,取至少 3 个软件预测到的基因作为靶基因。各软件的具体网址如下: MiRanda, <http://www.microrna.org> 和 <http://microrna.sanger.ac.uk/>; PicTar, <http://pictar.bio.nyu.edu/>; TargetScan, <http://www.targetscan.org/>; DIANA-microT, <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/>。

2 结 果

2.1 miRNA 芯片样品总 RNA 的质量鉴定结果

从 MCF-7 与 HBL-100 细胞中提取总 RNA,用紫外分光光度计测量 A 值,结果显示 $A_{260}/A_{280} \geq 1.9$, $A_{260}/A_{230} > 2.0$,表明所提取的总 RNA 纯度较高,没有蛋白质和 DNA 残留。

RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果条带清晰,且 28S 条带亮度约是 18S 的 2 倍(图 1),表明所提取的总 RNA 完整性好,无降解。质量鉴定结果表明总 RNA 样品符合 miRNA 微阵列的质量要求,可以进行芯片实验。

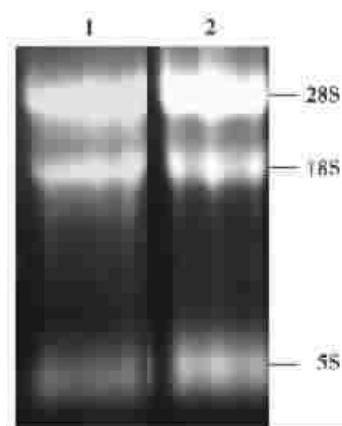


图 1 RNA 变性琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Electrophoresis of total RNA

Lane 1: MCF-7 cells; lane 2: HBL-100 cells.

2.2 乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞差异表达 miRNA

通过对 MCF-7 细胞与 HBL-100 细胞 miRNAs 表达谱数据进行分析,以 HBL-100 细胞为对照组,获得 173 个与乳腺癌相关 miRNAs ($P<0.01$),113 个表达上调,60 个表达下调。其中,miRNA 分子表达显著上调的为 82 个(表 1),显著下调的为 50 个(表 2)。

2.3 实时定量 RT-PCR 验证芯片结果

采用实时定量 RT-PCR 方法检测 mir-195 和 mir-18a 的表达,并采用 U6 进行归一化。将定量 PCR 结果与芯片检测结果进行比较,芯片结果显示:以 HBL-100 细胞为对照组,在 MCF-7 细胞中, mir-195 与 mir-18a 过表达倍数为 2.86 和 5.87;实时定量 PCR 结果显示:以 HBL-100 细胞为对照组,在 MCF-7 细胞中, mir-195 与 mir-18a 过表达倍数分别为 3.63 ± 0.10 和 7.06 ± 0.48 。miRNA 芯片与定量 RCP 结果具有一致的趋势,表明芯片结果具有真实可靠性。

2.4 mir-200b 靶基因预测结果

选择乳腺癌细胞中显著上调的 mir-200b 进行靶基因的预测。通过四个靶点预测软件(MiRanda、TargetScan、PicTar、DIANA-microT)预测 mir-200b 可能的靶基因。为了减少假阳性率,只挑选至少出现在 3 个软件中的基因作为其可能的靶基因,结果共筛选出 68 个基因(表 3)。

3 讨 论

目前快速有效鉴定 miRNAs 表达的方法是检

表 1 MCF-7 乳腺癌细胞中显著上调的 miRNAs
Table 1 Remarkably up-regulated miRNAs in MCF-7 cells

miRNA	Expression level		log ₂ (MCF-7/HBL-100)	miRNA	Expression level		log ₂ (MCF-7/HBL-100)
	MCF-7 cells	HBL-100 cells			MCF-7 cells	HBL-100 cells	
has-miR-200b	18 994	20	9.90	hsa-miR-20a	12 270	2 629	2.22
hsa-miR-620	40	0	9.12	hsa-miR-122	81	18	2.19
hsa-miR-200a	1 311	5	8.17	hsa-miR-374a	181	41	2.13
hsa-miR-429	870	4	7.89	hsa-miR-17	9 685	2 220	2.13
hsa-miR-532-5p	1 239	14	6.47	hsa-miR-106a	9 542	2 219	2.10
hsa-miR-200b *	455	9	5.66	hsa-miR-29c	6 374	1 512	2.08
hsa-miR-660	412	11	5.19	hsa-miR-590-5p	31	7	2.07
hsa-miR-362-5p	465	13	5.15	hsa-miR-378	222	55	2.01
hsa-miR-186 *	239	7	5.00	hsa-miR-132	1 554	443	1.81
hsa-miR-542-5p	191	6	4.91	hsa-miR-101	76	22	1.79
hsa-miR-200c	159	7	4.60	hsa-miR-212	79	23	1.77
hsa-miR-362-3p	156	8	4.36	hsa-miR-92a-1 *	94	28	1.76
hsa-miR-34a	654	40	4.02	hsa-miR-421	274	83	1.72
hsa-miR-548a-5p	18	1	3.98	hsa-miR-24-2 *	197	61	1.70
hsa-miR-500 *	217	14	3.94	hsa-miR-193a-5p	740	236	1.65
hsa-miR-138	232	15	3.94	hsa-miR-181a	3 025	978	1.63
hsa-miR-200a *	154	11	3.83	hsa-miR-181c	140	45	1.62
hsa-miR-365	517	41	3.65	hsa-miR-324-5p	449	148	1.60
hsa-miR-501-5p	131	11	3.55	hsa-miR-596	26	9	1.59
hsa-miR-502-3p	130	11	3.50	hsa-miR-29b-1 *	1 480	494	1.58
hsa-miR-29b	2 400	219	3.45	hsa-miR-137	4 499	1 526	1.56
hsa-miR-532-3p	118	11	3.45	hsa-miR-425	2 446	849	1.53
hsa-miR-193b *	340	33	3.36	hsa-miR-183 *	84	29	1.52
hsa-miR-20b	5 899	651	3.18	hsa-miR-195	1 364	477	1.51
hsa-miR-30a *	4 841	560	3.11	hsa-miR-10b	4 460	1 635	1.45
hsa-miR-30e *	2 324	285	3.03	hsa-miR-186	169	63	1.42
hsa-miR-30e	2 250	277	3.02	hsa-miR-563	24	9	1.40
hsa-miR-30c-2 *	205	27	2.90	hsa-miR-26b	15 782	6 242	1.34
hsa-miR-19a	88	12	2.87	hsa-miR-616	33	13	1.33
hsa-miR-19b	2 722	399	2.77	hsa-miR-125a-3p	97	39	1.30
hsa-miR-502-5p	70	10	2.76	hsa-miR-181b	2 392	976	1.29
hsa-miR-550 *	140	22	2.68	hsa-miR-92b	10 613	4 334	1.29
hsa-miR-130a	2 484	416	2.58	hsa-miR-589 *	35	14	1.27
hsa-miR-340	161	27	2.56	hsa-miR-484	321	134	1.26
hsa-miR-18a	1 009	172	2.55	hsa-miR-744	321	143	1.17
hsa-miR-500	84	15	2.52	hsa-miR-30a	7 215	3 253	1.15
hsa-miR-18b	331	60	2.46	hsa-miR-505 *	205	93	1.14
hsa-miR-15b *	275	53	2.38	hsa-miR-93	3 578	1 710	1.07
hsa-miR-331-3p	503	98	2.37	hsa-miR-140-3p	760	370	1.04
hsa-miR-23a *	649	134	2.27	hsa-miR-27a	10 496	5 123	1.03
hsa-miR-196b	97	21	2.23	hsa-miR-877	476	234	1.02

测 miRNAs 表达谱, 该方法可以更好地了解 miRNAs 的整体表达情况。我们以 miRNA 芯片为平台, 检测了乳腺癌细胞 MCF-7 与正常乳腺上皮细胞 HBL-100 的 miRNAs 表达谱, 发现两者之间

存在 173 个差异表达的 miRNAs, 其中 132 个 miRNAs 为明显差异表达, 包括 82 个表达上调的 miRNAs, 50 个表达下调的 miRNAs。

本研究采用的是美国 LC Sciences 生物技术公

表 2 MCF-7 乳腺癌细胞中显著下调的 miRNAs
Table 2 Remarkably down-regulated miRNAs in MCF-7 cells

miRNA	Expression level		log ₂ (MCF-7/HBL-100)	miRNA	Expression level		log ₂ (MCF-7/HBL-100)
	MCF-7 cells	HBL-100 cells			MCF-7 cells	HBL-100 cells	
hsa-miR-222	9 707	20 496	-1.08	hsa-miR-483-5p	128	1 551	-3.59
hsa-miR-221	9 175	20 336	-1.15	hsa-miR-125b	1 416	18 351	-3.70
hsa-miR-92b *	22	53	-1.26	hsa-miR-196a	393	5 292	-3.75
hsa-miR-346	17	41	-1.27	hsa-miR-758	8	115	-3.92
hsa-miR-210	174	422	-1.28	hsa-miR-654-5p	30	640	-4.43
hsa-miR-584	109	289	-1.41	hsa-miR-379 *	22	556	-4.67
hsa-miR-923	8 786	23 800	-1.44	hsa-miR-149 *	246	6 776	-4.79
hsa-miR-31	2 114	5 806	-1.46	hsa-miR-323-3p	10	290	-4.88
hsa-miR-936	86	239	-1.48	hsa-miR-299-5p	43	1 293	-4.90
hsa-miR-155	9 793	27 324	-1.48	hsa-miR-411 *	19	629	-5.06
hsa-miR-765	62	216	-1.81	hsa-miR-671-5p	75	2 507	-5.07
hsa-miR-543	13	56	-2.05	hsa-miR-574-5p	552	18 798	-5.09
hsa-miR-625	99	451	-2.18	hsa-miR-574-3p	151	5 280	-5.13
hsa-miR-154 *	15	72	-2.30	hsa-miR-218	19	669	-5.14
hsa-miR-100	1 615	8 156	-2.34	hsa-miR-376a	25	985	-5.32
hsa-miR-572	16	95	-2.53	hsa-miR-134	23	972	-5.39
hsa-miR-99a	76	437	-2.53	hsa-miR-495	11	595	-5.71
hsa-miR-34c-3p	271	1 629	-2.58	hsa-miR-382	25	1 314	-5.71
hsa-miR-152	128	773	-2.60	hsa-miR-199a-3p	44	2 669	-5.91
hsa-miR-939	31	192	-2.62	hsa-miR-494	28	2 161	-6.26
hsa-miR-638	4 912	36 242	-2.88	hsa-miR-376c	21	1 781	-6.38
hsa-miR-663	748	5 858	-2.97	hsa-miR-127-3p	16	1 990	-6.95
hsa-miR-575	44	364	-3.06	hsa-miR-379	24	3 120	-7.03
hsa-miR-539	23	224	-3.28	hsa-miR-493 *	18	2 661	-7.19
hsa-miR-337-5p	17	202	-3.53	hsa-miR-487b	8	1 418	-7.42

司的 μ Paraflo™ 微流体芯片,之前已有许多采用该公司芯片进行 miRNA 研究的报道^[10-12]。本实验的芯片数据库为 Sanger miRBase Release 10.0 版本,其信息量大,包括针对人成熟 miRNAs 的 711 个探针。因此本研究筛选到的差异表达的 miRNAs 数目较以往报道多,可以更多地了解 miRNAs 在乳腺癌细胞的表达情况。

国内外已有用微阵列检测乳腺癌 miRNAs 表达的文献报道。如 Iorio 等^[7]应用微阵列芯片首次从乳腺癌组织、乳腺癌细胞株中筛选出异常表达的 miRNAs 谱,发现有 29 条 miRNAs 在肿瘤中表达失调,其中,miR-10b、miR-125b、miR-145 在乳腺癌中显著低表达,miR-21 和 miR-155 在乳腺癌中显著高表达。miR-10b 在转移性的乳腺癌细胞中过表达,在癌转移的过程中扮演重要的角色^[13]。本实验结果显示,在 MCF-7 细胞中,miR-125b 呈低表达,miR-10b 呈高表达,miR-21 和 miR-145 分别表现出上调和下调的趋势,而 miR-155 呈高表达。其

他亦有与文献报道^[7]相同的结果,如 mir-122、mir-191、mir-196-b 等呈过表达。本文与文献^[7]报道的部分实验结果存在差异,如 mir-128b、mir-136 在乳腺癌组织中过表达,而在 MCF-7 细胞中未检出差异,其原因可能是乳腺癌组织与正常乳腺细胞株及乳腺癌细胞株中的 miRNAs 表达本身存在一定的差异。研究表明,即使在不同的细胞类型,miRNA 的表达亦存在着差异,同样的 miRNA (如 miR-17-5、miR-20a) 既可以起到致癌基因作用^[14],又可以起到抑癌基因作用^[15]。

国内亦有学者运用 miRNA 芯片技术,筛选了乳腺癌细胞 MCF-7 与乳腺上皮细胞 MCF-10A 的 miRNAs 表达谱,获得了 57 个与乳腺癌相关的 miRNAs^[8]。将本实验结果与文献^[8]的结果进行比较,发现两者部分结果相同,如 miR-494、miR-222、miR-221、miR-125b、miR-210、miR-31 等在 MCF-7 细胞中显著性低表达,miR-200b、miR-200a、miR-429、miR-93、miR-15a、miR-26b 等在 MCF-7 细胞中

表 3 预测的 mir-200b 靶基因
Table 3 Predicted target genes of mir-200b

Target gene	Accession No.	Target gene name	Target gene	Accession No.	Target gene name
TCF8	NM_030751	Transcription factor 8	NPC1	NM_000271	Niemann-Pick C1 protein precursor
GDI2	NM_001494	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	RHOA	NM_001664	Transforming protein RhoA precursor (H12)
ID2	NM_002166	DNA-binding protein inhibitor ID-2	NDN	NM_002487	Necdin
NTF3	NM_002527	Neurotrophin-3 precursor	OCLN	NM_002538	Occludin
PCTK2	NM_002595	Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-2	PTPRZ1	NM_002851	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta precursor
TBP	NM_003194	TATA-box-binding protein	EIF2B5	NM_003907	Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon
HSPA9B	NM_004134	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	DAG1	NM_004393	Dystrophin-associated glycoprotein 1
DUSP1	NM_004417	Dual specificity protein phosphatase 1	ELAVL2	NM_004432	ELAV-like protein 2
FGD1	NM_004463	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 1	HRB	NM_004504	HIV-1 Rev-binding protein
STX1A	NM_004603	Syntaxin-1A	FXR2	NM_004860	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2
PLS3	NM_005032	Plastin-3 (T-plastin)	HS3ST1	NM_005114	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 1 precursor
FOXP1B	NM_005249	Forkhead box protein G1C	MYCN	NM_005378	N-myc proto-oncogene protein
NOG	NM_005450	Noggin precursor	RANBP9	NM_005493	Ran-binding protein 9
SYT1	NM_005639	Synaptotagmin-1	LHFP	NM_005780	Lipoma HMGIC fusion partner precursor
PENK	NM_006211	Proenkephalin A precursor	PLCL1	NM_006226	phospholipase C-like 1
PPP2R5E	NM_006246	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	BASP1	NM_006317	Brain acid soluble protein 1
SEC23A	NM_006364	Protein transport protein Sec23A	MXD4	NM_006454	Max-interacting transcriptional repressor MAD4
GNAI3	NM_006496	Guanine nucleotide-binding protein G (k) subunit alpha (G(i) alpha-3)	PLK2	NM_006622	Serine/threonine-protein kinase PLK2
ZFPM2	NM_012082	Zinc finger protein multitype 2	FBXW2	NM_012164	F-box/WD repeat protein 2
DNAJB9	NM_012328	DnaJ homolog subfamily B member 9	MMD	NM_012329	Monocyte to macrophage differentiation protein
RLF	NM_012421	Zinc finger protein Rlf	FHOD1	NM_013241	FH1/FH2 domain-containing protein
TBK1	NM_013254	Serine/threonine-protein kinase TBK1	ASF1A	NM_014034	ASF1 anti-silencing function 1 homolog A
SESN1	NM_014454	Sestrin-1 (p53-regulated protein PA26)	ZFHX1B	NM_014795	Zinc finger homeobox protein 1b
RAB11FIP2	NM_014904	Rab11 family-interacting protein 2	TLN2	NM_015059	Talin-2
KIAA0423	NM_015091	KIAA0423 (KIAA0423), mRNA	RAB6IP1	NM_015213	Rab6-interacting protein 1 (Rab6IP1)
EIF5B	NM_015904	Eukaryotic translation initiation factor 5B (eIF-5B)	IER5	NM_016545	Immediate early response gene 5 protein
RKHD2	NM_016626	ring finger and KH domain containing 2	DACT1	NM_016651	Dapper homolog 1 (hDPR1)
XKR8	NM_018053	XK-related protein 8	C10orf6	NM_018121	Chromosome 10 open reading frame 6
ERRFI1	NM_018948	ERBB receptor feedback inhibitor 1	NGEF	NM_019850	Ephexin-1
ACE2	NM_021804	Angiotensin-converting enzyme 2 precursor	ELAVL4	NM_021952	ELAV-like protein 4
SMURF2	NM_022739	Smad ubiquitination regulatory factor 2	OSBPL11	NM_022776	Oxysterol-binding protein-related protein 11
GPR146	NM_138445	Probable G-protein-coupled receptor 146	SPRED1	NM_152594	Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1 (Spred-1)
PDIK1L	NM_152835	Serine/threonine-protein kinase PDIK1L	NEDD1	NM_152905	Protein NEDD1
OLIG3	NM_175747	Oligodendrocyte transcription factor 3	KCTD8	NM_198353	Potassium channel tetramerisation domain containing 8

显著性高表达;也有部分实验结果不完全一致。分析其原因,可能与两个研究中所采用的对照组细胞不同有关,也可能因为细胞体外培养的条件有差别,外界因素的影响较大,导致了二者之间的差异。现有研究表明,异常表达的 miRNAs 参与了癌症的增殖^[16]、浸润^[13]、血管生成^[17]、凋亡^[18]及信号

转导通路^[19]等环节。miRNAs 与癌症的关系已成为生命科学研究的重点,研究者们已经开始设想以 miRNAs 为靶点诊断和治疗癌症。本研究分析了乳腺癌细胞与乳腺上皮细胞中 miRNAs 的差异性表达,筛选出了与乳腺癌相关的 miRNAs,其中,过表达的部分 miRNAs 可能有癌基因的作用,低表达的

部分 miRNAs 可能有抑癌基因的作用。本研究为进一步探索 miRNAs 在乳腺细胞癌变分子机制中的调控作用提供了有用的数据库。通过文献检索,发现本实验筛选到的大部分 miRNAs 分子在国内外文献报道较少或无报道。因此,这些 miRNAs 需要运用生物信息学手段和分子生物学技术寻找其靶基因,从而明确其在乳腺癌发生发展过程中的生物学功能。

先前的研究发现 miR-200b 在卵巢癌、胆管癌细胞中呈高表达^[20,21];本研究及廖荣霞等^[8]发现 mir-200b 在 MCF-7 细胞中显著高表达。因此,我们选取 mir-200b 进行了初步的生物信息学分析,发现其作用靶点是与细胞增殖(如 MXD4、SESN1 等)、细胞周期调控(如 PLK2 等)、细胞信号转导(如 SMURF2 等)、抑癌基因(如 ERFF1、ZFHX1B 等)等生物特性密切相关的基因,涉及到肿瘤发生发展的各个方面,由此说明某些关键 miRNAs 表达水平的失衡可能是乳腺癌发生和发展的原因之一。

目前,我们正在对本实验中筛选到的差异表达 miRNAs 进行初步的功能检测。将 miRNAs 模拟物(或 pre-miRNA 表达载体)和阻遏物转染到乳腺癌细胞内,当内源性成熟 miRNAs 被增强或抑制后,发现肿瘤细胞的生长、增殖及细胞的形态受到影响,表明这些 miRNAs 在乳腺癌发生发展过程中具有重要的生物学功能。我们将在后续工作中继续筛选有癌基因或抑癌基因作用的 miRNAs,并运用生物信息学手段和分子生物学技术寻找 miRNAs 的靶基因,从而明确 miRNAs 在癌症发生发展过程中的生物学功能。

[参 考 文 献]

- [1] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. EMBO J, 2004,23(20):4051-4060.
- [2] Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J]. Cell, 2005,120(1):21-24.
- [3] Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals [J]. Nature, 2005,434(7031):338-345.
- [4] Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs [J]. Science, 2005,309(5740):1519-1524.
- [5] Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis [J]. Cell, 1991, 64(2):235-248.
- [6] Weinberg RA. Tumor suppressor genes [J]. Science, 1991, 254(5035):1138-1146.
- [7] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. Cancer Res, 2005,65(16):7065-7070.
- [8] 廖荣霞,孙建国,张亮,等. 乳腺癌 miRNAs 表达谱检测及初步分析 [J]. 第三军医大学学报, 2006,28(22):2209-2212.
- [9] Vivien W, Wei W. MicroRNA: a new player in breast cancer development [J]. Cancer Mol, 2007,3(5):133-138.
- [10] Choi Y, Qin Y, Berger MF, et al. Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking nobox [J]. Biol Reprod, 2007,77(2):312-319.
- [11] Shah YM, Morimura K, Yang Q, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation [J]. Mol Cell Biol, 2007,27(12):4238-4247.
- [12] Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation [J]. Circ Res, 2007,100(11):1579-1588.
- [13] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer [J]. Nature, 2007,449(7163):682-688.
- [14] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. Nature, 2005, 435(7043):828-833.
- [15] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression [J]. Nature, 2005,435(7043):839-843.
- [16] Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA [J]. Mol Cell Biol, 2006,26(21):8191-8201.
- [17] Lee DY, Deng Z, Wang CH, et al. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression [J]. PNAS, 2007,104(51):20350-20355.
- [18] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis [J]. Oncogene, 2007, 26(42):6133-6140.
- [19] Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias [J]. PNAS, 2004,101(32):11755-11760.
- [20] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines [J]. Gastroenterology, 2006,130(7):2113-2129.
- [21] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2007,67(18): 8699-8707.

[编辑及校对:甘可建]