

筛选舌鳞癌中差异表达的 miRNA

张巨峰 罗霞 邓铃

【摘要】 目的 应用 miRNA 芯片技术检测舌鳞癌组织中差异表达的 miRNA, 高通量筛选与舌鳞癌相关的 miRNAs。方法 应用 Agilent miRNA 芯片比较舌鳞癌和正常舌组织中 miRNAs 差异表达谱, 然后在扩大的样本中用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对部分差异表达的 miRNAs 进行验证。结果 与正常舌组织相比, 有 95 个 miRNAs 在舌鳞癌中异常表达 (差异 4 倍以上), 其中 52 个基因表达水平增高, 43 个基因表达水平下降。hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7d 经 qRT-PCR 验证与 miRNA 芯片结果一致, 即在舌鳞癌中表达下降。结论 hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7d 可能参与了舌鳞癌的发生过程。

【关键词】 舌; 癌, 鳞状细胞; 微 RNAs; let-7 家族

Screening differentially expressed miRNAs in tongue squamous carcinoma Zhang Jufeng, Luo Xia, Deng Ling. School of Life Science and Biopharmacology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Corresponding author: Zhang Jufeng, Email: jfzhang111@163.com

【Abstract】 Objective To screen for differentially expressed microRNAs (miRNAs) in tongue squamous carcinoma. **Methods** Total RNA of tongue squamous carcinoma and non-cancer tongue tissues were hybridized to Agilent miRNA microarray. The resultant differentially expressed miRNAs were further tested by using quantitative real time PCR (qRT-PCR) on 32 cancers and 36 non-cancerous counterparts. **Results** 95 aberrant miRNAs were identified by miRNA microarray (at least >4 folds) in tongue squamous carcinoma, including high expression of 52 miRNAs and low expression of 43 miRNAs. The qRT-PCR assay showed that the expression of hsa-let-7a, hsa-let-7c and hsa-let-7d was decreased in cancer compared to normal tissues. **Conclusion** hsa-let-7a, hsa-let-7c, hsa-let-7d may be involved in tongue squamous carcinoma development and progression.

【Key words】 Tongue; Carcinoma, squamous cell; MicroRNAs; let-7 family

MicroRNAs (miRNAs) 是在真核生物中发现的一类内源性非编码 RNA, 其大小长约 20~25 个核苷酸, 具有抑制靶基因表达的作用。Lewis 等^[1]预测, 人类基因组中大约有 30% 的基因表达受 miRNAs 分子调控。目前在多种人类肿瘤中检测到 miRNA 表达变化, 有研究表明一些肿瘤组织中差异表达的 miRNA 具有癌基因或抑癌基因的作用^[2-7]。miRNAs 表达模式比编码的 mRNA 对多种肿瘤的诊断更准确^[8]。

舌鳞癌是口腔癌中最常见的类型, 具有生长

快、侵袭和转移能力强的生物学特性^[9-10]。近年来, 青年和中年人群中舌鳞癌发病率有增多的趋势^[11-12]。目前对舌鳞癌中 miRNA 整体表达模式研究还比较有限。本研究利用 miRNA 芯片筛选舌鳞癌中差异表达的 miRNAs, 并扩大样本后用 RT-PCR (TaqMan) 进行验证, 发现 hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7d 在舌鳞癌中表达水平下降。

材料与方法

一、标本

24 例舌鳞癌组织石蜡包埋切片来源于深圳市第二人民医院、深圳北大医院病理科, 取 28 例正常人的舌黏膜上皮细胞为对照组。8 例新鲜舌鳞癌组织和舌正常组织取自深圳北大医院手术切除的标本, 所有患者术前均未接受任何放化疗治疗, 病

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.09.018

基金项目: 国家自然科学基金 (81171447); 广东省自然科学基金 (104518036002006310)

作者单位: 510006 广州, 广东药学院生命科学与生物制药学院

通讯作者: 张巨峰, Email: jfzhang111@163.com

理证实全部为鳞状细胞癌。标本手术切除后立即放入 -80°C 中冰箱中保存备用。石蜡标本和新鲜组织共32例患者中,男21例,女11例,年龄在38~69岁,平均年龄53.5岁;T1、T2、T3和T4期的各为13例、12例、5例和2例。对照组年龄和性别与病例组相匹配。

二、主要试剂和仪器

芯片扫描仪(Agilent公司),杂交盒(Agilent公司)。TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems公司); TaqMan MicroRNA反转录试剂盒(Appliedbiosystems公司); Trizol试剂(Invitrogen公司)。石蜡包埋组织切片总RNA提取试剂盒(TIANGEN)。

三、总RNA制备

总RNA分别从新鲜组织、石蜡组织切片和口腔黏膜上皮细胞中提取,方法如下:手术切除的组织约100 mg匀浆后加入1 ml Trizol,按常规酚/氯仿抽提、无水乙醇沉淀的方法,提取总RNA。石蜡组织切片中的RNA按照石蜡包埋组织切片总RNA提取试剂盒(TIANGEN公司)说明书的步骤来提取。用棉签刮取志愿者舌黏膜上皮细胞,迅速置于装有1 ml Trizol的EP管中,按常规酚/氯仿抽提、无水乙醇沉淀的方法,提取总RNA。所有提取的总RNA,用琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,Nanodrop检测纯度和浓度。检验合格的应用于本研究。

四、miRNA芯片检测

miRNA芯片检测委托上海伯豪生物技术有限公司,使用Agilent芯片。操作过程分为样品标记、芯片杂交、芯片洗涤、芯片扫描和芯片数据提取等几个步骤。

五、RNA反转录

cDNA用 hsa-let-7a、hsa-let-7c 和 hsa-let-7d 特异引物合成。反应体系为: 100 mmol/L dNTP 0.15 μl ; MultiScribeTM Reverse Transcriptase 1 μl ; 10 \times RT buffer 1.50 μl ; RNase inhibitor 0.188 μl ; 无核酶的ddH₂O 4.162 μl ; 5 \times TaqMan MicroRNA RT Primer 3.00 μl ; 总RNA样本5.00 μl (1~10 ng)。反应条件为: 16 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

六、miRNAs的RT-PCR定量

PCR反应体系为: TaqMan MicroRNA Assays (20 \times) 1.00 μl ; cDNA(稀释15倍) 1.33 μl ; TaqMan 2 \times 通用PCR缓冲液10.00 μl ; ddH₂O 7.67 μl ; 总体积为20 μl 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s;

60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。成熟miRNAs相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 方法计算,内参U6基因作为对照。

七、统计学分析

使用SPSS 12.0和GraphPad Prism 5统计学软件来分析数据,组间数据差异比较用t检验(Student's t test), $P < 0.05$ 具有统计学意义。

结 果

一、miRNA芯片检测舌鳞癌和正常舌组织miRNA表达情况

手术中切除的舌鳞癌和配对正常舌组织提取总RNA后,用Agilent芯片高通量检测miRNA表达谱。以4倍差异变化作为选择标准,与正常舌组织相比,舌鳞癌中有52个miRNAs表达水平上调,43个miRNAs表达水平下降(表1)。其中下调表达的hsa-let-7a、hsa-let-7c和hsa-let-7d是属于hsa-let-7家族。

二、RT-PCR(Taqman)验证hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7d的表达情况

RT-PCR(Taqman)能检测成熟的microRNA,具有精确度高和特异性强的优点。用Real-time RT-PCR(Taqman)方法在扩大的样本量中来验证miRNA芯片结果。舌鳞癌共32例(其中24例来源石蜡包埋切片,8例取自手术切除新鲜组织);正常舌组织和舌黏膜上皮细胞共36例作为对照。标本中对照组年龄和性别与病例组相匹配。结果显示hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7d在舌鳞癌中表达下降,有统计学意义($P=0.0013$; $P=0.0026$; $P=0.0341$)(图1)。

讨 论

miRNA表达与多种癌症相关,最近研究发现,大约50%得到注解的miRNAs在基因组上定位于与肿瘤相关的脆性位点^[13]。这说明miRNAs在肿瘤发生过程中起了非常重要作用。筛选肿瘤中差异表达的miRNAs,可能会发现一些与肿瘤发生有密切关系的miRNA。例如,miR-143和miR-145在结肠癌中明显下调;miR-21在胶质母细胞瘤中表达增加。这些肿瘤中差异表达的miRNA可能会起到肿瘤抑制基因或癌基因作用。目前舌鳞癌相关miRNAs研究还比较有限。在本研究中先利用miRNA芯片高通量分析舌鳞癌的miRNAs表达谱,发现hsa-let-7家族中的hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7d表达水平在舌鳞

表1 舌鳞癌和正常舌组织中差异表达的miRNA (至少4倍)

miRNA	倍数(癌组织/非癌组织)	P 值	miRNA	倍数(癌组织/非癌组织)	P 值
上调			hsa-miR-1274b	5.14	<0.05
hsa-miR-150	313.33	<0.05	hsa-miR-664	5.10	<0.05
hsa-miR-126	139.40	<0.05	hsa-miR-638	5.03	<0.05
hsa-miR-1	91.39	<0.05	hsa-miR-1826	5.03	<0.05
hsa-miR-145	78.59	<0.05	下调		
hsa-miR-199a-3p	66.54	<0.05	hsa-miR-1287	0.001 3	<0.05
hsa-miR-146a	55.54	<0.05	hsa-miR-184	0.001 9	<0.05
hsa-miR-195	52.02	<0.05	hsa-miR-1246	0.003 9	<0.05
hsa-miR-125b	50.99	<0.05	hsa-miR-124	0.004 3	<0.05
hsa-miR-342-3p	50.95	<0.05	hsa-miR-498	0.004 9	<0.05
hsa-miR-451	45.39	<0.05	hsa-miR-373	0.006 4	<0.05
hsa-miR-30a	44.83	<0.05	hsa-miR-671-5p	0.006 8	<0.05
hsa-miR-133b	40.75	<0.05	hsa-miR-584	0.010 8	<0.05
hsa-miR-99a	29.72	<0.05	hsa-miR-302c	0.016 1	<0.05
hsa-miR-206	24.04	<0.05	hsa-miR-223	0.017 2	<0.05
hsa-miR-199a-5p	22.32	<0.05	hsa-miR-671-3p	0.023 2	<0.05
hsa-miR-214	20.13	<0.05	hsa-miR-936	0.026 2	<0.05
hsa-miR-151-5p	18.87	<0.05	hsa-miR-1183	0.030 1	<0.05
hsa-miR-497	18.56	<0.05	hsa-miR-636	0.034 4	<0.05
hsa-miR-140-3p	17.45	<0.05	hsa-miR-1909	0.041 7	<0.05
hsa-miR-375	17.21	<0.05	hsa-miR-1299	0.049 2	<0.05
hsa-miR-486-5p	17.03	<0.05	hsa-miR-760	0.051 2	<0.05
hsa-miR-146b-5p	16.98	<0.05	hsa-miR-1202	0.052 4	<0.05
hsa-miR-143	16.82	<0.05	hsa-miR-1290	0.057 3	<0.05
hsa-miR-30b	16.65	<0.05	hsa-miR-601	0.057 6	<0.05
hsa-miR-100	14.94	<0.05	hsa-miR-371-5p	0.062 7	<0.05
hsa-miR-564	14.72	<0.05	hsa-miR-1182	0.065 6	<0.05
hsa-miR-10b	12.09	<0.05	hsa-miR-31	0.081 9	<0.05
hsa-miR-363	11.31	<0.05	hsa-miR-150	0.086 9	<0.05
hsa-miR-28-5p	11.06	<0.05	hsa-miR-583	0.091 8	<0.05
hsa-miR-30c	10.77	<0.05	hsa-miR-631	0.104 1	<0.05
hsa-miR-181a	10.66	<0.05	hsa-let-7a	0.105 6	<0.05
hsa-miR-1308	10.65	<0.05	hsa-miR-193b	0.112 7	<0.05
hsa-miR-144	10.32	<0.05	hsa-miR-487b	0.117 0	<0.05
hsa-miR-1274a	10.19	<0.05	hsa-miR-1914	0.118 5	<0.05
hsa-miR-199b-5p	10.09	<0.05	hsa-let-7c	0.120 3	<0.05
hsa-miR-20b	9.70	<0.05	hsa-miR-491-3p	0.123 2	<0.05
hsa-miR-429	8.50	<0.05	hsa-miR-1268	0.133 4	<0.05
hsa-miR-455-3p	7.54	<0.05	hsa-miR-516b	0.138 2	<0.05
hsa-miR-200a	7.44	<0.05	hsa-miR-490-3p	0.141 3	<0.05
hsa-miR-222	7.08	<0.05	hsa-miR-526b	0.146 9	<0.05
hsa-miR-887	7.01	<0.05	hsa-let-7d	0.150 8	<0.05
hsa-miR-886-3p	6.21	<0.05	hsa-miR-765	0.155 1	<0.05
hsa-miR-185	6.17	<0.05	hsa-miR-149	0.161 6	<0.05
hsa-miR-26a	6.07	<0.05	hsa-miR-483-5p	0.170 8	<0.05
hsa-miR-30e	6.02	<0.05	hsa-miR-30b	0.179 2	<0.05
hsa-miR-720	5.82	<0.05	hsa-miR-769-3p	0.192 6	<0.05
hsa-miR-650	5.47	<0.05	hsa-miR-662	0.195 8	<0.05
hsa-miR-148a	5.28	<0.05			

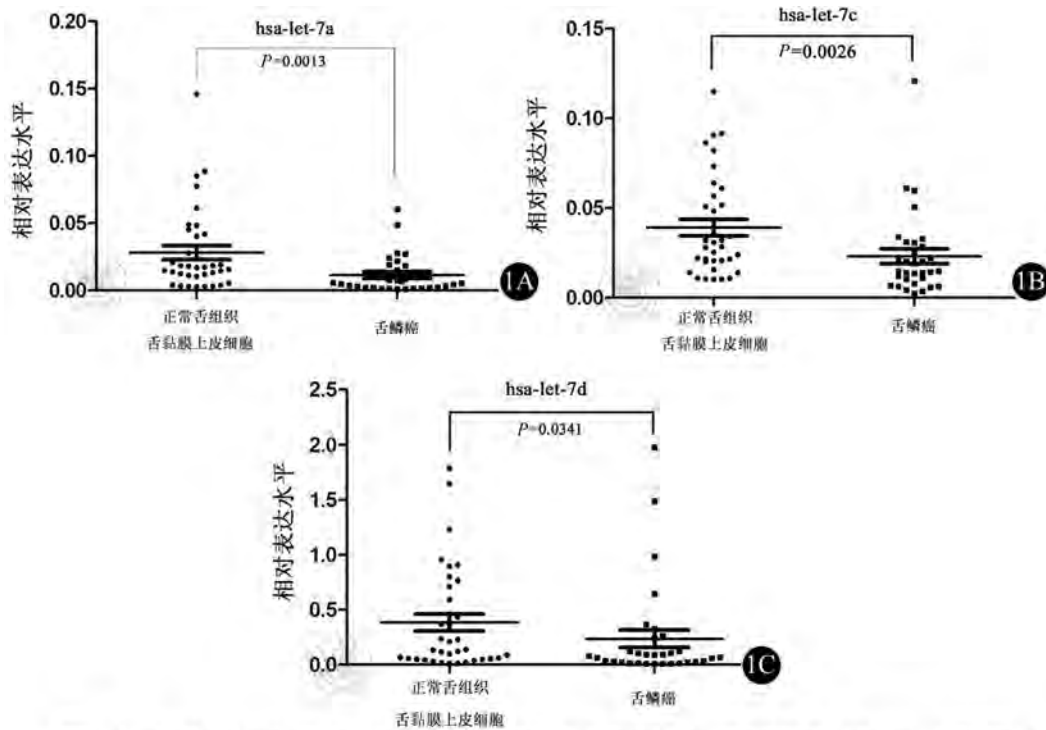


图1 hsa-let-7a、hsa-let-7c和hsa-let-7d在舌鳞癌组织中表达降低。用RT-PCR (Taqman) 检测hsa-let-7a、hsa-let-7c和hsa-let-7d在32例舌鳞癌和36例正常舌组织(含舌黏膜上皮细胞)中的表达情况。每组实验重复3次, 样品中miRNA表达水平用U6来标准化。

癌中降低, 扩大样本后用RT-PCR进行验证, 结果与miRNA芯片一致。

let-7家族首先在秀丽隐杆线虫中发现, 有13个成员, 定位于9个不同的染色体上。在许多肿瘤中, let-7表达水平都降低。有很多研究表明, 在肿瘤细胞中提高let-7的表达水平, 可以抑制肿瘤细胞的生长和增殖^[14-17]。let-7可以抑制癌基因HMGA2和Ras的表达而发挥抑癌的作用^[18-19]。

本研究发现let-7家族中的hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7d在舌鳞癌中表达降低, 提示可能在舌鳞癌中也发挥着抑癌基因的作用, 需进一步的工作去证明。对舌鳞癌中let-7的深入了解, let-7有可能成为舌鳞癌诊断分子标记和治疗的靶点。

参 考 文 献

[1] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.
 [2] Li XJ, Luo XQ, Han BW, et al. MicroRNA-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways[J]. Br J Cancer, 2013, 109(8): 2189-2198.
 [3] Han Y, Liu Y, Zhang H, et al. Hsa-miR-125b suppresses bladder cancer development by down-regulating oncogene SIRT7 and oncogenic long non-coding RNA MALAT1[J]. FEBS Lett, 2013, 587(23): 3875-3882.

[4] Guo J, Xia B, Meng F, et al. miR-137 suppresses cell growth in ovarian cancer by targeting AEG-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(2): 357-363.
 [5] Chen X, Pan M, Han L, et al. miR-338-3p suppresses neuroblastoma proliferation, invasion and migration through targeting PREX2a[J]. FEBS Lett, 2013, 587(22): 3729-3737.
 [6] Wang Z, Han J, Cui Y, et al. miRNA-21 inhibition enhances RANTES and IP-10 release in MCF-7 via PIAS3 and STAT3 signalling and causes increased lymphocyte migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(3): 384-389.
 [7] Tu Y, Gao X, Li G, et al. MicroRNA-218 inhibits glioma invasion, migration, proliferation, and cancer stem-like cell self-renewal by targeting the polycomb group gene Bmi1[J]. Cancer Res, 2013, 73(19): 6046-6055.
 [8] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.
 [9] Raimondi AR, Molinolo A, Gutkind JS. Rapamycin prevents early onset of tumorigenesis in an oral-specific K-ras and p53 two-hit carcinogenesis model[J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 4159-4166.
 [10] Katou F, Ohtani H, Watanabe Y, et al. Differing phenotypes between intraepithelial and stromal lymphocytes in early-stage tongue cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(23): 11195-11201.
 [11] Annertz K, Anderson H, Biorklund A, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults[J]. Int J Cancer, 2002, 101(1): 95-99.
 [12] Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002, 128(3): 268-274.
 [13] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes

- are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [14] Lee ST, Chu K, Oh HJ, et al. Let-7 microRNA inhibits the proliferation of human glioblastoma cells[J]. J Neurooncol, 2011, 102(1): 19-24.
- [15] Boyerinas B, Park SM, Hau A, et al. The role of let-7 in cell differentiation and cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17(1): F19-36.
- [16] Buechner J, Tomte E, Haug BH, et al. Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma[J]. Br J Cancer, 2011, 105(2): 296-303.
- [17] Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(16): 7713-7722.
- [18] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene[J]. Genes Dev, 2007, 21(9): 1025-1030.
- [19] Ngalame NN, Tokar EJ, Person RJ, et al. Aberrant microRNA Expression Likely Controls RAS Oncogene Activation During Malignant Transformation of Human Prostate Epithelial and Stem Cells by Arsenic[J]. Toxicol Sci, 2014.

(收稿日期: 2014-02-11)

(本文编辑: 戚红丹)

张巨峰, 罗霞, 邓铃. 筛选舌鳞癌中差异表达的 miRNA [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(9): 1669-1673.

