

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.11.002

hsa-miR-133a在人食管鳞状细胞癌细胞株中的表达及其生物信息学分析

谢 晖¹, 陈桂媛², 赵一奇³, 陈 诚¹, 吴钦良¹, 赵亚萍¹, 王建国¹

Expression and Bioinformatics Analysis of hsa-miR-133a in Cell Lines of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma

XIE Hui¹, CHEN Guiyuan², ZHAO Yiqi³, CHEN Cheng¹, WU Qinliang¹, ZHAO Yaping¹, WANG Jianguo¹

1. Department of Laboratory, The 82th Hospital of The People's Liberation Army, Huai'an 223001, China; 2. Huai'an First People's Hospital; 3. Department of General Surgery, The 82th Hospital of the People's Liberation Army

Corresponding Author: WANG Jianguo, E-mail: wjg82yy@163.com

Abstract: Objective To explore the hsa-miR-133a expression in the cell lines of human esophageal squamous cell carcinoma, predict and analyze the target genes of hsa-miR-133a using bioinformatic method and to provide theoretical guidance for the further function study. **Methods** The relative expressions of hsa-miR-133a were detected by real-time quantitative PCR in human esophageal squamous cell carcinoma cell lines KYSE-150, Eca109 and human normal esophageal epithelial cell line Het-1; hsa-miR-133a target genes were predicted by TargetScan, the PicTar and miRanda, then combined with the confirmed gene database DIANALAB-TarBase5.0 and miRTarBase, the intersection of the first three groups of forecast results were obtained for functional annotation and pathway enrichment analysis. **Results** Compared with normal esophageal epithelial cells, the expression levels of hsa-miR-133a in human esophageal squamous cell carcinoma cell lines KYSE-150, Eca109 were significantly lower; hsa-miR-133a target genes were significantly enriched in the AKT and p53 signal pathway closely related with tumor. **Conclusion** hsa-miR-133a target genes may be involved in the regulation of pathogenic of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: hsa-miR-133a; Bioinformatics; Esophageal squamous cell carcinoma

摘要:目的 探讨hsa-miR-133a在人食管鳞状细胞癌细胞株中的表达, 并对其靶基因进行预测和生物信息学分析, 为深入研究hsa-miR-133a的功能提供理论指导。**方法** 通过实时荧光定量PCR法, 检测人食管鳞状细胞癌细胞株KYSE-150、Eca109和正常食管上皮细胞株Het-1A中hsa-miR-133a的相对表达; 应用TargetScan、PicTar及miRanda预测hsa-miR-133a的靶基因, 取三者预测结果的交集, 并结合DIANALAB-TarBase5.0和miRTarBase两个实验证实的基因数据库, 进行功能注释和通路富集分析。**结果** 人食管鳞状细胞癌细胞株KYSE150、Eca109中hsa-miR-133a的表达水平显著低于正常食管上皮细胞; hsa-miR-133a的靶基因显著富集在与肿瘤密切相关的AKT和p53信号通路。**结论** hsa-miR-133a可能是参与调控食管鳞状细胞癌致病的靶基因。

关键词: hsa-miR-133a; 生物信息学; 食管鳞状细胞癌

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A

0 引言

食管癌(esophageal cancer, EC)是发生于食管上皮组织的常见恶性肿瘤, 其发病率在恶性肿瘤中位

居第八, 但死亡率在全世界居第六位, 每年约有48万新增病例^[1]。在我国, 食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)仍然是食管癌的主要病理类型^[2-3]。研究发现hsa-miR-133a作为抑癌基因在膀胱癌、头颈部癌、结肠直肠癌、乳腺癌以及食管癌中均表达下降^[4-8]。本研究拟探讨hsa-miR-133a在ESCC细胞株中的表达, 并通过在线数据库、运用生物信息学软件对hsa-miR-133a生物学特征以及功能进行预测分析, 从而为hsa-miR-133a靶基因的实验鉴定及其生物学功能研究提供数据支持和理论指导。

收稿日期: 2012-09-03; 修回日期: 2012-12-07

基金项目: 江苏省淮安市产学研合作促进计划专项资金资助项目(HAC201026)

作者单位: 1.223001 江苏淮安, 解放军第八二医院检验科; 2.淮安市第一人民医院检验科; 3.解放军第八二医院普外科

通信作者: 王建国, E-mail: wjg82yy@163.com

作者简介: 谢晖(1979-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事食管癌发病机制的研究

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的主要试剂包括：胎牛血清（美国Gibco公司），RPMI1640培养液（Gibco公司），miRNeasy总RNA抽提试剂盒（德国QIAGEN公司），反转录试剂盒、TaqMan MicroRNA Assay及ABI7500荧光定量PCR仪（美国ABI公司）。ABI-Prism 7900HT PCR仪购自美国Applied Biosystems公司。

1.2 细胞培养

人食管癌细胞系KYSE-150、Eca109和正常食管上皮细胞株Het-1A均购自中科院上海细胞库；采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液，置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 hsa-miR-133a表达水平检测

采用实时荧光定量聚合酶链反应^[9](real time quantitative polymerase chain reaction, q-PCR)检测hsa-miR-133a含量，选择miRNA-U6为内参照，每组实验重复3次。具体步骤：分别收获0、24、48、72及96 h各组细胞，用miRNeasy总RNA抽提试剂盒（QIAGEN, Inc）抽提各实验组细胞的总RNA，用ND-1000 NanoDrop检测RNA质量及浓度。取200 ng总RNA作为模板，miR-133a、miRNA-U6的反转录反应体系：100 nmol/L dNTPs 0.15 μl、50 u/μl的MultiScribe反转录酶1 μl、10×反转录缓冲液1.5 μl加40 u/μl的RNA酶抑制剂0.19 μl、特异性反转录引物3 μl，加无RNA酶水至15 μl。反转录反应条件：16℃ 30 min，42℃ 30 min，85℃ 5 min，收集cDNA，-80℃保存备用。miR-133a茎环状反转录特异引物、miRNA内参照miRNA-U6引物由美国Applied Biosystems公司合成。miR-133a、miRNA-U6反应体系：取2 μl cDNA为模板，Taqman 2×Universal PCR Master Mix 10 μl(购自美国Applied Biosystems公司)，含特异性上、下游引物的Taqman探针1 μl(购自美国Applied Biosystems公司)，加无RNA酶水至20 μl。PCR条件：95℃ 10 min，95℃ 15 s，60℃ 60 s，共40个循环。成熟hsa-miR-133a序列：5'-uuugucccucaaccagcug -3'(miRBase Accession: MIMAT0000278)。采用ΔCt法分析转染结果，miRNA-U6的Ct平均值为实验内参照。其中ΔCt=miR-133aCt-内参照Ct，应用2^{-ΔΔCt}方法计算目的基因相对含量。

1.4 数据来源

选择TargetScan6.1 (<http://www.targetscan.org/>)、PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)和miRanda (<http://www.microrna.org/>)三种在线软件预测hsa-miR-133a的靶基因，取交集，结合DIANALAB-TarBase5.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>)和miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)两个有实验证实的基因数据库软件来预测hsa-miR-133a的靶基因。

www.microrna.org/)三种在线软件预测hsa-miR-133a的靶基因，取交集，结合DIANALAB-TarBase5.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>)和miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)两个有实验证实的基因数据库软件来预测hsa-miR-133a的靶基因。

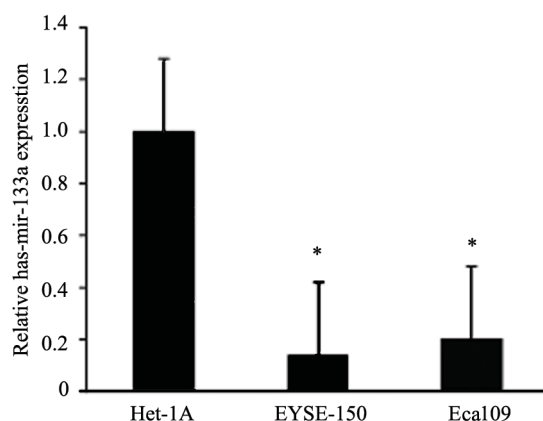
1.5 数据分析

采用GOEAST(<http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/>)对预测发现的miR-133a靶基因进行注释层次分类和功能富集分类，利用实现基因的GO富集分析。采用DAVID数据库(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)对hsa-miR-133a预测靶基因进行生物通路富集分析。使用超几何分布计算P值，筛选GO的显著性标准是P<0.001且假阳性率(false discovery rate, FDR) <0.01，从而得到基因在GO类别上的分布信息。

2 结果

2.1 人食管鳞状细胞癌细胞株中hsa-miR-133a的表达

采用qPCR技术检测KYSE-150、Eca109以及Het-1A细胞中miR-133a表达水平，结果表明：食管癌高分化细胞株KYSE-150及低分化细胞株Eca109中hsa-miR-133a含量显著低于正常食管上皮细胞株Het-1A细胞(P<0.05)，见图1。



*: P<0.05 vs. Het-1A

图1 人食管鳞状细胞癌细胞株中hsa-miR-133a的表达
Figure 1 Relative expression of hsa-miR-133a in the cell lines of human esophageal squamous cell carcinoma, KYSE-150 and Eca109

2.2 hsa-miR-133a靶基因预测

DIANA LAB-TarBase5.0和miRTarBase数据库提供已经有实验数据支持microRNA的确切靶基因，通过检索以上两种数据库发现hsa-miR-133a确认的靶基因有10个(PKM2、CASP9、HCN2、CACNA1C、HCN4、FSCN1、KRT7、KCNQ1、KCNH2、TAGLN2)。应用TargetScan, PicTar及miRanda软件预测hsa-miR-133a的靶基因，取三者预测结果的交集

有13个基因 (SOX4、BTBD3、PPP2CB、AFTPH、SNRK、PPP2CA、SEC61B、ARHGDI1、UBA2、SUPT16H、SMARCD1、LASS2、UBE2Q1), 结合已证实的靶标基因, 共23个。

2.3 hsa-miR-133a预测靶基因的GO注释分析及通路分析

对所发现的23个hsa-miR-133a靶基因进行GeneOntology注释层次分类及富集分析, 分别进行了GO生物过程、细胞组成和分子功能注释。筛选GO的显著性标准是 $P < 0.001$ 而假阳性率 (False discovery rate, FDR) < 0.01 。结果发现, hsa-miR-133a预测靶基因主要富集在蛋白质修饰、细胞增殖及凋亡等生物学过程和蛋白激酶活性、离子通道等分子功能上, 见表1。

利用DAVID数据库对23个靶基因进行生物通路富集分析, 结果显示: 在表2的3个通路数据库中, hsa-miR-133a预测的靶基因显著富集在AKT信号通路 (AKT signaling pathway) 和p53信号通路 (p53 pathway by glucose deprivation) 2个与肿瘤相关的信号通路中, 以及II型糖尿病 (Type II diabetes mellitus), 霍乱弧菌感染 (vibrio cholera infection) 等疾病通路中, 见表2。

3 讨论

微小RNA (microRNA, miRNA) 是近十年医

学领域中最重要发现之一, 它调控体内多种生理进程如早期胚胎发育、细胞增殖、细胞凋亡以及肿瘤的转移等, 人类1/3基因表达都受miRNAs调控。miRNA通常具有调控多个基因的功能, 而同一基因也可能同时受多个miRNA时空特异的精密调控, miRNA的这种调控方式, 导致其功能研究的复杂性, 仅仅依靠实验手段来研究miRNA已变得相当困难。而生物信息学融合了统计学、信息科学和生物学等各学科的理论和研究内容, 在医学、基础生物学、农业科学以及昆虫学等方面获得了广泛的应用。目前, 生物信息学对miRNA研究起着越来越重要的作用, 通过对海量和复杂的分子生物信息进行分析和处理为下一步实验提供指导。研究证明mir-133a与糖尿病、肿瘤有关, 尤其是在多种肿瘤中作为抑癌基因, 并与肿瘤细胞的侵袭相关^[5-7,10-11]。由于miR-133a在肿瘤中表达的普遍一致性, 引起了学者重视。

本实验发现hsa-mir-133a在ESCC高分化和低分化细胞株的表达水平较正常食管细胞株均明显下降, 与Kano等^[10]实验结果一致, 提示hsa-miR-133a参与ESCC发病, 但具体机制还不清楚, hsa-miR-133a靶基因的确定对于具体研究其生物学功能有着非凡意义。miRanda、TargetScan和PicTar是目前信息学中应用较广泛的miRNA靶基因预测在线软件。本次研究同时还使用了DIANA LAB-TarBase5.0和miRTarBase

表 1 hsa-miR-133a预测靶基因GO生物过程、细胞组成和分子功能分析结果

Table 1 Analysis result of predicted hsa-miR-133a target genes by GO molecular function,biological process,cellular component

GOID	Term	Number	P
Biological process			
GO:0010941	regulation of cell death	14	6.58e-5
GO:0042981	regulation of apoptotic process	14	4.19e-5
GO:0043067	regulation of programmed cell death	14	4.49e-5
GO:0006508	proteolysis	14	0.000147
Cellular component			
GO:0000159	protein phosphatase type 2A complex	6	7.2e-8
GO:0008287	protein serine/threonine phosphatase complex	6	3.47e-6
GO:0071564	npBAF complex	3	0.000951
GO:0034702	ion channel complex	12	2.71e-11
Molecular function			
GO:0005215	transporter activity	17	0.000147
GO:0005216	ion channel activity	17	2.31e-11
GO:0005244	voltage-gated ion channel activity	17	3.1e-17
GO:0005261	cation channel activity	17	1.3e-14
GO:0008324	cationtransmembrane transporter activity	17	9.8e-10
GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	17	2.05e-7
GO:0015267	channel activity	17	2.71e-11
GO:0022803	passive transmembrane transporter activity	17	2.71e-11
GO:0022832	voltage-gated channel activity	17	3.1e-17
GO:0022836	gated channel activity	17	2.87e-13
GO:0022892	substrate-specific transporter activity	17	9.68e-6
GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity	17	3.15e-12

Note: GOID:GO identify

表 2 hsa-miR-133a预测靶基因的通路数据库富集分析结果

Table 2 Analysis result of pathway enrichment about predicted hsa-miR-133a target genes by database

Category	Term	P	Gene number	Gene
BIOCARTA	Control of gene expression by Vitamin D receptor	7.3e-2	2(0.8%)	SMARCD1, SUPT16H
BIOCARTA	AKT signaling pathway	6.0e-2	2(0.8%)	PPP2CA, CASP9
KEGG	Type II diabetes mellitus	8.0e-2	2(0.8%)	CACNA1C, PKM2
KEGG	Vibrio cholera infection	9.5e-2	2(0.8%)	KCNQ1, SEC61B
PANTHER	p53 pathway by glucose deprivation	5.7e-2	2(0.8%)	PPP2CA, PPP2CB

两个实验证实了的靶基因数据库，对以上5个预测靶基因库进行整合，取其交集作为预测到的靶基因，提高预测结果的准确性。同时采用GOEAST软件对预测到的靶基因进行基因注释和分类，显示了hsa-miR-133a可能参与蛋白质修饰、细胞增殖及凋亡等生物学过程。

miRNA靶基因数目巨大，可广泛地参与到许多细胞信号转导系统中，并与之共同构成复杂的调控网络，进而发挥多种生物学作用。Cui等^[12]认为，miRNA通过选择信号转导通路上的蛋白即靶基因来调控生物作用。从本研究中我们发现hsa-miR-133a调控相互关联的疾病及信号转导通路主要有AKT信号通路和p53信号通路，这两个通路细胞的增殖和凋亡有关，提示hsa-miR-133a可能通过调控上述通路参与肿瘤的发病机制。本次研究同时发现hsa-miR-133a与Ⅱ型糖尿病（Type II diabetes mellitus）有关联，临床流行病学分析发现糖尿病可以增加肝癌、膀胱癌、胰腺癌等肿瘤的风险^[13]。糖尿病是否会增加ESCC风险？miRNA是否参加其中的机制，均有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-917.

[2] Zhang W, Bailey-Wilson JE, Li W, *et al.* Segregation analysis of esophageal cancer in a moderately high-incidence area of northern China[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67 (1):110-9.

[3] Mathé EA, Nguyen GH, Bowman ED, *et al.* MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(19): 6192-200.

[4] Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, *et al.* miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer[J]. *Br J Cancer*. 2010, 102(5):883-91.

[5] Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, *et al.* Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(1):209-17.

[6] Chen WS, Leung CM, Pan HW, *et al.* Silencing of miR-1-1 and miR-133a-2 cluster expression by DNA hypermethylation in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3):1069-76.

[7] Wu ZS, Wang CQ, Xiang R, *et al.* Loss of miR-133a expression associated with poor survival of breast cancer and restoration of miR-133a expression inhibited breast cancer cell growth and invasion[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:51.

[8] Suzuki S, Yokobori T, Tanaka N, *et al.* CD47 expression regulated by the miR-133a tumor suppressor is a novel prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(2):465-72.

[9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-8.

[10] Kano M, Seki N, Kikkawa N, *et al.* miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2804-14.

[11] Chavali V, Tyagi SC, Mishra PK. MicroRNA-133a regulates DNA methylation in diabetic cardiomyocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(3):668-72.

[12] Cui Q, Yu Z, Purisima EO, *et al.* Principles of microRNA regulation of a human cellular signaling network[J]. *Mol Syst Biol*, 2006, 2:46

[13] Chowdhury TA. Diabetes and cancer[J]. *QJM*, 2010, 103(12):905-15.

[编辑: 安 凤; 校对: 邱颖慧]