

鼻咽癌 microRNAs 差异表达谱的鉴定*

聂国辉¹ 刘锋² 林宜林¹ 陈静¹ 余振东¹ 李晓庆³
段鸿芳⁴ 路瑞静³ 赵春娟³ 胡洪义¹ 梅雪霜¹

[摘要] 目的:筛选及验证鼻咽癌中 microRNAs(miRs)的差异表达谱。方法:通过芯片高通量表达谱分析及大规模微阵列技术,筛选鼻咽癌与炎症组织中差异表达的 miRs,并应用 RT-QPCR 方法验证筛选结果的可信性。结果:鼻咽癌组织与对照组织的 miRs 存在差异表达,其中差异倍数大于 2 倍的人属 miRs 共有 144 种。RT-QPCR 发现与炎症组织相比,癌组织中 miRs-34b、miRs-449b、miRs-7-1 表达显著下调,而 miRs-125b、miRs-184、miRs-196b、miRs-205 及 miRs-24-1 表达上调,结果与芯片分析结果相一致。结论:差异表达的 miRs 可能与鼻咽癌的发生、发展密切相关,对鼻咽癌 miRs 表达谱的研究可能为鼻咽癌的早期诊断及治疗提供有力的靶向依据。

[关键词] 鼻咽癌;microRNAs;表达谱

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.13.016

[中图分类号] R739.63 [文献标志码] A

Identification of microRNAs profiles in nasopharyngeal carcinoma

NIE Guohui¹ LIU Feng² LIN Yilin¹ CHEN Jing¹ YU Zhendong¹ LI Xiaoping³
DUAN Hongfang⁴ LU Ruijing³ ZHAO Chunjuan³ HU Hongyi¹ MEI Xueshuang¹

(¹Department of Otorhinolaryngology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, 518036, China; ²Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University; ³Medical College of Shantou University; ⁴Medical College of Guangzhou University)

Corresponding author: NIE Guohui, E-mail: nghui@21cn.com

Abstract Objective: To filtrate and prove the different microRNAs(miRs) profiles in nasopharyngeal carcinoma. **Method:** Screening the different expressions of miRs between nasopharyngeal carcinoma and the inflammatory tissues by the application of expression profiling of chip high-throughput and large-scale microarray analysis. Then we used RT-QPCR technology to prove the accuracy of screening results. **Result:** There were significant expression differences of miRs between nasopharyngeal carcinoma and the control tissues, 144 human miRs had 2 or more fold the difference ratio. Compared with the inflammatory tissues, we have found that miRs-34b, miRs-449b and miRs-7-1 significantly low expressed in nasopharyngeal carcinoma, yet miRs-125b, miRs-184, miRs-196b, miRs-205 and miRs-24-1 expressed high. The results were consistent with the microarray analysis. **Conclusion:** The difference expressed miRs might be closely related to the process of nasopharyngeal carcinoma, and the research on miRs profiles maybe provide a powerful target basis for early diagnosis and therapy of nasopharyngeal carcinoma.

Key words nasopharyngeal carcinoma; microRNAs; profiles

microRNAs (miRs) 是一类内源性非编码 RNA,由 21~25 个核苷酸组成,它们参与基因表达转录后调节,通过与靶基因 mRNA 的 3'UTRs (3 端非编码区)或编码区结合来调控基因的表达^[1]。研究证实,肿瘤的发生、发展与 miRs 之间存在着错综复杂的联系,大约有一半的 miRs 上游基因位于染色体中与肿瘤相关的脆性位点^[2]。miRs 的表达异常可促进肿瘤的发生,在肿瘤的发展过程中扮演极其重要的角色。近年来,越来越多

的研究发现 miRs 的异常表达与鼻咽癌的发病和进展密切相关。本研究拟通过 miRs 表达谱芯片这种高通量表达谱分析及大规模微阵列技术,筛选出大量鼻咽癌组织中差异表达的 miRs,应用 RT-QPCR 技术验证确保筛选结果的可信性,以寻找与鼻咽癌发生、发展密切相关的 miRs,并为鼻咽癌的诊断及治疗提供新的生物学依据。

1 材料与方法

1.1 标本收集

30 例鼻咽癌及炎症组织样品(所取样本已经患者知情同意并获得医院伦理委员会批准)来源于北京大学深圳医院进行癌切除术的患者,样本采集依据随机原则。所有患者切除术前未作放疗或采用免疫疗法等。采集的样本均保存于 RNAlater 中,并置于液氮或-80℃冰箱。

* 基金项目:深圳市科技计划项目(No:201208273000135)资助

¹ 北京大学深圳医院耳鼻咽喉科(深圳,518036)

² 清华大学深圳研究生院

³ 汕头大学医学院

⁴ 广州医科大学

通信作者:聂国辉, E-mail: nghui@21cn.com

1.2 试剂及仪器

miRs 逆转录及荧光定量 PCR 试剂盒均购自德国 Qiagen 公司。实验用到的仪器主要有普通 PCR 仪、QPCR 仪、离心机、台式高速冷冻离心机及 -80℃ 超低温冰箱等。

1.3 总 RNA 提取

取鼻咽癌及炎症组织样本各 25 g, 用 TRIzol 法在液氮中研磨提取其中的总 RNA。RNA 提取完成后, 应用紫外分光光度仪及琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 的浓度、质量及片段大小。RNA 于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.4 芯片 miRs 表达谱分析

将提取的鼻咽癌及炎症组织样品的 RNA 利用 Agilent human miRs (8 * 60K) V16.0 芯片进行 miRs 表达谱芯片分析。

1.5 逆转录

miRs 逆转录应用 miScript Reverse Transcription Kit 试剂盒 (Qiagen, 德国), 依据试剂盒说明书依次加入反应所需的 RNA 模板及试剂后, 于普通 PCR 仪中进行反应。逆转录反应体系为 20 μl, 反应条件为 37℃、1 h、95℃、5 min。

1.6 RT-QPCR

应用 miScript SYBR Green PCR Kit 试剂盒 (Qiagen, 德国) 于定量 PCR 仪 (ABI Prime7000) 中进行 QPCR 检测 miRs 的相对表达量。miRs 的上游引物由 invitrogen 公司合成, 内参基因 U6smRNA 由上海生工生物科技公司合成, 各基因引物序列见表 1。下游引物为 miScript SYBR Green PCR Kit 试剂盒提供的通用引物 (详见试剂盒说明书)。根据试剂盒说明书加入反应体系 20 μl, 反应条件为 95℃、15 min, 94℃、30 s, 55℃、15 s, 70℃、30 s, 设置 3 个重复孔, 40 个循环结束。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件, 采用双侧 *t* 检验对实验数据进行统计分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 各基因引物序列

引物	5'-3'
miRs-34b	GCGCGCCAATCACTAACTCCAC
miRs-449b	GCGCGCAGGCAGTGTATTGTTA
miRs-7-1	GCGCGCGCCAACAAATCACAGTCT
miRs-125b	GCGCTCCCTGAGACCCCTAAC
miRs-184	GCGCGCTGGACGGAGA AACTGAT
miRs-196b	GCGCGCGCTAGGTAGTTTCCTGTT
miRs-205	GCGCTCCTTCATTCCACCGG
miRs-24-1	GCGCGCTGCCTACTGAGCTGAT

2 结果

2.1 芯片结果

应用 Agilent human miRs(8 * 60K) 芯片进行 miRs 表达谱芯片分析之后, 将芯片结果平均归一化, 以炎症组织样品作为对照, 得出鼻咽癌组织与对照组织的 miRs 差异表达谱。差异倍数大于 2 倍的人属 miRs 共有 144 种, 其中在鼻咽癌组织中高表达的有 44 种 (30.6%), 低表达的有 100 种 (69.4%)。并且不同样本间的芯片信号散点图说明各样本间的归一性较好 (图 1)。其中差异倍数在 10 倍以上的有 50 个, 见表 2。

2.2 分层聚类分析

我们对上述 3 组样品中存在显著变化 10 倍的 miRs 进行分层聚类分析, 如图 2 所示。在树型图中纵列自然分为 2 类, 前一列为验证对照组织, 后两列为鼻咽癌组织。横列分为 2 大类, 分析每一 miRs 在所有实验条件下的表达方式。表达方式有最多相同之处的被归为一类, 为上调、下调 2 大类。聚类图结果显示, 左侧 1 列聚为一类, 右侧 2 列聚为一类, 均为鼻咽癌组织标本, 两者的 miRs 呈完全相反的表达趋势。从纵向来看 miRs 的聚类, 功能相似的 miRs 被聚类在一起, 上调、下调差异 miRs 表达存在着明显的聚类性质不同。相关 miRs 被聚类在一起, 根据红、绿色彩的差异可看出炎症组与癌症组之间 miRs 表达的明显差异。提示鼻咽癌与炎症组织 miRs 表达存在着明显的聚类性质不同。

2.3 RT-QPCR 验证结果

用 RT-PCR 的方法对几种具有显著差异表达的 miRs 进行验证。结果显示, 鼻咽癌组织中 miRs-34b、miRs-449b、miRs-7-1 的表达显著下调, 而 miRs-125b、miRs-184、miRs-196b、miRs-205 及 miRs-24-1 的表达上调。RT-PCR 验证与芯片结果基本一致 (图 3)。

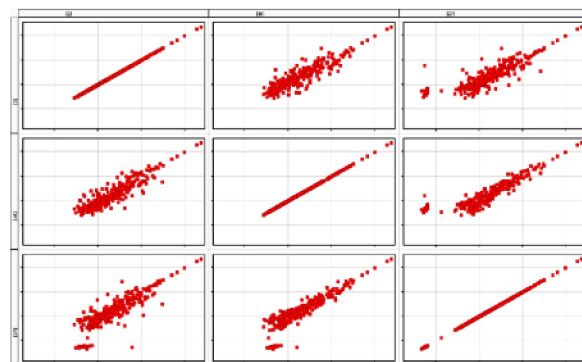


图 1 不同样品间的芯片信号散点图 各样品间的归一性较好。

表 2 鼻咽癌组织中 miRs 差异表达基因(≥10 倍)

miRs 表达	miRs 名称
高表达 10 倍以上(20 个)	miRs-125b-2, miRs-141, miRs-16-2, miRs-182, miRs-184, miRs-18b, miRs-193a-5p, miRs-196b, miRs-200a, miRs-205, miRs-205 *, miRs-224, miRs-23b *, miRs-24-1, miRs-378, miRs-4291, miRs-4317, miRs-455-5p, miRs-505, miRs-513a-5p
低表达 10 倍以上(30 个)	miRs-10a, miRs-1180, miRs-1273d, miRs-132, miRs-139-3p, miRs-143, miRs-145, miRs-150, miRs-152, miRs-181c, miRs-3180-5p, miRs-338-3p, miRs-34b, miRs-34b *, miRs-34c-3p, miRs-34c-5p, miRs-3607-5p, miRs-3609, miRs-3679-3p, miRs-449a, miRs-449b, miRs-486-5p, miRs-500a *, miRs-502-3p, miRs-532-3p, miRs-574-3p, miRs-628-5p, miRs-652, miRs-664, miRs-7-1 *, miRs-99b *

3 讨论

鼻咽癌在中国南方尤其是广东省发病率极高,以明显的区域分布特征、与病毒的密切关系以及常见的转移倾向显著区别于其他头颈部肿瘤。早期诊断对鼻咽癌的治疗至关重要,目前主要的治疗手段为放疗。鼻咽癌容易早期转移,但往往在肿瘤发展到中晚期才得以确诊与治疗,疗效较差,5 年生存率约为 60%。因此,探索鼻咽癌的肿瘤标志物和靶向分子,对鼻咽癌发病机制的进一步研究,寻找鼻咽癌基因诊断及治疗的新靶点,对鼻咽癌早期诊断与治疗具有重要的临床意义。

随着对肿瘤基因诊断与基因治疗研究的不断深入,miRs 已经获得科研工作者越来越多的关注。大量研究表明,异常表达的 miRs 与肿瘤的发生有极其密切的关联,如前列腺癌、乳腺癌、肾癌、肺癌等肿瘤都存在 miRs 异常表达的现象^[3-4]。异常表达的 miRs 通常通过使原癌基因活性增强(miRs 表达上调)或抑制抑癌基因(miRs 表达下调)引起肿瘤的发生和发展^[5]。在某些类型的白血病和淋巴瘤中 miRs-15 和 miRs-16 起着关键作用^[6]。不同来源的恶性肿瘤常常表现出不同的 miRs 表达谱;而一些 miRs 在不同肿瘤中明显过表达,在肺癌、淋巴瘤、胃癌、鼻咽癌、甲状腺未分化癌等全身多个肿瘤中发现了 miRs-17-92 的高表达^[7-8]。近年来,越来越多的研究发现 miRs 的异常表达与鼻咽癌的发病和进展密切相关。如 Sengupta 等^[9]采用基因芯片技术发现了 8 个明显表达异常的 miRs,其中 miRs-29c 的表达量仅有正常鼻咽上皮细胞的 1/5,miRs-29c 表达下调与多个 mRNA 的高表达相关,其靶基因大多数编码细胞外基质蛋白,而这些蛋白和肿瘤的侵袭及转移潜能相关,提示 miRs-29c 很可能在鼻咽癌的转移中发挥重要作用。目前对鼻咽癌中 miRs 的调控研究仍处于初级阶段,临床应用方面,miRs 靶向分子药物和外周血 miRs 的检测也未见报道。

随着基因检测技术的发展,肿瘤 miRs 表达谱的检测有了较为成熟的技术平台。本研究主要通过 miRs 表达谱芯片这种高通量表达谱分析,采用

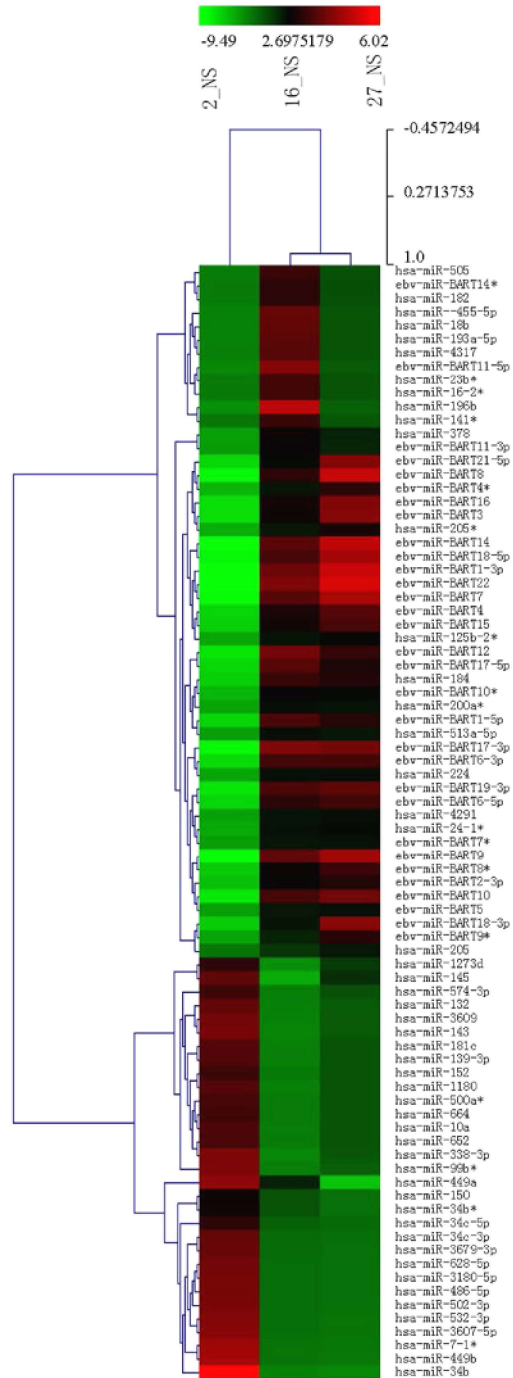
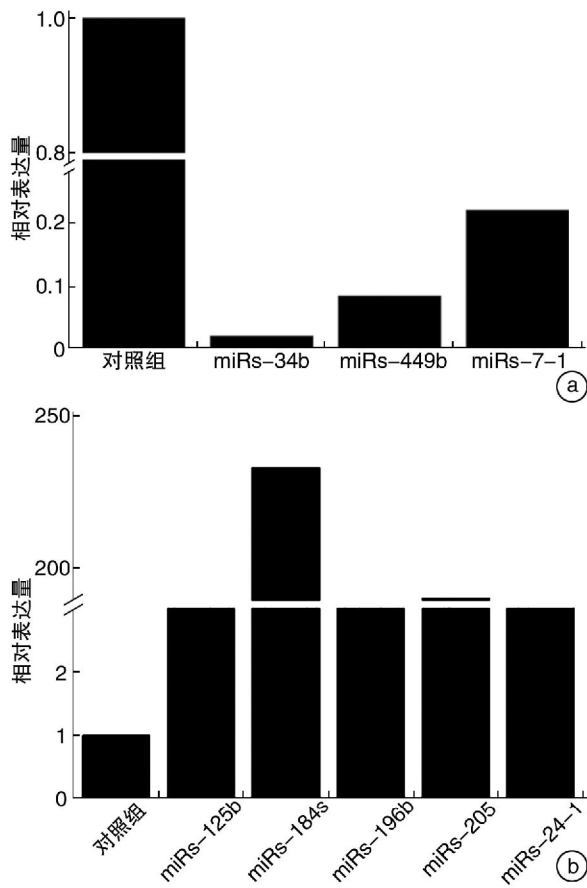


图 2 鼻咽癌组织和炎症组织差异表达 miRs 聚类分析



a:显著降低的 miRs 表达验证;b:显著增高的 miRs 表达验证。

图 3 RT-QPCR 验证结果

大规模微阵列技术,筛选 3 组鼻咽癌及炎症组织对照中差异表达的 miRs;继而再用 RT-QPCR 方法验证新芯片筛选结果的可信性,以期为鼻咽癌的早期诊断及治疗提供有效的靶向治疗依据,并为后期的生物信息学分析和一系列针对调控机制的深入研究打下了坚实的基础。

芯片结果共发现了表达差异倍数大于 2 倍的 miRs 144 种,其中在鼻咽癌组织中高表达的 miRs 有 44 种,低表达的有 100 种。除此之外,我们利用 RT-QPCR 技术验证几种具有显著差异表达的 miRs,发现 miRs-34b、miRs-449b、miRs-7-1 在鼻咽癌组织中的表达显著下调,而 miRs-125b、miRs-184、miRs-196b、miRs-205 及 miRs-24-1 的表达却明显升高,此结果与芯片结果基本一致,说明芯片结果可信。由此,我们可以大致推测,miRs 与鼻咽癌之间也存在着极其错综复杂的关联,某些异常高表达或低表达的 miRs 可能成为鼻咽癌早期诊断及监测的潜在标志物,也有可能直接或间接地影响了鼻咽癌的发生及发展。

Liu 等^[10]研究发现与非鼻咽癌组织相比,鼻咽癌组织中有 41 种表达异常的 miRs。并且 Luo 等^[11]的研究证明,miRs-149 在鼻咽癌细胞系中的

表达量显著高于正常的鼻咽上皮细胞,miRs-149 通过调控上皮细胞转型而影响了鼻咽癌的侵袭和转移,不仅明显促进了鼻咽癌细胞的增殖和迁移,还显著抑制了鼻咽癌细胞的凋亡。尽管本研究对鼻咽癌的 miRs 表达谱进行了初步鉴定并验证,但目前关于 miRs 在鼻咽癌中的功能研究仍处在初步阶段,关于 miRs 影响鼻咽癌发生、发展的具体机制还不是非常明确,需要继续深入研究。

参考文献

- [1] ZENG Y, CULLEN B R. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells [J]. RNA, 2003, 9: 112-123.
- [2] CALIN G A, SEVIGNANI C, DUMITRU C D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 2999-3004.
- [3] CHOW T F, YOUSSEF Y M, LIANIDOU E, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis [J]. Clin Biochem, 2009, 43: 150-158.
- [4] SCHAEFER A, JUNG M, KRISTIANSEN G, et al. MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology [J]. Urol Oncol, 2010, 28: 4-13.
- [5] EIRING A M, HARB J G, NEVIANI P, et al. miRs-328 function as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA translation in leukemic blasts [J]. Cell, 2010, 140: 652-665.
- [6] CALIN G A, DUMITRU C D, SHIMIZU M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miRs-15 and miRs16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 15524-15529.
- [7] HAYASHITA Y, OSADA H, TATEMATSU Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miRs-17-92, is over-expressed in human lung cancers and enhances cell proliferation [J]. Cancer Res, 2005, 65: 9628-9632.
- [8] CHEN H C, CHEN G H, CHEN Y H, et al. MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma [J]. Br J Cancer, 2009, 100: 1002-1011.
- [9] SENGUPTA S, DENBOON J A, CHEN I H, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 5874-5878.
- [10] LIU N, CHEN N Y, CUI R X, et al. Prognostic value of a microRNA signature in nasopharyngeal carcinoma: a microRNA expression analysis [J]. Lancet Oncol, 2012, 6, 13: 633-641.
- [11] LUO Z, ZHANG L, LI Z, et al. miRs-149 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2011, 7: 604-609.

(收稿日期:2014-03-19)