

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.013

大规模平行测序技术筛选人肾细胞癌组织中差异表达 microRNAs 及其验证

翟庆娜^{1,2}, 周亮³, 余振东^{1△}, 唐爱发³, 王勇³, 桂耀庭³(1. 北京大学深圳医院检验科, 广东深圳518036; 2. 汕头大学医学院临床检验诊断学教研室, 广东汕头515031; 3. 北京大学深圳医院男性生殖与遗传学省重点实验室, 广东深圳518036)

[摘要] 目的: 以大规模平行测序技术(massively parallel signature sequencing, MPSS)筛选人肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)和癌旁组织中差异表达的microRNAs(miRNAs), 并验证差异表达miRNAs之一的miR-660在人RCC中的表达。方法: MPSS检测10例RCC组织及相应癌旁组织中miRNAs的表达, 筛选RCC组织中差异表达miRNAs。RT-PCR检测5例RCC与癌旁组织中miR-660的表达, qPCR检测40例RCC与癌旁组织中miR-660的表达。结果: MPSS结果显示, RCC组织中283个miRNAs表达下调, 187个表达上调, 其中miR-660在RCC组织中表达量是癌旁组织的17.5%。RT-PCR初步验证了此结果; qPCR验证结果显示, 40例RCC组织中33例miR-660表达显著低于癌旁组织, RCC组织中miR-660平均表达量是癌旁的19.5%。结论: 人RCC组织中283个miRNAs表达下调, 187个上调。miR-660在RCC组织中低表达, 有可能成为RCC诊断及治疗的新靶点。

[关键词] 肾细胞癌; microRNAs; 大规模平行测序技术; miR-660

[中图分类号] R737.11; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0306-06

Massively parallel signature sequencing in screening differentially expressed microRNAs in human renal cell carcinoma tissues and their identification

ZHAI Qing-na^{1,2}, ZHOU Liang³, YU Zhen-dong¹, TANG Ai-fa³, WANG Yong³, GUI Yao-ting^{3△}(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Hospital of Peking University, Shenzhen 518036, Guangdong, China; 2. Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Shantou University Medical College, Shantou 515031, Guangdong, China; 3. Key Laboratory of Male Reproductive Medicine and Genetics in Guangdong, Shenzhen Hospital of Peking University, Shenzhen 518036, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To screen differentially expressed microRNAs (miRNAs) in tumor and the corresponding paracancerous tissues of renal cell carcinoma (RCC) by massively parallel signature sequencing (MPSS), and to identify the expression of miR-660 in RCC. **Methods:** The expression of miRNAs in tumor and the corresponding paracancerous tissues of 10 RCC patients was examined by MPSS, and the differentially expressed miRNAs were screened. Expression of miR-660 in tumor tissues of 5 patients and the paracancerous tissues of 40 RCC patients were further examined by RT-PCR and qPCR, respectively. **Results:** The MPSS results showed that 283 miRNAs were up-regulated and 187 were down-regulated in RCC tissues, and the expression level of miR-660 in RCC tissues was only 19.5% of that in the paracancerous tissues. The MPSS results were primarily confirmed by RT-PCR, and qPCR results further showed that miR-660 expression in 34 of 40 RCC tissues was significantly lower than that in the paracancerous tissues, with the average level being only 11.7% of that in the paracancerous tissues. **Conclusion:** A total of 283 miRNAs are up-regulated and 187 down-regulated in RCC tissues; and miR-660 is lowly expressed in RCC, which may be a new target for the diagnosis and treatment of RCC.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30900817); 深港创新圈项目资助(No. ZYB200907080110A)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 900817), and the Shenzhen-HongKong Innovation Circle Project (No. ZYB200907080110A)

[作者简介] 翟庆娜(1984-), 女, 河北石家庄人, 硕士生, 主要从事泌尿系肿瘤的基础研究。E-mail: zhqn123@126.com

[通信作者] 余振东(YU Zhen-dong, corresponding author), E-mail: dongboyaa@yahoo.com.cn; 桂耀庭(GUI Yao-ting, corresponding author), E-mail: dongboyaa@yahoo.com.cn。△共同通信作者

[**Key words**] renal cell carcinoma; microRNA; massively parallel signature sequencing (MPSS); miR-660
[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 306-310]

MicroRNAs(miRNAs)是一类分布广泛的非编码小 RNA,其功能是通过 DNA 甲基化、mRNA 靶向调节等机制来调控靶基因,如肿瘤抑制基因或癌基因的表达^[1-3]。miRNAs 突变或者异常表达与多种人类癌症相关,如在肾细胞癌中发现了一些 miRNAs 的异常表达,这些异常表达的 miRNAs 有可能在癌症的早期诊断和治疗中起重要作用^[4-7]。有报道^[8]显示,miR-660 在人白血病细胞中表达下调,经 4-羟基壬烯酸(4-hydroxynonenal, HNE)处理后表达上调,提示其可能与白血病的发生相关。但是,至今尚未见 miR-660 与泌尿系统肿瘤相关的报道。本研究利用第二代大规模平行测序技术对 10 例肾细胞癌及其对应癌旁组织进行了全基因组测序,筛查差异表达的 miRNAs,同时采用 qPCR 方法验证表达下调的 miR-660 在肾细胞癌组织中的表达情况,为 miR-660 进一步的功能研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本采集

40 例人肾细胞癌及其对应癌旁组织标本主要来源于广东、湖南、安徽和海南等各大医院肾细胞癌患者,所取标本均经过伦理委员会批准和患者知情同意,并签署知情同意书。

手术中采集的组织立即保存于液氮和 RNA later 试剂中。所取组织均已病理切片验证为肾细胞癌组织及相应癌旁正常组织,其中癌旁组织距离癌灶边缘大于 5 cm。40 例肾细胞癌患者的临床资料见表 1。

RNA 提取试剂盒、miScript 反转录试剂盒和 miScript SYBR Green PCR 试剂盒均购自德国 Qiagen 公司,RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司。普通 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司,荧光定量 PCR 仪(ABI PRISM 7000)购自美国 ABI 公司。

1.2 大规模平行测序检测肾细胞癌组织与癌旁组织差异表达的 miRNAs

利用 miRNAs 测序技术筛查 10 例肾细胞癌患者癌组织与癌旁组织差异表达的 miRNAs,得到一组新的 miRNAs,可能存在部分未知的 miRNAs。5 μg 总 RNA 经过 Superscript II 逆转录后进行 PCR 扩增,扩增产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,纯化出 92 bp DNA,用 Illumina Cluster Station 和 Genome Analyzer II 进行 miRNAs 序列分析,先筛选出

合适的序列,用 SOAP V2.0 软件分析识别各个序列标记,查阅 UCSC RefGene、RepeatMasker 和 NCBI 数据库资料以鉴别测得的序列。已知 miRNAs 由 MI-RANDA 数据库查得,新 miRNAs 用 RNAhybrid 和 Classify SVM 软件预测。

表 1 40 例肾细胞癌患者的临床资料

Tab. 1 Clinical data of 40 renal cell carcinoma patients

Sex	Tumor stage	Tumor stage				Total
		T1	T2	T3	T4	
Male	≤20	0	1	0	0	1
	21 ~ 40	4	1	0	1	6
	41 ~ 60	3	9	0	1	13
	>60	3	2	0	0	5
Female	≤20	0	1	0	0	1
	21 ~ 40	4	2	1	0	7
	41 ~ 60	2	2	1	0	5
	>60	1	1	0	0	2
Total		17	19	2	2	40

1.3 RT-PCR 检测癌及癌旁组织 miR-660 表达

用 RNeasy Protect Mini 试剂盒(Qiagen,德国)提取储存于液氮中 5 例患者的肾细胞癌标本及癌旁正常组织标本中的总 RNA,用 1.5% 琼脂糖凝胶上样电泳,紫外照胶仪下观察 RNA 的完整性。miR-660 上游引物为 5'-TACCCATTGCATATCGGAGTTG-3',下游引物为 miScript SYBR Green PCR Kit 试剂盒提供的通用引物。内参 U6 上游引物为 5'-CTCGCT-TCGGCAGCACA-3',下游引物为 5'-ACGCT-TCACGAATTTG CGT-3'。引物由 Invetrigen 公司合成。根据试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应。逆转录的条件为 37 ℃、1 h,95 ℃、5 min。PCR 条件:95 ℃、5 min,94 ℃、30 s,55 ℃、30 s,70 ℃、30 s,35 个循环;72 ℃、5 min。用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析,紫外照胶仪下观察条带。

1.4 定量 PCR 检测癌及癌旁组织 miR-660 表达

逆转录合成的 cDNA 作为模板,进行定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)扩增,确证 miR-660 在 40 例患者肾细胞癌组织中的表达。qPCR 应用 miScript SYBR Green PCR 试剂盒在荧光定量

PCR 系统中进行。miR-660 引物序列同 RT-PCR, 扩增条件为: 95 °C、15 min, 94 °C、15 s, 55 °C、30 s, 70 °C、30 s, 40 个循环; 20 μl 反应体系; 结果用 ABI 自带软件分析。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 软件, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾细胞癌及癌旁组织中差异表达的 miRNAs

利用大规模平行测序技术对 10 例肾细胞癌及其癌旁组织中的 miRNAs 进行序列分析, 并检测其表达差异。结果显示, 与癌旁组织相比, 肾细胞癌组织中发现 283 个表达下调和 187 个表达上调的 miRNAs, 上调或下调倍数不等(图 1)。其中 miR-660 定位于 Xp11.23 脆性位点, 在肾细胞癌中表达下调, 癌组织中表达量是癌旁组织的 17.5%。

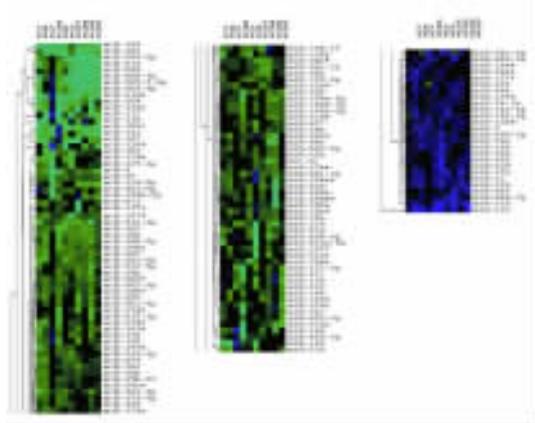


图 1 10 例肾细胞癌及癌旁组织中 miRNAs 表达的聚类分析

Fig. 1 Hierarchical cluster analysis of differentially expressed miRNAs in tumor and paracancerous tissues of 10 patients with renal cell carcinoma

2.3 RT-PCR 验证肾细胞癌组织中 miR-660 的表达

RT-PCR 结果(图 2)显示, miR-660 条带电泳所在位置符合其大小, 肾细胞癌组织中的 miR-660 比癌旁组织中亮度略暗, 提示肾细胞癌组织中 miR-660 的表达低于癌旁组织。

2.4 qPCR 验证肾细胞癌组织中 miR-660 的表达

将大规模平行测序技术检测的 10 例患者的标本进行 qPCR 检测验证, 10 例测序样本的 qPCR 验证结果与大规模平行测序结果一致, 肾细胞癌组织

miR-660 表达的 ΔCT 值为 10.76 ± 3.84 , 癌旁组织 ΔCT 值为 7.21 ± 3.41 , 肾细胞癌组织中 miR-660 表达量是癌旁组织中的 8.6%(图 3)。

以 qPCR 检测全部 40 例样本中, 肾细胞癌组织 miR-660 表达 ΔCT 值为 9.19 ± 3.84 , 癌旁组织 ΔCT 值为 6.87 ± 3.44 , 肾细胞癌组织中 miR-660 表达量是癌旁组织中的 19.5%。40 例标本中有 33 例(82.5%)肾细胞癌标本中 miR-660 表达量明显低于其癌旁组织中的表达, 最大下调了 98%, 最小下调了 60%, 仅有 7 例(17.5%)肾细胞癌标本中 miR-660 表达高于其癌旁组织。将肾细胞癌组织与相应癌旁组织的 ΔCT 值进行 *t* 检验, 结果显示, miR-660 在肾细胞癌中表达显著降低($P < 0.05$)。

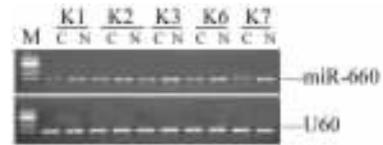


图 2 RT-PCR 检测 5 例肾细胞癌(C)及癌旁组织(N)中 miR-660 的表达

Fig. 2 RT-PCR analysis of miR-660 expression in tumor and paracancerous tissues of 5 renal cell carcinoma patients

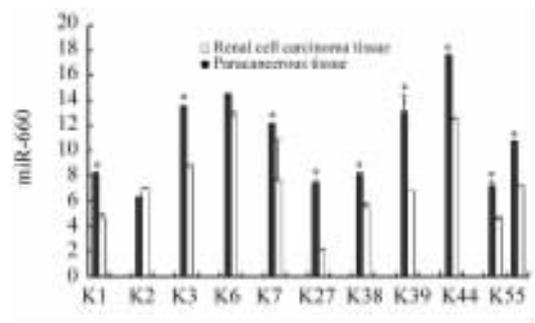


图 3 qPCR 检测 10 例肾细胞癌及癌旁组织中 miR-660 的表达

Fig. 3 qPCR analysis of miR-660 expression in tumor and paracancerous tissues of 10 renal cell carcinoma patients

* $P < 0.05$ vs renal cell carcinoma tissue

3 讨论

肾细胞癌是一种高致死性泌尿生殖道肿瘤。目前, 中国男性肾细胞癌的发病率为 4.7/10 万, 女性为 3/10 万左右, 是泌尿系统第二大肿瘤, 而且发病率每年增长 2.5%^[10]。虽然, 近年来肾细胞癌在影像学诊断、外科治疗和基础分子生物学研究领域取

得一定进展,但是大量肾细胞癌患者还是发生肿瘤转移。对于肾细胞癌转移患者,常规治疗的应答率较低($<25\%$)且伴有严重的毒性作用^[11]。免疫治疗近期虽然取得了一定研究进展,但由于肿瘤发生机制尚未完全明了。除少部分肿瘤的免疫原性较强外,绝大部分肿瘤免疫原性极弱,且与正常组织有交叉,给免疫治疗带来很多困难。

肾细胞癌的发生与多种因素有关,包括环境、病毒、基因突变等。肾细胞癌相关分子标志物的研究是一个热点。目前已经发现多种因子与肾细胞癌的发生、发展、患者疗效及预后评价有关,并有望与肾肿瘤分期和预后判断模型相结合以提高应用价值。多种分子标记物相继被发现,并用于肾细胞癌的诊断和预后判断^[12]。但是,这些独立存在的分子的预后标志物敏感性、特异性和实用性不够,局限了其临床应用。经生物信息学^[13]分析发现,miR-17-92家族在肾细胞癌中表达上调,转染 miR-17-92 后能促进肾细胞癌细胞的增殖,具有致癌作用。Ondrej 等^[14]发现,miRNAs-106b 的表达与肾细胞癌患者术后转移和无病生存率存在联系。同样,Hildebrandt 等^[15]发现,hsa-miR-9 参与肾透明细胞癌的发展并在其转移和复发中发挥重要作用。Imam 等^[16]报道了 miRNAs-185 通过抑制 Six1 的表达,抑制包括肾细胞癌在内的多种肿瘤的生长和恶化。miRNAs 的研究有望成为指导肾细胞癌诊断及治疗新药物的靶点。

大规模平行测序技术是一项新的 miRNAs 测序技术,具有 miRNAs 芯片技术无可比拟的优势,它是一种高通量、高分辨率、高精度和发现型的技术平台,能检测一切存在的 miRNAs,包括已知和未知的,而芯片只能检测已知的 miRNAs^[17]。本项研究利用大规模平行测序技术筛选发现,在肾细胞癌组织中有 283 个表达下调和 187 个表达上调的 miRNAs,其中还可能存在部分未知的 miRNAs,为今后的肾细胞癌临床和基础研究奠定了基础。

流行病学调查^[18]显示,肾细胞癌发病的男女之比约为 2:1,考虑肾细胞癌可能与男性 X 染色体上的某些基因突变有关。对测序结果分析后发现,miR-660 在肾细胞癌中的表达低于相应癌旁组织中,由于 miR-660 基因定位于 Xp11.23 脆性位点,推测其可能和肾细胞癌的发病相关。于是进一步利用 RT-PCR 和 qPCR 方法对筛查到的差异表达的 miR-660 进行了验证,证实肾细胞癌中 miR-660 的表达下调。在人白血病 HL-60 细胞的研究^[19]中,miR-

660 表达下调,本研究也发现 miR-660 在肾细胞癌中表达下调。生物信息学分析发现,对应的多个靶基因,如 YWHAH 等表达出现上调;有报道^[20] YWHAH 上调可促进肿瘤的发生,其机制可能与其调控细胞周期和细胞分裂等信号转导通路、抑制细胞凋亡有关,但具体机制有待进一步研究。另外,miR-660 与 YWHAH 的靶向关系以及调节机制也需要深入研究。

[参考文献]

- [1] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Med*, 2009, 60(1): 167-179.
- [2] Kim VN. MicroRNAs biogenesis: Coordinated cropping and dicing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(5): 376-385.
- [3] Agami R. microRNAs, RNA binding proteins and cancer [J]. *Eur J Clin Invest*, 2010, 40(4): 370-374.
- [4] Gottardo FL, Ferracin CG. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers [J]. *Urol Oncol*, 2007, 25(5): 387-392.
- [5] Huang Y, Dai Y, Yang J, et al. Microarray analysis of microRNAs expression in renal clear cell carcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2009, 35(10): 1119-1123.
- [6] Jung M, Mollenkopf HJ, Grimm C. MicroRNAs profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(9B): 3918-3922.
- [7] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease [J]. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 441-450.
- [8] Pizzimenti S, Ferracin M, Sabbioni S, et al. MicroRNAs expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(2): 282-288.
- [9] György H, Martin JS, Craig C, et al. Sequence-specific inhibition of small RNA function [J]. *PLoS Boily*, 2004, 2(4): 465-475.
- [10] 张骞, 金杰, 陶谦. 抑癌基因甲基化在肾细胞癌研究中的进展 [J]. *癌症*, 2007, 26(11): 1276-1280.
- [11] 冯晓莉, 何群, 陆敏, 等. 泌尿系统及男性生殖器官肿瘤病理学和遗传学(译)[M]. 人民卫生出版社, 2006: 16-19.
- [12] 管考鹏, 李长岭. 肾细胞癌相关分子标志物研究现状及进展 [J]. *癌症进展杂志*, 2007, 5(6): 525-530.
- [13] Chow TF, Mankarous M, Scorilas A, et al. The miR-17-92 cluster is over expressed in and has an oncogenic effect on renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 2010, 183(2): 743-751.
- [14] Ondrej S, Jana J, Radek L, et al. Expression of miRNAs-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 90.
- [15] Hildebrandt MA, Gu J, Lin J, et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in

- patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29(42): 5724-5728.
- [16] Imam JS, Buddavarapu K, Lee-Chang JS, et al. MicroRNAs-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers [J]. *Oncogene*, 2010, 29(35): 4971-4979.
- [17] Morrissy AS, Morin RD, Delaney A, et al. Next-generation tag sequencing for cancer gene expression profiling [J]. *Genome Res*, 2009, 19(10): 1825-1835.
- [18] 吴瑜璇, 苗文斌, 张钟宇, 等. 肾脏恶性肿瘤 286 例临床分析 [J]. *中华肿瘤杂志*, 28(5): 400.
- [19] Pizzimenti S, Ferracin M, Sabbioni S, et al. MicroRNAs expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(2): 282-288.
- [20] Hong N, Seung MS, Hyun KK, et al. The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein [J]. *BMC Cancer*, 2006, 6(1): 74.
- [收稿日期] 2011-02-18 [修回日期] 2011-03-20
[本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

抗癌药物: 阻断磷脂与蛋白质的相互作用

磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)信号转导在肿瘤中经常发生异常,因此很多治疗策略都聚焦在 PI3K 途径,侧重于下游靶分子如 Akt 的抑制剂等。Miao 的研究小组研究了一种新的调节途径,即通过阻断关键磷脂与蛋白质的相互作用,来抑制小鼠肿瘤模型中肿瘤的生长。

信号分子磷脂酰肌醇-3,4,5 三磷酸(PtdIns(3,4,5)),可通过与含有 PH 结构域的蛋白质发生相互作用来调控细胞的生长、增殖和存活。为了筛选该过程的抑制剂,作者对 50 000 个小分子进行了高通量筛选,发现两种化合物可破坏 PIP3 与 Akt 的 PH 结合域之间的相互作用,抑制浓度在微摩尔水平。作者进一步对其中一个化合物 PIT1 进行了鉴定,结果显示 PIT1 可以直接结合到 Akt 的 PH 结构域,而不是靶向到磷脂,而且 PIT1 的结合位点与 PIP3 的结合位点重叠。该抑制剂对 PIP3 特异性 PH 结构域的不同亚类有选择性,包括可与 PIP3 特异性结合的 Akt 和 PDK1 的 PH 结构域,但不影响 PIP2 选择性 PH 结构域。比较 Akt、PDK1 和 GRP1 的 PH 结构域的晶体结构,发现在 PIT1 的 R2 和 R3 位中的疏水集团可优先结合 Akt,而与 PDK1 及 GRP1 的结合性较差,表明该化合物抑制 PIP3 和 Akt 的 PH 结构域之间相互作用的选择性进行合理调节是可以实现的。

成胶质细胞瘤细胞由于 PTEN 基因突变导致 PIP3 的基础水平很高;而 PIT1 可抑制成胶质细胞瘤细胞中 PI3K-PDK1-Akt 依赖的磷酸化过程。在生长因子刺激的乳腺癌细胞中也观察到类似的效应。此外, PIT1 与几个先前报道的 Akt 抑制剂的作用机制不同,因此这几种抑制剂和联合使用。

该研究探讨了 PIT1 的潜在抗癌活性。PIT1 可降低多种肿瘤细胞的活力,与表达野生型 PTEN 的细胞相比,有高水平 PIP3 (也就是 PTEN 失活)的细胞优先死亡。PIT1 可造成能量平衡失调,包括导致肿瘤细胞的代谢应激和诱导自噬。在体内,一种 PIT1 的二甲基类似物(用于提高溶解度)可抑制乳腺癌小鼠模型中肿瘤的生长。

该研究筛查到的针对 PIP3-PH 结构域相互作用的新型小分子拮抗剂,可作为进一步优化的先导化合物。PIT1 不管单独应用还是与其他已知的 Akt 或 PI3K 抑制剂联合应用,对 PIP3 高表达的成胶质细胞瘤等多种肿瘤都会有效。

[徐安 摘译,李楠 审阅. Miao B, Skidan I, Yang J, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(46): 20126-20131.]