

· 论著 ·

MicroRNA-224 在肝癌 HepG2 细胞中的表达及其靶基因的预测分析

李琼 王阁 单锦露 陈川 张志敏 许文 雒喜忠 王东

【摘要】 目的 应用基因芯片技术研究 microRNA-224 在肝癌 HepG2 细胞中的表达,通过生物信息学预测其下游靶基因,并初步揭示其在肝癌发生过程中的作用。**方法** 利用基因芯片技术筛选得到和正常肝上皮 LO2 细胞比较差异表达的基因,通过生物信息学预测表达上调的 microRNA-224 的靶基因,并对其靶基因进行功能注释。**结果** 与 LO2 细胞比较,microRNA-224 在肝癌 HepG2 细胞中呈高表达。MicroRNA-224 预测靶基因有 264 个,其多个基因涉及细胞周期、信号转导、细胞增殖、细胞分化和细胞凋亡等众多生物学过程。**结论** MicroRNA-224 在肝癌 HepG2 细胞中呈现高表达,可能间接或直接地调控其下游靶基因表达,在肝癌发生过程中起着重要的作用。

【关键词】 MicroRNA-224; 基因芯片; 靶基因; 肝肿瘤

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A

Expression of microRNA-224 in HepG2 cells and analysis of its predicted target genes Li Qiong, WANG Ge, SHAN Jin-lu, CHEN Chuan, ZHANG Zhi-min, XU Wen, LUO Xi-zhong, WANG Dong. Cancer Center, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China
Corresponding author: WANG Ge, E-mail: wangge70@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of microRNA-224 in HepG2 cells and analyze its target genes to reveal its role in the carcinogenesis of hepatoma. **Methods** The genes with differential expression in HepG2 cells and LO2 cells were obtained by gene expression microarray analysis. The up-regulated target genes of microRNA-224 were predicted by bioinformatics method, and their functions were analyzed. **Results** Compared with LO2 cells, microRNA-224 was highly expressed in HepG2 cells. A total of 264 target genes of microRNA-224 were predicted, including genes involved in cell cycle, signal transduction, cell differentiation, proliferation and apoptosis. **Conclusions** MicroRNA-224 is highly expressed in HepG2 cells. MicroRNA-224 plays an important role in the carcinogenesis of hepatoma via regulating the expression of its target genes directly or indirectly.

【Key words】 MicroRNA-224; Gene chip; Target gene; Liver cancer

MicroRNA(miRNA)是一类在真核细胞中发现的长 20~24 nt 的小 RNA 分子,是由一段具有发夹样环状结构、长 70~80 nt 的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工生成。最近的研究发现,miRNA 在肝癌组织中的异常表达可能在肝细胞癌变的病理过程中起重要作用^[1]。本研究应用基因芯片技术,检测肝癌 HepG2 细胞和正常肝上皮 LO2 细胞中 miRNA 表达的差异谱,为进一步分析其调控的靶基因提供靶标。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570410,30370341);
全国优秀博士专项基金资助项目(200261)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心

通讯作者:王阁,E-mail: wangge70@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 试剂

肝癌 HepG2 细胞和正常肝上皮 LO2 细胞为本实验室冻存;细胞总 RNA 抽提试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;miRNA 分离试剂盒购自美国 Ambion 公司;荧光标记、芯片杂交、结果检测等在北京博奥生物芯片有限责任公司实验室进行,相关试剂与器材由该公司提供。利用靶基因预测软件 MIRANAD (<http://www.microrna.org>)并结合 Genbank 等数据库进行靶基因预测和分析。

1.2 基因表达谱的检测

基因表达谱的检测采用北京博奥生物芯片有限责任公司的哺乳动物 miRNA 芯片,其中包含 509 条探针,每条探针重复杂交 3 次,所有实验步骤严格按

照该公司的实验操作规程进行。

1.2.1 细胞 RNA 的提取和 miRNA 的分离:按细胞培养操作规程培养肝癌 HepG2 细胞和正常肝上皮 LO2 细胞,用 Trizol 一步法提取细胞中的总 RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,用分光光度计定量,甲醛变性凝胶电泳质检总 RNA 的质量。各自取 50 ~ 100 μ g 总 RNA 用 miRNA 分离试剂盒分离 miRNA。

1.2.2 miRNA 样品的荧光标记、杂交、清洗与扫描:利用 T4 RNA 连接酶标记法^[2]进行荧光标记,再用无水乙醇沉淀,吹干后用于芯片杂交。将标记好的 RNA 溶于 16 μ l 杂交液中(15% 甲酰胺;0.2% 十二烷基磺酸钠;3 $\times$ 标准柠檬酸盐溶液;50 $\times$ Denhardt 液),于 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交结束后,在 42 $^{\circ}$ C 左右含 0.2% 十二烷基磺酸钠,2 $\times$ 标准柠檬酸盐溶液的液体中洗 4 min,然后在 0.2 $\times$ 标准柠檬酸盐溶液中室温洗 4 min,甩干后用 LuxScan 10K/A 双通道激光扫描仪(北京博奥生物芯片有限责任公司)行芯片扫描。

1.2.3 图像与数据分析:LuxScan3.0 图像分析软件对芯片图像进行分析,所得数据用 Significance Analysis of Microarrays (SAM, version 2.1) 软件挑选差异表达基因。筛选条件为:FDR (False Discovery Rate) 控制在 5% 以内,倍数变化不低于 2 倍。

1.3 生物信息学预测 miRNA-224 靶基因

选用 MIRANAD 靶基因预测软件对肝癌细胞中上调的 miRNA-224 的 5' 端序列搜索靶基因,寻找 miRNA-224 可能在 mRNA 水平起作用的下游靶基因。并结合 Genbank 数据库分别对其预测的部分靶基因进行分析。

2 结果

2.1 基因芯片表达谱分析结果

143 个 miRNA 在肝癌 HepG2 细胞中表达,其中 66 个上调和 77 个下调。在肝癌 HepG2 细胞和正常肝上皮 LO2 细胞中表达差异较明显的部分上调和下调 miRNA 见表 1。

2.2 miRNA-224 靶基因的生物信息学预测和主要功能分析

根据文献[1],我们从基因芯片分析结果中挑选了在肝癌 HepG2 细胞和在肝癌组织中表达均上调的 miRNA-224。用 MIRANAD 对 miRNA-224 的靶基因进行预测,发现靶基因有 264 个,结合 Genbank 数据库得到相关靶基因的信息。预测的结果显示:miRNA-224 调节的靶基因范围非常广泛,包括与细

胞周期、增殖和凋亡相关基因、原癌基因(Ras、Bcl-2 等)、抑癌基因(DPH1 等)、细胞信号和转导蛋白基因、结缔组织生长因子等各个方面。见表 2。

表 1 在肝癌 HepG2 细胞和正常肝上皮 LO2 细胞中部分差异表达的 miRNA

miRNA 名称	倍数变化	miRNA 名称	倍数变化
表达上调		表达下调	
hsa-miRNA-15b	19.540	hsa-miRNA-122a	0.027
hsa-miRNA-301	14.687	hsa-miRNA-451	0.087
hsa-miRNA-193a	7.210	hsa-miRNA-370	0.151
hsa-let-7e	6.871	hsa-miRNA-198	0.175
hsa-miRNA-28	6.368	hsa-miRNA-520e	0.188
hsa-miRNA-424	6.333	hsa-miRNA-202	0.199
hsa-miRNA-18b	6.271	hsa-miRNA-134	0.215
hsa-miRNA-148b	5.734	hsa-miRNA-520b	0.220
hsa-miRNA-18a	5.673	hsa-miRNA-523	0.243
hsa-miRNA-224	5.139	hsa-miRNA-373	0.456

表 2 MIRANAD 预测 miRNA-224 的部分靶基因

基因 ID	基因符号	基因名称
90427	BMF	Bcl-2 修饰因子
10018	BCL2L11	Bcl-2 样 11(细胞凋亡协助者)
3026	HABP2	透明质酸相关蛋白
1021	CDK6	周期素依赖性激酶 6
1025	CDK9	周期素依赖性激酶 9
10298	PAK4	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 4
1801	DPH1	白喉酰胺合成样蛋白 1
5916	RARG	视黄酸受体 γ
8200	GDF5	生长分化因子 5
7126	TNFAIP1	TNF- α 诱导蛋白 1
2564	GABRE	γ -氨基丁酸受体
831	CAST	钙蛋白酶抑制剂
1649	DDIT3	DNA 损伤诱导的转录因子 3
1490	CTGF	结缔组织生长因子

3 讨论

miRNA 对其靶基因表达起着负性调控的作用。miRNA 通过两种方式与靶 mRNA 结合:一是当两者完全互补时,其作用方式类似于 RNA 干扰,即与完全互补的同源 mRNA 配对结合,导致靶 mRNA 降解;二是当两者不完全互补时,则通过与靶 mRNA 的 3' 端非翻译区不完全匹配结合,抑制其 mRNA 的翻译,这种方式在大多数动物中起主要作用。近年来的多项研究发现,许多 miRNA 在不同肿瘤组织中的表达水平有不同程度上调或下调,说明肿瘤发生与 miRNA 表达之间存在着一定的相关性^[3-8]。

大量研究已证实,miRNA 的异常表达与肿瘤发生关系密切,并且在不同的肿瘤组织中有着不同的 miRNA 表达谱,但目前对 miRNA 的具体作用机制认识有限。研究 miRNA 作用机制的关键是能准确预测 miRNA 的靶基因和正确认识 miRNA 及其靶基因的相互作用。本研究利用基因芯片技术,发现与正常肝上皮 LO2 细胞比较,肝癌 HepG2 细胞中有 143 个 miRNA 表达,其中包括 66 个表达上调和 77 个表达下调。从表达差异的 miRNA 里挑选出在肝癌 HepG2 细胞和在肝癌组织中均呈现一致高表达的 miRNA-224,提示 miRNA-224 可能在维持肝癌组织及细胞恶性表型中起关键作用。通过生物信息学方法对 miRNA-224 的靶基因进行预测,结果显示其调节靶基因包括与细胞周期、增殖和凋亡相关基因、原癌基因、抑癌基因、细胞信号和转导蛋白基因、结缔组织生长因子等,涉及肿瘤发生、发展的多个方面。这说明高表达的 miRNA-224 是肝癌发生、发展过程中的重要分子事件。DPH1 和 PAK4 就是预测的靶基因之一。DPH1 又名卵巢癌抑癌基因 1,是 1996 年 Schultz 等通过定位克隆和等位基因丢失谱等研究方法发现的与肝癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌等多种肿瘤有关的抑癌基因,定位于人染色体一个高度保守的区域 17p13.3,与 p53 基因位于同一染色体上。有研究发现,DPH1 与 p53 抑癌基因有着密切的联系^[9]。PAK4 为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 4,又名 p21 活化激酶,它位于人第 19 号染色体上,大小约为 54 kb。PAK 是一类进化上保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为 Rho 家族小 G 蛋白三磷酸酶(Rho-GTPase)Cdc42 和 Rac 下游重要的靶蛋白,参与许多重要的细胞活动^[10]。PAK4 是最新发现的 PAK 家族中的一员,也是目前研究的最为广泛的 II 类 PAK,是生物学界新近发现的一种细胞信号转导领域中的重要因子。研究发现,PAK4 是 Cdc42 的一个靶点,对细胞癌变和 Ras 驱动的肿瘤细胞不依赖性贴壁生长具有极其重要的影响,同时也是角化

细胞生长因子抵抗上皮细胞癌化过程中的一种重要的调节因子^[11]。

总之,在肝癌组织和肝癌 HepG2 细胞中均呈现高表达的 miRNA-224 可能通过其下游的靶基因直接或间接地在肝癌的发生过程中发挥着重要作用。

参考文献

- [1] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2537 - 2545.
- [2] Thomson JM, Parker J, Perou CM, et al. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods*, 2004, 1(1): 47 - 53.
- [3] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753 - 3756.
- [4] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 2005, 120(5): 635 - 647.
- [5] Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 2006, 124(6): 1169 - 1181.
- [6] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(39): 13944 - 13949.
- [7] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, 435(7043): 828 - 833.
- [8] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6092 - 6099.
- [9] Chen CM, Behringer RR. Ovc1 regulates cell proliferation, embryonic development, and tumorigenesis. *Genes Dev*, 2004, 18(3): 320 - 332.
- [10] Eswaran J, Lee WH, Debreczeni JE, et al. Crystal structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs. *Structure*, 2007, 15(2): 201 - 213.
- [11] Qu J, Li X, Novitsch BG, et al. PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development. *Mol Cell Bio*, 2003, 23(20): 7122 - 7133.

(收稿日期: 2007-11-06)

(本文编辑: 张昊)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊新增 5 名国际编委

为了促进本刊的发展,深入开展国际学术交流,经中华医学会批准,法国 Henri Bismuth、澳大利亚 Christopher Christophi、Robert McLaren Jones、日本 Masato Nagino、Keiichi Kubota 五名教授担任本刊第一届编辑委员会的国际编委。