

调控人脑胶质瘤中 ezrin 表达的 miRNAs 筛选及鉴定

徐小琳¹ 江海波² 盛莉莉³ 葛瑞祥² 沈 军² 毛 捷²

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 1.循证医学教研室; 2.神经外科; 3.肿瘤科,安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨调控人脑胶质瘤中 ezrin 的 miRNAs 筛选及鉴定。方法: 针对 ezrin 的测序序列, 在线使用 TargetScan、PI-TA、MicroRNA.org、miRgator v2.0、miRDB 等 5 种生物信息学软件预测分析可能调控 ezrin 的 miRNA 分子, 运用荧光素酶报告载体实验检测筛选候选 miRNA 分子, RT-PCR 检测 11 例胶质瘤组织和 10 例正常组织中候选 miRNA 分子 mRNA 的表达。结果: 5 种生物信息学软件预测出 819 个可能调控 ezrin 的 miRNAs, 根据评分结果同时结合目前国内外研究成果筛选出 miR-148a、-204、-205、-34b、-370、-376b、-377、-410、-495、-548a-3p、-630 和 -96 等 12 个 miRNAs。双荧光素酶质粒与 ezrin 3'-UTR 作用位点突变体实验, 证实 hsa-miR-204 与相应作用位点突变体 EZR 204 Mutant 无明显作用 ($P>0.05$)。RT-PCR 结果显示 miR-204 在脑胶质瘤组织中的表达低于正常脑组织, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。结论: 胶质瘤组织中 miR-204 可通过靶向调控 ezrin 表达发挥生物学作用。

【关键词】miR-204; ezrin; 胶质瘤; 荧光素酶报告载体; 生物信息学

【中图分类号】R 739.41 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2017.05.006

Screening and identification of microRNAs targeting ezrin in human glioma

XU Xiaolin, JIANG Haibo, SHENG Lili, GE Ruixiang, SHEN Jun, MAO Jie

Department of Evidence-based Medicine, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To screen and identify microRNAs targeting ezrin in human glioma. **Methods:** On-line software, including TargetScan, PITA, microRNA.org, miRgator v2.0 and miRDB, were used to predict potential microRNAs capable of regulating ezrin expression. Dual Luciferase Reporter Assay System was used to determine the luciferase activity of the candidate microRNA genes, and real-time PCR, to detect the mRNA values of the candidate microRNAs in the samples obtained from 11 cases of glioma and brain tissues from 10 healthy subjects. **Results:** The candidate microRNAs, including miR-148a, -204, -205, -34b, -370, -376b, -377, -410, -495, -548a-3p, -630 and -96 were selected from 819 potential microRNAs that were predicted to regulate the expression of ezrin. DNA constructs expressing the miRNA precursors were co-transfected with pLUC-ezrin 3'-UTR, and the results indicated that only transfection with miR-204 expression vector significantly down-regulated the luciferase activity compared to transfection with an empty vector ($P>0.05$), whereas real-time PCR demonstrated that miR-204 expression was significantly lower than that in samples from non-gliomas samples ($P<0.01$). **Conclusion:** MiR-204 in human glioma can direct regulation of ezrin gene, yet correlation and mechanisms of the two proteins need further investigation.

【Key words】 microRNA-204; ezrin; glioma; luciferase reporter vector; bioinformatics

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,占颅内肿瘤的30%~40%,最新的统计结果表明,临床上不论采用何种治疗手段,胶质母细胞瘤患者2年和5年生存率分别为27.2%和9.8%,平均生存期为14.6月^[1]。目前,寻找有效的治疗靶点是能否根治胶质瘤的关键。前期研究发现,ezrin在肿瘤中的表达水平与人脑胶质瘤的恶性程度、复发转移及预后密切相关^[2]。然而,ezrin在胶质瘤中过表达的机制仍不清楚。miRNA是内源性非编码小分子单链RNA,通

过不完全互补的碱基配对方式与靶基因3'-UTR结合,能在转录后水平调控基因表达。本研究拟采用生物信息学预测可能调控ezrin表达的miRNA分子,通过荧光素酶报告载体实验以及临床样本验证,锁定可能调控的miRNA分子,为下一步的研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 PCR仪(TAKARA公

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1408085MH205; 1708085MH231);安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2015A141)

收稿日期:2017-02-15

作者简介:徐小琳(1973-),女,助理研究员,电话:15056458756,电子邮箱:xxiaolin66@163.com;

盛莉莉,女,副主任医师,电子邮箱:13605535185@163.com,通信作者;

毛捷,男,副主任医师,副教授,电子邮箱:myw921@163.com,通信作者。

司);琼脂糖凝胶电泳仪(Bio-Rad 公司);分子凝胶成像系统(Kodak 4000MM P20);凝胶扫描分析系统(英国 UVItec 公司);人胚肾细胞 HEK293T 细胞株;miRNA 的过表达质粒 pLMP(由 pLL3.7 质粒改造成或 miRNA mimics 购买于上海吉码公司);双荧光素酶报告基因质粒 pLUC、大肠杆菌 TOP10 菌株、含 miRNA 表达或靶基因 3'-UTR 双荧光素酶报告基因的质粒菌株(深圳华安平康生物公司);小量质粒提取试剂盒(OMEGA 公司);转染试剂 FuGENE® HD (Roche 公司);质粒 miR-204、376b、630 mimics、miR-204、376b、630 inhibitor(深圳华安平康生物公

司);β-actin 鼠抗人(武汉三鹰);Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司);DNA(上海 Sangon Biotech 公司)。人脑胶质瘤组织和因外伤切除的非肿瘤组织均来自我院中心实验室储存的组织。

1.2 实验方法

1.2.1 可调控 ezrin 的 miRNAs 预测 我们在线运用生物信息学软件 TargetScan、PI TA、microrna.org、miRgator v2.0、miRDB 等 5 种软件进行预测,针对 ezrin 的测序序列(图 1) 预测筛选出可能调控 ezrin 的候选 miRNAs。

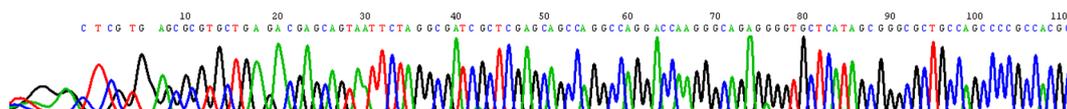


图 1 ezrin 测序序列

1.2.2 分析候选 miRNAs 与靶基因 ezrin3'-UTR 配对结合位点 针对 ezrin 的测序序列和候选的 miR-

NA 的碱基序列,比照分析候选 miRNAs 与靶基因 ezrin 3'-UTR 配对结合位点(表 1)。

表 1 miRNAs 与靶基因 ezrin 3'-UTR 配对结合位点

Conserved or poorly conserved	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	context+ score
Position 193-199 of EZR 3' UTR	5' ...UCCCCAGUUGUAAUAGUGCCAAG... 	7mer-m8	-0.21
hsa-miR-96	3' UCGUUUUUACACGAUCACGGUUU		
Position 418-425 of EZR 3' UTR	5' ...AUUGAUUUUUUAAUUUCUAUGAA... 	8mer	-0.36
hsa-miR-376b	3' UUGUACCUAAAAGG---AGAUACUA		
Position 421-428 of EZR 3' UTR	5' ...GAUUUUUUAAUUUCUAUGAAGGA... 	8mer	-0.25
hsa-miR-205	3' GUCUGAGGCCACCUUACUUCU		
Position 677-683 of EZR 3' UTR	5' ...UCAGCUAUUACUAAUUUUAUAC... 	7mer-1A	-0.09
hsa-miR-410	3' UGUCCGGUAGACACAAUUA		
Position 719-726 of EZR 3' UTR	5' ...UAACAUUAGUUUUAAAAGGGAA... 	8mer	-0.32
hsa-miR-204	3' UCCGUUCCUACUGUUUCCUU		
Position 744-750 of EZR 3' UTR	5' ...UUUUGUUCUGUAUUUUUGUAC... 	7mer-1A	-0.1
hsa-miR-495	3' UUCUUCACGUGUACAAACAA		
Position 252-258 of EZR 3' UTR	5' ...CUGUUGUGCUGGAGCAGGAC... 	7mer-1A	-0.07
hsa-miR-370	3' UGGUCCAAGGUGGGUGUCUCG		
Position 315-321 of EZR 3' UTR	5' ...AACUUAUGCUGGCCUGUGAU... 	7mer-m8	-0.12
hsa-miR-377	3' UGUUUUACACGGAACACACUA		
Position 506-512 of EZR 3' UTR	5' ...CACUCUCGCACACAGUGAUUC... 	7mer-m8	> -0.02
hsa-miR-34b	3' UACCGUACCUCAAUCUAAC		
Position 622-629 of EZR 3' UTR	5' ...UUUUUUUUGCUAAACAGUUUA... 	8mer	-0.31
hsa-miR-548a-3p	3' CGUUUUAUUUACGGUCAAAC		
Position 629-636 of EZR 3' UTR	5' ...UUGCUUAAACAGUUUAGAAUACA... 	8mer	-0.3
hsa-miR-630	3' UGGAAGGGACCAUGUCUUUGA		
Position 711-717 of EZR 3' UTR	5' ...CAGAUUUGUACAUAU-AGUUUUA... 	7mer-1A	-0.13
hsa-miR-548a-3p	3' CGUUUUAUUUACGGUCAAAC		

1.2.3 双荧光素酶活性检测 将经筛选确定的可能调控 ezrin 的候选 miRNAs 构建 ezrin 双荧光素酶及 miRNA 前体表达质粒,共转 293T 细胞 检测荧光素酶活性(按说明书操作)。

1.2.4 miR-204、-630、-376b 及靶基因 ezrin 的 3'-

UTR 双荧光素酶报告基因质粒构建 利用 PCR 扩增目的基因序列,并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分离及胶回收片段(按说明书操作)。设计 miR-204、-376b、-630 及靶基因 ezrin 3'-UTR 引物(表 2)。

表 2 miR-204、-376b、-630 及靶基因 ezrin 3'-UTR 引物

Gene	Forward seq-primers	Reverse seq-primers
ezrin 3'-UTR	cacaactcgagCAGCCAGGCCAGGACCAAGGGCAGA	tgaagatctGCCCTTTGCAAAGCTTTTATTTTCATG
miR-204-mut	TTAATTTCCCTAAGTTTGTCTCTGT	CTTAGGGAAATTAATAACTAATGTTAC
miR-630-mut	TTTTTCTTATGATTGTAAGTATATA	CAATCATAAGAAAACTGTTAAGC
miR-376b-mut	TTAATTAGATACTAGGATCCATCTTTGT	CCTAGTATCTAATTAATAAATCAAT

1.2.5 Real-time PCR 检测人脑胶质瘤和正常组织中候选 miRNAs 的表达 RNA 的提取:按照 RNA 提取步骤进行,用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度,OD260/OD280 比值控制在 1.8~2.2;反转录合成 cDNA 反应:使用 One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit 进行反转录反应(按说明书操作);检测 miRNAs 相对表达量,以 RNU-6 为内参照,采用 2- $\Delta\Delta Ct$ 法计算相对表达量。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行分析,两组间差异比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 可调控 ezrin 的 miRNAs 预测结果 在线运用 5 种生物信息学软件预测出 819 个可能调控 ezrin 的 miRNAs,其中 3 种以上软件预测到可调控 ezrin 的 miRNAs 有 34 个(表 3)。根据评分结果同时结合目前国内外的研究成果进行筛选,确定 miR-148a、-204、-205、-346、-370、-376b、-377、-410、-495、-548a-3p、-630 和 -96 等 12 个 miRNAs 进行候选验证。

2.2 双荧光素酶活性检测结果 将确定的 hsa-miR-148a、-204、-205、-346、-370、-376b、-377、-410、-495、-548a-3p、-630 和 -96 等 12 个 miRNAs,构建 ezrin 双荧光素酶及 miRNA 前体表达质粒,共转 293T 细胞,检测双荧光素酶活性。其中 hsa-miR-204(0.082 ± 0.006)、-376b(0.063 ± 0.006) 和 -630(0.096 ± 0.012) 与对照组(0.133 ± 0.002) 相比活性下降,差异有统计学意义($t = 13.859, P = 0.0002; t = 19.624, P = 0.0001; t = 5.122, P = 0.007$) (图 2)。

表 3 可调控 ezrin 的 miRNAs 预测结果

miRNA	预测软件	预测软件数量
hsa-miR-495	T P mi.org miRG miR	5
hsa-miR-376b	T P mi.org miRG miR	5
hsa-miR-96	T P miRG mi.org	4
hsa-miR-643	T P miRG miR	4
hsa-miR-630	T P miRG miR	4
hsa-miR-548m	T P miRG miR	4
hsa-miR-410	T P mi.org miRG	4
hsa-miR-205	T P mi.org miRG	4
hsa-miR-204	T P mi.org miRG	4
hsa-miR-183	T P mi.org miRG	4
hsa-miR-1323	T P mi.org miR	4
hsa-miR-940	T P miRG	3
hsa-miR-663	T P miRG	3
hsa-miR-648	T P miR	3
hsa-miR-623	T P miRG	3
hsa-miR-595	T P miRG	3
hsa-miR-566	T P miRG	3
hsa-miR-548p	T P miR	3
hsa-miR-548c-3p	T P miR	3
hsa-miR-548a-3p	T P miR	3
hsa-miR-377	T P mi.org	3
hsa-miR-370	T P miRG	3
hsa-miR-346	T P miRG	3
hsa-miR-338-3p	T P mi.org	3
hsa-miR-300	T P miRG	3
hsa-miR-211	P mi.org miRG	3
hsa-miR-18b	T P mi.org	3
hsa-miR-18a	T P mi.org	3
hsa-miR-153	T P mi.org	3
hsa-miR-148b	T P mi.org	3
hsa-miR-148a	T P mi.org	3
hsa-miR-1271	P mi.org miRG	3

可能调控其表达的 miRNA 分子,根据评分结果同时结合目前国内外的研究成果进行筛选,预测出 hsa-miR-148a、-204、-205、-34b、-370、-376b、-377、-410、-495、-548a-3p、-630 和 -96 等 12 个 miRNAs 可能高度靶向调控 ezrin 基因的 miRNA 分子,通过荧光素酶报告载体实验发现其中 3 个 miRNAs 即 hsa-miR-376b、-204 和 -630 相对于对照组荧光素酶活性下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),提示其对 ezrin 的表达水平具有抑制作用,进一步采用双荧光素酶质粒与 ezrin 3'-UTR 作用位点突变体共转 293T,证实 hsa-miR-376b、-204 和 -630 可直接结合 ezrin 3'-UTR 调控 ezrin 基因表达。我们进一步检测了 11 例胶质瘤组织和 10 例正常脑组织 hsa-miR-204 表达,观察到 miR-204 在脑胶质瘤组织中的表达低于正常脑组织,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),同时发现 hsa-miR-376b 和 -630 在正常和胶质瘤组织均未能检测到表达。综合以上结果,我们推断 miRNA-204 可能通过调控 ezrin 表达在恶性胶质瘤发展过程中发挥重要作用。

目前有文献报道,在肝癌^[6-7]、胃癌^[8-9]、胰腺癌^[10]、肾透明细胞癌^[11-12]、乳腺癌^[13-14]、子宫内膜癌^[15]、脑胶质瘤^[16-17]等肿瘤组织中,miRNA-204 表达水平均低于同一患者的正常组织中的水平, Lee 等^[18]在头颈部鳞癌(HNSCC)细胞株中恢复 miRNA-204 的功能,发现会抑制其相关靶基因的表达,推论出 miRNA-204 是一种具有肿瘤抑制作用的 miRNA。从研究结果来看,miRNA-204 在胶质瘤组织中的表达低于非肿瘤组织,然而,作为抑癌基因,其调控 ezrin 表达的分子机制及其在恶性胶质瘤中的具体作用仍有待下一步研究阐明。

【参考文献】

[1] ERIC T WONG ,NISE H YAMAGUCHI. Treatment advances for glioblastoma [J]. Expert Review of Neurotherapeutics ,2011 ,11 (10) : 1343-1345.
 [2] MAO J ,YUAN XR ,XU SS *et al.* Expression and Functional Significance of Ezrin in Human Brain Astrocytoma [J]. Cell Biochem Biophys 2013 ,67(3) : 507-511.
 [3] KASINSKI AL ,SLACK FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer 2011 ,11(12) : 849-864.
 [4] ESTELLER M. Non-coding RNAs in human disease [J]. Nat Rev Genet 2011 ,12(12) : 861-874.
 [5] SANDHU S ,GARZON R. Potential applications of microRNAs in

cancer diagnosis ,prognosis ,and treatment [J]. Semin Oncol , 2011 ,38(6) : 781-787.
 [6] QIU YH ,WEI YP ,SHEN NJ *et al.* MiR-204 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting slug in intrahepatic cholangio-carcinoma cells [J]. Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology 2013 ,32(5) : 1331-1341.
 [7] CUI ZH ,SHEN SQ ,CHEN ZB *et al.* Growth inhibition of hepatocellular carcinoma tumor endothelial cells by miR-204-3p and underlying mechanism [J]. World Journal of Gastroenterology 2014 , 20(18) : 5493-5504.
 [8] SACCONI A ,BIAGIONI F ,CANU V *et al.* MiR-204 targets Bcl-2 expression and enhances responsiveness of gastric cancer [J]. Cell Death & Disease 2012 ,3(11) : e423.
 [9] ZHANG LH ,WANG XQ ,CHEN PS. MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition ,anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells [J]. Bmc Cancer 2013 ,13(1) : 290.
 [10] CHEN Z ,SANGWAN V ,BANERJEE S *et al.* MiR-204 mediated loss of Myeloid cell leukemia-1 results in pancreatic cancer cell death [J]. Molecular Cancer 2013 ,12(1) : 105.
 [11] HALL DP ,COST NG ,HEGDE S *et al.* TRPM3 and miR-204 establish a regulatory circuit that controls oncogenic autophagy in clear cell renal cell carcinoma [J]. Cancer Cell ,2014 ,26(5) : 738 - 753.
 [12] MIKHAYLOVA O ,STRATTON Y ,HALL D *et al.* VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma [J]. Cancer Cell , 2012 ,21(4) : 532-546.
 [13] ZENG J ,WEI M ,SHI R *et al.* MiR-204-5p/Six1 feedback loop promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer [J]. Tumor Biology 2016 ,37(2) : 2729-2735.
 [14] WEIDONG L ,XUEJUN J ,QIANBING Z *et al.* Decreased expression of miR-204 is associated with poor prognosis in patients with breast cancer [J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology 2014 ,7(6) : 3287-3292.
 [15] BAO W ,WANG HH ,TIAN FJ *et al.* A TrkB-STAT3-miR-204-5p regulatory circuitry controls proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells [J]. Molecular Cancer 2013 ,12(305) : 8957-8968.
 [16] YING Z ,LI Y ,WU JH *et al.* Loss of miR-204 expression enhances glioma migration and stem cell-like phenotype [J]. Cancer Research 2013 ,73(2) : 990-999.
 [17] XIA Z ,LIU F ,ZHANG J *et al.* Decreased Expression of MiRNA-204-5p Contributes to Glioma Progression and Promotes Glioma Cell Growth ,Migration and Invasion [J]. Plos One 2015 ,10(7) : e0132399.
 [18] LEE Y. Network Modeling Identifies Molecular Functions Targeted by miR-204 to Suppress Head and Neck Tumor Metastasis [J]. Plos Computational Biology 2010 ,6(4) : e1000730.