文章编号:1000-5404(2006)22-2209-04

论著

乳腺癌 miRNAs 表达谱检测及初步分析

廖荣霞[1],孙建国[2],张 亮[3],陈 敏[1],陈 彬[1],娄桂予[1],周度金[1],陈正堂[2] (第三军医大学:[1]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038,[2]新桥医院肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037;[3]北京博奥生物芯片有限责任公司,北京 102206)

提 要:目的 制作哺乳动物 micro RNAs(miRNAs)检测微阵列,筛选乳腺癌 miRNAs 表达谱并进行初步分析。**方法** 利用已知的人及小鼠的 miRNAs 序列,设计了 496 条探针,制作 miRNAs 微阵列并验证其可靠性;培养乳腺癌细胞株 MCF-7 和正常乳腺上皮细胞株 MCF-10A,分别抽提细胞总 RNA,分离小分子 RNA,经 T_4 RNA 连接酶荧光标记后与微阵列杂交,通过芯片扫描和数据分析,获得乳腺癌 miRNAs 表达谱。**结果** 成功制作哺乳动物 miRNAs 微阵列,筛选获得 57 个乳腺癌相关 miRNAs,其中,29 个为低表达,28 个为高表达。**结论** 建立了哺乳动物 miRNAs 检测微阵列的技术平台,并筛选到乳腺癌 miRNAs 表达谱,为进一步研究其在乳腺癌发病机制中的作用打下基础。

关键词: miRNAs;微阵列;乳腺癌
中图法分类号: R394-33;R394.3;R737.9 **文献标识码**: A

Microarray-based miRNAs profiling in human breast cancer

LIAO Rong-xia[1], SUN Jian-guo[2], ZHANG Liang[3], CHEN Min[1], CHEN Bin[1], LOU Gui-yu[1], ZHOU Du-jin[1], CHEN Zheng-tang[2] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Chongqing 400038, [2]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [3]CapitalBio Corporation, Beijing 102206, China)

Abstract: **Objective** To make microRNAs (miRNAs) microarray for mammal miRNAs profiling and to screen breast cancer-specific miRNAs and analyze their functions preliminarily. **Methods** First, 496 probes designed according to known miRNAs sequences of human and mouse. Then, miRNAs microarray was made and subjected to credibility verification. Next, MCF-7, breast cancer cell line, and MCF-10A, normal human mammary epithelial cell line were cultured for respective total RNA extraction. Small molecular RNA was separated and fluorescence labeling was performed by T_4 RNA ligase. Finally, microarray hybridization was performed to obtain miRNAs signature of human breast cancer. **Results** We successfully made credible miRNAs microarray and obtained 57 breast cancer-related miRNAs by microarray-based screening, including 29 highly-expressed miRNAs and 28 lowly-expressed ones. **Conclusion** We built up the technical platform of mammal miRNAs detection and obtained miRNAs signature of human breast cancer so as to lay necessary basis for research on the function of miRNAs in breast cancer.

Key words: miRNAs; microarray; breast cancer

miRNAs 作为生物体正常生长发育的重要基因调控分子备受关注,其生物功能研究的一个重要领域是探明 miRNAs 与疾病的关系,而对 miRNAs 与肿瘤的关系的研究则成为持续的热点。现已明确,多种肿瘤存在 miRNAs 的异常表达或缺失,miRNAs 很可能是一类新的癌基因或抑癌基因。对慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)的研究发现 2 个 miRNAs 的基因,即 mir-15a 和 mir-16-1,位于 13q14 染色体缺失区域,50% ~60% 的 CLL 的患者存在 mir-16-1 和/或 mir-15a 的表达下调[1],miR143 和 miR145 在

基金项目:国家自然科学基金资助面上项目(30400241),全军"十一五"科技攻关项目(06G069),中国博士后科学基金资助项目(2005038478)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30400241), the Foundation of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06G069) and the Postdoctoral Science Foundation of China(2005038478)

作者简介:廖荣霞(1974-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事乳腺癌生物治疗及小分子 RNA 调控机制方面的研究。电话:(023)68752672
通讯作者:周度金,电话:(023)68752940,E-mail: dujinzhou@yahoo.com
陈正堂,电话:(023)68755626, E-mail: zhengtangchen@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-03-22;修回日期:2006-07-14

结肠癌中表达下调[2]，Let-7 在肺癌细胞中表达下调，在 A549 肺腺癌细胞中转染并表达 Let-7，导致肿瘤细胞生长抑制[3]。BIC 基因包含有 miR155 基因，前者在 Burkitt 淋巴瘤和几种其他类型淋巴瘤中明显上调[4]。50% 以上的 miRNAs 的基因位于在人类癌症中发生缺失、扩增的染色体区域或染色体脆性位点，进一步表明了 miRNAs 与人类癌症的相关性[5]。

近年来，微阵列技术的发展使 miRNAs 基因组研究成为可能，包含所有已知的哺乳动物 miRNAs 序列的微阵列随着 miRNAs 数据库（http://microrna.sanger.ac.uk/）的不断扩展而发展[6-8]。有研究者运用 miRNAs 微阵列证实了 miR-16 在 CLL 表达下调，并得到了与人 CLL 的临床病理特征相关的 miRNAs 表达谱[9]。认识 miRNAs 在正常组织与肿瘤组织中的差异表达，有助于明确与人类肿瘤相关的 miRNAs 从而揭示其致病作用。国内关于哺乳动物 miRNAs 微阵列研究刚刚起步，北京博奥生物芯片有限责任公司成功研制了哺乳动物 miRNAs 检测微阵列，我们筛查了乳腺癌 miRNAs 表达谱，为进一步研究其在乳腺癌发病机制中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 微阵列、细胞株和试剂

哺乳动物 miRNAs 微阵列由博奥生物芯片有限责任公司制作；乳腺癌细胞株 MCF-7 和正常乳腺上皮细胞株 MCF-10A 从美国 Beckman 研究所引进；Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品；miRNA Probe Construction kit 与 miRNA Isolation Kit 为美国 Ambion 公司产品；IMDM 培养基、DMEM/F-12 培养基及小牛血清购自美国 Hyclone 公司；马血清购自美国 Cambrex 公司；霍乱毒素购自美国 Sigma 公司；胰酶/EDTA 购自美国 Gibco 公司；常规生物化学试剂购自华美生物工程公司。

1.2 miRNAs 检测微阵列的制作

哺乳动物 miRNAs 微阵列针对人 435（包含 Nature 杂志预测的有 122 个 miRNAs[10]）、小鼠 261 个成熟 miRNA，由于人和小鼠的 miRNAs 两者具有共同的序列，取两者的并集，一共设计了 496 条探针（数据来自 2005 年 10 月 Sanger 的数据库）。设计的探针长度是 40 nt，其中 20 nt 左右的碱基是针对 miRNAs 基因的序列，其余序列是为了方便核酸在微阵列上固定的序列。把这些探针用芯片点样仪 martArray™（博奥公司产品）点制在 1 张 75 mm × 25 mm、经过化学修饰的载玻片上。

点制在微阵列上的样品还包括人的 U6 RNA、tRNA 作为内标；8 个人工制备的 30 个碱基长度 RNA 对应的探针作为微阵列的外标（Zip5、Zip13、Zip15、Zip21、Zip23、Zip25、Y2、Y3），Hex 作为点样阳性对照，50% DMSO 作为杂交阴性对照，实现微阵列的质量控制。

1.3 小分子 RNA 样品的分离与荧光标记

1.3.1 细胞培养与实验分组 MCF-7 细胞在含 10% 小牛血清的 IMDM 培养基中培养。MCF-10A 细胞在 10% 马血清的 DMEM/F-12 培养基中培养，培养基中加入终浓度为 10 μg/ml 的胰岛素，终浓度为 2 μg/ml 的氢化可的松，终浓度为 0.01 μg/ml的霍乱毒素，终浓度为 0.02 μg/ml 的 EGF（表皮生长因子）。

1.3.2 小分子 RNA 样品的分离 取对 Z 数生长期 MCF-7 细胞与 MCF-10A 细胞，Trizol 一步法提取细胞总 RNA，具体方法按说明书进行。异丙醇沉淀法浓缩 RNA，用分光光度计定量，甲醛变性胶电泳质检总 RNA 的质量。取 50 ~ 100 μg 总 RNA 用 miRNA Isolation Kit 分离小于 100 nt 的小分子 RNA，具体方法按说明书进行。

1.3.3 小分子 RNA 样品的荧光标记 T_4 RNA 连接酶对小分子 RNA 样品进行荧光标记[8]，无水乙醇沉淀、吹干后用于微阵列杂交。

1.4 微阵列杂交、芯片扫描及数据分析

将荧光标记后小分子 RNA 溶于 16 μl 杂交液中（15% 甲酰胺；0.2% SDS；3 × SSC；50 × Denhardts），于 42 ℃ 与微阵列杂交过夜。杂交结束后，微阵列玻片于 42 ℃ 下在含 0.2% SDS 的 2 × SSC 漂洗 4 min，再在 0.2 × SSC 室温漂洗 4 min。玻片甩干后，用 LuxScan 10K/A 双通道激光扫描仪（博奥公司产品）进行扫描，采用 Significance Analysis of Microarrays（SAM，version 2.1）软件分析有统计学意义的差异表达位点。实验重复 2 次。

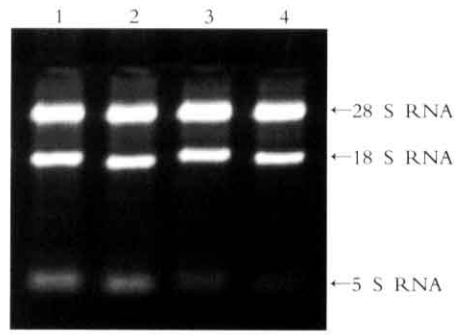
2 结果

2.1 制作人与小鼠 miRNAs 检测微阵列

成功制作了人与小鼠 miRNAs 检测微阵列。整个点阵分成 4 个亚阵，每个亚阵有 21 行，21 列，点间距为 185 μm，点的直径约为 130 μm。每条探针重复 3 次。

2.2 从 MCF-7 与 MCF-10A 获取细胞总 RNA

RNA 样品电泳条带清晰，28 S 比 18 S RNA 条带亮度接近 2:1，RNA 完好无降解，质量符合 miRNAs 微阵列的质量要求（图 1）。经 miRNA Isolation Kit 分离，分别获得 MCF-7 小分子 RNA 共 24.04 μg，MCF-10A 小分子 RNA 共 15.30 μg。

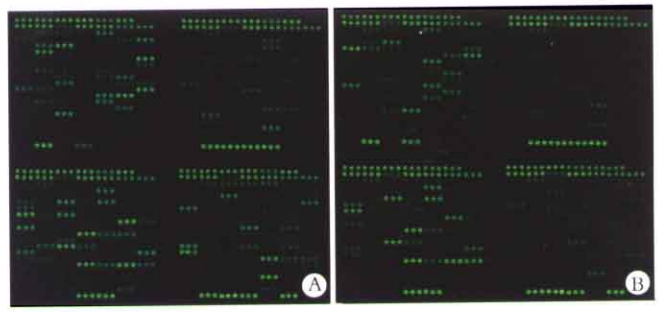


1：MCF-7；2：MCF-7；3：MCF-10A；4：MCF-10A

图 1 用于微阵列实验的总 RNA 电泳图

2.3　杂交结果

MCF-7 与 MCF-10A miRNAs 表达微阵列经扫描和数据分析，进行了 2 次重复的杂交实验，共筛选出 57 个乳腺癌相关 miRNAs，包括 29 个在 MCF-7 表达下调的 miRNAs 基因和 28 个在 MCF-7 表达上调的 miRNAs 基因。在 MCF-7 表达下调 5 倍以上的有：hsa-miR-205、hsa-miR-224、hsa-miR-125b、hsa-miR-100、pred_miR90、hsa-miR-221、hsa-miR-99a、hsa-miR-31 和 hsa-miR-222 共 9 个，其中 hsa-miR-205、hsa-miR-224、hsa-miR-125b 等 3 个基因下调最为明显，达 20 倍以上。在 MCF-7 表达上调 5 倍以上的有：hsa-miR-203、hsa-miR-429、hsa-miR-342、hsa-miR-301 和 hsa-miR-497 共 5 个，其中 hsa-miR-203 上调最为明显，达 10 倍以上。图 2 为微阵列检测图谱，表 1、表 2 为经数据分析得出的差异序列，改变倍数为 MCF-10A 与 MCF-7 之比。



A：MCF-7 miRNAs 表达微阵列；B：MCF-10A miRNAs 表达微阵列

图 2　MCF-7 与 MCF-10A miRNAs 表达微阵列

表 1　MCF-7 较 MCF-10A 表达下调的 miRNAs 序列

序号	miRNAs	定量	改变倍数	q 值(%)
1	hsa-miR-205	12.981 844 72	24.341 330 56	0
2	hsa-miR-224	8.059 208 032	24.294 613 28	0
3	hsa-miR-125b	15.536 528 69	23.493 296 6	0
4	hsa-miR-100	10.539 130 28	19.766 422 57	0
5	pred_miR90	5.878 175 224	18.925 688 84	0
6	hsa-miR-221	13.024 513 19	14.516 644 06	0
7	hsa-miR-99a	10.553 917 3	11.013 665 49	0
8	hsa-miR-31	9.167 088 452	10.524 550 4	0
9	hsa-miR-222	10.537 745 92	8.636 739 443	0
10	hsa-miR-130a	15.167 438 69	4.259 891 817	0
11	pred_miR191	9.342 917 54	4.184 569 152	0
12	hsa-miR-29a	13.957 979 05	3.603 404 796	0
13	hsa-miR-494	5.897 121 357	3.599 825 356	0
14	hsa-miR-210	10.388 393 76	2.822 128 102	0
15	hsa-miR-29b	15.859 138 88	2.811 654 158	0
16	hsa-miR-20b	5.624 965 189	2.423 164 902	0
17	hsa-miR-24	8.307 855 237	2.340 837 705	0
18	hsa-miR-422a	6.185 246 055	2.334 151 3	0
19	hsa-let-7a	9.296 147 657	2.318 311 471	0
20	hsa-miR-202	12.348 890 32	2.195 224 483	0
21	hsa-miR-125a	12.185 861 48	2.192 976 751	0
22	hsa-miR-17-3p	6.432 233 446	2.170 913 21	0
23	hsa-miR-21	6.372 228 4	2.133 144 602	0
24	hsa-miR-27a	8.747 850 565	2.101 073 9	0
25	hsa-miR-22	9.075 477 892	2.051 752 707	0
26	hsa-miR-18b	7.126 859 833	2.032 140 626	0
27	pred_miR154	3.814 203 446	2.031 230 212	0
28	hsa-miR-181b	13.920 801 76	2.021 939 159	0
29	hsa-let-7b	6.895 437 086	2.000 967 396	0

表 2　MCF-7 较 MCF-10A 表达上调的 miRNAs 序列

序号	miRNAs	定量	改变倍数	q 值(%)
1	hsa-miR-203	-12.475 500 21	0.066 442 73	0
2	hsa-miR-429	-10.036 630 42	0.103 957 32	0
3	hsa-miR-342	-13.106 246 87	0.116 494 58	0
4	hsa-miR-301	-7.207 240 108	0.127 995 279	0
5	hsa-miR-497	-10.046 710 89	0.197 088 311	0
6	hsa-miR-126	-7.152 905 443	0.239 861 566	0
7	hsa-miR-154	-7.125 343 988	0.240 480 696	0
8	hsa-miR-25	-10.355 404 66	0.285 191 409	0
9	hsa-miR-200b	-19.013 042 69	0.291 791 064	0
15	hsa-miR-339	-10.173 851 08	0.356 460 021	0
10	hsa-miR-7	-13.396 900 96	0.292 081 777	0
11	hsa-miR-93	-18.828 272 88	0.306 755 099	0
12	pred_miR257	-8.119 410 882	0.314 955 287	0
13	hsa-miR-200a	-9.353 494 444	0.334 883 597	0
14	hsa-miR-128b	-5.989 744 746	0.344 820 897	0
16	hsa-miR-374	-6.897 528 41	0.373 890 233	0
17	hsa-miR-520f	-9.121 519 126	0.387 871 994	0
18	hsa-miR-191	-6.683 068 616	0.390 566 471	0
19	hsa-miR-362	-7.575 762 678	0.399 060 651	0
20	hsa-miR-128a	-4.639 052 707	0.429 648 102	0
21	hsa-miR-520c	-8.521 417 995	0.429 684 458	0
22	pred_miR220	-4.347 512 844	0.453 268 415	0
23	hsa-miR-15a	-6.874 070 446	0.457 221 162	0
24	hsa-miR-141	-10.995 589 15	0.465 207 114	0
25	hsa-miR-26b	-7.666 863 623	0.470 184 742	0
26	hsa-miR-193b	-6.326 011 976	0.479 574 103	0
27	hsa-let-7i	-6.622 553 367	0.487 317 578	0
28	hsa-miR-185	-5.965 310 334	0.494 565 564	0

3 讨论

虽然 Northern blot 分析和克隆技术均可用于 miRNAs 的确认[11]，但二者都存在着工作量大，敏感性较低的缺点，使其无法用于高通量的 miRNAs 表达谱分析，难于以单一的实验同时分析数百个 miRNAs 的表达。微阵列正日益成为一种基因表达谱分析的有力工具，并已在 miRNAs 组研究中发挥作用。起初 miRNAs 微阵列检测的实际上是 70 nt 左右的 miRNAs 前体的表达，而非成熟的 miRNAs 的表达[6]，而后逐渐发展为可直接检测成熟的 miRNAs[9]，微阵列所包含的 miRNAs 序列也日趋完善。

本研究使用的 miRNAs 微阵列，针对人 435 个成熟的 miRNAs（包含 Nature 杂志预测的 122 个 miRNAs）及小鼠的已知 miRNAs 设计探针，数据来自 2005 年 10 月 Sanger 的数据库，代表性好，适用于人的各组织、细胞的不同时段的 miRNAs 表达谱的检测。

我们以 miRNAs 微阵列为平台，初步筛选了在乳腺癌细胞株 MCF-7 与正常乳腺上皮细胞株 MCF-10A 差异表达的 miRNAs。结果显示，在乳腺癌细胞株 MCF-7 较在正常乳腺上皮细胞株 MCF-10A 中的表达下调 5 倍及以上的 miRNAs 有 9 个，其中 8 个表达下调 10 倍以上；hsa-miR-205、hsa-miR-224、hsa-miR-125b 等 3 个基因的下调甚至达 20 倍以上。在 MCF-7 中表达上调 5 倍及以上的 miRNAs 有 5 个，其中表达上调 10 倍及以上的 miRNAs 仅 1 个：hsa-miR-203。可见，在乳腺癌细胞株 MCF-7 明显下调的 miRNAs 基因在数量上超过了在 MCF-7 中明显上调的 miRNAs 基因。

国外已有的以微阵列检测乳腺癌组织 miRNAs 表达的文献报道，多数 miRNAs 的表达在乳腺癌组织中较正常乳腺组织表达下调的趋势[12]，我们以 miRNAs 微阵列获得的乳腺癌细胞株与正常乳腺上皮细胞株 miRNAs 差异表达谱基本反映了这一趋势，与文献报道基本一致。其中，文献所述的下调最明显的基因为 hsa-miR-125b、hsa-miR-145、hsa-miR-21 和 hsa-miR-155。我们的微阵列实验也检测到 hsa-miR-125b、hsa-miR-21 不同程度的下调。由于我们的实验采用了最新的 miRNAs 数据以及预测的 miRNAs 序列，因此本研究结果筛选到的 miRNAs 数量较文献为多，如 hsa-miR-224、hsa-miR-422a、pred_miR90、hsa-miR-494、pred_miR191、hsa-miR-520f、hsa-miR-520c、hsa-miR-497、pred_miR257 等。部分实验结果与文献不完全一致，如 hsa-miR-221、hsa-miR-222 在 MCF-7 中表达显著下调，而文献中未检出差异，其中的原因可能是由于乳腺或乳腺癌细胞株与组织中的 miRNAs 表达谱存在一定的差异。我们将在后续实验中对乳腺癌组织 miRNAs 表达进行微阵列分析，并拟采用实时定量 RT-PCR 技术对本实验中筛选到的乳腺癌相关 miRNAs 加以验证，并进一步研究其生物功能。

参考文献：

[1] CALIN G A, DUMITRU C D, SHIMIZU M, *et al*. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(24): 15524 - 15529.

[2] MICHAEL M Z, O'CONNOR S M, VAN-HOLST-PELLEKAAN N G, *et al*. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia[J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(12): 882 - 891.

[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 [J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 3753 - 3756.

[4] EIS P S, TAM W, SUN L, *et al*. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(10): 3627 - 3632.

[5] 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 U S A, 2004, 101(9): 2999 - 3004.

[6] LIU C G, CALIN G A, MELOON B, *et al*. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(26): 9740 - 9744.

[7] NELSON P T, BALDWIN D A, SCEARCE L M, *et al*. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs[J]. Nat Methods, 2004, 1(2): 155 - 161.

[8] BARAD O, MEIRI E, AVNIEL A, *et al*. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues[J]. Genome Res, 2004, 14(12): 2486 - 2494.

[9] CALIN G A, LIU C G, SEVIGNANI C, *et al*. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(32): 11755 - 11760.

[10] XIE X, LU J, KULBOKAS E J, *et al*. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals[J]. Nature, 2005, 434(7031): 338 - 345.

[11] KIM V N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(5): 376 - 385.

[12] IORIO M V, FERRACIN M, LIU C G, *et al*. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7065 - 7070.

（编辑 陈聪连）