DOI:10.16016/j.1000-5404.201509129

MicroRNA-30a 在胃癌组织的表达分析及其靶基因成纤维活化蛋白 α 的鉴定

龚 莉,左钱飞,余 婷,汪莉娜,肖 斌,曾 浩 (400038 重庆,第三军医大学药学系微生物与生化药学教研室暨国家免疫生物制品工程技术研究中心)

[摘要] **目的** 分析 microRNA-30a(miR-30a)在胃癌中的表达水平并鉴定其新的靶基因。**方法** 选取 29 例胃癌患者的肿瘤组织和癌旁组织,利用 qRT-PCR 检测 miR-30a 的表达。通过 miRNA 靶基因预测数据库 TargetScan 预测 miR-30a 的靶基因。构建含有 miR-30a 结合位点的 3′UTR 片段的荧光素酶载体(pMIR-FAPα),通过荧光素酶报告实验对预测靶基因进行检测。利用 Western blot 和qRT-PCR对预测靶基因成纤维活化蛋白 α(fibroblast activation protein α,FAPα)的表达进行检测。**结果** miR-30a 在胃癌组织样本中的表达明显下调,通过生物信息学预测(TargetScan)和荧光素酶实验表明 miR-30a mimic 可与 FAPα 基因结合,qRT-PCR 和 Western blot 结果表明 miR-30a mimic 可抑制 FAPα mRNA 和蛋白质水平的表达。**结论** miR-30a 在人胃癌组织样本中表达下调,FAPα 是其靶基因。

[关键词] 胃癌;miR-30a;成纤维活化蛋白 α
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.2 [文献标志码] A

Identification of fibroblast activation protein α as target of microRNA-30a in gastric cancer

Gong Li, Zuo Qianfei, Yu Ting, Wang Lina, Xiao Bin, Zeng Hao (Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, National Engineering Research Center of Immunological Products, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of microRNA-30a (miR-30a) in human gastric cancer (GC) tissues and identify its direct target gene. **Methods** The expression of miR-30a in the tumor tissues and paratumor tissues of 29 patients with GC was detected by qRT-PCR. The potential target genes of miR-30a were predicted with TargerScan database. Luciferase reporter plasmid pMIR-fibroblast activation protein α (FAPα) with FAPα 3′UTR as the binding site of miR-30a was constructed. The predicted target gene (FAPα) of miR-30a was identified by dual luciferase activation assay. The mRNA and protein expression levels of FAPα were assessed by qRT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** The expression of miR-30a was significantly decreased in the tumor tissues compared with the paratumor tissues. Low expression of miR-30a in the tumor tissues was significantly correlated with the clinical stage. MiR-30a mimic significantly inhibited luciferase activation ($P<0.05$) in the HEK293 cells, which proved that miR-30a could target FAPα 3′ UTR. Western blotting and qRT-PCR showed that miR-30a inhibited the mRNA and protein expression levels of FAPα. **Conclusion** MiR-30a is down-regulated in GC, and FAPα is its target gene.

[**Key words**] gastric cancer; miR-30a; FAPα

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81202310) and the Project of Young Science and Technology Talent Training of Chongqing (CSTC2014kjrc-qnrc10008). Corresponding author: Xiao Bin, Tel: 86-23-68772377, E-mail: binxiaotmmu@163.com; Zeng Hao, Tel: 86-23-68752377, E-mail: zeng1109@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202310);重庆市青年科技人才培养项目(CSTC2014kjrc-qnrc10008)
[通信作者] 肖 斌,电话:(023)68772377,E-mail:binxiaotmmu@163.com
曾 浩,电话:(023)68752377,E-mail:zeng1109@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151229.1537.010.html(2015-12-29)

microRNA 通过与基因的 3′UTR 片段结合来调控基因的表达,参与细胞生长、凋亡等多个生理过程。近年来,已报道了一系列参与胃癌发生和发展的 miRNAs,如 miR-25、miR-141 和 miR-29c 等[1-3]。我们在前期研究中,证实 microRNA-30(miR-30)家族中的 miR-30b 在胃癌中低表达,且能够参与调控胃癌细胞的凋亡,然而对于 miR-30 家族的另一重要成员 miR-30a 的表达和功能仍需深入研究。

成纤维活化蛋白 α(fibroblast activation protein α,FAPα)是一种具有明胶酶活性的膜型丝氨酸酶。其具有降解细胞外基质、促进肿瘤细胞的侵袭、转移等作用。Baird 等[4]研究发现 FAPα 在体外实验中不仅可以与整合素相互作用增强 HT1080 细胞的转移能力,同时还可调节整合素下游的胞内信号通路。而在 LX-2 细胞中过表达 FAPα,除可引起星形孢菌素诱导的凋亡增强,也可引起该细胞在细胞外基质蛋白上的粘附和迁移增加[5]。由此可见,FAPα 在肿瘤中发挥的作用不容忽视,尤其是在肿瘤的侵袭转移过程中。但目前有关 FAPα 在胃癌中的具体作用及相关机制尚不清楚。因此,本研究检测胃癌中 miR-30a 的表达情况,采用生物信息学方法预测到 miR-30a 的靶基因 FAPα,并开展了相应的验证实验,为后续探究关于 miR-30a 在胃癌中的作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

人胃腺癌细胞株 SGC-7901、人胚肾细胞 HEK293 和 pMIR-REPORT 为本室保存;RPMI 1640 培养基购于美国 Hyclone 公司;FBS 购于美国 GIBCO 公司;TRIzol Reagent、转染试剂购于 Invitrogen 公司;SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购于日本 TOYOBO 公司;dNTP Mix 和荧光素酶购于 Pomega 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购于 Thermo Scientific 公司;PVDF 膜购于美国 Bio Rad 公司;FAPα 一抗购于美国 Abcam 公司;GAPDH 一抗购于天津三箭生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记二购于北京中杉金桥公司;ChemiDocT-MXRS + 仪器(美国 Bio Rad 公司);SpectraL Max190 仪器(Molecular Device)。

1.2 临床样本来源

所用临床样本来自于第三军医大学西南医院普外科进行手术治疗的胃癌患者,术中取出胃癌组织和癌旁正常组织(癌旁组织距肿瘤边缘 >5 cm),于液氮中冻存。术后取病理切片,经鉴定为胃腺癌组织共 29 例,其中Ⅰ期 3 例,Ⅱ期 9 例和Ⅲ期 17 例。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人胃腺癌细胞株 SGC-7901 和人胚肾细胞 HEK293 分别用含 10% FBS 的 RPMI 1640 和 DMEM/H,在 5% CO_2、37 ℃培养箱中培养。

1.3.2 总 RNA 提取 将癌旁正常组织和胃癌组织从液氮中取出后,于 DEPC 处理后的匀浆器中按比例 50 mg/mL 加入 Trizol。后续步骤按照说明书操作,最后用 50 μL DEPC 水溶解总 RNA,-80 ℃保存。

1.3.3 qRT-PCR 反应 按照加 Ploy A 尾法加入总 RNA、RNase Inhibitor 等试剂于 PCR 仪上反应,反应条件为 65 ℃,5 min。在第一步产物中加入相应逆转录试剂,PCR 仪上反应 50 ℃,90 min;70 ℃,15 min。反应完成后加入 120 μL Tricine-EDTA buffer 稀释产物。以 cDNA 为模板,加入 miR-30a 引物等试剂进行 qPCR 反应,反应条件为 95 ℃,2 min;40 个循环于 95 ℃,10 s;48 ℃,10 s;72 ℃,20 s,在 65 ℃采集荧光。以 U6 为内参。

1.3.4 miR-30a 的靶基因预测 根据靶基因预测数据库 TargetScan,在网站 http://mirbase.org/上预测 mir-30a 的靶基因。

1.3.5 双荧光素酶报告基因载体的构建 根据 NCBI 上查找 FAPα(NM_004460.3)3′UTR 序列,设计合成退火引物。退火引物序列上游:5′-CTAGTGGGCCCCA-GAAGTTCAAGCTAAATATTGTTTACATTTTCTGGTACTC-TGTGA-3′;下游:5′-AGCTTCACAGAGTACCAGAAAAT-GTAAACAATATTTAGCTTGAACTTCTGGGGCCCA-3′。反应条件为 95 ℃,2 min;每 8 秒下降 0.1 ℃;至 25 ℃。用 *Spe*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切 pMIR-REPORT 载体;然后 4 ℃连接酶切后载体与退火产物过夜;转化大肠杆菌 DH5α,挑取阳性克隆进行扩增;提取质粒并测序鉴定。

1.3.6 双荧光素酶报告实验 在 96 孔板中将 miR-30a mimic/mimic control 与已构建好的 FAPαWT 3′UTR Luciferase repoter 或 FAPαMut3′UTR Luciferase repoter 及 pRL-TK 共转染 HEK293 细胞。各孔 miR-30a/mimic control 转染终浓度为 50 nmol/L,pRL-TK 载体为 10 ng,pMIR-REPORT 载体为 200 ng。按照 Lipofectamine LTX and Plus Reagent 说明书进行转染。24 h 后用 Dual Luciferase Assay System 裂解细胞,进行荧光素酶活性检测。采用海肾荧光素酶作为内参,结果用萤火虫荧光素酶相对活性表示。

1.3.7 Western blot 检测 收集转染后细胞,RIPA 提取总蛋白;经 BCA 法测定总蛋白浓度,取 30 μg 蛋白样品上样,经 SDS-PAGE 电泳分离;蛋白分离后将其转移至 PVDF 膜上,洗膜后用含 0.3% BSA 封闭液室温封闭 1 h;缓冲液洗膜,加入 FAPα 一抗,4 ℃孵育过夜;缓冲液洗膜,室温下孵育二抗(辣根过氧化物酶山羊抗小鼠)1 h;缓冲液洗膜,将 PVDF 膜置于 ChemiDocTMXRS + 仪器上,加入显色液,运行系统检测荧光。

1.4 统计学方法

实验数据采用 GraphPad 6.0 软件进行分析;计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析,两组数据比较采用 t 检验,临床样本数据资料服从正态分布,$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-30a 在胃癌组织中低表达

将收集所得胃癌及癌旁正常组织共 29 对样本分别提取总 RNA。以 U6 作为内参,经 qRT-PCR 反应对 miR-30a 的表达水平进行检测。结果显示,miR-30a 在胃癌组织中的表达水平(0.98 ±0.85)低于正常组织(2.01 ±1.86)($P<0.05$)。结合患者临床资料分析,胃癌Ⅲ期患者 miR-30a 水平(0.64 ±0.46)显著低表达于Ⅰ + Ⅱ期患者(1.47 ±1.05)($P<0.05$)。然而,miR-30a 的表达水平与患者的年龄、淋巴结转移情况无明显相关性(表 1)。

表 1 29 例胃癌患者不同临床因素 miR-30a 的表达

临床因素	例数	miR-30a 表达	P 值
年龄			0.69
≤50 岁	10	0.91 ±0.94	
>50 岁	19	1.03 ±0.84	
临床分期			<0.05
Ⅰ + Ⅱ期	12	1.47 ±1.05	
Ⅲ期	17	0.64 ±0.46	
淋巴结转移			0.52
无	7	0.80 ±0.90	
有	22	1.04 ±0.84	

2.2 miR-30a 的靶基因预测

经靶基因预测软件 TargetScan 分析发现,FAPα3′UTR 区存在与 miR-30a 结合的互补序列。因此,选取 FAPα 作为 miR-30a 的候选靶基因。图 1 中 FAPα3′UTR WT 竖线部分即为 miR-30a 靶向结合 FAPα3′UTR 序列。FAPα3′UTR Mutant 为突变后的 FAPα3′UTR 与 miR-30a 互补结合序列。

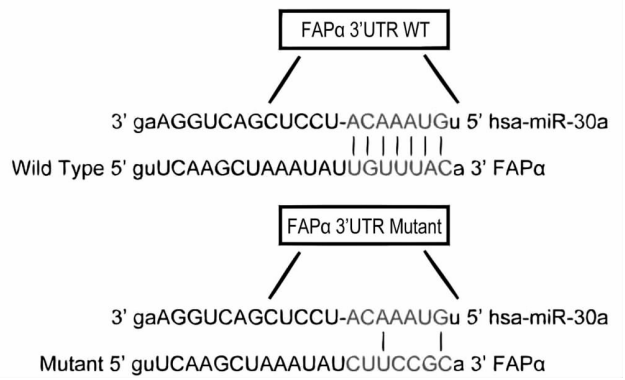
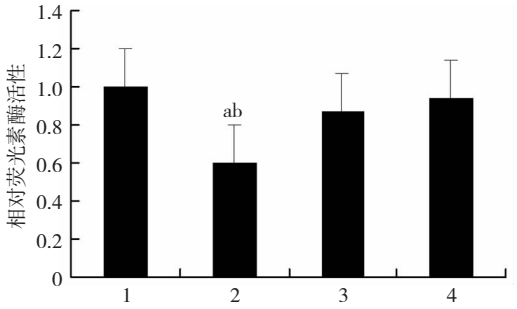


图 1 miR-30a 作用于 FAPα3′UTR 互补区域

2.3 双荧光素酶报告实验

将 miR-30a mimic 或 mimic control、pMIR-FAPα 或 pMIR-FAPα-mut 及对照质粒 pRL-TK 共转染 96 孔板中 HEK293 细胞,24 h 后裂解细胞进行荧光素酶活性检测。图 2 结果显示,miR-30a 和 pMIR-FAPα 共转染组相对荧光素酶活性较阴性对照组受到明显抑制($n=4$,$P<0.05$),表明 miR-30a 可与 FAPα 的 3′UTR 区结合,FAPα 是 miR-30a 的靶基因。

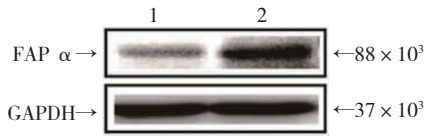


1:对照模拟物 + FAPα3′UTR 野生型;2:miR-30a 模拟物 + FAPα3′UTR 野生型;3:对照模拟物 + FAPα3′UTR 突变型;4:miR-30a 模拟物 + FAPα3′UTR 突变型 a:$P<0.05$,与对照模拟物 + FAPα3′UTR 野生型组比较;b:$P<0.05$,与对照模拟物 + FAPα3′UTR 突变型组比较

图 2 miR-30a mimic 抑制 FAPα3′UTR 野生型荧光素酶活性

2.4 过表达 miR-30a 后 FAPα 的 mRNA 蛋白表达水平降低

将 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板上,分别转染 miR-30a mimic 和 mimic control。24 h 后提取总 RNA 经 qRT-PCR 检测其 mRNA 表达水平,48 h 后提取总蛋白经 Western blot 进行检测。结果显示,miR-30a 过表达组的 FAPα mRNA 水平(0.96 ±0.03)较对照组(1.13 ±0.07)明显降低($P<0.05$);同样,过表达 miR-30a 显著抑制 FAPα 蛋白的表达($P<0.05$,图 3)。提示 miR-30a 能够调控靶基因 FAPα 的表达。



1:miR-30a 模拟物,2:对照模拟物

图 3 过表达 miR-30a 抑制 FAPαmRNA 和蛋白质表达水平

3 讨论

胃部肿瘤的形成过程中抑癌基因和致癌基因的改变及其遗传表观学的改变都与胃癌的发生密切相关。就目前关于 miR-30 家族与肿瘤的报道,多数研究表明其发挥抑癌作用[6]。Zhang 等[7]研究发现 miR-30c 在结肠癌中表达下调,通过靶向调控 ADAM19 的表达可

抑制肿瘤细胞的生长和转移。而后,其研究团队又发现 miR-30a 与结肠癌的临床分期相关,并且其不仅可以通过对靶基因 IRS2 表达的抑制作用抑制结肠癌细胞的增殖和转移,同时,还可以抑制 Akt 的磷酸化水平[8]。然而,miR-30b/d 被报道在黑色素瘤中具有促进侵袭转移的作用[9]。我们在前期研究中,通过基因芯片筛选出了胃癌组织中表达差异的基因,芯片结果显示 FAPα 在胃癌组织中表达上调[1,3]。本研究通过对 29 对胃癌患者临床样本进行检测分析,结果显示 miR-30a 在胃癌组织中较癌旁正常组织明显降低,并且Ⅲ期患者胃癌组织中 miR-30a 的表达显著低于Ⅰ+Ⅱ期患者,提示 miR-30a 在胃癌的发展中可能发挥着抑制肿瘤的作用。这与之前有研究报道称,miR-30a 在胃癌可能起着保护性 microRNA 的作用这一结果相吻合,并且该研究指出联合检测其他 6 个 microRNA 的表达水平可预测胃癌患者的预后[10]。因此,miR-30a 可能在胃癌的发生与发展过程中发挥重要的调控作用。

FAPα 主要表达在人上皮性肿瘤的成纤维细胞中,但研究发现其在乳腺癌细胞系、肿瘤相关巨噬细胞等细胞中也有表达[11-12],并且越来越多的研究证实 FAPα 与恶性肿瘤的形成和发展密切相关。FAPα 起着促进肿瘤和抑制肿瘤的双重作用。FAPα 在口腔鳞状细胞癌细胞的表达水平与患者肿瘤体积大小、淋巴结转移和临床分期密切相关。通过对 FAPα 基因的沉默或敲除可抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭转移[13]。Misemer 等[14]在检测侵袭性纤维瘤患者组织样本时发现,FAPα、WISP1 及 ADAM12 的高表达和 SOX11 的低表达的患者预后较差。在乳腺癌临床样本检测分析中,FAPα 的表达水平与患者的存活期呈负相关[11]。在本实验室前期通过胃癌组织样本芯片结果发现 FAPα 在胃癌组织中表达上调,并结合生物信息学方法预测 FAPα3′UTR 有 miR-30a 互补结合序列。因此,本研究在胃癌中验证 FAPα 为 miR-30a 的靶基因,通过 mircroRNA 对靶基因的靶向作用这一思路来阐明 FAPα 参与胃癌发生、发展的机制。

参考文献:

[1] Li B S, Zuo Q F, Zhao Y L, *et al*. MicroRNA-25 promotes gastric cancer migration, invasion and proliferation by directly targeting transducer of ERBB2, 1 and correlates with poor survival[J]. Oncogene, 2015, 34(20): 2556-2565. DOI: 10.1038/onc.2014.214

[2] Han T S, Hur K, Xu G, *et al*. MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1 [J]. Gut, 2015, 64(2): 203-214. DOI:10.1136/gutjnl-2013-306640

[3] Zuo Q F, Zhang R, Li B S, *et al*. MicroRNA-141 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1623. DOI:10.1038/cddis.2014.573

[4] Baird S K, Allan L, Renner C, *et al*. Fibroblast activation protein increases metastatic potential of fibrosarcoma line HT1080 through upregulation of integrin-mediated signaling pathways[J]. Clin Exp Metastasis, 2015, 32(5): 507-516. DOI:10.1007/s10585-015-9723-4

[5] Wang X M, Yu D M, McCaughan G W, *et al*. Fibroblast activation protein increases apoptosis, cell adhesion, and migration by the LX-2 human stellate cell line[J]. Hepatology, 2005, 42(4): 935-945. DOI:10.1002/hep.20853

[6] Kao C J, Martiniez A, Shi X B, *et al*. miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT[J]. Oncogene, 2014, 33(19): 2495-2503. DOI:10.1038/onc.2013.200

[7] Zhang N, Wang X, Huo Q, *et al*. MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin [J]. Oncogene, 2014, 33(24): 3119-3128. DOI:10.1038/onc.2013.286

[8] Zhang Q, Tang Q, Qin D, *et al*. Role of microRNA 30a targeting insulin receptor substrate 2 in colorectal tumorigenesis [J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(6): 988-1000. DOI:10.1128/MCB.01242-14

[9] Gaziel-Sovran A, Segura M F, Di M R, *et al*. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis[J]. Cancer Cell, 2011, 20(1): 104-118.

[10] Li X, Zhang Y, Zhang Y, *et al*. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature[J]. Gut, 2010, 59(5): 579-585. DOI:10.1136/gut.2008.175497

[11] Jia J, Martin T A, Ye L, *et al*. FAP-alpha (Fibroblast activation protein-alpha) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway[J]. BMC Cell Biol, 2014, 15: 16.

[12] Tchou J, Zhang P J, Bi Y, *et al*. Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor-associated macrophages in human breast cancer[J]. Hum Pathol, 2013, 44(11): 2549-2557. DOI:10.1016/j.humpath.2013.06.016

[13] Wang H, Wu Q, Liu Z, *et al*. Downregulation of FAP suppressed cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2014, 5:e1155.

[14] Misemer B S, Skubitz A P, Carlos-Manivel J, *et al*. Expression of FAP, ADAM12, WISP1, and SOX11 is heterogeneous in aggressive fibromatosis and spatially relates to the histologic features of tumor activity[J]. Cancer Med, 2014, 3(1): 81-90. DOI:10.1002/cam4.160

(**收稿**:2015-09-23;**修回**:2015-11-29)

(编辑 汪勤俭)