

Hsa - miR - 486 - 5p 的肿瘤及细胞骨架相关靶基因的预测分析

孙慧燕 杨晓明 王立生

摘 要 microRNAs 的功能研究离不开其靶基因的预测。本文利用 TargetScan 预测软件预测分析 hsa - miR - 486 - 5p 的肿瘤及细胞骨架相关靶基因。通过分析这些靶基因在肿瘤中的主要功能,为 hsa - miR - 486 - 5p 的功能研究奠定基础,同时对其其他 microRNAs 的功能研究提供有力的参考。

关键词 microRNA hsa - miR - 486 - 5p 靶基因 TargetScan 肿瘤

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

microRNAs(miRNAs)是大小为 19~25bp 的非编码小 RNA,其可以在转录后和(或)转录水平负调控靶基因的表达^[1,2]。Hsa - miR - 486 - 5p 是由郑晓飞教授课题组于 2005 年利用人胎肝组织研究 microRNA 鉴定方法时首先鉴定并注册的 5 种新 microRNAs(miR - 483~miR - 487)之一^[3]。目前,关于 miR - 486 的表达及生物学功能的文献报道非常有限。2010 年,由 Olson 所指导课题组在 Proc Natl Acad Sci 上阐明 miR - 486 在肌肉高表达,并可能是 PI₃K/AKT 的调控基因,预言 miR - 486 在肌肉萎缩的病理生理过程中起重要作用^[4]。2011 年,由 Kunke 所指导课题组在《Skeletal Muscle》杂志上进一步阐明 miR - 486 在杜兴肌肉营养不良症(duchenne muscular dystrophy,DMD)的病理过程中起到重要调控作用^[5]。在这两篇文章中都提到 miR - 486 的宿主基因为 ANK1,而后者属于锚蛋白家族,与细胞骨架运动密切相关。Kim 等^[6]认为,miR - 486 - 5p 是 SIRT1 的内源性抑制剂,能诱导人脂肪组织来源的间充质干细胞(human adipose tissue - derived mesenchymal stem cells,hAT - MSCs)复制性衰老,而 SIRT1 被证实是 miR - 486 - 5p 的靶基因。有研究者认为,miR - 486 在胃癌中是一新的抑癌 miRNA,其靶基因为抗凋亡基因 OLFM4^[7]。PNAS 提到 miR - 486 在肺癌中表达降低,其靶基因为胰岛素生长因子信号途径中的

IGF1、IGF1R 及 PIK₃R1 等,miR - 486 很可能是肺癌的一个新的抑癌基因^[8]。目前,对 miR - 486 的认识还很不清楚,甚至在不同的组织其作用是相反的。因此,有必要借助生物信息学的一些预测软件结合笔者的实验数据进行分析,以利于得出更客观的结论。TargetScan 是由 MIT 提供的在线对 microRNAs 进行靶基因预测的软件之一,其能链接 microRNA 相应靶基因的研究数据,并能提供靶基因 3'UTRs 相关信息。在笔者的实验过程中,发现 miR - 486 对癌细胞的迁移、增殖和细胞形态产生了影响。因此,利用 TargetScan 5.2 软件对其促癌及细胞骨架相关靶基因进行了预测研究,以期对 miR - 486 的进一步研究起到指导作用。

TargetScan 预测 hsa - miR - 486 - 5p 有 106 个保守靶基因,共有 109 个保守位点,22 个保守性不好的位点。106 个保守靶基因中与促进癌症发生发展有关的有 16 个,与细胞骨架有关的有 9 个,当然它们也会有交叉,比如 CLDN10 和 CIT 与细胞骨架有关,同时也是很多肿瘤的促癌基因。除了这类基因外,笔者也发现了一些与之无关或相反的靶基因,在本文中没有叙述,因为它们可能会在其他的生理或病理生理过程中起作用。随着预测手段的进步,这些数字还会发生改变。但本文主要是想提供一种思路和参考。

一、促癌相关靶基因

以下排序依据网站提供顺序,与功能大小无关。

1. PLAGL2: PLAGL2 (pleiomorphic adenoma gene like 2, PLAGL2) 是一类来源于 PLAG 基因家族(PLAG1, PLAGL1 和 PLAGL2)的锌指蛋白,其基因位于染色体 20q11.1,是一种急性髓系白血病的促癌基

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170460);中国博士后科学基金面上基金资助项目(2013M542509)

作者单位:100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所实验血液学研究室

通讯作者:王立生,研究员,电子信箱:wangls@bmi.ac.cn

因^[9,10]。这可以提示 miR-486 可能会与血液系统疾病有关。

2. ARID4B: ARID4B (AT-rich interactive domain-containing protein 4B) 蛋白由 ARID4B 基因编码的蛋白质。ARID4B 是组蛋白去乙酰酶依赖的 SIN3A 转录辅助抑制复合体的组成部分,其参与细胞增殖、分化、凋亡及肿瘤发生等。从一位乳腺癌患者分离出此基因的 IgG 抗体。在 ARID4B 上鉴定出一新的乳腺癌抗原表位 SSKKQKRSHK,其表达和乳腺癌的进程有关,因此血清中抗体的水平可能对乳腺癌的诊断有帮助^[11]。

3. AFF3: AFF3 (AF4/FMR2 family member 3) 核转录因子在淋巴发展和肿瘤发生中有重要作用。在一些 ALL 患者,此基因和 MLL 有融合现象^[12]。

4. SFRS3: 也被称为 SRp20。Zheng 等发现 splicing factor SRp20 (SFRS3) 在癌中高表达,其调控 Forkhead box transcription factor M1 (FoxM1) 和后者靶基因 PLK1 和 Cdc25B 的表达,影响细胞周期和增殖。小 RNA 干扰 SRp20 的表达,引起 G₂/M 阻滞,生长延缓和凋亡。在成纤维细胞过表达 SRp20 引起细胞过度增殖和转化,在体内能诱导成瘤。因此,SRp20 在肿瘤细胞过表达是肿瘤发生、发展和维持的重要步骤^[13]。

5. OLFM4: OLFM4 是 olfactomedin domain-containing 蛋白家族成员,其在胃肠道(胃、小肠、大肠)、前列腺和骨髓表达较高。最近研究认为 OLFM4 参与到一些恶性肿瘤的发生、发展中,尤其是胃肠道肿瘤。OLFM4 对肿瘤细胞有抗凋亡和促增殖作用,并且与肿瘤细胞的黏附和转移都有关系^[14,15]。另有实验证实 OLFM4 作为 miR-486 的靶基因在胃癌中起重要作用^[16]。OLFM4 除了在胃肠道肿瘤的发生发展中有关键作用外,Chen 等发现其可参与宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌的分化。因此 OLFM4 也有可能女性生殖道肿瘤中扮演重要角色^[17]。

6. EphA3: EphA3 属于 Eph/ephrin 酪氨酸激酶系统的组成成分之一,后者在细胞增殖与活力、细胞骨架、细胞迁移和抗细胞凋亡中起重要作用。Eph 受体酪氨酸激酶家族可以控制多种细胞生物学过程:细胞黏附和运动、细胞塑形和细胞生长。EphA3 是癌中最多的 Eph 受体突变体,其与癌症的关系很复杂^[18]。EphA3 和 CD133 在结直肠癌中高表达,并且其与肿瘤大小、组织学分级、淋巴结转移、远端转移和 TNM 分期正相关。高表达 EphA3 和 CD133 的结直肠癌患

者其生存期较短。EphA3 和 CD133 可以作为结直肠癌的临床评价指标^[19]。

7. Sp5: Sp5 属于 SP 锌指转录因子家族,其编码 C2H2 锌指蛋白,C 末端有 DNA 结合域。Sp5 在多种肿瘤(HCC、胃癌、肠癌)中高表达。乳腺癌细胞株 MCF-7 不表达内源性 Sp5,将 Sp5 转移入 MCF-7 细胞后,能明显促进细胞增殖。

8. PIK₃R1: PIK₃R1 (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha) 是胰岛素生长因子信号途径中一种重要的酶。利用慢病毒介导的 shRNA 策略敲减此基因在星形胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)细胞的表达,可以抑制细胞增殖、迁移和侵袭。敲减 PIK₃CA 或 PIK₃R1 可降低 FAK 活性,敲减 PIK₃R1 可降低 MMP2 表达,推测 PIK₃R1 像 PIK₃CA 一样可以影响肿瘤细胞的增殖和迁移,是 GBM 的一个潜在治疗靶点。而 Croce 等的研究结果认为,不仅 PIK₃R1 是 miR-486 在肺癌中的靶基因,其他相关分子 IGF1、IGF1R 也作为 miR-486 在肺癌中的靶基因发挥重要作用^[8]。

9. PIM1: PIM1 (proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim-1) 为丝/苏氨酸蛋白激酶家族,PIM 亚家族。主要在 B 淋巴和髓系细胞系表达,在血液系统肿瘤和前列腺癌高表达。可促进细胞增殖和存活。Pim-1 的特异性单抗 p9 明显抑制细胞增殖。

10. C1orf21: C1orf21 (chromosome 1 open reading frame 21) 基因与胃癌有关。

11. SMOC1: SMOC1 (SPARC-related modular calcium-binding protein 1) 在少突神经胶质瘤高表达。实验证实在体外 SMOC1 可以与 tenascin-C 相互作用。在 U87 神经胶质瘤细胞 SMOC1 可以影响其迁移。

12. CXCR5: CXCR5 (C-X-C chemokine receptor type 5) 属于 G 蛋白偶联受体,在 Burkitt's 淋巴瘤中高表达,其在 B 细胞的迁移中起重要作用。趋化因子和其受体参与前列腺癌(prostate cancer, PCa)的转移。CXCR5 在 PCa 明显高表达。在 PCa 细胞侵袭和迁移中具有重要作用。

13. Gab2: Gab2 (GRB2-associated-binding protein 2) 是激活磷脂酰肌醇 3 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI₃K) 的适配体蛋白。其在乳腺癌和转移性黑色素瘤中高表达,是一原癌基因蛋白。除此,Gab2 在肺癌中也高表达,提示其在肺癌的发生、发展中也起到

一定的作用。Docking 蛋白在多种肿瘤中高表达,并且与转移特性有密切关系。Gab2 在乳腺上皮细胞 MCF-10A 高表达后可阻滞细胞伸展,减弱应力纤维和成熟黏着斑,促进细胞迁移。

14. BZW1:黏液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma, MEC)是唾液腺最普遍的一种恶性肿瘤。Situ 等证实 BZW1(basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1)在 MEC 生长中具有重要作用。利用 qPCR 和免疫组化证实 BZW1 在 MEC 组织和细胞中高表达,而且与病情分级有关。利用特异 RNA 干扰慢病毒抑制 BZW1 表达则抑制 Mc3 细胞增殖和克隆形成,并且使细胞停留在 G₀/G₁ 期。抑制细胞迁移和侵袭,在体内实验中也得到了相同的结果。

15. SFRS1:SFRS1 也称为 SF2/ASF,被认为是一种原癌蛋白。利用免疫组化方法在 81 例非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的癌组织中检测 SF2/ASF 的表达,结果显示大部分原发性 NSCLC 肿瘤组织中 SF2/ASF 都高表达。体外实验中,小 RNA 干扰 SF2/ASF 促进了 NSCLC 细胞系的凋亡,其机制与 survivin-mTORC1-4E-BP1 有关。

16. SRF:SRF 调控立早基因的转录,引起多种细胞增殖、迁移和分化。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在肿瘤的侵袭和转移中具有重要作用。利用 Western blot 法检测 SRF 和 MMP-2 and MMP-9 在 HCC 组织中的表达,发现对比癌旁组织这 3 种基因明显升高。高表达 SRF 的组织中 MMP-2 and MMP-9 的表达也增高。在 HLE 细胞中过表达 SRF 后, MMP-2 和 MMP-9 的表达和酶活性均增加,且细胞迁移能力增加。

二、细胞骨架相关靶基因

1. SLC10A7: SLC10A7[solute carrier family 10(sodium/bile acid cotransporter family), member 7]属于 SLC10 家族成员,但不同于其他成员,其有 10 个穿膜结构域。SLC10A7 相关蛋白不仅存在于脊椎动物,还存在于酵母、植物甚至细菌。因此,SLC10A7 为分布最广泛的载体家族成员。

2. COL6A6:COL6A6(collagen, type VI, alpha 6)胶原蛋白 VI 是调控上皮细胞-纤连蛋白的重要基膜成分,是一种细胞结合蛋白。

3. TWFI:TWFI 编码一种肌动蛋白结合蛋白 twinfilin,非常保守。定位于 cortical G-actin-rich structures,受小 GTPase RAC1 调控。它同时作为 microRNA-1 的靶基因在心肌梗大的病理生理学过程

中起重要作用。

4. CLDN10:此基因编码 claudin 家族中一员。claudin 家族是 integral 膜蛋白,参与组成紧密连接。CLDN10 与 HCC 的复发密切相关,CLDN10 在肺癌中也普遍表达。CLDN10 在 HCC 高表达,而且与血管生成紧密相关,其可作为 HCC 术后不良预后的有用指标。CLDN10 在 HCC 的侵袭中起重要作用,可作为 HCC 治疗的潜在靶点。Han 等发现 CLDN10 可以作为鸡卵巢癌的新生标志物,由于以鸡作为合适的动物模型,因此这对人类卵巢癌的预测也具有一定的意义。

5. ARHGAP5:ARHGAP5(Rho GTPase-activating protein 5)编码 p190-B RhoGAP,后者负调控 RhoA 活性从而促进 HuH-7 肝癌细胞伸展和迁移。

6. CIT:CITRON(rho-interacting, serine/threonine kinase 21),简称 CIT,此基因编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞中间体的重要成分,在细胞分裂中起重要作用,参与中枢神经系统发育。CITRON 在 HCC 癌组织中高表达,在 SMMC-7721 细胞中用腺病毒介导的方式敲除 CITRON,抑制细胞的增殖和克隆形成。在裸鼠荷瘤实验中发现敲减 CITRON 可以抑制肿瘤的形成。

7. RICH2:RICH2,又被称为 ARHGAP44(Rho GTPase activating protein 44)。敲减 CD317 或 RICH2 会产生同样的表型:顶端肌动蛋白网络的消失,伴随顶端微绒毛的消失。同时,基底面肌动蛋白束增加;细胞高度缩减而紧密连接没有任何改变。抑制上皮转化和顶端及基膜蛋白的极化。

8. MKL1:巨核细胞白血病蛋白 1(megakaryoblastic leukemia protein-1, MKL1),也称 MAL、MRTF-A、BSAC,属于 MRTF 转录因子家族,后者有共同的肌动蛋白结合域和转录激活域等。MKL1 调控多种过程:肌细胞分化、心血管发育、神经系统发育、巨核细胞分化和迁移、细胞运动和上皮间质转化。MKL1 在肿瘤方面起到双重作用:肿瘤促进和肿瘤抑制。有实验证实, MRTF-A 在肺纤维化的胶原合成中起重要调控作用,而这依赖于 SRF 和 Sp1 对胶原表达的转录调控。

9. MYLK2:此基因编码肌球蛋白轻链激酶,广泛分布于成人骨骼肌中。在肿瘤中 MYLK2 激酶域很少发生突变,在肿瘤发生中不扮演重要角色。

综上所述, microRNAs 的功能研究离不开其靶基因的预测。目前,应用于靶基因预测的数据库有

miRbase、starBase、Tarbase、miRecords、targetScan、PicTar、miRanda 和 microRNA.org 等。Targetscan 是基于靶 mRNA 序列的进化保守等特征搜寻动物的 microRNA 靶基因的软件,其预测 microRNA 靶标假阳性率较低。笔者利用此网站,结合实验数据进行了有效的靶基因预测分选,为课题的顺利进行打下了良好的基础。

参考文献

- 1 Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 855-862
- 2 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- 3 Fu H, Tie Y, Xu C, *et al.* Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(17): 3849-3854
- 4 Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, *et al.* Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486 [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2010, 107(9): 4218-4223
- 5 Alexander MS, Casar JC, Motohashi N. Regulation of DMD pathology by an ankyrin-encoded miRNA [J]. *Skeletal Muscle*, 2011, 1:27
- 6 Kim YJ, Hwang SH, Lee SY, *et al.* miR-486-5p induces replicative senescence of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and its expression is controlled by high glucose [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(10): 1749-1760
- 7 Oh HK, Tan AL, Das K, *et al.* Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2657-2667
- 8 Peng Y, Dai Y, Hitchcock C, *et al.* Insulin growth factor signaling is regulated by microRNA-486, an underexpressed microRNA in lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(37): 15043-15048
- 9 Hensen K, Van Valckenborgh IC, Kas K, *et al.* The tumorigenic diversity of three PLAG family members is associated with different DNA

- binding capacities [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(5): 1510-1517
- 10 Landrette SF, Kuo YH, Hensen K, *et al.* PLAG1 and PLAGL2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11 [J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2900-2907
- 11 Cui D, Jin G, Gao T, *et al.* Characterization of BRCA1 and its novel antigen epitope identification [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(7): 1136-1145
- 12 To MD, Faseruk SA, Gokgoz N, *et al.* LAF-4 is aberrantly expressed in human breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(4): 568-574
- 13 Jia R, Li C, McCoy JP, *et al.* SRP20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance [J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(7): 806-826
- 14 Luo Z, Zhang Q, Zhao Z, *et al.* OLFM4 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(11): 1713-1720
- 15 Yu L, Wang L, Chen S. Olfactomedin 4, a novel marker for the differentiation and progression of gastrointestinal cancers [J]. *Eoplasma*, 2011, 58(1): 9-13
- 16 Oh HK, Tan AL, Das K, *et al.* Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2657-2667
- 17 Yu L, He M, Yang Z, *et al.* Olfactomedin 4 is a marker for progression of cervical neoplasia [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(2): 367-372
- 18 Lisabeth EM, Fernandez C, Pasquale EB. Cancer somatic mutations disrupt functions of the EphA3 receptor tyrosine kinase through multiple mechanisms [J]. *Biochemistry*, 2012, 51(7): 1464-1475
- 19 Xi HQ, Zhao P. Clinicopathological significance and prognostic value of EphA3 and CD133 expression in colorectal carcinoma [J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64(6): 498-503

(收稿日期:2014-02-10)

(修回日期:2014-03-14)

乳腺癌凝血紊乱机制研究进展

刘 玥 周 晋 刘 岩 司 宇 马瑞爽 史家岚

摘 要 乳腺癌是女性排名第1位的常见恶性肿瘤,患者发生血栓栓塞的风险较高,血栓形成是仅次于肿瘤转移的最主要的死亡原因,据2011年美国CA《A Cancer Journal for Clinicians》杂志公布的最新数据统计显示其发生率为0.48%~5.00%,且其发生率仍呈逐年上升趋势^[1]。乳腺癌患者发生静脉血栓栓塞(VTE)包括深静脉血栓(DVT)及肺栓塞(PE)的风险较正常群体高,部分患者可高于正常人5倍,在接受标准化疗的患者血栓形成的风险和凝血紊乱程度可进一步增强至之前的数倍。静脉血栓栓塞是导致乳腺癌患者死亡的第3位常见原因^[2]。因此,其凝血紊乱的机制引发了多方面的研究关注,乳腺癌血栓形成是多因素共同作用的结果,但其较高的血栓发生率原因尚未完全阐明。目前,关于乳腺癌静脉血栓栓塞原因的相关报道主要包括癌

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270588)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院

通讯作者:史家岚,电子邮箱:shi73661@gmail.com