

# 子宫肌瘤差异表达microRNA的定量分析及靶基因鉴定

刘 琴<sup>1,2</sup> 徐明娟<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>第二军医大学附属长海医院, 上海 200433; <sup>2</sup>上海市第七人民医院, 上海 200011)

**摘要** MicroRNA(miRNA)是一类非编码单链小分子RNA, 广泛参与人类各种生理、病理过程。最新研究提示, miRNA在子宫肌瘤中起着重要调控作用, 该研究试图对子宫肌瘤组织中差异表达miRNAs进行表达验证及靶基因鉴定, 结果发现, 与瘤旁组织相比, miR-363、miR-490、miR-135b等的表达水平在肌瘤组织中有着4~6倍的上调, 而miR-217、miR-590、miR-451则下调3~5倍。通过软件预测结合表达定量分析, 发现其中miR-363的靶基因为卵泡激素相互作用蛋白1基因(folliculin interacting protein 1, *FNIP1*)和溶质载体家族蛋白12成员5(solute carrier family 12 member 5, *SLC12A5*)。miR-135b的靶基因核受体亚科3 C组, 成员2(nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2, *NR3C2*)在肌瘤组织中表达有显著下降, 而miR-590的靶基因锌指蛋白367基因(zinc finger protein 367, *ZNF367*)和去泛素水解酶1基因(yeast OTU deubiquinating enzyme 1 homolog, *YOD1*)在肌瘤组织中的表达水平显著上升。进一步的报告基因分析发现, 其中*FNIP1*、*NR3C2*、*ZNF367*的3'UTR能够与相应的miRNA结合。分析相同肌瘤样品中表达水平的关系发现, 这三个靶基因表达均与相应的miRNA呈显著的负相关。该研究的发现为子宫肌瘤的分子机制研究和诊治提供了新的参考。

**关键词** 微小RNA; 子宫肌瘤; 靶基因; 诊断; 治疗靶点

## Differential Expression Analysis and Targets Identification of microRNA in Leiomyomas

Liu Qin<sup>1,2</sup>, Xu Mingjuan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; <sup>2</sup>Shanghai 7th People's Hospital, Shanghai 200011, China)

**Abstract** MicroRNA (miRNA) belongs to the small non-coding RNA family, which contributes broadly to most human physiological and pathological process. Recent report indicated that miRNAs were also involved in the pathogenesis of leiomyomas. In this study, we proposed to explore the differentially expressed miRNAs and identify their targets in leiomyomas. The results showed that three miRNAs (miR-363, miR-490 and miR-135b) were up-regulated for 4~6 folds, and three miRNAs (miR-217, miR-590 and miR-451) were down-regulated for 3~5 folds. We also analyzed the expression level of several predicted targets of the above miRNAs, and found that *FNIP1* and *SLC12A5* (miR-363 targets), *NR3C2* (miR-135b target), *ZNF367* and *YOD1* (miR-590 targets) were significantly changed. Reporter assay revealed that the 3'UTRs of *FNIP1*, *NR3C2* and *ZNF367* could be bound

收稿日期: 2015-01-07 接受日期: 2015-02-26

长海医院“1255”学科建设计划(批准号: CH125510105)和上海卫生系统重大疾病联合攻关项目(批准号: 2013ZYJB0201)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-81870765, E-mail: 13636373419@163.com

Received: January 7, 2015 Accepted: February 26, 2015

This work was supported by Changhai Hospital “1255” Subject Construction Funding Project (Grant No.CH125510105) and Shanghai Health System Important Disease Joint Research Project (Grant No.2013ZYJB0201)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-81870765, E-mail: 13636373419@163.com

网络出版时间: 2015-04-23 14:17 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150423.1417.001.html>

directly by relative miRNA. Moreover, negative expression correlations were found between these miRNAs and their targets, which further demonstrated them as the direct functional targets. Our founding will supply new potentials for leiomyomas molecular mechanism study, diagnosis and therapy.

**Keywords** microRNA; leiomyomas; target genes; diagnosis; therapeutic targets

子宫肌瘤(human uterine leiomyomas)多发生于育龄妇女,据报道在生育期妇女中发病率为30%~50%,在50岁之前总的发病率高达70%~75%<sup>[1]</sup>。该疾病是一种对雌孕激素敏感的良性肿瘤,主要由子宫平滑肌组织增生而成,子宫肌瘤病情严重者常可引起月经紊乱、经量过多及继发性贫血,增大的肌瘤可引起压迫症状、不孕、流产,肌瘤的退行性变化也可引起急腹症、恶变等,也是引起子宫全切术的首要病因,严重威胁女性大众健康。探索其发病的细胞及分子机制将有利于疾病的诊治。遗传因素、性激素、生长因子等在子宫肌瘤的形成与生长中起重要作用<sup>[2]</sup>。但到目前为止,子宫肌瘤确切的发病机制尚未完全明确。最新的研究发现,非编码小RNA在子宫肌瘤发生中起着非常重要的调控作用<sup>[3]</sup>。

MicroRNA(miRNA)是近年来发现的一类非编码单链小RNA分子,通过结合到靶基因mRNA的3'非翻译区(3'UTR),降解靶基因的mRNA或者抑制靶基因的翻译最终导致靶基因的沉默,是细胞内广泛存在的一种精细调节蛋白表达的转录后调控机制。研究证实,miRNA已经广泛参与到包括肿瘤、神经系统疾病、免疫系统以及心血管系统疾病在内的多种人类重大疾病的发生以及细胞凋亡、增殖、分化以及迁移等重要的细胞生理过程中<sup>[4]</sup>。

通过miRNA芯片分析,最新的研究结果显示,miRNA在子宫肌瘤组织标本中的表达发生了显著的变化,但是对于其中各个miRNA表达及靶基因的鉴定的报道比较少。本研究试图对子宫肌瘤组织中差异表达的miRNA进行定量分析及靶基因鉴定,结果发现,与瘤旁组织相比,miR-363、miR-490、miR-135b等的表达在肌瘤组织中有着4~6倍的上调,而miR-217、miR-590、miR-451则下调3~5倍。通过软件预测、表达分析以及报告基因实验,我们鉴定了其中三个基因*FNIP1*(folliculin interacting protein 1)、*NR3C2*(nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2)、*ZNF367*(zinc finger protein 367)分别是miR-363、miR-135b和miR-590的直接靶基因。进一步分析相同肌瘤样品中miRNA和靶基因的表达水平,发现这三

个靶基因表达均与相应的miRNA成显著的负相关。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养及转染

细胞株293T用DMEM培养液(10% FBS)于37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养。使用Lipo2000进行质粒转染,用量为24孔板每孔使用300 ng质粒。

### 1.2 病人样品

本次实验中共使用子宫肌瘤及瘤旁组织标本各16例,组织取样来源于手术切除的肌瘤组织以及在距离肿瘤边缘5 cm以外的范围切取的正常组织。这些组织标本在手术切除后,立即放入TRIzol进行组织研磨后冻存于-80 °C,用于后续RNA抽提分析。所有样品术后均经病理学检测诊断为子宫肌瘤。组织样本的获取均取得患者的知情同意。

### 1.3 RNA提取及荧光定量PCR(qPCR)分析

RNA的提取采用TRIzol试剂(Invitrogen公司)进行,获得的RNA经分光光度计测定质量合格后进行逆转录及定量分析。对于普通mRNA的定量分析,利用随机引物进行逆转录合成cDNA,然后采用SYBR mix(Roche公司)进行目标基因的定量分析,内参选择*GAPDH*。对于miRNA的定量分析采用TaqMan MiRNA Assay(ABI公司)进行分析,内参选择*U6*。

### 1.4 报告基因分析

报告基因分析采用pGL3质粒进行,将目的基因3'UTR克隆到报告质粒pGL3中luciferase下游,得到相应的3'UTR报告质粒。miRNA过表达质粒构建方法是将包含miRNA的基因组区长300 bp的序列克隆至pcDNA3.0载体上,同时对该质粒的miRNA的种子区进行互补突变获得对照突变质粒。进行转染实验操作是:24孔板中接种293T细胞,过夜培养后细胞密度达60%时进行转染,每孔转染pcDNA质粒1 μg、pGL3报告质粒300 ng,同时共转染Renilla质粒1 ng。24 h后收集细胞并裂解,用双荧光素报告系统检测试剂盒(Promega公司)测定报告基因的活性。

### 1.5 数据统计

所有数据表示为均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ ),采用SPSS

11.0统计软件进行分析。借助Student's *t*检验确定两组数据差异,  $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

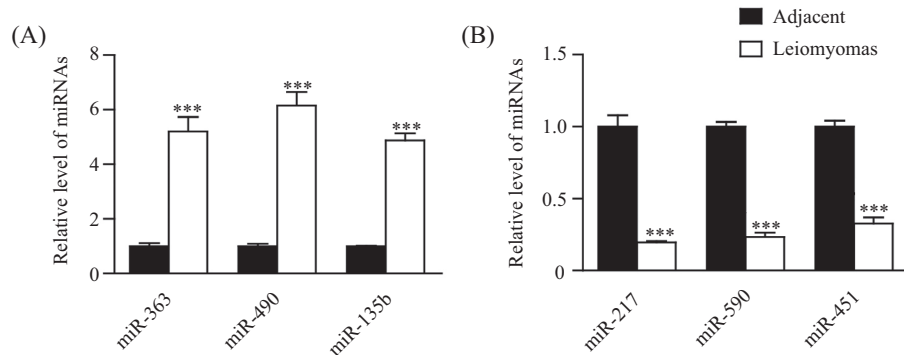
### 2.1 子宫肌瘤组织中miRNA的qPCR分析

miRNA广泛参与了各种生理病理过程, 在子宫肌瘤的样品中, 也不乏有通过芯片分析miRNA的表达变化的, 但是对其精细定量的miRNA仍然较少。本研究对于其中的部分miRNA进行了精确的

qPCR定量分析, 结果发现, 与瘤旁组织相比, 其中miR-363、miR-490、miR-135b等的表达在肌瘤组织中显著上调, 上调倍数分别为5.2倍、6.2倍、4.9倍(图1A), 而miR-217、miR-590、miR-451则显著下调, 分别降低至瘤旁组织的19%、23%、33%(图1B)。

### 2.2 miRNA靶基因在子宫肌瘤肿瘤及瘤旁组织中表达水平的qPCR定量分析

利用miRNA靶基因预测软件Targetscan对于图1中六个miRNA进行靶基因预测, 选择每个miRNA

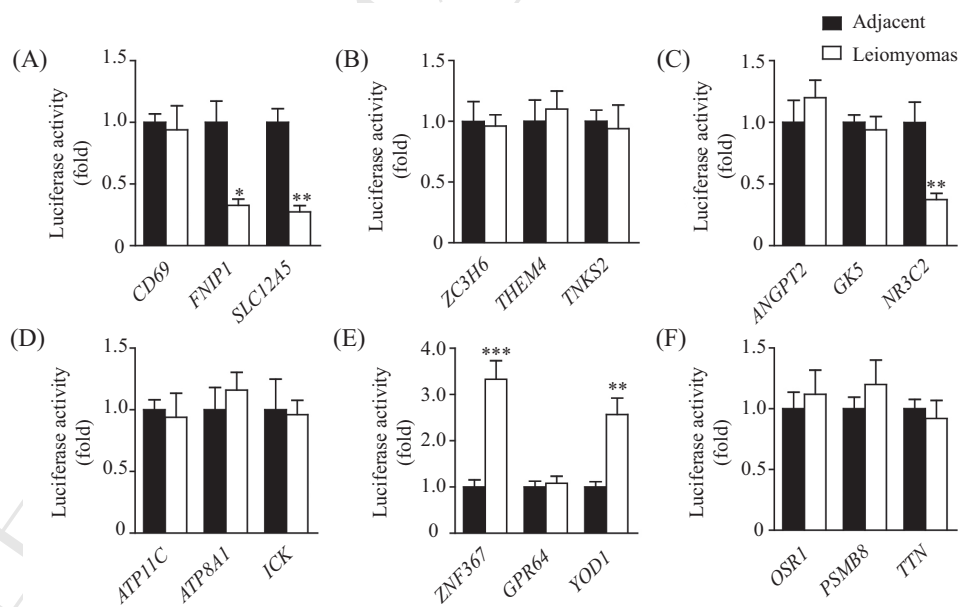


\*\*\* $P < 0.001$ , 与瘤旁组织相比。

\*\*\* $P < 0.001$  vs adjacent tissues.

图1 qPCR验证子宫肌瘤组织中表达上调(A)以及表达下调(B)的miRNA

Fig.1 qPCR verification of the up-regulated (A) and down-regulated (B) miRNA



A: miR-363预测的前三位靶基因的表达水平; B: miR-490预测的前三位靶基因的表达水平; C: miR-135b预测的前三位靶基因的表达水平; D: miR-217预测的前三位靶基因的表达水平; E: miR-590预测的前三位靶基因的表达水平; F: miR-451预测的前三位靶基因的表达水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与瘤旁组织相比。

A: the relative expression of the top 3 candidates of miR-363; B: the relative expression of the top 3 candidates of miR-490; C: the relative expression of the top 3 candidates of miR-135b; D: the relative expression of the top 3 candidates of miR-217; E: the relative expression of the top 3 candidates of miR-590; F: the relative expression of the top 3 candidates of miR-451. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs adjacent tissues.

图2 miRNA靶基因在子宫肌瘤肿瘤及瘤旁组织中表达水平的qPCR定量分析

Fig.2 qPCR analysis of the targets expression levels in leiomyomas tissues and adjacent tissues

得分(通过[http://www.targetscan.org/vert\\_61/](http://www.targetscan.org/vert_61/)网站输入相应的miRNA就会对多个靶基因自动计算评分)前三名的候选靶基因进行qPCR定量分析,探索其在子宫肌瘤病人的肿瘤组织及瘤旁组织的相对表达变化。结果发现,肌瘤组织中miR-363的三个候选靶基因中,有两个[*FNIP1*和*SLC12A5*(solute carrier family 12 member 5)]表达水平显著低于瘤旁组织(图2A),miR-135b的三个靶基因中有一个(*NR3C2*)表达水平在肌瘤组织中显著降低(图2C)。另外,表达下降的miR-590的三个候选靶基因中有两个表达水平显著升高(图2E)。这些候选基因的表达变化均与microRNA相反,符合靶基因的特征。而其他三个miRNA(miR-490、miR-217、miR-451)所对应的候选靶基的表达在瘤旁和肌瘤组织中均没有观察到明显变化(图2B、图2D和图2F)。

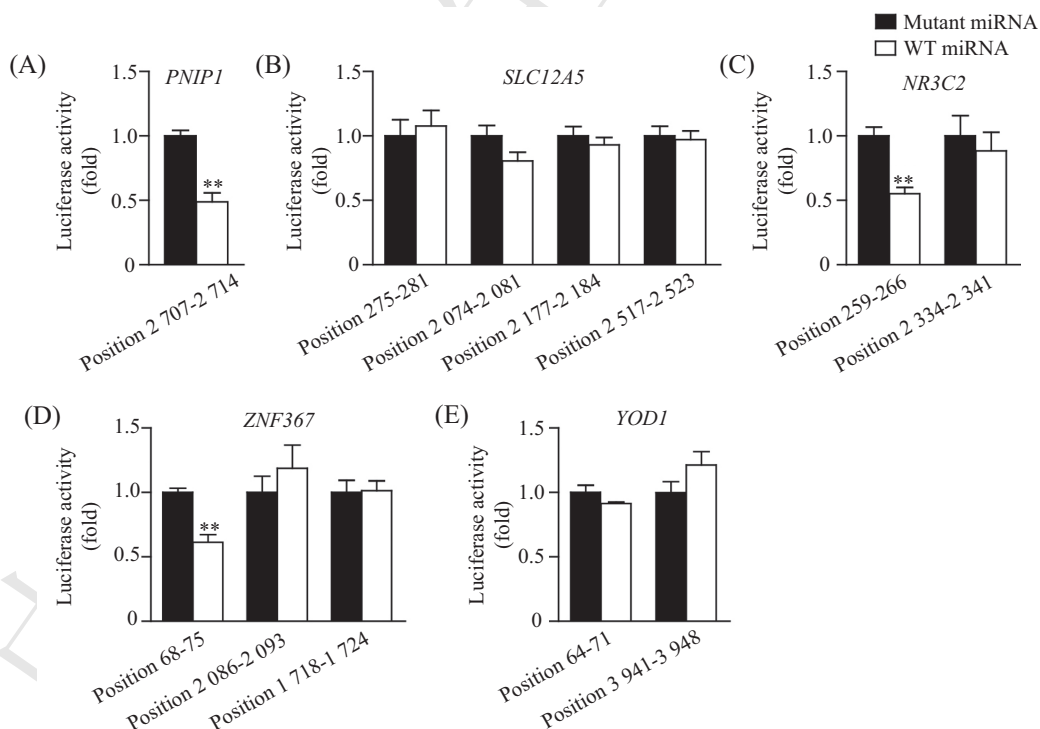
### 2.3 利用报告基因系统验证miRNA与靶基因3'UTR间的相互作用

为了确认上述表达变化的候选基因是否为miRNA的直接靶基因,将它们的3'UTR上的miRNA结合位点克隆到pGL3报告质粒luciferase的下游,通

过进一步表达正常和突变的miRNA分析miRNA对该位点的结合及luciferase活性的影响,从而判断是否是直接靶基因。结果表明,其中*FNIP1*的3'UTR上唯一结合位点能够被miR-363结合并显著抑制报告基因的活性(图3A),而*SLC12A5*的3'UTR上虽然有四个潜在结合位点,但均不是miR-363的结合位点(图3B),*NR3C2*的3'UTR上有两个miR-135b的潜在结合位点,其中第一个位点能够被miR-135b所抑制(图3C)。对于miR-590的两个有表达变化的候选基因*ZNF367*和*YOD1*(yeast OTU deubiquinating enzyme 1 homolog)而言,在前者的第一个位点可以被miR-590所抑制(图3D和图3E)。以上结果证明了*FNIP1*、*NR3C2*、*ZNF367*分别是miR-363、miR-135b、miR-590的直接靶基因。

### 2.4 miRNA与它们的靶基因在同一群样品中的表达水平相关性分析

由于miRNA是通过抑制靶基因起作用的,这提示miRNA和靶基因之间的表达应该是负相关的,因此我们在同一群子宫肌瘤样品中同时分析了miR-363、miR-135b、miR-590以及相应靶基因*FNIP1*、



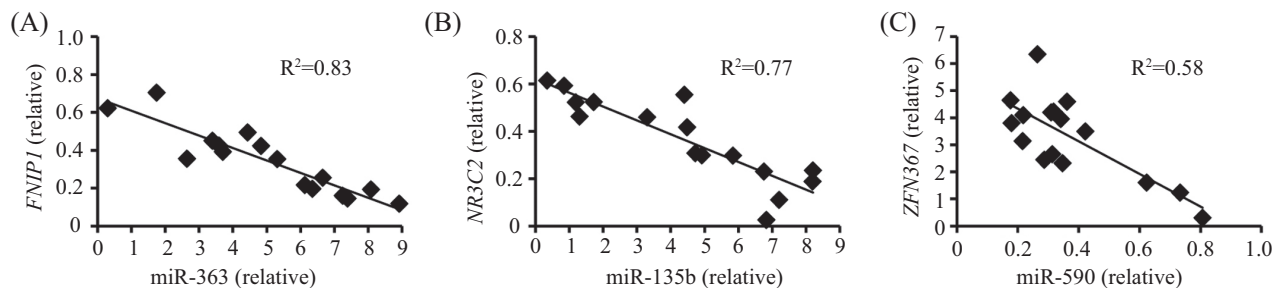
A、B: miR-363与对应的靶基因3'UTR之间的相互作用分析; C: miR-135b与对应的靶基因3'UTR之间的相互作用分析; D、E: miR-590与对应的靶基因3'UTR之间的相互作用分析。 \*\* $P < 0.01$ , 与瘤旁组织相比。

A~E: showed the interactions between miR-363 (A,B), miR-135b (C), miR-590 (D,E) and the 3'UTR of targets. \*\* $P < 0.01$  vs adjacent tissues.

图3 利用报告基因系统验证miRNA与靶基因3'UTR间的相互作用

Fig.3 Luciferase reporter analysis of direct interactions between miRNA and the predicted binding sites in the 3'UTR of the potential target candidates





A: miR-363与*FNIP1*表达水平相关性分析; B: miR-135b与*NR3C2*表达水平相关性分析; C: miR-590与*ZFN367*的表达水平相关性分析。

A: the expression correlation between miR-363 and *FNIP1*; B: the expression correlation between miR-135b and *NR3C2*; C: the expression correlation between miR-590 and *ZFN367*.

图4 miRNA与其靶基因的表达水平相关性分析  
Fig.4 Expression correlation between miRNA and their targets

*NR3C2*、*ZFN367*的表达水平, 并进行了相关性分析。结果表明, miR-363/*FNIP1*、miR-135b/*NR3C2*、miR-590/*ZFN367*均存在显著的负相关性(图4)。这进一步证实了上述三个靶基因的真实性。

### 3 讨论

miRNA广泛参与了人类及各种生物的生理病理过程, 其在肿瘤的发生中也起着重要的作用。有关子宫肌瘤发生中miRNA的报道最早见于2007年, Wang等<sup>[5]</sup>对子宫肌瘤临床标本进行miRNA芯片分析, 发现在子宫肌瘤与匹配肌层中, 多种miRNA的表达水平改变, 其中上调明显的包括let-7、miR-21、miR-23b等。随后, 又有两篇芯片分析的报道发现了一些新的变化候选miRNA, 其中包括miR-34a、miR-125b、miR-183、miR-142-5p、miR-139、miR-323等均有明显的表达变化<sup>[1,6]</sup>。2012年, Boryana等<sup>[7]</sup>通过高通量测序的方法发现, 超过50种miRNAs在肌瘤中表达异常。这些发现提示, miRNA在子宫肌瘤的发生发展中起重要调控作用。然而, 目前有关miRNA靶基因的具体鉴定仍然缺少, 本研究证实了多个表达有着显著上调或者下调的miRNA, 并且通过经典的实验鉴定了部分靶基因, 为子宫肌瘤的致病机理的研究提供了新的参考。

本研究所鉴定的靶基因包括*FNIP1*、*NR3C2*和*ZFN367*。研究发现, 卵泡激素是一个抗肿瘤基因, 卵泡激素突变与伯特-霍格-杜贝综合征(Birt-Hogg-Dube综合征, BHD综合征)发生密切相关, 而BHD综合征患者易发生肾上皮性肿瘤<sup>[8]</sup>。本研究发现, 子宫肌瘤患者中*FNIP1*作为表达上调的miR-363的靶基因而受到抑制, 这与该基因的功能是相符合的。

*NR3C2*是核因子超家族成员之一, 曾有报道发现该基因在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达显著下降<sup>[9]</sup>, 提示该基因可能是一个抗癌基因。我们的研究发现, miR-363在子宫肌瘤中表达上调, 其靶基因之一就是*NR3C2*, 通过作用于这个潜在的抗癌基因促进子宫肌瘤的形成可能是疾病发生的机制之一。*ZFN367*是锌指蛋白家族成员之一, 最新的研究发现, 该基因能够抑制肾上腺皮质癌的发病进程, 是一个典型的抑癌基因<sup>[10]</sup>。我们的研究发现, miR-590在子宫肌瘤中表达下降, 预期其靶基因*ZFN367*表达上调, 经本实验验证了其表达也是上调。然而, 这和*ZFN367*是抑癌基因是相悖的, 具体的机制是什么目前不清楚, 可能和miRNA的多靶点之间的相互代偿有一定关系, 真实情况需要进一步的探索。

本研究不仅分析并验证了多个miRNA在子宫肌瘤中的表达变化, 而且对它们的靶基因进行了严密的分析, 鉴定了三个靶基因, 并且发现三对miRNA/靶基因之间表达呈现负相关性。这些发现为揭示子宫肌瘤的发病分子机制提供了新线索, 为疾病的诊治提供了新的可能性。

### 参考文献 (References)

- 1 Marsh EE, Lin Z, Yin P, Milad M, Chakravarti D, Bulun SE. Differential expression of microRNA species in human uterine leiomyoma versus normal myometrium. *Fertil Steril* 2008; 89(6): 1771-6.
- 2 Norian JM, Owen CM, Taboas J, Korecki C, Tuan R, Malik M, et al. Characterization of tissue biomechanics and mechanical signaling in uterine leiomyoma. *Matrix Biol* 2012; 31(1): 57-65.
- 3 Qiang W, Liu Z, Serna VA, Druschitz SA, Liu Y, Espona-Fiedler M, et al. Down-regulation of miR-29b is essential for pathogenesis of uterine leiomyoma. *Endocrinology* 2014; 155(3): 663-9.

- 4 Moreno-Moya JM, Vilella F, Simon C. MicroRNA: Key gene expression regulators. *Fertil Steril* 2014; 101(6): 1516-23.
- 5 Wang T, Zhang X, Objuru L, Laser J, Aris V, Lee P, *et al.* A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46(4): 336-47.
- 6 Pan Q, Luo X, Chegini N. Differential expression of microRNAs in myometrium and leiomyomas and regulation by ovarian steroids. *J Cell Mol Med* 2008; 12(1): 227-40.
- 7 Georgieva B, Milev I, Minkov I, Dimitrova I, Bradford AP, Baev V. Characterization of the uterine leiomyoma microRNAome by deep sequencing. *Genomics* 2012; 99(5): 275-81.
- 8 Johannesma PC, Houweling AC, van Waesberghe JH, van Moorselaar RJ, Starink TM, Menko FH, *et al.* The pathogenesis of pneumothorax in Birt-Hogg-Dube syndrome: A hypothesis. *Respirology* 2014; 19(8): 1248-50.
- 9 Choi YW, Bae SM, Kim YW, Lee HN, Kim YW, Park TC, *et al.* Gene expression profiles in squamous cell cervical carcinoma using array-based comparative genomic hybridization analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17(3): 687-96.
- 10 Jain M, Zhang L, Boufraqueh M, Liu-Chittenden Y, Bussey K, Demeure MJ, *et al.* ZNF367 inhibits cancer progression and is targeted by miR-195. *PLoS One* 2014; 9(7): e101423.

中国细胞生物学