

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.02.0167

· 论 著 ·

Piwi 互作 RNA 的筛选及其在儿童肾母细胞瘤组织中的表达

王 璋^{1,2}, 张 丹^{1,2}, 张朝霞^{1,2}, 王钊颖^{1,2}, 谭小军^{1,3}, 卢虹旭^{1,3}, 沈炼桔^{1,2,4}, 龙春兰^{1,2,4}, 魏光辉^{3,4,5,6}, 何大维^{3,4,5,6*}

1. 重庆医科大学附属儿童医院儿童泌尿生殖发育与组织工程重庆市重点实验室, 重庆 400014
2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014
3. 重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科, 重庆 400014
4. 重庆医科大学附属儿童医院儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014
5. 重庆医科大学附属儿童医院儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014
6. 重庆医科大学附属儿童医院国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 重庆 400014

[摘要] **目的** 探讨 Piwi 互作 RNA (piRNA) 在儿童肾母细胞瘤中的表达及临床意义。**方法** 对 Piwi 样蛋白 2 (P*iwil*2) 基因重编程人成纤维细胞所形成的肿瘤样干细胞进行高通量测序, 筛选出差异表达 piRNA, 并利用 miRanda 软件预测其靶基因, 对靶基因进行基因本体 (GO) 功能分析。采用 qRT-PCR 检测差异表达 piRNA 及其靶基因在 34 例肾母细胞瘤患儿肿瘤组织及癌旁正常肾组织标本中的表达, 并分析差异表达 piRNA 及其靶基因与肾母细胞瘤临床病理特征的关系。**结果** 通过高通量测序筛选出 230 个差异表达 piRNA, 利用 miRanda 软件预测出 43 个靶基因, 经 GO 分析发现其参与的生物学过程主要为调节细胞钙离子浓度, 分子功能主要为参与 ATP 酶的活动及多聚 A 尾 RNA 结合。选取 5 个未知的差异表达 piRNA 及其靶基因检测其在肾母细胞瘤肿瘤组织及癌旁正常组织中的表达情况, 结果显示第 13 位未知上调 piRNA (NU13) 表达量在肿瘤组织中下调 ($P < 0.01$), 其靶基因 NOP56 核糖核蛋白 (NOP56) 表达在肿瘤组织和癌旁正常组织中差异表达无统计学意义 ($P = 0.58$); 第 9 位未知上调 piRNA (NU9) 表达量在肿瘤组织中下调 ($P < 0.01$), 其靶基因 40S 核糖体蛋白 S8 (RPS8) 基因在肿瘤组织和癌旁正常组织中差异表达无统计学意义 ($P = 0.29$); 第 5、7、9 位未知下调 piRNA (ND5、ND7、ND9) 及其共同靶基因 MT-RNR2 样蛋白 1 (MTRNR2L1) 基因的表达量在肿瘤组织中均下调 (P 均 < 0.01)。以上在儿童肾母细胞瘤组织中出现差异表达的 piRNA 及其靶基因与患儿年龄、性别、肿瘤临床分期、病理分型无明显相关性 (P 均 > 0.05)。**结论** piRNA NU9、NU13、ND5、ND7、ND9 及靶基因 MTRNR2L1 在儿童肾母细胞瘤组织中出现差异表达, 有望成为鉴别肾母细胞瘤与正常肾组织的标志物。

[关键词] 高通量测序; 肿瘤干细胞; Piwi 互作 RNA; 肾母细胞瘤

[中图分类号] R 73-3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)02-0167-09

Screening of Piwi-interacting RNAs and their expression in childhood nephroblastoma

WANG Zhang^{1,2}, ZHANG Dan^{1,2}, ZHANG Zhao-xia^{1,2}, WANG Zhao-ying^{1,2}, TAN Xiao-jun^{1,3}, LU Hong-xu^{1,3}, SHEN Lian-ju^{1,2,4}, LONG Chun-lan^{1,2,4}, WEI Guang-hui^{3,4,5,6}, HE Da-wei^{3,4,5,6*}

1. Chongqing Key Laboratory of Child Urogenital Development and Tissue Engineering, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
2. Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
3. Department of Urology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
4. Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
5. China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
6. National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of P-element-induced wimpy testis (Piwi)-interacting RNAs (piRNAs) in childhood nephroblastoma. **Methods** The differential piRNAs of P*iwil*2-iCSC

[收稿日期] 2019-11-23 **[接受日期]** 2020-02-10

[基金项目] 重庆市科学技术委员会项目(7000025)。Supported by Project of Science and Technology Commission of Chongqing (7000025)。

[作者简介] 王 璋, 硕士生。E-mail: 273399430@qq.com

*通信作者 (Corresponding author)。Tel: 023-63633264, E-mail: hedawei@hospital.cqmu.edu.cn

(P-element-induced wimpy testis like 2 [*Piwil2*] reprogramming human fibroblast) were screened by high-throughput sequencing. Target genes were predicted by miRanda software and performed by gene ontology (GO) function analysis. Differential piRNAs and their target genes were detected by qRT-PCR in tumor tissues and normal kidney tissues of 34 children with nephroblastoma. The correlation of differential piRNAs and their target genes with clinicopathological characteristics of nephroblastoma was analyzed. **Results** A total of 230 differential piRNAs were screened out through high-throughput sequencing, and 43 target genes were predicted by miRanda. The GO analysis showed that the biological process of target genes was mainly involved in regulating the cytosolic calcium ion concentration and its molecular function was mainly involved in the activity of ATPase and poly (A) RNA binding. The expression of five unknown differentially expressed piRNAs and their target genes were detected in nephroblastoma and normal kidney tissues. The expression of NU13 (13th unknown upregulated piRNA) and NU9 (9th unknown upregulated piRNA) were significantly downregulated in tumor tissues (both $P < 0.01$), while the expression of their target genes NOP56 ribonucleoprotein (*NOP56*, $P = 0.58$) and 40S ribosomal protein S8 (*RPS8*, $P = 0.29$) had no significant difference between tumor tissues and normal kidney tissues. The expression of ND5, ND7, ND9 (5th, 7th, 9th unknown downregulated piRNA) and their target gene MT-RNR2 like protein 1 (*MTRNR2L1*) were significantly downregulated in tumor tissues (all $P < 0.01$). The above-mentioned piRNAs and their target genes had no significant correlation with age, gender, tumor stage, or pathological type of the children (all $P > 0.05$). **Conclusion** piRNA NU9, NU13, ND5, ND7, ND9 and the target gene *MTRNR2L1* are differentially expressed in children with nephroblastoma. They are expected to be markers to distinguish nephroblastoma from normal kidney tissues.

[Key words] high-throughput sequencing; cancer stem cells; Piwi-interacting RNA; nephroblastoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(2): 167-175]

Argonaute 家族的 Piwi (P-element-induced wimpy testis) 蛋白主要在各种生物的生殖干细胞或胚胎源性/性腺肿瘤组织中广泛表达, 其与 Piwi 互作 RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA) 相互作用, 维持生殖细胞中关键保守基因的稳定^[1]。Piwi 家族蛋白 Piwi 样蛋白 (P-element-induced wimpy testis like, *Piwil*) 2 和 *Piwil*4 及 piRNA 已被证实在多种肿瘤组织中存在差异表达, 但是不同肿瘤中 piRNA 的表达水平及分布不同^[2-4], 发现更多 piRNA 并明确其在肿瘤中的表达情况有助于肿瘤的诊断和治疗^[5]。

恶性肿瘤的发生、耐药和转移均与肿瘤组织中存在少量肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 有关^[6-7]。目前的研究一般是基于干细胞标志物从实体肿瘤中分离获得 CSC, 但在 CSC 的提取和培养技术上仍存在相当大的困难。本课题组前期通过 *Piwil2* 基因重编程人成纤维细胞 (fibroblast, FB) 建立了肿瘤样干细胞^[8]。本研究以该肿瘤样干细胞作为体外培养的 CSC 模型, 通过高通量测序技术筛选 *Piwil2* 调控的差异表达 piRNA 并预测其靶基因, 分析差异表达的 piRNA 及其靶基因在儿童肾母细胞瘤中的表达情况及临床意义, 为临床诊断及治疗肾母细胞瘤提供新的分子标志物。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂 CO₂ 培养箱和超速离心机 (美国 Thermo 公司), 恒温水浴箱 (上海医疗

器械厂), 细胞培养皿 (美国 HyClone 公司), 移液器 (德国 Eppendorf 公司), 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司)。FBS (美国 HyClone 公司), F-12 培养液 (美国 Gibco 公司), 嘌呤霉素 (美国 Sigma 公司), TRIzol 试剂 (美国 Thermo 公司), miRNA 反转录第一链试剂盒和 miRNA qRT-PCR 试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司], mRNA 反转录第一链试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), mRNA qRT-PCR 试剂盒 (德国 Qiagen 公司)。

1.2 细胞培养 本课题组前期将携带 *Piwil2*-GFP 标记的慢病毒及空载目的基因的 GFP 标记的慢病毒分别感染原代培养的小儿包皮 FB, 分别命名为 *Piwil2*-FB、GFP-FB, 经细胞行为学及体外细胞染色体核型分析证实 *Piwil2*-FB 为 *Piwil2* 诱导的肿瘤样干细胞^[8], 并长期储存于液氮中。将 *Piwil2*-FB、GFP-FB 从 -80 °C 冰箱中取出, 快速在 37 °C 水浴箱中复温, 将细胞悬液移至 10 mL EP 管中, 加入 2 mL F-12 培养液, 离心清洗后分别培养于含 10% FBS 的 F-12 培养液中 (10 cm 培养皿), 在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。细胞每隔 48 h 进行换液, 待生长至 80% 以上融合度时用于实验。

1.3 临床标本 收集重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科 2015 年 6 月至 2019 年 6 月入院的肾母细胞瘤患儿的手术标本, 均为首次行肿瘤切除术并经病理科 2 位医师证实为肾母细胞瘤组织。本研究获得重庆医科大学附属儿童医院医学伦理委员会

批准,且标本均在患儿监护人知情同意后获取。标本来自 34 例儿童患者,男 15 例、女 19 例,年龄为 4.0~104.0 (29.9±24.2) 个月;依照美国国家肾母细胞瘤研究组 (National Wilms' Tumor Study Group, NWTS) -5 标准^[9]:组织分化良好 27 例、分化不良 7 例,分期 I 期 7 例、II 期 9 例、III 期 11 例、IV 期 1 例、V 期 6 例。取每例患儿的肿瘤组织作为肿瘤组,并取其癌旁组织 (距离肿瘤≥3 cm 的正常肾脏组织) 作为对照组织, V 期双侧肿瘤则取肿瘤同侧的正常肾脏组织。

1.4 高通量测序及靶基因预测送检 将两组细胞样本 (Piwi2-FB、GFP-FB) 送上海惠研生物科技有限公司进行高通量测序, Piwi2-FB 作为实验组、GFP-FB 作为对照组。cDNA 文库构建及高通量测序由上海惠研生物科技有限公司完成,差异基因的筛选标准为 $P < 0.05$ 且差异倍数 ≥ 1.5 , 通过 miRanda 算法 (<http://www.microrna.org/microrna/getDownloads.do>) 对这些差异基因进行靶基因预测,并通过 David (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 对靶基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能分析。

1.5 总 RNA 提取、反转录及 qRT-PCR 采用 TRIzol 法提取细胞及组织的总 RNA。将 10 cm 培养皿中的细胞用 1 mL TRIzol 试剂消化 10 min 后吸入 1.5 mL 去酶 EP 管中 (组织加 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TRIzol 后用电动匀浆器充分匀浆 1~2 min), 加入 200 μL 氯仿震荡混匀后室温放置 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\times g$ 离心 15 min, 吸取上清加入 500 μL 异丙醇混匀, 室温静置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\times g$ 离心 10 min 后弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇温和震荡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 $\times g$ 离心 5 min 后弃上清, 即得总 RNA。将总 RNA 真空干燥 5~10 min 后加入 50 μL DEPC 水溶解。利用 NanoDrop ND-1000 分光光度仪对总 RNA 进行质量检验, D_{260}/D_{280} 为 1.8~2.0; 进一步行琼脂糖凝胶电泳, 可见 28S、18S 2 条亮带。使用 miRNA 反转录试剂盒和 mRNA 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 采用 miRNA qRT-PCR 试剂盒和 mRNA qRT-PCR 试剂盒对组织进行检测。piRNA 及其靶基因的引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计合成, 引物序列和退火温度见表 1。

表 1 piRNA 和靶基因的引物序列
Tab 1 Primers of piRNAs and target genes

piRNA or target gene	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)
NU9	Forward: GCG CTC TCG TGA TGA AAA CTC TGT CCA GT	64
NU13	Forward: GGA GGT GAT GAA CTG TCT GAG CCT GAC CTT	64
ND5	Forward: ATG TTG GAT CAG GAC ATC CCA ATG GTG CAG	64
ND7	Forward: TGT TGG ATC AGG ACA TCC CAA TGG TGC AGC	64
ND9	Forward: TTG GAT CAG GAC ATC CCA ATG GTG CAG C	64
MTRNR2L1	Forward: AGA AGG CGT TCA AGC TCA ACA CC Reverse: CTG ATG TAG GCT TAT GCG GAG GAG	60
NOP56	Forward: TGA AGA TCA TCA ACG ACA ATG C Reverse: TTC AGA TAA AGA CAC CAC ACG A	60
RPS8	Forward: TCT CCT GGG GCT CAG AGT GTT G Reverse: CGG TAC GGT GTG CTG TCG ATG	60

piRNA: Piwi-interacting RNA; Piwi: P-element-induced wimpy testis; NU: Unknown upregulated piRNA; ND: Unknown downregulated piRNA; MTRNR2L1: MT-RNR2 like protein 1; NOP56: NOP56 ribonucleoprotein; RPS8: 40S ribosomal protein S8

1.6 统计学处理 应用 SPSS 21.0 及 Graphpad Prism7.0 软件进行统计学分析和作图。非正态分布的数据描述采用中位数 (下四分位数, 上四分位数) 表示, 通过 Wilcoxon 检验比较配对样本中目的基因的表达差异, 采用 Mann-Whitney 检验比较目的基因在不同年龄、性别、临床分期和病理分型的肿瘤组织中的差异。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Piwi2-FB 中 piRNA 表达谱及差异 piRNA 从 Piwi2-FB 中筛选出 230 个差异表达 piRNA, 对比 The piRNA database 数据库 (<http://www.regulatoryrna.org/database/piRNA/>), 其中 180 个为已发现且报道过的 piRNA (46 个在人类基因中有过报道, 134 个

在非人类生物中有过报道), 50个为未曾报道的新 piRNA。230个差异表达 piRNA 中, 106个表达量在 Piwil2-FB 中显著上调(其中 22个未知, 上调

未知用 NU 表示), 124个表达量显著下调(其中 28个未知, 下调未知用 ND 表示)。50个差异表达的未知 piRNA 的聚类分析见图 1。

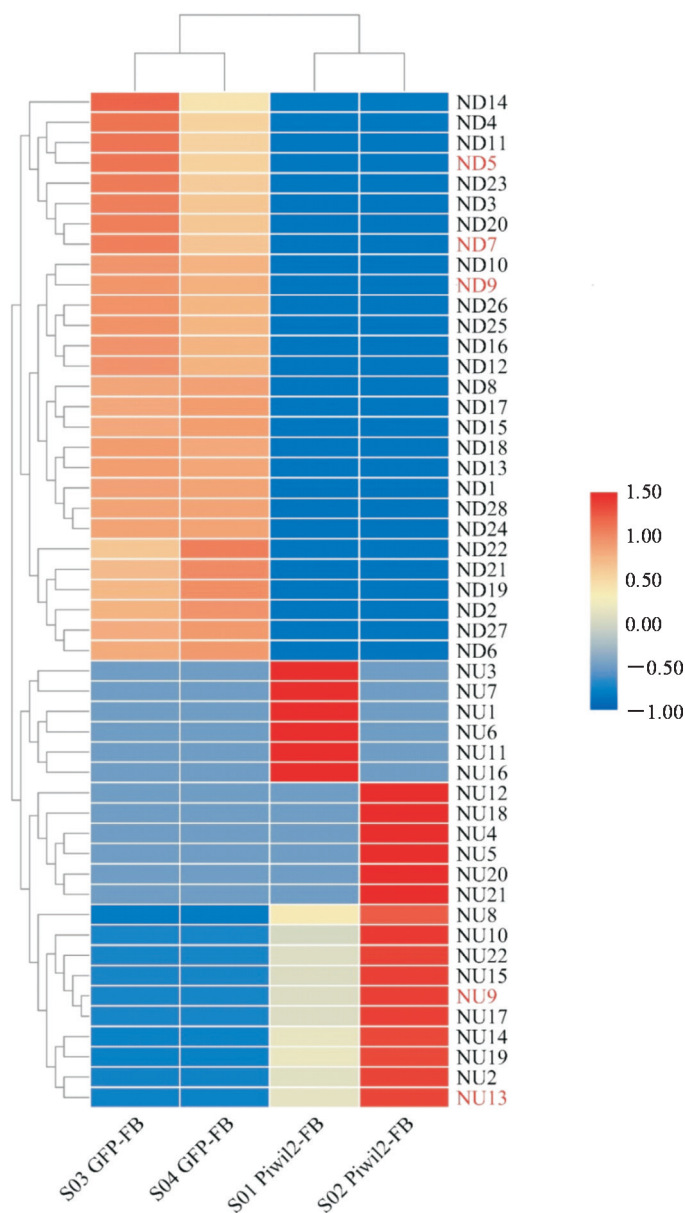


图 1 Piwil2 诱导的肿瘤样干细胞中 50 个差异表达的未知 piRNA 的聚类分析图

Fig 1 Heatmap of 50 differentially expressed unknown piRNAs in Piwil2-induced cancer stem-like cells

Piwil2: Piwi like 2; piRNA: Piwi-interacting RNA; Piwi: P-element-induced wimpy testis; NU: Unknown upregulated piRNA; ND: Unknown downregulated piRNA; S01/S02 Piwil2-FB: Piwil2-green fluorescent protein reprogramming human fibroblast; S03/S04 GFP-FB: Green fluorescent protein reprogramming human fibroblast

2.2 piRNA 靶基因预测及富集分析 通过 miRanda 算法对 230 个差异表达基因进行靶基因预测, 共 61 个 piRNA 预测出靶基因, 预测出的靶基因共 43 个。对这 43 个靶基因进行 GO 分析 ($P < 0.05$) (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), 发现其参与的生物学过程主要为调节细胞钙离子浓度, 分子功能主要为参与 ATP 酶的活动及多聚 A 尾 RNA 结合(图 2)。

通过 String 数据库 (www.string-db.org) 对其进行蛋白互作网络分析(互作分数 ≥ 0.15), 其中肌球蛋白 IXA (myosin IXA, MYO9A) 有 8 个相互作用蛋白, 成蛋白 2 (formin 2, FMN2) 有 7 个相互作用蛋白, 蛋白酪氨酸磷酸酶 D 型受体 (protein tyrosine phosphatase receptor-type delta, PTPRD) 有 6 个相互作用蛋白, NOP56 核糖核蛋白 (NOP56

ribonucleoprotein, NOP56) 有 4 个互作蛋白, 40S 核糖体蛋白 S8 (40S ribosomal protein S8, RPS8) 有 3 个互作蛋白, 相互作用综合分数最高的组合是 NOP56 和 RPS8 (0.994)。见图 3。靶基

因 MT-RNR2 样蛋白 1 (MT-RNR2 like protein 1, MTRNR2L1) 虽然没有在蛋白互作网络中, 但是在差异表达量前 10 位的下调未知 piRNA 中有 3 个 piRNA 靶向它。

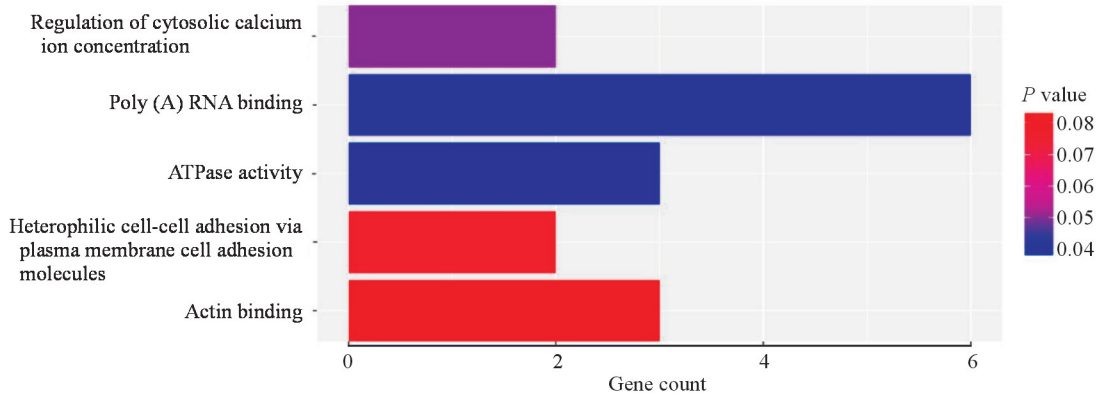


图 2 Piwil2 诱导的肿瘤样干细胞中差异表达 piRNA 的预测靶基因的 GO 分析

Fig 2 GO functional classification of predicted target genes of differentially expressed piRNAs in Piwil2-induced cancer stem-like cells

Piwil2: Piwi like 2; piRNA: Piwi-interacting RNA; Piwi: P-element-induced wimpy testis; GO: Gene ontology

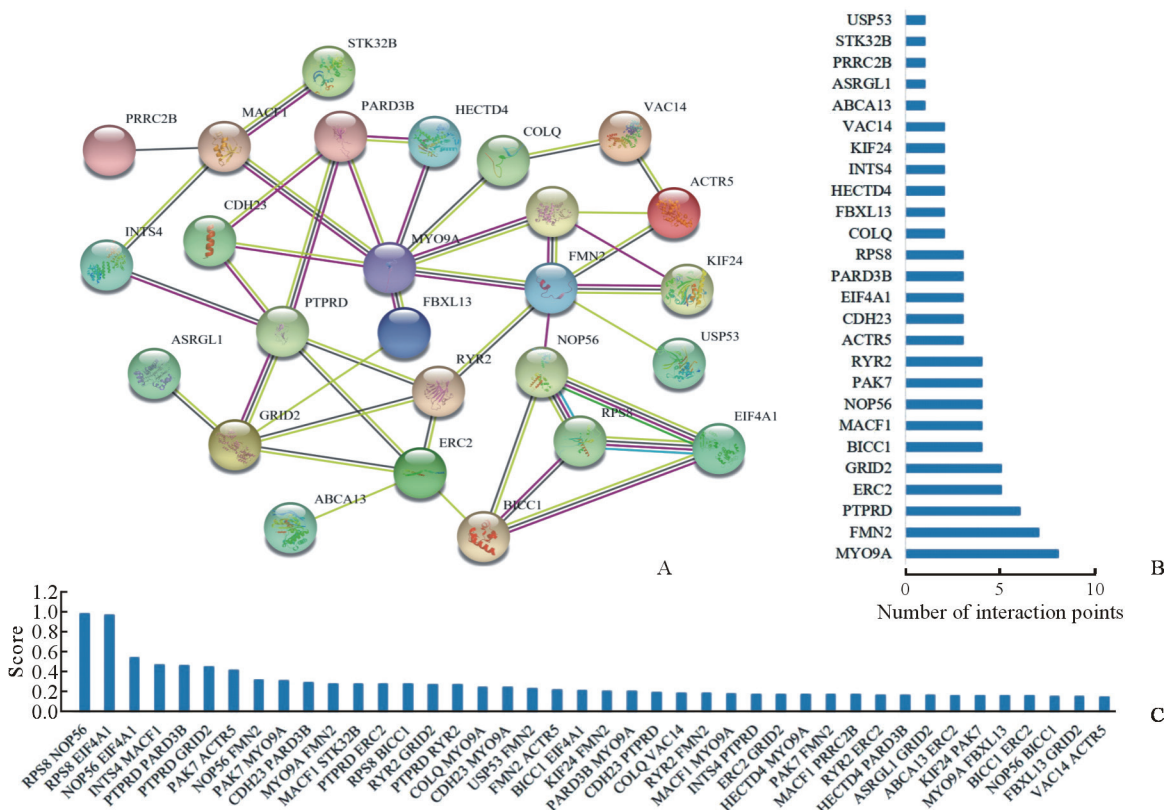


图 3 Piwil2 诱导的肿瘤样干细胞中差异表达 piRNA 的预测靶基因的蛋白互作分析

Fig 3 Protein interaction analysis of predicted target genes of differentially expressed piRNAs in Piwil2-induced cancer stem-like cells

A: Gene interaction network; B: Interaction points; C: Combined score. Piwil2: Piwi like 2; piRNA: Piwi-interacting RNA; Piwi: P-element-induced wimpy testis

2.3 piRNA 及其靶基因在肾母细胞瘤患儿肿瘤组织及癌旁组织中的表达 选择 piRNA NU13 (未知的上调差异表达 piRNA 第 13 位) 及其靶基因 *NOP56*, piRNA *NU9* (未知的上调差异表达 piRNA 第 9 位) 及其靶基因 *RPS8*, piRNA *ND5*、*ND7*、*ND9* (未知的下调差异表达 piRNA 第 5、7、9 位) 及其靶基因 *MTRNR2L1*, 在 34 例肾母细胞瘤患儿组织中进行 qRT-PCR 检测。结果 (图 4) 显示, 在肿瘤组织中, NU13 表达量下调 ($P < 0.01$), 其靶

基因 *NOP56* 的表达与癌旁正常组织差异无统计学意义 ($P = 0.58$); NU9 表达量下调 ($P < 0.01$), 其靶基因 *RPS8* 的表达与癌旁正常组织差异无统计学意义 ($P = 0.29$); 而 *ND5*、*ND7*、*ND9* 及其靶基因 *MTRNR2L1* 的表达量均下调 (P 均 < 0.01)。其中 *NOP56* 和 *RPS8* 在肿瘤组织中的表达量与患儿年龄和性别有关 (P 均 < 0.05), 其余基因的表达量与患儿年龄、性别、肿瘤临床分期、病理分型并无相关性 (P 均 > 0.05)。见表 2。

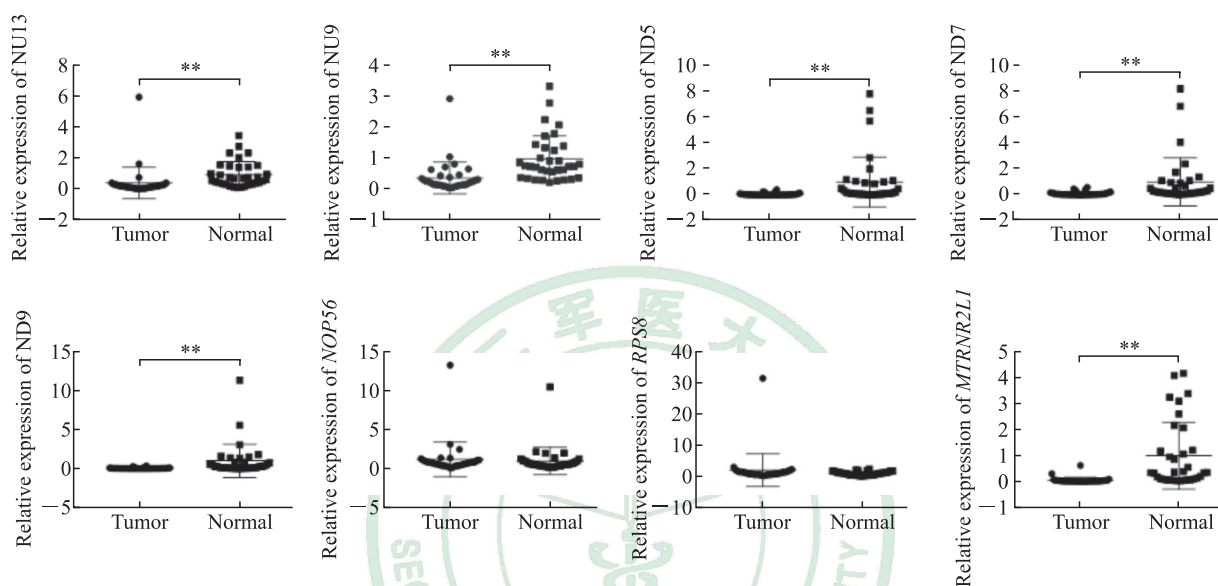


图 4 儿童肾母细胞瘤组织中 piRNA 及其预测靶基因的表达

Fig 4 Expression of piRNAs and their predicted target genes in childhood nephroblastoma

piRNA: Piwi-interacting RNA; Piwi: P-element-induced wimpy testis; NU: Unknown upregulated piRNA; ND: Unknown downregulated piRNA; MTRNR2L1: MT-RNR2 like protein 1; NOP56: NOP56 ribonucleoprotein; RPS8: 40S ribosomal protein S8. $**P < 0.01$. $n = 34$, median (lower quartile, upper quartile)

3 讨论

CSC 具有致癌性、多重分化、自我更新等特性, 有学者认为其是肿瘤复发转移及抵抗放射治疗和化学治疗的根本原因^[10], 探究其起源及参与其发生过程中的标志物有助于更好地判断肿瘤预后及更精准地进行靶向治疗。本课题组前期用 *Piwi2* 基因重编程人 FB 建立了稳定表达 *Piwi2*-GFP 标记的 *Piwi2*-FB, 经细胞生物行为学测试及 CSC 标志物检测证实重编程的细胞为肿瘤样干细胞^[8], 可以作为理想的体外 CSC 细胞模型。

piRNA 是长度为 23~31 nt 的小分子非编码 RNA, 特征是在 5' 端常见单磷酸的尿嘧啶, 而在 3' 端有甲基化修饰^[11]。piRNA 与 Piwi 蛋白 (包括 *Piwi2* 和 *Piwi4*) 结合后, 通过乒乓效应抑制转座

子的功能而起到稳定基因的作用, 此外 piRNA 还可通过 DNA 甲基化与组蛋白修饰参与基因调节^[12-14]。在 *Piwi2* 基因重编程 FB 构建的体外 CSC 模型中, 我们推测 *Piwi2* 基因过表达所致的相关 piRNA 表达量及功能变化可能在肿瘤发生过程中具有重要作用, 其差异表达的 piRNA 可能对肿瘤组织的发生及对肿瘤的诊治和预后判断有重要价值。

本实验通过高通量测序技术从 *Piwi2*-FB 筛选出差异表达 piRNA 230 个, 通过 miRanda 算法预测出靶基因共 43 个。对筛选出的差异表达 piRNA 的靶基因进行 GO 分析发现其参与的生物学过程主要为调节细胞钙离子浓度, 分子功能主要为参与 ATP 酶的活动及多聚 A 尾 RNA 结合。利用 String 数据库进行蛋白互作网络分析, 结果显示靶基因中 *NOP56* 和 *RPS8* 的相互作用综合分数最高 (0.994)

且在网络中有较多相互作用蛋白(4个、3个), 蛋白互作网络中, 但在表达量前10位的下调未知同时GO分析发现 *NOP56* 与 *RPS8* 也富集于多聚A尾RNA结合。靶基因 *MTRNR2L1* 虽然未出现于此 piRNA 中有3个 piRNA 靶向它。

表2 儿童肾母细胞瘤组织中 piRNA 及其预测靶基因表达与临床病理参数的关系

Tab 2 Correlation between expression of piRNAs and their predicted target genes and clinicopathological parameters in childhood nephroblastoma

Parameter	n	<i>M</i> (Q_L, Q_U)			
		NU9	NU13	ND5	ND7
Age (month)					
≤23	17	0.412 (0.156, 0.668)	0.344 (0.205, 0.796)	0.042 (0.008, 0.486)	0.143 (0.025, 0.805)
>23	17	0.310 (0.170, 0.423)	0.274 (0.147, 0.642)	0.177 (0.071, 0.434)	0.224 (0.082, 0.551)
<i>P</i> value		0.433	0.540	0.357	0.413
Gender					
Male	15	0.312 (0.166, 0.620)	0.308 (0.156, 0.629)	0.177 (0.053, 0.563)	0.339 (0.068, 0.536)
Female	19	0.374 (0.199, 0.540)	0.351 (0.163, 0.727)	0.153 (0.015, 0.415)	0.188 (0.040, 0.669)
<i>P</i> value		0.560	0.656	0.410	0.537
Tumor stage					
I - II	16	0.338 (0.201, 0.520)	0.319 (0.125, 0.572)	0.048 (0.018, 0.499)	0.192 (0.049, 0.945)
III - V	18	0.333 (0.156, 0.805)	0.402 (0.222, 0.702)	0.192 (0.071, 0.355)	0.219 (0.078, 0.544)
<i>P</i> value		0.825	0.313	0.597	0.932
Pathological type					
FH	27	0.312 (0.134, 0.540)	0.308 (0.139, 0.655)	0.177 (0.016, 0.509)	0.339 (0.050, 0.566)
uFH	7	0.356 (0.295, 0.865)	0.460 (0.238, 0.660)	0.153 (0.024, 0.227)	0.122 (0.049, 0.224)
<i>P</i> value		0.452	0.427	0.647	0.403
Parameter	n	ND9	MTRNR2L1	NOP56	RPS8
Age (month)					
≤23	17	0.093 (0.022, 0.440)	0.085 (0.047, 0.222)	1.973 (0.743, 3.502)	1.613 (1.143, 2.603)
>23	17	0.178 (0.037, 0.495)	0.071 (0.012, 0.139)	0.570 (0.459, 1.587)	0.779 (0.599, 1.667)
<i>P</i> value		0.563	0.205	0.016	0.031
Gender					
Male	15	0.312 (0.020, 0.448)	0.049 (0.013, 0.122)	0.616 (0.483, 1.214)	0.779 (0.595, 1.021)
Female	19	0.093 (0.024, 0.444)	0.107 (0.045, 0.235)	1.647 (0.702, 3.030)	1.613 (0.895, 2.732)
<i>P</i> value		0.681	0.060	0.040	0.005
Tumor stage					
I - II	16	0.100 (0.024, 0.423)	0.100 (0.016, 0.280)	0.100 (0.016, 0.280)	1.344 (0.679, 2.338)
III - V	18	0.236 (0.020, 0.583)	0.077 (0.025, 0.141)	0.077 (0.025, 0.141)	0.911 (0.628, 2.612)
<i>P</i> value		0.597	0.463	0.175	0.695
Pathological type					
FH	27	0.106 (0.020, 0.438)	0.060 (0.015, 0.177)	1.214 (0.570, 2.497)	1.292 (0.646, 2.346)
uFH	7	0.312 (0.036, 0.584)	0.125 (0.083, 0.209)	0.835 (0.283, 3.031)	0.927 (0.611, 2.621)
<i>P</i> value		0.294	0.151	0.647	0.771

M (Q_L, Q_U): Median (lower quartile, upper quartile); piRNA: Piwi-interacting RNA; Piwi: P-element-induced wimpy testis; NU: Unknown upregulated piRNA; ND: Unknown downregulated piRNA; MTRNR2L1: MT-RNR2 like protein 1; NOP56: NOP56 ribonucleoprotein; RPS8: 40S ribosomal protein S8; FH: Favorable histology; uFH: Unfavorable histology

肾母细胞瘤作为儿童中最常见的恶性肿瘤, 目前临床上还没有高特异性的诊断及预后相关标志物或治疗靶点^[15-16]。通过生物信息学筛选, 本研究将 piRNA NU13 及其靶基因 *NOP56*, piRNA NU9 及其靶基因 *RPS8*, piRNA ND5、ND7、ND9 及其靶基因 *MTRNR2L1* 在 34 例肾母细胞瘤患儿组织中进行 qRT-PCR 检测, 结果显示在肿瘤组织中以上 5 个

piRNA 及靶基因 *MTRNR2L1* 的表达量下调 (*P* 均 < 0.01)。本研究检测的 5 个 piRNA 均在肿瘤组织中下调, 虽然 NU9 与 NU13 的靶基因表达未见明显差异, 但其依然可能通过其他多种途径参与肿瘤的发生。许多研究已报道了 piRNA 参与肿瘤发生的途径, 最常见的是通过联合 Piwi 蛋白来调控转座子的功能从而影响肿瘤的发生^[17]。此外, piRNA

及 piRNA/Piwi 复合体也可通过靶向某些蛋白编码基因来调节肿瘤的生长,如招募 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 来调节 DNA 的甲基化等^[18]。因此,推测本实验中的 piRNA 表达量下调可能导致转座子功能失调,进而促进肿瘤的发生,但具体机制仍有待进一步研究。本研究结果表明 piRNA NU9、NU13、ND5、ND7、ND9 在肾母细胞瘤的肿瘤组织与癌旁正常组织中的表达差异显著,可以作为区分恶性肿瘤与正常组织的潜在标志物;然而它们的表达情况与肿瘤临床分期、病理分型之间并无相关性,是否可以作为肿瘤患者预后判断标志物还需进一步研究。

对 43 个靶基因进行蛋白互作网络分析,发现了其中位置较为重要且蛋白互作评分与可信度最高的互作蛋白 NOP56 与 RPS8。NOP56 参与核糖体 RNA 前体核糖甲基化修饰,是小分子核仁核糖核蛋白复合体的组成之一^[19]。研究表明 NOP56 异常与 Burkitt 淋巴瘤的 *Myc* 基因突变有关^[20],近期也有研究发现乳腺癌的发生与 NOP56 的上调有关^[21]。RPS8 作为 40S 核糖体亚基的组成部分,其确切功能尚未明确,有研究显示,RPS8 与 CDK11p46 协同作用可以抑制 cap- 和 IRES 依赖的翻译过程,降低或过表达 RPS8 可通过抑制翻译使荧光素酶的活性降低^[22]。String 数据库显示 RPS8 参与有关翻译的通路,且其上调可促进 NOP56 的表达与功能。本研究中靶基因 *NOP56* 和 *RPS8* 的表达在肿瘤组织及癌旁正常组织中并无明显差异,但两者在肿瘤组织中的表达与年龄及性别有关,推测其功能可能与机体的发育相关,需要加大样本量且剔除年龄与性别因素才可能发现其在肿瘤中真实的表达情况。*MTRNR2L1* 基因是编码 humanin 蛋白的 *MTRNR2* 基因的众多核拷贝之一,可能由线粒体 DNA 转录而来,有研究发现其与胰岛素抵抗有关^[23],它所编码的 humanin 蛋白具有神经保护活性和抗凋亡作用,同时也可直接作用于线粒体促进 ATP 的生成^[24-26]。许多研究显示肿瘤及其干细胞在能量代谢方面存在异常,糖酵解是肿瘤及其干细胞的主要产能方式,同时相比正常细胞其线粒体数量明显下降^[27-28]。本研究结果显示 *MTRNR2L1* 在肾母细胞瘤的肿瘤组织中表达下调,推测 CSC 可能通过调控 piRNA 从而间接调控正常细胞中 *MTRNR2L1* 或其他 *MTRNR2* 样基因的表达,从而下

调 humanin 蛋白来改变正常细胞的细胞周期及线粒体活动,使其向肿瘤细胞分化。另一种可能的原因是肾母细胞瘤肿瘤组织中的线粒体含量降低^[29],导致线粒体相关基因的表达量都有所下调。

综上所述,本研究通过高通量测序对肿瘤样干细胞中 piRNA 及其靶基因的表达与功能进行了初步探索,初步证明差异表达的 piRNA NU9、NU13、ND5、ND7、ND9 对鉴别儿童肾母细胞瘤的肿瘤组织与正常肾组织具有参考价值,但这些 piRNA 是否真正调控其预测的靶向基因及这些 piRNA 在其他肿瘤中是否也有诊断价值,仍需进一步的细胞实验和更广的疾病谱进行验证。

[参考文献]

- [1] TÓTH K F, PEZIC D, STUWE E, WEBSTER A. The piRNA pathway guards the germline genome against transposable elements[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 886: 51-77.
- [2] LIU J, ZHANG S, CHENG B. Epigenetic roles of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in cancer metastasis (review)[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40: 2423-2434.
- [3] HIRAKATA S, SIOMI M C. piRNA biogenesis in the germline: from transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859: 82-92.
- [4] ZENG G, ZHANG D, LIU X, KANG Q, FU Y, TANG B, et al. Co-expression of Piwil2/Piwil4 in nucleus indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 4607-4617.
- [5] ZHANG H, REN Y, XU H, PANG D, DUAN C, LIU C. The expression of stem cell protein Piwil2 and piR-932 in breast cancer[J]. *Surg Oncol*, 2013, 22: 217-223.
- [6] EUN K, HAM S W, KIM H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting[J]. *BMB Rep*, 2017, 50: 117-125.
- [7] PEIRIS-PAGÈS M, MARTINEZ-OUTSCHOORN U E, PESTELL R G, SOTGIA F, LISANTI M P. Cancer stem cell metabolism[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18: 55. doi: 10.1186/s13058-016-0712-6.
- [8] ZHANG D, WU X, LIU X, CAI C, ZENG G, ROHOZINSKI J, et al. Piwil2-transfected human fibroblasts are cancer stem cell-like and genetically unstable[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 12259-12271.
- [9] GROSFELD J L, O'NEILL J A Jr, FONKALSRUD E W, CORAN A G. 小儿外科学[M]. 6版. 吴晔明,译. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 467-468.
- [10] SUN J, LI G, LIU Y, MA M, SONG K, LI H, et al. Targeting histone deacetylase SIRT1 selectively

- eradicates EGFR TKI-resistant cancer stem cells via regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in lung adenocarcinoma[J]. *Neoplasia*, 2020, 22: 33-46.
- [11] ROJAS-RÍOS P, SIMONELIG M. piRNAs and PIWI proteins: regulators of gene expression in development and stem cells[J/OL]. *Development*, 2018, 145. pii: dev161786. doi: 10.1242/dev.161786.
- [12] OZATA D M, GAINETDINOV I, ZOCH A, O'CARROLL D, ZAMORE P D. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20: 89-108.
- [13] 刘启鹏,安妮,岑山,李晓宇. piRNA 抑制基因转座的分子机制[J]. *遗传*, 2018, 40: 445-450.
- [14] YIN J, JIANG X Y, QI W, JI C G, XIE X L, ZHANG D X, et al. piR-823 contributes to colorectal tumorigenesis by enhancing the transcriptional activity of HSF1[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108: 1746-1756.
- [15] 陈天拓,何晶晶,苏义林,朱凯. 肿瘤干细胞标志物 CD133 和 CD44 在肾母细胞瘤中的表达及意义[J]. *安徽医学*, 2018, 39: 1194-1198.
- [16] SHUKRUN R, PODE-SHAKKED N, PLENICEANU O, OMER D, VAX E, PEER E, et al. Wilms' tumor blastemal stem cells dedifferentiate to propagate the tumor bulk[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3: 24-33.
- [17] LIU Y, DOU M, SONG X, DONG Y, LIU S, LIU H, et al. The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 123. doi: 10.1186/s12943-019-1052-9.
- [18] FU A, JACOBS D I, HOFFMAN A E, ZHENG T, ZHU Y. PIWI-interacting RNA 021285 is involved in breast tumorigenesis possibly by remodeling the cancer epigenome[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36: 1094-1102.
- [19] LYKKE-ANDERSEN S, ARDAL B K, HOLLENSSEN A K, DAMGAARD C K, JENSEN T H. Box C/D snoRNP autoregulation by a *cis*-acting snoRNA in the *NOP56* pre-mRNA[J/OL]. *Mol Cell*, 2018, 72: 99-111.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.017.
- [20] COWLING V H, TURNER S A, COLE M D. Burkitt's lymphoma-associated c-Myc mutations converge on a dramatically altered target gene response and implicate Nol5a/Nop56 in oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2014, 33: 3519-3527.
- [21] 曲杰,林萍萍,吕喜英,吴练练,李青山. NOP56 在乳腺癌组织中的表达情况及对临床预后的意义[J]. *生物信息学*, 2019, 17: 122-130.
- [22] HAO Y, KONG X, RUAN Y, GAN H, CHEN H, ZHANG C, et al. CDK11p46 and RPS8 associate with each other and suppress translation in a synergistic manner[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407: 169-174.
- [23] VEILLEUX A, MAYEUR S, BÉRUBÉ J C, BEAULIEU J F, TREMBLAY E, HOULD F S, et al. Altered intestinal functions and increased local inflammation in insulin-resistant obese subjects: a gene-expression profile analysis[J/OL]. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15: 119. doi: 10.1186/s12876-015-0342-y.
- [24] BODZIOCH M, LAPICKA-BODZIOCH K, ZAPALA B, KAMYSZ W, KIEC-WILK B, DEMBINSKA-KIEC A. Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms[J]. *Genomics*, 2009, 94: 247-256.
- [25] XIAO J, KIM S J, COHEN P, YEN K. Humanin: functional interfaces with IGF-I[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2016, 29: 21-27.
- [26] 殷博凯,郭艳芹,何治. Humanin 及其衍生肽保护作用的研究进展[J]. *生命科学*, 2019, 31: 940-944.
- [27] PALORINI R, VOTTA G, BALESTRIERI C, MONESTIROLI A, OLIVIERI S, VENTO R, et al. Energy metabolism characterization of a novel cancer stem cell-like line 3AB-OS[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115: 368-379.
- [28] AMINZADEH S, VIDALI S, SPERL W, KOFLER B, FEICHTINGER R G. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor[J]. *Transl Pediatr*, 2015, 4: 20-32.
- [29] FEICHTINGER R G, NEUREITER D, ROYER-POKORA B, MAYR J A, ZIMMERMANN F A, JONES N, et al. Heterogeneity of mitochondrial energy metabolism in classical triphasic Wilms' tumor[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 187-193.

[本文编辑] 孙 岩