

## 靶向肝素酶基因的 microRNAs 在胃癌中的表达

张 炎<sup>1</sup>, 虞积耀<sup>2</sup>, 郭世伟<sup>3</sup>, 王育红<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学海军临床医学院普通外科, 北京 100048

2. 第二军医大学海军临床医学院病理科, 北京 100048

3. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 检测胃癌组织中肝素酶基因 (heparanase, HPA) 及可能靶向其表达的 microRNAs (miRNAs) 的表达水平。**方法** 应用实时定量 PCR 检测 HPA 在胃癌组织中的表达变化; 根据 miRNAs 与 HPA 3' 非翻译区 (3'-UTR) 序列的结合情况, 运用生物信息学方法筛选出可能靶向 HPA 的 miRNAs, 并利用实时定量 PCR 检测这些 miRNAs 在胃癌组织中的表达水平。**结果** HPA 在胃癌组织中表达水平较癌旁组织和正常组织高; 生物信息学分析显示, miR-18b、miR-137、miR-502 和 miR-299-3p 可能结合于 HPA 的 3'-UTR 上, 抑制其表达; 实时定量 PCR 检测结果显示, 胃癌组织 miR-18b、miR-137、miR-502 和 miR-299-3p 的表达均较癌旁组织和正常组织低。**结论** 胃癌组织 HPA 高表达, 而可能靶向 HPA 的 miR-18b、miR-137、miR-502 和 miR-299-3p 低表达, 提示上述靶向 HPA 的 miRNAs 可能参与了胃癌的发生发展。

**[关键词]** 肝素酶; 胃肿瘤; 微 RNAs; 基因表达; 生物信息学**[中图分类号]** R 735.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0200-04

### Expression of microRNAs targeting heparinase in gastric cancer

ZHANG Yan<sup>1</sup>, YU Ji-yao<sup>2</sup>, GUO Shi-wei<sup>3</sup>, WANG Yu-hong<sup>1\*</sup>

1. Department of General Surgery, Clinical College of Navy Medicine, Second Military Medical University, Beijing 100048, China

2. Department of Pathology, Clinical College of Navy Medicine, Second Military Medical University, Beijing 100048, China

3. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of heparinase (HPA) and miRNAs that may regulate HPA expression in the gastric cancer tissue. **Methods** The expression levels of HPA were determined by real-time PCR in the gastric cancer tissues. Based on the binding of miRNAs with the 3' untranslated region (3'-UTR) of HPA, we screened for miRNAs targeting HPA using bioinformatics method and determined the expression levels of these miRNAs in the gastric cancer tissues using real-time PCR. **Results** The expression of HPA was higher in the gastric cancer tissues compared with those in the tumor-adjacent and normal tissues. Bioinformatics analysis showed that miR-18b, miR-137, miR-502, and miR-299-3p might inhibit HPA expression by binding to its 3'-UTR. Real-time PCR analysis revealed lower expression levels of miR-18b, miR-137, miR-502, and miR-299-3p in the gastric cancer tissues compared with in the adjacent and normal tissues. **Conclusion** HPA is highly expressed in the gastric cancer tissues; miR-18b, miR-137, miR-502 and miR-299-3p, which may target HPA, are lowly expressed, indicating miRNAs targeting HPA may participate in the carcinogenesis of gastric cancer.

**[Key words]** heparinase; stomach neoplasms; microRNAs; gene expression; bioinformatics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):200-203]

肝素酶 (heparanase, HPA) 是体内唯一降解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG) 的  $\beta$ -D-葡萄糖醛酸内切酶, 其通过裂解硫酸肝素糖胺聚糖链 (HS-GAG) 降解 HSPG, 破坏由细胞外基质和基底膜构成的组织屏障, 产生促肿瘤侵袭转移的生物学效应<sup>[1]</sup>。研究发现各种恶性肿瘤的演进、浸润及远处转移可能

与肝素酶基因密切相关, 并且肝素酶的表达与胃癌腹膜、淋巴结转移显著正相关<sup>[2-3]</sup>。MicroRNA (miRNA) 是一类在进化上高度保守, 长 18~25 个核苷酸的单链非编码小 RNA, 主要通过碱基互补配对原则结合于靶基因的 3' 非翻译区 (3'-UTR), 从而抑制靶基因的表达。miRNA 参与了包括细胞增殖、分

[收稿日期] 2011-07-05

[接受日期] 2012-01-16

[作者简介] 张 炎, 硕士生, 主治医师. E-mail: zynews@hotmail.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 010-66958525, E-mail: dearwkg@163.com

化、凋亡以及肿瘤发生和转移等各种生理病理过程,利用 miRNA 与肿瘤相关蛋白之间的相互作用,能发挥促进或抑制肿瘤形成的生物学功能<sup>[4-5]</sup>。

本研究通过在基因水平检测肝素酶在胃癌组织中的相对表达水平,生物信息学筛选能靶向其表达的内源性 miRNAs,并确定这些 miRNAs 在胃癌组织中的表达,为进一步明确胃癌转移过程中 miRNAs 的异常表达与肝素酶表达上调的特异相关性提供基础,为探索胃癌发生、发展和转移的分子机制,确立转移防治靶点,寻求新的干预策略提供参考。

## 1 材料和方法

1.1 胃癌组织 选取第二军医大学长海医院胃癌根治术后肿瘤组织病理标本 6 例,同时选取相应的癌旁对照组织(距胃癌旁 5 cm 处黏膜组织)。正常胃组织 RNA 购自美国 Ambion 公司。

1.2 核酸提取 采用 TRIzol 一步法制备组织 RNA。具体操作参照 TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书进行。对提取的总 RNA 用紫外分

光光度计(美国 Thermo 公司)测  $D_{260}/D_{280}$  值,以确定其浓度和纯度。对总 RNA 样品进行 1% 琼脂糖凝胶电泳以检测其完整性。

1.3 反转录合成 cDNA 使用 PrimeScript™ 反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)将 RNA 反转录合成 cDNA。10  $\mu$ l 反应体系中含有 PrimeScript™ 缓冲体系(1 $\times$ ),PrimeScript™ 反转录酶混合物 I (1 $\times$ ),寡聚胸腺嘧啶引物(25 pmol),随机引物(50 pmol),总 RNA 样品(500 ng),去离子水(RNase-free)。miRNAs 的反转录反应体系中需加入对应 miRNA 的反转录引物。反应条件为 37 $^{\circ}$ C 15 min(反转录反应),85 $^{\circ}$ C 5 s(反转录酶的失活反应)。

1.4 实时定量 PCR 运用 One Step SYBR Prime-Script RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)在 Rotor-Gene 3000A 型号的实时定量 PCR 仪(美国 Qiagen 公司)上分别检测肝素酶和相关 miRNAs 的表达,扩增基因的引物序列见表 1。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s(预变性反应),95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 15 s(PCR 循环反应,共 40 个循环)。

表 1 扩增基因的引物序列

Tab 1 Sequences of primers for gene amplification

Gene	Primer sequence (5'-3')
HPA	Forward: CCTTGCTATCCGACACCTTT Reverse: GGCTGACAGGCCCAATTTA
miR-18b	RT primer: CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTAACTGCA Forward: ACACTCCAGCTGGGTAAGGTGCATCTAGTG Reverse: CTCAACTGGTGTCTGTGGAGT
miR-137	RT primer: CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACGCGT Forward: ACACTCCAGCTGGGTTATTGCTTAAGAATAC Reverse: CTCAACTGGTGTCTGTGGAGT
miR-502	RT primer: CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTAGCACCC Forward: ACACTCCAGCTGGGATCCTTGCTATCT Reverse: CTCAACTGGTGTCTGTGGAGT
miR-299-3p	RT primer: CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAGCGGTTT Forward: ACACTCCAGCTGGGATATGTGGGATGGT Reverse: CTCAACTGGTGTCTGTGGAGT
GAPDH	Forward: AGCCACATCGCTCAGACAC Reverse: GCCCAATACGACCAAATCC

1.5 生物信息学筛选 根据 miRNAs 与 HPA 的 3'-UTR 序列的结合情况,运用多个生物信息学在线软件筛选出可能作用于 HPA 的 miRNAs。常用的生物信息学软件为 TargetScan ([www.targetscan.org/](http://www.targetscan.org/))、PicTar ([www.pictar.mdc-berlin.de/](http://www.pictar.mdc-berlin.de/)) 和 miRanda ([www.microrna.org/](http://www.microrna.org/))。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计处理,组间比较采用 *t* 检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 肝素酶在胃癌组织中的表达 提取的组织 RNA 样品经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,28S、18S 及 5S 小分子 RNA 条带清晰,说明完整性良好(图 1A)。实时定量 PCR 结果(图 1B)显示,相对于正常胃组织,HPA 在癌旁组织的表达水平较高,在胃癌组织中明显升高( $P < 0.01$ ),提示 HPA 在胃癌的发生发展中可能发挥重要作用。

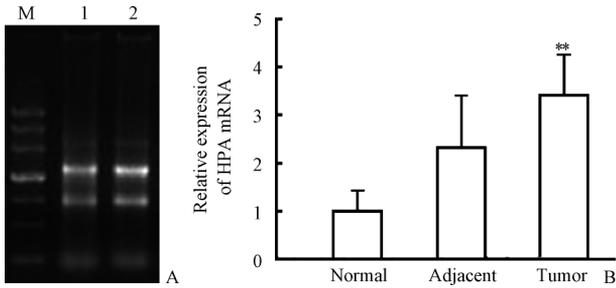


图1 实时定量PCR检测HPA基因在胃癌组织中的相对表达

Fig 1 Relative expression of HPA mRNA

in gastric cancer tissue detected by real-time PCR

A: Gel of RNA samples from a pair of gastric cancer tissues (M: Marker 2000; 1,2: RNA samples of adjacent and tumor tissues, respectively); B: Relative expression levels of HPA mRNA in different tissues (\*\*  $P < 0.01$  vs normal tissue;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

2.2 生物信息学分析 经过几个生物信息学软件对HPA基因序列的综合分析,发现miR-18b、miR-137、miR-299-3p和miR-502可能作用于HPA基因,其作用靶点如表2,其中miR-18b和miR-137与HPA基因分别有两个结合靶点。结果提示miR-18b、miR-137、miR-299-3p和miR-502可能通过HPA基因影响胃癌的发生和发展。

2.3 miRNAs在胃癌中的表达 实时定量PCR结果显示,相对于正常胃组织,miR-18b、miR-137、miR-299-3p和miR-502在胃癌组织的表达水平明显较低,分别为正常胃组织含量的50%、50%、45%和69%(图2)。结果提示这些miRNAs的表达可能与胃癌的发生发展密切相关。

表2 miRNAs作用于HPA基因的可能靶点位置

Tab 2 Potential target sites of miRNAs targeting HPA gene

miRNA		Target site	
Name	Sequence (3'-5')	Positon of HPA 3'-UTR	Sequence (5'-3')
miR-18b	GAUUGACGUGAUCU <u>ACGUGGAAU</u>	799-821	ACTCAATTGATCCTCC <u>CACCTTG</u>
miR-18b	GAUUGACGUGAUCU <u>ACGUGGAAU</u>	1 474-1 497	GAGAAACTATCTATT <u>TTCACCTTA</u>
miR-137	GAUGCGCAUAAGAAU <u>UCGUAAU</u>	1 530-1 522	TCGGTTTTCTTTGT <u>CAGCAATAA</u>
miR-137	GAUGCGCAUAAGAAU <u>UCGUAAU</u>	1 785-1 807	AATTCAAATGGCTTA <u>AGCAATAA</u>
miR-299-3p	UUCGCCAAAUGGU <u>AGGGUGUAU</u>	1 807-1 828	AGGAAATGTATAT <u>TCCACATA</u>
miR-502	AUCGUGGGUCUA <u>UCGUUCCUA</u>	1 296-1 317	AATATGGTCAGGA <u>AAGCAAGGAA</u>

Underlines indicate the target sites

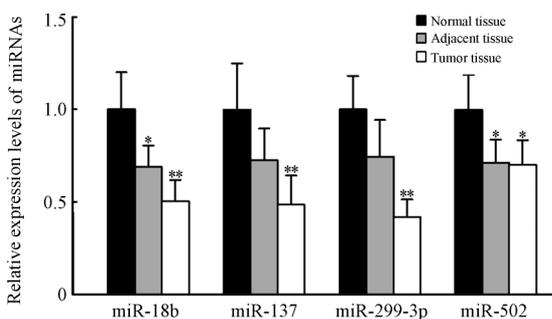


图2 miRNAs在胃癌组织中的相对表达水平

Fig 2 Relative expression levels of miRNAs in gastric cancer tissue

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs normal tissue;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

转录因子等多个方面。(1)早期生长反应基因1(EGR1):其能结合在HPA基因转录启动子中的高效诱导区,激活HPA基因转录启动子,从而诱导肿瘤细胞中HPA表达<sup>[7]</sup>。(2)构成性转录因子(Sp1):其对HPA-1启动子高效诱导区中的GC盒具有高亲和力<sup>[8]</sup>,因此对HPA转录也可能存在一定的调控作用。(3)p53:野生型p53的去除或活性的抑制均可导致HPA-1表达和酶活性的明显增高,p53通过组蛋白脱乙酰基作用调控HPA的表达<sup>[9]</sup>。总之,HPA的表达调控是多因素、多因子、多层次共同作用完成的,这些因素和因子或多或少地参与了肿瘤细胞内其他信号转导网络,从而使整个肿瘤细胞具有转移、侵袭、抗凋亡、血管生成等诸多恶性特质。

miRNAs作为真核细胞内的一类具有基因表达微调功能的内源性非编码小RNA分子,在不同物

### 3 讨论

恶性肿瘤中导致HPA过表达以及酶活性增强的机制尚不明确。但研究<sup>[6-9]</sup>表明,HPA表达可能受几个方面的影响,包括启动子甲基化、转录剪切、

种间具有非常高的同源性,据预测有 1/3 的人类基因都被其调控。研究表明,miRNAs 通过调节其靶基因的表达,几乎参与了所有生命活动,包括细胞增殖和凋亡、器官生成、个体发育、造血、脂肪代谢等<sup>[10]</sup>。Pavicic 等<sup>[11]</sup>报道,肿瘤组织中 miR-18b 的甲基化程度较正常组织明显升高,甲基化的 miR-18b 调控能力受到明显抑制。Deng 等<sup>[12]</sup>的研究发现,miR-137 通过抑制羧基末端结合蛋白 1(ctbp-1) 的表达调节黑素瘤的发生发展,同时也发现 miR-137 是肿瘤发生发展过程中一个重要蛋白 cdc42 的抑制因子<sup>[13]</sup>。这些结果的发现提示肿瘤的发生发展过程受多元化信号通路网络调控,miRNAs 作为细胞内源性调控因子,对肿瘤的治疗和预后具有重要意义。

本研究根据生物信息学技术筛选出几个可能靶向肝素酶基因的 miRNAs(miR-18b、miR-137、miR-299-3p 和 miR-502),鉴定了它们在胃癌组织中的相对表达水平,推测这几个 miRNAs 可能通过调节肝素酶的表达影响胃癌的发生和发展。以 miRNAs 调控肝素酶表达的功能,作为新的治疗切入点,通过对疾病发生发展过程中 miRNAs 调控网络的深入研究,对了解胃癌的发病原因、机制以及寻找基因治疗新的药物靶点都具有重要意义。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Koliopoulos A, Friess H, Kleeff J, Shi X, Liao Q, Pecker I, et al. Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 4655-4659.
- [2] Vlodaysky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis [J]. *Nat Med*, 1999, 5: 793-802.
- [3] Hulett M D, Freeman C, Hamdorf B J, Baker R T, Harris M J, Parish C R. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis[J]. *Nat Med*, 1999, 5: 803-809.
- [4] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin G A, Croce C M. MicroRNA expression and function in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12: 580-587.
- [5] Gregory R I, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 3509-3512.
- [6] de Mestre A M, Soe-Htwe T, Sutcliffe E L, Rao S, Pagler E B, Hornby J R, et al. Regulation of mouse Heparanase gene expression in T lymphocytes and tumor cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85: 205-214.
- [7] de Mestre A M, Rao S, Hornby J R, Soe-Htwe T, Khachigian L M, Hulett M D. Early growth response gene 1 (EGR1) regulates heparanase gene transcription in tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 35136-35147.
- [8] Jiang P, Kumar A, Parrillo J E, Dempsey L A, Platt J L, Prinz R A. Cloning and characterization of the human heparanase-1 (HPR1) gene promoter: role of GA-binding protein and Sp1 in regulating HPR1 basal promoter activity [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 8989-8998.
- [9] Baraz L, Haupt Y, Elkin M, Peretz T, Vlodaysky I. Tumor suppressor p53 regulates heparanase gene expression [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 3939-3947.
- [10] Zhang B, Pan X, Cobb G P, Anderson T A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *Dev Biol*, 2007, 302: 1-12.
- [11] Pavicic W, Perki E, Kaur S, Peltomäki P. Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach [J]. *Mol Med*, 2011, 17(7-8): 726-735.
- [12] Deng Y, Deng H, Bi F, Liu J, Bemis L T, Norris D, et al. MicroRNA-137 targets carboxyl-terminal binding protein 1 in melanoma cell lines [J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7: 133-137.
- [13] Liu M, Lang N, Qiu M, Xu F, Li Q, Tang Q, et al. miR-137 targets Cdc42 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in colorectal cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128: 1269-1279.

[本文编辑] 贾泽军