·论　著·

肺腺癌 miR-195 的表达及靶基因筛选*

罗　裕[1]，潘民主[2]，莫慧慧[2]，区莹莹[2]，明火清[2]，韦　想[2]，黄　荣[3]，杨日荣[3]

1. 广西壮族自治区人民医院检验科，广西南宁 530021；2. 广西医科大学第一临床医学院，广西南宁 530021；3. 广西医科大学基础医学院免疫学教研室，广西南宁 530021

摘　要：目的　研究 miR-195 在肺腺癌中的表达差异，筛选 miR-195 靶基因，分析靶基因作用网络及其对患者生存预后的影响。**方法**　利用 TCGA 数据库，比较 miR-195 在肺腺癌癌组织与癌旁正常组织间的表达差异；采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-195 在临床标本中的相对表达水平。设计 miR-195 的 Hybrid PCR 引物，扩增出靶基因的 mRNA 3′-非翻译区（3′UTR），菌落 PCR 筛选靶基因的 3′UTR 片段进行测序。美国国家生物信息中心网站比对测序结果，得到靶基因的基因注释和全长序列，构建靶基因作用网络并进行生存分析。**结果**　miR-195 在肺腺癌癌组织中的相对表达水平低于癌旁正常组织，差异有统计学意义（$P<0.01$）。Hybrid PCR 筛选 miR-195 候选靶基因显示多个条带。miR-195 与靶基因的结合位点在基因 3′UTR 上有 19 个。靶基因 GCLC、NOB1 的低表达与肺腺癌患者的良好预后相关。**结论**　肺腺癌癌组织中 miR-195 呈低表达。miR-195 可能通过直接抑制靶基因 GCLC、NOB1 的功能，进而影响肺腺癌的发生、发展。

关键词：miR-195；　肺腺癌；　靶基因

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.010　　**中图法分类号：**R734.2

文章编号：1673-4130(2021)09-1064-05　　**文献标志码：**A

Expression and target gene screening of miR-195 in lung adenocarcinoma*

LUO Yu[1], *PAN Minzhu*[2], *MO Huihui*[2], *OU Yingying*[2], *MING Huoqing*[2], *WEI Xiang*[2], *HUANG Rong*[3], *YANG Rirong*[3]

1. *Department of Clinical Laboratory, Peoples's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi* 530021, *China*; 2. *First School of Clinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi* 530021, *China*; 3. *Department of Immunology, School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi* 530021, *China*

Abstract: Objective　To study the expression difference of miR-195 in lung adenocarcinoma, screen the target gene of miR-195, analyze the interaction network of target gene and its influence on survival and prognosis of patients. **Methods**　TCGA database was used to compare the expression of miR-195 between lung adenocarcinoma tissues and normal tissues, and real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the relative expression level of miR-195 in clinical specimens. A Hybrid PCR primer for miR-195 was designed to amplify the 3′UTR of the target gene, the 3′UTR fragment of target gene was screened by colony PCR and sequenced. NCBI website was used compare the sequencing results and obtain the target gene annotation and full-length sequence. The target gene action network was constructed and survival analysis was carried out. **Results**　The relative expression level of miR-195 in lung adenocarcinoma tissues was lower than that in adjacent normal tissues ($P<0.01$). Hybrid PCR was used to screen miR-195 candidate target gene to display multiple bands. There was 19 binding sites of miR-195 to target gene in 3′UTR. Low expression of target genes GCLC and NOB1 was associated with good prognosis of lung adenocarcinoma. **Conclusion**　The expression of miR-195 was down regulated in lung adenocarcinoma. miR-195 may affect the occurrence and development of lung adenocarcinoma by directly inhibiting the function of GCLC and NOB1.

* **基金项目：**广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题（Z20190501）。

作者简介：罗裕，女，主管技师，主要从事肿瘤免疫检验研究。

本文引用格式：罗裕，潘民主，莫慧慧，等. 肺腺癌 miR-195 的表达及靶基因筛选[J]. 国际检验医学杂志，2021，42(9)：1064-1068.

Key words: miR-195;　lung adenocarcinoma;　target gene

肺癌是常见的恶性肿瘤之一，其发生、发展是多因素的过程，涉及较多基因与蛋白[1]。而微小 RNA (miRNA)作为单链非编码 RNA，广泛存在于真核生物体内，其通过与靶基因的 mRNA 3′-非翻译区(3′UTR)结合，降解 mRNA 或抑制其翻译，调控多种细胞的功能[2-3]。miRNA 失调对许多癌症有影响，如结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、胃癌、肝细胞癌及前列腺癌等[4-8]。本研究通过检测肺腺癌中 miR-195 的表达，研究 miR-195 靶基因间的相互联系，分析靶基因的生存预后，以探讨其在肺腺癌中的作用，为肺腺癌研究提供新的思路。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集广西壮族自治区人民医院 11 例临床肺腺癌患者的标本，包括癌组织与癌旁正常组织，标本离体后在最短时间内将癌组织及癌旁正常组织切成直径 0.5 cm 的小块，分别装入已编号的灭菌冻存管中，迅速放入液氮转移罐，做好长期保存准备。标本存放好后，登记标本编号、住院号、肿瘤类型、取材数量。本研究通过广西壮族自治区人民医院伦理委员会的批准，并在患者知情同意情况下进行标本收集。

1.2　方法

1.2.1　实时荧光定量 PCR 检测 miR-195 在临床标本中的表达　取约 0.1 g 组织标本放入冰预冷的含 1.5 mL RNA 裂解液的匀浆器中，进行总 RNA 提取。反转录取 2 μg 的 RNA、3 μL 随机引物，补 DEPC 水至 24 μL，放入 PCR 仪中。70 ℃热变性 15 min，迅速冰浴 3 min。按照说明书加入其他试剂，每管液体总体积约 40 μL，将混合物短暂离心后置于 PCR 仪中，37 ℃ 90 min；向每管 PCR 产物中加入 60.0 mL 超纯水稀释。进行实时荧光定量 PCR，并取 PCR 产物进行凝胶电泳检测。

1.2.2　细胞培养及总 RNA 提取　使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，肺腺癌 A549 细胞在 CO_2 浓度为 5%、饱和湿度、温度为 37 ℃的恒温细胞培养箱中进行培养。取生长汇合度 90%的 A549 细胞，PBS 洗涤 2 次，加入 1.0 mL 的 Trizol 试剂，裂解细胞。室温静置 5 min 后加入 200 μL 氯仿剧烈震荡 30 s，室温静置 3 min，4 ℃预冷离心机，12 000 r/min 离心 5 min。吸取上清液转移至离心管，加入异丙醇，于−20 ℃冰箱放置 2 h 以上。取出标本，用 4 ℃预冷高速离心机 12 000 r/min 离心 30 min，去除上清液，保留的沉淀物中加入 1.0 mL 70%的预冷乙醇，颠倒洗涤，4 ℃，12 000 r/min 离心 10 min，去上清液后得到总 RNA。

1.2.3　目的片段的筛选及测序　利用引物设计软件 OLIGO(V7)进行 miR-195 的 Hybrid PCR 设计。将纯化后的 Hybrid PCR 产物与 T 载体连接，按照美国 Promega 公司 T-Easy 载体试剂盒说明书进行操作。将连接产物加至感受态细胞中，冰浴 30 min，42 ℃水浴热击 90 s。快速冷却 2 min。加入培养基混匀，振荡培养 1 h，取菌液涂布于平板上，倒置平板 37 ℃过夜培养。在转化的蓝白斑平板中挑选白色菌落进行菌落 PCR。检测 500 个菌落，然后取 PCR 产物进行凝胶电泳检测，根据电泳结果，挑选片段大小不一的阳性片段相对应的阳性克隆菌过夜摇菌培养，取菌液与甘油混合送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.4　生物信息学分析　在获得 miR-195 候选靶基因的测序序列后，在美国国家生物信息中心网站上进行核酸比对及基因注释，并利用 miRanda、TargetScan、RNA Hybrid 等软件分析 miR-195 与候选靶基因的作用，使用 GeneMANIA 网站(http://www.genemania.org/)，构建候选靶基因作用网络图谱，最后采用生存预后网站(http://gepia2.cancer-pku.cn/)进行 Kaplan-Meier 生存分析。

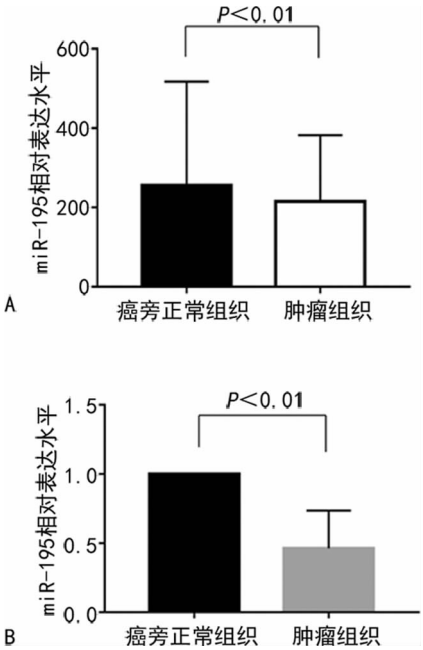
1.3　统计学处理　采用 SPSS20.0 软件进行统计分析，计量资料满足正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用两样本均数 t 检验，计量资料不满足正态分布以 $M(P_{25},P_{75})$表示，采用秩和检验；以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　miR-195 在肺腺癌组织中的表达　在 TCGA 数据库下载到肺腺癌组织标本数据，包括癌组织 519 例及癌旁正常组织 46 例。在癌组织中 miR-195 的相对表达水平低于癌旁正常组织，差异有统计学意义($P<0.01$)，见图 1A。收集 11 例临床肺腺癌患者的癌组织与癌旁正常组织标本，分别检测 miR-195 的相对表达水平，结果显示，miR-195 在癌组织的相对表达水平低于癌旁正常组织，差异有统计学意义($P<0.01$)，见图 1B。

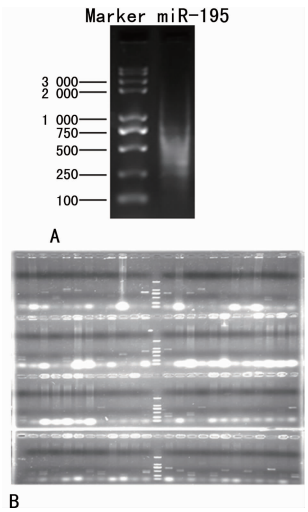
2.2　miR-195 靶基因的筛选　根据 Hybrid PCR 结合序列匹配的基本原则，设计 miR-195 互补引物，进行 PCR，结果显示 miR-195 的 Hybrid PCR 产物有多条 DNA 条带，见图 2A。通过蓝白斑筛选出约 500 个白色菌落进行菌落 PCR，琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，结果显示不同大小的条带，见图 2B。挑选 96 个不同大小片段的 T 载体进行测序，得到 19 个不同序

列。对测序得到的不同长度 DNA 序列进行核酸序列比对，并进行基因注释，结果见表 1。



注：A 表示 TCGA 数据库肺腺癌标本 miR-195 的相对表达水平；B 表示临床肺腺癌标本 miR-195 的相对表达水平。

图 1　癌组织与癌旁正常组织中 miR-195 的相对表达水平比较



注：A 表示琼脂糖凝胶电泳检测 Hybrid PCR 产物；B 表示菌落 PCR 产物。

图 2　miR-195 靶基因的筛选及测序

2.3　肺腺癌 miR-195 靶基因结合位点分析及作用网络构建　利用生物信息学软件对肺腺癌 miR-195 靶基因的结合位点进行分析显示，miR-195 结合位点在靶基因 3′UTR 上有 19 个，见表 1。根据 miRNA 种子序列完全匹配原则，与 miR-195 种子序列完全匹配的有 19 个靶基因，分别为 ATP6V1B2、M6PR、GCLC0、TNIP2、NOB1、SUMO3、FOPNL、IPO7、GDI2、CREG1、RRAGA、MAFK、CEACAM6、SELENBP1、THRAP3、CYBRD、ANKIB1、PPT1、FDFT1，见图 3。再利用 GeneMANIA 网站（http://www.genemania.org/）分析上述靶基因，得到作用网络及靶基因间的关系，结果显示，靶基因 SUMO3 与 IPO7 之间有直接的相互作用，见图 4。

2.4　靶基因生存预后分析　利用 TCGA 数据库，对 miR-195 的靶基因进行生存预后分析，Kaplan-Meier 生存曲线结果显示，与高表达患者相比，低表达 GCLC、NOB1 的患者预后较好（$P<0.05$），见图 5。

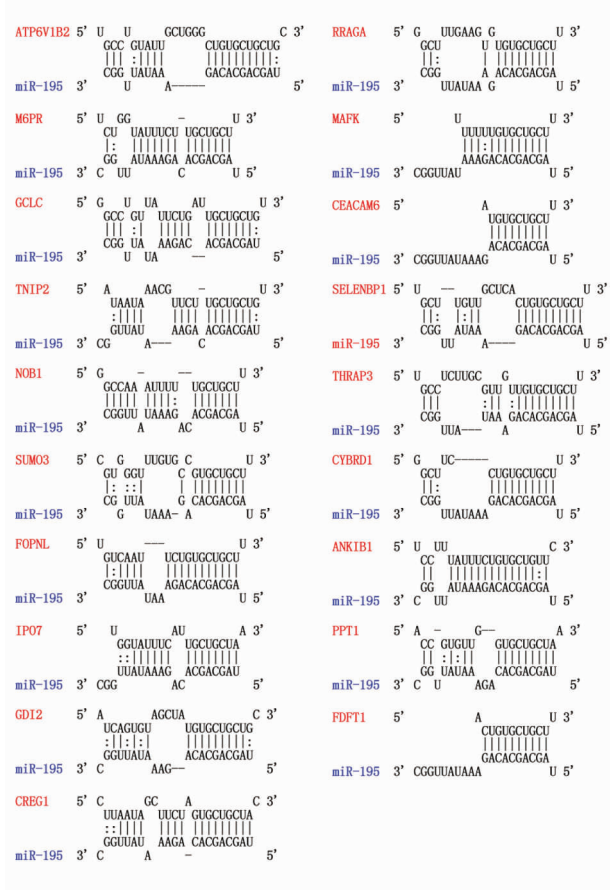


图 3　肺腺癌 miR-195 靶基因结合位点分析

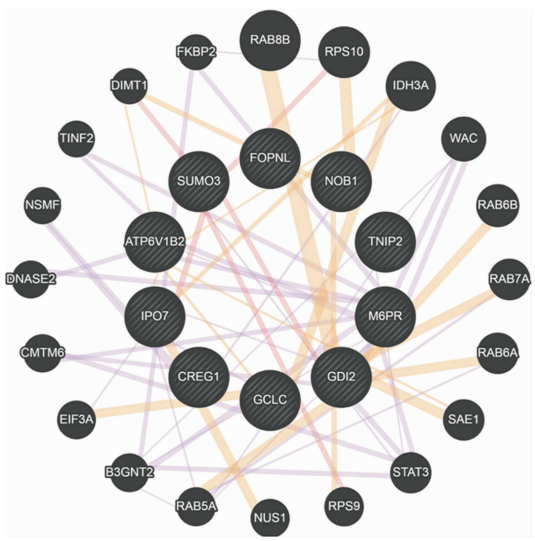
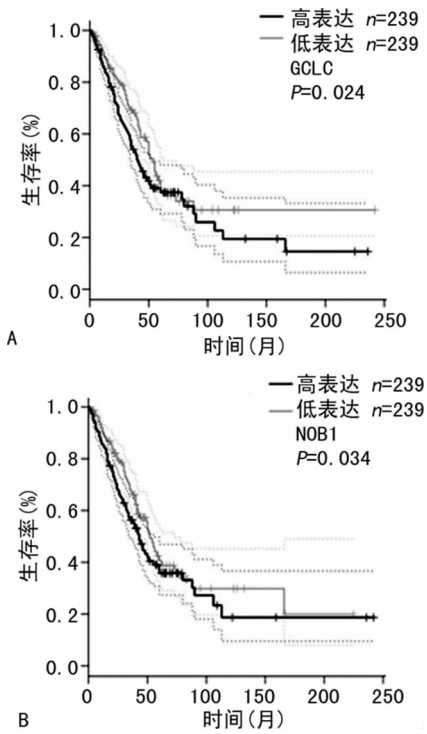


图 4　候选靶基因作用网络构建图

表 1　肺腺癌 miR-195 靶基因序列比对及基因注释

转录本核酸编号	基因注释	3′UTR
NM_001693.3	ATP 酶,氢离子转运 V1 型 B2 亚基(ATP6V1B2)	+
NM_002355.3	甘露糖-6-磷酸受体(M6PR)	+
NM_001498.3	谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC)	+
NM_024309.3	肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 相互作用蛋白 2 (TNIP2)	+
NM_014062.2	NIN1/RPN12 结合蛋白 1 同源物 (NOB1)	+
NM_006936.2	类泛素蛋白修饰分子 3(SUMO3)	+
NM_144600.3	纤维母细胞生长因子受体 1 癌基因伴侣 N 端样蛋白(FOPNL)	+
NM_006391.2	输入蛋白 7(IPO7)	+
NM_001494.3	GDP 解离抑制剂 2(GDI2)	+
NM_003851.2	E1A 激活基因细胞抑制因子 1(CREG1)	+
NM_006570.4	Ras 相关的 GTP 结合因子 A(RRAGA)	+
NM_002360.3	转录因子 MafK(MAFK)	+
NM_002483.6	癌胚抗原相关细胞黏附分子 6(CEACAM6)	+
NM_003944.3	硒结合蛋白 1(SELENBP1)	+
NM_005119.3	甲状腺激素受体相关蛋白 3(THRAP3)	+
NM_024843.3	细胞色素 B 还原酶(CYBRD1)	+
NM_019004.1	含锚蛋白重复序列和 IBR 结构域蛋白 1(ANKIB1)	+
NM_000310.3	棕榈酰蛋白硫酯酶 1(PPT1)	+
NM_001287742.1	人法尼基二磷酸法尼基转移酶 1(FDFT1)	+

注:+表示阳性。



注:A、B 分别为 GCLC、NOB1 生存曲线。

图 5　miR-195 靶基因 Kaplan-Meier 生存分析曲线图

3　讨　　论

肺腺癌是对人类的健康与生命威胁最大的恶性肿瘤之一,其发病率正在逐年上升[1]。越来越多的研究结果显示,肺腺癌的发生、发展是多种环境因素影响、细胞自身多种基因失活或基因过度激活共同作用的结果。研究发现,肺腺癌常见的基因变异有表皮生长因子受体、Kirsten 鼠肉瘤病毒基因等,不同的基因变异型患者存在不同的治疗靶点[9]。miR-195 作为影响癌症的重要因子可以通过下调碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),抑制 SNU-1 和 KATO-3 细胞的侵袭和转移,控制癌症的发展[10]。miR-195 也可以通过调节 SALL4 来抑制胶质瘤的增殖和迁移[11]。研究显示,miR-497 ~ miR-195 团簇通过维持内皮细胞 Notch 和缺氧诱导因子 1α(HIF-1α)活性来调节成骨过程中的血管生成[12]。同时,miR-195 可以直接靶向 CX3CL1/CX3CR1 预防局灶性脑缺血[13]。本研究首先在 TCGA 数据库中下载得到肺腺癌的测序数据,比对癌旁正常组织与癌组织中 miR-195 的相对表达水平,发现 miR-195 在癌组织中相对表达水平低于癌旁正常组织。通过检测 11 例临床肺腺癌标本中 miR-195 的相对表达水平,发现相对于癌旁正常组织,癌组织中的 miR-195 表达下调,推测 miR-195 的相对表达水平与肺腺癌的发生具有相关性。为进一步了解 miR-195 调控肺腺癌的相关因素,笔者利用 Hybrid PCR 模拟 miR-195 与靶基因的结合,并利用菌落

PCR 筛选 Hybrid PCR 产物条带，发现 miR-195 对应多个靶基因。随后，进一步利用生物信息学方法筛选出 miR-195 在肺腺癌中的 19 个靶基因等。据报道，SUMO 化修饰能够调节蛋白的稳定性，调控细胞周期、信号转导，维持基因组完整性[14]。本研究构建靶基因作用网络，结果发现 SUMO3 可以调控 IPO7。有研究发现，miR-22 可下调 IPO7 从而影响低氧诱导因子-1α 的表达[15]。最后对靶基因进行生存分析，结果发现患者靶基因 GCLC、NOB1 低表达与肺腺癌良好预后相关。有报道称，GCLC 和 GCLM 在外周 T 细胞淋巴瘤组织中高表达，可能参与肿瘤的发生、发展，且 NOB1 蛋白表达升高，细胞凋亡率会降低[16-17]。

综上所述，本研究结果揭示了肺腺癌中 miR-195 的功能及靶基因之间的相互关系，为肺腺癌的研究提供了有效依据。随着研究的深入，肺腺癌 miR-195 及其靶基因的调控网络将逐步清晰，miR-195 有可能成为肺腺癌的一个新的标志物，但仍需要继续探索 miR-195 在肿瘤发生、发展中的具体作用机制，为肺腺癌的诊断、药物治疗、预后监测提供新的靶点。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 王欣，徐渴，曾强，等. miRNA-200 a 阻抑小鼠矽肺纤维化的实验研究[J]. 公共卫生与预防医学，2018，29(1)：21-25.

[3] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. microRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-221.

[4] LI B, WANG S S, WANG S M. miR-195 suppresses colon cancer proliferation and metastasis by targeting WNT3A [J]. Mol Genet Genomics, 2018, 293(5): 1245-1253.

[5] YANG X, YAN Z L, YANG H Y, et al. Clinical value of combined detection of miR-1202 and miR-195 in early diagnosis of cervical cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 17(3): 3387-3391.

[6] QUAN Z, LING R H, YANG X Z, et al. miR-195 suppresses cervical cancer migration and invasion through targeting Smad3[J]. Int J Gynecol Cancer, 2016, 26(5): 817-824.

[7] WANG Y, ZHANG X, ZOU C, et al. miR-195 inhibits tumor growth and angiogenesis through modulating IRS1 in breast cancer[J]. Biomed Pharmacoth, 2016, 80(1): 95-101.

[8] ZHANG X, TAO T, LIU C H, et al. Downregulation of miR-195 promotes prostate cancer progression by targeting HMGA1[J]. Oncol Rep, 2016, 36(1): 376-382.

[9] 董文，周艳. 基因变异相关的肺腺癌分子分型及其靶向治疗[J]. 医学综述，2013，19(9)：1597-1600.

[10] WANG J, LI L, JIANG M, et al. microRNA-195 inhibits human gastric cancer by directly targeting basic fibroblast growth factor[J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(11): 1320-1328.

[11] CHEN L P, ZHANG N N, REN X Q, et al. miR-103/miR-195/miR-15b regulate SALL4 and inhibit proliferation and migration in glioma[J]. Molecules, 2018, 23(11): 2938.

[12] YANG M, LI C J, SUN X, et al. miR-497－195 cluster regulates angiogenesis during coupling with osteogenesis by maintaining endothelial Notch and HIF-1α activity [J]. Nat Commun, 2017, 8: 16003.

[13] YANG G, LIU Z D, WANG L, et al. microRNA-195 protection against focal cerebral ischemia by targeting CX3CR1[J]. J Neurosurg, 2018, 131(5): 1-10.

[14] RONALD T H. Protein modification by SUMO[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(5): 332-333.

[15] MONTELEONE F, TAVERNA S, ALESSANDRO R, et al. SWATH-MS based quantitative proteomics analysis reveals that curcumin alters the metabolic enzyme profile of CML cells by affecting the activity of miR-22/IPO7/HIF-1α axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 170.

[16] 党春艳，薛丽，马淑萍，等. 外周 T 细胞淋巴瘤组织中 GCLC 和 GCLM 的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学，2020，28(10)：1726-1729.

[17] 王慧，耿玲，郭威，等. 上调 miR-15 a 表达对子宫内膜癌细胞增殖、凋亡和 NOB1 蛋白表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版)，2019，54(6)：840-844.

(收稿日期：2020-09-10　修回日期：2020-12-28)