

# microRNA-345 在恶性胸膜间皮瘤细胞中的异常表达及其靶基因生物信息学分析

黄何菲 李君贤 彭理 范岩鑫 张芳芳 朱丽瑾

杭州医学院公共卫生学院 浙江杭州 310000

**【摘要】**目的 探究 microRNA-345 (miR-345) 在恶性胸膜间皮瘤细胞中的异常表达, 并利用生物信息学对其靶基因进行筛选及分析。方法 利用荧光定量 PCR (qPCR) 对恶性胸膜间皮瘤细胞 (NCI-H2452、MSTO-211H、NCI-H2052) 和正常间皮细胞 MeT-5A 细胞中 miRNA-345 表达水平进行检测分析, 通过生物信息学分析预测 miRNA-345 下游基因, 利用 metasplice 分析 miRNA-345 下游基因的通路。结果 三株恶性间皮瘤细胞相比 MeT-5A 细胞 miRNA-345 的表达量均降低, 生物信息学分析筛选出了 26 个 miRNA-345 下游基因 (上调 9 个, 下调 17 个), 通过富集分析发现筛选出的 miRNA-345 下游基因主要参与脉管系统发育、细胞连接组织、上皮细胞迁移、Ras 蛋白信号转导、细胞外基质组织和上皮细胞分化等信号通路。结论 miRNA-345 在恶性胸膜间皮瘤细胞中表达量下降, 生物信息学分析结果提示脉管系统发育、细胞连接组织、上皮细胞迁移、Ras 蛋白信号转导、细胞外基质组织和上皮细胞分化等相关通路参与了 miRNA-345 在恶性胸膜间皮瘤细胞中的表达调控。

**【关键词】**恶性胸膜间皮瘤细胞; miRNA-345; 生物信息学分析

Abnormal expression of microRNA-345 in malignant pleural mesothelioma cells and bioinformatics analysis of its target gene

Huang he-fei, LI jun-xian, Peng li, Fan yan-xin, Zhang fang-fang, Zhu li-jin

School of Public Health, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310000, China

恶性胸膜间皮瘤 (malignant pleural mesothelioma, MPM) 是一种原发于胸膜、侵袭性高的恶性肿瘤, 是胸膜原发肿瘤中最常见的类型, 主要累及胸膜腔及其周围结构<sup>[1]</sup>。80% 的 MPM 病例可能与石棉接触有关<sup>[2]</sup>, 但其致病机制尚未完全阐明。石棉相关 MPM 的潜伏期长达 20-40 年, 在疾病的早期阶段, 临床症状不明显或没有特异性, 因此, 诊断常常在晚期才获得, 中位生存期仅 9-17 个月<sup>[3]</sup>。

微小 RNA (microRNA, miRNA, miR) 是一种小的内源性发夹转录物产生的非编码 RNA 分子, 大约由 20-25 个核苷酸组成<sup>[4]</sup>, 它主要通过抑制 mRNA 的翻译水平或断裂靶标 mRNAs 来调节基因的表达, 参与细胞的增殖、分化、迁移及侵袭等过程<sup>[4]</sup>。既往已有研究表明, miRNA 在癌症的发生发展预后等过程中起着重要的作用<sup>[4]</sup>。例如 miR-345, 它能在体内有效抑制胰腺癌细胞的增殖, 同时对膀胱癌细胞的增殖、侵袭具有抑制作用并促进其细胞的凋亡<sup>[5, 6]</sup>, 但 miR-345 在恶性间皮瘤中的作用尚未阐明。本课题组利用荧光定量 PCR (qPCR) 检测细胞 miR-345 表达水平, 通过生物信息学分析预测 miRNA-345 下游靶基因, 并利用 metasplice 分

析其下游靶基因的通路, 探究 miRNA-345 在恶性间皮瘤细胞中的表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株的购买与培养

人正常胸膜间皮细胞 MeT-5A 和人恶性胸膜间皮瘤细胞株 NCI-H2452、NCI-H2052 购自 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), MSTO-211H 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。将 MeT-5A 细胞培养于含有 10% 胎牛血清 (FBS, Wisent) 的 M199 培养液, NCI-H2452、NCI-H2052 和 MSTO-211H 细胞培养于含有 10% 胎牛血清 (FBS, Wisent) 的 RPMI-1640 培养液中, 并置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的环境中培养, 每 3-4 天进行一次, 传代培养。

### 1.2 荧光定量 PCR (qPCR) 检测细胞 miR-345 表达水平

对 MeT-5A、NCI-H2452、MSTO-211H 以及 NCI-H2052 细胞中 miR-345 表达水平进行检测。采用 Trizol 试剂盒 (Life Technologies, ThermoFisher, USA) 按照说明书提示的操作过程进行总 RNA 的提取, 采用 NanoDrop2000 微量分光光度计 (Thermo, MA, USA) 检测 RNA 浓度

和纯度。提取出来的总 RNA 依据 ReverTra Ace qPCR 逆转录试剂盒说明书进行逆转录和荧光定量 PCR 反应。逆转录反应条件：20℃ 10min，42℃ 50min，75℃ 5min，4℃ 保存。PCR 反应条件：预变性 95℃/10min，循环反应 95℃/10s、60℃/20s、72℃/10s，共 40 个循环。所有样本重复检测 3 次，计算 Ct 值，利用 U6 标准化 miR-345 的表达水平，利用相对公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算相对表达量。

### 1.3 生物信息学分析

在美国国立生物技术信息中心开发的基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 筛选下载恶性间皮瘤组织样本表达数据，最终下载 GSE51024 数据集进行后续分析，R 4.1.2 软件使用 limma 包对下载的数据集进行差异表达基因分析，获得基因表达差异倍数，以  $|\log_2FC| > 1$ ，P 值  $< 0.05$  为条件筛选差异表达基因。通过 miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 网站、TargetScan8.0 ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/)) 网站和 miRDB 网站 (<https://mirdb.org/>) 查询 miR-345 下游靶基因，并与差异表达基因比对获得基因交集。将最终筛选出来的基因导入 matescape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 进行功能注释，再使用 GO-BP (Gene Ontology-Biological Process) 以及 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 本体来源对每个给定的基因列表进行通路和过程富集分析。

## 2 结果

### 2.1 miR-345 在三株恶性间皮瘤细胞中的表达水平

三株恶性间皮瘤细胞中 miR-345 表达量与正常人胸膜间皮细胞 MeT-5A 相比均下降。

### 2.2 生物信息学分析

GSE51024 数据集中一共拥有样本 96 份，其中恶性间皮瘤组织样品 55 份，癌旁正常组织样品 41 份，对数据进行差异分析后筛选出差异表达基因 1435 个 (图 2A)，TargetScan8.0 提示 miR-345 下游基因有 3527 个，miRwalk 网站提示 miR-345 下游基因有 59150 个，miRDB 网站提示 miR-345 下游基因有 319 个，四者取交集，筛选出基因共 26 个 (图 2B)，分别为 MMP16、UNC13B、RAPGEF5、USP54、SNX30、KITLG、TMEM139、MXRA5、PTPRB、FAP、SLC2A5、SULF2、CPA4、GREM1、SORT1、ALCAM、C1GALT1、TMEM204、RORA、TJP2、QKI、ARHGAP6、CCDC78、ZMAT3、SORBS1、

C1orf115，其中上调基因 9 个，下调基因 17 个，具体如表 1 所示。

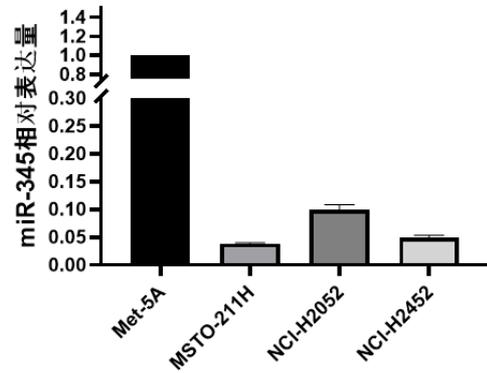
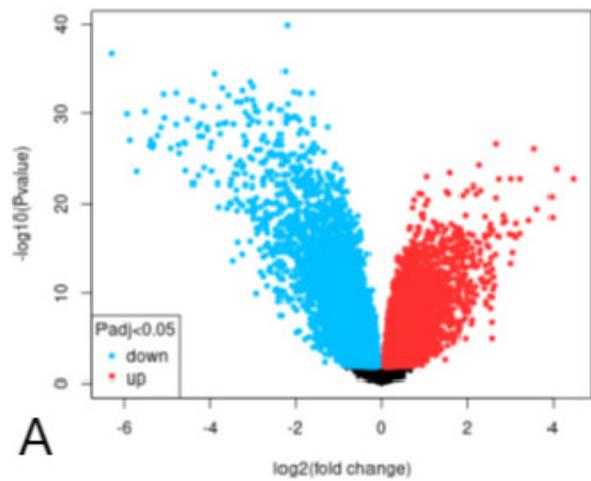
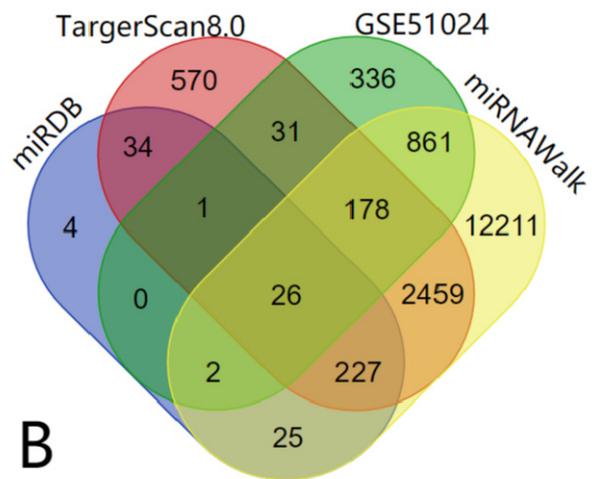


图 1 不同细胞中 miR-345 的相对表达量



A



B

图 2A.MPM 组织样本与癌旁正常组织样本差异分析火山图，左侧蓝点为下调基因，右侧红点为上调基因；图 2B.MPM 组织样本与癌旁正常组织样本差异表达基因，TargetScan8.0、miRWalk、miRDB 网站预测 miR-345 下游基因交集韦恩图。

表 1

表达趋势 Express trend	基因 Gene
上调基因 Up-regulated genes	MMP16、MXRA5、FAP、SLC2A5、SULF2、CPA4、GREM1、C1GALT1、ZMAT3
下调基因 Down-regulated genes	UNC13B、RAPGEF5、USP54、SNX30、KITLG、TMEM139、PTPRB、SORT1、ALCAM、TMEM204、RORA、TJP2、QKI、ARHGAP6、CCDC78、SORBS1、C1orf115

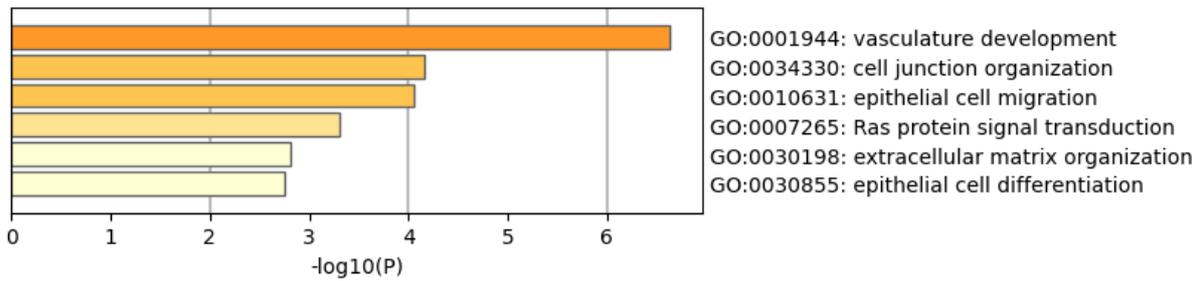


图 3 基因富集分析结果

筛选出的基因中，通过富集分析得到通路富集分析结果见图 3，其主要参与脉管系统发育（vasculature development）、细胞连接组织（cell junction organization）、上皮细胞迁移（epithelial cell migration）、Ras 蛋白信号转导（Ras protein signal transduction）、细胞外基质组织（extracellular matrix organization）、上皮细胞分化（epithelial cell differentiation）等过程。

### 3 讨论

本研究首次对 microRNA-345（miR-345）在恶性胸膜间皮瘤细胞中的表达进行探讨，qPCR 结果显示，三株 MPM 细胞（NCI-H2452、MSTO-211H、NCI-H2052）中 miR-345 表达量与正常人胸膜间皮细胞 MeT-5A 相比均下降，表明其在恶性胸膜间皮瘤细胞中异常表达。

在本次研究中，我们通过生物信息学分析筛选出了恶性间皮瘤细胞中与 miR-345 有关的 26 个可能的下游基因，其中上调基因 9 个，下调基因 17 个（具体如表 1 所示），这些基因与间皮瘤的关系未见报道，但与多种肿瘤的生长与转移有关。

上调基因中，MMP16 基因促进肿瘤转移，提示肝细胞癌预后不良<sup>[7]</sup>；MXRA5 基因的表达与胶质瘤的临床病理特征和不良预后相关，它可能在胶质瘤的免疫抑制微环境中起重要作用<sup>[8]</sup>；FAP 基因在富于纤维间质的肝细胞癌中高表达，且与肿瘤的血管侵袭性相关<sup>[9]</sup>；SLC2A5 基因促进肺腺癌细胞生长和转移<sup>[10]</sup>；SULF2 基因具有促肿瘤效应，在前列腺癌转移中起重要作用<sup>[11]</sup>；CPA4 基因则与胰腺癌有关<sup>[12]</sup>；GREM1 基因过表达则抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成能力<sup>[13]</sup>；上调糖基转移酶

C1GALT1 对膀胱癌细胞具有促转移和增殖作用<sup>[14]</sup>；ZMAT3 基因与癌症相关的研究未见报道。

下调基因中，USP54 基因在结直肠癌干细胞中过表达并促进肠道肿瘤的发生<sup>[15]</sup>；KITLG 基因在鼻咽癌细胞中表达被抑制时，癌细胞的增殖、侵袭和转移能力均降低<sup>[16]</sup>；PTPRB 基因可对结直肠癌的转移起促进作用<sup>[17]</sup>；SORT1 基因则可对胃癌的进展起促进作用<sup>[18]</sup>；RORA 基因在胃癌细胞中高表达对癌症的进展起抑制作用<sup>[19]</sup>；TJP2 基因的 Alu 相关转录物与结直肠癌相关<sup>[20]</sup>；QKI 基因对胃癌细胞的增殖和转移起抑制作用<sup>[21]</sup>；ARHGAP6 基因能调节肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[22]</sup>；SORBS1 基因在结直肠癌中过表达能对肿瘤生长和迁移起关键作用<sup>[23]</sup>；而 UNC13B、RAPGEF5、SNX30、TMEM139、ALCAM、TMEM204、CCDC78、C1orf115 这 8 个基因与癌症相关的研究未见报道。

对筛选出的基因通过 GO-BP、KEGG 等通路分析，分析结果提示，microRNA-345 下游基因与脉管系统发育、细胞连接组织、上皮细胞迁移、Ras 蛋白信号转导、细胞外基质组织和上皮细胞分化等生理过程密切相关。

综上所述，通过 qPCR 实验检测细胞 miR-345 表达水平以及生物信息学分析结果和相关的文献，我们可以大胆推测，miR-345 通过调控 MMP16、USP54、KITLG、MXRA5、PTPRB、FAP、SLC2A5、SULF2、CPA4、GREM1、SORT1、C1GALT1、RORA、TJP2、QKI、ARHGAP6、SORBS1、TMEM204、UNC13B 下游基因影响其在恶性胸膜间皮瘤细胞中的表达，

且与脉管系统发育、细胞连接组织、上皮细胞迁移、Ras 蛋白信号传导、细胞外基质组织和上皮细胞分化等通路有关，但其具体影响机制还需进一步深入研究。本次研究为进一步研究恶性间皮瘤的发病机制及预防策略等提供新的方向。

#### 参考文献:

- [1] Reid G, Johnson TG, van Zandwijk N. Manipulating microRNAs for the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma: Past, Present and Future. *Front Oncol*. 2020. 10: 105.
- [2] Tolani B, Acevedo LA, Hoang NT, He B. Heterogeneous Contributing Factors in MPM Disease Development and Progression: Biological Advances and Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 2018. 19 ( 1 ) .
- [3] Lo Russo G, Tessari A, Capece M, et al. MicroRNAs for the Diagnosis and Management of Malignant Pleural Mesothelioma: A Literature Review. *Front Oncol*. 2018. 8: 650.
- [4] Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009. 4: 199–227.
- [5] 杨琴, 王杰, 吕沐瀚, 唐世孝. miR-345 抑制人胰腺癌细胞的增殖能力研究. *现代医药卫生*. 2018. 34 ( 06 ) : 828–832.
- [6] 雷永华, 王磊, 赵致广, 张伟, 付晓亮. miR-345 靶向调控 TGM1 抑制膀胱癌的初步研究. *现代生物医学进展*. 2018. 18 ( 18 ) : 3412–3419.
- [7] Shen Z, Wang X, Yu X, Zhang Y, Qin L. MMP16 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017. 8 ( 42 ) : 72197–72204.
- [8] Sun JZ, Zhang JH, Li JB, et al. MXRA5 Is a Novel Immune-Related Biomarker That Predicts Poor Prognosis in Glioma. *Dis Markers*. 2021. 2021: 6680883.
- [9] Kim GJ, Rhee H, Yoo JE, et al. Increased expression of CCN2, epithelial membrane antigen, and fibroblast activation protein in hepatocellular carcinoma with fibrous stroma showing aggressive behavior. *PLoS One*. 2014. 9 ( 8 ) : e105094.
- [10] Weng Y, Fan X, Bai Y, et al. SLC2A5 promotes lung adenocarcinoma cell growth and metastasis by enhancing fructose utilization. *Cell Death Discov*. 2018. 4: 38.
- [11] Vicente CM, Lima MA, Nader HB, Toma L. SULF2 overexpression positively regulates tumorigenicity of human prostate cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015. 34 ( 1 ) : 25.
- [12] Shao Q, Zhang Z, Cao R, Zang H, Pei W, Sun T. CPA4 Promotes EMT in Pancreatic Cancer via Stimulating PI3K–AKT–mTOR Signaling. *Oncotargets Ther*. 2020. 13: 8567–8580.
- [13] Gu Q, Luo Y, Chen C, Jiang D, Huang Q, Wang X. GREM1 overexpression inhibits proliferation, migration and angiogenesis of osteosarcoma. *Exp Cell Res*. 2019. 384 ( 1 ) : 111619.
- [14] Liu CH, Hu RH, Huang MJ, et al. C1GALT1 promotes invasive phenotypes of hepatocellular carcinoma cells by modulating integrin  $\beta$  1 glycosylation and activity. *PLoS One*. 2014. 9 ( 8 ) : e94995.
- [15] Fraile JM, Campos-Iglesias D, Rodríguez F, Español Y, Freije JM. The deubiquitinase USP54 is overexpressed in colorectal cancer stem cells and promotes intestinal tumorigenesis. *Oncotarget*. 2016. 7 ( 46 ) : 74427–74434.
- [16] Ling J, Zhang L, Chang A, et al. Overexpression of KITLG predicts unfavorable clinical outcomes and promotes lymph node metastasis via the JAK/STAT pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Lab Invest*. 2022. 102( 11 ) : 1257–1267.
- [17] Weng X, Chen W, Hu W, et al. PTPRB promotes metastasis of colorectal carcinoma via inducing epithelial–mesenchymal transition. *Cell Death Dis*. 2019. 10 ( 5 ) : 352.
- [18] Liang M, Yao W, Shi B, et al. Circular RNA hsa\_circ\_0110389 promotes gastric cancer progression through upregulating SORT1 via sponging miR-127-5p and miR-136-5p. *Cell Death Dis*. 2021. 12 ( 7 ) : 639.
- [19] Ma X, Chen H, Li L, Yang F, Wu C, Tao K. CircGSK3B promotes RORA expression and suppresses gastric cancer progression through the prevention of EZH2 trans-inhibition. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021. 40( 1 ) : 330.
- [20] Kim YJ, Jung YD, Kim TO, Kim HS. Alu-related transcript of TJP2 gene as a marker for colorectal cancer. *Gene*. 2013. 524 ( 2 ) : 268–74.
- [21] 王黎. RNA 结合蛋白 QKI 通过转录后调节 COX2 抑制胃癌的发生发展. 见: 卢兹凡, 杨栋, 主编. ( 02 ) , 2012.
- [22] Wu Y, Xu M, He R, Xu K, Ma Y. ARHGAP6 regulates the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2019. 41 ( 4 ) : 2281–2888.
- [23] Cho WC, Jang JE, Kim KH, Yoo BC, Ku JL. SORBS1 serves a metastatic role via suppression of AHNK in colorectal cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2020. 56 ( 5 ) : 1140–1151.

作者简介: 黄何菲 ( 2002- ) , 女, 本科生。