· ARTICLES · · 论 著 ·

DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2015.07.001
www.csumed.org/xbwk/fileup/PDF/201507701.pdf

新疆南部维吾尔族 HPV16 阳性宫颈鳞癌 microRNA 筛选及功能分析

袁敏[1]，程静新[1,2]，刘雅歆[1]，苏伟[1]，张瑜[2]，张怡[2]

(1. 新疆医科大学附属肿瘤医院妇科，乌鲁木齐 830011；2. 中南大学湘雅医院妇产科，长沙 410008)

[摘要] **目的：**初步探讨新疆南部维吾尔族HPV16阳性宫颈鳞癌差异表达的microRNA(miRNA)，预测并分析靶基因功能。**方法：**采用miRNA微阵列芯片技术对5例HPV16阳性的新疆南部维吾尔族宫颈鳞癌进行miRNA初步研究，挑选出差异表达的miRNA，并利用实时定量RT-PCR进行初步验证，利用targetscan，miRwalk，miRanda及pictar 4种软件预测其靶基因。**结果：**新疆南部维吾尔族HPV16阳性宫颈鳞癌差异表达基因18个，对差异表达显著的miRNA-138和miRNA-720进行初步验证并预测其靶基因，预测miRNA-138靶基因为EZH2，LYPLA1，ARHGEF3，CLNS1A，EIF4EBP1，GNAI2，LIMK1，RHOC，ROCK2，SLC20A1，TERT，H2AFX；miRNA-720靶基因为EZH2，AGAP2，SPOCK2，FGF14，HNRNPA2B1，QKI，FOXG1，ACVR1B，DNMT3A，EPHB2，LATS2，KRAS，CCND2，NBN，ENAM，AMELX，PRNP，CALB1，两者共同的靶基因是EZH2。**结论：**miRNA-138，miRNA-720在新疆南部维吾尔族HPV16阳性宫颈鳞癌组织中表达均下调，两者共同的靶基因是EZH2，可能与宫颈癌的浸润和转移有关。

[关键词] 新疆南部维吾尔族；HPV16；宫颈鳞癌；miRNA-138；miRNA-720

Screening and functional analysis of microRNA expression in HPV16-positive squamous carcinoma of the cervix in the Uygur of southern Xinjiang

YUAN Min[1], CHENG Jingxin[1,2], LIU Yaxin[1], SU Wei[1], ZHANG Yu[2], ZHANG Yi[2]

(1. Department of Gynecology, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Ulumuqi 830011;
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT **Objective:** To explore the differential expression of microRNA (miRNA) in HPV16-positive

收稿日期(Date of reception)：2014-05-09
第一作者(First author)：袁敏，Email: Yuanmin003@126.com
通信作者(Corresponding author)：张怡，Email: zhangyi5588@aliyun.com
基金项目(Foundation item)：国家自然科学基金(81360380)；新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题(XJDX0201_2013_03)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81360380), and the Open Project of Xinjiang Key Laboratory of Biological Resource and Genetic Engineering, P. R. China (XJDX0201_2013_03).

squamous carcinoma of the cervix in the Uygur of southern Xinjiang and to predict the target genes of the miRNAs.

Methods: Samples of HPV16-positive squamous carcinoma of the cervix from 5 Uygurs were collected for miRNA microarray assay. The differentially expressed miRNAs were selected for further verification by real-time quantitative RT-PCR. The software, including targetscan, miRwalk, miRanda and pictar, were used to predict the target genes of the verified miRNAs.

Results: Eighteen differentially expressed miRNAs were identified by miRNA microarray assay. The significantly differentially expressed miRNA-138 and miRNA-720 were verified by real-time quantitative RT-PCR. According to the prediction, the target genes for miRNA-138 were EZH2, LYPLA1, ARHGEF3, CLNS1A, EIF4EBP1, GNAI2, LIMK1, RHOC, ROCK2, SLC20A1, TERT, and H2AFX, while for miRNA-720 were EZH2, AGAP2, SPOCK2, FGF14, HNRNPA2B1, QKI, FOXG1, ACVR1B, DNMT3A, EPHB2, LATS2, KRAS, CCND2, NBN, ENAM, AMELX, PRNP, and CALB1.

Conclusion: miR-138 and miR-720 are the down-regulated target miRNAs in HPV16-positive squamous carcinoma of the cervix in the Uygur of southern Xinjiang. The common target gene for miR-138 and miR-720 is EZH2, which might be related to cervical squamous carcinoma invasion and metastasis.

KEY WORDS Uygur of Southern Xinjiang; HPV16; cervical squamous carcinoma; miRNA-138; miRNA-720

宫颈癌是新疆地区高发肿瘤，其中以天山以南地区(新疆南部)为多，当地维吾尔族妇女宫颈癌的患病率为527/10万，是北京市妇女的210多倍，明显高于中国其他地区。宫颈癌主要和必要的病因为人乳头瘤病毒(human papillomavirus，HPV)感染。我们的前期研究[1]显示：新疆地区维吾尔族宫颈癌患者以HPV16感染为主，感染率可达94.31%。但HPV感染导致宫颈浸润癌的机制尚不明了。

微小RNA(microRNA，miRNA)是一类在转录后水平上通过与靶基因mRNA的3'-非翻译区(untranslated regions，UTR)结合后调控基因表达的小分子非编码RNA。在多种肿瘤中都发现有miRNA的异常表达，并且这些miRNA在肿瘤的发生过程中扮演着重要的角色[2]。

本研究拟采用微阵列芯片技术筛选新疆南部维吾尔族HPV16相关宫颈鳞癌的差异miRNA并进行功能分析，寻找与新疆南部维吾尔族宫颈鳞癌相关的miRNA。

1 对象与方法

1.1 对象

收集新疆医科大学附属肿瘤医院2011年8月至2012年12月间初治原发Ib~IIa期宫颈鳞状细胞癌23例，分别取癌旁组织作为对照，均为新疆南部维吾尔族患者，临床分期IIa1期14例、Ib1期9例，年龄36~69(中位年龄51)岁，临床分期以国际妇产科联盟(international federation of gynecology and obstetrics，FIGO)妇科肿瘤2009年新分期为标准。患者均由病理证实，且除外其他恶性肿瘤及严重的内科疾病。所有标本的收集均征得患者及其家属同意，并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 琼脂糖凝胶电泳检测 HPV16

HPV16引物序列如下：HPV16 E7-F 5'-CAAG-TGTGACTCTACGCTTCGG-3'，HPV16 E7-R 5'-GTGCCCATTAACAGGTCTTCCAA-3'。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物，紫外凝胶成像仪下观察。电泳条带显示产物大小约81 bp即为HPV16阳性。

1.2.2 微阵列芯片技术行 miRNA 筛选

CapitalBio®哺乳动物miRNA芯片V4.0，购自北京博奥公司，操作过程严格按说明书进行，采用晶芯®Slide Washer™ 8芯片洗干仪对芯片进行清洗甩干，晶芯®LuxScan™ 10K/A双通道激光扫描仪对芯片进行扫描，LuxScan3.0图像分析软件对数据进行提取，SAM软件进行差异基因的挑选。筛选条件为假发现率(false discovery rate，FDR)控制在5%以内，差异倍数(fold change，FC)为1.5。

1.2.3 实时定量 RT-PCR 检测 miRNA

根据基因芯片检测结果，从中选取差异表达显著的has-miRNA-138，has-miRNA-720进行实时定量RT-PCR检测，对芯片结果进行验证。以U6作为内参。引物序列见表1。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequences

基因	引物序列
miRNA通用Sense引物	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6-F	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
U6-R	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
hsa-miR-720	5'-UCUCGCUGGGGCCUCCA-3'
hsa-miR-720-RT	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGGAGG-3'
hsa-miR-720-AS	5'-GCTCTCGCTGGGGCCT-3'
hsa-miR-138	5'-AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG-3'
hsa-miR-138-RT	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGGCCT-3'
hsa-miR-138-AS	5'-GCGAGCTGGTGTTGTGAATCA-3'

1.2.4 miRNA 的靶基因预测

利用目前常用miRNA靶基因预测网站进行操作。1)targetscan网址：http://www.targetscan.org；2)miRwalk网址：http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/；3)miRanda网址：http://www.microrna.org/microrna/home.do；4)pictar网址：http://pictar.mdc-berlin.de/。

1.3 统计学处理

采用SPSS16.0统计学软件进行分析，统计方法采用配对t检验，实验数据以均数±标准差($\bar{x}$±s)表示，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 组织总 RNA 质量检测结果

使用M200Pro酶标仪检测样品总RNA纯度，A260/A280在1.8~2.0，说明总RNA纯度较高；1.2%甲醛变性凝胶电泳检测样品总RNA完整性，28 S条带亮度约为18 S的2倍，5 S条带亮度最淡(图1)，说明提取的总RNA完整，没有降解。

2.2 HPV16 检测结果

对23例宫颈鳞癌组织进行HPV16检测，17例HPV16阳性，其中5例标本用于芯片检测，15例标本用于实时定量RT-PCR检测(该15例标本中包括用于芯片检测的3例标本)，6例HPV16检测结果阴性，HPV16阳性表达率为73.9%。琼脂糖凝胶电泳检测HPV16结果见图2。电泳亮带在81 bp左右，提示此电泳亮带为目的条带，HPV16检测结果为阳性；无电泳亮带及电泳亮带不在81 bp左右，提示此电泳杂带非目的条带，可能为引物二聚体或cDNA模板本身所致，HPV16检测结果为阴性。

2.3 芯片结果

5例新疆南部维吾尔族HPV16阳性宫颈鳞状细胞癌组织及癌旁组织(患者年龄48~58岁，临床分期为Ib1~IIa1期)miRNA芯片扫描结果见图3。使用SAM软件挑选差异miRNAs，18个miRNAs在癌组织中表达发生变化，其中10个miRNAs表达上调，8个miRNAs表达下调(图4，表2)。

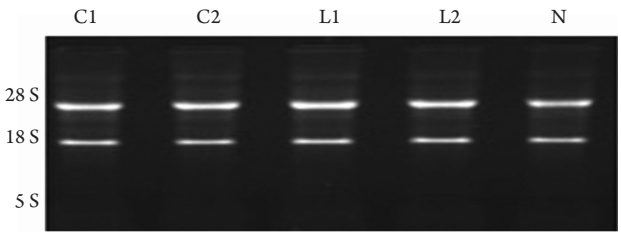

图 1　总RNA甲醛变性凝胶电泳图

Figure 1　Picture of formaldehyde degeneration electrophoresis gel about total RNA

C1, C2: Cervical cancer tissues; L1, L2: Cervical cancer adjacent tissues; N: Normal tissue

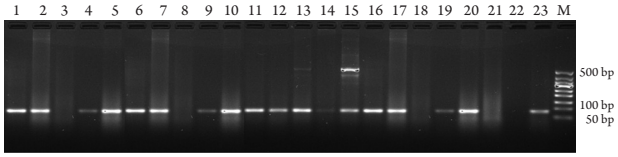

图2 2%琼脂糖凝胶电泳检测HPV16结果

Figure 2 Results about detection in HPV16 by 2% agarose gel electrophoresis

1–23: 23 cases of cervical cancer tissues; M: Marker

2.4 实时定量 PCR 检测结果

2.4.1 实时定量 RT-PCR 检测情况

实时定量RT-PCR以U6为内参，对miRNA芯片中差异表达的miRNA，从中随机抽取两个差异表达的miRNA：miRNA-138，miRNA-720，进行实时定量RT-PCR检测，均可见典型的PCR扩增曲线，说明PCR产物量足够，引物敏感度高，目的基因和U6内参的溶解曲线均为单峰，说明产物单一，无其他非特异性产物(图5)。

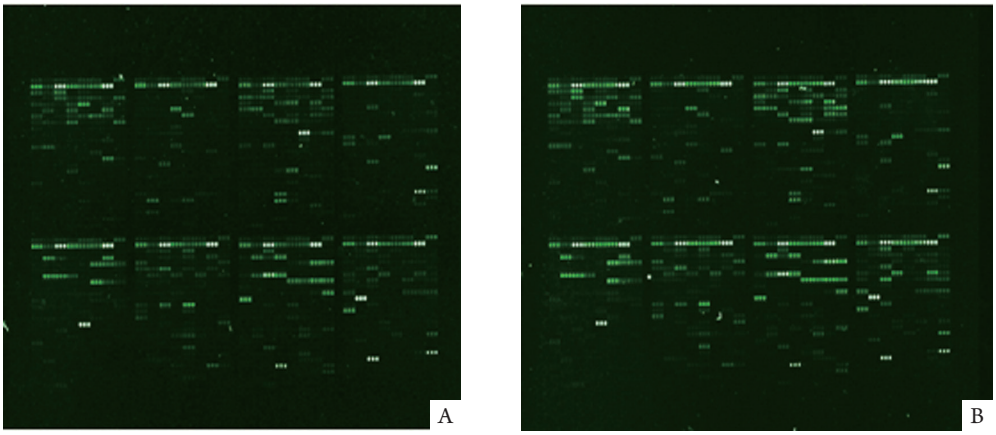

图 3 miRNA 芯片检测结果

Figure 3 miRNA microarray results

A: Cervical cancer tissue; B: Cervical cancer adjacent tissue

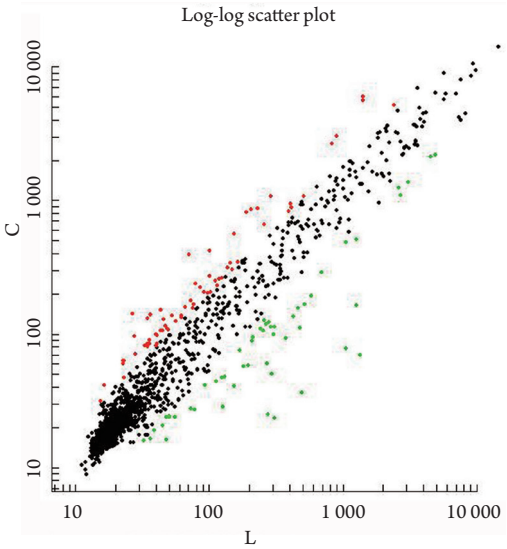

图4 宫颈鳞癌(C)及癌旁(L)比较分析散点图

Figure 4 Comparative analysis scatter plot of the cervical squamous cell carcinoma (C) and their adjacent tissue (L)

X and *Y* axes were the fluorescence intensity of the signal to the coordinate value of the cervical squamous cell carcinoma and their adjacent tissue respectively. Hybridization signals for each data point represents a miRNA chip point, the data points marked in red and green were differentially expressed miRNA (fold change≥2 or fold change≤0.5), almost no difference in the expression of black marks belong (0.5< fold change<2)

表 2　新疆南部维吾尔族 HPV16 阳性宫颈鳞癌中差异表达的 miRNAs

Table 2　miRNAs differentially expressed in the Uygur of southern Xinjiang HPV16-related cervical squamous carcinoma

Gene	Score/d	Fold change	Q-value/%
hsa-miR-31	12.290776220	2.3406	0
hsa-miR-142-5p	6.551195741	2.4139	0
hsa-miR-1234	5.869047548	1.7107	0
hsa-miR-1273	4.160696058	1.6652	0
hsa-miR-720	4.996993840	3.7139	0
hsa-miR-21	2.941448468	1.8642	0
hsa-miR-1285	2.349078383	1.8136	0
hsa-miR-138	3.731821136	3.0244	0
hsa-miR-1181	1.836497267	1.9024	4.614
hsa-miR-224	4.792889161	4.6074	0
hsa-miR-26a	−6.087792042	0.5926	0
hsa-miR-125b	−5.155407108	0.4327	0
hsa-miR-99a	−4.094353170	0.6160	0
hsa-miR-134	−6.346869021	0.3074	0
hsa-miR-195	−3.622344421	0.6043	0
hsa-miR-379	−5.031154595	0.2060	0
hsa-miR-100	−2.491208703	0.3246	0
hsa-miR-625	−4.391300569	0.2868	1.969

2.4.2 实时定量 RT-PCR 验证结果

对已用miRNA微阵列芯片技术筛选出差异表达显著的两个miRNAs：miRNA-138和miRNA-720进行实时定量RT-PCR验证。选取15例Ib~IIa期HPV16检测阳性的新疆南部维吾尔族宫颈鳞状细胞癌组织、癌旁组织进行检测。miRNA-138和miRNA-720在宫颈鳞状细胞癌组、癌旁组织中的表达率均为100%，对宫颈鳞状细胞癌组、癌旁组的目的基因数据分别进行正态性检验，符合正态分布，采用配对t检验。miRNA-138在癌组织与癌旁组织中表达的差异有统计学意义(t=2.167，P<0.05)；miRNA-720在癌组织与癌旁组织中表达的差异有统计学意义(t=4.987，P<0.001)。实时定量RT-PCR检测miRNA-138，miRNA-720在宫颈鳞状细胞癌组织中均差异表达(表3)，与芯片结果一致，说明miRNA芯片检测结果可靠。

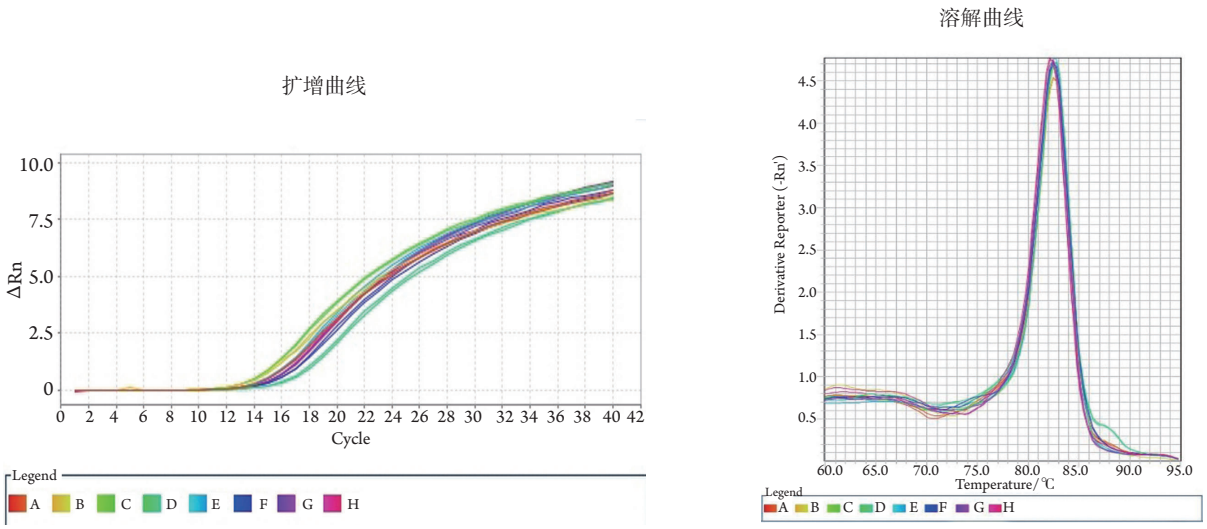

图5　PCR扩增曲线和溶解曲线

Figure 5　Amplification plot and melt curve of PCR

2.5 miRNA-138，miRNA-720 靶基因预测情况

目前不同研究小组开发出多个miRNA靶基因预测软件，为实验提供理论指导。我们针对性地应用targetsca，miRwalk，miRanda，pictar预测软件中寻找miRNA-138，miRNA-720的靶基因系列。

2.5.1 miRNA-138 靶基因预测结果

通过多数据信息交叉比对，获取miRNAs分子与3'-UTR的可能结合靶点，发现共有12个基因被一致预测为miRNA-138的靶基因(表4)。

2.5.2 miRNA-720 靶基因预测结果

利用目前得到人们认可的4个miRNA靶基因预测网站寻找miRNA-720靶基因，4个软件预测结果无完全重合者。Targetscan网址和miRanda网址预测靶基因交叉者与miRwalk网址和miRanda网址预测靶基因结果交叉者共18个基因列入本结果(表5)。EZH2为miRNA-720与miRNA-138共同调控靶基因。

表 3 miRNA-138，miRNA-720 在宫颈鳞癌及癌旁组织中表达的验证结果 (n=15，$\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression of miRNA-138 and miRNA-720 in cervical squamous carcinoma tissue and para-carcinoma tissue (n=15，$\bar{x} \pm s$)

目的基因	$\triangle Ct_{癌组织}$	$\triangle Ct_{癌旁组织}$	$\triangle\triangle Ct_{(癌-癌旁)}$	$2^{-\triangle\triangle Ct}$	t	P
miR-138	14.4232 ± 1.6156	13.1258 ± 2.4932	1.2975 ± 2.3187	0.4069	2.167	0.048
miR-720	5.9730 ± 3.3019	0.6096 ± 2.8229	5.6016 ± 4.0074	0.0258	4.987	<0.001

表 4 miRNA-138 靶基因预测结果及其功能

Table 4 miRNA-138 predicted target genes and their function

基因	基本功能
EZH2	参与染色体结构的形成，调节基因表达，控制细胞生长
LYPLA1	具有去棕榈化作用以及溶血磷脂酶的活性
ARHGEF3	与骨矿物质密度有关，与绝经后骨质疏松有关
CLNS1A	与核小体核糖核蛋白生物合成、血小板激活和细胞骨架的调节有关
EIF4EBP1	与紫外线和胰岛素等信号的磷酸化有关
GNAI2	原癌基因，促进细胞增殖，细胞周期增长
LIMK1	与细胞骨架结构相关，刺激轴突生长
RHOC	促进肿瘤细胞增殖和转移
ROCK2	调节细胞分裂，平滑肌收缩，肌动蛋白应力纤维和粘着斑的形成，c-fos血清反应元件的激活
SLC20A1	与磷酸盐代谢，信号转导，核酸和脂质的合成有关，也与病毒感染有关
TERT	人端粒反转录酶(hTERT)是端粒酶复合体的核心成分，与端粒酶活性密切相关，在绝大部分肿瘤组织中表达明显增高，并与肿瘤的进展和转移也显著相关。抑制端粒酶活性可增加肿瘤细胞对放化疗的敏感性
H2AFX	编码组蛋白H2A家族的一员，与细胞活化有关，与DNA损伤修复有关，与活性细胞的增殖有关

表 5　miRNA-720 靶基因预测结果及其功能

Table 5　miRNA-720 predicted target genes and their function

基因	基本功能
EZH2	参与染色体结构的形成，调节基因表达，控制细胞生长
AGAP2	介导神经生长因子的抗凋亡作用，在肿瘤细胞中过度表达，促进癌细胞的侵袭
SPOCK2	编码不同的蛋白异构体
FGF14	与肿瘤的生长和侵袭有关
HNRNPA2B1	影响pre-mRNA处理和其他方面的信使核糖核酸代谢和运输，与肺癌细胞的上皮间质转化有关
QKI	调节前体mRNA剪接，mRNA从核内输出，蛋白质翻译，mRNA的稳定；编码的蛋白参与髓鞘和少突胶质细胞的分化，可能与精神分裂症有关
FOXG1	阻遏基因，与大脑发育有关
ACVR1B	与垂体肿瘤有关
DNMT3A	与DNA甲基化表观遗传修饰有关，与胚胎发育、重要的印记、X染色体失活有关，其表达调控有发展性的监管
EPHB2	与神经系统发育有关
LATS2	肿瘤抑制基因，与中心体、有丝分裂纺锤体的形成有关，可能与p53反应的细胞骨架损伤的正反馈回路功能相关，还可阻遏雄激素应答基因表达
KRAS	源于哺乳动物ras基因家族，一个氨基酸替换负责一个激活突变。与各种恶性肿瘤包括肺腺癌、黏液瘤、胰腺导管腺癌和结肠癌有关
CCND2	参与肿瘤抑制蛋白的磷酸化Rb，与卵巢颗粒细胞和生殖细胞的增殖有关，在卵巢和睾丸的肿瘤中高水平表达
NBN	与奈梅亨断裂综合征有关
ENAM	参与釉质矿化和结构组织
AMELX	与釉质发育过程中所涉及的生物矿化有关，与X连锁的釉质发育不全有关
PRNP	与克雅氏病、致死性家族性失眠症、亨廷顿病、库鲁病有关
CALB1	钙结合蛋白

3 讨 论

miRNA是广泛存在于动物、植物及病毒等多细胞真核生物中的一类内源性非蛋白编码的单链小分子RNAs，能通过与其靶mRNA的特异性碱基配对引起靶mRNA的降解、抑制或活化，从而对基因进行转录或转录后的调控。

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤，目前有关miRNA与宫颈癌的病因、诊断、治疗及预后方面的研究受到人们的关注。检测和分析miRNA的表达水平是研究miRNA功能的首要环节。miRNA常用的检测方法包括RNA印迹分析方法、miRNA基因芯片和实时定量RT-PCR等。RNA印迹分析方法具有操作复杂、费力、费时的缺点。miRNA芯片技术可同时对大量miRNA的表达水平进行高通量、快速、准确的检测，能快速有效地检测miRNA表达图谱，因此是高效筛选差异表达miRNA的有效方法。2004年Lu等[3]报道首次用miRNA芯片技术检测miRNA在245个哺乳动物不同肿瘤中的表达图谱，结果的重复性很好，而且被Northen杂交，RT-PCR等方法所证实，显示了miRNA芯片技术的巨大潜力。实时定量RT-PCR是实用价值很高的定性定量检测技术，具有用时少、灵敏度高、精确度高、重复性好、可以高通量检测、能有效区分miRNA前体分子以及其他成熟miRNA同源分子等优点，已被越来越多地应用于miRNA的检测。

本研究选取5例HPV16阳性新疆南部维吾尔族宫颈鳞癌组织与癌旁组织作为研究对象，采用微阵列芯片技术，检测了宫颈鳞癌与癌旁组织的miRNA的表达；采用SAM软件筛选FDR控制在5%以内、FC为0.2倍以上的差异表达miRNA，发现18个miRNAs在癌组织中表达发生变化，其中10个miRNAs上调表达，包括miRNA-31，miRNA-142-5p，miRNA-1234，miRNA-1273，miRNA-720，miRNA-21，miRNA-1285，miRNA-138，miRNA-1181，miRNA-224；8个miRNAs下调表达，包括miRNA-26a，miRNA-125b，miRNA-99a，miRNA-134，miRNA-195，miRNA-379，miRNA-100，miRNA-625。同时，在这些miRNAs

中，miRNA-138，miRNA-720在宫颈鳞癌中的表达差异显著，故对这2个miRNAs进行了15例样本实时定量RT-PCR验证，结果与芯片结果一致，说明本次实验miRNA芯片检测结果是可靠的。

多种miRNA在宫颈癌中表达，如miRNA-205在宫颈癌组织中高表达[4]，hsa-cer-miRNA1，hsa-cer-miRNA2和hsa-cer-miRNA4在宫颈癌组织中上调表达[5]；而HR-HPV E7癌蛋白可以通过下游关键分子调控miRNA-15，miRNA-16的表达水平[6]，细胞分化过程中调控miRNA-203的活化程度[7]，影响细胞的增殖和细胞周期。本研究结果亦显示miRNA-138，miRNA-720在Ib~IIa期新疆南部HPV16阳性维吾尔族宫颈鳞癌组织中表达下调。

miRNA-138在多种肿瘤中表达下调，认为其作为抑癌基因发挥作用[8-10]。研究[11]发现：miRNA-138在鼻咽鳞状细胞癌的细胞株中抑制上皮-间质转化，下调的miRNA-138增强细胞迁移和侵袭，是一种多功能分子调节器。而目前国内外有关miRNA-720与宫颈癌以外其他肿瘤的相关性的报道也日渐增多。前庭神经鞘瘤的研究[12]发现：miRNA-720，miRNA-21，miRNA-221，miRNA-431在前庭神经鞘瘤中均呈上调表达，并发现这些上调的miRNAs位于14q32染色体。食管癌的研究[13]发现，SnoN/SKIL基因通过下调hsa-miRNA-720控制食管癌细胞的增殖。本研究结果显示miRNA-138，miRNA-720在新疆南部维吾尔族宫颈鳞癌组织中的表达均较癌旁组织下调，并在Ib~IIa期宫颈癌组织中即可以检测到其表达量的变化，因此作者推断其可能具有早期诊断的意义。同一基因可以在不同的肿瘤组织中呈现出不同的表达，miRNA-720在其他一些肿瘤组织中表达上调，而在新疆南部维吾尔族宫颈鳞癌组织中表达下调。

已证实miRNA通过各自不同的靶基因来调控肿瘤细胞的生物学行为，从而参与肿瘤的发生过程。研究[14-15]发现：miRNA-138靶向DNA损伤相关蛋白H2AX，通过下调其表达，诱导细胞在DNA损伤后出现染色体不稳定。miRNA-720通过靶向调节TWIST1基因抑制乳腺癌患者肿瘤的侵袭和转移[16]。本研究利用目前得到人们认可的4个软件进行靶基因预测：targetscan用于哺乳动物，miRwalk主要用于预测人、小鼠和大鼠，miRanda可用于线虫和人，pictar可以在脊椎动物，线虫和果蝇中预测miRNA 的靶基因。结果miRNA-138的靶基因包括EZH2，LYPLA1，ARHGEF3，CLNS1A，EIF4EBP1，GNAI2，LIMK1，RHOC，ROCK2，SLC20A1，TERT，H2AFX。miRNA-720的靶基因包括EZH2，AGAP2，SPOCK2，FGF14，HNRNPA2B1，QKI，FOXG1，ACVR1B，DNMT3A，EPHB2，LATS2，KRAS，CCND2，NBN，ENAM，AMELX，PRNP，CALB1。EZH2是miRNA-138和miRNA-720共同的靶基因。EZH2是果蝇zeste基因增强子的人类同源物，是1996年发现的一种新的人类基因。该基因定位于人染色体7q35，基因长度约40 kb。EZH2基因编码的蛋白属于多梳家族成员。多梳家族成员相互结合形成了多聚蛋白复合物，EZH2主要通过将3个甲基基团加到组蛋白3的27号赖氨酸(H3K27)上行使基因沉默者的角色。H3K27是维持染色质凝聚的一种重要修饰，参与染色体结构的形成，调节基因的表达，控制细胞的生长，因而在细胞记忆、生长发育及X染色体灭活等方面均有重要作用。EZH2β的功能特征揭示EZH2基因亚型，增加了哺乳动物基因表达调控的复杂性[17]。EZH2过多表达意味着过多的组蛋白甲基化抑癌基因将导致其表达沉默，就可能导致肿瘤形成，所以一种靶向EZH2的临床药物前模型显示其能够抑制脑癌及前列腺癌的进展[18-19]。在宫颈癌组织中EZH2的高表达与肿瘤细胞分化、临床分期、浸润深度及淋巴结转移密切相关[20]。EZH2参与染色体结构的形成，调节基因表达，控制细胞生长，因而在细胞记忆、生长发育及X染色体灭活等方面均有重要作用。

本研究下一步将进行双荧光素酶报告基因检测以验证靶基因，继续了解相关预测靶基因的功能，进而应用Western印迹提取蛋白，从而得到miRNA-138，miRNA-720调控的靶基因及其所编码蛋白。

参考文献

[1] 古扎丽努尔·阿不力孜, 程静新, 米克热木, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌的HPV谱研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(5): 379-382.
GU Za-lnur-Abliz, CHENG Jingxin, Mikaram, et al. The spectrum of HPV infection in Xinjiang Uighur women with cervical cancer[J]. Tumor, 2007, 27(5): 379-382.

[2] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857-866.

[3] Lu Y, Zhu J, Liu P. A two-step strategy for detecting differential gene expression in cDNA microarray data[J]. Curr Genet, 2005, 47(2): 121-131.

[4] Xie H, Zhao Y, Caramuta S, et al. miR-205 expression promotes cell proliferation and migration of human cervical cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46990.

[5] Reshmi G, Chandra SS, Babu VJ, et al. Identification and analysis

of novel microRNAs from fragile sites of human cervical cancer: computational and experimental approach[J]. Genomics, 2011, 97(6): 333-340.

[6] Myklebust MP, Bruland O, Fluge Ø, et al. MicroRNA-15b is induced with E2F-controlled genes in HPV-related cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 105(11): 1719-1725.

[7] Melar-New M, Laimins LA. Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins[J]. J Virol, 2010, 84(10): 5212-5221.

[8] Gong H, Song L, Lin C, et al. Downregulation of miR-138 sustains NF-κB activation and promotes lipid raft formation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(5): 1083-1093.

[9] Jin Y, Chen D, Cabay RJ, et al. Role of microRNA-138 as a potential tumor suppressor in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2013, 303: 357-385.

[10] Liu X, Lü XB, Wang XP, et al. MiR-138 suppressed nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene[J]. Cell Cycle, 2012, 11(13): 2495-2506.

[11] Liu X, Wang C, Chen Z, et al. MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines[J]. Biochem J, 2011, 440(1): 23-31.

[12] Torres-Martin M, Lassaletta L, de Campos JM, et al. Global profiling in vestibular schwannomas shows critical deregulation of microRNAs and upregulation in those included in chromosomal region 14q32[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65868.

[13] Shinozuka E, Miyashita M, Mizuguchi Y, et al. SnoN/SKIL modulates proliferation through control of hsa-miR-720 transcription in esophageal cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(1): 101-106.

[14] Wang Y, Huang JW, Li M, et al. MicroRNA-138 modulates DNA damage response by repressing histone H2AX expression[J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(8): 1100-1111.

[15] Zhao X, Yang L, Hu J, et al. miR-138 might reverse multidrug resistance of leukemia cells[J]. Leuk Res, 2010, 34(8): 1078-1082.

[16] Li LZ, Zhang CZ, Liu LL, et al. miR-720 inhibits tumor invasion and migration in breast cancer by targeting TWIST1[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(2): 469-478.

[17] Bland RD, Clarke TL, Harden LB. Rapid infusion of sodium bicarbonate and albumin into high-risk premature infants soon after birth: a controlled, prospective trial[J]. Am J Obstet Gynecol, 1976, 124(3): 263-267.

[18] Suvà ML, Riggi N, Janiszewska M, et al. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance[J]. Cancer Res, 2009, 69(24): 9211-9218.

[19] Crea F, Hurt EM, Mathews LA, et al. Pharmacologic disruption of polycomb repressive complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 40.

[20] 方静, 薛艳, 周党侠, 等. EZH2基因在宫颈癌中的表达及其意义[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2011, 32(6): 758-760.
FANG Jing, XUE Yan, ZHOU Dangxia, et al. Expression of EZH2 gene in cervical cancer and its signifucance[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University. Medical Science, 2011, 32(6): 758-760.

(本文编辑　郭征)

本文引用：袁敏, 程静新, 刘雅歆, 苏伟, 张瑜, 张怡. 新疆南部维吾尔族HPV16阳性宫颈鳞癌microRNA筛选及功能分析[J]. 中南大学学报: 医学版, 2015, 40(7): 701-709. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2015.07.001

Cite this article as: YUAN Min, CHENG Jingxin, LIU Yaxin, SU Wei, ZHANG Yu, ZHANG Yi. Screening and functional analysis of microRNA expression in HPV16-positive squamous carcinoma of the cervix in the Uygur of southern Xinjiang[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2015, 40(7): 701-709. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2015.07.001