

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.009

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20181227.1741.012.html(2018-12-29)

miRNA-32 启动子区域相互作用蛋白的分析*

吴巍芸

(广东医科大学附属第一医院消化内科,广东湛江 524001)

[摘要] **目的** 检测及分析与微 RNA-32(miRNA-32)基因上游启动子区域相互作用的蛋白。**方法** 采用 DNA pulldown 技术联合质谱鉴定的方法检测 miRNA-32 启动子区域相互作用的蛋白,并用生物信息学方法对这些蛋白进行 GO 富集及 KEGG 通路分析。**结果** 在大肠癌 HCT-116 细胞中总共鉴定到 191 个与 miRNA-32 启动子区域特异性结合的蛋白。GO 功能富集分析显示,这些蛋白涉及多种生物学功能,包括参与核酸代谢、基因转录、细胞周期、细胞生长和再生等过程。KEGG 通路分析表明这些蛋白参与多条信号通路,包括间隙连接、细胞周期信号通路、MAPK 信号通路等。**结论** 与 miRNA-32 启动子区域有相互作用的蛋白具有多种生物学功能及参与多条信号通路。

[关键词] 质谱分析法;启动子;DNA pulldown;GO 富集;KEGG 信号通路

[中图分类号] R735.3+4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1657-04

Analysis of the interacting proteins with miRNA-32 promoter region*

WU Weiyun

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

[Abstract] **Objective** To detect and analyze the proteins interacting with the miR-32 promoter region. **Methods** DNA pulldown technology combined with mass spectrometry was used to analyze the miRNA-32 promoter-interacting proteins, and bioinformatics methods were used to perform GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis. **Results** A total of 191 proteins that specifically bind to the miRNA-32 promoter region were identified in colorectal cancer HCT-116 cells. GO functional enrichment analysis results showed that these interacting proteins involved a variety of biological functions, including those involved in nucleic acid metabolism, gene transcription, cell cycle, cell growth and regeneration, and other metabolic processes. The results of KEGG pathway analysis showed that these interacting proteins participated in several important signaling pathways in cells, including gap junction, cell cycle signaling pathway, MAPK signaling pathway and so on. **Conclusion** The proteins interacting with the miR-32 promoter region have a variety of biological functions and participate in multiple signaling pathways.

[Key words] mass spectrometry; promoter; DNA pulldown; GO enrichment; KEGG signaling pathway

大肠癌是消化系统主要的恶性肿瘤之一。微 RNA(miRNA)是一类长 18~25 nt 的非编码小分子 RNA,广泛参与了生物体多种生理病理过程,如个体发育,细胞增殖、凋亡和分化,代谢与应激反应的调节,肿瘤形成等,在疾病的诊断、治疗、预测预后及药物疗效方面均具有巨大的潜力^[1-2]。作者前期研究显示,miRNA-32 在大肠癌组织表达较正常组织显著上调,且与大肠癌淋巴结转移及远处转移相关;生存曲线分析显示,miRNA-32 表达增高的患者预后较 miRNA-32 表达不增高的患者差^[3-4]。体外研究发现,miRNA-32 过表达可以通过抑制靶基因第 10 号

染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(phosphatase and tension homologue deleted on chromosome ten, PTEN)增强大肠癌细胞的增殖,减少凋亡,促进大肠癌细胞的迁移和侵袭等,参与大肠癌发生、发展过程^[3-4]。但 miRNA-32 在大肠癌中的上调机制尚未清楚。本实验通过 DNA pulldown 技术联合质谱鉴定的方法对 miRNA-32 启动子区域相互作用蛋白进行分析,进一步用生物信息学方法对相互作用蛋白进行 GO 富集分析及 KEGG 通路分析,旨在揭示可能与 miRNA-32 启动子存在相互作用的蛋白,以期为进一步研究 miRNA-32 表达调控的机制提供重要

* 基金项目:广东省自然科学基金项目(2017A030313546)。 作者简介:吴巍芸(1981—),副教授,硕士,主要从事大肠癌及非编码 RNA 方面的研究。

的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人大肠癌细胞株 HCT-116 购自中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂 高纯度质粒小体中量试剂盒、Universal DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;高保真 Prime STAR DNA 聚合酶试剂盒、DNA 标记物购自 Takara 公司;快速银染试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Dynabeads® M-280 链霉亲和素购自 Thermo 公司;聚合酶链反应(PCR)引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA pulldown 蛋白结合探针制备 PCR 扩增 miRNA-32 所在的宿主基因 TMEm245 转录起始上游-1 987~-1 bp 片段。上游引物:5'-CAG CCT GTT CAA CAT GGT GAA-3',下游引物:5'-GTA ATG GGA GTC GGG CTA GAA AC -3'。并在上游引物 5'用生物素标记。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;循环参数分别为 94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 2 min,共 35 个循环;72 °C 充分延伸 10 min,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增情况。Universal DNA 纯化回收试剂盒纯化、回收扩增的目的片段并测序鉴定。

1.2.2 DNA pulldown 实验 HCT-116 细胞于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,37 °C,5% CO₂ 环境中常规培养,细胞生长状态良好时,RIPA 裂解液裂解细胞,提取细胞蛋白。m280 链霉素亲和磁珠与上述生物素标记的 DNA 探针冰上孵育 4 h 结合(实验组),以无生物素标记的 DNA 探针-磁珠为阴性对照组。再往磁珠-DNA 混合物中加入细胞裂解液(约含蛋白 1 mg),4 °C 孵育过夜。清洗缓冲液清洗磁珠-DNA 探针-蛋白复合物,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白条带并银染。

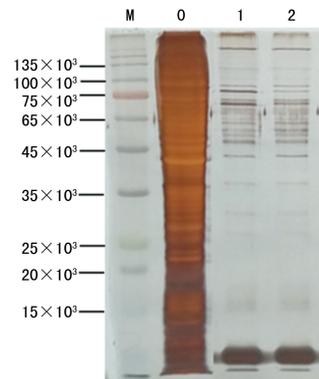
1.2.3 质谱鉴定和分析 将电泳条带胰酶酶解成肽

段,纯化肽段后用质谱仪 Thermo Scientific Q Exactive 分析。质谱原始文件经过 MM File Conversion 软件处理转换,得到 MGF 格式文件,然后用 MAS-COT 检索 uniprot 数据库。质谱鉴定及分析送广州赛哲生物技术有限公司完成。

1.2.4 差异表达蛋白 GO、KEGG 富集分析 对实验组和阴性对照组比较筛选出的差异表达蛋白进行 GO、KEGG 富集分析。GO 富集包括细胞组成(cellular component),分子功能(molecular function)及生物学过程(biological process)三方面内容。在生物体内,不同基因相互协调行使生物学功能,基于 KEGG 通路分析有助于更进一步了解基因生物学功能。GO 富集与 KEGG 通路检验时,当 $P < 0.05$ 的 GO 功能条目及主要 KEGG 信号通路被认为是显著富集。

2 结果

2.1 DNA pulldown 获取 miRNA-32 启动子区域相互作用蛋白 用生物素标记的 DNA 探针-磁珠复合物 pulldown 能与 DNA 相互作用的蛋白。pulldown 后的样品进行 SDS-PAGE 分离,实验组与阴性对照组相比存在蛋白条带差异(input 为阳性对照组),见图 1。



M:DNA 标记物;1:input;2:生物素标记探针实验组;3:非生物素标记探针组(阴性对照组)

图 1 DNA pulldown 实验

表 1 质谱分析实验组与阴性对照组的差异蛋白

归组后 蛋白编号	数据库中 蛋白登录号	蛋白得分	蛋白质量	匹配上蛋白的 二级谱数	匹配上蛋白的 肽段数	蛋白丰度	蛋白描述
7.5	CMS1_HUMAN	26	32 149	5(2)	3(2)	0.22	蛋白 CMSS1
10.5	TBB6_HUMAN	614	50 281	34(29)	10(9)	1.28	微管蛋白 β -6 链
14.2	TBA4A_HUMAN	1 251	50 634	46(42)	19(17)	3.84	微管蛋白 α -4A 链
55.2	LAP2A_HUMAN	362	76 016	19(9)	15(8)	0.46	Lamina 相关多肽 2,同种型 α
75.2	IF4A2_HUMAN	330	46 601	20(12)	14(9)	0.98	真核起始因子 4A-II
99.2	PFKAL_HUMAN	113	85 762	10(5)	9(5)	0.21	ATP 依赖性 6-磷酸果糖激酶,肝脏类型
135.3	ADT4_HUMAN	100	35 285	16(5)	7(4)	0.43	ADP/ATP 转位酶 4
177.4	RAB35_HUMAN	119	23 296	7(6)	4(3)	0.5	Ras 相关蛋白 Rab-35
296	CAP1_HUMAN	102	52 325	8(4)	8(4)	0.28	腺苷酸环化酶相关蛋白 1
324	RB11A_HUMAN	91	24 492	5(3)	5(3)	0.47	Ras 相关蛋白 Rab-11A

并分析其功能对研究 miRNAs 的转录调控具有重要意义。JIANG 等^[10]研究发现,miRNA-378 在人脂肪细胞中表达升高,通过荧光素酶报告基因检测发现 miRNA-378 的启动子区域在其上游 -698 bp~ -94 bp 处,其中含有转录因子 SREBP 和 C/EBP 的结合位点,并通过 EMSA 实验证实,初次报道了脂肪因子和细胞因子可能通过与人脂肪细胞的 miRNA-378 启动子区域的 SREBP 和 C/EBP 结合位点结合,上调 miRNA-378 的表达。研究发现,心肌特异性表达的 miRNA-1 受到肌肉组织形成有关的转录因子 SRF 和 MyoD 的调节^[11]; YIN 等^[12]发现,在卵巢颗粒细胞中,类固醇因子-1(SF-1)能与 miRNA-383 的启动子区域结合,促进 miRNA-383 的表达。miRNA-32 属于基因内 miRNA,其宿主基因为跨膜蛋白 245(transmembrane protein 245, TMEM245)。miRNA-32 位于 TMEM245 的第 14 个内含子中。研究发现,内含子编码的 miRNAs 与它们的宿主基因共表达^[13],且它们产生在内含子剪接之前,显示这些 miRNAs 和它的宿主基因 mRNA 来自于相同的转录本,所以调控这些 miRNAs 和它们相应的宿主基因表达应是相同的机制^[14-15]。

本实验在 Ensembl 数据库中检索 TMEM245 转录起始点上游约 2.0 kb 长度的区域,采用 DNA pull-down 技术联合质谱分析的方法对启动子区域相互作用蛋白进行分析,进一步用生物信息学方法对相互作用蛋白进行 GO 富集分析及 KEGG 通路分析。结果显示,DNA pulldown 和质谱分析总共鉴定到 191 个潜在的特异性与启动子区域相互结合的蛋白。GO 功能富集分析结果显示,这些相互作用蛋白涉及多种生物学功能,包括参与核酸代谢、基因转录,蛋白代谢、修饰,核质运输、细胞周期、细胞生长和再生等代谢过程等。KEGG 通路分析结果表明这些相互作用蛋白参与多条细胞内重要的信号通路,包括间隙连接、细胞周期信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Ras 通路、Toll 样受体信号通路等。这些信号通路在调控细胞增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭等重要生理和病理过程中发挥重要作用。这为进一步研究大肠癌中 miRNA-32 上调及大肠癌发生、发展的机制提供了重要的信息。这些信息的预测为下一步寻找有意义的调控 miRNA-32 表达的蛋白提供了线索,但由于生物信息学具有一定的局限性,还需进行进一步的分子生物学及功能的验证,这为下一步研究提供了可靠的研究策略。

参考文献

- [1] SETHI S, SETHI S, BLUTH M H. Clinical implication of microRNAs in molecular pathology: an update for 2018 [J]. *Clin Lab Med*, 2018, 38(2): 237-251.
- [2] ZHENG Q, CHEN C, GUAN H, et al. Prognostic role of microRNAs in human gastrointestinal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017; 8(28): 46611-46623
- [3] WU W, YANG J, FENG X, et al. MicroRNA-32 (miRNA-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells [J]. *Mol Cancer*, 2013, 23;12:30.
- [4] WU W, YANG P, FENG X, et al. The relationship between and clinical significance of microRNA-32 and phosphatase and tensin homologue expression in colorectal cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(12): 1130-1140.
- [5] LIANG X, LI H, FU D, et al. MicroRNA-1297 inhibits prostate cancer cell proliferation and invasion by targeting the AEG-1/Wnt signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(2): 208-214.
- [6] CHEN Z Y, CHEN X, WANG Z X. The role of microRNA-196a in tumorigenesis, tumor progression, and prognosis [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 15457-15466.
- [7] PELLATT D F, STEVENS J R, WOLFF R K, et al. Expression profiles of miRNA subsets distinguish human colorectal carcinoma and normal colonic mucosa [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, 7: e152.
- [8] TOIYAMA Y, TAKAHASHI M, HUR K, et al. Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(12): 849-859.
- [9] LI J, ZOU K, YU L, et al. MicroRNA-140 inhibits the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 10: 426-437.
- [10] JIANG X, XUE M, FU Z, et al. Insight into the effects of adipose tissue inflammation factors on miR-378 expression and the underlying mechanism [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6): 1778-1788.
- [11] ZHAO Y, SAMAL E, SRIVASTAVA D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 214-220.
- [12] YIN M, LU M, YAO G, et al. Transactivation of microRNA-383 by steroidogenic factor-1 promotes estradiol release from mouse ovarian granulosa cells by targeting RBMS1 [J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(7): 1129-1143.
- [13] BASKERVILLE S, BARTEL D P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes [J]. *RNA*, 2005, 11(3): 241-247.
- [14] RODRIGUEZ A, GRIFFITHS-JONES S, ASHURST J L, et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units [J]. *Genome Res*, 2004, 14(10A): 1902-1910.
- [15] KIM Y K, KIM V N. Processing of intronic microRNAs [J]. *Embo J*, 2007, 26: 775-783.