ER⁺和 ER⁻乳腺肿瘤细胞中 mRNA 和非编码 RNA 的表达模式

蔡晶晶^①, 杨晟^②, 张慧^②, 郭丽^②, 陈峰^②, 吴倩^{①*}

① 南京医科大学公共卫生学院卫生检验学系, 生殖医学国家重点实验室, 南京 211166;

② 南京医科大学公共卫生学院, 流行病与卫生统计学系, 南京 211166

* 联系人, E-mail: wuqian@njmu.edu.cn

2013-09-04 收稿, 2013-11-25 接受, 2014-05-20 网络版发表

国家自然科学基金(81102182, 81072338, 81072389)和江苏省优势学科(苏政办发[2011]6 号)资助

摘要 利用 microarray 分别获得 MCF-7(雌激素受体阳性, ER⁺)和 MDA-MB-231(雌激素受体阴性, ER⁻)两种乳腺肿瘤细胞的 miRNA, lncRNA 和 mRNA 表达谱. 筛选差异表达的 miRNA, 预测其靶基因; 对 lncRNA 和 mRNA 芯片数据进行生物信息学分析, 对差异基因进行 gene ontology (GO)和 pathway(信号通路)分析. 对差异表达的 mRNA 和 miRNA 的靶基因作交集, 再与差异表达的 lncRNA 建立共表达关系, 在 mRNA-lncRNA 共表达网络中导入 miRNA-mRNA 相互作用, 借此获得关键 miRNA-mRNA-lncRNA 相互作用. 结果发现雌激素受体表型不同的乳腺肿瘤细胞中 mRNA 和非编码 RNA 的表达有显著性差异. 在差异表达的 miRNA 中, *miR-19a-3p*, *miR-19b-3p* 等在 MCF-7 细胞中表达明显下调, *miR-148b-3p* 等在 MCF-7 细胞中表达显著上调. 差异表达 miRNA 的靶基因分析结果显示, *miR-19a-3p* 和 *miR-19b-3p* 的靶基因为 *ESR1*; 在差异表达的 lncRNA 中, *uc001vet.1(DLEU1)* (Fc=15.44), *uc001ver.2(DLEU1)* (Fc=4.13)在 MCF-7 细胞中的表达明显增高. 共表达分析表明, *ESR1* 与 *uc001vet.1* 和 *uc001ver.2* 具有较高的共表达系数, 而且 *miR-19a* 和 *miR-19b* 与 *DLEU1* 均在 13 号染色体上. 推断 *miR-19a* 和 *miR-19b* 可能与 *DLEU1* 共同作用影响 *ESR1* 的表达. 由此推断 miRNA-mRNA-lncRNA 相互作用影响不同雌激素表型乳腺癌肿瘤细胞的发生发展, 雌激素受体可能受 miRNA 和 lncRNA 的共同调控作用.

关键词

miRNA
长链非编码 RNA
mRNA
雌激素受体
乳腺癌

长期以来, 由于受中心法则的影响, 对 RNA 的研究集中在 mRNA, tRNA 和 rRNA, 对其功能的探索也主要定位于蛋白质的翻译. 近年来, 一类不具有蛋白编码能力却能转录的非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)^[1,2]在肿瘤相关基因中的研究越来越多. 根据 ncRNA 分子大小可分为非编码小 RNA 和非编码长链 RNA(long non-coding RNA, lncRNA). 非编码小 RNA 的长度一般为几十到几百核苷酸, 其中以微小 RNA(microRNA, miRNA)^[3]和小干扰 RNA(small in-

terfering RNA, siRNA)的研究较多, 也较为成熟. 而 lncRNA 的研究刚刚起步, 多数 lncRNA 的特点和生物学功能尚不是很清楚. lncRNA 是一类长度超过 200 nt, 不具备蛋白编码功能的基因转录产物, 大多由 RNA 聚合酶 II 转录而来, 且缺少有意义的可读框(open reading frame, ORF). 与 mRNA 相比, lncRNA 的整个序列的保守性较差, 易受进化的压力形成物种内部表型差异. 但是 lncRNA 具有极其保守的二级结构, 剪切位点极为稳定. 这一点预示着 lncRNA 很

引用格式: 蔡晶晶, 杨晟, 张慧, 等. ER⁺和 ER⁻乳腺肿瘤细胞中 mRNA 和非编码 RNA 的表达模式. 科学通报, 2014, 59: 1861-1873

Cai J J, Yang S, Zhang H, et al. Expression pattern of mRNA and non-coding RNA in ER⁺ and ER⁻ breast cancer cells (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 1861-1873, doi: 10.1360/972013-986

可能有重要的生物学功能。

系统生物学认为,生命体是一个复杂的动态变化网络,对于生命的研究需要从整体出发,研究生命网络中的这些复杂的相互作用和调控关系,而不是仅孤立地研究各个网络中的节点,“相互作用→网络→功能”的研究思路已经被广泛宣传.就非编码 RNA 层次的研究也是如此.各种非编码 RNA 并非孤立地行使着各自的功能,它们之间存在着相互关系和相互作用进而形成非编码 RNA 的复杂调控网络.有研究发现^[4], *miRNA-29a* 可调控 *lncRNA MEG3* (maternally-expressed gene 3) 启动子发生超甲基化,引起肝癌细胞和组织中 *MEG3* 表达下调,从而将 *miRNA* 与 *lncRNA* 联系起来.另一种为人们熟悉的肝癌相关 *lncRNA-H19* 被证实与 *miR-200* 家族有关^[5], *H19* 与蛋白复合物 hnRNP U/PCAF/RNA Pol II (核糖核蛋白 U/组蛋白乙酰化转移酶 PCAF/RNA 聚合酶 II 复合物) 有关联,再通过增强组蛋白乙酰化激活 *miR-200* 家族.这一结果表明, *H19* 可以改变 *miR-200* 路径,从而促进上皮间质转化,抑制肿瘤转移. Yang 等人^[6] 在研究非小细胞肺癌顺铂耐药的实验中,筛选出差异表达的 mRNA 和 ncRNA, 构建了 *lncRNA-miRNA-mRNA* 的网络图,分析表明, mRNA 可以受 *miRNA* 和 *lncRNA* 的共同调控.例如,基因 *BAG1* (BCL2-associated athanogene) 可以被 3 个 *miRNA* 和 3 个 *lncRNA* 同时调控,这也解释了为何一些 *miRNA* 变化,其靶基因未发生相应的变化, *lncRNA* 的作用不可忽视.最近 Augoff 等人^[7] 在乳腺癌实验中发现, *miR-31* 序列与一种新 *lncRNA-LOC554202* 的内含子序列相对应, *miR-31* 的转录活性也受 *LOC554202* 的控制.在基底样亚型的三阴性乳腺癌细胞株中, *miR-31* 和 *LOC554202* 均下调;相反地,在管腔型的乳腺癌细胞株中,两者均表达上调.

不同 RNA 分子组成的调控网络调节着肿瘤细胞编码蛋白的癌基因和抑癌基因的表达,从而参与调节肿瘤细胞的多种生命现象.有关 ncRNA 调控肿瘤在部分交叉研究领域刚刚开展,目前尚缺乏系统和深入的研究.本文以两种不同雌激素受体表型乳腺癌细胞系(MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞)为对象,旨在构建全基因组水平编码-非编码 RNA 调控网络,探讨 ncRNA 和 mRNA 之间的相互作用模式,结合转录调控网络,初筛参与病变进程的关键 RNA 分子,从而揭示不同表型的乳腺肿瘤发生发展过程中

多种 RNA 生物分子的动态表达变化,通过人群验证潜在的跨分子生物标志物的潜在价值,为完善一个多通路、多层次的基因调控网络以解析恶性肿瘤的发生和发展机制奠定基础,为准确地预测、诊断、个体化治疗、预后评价以及新药的设计和研发提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 细胞培养与组织样本的获取

(i) 细胞培养. 以乳腺肿瘤细胞系 MCF-7(ER⁺, estrogen receptor, 雌激素受体阳性)和 MDA-MB-231(ER⁻, 雌激素受体阴性)为研究对象. 乳腺肿瘤细胞系 MCF-7 培养于含 100 μg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素和 10%胎牛血清的 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养液中,于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养;乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 在含 100 μg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素和 10%胎牛血清的 L-15 培养液中,于 37℃普通培养箱中培养.

(ii) 组织样本. ER⁺乳腺癌肿瘤组织样本 24 例, ER⁻乳腺癌肿瘤组织样本 24 例,来自江苏省人民医院的乳腺癌患者,入组患者均为在 2009 年 9 月~2010 年 6 月被诊断为乳腺癌的新发病例,并符合以下要求:有明确的细胞学诊断;手术前未经任何放射治疗、化学治疗及内分泌治疗;手术后有完整的临床及病理资料.该实验的受试者均已签署入组知情同意书,南京医科大学伦理道德委员会审核通过.

1.2 miRNA/lncRNA/mRNA 表达谱的建立

(i) *miRNA* 表达谱. 采用 Trizol 法提取组织或细胞样品的总 RNA,使用 mirVana™ *miRNA* Isolation Kit(AM1561, ABI, 美国)对总 RNA 进行纯化,纯化后重新定量.使用 Agilent 公司(美国)的 *miRNA* Complete Labeling and Hyb Kit 对总 RNA 进行去磷酸化及标记反应,杂交 Agilent Human *miRNA* Microarray Release 16.0 芯片.杂交结束后,使用 Agilent 芯片扫描仪(G2565CA, 美国)对清洗后的芯片进行扫描,得到杂交图片.使用 Agilent Feature Extraction(v10.7, 美国)软件对杂交图片进行分析并提取数据;然后使用 Agilent GeneSpring(美国)软件对数据进行归一化,并进行组间的差异分析,例如, *t* 检验方法进行两组差异表达基因分析,方差分析(analysis of variance,

ANOVA)方法进行多组差异表达基因分析。

(ii) lncRNA+mRNA 表达谱。Trizol 提取组织块或细胞中的总 RNA, 用 NucleoSpin® RNA Clean-up 试剂盒(MACHEREY-NAGEL, 德国)对总 RNA 过柱纯化, 然后进行体外扩增和荧光标记, 标记过程采用晶芯®生物芯片通用标记试剂盒(博奥生物, 北京)杂交晶芯®lncRNA 芯片 V2.0(博奥生物)。清洗后, 芯片用 Agilent G2565CA Microarray Scanner(美国)进行扫描, 得到杂交图片。采用 Feature Extraction 图像分析软件对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号。将原始数据输入 GeneSpring GX 软件中, 采用 percentile shift 方法对信号值进行归一化处理。然后用 Absolute Fold Change ≥ 2 , 同时 Flag 标记为 Detected 的标准进行差异基因筛选。

1.3 qRT-PCR 验证关键 miRNA/lncRNA

(i) miRNA 的 qRT-PCR 验证。采用 Qiagen miRNesay Mini Kit(德国)提取样本中的 RNA, 并使用 SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 试剂盒(TaKaRa, 宝生物工程(大连)有限公司, 大连)转录得到 cDNA, 然后进行 real-time PCR 反应(ABI 7300, 美国)。以 U6 作为内参, $2^{-\Delta Ct}$ 法处理 real-time PCR 的数据, $\Delta Ct = Ct(miRNA) - Ct(内参)$ 。引物设计均基于 miRBase database(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)。扩增步骤为 95℃ 5 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 循环; 分析溶解曲线。每个样本 3 个平行样。

(ii) lncRNA 的 qRT-PCR 验证。采用 TaKaRa SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit(日本), 操作按试剂盒说明书进行。逆转录反应体系如下, 5×PrimeScript™ 缓冲液 2 μ L, PrimeScript™ 逆转录酶 0.5 μ L, Oligo dT 引物(50 μ mol/L) 0.5 μ L, Random 6 mers 引物(100 μ mol/L) 0.5 μ L, RNA 样品 500 ng, 加焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水至 10 μ L。上述试剂混匀后, 37℃ 45 min, 85℃ 5 s 后获得 cDNA, -20℃ 保存备用。PCR 反应采用 TaKaRa StepOne™ 实时定量 PCR 系统(日本)推荐条件进行。采用 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算每个 lncRNA 的相对表达量。

1.4 数据分析

(i) 统计分析。采用非参数检验中的 2 个独立样本检验检测 ER⁺样本和 ER⁻样本 miRNA 表达情况有无统计学差异。P<0.05 表示有统计学差异。统计

软件采用 SPSS(version 16.0)和 GraphPad Prism 5 Demo software(GraphPad software, 美国)。

(ii) 表达差异分析。采用随机方差模型(random variance model, RVM)、差异倍数分析(fold change)、t 检验等进行差异 miRNA 的筛选。

(iii) 聚类分析。把基于相似数据特征的变量或样本组合在一起, 归为一个簇的基因在功能上可能相似或关联, 从而找到未知基因的功能信息或已知基因的未知功能。采用 Cluster 3.0 程序完成 hierarchical clustering 分析, 结果以 TreeView 1.60 程序可视化。

(iv) miRNA 靶基因预测及信号通路分析。应用互联网上 miRNA 靶基因预测软件 mirDB(<http://mirdb.org/miRDB/>), TargetScan(<http://www.targetscan.org/>), Miranda(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)在线服务站点, 输出差异表达 miRNA 的预测靶基因, 取至少 2 个软件预测到的基因作为靶基因。另外, 本实验采用 CapitalBio® Molecule Annotation System V3.0 对靶基因进行 gene ontology(GO)分析并进行生物功能富集。

(v) lncRNA-mRNA 共表达分析。对已筛选出的 MCF-7 组与 MDA-MB-231 组的差异基因, 与芯片数据中差异表达的 mRNA 取交集, 对得到的交集 mRNA 分别进行功能分析和信号通路分析, 找到显著的可靠的基因靶向功能(GO analysis)和信号通路(pathway analysis)。对最后选出的差异 mRNA 和差异 lncRNA 建立共表达关系, 并作出共表达关系网络图。

(vi) miRNA-mRNA-lncRNA 相互作用分析。通过进行差异表达 mRNA 的 GO 分析或者文献寻找感兴趣的 mRNA, 分析与关键 mRNA 有共表达作用的 lncRNA, 作出 lncRNA-mRNA 共表达网络图。将以网络中的关键 mRNA 为靶基因的表达式有差异的 miRNA 加到网络图中, 得到 miRNA-mRNA-lncRNA 相互作用图, 以此预测 miRNA-lncRNA 相互作用对关键 mRNA 的作用, 从而推测 miRNA-mRNA-lncRNA 相互作用对不同雌激素受体表型乳腺肿瘤的影响。具体流程见图 1。

2 结果

2.1 miRNA 表达谱分析

(i) miRNA 的差异表达。经 qRT-PCR 的验证

图 1 芯片数据分析简易流程图

(数据未显示), *miR-141* 和 *miR-200c* 在 MCF-7 细胞中的表达量增高, 与文献[8,9]报道一致, 证明芯片数据可靠. 乳腺癌肿瘤 MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞 miRNA 芯片对比结果(图 2), 根据随机方差模型(RVM)、差异倍数分析 $Fc(\text{fold change}) > 2$ 和 t 检验 $P < 0.05$ 等标准, 筛选出 101 个差异表达 miRNA(36 个上调, 65 个下调), 其中 5 个 miRNA 在 MDA-MB-231 细胞中呈无表达或低表达状态, 而在 MCF-7 细胞中特异性表达; 40 个 miRNA 在 MCF-7 细胞中呈无表达或低表达状态, 在 MDA-MB-231 细胞中呈特异性表达(图 3, 表 S1).

(ii) 差异表达 miRNA 的靶基因分析. 对筛选出的 101 个 miRNA 进行靶基因预测, 分别在预测软件 mirDB, TargetScan, Miranda 的在线服务站点输出差异 miRNA 的靶基因, 取 3 个数据库靶基因交集基因, 共预测到 2070 个 mRNA. 再与 mRNA 芯片数据比较取交集, 共有包括 *ESR1*(estrogen receptor 1)在内的 723 个 mRNA 呈现显著性差异表达.

(iii) *miR-17-92* 簇及其旁系的表达. *miR-17-92* 簇是一个高度保守的基因簇, 编码 *miR-17-5p*, *miR-17-3p*, *miR-18a*, *miR-19a-3p*, *miR-20a*, *miR-19b-3p* 和 *miR-92-3p* 等 7 个 miRNA. *miR-17-92* 基因簇中 miRNA 在多种肿瘤中高表达, 可以作为抑癌基因抑制乳腺癌细胞的增殖^[10]. *miR-17-92* 簇有 2 个旁系同源体, 分别是 *miR-106a-363* 和 *miR-106b-25* 基因簇.

miR-106a-363 基因簇包含 *miR-106a*, *miR-18b*, *miR-20b*, *miR-19b-5p*, *miR-92-5p* 和 *miR-363* 等 6 个 miRNA. *miR-106b-25* 基因簇包含 *miR-106b*, *miR-93* 和 *miR-25*. 在本实验中, *miR-17-92* 基因簇中 *miR-17-5p*, *miR-17-3p*, *miR-19a-3p*, *miR-20a*, *miR-19b-3p* 和 *miR-92-3p* 等 6 个 miRNA 以及 *miR-106a-363* 基因簇中的 *miR-20b* 均在 MCF-7 细胞中呈现低表达, *miR-106b-25* 基因簇中的 3 个 miRNA 在 MCF-7 细胞中明显高表达(图 4, 表 1).

2.2 lncRNA/mRNA 表达谱分析

(i) lncRNA 芯片. 本实验采用博奥生物公司的晶芯芯片 2.0 系统, 该芯片包括 39213 条 lncRNA 序列. lncRNA 序列来源于一些权威的数据库, 如 RefSeq, Ensemble, UCSC 等(表 2).

(ii) lncRNA 的差异表达. MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞芯片结果中, 检测到差异表达的 lncRNA 共 6048 个, 再根据差异倍数分析 $Fc > 2$ 或 $Fc < 0.5$ 、 t 检验 $P < 0.05$ 、与编码基因不匹配、lncRNA 长度 < 2 kb 标准进一步筛选出 451 个差异表达的 lncRNA.

(iii) mRNA 的差异表达. MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞芯片结果中, 检测到差异表达的 mRNA 共 6871 个, 再根据 $Fc > 5$ 或 $Fc < 0.2$, $P < 0.001$ 标准进一步筛选出 1294 个差异表达的 mRNA.

(iv) lncRNA/mRNA 聚类分析. 利用 Cluster 3.0

图 2 miRNA 聚类图

每株细胞 3 个平行样, 以 Cluster 3.0 程序作图。横坐标表示 miRNA 的芯片表达量, 纵坐标代表 miRNA。在聚类图中, 红色代表上调表达的 miRNA, 绿色代表下调表达的 miRNA, 颜色越深表示表达量越高。聚类图显示, miRNA 表达谱在 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞中有显著差别

图3 miRNA 差异表达结果(Venn 图)

以 R 软件的 VennDiagram 程序包作图. 绿色代表在 MDA-MB-231 细胞中呈特异性表达的 miRNA, 蓝色表示在 MCF-7 细胞中呈现特异性表达的 miRNA, 交集代表在两种细胞株中均有差异表达的 miRNA. miRNA 芯片数据分析结果显示, 根据上述标准, 共筛选出 101 个 miRNA 在 2 种细胞株中有差异表达. 其中有 56 个 miRNA 在 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞中均有显著表达. 有 5 个 miRNA 在 MDA-MB-231 细胞中呈无表达或低表达状态, 而在 MCF-7 细胞中特异性表达; 有 40 个 miRNA 在 MCF-7 细胞中呈无表达或低表达状态, 在 MDA-MB-231 细胞中呈特异性表达

图4 miR-17-92 基因簇及其旁系中差异表达的miRNA 聚类图
每株细胞 3 个平行样, 以 Cluster 3.0 程序作聚类图. 横坐标表示 miRNA 的芯片表达量, 纵坐标代表 miRNA. miR-17-92 基因簇中的 miR-17-5p, miR-17-3p, miR-19a-3p, miR-20a, miR-19b-3p 和 miR-92-3p 以及 miR-106a-363 基因簇中的 miR-20b 均在 MCF-7 细胞中呈现低表达, miR-106b-25 基因簇中的 3 个 miRNA 在 MCF-7 细胞中明显高表达

程序作聚类图(图 5(a), (b)), 颜色变化代表各细胞芯片检测数值的变化. 在 Lombaerts 等人^[11]的研究结果显示, MDA-MB-231 细胞同属于成纤维样细胞型, 而 MCF-7 细胞归于上皮样细胞型.

(v) 差异表达 mRNA 的功能分析(GO analysis)和信号通路分析(pathway analysis). 将两组之间的

表1 MCF-7 vs. MDA-MB-231 细胞中 miR-17-92 簇及其旁系的差异表达

miRNA	表达倍数	表达调控
miR-17-5p	2.44	下调
miR-17-3p	3.60	下调
miR-19a-3p	2.62	下调
miR-20a-3p	29.43	下调
miR-20a-5p	2.58	下调
miR-19b-3p	2.86	下调
miR-92a-3p	3.35	下调
miR-20b-5p	3.66	下调
miR-106b-5p	2.58	上调
miR-93-5p	2.81	上调
miR-25-3p	2.61	上调

表2 晶芯 2.0 芯片上 lncRNA 来源

数据库	lncRNA 序列数
imsRNA(2011 年 2 月)	848
RefSeq(2011 年 2 月)	4765
UCSC(2011 年 2 月)	13521
ENSEMBL(2011 年 11 月)	12754
lncRNA From GeneDev(2011 年 11 月)	8195
Hox ncRNAs(2011 年 4 月)	407
lncRNAdb(2011 年 1 月)	78
NRED(2011 年 1 月)	1289
H-InvDB 7.5	17203
CombinedLitV2	529
Antisense ncRNA pipeline(2011 年 1 月)	1053
snoRNA(2011 年 2 月)	389
EvoFold(2011 年 1 月)	47109
RNAzV2(2011 年 1 月)	35827
去除冗余后的序列	39213

差异基因基于 GO(gene ontology)数据库(<http://www.geneontology.org/>)进行基因功能注释, 得到基因参与的所有功能, 而后利用 Fisher 精确检验和多重比较检验计算每个功能的显著性水平(P 值)和误判率(false discovery rate, FDR). 从而筛选出差异基因所体现的显著性功能, 显著性筛选的标准为 $P < 0.05$. 部分结果见表 3.

基于 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>), 对差异基因利用 Fisher 精确检验和卡方检验, 把目标基因参与的通路进行显著性分析, 按照 $P < 0.05$ 进行筛选, 得到显著性的通路. MCF-7 细胞组与 MDA-MB-231 细胞组差异表达基因的通路分析结果见图 6.

从表 3 和图 6 可以发现, MCF-7 细胞 vs. MDA-

图 5 lncRNA 聚类图(a)和 mRNA 聚类图(b)

每株细胞 3 个平行样, 以 Cluster 3.0 程序作聚类图. 横坐标表示 miRNA 的芯片表达量, 纵坐标代表 miRNA. (a), (b) 表明 lncRNA 和 mRNA 表达谱在 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞中均有明显差异. 在筛选出的 451 个差异表达 lncRNA 中, 有 151 个 lncRNA 在 MDA-MB-231 细胞中呈现高表达, 300 个 lncRNA 在 MCF-7 细胞中呈现高表达. 同样, 在筛选出的 1294 个差异表达 mRNA 中, 有 602 个 mRNA 在 MCF-7 细胞中表达量明显高于 MDA-MB-231 细胞

表 3 MCF-7 vs. MDA-MB-231 细胞株差异基因的 GO 分析

基因功能名称	基因计数	P 值	误判率	富集度	表达调控
细胞凋亡过程	654	0.0000	0.0000	3.6081	上调
表皮生长因子信号转导通路	185	0.0000	0.0001	6.3776	上调
细胞凋亡过程中的负调控	484	0.0000	0.0001	3.7674	上调
乳腺腺泡发育	15	0.0000	0.0002	28.6024	上调
细胞增殖的正调控	411	0.0001	0.0007	3.6536	上调
细胞增殖的正调控	411	0.0000	0.0000	6.2005	下调
细胞凋亡过程中的负调控	484	0.0000	0.0000	5.0773	下调
血管生成	201	0.0000	0.0000	6.7921	下调
细胞增殖的调控	108	0.0001	0.0002	6.7418	下调
细胞凋亡的诱导	182	0.0001	0.0002	5.0008	下调

图 6 上调显著性通路(a)和下调显著性通路(b)vs.(-lgP)条形图

基于 KEGG 数据库进行的基因信号通路分析, 对实验中筛选出的差异基因结合双侧 Fisher 精确检验和卡方检验, 按照 $P < 0.05$ 的标准进行筛选, 从而得到差异表达的基因参与的显著信号通路。图中纵轴表示通路名称, 横轴表示相应通路的 $-\lg P$ 值

MB-231 细胞组的差异表达的 mRNA 参与的功能有细胞凋亡、细胞增殖、血管生成和乳腺发育等。上调差异基因参与的显著性信号转导通路包括雌激素信号通路、ErbB(erythroblastic leukemia viral oncogene)信号通路、低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor, HIF-1)信号通路和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路等; 下调差异基因参与的显著性信号转导通路包括丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K-Akt)信号通路、细胞外基质-受体相互作用和 p53 信号通路等。

2.3 miRNA-mRNA-lncRNA 相互作用

用筛选出的差异表达的 lncRNA 和 mRNA 作共表达分析, 主要计算每 2 个基因(lncRNA-lncRNA, lncRNA-mRNA, mRNA-mRNA)之间的相互作用系数(interaction), 该系数表示 2 个基因共表达程度, 绝对值越大表示共表达能力越强, 数值的正负分别表示正调控和负调控, 相关系数的绝对值越接近 1, 相关越密切; 越接近于 0, 相关越不密切. 用于计算相关系数的数据选用芯片归一化后的信号值. 将以共表达网络图中关键基因为靶基因的差异 miRNA 也放入

图中, 根据负相关关系把 miRNA-mRNA 关系导入共表达网络. 图 7(a)和(b)分别显示关键 mRNA-ESR1 在 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞中的 miRNA-mRNA-lncRNA 关系图. 图 7 中六边形小点代表关键基因 ESR1, 紫色圆点表示共表达基因. 环边圆点代表共表达 lncRNA, 其中红色内环圆点表示上调, 紫色内环圆点表示下调. 红色正方形小点表示上调的 miRNA, 紫色正方形小点表示下调的 miRNA. 在 mRNA-mRNA, mRNA-lncRNA 和 lncRNA-lncRNA 关系中, 实线代表正调控, 虚线代表负调控. 基因的大小代表了“度”, 网络中每一个结点代表一个目标基因, 某个节点与周围节点的连接线条越多, 这个节点的“度”也就越大, 其中“度”代表网络中某一节点与周围节点的关系数量. 在图 7 中, 与 ESR1 有共表达关系的 mRNA 有 2 个, 包括有正调控表达(连接线为实线)的 FMNL2(formin-like 2)和 CD74(CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain); 与 ESR1 有共表达关系的 lncRNA 有 3 个, 包括有负调控关系(连接线为虚线)的 uc001ver.2(deleted in lymphocytic leukemia 1, DLEU1)等(表 4). 以 ESR1 为靶基因, 且表达有差异的 miRNA 有 miR-130a-3p, miR-19a-3p, miR-19b-3p 以及 miR-148b-3p 等. 其中 miR-130a-3p, miR-19a-3p 以及 miR-19b-3p 在 MCF-7

图 7 *ESR1* 在 MCF-7 细胞(a)和 MDA-MB-231 细胞(b)中的 miRNA-mRNA-lncRNA 关系图

根据芯片数据计算每两个基因之间的 Pearson 相关系数, 挑选系数大于 0.99 的基因对作共表达网络图, 此图用 Cytoscape 软件作成。(a)和(b)分别表示在 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞中, 以基因 *ESR1* 为中心的 miRNA-mRNA-lncRNA 网络图。图中圆点表示 mRNA, 环边圆点代表 lncRNA, 正方形代表以 *ESR1* 为靶基因的差异表达 miRNA。其中红色表示在芯片数据中表达显著上调, 紫色为下调。基因之间的实线和虚线分别表示正调控和负调控。基因节点的大小显示了基因在整个网络中的度, 节点越大, 表示与其有相关关系的基因越多。

表4 与 *ESR1* 有共表达关系的 mRNA/lncRNA(MCF-7 细胞)

mRNA	mRNA/lncRNA	互作
<i>ESR1</i>	XLOC_002797	-0.999992381
<i>ESR1</i>	uc001ver.2	-0.999989273
<i>ESR1</i>	NR_037174	-0.999980388
<i>ESR1</i>	<i>FMNL2</i>	0.999954187
<i>ESR1</i>	<i>CD74</i>	0.999993841

细胞中表达明显下调, 标注为紫色; *miR-148b-3p* 在 MCF-7 细胞中表达明显上调, 标注为红色。

3 讨论

3.1 miRNA 表达谱

本实验 miRNA 芯片结果与国内外相关文献比较, 基本一致. 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中, *miR-205-5p*, *miR-3944-5p*, *miR-31-5p*, *miR-31-3p*, *miR-205-3p*, *miR-9-3p* 和 *miR-582-5p* 表达显著下调. Sempere 等人^[12]用原位杂交的方法检测了乳腺组织中 *miR-205* 的表达情况, 发现 *miR-205* 只在正常的肌上皮细胞中表达, 而在乳腺癌患者组织病变区的肌上皮细胞中表达显著下调甚至消失. Valastyan 等人^[13]在动物实验中发现, *miR-31* 可通过调控 *RhoA* 等 3 个靶基因表达来抑制乳腺癌细胞的侵袭与转移. 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 *miR-454-3p* 表达显著上调, *miR-454-3p* 已证实与多发性硬化症、舒张功能障碍、结肠癌等病变有关^[14-16], 其在乳腺癌发生发展中的生物学功能有待进一步的研究.

本实验采用的人乳腺癌 MDA-MB-231 属于高转移性恶性乳腺癌细胞系, 为雌激素受体阴性(ER⁻), MCF-7 为原位 ER 阳性(ER⁺)乳腺癌细胞系, 恶性程度较 MDA-MB-231 低. 实验结果表明, 2 种不同雌激素受体表型乳腺癌细胞中 miRNA 表达谱有差异. 与 MCF-7 细胞相比, *miR-141-3p* 和 *miR-200c-3p* 等在 MDA-MB-231 细胞中表达显著下调. *miR-141-3p* 和 *miR-200c-3p* 同属 *miR-200* 家族, Hurteau 等人^[17]结合 qRT-PCR 及生物信息学方法鉴定出 *miR-200c* 可能作用于 *TCF8*(transcription factor 8, 又名 *δEF1*, *ZEB1*, *Nil-2-A*, 是 E-钙黏着蛋白(E-cadherin)的转录抑制剂), 他们通过在缺乏内源 *miR-200c* 和 E-cadherin 的 MDA-MB-231(ER⁻)细胞中过表达 *miR-200c*, 发现 *miR-200c* 的表达能够降低 *TCF8* 的水平, 同时恢复 E-cadherin 表达, 并且改变了细胞形态. 文献[18]表

明, *miR-200* 家族(如 *miR-141* 和 *miR-200c*)可通过作用于肿瘤侵袭转移相关因子 *ZEB1*(zinc finger E-box binding homeobox 1) 和 *ZEB2*(zinc finger E-box binding homeobox 2, 又名 *SIP1*)来调节上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 从而发挥抑制肿瘤侵袭与转移的功能. 与 MDA-MB-231 细胞相比, *miR-130a-3p*, *miR-221* 和 *miR-222* 等在 MCF-7 细胞中表达下调. 崔秀英等人^[19]通过 miRNA 芯片和 RT-PCR 的方法比较阿霉素耐药细胞株 MCF-7/ADR 与其对应的 MCF-7 乳腺癌细胞株 miRNA 表达差异, 结果发现, *miR-221*, *miR-222* 和 *miR-130a* 等在 MCF-7/ADR 中显著上调, 在 MCF-7 细胞中表达下调. le Sage 等人^[20]发现, *miR-221* 和 *miR-222* 可以调控肿瘤抑制因子 p27/Kip1 以促进肿瘤细胞的增殖. Chen 和 Gorski^[21]认为, *miR-130a* 通过调控其靶基因 *GAX*(又名 *MEOX2*, mesenchyme homeobox 2) 和 *HOXA5* (homeobox A5)的表达来调控肿瘤血管的生成从而调节肿瘤的生长. Lehmann 等人^[22]在 71 例原发性乳腺癌患者样本中发现了包括 *miR-148* 在内的多个 miRNA 超甲基化异常, 这种表观遗传失活在乳腺癌发生发展中起到重要作用. 随后 Cuk 等人^[23]在实验中发现, *miR-148b* 在乳腺肿瘤患者的血浆中表达量明显上调, 提示 *miR-148b* 等可作为早期乳腺癌的检测标志.

实验中有部分结果与国内外文献结果不一致, 其原因可能是细胞与组织的差异, 不同基因芯片数据库版本中所包含的探针数目也有差异. 实验中发现多数筛选出的差异显著的 miRNA 在国内外研究甚少, 今后可着重研究它们在乳腺癌发生发展的生物学功能.

3.2 miRNA-mRNA-lncRNA 相互作用

本实验中 *miR-17-92* 簇在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中的表达明显异常. 本实验着重研究了其中以 mRNA-*ESR1* 为靶基因的 *miR-19a-3p* 和 *miR-19b-3p*, 统计学结果表明, 它们在 ER⁺和 ER⁻的组织中表达差异显著(图 8(a), (b)). 同时, 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中均与 *ESR1* 有较强的共表达关系的 lncRNA-*DLEU1* 引起了关注. *DLEU1* 在乳腺肿瘤雌激素受体表型不同的 2 种细胞中的表达也有统计学意义上的差异(图 9). *miR-19a*, *miR-19b* 和 lncRNA-*DLEU1* 均在人类第 13 号染色体上, 而 *DLEU1* 已被

图8 *miR-19a-3p*(a)和*miR-19b-3p*(b)在ER⁺和ER⁻组织中的差异表达

在24个乳腺癌病人的ER⁺和ER⁻肿瘤组织中,采用real-time PCR测定miRNA的表达,以U6为内参,以GraphPad Prism 5作图.其中的横线代表中位数,上下2根界线分别代表75%和25%分位数. miRNA表达谱分析结果表明,*miR-19a-3p*和*miR-19b-3p*均在MDA-MB-231细胞(ER⁻)中呈现高表达. (a), (b)表示在ER⁺和ER⁻组织中,*miR-19a-3p*和*miR-19b-3p*的表达也有差异,两者均在MDA-MB-231细胞(ER⁻)中呈现高表达,且在ER⁻组织中的表达量高于在ER⁺组织中的表达量($P=0.0202$, $P<0.0001$). 此结果与细胞结果一致

图9 *lncRNA-DLEU1*在MCF-7和MDA-MB-231细胞中的差异表达

将*DLEU1*的芯片表达数据作负对数变换,以GraphPad Prism 5作柱状图. *lncRNA-DLEU1*的表达量在MCF-7和MDA-MB-231细胞中有明显的差异,且*DLEU1*在MDA-MB-231细胞中的表达量相对较高($P<0.05$)

证实在慢性淋巴细胞白血病的分子机制中有极其重要的功能^[24]. 通过DNA甲基化和组蛋白修饰等作用,*lncRNA-DLEU1*等调控13q14.3上的一系列基因的表达,最终发挥抑癌的功能. 推测miRNA与

lncRNA共同作用影响靶基因*ESR1*的表达,从而引起ER信号通路的变化,在乳腺肿瘤的发生发展中起到重要的作用. 其中的复杂机制还有待后续的实验证实.

4 结语

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤之一,包括激素依赖型和激素非依赖型. 正常乳腺上皮细胞中雌激素受体(estrogen receptor, ER)信号通路,引发基因组和非基因组效应以调控乳腺生长、发育和细胞凋亡. 当ER信号通路失调,可导致相关基因表达失衡或改变胞质内蛋白功能,促使乳腺细胞过度增殖或乳腺细胞凋亡受阻,从而导致乳腺癌的发生;另一方面可促使乳腺癌由雌激素依赖型向雌激素非依赖型转化并造成治疗抵抗. 深入研究*miR-19a*以及*miR-19b*与*lncRNA-DLEU1*的相互作用机制对揭示乳腺癌的发病机理以及寻找更有效的乳腺癌治疗药物有重要意义.

参考文献

- 1 Imanishi T, Itoh T, Suzuki Y, et al. Integrative annotation of 21037 human genes validated by full-length cDNA clones. PLoS Biol, 2004, 2: e162
- 2 Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. Science, 2007, 316: 1484-1488
- 3 Xiao Y F, Yong X, Fan Y H, et al. microRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: Novel tools for cancer screening (Review). Oncol Rep, 2013, 30: 535-544
- 4 Braconi C, Kogure T, Valeri N, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene *MEG3* in hepatocellular cancer. Oncogene, 2011, 30: 4750-4756

- 5 Zhang L, Yang F, Yuan J, et al. Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 2013, 34: 577–586
- 6 Yang Y, Li H, Hou S, et al. The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA AK126698 on cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell. *PLoS One*, 2013, 8: e65309
- 7 Augoff K, McCue B, Plow E F, et al. miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer*, 2012, 11: 5
- 8 Neves R, Scheel C, Weinhold S, et al. Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC Res Notes*, 2010, 3: 219
- 9 Chen L, Li Y, Fu Y, et al. Role of deregulated microRNAs in breast cancer progression using FFPE tissue. *PLoS One*, 2013, 8: e54213
- 10 Hossain A, Kuo M T, Saunders G F. miR-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 8191–8201
- 11 Lombaerts M, Van Wezel T, Philippo K, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Brist J Cancer*, 2006, 94: 661–671
- 12 Sempere L F, Christensen M, Silahatoglu A, et al. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res*, 2007, 67: 11612–11620
- 13 Valastyan S, Benaich N, Chang A, et al. Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. *Gene Dev*, 2009, 23: 2592–2597
- 14 Gandhi R, Healy B, Gholipour T, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 2013, 73: 729–740
- 15 Nair N, Kumar S, Gongora E, et al. Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol Cell Biochem*, 2012, 1–8
- 16 Chang K H, Mestdagh P, Vandesompele J, et al. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2010, 10: 173
- 17 Hurteau G J, Carlson J A, Spivack S D, et al. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res*, 2007, 67: 7972–7976
- 18 Gregory P A, Bert A G, Paterson E L, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 593–601
- 19 崔秀英, 郭运杰, 姚和瑞. 耐药乳腺癌细胞株 MCF-7/ADR 中 microRNA 的分析. *南方医科大学学报*, 2008, 28: 1813–1815
- 20 le Sage C, Nagel R, Egan D A, et al. Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *Embo J*, 2007, 26: 3699–3708
- 21 Chen Y, Gorski D H. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood*, 2008, 111: 1217–1226
- 22 Lehmann U, Hasemeier B, Römermann D, et al. Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma. *Verhandlungen Deutschen Gesellschaft Pathologie (in German)*, 2006, 91: 214–220
- 23 Cuk K, Zucknick M, Heil J, et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer*, 2012, 132: 1602–1612
- 24 Garding A, Bhattacharya N, Claus R, et al. Epigenetic upregulation of lncRNAs at 13q14.3 in leukemia is linked to the in *cis* downregulation of a gene cluster that targets NF-κB. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003373

Expression pattern of mRNA and non-coding RNA in ER⁺ and ER⁻ breast cancer cells

CAI JingJing¹, YANG Sheng², ZHANG Hui², GUO Li², CHEN Feng² & WU Qian¹

¹ Department of Hygienic Analysis and Detection, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China;

² Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

The miRNA, lncRNA and mRNA expression profiles of MCF-7 (ER⁺) and MDA-MB-231 (ER⁻) cells were obtained using microarray technology. Expression profiling and target prediction of miRNA was performed. Bioinformatic analysis of lncRNA and mRNA was undertaken using gene ontology (GO) and pathway analysis. The same mRNAs from the predicted target mRNAs and aberrantly expressed mRNAs were intersected. A co-expression network was built using the co-expression relationship of selected mRNAs and lncRNAs, and the selected miRNA-mRNA network was added to enable the key interaction among miRNA-mRNA-lncRNA to be identified from the network. Results showed that the mRNA and ncRNA expression profiles in cells with different estrogen receptor phenotypes were aberrantly distinct. Among the aberrantly expressed miRNAs, the expression of *miR-19a-3p*, *miR-19b-3p* and so on was much lower in MCF-7 cells, while the expression of *miR-148b-3p* was much higher. The analysis of the predicted target genes showed that *ESR1* is the target gene of *miR-19a-3p* and *miR-19b-3p*. Among the aberrantly expressed lncRNAs, *uc001vet.1* (*DLEU1*, Fc=15.44) and *uc001ver.2* (*DLEU1*, Fc=4.13) were significantly upregulated in MCF-7 cells. Statistical analysis revealed that there was a co-expression relationship between *ESR1* and *uc001vet.1* and *uc001ver.2*. *miR-19a*, *miR-19b* and *DLEU1* are all located on 13q; we speculated that *miR-19a* and *miR-19b* might interact with *DLEU1* and that this interaction might affect the expression of *ESR1*. We concluded that miRNA-mRNA-lncRNA interactions might have an impact on the occurrence and development of breast cancer cells with different estrogen receptor expression. In breast cancer cells, estrogen receptor may be co-regulated by both miRNA and lncRNA.

miRNA, lncRNA, mRNA, estrogen receptor, breast cancer

doi: 10.1360/972013-986

补充材料

表 S1 差异表达的 miRNA(MCF-7 vs. MDA-MB-231)

本文以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

表 S1 差异表达的 miRNA(MCF-7 vs. MDA-MB-231)

miRNA	表达倍数的 log ₂ 值	表达调控
<i>miR-141-3p</i>	13.39	上调
<i>miR-200c-3p</i>	12.83	上调
<i>miR-195-5p</i>	9.07	上调
<i>miR-203</i>	8.85	上调
<i>miR-328</i>	6.85	上调
<i>miR-342-3p</i>	5.14	上调
<i>miR-34a-5p</i>	4.87	上调
<i>miR-183-5p</i>	4.80	上调
<i>miR-429</i>	4.45	上调
<i>miR-1260b</i>	3.72	上调
<i>miR-193b-3p</i>	3.46	上调
<i>miR-301a-3p</i>	3.28	上调
<i>miR-96-5p</i>	3.08	上调
<i>let-7b-3p</i>	2.79	上调
<i>miR-149-5p</i>	2.77	上调
<i>miR-454-3p</i>	2.51	上调
<i>miR-7-5p</i>	2.27	上调
<i>miR-21-3p</i>	2.19	上调
<i>miR-374b-5p</i>	2.08	上调
<i>miR-130a-3p</i>	11.98	下调
<i>miR-146a-5p</i>	11.34	下调
<i>miR-222-3p</i>	10.59	下调
<i>miR-3934</i>	9.79	下调
<i>miR-30a-3p</i>	9.64	下调
<i>miR-224-5p</i>	9.27	下调
<i>miR-138-5p</i>	8.93	下调
<i>miR-3138</i>	8.85	下调
<i>miR-221-5p</i>	8.65	下调
<i>miR-4655-5p</i>	8.39	下调
<i>miR-100-5p</i>	7.91	下调
<i>miR-221-3p</i>	7.91	下调
<i>miR-30e-3p</i>	7.75	下调
<i>miR-455-3p</i>	7.44	下调
<i>miR-29b-1-5p</i>	7.14	下调
<i>miR-30c-2-3p</i>	7.01	下调
<i>miR-181a-3p</i>	6.87	下调
<i>miR-3132</i>	6.84	下调
<i>miR-3135b</i>	6.76	下调
<i>miR-4466</i>	6.30	下调
<i>miR-4430</i>	6.30	下调
<i>miR-30a-5p</i>	6.26	下调
<i>miR-135b-5p</i>	6.26	下调
<i>miR-3656</i>	6.26	下调
<i>miR-1202</i>	6.23	下调
<i>miR-22-5p</i>	6.19	下调
<i>miR-584-5p</i>	6.09	下调

miRNA	表达倍数的 $\log_2$ 值	表达调控
<i>miR-5001-5p</i>	6.06	下调
<i>miR-3125</i>	6.02	下调
<i>miR-34c-5p</i>	6.01	下调
<i>miR-3926</i>	5.95	下调
<i>miR-222-5p</i>	5.95	下调
<i>miR-4521</i>	5.74	下调
<i>miR-100-3p</i>	5.63	下调
<i>miR-4428</i>	5.46	下调
<i>miR-125b-5p</i>	5.33	下调
<i>miR-455-5p</i>	5.20	下调
<i>miR-29a-3p</i>	5.20	下调
<i>miR-142-3p</i>	5.18	下调
<i>miR-3679-5p</i>	5.12	下调
<i>miR-2392</i>	5.03	下调
<i>miR-572</i>	5.02	下调
<i>miR-20a-3p</i>	4.88	下调
<i>miR-150-3p</i>	4.83	下调
<i>miR-181a-2-3p</i>	4.78	下调
<i>miR-29b-3p</i>	4.39	下调
<i>miR-10a-5p</i>	2.84	下调
<i>miR-30c-5p</i>	2.23	下调