

文章编号 1006-8147(2019)02-0119-05

论 著

## MiR-199a-3p 在胰腺癌中的表达水平及生物信息学分析

余冬,冯霜,李俊,孙晋津

(天津医科大学第二医院肝胆胰外科,天津 300211)

**摘要** 目的:探讨 miR-199a-3p 在胰腺癌中的表达水平及作为胰腺癌的诊断指标的意义,并进行生物信息学分析。方法:从 GEO 数据库收集胰腺癌和正常胰腺组织中 miR-199a-3p 的数据。汇总数据绘制受试者工作特征曲线,进行 Meta 分析,采用生物信息学方法预测 miR-199a-3p 的靶基因,并对靶基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。结果:收集到 6 个 GEO 数据,4 个数据的 ROC 曲线表现出显著的诊断意义,Meta 分析结果显示 miR-199a-3p 在胰腺癌中表达水平高于正常胰腺组织,差异有统计学意义( $P<0.001$ )。预测到 221 个 miR-199a-3p 潜在的靶基因,其功能主要富集在基因表达的调控,细胞代谢的调控,蛋白质域特异性结合等生物学过程( $P<0.001$ ),KEGG 分析结果显示主要集中在 PI3K-Akt 通路、黏着斑、肌动蛋白细胞骨架调控、癌症通路、Hippo 通路、鞘脂通路、ErbB 通路、MAPK 通路等通路( $P<0.05$ )。结论:相比正常胰腺组织,miR-199a-3p 在胰腺癌中为高表达,可作为胰腺癌的一个潜在诊断指标,并可能在胰腺癌的发生发展中起到重要作用,为胰腺癌的研究和治疗提供了新的方向。

**关键词** miR-199a-3p;胰腺癌;生物信息学

中图分类号 R735.9

文献标志码 A

### The expression of miR-199a-3p in pancreatic cancer and bioinformatics analysis

YU Dong, FENG Shuang, LI Jun, SUN Jin-jin

(Department of Hepatobiliary and pancreatic surgery Surgery, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate miR-199a-3p's expression levels and diagnostic value in pancreatic cancer, and to conduct bioinformatics analysis. **Methods:** We gathered miR-199a-3p expression data of pancreatic cancer and normal pancreatic tissues by analysis of a public dataset from Gene Expression Omnibus (GEO) databases. We plotted ROC curve and conducted Meta-analysis using all collected data. Furthermore, the bioinformatics analysis of miR-199a-3p involved target prediction analysis, gene ontology enrichment and KEGG pathway enrichment. **Results:** A total of six GEO data were finally collected in this study, four of these data showed significant diagnostic value by conducting ROC curve, and Meta-analysis indicated that miR-199a-3p expression was significantly higher in pancreatic cancer by GEO data compared with normal pancreatic tissue ( $P<0.001$ ). The 221 target genes were predicted as potential target genes for miR-199a-3p. The function of target genes was mostly enriched in the regulation of cell metabolism, regulation of gene expression, protein domain specific binding and other biological processes( $P<0.001$ ). KEGG analysis was mostly observed in enrichment pathway, such as PI3K-Akt signaling pathway, focal adhesion, actin cytoskeleton regulation, cancer pathway, Hippo signaling pathway, sphingolipid signaling pathways, ErbB signaling pathway, MAPK signaling pathway and other Signal pathways( $P<0.05$ ). **Conclusion:** MiR-199a-3p expression is significantly higher in pancreatic cancer compared with normal pancreatic tissues. It can be used as a potential diagnostic biomarker of pancreatic cancer, and it may play a vital role in the development of pancreatic cancer. Meanwhile, it could provide a research direction for the treatment of pancreatic cancer in the future.

**Key words** miR-199a-3p; pancreatic cancer; Bioinformatics

胰腺癌是一种高致死率的疾病,恶性程度高,早期诊断困难,手术切除率低,对放化疗不敏感,容易复发和远处转移,预后极差<sup>[1]</sup>。近年来,由于癌症的早期发现和治疗方案的改善,大多数常见恶性肿瘤的5年生存率有所升高,但胰腺癌的生存率未见明显改善,其5年生存率仅为8%<sup>[2]</sup>。因此寻求新的诊断及治疗策略以达到早发现、早诊断、早治疗的目的尤为迫切。microRNA(miRNA)是一类长度约为

22个核苷酸(nt)的非编码单链小RNA分子,在细胞内由70~80nt的单链RNA前体经Dicer酶剪切加工而来。miRNA可以调节基因的表达,在肿瘤的发生和抑制、肿瘤的诊断和结局发挥重要作用<sup>[3]</sup>。有研究表明miR-199a-3p参与卵巢癌<sup>[4]</sup>、肝癌<sup>[5]</sup>、骨肉瘤<sup>[6]</sup>、结直肠癌<sup>[7]</sup>等多种癌症的发生和发展。然而,关于miR-199a-3p在胰腺腺癌中的研究及作用机制却鲜有报道,其相关的作用机制仍有待明确和解决。GEO(Gene Expression Omnibus)数据库是目前最大的完全公开的基因表达数据库,包括大量的基因微

作者简介 余冬(1993-),男,硕士在读,研究方向:普通外科;通信作者:孙晋津, E-mail: sun.jinjin@126.com。

阵列和各种形式的高通量基因测序数据,并且可供自由下载和研究分析<sup>[8]</sup>。本研究基于 GEO 数据库的 miRNA 的测序数据,综合各个生物信息学分析软件,利用相关统计学方法,研究胰腺癌中的 miR-199a-3p 表达水平及其生物学功能。

## 1 资料和方法

**1.1 数据资料及纳入和排除标准** 从 GEO 数据库 (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载胰腺癌的 miRNA 数据,在 GEO 数据库使用如下关键字进行检索: (pancreas OR pancreatic) AND (cancer OR carcinoma OR tumor OR neoplasm\* OR malignant\* OR adenocarcinoma) AND (microRNA OR miRNA OR "micro RNA")。芯片数据的纳入标准: (1) 所测为人的胰腺癌样本,包括非编码 RNA 芯片数据; (2) 有正常对照(包括正常胰腺组织或癌旁组织),至少超过 2 例; (3) 芯片数据可以用来计算和对比。排除标准: (1) 数据中无 miR-199a-3p 相关可用的数据; (2) 样本为血液的; (3) 样本是胰腺癌细胞系的; (4) 数据中不只有人的样本; (5) 样本有药物等其他因素的干扰。

**1.2 数据处理和统计学方法** 采用 SPSS17.0 对数据进行分析, miR-199a-3p 表达数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, student' *T* 用于两独立样本的检验, ROC 曲线用于检验 miR-199a-3p 数据的诊断价值; review manager

5.3 进行 Meta 分析, 卡方检验和  $I^2$  检验用于数据的异质性检验,  $P < 0.05$  或  $I^2 > 50\%$  表示有显著异质性, 并且应用随机效应模型, 否则, 选择固定效果模型。森林图用于检验数据的偏移,  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

**1.3 miR-199a-3p 生物信息学分析** 用 7 个基因预测平台, 包括 TargetScan<sup>[9]</sup>、MirDB<sup>[10]</sup>、DIANA microT<sup>[11]</sup>、miRWalk<sup>[12]</sup>、PITA<sup>[13]</sup>、RNA22<sup>[14]</sup> and NBmiRTar<sup>[15]</sup> 预测 miR-199a-3p 的靶基因。所预测的全部靶基因取其交集, 至少被 4 个平台同时预测到的基因纳入潜在的靶基因。对全部潜在的靶基因利用 DAVID 在线分析工具<sup>[16]</sup>对 GO 功能和 KEGG 通路进行富集分析。

## 2 结果

**2.1 数据收集** GEO 数据库最终收集到 6 个胰腺癌的 miR-199a-3p 表达数据, 分别是 GSE24279、GSE32678、GSE41372、GSE43796、GSE60978、GSE71533, 6 个 GEO 数据的信息如图 1 所示, GSE24279、GSE41372、GSE60978、GSE71533 数据中胰腺癌的 miR-199a-3p 表达水平的平均值都高于正常胰腺组织, 且差异有统计学意义 ( $P$  值分别是  $P < 0.001$ 、 $P = 0.003$ 、 $P = 0.001$ 、 $P < 0.001$ )。从 ROC 曲线可以看出, GSE24279、GSE41372、GSE60978、GSE71533 数据中胰腺癌表现出具有显著意义的诊断价值, 对应的受试者工作特征曲线如图 2 所示。

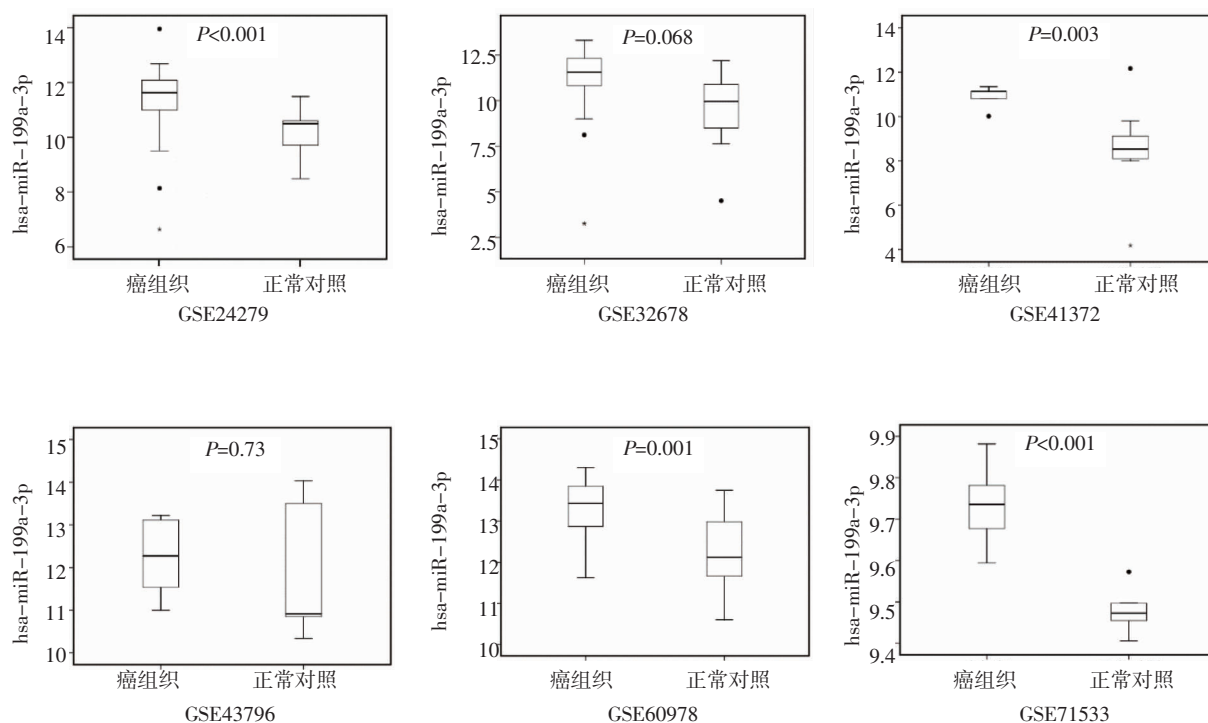


图 1 6 个 GEO 数据库中 miR-199a-3p 在胰腺癌和正常对照中的表达水平

Fig 1 Expression of miR-199a-3p in pancreatic cancer and normal pancreatic tissues in six GEO databases

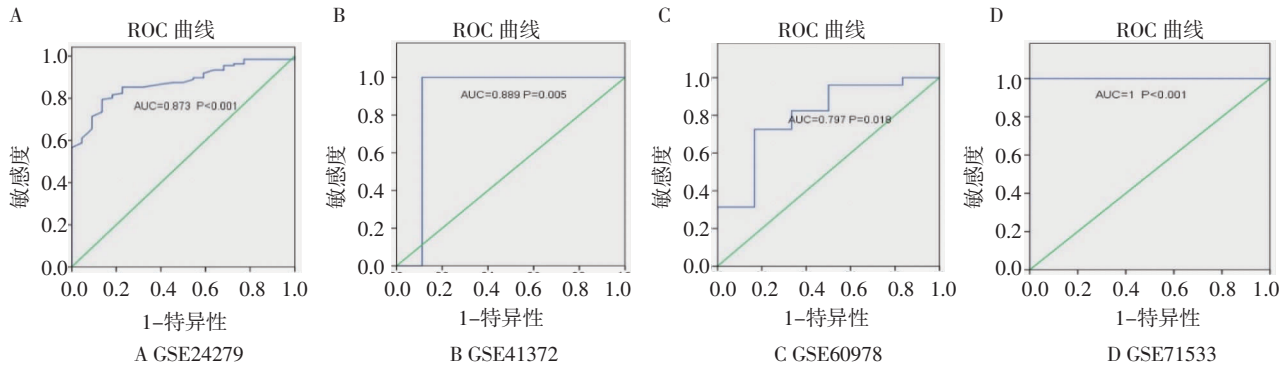


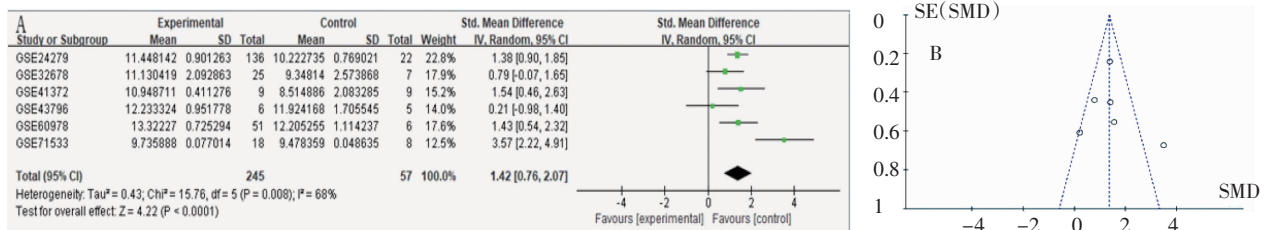
图 2 4 个 GEO 数据中胰腺癌的 miR-199a-3p 的 ROC 曲线

Fig 2 The ROC curve of miR-199a-3p in pancreatic cancer in four GEO databases.

2.2 Meta 分析结果 6 个数据库中胰腺癌 miR-199a-3p 的表达数据进行 meta 分析, 异质性检验显示  $P<0.05$  或  $I^2>50\%$ , 应用随机效应模型, SMD(标准均数差)为 1.36(95%CI:1.03–1.69,  $P<0.001$ ), Meta 分析显示胰腺癌和正常胰腺组织的 miR-199a-3p 的表达水平有差异, 差异有统计学意义。数据分析结果、森林图、漏斗图如图 3 所示。

2.3 生物信息学分析结果 预测 221 个 miR-199a-3p

潜在的靶基因。GO 功能富集分析表明靶基因的功能主要富集在基因表达的调节, 细胞代谢的调节, 蛋白质域特异性结合等生物学过程 ( $P<0.001$ )。KEGG 通路富集分析结果显示主要富集在 PI3K-Akt 通路、黏着斑、肌动蛋白细胞骨架调控、癌症通路、Hippo 通路、鞘脂通路、ErbB 通路、MAPK 通路等通路 ( $P<0.05$ )。各项预测结果的前 10 项如表 1 所示。



A 图中是 6 组 GEO 数据的信息, 异质性检验显示存在异质性, 应用随机效应模型, SMD 和 95%CI 用于结果的评估

图 3 胰腺癌和正常胰腺组织之间的 miR-199a-3p 表达水平的组合 SMD 的森林图 (A) 和漏斗图 (B)

Fig 3 Forest plot (A) and funnel plot (B) of the combined SMD for miR-199a-3p expression between pancreatic cancer and normal pancreatic tissues

表 1 GO 富集分析和 KEGG 信号转导通路富集分析结果各项预测的前 10 项

Tab 1 Ten results most strongly enriched by GO analysis and KEGG pathways analysis

分析结果	数目	P	分析结果	数目	P
BP-代谢过程的正调控	68	9.60E-08	MF-蛋白质域特异性结合	25	2.36E-07
BP-神经系统发育	54	1.32E-07	MF-大分子复合物结合	35	8.22E-06
BP-大分子代谢过程的负调控	55	5.05E-07	MF-调节区核酸结合	27	8.24E-06
BP-基因表达的正调控	44	1.00E-06	MF-转录调节区 DNA 结合	26	2.24E-05
BP-代谢过程的负调控	57	1.22E-06	MF-调节区 DNA 结合	26	2.38E-05
BP-大分子代谢过程的正调控	62	1.26E-06	MF-转录因子活性, 特异性序列 DNA 结合	32	4.17E-05
BP-细胞代谢过程的负调控	54	1.54E-06	MF-核酸结合转录因子活性	32	4.24E-05
BP-基因表达的负调控	40	1.62E-06	MF-转录共抑制活性	12	7.57E-05
BP-细胞分化的调控	41	1.62E-06	MF-RNA 聚合酶 II 调节区特异性序列 DNA 结合	20	8.72E-05
BP-神经发育的调节	25	1.82E-06	MF-RNA 聚合酶 II 调节区 DNA 结合	20	9.31E-05
CC-核质	59	5.76E-04	PATHWAY-PI3K-Akt 信号通路	16	7.15E-05
CC-兴奋性突触	8	0.014 276	PATHWAY-黏着斑	10	0.002 146
CC-突触	18	0.018 691	PATHWAY-肌动蛋白细胞骨架调控	10	0.002 526
CC-核染色质	10	0.021 961	PATHWAY-癌症通路	14	0.002 889
CC-突触后	11	0.024 637	PATHWAY-Hippo 信号通路	8	0.004 865
CC-神经元投影	21	0.025 228	PATHWAY-鞘脂信号通路	7	0.006 296
CC-细胞外基质成分	6	0.025 413	PATHWAY-ErbB 信号通路	6	0.007 022
CC-受体复合物	10	0.027 091	PATHWAY-ECM-受体相互作用	6	0.007 022
CC-突触后特化	7	0.032 495	PATHWAY-MAPK 信号通路	10	0.008 684
CC-突触后密度	7	0.032 495	PATHWAY-心肌细胞中的肾上腺素能信号传导	7	0.015 689

BP:生物学过程, CC:细胞组分, MF:分子功能, PATHWAY:信号通路



### 3 讨论

目前 miRNA 是各个疾病和肿瘤的基因调控中重要组成部分,广泛参与生物体内的信号通路的调控及生物学行为。已经有越来越多的研究指出 miR-199a-3p 在各个癌症中基因表达、分子调控等方面都发挥着重要的作用。Kinose 等<sup>[17]</sup>发现在卵巢癌中 miR-199a-3p 的靶基因为 MET,并可通过降低 c-Met 的表达来抑制卵巢癌的进展,有望成为治疗卵巢癌播散的潜在靶标。Huang 等<sup>[18]</sup>得出 miR-199a-3p 在肾癌中下调,其可抑制细胞增殖,且可抑制 c-Met 及其下游信号通路的表达。在结直肠癌中,Han 等<sup>[19]</sup>证明 NLK 是 miR-199a-3p 一个靶基因,NLK 的表达抑制结直肠癌细胞的生物学行为。在骨肉瘤中,Tian 等<sup>[20]</sup>发现 miR-199a-3p 呈低表达,通过下调 AXL mRNA 和蛋白质的表达而负向促进骨肉瘤的进展,且和 AKT 途径调节骨肉瘤的进展相关。Koshizuka 等<sup>[21]</sup>证明在头颈部肿瘤中 miR-199a-3p 靶向调节 ITGA3 来抑制肿瘤细胞的迁移和进展。在上述的肿瘤中 miR-199a-3p 调控相应的靶基因和信号通路并发挥着抑癌作用。而关于胰腺癌中 miR-199a-3p 的表达情况和作用机制的研究少见文献报道,仅有少部分对胰腺癌中 miRNA 的研究中有提及 miR-199a-3p。国外有研究对 5 例胰腺癌和 5 例正常胰腺组织进行 miRNA 微阵列研究,结果分析显示胰腺癌中 miR-199a-3p 表达水平相比于正常胰腺组织呈上调<sup>[22]</sup>。值得注意的是在另一项研究中,通过 65 例胰腺癌和相应的正常胰腺组织行 miRNA 微阵列研究,得到相同的研究结果<sup>[23]</sup>。然而在国内的一项研究中,利用 miRNA 芯片技术筛选胰腺癌差异 miRNA 表达谱时,得出胰腺癌中 miR-199a-3p 呈下调,但正常胰腺与胰腺癌之间表达差异无统计学意义<sup>[24]</sup>。因此 miR-199a-3p 在胰腺癌中的表达尚不确切。另一方面,仅有检索到两篇文献有报道 miR-199a-3p 在胰腺癌的作用机制。其中之一发现在胰腺肿瘤中 miR-199a-3p 主要调节胰腺星状细胞的活化与促肿瘤效应,miR-199a-3p 可作为靶向治疗的潜在靶点<sup>[25]</sup>。另一篇研究表明基因型的变异可干扰 miR-199a/HIF1A 调节环的调节来改变胰腺癌的风险和预后<sup>[26]</sup>。从目前的研究现状来看,miR-199a-3p 在胰腺癌中的表达情况和机制仍未完全阐明,仍需进一步深入的研究。

本研究中,通过筛选并比较 GEO 数据库中胰腺癌和正常胰腺组织中 miR-199a-3p 的表达水平,综合多组 GEO 数据并进行 Meta 分析,发现胰腺癌中 miR-199a-3p 的表达水平高于正常组织,差异有

统计学意义( $P<0.001$ ),4 项数据的 ROC 曲线表明 miR-199a-3p 有着一定的诊断价值,可能成为一种新的诊断指标,为胰腺癌的早期诊断提供方向。miRNA 主要与靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-UTR)互补配对,调节靶基因 mRNA 降解和蛋白合成,从而调控转录后靶基因的表达水平,最终影响细胞增殖、分化和凋亡等功能。基因调控是一个复杂的网络,利用生物信息学分析 miR-199a-3p 与其相关的靶基因,并探索靶基因的作用,以进一步了解 miR-199a-3p 的功能。本研究综合数个靶基因预测平台,更广泛的收集预测到靶基因,但同时也可能带来一定的差异性。对 miR-199a-3p 的靶基因 GO 功能分析,得出其主要富集在基因表达的调节,细胞代谢的调节,蛋白质域特异性结合等重要的生物学过程。靶基因的 KEGG 信号通路富集分析结果主要富集在 PI3K-Akt 信号通路、黏着斑、肌动蛋白细胞骨架调控、癌症通路、Hippo 信号通路、鞘脂信号通路、ErbB 信号通路、MAPK 信号通路等信号转导通路。已经有研究指出约 50%的胰腺癌呈现 PI3K 信号传导的激活增加,且和 Akt 的磷酸化有关,通常与肿瘤的未分化状态相关并且与不良预后相关<sup>[27]</sup>。同样也有研究报道 MAPK 信号通路<sup>[28]</sup>、ErbB 信号通路<sup>[29]</sup>在胰腺癌中有着密切的联系。可见上调的 miR-199a-3p 可能与胰腺癌的发生发展有着密切的联系,为胰腺癌的研究提供新的研究方向和理论依据。本研究的分析结果综合了多个 GEO 数据库,增加了信息的可靠性,也存在一定的局限性,结果的准确性需实验进一步来验证。

### 参考文献:

- [1] Kamisawa T, Wood L D, Itoi T, et al. Pancreatic cancer[J]. Lancet, 2016,388(10039):73
- [2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(1):7
- [3] Garzon R, Calin G A, Croce C M. MicroRNAs in Cancer[J]. Annu Rev Med, 2009,60(1):167
- [4] Marchini S, Cavalieri D, Fruscio R, et al. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections[J]. Lancet Onco, 2011,12(3):273
- [5] Fornari F, Milazzo M, Chieco P, et al. MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells[J]. Cancer Res, 2015,70(12):5184
- [6] Duan Z, Choy E, Harmon D, et al. MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration[J]. Mol Cancer Ther, 2011,10(8):1337
- [7] Wan D, He S, Xie B, et al. Aberrant expression of miR-199a-3p and its clinical significance in colorectal cancers[J]. Med Oncol, 2013, 30(1):378

- [8] Barrett T, Troup D B, Wilhite S E, et al. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007,35(Database issue):760
- [9] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, et al. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets[J]. *Cell*, 2003,115(7):787
- [10] Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(D1):D146
- [11] Paraskevopoulou M D, Georgakilas G, Kostoulas N, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013,41(Web Server issue):W169
- [12] Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA–target interactions[J]. *Nat Methods*, 2015,12(8):697
- [13] Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition[J]. *Nat Genet*, 2007,39(10):1278
- [14] Miranda K C, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes[J]. *Cell*, 2006,126(6):1203
- [15] Yousef M, Jung S, Kossenkova A V, et al. Naïve Bayes for microRNA target predictions—machine learning for microRNA targets [J]. *Bioinformatics*, 2007,23(22):2987
- [16] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2008,4(1):44
- [17] Kinoshita Y, Sawada K, Nakamura K, et al. The hypoxia-related microRNA miR-199a-3p displays tumor suppressor functions in ovarian carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015,6(13):11342
- [18] Huang J, Dong B, Zhang J, et al. miR-199a-3p inhibits hepatocyte growth factor/c-Met signaling in renal cancer carcinoma[J]. *Tumor Biol*, 2014,35(6):5833
- [19] Han Y, Kuang Y, Xue X, et al. NLK, a novel target of miR-199a-3p, functions as a tumor suppressor in colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014,68(5):497
- [20] Tian R, Xie X, Han J, et al. miR-199a-3p negatively regulates the progression of osteosarcoma through targeting AXL[J]. *Am J Cancer Res*, 2014,4(6):738
- [21] Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer[J]. *Cancer Sci*, 2017,108(8):1681
- [22] Nagao Y, Hisaoka M, Matsuyama A, et al. Association of microRNA-21 expression with its targets, PDCD4 and TIMP3, in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2012,25(1):112
- [23] Bloomston M, Frankel W L, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis[J]. *JAMA*, 2007,297(17):1901
- [24] 夏蜀珺, 郭俊超, 李建, 等. 胰腺癌早期诊断相关 miRNAs 的筛选与验证[J]. *中华外科杂志*, 2014,52(3):198
- [25] Kunjitharan P R, Linda B, Vegard T, et al. MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor[J]. *Oncotarget*, 2016,7(13):16396
- [26] Wang X, He R, Zhao T, et al. Single nucleotide polymorphism in the microRNA-199a binding site of HIF1A gene is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma risk and worse clinical outcomes[J]. *Oncotarget*, 2016,7(12):13717
- [27] Eser S, Reiff N, Messer M, et al. Selective Requirement of PI3K/PDK1 Signaling for Kras Oncogene-Driven Pancreatic Cell Plasticity and Cancer[J]. *Cancer Cell*, 2013,23(3):406
- [28] Tong W G, Ding X Z, Talamonti M S, et al. LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,335(3):949
- [29] Friess H, Yamanaka Y, Kobrin M S, et al. Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression[J]. *Clin Cancer Res*, 1995,1(11):1413

(2018-06-17 收稿)