

文章编号 1006-8147(2018)04-0287-04

论 著

肺鳞癌中 miR-144 靶基因预测及其生物信息学分析

李伟,王兆松,董秋萍,徐玥,陈永孜,许世磊

(天津医科大学肿瘤医院,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津 300060)

摘要 目的:分析 miR-144 靶基因在肺鳞癌中参与的信号通路生物过程。方法:分析 The Cancer Genome Atlas 网站中肺鳞癌患者的 miR-144 的表达量及生存曲线;预测 miR-144 靶基因并通过表达数据筛选影响肺鳞癌进展基因;BinGo 软件对候选靶基因进行 GO 注释分析,利用 DAVID 网站预测其信号通路。结果:miR-144 表达量高有利于延长肺鳞癌患者生存时间。综合 4 个靶基因数据库发现 miR-144 有 72 个预测结果,其中 45 个在肺鳞癌患者癌与癌旁组织间表达存在差异。其中部分候选靶基因参与胞核及星形微管的组成,参与上皮细胞增生、RNA 合成。通路分析显示部分候选靶基因参与 Ras、Wnt、Hippo 等信号通路。结论:45 个 miR-144 候选靶基因通过多条信号通路及生物过程调节细胞生命活动,影响肿瘤患者生存预期。

关键词 miR-144;肺鳞状细胞癌;生物信息学;基因本体论

中图分类号 R73

文献标志码 A

Bioinformatic analysis and prediction of miR-144 target genes in lung squamous cell carcinoma

LI Wei, WANG Zhao-song, DONG Qiu-ping, XU Yue, CHEN Yong-zi, XU Shi-lei

(Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract **Objective:** To analyze the target genes of miR-144 in lung squamous cell carcinoma and their biological processes and signaling pathways. **Methods:** The relationship between miRNA expression and survival plot of patients with lung squamous cell carcinoma in TCGA was analyzed. And then the target gene of miR-144 was predicted by target gene databases. The gene ontology (GO) enrichment was performed by BinGo. DAVID database was used to predict the target gene signal pathway. **Results:** The high expression of miR-144 was beneficial to prolong the overall survival of patients with lung squamous cell carcinoma. Seventy-two target genes of miR-144 were obtained by 4 miRNA database and 45 of 72 target genes were significantly different in cancer and normal tissue. GO enrichment analysis found that genes constituted the nucleus and astral microtubule mainly. And they took part in endothelial cell proliferation and RNA. Ras, Wnt and Hippo signal pathway were affected by the target genes. **Conclusion:** Forty-five miR-144 target genes may affect cell life activities and regulate tumor development by multiple signaling pathways.

Key words miR-144; lung squamous cell carcinoma; bioinformatics; gene ontology

肺鳞状上皮细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LSCC)是原发性肺癌中常见的一种^[1],但其对放疗、化疗不敏感^[1-2]。因此找到更好的治疗靶点,对于治疗肺鳞癌具有重要的意义。已有研究表明,Hsa-miR-144 可以通过调控 TIGAR 基因来抑制肺癌的增殖并诱导肺癌细胞的凋亡和自噬^[3],miR-144 可以通过影响 GLUT1 影响肿瘤的代谢^[4-7],还可以通过 AP-4 影响非小细胞肺癌的转移^[8]。miR-144 影响肿瘤的研究中往往只针对其中一个靶基因,而 miRNA 在细胞中通常会调控多种靶基因,目前对于肺鳞癌相关 miR-144 靶基因综合的研究还未见报道,本文采用多种生物信息学的手段,综合分析了 miR-144 的靶基因及其相关的一些生物学特征信息,并依据

TCGA 中肺鳞癌患者的数据,深入分析了 miR-144 靶基因的相关信息,以期为其在肺鳞癌治疗方面的作用提供理论支持^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 数据材料 通过网站 UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/datapages/>)下载已经标准化处理的 TCGA 数据库中肺鳞状细胞癌患者数据(更新时间 2016 年 4 月)。

1.1.2 分析软件及数据库 SPSS 19.0 统计分析软件,GraphPad Prims 7 统计分析软件,Cytoscape 3.5.0 系统生物学分析软件(<http://www.cytoscape.org/>);miRNA 靶基因数据库 Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_71/)、TargetMiner (http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu/targetminer20.htm)、miRDB (<http://www.mirdb.org/>)

作者简介 李伟(1989-),男,硕士在读,研究方向:生物化学与分子生物学;通信作者:许世磊,E-mail:slxu@sibs.cn。

www.mirdb.org/miRDB/), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>); 靶基因综合分析网站 Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>); DAVID 信号通路分析网站 (<https://david.ncifcrf.gov/>)。

1.2 方法交叉表分析肺鳞癌患者 miR-144 表达量与性别、年龄的相关性,并分析表达量与总生存率 (overall survival, OS) 间关系并作图;通过 Targetscan、Targetminer、miRDB 和 PicTar 数据库预测 miR-144 靶基因,利用 Venny 2.1 软件综合分析 4 个数据库的结果并预测得到 miR-144 的候选靶基因;使用 GraphPad Prims 7 软件对患者的癌与癌旁组织基因表达数据进行配对样本 t 检验,分析靶基因在组织间的表达差异;使用 BinGo 插件对靶基因进行 GO (gene ontology) 富集分析;DAVID 分析靶基因参与的信号通路。

2 结果

2.1 miR-144 与患者总生存率间关系 下载并筛选出 458 例 TCGA 中收录了 miR-144 的表达量及 OS 的肺鳞癌病例。简单整理数据发现,458 例患者中 miR-144 的最高表达量 10.19,最低表达量为 2.29,中位数为 6.277,均值为 6.256,方差为 2.163。以其表达量中位数(6.277)为界限分为高表达组(共 229 例)和低表达组(229 例)。年龄方面,40 岁为其最低年龄,90 岁为最大统计年龄,年龄中值为 68 岁,平均年龄 67.55 岁,方差 73.612,按其中位数将所有统计患者分为低龄和高龄两组,交叉表分析发现 miR-144 表达量与患者年龄无必然联系 ($P>0.05$)。从性别方面分析,所有统计患者中,男性有 338 例,女性患者 120 例,交叉表分析发现 miR-144 表达量与性别也无必然联系 ($P>0.05$),具体结果见表 1。

表 1 肺鳞癌患者 miR-144 表达量与年龄、性别交叉表分析

Tab 1 Cross-Tabulations analysis of miR-144 expression level and age, gender in patients with lung squamous cell

项目	n	miR-144 表达量/%		P
		低	高	
年龄/岁				
≤68	228	114(50.0)	114(50.0)	0.925
>68	222	112(50.5)	110(49.5)	
性别				
女性	120	63(52.5)	57(47.5)	0.595
男性	338	166(49.1)	172(50.9)	

SPSS 绘制 miR-144 表达量与总生存率的生存函数,分析发现 miR-144 高表达组的总生存率比低表达组的高,且 $P=0.003$ (小于 0.05),生存函数图如图 1 所示。因此 miR-144 的高表达有利于延长肺鳞

癌患者的总生存时间,并且这种影响与患者的年龄和性别无关。

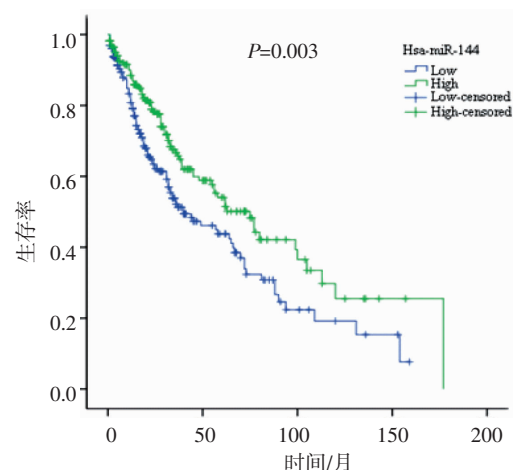


图 1 肺鳞癌患者 miR-144 表达量与总生存率分析

Fig 1 MiR-144 expression and overall survival (OS) analysis in patients with lung squamous cell

2.2 miR-144 在肺鳞癌患者与其正常组织间表达差异分析 对 TCGA 中的肺鳞癌患者数据进行分析筛选,得到了 43 例即收录了癌组织又收录相应的癌旁正常组织表达信息的患者,这 43 例癌组织的 hsa-miR-144 的表达均值为 6.248 6,最大值为 9.810 2,最小值 2.294 7,方差为 2.328 0;癌旁组织的 hsa-miR-144 的表达均值为 9.517 2,最大值为 12.085 4,最小值 5.244 0,方差为 1.806 4。使用 GraphPad Prism 7 对 43 对数据进行配对样本的 t 检验分析,得到如图 2 所示的点状图,肿瘤组织中 miR-144 的表达量远低于癌旁正常组织,并且其 $P<0.000 1$,提示 miR-144 的表达对于肿瘤的发生发展具有十分重要的意义。

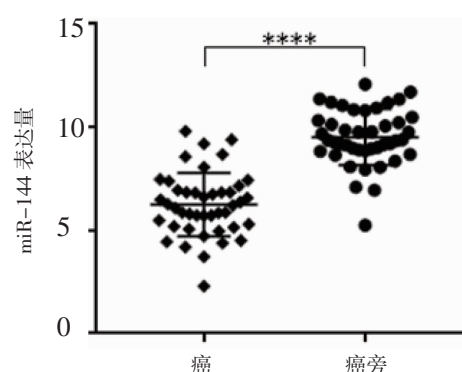


图 2 肺鳞癌患者癌与癌旁 miR-144 表达量分析 (****: $P<0.000 1$)

Fig 2 Expression analysis of miR-144 in tumor and normal tissue from patients with lung squamous cell carcinoma (****: $P<0.000 1$)

2.3 miR-144 靶基因的预测 通常一个 miRNA 调控多靶基因的表达,不同数据库的预测会得到不同的结果,为了能准确地预测,综合多个数据库的预测结果,并将每个数据库中均出现的基因作为最终候选靶基因。

本文采用 Targetscan、miRDB、Targetminer 和 PicTar4 个数据库预测 miR-144 靶基因,分别得到了 1043、569、2228 和 397 个靶基因。通过在线综合分析工具 Venny 2.1 综合分析并最终得到了一个共有 72 个基因的集合,如图 3 所示,这个集合中包括了 ABCA1、CAV2、HOXA10、MOB2、SS18、ZFX 等基因,因此,可以认为这 72 个基因是 miR-144 的候选靶基因。

2.4 肺鳞癌患者中 miR-144 靶基因的表达差异分析 分析肺鳞癌患者的癌与癌旁组织间所有靶基因的表达,通过表达差异分析,确定有显著性差异的基因为 miR-144 影响肺鳞癌进展的靶基因。筛选得到了 TCGA 数据库中 36 例肺鳞癌患者的配对表达数据,这些数据包含癌与癌旁组织的所有 RNA 测序数据,并已进行标准化处理。36 例患者癌和癌

旁正常组织的 72 个候选靶基因表达数据主要包括每个基因在癌与癌旁正常组织的极值、均值、方差。使用 GraphPad Prims 对上述 72 个基因在不同组织的表达进行配对样本的 *t* 检验,其中在肿瘤组织和配对的正常组织中表达具有明显的差异 ($P<0.05$) 有 45 个基因,其中在癌旁组织中高表达的有 30 (66.67%) 个,15 (33.33%) 个基因在肿瘤中高表达,见表 2。

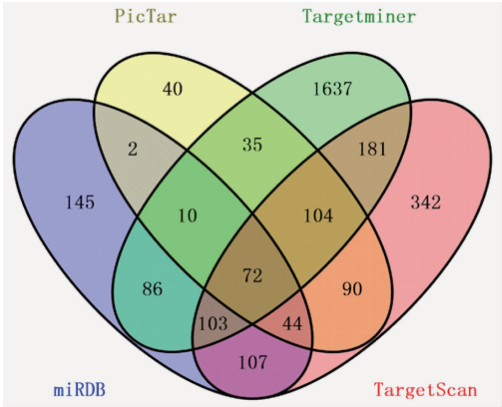


图 3 miR-144 靶基因分析示意图
Fig 3 Illustration of miR-144 target gene analysis

表 2 癌与癌旁正常组织 miR-144 靶基因表达差异情况

Tab 2 The different expression of miR-144 target gene in tumor and normal tissue		
表达水平	P	基因
癌旁组织	0.05~0.001	CCDC88A, FAM126B, PCDH18, PTP4A1, VKORC1L1
	0.001~0.0001	APPBP2, ARHGAP26, SLC12A2
	<0.0001	ARRDC3, CAV2, CELF2, DMD, ETS1, FBXW11, FNDC3A, MBNL1, MEIS1, MOB2, NCOA7, NR2F2, PAFAH1B1, PDE4D, PDE7B, PNRC1, PURA, SEMA6A, TSPAN12, DFY3, ZDHHC17, ZNF238
肿瘤	0.05~0.001	ARFGEF1, LCOR, LSM14A, NFE2L2
	0.001~0.0001	SFRS13A
	<0.0001	ACBD3, FBN2, HOXA10, KPNA1, MARK1, MED14, MYO1E, PHTF2, PTHLH, SLC7A11
组织高表达	<0.0001	BRPF1, SENP7, SON, ABCA1, BACH2, ELL2, GATA3, MYST3, RARB, RIN2, RNF111, SEMA6D, SFRS12, SUCLA2, UBR3, ST18, ALDH1A3, ATP2B1, CCNT2, CDK19, EIF5, PTPN9, SORCS3, SS18, UBE2D1, UBE2D2, ZFX
无差异	>0.05	

2.5 miR-144 靶基因 GO 注释分析 基因本体论 (gene ontology, GO) 是通过对其产物在细胞中参与的生物学过程、组成成分以及分子功能对基因及产物进行描述。为进一步分析 miR-144 的靶基因在肺鳞癌发生发展中的作用,对筛选出的 45 个差异表达的靶基因通过分析软件 Cytoscape 的 BiNGO 插件进行 GO 注释富集分析,设置物种为人类 (Homo sapiens),差异水平 0.05,注释文件选择所有 (All)。结果显示可知,从细胞组成方面看部分靶基因参与细胞核以及星形微管、细胞质中颗粒等的组成。这些基因参与包括肌肉形成、胚胎发育、神经元迁移、上皮细胞增生、RNA 转录等等多达 50 项生物学过程,另外还参与了代谢过程。从参与的分子

学过程看主要行 DNA 结合功能,这有利于其参与 RNA 转录的过程,另外还有一些蛋白质的结合功能。

2.6 miR-144 靶基因 KEGG 通路分析 通过 GO 富集分析对 miR-144 靶基因的功能进行初步解析,但基因通常是通过参与机体的信号通路对生命活动进行调节的,本文通过 DAVID 对 45 个候选靶基因进行信号通路分析。其中 16 个靶基因参与了多达 37 个信号通路,FBXW11 参与了 7 个信号通路,包括蛋白质泛素化降解, Wnt 信号通路, Hedgehog 信号通路, Hippo 信号通路等,其中 Wnt 和 Hippo 信号通路对肿瘤的发生发展具有重要的影响。ETS1, CAV2 参与的信号通路对肿瘤的迁移侵袭具有重要影响。

3 讨论

本文对 miR-144 的靶基因进行生物信息学分析,并联系肺鳞癌患者的临床及基因表达数据,以期能够对临床研究提供指导意义。一个 miRNA 往往会调控多个靶基因表达,笔者发现 miR-144 共有 72 个候选靶基因,其中 45 个在肺鳞癌患者癌与癌旁正常组织间表达差异明显。

GO 富集分析发现 miR-144 靶基因的产物参与细胞核组成,另外还与星形微管、细胞质中颗粒形成有关。miR-144 与肌肉的形成、个体胚胎发育、上皮细胞增生、RNA 转录等生物学过程有关,其靶基因还参与了人体的新陈代谢过程^[10-12]。分子功能中 DNA 结合,蛋白质结合等功能,都有利于其参与相应的生物过程^[13-14]。

miR-144 靶基因的 KEGG 通路分析可帮助我们更好地了解其在生命活动中参与的信号通路。miR-144 可以通过影响 Ras 信号通路、Wnt 信号通路、Hippo 信号通路等调控肺鳞癌的发生发展^[15-16],当 miR-144 的表达发生变化时,整个细胞中基因的表达发生变化,一系列的信号通路也随之变化,进而影响了肿瘤的进展过程。miR-144 在正常组织中表达量高于癌组织,且其高表达可有效延长肺鳞癌患者的总生存时间,因此,综合分析 miR-144 靶基因的相关信息,可为深入研究其在肺鳞癌患者中的作用机制提供重要理论数据支持。

参考文献:

- [1] Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 359(13): 1367
- [2] Romanidou O, Imbimbo M, Mountzios G, et al. Therapies in the pipeline for small-cell lung cancer [J]. Br Med Bull, 2016, 119(1): 37
- [3] Chen S, Li P, Li J, et al. MiR-144 inhibits proliferation and induces apoptosis and autophagy in lung cancer cells by targeting TIGAR [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(3): 997
- [4] Liu M, Gao J, Huang Q, et al. Downregulating microRNA-144 mediates a metabolic shift in lung cancer cells by regulating GLUT1 expression [J]. Oncol Lett, 2016, 11(6): 3772
- [5] Monroig Pdel C, Chen L, Zhang S, et al. Small molecule compounds targeting miRNAs for cancer therapy [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 81: 104
- [6] Sethi S, Ali S, Sethi S, et al. MicroRNAs in personalized cancer therapy [J]. Clin Genet, 2014, 86(1): 68
- [7] Tutar L, Tutar E, Ozgur A, et al. Therapeutic Targeting of microRNAs in Cancer: Future Perspectives [J]. Drug Dev Res, 2015, 76(7): 382
- [8] Gao F, Wang T, Zhang Z, et al. Regulation of activating protein-4-associated metastases of non-small cell lung cancer cells by miR-144 [J]. Tumour Biol, 2015, 37(12): 15535
- [9] Mirzaei H, Masoudifar A, Sahebkar A, et al. MicroRNA: A Novel Target of Curcumin in Cancer Therapy[J]. J Cell Physiol, 2017, 233(4): 3004
- [10] Gross N, Kropp J. MicroRNA Signaling in Embryo Development [J]. 2017, 6(3): 34
- [11] Bai B, Shi B, Hou N, et al. MicroRNAs participate in gene expression regulation and phytohormone cross-talk in barley embryo during seed development and germination [J]. BMC Plant Biol, 2017, 17(1): 150
- [12] Kane N M, Thrasher A J, Angelini G D, et al. Concise review: MicroRNAs as modulators of stem cells and angiogenesis[J]. Stem Cells, 2014, 32(5): 1059
- [13] Li J, Sun P, Yue Z, et al. MiR-144-3p Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells by Targeting Proline-Rich Protein 11 Expression via the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway [J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(8): 619
- [14] Zhang J J, Chen J T, Hua L, et al. MiR-98 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation via targeting EZH2 and suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 472
- [15] Liu S, Luan J, Ding Y. MiR-144-3p Targets FosB Protooncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit (FOSB) to Suppress Proliferation, Migration, and Invasion of PANC-1 Pancreatic Cancer Cells [J]. Oncol Res, 2017, 26(5):683
- [16] Yan J, Xu Y, Wang H, et al. MicroRNA-503 inhibits the proliferation and invasion of breast cancer cells via targeting insulin-like growth factor 1 receptor [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1707

(2018-01-16 收稿)