

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.34.004

胃癌中 P53 诱导相关微小 RNA 靶基因预测及生物信息学分析*

曹 辉¹, 许 钟^{2△}, 白班俊², 张玲玲²

(贵州省人民医院:1. 肿瘤科;2. 消化内科, 贵阳 550002)

摘要:目的 利用生物信息学预测胃癌中 P53 诱导相关微小 RNA(miRNA)的靶基因及功能。方法 通过胃癌的限定, 用在线数据库 mir2disease、Gene Expression Atlas 缩小目的基因范围。利用在线预测软件 miRNA 靶基因数据库 miRGen(v3.0)预测目标 miRNA 的靶基因。通过在线软件 DAVID 和 Pathway Miner 对预测的靶基因数据集进行功能富集和信号转导通路分析。结果 胃癌中 P53 诱导相关 miRNA 包括 miR-21、miR-25、miR-103 等, 预测 miR-21 靶基因共 1 090 个, 其中在胃癌中下调共 115 个; Pathway Miner 分析显示 miR-21 的靶基因涉及黏附连接、胰岛素信号转导通路、细胞凋亡、钙信号转导通路、JAK-STAT 信号转导途径等。结论 miR-21 靶基因涉及多个肿瘤发生、发展相关信号通路。

关键词:胃肿瘤; 基因, P53; 微 RNAs; 计算生物学

中图分类号: K735.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)34-4570-04

Bioinformatics analysis of target prediction and function of P53 induced miRNAs in human gastric cancer*

Cao Hui¹, Xu Zhong^{2△}, Bai Banjun², Zhang Lingling²

(1. Department of Oncology; 2. Department of Gastroenterology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To predict target genes and functions of P53-induced miRNAs in gastric cancer by bioinformatics analysis. **Methods** Databases of mir2disease and Gene Expression Atlas were used for extraction P53-induced miRNAs in gastric cancer from published literature. The target genes of related miRNA were predicted by miRGen(v3.0) Database. Then DAVID and Pathway Miner were used for Gene Ontology Enrichment and pathway analysis of the target genes. **Results** P53 induced miRNAs in human gastric cancer included miR-21, miR-25, miR-103. Among them, 1 090 predicted target genes of miR-21 were found in total and 115 in gastric cancer, respectively. The pathway analysis showed that these target genes were involved in Adherens junction, Adipocytokine signaling pathway, apoptosis, calcium signaling pathway and JAK-STAT signaling pathway, etc. **Conclusion** Bioinformatics analysis suggests P53 induced miR-21 expression in gastric cancer, and its target genes are involve in multiple signaling pathways which related tumor pathogenesis and progression.

Key words: stomach neoplasms; genes, P53; miRNA; bioinformatics

微小 RNA (miRNA) 通过使其靶 mRNA 的降解或翻译抑制, 在转录后水平调控基因表达^[1], 参与调控细胞的增殖、分化及肿瘤发生、发展等生理和病理过程, 因而受到广泛关注。多项研究对胃癌临床标本检测发现, 相对于癌旁组织, 胃癌中出现多种 miRNA 表达的异常上调或下调; 同时, miRNA 的表达也受到多种转录因子的调控, 如 P53 可诱导 miR-34a、miR-26b、miR-92、miR-29a、miR-25、miR-103、miR-128a 等一系列 miRNA 的表达上调^[2]。对野生型 P53 胃癌来说, 探讨 P53 通过 miRNA 间接作用参与肿瘤的发生有助于深入理解该类肿瘤的发生机制。本研究拟通过生物信息学预测胃癌中 P53 诱导相关 miRNA 的靶基因, 并进一步对其靶基因进行功能富集分析和信号转导通路富集分析, 为后续的表达调控实验奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 目标 miRNA 的筛选 通过在线人类疾病相关 microRNA 数据库 mir2disease^[3], 检索胃癌中高表达的 miRNA; 用检索结果与 P53 诱导相关 miRNA 对比, 取交集得到胃癌中 P53 诱导相关 miRNA。

1.2 靶基因的预测 确定目标 miRNA 后, 利用在线预测软件 miRNA 靶基因数据库 miRGen(v3.0) 进行靶基因预测 (含 PicTar、miRanda、DIANA-microT、TargetScanS 等 miRNA 靶基因预测工具)^[4], 得到目标 miRNA 的候选靶基因数据集。

1.3 确立胃癌中的预测靶基因 通过在线基因表达谱数据库 Gene Expression Atlas^[5] 检索获得胃癌中表达下调的基因, 用预测的候选靶基因数据集与之对比, 获得胃癌中目标 miRNA 的靶基因数据集。

1.4 功能富集分析 通过在线软件 DAVID^[6] 对预测的靶基因数据集进行功能富集分析; Pathway Miner 进行信号转导通路分析。

2 结 果

2.1 目标 miRNA 的筛选情况 应用在线 mir2disease 数据库检索胃癌相关 miRNA, 根据其详细注释筛选出在胃癌中表达上调的基因, 共 18 个; 汇总胃癌中高表达的 miRNA 与 P53 诱导相关 miRNA^[2] 两者对比, 初步获得本研究候选 miRNAs, 见图 1。

* 基金项目: 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2012]2240 号)。 作者简介: 曹辉(1978-), 博士, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤方面的研究工作。 △ 通讯作者, Tel: (0851)5937515; E-mail: xucong0567@163.com。

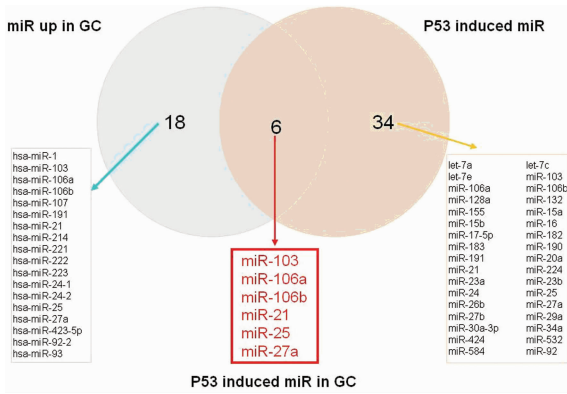


图 1 目标 miRNA 筛选图

2.2 miR-21 靶基因的预测 从候选目标 miRNA 中选择文献报道较多的 miR-21,通过在线软件预测其靶基因,用集成常用预测工具的 miRGen(v3)分析,结果共获得 1 090 个基因。

表 1 胃癌中 miR-21 的靶基因预测与筛选结果

RNF103	CPEB3	ZNF367	NR0B1	CREBL2	ASIP	SOX2
GPR64	SOX5	TESK2	SCN8A	PDCD4	TRIM2	TMEM27
KIAA1468	ARHGAP24	SPANXB2	CNTFR	ACAT1	AGXT	CPT2
FH	INSR	PDHA1	HSD17B4	BCL2	ALDH1A1	GRM7
HPGD	PPARA	PDE4DIP	HERPUD1	CAB39L	SAR1B	APEH
AUH	HDC	PCSK6	PLAGL2	S100A10	TCEB3	SUCLG2
RIN1	CCPG1	CDH6	PCBP2	GUCA1C	JAK3	CHERP
SARDH	DNAJB9	PADI4	PPARGC1A	SPCS1	BTBD3	WWC1
SOSTDC1	PVRL3	RAI14	PLL	AKAP7	ZNF219	BAIAP2
BSPRY	FAM46C	ODAM	STYK1	GTPBP2	MID1IP1	MYOZ1
GREM2	UNKL	IRX1	GALNT12	AGXT2L1	ATP13A4	C1orf94
ZNF300	RAD17	RANBP3L	FBXL13	SPATA18	MAMDC2	TMEM161B
GANC	FUNDC1	ZNF575	ANGPTL5	WDFY3	CPEB2	ZNF438
ZNF326	SLC9A10	ANG	RNASE4	SPATA21	PTGER3	ELL2
DMRTC1	LNX1	SLC2A4RG	CASR	MAST4	GPR137B	ADCY2
C1QTNF3	MEGF9	PGPEP1	TRIM29	ADAM8	KIAA1958	TOR1AIP2
ZBTB37	TXNDC5	MAK3	—	—	—	—

—:此项无数据。

表 2 应用 DAVID 进行 Gene_Ontology 功能富集分析(部分)

库	项目	P	基因
GOTERM_BP_FAT	regulation of fatty acid oxidation	0.000 6	PPARA, PPARGC1A, CAB39L, CPT2
GOTERM_BP_FAT	transcription, DNA-dependent	0.001 8	PPARA, PPARGC1A, ZNF219, TRIM29, SOX5, TCEB3, PTGER3, ELL2
GOTERM_BP_FAT	RNA biosynthetic process	0.002 0	PPARA, PPARGC1A, ZNF219, TRIM29, SOX5, TCEB3, PTGER3, ELL2
GOTERM_BP_FAT	regulation of fatty acid metabolic process	0.003 1	PPARA, PPARGC1A, CAB39L, CPT2
GOTERM_BP_FAT	regulation of cellular ketone metabolic process	0.004 8	PPARA, PPARGC1A, CAB39L, CPT2
GOTERM_BP_FAT	response to hormone stimulus	0.006 4	INSR, BAIAP2, PPARA, BCL2, ASIP, AGXT, NR0B1, ADCY2
GOTERM_CC_FAT	mitochondrial lumen	0.006 7	AGXT, SARDH, FH, ACAT1, PDHA1, SUCLG2
GOTERM_CC_FAT	mitochondrial matrix	0.006 7	AGXT, SARDH, FH, ACAT1, PDHA1, SUCLG2

2.3 确立胃癌中的预测靶基因 应用在线基因表达谱数据库 Gene Expression Atlas 检索,选择“(All genes) and down in gastric carcinoma”,限定为“Homo sapiens”,获得胃癌中表达下调的基因共 2 737 个,用预测的 1 090 个候选靶基因数据集与之对比,获得胃癌中目标 miRNA 的靶基因数据集共 115 个,见表 1。

2.4 功能富集分析结果 应用 DAVID 进行 Gene_Ontology 分析时,选择系统默认的 GOTERM_BP_FAT, GOTERM_CC_FAT, GOTERM_MF_FAT 3 个库,其中 P<0.01 部分结果见表 2。通过 Pathway Miner 分析相关信号通路(表 3),细胞调节通路包括黏附连接、脂肪细胞因子信号转导通路、胰岛素信号转导通路、细胞凋亡、钙信号转导通路、JAK-STAT 信号转导途径等,代谢途径包括赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、丁酸代谢、脂肪酸代谢、丙酮酸代谢等,见图 2。

续表 2 应用 DAVID 进行 Gene_Ontology 功能富集分析(部分)

库	项目	P	基因
GOTERM_BP_FAT	development of primary male sexual characteristics	0.006 9	BCL2、NR0B1、SOX2、HSD17B4
GOTERM_BP_FAT	development of primary sexual characteristics	0.007 1	CDH6、BCL2、NR0B、SOX2、HSD17B4
GOTERM_BP_FAT	male sex differentiation	0.009 5	BCL2、NR0B1、SOX2、HSD17B4

表 3 Pathway Miner 分析中 KEGG 部分相关信号通路名称

细胞和调控进程通路	代谢通路
Adherens junction	Lysine degradation
Adipocytokine signaling pathway	Valine,leucine and isoleucine degradation
Focal adhesion	Butanoate metabolism
Dentatorubropallidolusian atrophy (DRPLA)	Fatty acid metabolism
Insulin signaling pathway	Pyruvate metabolism
Apoptosis	Citrate cycle (TCA cycle)
Neuroactive ligand-receptor interaction	Tryptophan metabolism
Regulation of actin cytoskeleton	Propanoate metabolism
Prion disease	Glycine,serine and threonine metabolism
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	Caprolactam degradation
Neurodegenerative Disorders	Reductive carboxylate cycle (CO ₂ fixation)
Type II diabetes mellitus	Fatty acid elongation in mitochondria
Cell adhesion molecules (CAMs)	Biotin metabolism
Cytokine-cytokine receptor interaction	Alanine and aspartate metabolism
Olfactory transduction	Histidine metabolism
Calcium signaling pathway	Glycolysis/Gluconeogenesis
JAK-STAT signaling pathway	Synthesis and degradation of ketone bodies
	Retinol metabolism
	Starch and sucrose metabolism

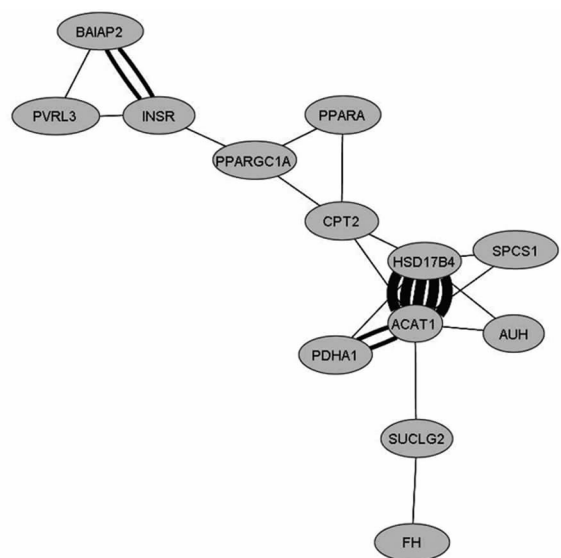


图 2 Pathway Miner 分析中部分信号通路涉及基因(KEGG)

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,在胃黏膜癌变过程中,P53 等多种抑癌基因的变化参与了胃癌形成。P53 和多种转录因子之间存在着相互作用,但仍难以充分阐明胃癌发生机制。近年来发现 P53 可影响一组 miRNA 的表达^[2],为本研究提供了新的契机。

miRNA 作为一类具有调控基因表达的非编码 RNA(约 18~22 nt),通过使其靶 mRNA 的降解或翻译抑制,在转录后水平调控基因表达^[1,7]。miRNA 通过这种机制参与调控细胞的增殖、分化及肿瘤发生、发展等生理、病理过程。同时,miRNA 的表达也受到多种转录因子的调控,P53 可诱导一系列 miRNA 的表达上调^[2]。通过对胃癌临床标本的检测,发现相对于癌旁组织,胃癌中出现多种 miRNA 表达的异常表达,如 mir-34、mir-128a、miR-92、miR-25、miR-103 等的上调, mir-128b、mir-129、mir-148 等的下调^[8-10]。正是由于 miRNA 与转录因子之间存在相互调控作用,推测在野生型 P53 胃癌中,P53 可能在诱导 miRNA 的表达后,进而通过 miRNA 对下游基因的转录后水平调控,从而促进肿瘤的发生。因此,作者进行了相关生物信息学分析,为后续研究提供理论基础。

通过在线数据的深度挖掘,成功缩小胃癌中目标 miRNA 分析范围。miR-21 与胃癌的发生和转移有关,有望作为胃癌分子标志^[11],选择其进一步分析预测靶基因。经过整合常用 miR 靶基因预测软件的靶基因数据库 miRGen(v3)进行靶基因预测后,应用基因表达谱数据库有效缩小靶基因范围,获得在胃癌中相关的预测靶基因集。应用在线软件 DAVID 和 Pathway Miner 分别进行 GO 基因注释、功能富集分析和信号通路分析。结果显示在胃癌中 MiR-21 的靶基因涉及系列信号通路中,包括黏附连接、胰岛素信号转导通路、细胞凋亡、钙信号转导通路、JAK-STAT 信号转导途径等与肿瘤发生、发展及转移密切相关的信号通路^[12-13]。

经过充分数据发掘,利用生物信息学分析结果所提供的重点信号转导通路为基础,可以开展针对性的实验研究,将有助于进一步理解 P53、miRNA 及下游靶基因组成的调控网络在胃癌发生、发展中的作用机制。

参考文献:

- [1] Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(11):4034-4039.
- [2] Tarasov V, Jung P, Verdoordt B, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(13):1586-1593.
- [3] Jiang Q, Wang Y, Hao Y, et al. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): D98-104.
- [4] Alexiou P, Vergoulis T, Gleditsch M, et al. miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D137-141.
- [5] Petryszak R, Burdett T, Fiorelli B, et al. Expression Atlas update—a database of gene and transcript expression (上接第 4569 页)
2011, 12(10):732-735.
- [13] 孙红, 常爱民, 张洋, 等. 增加 β 1-肾上腺素受体表达对心力衰竭大鼠心肌细胞收缩功能的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2007, 27(12):1398-1402.
- [14] Renoux C, Dell'aniello S, Suissa S. Hormone replacement therapy and the risk of venous thromboembolism: a population-based study[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(5): 979-986.
- [15] Emre A, Sahin S, Erzik C, et al. Effect of hormone replacement therapy on plasma lipoproteins and apolipoproteins, endothelial function and myocardial perfusion in postmenopausal women with estrogen receptor-alpha IVS1-397 C/C genotype and established coronary artery disease[J]. *Cardiology*, 2006, 106(1):44-50.
- [16] Chen HM, Hsu JH, Liou SF, et al. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, prevents lysophosphatidylcholine-induced cardiac injury by reducing reactive oxygen species production, calcium overload and apoptosis via MAPK pathways[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14:233.
- [17] Huang C, Gu H, Zhang W, et al. Testosterone-down-regulated Akt pathway during cardiac ischemia/reperfusion: a mechanism involving BAD, Bcl-2 and FOXO3a [J]. *J Surg Res*, 2010, 164(1):e1-11.
- [18] Penna C, Pasqua T, Amelio D, et al. Catestatin increases the expression of anti-apoptotic and pro-angiogenic factors in the post-ischemic hypertrophied heart of SHR[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e102536.
- [19] Zhang Y, Li H, Zhao G, et al. Hydrogen sulfide attenuates the recruitment of CD11b+Gr-1+ myeloid cells and regulates Bax/Bcl-2 signaling in myocardial ischemia injury [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:4774.
- [20] Wang F, Xiao J, Shen Y, et al. Estrogen protects cardiomyocytes against lipopolysaccharide by inhibiting autophagy[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(3):1509-1512.
- [6] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1):44-57.
- [7] Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells [J]. *RNA*, 2003, 9(1):112-123.
- [8] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [9] Tchernitsa O, Kasajima A, Schafer R, et al. Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression [J]. *J Pathol*, 2010, 222(3):310-319.
- [10] Li X, Zhang Y, Zhang H, et al. miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3 [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(7): 824-833.
- [11] Li BS, Zhao YL, Guo G, et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41629.
- [12] Souma Y, Nishida T, Serada S, et al. Antiproliferative effect of SOCS-1 through the suppression of STAT3 and p38 MAPK activation in gastric cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(6):1287-1296.
- [13] Wei Q, Zhou W, Wang W, et al. Tumor-suppressive functions of leucine zipper transcription factor-like 1 [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7):2942-2950.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-09-22)

(收稿日期:2014-06-18 修回日期:2014-08-15)