

• 基础实验研究论著 •

hsa-miR-100 的生物信息学分析*

付海龙^{1,2}, 徐广峰^{2,3}, 史春梅^{3,4}, 季晨博^{3,4}, 郭锡熔^{3,4}, 赵亚萍^{1,2,△}

(1. 蚌埠医学院, 安徽蚌埠 233030; 2. 中国人民解放军第 82 医院检验科, 江苏淮安 223001;

3. 南京医科大学儿科研究所, 江苏南京 210029;

4. 南京医科大学附属南京妇幼保健院儿童保健科, 江苏南京 210004)

摘要:目的 对 hsa-miR-100 进行靶基因、功能预测等生物信息学分析, 为深入研究 hsa-miR-100 功能提供理论和试验基础。方法 利用 Pubmed 检索 miRNA-100 相关文章, 通过 miRBase、NCBI、UCSC Browser 等在线工具分析 hsa-miR-100 序列, 应用 miRanda、TargetScan 及 PicTar 预测 hsa-miR-100 靶基因, 结合已证实的靶基因进行功能富集分析和信号通路富集分析。结果 hsa-miR-100 与多种肿瘤发生、发展有关, 其序列在各物种间具有高度保守性。hsa-miR-100 靶基因功能富集于基因沉默、染色质沉默、细胞生物合成负性调节等 ($P < 0.01$), 涉及肿瘤信号通路、溶酶体信号通路、凋亡信号通路等信号转导通路 ($P < 0.05$)。结论 hsa-miR-100 可能参与肿瘤发生相关的生物学过程。

关键词: 微 RNAs; hsa-miR-100; 生物信息学; 靶基因; 肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)18-2177-04

Bioinformatics analysis of hsa-miR-100*

Fu Hailong^{1,2}, Xu Guangfeng^{2,3}, Shi Chunmei^{3,4}, Ji Chenbo^{3,4}, Guo Xirong^{3,4}, Zhao Yaping^{1,2,△}

(1. Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the 82nd Hospital of PLA,

Huaian, Jiangsu 223001, China; 3. Institute of Pediatrics, Nanjing Medical University, Nanjing,

Jiangsu 210029, China; 4. Department of Child Care Health, Nanjing Maternal and Child Care Health Hospital

Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210004, China)

Abstract: Objective To predict targets and functions of hsa-miR-100 by bioinformatics analysis, so as to lay foundations and provide theoretical basis for the further studies of hsa-miR-100 biological function. **Methods** Current studies of miR-100 were retrieved by Pubmed. The sequence of hsa-miR-100 was got from miRBase database, NCBI, UCSC Browser. Target genes of hsa-miR-100 were predicted by miRanda, TargetScan and PicTar, and then analyzed by gene ontology and pathway enrichment analysis. **Results** Current studies showed that hsa-miR-100 was related with multiple tumorigenesis. miR-100 was highly conserved among different species. Gene ontology analysis demonstrated the target genes of hsa-miR-100 were enriched in gene silencing, chromatin silencing, negative regulation of biosynthetic process and other biological processes ($P < 0.01$). The pathway analysis indicated the target genes mainly involved in cancer signaling, lysosome signaling, apoptosis signaling and other pathways ($P < 0.05$). **Conclusion**

The target genes of hsa-miR-100 enriched in multiple biological processes were relevant to the tumor signaling pathways.

Key words: microRNAs; hsa-mir-100; bioinformatics analysis; target genes; neoplasm

小 RNA(miRNA)是一类长度约 22 nt、可在转录后水平调控基因(包括许多重要的肿瘤相关基因)表达的内源性非编码小分子 RNA, 并参与体内几乎所有的信号转导途径^[1-2]。miR-100 是具有高度保守性的 miRNA 之一^[3]。本文拟对迄今已有的 miR-100 研究文献进行总结分析, 并通过生物信息学方法预测人 miR-100(hsa-miR-100)靶基因, 对其靶基因进行功能及信号通路富集分析, 为后续深入研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 数据来源 使用 Pubmed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)查阅已发表的 miR-100 研究文献, 利用 miRBase(<http://www.mirbase.org/index.shtml>)、NCBI Mapviewer(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>)、UCSC Genome Browser(<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)等在线工具获取 hsa-miR-100 碱基序列、染色体定位、物

种保守性等基本信息; 选择 miRanda(<http://www.microrna.org/>)、TargetScan(<http://www.targetscan.org/>)、PicTar(<http://pictar.bio.nyu.edu/>)miRNA 靶基因预测网站预测 hsa-miR-100 靶基因; 采用 DAVID(<http://David.abcc.ncifcrf.gov/>)、Gene Ontology 和 KEGG(<http://www.genome.jp/>)公共数据库对靶基因进行功能富集分析(GO 分析)和信号转导通路富集分析(Pathway 分析)。

1.2 GO 及 Pathway 分析 综合各预测网站 hsa-miR-100 靶基因交集, 根据 GO 注释中的生物学过程和分子功能进行 GO 注释层次分类及富集分析。采用 BiNGO 进行 GO 注释的显著性分析^[4], 选择所有的蛋白编码基因作为背景基因, 使用超几何分布计算 P 值, 以 $P < 0.01$ 为显著性阈值, 分别得到相对于背景具有统计意义的高频率注释, 即基因集合在 GO 类别上的分布信息。采用 DAVID 数据库对 hsa-miR-100 预测靶基因集

* 基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2012666); 江苏省淮安市产学研合作促进计划专项资金资助项目(HAC201026)。△ 通讯作者, E-mail: zyp82yy@yahoo.com.cn。

合进行基于 KEGG 数据库的 Pathway 分析,通过 Fisher Exact Test 计算 P 值,以 $P < 0.05$ 为显著性阈值,得到基因集合相对于背景具有统计意义的信号转导及疾病通路。

2 结 果

2.1 hsa-miR-100 研究进展 已有的研究显示 hsa-miR-100 在宫颈癌、鼻咽癌、卵巢癌、急性髓细胞白血病等恶性肿瘤中低表达,通过抑制 PLK1、RBSP3、mTOR 等靶基因表达起到抑癌作用。然而在神经胶质瘤、髓母细胞瘤、儿童急性淋巴细胞白血病、弥散型胃癌等恶性肿瘤中 hsa-miR-100 高表达,通过调节 ATM、ATAD2、SMARCA5 等靶基因表达发挥原癌基因作用。此外,hsa-miR-100 亦参与新生血管形成、上皮间质转化等过程。见表 1。

2.2 hsa-miR-100 同源性分析 通过 miRBase、NCBI Mapviewer、UCSC Genome Browser 分析发现人 miR-100 位于染色

体 11q24.1;应用 miRBase 对人、小鼠、果蝇等百余种物种的 miR-100 序列进行分析,发现 hsa-miR-100 中“13-aaccguagaucgcaacuugug-34”22 个碱基在物种间高度保守(见表 2)。

2.3 hsa-miR-100 靶基因预测及靶基因 GO 和 Pathway 分析 miRanda、TargetScan、PicTar 软件预测 hsa-miR-100 靶基因结果分别为 1 389、28、41 个,取交集共 8 个基因,分别为: SMARCA5、FZD8、TRIB2、EIF2C2、KBTBD8、ZZEF1、BAZ2A、HS3ST3B1。DIANA LAB-TarBase 6.0 数据库收录已有试验数据支持的 hsa-miR-100 靶基因共 8 个: PLK1、IGF1R、mTOR、Raptor、FGFR3、MMP13、EGR2、ID1。GO 分析发现 hsa-miR-100 靶基因功能主要涉及基因沉默、染色质沉默、负性调节细胞的生物合成等生物学过程($P < 0.01$,见表 3),涉及的信号通路主要有肿瘤信号通路、溶酶体信号通路、凋亡信号通路等($P < 0.05$,见表 4)。

表 1 hsa-miR-100 研究文献荟萃

相关疾病	miR-100 表达	作用	第一作者(发表年份)
透明细胞卵巢癌	降低	抑癌基因(抑制增殖、促凋亡、增强对西罗莫司抑制剂 RAD001 的敏感性)	Nagaraja AK(2010) ^[5]
宫颈癌	降低	抑癌基因(调控细胞增殖、凋亡及细胞周期)	Li BH(2011) ^[6]
口鳞状细胞癌	降低	抑癌基因(抑制细胞增殖、影响放射敏感性)	Henson BJ(2009) ^[7]
鼻咽癌	降低	抑癌基因(调控细胞增殖)	Shi W(2010) ^[8]
肺癌	降低	抑癌基因(抑制细胞增殖、促进凋亡、调节细胞周期)	Gao W(2011) ^[9]
头颈部鳞状细胞癌	降低	抑癌基因(抑制细胞的增殖,促进凋亡并使细胞阻滞在 G2/M 期)	Dai Y(2011) ^[10]
甲状腺瘤	降低	抑癌基因	Vriens MR(2011) ^[11]
膀胱癌	降低	抑癌基因	Catto JW(2009) ^[12]
儿童肾上腺皮脂瘤	降低	抑癌基因	Doghman M(2010) ^[13]
肝癌	降低	抑癌基因	Cairo S(2010) ^[14]
乳腺癌(MCF7 细胞)	降低	抑癌基因	Lobert S(2011) ^[15]
局限性前列腺癌	升高	原癌基因	Leite KR(2011) ^[16]
弥散型胃癌	升高	原癌基因	Ueda T(2010) ^[17]
儿童急性髓细胞性白血病	升高	原癌基因	Zhang H(2009) ^[18]
儿童急性淋巴白血病	升高	原癌基因	de Oliveira JC(2012) ^[19]
神经胶质瘤(M059J 细胞)	升高	原癌基因(降低放射敏感性)	Ng WL(2010) ^[20]
髓母细胞瘤	升高	原癌基因(调控细胞增殖、凋亡及细胞周期)	Liu W(2009) ^[21]

表 2 部分物种 miR-100 保守序列

序列号	名称	物种	染色体定位	保守序列
MI0000102	hsa-mir-100	<i>Homo sapiens</i> (人)	11:122022937-122023016[-]	13-aaccguagaucgcaacuugug-34
MI0000692	mmu-mir-100	<i>Mus musculus</i> (小家鼠)	9:41339508-41339587[+]	13-aaccguagaucgcaacuugug-34
MI0000885	rno-mir-100	<i>Rattus norvegicus</i> (褐家鼠)	8:44518670-44518749[+]	13-aaccguagaucgcaacuugug-34
MI0000378	dme-mir-100	<i>Drosophila melanogaster</i> (果蝇)	2:18471434-18471533[+]	12-aaccguaaaucgcaacuugug-33
MI0001258	gga-mir-100	<i>Gallus gallus</i> (原鸡)	24:3372894-3372973[+]	13-aaccguagaucgcaacuugug-34
MI0012218	dpu-mir-100	<i>Daphnia pulex</i> (蚤状溞)	71:446640-446740[-]	21-aaccguagaucgcaacuugugu-43
MI0013497	aae-mir-100	<i>Aedes aegypti</i> (埃及伊蚊)	1:1142154-1142279[+]	31-aaccguagaucgcaacuugug-52
MI0001958	dre-mir-100-1	<i>Danio rerio</i> (鲈)	15:20399275-20399370[+]	24-aaccguagaucgcaacuugug-45
MI0013878	api-mir-100	<i>Acyrthosiphon pisum</i> (豌豆蚜)	15:20399275-20399370[+]	21-gaccguagaucgcaacuugug-42
MI0002709	ggo-mir-100	<i>Gorilla gorilla</i> (大猩猩)	11:122022937-122023016[-]	13-aaccguagaucgcaacuugug-34

表 3 hsa-miR-100 预测靶基因 GO 分析结果

GO 号	GO 注释	P 值	基因数量 (n)	基因
16458	gene silencing	2.69×10 ⁻⁶	3	EIF2C2, SMARCA5, BAZ2A
183	chromatin silencing at rDNA	3.71×10 ⁻⁶	2	SMARCA5, BAZ2A
5677	chromatin silencing complex	3.71×10 ⁻⁶	2	SMARCA5, BAZ2A
40029	regulation of gene expression, epigenetic	7.12×10 ⁻⁶	3	EIF2C2, SMARCA5, BAZ2A
6342	chromatin silencing	4.07×10 ⁻⁵	2	SMARCA5, BAZ2A
45814	negative regulation of gene expression, epigenetic	5.28×10 ⁻⁵	2	SMARCA5, BAZ2A
10558	negative regulation of macromolecule biosynthetic process	7.69×10 ⁻⁵	4	EIF2C2, SMARCA5, BAZ2A, TRIB2
31327	negative regulation of cellular biosynthetic process	8.64×10 ⁻⁵	4	EIF2C2, SMARCA5, BAZ2A, TRIB2
9890	negative regulation of biosynthetic process	9.20×10 ⁻⁵	4	EIF2C2, SMARCA5, BAZ2A, TRIB2
31324	negative regulation of cellular metabolic process	2.29×10 ⁻⁴	4	EIF2C2, SMARCA5, BAZ2A, TRIB2
10605	negative regulation of macromolecule metabolic process	2.48×10 ⁻⁴	4	EIF2C2, SMARCA5, BAZ2A, TRIB2
6338	chromatin remodeling	2.89×10 ⁻⁴	2	SMARCA5, BAZ2A
9892	negative regulation of metabolic process	3.30×10 ⁻⁴	4	EIF2C2, SMARCA5, BAZ2A, TRIB2

表 4 hsa-miR-100 预测靶基因 Pathway 分析结果

编号	项目	数量[n(%)]	P 值	基因
hsa04210	Apoptosis	11(1.6)	0.005 187	BAX, CFLAR, DFFB, FADD, FASLG, TRAF2, ENDOG, IRAK3, PIK3CD, PPP3CA, AKT3
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	13(1.9)	0.006 231	F11R, PTK2, RAP1B, ACTG1, CTNNA2, CTNNB1, CLDN11, CLDN17, CLDN4, ITGA4, ITGAM, PIK3CD, RAC1
hsa05200	Pathways in cancer	24(3.4)	0.020 451	BAX, FADD, FASLG, GLI1, PTK2, TRAF2, BIRC5, CTNNA2, CTNNB1, DAPK3, FGF3, FGFR3, FLT3, FZD8, ITGA3, LAMA1, LAMA5, MTOR, PIK3CD, RAC1, SUFU, TGFB3, AKT3, WNT7A
hsa04142	Lysosome	11(1.6)	0.036 133	ATP6V0C, ATP6V0B, ATP6V0D1, ACP5, AP1M1, AP1M2, AP1S3, GNS, GAA, MANBA, PPT2
hsa04530	Tight junction	12(1.7)	0.037 116	F11R, ACTG1, CTNNA2, CTNNB1, CLDN11, CLDN17, CLDN4, CRB3, LLGL1, RRAS, SYMPK, AKT3
hsa04940	Type I diabetes mellitus	6(0.9)	0.038 205	FASLG, GAD2, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DRB4, HLA-DQ
hsa05310	Asthma	5(0.7)	0.038 762	FCER1G, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DRB4, HLA-DQA1
hsa00062	Fatty acid elongation in mitochondria	3(0.4)	0.046 876	ECHS1, HADHB, PPT2

3 讨 论

miRNA 作用机制是通过与靶基因 3'UTRs 完全或不完全互补结合,降解靶基因或抑制靶基因翻译。由于 miRNA 靶基因的种类和数量较多,而且靶基因参与的调控机制也比较复杂,所以通过生物信息学对 miRNA 进行分析,准确预测 miRNA 靶基因,正确认识 miRNA 与其靶基因的相互作用,对确定 miRNA 研究方向具有重要意义。

本研究分析发现 miRNA-100 序列在百余种物种中高度保

守,提示其可能具有较为强大的生物学功能。目前有关 hsa-miRNA-100 的研究主要集中于肿瘤相关疾病,但在不同肿瘤中作用并不一致,有的甚至完全相反。hsa-miR-100 在宫颈癌、鼻咽癌、急性髓细胞白血病等恶性肿瘤中的表达量降低,可能发挥抑癌基因作用;而在神经胶质瘤、髓母细胞瘤、儿童急性淋巴细胞白血病等恶性肿瘤中表达量升高,提示发挥原癌基因作用。miR-100 通过对靶基因的调节来影响细胞周期,控制细胞的增殖、凋亡,还可影响某些肿瘤对抗癌药物、放射治疗的敏感

性。此外,miR-100 异常表达在其他疾病中也有报道。Joyce 等^[22]研究表明银屑病患者 miR-100 水平明显升高,Shimamura 等^[23]报道 miR-100 参与上皮间质转化,Grundmann 等^[24]认为 miR-100 可调节血管内皮细胞增殖及血管平滑肌细胞迁移。

目前有关 miRNA 靶基因的确定主要靠生物信息学软件预测和生物学试验方法,尽管准确预测和鉴定 miRNA 靶基因的难度都很大,但不同软件预测的结果有可能不一样,采用多个软件进行预测,取其交集部分,可提高预测结果的可靠性,减小假阳性率。本研究通过目前应用较广泛的 miRNA 靶基因预测软件 miRanda、TargetScan 和 PicTar 预测 miR-100 靶基因,综合各软件预测靶基因集合进行 OG 及 Pathway 分析,发现 hsa-miRNA-100 靶基因功能主要富集于基因沉默、染色质沉默、负性调节细胞生物合成等($P < 0.01$),信号通路主要富集于肿瘤信号通路、溶酶体信号通路、凋亡信号通路等($P < 0.05$)。由于这些生物学功能涉及肿瘤发生、发展的多个阶段,据此可推测 hsa-miR-100 在多种肿瘤中表达异常,并通过调控其靶基因的表达进而引起多种生物学特性的变化。通过试验证实 hsa-miR-100 调控这些信号通路的具体机制,将进一步阐明 hsa-miR-100 参与肿瘤发生、发展的过程,为多种恶性肿瘤的诊断、治疗提供理论依据和试验基础。

参考文献

[1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[2] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. Development, 2005, 132(21): 4653-4662.

[3] Christodoulou F, Raible F, Tomer R, et al. Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity[J]. Nature, 2010, 463(7284): 1084-1088.

[4] Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks[J]. Bioinformatics, 2005, 21(16): 3448-3449.

[5] Nagaraja AK, Creighton CJ, Yu Z, et al. A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(2): 447-463.

[6] Li BH, Zhou JS, Ye F, et al. Reduced miR-100 expression in cervical cancer and precursors and its carcinogenic effect through targeting PLK1 protein[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(14): 2166-2174.

[7] Henson BJ, Bhattacharjee S, O'Dee DM, et al. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2009, 48(7): 569-582.

[8] Shi W, Alajez NM, Bastianutto C, et al. Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 126(9): 2036-2048.

[9] Gao W, Shen H, Liu L, et al. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(4): 557-566.

[10] Dai Y, Xie CH, Neis JP, et al. MicroRNA expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma with docetaxel-induced

multidrug resistance[J]. Head Neck, 2011, 33(6): 786-791.

[11] Vriens MR, Weng J, Suh I, et al. MicroRNA expression profiling is a potential diagnostic tool for thyroid cancer[J]. Cancer, 2011, 118(13): 3426-3432.

[12] Catto JW, Miah S, Owen HC, et al. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(21): 8472-8481.

[13] Doghman M, El WA, Cardinaud B, et al. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors[J]. Cancer Res, 2010, 70(11): 4666-4675.

[14] Cairo S, Wang Y, de Reynies A, et al. Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(47): 20471-20476.

[15] Lobert S, Jefferson B, Morris K. Regulation of beta-tubulin iso-types by micro-RNA 100 in MCF7 breast cancer cells[J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2011, 68(6): 355-362.

[16] Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, et al. Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis[J]. Urol Oncol, 2011, 29(3): 265-269.

[17] Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 136-146.

[18] Zhang H, Luo XQ, Zhang P, et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7826.

[19] de Oliveira JC, Scrideli CA, Brassesco MS, et al. Differential miRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features[J]. Leuk Res, 2012, 36(3): 293-298.

[20] Ng WL, Yan D, Zhang X, et al. Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line, M059J[J]. DNA Repair (Amst), 2010, 9(11): 1170-1175.

[21] Liu W, Gong YH, Chao TF, et al. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNAs gene in medulloblastomas[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(20): 2405-2411.

[22] Joyce CE, Zhou X, Xia J, et al. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(20): 4025-4040.

[23] Shimamura T, Imoto S, Shimada Y, et al. A novel network profiling analysis reveals system changes in epithelial-mesenchymal transition[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20804.

[24] Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, et al. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells[J]. Circulation, 2011, 123(9): 999-1009.

(收稿日期: 2012-05-23)