

DOI:10.3969/cmba.j.issn.1673-713X.2016.06.014

· 技术与方法 ·

生物信息学分析 mircoRNA 在乳腺癌中的调控网络

周嘉彬, 吕钰冰, 韩泽平, 何金花, 黎毓光, 朱剑霞

生物信息学是指综合应用信息科学、数学的理论、方法和技术来管理、分析和利用生物分子数据的一门科学。科学地利用生物分子数据及其分析结果,可以大大提高研究和开发的科学性及效率^[1]。miRNA (mircoRNA) 是一类由内源基因编码的长度为 20 ~ 24 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA。miRNA 能够与靶信使 RNAs (mRNAs) 3'-端非翻译区 (3'-UTR) 互补配对,阻碍 mRNA 翻译或使其稳定性降低而被降解,从而参与到转录后调控^[2]。近年许多研究表明,miRNA 在肿瘤的发生发展中起着重要的作用^[3-4]。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,是发达国家中引起女性死亡的第二大癌症(在发展中国家位居第一)^[5]。已有大量文献报道,多种 miRNAs 在乳腺癌的发生、发展及肿瘤的治疗过程中发挥着重要的作用^[6-8]。因此,探讨 miRNA 在乳腺癌细胞中的分子调控机制,能够为抗癌策略提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

目前生物学信息软件分为单机分析软件、在线分析软件和生物学数据库,利用生物信息学软件能够提示、指导、替代实验操作,利用对实验数据的分析所得的结论设计下一阶段的实验,本次论文所用到的生物学信息软件如下:

①人类 miRNA 疾病数据库 (HMDD v2.0, <http://www.cuilab.cn/hmdd>)

②miRwalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>)

③PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

④lncRNA 疾病数据库 (<http://www.cuilab.cn/lncrnadisease>)

⑤starBase v2.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>)

⑥TransmiR (<http://www.cuilab.cn/transmir>)

⑦Cytoscape 软件

1.2 方法

1.2.1 通过 HMDD v2.0 查询已证实与乳腺癌相关的 miRNAs,并将所有 miRNAs 进行汇总,筛选出有 14 篇或以上文献报道与乳腺癌相关的 miRNAs 作为研究对象。

1.2.2 运用 miRwalk 2.0 在线软件对上述 miRNAs 进行分析研究,筛选出各个 miRNAs 的共同的靶基因。

1.2.3 运用 PubMed 搜索上述靶基因与乳腺癌之间关系的论文,并筛选出与乳腺癌密切相关的 miRNA 的靶基因。

1.2.4 通过 lncRNA 疾病数据库查询与乳腺癌相关的 lncRNAs (long noncoding RNAs),并运用 starBase v2.0 对所得到的 miRNAs 和 lncRNAs 进行综合分析,得到与上述 miRNAs 相互作用的且与乳腺癌相关的 lncRNAs。

1.2.5 运用 TransmiR 在线软件查询上述 miRNAs 的转录因子并进行分析研究,筛选出 miRNAs 共同的转录因子,并通过 PubMed 查询所得转录因子与乳腺癌的关系,筛选出与乳腺癌相关的转录因子。

1.2.6 运用 Cytoscape 软件绘制出 miRNA 在乳腺癌中的分子调控网络。

2 结果

2.1 与乳腺癌相关的 miRNAs

通过 HMDD v2.0 查询已证实与乳腺癌相关的 miRNAs 共 243 个,其中有 14 篇或以上文献报道的 miRNA 有 hsa-mir-155、hsa-mir-200b、hsa-mir-200c 和 hsa-mir-21。其中 hsa-mir-155、hsa-mir-21 在乳腺癌的发生、发展过程中起到促进作用^[9-10],而 hsa-mir-200b、hsa-mir-200c^[11-12]起到抑制作用(表 1)。

表 1 HMDD v2.0 数据库中与乳腺癌相关的 miRNAs

miRNAs	文献报道数	在乳腺癌中的作用
hsa-mir-155	19	促进
hsa-mir-200b	14	抑制
hsa-mir-200c	18	抑制
hsa-mir-21	38	促进

2.2 与乳腺癌密切相关的 miRNA 的靶基因

运用 miRwalk 2.0 分析上述 4 个 miRNAs 的靶基因,其中 hsa-mir-155 共有 932 个靶基因,hsa-mir-200b 共有 202 个靶基因,hsa-mir-200c 共有 212 个靶基因,hsa-mir-21 共有 634 个靶基因。通过分析发现 SP1 (Sp1 transcription factors)、SUZ12 (suppressor of zeste 12 homolog) 和 KLHL42 (kelch like family member 42) 为 hsa-mir-155、

基金项目: 广州市番禺区中心医院青年基金 (2014-Q-03、2014-Q-05); 广东省建设中医药强省项目 (20141230); 广州市番禺区科技和信息化局项目 (2014-Z03-65)

作者单位: 511400 广东省广州市番禺区中心医院检验科

通信作者: 韩泽平, Email: hanzeping1987@126.com

收稿日期: 2016-09-12

表 2 与乳腺癌密切相关的 miRNA 的靶基因

miRNA	miRNA 的靶基因数量	4 个 miRNAs 的共同靶基因
hsa-mir-155	932	KLHL42
hsa-mir-200b	202	SP1*
hsa-mir-200c	212	SUZ12*
hsa-mir-21	634	

注：*表达缺失时可抑制乳腺癌生长。

hsa-mir-200b、hsa-mir-200c 和 hsa-mir-21 共同的靶基因。通过 PubMed 查询上述三个靶基因与乳腺癌的关系，发现当 SP1^[13-15]和 SUZ12^[16-18]表达缺失时可抑制乳腺癌的生长（表 2），然而未找到 KLHL42 与乳腺癌的相关报道。

2.3 与 miRNA 相互作用的乳腺癌相关的 lncRNA

通过 lncRNA 疾病数据库查询与乳腺癌相关的 lncRNAs 有 17 个，运用 starBase v2.0 对所得到的 miRNAs 和 lncRNAs 进行综合分析，发现 lncRNA XIST（X inactive-specific transcript）与 hsa-mir-155、hsa-mir-200b、hsa-mir-200c 和 hsa-mir-21 相互作用（图 1）。其中 XIST 在乳腺癌的发生、发展过程中起到促进作用^[19]。

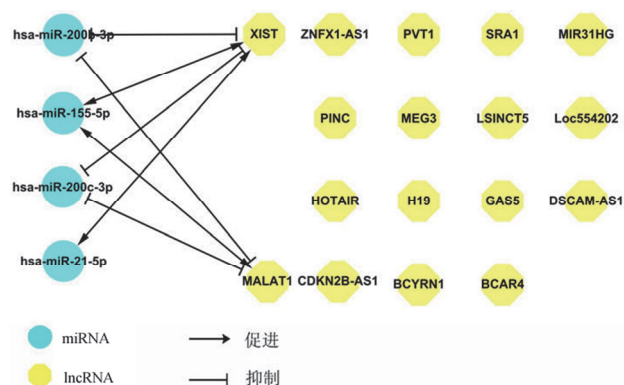


图 1 与 miRNA 相互作用的乳腺癌相关的 lncRNA

2.4 与乳腺癌密切相关的 miRNA 转录因子

运用 TransmiR 查询上述 miRNAs 的转录因子，其中 hsa-mir-155 有 16 个转录因子，hsa-mir-200b 有 13 个转录因子，hsa-mir-200c 有 14 个转录因子，hsa-mir-21 有 16 个转录因子。然而只有 TGFB1（transforming growth factor beta 1）是 hsa-mir-155、hsa-mir-200b、hsa-mir-200c 和 hsa-mir-21 唯一共同转录因子（图 2）。通过 PubMed 查询发现，TGFB1 在乳腺癌的发生、发展过程中起到促进作用^[20-21]。

2.5 运用 Cytoscape 软件绘制出 miRNA 在乳腺癌中的分子调控网络

从上述结果可知，hsa-mir-155、hsa-mir-200b、hsa-mir-200c 和 hsa-mir-21 这四个 miRNAs 可与其下游靶基因 KLHL42、SP1 和 SUZ12 的 mRNA 的 3'-UTR 配对结合，在转录水平调控其表达。其中 SP1 和 SUZ12 与乳腺癌的密切相关。而进一步的分析发现，hsa-mir-155、hsa-mir-200b、hsa-mir-200c 和 hsa-mir-21 亦受其上游的转

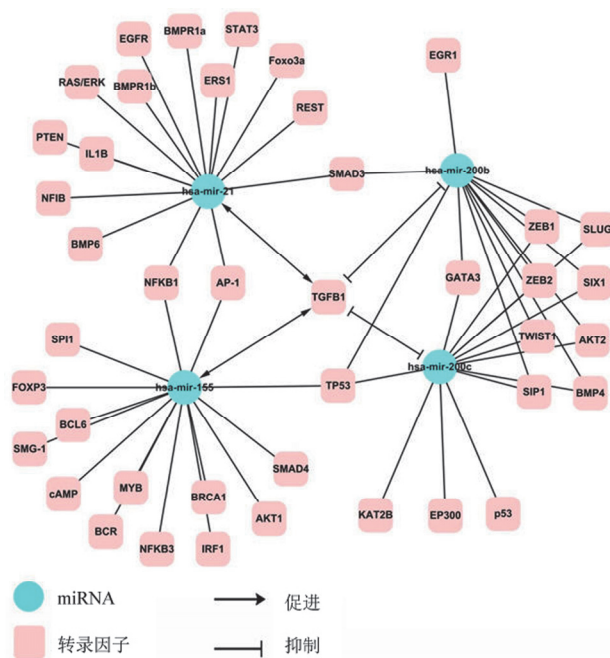


图 2 与乳腺癌密切相关的 miRNA 的转录因子

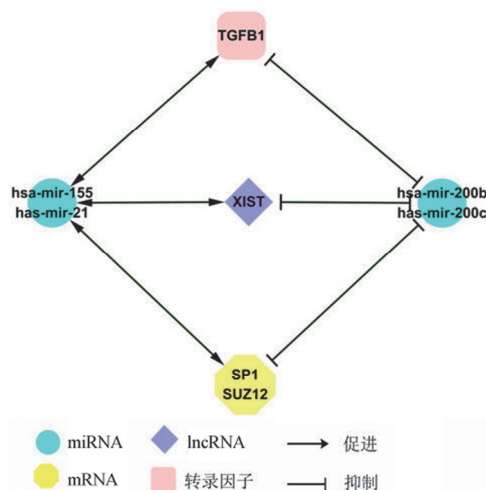


图 3 miRNA 在乳腺癌中的分子调控网络

录因子 TGFB1 调控，并且能够与 lncRNA XIST 相互作用，在乳腺癌发生发展中起着重要作用。如此所有的相关基因构成了一个 miRNA 在乳腺癌中的分子调控网络（图 3）。

3 讨论

miRNA 是一类进化上保守的，具有强大调控作用，与高等植物、动物的生长发育调节密切相关的单链非编码小 RNA。Lee 等^[22]在线虫发育时鉴定了第一个 miRNA lin-4，随后许多生物学家开始重新思考细胞遗传调控方面的重要问题。由于 miRNA 序列、结构、丰度和表达方式具有多样性，使其有成为 mRNA 编码蛋白质强有力调节子的可能，因此 miRNA 的出现丰富了人们对蛋白质合成调控的认识。随着 miRNA 分析技术的不断成熟，许多 miRNAs

的作用已被人所了解。目前认为 miRNA 是通过蛋白翻译水平的调控影响基因的表达,从而参与到造血、发育、病毒防御、器官形成、细胞增殖和凋亡等调节途径中。许多研究表明,miRNA 在糖尿病^[23]、心血管疾病^[24]、肿瘤^[25]等众多疾病中发挥着重要的作用。目前的研究主要致力于探索 miRNA 在肿瘤治疗中的作用^[26],以及如何通过抑制或促进 miRNAs 的表达来控制肿瘤细胞的增殖^[27]。

乳腺癌的发生是一个多因素参与的多阶段性过程,该病的具体病因及发病机制目前仍未明确。笔者通过 HMDD v2.0 查询发现该网站到 2014 年 6 月份为止一共收录了与乳腺癌相关的 miRNAs 243 个,探讨 miRNAs 与乳腺癌关系的论文一共有 319 篇。其中各种 miRNAs 在乳腺癌中的作用机制各有所异,并通过各种途径促进或抑制乳腺癌的发展。基于较多人认可的乳腺癌相关的 miRNA 的基础上,本文利用生物信息学分析技术进行综合分析,得出了一条与乳腺癌相关的分子调控网络,但该分子调控网络的可信度仍有赖于日后实验验证。在该网络中 SP1 和 SUZ12 在接受上游信号后是如何促进或抑制乳腺癌细胞增殖和转移的,具体的分子调控机制有待日后实验解决。

此乳腺癌的分子调控网络中,hsa-mir-155 和 hsa-mir-21 可通过抑制下游基因的表达从而促进乳腺癌细胞增殖和提高乳腺癌细胞的侵袭能力^[9-10],但未有文献报道在乳腺癌中 hsa-mir-155 和 hsa-mir-21 是如何调控 SP1 和 SUZ12 基因的表达。研究表明,hsa-mir-200b 和 hsa-mir-200c 可作用于 SP1 和 SUZ12 mRNA 的 3'-UTR 从而抑制 SP1 和 SUZ12 的表达,SP1 和 SUZ12 的表达降低可抑制乳腺癌细胞增殖并诱导乳腺癌细胞凋亡^[13,17]。TGFB1 表达增高可提高乳腺癌细胞的侵袭能力,促进乳腺癌细胞转移,降低乳腺癌患者的 5 年生存率^[21]。Neilsen 等^[28]发现在 p53 变异的乳腺癌细胞中,锌指蛋白 652 可直接抑制 hsa-mir-155 的转录因子 TGFB1、TGFB2 等的表达,从而降低乳腺癌细胞的侵袭与转移能力。Yu 等^[29]的研究中发现,在乳腺癌细胞中 TGFB1 可诱导 hsa-mir-21 与 MSH2 (mutS homolog 2) 结合而抑制其表达,从而促进乳腺癌细胞转移。Xu 等^[30]将乳腺癌细胞与间质干细胞混合培养,发现 TGFB1 可作用于 hsa-mir-200b 和 hsa-mir-200c 从而促进乳腺癌细胞上皮间质转换。XIST 是乳腺癌治疗预后的生物标志,当 XIST 高表达时乳腺癌的化疗效果差,同时影响乳腺癌患者的生存率^[19]。然而 XIST 与 miRNA 相互作用的机制有待日后实验探讨。

我们不难发现,当 TGFB1、XIST、hsa-mir-155、hsa-mir-21、SP1 和 SUZ12 表达活跃时能促进乳腺癌的发生,而 hsa-mir-200b 和 hsa-mir-200c 表达活跃时能抑制乳腺癌的发生。因此,在今后的工作中如何利用药物提高 hsa-mir-200b 和 hsa-mir-200c 的表达,以及降低 TGFB1、XIST、hsa-mir-155、hsa-mir-21、SP1 和 SUZ12 的表达可能成为以后治疗乳腺癌的重要研究方向。

综上所述,生物学信息分析技术是我们探讨 miRNA

通过何种途径在乳腺癌的发生、发展中起调控作用必不可少的技术。生物学信息分析和实验论证相结合能使我们更高效地研究乳腺癌的发病机制,为实现靶基因治疗提供更多的依据和可能。

参考文献

- [1] Ahmed A. Analysis of metagenomics next generation sequence data for fungal ITS barcoding: do you need advance bioinformatics experience? *Front Microbiol*, 2016, 7:1061.
- [2] Monroig PD, Calin GA. MicroRNA and epigenetics: diagnostic and therapeutic opportunities. *Curr Pathobiol Rep*, 2013, 1(1):43-52.
- [3] Zhao L, Zheng XY. MicroRNA-490 inhibits tumorigenesis and progression in breast cancer. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:4505-4516.
- [4] Xu H, Zhu J, Hu C, et al. Inhibition of microRNA-181a may suppress proliferation and invasion and promote apoptosis of cervical cancer cells through the PTEN/Akt/FOXO1 pathway. *J Physiol Biochem*, 2016. [Epub ahead of print]
- [5] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2):87-108.
- [6] Zhao L, Zheng XY. MicroRNA-490 inhibits tumorigenesis and progression in breast cancer. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:4505-4516.
- [7] Muhammad N, Bhattacharya S, Steele R, et al. Anti-miR-203 suppresses ER-positive breast cancer growth and stemness by targeting SOCS3. *Oncotarget*, 2016. [Epub ahead of print]
- [8] Cabello P, Pineda B, Tormo E, et al. The antitumor effect of metformin is mediated by miR-26a in breast cancer. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8):pii: E1298.
- [9] Tiago DM, Conceição N, Caiado H, et al. Matrix Gla protein repression by miR-155 promotes oncogenic signals in breast cancer MCF-7 cells. *FEBS Lett*, 2016, 590(8):1234-1241.
- [10] Kuang Y, Nie YJ. Exploration of the regulatory effect of miR-21 on breast cancer cell line proliferation and invasion as well as the downstream target genes. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(5):470-473.
- [11] Feng ZM, Qiu J, Chen XW, et al. Essential role of miR-200c in regulating self-renewal of breast cancer stem cells and their counterparts of mammary epithelium. *BMC Cancer*, 2015, 15:645.
- [12] Hong H, Yu H, Yuan J, et al. MicroRNA-200b impacts breast cancer cell migration and invasion by regulating Ezrin-Radixin-Moesin. *Med Sci Monit*, 2016, 22:1946-1952.
- [13] Yao Y, Hu J, Shen Z, et al. MiR-200b expression in breast cancer: a prognostic marker and act on cell proliferation and apoptosis by targeting Sp1. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(4):760-769.
- [14] Zhang L, Yang W, Zhu X, et al. p53 inhibits the expression of p125 and the methylation of POLD1 gene promoter by downregulating the Sp1-induced DNMT1 activities in breast cancer. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:1351-1360.
- [15] Li L, Gao P, Li Y, et al. Erratum to: JMJD2A-dependent silencing of Sp1 in advanced breast cancer promotes metastasis by downregulation of DIRAS3. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 156(1):207-208.
- [16] Peng F, Jiang J, Yu Y, et al. Direct targeting of SUZ12/ROCK2 by miR-200b/c inhibits cholangiocarcinoma tumourigenesis and metastasis. *Br J Cancer*, 2013, 109(12):3092-3104.
- [17] Iliopoulos D, Lindahl-Allen M, Polytarchou C, et al. Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol Cell*, 2010, 39(5):761-772.

- [18] Holm K, Hegardt C, Staaf J, et al. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(3):R36.
- [19] Schouten PC, Vollebergh MA, Opdam M, et al. High XIST and low 53BP1 expression predict poor outcome after high-dose alkylating chemotherapy in patients with a BRCA1-like breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(1):190-198.
- [20] Miret N, Pontillo C, Ventura C, et al. Hexachlorobenzene modulates the crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and transforming growth factor- β 1 signaling, enhancing human breast cancer cell migration and invasion. *Toxicology*, 2016, 366-367:20-31.
- [21] Ding MJ, Su KE, Cui GZ, et al. Association between transforming growth factor- β 1 expression and the clinical features of triple negative breast cancer. *Oncol Lett*, 2016, 11(6):4040-4044.
- [22] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5):843-854.
- [23] Estrella S, Garcia-Diaz DF, Codner E, et al. Expression of miR-22 and miR-150 in type 1 diabetes mellitus: Possible relationship with autoimmunity and clinical characteristics. *Med Clin (Barc)*, 2016, 147(6):245-247.
- [24] Wu XC, Jia YP. Research progress of miR-126 in cardiovascular diseases. *Chin J Clinicians (Electron Ed)*, 2016, 10(12):1800-1803. (in Chinese)
- 吴雪纯, 贾永平. miR-126 在心血管疾病中的研究进展. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2016, 10(12):1800-1803.
- [25] Pang C, Liu M, Fang W, et al. MiR-139-5p is increased in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(3):1111-1117.
- [26] Zhang X, Guo Q, Chen J, et al. Quercetin enhances cisplatin sensitivity of human osteosarcoma cells by modulating microRNA-217-KRAS axis. *Mol Cells*, 2015, 38(7):638-642.
- [27] He D, Wang J, Zhang C, et al. Down-regulation of miR-675-5p contributes to tumor progression and development by targeting pro-tumorigenic GPR55 in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*, 2015, 14:73.
- [28] Neilsen PM, Noll JE, Mattiske S, et al. Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155. *Oncogene*, 2013, 32(24):2992-3000.
- [29] Yu Y, Wang Y, Ren X, et al. Context-dependent bidirectional regulation of the MutS homolog 2 by transforming growth factor β contributes to chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(12):1633-1642.
- [30] Xu Q, Wang L, Li H, et al. Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- β . *Int J Oncol*, 2012, 41(3):959-968.

· 协会之窗 ·

生物诊断新技术与新材料学术峰会召开

10 月 29 日, 中国医药生物技术协会生物诊断技术分会“生物诊断新技术与新材料”专业学组成立暨首届学术峰会在烟台召开。

协会吴朝晖秘书长、生物诊断技术分会主任委员李银太、烟台市副市长张代令及 100 余位来自全国生物治疗领域的专家、教授、医师及科研工作者出席了开幕式, 开幕式由生物诊断技术分会副主任委员张贺秋主持。

开幕式上, 李银太教授代表主办方致开幕辞, 对参与本次大会的嘉宾表示了热烈的欢迎和诚挚的感谢, 烟台市副市长张代令代表举办地致欢迎辞, 对大会的顺利召开表示由衷的祝贺, 对峰会在烟台举办表示十分的欢迎与感谢! 协会吴朝晖秘书长代表协会致辞。

会议中来自中美两国的多位专家分享了 14 场精彩纷呈的学术报告, 在展示各自领域研究成果, 交流行业发展动态的同时, 与参会嘉宾积极交流探讨, 促进了生物诊断领域的技术交流与合作, 本次大会将对我国生物诊断产业健康、稳定、快速发展产生正积极的作用。