DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201804001

hsa-miR-192-3p 的靶基因预测及功能分析

刘超群,张新生 ,张 越*
(沈阳医学院 公共卫生学院职业卫生教研室, 沈阳 110034)

摘 要:通过生物信息学方法预测 hsa-miR-192-3p 的靶基因及其靶基因的可能功能。首先通过 miRbase 在线数据库对 hsa-miR-192-3p 的碱基序列及序列在各物种间的保守性进行分析,再通过 miRGator v3.0 在线数据库查看 hsa-miR-192-3p 在各个组织器官中的表达丰富度情况;其次,应用 TargetScan 和 miRanda 在线数据库预测 hsa-miR-192-3p 的靶基因;最后,将预测得到的两个数据库的靶基因交集用 DAVID 在线数据库进行功能富集分析和信号转导通路富集分析。结果表明:hsa-miR-192-3p 在人、家鼠、猕猴等生物中存在高度保守性;hsa-miR-192-3p 在胃肠道、肾脏、肝胆系统、干细胞、鼻、脾、胸腺中表达丰富度较高;通过两个靶基因预测软件预测的靶基因取交集后共有 190 个;功能富集分析发现 hsa-miR-192-3p 靶基因富集在细胞质、细胞核、质膜、高尔基体等 15 个细胞组件($p<0.05$),参与蛋白结合、GTP 酶活性、锌离子跨膜转运蛋白活性等 7 个分子功能($p<0.05$),涉及金属离子运输、RNA 聚合酶 II 启动子的转录阳性调控、基因表达调节、钙离子跨膜运输、胚胎发育等 18 个生物过程($p<0.05$);预测靶基因集合显著富集于癌症通路与催乳素信号通路中($p<0.05$)。得出结论:hsa-miR-192-3p 预测的靶基因集合富集于多个生物过程,与肿瘤密切相关,生物信息预测为今后的研究奠定了一定的理论基础,为后续实验验证提供了研究方向。

关键词:hsa-miR-192-3p;信号转导通路;功能富集分析;癌症
中图分类号:R34 **文献标志码**:A **文章编号**:1672-5565(2018)04-262-07

Prediction of hsa-miR-192-3p target gene and bioinformatics analysis

LIU Chaoqun, ZHANG Xinsheng, ZHANG Yue*
(*Department of Labor Hygiene and Environmental Hygiene*, *School of Public Health*, *Shenyang Medical College*, *Shenyang* 110034, *China*)

Abstract: This paper predicts the target genes and potential functions of hsa-miR-192-3p by bioinformatics methods. Firstly, the amino acid sequence of hsa-miR-192-3p and the conservation of the sequence between species were analyzed by the miRbase online database, and the expression abundance of hsa-miR-192-3p in tissues and organs was obtained through the miRGator v3.0 online database. The target genes of hsa-miR-192-3p were then predicted by TargetScan and miRanda online database. Finally, the predicted target gene set was subjected to functional enrichment analysis and signal transduction pathway enrichment analysis using the DAVID online database. Results show that hsa-miR-192-3p was highly conserved in humans, mice, macaques, and other organisms, and it was highly expressed in gastrointestinal tract, kidney, hepatobiliary system, stem cells, nasal, spleen, and thymus. A total of 190 target genes were predicted by the two target gene prediction softwares. Functional enrichment analysis revealed that the hsa-miR-192-3p target genes were enriched in 15 cellular components ($p<0.05$) such as cytoplasm, nucleus, plasma membrane, and Golgi apparatus, involved in protein binding, GTPase activity, zinc ion transmembrane transporter activity, and other 7 molecular functions ($p<0.05$), and related to eighteen biological processes ($p<0.05$) including metal ion transport, transcriptional positive control of RNA polymerase II promoter, gene expression regulation, calcium transmembrane transport, embryonic development and so on. The

收稿日期:2018-04-01;**修回日期**:2018-07-12.
基金项目:国家自然科学基金面上项目(81070128);沈阳市“高层次创新人才计划”项目(No.RC170408);辽宁省重点研发计划(No.2018225013);沈阳医学院硕士研究生科研创新基金项目(No.Y20170609);沈阳中青年创新支持计划(No.RC180379);教育部留学启动基金(No.20121707);人力资源与社会保障部科技项目择优资助(No.2015).
作者简介:刘超群,女,硕士研究生,研究方向:非编码 RNA 与心衰。E-mial:3320912426@qq.com.
*通信作者:张越,女,副教授,硕士生导师,研究方向:非编码 RNA 与心衰。E-mial:ziseputi@qq.com.

predicted target gene set was significantly enriched in cancer and in prolactin signaling pathways($p<0.05$). It can be concluded that the target gene set predicted by hsa-miR-192-3p is enriched in multiple biological processes and is closely related to tumors. Bioinformatics prediction lays a certain theoretical foundation for future research and provides experimental directions for subsequent experimental verification.

Keywords:Hsa-miR-192-3p; Signal transduction pathway; Functional enrichment analysis; Cancer

miRNAs(microRNAs)是一类长度约为 19~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA,由长度约为 60~70 nt 具有发夹结构的 pre-miRna(Precursor microRna)经 Dicer 酶剪切而来,普遍存在于各种生物中,人类细胞中约有 1/3 的蛋白编码基因受 miRNAs 的调控,主要通过与信使 RNA(mRNA)的 3'非编码(3'-UTR)区结合,抑制 mRNA 翻译或促进其降解,从而在转录后水平负性调控靶基因的表达[1]。不同时间、不同疾病、不同组织和细胞中 miRNA 的表达水平有显著差异。miRNA 与多种疾病的发生发展都有密切联系,在肿瘤、心血管疾病、糖尿病等等疾病中都有举足轻重的作用,因而深入研究 miRNA 具有重要意义。研究表明,miRNAs 参与了许多生命活动过程的调节,包括机体生长发育、激素分泌、信号转导、细胞增殖、凋亡、分化以及对外界环境变化的应答等过程[2]。

hsa-miR-192-3p 位于染色体 11q13.1,近年研究结果显示肾病、胃癌、结肠癌等疾病都与 miR-192-3p 的失调有关[3-5]。有研究提示 miR-192 与肾癌有关[6],Lokeshwar SD 和 Talukder A 等人用正常和肿瘤标本通过 qPCR 分析 7 个异常表达的 miRNA,其中 miR-192 下调 3~60 倍。然而,对 miRNAs 具体作用机制的认识仍然存在局限,如许多 miRNA 的靶基因没有确定,并且对其进行靶基因分析和鉴定的难度较大。因此,准确的预测 miRNA 的靶基因并对预测出来的靶基因进行生物信息学分析是研究 miRNA 作用机制的关键。

目前已有很多工作者使用生物信息学工具进行数据分析,常凯、江忠勇等人发表在重庆医科大学学报上的文章就曾用过 TargetScan、miRanda 和 DAVID 等数据库进行预测分析[7]。本研究也将综合多种生物信息学工具预测 hsa-miR-192-3p 的靶基因并对其进行表达分析、功能富集分析和信号转导通路富集分析,进一步挖掘数据中的生物学知识为后续的功能研究提供理论依据和数据支持。

1　材料与方法

1.1　hsa-miR-192-3p 的保守性分析

通过 miRbase(http://www.mirbase.org/)和 UCSC(http://genome.ucsc.edu/)在线数据库分析 hsa-miR-192-3p 在各物种之间的保守性。

1.2　hsa-miR-192-3p 在各组织中的表达情况

通过 miGator v3.0(http://mirgator.kobic.re.kr/)数据库查看 hsa-miR-192-3p 在各个组织器官中的表达情况,在 miGator v3.0 数据库中输入 hsa-miR-192-3p 后,查询结果。miGator v3.0 汇编了 GEO、TCGA 等机构发布的 70 多个人类 miRNA 深度测序数据集,使用者可以通过 miGator v3.0 数据库在线查询所研究的 miRNA 的序列和表达情况。

1.3　hsa-miR-192-3p 的靶基因预测

运用 TargetScan 和 miRanda 两种靶基因预测软件。TargetScan 是目前应用最为广泛的,这款软件的算法提出了一个新概念即种子匹配(Seed match),其定义是靶基因 mRNA 的 3'UTR 非编码区上的一段 7nt(Nucleotide)与 miRNA 的 5'端的 2~8 位碱基完全互补的序列,miRNA 上的这 7 个核苷酸叫做 miRNA 的种子区,软件还同时考虑了序列在各个物种之间的保守性来进行分析预测。miRanda 是开发的第一个预测靶基因的软件,不会受到物种的限制,因而适用范围较为广泛。Betel 等人在传统的 miRNA 与靶基因碱基的要求之外更新了算法 mirSVR,作为一种新方法,mirSVR 不需要种子区亚类(Seed subclasses),将靶点位置序列与结构特征(Contextual features)结合分析,并进行回归分析。通过 TargetScan 7.2(http://www.targetscan.org/vert_72/)和 miRanda(http://www.microrna.org/)两种在线数据库预测 hsa-miR-192-3p 的靶基因,取两个数据库预测结果的交集,以便进行下一步研究。

1.4　hsa-miR-192-3p 靶基因的功能富集分析

DAVID 6.8(https://david.ncifcrf.gov/)是一个生物信息数据库,整合了生物学数据和分析工具,为大规模的基因或蛋白列表提供系统综合的生物功能注释信息,帮助用户从中提取生物学信息。DAVID 工具目前可以实现以下功能:识别富集的生物条目;发现功能相关的基因集合;聚类注释条目;寻找其他功能相关的但是不在列表中的基因;列出相互作用的蛋白质,此外,DAVID 还可以进行基因 ID 的转换。

将靶基因的交集进行功能富集分析,通过

DAVID 在线分析工具对靶基因交集进行功能富集分析,选择本物种所有的基因作为背景基因,以 P < 0.05 为显著性阈值,得到的功能注释相对于背景具有统计意义。

1.5 hsa-miR-192-3p 靶基因的信号转导通路富集分析

将 2 个在线数据库预测到的 hsa-miR-192-3p 的靶基因交集,采用 DAVID 6.8 在线数据库进行信号转导通路富集分析,以 P <0.05 为显著性阈值,得到基因集合的信号转导通路相对于背景具有统计学意义。

2 结果分析

2.1 hsa-miR-192-3p 的保守性分析

通过 miRbase 和 UCSC 在线数据库对 hsa-miR-192-3p 进行保守性分析,发现 miRbase 及 UCSC 均显示此 miRNA 在人、鸭嘴兽、家鼠、褐家鼠、等多个物种之间具有高度保守性(P<0.05),如表 1 所示,提示 hsa-miR-192-3p 具有潜在的重要生物学功能。

表 1 不同物种 hsa-miR-192-3p 成熟序列

Table 1 Mature sequence of hsa-miR-192-3p in different species

ID	miRNA	保守序列
MIMAT0004543	hsa-miR-192-3p	CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAG
MIMAT0007017	oan-miR-192-3p	CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAG
MIMAT0017012	mmu-miR-192-3p	CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAG
MIMAT0017147	rno-miR-192-3p	CUGCCAGUUCCAUAGGUCACAG
MIMAT0026835	mml-miR-192-3p	UGCCAAUUCCAUAGGUCACAG
MIMAT0036025	chi-miR-192-3p	CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAGG

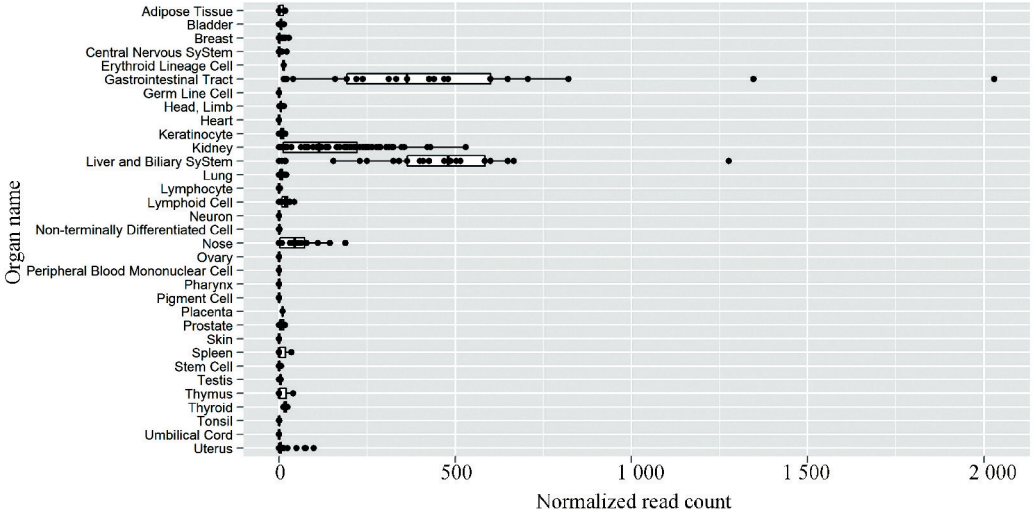

图 1 hsa-miR-192-3p 在各个组织器官中的表达情况

Fig.1 Expression abundance of hsa-miR-192-3p in organs

2.2 hsa-miR-192-3p 的表达情况分析

hsa-miR-192-3p 在各个器官的表达情况,下载结果图片见图 1,其中在胃肠道、肾脏、肝胆系统、干细胞、鼻、脾、胸腺中表达丰富度较高。

2.3 hsa-miR-192-3p 的靶基因预测

TargetScan 预测的 hsa-miR-192-3p 靶基因数量为 3 477 个,miRanda 预测的靶基因个数为 886 个,两个数据库预测的靶基因取交集共筛选出 190 个靶基因,其中包括与癌症信号通路和催乳素信号通路相关的基因,与癌症信号通路相关的靶基因为 *BCL2L*11、*CCND*2、*ZEB*2 等,与催乳素信号通路相关的靶基因为 *ELF*5、*ESR*1、*SOCS*5 等。

2.4 hsa-miR-192-3p 靶基因的功能富集分析

将 2 个数据库都预测到基因交集的 190 个 hsa-miR-192-3p 的靶基因用 DAVID 数据库作功能富集分析发现 hsa-miR-192-3p 的靶基因富集在细胞质、细胞核、质膜、高尔基体等 15 个细胞组件(p<0.05),参与蛋白结合、GTP 酶活性、锌离子跨膜转运蛋白活性、转录激活因子等 7 个分子功能(p<0.05),涉及金属离子运输、RNA 聚合酶 II 启动子的转录阳性调

控、基因表达调节、钙离子跨膜运输、胚胎发育等 18 个生物过程($p<0.05$),结果见表 2。

表 2　hsa-miR-192-3p 靶基因功能富集分析部分结果

Table 2　Functional enrichment analysis of target genes of hsa-miR-192-3p

GO 号	Term	基因数/个	*P* 值
GOTERM_BP_DIRECT			
GO:0006829	zinc II ion transport	3	3.0×10^{-3}
GO:0007420	brain development	8	4.3×10^{-3}
GO:0006351	metal ion binding	34	4.9×10^{-3}
GO:0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	20	8.6×10^{-3}
GO:0040029	regulation of gene expression, epigenetic	3	9.5×10^{-3}
GO:0000122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	16	1.0×10^{-2}
GO:0001701	in utero embryonic development	7	1.5×10^{-2}
GO:0008360	regulation of cell shape	6	1.7×10^{-2}
GO:0006357	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	11	2.0×10^{-2}
GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	12	2.2×10^{-2}
GOTERM_CC_DIRECT			
GO:0031526	brush border membrane	5	1.7×10^{-3}
GO:0005634	nucleus	73	3.2×10^{-3}
GO:0055037	recycling endosome	6	5.1×10^{-3}
GO:0015629	actin cytoskeleton	8	6.6×10^{-3}
GO:0005886	plasma membrane	56	1.2×10^{-2}
GO:0005737	cytoplasm	68	1.2×10^{-2}

2.5　hsa-miR-192-3p 靶基因的信号转导通路分析

利用 DAVID 数据库对基因集合的 190 个候选靶基因进行生物通路富集分析。结果显示,预测靶基因集合显著富集于催乳素信号通路与癌症通路($P<0.05$),结果如表 3 所示;并给出两个信号通路图,截获结果如图 2、图 3 所示。

表 3　hsa-miR-192-3p 靶基因的信号转导通路富集分析结果

Table 3　Signal pathway enrichment analysis of target genes of hsa-miR-192-3p

ID	Term	基因数/个	*P* 值
hsa05206	MicroRNAs in cancer	7	2.6×10^{-2}
hsa04917	Prolactin signaling pathway	4	3.6×10^{-2}

3　讨　论

近年来,许多研究表明,miRNA 与多种癌症有关,相关 miRNA 可能起到原癌基因或者抑癌基因的作用。因此,通过利用在线数据库预测 miRNA 调控的靶基因,进而研究 miRNA 的生物学功能,对临床疾病尤其是癌症的诊断与治疗具有重要的价值。

本研究中,两个数据库预测的 hsa-miR-192-3p 靶基因取交集后共 190 个,其中癌症信号通路的靶基因有 *BCL2L*11、*CRK*、*CCND*2、*IGF*2*BP*1、*ITGB*3、*ZEB*2。一些研究已经表明 hsa-miR-192 与癌症具有相关性,包括乳腺癌[8]、肺癌[9]、膀胱癌[10]、肝癌[11]、结肠直肠癌[12]和急性淋巴细胞白血病[9]等。本研究预测出来的两条通路,其中一条就是癌症通路,hsa-miR-192-3p 的部分靶基因聚集在肺癌和乳腺癌的通路中,且另一条通路是催乳素信号通路,两个通路存在共同的靶基因 *CCND*2,说明 *CCND*2 在癌症疾病中起着重要的作用,尤其是在乳腺癌中,已有相关报道证明 *CCND*2 和乳腺癌有关,报道在肿瘤和正常组织之间差异表达的基因共有 9 个,其中一个基因就是 *CCND*2[13]。已有相关报道证明 *BCL2L*11 与乳腺癌和肺癌具有相关性;*ZEB*2 与食管癌,骨肉瘤,直肠癌等癌症有关。Matsumoto R 和 Tsuda M 等人的研究发现 *CRK* 可引起浸润性膀胱癌的发生,*CRK* 可能是膀胱癌的一个有效分子靶点,特别是对于预防癌细胞转移[14]。另有研究表明 miR-126/CRK 轴的失调可能促进人胃癌的恶性进

展,miR-126 和 CRK 联合表达可作为晚期胃癌患者总生存期的独立预测因子[15]。Elmansuri A 和 Tanino MA 等人在人肺癌组织中观察到 *CRK* 的过度表达,并且与不良预后显著相关[16]。Baudry D 癌症和 Faussillon M 等人检测到 *CCND*2 在肾母细胞瘤中特异性上调[17]。

上述这些已经证明与癌症有关的本基因都是本研究对 has-miR-192-3p 进行生物信息预测出来的靶基因,说明 has-miR-192-3p 很可能与癌症有关,并通过这些基因在癌症的发生发展中起到关键作用,另外那些没有得到验证与癌症有关的靶基因很可能也在疾病中起到关键作用,本研究预测的两条通路中富集的靶基因就具有很好的提示作用,这些基因都可能与癌症的发生发展有关,虽然癌症机制还尚未完全清楚,但本研究为以后研究癌症机制提供了线索和方向。

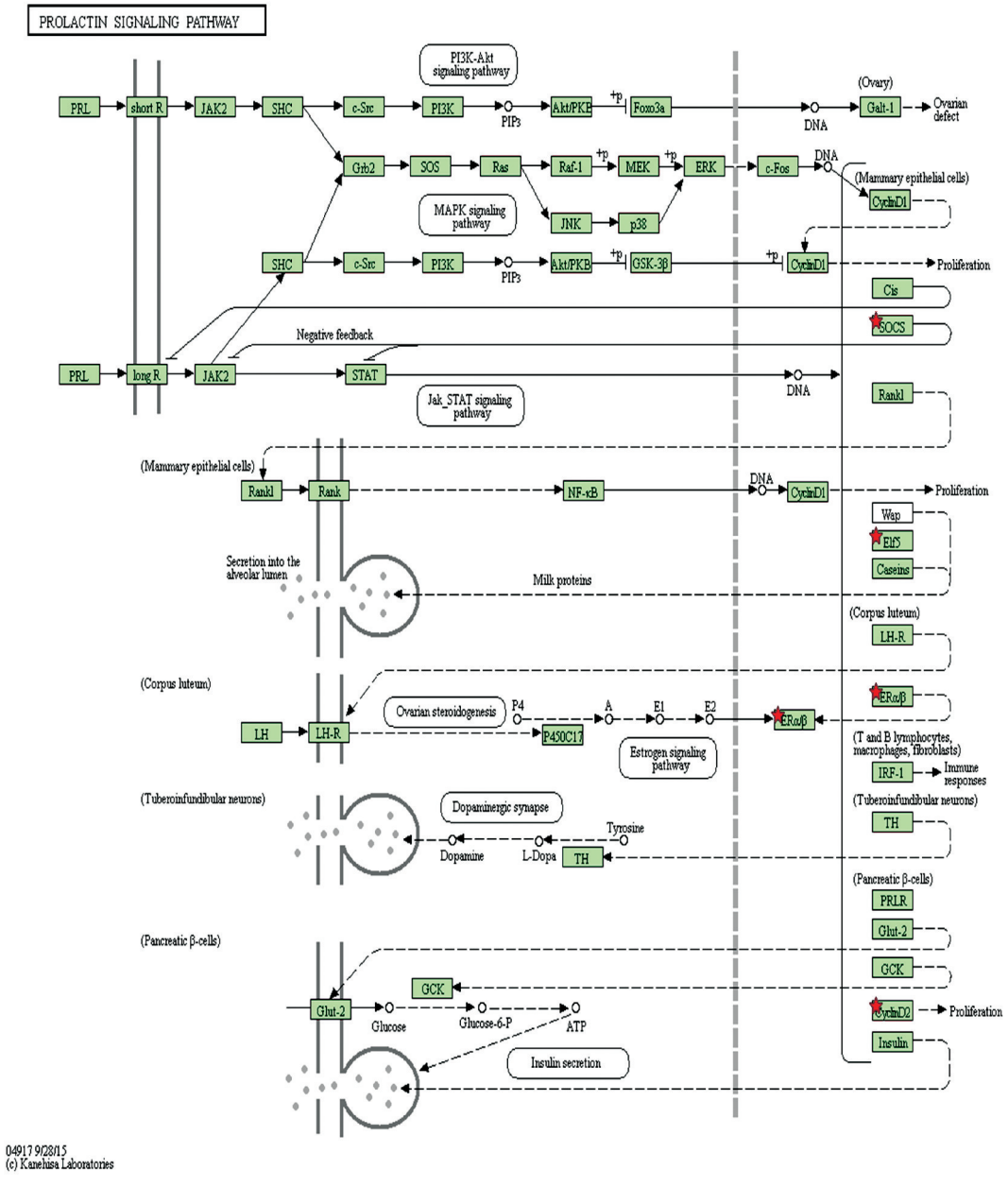

图 2 hsa-miR-192-3p 的靶基因参与催乳素信号通路信

Fig.2 Target genes of hsa-miR-192-3p articipated in prolactin signal pathway

注:红色五角星:hsa-miR-192-3p 靶基因;绿色方块:催乳素信号通路基因(彩图详见电子版:http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx2018 年第 4 期)。

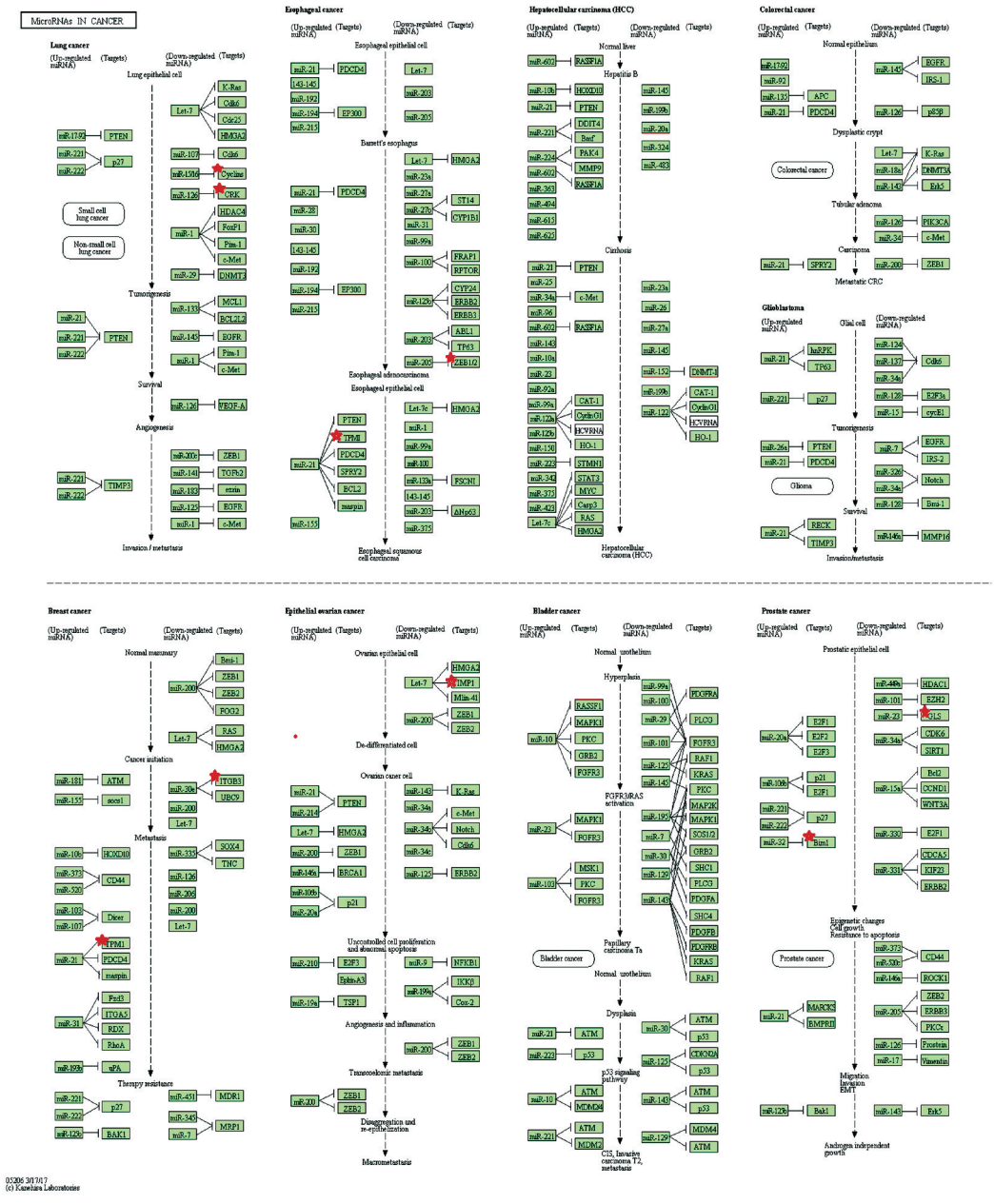

图 3　hsa-miR-192-3p 的预测靶基因参与癌症信号通路

Fig.3　Predicted target genes of hsa-miR-192-3p articipated in cancer signal pathway

注:红色五角星:hsa-miR-192-3p 靶基因;绿色方块:癌症信号通路基因(彩图详见电子版:http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx)。

4　结　论

(1)hsa-miR-192-3p 在肿瘤中的作用不可忽视。

(2)通过生物信息学预测软件进行靶基因预测,得到靶基因集合,并对靶基因集合进行分子功能、生物过程和信号转导通路富集分析,使我们对 hsa-miR-192-3p 靶基因所参与的分子功能、生物过程等有一个较为全面的认识,已有研究报道,miR-192-3p 与其靶基因在肿瘤中的作用与本文中的分析结果一致,生物信息学分析方法具有一定的可靠性,但生物预测所得到的靶基因会有假阳性的情况存在,所以还需进一步的 RT-PCR、荧光素酶报告基因,MTS、Western blotting 等实验对预测所得的靶基因和其所参与的生物学功能等进行验证。

(3)生物预测分析为后期深入研究 miRNA 在疾病中的作用机制提供了一定的方向和思路。

参考文献(References)

[1]CHUA J H, ARMUGAM A, JEYASEELAN K, et al. MicroRNAs: Biogenesis, function and applications[J].Current

Opinion in Molecular Therapeutics , 2009, 11(2):189-199.

[2]WANG J, FANG M, LIU X Y, et al. A novel GATA4 mutation responsible for congenital ventricular septal defects [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2011 , 28 (4) :557-564. DOI: 10.3892/ijmm.2011.715. Epub 2011 Jun 1.

[3]JASWANI P, PRAKASH S,PRASAD N, et al. Predicting miRNA association with corresponding target genes and single nucleotide polymorphisms in altered renal pathophysiology[J]. Microrna, 2017, 6(3): 213-221.DOI: 10.2174/2211536606666171016151846.

[4]SMID D, KULDA V, SRBECKA K,et al. Tissue microRNAs as predictive markers for gastric cancer patients undergoing palliative chemotherapy [J]. International Journal of Oncology , 2016, 48(6): 2693-2703.DOI: 10.3892/ijo.2016.3484. Epub 2016 Apr 12.

[5] KRATTINGER R, BOSTRÖM A, SCHIÖTH H B, et al. MicroRNA-192 suppresses the expression of the farnesoid X receptor[J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology, 2016, 310(11): 1044-1051.DOI: 10.1152/ajpgi.00297.2015.

[6]LOKESHWAR S D, TALUKDER A, YATES T J, et al. Molecular characterization of renal cell carcinoma: A potential three-microRNA prognostic signature[J]. Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention, 2018, 27(4): 464-472. DOI:10.1158/1055-9965.EPI-17-0700.

[7]常凯,江忠勇,任俊龙,等. 糖尿病肾病相关 miR-130b-3p 靶点的生物信息学预测[J]. 重庆医科大学学报,2018,(6):788-792.DIO:10.13406/j.cnki.cyxb.001413.

CHANG Kai, JIANG Zhongyong, REN Junlong, et al. Bioinformatics prediction of miR-130b-3p target genes associated with diabetic nephropathy[J].Journal of Chongqing Medical University, 2018, (6): 788 - 792. DIO: 10. 13406/j. cnki. cyxb.001413.

[8]XIANG M, ZENG Y, YANG R, et al. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs[J]. Biochemical Biophysical Research Communication, 2014, 454 (1): 210 - 214. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2014.10.064.

[9]CAO J, HE Y, LIU H Q, et al. MicroRNA 192 regulates chemo-resistance of lung adenocarcinoma for gemcitabine and cisplatin combined therapy by targeting Bcl-2[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 8(8): 12397-12403.

[10]HU Yingbo, CHENG Cheng, HONG Zhengdong, et al. Independent prognostic miRNAs for bladder urothelial carcinoma[J]. Oncology Letters, 2017, 14(3): 3001-3005. DOI: 10.3892/ol.2017.6471.

[11]ZHU H T, LIU R B, LIANG Y Y, et al. Serum microRNA profiles as diagnostic biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma[J]. Liver International Official Journal of the International Association for the Study of the Liver, 2017, 37(6): 888-896.

[12]CARTER J V, ROBERTS H L, PAN J, et al. A highly predictive model for diagnosis of colorectal neoplasms using plasma microRNA: Improving specificity and sensitivity [J]. Annals of Surgery, 2016, 264(4): 575-584.DOI: 10.1097/SLA.0000000000001873.

[13]LI Z, HENG J, YAN J, et al. Integrated analysis of gene expression and methylation profiles of 48 candidate genes in breast cancer patients[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2016, 160(2): 371-383.

[14]MATSUMPTO R, TSUDA M, WANG L, et al. Adaptor protein CRK induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells through HGF/c-Met feedback loop[J]. Cancer Science, 2015, 106(6): 709-717.

[15]FENG R, SAH B K, BEEHARRY M K, et al.Dysregulation of miR-126/Crk protein axis predicts poor prognosis in gastric cancer patients [J]. Cancer Biomarkers, 2017, 21 (2): 335-343.DOI: 10.3233/CBM-170472.

[16]ELMANSURI A Z, TANINO M A, MAHABIR R, et al. Novel signaling collaboration between TGF-β and adaptor protein Crk facilitates EMT in human lung cancer[J].Oncotarget, 2016, 7(19):27094-27107. DOI:10.18632/oncotarget.8314.

[17]BAUDR Y D, FAUSSILLON M, CABANIS M O, et al. Changes in WT1 splicing are associated with a specific gene expression profile in Wilms' tumour[J]. Oncogene, 2002, 21 (36): 5566 - 5573. DOI: 10. 1038/sj. onc. 1205752.