

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201903009

# 结肠癌中核内 miRNA 的激活调控作用研究

邹小龙\*, 董雪松, 孙学溥

(哈尔滨医科大学 附属第一医院普外科, 哈尔滨 150001)

**摘要:**为了探究增强子介导的核内 miRNA 在结肠癌发生中的作用,本研究筛选了结肠癌中的差异表达的 miRNA 数据、结肠的特异性增强子数据、结肠癌中差异表达基因数据,利用细胞核内 miRNA 靶向增强子预测算法,筛选 miRNA 调控的结肠特异性增强子;利用增强子靶基因预测数据,筛选核内 miRNA 调控的差异表达靶基因,并且构建核内 miRNA-靶基因网络,并通过网络的分析 and 筛选获得结肠癌中关键的致病基因,同时对网络中的靶基因进行 GO 的功能注释。结果表明,我们所构建的核内 miRNA-激活调控靶基因网络包含 miRNA-靶基因关系对 2 121 个,259 个节点,其中包含 34 个下调基因、183 个上调的基因,7 个下调的 miRNA,35 个上调的 miRNA。而后我们分析了网络进行的节点度的整体分布情况,发现网络中大部分的节点的度都是小于 10 的,仅有少量 miRNA 结合和部分的差异表达基因节点的度大于 10。核内 miRNA 主要通过激活调控了一些应激反应相关的功能和,同时,抑制调控了细胞周期、细胞凋亡、细胞死亡巨噬细胞代谢等相关功能,通过激活和抑制相关功能诱发结肠癌的发生。从核内 miRNA 的激活调控角度研究结肠癌的发病机制,是对原有细胞浆中 miRNA 抑制调控机制的补充,也为结肠癌的系统研究提供了新的视野。

**关键词:**结肠癌;miRNA-增强子-靶基因网络;核内 miRNA

**中图分类号:**Q522 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2019)02-111-05

## Activation regulation of nuclear miRNA regulation in colon cancer

ZOU Xiaolong\*, DONG Xuesong, SUN Xuepu

(Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University Heilongjiang, Harbin 150001, China)

**Abstract:** To explore the role of enhancer-triggered nuclear miRNAs in colon cancer, this study selects the differentially expressed miRNA data, the colon specific enhancer data, and the differentially expressed gene data in colon cancer. The colon specific enhancers were screened using miRNA targeting enhancer prediction algorithm. Together with enhancer and target gene data, the nuclear miRNA triggered genes were filtered. The nuclear miRNA-target gene network was constructed by integrating all the data above. Topological properties of the network were analyzed, and the key pathogenic genes were found in the network. Finally, Gene Ontology annotation was conducted to all the target genes. Results showed that the miRNA-activated gene network contained 2 121 miRNA-target gene pairs and 259 nodes in total, including 34 down-regulated genes, 183 up-regulated genes, 7 down-regulated miRNAs, and 35 up-regulated miRNAs. Then we found that most of the nodes degrees in the network were less than 10, and only a small group of miRNAs and some of the differentially expressed gene nodes had higher degrees. Therefore, nuclear miRNAs mainly regulated some stress-related functions through activating gene expression. At the same time, they negatively regulated the cell cycle, apoptosis, cell death, macrophage metabolism, and other related functions. Study on the pathogenesis of colon cancer from the activation regulation of nucleus miRNAs is a supplement to its negative regulation mechanism in cell cytoplasm, and provides a new insight for the systematic study in colon cancer.

**Keywords:** Colon cancer; miRNA-enhancer-gene network; Nuclear miRNA

收稿日期:2019-03-27;修回日期:2019-04-19.

基金项目:黑龙江省教育厅课题资助(No. 11551207).

\*通信作者:邹小龙,男,博士,研究方向:外科学,生物信息学. E-mail: zouxiaolongbs@163.com.

2018年全球癌症报告结果显示,结肠癌的发病率仍高居前五位。近几年来我国患上结肠癌的人数每年都在增加,结肠癌是我国常见的消化道肿瘤之一,具有发病率高、早期治愈率高的特点。尽管在众多研究人员与临床医生的共同努力下结肠癌的诊治技术及疗效已经有很大的提高,但是结肠癌的患者仍逐年增加<sup>[1]</sup>。目前,众多研究主要是针对结肠癌发病机制的众多研究仍不够深入,对疾病本身的发生、发展机制尚不够深入,因而没有一个高效的诊疗测序对结肠癌的发生进行有效的预防和预警。

迄今为止的 miRNA 和基因表达之间的关系研究主要集中在 miRNA 的 3' 非编码区域的负向调控基因的翻译过程。但随着 miRNA 作用机制研究的深入,有研究发现 miRNA 在细胞核内也存在通过增强子介导而激活基因表达的调控机制<sup>[2]</sup>。那么利用 miRNA 细胞核内调控机制,我们利用生物信息的多种分析方法对结肠癌的 miRNA 和基因进行补充性分析,从而为结肠癌发病的研究提供新的视角。

通过整合多个数据库的 miRNA、基因表达谱数据,结肠特异的增强子数据,通知利用 miRNA 增强子预测算法对上述数据进行系统的整合分析,并构建 miRNA-增强子-靶基因调控网络,并对网络进行拓扑学分析,最后通过分析网络中差异表达基因的功能,发现了多个与结肠癌发生密切相关的生物学功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 miRNA 表达数据

从 HMDD V3.0 数据库<sup>[3]</sup>(<http://www.cuilab.cn/hmdd>)筛选得到了被多篇文献证实结肠癌中差异表达的 miRNA 信息。

### 1.2 基因表达数据

从 CoRECG 数据库<sup>[4]</sup>(<http://lms.snu.edu.in/corecg/>)下载至少被一篇文献报道过在结肠癌样本中差异表达的基因数据。

### 1.3 增强子及其调控靶基因的关系数据

从 EnhancerAtlas 数据库(<http://enhanceratlas.org/download.php>)下载了结肠特异的增强子和靶基因关系数据。

### 1.4 增强子区域的序列处理

利用从 EnhancerAtlas 数据库<sup>[5]</sup>中得到的结肠特异的增强子区域信息,首先将位置信息转化为每个增强子基因组序列信息,即得到对应增强子的 fastq 格式的文件。

### 1.5 miRNA 的增强子靶基因关系预测分析

利用 RNA biology 文章中提供的 miRNA 与增强子靶向关系预测算法<sup>[2]</sup>,计算并筛选 miRNA 靶向的增强子区域。

### 1.6 miRNA-增强子-差异表达靶基因网络构建及分析

利用上述方法得到 miRNA-增强子-靶基因关系网络,并结合结肠癌差异表达靶基因的信息,最终得到差异表达 miRNA-结肠特异增强子-结肠癌差异表达靶基因网络。并使用 Cytoscape 软件对网络进行相关的网络参数分析。

### 1.7 miRNA 激活调控差异表达基因的 GO 分析

基因本体论(Gene Ontology, GO)<sup>[6]</sup>是一种常用的基因相关功能注释软件,该数据库为树状结构。该数据库主要包含生物学过程、细胞组分、分子功能三个主要的功能分支。我们将网络中的差异表达靶基因进行功能注释( $P < 0.01, FDR < 0.05$ )。

## 2 结果分析

### 2.1 差异表达 miRNA 筛选

将下载的数据进行筛选整理,最终得到的结肠癌差异表达 miRNA 共计 24 个,其中 7 个下调的 miRNA,35 个上调的 miRNA。

### 2.2 差异表达基因筛选结果

经过筛选分析得到在正常和结肠癌样本中差异表达基因 1 551 个,其中上调基因 1 144 个,下调基因 407 个。

### 2.3 增强子介导的 miRNA 向差异表达基因关系筛选结果

将 24 个差异表达 miRNA 分别利用 NamiRNA 增强子预测分析算法在 842 个结肠特异性增强子区域进行靶向位点预测,共得到 miRNA 靶向增强子关系对 76 274 对。整合结肠癌差异表达基因数据,最终得到上调 miRNA-上调靶基因关系对 3 839 个,下调 miRNA-下调靶基因关系对 1 042 个。miRNA 激活调控的差异表达基因共计 249 个,上调基因 201 个,下调基因 48 个。

### 2.4 miRNA-增强子-差异表达靶基因网络构建及分析

利用上述步骤建立的 miRNA-增强子,增强子靶向的差异表达基因关系对,最终得到 miRNA-靶基因关系对 2 121 个,259 个节点,其中包含 34 个下调基因,183 个上调的基因,7 个下调的 miRNA,35 个上调的 miRNA(见图 1)。网络中的节点的度分布如图 2 所示,网络中的失调的 miRNA 可以通过细胞核



内激活调控的方式同时调控 217 个基因的差异表达。其次,对网络中所有基因和 miRNA 的度进行分析,筛选度比较高的基因节点,认为该部分的基因是

潜在的结肠癌诊疗靶点,如图 3 所示。利用网络的度分析,筛选到 *TDG*、*NUCKS1*、*IL11RA*、*POLB*、*COL1A1*、*ITGB4* 等关键基因。

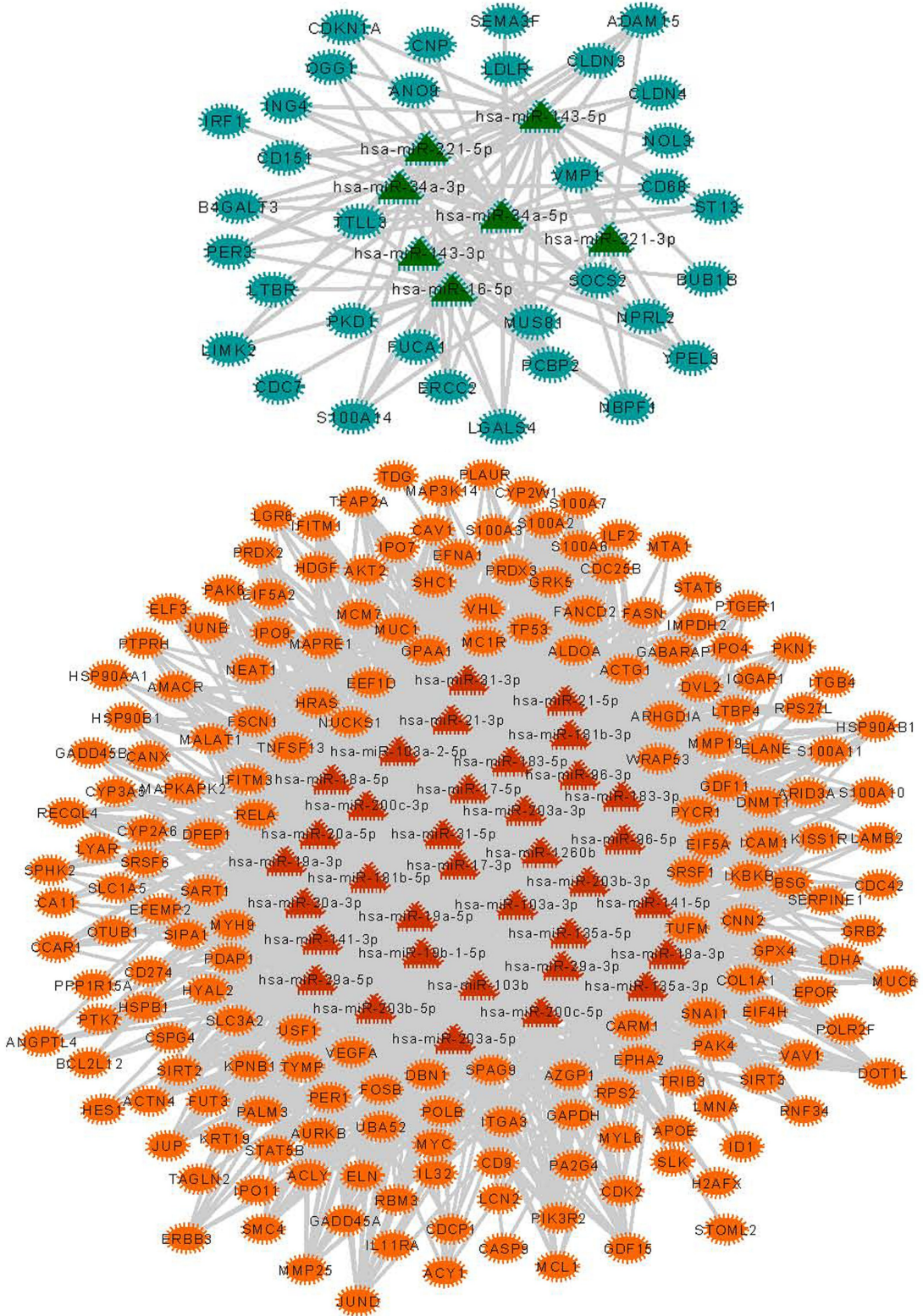


图 1 miRNA-激活调控靶基因网络

Fig.1 miRNA positive regulated genes network

注:图中的橘色圆点代表上调靶基因;红色三角形代表上调的 miRNA;绿色三角形代表下调 miRNA;绿色圆形代表下调靶基因.彩图见电子版 <http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx>.2019 年第 2 期.

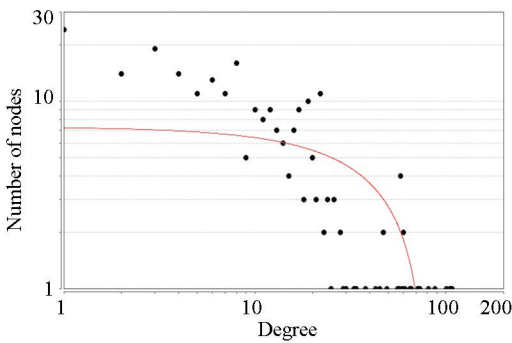


图 2 网络中度的分布图

Fig.2 Distribution of degree in the network

### 2.5 miRNA 激活调控差异表达基因的 GO 分析

差异表达靶基因 GO 功能富集分析,结果显示,结肠癌中被下调 miRNA 正向调控的下调靶基因主要富集在应激反应<sup>[7]</sup>、对脂质体的反应、细胞周期负向调控、细胞生长的负调控、细胞凋亡<sup>[8]</sup>、双链断裂修复、对生物刺激的反应等生物学功能均被抑制因此出现细胞的异常增生和分裂的异常。功能中排在前十位被下调的功能如下图(见图 4)。

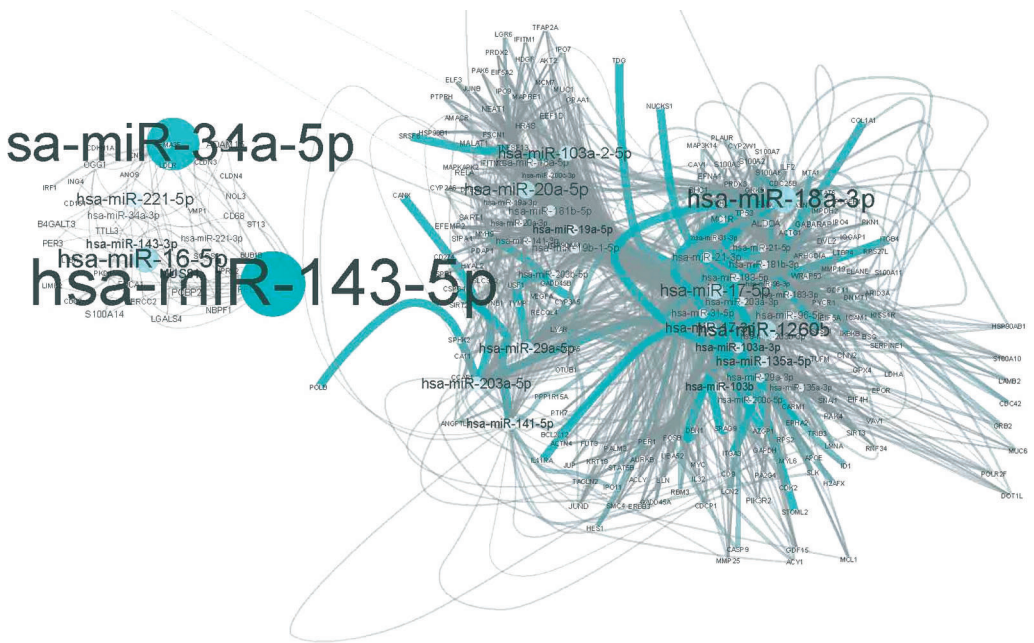


图 3 网路度分布连通图

Fig.3 Network overview by node degree

注:网络是节点的大小显示该节点的度,网络中绿色边为网路中度较高节点的边.

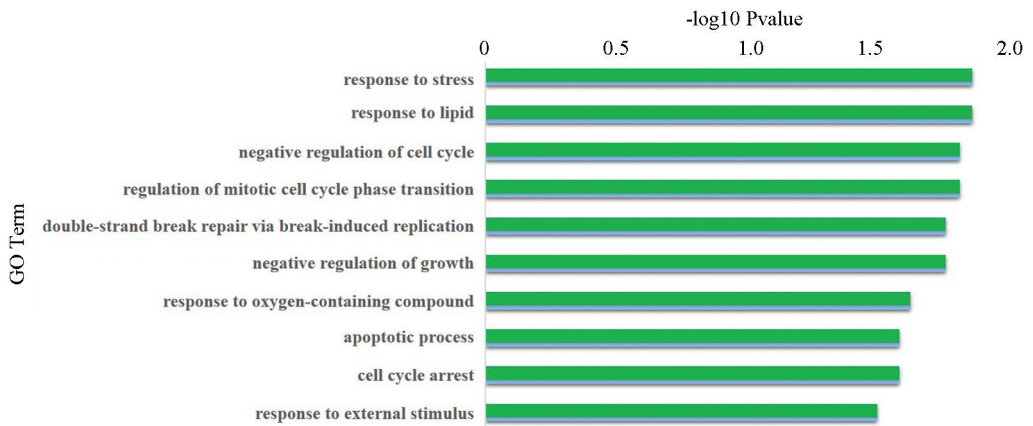


图 4 下调基因 GO 功能分析

Fig.4 GO analysis on down-regulated genes

结肠癌中被上调 miRNA 正向调控的上调靶基因主要富集细胞对外界刺激的反应、对于应激反应

和化学刺激的反应、细胞代谢和细胞过程和巨噬细胞代谢的调控等生物学过程<sup>[9-10]</sup>,如图 5 所示。



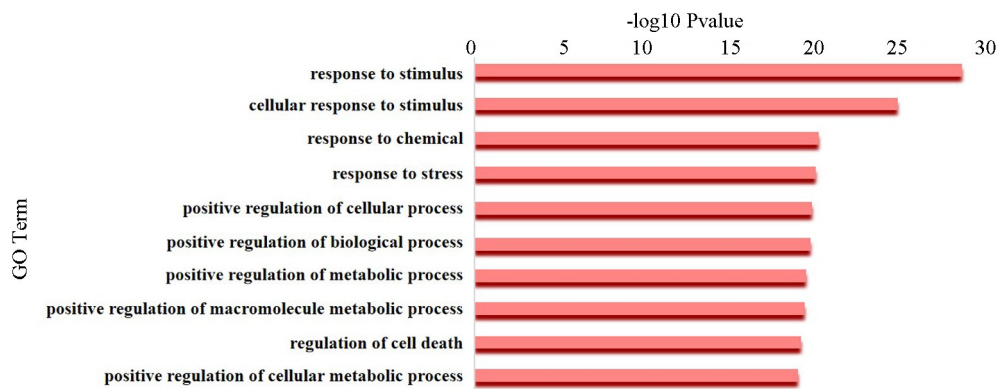


图5 上调基因 GO 功能分析

Fig.5 GO analysis on up-regulated genes

### 3 讨论

通过整合结肠癌差异表达的 miRNA、结肠特异性增强子数据和结肠癌差异表达基因数据,同时,采用 NamiRNA 靶向增强子预测算法筛选 miRNA 和靶向增强子区域的靶向关系,从而构建结肠癌特异的 miRNA-增强子-靶基因激活调控网络。该网络包含 miRNA-靶基因关系对 2 121 个,259 个节点,其中包含 34 个下调基因、183 个上调的基因,7 个下调的 miRNA,35 个上调的 miRNA。而后我们分析了网络进行的节点度的整体分布情况,发现网络中大部分的节点的度都是小于 10 的,仅有少量 miRNA 结合和部分的差异表达基因节点的度大于 10。

其次,利用网络中节点的度对网络中关键节点进行分析,发现除了筛选到的 42 个 miRNA 外,还有部分差异表达基因受到多个 miRNA 的调控,例如 *TDG*、*NUCKS1*、*IL11RA*、*POLB*、*COL1A1*、*ITGB4* 等关键基因。筛选的关键基因中如 *IL11RA* 于结肠癌中高表达,并且与结肠癌的临床病理因素密切相关<sup>[11]</sup>。*TDG*(胸腺嘧啶糖基化酶)等基因也被多篇文章报道可以作为结肠癌的标志。

通过分别对 miRNA-增强子-靶基因网络中上调和下调靶基因的 GO 功能分析,发现结肠癌中激活表达的基因主要参与了一些应激反应相关的功能和,同时,抑制了细胞周期、细胞凋亡、细胞死亡巨噬细胞代谢等相关功能,通过激活和抑制相关功能诱发结肠癌的发生。

### 参考文献(References)

[1] SMITH R A, ANDREWS K S, BROOKS D, et al. Cancer screening in the United States, 2018: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening[J]. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(4): 297-316. DOI:10.3322/caac.21446.

[2] XIAO M, LI J, LI W, et al. MicroRNAs activate gene tran-

scription epigenetically as an enhancer trigger[J]. *RNA Biology*, 2017, 14(10): 1326-1334. DOI: 10.1080/15476286.2015.1112487.

- [3] HUANG Z, SHI J, GAO Y, et al. HMDD v3.0: A database for experimentally supported human microRNA-disease associations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): 1013-1017. DOI:10.1093/nar/gky1010.
- [4] AGARWAL R, KUMAR B, JAYADEV M, et al. CoReCG: A comprehensive database of genes associated with colorectal cancer[J]. *Database*, 2016, 2016: baw059. DOI: 10.1093/database/baw059.
- [5] GAO T, HE B, LIU S, et al. EnhancerAtlas: A resource for enhancer annotation and analysis in 105 human cell/tissue types[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(23): 3543-3551. DOI:10.1093/bioinformatics/btw495.
- [6] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): 607-613. DOI: 10.1093/nar/gky1131.
- [7] PETERSEN K, MONSEN V T, HAKVAG PETERSEN C H, et al. DHA-induced stress response in human colon cancer cells-Focus on oxidative stress and autophagy[J]. *Free Radic Biology Medicine*, 2016, 90(1): 158-172. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.018.
- [8] LI X, HAN F, LIU W, et al. PTBP1 promotes tumorigenesis by regulating apoptosis and cell cycle in colon cancer[J]. *Bull Cancer*, 2018, 105(12): 1193-1201. DOI: 10.1016/j.bulcan.2018.08.013.
- [9] PODGÓRSKA M, PIETRASZEK-GREMPLEWICZ K, NOWAK D. Apelin effects migration and invasion abilities of colon cancer cells[J]. *Cells*, 2018, 7(8): 113-130. DOI: 10.3390/cells7080113.
- [10] CRUZ A L S, CARROSSINI N, TEIXEIRA L K, et al. Cell cycle progression regulates biogenesis and cellular localization of lipid droplets[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2019, 39(9): e00374-18. DOI: 10.1128/MCB.00374-18.
- [11] YAMAZUMI K, NAKAYAMA T, KUSABA T, et al. Expression of interleukin-11 and interleukin-11 receptor alpha in human colorectal adenocarcinoma; immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(2): 317-321. DOI: 10.3748/wjg.v12.i2.317.