

miRNA-148a 在膀胱癌组织中的表达及生物信息学分析*

谢小娟^{1,2}, 朱娜³, 潘晶晶², 魏力强¹, 陈薇²

(1. 陕西省临床检验中心, 西安 710068; 2. 西安交通大学医学院第一附属医院检验科, 西安 710061; 3. 陕西省人民医院科研处, 西安 710068)

摘要:目的 探索 miRNA-148a 在膀胱癌发生发展中的作用。方法 收集 35 例膀胱癌组织和 16 例非癌组织, 采用荧光定量 PCR 方法检测 miRNA-148a 的相对表达量, 并分析其与临床特征的相关性; 采用生物信息学分析, 预测 miRNA-148a 的靶基因和转录因子, 构建 TF-miRNA-148a-靶基因调控网络图, 并对其靶基因进行 GO 富集和 KEGG Pathway 分析。结果 miRNA-148a 在膀胱癌中的相对表达量(0.0008 ± 0.0002)明显低于非癌组织(0.0021 ± 0.0005) ($t=2.46, P<0.05$), 其相对表达量在不同性别、年龄、病理分级、临床分期、淋巴结转移组的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。3 个软件都预测到的 miRNA-148a 靶基因 268 个; 预测到 miRNA-148a 的转录因子 60 个, 结合评分 >80 的结合位点 657 个; 对 268 个靶基因进行 GO 富集分析, 发现其靶基因主要涉及神经细胞分化、发育、增殖、mRNA 合成、蛋白连接等众多的生物学过程 ($P<0.001$, 相对于背景具有统计意义); KEGG Pathway 分析发现 268 个靶基因参与 p53, 恶性肿瘤、前列腺癌、PI3K-AKT 等信号通路 ($P<0.05$, 相对于背景具有统计意义); 根据构建的 TF-miRNA-148a-靶基因调控网络图, 挖掘出可能调控 miRNA-148a 的转录因子有 SP1, ESR1, AP1, MYC, BRCA1 等; 可能受 miRNA-148a 调控的基因有 IGF1, P27^{kip1}, NCOA1, PTEN, SERPINE1 等。结论 miRNA-148a 在膀胱癌中表达下调, 可能参与膀胱癌的发生发展, 生物信息学分析为后续研究提供一定的思路。

关键词:膀胱癌; miRNA-148a; 生物信息学

中图分类号: R737.14; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2015)04-006-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.002

Expression of miRNA-148a in Bladder Carcinoma Tissues and Its Bioinformatics Analysis

XIE Xiao-juan^{1,2}, ZHU Na³, PAN Jing-jing², WEI Li-qiang¹, CHEN Wei² (1. Shaanxi Center for Clinical Laboratory, Xi'an 710068, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3. Scientific Research Division, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of miRNA-148a in bladder tumorous development and progression. **Methods** Expression of miRNA-148a was assessed in 35 bladder carcinoma tissues and 16 non-carcinoma tissues by fluorescence quantitative real time PCR, and correlation with clinical features was evaluated. Target genes and transcription factors of miRNA-148a were predicted using bioinformatic analysis, then TF-miRNA-148a-target genes network diagram was built and the target genes was analyzed of gene ontology enrichment and KEGG pathway. **Results** Expression of miRNA-148a was lower in bladder carcinoma tissues than in non-carcinoma tissues (0.0008 ± 0.0002 vs 0.0021 ± 0.0005) ($t=2.46, P<0.05$), but its expression was no statistical significance in different groups of gender, age, pathological classification, clinical stage, lymph node metastasis ($P>0.05$). 268 target genes of miRNA-148a were predicted by three softwares at the same time, 60 transcription factors were predicted and the binding sites with combination scores above 80 was 657. The target genes of miRNA-148a was enriched in many biological processes, such as neuron differentiation, generation of neurons, neuron projection development, cytoplasmic mRNA processing body, cytoplasm ($P<0.001$). They also participated in p53 signaling pathway, proteoglycans in cancer-homo sapiens, pathways in cancer, prostate cancer, protein processing in endoplasmic reticulum, focal adhesion and so on ($P<0.05$). According to TF-miRNA-148a-target genes network diagram, miRNA-148a was regulated by SP1, ESR1, AP1, MYC and BRCA1, genes of IGF1, P27^{kip1}, NCOA1, PTEN, SERPINE1 might be regulated by miRNA-148a. **Conclusion** miRNA-148a which was significantly down-regulation in bladder carcinoma tissues may be participate in bladder tumorous development and progression, bioinformatics analysis provides some ideas for further research.

Keywords: bladder carcinoma; miRNA-148a; bioinformatics

近年来, 大量研究资料表明, 多种微小 RNA (miRNA) 参与了肿瘤细胞的生物调控过程, 在肿

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81372151)。

作者简介: 谢小娟(1981—), 女, 硕士, 主要从事分子生物学研究。

通讯作者: 陈薇(1962—), 女, 博士生导师, E-mail: chenwei808@mail.xjtu.edu.cn。

瘤的发生、发展中扮演着重要角色,间接起着原癌基因和抑癌基因的作用^[1]。研究 miRNA 作用机制的关键是准确预测 miRNA 的靶基因和正确认识 miRNA 与其靶基因的相互作用^[2]。miRNA-148a 定位于 7 号染色体 7p15.2,在胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌等多种癌组织中均表达下调。但 miRNA-148a 在膀胱癌中的表达及作用尚未见报道。本课题在膀胱癌组织中检测 miRNA-148a 的表达水平,并运用生物信息学分析,预测 miRNA-148a 在膀胱癌发生发展中的作用,为后续研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 膀胱癌组织取自 2006 年 5 月~2011 年 1 月西安交通大学第一附属医院泌尿外科膀胱癌患者手术切除标本,经病理证实,膀胱癌组织 35 例,非癌组织 16 例。采集前均经过医院伦理委员会批准和患者知情同意。术中取材,立即放入液氮中,然后转入-80℃冰箱长期保存。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);核酸蛋白浓度分析仪(美国 Bio-Rad 公司, SmartSpec Plus);逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司);PCR 引物(广州市锐博生物科技有限公司设计合成,未提供引物序列);定量 PCR 试剂(大连 TaKaRa 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,7300)。

1.3 方法

1.3.1 荧光定量 PCR:①RNA 提取:取冻存的组织标本约 100 mg 剪碎,放入盛有液氮的研磨器中,加入 1 ml Trizol 研磨匀浆,然后按照 Trizol 试剂说明书提取组织 RNA,-80℃保存备用。②逆转录 cDNA 合成:按照美国 Thermo 公司的逆转录试剂盒说明书操作,-20℃保存备用。③PCR 反应体系(20 μl):cDNA 2 μl,上、下游引物各 0.8 μl,SYBY Green 10 μl,dd H₂O 6.4 μl。④PCR 反应条件:95℃ 30 s 变性,95℃ 5 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s 循环 40 次,溶解曲线生成。每一标本重复操作 3 次,结果取均值。⑤基因表达水平计算:以 $2^{-\Delta CT}$ (ΔCT =标本目的基因 CT 值-标本内参基因 CT 值)表示样本中目的基因的相对表达量, ΔCT 越高,表达量越低。

1.3.2 生物信息学分析:①靶基因预测:采用 mi-Randa,Clip-Sep,TargetScan,miRDB 等 4 个在线软件预测 miRNA-148a 的靶基因。②靶基因的 GO(Gene ontology)富集分析:选择 3 个软件都预测到的 miRNA-148a 靶基因,找到富集这些靶基因的 GO 分类条目,寻找它们可能的基因功能。③靶基因的 KEGG Pathway 分析:采用生物学通路

数据库(www.genome.jp)在线预测靶基因的 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genome) Pathway。④转录因子预测:通过 mirbase 数据库以及 UCSC 数据库找出 miRNA 前体的位置。为了保证结果的代表性,取其前体上游的 5 000 bp 基因序列进行分析。在 JASPAR 中输入前体的序列并选择相应的参数进行搜索,得出转录因子(transcription factor,TF)的位置与名称。⑤重要靶基因和转录因子的筛选:根据 miRNA-148a 预测的靶基因、转录因子、靶基因编码的蛋白构建 TF-miRNA-148a-靶基因调控网络图,对网络图里面的互作关系进行统计,从而挖掘出 miRNA-148a 重要的转录因子和靶基因。

1.4 统计学分析 用 spss statistics 17.0 软件对数据进行统计,两组数据间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-148a 在膀胱癌组织中的表达

2.1.1 膀胱癌组织和非癌组织中 miRNA-148a 的相对表达量分别为 0.0008 ± 0.0002 和 0.0021 ± 0.0005 ,差异有统计学意义($t = 2.46$, $P < 0.05$),见图 1。

2.1.2 miRNA-148a 在膀胱癌组织中的相对表达量在不同性别、年龄、病理分级、临床分期、淋巴结转移组的差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

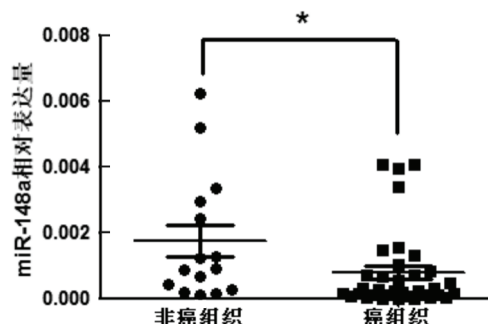


图 1 miRNA-148a 在膀胱癌和非癌组织中的表达

表 1 miRNA-148a 在膀胱癌中的表达水平与临床特征关系

组别	n	表达水平	t	P
年龄(岁)				
<60	11	0.0015±0.0005	1.86	0.088
≥60	24	0.0005±0.0002		
性别				
男性	30	0.0008±0.0002	0.285	0.777
女性	5	0.0009±0.0006		
病理分级				
低级别	13	0.0012±0.0004	1.23	0.237
高级别	22	0.0006±0.0002		
TNM 分期				
T1-2	25	0.0006±0.0003	1.45	0.177
T3-4	10	0.0012±0.0005		
淋巴结转移				
N	31	0.0006±0.0002	0.47	0.642
Y	4	0.0009±0.0003		

2.2 miRNA-148a 的生物信息学分析

2.2.1 靶基因预测: 4个软件预测的 miRNA-148a 靶基因个数分别是 miRanda 2 292 个, Clip-Sep 218 个, TargetScan 698 个, miRDB 317 个。其中 3 个软件预测的相同靶基因 268 个, 4 个软件预测的相同靶基因 53 个, 见图 2。

2.2.2 靶基因的 GO 富集分析: 以 3 个软件都预测到的 268 个靶基因做细胞组件、分子功能、生物过程的 GO 富集分析 ($P < 0.001$, 相对于背景具有统计学意义), 见表 2。

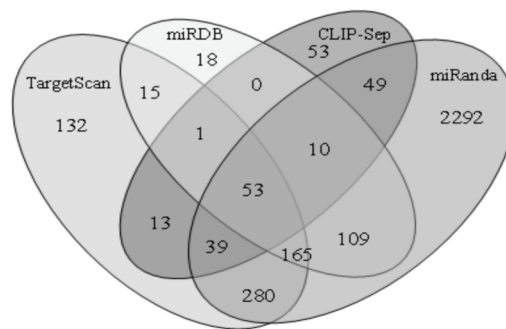


图 2 4 个软件预测的 miRNA-148a 的靶基因个数

表 2

miRNA-148a 预测靶基因的 GO 富集分析结果

GO ID	Term	P	Gene Names
GO:0030182	neuron differentiation	1.87E-05	ITGA5 PRNP PTEN CNTN4 PRICKLE2
GO:0048699	generation of neurons	1.87E-05	FZD6 NRP1 CDK5R1 SYNJ1 NOG
GO:0031175	neuron projection development	1.87E-05	PTEN ROBO1 ROBO2 ROCK1 SOS2
GO:0000932	cytoplasmic mRNA processingbody	0.000227	DDX6 TNRC6B EIF2C1 TNRC6A PNRC2
GO:0005737	cytoplasm	0.000227	MTMR1 NRP1 EIF2C4 RAB12 RBM24
GO:0035770	RNA granule	0.000227	DDX6 TNRC6B EIF2C1 TNRC6A PNRC2
GO:0043229	intracellular organelle	0.000227	TGFA HSP90B1 RSBN1L ZBTB8A
GO:0005515	protein binding	5.37E-07	CDKN1B COL2A1 E2F7 SIK1 EIF2C4
GO:0005488	binding	0.000143	PAPD4 EIF2C4 RAB12 RBM24 ZBTB8A
.....			

2.2.3 靶基因的 KEGG Pathway 分析: 以 3 个软件都预测到的 268 个靶基因做 KEGG Pathway 分

析, 采用 Fisher 确切概率法 ($P < 0.05$, 相对于背景具有统计学意义), 见表 3。

表 3

miRNA-148a 预测靶基因的 KEGG Pathway 分析

Term	ID	样本号	背景数量	P-Value	基因
p53 signaling pathway	hsa04115	6	68	0.000 8	PTEN MDM4 GADD45A IGF1 SERPINE1 SESIN2
Proteoglycans in cancer-Homo sapiens(human)	hsa05205	11	225	0.001 2	SOS2 IGF1 FZD6 ITGA5 WNT10B MRAS
Pathways in cancer	hsa05200	13	330	0.003 1	PTEN MITF CCDC6 COL4A1 SOS2 CDKN1B
Prostate cancer	hsa05215	6	89	0.003 3	PTEN SOS2 CDKN1B IGF1 TGFA HSP90B1
Protein processing in endoplasmic reticulum	hsa04141	8	167	0.006 1	UBE2D1 CANX PLAA SKP1 DNAJB12 LMAN1
Focal adhesion	hsa04510	9	206	0.006 7	PTEN COL2A1 COL4A1 SOS2 IGF1 ITGA11
PI3K-Akt signaling pathway-Homo sapiens(human)	hsa04151	12	346	0.011 5	PTEN COL2A1 COL4A1 SOS2 IGF1 PRKAA1

2.2.4 转录因子预测: 预测到 miRNA-148a 的转录因子 60 个, 结合评分 > 80 的结合位点 657 个,

其中 151 个位点 > 90 分, 26 个位点为 100 分, 见表 4。

表 4

miRNA-148a 的预测转录因子与结合位点

Model ID	Model name	Score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0003.1	TFAP2A	100	953	961	-	GCCCGGGGG
MA0036.1	GATA2	100	2 582	2 586	-	GGATA
MA0036.1	GATA2	100	3 098	3 102	-	GGATA
MA0037.1	GATA3	100	4 891	4 896	-	agatag
MA0056.1	MZF1_1-4	100	544	549	-	TGGGGA
.....						

2.2.5 靶基因和转录因子筛选: 对 TF-miRNA-148a-靶基因调控网络图里面的互作关系进行统计, 挖掘出可能调控 miRNA-148a 的转录因子有 SP1, ESR1, AP1, MYC, BRCA1 等; 可能受 miRNA-148a 调控的基因有 IGF1, P27^{kip1}, NCOA1, PTEN, SERPINE1 等, 见图 3。

3 讨论 膀胱癌为泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 浸润性生长, 易复发。文献报道许多 miRNA 参与膀胱癌的发生发展。miRNA-145, miRNA-133a, miRNA-143 等在膀胱癌中表达下调, 起肿瘤抑制

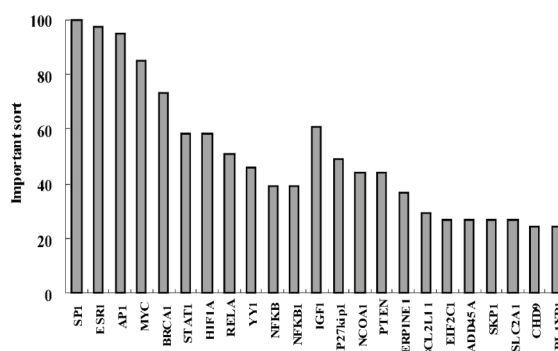


图 3 预测的 miRNA-148a 转录因子和靶基因重要性排序

基因的作用^[3,4]。Ichimi 等^[5]报道 miRNA-30-3p, miRNA-133a 和 miRNA-199a 能够抑制癌基因 KRT7 在膀胱癌细胞中的表达。miRNA-21, miRNA-96 等在膀胱癌组织中表达显著上调^[6,7], 促进膀胱癌发生发展。Wang 等^[7]报道 miRNA-96 在膀胱癌中高表达, 且与病理分级、临床分期明显正相关, 它通过抑制 PDK/Akt 信号通路促进癌细胞的转移。

文献报道 miRNA-148a 参与多种肿瘤的发生、发展, 在胃癌、直肠癌、食管癌、胰腺癌、前列腺癌中低表达^[8~13]。其低表达原因被认为与 miRNA-148a 基因启动子甲基化有关^[11,12], 提示 miRNA-148a 可能在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用。Hanoun 等^[11]发现 miRNA-148a 不仅是在胰腺导管癌中下降, 甚至在胰腺导管上皮内瘤变前就下降, 表明 miRNA-148a 下降在胰腺癌的早期就已经发生。体外试验将 miRNA-148a 前体转染至前列腺癌细胞, 发现 miRNA-148a 抑制了前列腺癌细胞的增殖、浸润及迁移, 而且能够增加前列腺癌细胞对紫杉醇化疗药物的敏感性, 降低其耐药程度^[13]。邓震等^[14]研究发现 miRNA-148a 可以抑制 LNCaP 细胞的神经内分泌分化, 可能成为前列腺癌生物治疗的新靶点。由此表明, miRNA-148a 在多种肿瘤中作为一种抑癌基因的功能, 调控肿瘤生长及凋亡等生物学行为。本课题分析发现, miRNA-148a 在膀胱癌组织中表达明显下降; 由于标本数量有限, miRNA-148a 的相对表达量在不同性别、年龄、病理分级、临床分期、淋巴结转移组的差异不显著。

本课题采用 4 个在线软件预测 miRNA-148a 的靶基因, 其中 3 个软件预测的相同靶基因 268 个, 包括 PTEN, P27^{kip1}, ACVR1, BCL2L11, CAND1, DSC2 等。通过对这 268 个靶基因进行 GO 富集和 KEGG Pathway 分析发现, miRNA-148a 的靶基因主要富集在 p53 信号通路、恶性肿瘤的信号通路、前列腺癌信号通路、PI3K-AKT 信号通路等, 涉及神经细胞分化、发育、增殖、mRNA 合成、蛋白连接等众多的生物学过程。这些预测的靶基因参与的信号通路及生物学过程均涉及到肿瘤细胞分化和代谢等方面, 提示 miRNA-148a 可能作为一个抑癌基因, 调控肿瘤生长及凋亡等生物学行为。根据 miRNA-148a 的 TF-miRNA-靶基因调控网络图, 挖掘出可能受 miRNA-148a 调控的重要基因有 IGF1, P27^{kip1}, NCOA1, PTEN, SERPINE1 等。Ke 等^[15]报道 PTEN 基因是 miRNA-148a 的靶基因, 抑制其蛋白合成, 从而参与 PI3K-AKT 信号通路; Guo 等^[16]报道 miRNA-

148a 通过靶向 P27^{kip1} 基因, 促进胃癌细胞增殖, 这些文献与生物信息学预测相符。

目前认为, 对于低级别非浸润性的膀胱癌, 发生机制以 HRAS 和 FGFR3 基因的突变为主, 而高级别浸润性癌则以 p53 和 pRb 抑癌基因通路的异常多见^[17,18]。本研究发现 miRNA-148a 的靶基因富集在 p53 信号通路, 目前已有文献证实 PTEN 是 miRNA-148a 的靶基因^[15]。miRNA-148a 可能通过抑制 PTEN 基因的表达而使 p53 信号通路异常, 从而参与膀胱癌的发生发展。miRNA-148a 作为一个抑癌基因, 如何参与膀胱癌的发生发展还需后续实验进一步证实, 生物信息学分析可为其提供一定的研究思路。

参考文献:

- [1] Osman A. MicroRNAs in health and disease-basic science and clinical applications[J]. Clin Lab, 2012, 58(5/6):393-402.
- [2] 蒋永容, 陈川, 张志敏, 等. miRNA-122a 靶基因预测及生物信息学分析[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(16):931-934.
- [3] Jiang YR, Chen C, Zhang ZM, et al. Bioinformatic analysis and prediction of miRNA-122a target genes[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2011, 38(16):931-934.
- [4] Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, et al. miRNA-145 and miRNA-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer[J]. Br J Cancer, 2010, 102(5):883-891.
- [5] Lin T, Dong W, Huang J, et al. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer[J]. J Urol, 2009, 181(3):1372-1380.
- [6] Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer[J]. International Journal of Cancer, 2009, 125(2):345-352.
- [7] Baffa R, Fassan M, Volinia S, et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets[J]. J Pathol, 2009, 219(2):214-221.
- [8] Wang Y, Luo HM, Li Y, et al. hsa-miRNA-96 up-regulates MAP4K1 and IRS1 and may function as a promising diagnostic marker in human bladder urothelial carcinomas[J]. Molecular Medicine Reports, 2012, 5(1):260-265.
- [9] Song YX, Yue ZY, Wang ZN, et al. MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation[J]. Mol Cancer, 2011(10):1.
- [10] Zhang H, Li Y, Huang Q, et al. MiRNA-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(11):1702-1710.
- [11] Hummel R, Hussey DJ, Michael MZ, et al. MiRNAs and their association with locoregional staging and survival following surgery for esophageal carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(1):253-260.

(下转 13 页)

(上接 9 页)

- [11] Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, et al. The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis[J]. Clin Chem, 2010, 56(7): 1107-1118.
- [12] Zhu AK, Xia JZ, Zuo JB, et al. MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in gastric cancer[J]. Med Oncol, 2012, 29(4): 2701-2709.
- [13] Fujita Y, Kojima K, Ohhashi R, et al. miR-1480 Attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression[J]. J Biol Chem, 2010, 285(25): 19076-19084.
- [14] 邓震, 矫力, 蔡小兵, 等. microRNA-148a 对前列腺癌细胞系 LNCaP 神经内分泌分化的影响[J]. 上海医学, 2011, 34(7): 500-503.
- Deng Z, Jiao L, Cai XB, et al. Effect of microRNA-148a on neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cell line LNCaP[J]. Shanghai Med J, 2011, 34(7): 500-503.
- [15] Yuan K, Lian ZR, Sun B, et al. Role of miRNA-148a in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35331.
- [16] Guo SL, Peng Z, Yang X, et al. miRNA-148a promoted cell proliferation by targeting p27 in gastric cancer cells[J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(5): 567-574.
- [17] Koss LG. Bladder cancer from a perspective of 40 years[J]. J Cell Biochem Suppl, 1992, 161: 23-29.
- [18] Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(9): 713-725.

收稿日期: 2015-06-11