

食管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002376

食管鳞癌中 miRNA-mRNA 调控网络的构建和信号通路分析

杨玲玲¹, 杨 兰¹, 孙璐娜², 戴天运², 孙 鹏², 申嘉炜², 陈珏宇², 陈云昭¹

(1. 石河子大学医学院病理系/一附院病理科, 石河子 832000; 2. 石河子大学医学院, 石河子 832000)

【摘要】目的:构建食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中 miRNA-mRNA 的调控网络,对候选基因进行基因本体(gene ontology, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,为 ESCC 发生发展的分子机制研究提供一定的理论指导。**方法:**从 GEO 数据库中筛选 ESCC 组织中的差异表达 miRNA(differentially expressed miRNA, DE miRNA)和差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并在线数据库预测调控 DE miRNA 的靶基因。对 DE miRNA 的靶基因及 DEGs 取交集得到候选基因,使用 DAVID 在线数据库对其进行 GO 富集分析和 KEGG 分析,并运用 GEPIA 网站进行生存分析。**结果:**筛选出 4 个 DE miRNA(miR-34c-5p, miR-944, miR-133b, miR-139-5p),分析 DE miRNA 在 ESCC 组织和正常食管组织中的表达情况。候选基因 GO 富集分析表明其主要参与细胞增殖、凋亡、迁移等过程,KEGG 分析表明其主要富集在 PI3K/AKT、Rap1、P53 信号通路,生存分析发现候选基因中的 COL1A1、SOX4 与食管癌较差的无病生存期(disease-free survival, DFS)有关。**结论:**miR-34c-5p、miR-944、miR-133b 和 miR-139-5p 在 ESCC 中存在差异表达,可能在食管鳞癌的发生发展中发挥作用,且候选基因 COL1A1、SOX4 与食管癌较差的无病生存期相关。

【关键词】食管鳞癌;miRNA;靶基因;生物信息学**【中图分类号】**R735.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-07-12

Construction of miRNA-mRNA regulatory network and signal pathway analysis in esophageal squamous cell carcinoma

Yang Lingling¹, Yang Lan¹, Sun Luna², Dai Tianyun², Sun Peng², Shen Jiawei², Chen Jueyu², Chen Yunzhao¹

(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine;

2. Shihezi University School of Medicine)

【Abstract】Objective: We using bioinformatics methods to screen differentially expressed miRNA(DE miRNA) and its target genes and esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) differentially expressed genes(DEGs) in ESCC, we perform GO and KEGG enrichment. Then, we screen for genes associated with the of esophageal squamous cell carcinoma. **Methods:** Gene expression profile datasets and microRNA(miRNA) expression profile datasets were downloaded from the NCBI gene expression omnibus(GEO) database, DE miRNA and DEGs in ESCC tissues were screened using GEO2R tool. The target genes of DE miRNAs were predicted by using the online databases TargetScan, StarBase, miRWalk and miRDB. The target genes of DE miRNA and DEGs were taken together, GO and KEGG enrichment analysis was performed using DAVID online database, the survival analysis was performed using GEPIA website. **Results:** Four DE miRNAs were screened from the GEO database(miR-34c-5p, miR-944, miR-133b and miR-139-5p expression) and the expression of DE miRNA in ESCC tissues and normal esophageal tissues were analyzed. GO enrichment analysis of candidate genes indicated that it was mainly involved in cell proliferation, apoptosis, migration et al. KEGG enrichment analysis indicated that it was mainly enriched in PI3K/AKT, Rap1, P53 signaling pathway, survival analysis found COL1A1, SOX4 is associated with poor disease-free survival(DFS). **Conclusion:** MiR-34c-5p, miR-944, miR-133b and miR-139-5p may play a role in the develop-

作者介绍: 杨玲玲, Email: 1458936702@qq.com,

研究方向: 肿瘤病理与分子诊断学研究。

通信作者: 杨 兰, Email: 417428883@qq.com; 陈云昭, Email: cyz0515@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81860518, 81260301); 石河子大学大学生研究训练计划资助项目(编号: SRP2019094)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200319.1714.002.html> (2020-03-20)

ment of esophageal squamous cell carcinoma. Through the predictive analysis of target genes of four DE miRNAs, it provides a theoretical basis for further research on the pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma.

【Key words】esophageal squamous cell carcinoma; miRNA; target genes; bioinformatics

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是全球第九大常见癌症^[1], EC 有 2 种主要的组织学类型: 鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和腺癌。ESCC 在亚洲国家更为常见, 占中国 EC 病例的 90% 以上^[2]。尽管 ESCC 外科手术和其他治疗方法取得了巨大进展, 但 EC 切除术后或放化疗后复发率仍然很高^[3], 术后 5 年生存率仅为 34%~36%^[4]。因此, 阐明 ESCC 发病的分子机制及筛选与预后相关的分子靶标至关重要。

microRNA(miRNA)是一类非编码 RNA, 包含 19~24 个核苷酸^[5]。miRNA 调节基因表达的方式有 2 种: 当 miRNA 序列与靶 mRNA 的 3'UTR 严格互补时, 将发生互补区域的降解; 而当 miRNA 序列与靶 mRNA 的 3'UTR 不严格互补时, 靶 mRNA 的翻译效率将受到抑制^[6]。多项研究表明, ESCC 组织和外周血中许多 miRNA 的表达是失调的, 这在 ESCC 的临床诊断和预后方面具有重要价值^[7]。

近年来, 运用生物信息学技术在分子水平上进行数据挖掘, 为研究各种疾病的分子机制提供了新的思路。本研究通过收集 GEO 数据库中 ESCC miRNA 和 mRNA 表达微阵列数据集, 并进行数据分析, 寻找与 ESCC 发生发展相关的 miRNA 及其调控的信号通路和与 EC 生存相关的基因, 为阐明 ESCC 的病因、发病机制及预后提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

从美国国立生物技术信息中心(National Center For Biotechnology Information, NCBI)的 GEO 公共数据库中下载 2 个 miRNA 表达谱数据集 GSE114110 和 GSE59973, 及 mRNA 表达谱数据集 GSE20347。共包含 50 例食管鳞癌组织样本和 30 例正常食管组织样本。其中 GSE114110 包含 30 例食管鳞癌组织样本和 10 例正常食管组织样本, GSE59973 包含 3 例食管鳞癌组织样本和 3 例正常食管组织样本, GSE20347 包

含 17 例食管鳞癌组织样本和 17 例正常食管组织样本。

1.2 方法

1.2.1 DE miRNA 及 DEGs 筛选 本研究将样本分为 ESCC 组和正常食管组。运用 GEO 数据库的 GEO2R 在线分析工具筛选 DE miRNA 和 DEGs。其中 DE miRNA 的筛选标准设定为多重假设检验校正 $P < 0.05$, 表达值倍数变化(fold change, FC) > 4 , 符合上述标准的即判定为 DE miRNA。筛选 DEGs 的标准设定为校正 $P < 0.05$, $|\log_2 FC| > 2$ 。

1.2.2 差异表达 miRNA 在 ESCC 和正常食管组织表达情况 本研究从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)下载 33 例 ESCC 组织和 13 例正常食管组织的表达谱数据, 运用 GraphPad Prism 5 分析 ESCC 及食管正常组织 DE miRNA 表达情况, 构建箱式图并计算 P 值。

1.2.3 差异表达 miRNA 的靶基因预测 使用 TargetScan(<http://www.targetscan.org/>)、StarBase(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)、miR Walk(<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)和 miRDB(<http://mirdb.org/>)4 个数据库对筛选出的 DE miRNAs 靶基因进行在线预测。

1.2.4 构建 miRNA-mRNA 调控网络 利用 Cytoscape 软件进行 miRNA-mRNA 调控网络构建, 生成初步的 miRNA-mRNA 调控网络, 并根据需要对节点进行形状、大小的设置。

1.2.5 GO 及 KEGG 通路富集分析 采用 DAVID 数据库对 DE miRNA 对应的靶基因与 DEGs 取交集得到 60 个候选基因, 并对其进行 GO 及 KEGG 富集分析, 以 $P < 0.05$ 设定为差异有统计学意义的阈值条件。

1.2.6 基因表达水平和生存分析 运用 GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)网站分析食管癌组织和正常食管组织的基因表达情况, 对候选基因进行生存分析。

2 结果

2.1 DE miRNA 和 DEGs 筛选

从 ESCC miRNA 表达谱数据集 GSE114110 和 GSE59973 中分别筛选出 116 个 DE miRNA 和 26 个 DE miRNA(图 1A、B), 并将这些 DE miRNA 取交集得到 4 个 DE miRNA(miR-34c-5p、miR-944 表达上调, miR-133b、miR-139-5p 表达下调)。从 ESCC mRNA 表达谱数据集 GSE20347 中筛选出 1 353 个 DEGs(图 1C)。

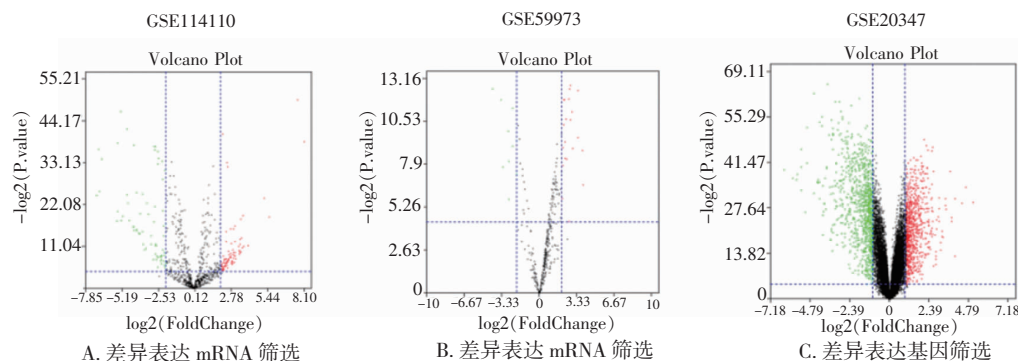


图 1 ESCC 差异表达 miRNAs 和差异表达基因火山图

2.2 4 个 DE miRNA 在 ESCC 和正常食管组织中的表达情况

本研究从 GEO 数据库下载 33 例 ESCC 组织和 13 例正常食管组织的表达谱数据,运用 GraphPad Prism 5 分析 ESCC 及食管正常组织中 4 个 DE miRNA 表达情况并构建箱式图,结果显示 miR-133b、miR-139-5p 在 ESCC 组织中的表达水平明显低于正常食管组织(图 2A、B; $P<0.01$)。miR-34c-5p、miR-944 在 ESCC 组织中的表达水平明显高于正常食管组织(图 2C、D; $P<0.01$),与筛选结果一致。

2.3 DE miRNA 的靶基因预测

使用在线数据库 (TargetScan、StarBase、miRWalk 和

miRDB)分别对 4 个 DE miRNA 的潜在靶基因进行预测,运用在线软件 Venn 取交集后得到上调的 DE miRNA(miR-34c-5p、miR-944)预测的靶基因数共 343 个,下调的 DE miRNA(miR-133b、miR-139-5p)预测的靶基因数共 426 个。

2.4 miRNA-mRNA 调控网络

4 个 DE miRNA 的 769 个靶基因及 1 353 个 DEGs 取交集得到 60 个候选基因,利用 Cytoscape 软件绘制 miRNA-mRNA 调控网络,红色节点代表 miRNA,蓝色节点代表候选基因。从 miRNA-mRNA 网络(图 3)可看出,一个 miRNA 可调控多个靶基因,一个靶基因并非受单一的 miRNA 调控。

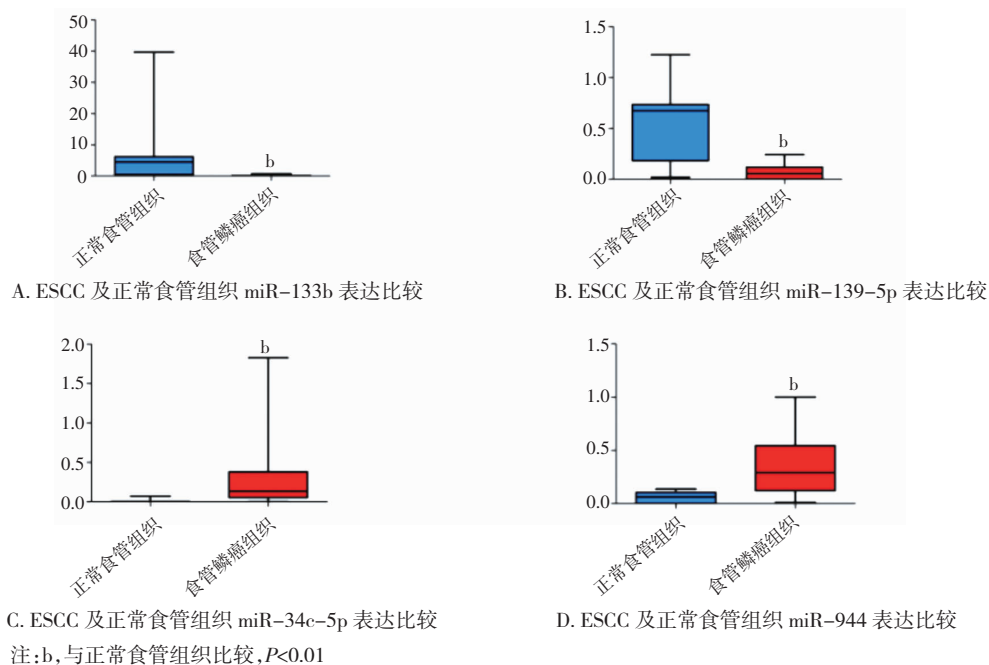


图2 食管鳞癌组织和正常食管组织 DE miRNA 表达情况

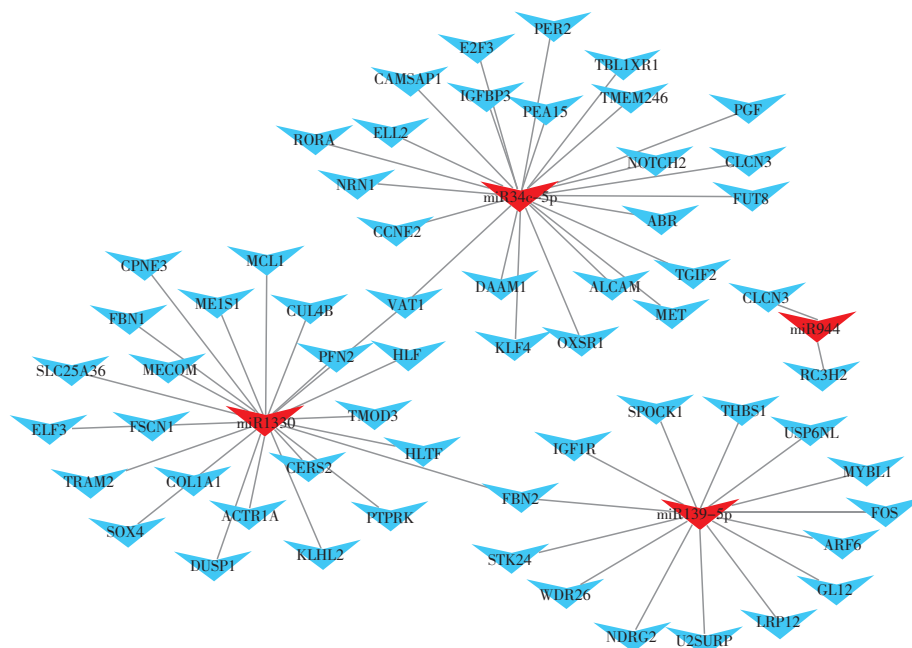


图3 食管鳞癌相关 miRNA-mRNA 调控网络

2.5 候选基因的生物学功能及通路富集分析

采用 DAVID 数据库对候选基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。其中 GO 分析表明,候选基因富集在生物过程(biological processes, BP)的主要包括细胞增殖的负调节、细胞凋亡过程的调节、细胞迁移、胶原生物合成过程、细胞黏附(图

4A);富集在细胞组分(cellular components, CC)的主要包括细胞质、细胞膜和核质(图 4B);富集在分子功能(molecular functions, MF)的主要包括 β -catenin 结合、蛋白质结合(图 4C)。KEGG 通路富集分析显示候选基因主要在 PI3K-Akt 信号通路、Rap1 信号通路、p53 信号通路中富集(图 4D)。以 $P <$

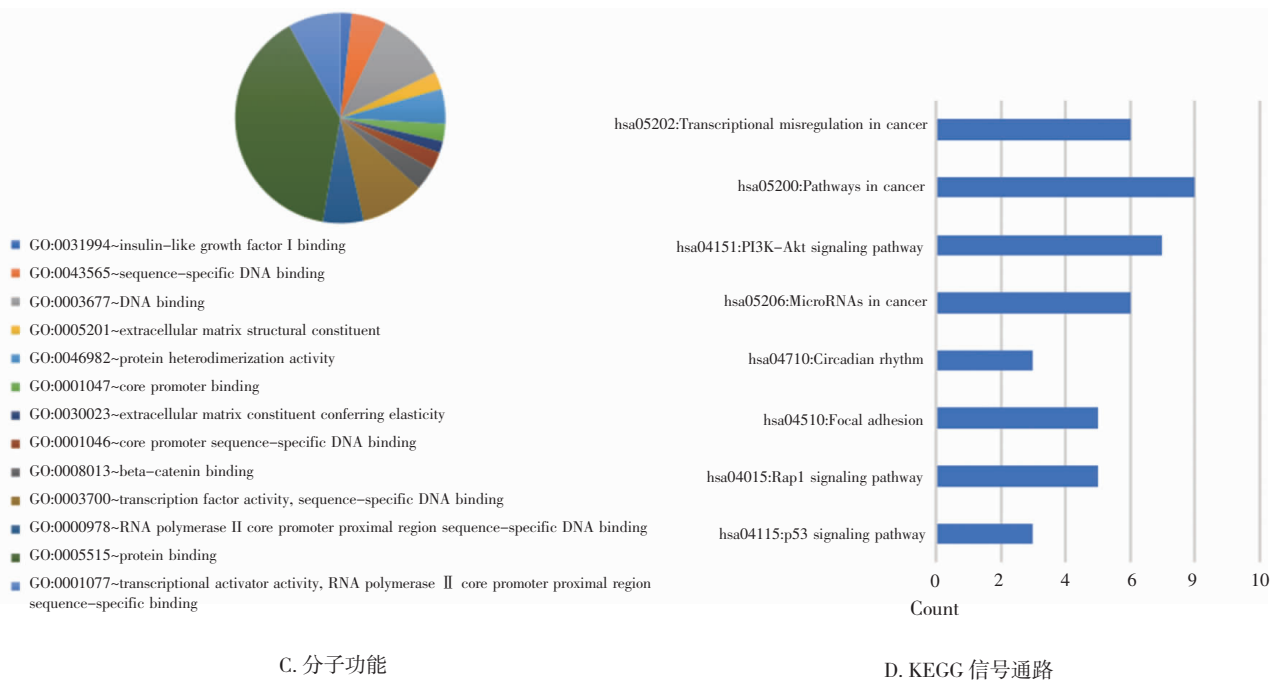
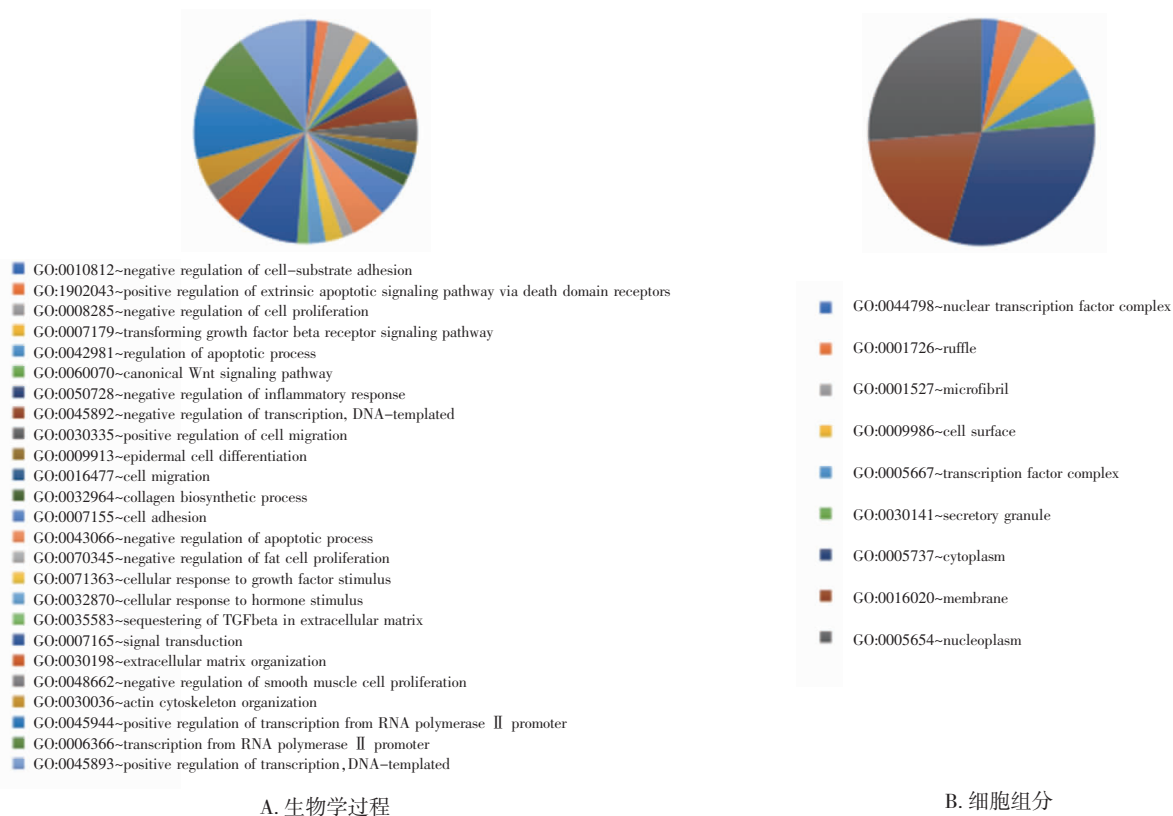


图 4 GO 和 KEGG 富集分析结果

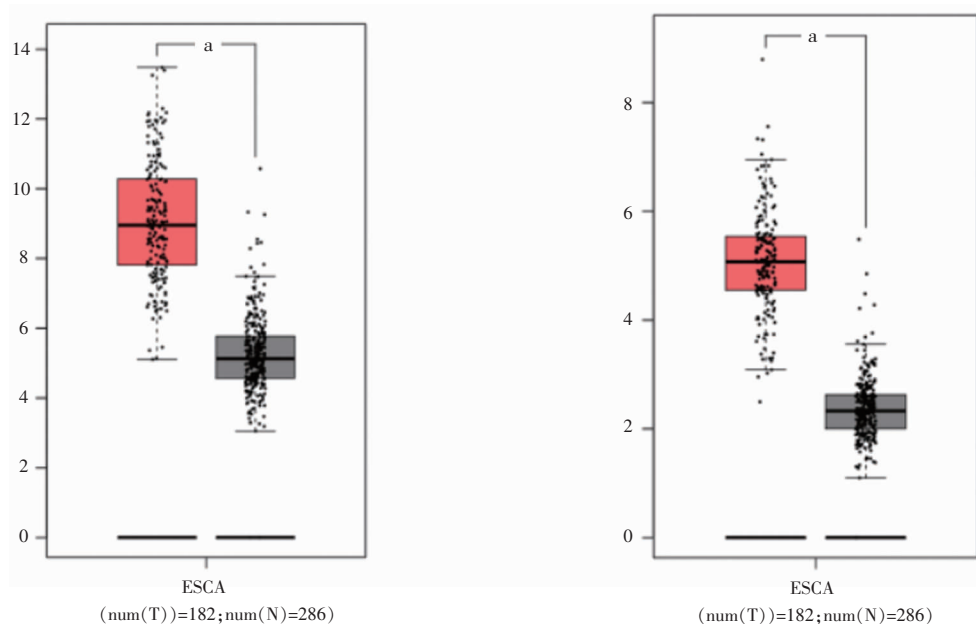
0.05 为差异有统计学意义的阈值条件。

2.6 候选基因表达水平与生存分析

使用 GEPIA 网站对食管癌组织和正常食管组织之间的基因表达水平进行分析,其中下调的 DE-miRNA(miR-133b)靶基因 *COL1A1*、*SOX4* 的表达水平在食管癌组织中明显高于正常食管组织(图 5; $P<0.05$)。进一步生存分析发现 *COL1A1* 和 *SOX4* 与食管癌较差的无病生存期相关(图 6; $P<0.05$)。

3 讨论

研究发现,饮食和生活习惯以及遗传多态性是已知的 ESCC 相关危险因素。目前,ESCC 发生和进展的复杂分子机制尚未完全清楚^[8]。虽然治疗方式的多样化使得 EC 的生存率有了相应的提高,但是 EC 预后仍然不佳^[9]。因此,寻找与 ESCC 病因、发病

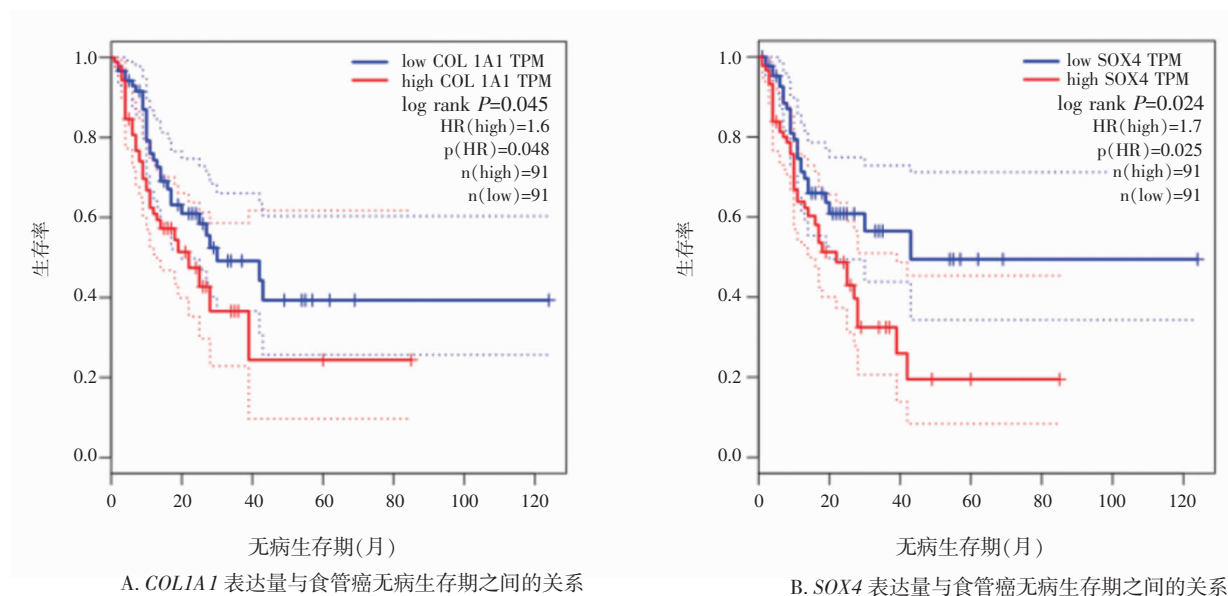


A. 食管癌及正常食管组织 *COL1A1* 表达比较

B. 食管癌及正常食管组织 *SOX4* 表达比较

注:a,与正常食管组比较, $P < 0.05$

图5 食管癌和正常食管组织中 *COL1A1* 和 *SOX4* 的表达水平



A. *COL1A1* 表达量与食管癌无病生存期之间的关系

B. *SOX4* 表达量与食管癌无病生存期之间的关系

图6 食管癌中低表达和高表达 *COL1A1* 和 *SOX4* 的无病生存期

机制及预后相关的分子标志物是必不可少的。ESCC 的发生发展是多基因及多条信号通路共同作用的结果,从多基因水平研究肿瘤基因表达谱为更好地探索肿瘤发病机制提供帮助。基因芯片可以同时检测上万个基因的表达水平,是一种研究基因组和基因间相互作用的强有力工具^[10]。本研究应用生物信息学方法筛选了 ESCC 组织与正常食管组织的 DE miRNA 和 DEGs。得到与 ESCC 相关的 4 个 DE miRNA 及 1 353 个 DEGs,并运用在线数据库预测 4 个 DE miRNA 的靶基因,通过整合 DEGs 和 DE miRNA 的靶基因,筛选出 60 个候选基因并进行 GO 和 KEGG 富集分析,发现其主要富集在 PI3K-Akt 信号通路、Rap1 信号通路和 P53 信号通路。进一步通过生存分析发现高表达 *COL1A1*、*SOX4* 与食管癌患者较差的无病生存期相关。

微小 RNA(miRNA)是高度保守的短链非编码 RNA^[11],多项研究表明,miRNA 可以调控许多与肿瘤发生发展相关的重要基因,也可以调节肿瘤的增殖、凋亡、侵袭和转移等^[12-14]。本研究结果提示在 ESCC 组织中 miR-34c-5p、miR-944 表达上调,miR-133b、miR-139-5p 表达下调。邓鑫和罗茂等^[15]发现 miR-944 在 ESCC 组织表达中上调,其可能通过促进癌细胞的增殖和侵袭能力参与 ESCC 的发生发展,miR-139-5p 在人 ESCC 中发挥生长和侵袭抑制功能^[16],miR-133b 可能通过下调 EGFR 的表达抑制食管鳞癌的增殖、侵袭和转移,在 ESCC 的演进中起负调控作用^[17]。因此,miR-944、miR-133b 及 miR-139-5p 在 ESCC 中存在差异表达,且对食管癌的发生及进展具有一定的调控作用,miR-34c-5p 在 ESCC 中的作用尚未见相关报道。

此外,这 4 个 miRNA 在其他肿瘤中也具有重要作用,陈莹等^[18]发现 miR-34c-5p 在肺癌组织中高表达;miR-944 在宫颈癌、子宫内膜癌和乳腺癌等肿瘤组织中过度表达,且其高表达与子宫内膜癌患者不良预后密切相关^[19-21];miRNA-133b 已被证明在胃癌、前列腺癌和结肠直肠癌中表达下调^[22];MiR-139-5p 在非小细胞肺癌组织中低表达^[23],且在上皮性卵巢癌中 MicroRNA-139 通过直接靶向 HDGF 来抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[24]。

通过生物信息学预测发现 *SOX4*、*COL1A1* 为 miR-133b 的靶基因。*SOX4* 是 SOX 转录因子家族的成员,研究表明 *SOX4* 在多种人类肿瘤(如食管癌、乳腺癌、肝细胞癌、结直肠癌和肺癌)中的表达明显升高,*SOX4* 的下调可以抑制肿瘤的转移^[25],可通过调节 Wnt、Notch1 和 p53 等信号通路促进肿瘤细胞的生长和转移^[26]。I 型胶原 A1(COL1A1)是 I 型胶原蛋白的主要成分,能够诱导 I 型胶原合成,在肿瘤细胞浸润及迁移中发挥重要作用^[27-28]。Zhu 等^[29]发现 *COL1A1* 可促进乳腺癌转移,可能成为乳腺癌新的预后生物标志物和乳腺癌的潜在治疗靶点。本研究运用 GEPIA 网站进行生存分析发现,*SOX4*、*COL1A1* 与食管癌患者较差的无病生存期相关。提示 *SOX4*、*COL1A1* 与食管癌的进展及预后可能具有密切的关系,其具体机制尚需进一步实验验证。

GO 富集分析表明 60 个候选基因主要富集在细胞增殖、凋亡、黏附、迁移等生物学过程。KEGG 富集通路分析发现其主要富集在 PI3K/AKT、Rap1、P53 信号通路,这 3 个信号通路均被发现与食管癌的发生及进展关系密切。这进一步证实了 ESCC 的发生发展可能与多种信号通路的共同调节紧密相关。

综上所述,ESCC 中 DE miRNA 可能与 ESCC 的病因、发病机制及预后具有相关性。本研究通过生物信息学技术构建 ESCC 的 miRNA-mRNA 调控网络并进行信号通路分析,为 ESCC 发生发展的分子机制研究提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Wang Y, Jiang Z, Xu C, et al. Increased MET gene copy number negatively affects the survival of esophageal squamous cell carcinoma patients[J]. BMC Cancer, 2019, 19: 240.
- [2] Lyu J, Li T, Wang Q, et al. Outcomes of concurrent chemoradiotherapy versus chemotherapy alone for stage IV esophageal squamous cell carcinoma: a retrospective controlled study[J]. Radiat Oncol, 2018, 13: 233.
- [3] Deng J, Weng X, Ye J, et al. Identification of the germline mutation profile in esophageal squamous cell carcinoma by whole exome sequencing[J]. Front Genet, 2019, 10: 47.
- [4] Xiao Q, Chen T, Wu Y, et al. MicroRNA6753p promotes esophageal

- squamous cell cancer cell migration and invasion[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(4):3631–3640.
- [5] Cheng L, Shi G, Fang C, et al. Identifying the differentially expressed microRNAs in esophagus squamous cell carcinoma of Kazakh patients in Xinjiang[J]. Oncol Lett, 2019, 17(3):2657–2668.
- [6] Zhang Y, Ren S, Yuan F, et al. miR-135 promotes proliferation and stemness of oesophageal squamous cell carcinoma by targeting RERG[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(S2):1210–1219.
- [7] Liu Y, Tang Y, Li P. Inhibitory effect of microRNA-455-5p on biological functions of esophageal squamous cell carcinoma Eca109 cells via Rab31[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6):4959–4966.
- [8] Wen J, Hu Y, Liu Q, et al. miR-424 coordinates multilayered regulation of cell cycle progression to promote esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation[J]. EBioMedicine, 2018, 37:110–124.
- [9] van Rijswijk AS, Hagens ERC, van der Peet DL, et al. Differences in esophageal cancer surgery in terms of surgical approach and extent of lymphadenectomy: findings of an international survey[J]. Ann Surg Oncol, 2019, 26(7):2063–2072.
- [10] 陈林波, 李先鹏, 姜昊, 等. 肝癌相关基因的生物信息学分析及功能预测[J]. 温州医科大学学报, 2018, 48(11):52–56.
- [11] Jiang T, Liu J, Mu J. Downregulation of microRNA449a5p promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation via cyclin D1 regulation[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(1):848–854.
- [12] Jiang C, Chen X, Alattar M, et al. MicroRNAs in tumorigenesis, metastasis, diagnosis and prognosis of gastric cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2015, 22:291–301.
- [13] Shirjang S, Mansoori B, Asghari S, et al. MicroRNAs in cancer cell death pathways: apoptosis and necroptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 139:1–15.
- [14] Ban E, Kwon TH, Kim A. Delivery of therapeutic miRNA using polymer-based formulation[J]. Drug Deliv Transl Res, 2019, 5:1–14.
- [15] 邓鑫, 罗茂. miR-944 在食管鳞癌中的表达及其对 Eca109 细胞增殖、侵袭的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(8):684–690.
- [16] Liu R, Yang M, Meng Y, et al. Tumor-suppressive function of miR-139-5p in esophageal squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e77068.
- [17] 曾薇, 朱金峰, 孔德华, 等. miR-133b 通过靶向调控 EGFR 影响食管鳞癌的侵袭、转移[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(7):1010–1016.
- [18] 陈莹, 张若冰, 杨凯云, 等. MicroRNA-590-5p、microRNA-103、microRNA-34c-5p、Dicer 及 BRMS-1 基因在肺癌中的表达研究[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(14):52–55.
- [19] He H, Tian W, Chen H, et al. MiR-944 functions as a novel oncogene and regulates the chemoresistance in breast cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(2):1599–1607.
- [20] He Z, Xu H, Meng Y, et al. miR-944 acts as a prognostic marker and promotes the tumor progression in endometrial cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88:902–910.
- [21] 章丽, 张志秀, 于爱军, 等. 子宫内膜癌组织 microRNA-944 的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(1):50–54.
- [22] Lin C, Xie L, Lu Y, et al. miR-133b reverses cisplatin resistance by targeting GSTP1 in cisplatin-resistant lung cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4):2050–2058.
- [23] You YH, Wang XG, Xu M, et al. Expression and clinical significance of miR-139-5p in non-small cell lung cancer[J]. J Int Med Res, 2019, 47(2):867–874.
- [24] Liu J, Jin S, Wang R. MicroRNA139 suppressed tumor cell proliferation, migration and invasion by directly targeting HDGF in epithelial ovarian cancer[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(3):3379–3386.
- [25] Zhou CL, Li JJ, Ji P. Propofol suppresses esophageal squamous cell carcinoma cell migration and invasion by down-regulation of sex-determining region Y-box 4(SOX4)[J]. Med Sci Monit, 2017, 23:419–427.
- [26] Pang L, Li B, Zheng B, et al. miR-138 inhibits gastric cancer growth by suppressing SOX4[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2):1295–1302.
- [27] Ma HP, Chang HL, Bamodu OA. Collagen 1A1(COL1A1) is a reliable biomarker and putative therapeutic target for hepatocellular carcinogenesis and metastasis[J]. Cancer, 2019, 11(6):786.
- [28] 黄非, 王建洪, 毛贺娟, 等. miR-29 a-3 p 调控 COL1 A1 参与喉癌 Hep-2 细胞增殖及凋亡过程研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(19):1911–1914.
- [29] Zhu X, Rao X, Yao W, et al. Downregulation of MiR-196b-5p impedes cell proliferation and metastasis in breast cancer through regulating COL1A1[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(10):3122–3132.

(责任编辑:张辉洁)