

## EGFR突变相关miR-335靶基因预测及其功能的生物信息学分析\*

苏玉亮 张 寰 曲金力 钱碧云

**摘要 目的:**通过筛选肺癌组织中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变差异表达的microRNAs(miRs),并对其靶基因预测及功能的生物信息学分析,以期 miR与EGFR在肺癌中潜在的相互作用机制研究奠定基础。**方法:**利用TaqMan低密度芯片(TaqMan Low Density Array, TLDA)在4对肺癌组织中筛选EGFR突变差异表达的miRs。应用miRanda、PicTar和TargetScan数据库进行靶基因预测,并通过DAVID数据库对预测的靶基因进行Gene Ontology(GO)分析和KEGG信号转导通路富集分析。**结果:**miR-335在配对肺癌组织样本间差异表达值 $\Delta\Delta Ct$ (cycle threshold)的绝对值均 $>1$ ,预测其有57个靶基因,功能主要集中于通道调节因子活性等8类分子( $P<0.05$ )和RNA代谢调节等22类生物学过程( $P<0.05$ )。分析结果未提示有显著富集的细胞组分和信号转导通路( $P>0.05$ )。**结论:**本研究虽然未明确提示miR-335与EGFR具有直接作用,但是其参与的调控网络可能与EGFR具有密切联系。

**关键词** 肺癌 表皮生长因子受体 miR-335 生物信息学

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.10.002

### Bioinformatics analysis of target gene prediction and functions of miR-335 related to EGFR mutation

Yuliang SU, Huan ZHANG, Jinli QU, Biyun QIAN

Correspondence to: Biyun QIAN; E-mail: qianbiyun@yahoo.com.cn

Department of Epidemiology and Biostatistics, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin City, Tianjin 300060, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81071914) and the Natural Science Foundation of Tianjin (No. 13JCYBJC23100)

**Abstract Objective:** This study measured the expression of microRNAs (miRs) between paired lung cancer tissues with and without epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and then bioinformatically predicted the target genes. The functions of miRs were analyzed to provide basis for the potential regulator mechanism between miR and EGFR in the future. **Methods:** The TaqMan low-density array was applied to identify the miRs differently expressed between 4 paired lung cancer tissues with and without EGFR mutation. The target genes of miR-335 were screened using miRanda, PicTar, and TargetScan databases. Subsequent bioinformatics analysis of these target genes was performed by gene ontology (GO) and KEGG pathway analyses using the DAVID database. **Results:** The miR-335 expression between paired lung cancer tissues was different. A total of 57 predicted target genes of miR-335 were found. The gene set was mainly located in eight molecular functions ( $P<0.05$ ), such as channel regulator activity, among others, and 22 biological processes ( $P<0.05$ ), such as regulation of RNA metabolic process, among others. GO cellular component and KEGG pathway analyses found no significant result. **Conclusion:** Results showed that miR-335 had no direct effect on EGFR. However, the regulatory network involving miR-335 might be closely associated with EGFR.

**Keywords:** lung carcinoma, EGFR, miR-335, bioinformatics

肺癌已成为我国乃至全世界最常见的恶性肿瘤之一,发病率呈逐渐上升的趋势,且5年生存率小于15%,居癌症死亡率的第一位<sup>[1-2]</sup>。研究表明在大部分肺癌患者中EGFR呈现高表达和高突变率<sup>[3]</sup>,在欧洲和东亚人群EGFR突变率分别高达10%~23%和30%~40%<sup>[4]</sup>。EGFR突变对于肺癌的诊断、治疗及预后评估具有重要的指导意义。

microRNA是一类大小约22个核苷酸(nts)的内源性非编码小RNA,参与细胞增殖、分化、代谢、凋亡等过程,在肿瘤形成过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>,不仅可以作为癌症的早期诊断和预后评估的标志物,还是潜在的治疗靶点<sup>[6]</sup>。miR对EGFR及其通路的调控研究可能对肺癌具有重要意义。本文利用TaqMan低密度芯片检测肺癌组织中可能与EGFR突变相关的miRs

作者单位:天津医科大学附属肿瘤医院流行病学与生物统计学教研室,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

\*本文课题受国家自然科学基金(编号:81071914)和天津市自然科学基金(编号:13JCYBJC23100)资助

通信作者:钱碧云 qianbiyun@yahoo.com.cn

表达谱,筛选差异表达的 miRs,并通过生物信息学方法对其进行靶基因数据整合和系统的功能分析归纳,以期为将来靶基因的实验鉴定及其生物学功能的研究提供一定前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 肺癌组织RNA提取

收集2011年1月至2011年10月天津医科大学附属肿瘤医院住院肺癌患者资料,选取性别和年龄匹配的肺腺癌Ⅲ或Ⅳ期手术样本8例(其中EGFR突变型和EGFR野生型各4例),组织蜡块切片镜下观察癌细胞含量均在60%以上。以Trizol reagent提取总RNA。采用Nanodrop和1%琼脂糖凝胶电泳进行浓度和质量检测。

### 1.2 TLDA芯片筛选差异表达的miRs

采用TLDA芯片(包含667个人类已知的miRs及多个内参,共计768个miRs)进行全基因组芯片检测,按照实验步骤在ABI公司的7900HT系统上进行384孔默认的热循环条件。

### 1.3 靶基因预测

选择miRanda、PicTar和TargetScan共3个在线数据库进行预测,将在2个及以上数据库中预测到的靶基因纳入下一步分析中。

### 1.4 Gene-Ontology分析及KEGG通路分析

利用DAVID在线数据库,通过GO分析对靶基因进行分层功能富集分析,包括分子功能(molecular function, MF)、生物学过程(biological process, BP)和细胞组分(cellular component, CC),同时还对预测的靶基因进行KEGG信号转导通路富集分析。

### 1.5 统计学分析

TLDA芯片结果采用7900HT SDS2.4和RQ2.4读取并分析,miR表达值Ct(cycle threshold)<35认定为具有实际表达,它与相应的内参表达值Ct之间的差值记为 $\Delta Ct$ ,成对匹配样本间(一个为EGFR突变型,一个为EGFR野生型) $\Delta Ct$ 的差值记为 $\Delta\Delta Ct$ ,选取具有实际表达、 $\Delta Ct > 1.5$ 或 $< -1.5$ 、成对匹配样本间的 $\Delta\Delta Ct$ 绝对值 $> 1$ 的前几位miRs。在GO分析及KEGG通路分析中,数据间差异比较采用ANOVA检验,其中在KEGG通路分析中,通过Fisher Exact Test计算P值,以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 miR芯片分析结果

miR芯片分析结果显示,在前9位EGFR突变差异表达的miRs中(图1),仅miR-335和miR-345在4对样本中 $\Delta\Delta Ct$ 的差值绝对值均 $> 1$ ,综合考虑其与肿瘤关联及相关功能研究现状,选择miR-335进行靶基因预测。

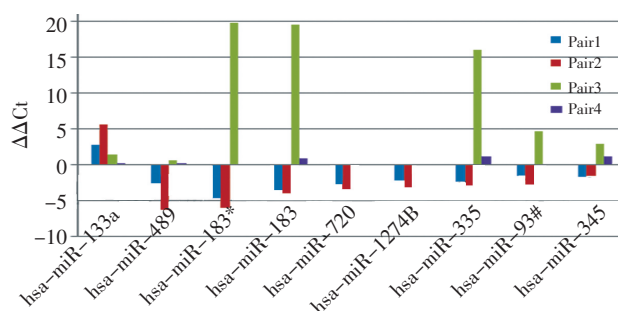


图1 肺癌组织中EGFR突变差异表达的前9位miRs

Figure 1 Top nine miRs differentially expressed in lung cancer tissues related to EGFR mutation

### 2.2 靶基因预测结果

利用miRanda(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)、TargetScan([http://www.targetscan.org/vert\\_61/](http://www.targetscan.org/vert_61/))和PicTar(<http://pictar.mdc-berlin.de/>),共3个在线数据库进行靶基因预测,取其交集(2个及以上数据库预测到),得到57个潜在的靶基因,其中3个数据库同时预测到的有2个,分别为真核翻译终止因子1(eukaryotic translation termination factor1, ETF1)和sorcs1受体1(soRtilin-related vps10 domain containing receptor1)。

### 2.3 GO分析和KEGG信号转导通路富集分析结果

针对预测出的57个靶基因,利用DAVID数据库,根据GO注释中的分子功能、生物学过程和细胞组分进行注释层次分类及富集分析,同时进行KEGG信号转导通路富集分析。结果共得到有统计学意义的8类分子功能注释信息( $P < 0.05$ ,表1),主要集中于通道调节因子活性、钙离子通道活性、序列特异性DNA结合和转录因子活性等,以及22类生物学过程注释信息( $P < 0.05$ ,表2),主要集中于RNA代谢调节、神经元发育、轴突生成和神经细胞分化过程等。结果虽然提示有3类细胞组分注释信息和1条富集的信号转导通路,但无统计学意义( $P > 0.05$ ,数据未列出)。

表1 miR-335预测靶基因的GO分析分子功能分类

Table 1 Molecular function of miR-335 target genes predicted by GO analysis

Molecular function	N. of genes(%)	P	Genes
Channel regulator activity	4(7.0)	0.002	RASA1、HPCAL4、NRXN1、STIM2
Calcium channel regulator activity	3(5.3)	0.002	HPCAL4、NRXN1、STIM2

表1 miR-335 预测靶基因的 GO 分析分子功能分类 (续表1)

Table 1 Molecular function of miR-335 target genes predicted by GO analysis

Molecular function	N. of genes (%)	P	Genes
Sequence-specific DNA binding	9(15.8)	0.002	ISL1、LASS5、LMX1A、MAX、POU5F1, et al
Transcription factor activity	10(17.5)	0.013	ISL1、LASS5、LMX1A、MAX、POU5F1, et al
Calmodulin binding	4(7.0)	0.018	ADCY3、EEF2K、MAP2、MYO1D
Metal ion binding	24(42.1)	0.033	ADAM19、ATP1B1、BCL11B、ISL1、LMX1A, et al
Cation binding	24(42.1)	0.036	ADAM19、ATP1B1、BCL11B、ISL1、LMX1A, et al
Ion binding	24(42.1)	0.043	ADAM19、ATP1B1、BCL11B、ISL1、LMX1A, et al

表2 miR-335 预测靶基因的 GO 分析生物学过程分类

Table 2 Biological process of miR-335 target genes predicted by GO analysis

Biology process	N. of genes (%)	P	Genes
Regulation of RNA metabolic process	16(28.1)	0.001	BCL11B、ISL1、LASS5、LMX1A、POU5F1, et al
Neuron projection development	6(10.5)	0.002	POU5F1、EPHA4、ISL1、LMX1A、MAP2, et al
Axonogenesis	5(8.8)	0.005	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、NRXN1
Cell morphogenesis involved in neuron differentiation	5(8.8)	0.006	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、NRXN1
Axon guidance	4(7.0)	0.006	EPHA4、ISL1、LMX1A、NRXN1
Neuron projection morphogenesis	5(8.8)	0.007	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、NRXN1
Neuron development	6(10.5)	0.007	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、MAP2, et al
Regulation of transcription, DNA-dependent	14(24.6)	0.007	BCL11B、LASS5、ISL1、LMX1A、POU5F1, et al
Cell projection organization	6(10.5)	0.010	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、MAP2, et al
Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	6(10.5)	0.010	BCL11B、ISL1、SMARCA2、SP1、HAND1, et al
Cell morphogenesis involved in differentiation	5(8.8)	0.011	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、NRXN1
Cell projection morphogenesis	5(8.8)	0.011	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、NRXN1
Cell part morphogenesis	5(8.8)	0.013	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、NRXN1
Neuron differentiation	6(10.5)	0.019	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、MAP2, et al
Positive regulation of transcription, DNA-dependent	6(10.5)	0.026	BCL11B、ISL1、SMARCA2、SP1、HAND1, et al
Positive regulation of RNA metabolic process	6(10.5)	0.027	BCL11B、ISL1、SMARCA2、SP1、HAND1, et al
Regulation of transcription	16(28.1)	0.032	BCL11B、ISL1、LASS5、LMX1A、MAX, et al
Cell morphogenesis	5(8.8)	0.037	BCL11B、EPHA4、ISL1、LMX1A、NRXN1
Heart development	4(7.0)	0.041	ADAM19、ISL1、HAND1、CRKL
Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	7(12.3)	0.042	BCL11B、ISL1、SMARCA2、SP1、HAND1, et al
Tube development	4(7.0)	0.043	SP1、HAND1、NR4A3、PGF
Positive regulation of transcription	6(10.5)	0.049	BCL11B、ISL1、SMARCA2、SP1、HAND1, et al

### 3 讨论

关于EGFR与肿瘤的关系目前研究较多,且大多数人类上皮细胞癌是以生长因子及表皮生长因子受体家族的功能性活化为标志<sup>[7]</sup>。近年来出现的针对EGFR基因突变的靶向治疗药物表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)是肺癌治疗史上里程碑式的进展。研究表明具有EGFR基因突变的患者对EGFR-TKIs治疗的敏感率可达到70%~80%<sup>[8]</sup>。随着研究的深入,miR对的EGFR调节得到了很多实验的验证,如miRTarBas数据库(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.html>)中收录的hsa-miR-1、hsa-miR-128b、hsa-miR-146a、

hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-542-5p和hsa-miR-7,还有一些未被此数据库收录,如has-miR-133a<sup>[9]</sup>和has-miR-145<sup>[10]</sup>等。

目前很多研究表明miR-335与肿瘤细胞生长、转移和侵袭密切相关。Xiong等<sup>[11]</sup>研究发现,miR-335在前列腺癌细胞系和组织中低表达。Wang等<sup>[12]</sup>在研究中发现miR-335在乳腺癌标本中显著低表达,并有研究表明乳腺癌细胞系中miR-335高表达可抑制乳腺癌细胞的转移和侵袭<sup>[13]</sup>。Huang等<sup>[14]</sup>研究指出在胰腺癌中miR-335可通过降解促癌基因SOX4的mRNA抑制肿瘤细胞的生长。还有研究报道miR-335低表达与卵巢癌化疗抵抗相关<sup>[15]</sup>。在中国



汉族肺癌人群研究中,Zu等<sup>[16]</sup>发现作为miR-335的靶基因,BRIC基因上与miR-335结合的靶位点遗传变异T>C与肺癌的易感性显著相关。但在星形细胞瘤细胞中,Shu等<sup>[17]</sup>研究指出miR-335可直接作用于潜在的抑癌基因DAAM1,促进肿瘤细胞的生长和侵袭。另有研究指出组织miR-335高表达与胃癌的较高复发率和较差生存相关<sup>[18]</sup>。这些研究说明miR-335的不同作用可能具有组织特异性,或与种族相关。

本生物信息学研究结果提示miR-335的作用主要集中在通道调节因子活性和钙离子通道活性等8类分子功能以及RNA代谢和神经元发育等22类生物学过程。离子通道受细胞内许多信号途径包括蛋白磷酸化和去磷酸化的调节,其中EGFR信号通路对离子通道活性调节具有重要作用<sup>[19]</sup>。EGFR信号转导通路对离子通道功能的调节主要通过调节转录因子来调控基因的表达以及通过活化细胞内效应器酶,参与离子通道的调节。在生物学过程方面,已有动物实验证明EGFR通过自分泌的方式活化后,可阻止神经前体细胞(neural precursor cells,NPCs)向神经细胞(neuron)分化<sup>[20]</sup>。KEGG通路富集分析结果虽然无统计学显著性( $P=0.056$ ),但还是提示miR-335可能与MAPK通路相关,而且Lynch等<sup>[21]</sup>研究显示miR-335通过与转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ ,TGF- $\beta$ )信号通路上的多个基因相结合抑制神经母细胞瘤细胞的侵袭性,而TGF- $\beta$ 信号通路可调节包含促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)在内的多个胞内信号通路。

综上所述,本研究利用TLDA芯片技术在配对肺癌组织中筛选EGFR突变差异表达的miRs,并利用多个生物信息学数据库进行靶基因预测、GO分析和KEGG信号转导通路富集分析等生物信息学分析,结果提示miR-335与EGFR可能不存在直接作用关系,但是其潜在的调控网络与EGFR具有密切关系,为miR-335的后续功能及其与EGFR相互作用机制研究提供理论基础。

参考文献

- 1 Chen W, Zhang S, Zou X. Estimation and projection of lung cancer incidence and mortality in China[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2010, 13(5):488-493.
- 2 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- 3 Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, et al. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(12 Pt 2):4227s-4232s.
- 4 Yatabe Y, Mitsudomi T. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancers[J]. Pathol Int, 2007, 57(5):233-244.

- 5 马筱秋,蔡建春.mic的RNAs在肿瘤表观遗传调控中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(4):237-240.
- 6 Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(3):143-159.
- 7 Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11):1160-1174.
- 8 Ulahannan SV, Brahmer JR. Antiangiogenic agents in combination with chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer Invest, 2011, 29(4):325-337.
- 9 Tao J, Wu D, Xu B, et al. microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor[J]. Oncol Rep, 2012, 27(6):1967-1975.
- 10 Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, et al. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines[J]. Ann Oncol, 2008, 19(6):1053-1059.
- 11 Xiong SW, Lin TX, Xu KW, et al. MicroRNA-335 Acts as a Candidate Tumor Suppressor in Prostate Cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2013.[Eupb ahead of print].
- 12 Wang F, Zheng Z, Guo J, et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor[J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(3):586-593.
- 13 Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. Nature, 2008, 451(7175):147-152.
- 14 Huang HY, Cheng YY, Liao WC, et al. SOX4 transcriptionally regulates multiple SEMA3/plexin family members and promotes tumor growth in pancreatic cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(12):e48637.
- 15 Sorrentino A, Liu CG, Addario A, et al. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2008, 111(3):478-486.
- 16 Zu Y, Ban J, Xia Z, et al. Genetic variation in a miR-335 binding site in BIRC5 alters susceptibility to lung cancer in Chinese Han populations[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(2):529-534.
- 17 Shu M, Zheng X, Wu S, et al. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells[J]. Mol Cancer, 2011, 10:59.
- 18 Yan Z, Xiong Y, Xu W, et al. Identification of hsa-miR-335 as a prognostic signature in gastric cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e40037.
- 19 Martina J A, Lelouvier B, Puertollano R. The calcium channel mucolipin-3 is a novel regulator of trafficking along the endosomal pathway[J]. Traffic, 2009, 10(8):1143-1156.
- 20 Romero-Grimaldi C, Murillo-Carretero M, Lopez-Toledano MA, et al. ADAM-17/tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme inhibits neurogenesis and promotes gliogenesis from neural stem cells[J]. Stem Cells, 2011, 29(10):1628-1639.
- 21 Lynch J, Fay J, Meehan M, et al. MiRNA-335 suppresses neuroblastoma cell invasiveness by direct targeting of multiple genes from the non-canonical TGF-beta signalling pathway[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(5):976-985.

(2013-04-01收稿)  
(2013-04-30修回)  
(本文编辑:郑莉)