

基于生物信息学构建骨肉瘤 miRNA-mRNA 的调控网络

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3196>袁长深¹, 容伟明², 卢智贤², 段戡¹, 郭锦荣¹, 梅其杰¹

2095-4344.3196

投稿日期: 2020-04-08

送审日期: 2020-04-16

采用日期: 2020-05-30

在线日期: 2020-11-30

中图分类号:

R459.9; R318; R738.1

文章编号:

2095-4344(2021)17-02740-07

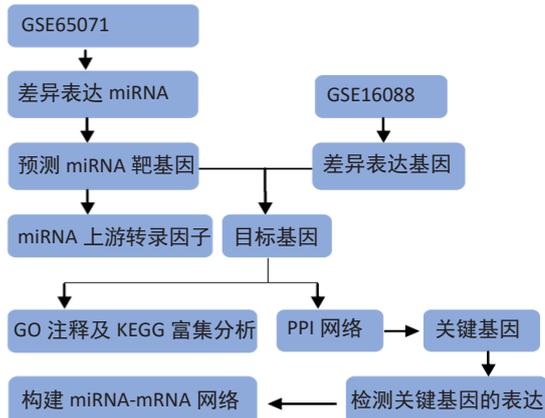
文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△通过数据库挖掘不同数据集筛选出骨肉瘤的差异表达 miRNA 和差异表达基因, 并预测差异表达 miRNA 上游的转录因子和对目标基因进行 GO 和 KEGG 富集分析;

△利用现代生物信息学方法, 从宏观层面构建骨肉瘤潜在在 miRNA-mRNA 调控网络, 为研究骨肉瘤治疗靶点提供新的方向, 对阐明其发病机制及后期实验奠定基础理论。



文题释义:

骨肉瘤: 是一种好发于儿童和青少年的原发性恶性肿瘤, 死亡率非常高。随着对骨肉瘤发病机制认识的不断深入和诊疗技术的发展, 骨肉瘤患者5年生生存率已由低于20%升高到50%~60%, 但对于发生肺转移或局部复发者, 预后仍极差。

miRNA: 是长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子, 参与细胞发育、分化和细胞周期等生物过程, 在肿瘤的发生机制中发挥重要作用。由于miRNA与肿瘤的发生、发展密切相关, 因而阐明miRNA在骨肉瘤中的作用机制, 有利于为治疗靶点提供一个新的方向。

摘要

背景: 骨肉瘤是常见的原发性恶性肿瘤, 其极易转移及预后较差; miRNA调控基因的表达参与骨肉瘤的发生与发展, 但其潜在的miRNA-mRNA 调控网络尚未全面建立。

目的: 通过生物学分析方法, 构建骨肉瘤发病机制中潜在在miRNA-mRNA调控网络, 以便更全面地阐明骨肉瘤的发病机制。

方法: 从GEO数据库获取miRNA微阵列数据集(GSE65071), 利用GEO2R对20个骨肉瘤血浆样本和15个健康者血浆样本的数据进行差异表达分析, 筛选出在骨中有靶向基因的差异表达miRNA, 并预测差异表达miRNA潜在在转录因子。同时, 从GEO数据库获得GSE16088数据集并在线分析获取差异表达基因, 将靶基因与差异表达基因交集获得目标基因。最后, 对目标基因进行GO注释和KEGG通路富集分析, 构建PPI网络和筛选出关键基因, 进一步评估关键基因的表达。

结果与结论: 共筛选出8个上调差异表达miRNA和14个下调差异表达miRNA, 其主要转录因子有EGR1、POU2F1、SP1、SP4、NFIC、LHX3。22个差异表达miRNA靶基因与差异表达基因交集共获得110个目标基因。KEGG途径分析显示目标基因主要涉及细胞衰老、Apelin信号通路和癌症中的蛋白聚糖等途径。PPI网络分析显示CCNB1、AURKA、CD44较为重要。结果显示, 通过构建骨肉瘤发病相关潜在在miRNA-mRNA 调控网络, 为深入研究骨肉瘤分子机制提供理论基础, 也为开发新的治疗靶标提供科学依据。

关键词: 骨; 骨肉瘤; 生物学分析; RNA; miRNA; mRNA; 基因; 蛋白; 靶向

Construction of osteosarcoma miRNA-mRNA regulatory network based on bioinformatics

Yuan Changshen¹, Rong Weiming², Lu Zhixian², Duan Kan¹, Guo Jinrong¹, Mei Qijie¹

¹The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yuan Changshen, Master, Associate chief physician, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Mei Qijie, Master, Associate chief physician, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

¹广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530023; ²广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市 530000

第一作者: 袁长深, 男, 1978年生, 硕士, 副主任医师, 主要从事骨与关节疾病的基础与临床研究。

通讯作者: 梅其杰, 硕士, 副主任医师, 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530023

<https://orcid.org/0000-0001-5749-9859> (袁长深)

基金资助: 广西中医药民族医药自筹科研课题(GZZC15-12), 项目负责人: 梅其杰; 广西中医药大学自然科学研究项目(2015MS007), 项目负责人: 郭锦荣

引用本文: 袁长深, 容伟明, 卢智贤, 段戡, 郭锦荣, 梅其杰. 基于生物信息学构建骨肉瘤 miRNA-mRNA 的调控网络 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(17):2740-2746.



Abstract

BACKGROUND: Osteosarcoma is a common primary malignant tumor, which is easy to metastasize and has a poor prognosis. MicroRNA (miRNA) regulates gene expression to participate in the occurrence and development of osteosarcoma, but its potential miRNA-mRNA regulatory network has not been fully established.

OBJECTIVE: To build a potential miRNA-mRNA regulatory network in the pathogenesis of osteosarcoma through bioinformatic analysis in order to comprehensively clarify the pathogenesis of osteosarcoma.

METHODS: GEO2R tool was used to perform differential expression analysis on the data of 20 osteosarcoma plasma samples and 15 healthy plasma samples, based on the miRNA microarray dataset (GSE65071) from the GEO database. Differentially expressed miRNAs with targeted genes in bone were screened, and potential transcription factors for differentially expressed miRNAs were predicted. Simultaneously, the GSE16088 dataset was obtained from the GEO database and analyzed online to obtain differentially expressed genes, and the target genes were intersected with the differentially expressed genes to obtain the desired genes. Finally, gene ontology (GO) annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. Protein-protein interaction network was then established, and hub genes were screened. The expression of hub genes was further evaluated.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 8 up-regulated and 14 down-regulated differentially expressed miRNAs were screened. The major transcription factors were EGR1, POU2F1, SP1, SP4, NFIC, and LHX3. In total, 110 desired genes were obtained by the intersection of 22 target genes with differentially expressed miRNA and differentially expressed genes. KEGG pathway analysis showed that the desired genes were mainly involved in cellular senescence, Apelin signaling pathway and proteoglycans in cancer. Protein-protein interaction network analysis showed that CCNB1, AURKA, and CD44 were more important. By constructing a potential miRNA-mRNA regulatory network related to osteosarcoma pathogenesis, it provides a theoretical basis for the in-depth study of osteosarcoma molecular mechanism and also provides a scientific basis for the development of new therapeutic targets.

Key words: bone; osteosarcoma; bioinformatics analysis; RNA; miRNA; mRNA; gene; protein; target

Funding: Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Self-funded Research Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. GZZC15-12 (to MQJ); Natural Science Research Project of Guangxi University of Chinese Medicine, No. 2015MS007 (to GJR)

How to cite this article: YUAN CS, RONG WM, LU ZX, DUAN K, GUO JR, MEI QJ. Construction of osteosarcoma miRNA-mRNA regulatory network based on bioinformatics. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2021;25(17):2740-2746.

0 引言 Introduction

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的原发性恶性肿瘤^[1], 死亡率和致残率非常高。随着对肿瘤发病机制认识不断深入和诊疗技术的发展, 骨肉瘤患者5年生存率已由低于20%升高到50%–60%, 但对于发生肺转移或局部复发的骨肉瘤患者, 预后仍极差。因此, 探索其潜在发病机制而研发骨肉瘤有效治疗方法是医学领域的热点话题。

MicroRNA (miRNA) 是基因组非编码部分产生小的保守的核糖核酸, 有20–24个核苷酸, 转录后调控下游基因表达, 参与细胞发育、分化和细胞周期^[2-3]。研究表明, miRNA与骨肉瘤的发展、预后密切相关^[4-5]。骨肉瘤患者外周血中miR-125b、miR-145^[6]、miR-199a-5p、miR-199a-3p等在骨肉瘤发病中起重要作用^[7], 可作为骨肉瘤发展的标志物, 有望作为骨肉瘤诊断、病情进展及预后评估的新型生化指标, 成为骨肉瘤治疗的新靶点^[8]。

生物信息学通过整合多个学科领域(包括生物学、计算机科学、数学等)的信息和知识, 从整体层面揭示疾病的复杂分子机制, 为医学领域提供新的方法。GEO数据库是由美国国立生物技术信息中心NCBI创建并维护的生物信息学数据库, 其收录了大量的高通量基因表达数据。该研究通过生物信息学挖掘骨肉瘤中差异表达miRNA和差异表达基因, 构建骨肉瘤发病机制中潜在miRNA-mRNA调控网络, 为骨肉瘤的早期诊断、治疗和预后提供理论依据。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 外周血 miRNA 芯片的来源 通过 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) 检索“osteosarcoma”“miRNA”等关键词, 并限制研究类型为 expression profiling by RT-PCR 和种属为 Homo sapiens, 检索 2019 年 12 月以前已报道的骨肉瘤外周血 miRNA 的表达谱, 最终筛选出由

GPL19631(Exiqon human V3 microRNA PCR panel I + II) 平台完成的 GSE65071 数据集, 其是一个包括 20 例儿童患者血浆样本 (10 例无转移局限型、10 例转移型) 和 15 例 18 岁健康个体对照血浆样本进行全面 miRNA 表达谱分析的数据集。该研究将 20 个骨肉瘤疾病样本作为骨肉瘤样本组, 15 个健康者的血浆样本作为对照组。

1.2 外周血差异表达 miRNA 筛选 选择数据集 GSE65071, 进入 GEO2R 页面 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE65071>), 选择“Analyze with GEO2R”项目, 点击“Define groups”对骨肉瘤血浆样本和正常血浆样本进行分组, 选择“Save all results”并保存至 TXT 文档。将 TXT 文档以 Excel 方式打开后, 筛选同时满足 $P < 0.05$ 和 $|\log_{2}FC| > 1$ 的差异表达 miRNA (DE-miRNA)。根据 P 值和差异倍数, 构建 miRNA 表达谱的火山图以便更直观地了解差异表达情况。

1.3 差异表达 miRNA 下游靶基因的预测 miRNet (<https://www.mirnet.ca/miRNet/upload/MirUploadView.xhtml>) 是一个集成 11 个数据库的 miRNA-靶标相互作用数据的在线工具, 可用于预测 miRNA 的下游靶基因。因此, 该研究通过 miRNet 数据库预测差异表达 miRNA 在骨中的下游靶基因。

1.4 差异表达 miRNA 上游的潜在转录因子 FunRich 数据库提供途径、转录因子、生物过程、细胞成分、分子功能和蛋白质-蛋白质相互作用等的注释, 使用 FunRich 软件预测在骨中有靶基因的差异表达 miRNA 潜在转录因子。将上调和下调的差异表达 miRNA 分别输入该软件, 获得前 10 个最显著的预测转录因子。

1.5 骨肉瘤差异表达基因数据处理 为提高筛选差异表达 miRNA 靶基因的可靠性, 通过 GEO 其他数据集验证其靶基因的表达。在 GEO 数据库中检索骨肉瘤 mRNA 的表达数据集, 该研究选择由 GPL96(Affymetrix Human Genome U133A Array) 平台完成的 GSE16088 数据集, 并利用“Analyze with

GEO2R”对 14 个儿童骨肉瘤组织样本与 3 个正常组织样本在线进行差异表达分析，下载分析后的结果，构建火山图并筛选出同时满足 $P < 0.05$ 和 $|\logFC| \geq 2$ 的差异表达基因。

1.6 筛选差异表达 miRNA 下游靶基因的目标基因 使用从 GEO 中得到的骨肉瘤样本与正常样本之间的差异表达基因，确定上调、下调的差异表达基因。利用韦恩图把上调的差异表达基因和下调的差异表达 miRNA 预测靶基因交集；下调的差异表达基因和上调的差异表达 miRNA 预测靶基因交集。

1.7 GO 功能注释和 KEGG 途径富集分析 Enrichr 是一个基于网页端的综合性基因集富集分析工具。采用 Enrichr 数据库对骨肉瘤中差异表达 miRNA 的靶目标基因进行基因本体论数据库 (GO) 功能注释和 KEGG 信号通路富集分析，其中 GO 分析包括 3 类：生物过程 (BP)、细胞成分 (CC) 和分子功能 (MF)。

1.8 蛋白质-蛋白质相互作用网络的建立与分析 为了更好地了解目标基因表达的蛋白之间的关系，使 String 数据库在综合得分 ≥ 0.4 条件下建立 PPI 网络。使用 cytoscape3.6.1 软件的插件“cytohubba”进行网络拓扑分析，筛选出 PPI 网络中前 20 个关键基因。

1.9 关键基因的鉴定 目前暂无检测骨肉瘤的基因数据库，骨肉瘤是肉瘤中的一种，因而采用肉瘤的相关数据库。基因表达谱交互分析 (GEPIA) 是一种基于 Web 的工具，可用于分析来自 TCGA、GTEx 肿瘤和正常样品的差异表达分析、相关性分析、患者存活率分析等。使用 GEPIA 进一步验证前 20 个关键基因在肉瘤中的表达水平，关键基因同时满足 $|\logFC| > 1$ 和 $P < 0.05$ 被认为差异有显著性意义，构建潜在 miRNA-mRNA 关系网络。

2 结果 Results

2.1 芯片数据集 在 GEO 数据库中，筛选出 GSE65071 芯片数据，其由 GPL19631(<http://www.exiqon.com/mirna-pcr-panels>) 平台完成，数据样本为 20 例骨肉瘤患者血浆样本、15 例健康者血浆样本。

2.2 芯片数据差异表达 miRNA 的筛选 使用 GEO2R 在线分析，对比 GSE65071 数据集中骨肉瘤样本组与对照组的 miRNA 表达差异，输出结果后再以 $P < 0.05$ 、 $|\logFC| > 1$ 作为条件进行严格筛选，共筛选出 265 个差异表达 miRNA，包括 60 个上调差异表达 miRNA 和 205 个下调差异表达 miRNA，见图 1。

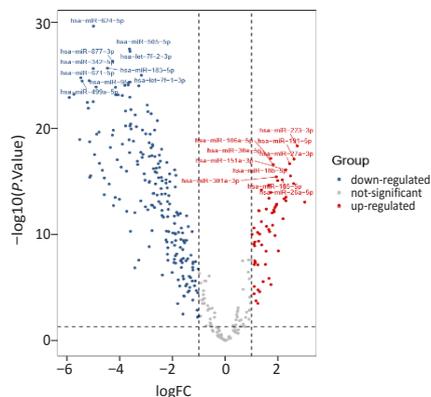
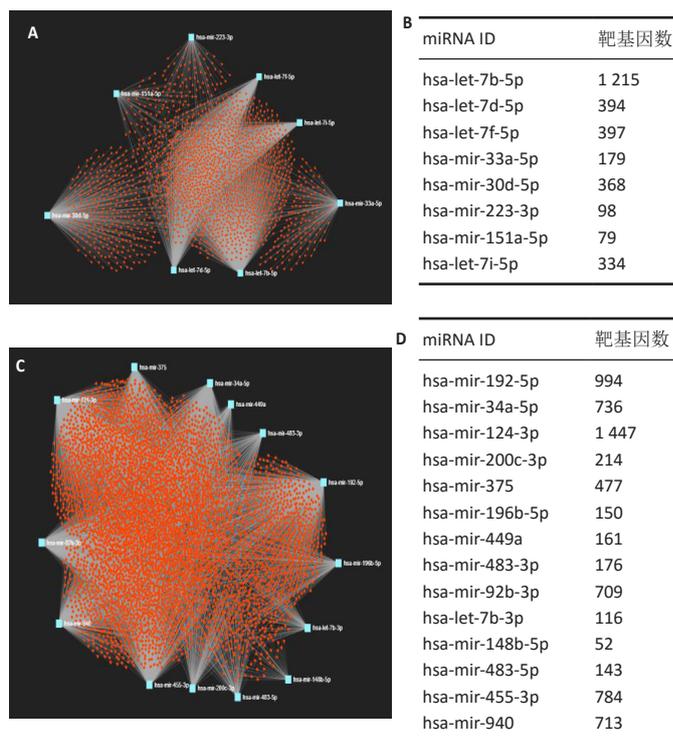


图 1 | 差异表达 miRNA 的筛选 (DE-miRNA)
Figure 1 | Screening of differentially expressed miRNA

2.3 差异表达 miRNA 下游靶基因的预测 通过 miRNet 数据库分析 265 个差异表达 miRNA，最终筛选出在骨中有靶基因的 22 个差异表达 miRNA，包括 8 个上调的差异表达 miRNA，分别为 hsa-let-7b-5p、hsa-let-7d-5p、hsa-let-7f-5p、hsa-mir-33a-5p、hsa-mir-30d-5p、hsa-mir-223-3p、hsa-let-7i-5p、hsa-mir-151a-5p；14 个下调差异表达 miRNA，分别为 hsa-mir-192-5p、hsa-mir-34a-5p、hsa-mir-124-3p、hsa-mir-200c-3p、hsa-mir-375、hsa-mir-196b-5p、hsa-mir-449a、hsa-mir-483-3p、hsa-mir-92b-3p、hsa-let-7b-3p、hsa-mir-148b-5p、hsa-mir-483-5p、hsa-mir-455-3p、hsa-mir-940。在数据库中分别有 1 934 和 5 065 个独立靶基因。为了更好地展示差异表达 miRNA 与靶基因的关系，分别建立了上调差异表达 miRNA-靶基因网络和下调差异表达 miRNA-靶基因网络，见图 2A、C；同时，也列出每个差异表达 miRNA 靶基因计数，见图 2B、D。

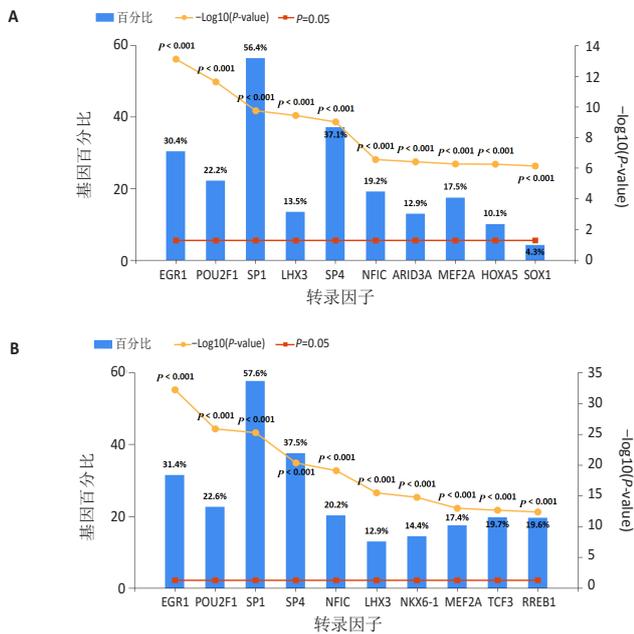


图注：图中 A 为 miRNet 构建的上调差异表达 miRNA-靶基因的网络；B 为每个上调的差异表达 miRNA 的靶基因计数；C 为 miRNet 构建的下调差异表达 miRNA-靶基因网络；D 为每个下调的差异表达 miRNA 的靶基因计数

图 2 | 差异表达 miRNA 在 miRNet 数据库预测的潜在靶基因

Figure 2 | Differentially expressed miRNAs predicted potential target genes in miRNet database

2.4 差异表达 miRNA 上游的潜在转录因子 采用 FunRich 软件分别预测骨中有靶向基因的差异表达 miRNA 上游转录因子，获得差异较明显的前 10 个转录因子，见图 3A、B。8 个上调差异表达 miRNA 前 10 个转录因子是 EGR1、POU2F1、SP1、LHX3、SP4、NFIC、ARID3A、MEF2A、HOXA5 和 SOX1。14 个下调差异表达 miRNA 前 10 个转录因子是 EGR1、POU2F1、SP1、SP4、NFIC、LHX3、NKX6-1、MEF2A、TCF3 和 RREB1；其中 EGR1、POU2F1、SP1、SP4、NFIC、LHX3 较为重要。



图注：图中 A 为上调的 8 个差异表达 miRNA 的转录因子；B 为下调的 14 个差异表达 miRNA 的转录因子

图 3 | 差异表达 miRNA 上游转录因子

Figure 3 | Differentially expressed miRNA upstream transcription factors

2.5 差异表达基因的筛选 在 GEO 数据库中筛选出 GSE16088 芯片数据，由 GPL96(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/info/geo_affy.html) 平台完成，使用 GEO2R 在线分析 14 个骨肉瘤组织样本与 3 个正常组织样本的差异表达，得到了 173 个上调和 346 个下调的显著差异表达基因，见图 4。对差异表达基因和差异表达 miRNA 预测的靶基因进行综合分析后，获得上调的差异表达 miRNA 的靶向目标基因 36 个和下调的差异表达 miRNA 的靶向目标基因 74 个，见图 5。

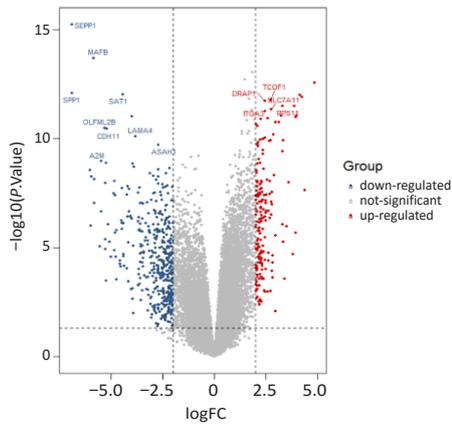
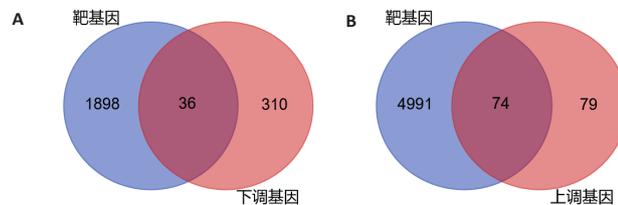


图 4 | 差异表达基因的筛选

Figure 4 | Screening of differentially expressed genes

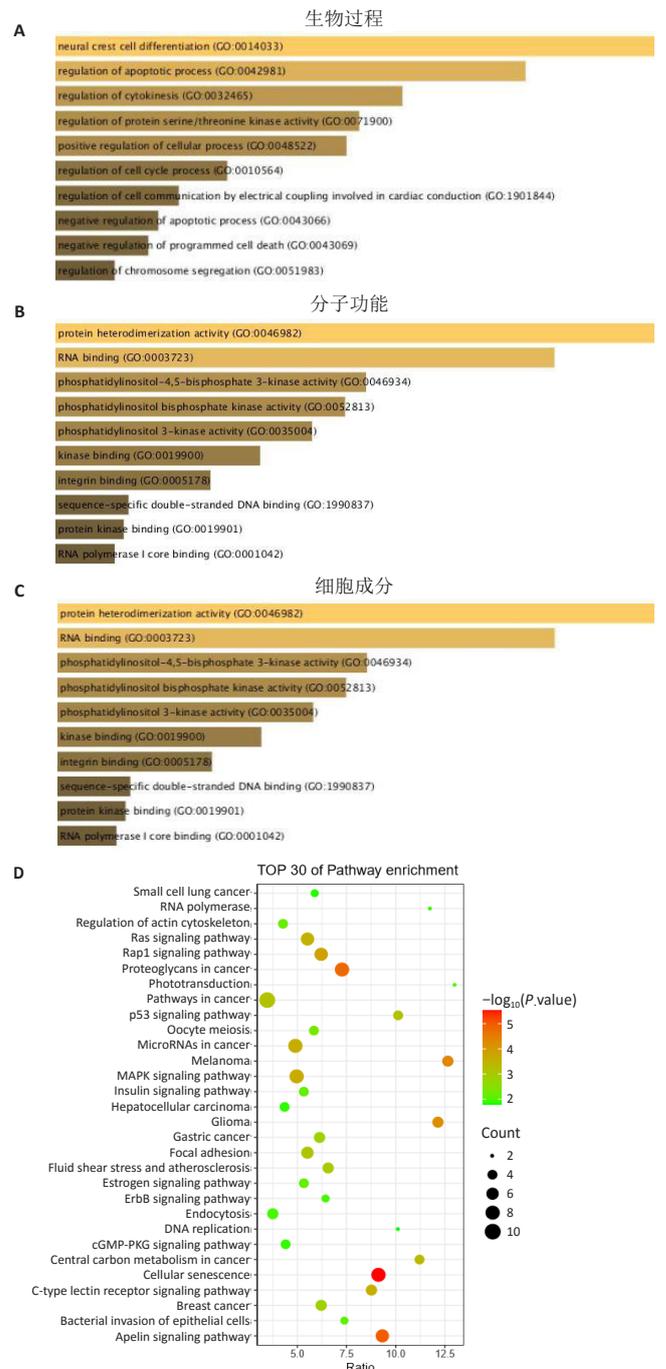


图注：图中 A 为上调差异表达 miRNA 的靶基因和下调的差异表达基因交集；B 为下调差异表达 miRNA 的靶基因和上调的差异表达基因交集

图 5 | 目标基因的筛选

Figure 5 | Screening of desired genes

2.6 GO 功能和信号通路富集分析 为了明确筛选出目标基因的生物学作用，使用 Enrichr 数据库对 110 个目标基因进行 GO 功能注释和 KEGG 途径富集分析。在 GO 功能注释中，生物过程分析揭示目标基因在神经胚细胞分化、凋亡过程的调节、胞质分裂调节中显著富集；分子功能分析目标基因在蛋白质异二聚活性、RNA 结合、磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 3-激酶活性等方面较为丰富；细胞成分分析表明目标基因显著富集于纺锤极体、黏着斑、纺锤体等，见图 6A-C。KEGG 途径富集分析结果显示，目标基因在细胞衰老、Apelin 信号通路、癌症中的蛋白聚糖、黑色素瘤、胶质瘤等途径中显著富集，见图 6D。



图注：图中 A-C 分别为目标基因的前 10 个生物过程、分子功能、细胞成分富集项目；D 代表目标基因的前 30 个显著的 KEGG 途径

图 6 | 目标基因 GO 功能注释与 KEGG 富集

Figure 6 | GO function annotation and KEGG enrichment of desired genes

2.7 PPI网络的建立与分析 将所有目标基因导入String数据库中,构建目标基因的蛋白互作网络,最终获得的110个节点和276个边缘的网络。将数据输入到cytoscape3.6.1软件建立一个更直观的PPI网络,并根据网络拓扑分析筛选出前20个关键基因,见图7,包括下调差异表达miRNA的靶基因:CCNB1、AURKA、CD44、FGF2、NPM1、AURKB、KIF2C、MKI67、KIF23、CDC6、FEN1、CENPN、TRIP13、RFC3、MCM10、CTGF、CAV1、PA2G4;上调差异表达miRNA的靶基因:PDGFRA、TWIST1。

2.8 关键基因的鉴定 利用GEPIA数据库检测20个关键基因在肉瘤中的表达水平,其中CCNB1、AURKA、CD44、AURKB、KIF2C、MKI67、KIF23、CDC6、FEN1、CENPN、TRIP13、RFC3、MCM10等13个基因的表达水平在肉瘤组织中均显著高于正常组织;另外FGF2、NPM1、CTGF、CAV1、PA2G4、PDGFRA、TWIST1等7个基因的表达在肉瘤组织与正常组织样品之间无显著差异,见图8;最后构建骨肉瘤发病机制中潜在的miRNA-mRNA关系,见图9。

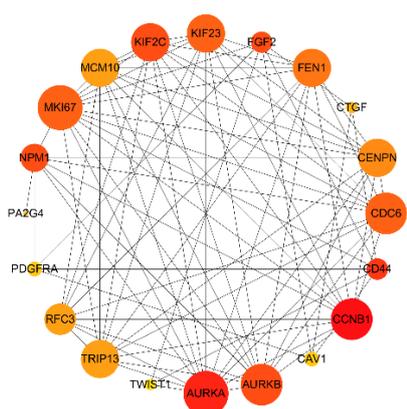
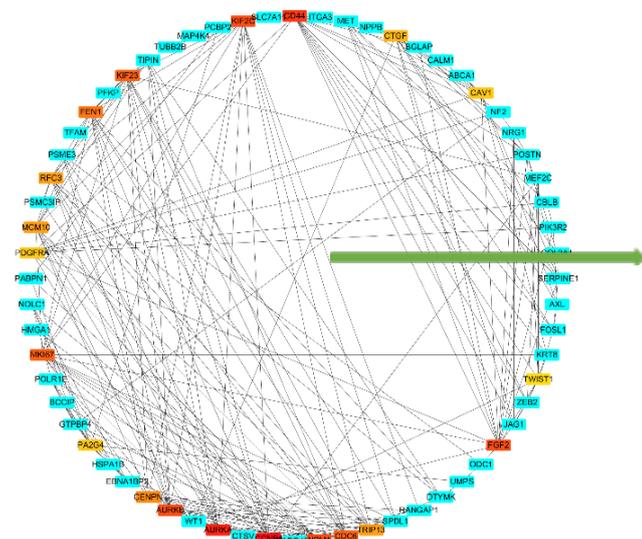


图7 | 候选基因的PPI网络分析图及关键基因图
Figure 7 | Protein-protein interaction network analysis of candidate genes and hub genes

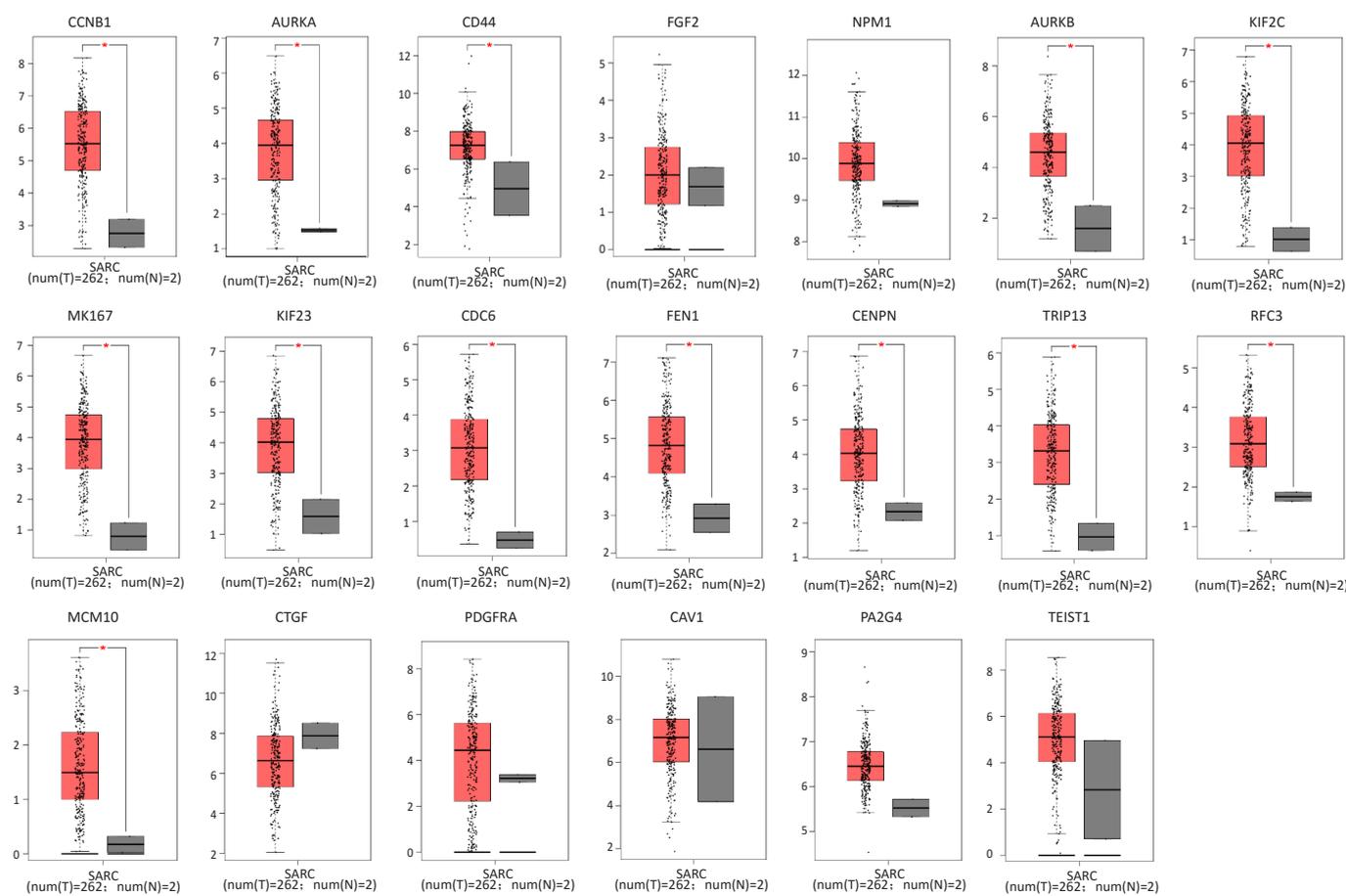


图8 | 20个关键基因在GEPIA数据库肉瘤中的表达水平
Figure 8 | The expression levels of 20 hub genes in sarcoma of GEPIA database

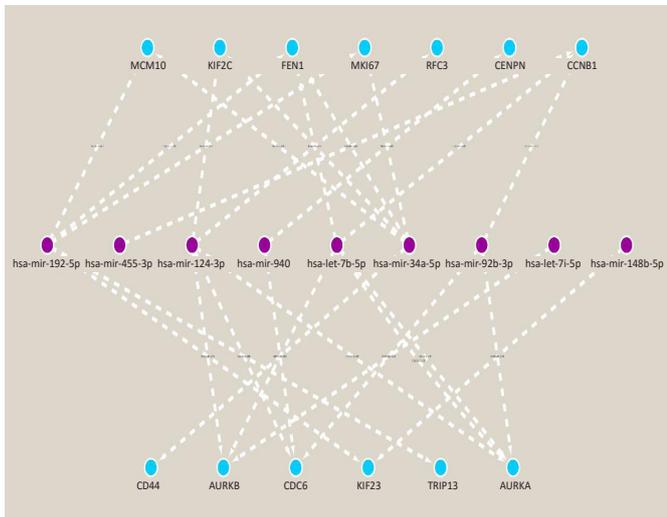


图9 | miRNA-mRNA 网络关系

Figure 9 | miRNA-mRNA network relationship

3 讨论 Discussion

miRNA 在调控基因表达中起关键作用，但大多数 miRNA 与 mRNA 的相互作用尚不清楚^[9]。而体内 miRNA-mRNA 调控网络在癌症的发生发展中起重要作用^[10]，其调控失调也是骨肉瘤发病的原因之一^[4]。

到目前为止，骨肉瘤中的 miRNA-mRNA 调控网络尚未全面建立。在该研究中，对 GEO 数据库中 miRNA 的数据集进行差异表达分析，最终筛选出血浆中异常表达且在骨中有靶基因的 22 个差异表达 miRNA，包括 8 个上调的差异表达 miRNA 和 14 个下调的差异表达 miRNA，其分析结果与临床报道基本相同。miR-449a 下调可降低对细胞周期蛋白 A2 的抑制作用，促进骨肉瘤细胞的生长^[11]。miR-375 低表达可增加 YAP1 表达，导致骨肉瘤细胞增殖和迁移^[12]。miR-192 的正常表达可抑制 U2OS 和 MG63 细胞的增殖、侵袭和迁移并诱导凋亡，但在骨肉瘤细胞系与骨肉瘤组织中却显著下调^[13]。另外，miR-151a-5p 在肺癌组织中的表达明显高于正常肺组织^[14]。miR-124-3p 被证实与多种肿瘤的发生、发展有关，在肝癌细胞系及肝癌组织中表达明显低于正常组织^[15]，且也在骨肉瘤的转移中发挥重要作用^[16]，但 miR-223-3p 在骨肉瘤患者中呈下调状态^[17]，这与作者筛选的结果相反，可能与所取标本部位差异相关。

miRNA 表达受转录因子的调控，亦可反过来作用于转录因子^[18]，共同调控 mRNA 转录和翻译，被视为细胞代谢的主要调节剂^[19]，因此作者通过 FunRich 软件预测差异表达 miRNA 的转录因子。早期生长反应蛋白 1(EGR1) 是具有锌指结构的转录因子，在调节细胞分化、血管生成和迁移中起到至关重要的作用^[20]；EGR1 可通过降低细胞周期相关基因和增加凋亡相关基因的表达而抑制骨肉瘤细胞的增殖^[21]。POU2F1 位于染色体 1q24 上，也称为八聚体结合转录因子 1(OCT-1)^[22]，是体内最重要的调节蛋白之一，在氧化、增殖、免疫以及代谢调节中发挥作用。OCT-1 在许多肿瘤(包括骨肉瘤)中明显上调，具有促癌作用^[23-25]。特异性蛋白 1(Sp1)

是涉及许多生物过程的重要转录因子，包括细胞代谢、增殖分化、衰老凋亡等，其通过调控真核 RNA 聚合酶 III 基因的表达在肿瘤形成、癌细胞生长和细胞转移中发挥重要作用^[26]；同时 SP1/MIR17HG/miR-130a-3p/SP1 反馈回路在骨肉瘤发展进程中发挥促进作用^[27]。

通过对差异表达 miRNA 靶基因与差异表达基因的整合，筛选出 74 个上调和 36 个下调目标基因。GO 功能注释结果显示这 110 个目标基因主要富集于神经胚细胞分化、蛋白质异二聚活性、纺锤极体等；KEGG 富集分析显示，目标基因主要富集在细胞衰老、Apelin 信号通路和癌症中的蛋白聚糖等途径中。细胞衰老是生长停滞的状态，衰老细胞永久丧失了增殖的潜能同时可抑制癌症的发展，因此诱导细胞衰老可能成为肿瘤治疗的新疗法^[28]。Apelin 是一种内源性神经肽，它可与 apelin 受体 (APJ) 结合调节细胞的增殖、迁移和血管生成^[29-30]。APL/APJ 信号系统可通过激活丝裂原活化蛋白激酶 / 细胞外信号调节激酶 (MAPK/ERK) 和磷脂酰肌醇-3-激酶 / 蛋白激酶 (PI3K/Akt) 等途径促使肿瘤血管生成、细胞增殖、转移以及抑制细胞凋亡等，在肿瘤的发展中扮演着重要的角色^[31-32]。蛋白聚糖是细胞外基质的主要成分，通过可溶性因子的活性调节肿瘤生长和血管生成，在恶性肿瘤中发挥越来越重要的作用^[33]。这些不同的途径均可能是骨肉瘤的潜在作用机制。

构建目标基因的 PPI 网络，筛选出在网络中较为重要的前 20 个基因，再通过 GEPIA 数据库进一步对这 20 个基因进行表达分析，结果显示 CCNB1、AURKA、CD44 等 13 个基因具有统计学意义，其在骨肉瘤中起关键作用。细胞周期蛋白 B1(CCNB1) 是细胞周期 G₂-M 中的关键蛋白，参与癌细胞的生长分化、凋亡、转移等，在多种恶性肿瘤中大量表达^[34]；研究也发现，降低 CCNB1 的表达可抑制骨肉瘤细胞增殖^[35]。Aurora 蛋白激酶包括 Aurora-A (即 AURKA)、Aurora-B 和 Aurora-C，是一类丝氨酸 / 苏氨酸激酶，在细胞有丝分裂中起着重要作用^[36]；AURKA 作为 Aurora 激酶家族的重要成员，是细胞周期关键调节剂，可使 BRCA1 磷酸化或激活 polo 样激酶 1(PLK1) 等不同机制促进癌细胞有丝分裂和中心体的扩增，是癌症发展中的致癌基因^[37]；抑制 Aurora-A 激酶的活性，可以阻止骨肉瘤癌细胞的生长和增殖，并诱导骨肉瘤癌细胞凋亡^[38]。CD44 是一种广泛分布的跨膜糖蛋白，通过与透明质酸较好的亲和力在多种细胞中发挥关键的作用，包括生长、分化、侵袭和存活等^[39-40]；透明质酸与 CD44 的结合，可影响 MAPK 和 PI3/Akt 信号通路中 MAP 和 PI3 激酶的活性，促使肿瘤细胞的增殖、存活及转移^[41]。XIAO 等^[42]发现骨肉瘤患者中 CD44 表达水平越高其预后越差，降低 CD44 的表达可有效抑制骨肉瘤的发展与转移。

尽管该研究仍存在一定的局限性，例如：选取 GEO 数据集样本量较小，也缺乏对 miRNA-mRNA 调控网络的体内外验证实验。但该研究通过生物信息网络手段，综合各数据库的相关研究，更加系统、全面的从宏观层面构建骨肉瘤基因调控网络；避免传统研究对其单一或片面的阐述，为临床治

疗和实验研究提供有效依据。

鉴于生物信息学的优势,该研究发现 miRNA 和 mRNA 在骨肉瘤中的表达是通过多途径、多靶点进行调控。通过对 miRNA 和 mRNA 的筛选、分析,认为潜在 miRNA-mRNA 网络对阐明骨肉瘤发病机制、预后及开发新靶点药物具有重要的指导意义。

作者贡献: 撰写文章为袁长深副主任医师,资料收集、数据分析为容伟明、卢智贤研究生,文章设计为段戡教授,文章评估为郭锦荣主治医师,后期审校为梅其杰副主任医师。

经费支持: 该文章接受了“广西中医药民族医药自筹科研课题(GZZC15-12)”及“广西中医药大学自然科学研究项目(2015MS007)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究未涉及伦理学问题。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 此篇文章属于生物信息数据分析,未涉及相关的统计学方法。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- PERUT F, RONCUZZI L, BALDINI N. The Emerging Roles of Extracellular Vesicles in Osteosarcoma. *Front Oncol.* 2019;9:1342.
- ABU-HALIMA M, BACKES C, LEIDINGER P, et al. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil Steril.* 2014;101(1):78-86.e2.
- HUERTA-ZAVALA ML, LOPEZ-CASTILLEJOS ES, REQUENEZ-CONTRERAS JL, et al. A single miRNA and miRNA sponge expression system for efficient modulation of miR-223 availability in mammalian cells. *J Gene Med.* 2019; 21(8):e3100.
- ANDERSEN GB, KNUDSEN A, HAGER H, et al. miRNA profiling identifies deregulated miRNAs associated with osteosarcoma development and time to metastasis in two large cohorts. *Mol Oncol.* 2018;12(1):114-131.
- GONG N, GONG M. MiRNA-221 from tissue may predict the prognosis of patients with osteosarcoma. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(29):e11100.
- 张琨. miR-125b, miR-126, miR-145 在骨肉瘤病人血清中的表达 [D]. 长沙:中南大学,2014.
- 陈康. 骨肉瘤病人血清中 miRNA 的表达谱研究 [D]. 南京:南京大学,2012.
- 刘书中, 劳立峰, 王以朋. 外周血 miRNAs 检测在骨肉瘤中的意义 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2016,29(5):552-556.
- PLOTNIKOVA OM, SKOBLV MY. Efficiency of the miRNA- mRNA Interaction Prediction Programs. *Mol Biol (Mosk).* 2018;52(3):543-554.
- BHOWMICK SS, BHATTACHARJEE D, RATO L. Integrated analysis of the miRNA-mRNA next-generation sequencing data for finding their associations in different cancer types. *Comput Biol Chem.* 2020;84:107152.
- SHEKHAR R, PRIYANKA P, KUMAR P, et al. The microRNAs miR-449a and miR-424 suppress osteosarcoma by targeting cyclin A2 expression. *J Biol Chem.* 2019;294(12):4381-4400.
- LIU G, HUANG K, JIE Z, et al. CircFAT1 sponges miR-375 to promote the expression of Yes-associated protein 1 in osteosarcoma cells. *Mol Cancer.* 2018;17(1):170.
- WANG Y, ZHANG S, XU Y, et al. Upregulation of miR-192 inhibits cell growth and invasion and induces cell apoptosis by targeting TCF7 in human osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2016;37(11):15211-15220.
- 隆姝孜, 周寒静, 刘静姝, 等. miR-151a-5p 对肺癌 A549 细胞生物学功能和化疗敏感性的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2019,41(8):770-777.
- LONG HD, MA YS, YANG HQ, et al. Reduced hsa-miR-124-3p levels are associated with the poor survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):2615-2623.
- LI S, WU X, PEI Y, et al. PTHR1 May Be Involved in Progression of Osteosarcoma by Regulating miR-124-3p-AR-Tgfb1i1, miR-27a-3p-PPARG-Abca1, and miR-103/590-3p-AXIN2 Axes. *DNA Cell Biol.* 2019;38(11):1323-1337.
- JI Q, XU X, SONG Q, et al. miR-223-3p Inhibits Human Osteosarcoma Metastasis and Progression by Directly Targeting CDH6. *Mol Ther.* 2018; 26(5):1299-1312.
- MULLANY LE, HERRICK JS, WOLFF RK, et al. MicroRNA-transcription factor interactions and their combined effect on target gene expression in colon cancer cases. *Version 2. Genes Chromosomes Cancer.* 2018;57(4):192-202.
- DHARAP A, POKRZYWA C, MURALI S, et al. Mutual induction of transcription factor PPARγ and microRNAs miR-145 and miR-329. *J Neurochem.* 2015; 135(1):139-146.
- YANG W, LU Z, ZHI Z, et al. Increased miRNA-518b inhibits trophoblast migration and angiogenesis by targeting EGR1 in early embryonic arrest. *Biol Reprod.* 2019;101(4):664-674.
- 秦丽, 张惠华, 郭淑军, 等. 外源性 EGR1 瞬时表达对骨肉瘤细胞细胞周期和凋亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011,27(2):293-299.
- NG MC, LAM VK, TAM CH, et al. Association of the POU class 2 homeobox 1 gene (POU2F1) with susceptibility to Type 2 diabetes in Chinese populations. *Diabet Med.* 2010;27(12):1443-1449.
- STEPCHENKO AG, GEORGIEVA SG, PANKRATOVA EV. Multiple Interactions of the Oct-1 (POU2F1) Transcription Factor with PORE and MORE Sites. *Mol Biol (Mosk).* 2019;53(3):430-435.
- VÁZQUEZ-ARREGUÍN K, TANTIN D. The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(6):792-804.
- XIE CH, CAO YM, HUANG Y, et al. Long non-coding RNA TUG1 contributes to tumorigenesis of human osteosarcoma by sponging miR-9-5p and regulating POU2F1 expression. *Tumour Biol.* 2016;37(11):15031-15041.
- PENG F, ZHOU Y, WANG J, et al. The transcription factor Sp1 modulates RNA polymerase III gene transcription by controlling BRF1 and GTF3C2 expression in human cells. *J Biol Chem.* 2020;295(14):4617-4630.
- MENG Y, HAO D, HUANG Y, et al. Positive feedback loop SP1/MIR17HG/miR-130a-3p promotes osteosarcoma proliferation and cisplatin resistance. *Biochim Biophys Res Commun.* 2020;521(3):739-745.
- HOU Z, GUO K, SUN X, et al. TRIB2 functions as novel oncogene in colorectal cancer by blocking cellular senescence through AP4/p21 signaling. *Mol Cancer.* 2018;17(1):172.
- HE L, XU J, CHEN L, et al. Apelin/APJ signaling in hypoxia-related diseases. *Clin Chim Acta.* 2015;451(Pt B):191-198.
- CHENG B, CHEN J, BAI B, et al. Neuroprotection of apelin and its signaling pathway. *Peptides.* 2012;37(1):171-173.
- 郝延璋. Apelin 对胃癌生物学功能的影响及其分子机制的研究 [D]. 济南:山东大学,2017.
- CHEN T, LIU N, XU GM, et al. Apelin13/APJ promotes proliferation of colon carcinoma by activating Notch3 signaling pathway. *Oncotarget.* 2017;8(60): 101697-101706.
- THEOCHARIS AD, KARAMANOS NK. Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms. *Matrix Biol.* 2019;75-76:220-259.
- YE C, WANG J, WU P, et al. Prognostic role of cyclin B1 in solid tumors: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(2):2224-2232.
- ZHANG J, ZHU X, LI H, et al. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. *Int Immunopharmacol.* 2015;24(1):50-58.
- VADER G, LENS SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1786(1):60-72.
- D'ASSORO AB, HADDAD T, GALANIS E. Aurora-A Kinase as a Promising Therapeutic Target in Cancer. *Front Oncol.* 2016;5:295.
- JIANG Z, JIANG J, YANG H, et al. Silencing of Aurora kinase A by RNA interference inhibits tumor growth in human osteosarcoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *Oncol Rep.* 2014;31(3):1249-1254.
- CICHY J, PURÉ E. The liberation of CD44. *J Cell Biol.* 2003;161(5):839-843.
- PONTA H, SHERMAN L, HERRLICH PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(1):33-45.
- SKANDALIS SS, GIALELI C, THEOCHARIS AD, et al. Advances and advantages of nanomedicine in the pharmacological targeting of hyaluronan-CD44 interactions and signaling in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014;123:277-317.
- XIAO Z, WAN J, NUR AA, et al. Targeting CD44 by CRISPR-Cas9 in Multi-Drug Resistant Osteosarcoma Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(4):1879-1893.

(责任编辑: MZH, ZN, SX)