

肠炎和肠炎相关结直肠癌miRNA表达 检测及生物信息学分析

殷媛¹, 王成², 戴欣³, 黄朝晖¹

1. 江南大学附属医院肿瘤研究所, 江苏 无锡 214062;

2. 南京军区南京总医院检验科, 江苏 南京 210002;

3. 美世大学药学院, 制药科学系, 癌症纳米医学实验室, 佐治亚州 亚特兰大 30341

[摘要] 背景与目的: 炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)为一组慢性肠道疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD)。肠炎相关性结直肠癌(colitis-associated colorectal cancers, CAC)是由IBD癌化形成的一种恶性肿瘤。该研究通过检测UC、CD和CAC组织中相关微小核糖核酸(miRNA)的水平, 初步探讨其作为肠炎癌转化分子标志物的可能性, 并对在肠炎和CAC中显著变化的一组miRNAs进行靶基因归集和生物信息学分析, 为以miRNAs为靶点的基因治疗提供理论和实验基础。**方法:** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)技术, 检测13例UC组织、3例CD患者组织、12例CAC组织及8例正常肠组织中16种miRNAs的表达。通过生物信息学对显著变化的一组miRNA进行靶基因分析, 将文献中已报导的所有靶基因进行汇总, 并利用DAVID数据库对靶基因进行功能富集分析(GO-analysis)和信号转导通路富集分析(KEGG-analysis, BIOCARTA-analysis)。**结果:** 炎症相关miR-146a和癌症相关miR-27a、miR-29a、miR-20a、miR-21在UC、CD和CAC中的表达都显著高于正常结肠组织, 且这一组miRNA的靶基因都富集在癌症相关通路、免疫信号相关通路和炎癌转换相关通路上。**结论:** miR-146a、miR-27a、miR-29a、miR-20a和miR-21可能是参与肠炎向结直肠癌转化的一组miRNA。

[关键词] 微小核糖核酸; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 肠炎相关结直肠癌; 实时荧光定量聚合酶链反应; GO分析; KEGG分析; BIOCARTA分析

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.11.006

中图分类号: R735.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)11-0916-06

Investigation of key miRNAs and their target genes in inflammatory bowel diseases and colitis-associated colorectal cancers using miRNA profiling and bioinformatic tools YIN Yuan¹, WANG Cheng², DAI Xin³, HUANG Zhaohui¹ (1. Wuxi Oncology Institute, the Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214062, Jiangsu Province, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China; 3. Cancer Nanomedicine Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Mercer University College of Pharmacy, Atlanta 30341, GA, USA)

Correspondence to: HUANG Zhaohui E-mail: hzhwxsy@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Inflammatory bowel diseases (IBD) are a group of chronic intestinal diseases, including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). This study identified differentially expressed miRNAs in UC, CD and colitis-associated colorectal cancers (CAC) to explore their potential as novel molecular biomarkers. **Methods:** Tissue samples were taken from 13 UC patients, 3 CD patients, 12 CAC patients, and 8 age- and gender-matched healthy controls. The miRNA expressions were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) assay. Known targets of deregulated miRNAs were utilized using miRWalk 2.0 database, and subsequent bioinformatics analysis of these target genes was performed by DAVID software (GO-analysis, KEGG-analysis and BIOCARTA-analysis). **Results:** The data showed that miR-146a, miR-27a, miR-29a, miR-20a and miR-21 were upregulated in UC, CD and CAC tissues compared with normal control. Moreover, the target genes of

these miRNAs were enriched in several key signal transduction pathways including cancer-related pathway and immunity-associated pathway. **Conclusion:** miR-146a, miR-27a, miR-29a, miR-20a and miR-21 may play important roles in the switching from IBD to CAC.

[**Key words**] miRNA; Ulcerative colitis; Crohn's disease; Colitis-associated colorectal cancers; Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; GO-analysis; KEGG-analysis; BIOCARTA-analysis

炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)为一组慢性肠道疾病,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD)^[1-2]。IBD是一类病因不明的肠道慢性非特异性炎症,其诊断和治疗都相当棘手,现有治疗手段很难将其完全治愈。IBD的持续发作不仅严重影响患者的生活质量,而且可发生癌变,严重威胁患者的生命健康^[3-4]。肠炎相关性结直肠癌(colitis-associated colorectal cancers, CAC)是由IBD癌化形成的一种恶性肿瘤,虽然占总体结直肠癌的比例不高(小于等于5%),但恶性程度高,诊断时多为晚期,且呈多灶性、异质性特点,同时还常伴有其他部位肿瘤发生,如淋巴瘤、胆管癌等,因此其5年生存率明显低于结直肠癌平均值。有研究显示,18.4%的IBD患者会转化为CAC,但目前尚无有效的方法对此种并发症的发生进行检测,同时,IBD转化为CAC的分子机制目前并不清楚^[5]。

微小核糖核酸(miRNA)是一类长度约为22个核苷酸的非编码单链小核糖核酸分子,其在进化上高度保守,普遍存在于动植物体内。目前,已经证实人体内有超过30%的编码基因受到miRNA调控,因此miRNA广泛参与细胞的发育分化、能量代谢、细胞周期及纤维化的生理过程^[6]。有研究显示,miRNA在癌症包括结肠癌的发生、发展过程中发挥重要作用,一些特异变化的miRNA被称为“原癌miRNA”,可以作为癌症发生、发展的标志物^[7]。同时,有研究表明,结肠炎组织中miRNA表达与正常组织差异显著^[8]。目前,关于CAC中miRNA表达报道较少,因此,对IBD组织及CAC组织中miRNA表达的检测和比较将会为炎症转化为癌症提供一种动态监测指标,同时也可作为CAC的发生、发展的分子机制研究提供一条新的思路。

随着miRNA研究的日渐深入,对其功能进行筛选和验证需要更明确的指向性^[9]。通过对

miRNA靶基因进行生物学富集分析,可以为寻找miRNA表达谱改变所引起的生物学变化提供线索,以便进一步鉴定和筛选有意义的生物学功能。

本研究检测和分析了UC、CD和CAC组织中相关miRNA的水平,探讨其作为肠炎癌转化分子标志物的可能性。对其中显著变化的一组miRNAs靶基因进行生物学富集分析,为以miRNAs为靶点的基因治疗提供理论和实验基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

收集2010年2月—2012年10月在江南大学附属医院确诊的组织标本36例,包括UC组织13例,CD患者组织3例,CAC组织12例及正常对照组织8例,所有组织标本取出后立即置于液氮中速冻后,置-80℃环境中保存待用。

1.2 主要仪器及试剂

7300型荧光定量PCR仪购自美国ABI公司,高速冷冻离心机购自美国Eppendorf公司,SAS67120型超纯水机购自美国Millipore公司,引物、反向互补探针购自美国ABI公司,TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 组织RNA提取

取100 μg组织,按TRIzol试剂说明书操作提取组织RNA。

1.4 RTFQ-PCR检测

组织RNA逆转录反应总体积均为10 μL,包括DEPC处理的不含RNA酶H₂O 3.5 μL,5×AMV逆转录酶缓冲液2 μL,dNTP 1 μL,逆转录引物1 μL,AMV酶0.5 μL,RNA 2 μL。反应参数:

16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 4 °C 循环反应。RTFQ-PCR反应体系为20 μL, 包括双蒸水14.77 μL, 10×PCR缓冲液2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL, 10 mmol/L dNTP 0.4 μL, Taq酶0.3 μL, 探针0.33 μL, cDNA 1 μL。循环参数: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共40个循环。每个样本检测3个复孔。组织miRNA的含量采用相对定量法进行, 以U6 snRNA为内参照, 用 $2^{-\Delta Ct}$ 计算, 其中 $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{U6}$ 。

1.5 靶基因生物信息学分析

利用miRNA靶基因数据库miRWalk 2.0分别对文献中已证明过的miRNA靶基因进行查询和汇总, 得到目标靶基因合集。

利用DAVID数据库对靶基因进行功能富集分析(GO-analysis), 根据GO的3大应用功能(即分子功能、生物学过程和细胞组分)分析, 得到这些靶基因主要参与的生物学过程。根据靶基因在功能集中的数量百分比计算富积得分, 并计算显著性程度 P 值, $P < 0.001$ 为阈值得到差异有统计学意义的功能富集。

利用DAVID数据库对靶基因进行信号转导通路富集分析(KEGG-analysis, BIOCARTA-analysis), 得到这些靶基因主要参与的信号通路。根据靶基因在功能集中的数量百分比计算富积得分, 并计算显著性程度 P 值, $P < 0.001$ 为阈值得到差异有统计学意义的信号转导通路富集。

1.6 统计学处理

用GraphPad Prism 6软件进行数据统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 进行, 表示在分析前进行正态性检验。组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miRNA表达谱检测和分析

根据课题组前期芯片结果及文献报道结果^[10-11], 本研究运用RTFQ-PCR技术对选取的包括炎症相关miRNAs(miR-146a、miR-146b、miR-150、miR-155、miR-193-3p和miR-181a)和原癌miRNAs(miR-27a、miR-29a、miR-210、miR-191、miR-194、miR-214、miR-20a、miR-21、miR-24和miR-30d)共16种miRNAs的表达水平进行了检测。

2.1.1 炎症相关miRNAs在不同组织中的表达水平

本研究运用RTFQ-PCR技术对选取的炎症相关miRNAs的表达水平进行了检测。结果表明, miR-146a、miR-146b和miR-150在UC、CD和CAC中的表达与正常结肠组织相比都上升, 且miR-146a的表达与正常肠组织相比差异有统计学意义($P < 0.01$), 并且CAC与UC相比, miR-146a的表达差异有统计学意义($P < 0.01$, 图1)。

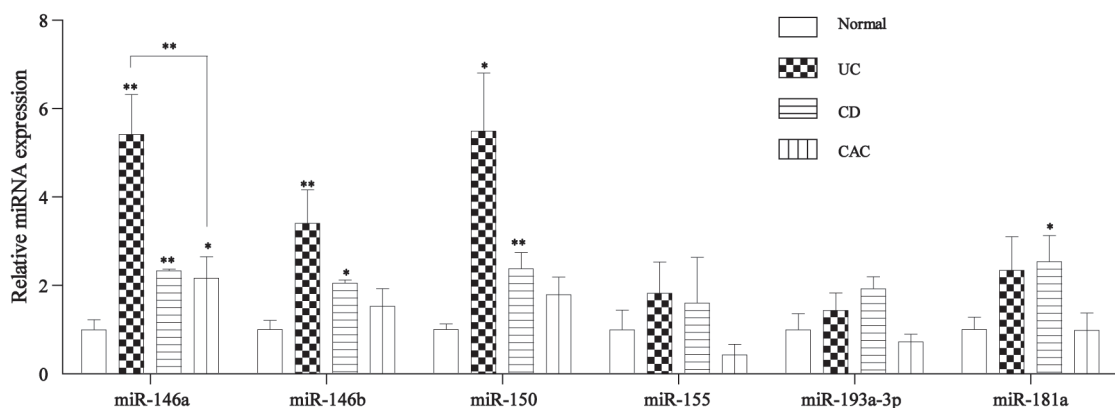


图 1 炎症相关miRNAs在不同组织中的表达水平

Fig. 1 Expression levels of inflammation associated miRNAs in different tissues

*: $P < 0.05$, as compared with normal group; **: $P < 0.01$, as compared with normal group

2.1.2 癌症相关miRNA在不同组织中的表达水平

本研究运用RTFQ-PCR技术对选取的癌症相关miRNAs的表达水平进行了检测,结果见图2。结果表明,miR-27a、miR-29a、miR-214、miR-20a、miR-21和miR-24在UC、CD和CAC中的表达都上升,其中miR-27a、miR-29a、miR-20a和miR-21的表达与正常肠组织相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。同时,我们对IBD和CAC组织中的miRNA表达进行分析发现,miR-27a、miR-20a和miR-21在IBD和CAC之间差异有统计

学意义($P<0.05$)。而miR-29a的表达虽然在IBD和CAC之间差异无统计学意义,但其表达丰度高,与正常组织相比变化明显,因此考虑其在肠炎向肠癌转化中也发挥重要作用。

以上实验表明,炎症相关miR-146a和癌症相关miR-27a、miR-29a、miR-20a和miR-21在UC、CD和CAC中的表达都显著高于正常结肠组织,且在肠炎和肠癌之间也有明显区分,提示miR-146a、miR-27a、miR-29a、miR-20a和miR-21可能是参与肠炎向结直肠癌转化的一组miRNAs。

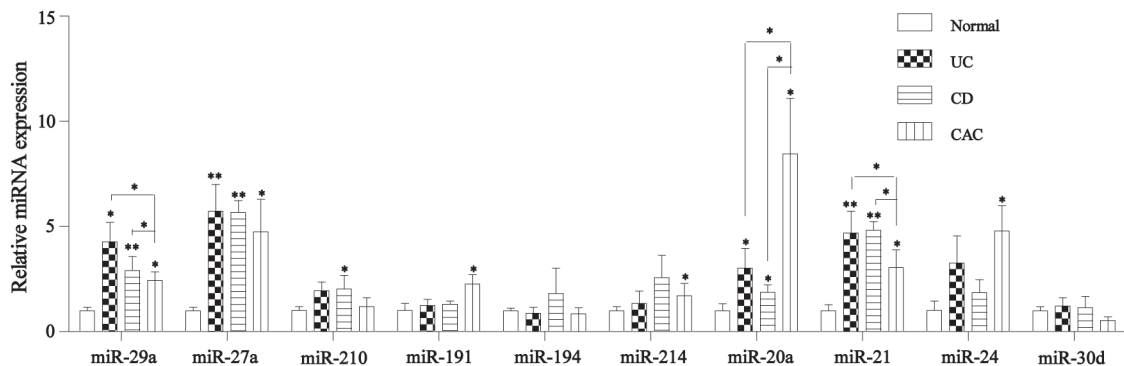


图2 癌症相关miRNAs在不同组织中的表达水平

Fig. 2 Expression levels of cancer associated miRNAs in different tissues

*: $P<0.05$, as compared with normal group; **: $P<0.01$, as compared with normal group

2.2 生物信息学分析

2.2.1 靶基因合集

利用miRNA靶基因数据库miRWalk 2.0分别对文献中已证明过的miR-27a、miR-29a、miR-146a、miR-20a和miR-21的靶基因进行查询,并进行归集汇总,共得到710个靶基因。

2.2.2 靶基因集合的功能富集分析

利用DAVID数据库对靶基因进行功能富集分析(GO-analysis),结果显示,miR-27a、miR-29a、miR-146a、miR-20a和miR-21的靶基因功能分别富集在转录因子调控、RNA代谢过程、细胞表面受体相关信号转导、细胞增殖调控和细胞程序性死亡调控等生物学过程中($P<0.001$,图3)。

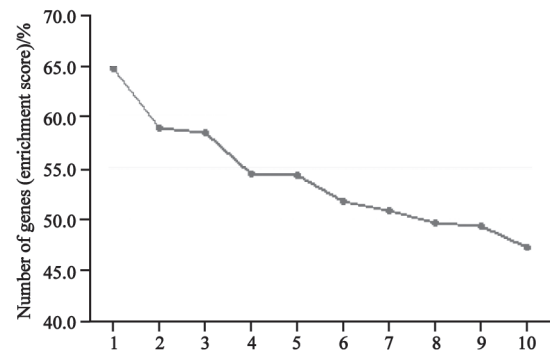


图3 差异有统计学意义的生物功能富集得分

Fig. 3 Enrichment scores of the biological function processes with statistically significant difference

1: Regulation of transcription; 2: Regulation of RNA metabolic process; 3: Regulation of cell proliferation; 4: Regulation of programmed cell death; 5: Regulation of apoptosis; 6: Cell surface receptor linked signal transduction; 7: Positive regulation of gene expression; 8: Intracellular signaling cascade; 9: Negative regulation of gene expression; 10: Positive regulation of cellular biosynthetic process

2.2.3 靶基因集合的信号转导通路富集分析

利用DAVID数据库对靶基因进行信号转导通路富集分析(KEGG-analysis, BIOCARTA-analysis), 结果显示, miR-27a、miR-29a、miR-146a、miR-20a和miR-21的靶基因富集在结直肠癌相关通路、p53通路、细胞因子和炎症反应通路、MAPK通路及Toll样受体通路中($P < 0.001$, 图4)。

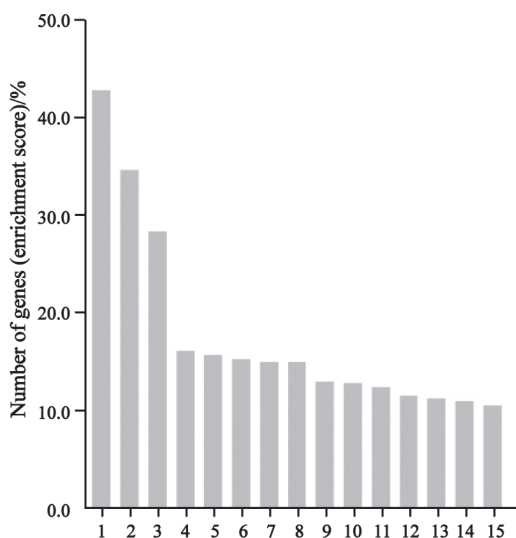


图4 差异有统计学意义的通路富集得分

Fig. 4 Enrichment scores of the pathways with statistically significant difference

1: Pathways in cancer; 2: Pathways in colorectal cancer; 3: Cytokine-cytokine receptor interaction; 4: MAPK signaling pathway; 5: p53 signaling pathway; 6: Cell cycle; 7: Toll-like receptor signaling pathway; 8: Apoptosis; 9: Jak-STAT signaling pathway; 10: Chemokine signaling pathway; 11: Focal adhesion; 12: Prostate cancer; 13: TGF-beta signaling pathway; 14: T cell receptor signaling pathway; 15: Endocytosis

3 讨 论

IBD是一种原因未明的结直肠炎性病变, 以反复发生的肠道溃疡为特征, 患者常表现为腹泻、黏液血便及腹痛。在发病率最高的北美和西欧国家, IBD的发病率为100/10 000 ~ 200/10 000。我国尚缺乏大规模人群的发病率调查, 但最新的一项基于住院患者的研究统计显示, 近10年发病人数增加了3倍, 说明在我国的发病率呈快速上升趋势。IBD随着病程延长, 癌变风险增加。有研究表明, IBD患者与普通人相比患肠癌风险增加了19倍, 炎癌转化是IBD患者死亡的主要原因之一, 但对于IBD转化为CAC的分

子机制目前并不清楚^[12]。

本研究选取了结肠组织相关miRNAs、炎症相关miRNAs及原癌miRNAs等3种来源的miRNAs, 用RTFQ-PCR方法检测了UC、CD和CAC组织中这些miRNAs的表达情况。结果表明, miR-27a、miR-29a、miR-146a、miR-20a和miR-21在这3类组织中较正常肠组织都显著上升, 且在结直肠炎和结直肠癌之间也有明显区分, 提示其可能是参与结直肠炎向结直肠癌转化的一组miRNAs。miR-27a和miR-29a被报道在结直肠组织中高表达并参与了肠癌的发生、发展, 本研究发现这两个miRNAs在IBD中也呈高表达, 而经典的原癌基因miR-20a和miR-21在IBD中也显著升高, 显示了这些miRNAs在炎症转化为癌症中可发挥动态监测作用, 并且可能直接参与IBD转化为CAC的调控。miR-146a是一种在天然免疫中发挥重要作用的miRNA, 尤其是参与了巨噬细胞的分化和功能调控^[13]。而在对IBD有限的机制研究中, 研究者认为, 巨噬细胞对IBD的发生、发展起关键作用^[14]。与我们的结果结合来看, miR-146a很可能是IBD转化为CAC的重要标志和调控分子。

随着对miRNA研究的深入, 机体中miRNA的错综复杂的调控方式也显示出来。miRNA的调控呈现“多对多”的形式, 即一种miRNA可以调控多个靶点, 而多种miRNA也可能调控一个靶基因^[15]。任何生理病理过程都伴随着多种miRNA的变化, 意味着对生物学过程的研究不能局限于点和线, 而应该着眼于整个动态变化的调控网络。GO功能分析和KEGG通路分析等生物信息学方法的出现^[16], 对miRNA相关的基因表达调控网络的研究有很大的帮助, 也为机制的实验验证提供了线索, 使功能验证不再盲目^[17]。本研究对实验挑选出的miR-27a、miR-29a、miR-146a、miR-20a和miR-21进行了靶基因功能富集分析和通路富集分析, 结果显示, 这一组miRNA与癌症相关通路、炎症相关通路、转录因子、细胞因子和细胞因子受体密切相关。该结果提示, 筛选的在IBD向CAC转化过程中动态变化的这组miRNA, 不仅仅作为

检测指标存在,很可能参与了肠组织中炎癌转化的过程。

本研究对IBD组织及CAC组织中miRNA表达的检测和比较将会为炎症转化为癌症提供一种动态监测指标,同时也可作为CAC的发生、发展的机制研究提供一条新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] LANGHORST J, WULFERT H, LAUCHE R, et al. Systematic review of complementary and alternative medicine treatments in inflammatory bowel diseases [J] . J Crohns Colitis, 2015, 9(1): 86–106.
- [2] YUN J, XU C T, PAN B R. Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese [J] . World J Gastroenterol, 2009,15(7): 788–803.
- [3] LAKATOS L, MESTER G, ERDELYI Z, et al. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study [J] . Inflamm Bowel Dis, 2006, 12(3): 205–211.
- [4] HERSZENYI L, BARABAS L, MIHELLER P, et al. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease: the true impact of the risk [J] . Dig Dis, 2015, 33(1): 52–57.
- [5] ALGABA A, GUERRA I, MARIN-JIMENEZ I, et al. Incidence, management, and course of cancer in patients with inflammatory bowel disease [J] . J Crohns Colitis, 2015, 9(4): 326–333.
- [6] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J] . Cell, 2004, 116(2): 281–297.
- [7] DI LEVA G, GAROFALO M, CROCE C M. MicroRNAs in cancer [J] . Annu Rev Pathol, 2014, 9: 287–314.
- [8] WHITEOAK S R, FELWICK R, SANCHEZ-ELSNER T, et al. MicroRNAs in inflammatory bowel diseases: paradoxes and possibilities [J] . Inflamm Bowel Dis, 2015, 21(5): 1160–1165.
- [9] HUANG DA W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J] . Nat Protoc, 2009, 4(1): 44–57.
- [10] HUANG Z, HUANG S, WANG Q, et al. MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma [J] . Cancer Res, 2011, 71(7): 2582–2589.
- [11] DAI X, CHEN X, CHEN Q, et al. MicroRNA-193a-3p reduces intestinal inflammation in response to microbiota via down-regulation of colonic PepT1 [J] . J Biol Chem, 2015, 290(26): 16099–16115.
- [12] SUSSMAN D A, SANTAOLALLA R, STROBEL S, et al. Cancer in inflammatory bowel disease: lessons from animal models [J] . Curr Opin Gastroenterol, 2012, 28(4): 327–333.
- [13] HOU J, WANG P, LIN L, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2 [J] . J Immunol, 2009, 183(3): 2150–2158.
- [14] ZHU W, YU J, NIE Y, et al. Disequilibrium of M1 and M2 macrophages correlates with the development of experimental inflammatory bowel diseases [J] . Immunol Invest, 2014, 43(7): 638–652.
- [15] LIN Y, SIBANDA V L, ZHANG H M, et al. MiRNA and TF co-regulatory network analysis for the pathology and recurrence of myocardial infarction [J] . Sci Rep, 2015, 5: 9653. doi: 10.1038/srep09653.
- [16] CHEN L, CHU C, LU J, et al. Gene ontology and KEGG pathway enrichment analysis of a drug target-based classification system [J] . PLoS One, 2015, 10(5): e0126492.
- [17] ZHANG Y, GUO X, XIONG L, et al. Comprehensive analysis of microRNA-regulated protein interaction network reveals the tumor suppressive role of microRNA-149 in human hepatocellular carcinoma via targeting AKT-mTOR pathway [J] . Mol Cancer, 2014, 13: 253.

(收稿日期: 2015-06-11 修回日期: 2016-12-25)