

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.05.002

基底样型和 Luminal A 型乳腺癌 microRNAs 表达谱的生物信息学分析

姜茂竹, 麦仲伦, 曾融, 吴钢, 郑燕芳, 张积仁

Bioinformatics-based Analysis for microRNAs Expression Profiles between Basal-like and Luminal A Breast Cancers

JIANG Maozhu, MAI Zhonglun, ZENG Rong, WU Gang, ZHENG Yanfang, ZHANG Jiren

Oncology Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Corresponding Author: ZHENG Yanfang, E-mail: zyfcn@yahoo.com; ZHANG Jiren, E-mail: zhangjiren@126.com

Abstract: Objective To explore differently expressed microRNAs between basal and Luminal A subtype of breast cancers and study the regulatory roles of these microRNAs. **Methods** A dataset of microRNAs expression profilings of basal and Luminal A subtype of breast cancers was obtained from GEO database and analyzed by BRB-ArrayTools. Target gene sets were collected by prediction software TargetScan, miRDB and TarBase. And then Gene Ontology categories and pathways of target gene sets were further analyzed by DAVID database. **Results** Up-regulation of 31 microRNAs and down-regulation of 23 microRNAs were identified in basal compared with Luminal A breast cancers ($P \leq 0.001$). Correspondingly, two gene sets of 4 916 and 3 217 target genes were collected. Further Gene Ontology analyses showed that different Gene Ontology categories were enriched between two target gene sets. There were 35 and 39 KEGG pathways ($P \leq 0.05$) were enriched separately in two target gene sets. Also, 5 and 9 BIO-CARTA pathways were enriched ($P \leq 0.05$). **Conclusion** There are different microRNAs expression patterns between Basal and Luminal A breast cancers. Function analysis indicated that differently expressed microRNAs may take part in quite different biological processes and signaling pathways, and may have different regulating roles in different breast cancers.

Key words: Breast cancer; Basal; Luminal A; microRNAs; Bioinformatics

摘要:目的 对基底型和 Luminal A 型乳腺癌 microRNAs 表达谱进行分析,找出两种分子亚型乳腺癌之间差异表达的 microRNAs,并对差异表达 microRNAs 在不同分子亚型乳腺癌中可能发挥的生物学功能进行初步探讨。**方法** 从公共基因芯片数据库 GEO 中筛选基底样型和 Luminal A 型乳腺癌 microRNAs 表达谱数据,利用 BRB-arrayTools 软件筛选出差异表达的 microRNAs。对差异表达的 microRNAs,利用 TargetScan 和 miRDB 靶基因预测软件及 TarBase 数据库获得可能的靶基因集。利用 DAVID 数据库,对差异表达 microRNAs 的靶基因集进行进一步 Gene Ontology 和信号通路分析。**结果** 通过对基底样型和 Luminal A 型乳腺癌 microRNAs 表达谱分析获得 54 个差异表达的 microRNAs ($P \leq 0.001$)。相对于 Luminal A 亚型乳腺癌,31 个 microRNAs 在基底样型乳腺癌中上调表达,而 23 个 microRNAs 下调表达。上调和下调表达 microRNAs 可能的靶基因集数目分别为 4 916 和 3 217 个。对于上调和下调 microRNAs 的靶基因集, Gene Ontology 分析表明,两个靶基因集分别在不同的生物学过程显著富集; KEGG 通路分析分别涉及了 35 条和 39 条 ($P \leq 0.05$); BIO-CARTA 通路分析则分别涉及 5 条和 9 条 ($P \leq 0.05$)。**结论** 本研究获得了基底样型和 Luminal A 型乳腺癌差异表达的 microRNAs,并通过靶基因功能分析获得差异表达 microRNAs 在两种分子亚型乳腺癌之间可能参与的不同生物学过程及信号通路,可能在不同分子亚型乳腺癌中发挥不同的调节作用。

关键词: 乳腺癌; 基底样型; Luminal A 型; 微小 RNAs; 生物信息学

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A

收稿日期: 2012-07-30; 修回日期: 2012-10-10

作者单位: 510282 广州, 南方医科大学珠江医院肿瘤中心

通信作者: 郑燕芳, E-mail: zyfcn@yahoo.com; 张积仁, E-mail: zhangjiren@126.com

作者简介: 姜茂竹 (1982-), 男, 博士在读, 主要从事微小 RNAs 和肿瘤关系的研究

0 引言

成熟 microRNAs (miRNAs) 是一类长约 22nt 的内源性非编码单链微小 RNA 分子, 在多个生物过程如细胞增殖、凋亡及分化中发挥重要作用^[1]。越来越多的研究表明, miRNAs 作为癌基因或抑癌

经过筛选,在 Luminal A 型和基底样型乳腺癌之间总共找出 54 个差异表达的 miRNAs ($P \leq 0.001$)。其中,相对于 Luminal A 型乳腺癌,31 个 microRNAs 在基底样型乳腺癌中上调表达,差异表达倍数为 1.48~12.88 倍,而 23 个 microRNAs 下调表达,差异表达倍数为 1.38 - 9.09 倍,差异表达的 miRNAs 可见表 1。以差异表达的 miRNAs 为新的基因子集,对所有实验样本进行聚类分析(图略)。

2.3 差异表达 miRNAs 靶基因预测结果

利用靶基因预测软件及经过实验验证的 miRNAs 靶基因收录数据库查询,得到了差异表达 miRNAs 的靶基因集。相对于 Luminal A 型乳腺癌,Basal 型乳腺癌上调表达的 31 个 miRNAs,其可能的靶基因集数目为 4 916 个,将基因集命名为 L1;而下调表达的 23 个 miRNAs,其可能的靶基因集数目为 3 217 个,将基因集命名为 L2,见表 2。

2.4 差异表达 miRNAs 靶基因 GO 功能及通路分析

利用 DAVID 数据库对预测得到的靶基因集 L1 及 L2 进行 GO 分类的生物学过程 (biological

processes, BP) 富集后,富集得到的 GO BP 分类分别 369 个和 316 个 ($P \leq 0.05$),其中两组靶基因集共有和 GO BP 分类为 181 个。其中,L1 富集最明显的 GO BP 为蛋白运输、蛋白定位及代谢过程的正向调控作用;而 L2 富集最明显的 GO BP 为细胞周期、细胞黏附及血管发生及形成。值得注意的是,L1 和 L2 基因集富集最显著的前 20 个 GO BP 分类只有 3 个相同,见图 2。

对靶基因集 L1 及 L2 进行 KEGG 信号通路富集分别得到 35 条和 39 条 ($P \leq 0.05$),两组共有的信号通路为 26 条。其中,L1 富集最明显的 KEGG 通路包括胞吞通路、神经营养蛋白通路、泛素介导蛋白水解通路、肿瘤相关通路、MAPK 及 P53 信号通路;而 L1 富集最明显的 KEGG 通路则主要集中在肿瘤相关通路及黏着斑通路。L1 和 L2 基因集富集最显著的前 10 条 KEGG 信号通路有 3 条相同,见图 3。而对 L1 和 L2 靶基因集进行 BIOCARTA 代谢通路富集分别得到 5 条和 9 条 ($P \leq 0.05$),两个靶基因集之间共有的 BIOCARTA 代谢通路有 1 条,如表 3 所示。

表 1 Luminal A 型和基底样型乳腺癌之间差异表达的 miRNAs ($P \leq 0.001$, FDR < 0.01)

Table 1 Differently expressed miRNAs between Luminal A and basal breast cancers

ID	MicroRNA name	P	FDR	Fold-change (Basal vs. Luminal A)	ID	MicroRNA name	P	FDR	Fold-change (Basal vs. Luminal A)
1	hsa-miR-135b	< 1e-07	< 1e-07	12.88	28	hsa-miR-500*	0.0004737	0.00417	1.58
2	hsa-miR-224	3.00E-07	9.34E-06	5.5	29	hsa-miR-501-3p	0.0001222	0.00131	1.56
3	hsa-miR-18a	< 1e-07	< 1e-07	4.76	30	hsa-miR-106b*	0.0001722	0.00176	1.5
4	hsa-miR-9*	< 1e-07	< 1e-07	4.49	31	hsa-miR-532-3p	1.20E-05	0.000191	1.48
5	hsa-miR-9	< 1e-07	< 1e-07	4.38	32	hsa-miR-423-3p	0.0005251	0.00448	0.72
6	hsa-miR-18b	< 1e-07	< 1e-07	3.13	33	hsa-miR-29b-2*	0.0009808	0.00732	0.7
7	hsa-miR-155	1.50E-06	3.82E-05	3.02	34	hsa-miR-99b	0.0005654	0.00476	0.62
8	hsa-miR-146a	4.89E-05	0.000648	2.78	35	hsa-miR-193a-5p	0.000233	0.00225	0.61
9	hsa-miR-516a-5p	5.44E-05	0.000701	2.73	36	hsa-miR-331-3p	7.69E-05	0.000918	0.55
10	hsa-miR-142-5p	8.38E-05	0.000984	2.68	37	hsa-let-7e	0.0007573	0.00596	0.54
11	hsa-miR-455-5p	1.50E-06	3.82E-05	2.6	38	hsa-miR-125a-5p	0.0001988	0.00198	0.51
12	hsa-miR-142-3p	0.000343	0.00315	2.52	39	hsa-miR-26a	1.00E-07	3.41E-06	0.48
13	hsa-miR-19a	6.30E-06	0.000119	2.48	40	hsa-miR-365	1.39E-05	0.000212	0.46
14	hsa-miR-17*	< 1e-07	< 1e-07	2.46	41	hsa-miR-148b	4.20E-06	8.59E-05	0.44
15	hsa-miR-146b-5p	0.0001113	0.00121	2.43	42	hsa-let-7c	6.20E-06	0.000119	0.44
16	hsa-miR-17	6.55E-05	0.000809	2.28	43	hsa-miR-214*	0.0006993	0.00566	0.44
17	hsa-miR-20a	0.0009299	0.00701	2.12	44	hsa-let-7b	1.00E-06	2.75E-05	0.41
18	hsa-miR-452	1.24E-05	0.000193	2.1	45	hsa-miR-193b	1.60E-06	3.82E-05	0.41
19	hsa-miR-378	0.0003209	0.00298	2.03	46	hsa-miR-190b	1.90E-06	4.25E-05	0.41
20	hsa-miR-106a	4.70E-06	9.35E-05	1.91	47	hsa-miR-199a-5p	0.000469	0.00417	0.38
21	hsa-miR-19b	0.0002571	0.00242	1.82	48	hsa-miR-29c	< 1e-07	< 1e-07	0.3
22	hsa-miR-15b*	4.83E-05	0.000648	1.76	49	hsa-miR-342-5p	3.00E-07	9.34E-06	0.3
23	hsa-miR-362-5p	2.30E-06	4.99E-05	1.74	50	hsa-miR-10a	0.0006969	0.00566	0.3
24	hsa-miR-505	5.48E-05	0.000701	1.74	51	hsa-miR-342-3p	1.00E-07	3.41E-06	0.27
25	hsa-miR-92a	0.0004771	0.00417	1.7	52	hsa-miR-29c*	< 1e-07	< 1e-07	0.24
26	hsa-miR-505*	1.00E-07	3.41E-06	1.68	53	hsa-miR-149	< 1e-07	< 1e-07	0.11
27	hsa-miR-378*	9.19E-05	0.00103	1.58	54	hsa-miR-375	< 1e-07	< 1e-07	0.11

Note: *, means the miRNA arises from the 3' arm of the pre-miRNA hairpin; FDR: false discovery rate

腺癌, 基底样型乳腺癌中上调表达比较显著的 miRNAs 为 miR-135b、miR-224、及 miR-9。在其他研究中, 同样是利用 miRNAs 表达谱方法, miR-135b 被认为其表达与雌激素受体表达情况呈负相关^[6], 而另一项研究则利用 8 种人类乳腺癌基因工程小鼠模型表明 miR-135b 为基底样型乳腺癌特征性 miRNA^[7]。在乳腺癌细胞中的研究则表明, miR-224 可能在肿瘤恶性侵袭及转移相关调控中发挥作用^[8-9]。miR-9 可能对乳腺癌和结直肠癌的复发、转移具有调控作用^[10-11]。而相对于 Luminal A 型乳腺癌, 基底样型乳腺癌中下调表达比较显著的 miRNAs 为 miR-375、miR-149 等。对 miR-375 的研究表明, 在乳腺癌 MCF-7 细胞中, 抑制 miR-375 的表达, 明显影响雌激素受体活性及细胞增殖^[12], 而另一项研究则表明再表达 miR-375 可以逆转乳腺癌对他莫昔芬治疗的耐药性^[13]。目前为止, 对 miR-149 与乳腺癌的研究则非常少。结合以上研究, 本研究获得的 Luminal A 型乳腺癌和基底样型乳腺癌差异表达的 miRNAs 可以较好体现两种不同分子亚型乳腺癌的相关特征, 结合分层聚类分析, 我们可以看到, 差异表达 miRNAs 可以对不同类型样本进行准确分类。

miRNAs 通过仅有 7 个碱基的种子序列特异性作用于靶基因的 3' 末端非翻译区, 在转录后水平抑制靶基因的表达^[1]。miRNAs 与靶基因相互作用的这种特性决定了单个 miRNA 可以靶向调节多个基因的表达及单个基因可以受到多个 miRNA 的调节^[14], 因而导致通过实验验证差异表达的 miRNAs 及其靶基因的相互作用的困难。为了更好理解两种不同分子亚型乳腺癌之间差异表达的 miRNAs 协同发挥的调节作用, 本研究将经预测软件预测得到的和已经通过实验验证的靶基因结果给合形成靶基因集, 然后进行 GO 功能和信号通路分析。为了排除靶基因预测软件的假阳性, 研究对 TargetScan 和 miRDB 两种软件的预测结果取交集, 然后再与来自于 TarBase 收集的经实验验证的靶基因取并集, 在一定程度上降低了假阳性结果, 有利于进行靶基因集的功能分析。

对两种 Luminal A 型乳腺癌和基底样型乳腺癌差异表达的 miRNAs 形成的靶基因集 L1 和 L2 分别进行了 GO BP 分类、KEGG 信号通路和 BIO-CARTA 代谢通路富集分析, 我们两个靶基因集分别在不同的 GO BP 分类及通路中得到富集, 提示了两种分子亚型乳腺癌发现差异表达的 miRNAs 可能在各自疾病发生及进展过程中发挥不同的调控作

用。尽管本研究通过生物信息学方法分析得出的差异表达 miRNAs 参与调控的生物功能及相关信号通路仍需要进一步实验验证, 但这种系统分析的方法仍可为实验研究提供有利思路, 为深入研究 miRNAs 在不同分子亚型乳腺癌中的调控作用奠定基础。

参考文献:

- [1] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4): 271-82.
- [2] Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 347-55.
- [3] Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(8): 790-800.
- [4] van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer[J]. *Nature*, 2002, 415(6871): 530-6.
- [5] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1938-48.
- [6] Lowery AJ, Miller N, Devaney A, *et al.* MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(3): R27.
- [7] Zhu M, Yi M, Kim CH, *et al.* Integrated miRNA and mRNA expression profiling of mouse mammary tumor models identifies miRNA signatures associated with mammary tumor lineage[J]. *Genome Biol*, 2011, 12(8): R77.
- [8] Huang L, Ting D, Lin X, *et al.* MicroRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 127-33.
- [9] Zhu S, Sachdeva M, Wu F, *et al.* Ubc9 promotes breast cell invasion and metastasis in a sumoylation-independent manner[J]. *Oncogene*, 2010, 29(12): 1763-72.
- [10] Zhou X, Marian C, Makambi KH, *et al.* MicroRNA-9 as potential biomarker for breast cancer local recurrence and tumor estrogen receptor status[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39011.
- [11] Zhu L, Chen H, Zhou D, *et al.* MicroRNA-9 up-regulation is involved in colorectal cancer metastasis via promoting cell motility[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 1037-43.
- [12] de Souza Rocha Simonini P, Breiling A, Gupta N, *et al.* Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9175-84.
- [13] Ward A, Balwierz A, Zhang JD, *et al.* Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(9): 1173-82.
- [14] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-33.