

· 论 著 ·

重型颅脑损伤病人外周血 miRNA 生物信息学分析

顾 浩 冯东福

【摘要】目的 通过生物信息学方法分析重型颅脑损伤(sTBI)病人外周血微小RNA(miRNA)的靶基因及功能。**方法** 从GEO数据库中检索获取sTBI病人和对照组外周血的基因芯片数据,应用生物信息学方法筛选差异表达的miRNA,并进行靶基因预测和生物学功能及信号通路分析,构建miRNA及靶基因的调控网络。**结果** 检索得到芯片GSE21854,筛选得到145个差异表达的miRNA,预测得到靶基因共580个。这些靶基因的功能主要为细胞增殖负性调控、转换生长因子 β 受体信号通路负性调控等,主要分布在Ras信号通路、转换生长因子 β 信号通路等。miRNA及靶基因的调控网络图显示hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-760、hsa-miR-217、hsa-miR-199a-3p、hsa-miR-543是调控核心。**结论** sTBI病人外周血存在差异性表达的miRNA,hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-760、hsa-miR-217、hsa-miR-199a-3p、hsa-miR-543与sTBI的进展密切相关。

【关键词】 重型颅脑损伤;微小RNA;外周血;生物信息学

【文章编号】 1009-153X(2019)12-0749-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1*5; Q 786

Bioinformatics study of microRNA in peripheral blood in patients with severe traumatic brain injury

GU Hao¹, FENG Dong-fu^{1,2}. 1. Department of Neurosurgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Medical School, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 2. Institute of Traumatic Medicine, Medical School, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

【Abstract】Objective To study the target genes and their functions of microRNA (miRNA) in the peripheral blood in the patients with severe traumatic brain injury (sTBI) by bioinformatics analysis. **Methods** The microarray data of the patients with sTBI were retrieved from GEO database, and the miRNAs with differential expression were screened by bioinformatics tools. Then the target genes of miRNAs with differential expression were analyzed. Gene ontology and signal pathway analysis were performed in the target genes. miRNAs and their targeted genes networks were established. **Results** The data were obtained from GSE21854 and 145 differential expressed miRNAs were screened out. A total of 580 target genes of screened miRNA were obtained. The functions of these target genes mainly included negative regulation of cell proliferation, negative regulation of transforming growth factor β receptor signaling pathway and so on. The miRNA and their targeted genes networks analysis revealed that hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-760, hsa-miR-217, hsa-miR-199a-3p and hsa-miR-543 were the key genes. **Conclusions** The differential expressed miRNAs exist in the peripheral blood in the patients with sTBI and hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-760, hsa-miR-217, hsa-miR-199a-3p and hsa-miR-543 are closely associated with the progression of sTBI.

【Key words】 Severe traumatic brain injury; MicroRNA; Bioinformatics; Analysis

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)病死率、致残率高,特别是重型TBI(severe TBI, sTBI)^[1]。研究表明多种基因参与sTBI的病理生理过程^[2],因此,了解这些基因的作用对sTBI的治疗具有指导意义。微小RNA(microRNA, miRNA)能够抑制靶点mRNA的翻译^[3],并且可以作为一些疾病的生物学标记^[4]。最近的研究表明,外周血miRNA在损伤后表达升高^[5]。本文通过检索GEO数据库,检索与TBI相关的外

周血的基因芯片报告^[6],但这些研究只对芯片数据集进行差异表达分析。为深入挖掘这些数据的价值,我们使用RStudio与BioConductor软件,利用生物信息学方法筛选出差异表达的miRNA,并进行靶基因预测,再对预测结果进行生物学功能和信号通路富集分析,最后对差异表达的miRNA及靶基因构建调控网络,揭示与sTBI密切相关的miRNA及功能。

1 资料与方法

1.1 数据来源 从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)检索sTBI病人miRNA的表达芯片数据。数据集需要满足3个要求:①数据集系全基因组miRNA表达芯片;②包含有sTBI病人与正常对照;③数据包原始数据或标准化后的数据。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.12.010

基金项目:国家自然科学基金(81772059)

作者单位:201900上海,上海交通大学医学院附属第九人民医院神经外科(顾浩、冯东福);201900上海,上海交通大学医学院创伤医学研究所(冯东福)

通讯作者:冯东福, E-mail: drneuro@163.com

1.2 差异表达 miRNA 的筛选 在RStudio软件(3.5.3版本)环境下,应用Bioconductor(3.9版本)中limma软件包对芯片数据进行背景校正、标准化和log2转换。以P<0.05和倍性变化>1.5倍为阈值进行筛选。

1.3 miRNA 靶基因预测分析 分别利用 miRanda 网站 (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 和 TargetScan 网站 (http://www.targetscan.org/vert_72/)对差异表达 miRNA 进行靶基因预测分析,再取对结果交集进行后续分析。

1.4 生物学功能分析和信号通路分析 将差异表达的 miRNA 提交至 DAVID(<https://david.ncicrf.gov/>)网站进行生物学功能(GeneOntology, GO)分析。利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)网站 (<https://www.kegg.jp/>)对靶基因进行信号通路分析。

1.5 miRNA 与靶基因的调控分析 利用 miRWalk (版本 3.0)网站 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) miRNAs 模块中 Graph 功能进行分析^[7],得到具有核心调控作用的 miRNA 与靶基因的相互作用网络,通过节点之间的连通度表示该节点的重要程度。

2 结果

2.1 GSE 芯片数据特征 检索 GEO 数据库,得到 GSE21854 芯片数据集,该芯片用于检测 sTBI 病人外周血 miRNA 表达水平。本文共收集 20 个样本, sTBI 病人和健康对照组外周血样本各 10 个,其采用 LC_MRA-1001_miRHuman_13.0_090309 平台。10 例 sTBI 中,男 8 例,女 2 例;年龄 16~40 岁,平均 25 岁,中位年龄 23 岁;采样时间为伤后(68±8)h。健康对照组男 8 例,女 2 例;年龄 18~41 岁,平均 26.8 岁,中位年龄 23.5 岁。

2.2 差异表达 miRNA 检测 利用 RStudio 软件分析,经 log2 校正和质量控制后,筛去不达标样本结果,得到 145 个差异表达 miRNA,其中上调 79 个,下调 66 个。前 5 个差异表达 miRNA 分别为:hsa-miR-574-3p 上调,hsa-miR-574-5p 上调,hsa-miR-1246 上调,hsa-miR-605 下调,hsa-miR-145* 上调。

2.3 miRNA 靶基因预测 对差异表达的 miRNA 分别经过 TargetScan、miRanda 网站进行预测,对预测结果取交集后共得到 580 个靶基因。见表 1。

2.4 miRNA 靶基因功能分析和信号通路分析 对 580 个靶基因进行功能分析发现,功能主要集中在细胞增殖负性调控、转换生长因子β受体信号通路负性调控等。见表 2。

2.5 miRNA 靶基因信号通路分析 对 580 个靶基因经 KEGG 数据库进行信号通路分析发现,信号通路主要分布在 Ras 信号通路、转换生长因子β信号通路等。见表 3。

2.6 miRNA 与靶基因网络调控分析 通过构建差异表达 miRNA 与靶基因之间的靶向调控关系建立互作网络。结果显示 hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-760、hsa-miR-217、hsa-miR-199a-3p、hsa-miR-543 是调控核心。

3 讨论

sTBI 病死率超过 20%,一半以上病人预后不良^{8、9}。这与 sTBI 的发病过程有关,不仅是机械外力造成的急性原发性损伤,还包括后续的继发性损伤,包括神经元死亡、血脑屏障破坏以及神经功能紊乱等。鉴于急性原发性损伤难以预料和控制,因此目前的

表 1 重型颅脑损伤外周血 miRNA 中差异表达靶基因

Entrez 代号	基因标记	描述
387509	GPR153	人 G 蛋白偶联受体 153, mRNA
9563	H6PD	人己糖-6-磷酸脱氢酶, 转录变体 X3, mRNA
26099	SZRD1	人 SUZ RNA 结合域包含 1 蛋白, 转录变体 1, mRNA
126917	IFFO2	人中间丝家族孤啡肽 2 蛋白, 转录变体 X1, mRNA
440574	MINOS1	人线粒体内膜组装系统 1 蛋白, 转录变体 5, mRNA

表 2 重型颅脑损伤外周血 miRNA 中差异表达靶基因的生物学功能

GO 编号	生物学功能
GO:0008285	细胞增殖负性调控
GO:0030512	转换生长因子β受体信号通路负性调控
GO:0006198	环磷酸腺苷分解代谢
GO:0031054	前体 miRNA 处理
GO:0045740	DNA 复制的正性调控

表 3 重型颅脑损伤外周血 miRNA 中差异表达靶基因的信号通路

通路编号	信号通路
hsa04014	Ras 信号通路
hsa04350	转换生长因子β信号通路
hsa05214	肿瘤信号通路
hsa04218	细胞衰老
hsa04070	磷脂酰肌醇信号通路

研究主要集中探索继发性损伤的机制^[10]。

在大脑发育过程中,miRNA 影响脑发育进程^[11],参与突触形成及神经元发生、分化、成熟等过程^[12]。研究表明小鼠 sTBI 后脑组织 miRNA 的表达水平发生改变^[13],并且参与伤后炎症反应、神经元凋亡、认知功能障碍等进程^[10]。但在临床工作中,检测病人脑组织 miRNA 不仅存在技术困难,还可能给病人带来更大的伤害。最近的研究发现 sTBI 病人脑脊液和血液 miRNA 也发生改变^[6,14]。我们检索 GEO 数据库 sTBI 病人外周血基因芯片数据,通过 Rstudio 软件分析得出 145 个差异表达的 miRNA,依据预设标准得到 miRNA 上调 79 个、下调 66 个;通过生物信息学方法筛选得出 580 个靶基因,进一步的生物学功能和信号通路分析表明这些靶基因主要集中在细胞增殖负性调控、转换生长因子 β 受体信号通路负性调控等,信号通路主要分布在 Ras 信号通路、转换生长因子 β 信号通路等;通过构建差异表达 miRNA-靶基因调控网络显示 hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-760、hsa-miR-217、hsa-miR-199a-3p、hsa-miR-543 是调控网络的核心。既往研究发现轻、中型 TBI 病人血清 hsa-miR-199a-3p 水平升高^[14],这提示 hsa-miR-199a-3p 可能与 TBI 损伤程度相关。

值得注意的是,sTBI 病人常合并颌面外伤,可能会对分析结果带来影响,有研究表明 miRNA 能将 sTBI 病人与单纯颌面外伤病人进行区分^[6]。除此之外,sTBI 病人中 GCS 评分 3~5 分与 6~8 分病人的治疗预后差异悬殊,而且病人可能合并其他系统疾病,也可能对分析结果带来影响。既往有研究发现同一 miRNA 在轻型 TBI 和 sTBI 病人表现出相反的变化趋势^[6],这些证据表明 miRNA 在疾病的诊疗中既有潜力,亦存在一定的限制,需要在今后的研究中深入探索,加以鉴别。

综上所述,本文利用生物信息学方法筛选出 sTBI 病人外周血差异表达 miRNA,进一步分析得出这些 miRNA 的靶基因,以及靶基因的生物学功能和信号通路,并从中找出具有核心调控作用的 miRNA,为后续的探索提供了依据和基础,也为了解 sTBI 的发病机制和治疗提供了新的方向。

【参考文献】

- [1] Dewan MC, Rattani A, Gupta S, *et al.* Estimating the global incidence of traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg*, 2018, 130(4): 1080-1097.
- [2] Bennett ER, Reuter-Rice K, Laskowitz DT. Genetic Influences in Traumatic Brain Injury. In: Laskowitz D *et al* eds. *Translational Research in Traumatic Brain Injury* [M]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group, 2016. 1-32.
- [3] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [4] Larocca D, Barns S, Hicks S D, *et al.* Comparison of serum and saliva miRNAs for identification and characterization of mTBI in adult mixed martial arts fighters [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e207785.
- [5] Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, *et al.* Plasma microRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(11): 1977-1983.
- [6] Redell JB, Moore AN, Ward NR, *et al.* Human traumatic brain injury alters plasma microRNA levels [J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27(12): 2147-2156.
- [7] Sticht C, De La Torre C, Parveen A, *et al.* miRWalk: an online resource for prediction of microRNA binding sites [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e206239.
- [8] 惠纪元, 龚如, 梁玉敏, 等. 中国颅脑创伤数据库: 短期预后因素分析 [J]. *中华神经外科杂志*, 2014, 30(1): 56-58.
- [9] Murray DA, Meldrum D, Lennon O. Can vestibular rehabilitation exercises help patients with concussion: a systematic review of efficacy, prescription and progression patterns [J]. *Br J Sports Med*, 2017, 51(5): 442-451.
- [10] Pan YB, Sun ZL, Feng DF. The role of MicroRNA in traumatic brain injury [J]. *Neuroscience*, 2017, 367: 189-199.
- [11] Eda A, Takahashi M, Fukushima T, *et al.* Alteration of microRNA expression in the process of mouse brain growth [J]. *Gene*, 2011, 485(1): 46-52.
- [12] Chen W, Qin C. General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development [J]. *RNA Biol*, 2015, 12(7): 701-708.
- [13] Miao W, Bao TH, Han JH, *et al.* Voluntary exercise prior to traumatic brain injury alters miRNA expression in the injured mouse cerebral cortex [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2015, 48(5): 433-439.
- [14] Bhomia M, Balakathiresan NS, Wang KK, *et al.* A panel of serum MiRNA biomarkers for the diagnosis of severe to mild traumatic brain injury in humans [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28148.