

• 论 著 •

# miR-139-5p 靶基因参与调控人骨肉瘤细胞表型的机制分析\*

魏代平<sup>1</sup>, 李海龙<sup>2</sup>, 颜春鲁<sup>2△</sup>, 汪永锋<sup>2</sup>, 吕栋辉<sup>2</sup>, 张金龙<sup>2</sup>, 李嘉进<sup>2</sup>

1. 甘肃省兰州市皋兰县人民医院骨科, 甘肃兰州 730299; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000

**摘 要:**目的 通过生物信息学方法预测 miR-139-5p 的靶基因, 并对靶基因进行信号通路富集分析, 结合蛋白质互作(PPI)网络分析筛选核心基因。**方法** 使用 dbDEMC 数据库检索 miR-139-5p 在骨肉瘤细胞中的表达, 使用 miRSystem 网站的生物信息学数据库进行 miR-139-5p 的靶基因预测, 利用 DAVID6.8 软件对 miR-139-5p 的靶基因开展 KEGG 信号通路富集分析, 利用 string 软件对 KEGG 聚类分析中发现的与肿瘤密切相关的基因进行 PPI 网络分析, 获得相关参数, 然后将数据导入 Cytoscape 3.8 软件, 由其插件 MCODE 筛选出核心基因, 并利用 HCMDB 数据库分析其在骨肉瘤中的表达, 选择有阳性意义的基因作为核心基因。**结果** miR-139-5p 表达水平在骨肉瘤细胞中明显下调( $P < 0.05$ )。预测分析共获得 407 个靶基因, 富集在 59 条信号通路中, 其中与肿瘤关系密切的通路有 21 条, 分别是 mTOR 通路、癌症中的蛋白多糖、小细胞肺癌、cAMP 信号通路、细胞外受体相互作用、焦点粘连、胶质瘤等。PPI 网络分析显示, 21 条信号通路中的 NOTCH1、FN1、CXCR4 和 RPS6KB1 是参与 miR-139-5p 调控人骨肉瘤细胞生物表型的关键核心基因。**结论** miR-139-5p 可能是骨肉瘤细胞中潜在的抑癌基因, 与骨肉瘤具有相关性, 富集于 21 条信号通路中的癌基因的异常表达与其细胞恶性表型具有显著相关性。靶基因 NOTCH1、FN1、CXCR4 和 RPS6KB1 是 miR-139-5p 调控骨肉瘤发生、发展及预后的关键核心基因。另外, 生物信息学分析发现的具有高度相关性的癌基因和信号通路为探讨其功能和机制提供了线索和依据。

**关键词:** miR-139-5p; 骨肉瘤; 信号通路; 核心基因

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.04.017

**中图法分类号:** R738.1; R446.9

**文章编号:** 1673-4130(2022)04-0460-05

**文献标志码:** A

## Mechanism analysis of miR-139-5p targeted regulating core genes for participating in human osteosarcoma cell phenotype\*

WEI Daiping<sup>1</sup>, LI Hailong<sup>2</sup>, YAN Chunlu<sup>2△</sup>, WANG Yongfeng<sup>2</sup>,  
LYU Donghui<sup>2</sup>, ZHANG Jinlong<sup>2</sup>, LI Jiajin<sup>2</sup>

1. Department of Orthopedics, Gaolan County People's Hospital, Lanzhou,

Gansu 730299, China; 2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China

**Abstract: Objective** To predict the target genes of miR-139-5p by bioinformatics methods, and to screen the core genes by the signal pathway enrichment analysis and protein-protein interaction (PPI) network analysis on the targeted genes. **Methods** The expression of miR-139-5p in osteosarcoma cells was retrieved by using dbDEMC database, the bioinformatics database in the miRSystem network station was used to predict the target genes of miR-139-5p, the David6.8 software was used to carry out the KEGG signal pathway enrichment analysis, the string software was used to conduct the PPI network analysis on the genes closely related to tumor found in KEGG cluster analysis, the related parameters were obtained, then the data were imported into Cytoscape 3.8, the core genes were screened out by its plug-in MCODE, their expression in osteosarcoma were analyzed by using the HCMDB database. Finally, those genes with positive significance were selected as the core genes. **Results** The expression level of miR-139-5p was significantly down-regulated in osteosarcoma ( $P < 0.05$ ), a total of 407 target genes were obtained by predictive analysis, which were enriched in 59 signa-

\* 基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(20JR5RA185); 大学生创新创业一体化实践平台建设项目(6-1)。

作者简介: 魏代平, 男, 主治医师, 主要从事中药抗肿瘤和骨病的分子生物学机制研究。△ 通信作者, E-mail: yanchl1979@126.com。

本文引用格式: 魏代平, 李海龙, 颜春鲁, 等. miR-139-5p 靶基因参与调控人骨肉瘤细胞表型的机制分析[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43

ling pathways, 21 pathways were closely related to cancer, including mTOR pathway, proteoglycan in cancer, small cell lung cancer, cAMP signaling pathway, extracellular receptor interaction, focal adhesion, glioma, etc. The PPI network analysis showed that NOTCH1, FN1, CXCR4 and RPS6KB1 in 21 signal pathways were the key core genes involved in miR-139-5p regulating the biological phenotype of human osteosarcoma cells. **Conclusion** miR-139-5p may be a potential tumor suppressor gene in osteosarcoma cells, has the correlation with osteosarcoma, the cancer gene abnormal expression enriched in 21 signal pathways has the significant correlation with the malignant phenotype of osteosarcoma cells. The target genes NOTCH1, FN1, CXCR4 and RPS6KB1 are the key core genes of miR-139-5p in regulating the occurrence, development and prognosis of osteosarcoma cells. In addition, the oncogenes and signaling pathways with high correlation found by bioinformatical analysis provide clues and basis for exploring their functions and mechanisms.

**Key words:** miR-139-5p; osteosarcoma; signaling pathway; core gene

骨肉瘤是一种起源于间叶组织的侵袭性恶性肿瘤,其发病率和病死率在原发性骨肿瘤中均居首位。约 60% 的病例是 10~20 岁的儿童和青少年。近年来研究发现,miRNA 在骨肉瘤中异常表达,参与了骨肉瘤细胞多种恶性表型的生物学过程,有可能成为骨肉瘤诊断、治疗监测、预后判断的重要标志物<sup>[1]</sup>。

有研究报道,骨肉瘤组织中 miR-139-5p 的表达下调。miR-139-5p 通过靶向调控 SLITRK4<sup>[2]</sup>、NOTCH1<sup>[3]</sup>、GPR56<sup>[4]</sup>、Rock1<sup>[5]</sup>、RUNX2<sup>[6]</sup>、DNMT1<sup>[7]</sup>、CDK14<sup>[8]</sup>等基因,抑制骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和转移。目前,普遍的研究思路是探讨 miRNA 在肿瘤组织中的功能和对表型的影响,需在生物信息学预测的基础上,进行实验验证研究。然而,这种预测存在着一定程度的偶然性和盲目性。本文借助于生物信息学方法,对 miR-139-5p 的靶基因进行预测,并对靶基因进行信号通路富集分析,再选择与肿瘤有关的信号通路中的基因进行蛋白质互作(PPI)网络分析,而后筛选 PPI 网络中的参数,选择 Cytoscape3.8 软件构建关键核心基因;对关键核心基因使用 HCMDB 数据库,分析其在骨肉瘤中的表达,从而解析 miR-139-5p 的靶基因及其调控恶性表型的分子机制,为骨肉瘤分子标志物研究提供依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 从 dbDEMC(<https://www.biosino.org/dbDEMC/>)数据库检索到 GEO(GSE28423)数据集,包含 19 个骨肉瘤细胞系及 4 个正常对照细胞的 miRNA 表达谱,从中检索 miR-139-5p 的表达。从 HCMDB 数据库(<http://hcmdb.i-sanger.com/index>)检索到 44 例 GEO(GSE14359 和 GSE32981)数据集中骨肉瘤组织和正常组织表达,用于验证 miR-139-5p 的关键核心基因的差异表达。

### 1.2 方法

**1.2.1 miR-139-5p 在骨肉瘤细胞中的表达** 使用 dbDEMC 数据库检索 miR-139-5p 在骨肉瘤细胞中相

对于正常对照细胞的差异表达。

**1.2.2 miR-139-5p 靶基因预测和靶基因富集信号通路分析** 使用 miRSystem 网站(<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/index.php>)中集成的 DIANA、MIRANDA、MIRBRIDGE、PICTAR、PITA、RNA22、TARGETSCAN 软件对 miR-139-5p 的靶基因进行预测和分析,选取至少 3 个软件支持的靶基因作为下一步分析的候选基因,对所检索到的靶基因使用 DAVID6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)软件进行 KEGG 信号通路富集分析,富集聚类分析采用 Fisher 确切概率法,检验水准为  $\alpha < 0.05$ 。

**1.2.3 miR-139-5p 靶基因的肿瘤相关信号通路 PPI 网络分析** 选择在线软件 string(<https://string-db.org/>)数据库,将 72 个 miR-139-5p 靶基因中与肿瘤信号通路具有相关性的基因输入在线软件 string 进行 PPI 网络分析,观察节点,分析其节点后,对节点和周边数据进行提取并导出文件。

**1.2.4 选择 miR-139-5p 的肿瘤相关信号通路基因进行 PPI 网络构建与关键基因分析** 将 PPI 数据库构建作用靶点输入 Cytoscape3.8 软件构建网络,采用其插件 MCODE 计算参数,筛选关键基因。

**1.2.5 肿瘤密切相关通路基因的表达情况分析** 选择前述的关键基因,检索 HCMDB 数据库,利用在线软件检索分析这些关键基因在骨肉瘤组织中的表达。

## 2 结果

**2.1 miR-139-5p 在骨肉瘤细胞中的表达** 使用 dbDEMC 数据库检索了 miR-139-5p 在骨肉瘤细胞中相对于正常对照细胞的表达,结果发现 miR-139-5p 在骨肉瘤细胞中明显表达下调( $P < 0.05$ ),见图 1。

**2.2 miR-139-5p 靶基因预测** 使用 miRSystem 网站的生物信息学数据库进行了 miR-139-5p 的靶基因预测,以至少 3 个软件支持的靶基因作为选择标准,共获得 407 个靶基因。

**2.3 miR-139-5p 靶基因富集信号通路分析** 将所获

得的 407 个靶基因输入 DAVID6.8 在线软件进行信号通路分析,共获得 59 条信号通路,其中,有 21 条信号通路与肿瘤有关,见表 1。这些通路包括 mTOR 通

路、癌症中的蛋白多糖、小细胞肺癌、cAMP 信号通路、细胞外受体相互作用、焦点粘连、胶质瘤等。

表 1 miR-139-5p 靶基因富集信号的 21 条肿瘤相关信号通路

| KEGG 信号通路               | 富集基因数( <i>n</i> ) | <i>P</i> | 富集倍数      | 错误发现率     |
|-------------------------|-------------------|----------|-----------|-----------|
| mTOR 信号通路(hsa04150)     | 5                 | 0.033    | 4.061 762 | 0.124 167 |
| 癌症中的蛋白多糖(hsa05205)      | 17                | <0.001   | 4.004 897 | 0.000 032 |
| 小细胞肺癌(hsa05222)         | 7                 | 0.008    | 3.880 177 | 0.054 339 |
| cAMP 信号通路(hsa04024)     | 16                | <0.001   | 3.807 389 | 0.000 051 |
| 细胞外受体相互作用(hsa04512)     | 7                 | 0.009    | 3.790 978 | 0.055 619 |
| 焦点粘连(hsa04510)          | 16                | <0.001   | 3.659 529 | 0.000 067 |
| 胶质瘤(hsa05214)           | 5                 | 0.047    | 3.624 341 | 0.149 596 |
| p53 信号通路(hsa04115)      | 5                 | 0.052    | 3.516 152 | 0.160 916 |
| Rap1 信号通路(hsa04015)     | 15                | <0.001   | 3.365 460 | 0.002 017 |
| 转化生长因子-β 信号通路(hsa04350) | 6                 | 0.031    | 3.365 460 | 0.120 919 |
| 癌症途径(hsa05200)          | 26                | <0.001   | 3.117 118 | 0.000 084 |
| AMPK 信号通路(hsa04152)     | 8                 | 0.014    | 3.064 484 | 0.074 468 |
| cGMP-PKG 信号通路(hsa04022) | 10                | 0.006    | 2.982 053 | 0.045 728 |
| PI3K-Akt 信号通路(hsa04151) | 21                | <0.001   | 2.867 957 | 0.000 067 |
| 鞘脂信号通路(hsa04071)        | 7                 | 0.040    | 2.748 459 | 0.135 827 |
| Wnt 信号通路(hsa04310)      | 8                 | 0.026    | 2.731 388 | 0.102 396 |
| 钙离子信号通路(hsa04020)       | 10                | 0.013    | 2.632 203 | 0.067 565 |
| 趋化因子信号通路(hsa04062)      | 9                 | 0.042    | 2.279 828 | 0.136 342 |
| MAPK 信号通路(hsa04010)     | 12                | 0.017    | 2.234 772 | 0.081 489 |
| Hippo 信号通路(hsa04390)    | 7                 | 0.098    | 2.184 206 | 0.268 413 |
| 癌症中的 miRNA(hsa05206)    | 12                | 0.038    | 1.976 913 | 0.131 422 |

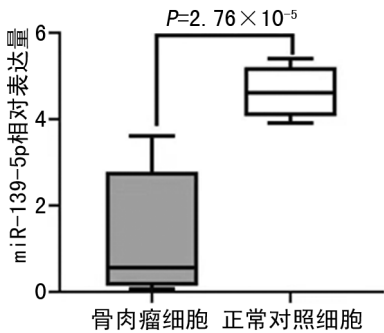


图 1 miR-139-5p 在骨肉瘤细胞中的表达

**2.4 miR-139-5p 靶基因肿瘤通路 PPI 网络分析结果** 有 73 个基因富集在与肿瘤密切相关的信号通路中(表 1),将其输入在线软件 string 进行 PPI 网络分析,并将其聚类在 3 个模块中(图 2)。分析其节点, Cytoscape3.8 软件的插件 MCODE 计算参数,筛选出 IGF1R、NOTCH1、CDH1、FOS、FN1、JUN、CDC42、CXCR4、RPS6KB1 共 9 个基因为关键基因。

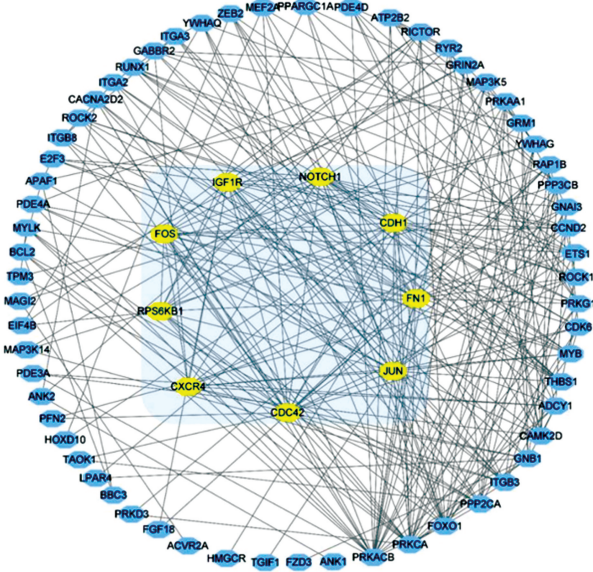


图 2 Cytoscape 软件的 MCODE 插件筛选的 9 个关键核心基因

**2.5 miR-139-5p 靶基因中关键核心基因在骨肉瘤中**

的表达分析 选择在线 HCMDDB 数据库,检索分析 9 个 miR-139-5p 的靶基因中的关键核心基因 IGF1R、NOTCH1、CDH1、FOS、FN1、JUN、CDC42、CXCR4、RPS6KB1 在骨肉瘤中的表达(图 3)。结果发现,

NOTCH1、FN1、CXCR4、RPS6KB1 在正常组织与骨肉瘤组织之间比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。这 4 个靶基因作为 miR-139-5p 的预测靶基因,至少获得 3 个软件支持(表 2)。

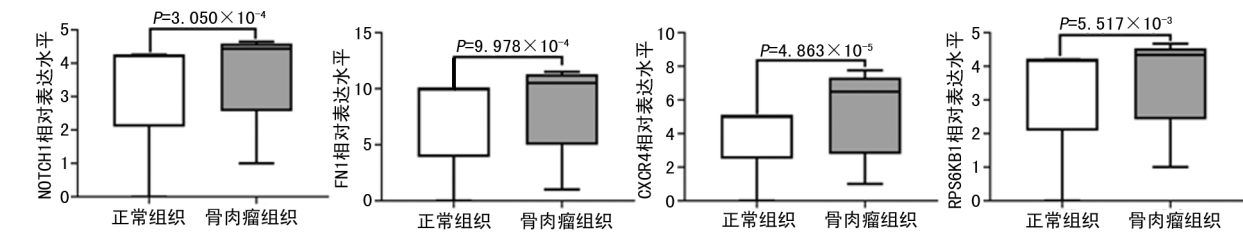


图 3 关键核心基因在正常组织与骨肉瘤组织之间差异表达(HCMDDB 数据库)

表 2 miR-139-5p 的靶基因预测软件支持情况

| 靶基因     | DIANA | MIRANDA | MIRBRIDGE | PICTAR | PITA | RNA22 | TARGETSCAN |
|---------|-------|---------|-----------|--------|------|-------|------------|
| NOTCH1  | Y     | Y       | —         | Y      | Y    | Y     | Y          |
| FN1     | Y     | Y       | —         | —      | —    | Y     | —          |
| RPS6KB1 | Y     | Y       | —         | —      | Y    | —     | —          |
| CXCR4   | Y     | Y       | —         | Y      | Y    | —     | —          |

注:Y 代表获得该软件支持;—表示无数据。

3 讨 论

人类 miR-139-5p 属于 miR-139 家族,其成熟体核心碱基序列为“UCUACAGUGCACGUGUCUC-CAGU”。有研究指出,miR-139-5p 在肿瘤组织中高表达,其表达与肺癌<sup>[9]</sup>、子宫内膜癌<sup>[10]</sup>、卵巢癌<sup>[11]</sup>、膀胱癌<sup>[12]</sup>、食管癌<sup>[11]</sup>、胃癌<sup>[13]</sup>等多种肿瘤的生物学行为密切相关。也有实验研究发现 miR-139-5p 明显影响骨肉瘤细胞的恶性表型,其机制通过负向调控 SLITRK4、NOTCH1、GPR56、Rock1、RUNX2、DNMT1、CDK14 实现。复习文献,不难发现,在不同肿瘤中同一 miRNA 靶向调控的基因存在差别。因此,开展 miRNA 的功能及其靶基因的研究,单纯依赖生物信息学分析是远远不够的。如何更有效开展 miRNA 靶基因的验证研究值得深入探讨。必须考虑所探讨的靶基因在特定组织中的表达情况,否则,所选择的靶基因难免存在偶然性和盲目性。

本研究借助于生物信息学数据库,对 miR-139-5p 的靶基因进行预测,将所获得的 407 个靶基因输入 DAVID6.8 在线软件,进行信号通路富集分析,共获得 59 条信号通路,其中,有 21 条信号通路与肿瘤有关。这些通路包括 mTOR 信号通路、癌症中的蛋白多糖、小细胞肺癌、cAMP 信号通路、细胞外受体相互作用、焦点粘连、胶质瘤等。对富集在这些通路中的 73 个基因采用在线软件 string 进行 PPI 网络分析。分析其节点后,将节点和周边数据提取后导入 Cyto-scape3.8 软件构建网络,采用目前通用的插件

MCODE 计算参数,筛选出 IGF1R、NOTCH1、CDH1、FOS、FN1、JUN、CDC42、CXCR4、RPS6KB1 共 9 个基因为关键基因。

按照基因时间、空间表达的特异性,借助于 HC-MDB 数据库,检索骨肉瘤癌基因数据库分析后发现,在 miR-139-5p 调控的靶基因中的关键核心基因中,NOTCH1、FN1、CXCR4、RPS6KB1 是在骨肉瘤中表达上调的癌基因,其他 5 个基因并非癌基因。其中 NOTCH1 作为 miR-139-5p 的靶基因,在骨肉瘤细胞中已经得到实验验证<sup>[3]</sup>。FN1、CXCR4、RPS6KB1 较少见文献报道,可作为未来进一步深入探讨的靶基因。NOTCH1 作为 NOTCH 信号通路的分子<sup>[14]</sup>,可作为膜结合配体 Jagged1、Jagged2 和 Delta1 的受体来调节细胞的活性。NOTCH1 与配体结合以后释放其细胞内结构域(NICD),然后转入细胞核内与 RB-PJ/RBPSUH 形成转录激活复合物,并激活分裂位点增强子的基因,从而影响分化、增殖和凋亡程序的执行,NOTCH 也是人类肿瘤中开展靶向治疗的重要靶点<sup>[15]</sup>。FN1 是 TNFSF12/TWEAK 的受体,为某些细胞的弱凋亡诱导剂,可促进血管生成和内皮细胞增殖<sup>[16]</sup>,可能调节细胞与基质蛋白的黏附。CXCR4 是 CXC 趋化因子 CXCL12/SDF-1 的受体,通过增加细胞内钙离子水平和促进 MAPK1/MAPK3 激活来传递信号<sup>[17]</sup>。作为细胞外泛素的受体,CXCR4 可增加细胞内钙离子水平和降低细胞 cAMP 水平。RPS6KB1 是 mTOR 信号通路的下游效应分子<sup>[18]</sup>,在

蛋白质合成、细胞增殖、细胞生长、细胞周期进程和细胞存活的调节中整合生长因子信号。原发性肝癌患者中出现 RPS6KB1 高表达,往往提示预后不良<sup>[19]</sup>。因此, NOTCH1、FN1、CXCR4、RPS6KB1 是 miR-139-5p 靶基因中的关键核心基因,对其进行研究,将是揭示 miR-139-5p 参与人骨肉瘤细胞表型的重要突破口。

本文解析了 miR-139-5p 的靶基因及其调控恶性表型的分子机制,为骨肉瘤分子标志物研究提供依据。此外,本文所建立的方法对于同类研究有一定的启示作用。

参考文献

[1] ZHOU L, MA X, YUE J, et al. The diagnostic effect of serum miR-139-5p as an indicator in osteosarcoma[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 23(4):561-567.

[2] WU J, ZHANG T, CHEN Y, et al. MiR-139-5p influences hepatocellular carcinoma cell invasion and proliferation capacities via decreasing SLITRK4 expression[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(5):BSR20193295.

[3] XIAO X H, ZHANG Y Q, PAN W N, et al. miR-139-mediated NOTCH1 regulation is crucial for the inhibition of osteosarcoma progression caused by resveratrol[J]. *Life Sci*, 2019, 242:117215.

[4] 赵玉果,陶海云,叶向阳,等. miR-139-5p 靶向 GPR56 抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的实验研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(24):4329-4333.

[5] FAN G T, HE Z W, CAO L L, et al. MiR-139 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting ROCK1[J]. *Front Biosci (Landmark edition)*, 2019, 24:1167-1177.

[6] WANG W K, LUO P, GUO W J, et al. LncRNA SNHG20 knockdown suppresses the osteosarcoma tumorigenesis through the mitochondrial apoptosis pathway by miR-139/RUNX2 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3):1927-1933.

[7] SHI Y K, GUO Y H. MiR-139-5p suppresses osteosarcoma cell growth and invasion through regulating DNMT1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2):459-466.

[8] GU Z H, HOU Z H, ZHENG L B, et al. Long noncoding

RNALINC00858 promotes osteosarcoma through regulating miR-139-CDK14 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2):1134-1140.

[9] XU W, HANG M, YUAN C Y, et al. MicroRNA-139-5p inhibits cell proliferation and invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor in human non-small cell lung cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4):3864-3870.

[10] LIU J H, LI C Y, YI J, et al. Tumor-suppressor role of miR-139-5p in endometrial cancer[J]. *Bio Med Central*, 2018, 18(1):51.

[11] 朱军义,郭哲,王双双,等. MiR-139-5p 通过靶向 NFAT 抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的生集落形成、侵袭和迁移[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(4):807-813.

[12] JIAO W P, ZHANG J Y, WEI Y Y, et al. MiR-139-5p regulates VEGFR and downstream signaling pathways to inhibit the development of esophageal cancer[J]. *Dig Liv Dis*, 2019, 51(1):149-156.

[13] 周畅,蒋裕芸,严莉,等. miR-139-5P 在胃癌中的表达及意义[J]. *广东医学*, 2015, 36(3):371-374.

[14] GHARAIBEH L, ELMADANY N, ALWOSAIBAI K, et al. Notch 1 in cancer therapy: possible clinical implications and Challenges[J]. *Mol Pharmacol*, 2020, 98(5):559-576.

[15] MASUKO K, MASARU K. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation(Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(2):279-297.

[16] ZOLLINGER A J, SMITH M L. Fibronectin, the extracellular glue[J]. *Matrix Biol*, 2017, 60:27-37.

[17] NANAOKO K, ZHANG T T, TOSHIO N. Involvement of CXCR4 in normal and abnormal development[J]. *Cells*, 2019, 8(2):185.

[18] SAVITHA S, ALAKANANDA B. Distinct roles of mTOR targets S6K1 and S6K2 in breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4):1199.

[19] LI P D, ZHANG W J, ZHANG M Y, et al. Overexpression of RPS6KB1 predicts worse prognosis in primary HCC patients[J]. *Medical Oncol*, 2012, 29(5):3070-3076.

(收稿日期:2021-04-16 修回日期:2021-09-30)