

• 基础研究 •

卵巢癌外泌体携运 miRNAs 调控葡萄糖代谢生物信息学分析

福建医科大学附属医院 福建省妇幼保健院 (福州 350001) 衣 欢 郑祥钦 宋建榕¹ 苏彦钊 吴花敏
林 蓉 徐鹭鹭² 黄湧彬²

【摘 要】 目的 研究卵巢癌外泌体的差异表达微小 RNA (miRNA) 和富集通路, 筛选诊治、预后判断分子标志物。**方法** 从高通量基因表达数据库 (GEO) 下载并分析获得在卵巢癌外泌体明显富集差异表达的 miRNA 基因数据集 (GSE) 76449。应用生物信息学和蛋白质谱分析方法, 筛选外泌体携运 miRNA 的靶向通路和预后靶标。**结果** 共筛选出 32 个外泌体富集差异表达 miRNAs, 基因本体 (GO) 和代谢途径分析数据库 (KEGG) 分析显示, 差异 miRNAs 基因主要富集在细胞氮化合物代谢功能以及鞘糖脂生物合成——乳酸和内酯系列和粘蛋白型 O-聚糖生物合成等信号通路, 预后分析发现 miRNA-337-3p 高表达、miRNA-6809-3p 预测靶基因 WNT3 低表达和共表达蛋白卷曲蛋白 4 基因 (FZD4)、干细胞生长因子 (HGF) 都与卵巢癌不良预后密切相关。**结论** 外泌体富集葡萄糖代谢相关 miRNAs 可能与卵巢癌发生发展有关, 可为卵巢癌的诊疗提供新思路。

【关键词】 卵巢癌; 生物信息学; 外泌体; 微小 RNA; 葡萄糖代谢; 分子标记物

【中图分类号】 R711.75 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)05-0117-03

Bioinformatics analysis of ovarian-cancer-secreted exosomal miRNAs regulating glucose metabolism YI Huan, ZHENG Xiangqin, SONG Jianrong, SU Yanzhao, WU Huamin, LIN Rong, XU Lulu, HUANG Yongbin. Fujian Provincial Maternity and Children's Hospital, Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To study differentially expressed miRNAs and enrichment pathways in exosomes derived from ovarian cancer and screen molecular markers for diagnosis, treatment and prognosis. **Methods** One set of exosomal miRNA expression profile data related to ovarian cancer (GSE76449) were downloaded from GEO database, then up-regulated miRNAs were obtained by differentially expressed analysis. The combination usage of bioinformatics and mass spectrometry were analyzed for functional annotation pathway and prognostic biomarkers. **Results** A total of 32 differentially expressed miRNAs were obtained. Based on the GO and KEGG function annotation, miRNA were mainly enriched in the function of cellular nitrogen compound metabolic process and the pathway of glycosphingolipid and mucin type O-glycan biosynthesis. By analyzing prognosis of network node, miR-337-3p were found to be upregulated. MiR-6809-3p predicted target gene WNT3 and coexpressed proteins including FZD4, HGF were all associated with the poor outcome of patients with ovarian cancer. **Conclusion** Exosomal miRNAs influenced glucose metabolism is related to the progress of ovarian cancer and provided new strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cancer.

【Key words】 ovarian cancer; bioinformatics; exosome; miRNA; glucose metabolism, biomarkers

卵巢癌恶性程度高, 全球约 4% 的女性死于卵巢癌, 每年有 225 000 例新发卵巢癌病例^[1-2]。由于卵巢癌异质性明显, 缺乏早期有效的分子标志物, 加上病理机制多样复杂, 导致近年预后改善不明显。研究发现血清中肿瘤源性外泌体 miRNA 与原发组织的 miRNA 相关性高^[3-4], 并具有调节葡萄糖代谢等功能, 可以成为无创性卵巢癌筛查、治疗及预后判断的利器^[5]。但是, 卵巢癌源性外泌体如何介导葡萄糖代谢机制不明确。本研究借助高通量基因表达数据库 (GEO) 卵巢癌外泌体 miRNA 芯片数据集、蛋白组学研究和生物信息学分析, 探讨卵巢癌发生过程中葡萄糖代谢与 miRNA 的调控关系, 以期对卵巢癌发病机制及治疗靶点的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 卵巢癌 miRNA 差异表达分析: 从 GEO 数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/)^[6] 下载卵巢癌 miRNA 表达谱数据库 (GSE76449), 包括 6 个卵巢癌细胞系样本 [HEYA8, HEYA8 _ MDR (多发耐药), A2780 _ PAR, A2780 _ CP20, SKOV3 _ ipl and SKOV3 _ TR 耐药)] 及其外泌体的 miRNA 表达谱, 均采用 miRNA 表达谱芯片 4.0 (美国昂飞公司) 进行测量。利用 GEO 2R 分析工具进行差异表达分析, log | Fold change | 值大于 0.58 且 $P < 0.05$ 为上调差异表达基因。

1.2 靶基因预测、功能注释和富集分析: 提取上调 miRNA, 使用 TarBase (version 7.0)、DIANA TOOLS 和

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2016J01430); 福建省卫生计生青年科研课题 (2016-1-16)

1 通信作者; 2 福建医科大学

STRING version 10.5^[6]进行 GO 和 KEGG 分析, 预测靶基因, 构建上调差异 miRNA-mRNA 功能注释、富集通路和蛋白相互作用网络图。

1.3 外泌体分离、鉴定和质谱分析: 按前期提取方法从两株卵巢癌细胞 (HO8910PM 和 OVCA429) 和 1 例高级别浆液性卵巢癌患者血清中提取、鉴定外泌体^[7]。有关人的研究经我院伦理委员会审批通过, 并取得患者的知情同意。质谱分析法 (MS)^[8]鉴定所得蛋白, STRING 蛋白网络分析共表达蛋白的相互作用, 筛选节点蛋白, GO 功能注释和 KEGG 通路分析。

1.4 预后分析: 利用医学癌症数据库 (TCGA, <http://tcga-data.nci.nih.gov>)^[5]分析靶基因在卵巢癌中预后表达情况。

2 结果

2.1 差异 miRNA 筛选和功能注释: 分析 GSE76449 卵巢癌细胞 miRNA 芯片数据发现, 与卵巢癌细胞相比, 卵巢癌源性外泌体有 32 个 miRNA 呈现明显富集表达 (图 1)。GO 聚类分析发现其在细胞氮化合物代谢处理和细胞器这两个功能区域富集明显。前者是细胞糖脂代谢、细胞功能的重要生物过程, 而细胞器则与外泌体组装、分泌密切相关。KEGG 功能分析则显示出 5 条富集通路, 其中 2 条通路显示与葡萄糖代谢有关: 鞘糖脂生物合成——乳酸和内酯系列 (包括 miR-1825, miR-6865-3p, miR-1246, miR-6514-3p, miR-4290 和 miR-5571-5p) 和粘蛋白型 O-聚糖生物合成 (包括 miR-1825, miR-6809-3p 和 miR-122-5p), 而 miR-1825 同时参与调控这两条通路。

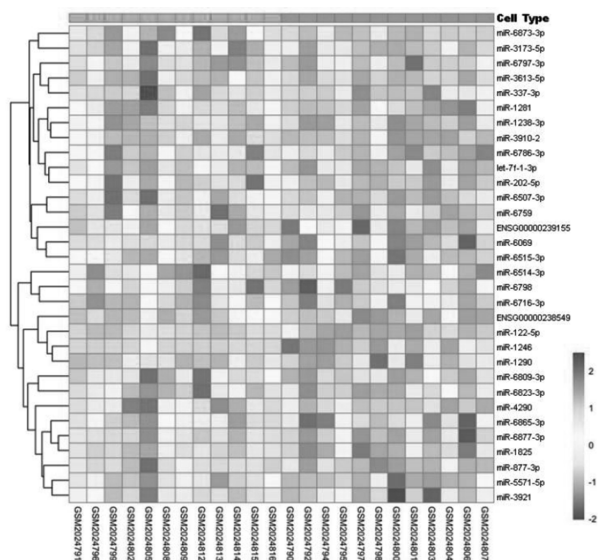
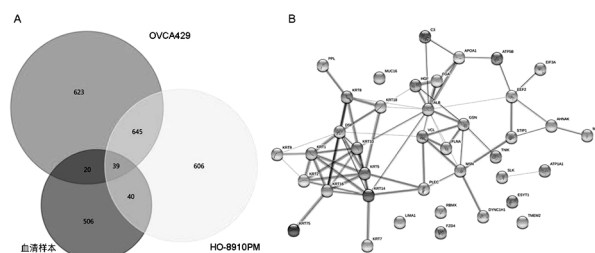


图 1 卵巢癌及其来源外泌体差异 miRNA 热图分析

2.2 差异 miRNA-mRNA 功能注释: 靶基因富集通路为肿瘤蛋白聚糖 ($P=3.04 \times 10^{-6}$), 涵盖 23 个 miRNA 的 92 个靶 mRNA。节点蛋白包括 HGF、有丝分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、FZD4、卷曲蛋白 3 受体 (FZD3)、扭曲蛋白 1 (TWIST1) 等等。

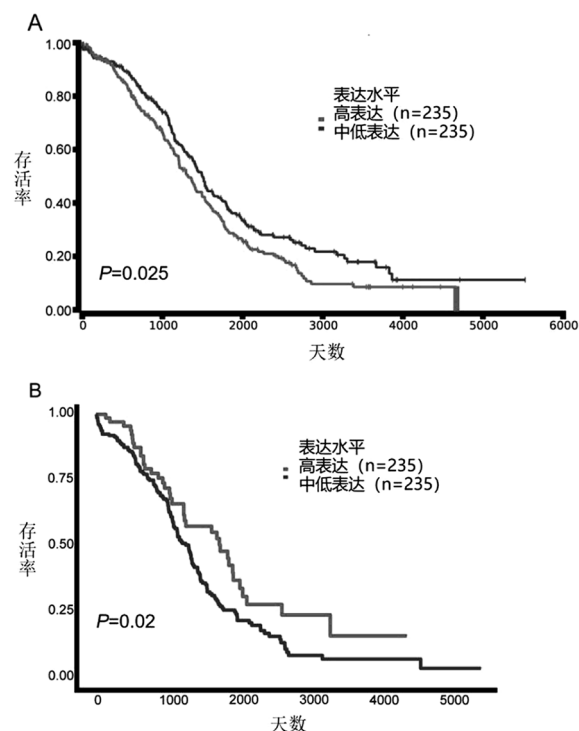
2.3 外泌体蛋白质谱分析: 超速离心所得的细胞外囊泡样

本, 形态符合外泌体双凹圆盘状结构, 电镜及纳米颗粒追踪分析仪显示其大小为 30~150 nm。外泌体 MS 分析、筛选卵巢高级别浆液性癌患者血清和卵巢癌细胞来源外泌体的共表达蛋白, Venn 图发现 39 个共表达蛋白 (图 2A), 蛋白相互作用见图 2B。与生物信息学分析结果一致, KEGG 通路研究发现这 39 个共表达蛋白仅仅富集在肿瘤蛋白聚糖通路上 ($P=0.016$)。因此, 通过两项不同分析策略得出 2 个相同共表达蛋白: HGF 和 FZD。



注: A, Venn 图分析共表达蛋白; B, 蛋白相互作用分析图

图 2 卵巢癌细胞系及卵巢癌病人血清外泌体蛋白质谱分析图



注: A, miR-337-3p 与卵巢癌预后呈负相关; B, miR-337-3p 的靶基因 WNT3 与卵巢癌预后呈正相关

图 3 TCGA 生存分析图

2.4 预后分析: 卵巢癌预后差, 我们利用 TCGA 卵巢癌数据库, 筛选前述结果所得葡萄糖代谢相关 miRNA、靶基因中与不良预后密切相关的对象。结果发现, miR-337-3p 高表达与卵巢癌不良预后密切相关 ($P=0.025$) (图 3A), miR-6809-3p 所预测的靶基因 WNT3 低表达也与卵巢癌不良预后密切相关 ($P=0.02$) (图 3B)。影响卵巢癌预后的节点蛋白包括: 肌球蛋白 (MYOF, $P=0.0042$), 角蛋白 7

(KRT7, $P=0.0028$), 角蛋白 5 (KRT5, $P=0.034$), 角蛋白 10 (KRT10, $P=0.048$), 鼠类肉瘤病毒癌基因同源物 B1 (BRAF, $P=0.026$), WNT3 ($P=0.02$), FZD4 ($P=0.016$), TWIST2 ($P=0.044$), 胰岛素样生长因子 (IGF1, $P=0.011$), HGF ($P=0.0051$) 和 TWIST1 ($P=0.007$)。

3 讨论

公共数据库生物信息学分析和 MS 筛选都是挖掘卵巢癌诊治、预后判断分子生物学靶标的重要途径, 两者互补利用有助于降低假阳性率, 有效发现诊治靶点。外泌体携带 miRNA 是新兴卵巢癌诊治生物学标志物。本实验通过挖掘 GEO 数据库中卵巢癌外泌体 miRNA 相关的芯片数据集, 分析差异表达 miRNA 基因, 进而通过 KEGG 通路、GO 生物功能富集以及靶基因预测和预后分析等方法对数据进行二次分析, 以期对卵巢癌发病机制及诊治靶点研究提供理论依据。本研究发现了外泌体富集 32 个 miRNA, 进一步分析筛选出调控鞘糖脂生物合成——乳酸和内酯系列和粘蛋白型 O-聚糖生物合成通路的 miRNAs。通过预测软件, 发现 miRNA-mRNA 主要富集于肿瘤蛋白聚糖通路, 揭示外泌体 miRNA 介导葡萄糖代谢调控卵巢癌发生发展的可能机制。另一方面, 鉴于外泌体 miRNA 通过调控 mRNA 翻译的蛋白起作用, 我们通过卵巢癌细胞系和患者血清来源外泌体上共表达蛋白 MS 分析, 发现 39 个共表达蛋白同样富集于肿瘤蛋白聚糖通路。通过两个筛选策略, 结果显示 miR-337-3p 高表达、miR-6809-3p 预测靶基因 WNT3 低表达和共表达蛋白 FZD4、HGF 都与卵巢癌不良预后密切相关, 以期作为卵巢癌诊断、治疗和预后判断靶点分子。

本实验研究发现外泌体富集 miRNAs 调控葡萄糖代谢等途径, 提示卵巢癌通过能量代谢调控肿瘤生长的机制。文献报道, 肠癌源性外泌体富集 miR-25-3p, 靶向调控内皮细胞可溶性血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2), 紧密连接蛋白-1 (ZO-1), 细胞间紧密连接蛋白 (occludin) 和组织中紧密连接蛋白 (Claudin5) 的表达, 从而形成有利于癌症转移的微环境^[9]。糖酵解中间产物如氨基酸、磷脂和核酸为恶性肿瘤供能, 肿瘤蛋白聚糖失调也有利于肿瘤侵袭转移的微环境。下调糖代谢基因后, 卵巢癌细胞的增殖、侵袭能力受到显著抑制。文献报道, 乳腺癌通过外泌体分泌 miR-122, 通过靶向抑制转移部位 PKM 来调控葡萄糖代谢^[10]。在软骨肉瘤中 miR-125b 下调导致糖原合成增加、乳酸生成增多; 在前列腺癌中, miR-205 表达上调促进细胞氧化磷酸化转换为糖酵解^[11]。预后分析显示, miR-337-3p 上调与卵巢癌不良预后相关。还有研究显示 miR-337-3p 失调将影响胃癌、子宫内膜癌恶性潜能^[12], 但是尚没有其与卵巢癌相关的研究数据。

本研究显示卵巢癌细胞外泌体上明显富集表达 miR-1825, 并且参与细胞氮化合物代谢处理、鞘糖脂生物合成和粘蛋白型 O-聚糖生物合成。已有研究发现 miR-1825 靶向调控盘状结构域受体 1 (DDR1), 后者参与上皮相关恶性肿瘤和胰岛素样生长因子-1 受体功能性交叉对话^[13]。miR-1825 高表达导致 DDR1 异常表达, 进而促进肿瘤生成。在前列腺癌研究中, miR-1825 高表达与前列腺癌不良预后相关, 并

且经抗肿瘤治疗后 miR-1825 水平明显下降。目前尚没有关于 miR-1825 与卵巢癌的相关性研究。

本研究重点介绍如何利用公共数据库结合蛋白组学方法筛选外泌体生物学标志物。我们发现 32 个差异的 miRNA 和 5 条功能富集通路, 从葡萄糖代谢角度为卵巢癌研究提供可能的代谢通路。然后通过预后分析, 我们捕获了卵巢癌预后的特异性指标, 有助于从肿瘤代谢角度提出改善卵巢癌不良预后的新思路。但是 miRNA-mRNA-蛋白网络之间存在复杂相互作用关系, 许多 miRNA 对卵巢癌发生发展作用不明确, 而且局限于公共数据库的样本有限, 未来需要更多基础实验和样本阐明机制。

参考文献

- [1] Itamochi H, Kigawa J. Molecular targeted therapies for epithelial ovarian cancer [J]. Nihon Rinsho, 2012, 70 (S4): 622-627.
- [2] Kroeger P J, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2017, 29 (1): 26-34.
- [3] Squadrito M L, Baer C, Burdet F, et al. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells [J]. Cell Rep, 2014, 8 (5): 1432-1446.
- [4] Taylor D D, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2008, 110 (1): 13-21.
- [5] Deng J L, Xu Y H, Wang G. Identification of Potential Crucial Genes and Key Pathways in Breast Cancer Using Bioinformatic Analysis [J]. Front Genet, 2019, 10: 695.
- [6] Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, et al. Functional micro RNA targets in protein coding sequences [J]. Bioinformatics, 2012, 28 (6): 771-776.
- [7] Yi H, Ye J, Yang X M, et al. High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (5): 5062-5070.
- [8] Yi H, Zheng X, Song J, et al. Exosomes mediated pentose phosphate pathway in ovarian cancer metastasis: a proteomics analysis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (12): 15719-15728.
- [9] Zeng Z, Li Y, Pan Y, et al. Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis [J]. Nat Commun, 2018, 9 (1): 5395.
- [10] Fong M Y, Zhou W, Liu L, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17 (2): 183-194.
- [11] Ippolito L, Marini A, Cavallini L, et al. Metabolic shift toward oxidative phosphorylation in docetaxel resistant prostate cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7 (38): 61890-61904.
- [12] Wang Z, Wang J, Yang Y, et al. Loss of has-miR-337-3p expression is associated with lymph node metastasis of human gastric cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32: 76.
- [13] Guo X, Han T, Hu P, et al. Five microRNAs in serum as potential biomarkers for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention [J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50 (12): 2193-2200.