

·生物信息学·

## 基于生物信息学筛选膀胱癌预后相关的 关键 miRNAs 并验证

邹震海,程 琪,李 中,刘贝贝,高五岳,孙 巍,郭园园,刘建民  
(蚌埠医学院第一附属医院泌尿外科,安徽 蚌埠 233004)

**摘要:**目的 筛选并分析与膀胱癌预后相关的关键 microRNAs(miRNAs)及其靶基因并进行实验验证。方法 从 TCGA 数据库中下载膀胱癌及正常组织的 miRNAs 数据及相应的预后信息;利用 edgeR 包、survival 包获取既存在表达差异又有 OS 临床预后意义的 miRNAs 分子;将优选的 miRNAs 进行临床相关性分析,得到关键 miRNAs。利用 3 大常用 miRNA 预测靶基因的数据库(miRDB、miR Walk、TargetScan)预测关键 miRNAs 的靶基因,采用 DAVID 数据库对靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。qRT-PCR 检测关键 miRNA 在膀胱癌细胞中的表达水平;通过转染过表达 T24 细胞中 miR-1307-5p 和 miR-944,检测细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡能力的变化。**结果** 从 TCGA 数据库中下载 418 例膀胱癌及 19 例正常对照的 miRNA 数据,共筛选出 293 个差异 miRNAs,高表达 224 个和低表达 69 个。通过单因素分析优选出与患者预后显著相关的 9 个 miRNAs 分子,进一步分析出与患者临床病理信息密切相关的 2 个 miRNA,分别为 miR-1307-5p 和 miR-944。GO 和 KEGG 分析显示,这些 miRNAs 的靶基因主要与细胞内的细胞质、细胞器以及金属阳离子的结合有关,并且参与了多种与致癌相关的信号通路。qRT-PCR 分析显示,miR-944 在膀胱癌细胞中的表达下调( $P<0.05$ ),miR-1307-5p 的表达水平无明显变化( $P>0.05$ );过表达 miR-944 可抑制膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡,但过表达 miR-1307-5p 后膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡无明显变化。**结论** 基于生物信息学分析获得具有重要临床意义的 2 个关键 miRNAs 分子,分别是 miR-1307-5p 和 miR-944,其中 miR-944 可以抑制膀胱癌细胞的生物行为,可能作为膀胱癌潜在的治疗靶点。

**关键词:**膀胱肿瘤;miRNA;生物信息学;miR-944

中图分类号:R737.14

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.22.001

文章编号:1006-1959(2022)22-0001-08

### Screening and Verification Key miRNAs Related to Prognosis of Bladder Cancer based on Bioinformatics

ZOU Zhen-hai, CHENG Qi, LI Zhong, LIU Bei-bei, GAO Wu-yue, SUN Wei, GUO Yuan-yuan, LIU Jian-min

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui, China)

**Abstract: Objective** To screen and analyze the key microRNAs (miRNAs) and their target genes related to the prognosis of bladder cancer, and carry out experimental verification. **Methods** The miRNAs data of BLCA and normal tissues and the corresponding prognosis information were downloaded from TCGA database. Use edgeR package and survival package to obtain miRNAs molecules with both expression differences and clinical prognostic significance of OS; clinical correlation analysis of the preferred miRNAs was carried out to obtain the key miRNAs. Three commonly used databases (miRDB, miRWalk and TargetScan) were used to predict the target genes of key miRNA, and DAVID database was used for GO and KEGG enrichment analysis of the target genes. The expression level of key miRNA in bladder cancer cells was detected by qRT-PCR. By transfecting the expression of miR-1307-5p and miR-944 in the overexpressed T24 cells, the changes of cell proliferation, migration, invasion and apoptosis were detected. **Results** A total of 418 cases of bladder cancer and 19 normal controls were downloaded from TCGA database, and 293 differential miRNAs were screened, of which 224 were highly expressed and 69 were low expressed. Through single factor analysis, nine miRNAs molecules which were significantly related to the prognosis of patients were selected, and two miRNAs which were closely related to the clinicopathological information of patients were further analyzed, namely miR-1307-5p and miR-944. GO and KEGG analysis showed that the target genes of these miRNAs were mainly related to the combination of cytoplasm, organelles and metal cations in cells, and participated in a variety of signal pathways related to carcinogenesis. The results of qRT-PCR showed that the expression of miR-944 in bladder cancer cells was significantly down-regulated ( $P<0.05$ ), but the expression level of miR-1307-5p had no significant change ( $P>0.05$ ). Over-expression of miR-944 could inhibit the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells and promote apoptosis, but over-expression of miR-1307-5p had no obvious changes in the proliferation, migration, invasion and apoptosis of bladder cancer cells. **Conclusion** Based on bioinformatics analysis, two key miRNAs molecules with important clinical significance are obtained, namely miR-1307-5p and miR-944. miR-944 can inhibit the biological behavior of bladder cancer cells, and may be a potential therapeutic target for bladder cancer.

**Key words:** Bladder cancer; miRNA; Bioinformatics; miR-944

基金项目:1.国家自然科学基金项目(编号:81702495);2.安徽省卫健委科研项目重点项目(编号:AHWJ2021a007);3.蚌埠医学院研究生创新计划项目(编号:Byycx21074)

作者简介:邹震海(1997.2-),男,江苏盐城人,硕士研究生,主要从事泌尿系统肿瘤临床和基础研究

通讯作者:刘建民(1963.7-),男,安徽亳州人,硕士,主任医师,主要从事泌尿系统肿瘤临床和基础研究

膀胱癌(bladder cancer)是泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一。吸烟、遗传因素以及接触芳香胺和其它工业化学品被认为是膀胱癌发生发展的原因<sup>[1]</sup>。在所有新诊断的病例中,75%表现为非肌肉浸润性膀胱癌(NMIBC),25%表现为肌肉浸润性膀胱癌(MIBC)<sup>[2]</sup>。对于MIBC患者,转移的发生更加频繁,预后更差,大约有50%的可能发展为转移性疾病,其平均生存时间为14~15个月<sup>[3]</sup>,且没有针对这些患者的治愈性治疗选择。因此,进一步研究驱动膀胱癌进展的分子机制和确定潜在的治疗靶点具有重要意义。微小核糖核酸(miRNAs)是一种小的非编码核糖核酸,长度在21~25个核苷酸不等<sup>[4]</sup>。目前发现miRNAs参与了哺乳动物基因组中超过50%的mRNA的调控<sup>[5]</sup>。miRNAs主要通过与其特定目标mRNA的3'-非翻译区(3'-UTR)的碱基配对来调控基因转录,从而导致基因表达量的改变<sup>[6]</sup>。单个miRNA能够沉默多个基因的表达,反过来,一个基因可以被多个miRNA调控<sup>[7]</sup>。目前,多种miRNAs已经被证实能够对膀胱癌细胞的生物学功能产生影响,包括细胞的增殖、侵袭、迁移和凋亡<sup>[8,9]</sup>。新一代测序(NGS)技术的快速发展和癌症基因组图谱(TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>)数据库的建立,产生了许多大规模的癌症基因组数据集,为利用生物信息学分析来预测相关的肿瘤生物标志物提供了基础。本研究通过从TCGA数据库中获取膀胱癌患者的miRNAs数据及相应的预后信息,筛选出有重要预后价值的关键miRNAs行下游靶基因的预测以及GO和KEGG通路分析,并通过实验进行验证,以期对膀胱癌的靶向治疗提供新思路,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 生物信息学资料来源 从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)中共下载418例膀胱癌(BLCA)及19例正常对照的miRNA数据及相应的临床病理特征及生存信息。临床病理特征包括:年龄、性别、分级、分期以及T分期。

1.1.2 材料及试剂 正常人尿路上皮细胞系SV-HUC-1以及膀胱癌细胞系T24来源于中国科学院上海细胞库;RPMI-1640培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗和胰酶购自美国Gibco公司;脂质体转染试剂Lipo2000、TRIzol、PowerUp SYBR Green Master MIX PCR试剂盒购自美国Thermo Fish公司;miR-NC、miR-944 mimics和miR-1307-5p mimics均由上海吉玛公司设计并合成。miR-944 mimics序列:正义5'-AAAUUAUUGUACAUCGGAUGAG-3'、反义5'-CAUCCHAUGUACAAUAAUUUUU-3';MiR-1307-5p inhibitor序列:正义5'-UCGACCG-

GACCUCGACCGGCU-3'、反义5'-CCGGUCGAG-GUCCGGUCGAUU-3'。

### 1.2 方法

1.2.1 差异miRNAs的获取 利用R软件(v3.5.2)中edgeR包计算差异表达的miRNAs,筛选条件: $\log_2$ -FoldChange=1,  $P_{adj}=0.05$ 。利用Plot函数及Pheatmap包分别绘制火山图及热图。

1.2.2 与总生存期相关的miRNAs获取 从TCGA数据库中下载BLCA患者的临床生存等病理信息,基于上述差异表达的miRNAs列表,利用survival包进行Kaplan-Meier单因素生存分析的方法绘制不同miRNAs高低表达的生存曲线。

1.2.3 miRNAs与临床病理信息之间的相关性分析 将优选miRNAs与患者5个临床性状进行相关性分析(年龄、性别、分级、分期以及T分期),利用t或Kruskal检验,将miRNAs表达量按临床性状分别分为两组,得到相关性分析结果的列表。

1.2.4 预测miRNAs靶基因及GO和KEGG分析 利用3大常用的miRNA预测靶基因的数据库(miRDB、miRWalk、TargetScan)预测相应的靶基因,两个及以上的数据库都预测到的靶基因作为下一步GO和KEGG通路分析的基因,并绘制相应的韦恩图。通过DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对预测的靶基因进行GO和KEGG通路分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义;其中GO分析包括生物过程、细胞组成和分子功能。

1.2.5 细胞培养及转染 正常人尿路上皮细胞系SV-HUC-1,以及膀胱癌细胞系T24细胞置于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养。培养箱条件37℃、5% CO<sub>2</sub>。当细胞处于对数生长期时,0.25%胰酶消化传代,每2 d换液或传代1次。在其生长状态良好时,将T24细胞接种于6孔板中,生长至60%融合度,按照Lipofectamine 2000试剂说明书,将miR-NC、miR-944 mimics和miR-1307-5p mimics转染入细胞。

1.2.6 CCK8细胞增殖实验 将转染后的T24细胞接种于96孔板中,分别培养24、48、72 h后,每孔加入10  $\mu$ l CCK8溶液,避光,37℃条件下孵育1 h,酶标仪检测细胞在450 nm处的吸光度值(OD450 nm值)。

1.2.7 Transwell小室法 细胞侵袭实验中,上室制备Matrigel胶后,将细胞加入无血清培养基中,吸取100  $\mu$ l加入上室。下室加入含20%胎牛血清的RPMI-1640培养基。37℃恒温培养箱中培养24 h后,轻轻去除上室中的细胞和Matrigel胶,用4%多聚甲醛固定30 min后结晶紫染色,显微镜下拍照并分析。细胞迁移实验中,Transwell上室不加入Matrigel胶,其余步骤同细胞侵袭实验。

**1.2.8 流式细胞术** 收集转染后的细胞,取 5~10 万重悬的细胞,1000 g 离心 5 min,弃上清。加入 PBS 重悬后,1000 g 离心 5 min,以 195  $\mu$ l Annexin V-FITC 结合液重悬细胞。加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC、10  $\mu$ l 碘化丙啶染色液,混匀后室温孵育 10~20 min,流式上机检测。

**1.2.9 总 RNA 提取及 qRT-PCR** 根据说明书,使用 Trizol 试剂从细胞中分离总 RNA,将 RNA 逆转录成互补脱氧核糖核酸 (cDNA),PowerUp SYBR Green Master MIX PCR 试剂盒用于测定 miRNA (U6 作为内参基因)的表达水平。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法用于计算目的基因的相对表达量。使用 Primer 5.0 设计引物,见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
MiR-1307-5p-F	CGTCGACCGACCTCGAC
MiR-944-F	GCGCGAAATTATTGTACATCG
U6-F	CGCTTCGGCAGCACATATACTAA
Universal Micro-R	AGTGCAGGTCCGAGGTATT

**1.3 统计学方法** 基因表达数据通过  $\log_2$  转换标准化,使用 R 软件 3.6.2 和 Perl 语言包构建图,另使用 SPSS 22.0 统计学软件和 GraphPad Prism9 进行实验数据分析处理,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用  $t$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 膀胱癌差异 miRNAs 的筛选结果** 通过对从 TCGA 数据库中共下载的 418 例膀胱癌及 19 例正

常对照的 miRNA 数据进行分析,共筛选出 293 个差异表达的 miRNAs,其中高表达 224 个,低表达 69 个,绘制火山图见图 1。

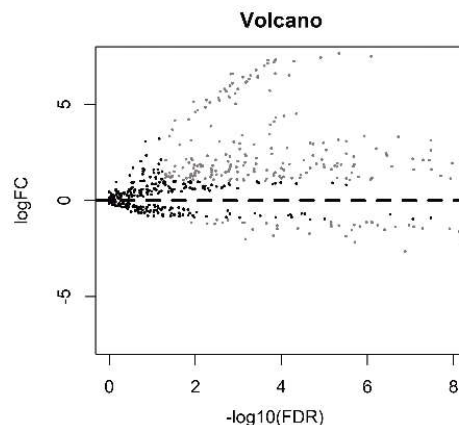


图 1 差异表达 miRNAs 的火山图

**2.2 差异表达的 miRNAs Kaplan-Meier 单因素生存分析** 基于上述 293 个差异表达的 miRNAs,利用 survival 包进行 Kaplan-Meier 单因素生存分析的方法绘制不同 miRNAs 高低表达的生存曲线,共得到 65 个 OS 生存曲线中  $P$  值 $<0.05$  的 miRNAs,根据  $P$  值大小,选择表现出重要预后价值的前 9 个 miRNA (图 2)。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,miR-502b-3p、miR-1307-5p、miR-1910-5p、miR-944 的高表达和 miR-483-5p、miR-483-3p、miR-615-3p、miR-217-5p、miR-708-3p 的低表达将有利于膀胱癌的预后。

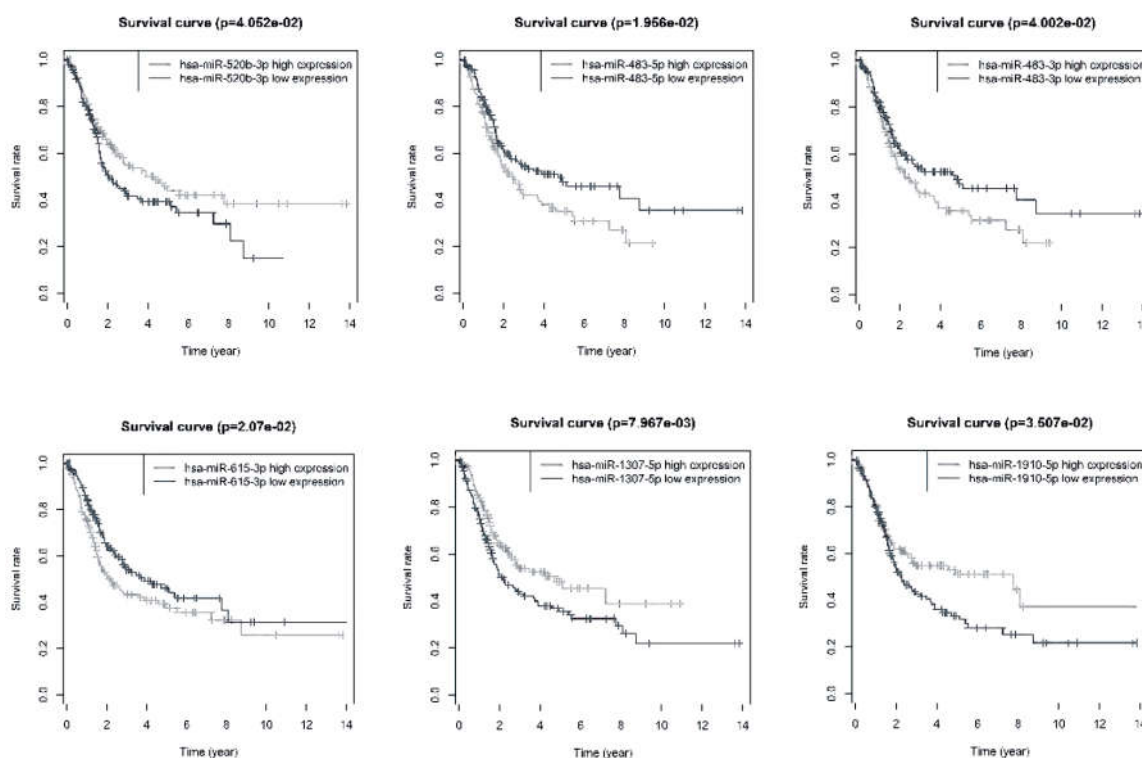


图 2 9 种 miRNAs 的 OS 生存曲线图

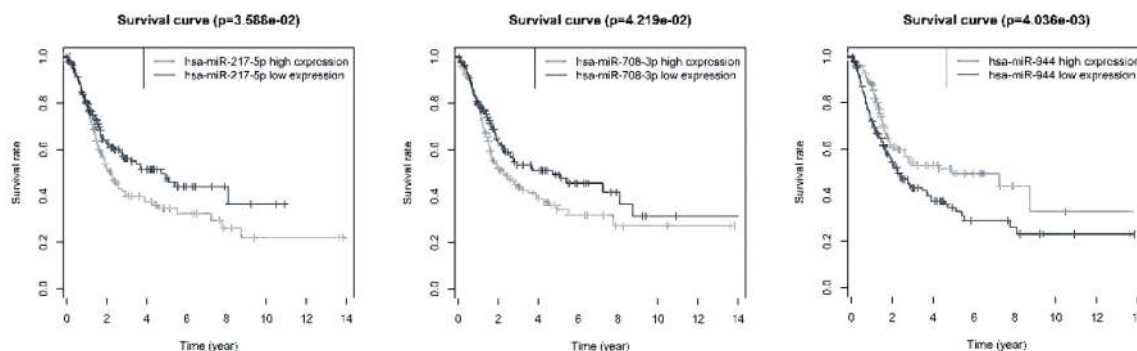


图2 9种 miRNAs 的 OS 生存曲线图(续)

2.3 miRNAs 与临床病理信息之间的相关性分析 将优选的9个 miRNAs 与患者5个临床性状进行相关性分析(年龄、性别、分级、分期以及T分期),利用 Kruskal 检验,将9个 miRNAs 表达量按临床性状分别分为两组,并得到相关性分析结果的列表(表2)。根据  $P$  值,共有2种 miRNA 与膀胱癌的临床病理信息相关,分别是 miR-1307-5p 和 miR-944,其中 miR-1307-5p 与患者年龄、分级、分期以及T分期相关,miR-944 与患者分级、分期以及T分期相关

( $P < 0.05$ )。

2.4 差异表达的关键 miRNAs 靶基因的预测分析 利用3大常用 miRNA 预测靶基因的数据库(miRDB、miRWalk、TargetScan)预测相应的靶基因,两个及以上的数据都预测到的靶基因作为下一步 GO 和 KEGG 通路分析的基因,去除9个重复的基因,总共留下1669个靶基因用于进一步的 GO 和 KEGG 通路分析,并绘制相应的韦恩图,见图3。

表2 膀胱癌中优选的9个 miRNAs 的相关性分析结果

miRNA	年龄		性别		分级		分期		T分期	
	$r$	$P$	$r$	$P$	$r$	$P$	$r$	$P$	$r$	$P$
hsa-miR-1307-5p	-3.186	0.002	-1.750	0.082	-5.833	7.548e-06	2.968	0.003	2.455	0.015
hsa-miR-944	0.469	0.639	1.530	0.128	-2.475	0.020	2.482	0.014	2.365	0.019
hsa-miR-483-5p	-0.642	0.521	0.014	0.989	-2.291	0.033	1.582	0.115	1.327	0.185
hsa-miR-1910-5p	0.259	0.796	0.645	0.520	0.319	0.751	1.494	0.136	2.527	0.012
hsa-miR-708-3p	1.022	0.308	1.912	0.058	1.141	0.265	-1.204	0.230	-1.440	0.151
hsa-miR-483-3p	-0.442	0.659	-0.597	0.551	-2.657	0.015	1.057	0.292	1.125	0.261
hsa-miR-217-5p	1.051	0.294	1.023	0.309	0.854	0.394	-1.008	0.314	-0.979	0.329
hsa-miR-615-3p	0.55	0.583	1.794	0.075	2.284	0.030	-1.002	0.317	-0.457	0.648
hsa-miR-520b-3p	0.982	0.327	0.376	0.707	1.548	0.123	-0.345	0.730	0.813	0.417

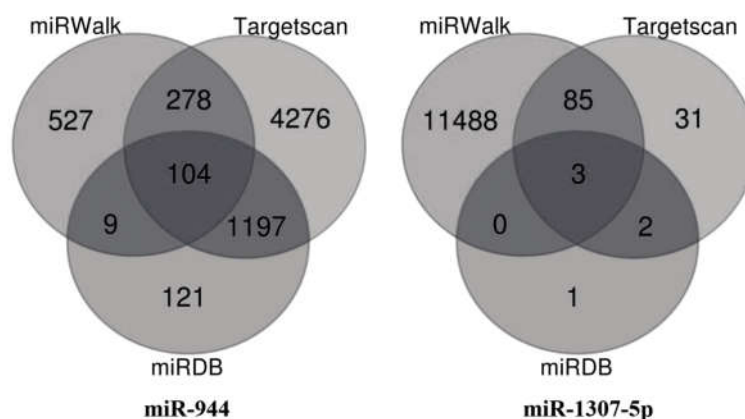


图3 3大 miRNA 靶基因数据库预测的靶基因

2.5 预测靶基因的 GO 和 KEGG 通路分析 通过 DAVID 数据库对预测的靶基因进行 GO 和 KEGG 通路分析,GO 分析显示,预测的靶基因在生物过程中主要富集于神经系统发育、多细胞生物发育、解剖结构发育、单细胞-多细胞生物过程和发育进程,细胞组成中主要富集于细胞内、细胞内成分、细胞器、细胞内细胞器和细胞质,分子功能中主要富集于离子结合、阳离子结合、金属离子结合、转移酶活性和蛋白质丝氨酸,见表 3;KEGG 通路分析显示,预测的靶基因主要富集于长寿通路、mTOR 信号通路和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等通路中,见表 4、图 4。

2.6 miR-944 和 miR-1307-5p 在膀胱癌细胞中的表达水平 与正常尿路上皮细胞 SV-HUC-1 相比,膀

胱癌 T24 细胞中 miR-944 的表达水平下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 miR-1307-5p 的表达水平无变化( $P>0.05$ ),见图 5。

2.7 过表达 miRNA 对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响 CCK8 增殖实验显示,与 mimics-NC 组相比,miR-944 mimics 组的 T24 细胞的增殖能力减弱,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 6A;Transwell 迁移和侵袭实验显示,miR-944 mimics 组的 T24 细胞的迁移和侵袭能力均减弱,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 6B;流式细胞术分析显示,miR-944 mimics 组的 T24 细胞凋亡增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但过表达 miR-1307-5p 后膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡无明显变化,见图 6C。

表 3 排名前 5 位的 miRNA 靶基因的 GO 功能富集分析

项目	基因集名称	基因数目	P	校正后的 P
生物过程	nervoussystem development	309	4.20E-17	3.70E-13
	multicellular organism development	590	3.70E-15	1.60E-11
	anatomical structure development	628	2.40E-14	7.20E-11
	single-multicellular organism process	681	4.70E-14	1.00E-10
	developmental process	661	7.40E-14	1.20E-10
细胞组成	intracellular	1364	1.50E-17	1.10E-14
	intracellular part	1363	2.10E-17	1.10E-14
	organelle	1288	1.60E-13	4.80E-11
	intracellular organelle	1221	1.80E-13	4.80E-11
	cytoplasm	1092	5.00E-13	9.10E-01
分子功能	ion binding	634	3.00E-08	5.30E-05
	cation binding	451	1.50E-07	1.40E-04
	metal ion binding	441	3.30E-07	2.00E-04
	transferase activity	260	3.60E-06	1.60E-03
	protein serine	65	7.10E-06	2.60E-03

表 4 排名前 10 位的 miRNA 靶基因的 KEGG 信号通路富集分析

通路名称	基因数量	P	校正后的 P
Longevity regulating pathway	75	7.60e-18	2.38e-15
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	46	8.89e-13	1.39e-10
mTOR signaling pathway	37	1.63e-12	1.70e-10
Longevity regulating pathway - multiple species	45	6.51e-10	5.10e-8
Inflammatory mediator regulation of TRP channels	31	1.08e-9	6.75e-8
Inositol phosphate metabolism	22	2.58e-9	1.18e-7
Glioma	28	2.63e-9	1.18e-7
Autophagy-animal	26	2.07e-8	8.09e-7
Apelin signaling pathway	25	3.02e-8	9.57e-7
FoxO signaling pathway	30	6.58e-8	1.59e-6

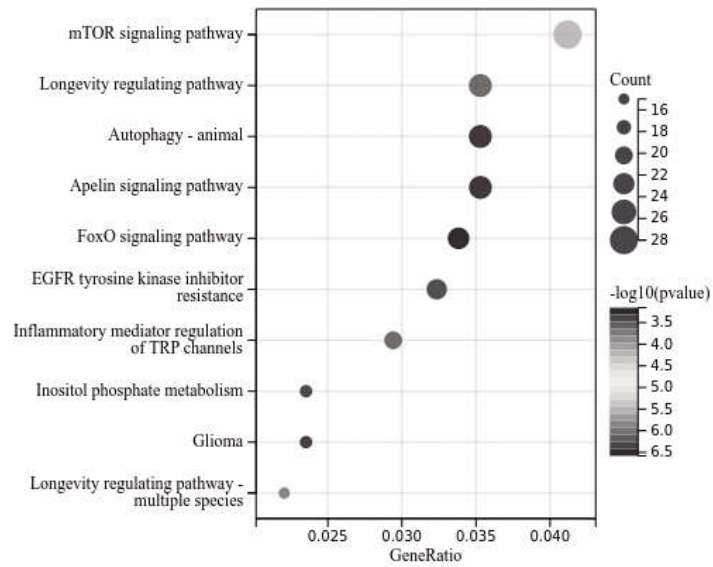


图 4 miRNA 靶基因的 KEGG 信号通路分析

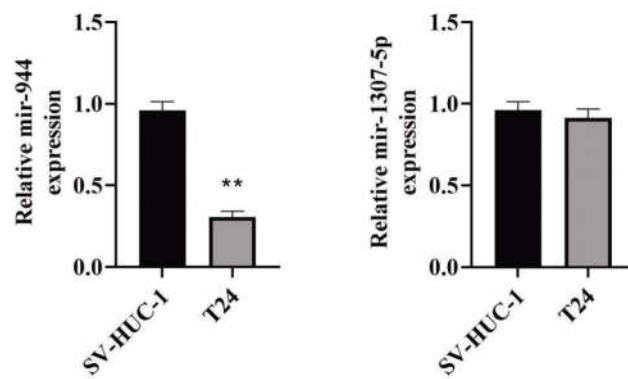
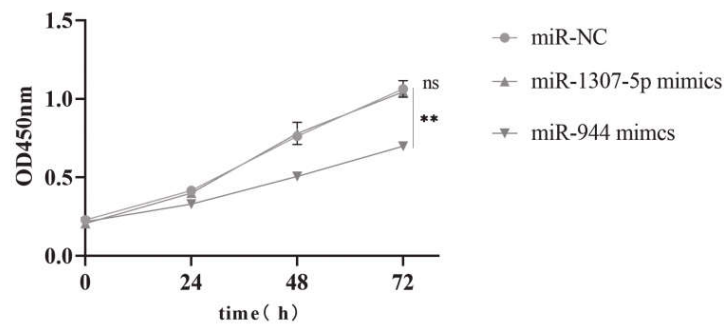
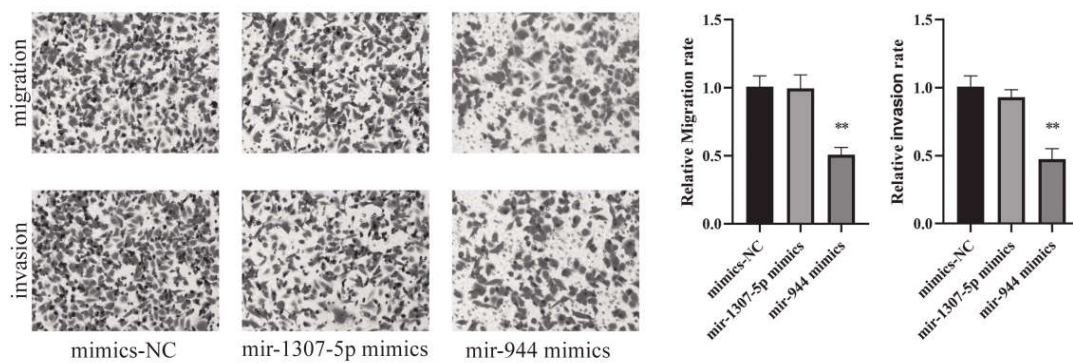
注: \*\* $P < 0.05$ 

图 5 miR-944 和 miR-1307-5p 在膀胱癌细胞中的表达水平



A



B

注: \*\* $P < 0.05$ 

图 6 miR-1307-5p 和 miR-944 对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响



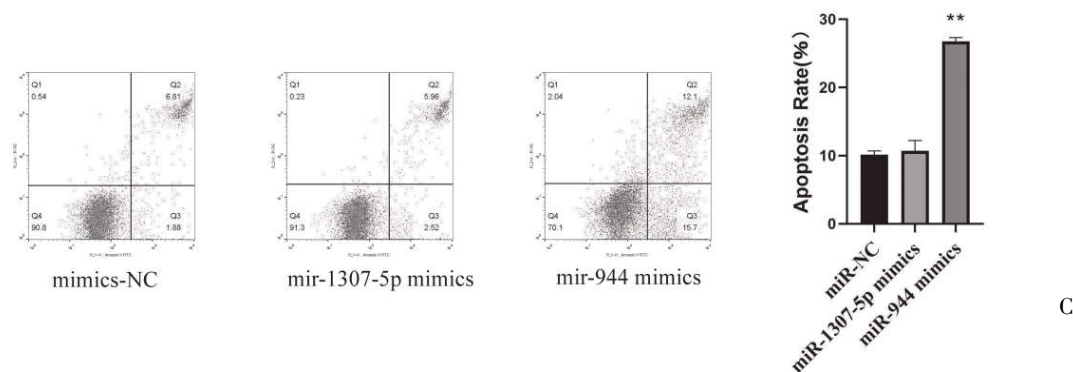
注: \*\* $P < 0.05$ 

图 6 miR-1307-5p 和 miR-944 对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响(续)

### 3 讨论

膀胱癌是全球第 9 大常见的恶性肿瘤,每年大约有 356 000 例新增病例和 145 000 例死亡病例,具有复发倾向,需要在诊断后终生监测<sup>[10,11]</sup>。miRNAs 是一类短的非编码 RNA,能够与目标 mRNA 上的互补序列结合,通过抑制蛋白质的翻译或增加 mRNA 的降解来诱导基因沉默<sup>[12]</sup>。目前 miRNAs 的异常表达已被证明与多种人类疾病有关<sup>[13]</sup>。Yin Z 等<sup>[14]</sup>研究发现,miR-96-5p 能够负性调控抑癌基因 FOXO3,促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭,从而发挥促癌作用。Chen Y 等<sup>[15]</sup>研究证明,miR-148a 通过靶向 Wnt1 抑制肺癌细胞的迁移和侵袭,这可能为肺癌转移的分子机制提供新的思路。然而,还有许多 miRNA 在膀胱癌中发挥着抑癌或促癌的作用,其功能和机制仍需进一步研究。因此,本研究对 TCGA 数据库中下载的 418 例膀胱癌患者及 19 例正常对照的 miRNAs 数据进行生物信息学分析,利用 R 软件中 edgeR 包获取差异表达的 miRNAs,共筛选出 293 个差异表达的 miRNAs,其中高表达 224 个,低表达 69 个。再利用 survival 包进行 Kaplan-Meier 单因素生存分析,选择表现出重要预后价值的前 9 个 miRNAs,最后通过临床病理信息的相关性分析得到 2 个密切相关的 miRNAs,分别是 miR-1307-5p 和 miR-944。

研究表明<sup>[16]</sup>,miR-1307-5p 和 miR-944 与肿瘤的发生发展均密切相关。miR-1307-5p 是通过修饰 miR-1307 前体的 5' 端粒获得的一种成熟体 miRNA,其可通过靶向 ING5 的表达来提高卵巢癌细胞的化疗耐药性。Du X 等<sup>[17]</sup>通过一系列体内外实验表明,miR-1307-5p 也能够促进肺腺癌增殖,该作用机制是通过靶向 TRAF3 上调 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路实现的。miR-944 最早通过 miRNAs 克隆法在人宫颈细胞中鉴定获得<sup>[18]</sup>,该 miRNA 位于肿瘤蛋白 p63(TP63)

基因的内含子中,定位于人 3q28 染色体上<sup>[19]</sup>。miR-944 的异常表达在人类恶性肿瘤中发挥抑癌或致癌的作用。研究表明<sup>[20]</sup>,miR-944 在结直肠癌患者中的表达水平显著降低,并且通过靶向下游调节因子 MACC1 抑制结直肠癌细胞的迁移和侵袭,这表明 miR-944 可能在结直肠癌中发挥抗转移作用。但 miR-944 在宫颈癌中又显著过表达,并通过靶向 HECT 结构域连接酶 W2(HECW2)和 S100P 结合蛋白(S100PBP)促进细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[21]</sup>。然而,在膀胱癌中,这两种 miRNAs 的具体作用有待进一步的验证。

为了更深入地了解这 2 种 miRNAs 的分子机制,3 大常用 miRNA 预测靶基因的数据库(miRDB、miRWalk、TargetScan)被用于预测相应的靶基因并利用 DAVID 数据库对预测的靶基因进行了 GO 富集和 KEGG 通路分析。GO 分析显示,预测的靶基因在生物过程中主要富集于神经系统发育、多细胞生物发育、解剖结构发育、单细胞-多细胞生物过程和发育进程,细胞组成中主要富集于细胞内、细胞内成分、细胞器、细胞内细胞器和细胞质,分子功能中主要富集于离子结合、阳离子结合、金属离子结合、转移酶活性和蛋白质丝氨酸;KEGG 通路分析显示,预测的靶基因主要富集于长寿通路、mTOR 信号通路和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等通路中。以上结果说明这两种 miRNA 可能通过影响膀胱癌细胞内的细胞质和细胞器的功能以及干扰金属阳离子等其他物质的结合发挥相应的作用。最后,相关分子生物学技术和细胞实验进一步验证了生物信息学分析的结果,qRT-PCR 分析显示 miR-944 在膀胱癌细胞中的表达水平下调,而 miR-1307-5p 的表达水平无明显差异。同时,细胞功能学实验也证实了 miR-944 对膀胱癌细胞生物行为的抑制作用,这与上述

qRT-PCR的结果一致。

总之,本研究利用来自TCGA数据库中膀胱癌患者的miRNAs数据和预后信息,分析了膀胱癌组织和正常膀胱上皮组织之间的miRNAs表达以及各项临床病理数据,获得了2种异常表达的miRNAs。通过进一步的分析,预测了miRNAs的下游靶基因和靶基因富集的信号通路,最后进行相关实验验证后发现miR-944有潜力成为预测膀胱癌诊断、治疗和预后的一种新的生物标志物。

#### 参考文献:

- [1]Antoni S,Ferlay J,Soerjomataram I,et al.Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends[J].Eur Urol,2017,71(1):96-108.
- [2]Siegel RL,Miller KD,Jemal A.Cancer statistics,2016[J].CA Cancer J Clin,2016,66(1):7-30.
- [3]Mari A,Campi R,Tellini R,et al.Patterns and predictors of recurrence after open radical cystectomy for bladder cancer: a comprehensive review of the literature[J].World J Urol,2018,36(2):157-170.
- [4]Homami A,Ghazi F.MicroRNAs as biomarkers associated with bladder cancer[J].Med J Islam Repub Iran,2016,30:475.
- [5]Friedman RC,Farh KK,Burge CB,et al.Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J].Genome Res,2009,19(1):92-105.
- [6]Bagga S,Bracht J,Hunter S,et al.Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation[J].Cell,2005,122(4):553-563.
- [7]Romero-Cordoba SL,Salido-Guadarrama I,Rodriguez-Dorantes M,et al.miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer[J].Cancer Biol Ther,2014,15(11):1444-1455.
- [8]王必佳,李浩诣,周振华,等.miR-26a通过促进KLF9的转录表达抑制胶质瘤侵袭能力[J].山西医科大学学报,2022,53(1):26-31
- [9]Feng Y,Kang Y,He Y,et al.microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer[J].BMC Urol,2014,14:50.
- [10]Martinez Rodriguez RH,Buisan Rueda O,Ibarz L.Bladder cancer: Present and future [J].Med Clin (Barc),2017,149(10):449-455.
- [11]Li Z,Lin C,Zhao L,et al.Oncogene miR-187-5p is associated with cellular proliferation,migration,invasion,apoptosis and an increased risk of recurrence in bladder cancer [J].Biomed Pharmacother,2018,105:461-469.
- [12]Bartel DP.MicroRNAs: genomics,biogenesis,mechanism,and function[J].Cell,2004,116(2):281-297.
- [13]Alvarez-Garcia I,Miska EA.MicroRNA functions in animal development and human disease [J].Development,2005,132(21):4653-4662.
- [14]Yin Z,Wang W,Qu G,et al.MiRNA-96-5p impacts the progression of breast cancer through targeting FOXO3[J].Thorac Cancer,2020,11(4):956-963.
- [15]Chen Y,Min L,Ren C,et al.miRNA-148a serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through Wnt1 in non-small cell lung cancer [J].PLoS One,2017,12(2):e0171751.
- [16]Chen WT,Yang YJ,Zhang ZD,et al.MiR-1307 promotes ovarian cancer cell chemoresistance by targeting the ING5 expression[J].J Ovarian Res,2017,10(1):1.
- [17]Du X,Wang S,Liu X,et al.MiR-1307-5p targeting TRAF3 upregulates the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway and promotes lung adenocarcinoma proliferation[J].Cancer Cell Int,2020,20:502.
- [18]Lui WO,Pourmand N,Patterson BK,et al.Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer[J].Cancer Res,2007,67(13):6031-6043.
- [19]Schmitz M,Driesch C,Jansen L,et al.Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer[J].PLoS One,2012,7(6):e39632.
- [20]Ji J,Peng Y,Niu T,et al.miR-944 inhibits cell migration and invasion by targeting MACC1 in nasopharyngeal carcinoma [J].Int J Clin Exp Pathol,2018,11(3):1167-1174.
- [21]李新菊,宋宇,王学玲.miR-944靶向调控S100BPB基因促进宫颈癌细胞迁移和侵袭的机制探讨[J].现代肿瘤医学,2019,27(7):1122-1127.

收稿日期:2022-05-12;修回日期:2022-05-23

编辑/杜帆