

基于生物信息学筛选食管鳞状细胞癌生物标志物*

文婷¹ 罗茂² 康敏¹

(1. 西南医科大学附属医院消化内科, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学药物研究中心, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 应用生物信息学筛选食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中差异表达的 microRNA (miRNA) 并预测其靶基因, 分析生物学功能。方法 收集西南医科大学附属医院 2021 年 6 月—2022 年 2 月期间的 20 对食管鳞状细胞癌组织和癌旁正常配对组织标本。通过 GEO 数据库下载 ESCC miRNA 表达谱芯片数据, 利用 R 软件 limma 包进行归一化, 筛选差异表达 miRNA; 利用在线工具 Kaplan-meier Plotter 对差异表达 miRNA 进行生存分析。通过 qRT-PCR 验证与生存率相关的差异 miRNA 在 ESCC 组织中的表达; 利用 TargetScan 和 miRDB 预测靶基因, 应用 DAVID 对靶基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析; 通过 STRING 和 Cytoscape 构建 PPI 网络鉴定核心基因并构建 miRNA-mRNA 网络图; 最后利用 UALCAN 评估核心基因在食管癌中的表达。结果 与癌旁正常组织相比, hsa-miR-93、hsa-miR-130b、hsa-miR-18a、hsa-miR-23b 在 ESCC 组织中表达上调; 而 hsa-miR-1、hsa-miR-133b、hsa-miR-378a 在 ESCC 组织中表达下调。其中 3 种下调 miRNA 在 ESCC 组织中的表达较癌旁正常组织有显著差异($P < 0.01$)。核心基因 HNRNPK、HNRNPU、DHX15、MATR3、HNRNPA3 在食管癌中的表达明显上调, 且与 hsa-miR-1 密切相关。结论 ESCC 癌组织中 miRNA 存在差异表达, miRNA 可能通过作用靶基因间接参与调控相关的生物功能和通路, 从而影响 ESCC 的发生发展。

【关键词】 食管鳞状细胞癌; microRNA; 生物标志物; 基因; 生物信息学分析

【中图分类号】 R735.1; R730.21 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2024.07.002

Screening of biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma based on bioinformatics

WEN Ting¹, LUO Mao², KANG Min¹

(1. Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China;

2. Drug Discovery Research Center, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

【Abstract】 **Objective** Bioinformatics was applied to screen differentially expressed microRNAs (miRNAs) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and predict their target genes and analyze the biological functions. **Methods** Twenty pairs of esophageal squamous cell carcinoma tissues and normal paired tissues adjacent to the carcinoma were collected from June 2021 to February 2022, Southwest Medical University Hospital. The miRNA expression profile microarray data of ESCC was downloaded from the GEO database and normalized using the R software limma package to screen for differentially expressed miRNAs. The survival analysis of differentially expressed miRNAs was performed using the online tool Kaplan-meier Plotter. The expression of differential miRNAs associated with survival was verified in ESCC tissues by qRT-PCR; targetScan and miRDB were used to predict target genes, and DAVID was used to annotate GO functions and KEGG pathway enrichment analysis of target genes. The PPI network was constructed by STRING and Cytoscape to identify core genes. The cytoscape was used to construct miRNA-mRNA network diagrams. UALCAN was used to evaluate the expression of core genes in esophageal cancer. **Results** Compared with normal tissues, hsa-miR-93, hsa-miR-130b, hsa-miR-18a, and hsa-miR-23b were expressed up-regulated in ESCC tissues; while hsa-miR-1, hsa-miR-133b, and hsa-miR-378a were expressed down-regulated in ESCC tissues. Three of these down-regulated miRNAs were

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81800434); 四川省科技计划联合创新专项(2022YFS0627); 西南医科大学附属医院博士科研启动基金项目(21037)

通讯作者: 康敏, 副教授, 硕士生导师, E-mail: 326006061@qq.com

引用本文: 文婷, 罗茂, 康敏. 基于生物信息学筛选食管鳞状细胞癌生物标志物[J]. 西部医学, 2024, 36(7): 943-950. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2024.07.002

significantly differentially expressed in ESCC tissues compared with normal tissues. The expressions of core genes *HNRNPK*, *HNRNPU*, *DHX15*, *MATR3* and *HNRNPA3* were significantly increased in esophageal cancer, and these core genes are closely related to hsa-miR-1. **Conclusion** The miRNAs are differentially expressed in ESCC tissues. The miRNAs may be involved in regulating relevant biological functions and pathways through target genes, thus affecting the occurrence and development of ESCC.

【Key words】 Esophageal squamous cell carcinoma; microRNA; Gene; Biomarkers; Bioinformatics analysis

食管癌(Esophageal cancer, EC)是世界上最常见恶性肿瘤之一,其死亡率居全球恶性肿瘤第六位,严重危害人类健康^[1]。食管癌病理类型主要分为食管腺癌(Esophageal adenocarcinoma, EAC)和食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC),在我国 ESCC 是最常见病理类型,约占 EC 的 90%^[2]。据报道,在大多数国家,EC 诊断后 5 年的存活率在 10%~30%之间^[3]。因此提高 EC 的早诊率对于选择治疗方法和改善患者的总体生存率至关重要。目前,许多非编码 RNA 可作为食管癌风险因素、诊断和预后的生物标志物^[4]。近年来, microRNAs (miRNAs) 被发现是不同癌症诊断和预后的候选生物标志物^[5]。miRNAs 是一类小的非编码 RNA,在基因表达转录后调控中起作用。它们是各种细胞活动的强大调节因子,参与细胞生长、分化、发育和凋亡^[6]等多种生物过程,其调节失衡与多种疾病有关,包括 ESCC。近年来,相关研究表明 miR-200 家族中的成员通过调控靶基因参与肿瘤、感染等病理生理进程^[7]。miRNA 异常表达与 ESCC 的发病和进展密切相关。ESCC 的发病机制十分复杂,为提高该肿瘤的早诊率及生存率,在整体上了解 miRNA 调控 ESCC 的作用机制至关重要。因此本研究利用基因芯片技术,筛选人 ESCC 样本中表达有明显差异的 miRNA,并用 qRT-PCR 技术验证结果;预测可能受其调控的基因,并对这些基因进行生物信息学分析,为研究 miRNA 在 ESCC 中的作用提供线索。

1 材料与方法

1.1 组织标本 收集西南医科大学附属医院 2021 年 6 月—2022 年 2 月的 20 对 ESCC 癌组织和癌旁正常配对组织标本。所有患者均知情并同意标本收集,同时获得西南医科大学附属医院伦理委员会授权同意(受理号:KY2022346)。

1.2 主要材料与仪器 氯仿(北京化学试剂,中国),异丙醇(欣正通工,中国),无水乙醇(国药集团化工,美国),无 RNA 酶水(碧云天公司,中国),miRNA cDNA 逆转录试剂盒(KR211)及 miRNA 荧光定量试剂盒(FP411)(天根,中国),无酶枪头和无酶 EP 管(Biologix,美国),PCR 引物(生工生物工程,上海),高速

冷冻离心机(Eppendorf),实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司,美国),微量紫外可见分光光度计(NanoDrop),-80 °C 超低温冰箱(Thermo)。

1.3 方法

1.3.1 数据源 在基因表达综合(Gene expression omnibus, GEO)数据库以“Esophageal squamous cell carcinoma”为关键词搜索有关 miRNA 的 ESCC 表达谱芯片数据。纳入标准:①物种为“Homo sapiens”。②含有 miRNA 数据。③有癌旁正常样本为对照组。最终将 GSE67269 和 GSE59973 两个芯片数据纳入研究,利用从芯片中获取的 miRNA 表达数据,按照癌组织和癌旁正常组织样本进行分组,筛选差异表达 miRNA。

1.3.2 数据处理和获取差异 miRNA 利用 R 软件“limma”和“ggplot”包来可视化和分析芯片数据,筛选出差异表达的 miRNA;设置条件满足 $|\log F C| \geq 1$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.3.3 差异基因 miRNA 生存分析 Kaplan-meier Plotter(<http://kmplot.com/analysis/>)数据库常用于进行生存分析,它用于评估基因的表达与患者生存率之间的相关性,从而可以验证相关生物标志物是否与生存相关的。利用其数据库分析差异 miRNA 在 ESCC 患者中的生存率。

1.3.4 样品的提取 取 25 mg ESCC 组织和癌旁正常组织分别放于液氮预冷处理的研钵中,固化、研碎、备用,按照 miRNA 提取试剂盒说明从 ESCC 组织和癌旁正常组织中提取总 RNA。

1.3.5 样本质量检测 使用紫外分光光度计检测样品总 miRNA 在 260 nm 和 280 nm 下的吸光度(A)值,检测 miRNA 浓度和纯度,采用 A260/A280 值来判断所提取样本的质量, A260/A280 值在 1.9~2.1 之间时,认为 RNA 的纯度较好。

1.3.6 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证芯片结果 针对芯片中有差异表达的 miRNA,结合其在 ESCC 患者中的生存分析,筛选出均有统计学意义的差异 miRNA 进行 qRT-PCR 验证。按照 miRNA cDNA 逆转录试剂盒对提取的 miRNA 进行逆转录,然后在实时定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增,使用 U6 作为内参。反应程序:95 °C 预变性 15 min;95 °C 变性 10 s,50~

60 °C 复性 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 3 min, 60~95 °C 绘制熔解曲线。数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 使用引物序列表
Table 1 The primer sequences for qRT-PCR

miRNAs	Sequences(5'-3')
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
hsa-miR-93	F: ACUGCUGAGCUAGCACUCCCG
hsa-miR-130b	F: CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
hsa-miR-23b	F: AUCACAUUGCCAGGGAUUACCAC
hsa-miR-18a	F: ACUGCCCUAAGUGCUCUUCUGG
hsa-miR-1	F: UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUAU
hsa-miR-133b	F: UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA
hsa-miR-378a	F: ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC

1.3.7 靶基因预测 对 qRT-PCR 验证的差异 miRNA 进一步分析, 筛选出在 ESCC 组织中有显著差异表达的 miRNA, 利用 TargetScan 和 miRDB 分别预测靶基因^[8-9], 然后利用韦恩图对 2 个数据库预测的基因取交集, 以获得差异基因。

1.3.8 靶基因的生物信息学分析 利用在线数据库 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>) 对预测基因进行基因本体论 (Gene-ontology, GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genom, KEGG) 通路富集分析; $P < 0.05$ 提示功能注释与通路在 ESCC 样本和癌旁正常样本间存在差异, 且筛选前 20 个主要富集进行分析。柱状图和气泡图呈现分析结果。

1.3.9 差异基因蛋白质相互作用网络构建 通过 STRING(<http://string-db.org/>) 在线网站构建差异基因蛋白质相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 网络。利用 Cytoscape^[10] 软件中 Cytohubba 插件的 MCC 算法, 按基因节点连接度筛选出关键模块中连接度最高的 10 个基因, 即核心基因; 并构建 miRNA-mRNA 网络图。

1.3.10 评估核心靶基因在 ESCC 中的表达 UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/>) 主要是基于肿瘤基因组图谱数据库中的癌症数据进行分析, 它可以对相关基因进行表达谱分析、生存分析等。使用 UALCAN 在线工具评估核心靶基因在 EC 中的表达。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 26.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件对实验结果进行统计学分析和作图, 计量资料采用均数 ± 标准差 (SD) 表示。两组间分析使用 *t* 检验, 多组间数据使用单因素方差分析。所有实验数据平行重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异 miRNA 筛选结果 从 GSE67269 芯片获得 68 种差异表达 miRNA, GSE59973 中获得 50 种差异表达 miRNA, 两个芯片数据取交集最终筛选出 14 种差异表达 miRNA, 其中上调的 miRNA 有 7 种, 下调的 miRNA 有 7 种; 利用“ggplot”绘制火山图, ESCC 样本和癌旁正常样本中没有显著差异的基因被标记为黑点, 而上调或下调的 miRNA 分别被标记为红点或绿点。见图 1、表 2。

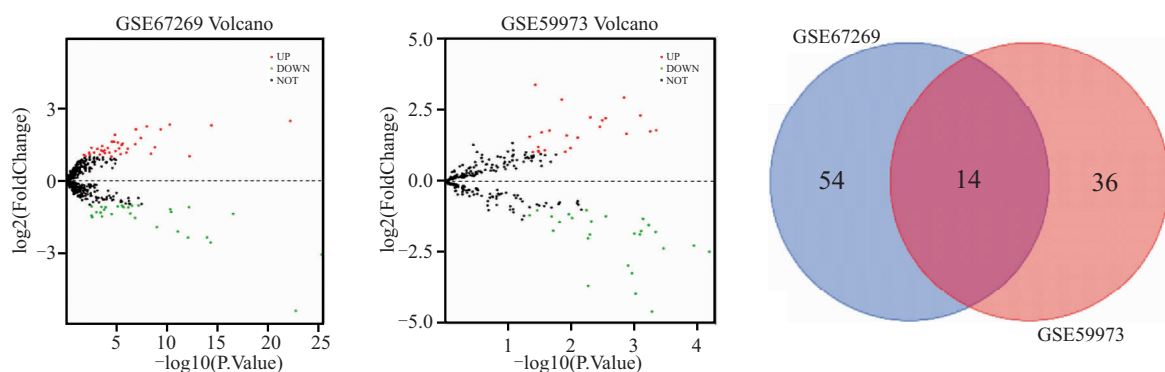


图 1 ESCC 组织差异 miRNA 表达的火山图和韦恩图

Figure 1 Volcanic and Venn maps of miRNA expression in ESCC tissue differences

2.2 差异 miRNA 生存分析 通过 Kaplan-meier Plotter 在线数据库分析发现, 有 7 种差异 miRNA 与 ESCC 的生存率相关, 分别为 hsa-miR-93、hsa-miR-130b、hsa-miR-18a、hsa-miR-23b、hsa-miR-1、hsa-miR-133b、hsa-miR-378a (均 $P < 0.05$); 而余 7 种差异 miRNA (hsa-miR-497、hsa-miR-30c、hsa-miR-223、

hsa-miR-145、hsa-miR-30e、hsa-miR-21、hsa-miR-183) 与 ESCC 的生存率无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。上述结果表明, hsa-miR-93、hsa-miR-130b、hsa-miR-18a、hsa-miR-23b、hsa-miR-1、hsa-miR-133b、hsa-miR-378a 等 miRNA 可能作为预测 ESCC 患者预后的潜在生物标志物, 为了进一步验证研究结果的准确性, 可以扩大收

表 2 ESCC 组织中差异 miRNA 表达

Table 2 Differential microRNA expression of esophageal squamous cell carcinoma tissues

miRNA	logFC	P. Value	expression
hsa-miR-130b	2.299 576	4.07E-15	上调
hsa-miR-497	-1.019 83	6.97E-08	下调
hsa-miR-133b	-4.583 02	0.000 524	下调
hsa-miR-30c	-1.536 85	0.000 591	下调
hsa-miR-223	2.323 7	0.000 798	上调
hsa-miR-145	-3.947 27	0.000 956	下调
hsa-miR-18a	2.154 339	0.003 204	上调
hsa-miR-378a	-1.413 21	0.004 806	下调
hsa-miR-1	-3.672 38	0.005 393	下调
hsa-miR-23b	1.290 28	0.009 703	上调
hsa-miR-30e	-1.156 58	0.010 901	下调
hsa-miR-21	1.104 56	0.026 386	上调
hsa-miR-93	1.077 725	0.033 447	上调
hsa-miR-183	1.578 997	0.045 837	上调

集临床 ESCC 患者样本来进一步分析。见图 2。

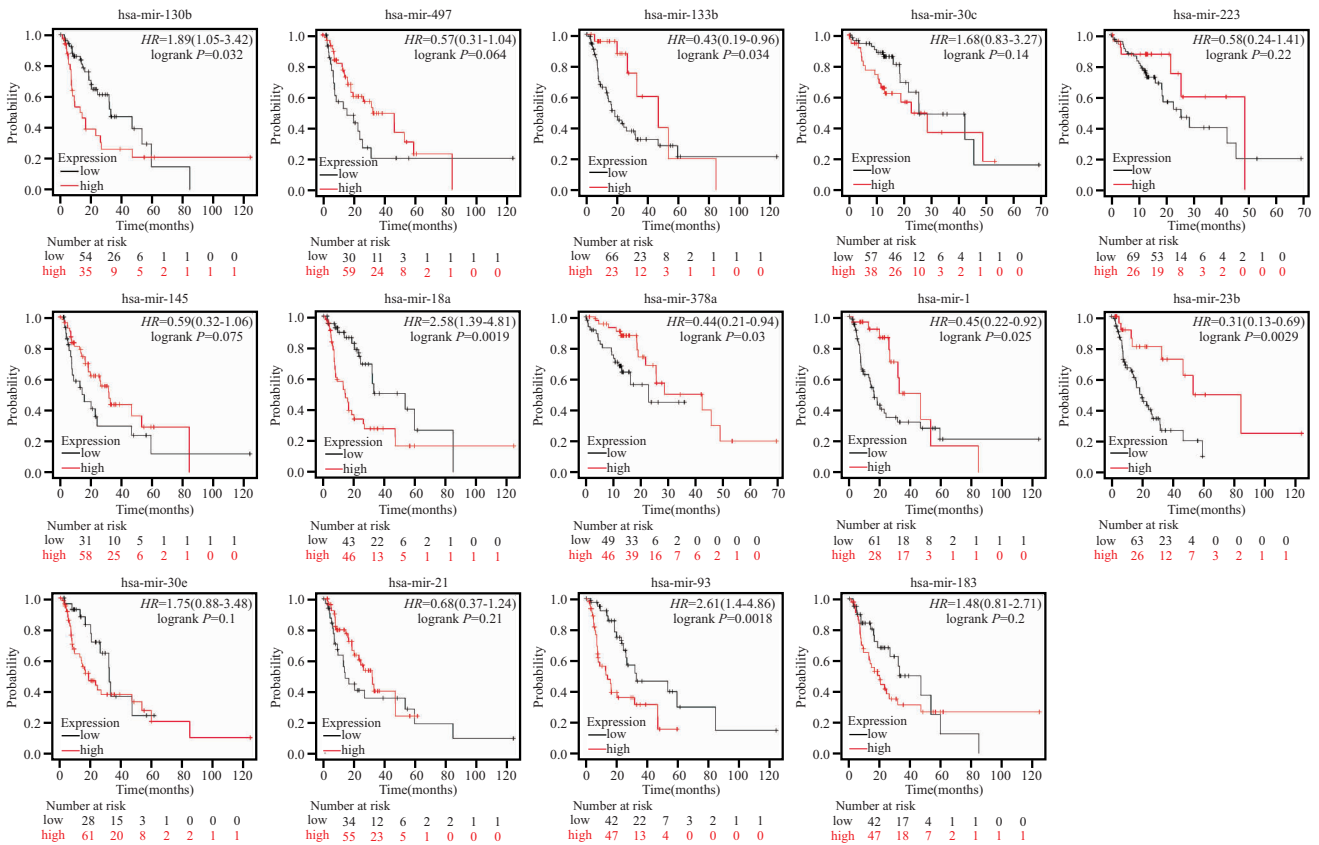


图 2 ESCC 差异 miRNA 的 Kaplan-Meier 生存分析

Figure 2 Kaplan-Meier survival analysis of differential miRNAs in ESCC

2.5 GO 分析和 KEGG 富集分析 GO 描述基因和蛋白质的功能,包括生物过程(Biological processes, BP)、细胞组分(Cell component, CC)和分子功能(Molecular function, MF);而 KEGG 分析显示通路富集。BP 分析结果显示,显著差异表达 miRNA 的靶基因主要涉及 266 个生物学过程;最为富集的是正向调节 RNA 聚合酶 II 启动子的转录(Positive regulation of

2.3 qRT-PCR 结果 将生存分析有统计学意义的差异 miRNA 进行 qRT-PCR 验证。实验结果表明(图 3),与癌旁正常组织相比,hsa-miR-93、hsa-miR-130b、hsa-miR-18a、hsa-miR-23b 在 ESCC 组织中表达上调 ($P < 0.05$);而 hsa-miR-1、hsa-miR-133b、hsa-miR-378a 在 ESCC 组织中表达较癌旁正常组织低,与芯片预测数据结果一样。其中 3 种下调 miRNA 在 ESCC 组织中表达较癌旁正常组织差异显著 ($P < 0.01$)。

2.4 靶基因预测 通过基因数据库对靶基因进行预测及筛选,将在 qRT-PCR 实验中有显著差异表达的 miRNA (hsa-miR-1、hsa-miR-133b、hsa-miR-378a) 进行靶基因预测。TargetScan 预测到 1830 个靶基因, miRDB 预测到 1908 个靶基因,2 个数据库共同预测得到的基因有 1023 个。

transcription from RNA polymerase II promoter),其次是蛋白质磷酸化(Protein phosphorylation)及正向调节细胞增殖(Positive regulation of cell proliferation)等。CC 分析结果显示,这些 miRNA 的靶基因主要涉及 102 个细胞组分;最为富集的是细胞质(Nucleoplasm),其次是胞浆(Cytoplasm)及细胞核(Nucleus)等。MF 分析结果显示,这些 miRNAs 的靶基

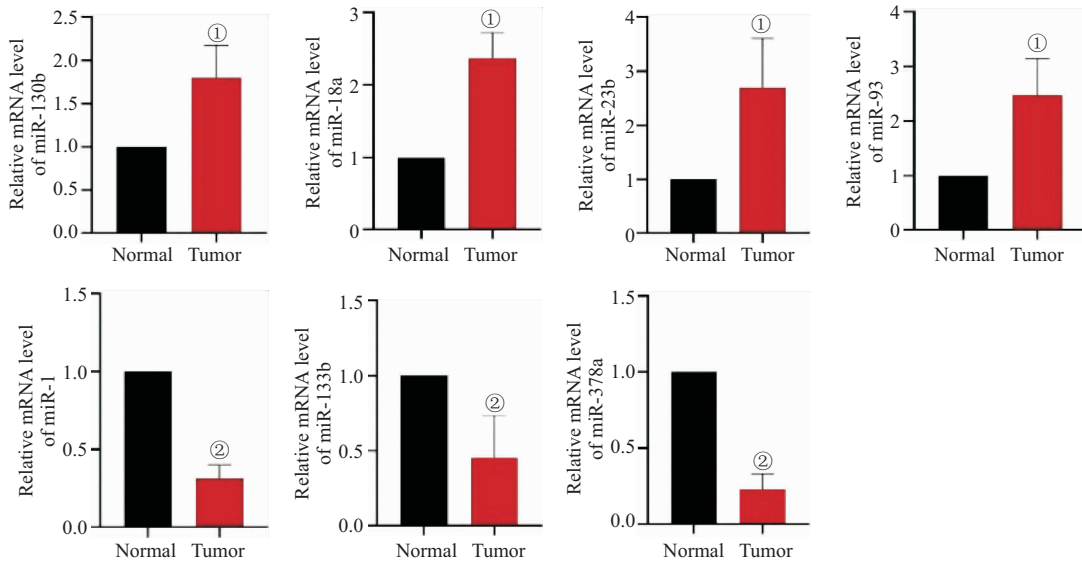


图 3 qRT-PCR 检测差异 miRNA 在 ESCC 组织中相对表达水平

Figure 3 The expression levels of miRNAs determined by RT-qPCR detection in ESCC tissues

注：与癌旁正常组织比较，① $P < 0.05$ ；② $P < 0.01$ 。

因主要涉及 89 个分子功能：其中最为富集的是蛋白结合(Protein binding)，其次有 RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性 DNA 结合(RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding) 及 DNA 结合(DNA binding)。KEGG 分析结果显示，这些 miRNA 的靶基因主要涉及 55 个信号通路，其中最为富集的是癌症中的通路

(Pathways in cancer)，其次分别有 MAPK 信号传导途径(MAPK signaling pathway)、PI3K-Akt 信号传导途径(PI3K-Akt signaling pathway)等。上述结果表明差异 miRNA 的靶基因能调节蛋白质的结合、转录、促进细胞增殖，以及通过 MAPK、PI3K-Akt 等信号通路参与 ESCC 的发生发展过程。见图 4。

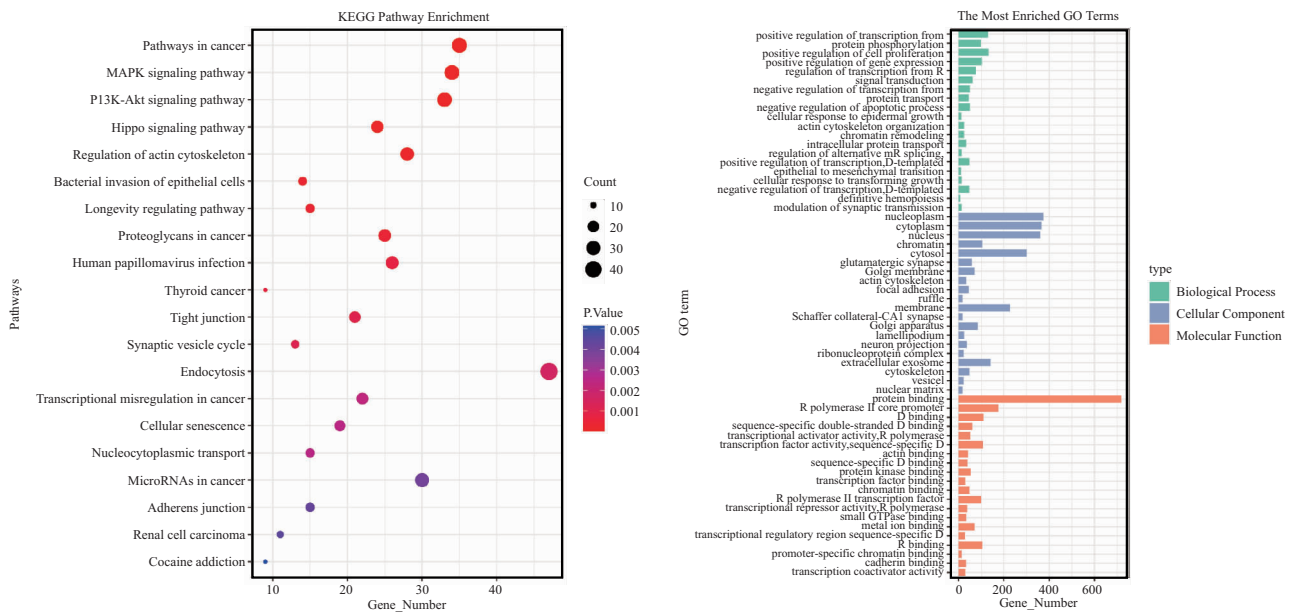


图 4 前 20 个核心靶基因 KEGG 和 GO 富集分析

Figure 4 GO and KEGG enrichment analysis of the top 20 core target genes

2.6 鉴定核心基因和构建 miRNA-mRNA 网络图
使用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件对靶基因进行构建了 PPI 网络鉴定出的前 10 个核心基因

(*ELAVL1*、*HNRNPA1*、*PTBP1*、*HNRNPK*、*SRSF1*、*HNRNPU*、*DHX15*、*MATR3*、*HNRNPA3*、*DDX5*)，然后使用 Cytoscape 软件构建 miRNA-mR-

NA 网络图,结果显示 *PTBP1* 是 *hsa-miR-1* 和 *hsa-miR-133b* 共同作用的靶基因,而 *SRSF1* 是 *hsa-miR-1* 和 *hsa-miR-378a* 共同作用的靶基因;前 10 个核心

基因与 *hsa-miR-1* 相关联的基因最多,从而预测 *hsa-miR-1* 可能作为 ESCC 早期诊断和靶向治疗的潜在生物标志物,见图 5。

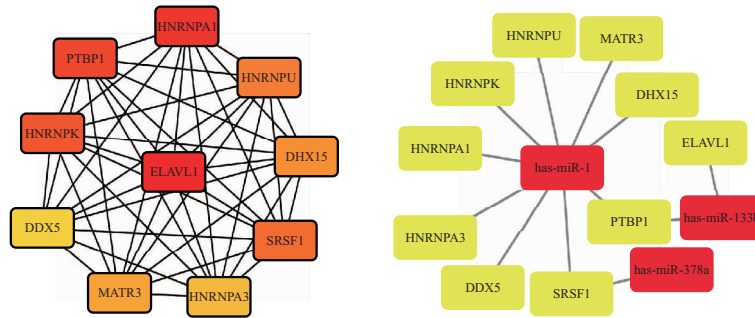


图 5 前 10 个核心基因和 miRNA-mRNA 网络图
Figure 5 Top 10 core genes and miRNA-mRNA network diagram

2.7 评估靶基因在 EC 中的表达 通过上述构建 miRNA 和 mRNA 作用图可知与 *hsa-miR-1* 相关联的核心基因最多,进一步利用 UALCAN 在线数据库评估与其相关联的核心靶基因在 EC 组织中的表达。结果显示, *HNRNPK*、*HNRNPU*、*DHX15*、*MATR3*、*HNRNPA3* 在 EC 组织中的表达明显上调,而 *DDX5*

的表达无统计学意义,因 UALCAN 在线数据库中存储的基因有限,故未检测到 *SRSF1* 在 EC 组织中的表达。综合上述研究结果发现, *hsa-miR-1* 可能通过靶向作用 *HNRNPK*、*HNRNPU*、*DHX15*、*MATR3*、*HNRNPA3* 等基因从而影响 EC 的发生发展进程。见图 6。

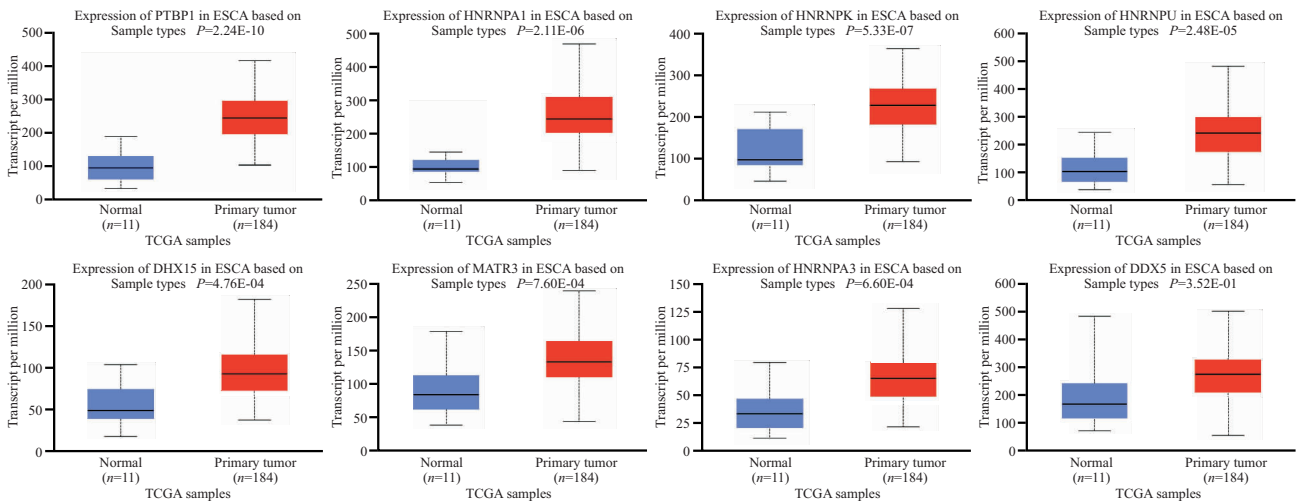


图 6 ESCC 中核心基因的蛋白表达水平
Figure 6 Protein expression levels of core genes in esophageal squamous cell carcinoma

3 讨论

EC 早期无特异性症状,大多数 EC 发现都是中晚期,据报道目前 EC 的五年生存率仍较低。因此挖掘与 EC 生存预后相关的分子标志物尤为重要。食管鳞状上皮癌变的根本原因是基因表达失控,miRNA 是基因表达的重要调控因子,可通过增加降解或抑制信使从而达到抑制下游靶基因表达的目的。本研究通过生物信息学分析从 GEO 数据库中挖掘出 14 种在 ESCC 组织中有差异表达的 miRNA。结合 Kaplan-meier Plotter 在线数据库发现仅 7 种 miRNA 与 ES-

CC 生存率相关。qRT-PCR 实验结果证实, *hsa-miR-93*、*hsa-miR-130b*、*hsa-miR-18a*、*hsa-miR-23b* 在 ESCC 中作为肿瘤促癌因子调控肿瘤进展;而 *hsa-miR-1*、*hsa-miR-133b*、*hsa-miR-378a* 在 ESCC 中扮演抑癌因子角色,与芯片预测数据结果一样。通过 TargetScan 和 miRDB 预测 3 个有显著差异的 miRNA 的靶基因,得到 1023 个基因。并通过 GO 和 KEGG 富集分析,发现它们广泛参与多种细胞过程和肿瘤发展有关的信号通路。通过构建了 PPI 网络鉴定出的前 10 个核心基因 (*ELAVL1*、*HNRNPA1*、*PTBP1*、

HNRNPK、*SRSF1*、*HNRNPU*、*DHX15*、*MATR3*、*HNRNPA3*、*DDX5*)及构建 miRNA-mRNA 网络图,结果显示与 hsa-miR-1 相关联的核心基因最多。据报道,hsa-miR-1 的下调已在多种癌症中得到证实,包括肺癌^[11]、乳腺癌^[12]、结直肠癌^[13]、胃癌^[14]和肝癌^[15]等。大量研究表明,hsa-miR-1 参与癌症的生物学过程,如增殖、侵袭和转移、细胞凋亡、血管生成、化学增敏和免疫调节等^[16]。但 hsa-miR-1 在 ESCC 中的研究甚少,本研究表明,hsa-miR-1 在 ESCC 中扮演抑癌因子角色,可能通过 MAPK、PI3K-Akt 等信号传导途径抑制 ESCC 的发生发展。后续可以通过深入研究 hsa-miR-1 在 ESCC 的具体作用机制,为癌症的早期诊断和靶向治疗提供新的技术手段。

结合生物信息学分析发现 hsa-miR-1 的靶基因 *HNRNPK*、*HNRNPU*、*HNRNPA3*、*DHX15*、*MATR3* 在 EC 中的表达明显上调。异质核糖核蛋白 K (*HNRNPK*)是异质核糖核蛋白(*HNRNP*)家族中研究最广泛的成员,参与生理和病理过程,如器官发生和癌变^[17]。先前的研究表明,*HNRNPK* 可以与靶 mRNA 的 3'UTR 结合,包括 Src、c-Myc 等,这些 mRNA 编码参与细胞增殖,凋亡和分化的蛋白质^[18]。异质核糖核蛋白 U(*HNRNPU*)是 *HNRNP* 亚家族的成员,参与染色质重塑、转录调控和 mRNA 稳定性^[19]。通过物理相互作用,*HNRNPU* 调节各种因素的功能^[20-21]。例如,*HNRNPU* 与 p300 相互作用,促进核小体的局部乙酰化和靶基因的转录^[21]。同时,*HNRNPU* 与 Yes 相关蛋白结合以减弱基因转录^[20]。据报道,*HNRNPU* 在三阴性乳腺癌、肝细胞癌中作为促癌因子,促进肿瘤进展^[22]。异质核糖核蛋白 A3 (*HNRNPA3*)也是 *HNRNP* 亚家族的成员之一,其有助于核酸代谢,包括选择性剪接、mRNA 稳定以及转录和翻译调节^[17]。最近的一项研究报道,*HNRNPA3* 过表达与非小细胞肺癌^[23]患者预后不良有关。*HNRNPA3* 与端粒序列结合,可能在其维持中发挥重要作用^[24]。*DHX15* 是 DEAH/H-box RNA 螺旋酶家族的成员,参与了 RNA 代谢和血管生成过程^[25]。研究报道,*DHX15* 在急性淋巴细胞白血病^[26]、肺癌^[27]和前列腺癌^[28]中作为肿瘤促进因子,致力于肿瘤的发生。在脑胶质瘤^[29]、肝细胞癌^[30]和胃癌^[31]中作为肿瘤抑制因子。*Matrin3*(*MATR3*)是 NMPs 的一种,是一种 DNA 和 RNA 结合蛋白。它参与了广泛的生物过程,包括 RNA 剪接、mRNA 组装/稳定、RNA 输出/保留和病毒 RNA 调控^[32]。最近的研究也描述了在癌症进展中,*MATR3* 作为促生存因子的作用^[33]。

结合目前研究报道,可知上述五种核心基因在肿瘤的发生发展中扮演着至关重要的角色。这与生物信息学分析的结果一致。生物信息学结果表明上述五种核心基因可能在 EC 中上调,影响 EC 的发生发展,而作为 hsa-miR-1 的靶基因,提示有可能作为 ESCC 早期诊断及评估预后的生物标志物。然而,目前尚无相关研究显示上述核心基因在 ESCC 中的具体作用机制。因此,需通过进一步收集 ESCC 患者的临床标本及临床数据进行验证,以提供更可靠的依据证明可以将其应用于临床分析。

本研究结果表明,hsa-miR-1 可能通过作用于 *HNRNPK*、*HNRNPU*、*DHX15*、*MATR3*、*HNRNPA3* 等基因从而影响 ESCC 的发生发展。hsa-miR-1、*HNRNPK*、*HNRNPU*、*DHX15*、*MATR3*、*HNRNPA3* 可能是 ESCC 诊断、治疗和风险评估的生物标志物。

4 结论

本研究通过基因芯片与生物信息学分析相结合,挖掘出与 ESCC 发病相关的基因及相关的通路,但这些基因在 ESCC 发生过程中的具体作用机制还有待于进一步研究确定。本研究为后续 ESCC 的诊断和靶向治疗提供了理论基础。

【参考文献】

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] ARNOLD M, SOERJOMATARAM I, FERLAY J, *et al.* Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012[J]. *Gut*, 2015, 64(3): 381-387.
- [3] ALLEMANI C, MATSUDA T, DI CARLO V, *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391 (10125): 1023-1075.
- [4] 汪莘,胡欣,刘康,等. LncRNA 在食管癌中的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2022, 19(7): 51-54.
- [5] XI T, ZHANG G. Epigenetic regulation on the gene expression signature in esophagus adenocarcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(2): 83-88.
- [6] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, *et al.* An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [7] 张英,秦江月,贾慧卓,等. 人 microRNA-200 家族靶基因预测及生物信息学分析[J]. *西部医学*, 2020, 32(1): 9-13.
- [8] MCGEARY S E, LIN K S, SHI C Y, *et al.* The biochemical

- basis of microRNA targeting efficacy[J]. *Science*, 2019, 366(6472): eaav1741.
- [9] CHEN Y, WANG X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D127-D131.
- [10] OTASEK D, MORRIS J H, BOUCAS J, *et al.* Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 185.
- [11] YU Q Q, WU H, HUANG X, *et al.* MiR-1 targets PIK3CA and inhibits tumorigenic properties of A549 cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(2): 155-161.
- [12] YANG L, CAI N, ZHAO L. microRNA-1 regulates the growth and chemosensitivity of breast cancer cells by targeting MEK/ERK pathway[J]. *J BUON*, 2020, 25(5): 2215-2220.
- [13] LV X, ZHANG J, ZHANG J, *et al.* A Negative Feedback Loop Between NAMPT and TGF-beta Signaling Pathway in Colorectal Cancer Cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 187-198.
- [14] XIE M, DART D A, GUO T, *et al.* microRNA-1 acts as a tumor suppressor microRNA by inhibiting angiogenesis-related growth factors in human gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2018, 21(1): 41-54.
- [15] DATTA J, KUTAY H, NASSER M W, *et al.* Methylation mediated silencing of microRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 5049-5058.
- [16] KHAN P, EBENEZER N S, SIDDIQUI J A, *et al.* microRNA-1: Diverse role of a small player in multiple cancers[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 124: 114-126.
- [17] GEUENS T, BOUHY D, TIMMERMAN V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease[J]. *Hum Genet*, 2016, 135(8): 851-867.
- [18] BOMSZTYK K, DENISENKO O, OSTROWSKI J. hnRNP K: one protein multiple processes[J]. *Bioessays*, 2004, 26(6): 629-638.
- [19] ZHANG L, SONG D, ZHU B, *et al.* The role of nuclear matrix protein HNRNPU in maintaining the architecture of 3D genome[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 90: 161-167.
- [20] HOWELL M, BORCHERS C, MILGRAM S L. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U associates with YAP and regulates its co-activation of Bax transcription[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26300-26306.
- [21] MARTENS J H, VERLAAN M, KALKHOVEN E, *et al.* Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(8): 2598-2606.
- [22] LIANG Y, FAN Y, LIU Y, *et al.* HNRNPU promotes the progression of hepatocellular carcinoma by enhancing CDK2 transcription[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 409(1): 112898.
- [23] PACURARI M, ADDISON J B, BONDALAPATI N, *et al.* The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(2): 548-560.
- [24] HAMADA T, KURACHI S, KURACHI K. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 is the liver nuclear protein binding to age related increase element RNA of the factor IX gene[J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12971.
- [25] STUDER M K, IVANOVIĆ L, WEBER M E, *et al.* Structural basis for DEAH-helicase activation by G-patch proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(13): 7159-7170.
- [26] PAN L, LI Y, ZHANG H Y, *et al.* DHX15 is associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia (AML) and regulates cell apoptosis via the NF- κ B signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(52): 89643-89654.
- [27] YAO G, CHEN K, QIN Y, *et al.* Long Non-coding RNA JHDMID-AS1 Interacts with DHX15 Protein to Enhance Non-Small-Cell Lung Cancer Growth and Metastasis[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 831-840.
- [28] JING Y, NGUYEN M M, WANG D, *et al.* DHX15 promotes prostate cancer progression by stimulating Siah2-mediated ubiquitination of androgen receptor[J]. *Oncogene*, 2018, 37(5): 638-650.
- [29] ITO S, KOSO H, SAKAMOTO K, *et al.* RNA helicase DHX15 acts as a tumour suppressor in glioma[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(9): 1349-1359.
- [30] ZHAO M, YING L, WANG R, *et al.* DHX15 Inhibits Autophagy and the Proliferation of Hepatoma Cells[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 7: 591736.
- [31] ZONG Z, LI H, NING Z, *et al.* Integrative bioinformatics analysis of prognostic alternative splicing signatures in gastric cancer[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2020, 11(4): 685-694.
- [32] DURŚLEWICZ J, KLIMASZEWSKA-WISNIEWSKA A, JÓŹ WICKI J, *et al.* Prognostic significance of MATR3 in stage I and II non-small cell lung cancer patients[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(12): 3313-3322.
- [33] CHAUDHARY R, GRYDER B, WOODS W S, *et al.* Pro-survival long noncoding RNA PINCR regulates a subset of p53 targets in human colorectal cancer cells by binding to MatrIn 3[J]. *Elife*, 2017, 6: e23244.

(收稿日期:2023-03-08;修回日期:2024-01-01;编辑:刘灵敏)