



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2023.12.013

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2023.12.013>

· 论著 ·

慢性髓系白血病干细胞差异微小 RNA 筛选及其靶基因生物信息学分析

郭佳丽 潘晨华 李依 刘晓倩 蒋慧 常伟

【摘要】 目的 利用生物信息学分析方法寻找慢性髓系白血病干细胞(CML-LSCs)的潜在靶点。**方法** 从 GEO 数据库中选择合适的数据集,下载后通过 perl 语言及 R 语言联合对数据进行整理和清洗。使用 R 语言进行差异表达分析,筛选出差异微小 RNA(microRNA, miRNA)。通过 miRWalk 数据库对差异 miRNAs 进行靶基因预测,同时构建 miRNA-mRNA 调控网络,从中筛选出关键 miRNAs。运用 Metascape 数据库对关键 miRNAs 的靶基因进行基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析。利用 STRING 数据库构建靶基因蛋白质-蛋白质作用网络(PPI),通过 Cytoscape 插件筛选出核心基因。运用 R 语言对核心基因再次进行 GO 和 KEGG 富集分析。**结果** 筛选出 6 个与 CML 发病及耐药相关的基因:CCND1、KIT、YWHAZ、BCL2L11、MCL1、SIRT1。GO 富集分析结果发现,其与生殖系统发育、性别分化、转录抑制因子复合物、死亡域结合等生物过程和分子功能相关。KEGG 富集分析结果发现,其主要参与 PI3K-Akt 信号通路、FOXO 信号通路及急性髓系白血病等信号通路。通过构建 PPI 网络发现,这 6 个靶基因主要受 miR-193b-3p、miR-9-5p 调控。**结论** 通过生物信息学确定了调控 CML-LSCs 的两个关键 miRNAs:miR-193b-3p、miR-9-5p,以及受其调控的靶基因:CCND1、KIT、YWHAZ、BCL2L11、MCL1、SIRT1。因此针对 miR-193b-3p、miR-9-5p 的后续研究有利于为 CML-LSCs 的治疗提供新的靶点和生物标志物,有助于提高对其作用机制的理解,为 CML 的治疗提供了新的策略。

【关键词】 慢性髓系白血病; 白血病干细胞; 微小 RNA; 生物信息学; GEO 数据库

【中图分类号】 R559 **【文献标识码】** A

慢性髓系白血病(CML)是一种发生在造血干细胞水平的骨髓恶性增殖性疾病,其典型特征是表达具有强酪氨酸激酶活性的 BCR-ABL1 融合基因。随着酪氨酸激酶抑制剂(TKI)的应用,CML 患者的生存期和生存质量得到极大改善^[1]。不过,尽管 TKI 治疗使患者长期总生存率达 90%,但仍有约 1/4 的患者在治疗期间出现 TKI 耐药^[2],且在大多数停止 TKI 治疗的 CML 患者中可检测到白血病细胞重新生长和疾病分子学复发。究其耐药和复发原因,主要是由于白血病干细胞(LSCs)的存在。LSCs 对 TKI 不敏感,能够通过不完全依赖 BCR-ABL 融合基因活性的生存机制在 TKI 治疗下存活,一旦 TKI 治疗中断,其可能具有恢复白血病进

程的克隆能力^[3]。因此,针对 LSCs 展开研究可为 CML 提供新的治疗策略。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类小的非编码 RNA,参与恶性肿瘤的形成,在恶性肿瘤的发病中具有类似癌基因或抑癌基因的生物学(BP)效应^[4]。有大量研究结果表明 miRNAs 在 CML-LSCs 自我更新、维持和 TKI 耐药中发挥重要作用,如 miR-126 水平降低会使 CML-LSCs 对 TKI 敏感;此外,将 CML-LSCs 暴露于伊马替尼下会增加 miR-21 水平,从而导致 TKI 耐药^[5]。以上结果均证明 miRNAs 在 CML 诊断和治疗中具有极大的潜力。因此我们希望基于生物信息学分析,构建 CML 潜在的 miRNA-mRNA 调控网络,为 CML 提供新的治疗靶点。

材料与方法

1. 材料:以“Chronic myeloid leukemia, LSCs”作为搜索关键词在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)获得本研究的数据集 GSE90773。该数据集由 5 例 CML 患者和 4 例健康供者外周血分离出的

基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会联合基金项目(WJ2018H0113);武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WX18C32);武汉市卫生健康委员会科研项目(WX21C23)

作者单位:430080 武汉,武汉市普仁医院血液科(郭佳丽、李依、刘晓倩、蒋慧、常伟),生物细胞治疗研究中心(潘晨华)

通讯作者:常伟, E-mail: cwei200408@163.com

CD34⁺CD38⁻干细胞样本组成。

2. 方法

(1) 差异表达 miRNAs 筛选: 运用 perl 语言将 GSE90773 的原始表达矩阵进行 ID 转换和分组得到 CML 和健康供体的 miRNAs 表达矩阵。通过 R 语言的“limma”包对 miRNAs 的表达矩阵进行数据矫正和归一化处理, 然后筛选出同时满足 $|\text{Log2}| > 2$, 矫正后的 P 值 < 0.05 的差异 miRNAs。

(2) miRNAs 靶基因预测及 miRNA-mRNA 调控网络构建: 使用 miRwalk 数据库 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 对差异 miRNAs 进行靶基因预测, 同时为提高准确性, 将 TargetScan 和 miRTarbase 数据库中共有的靶基因用于后续研究。然后通过 Cytoscape 软件构建 miRNA-mRNA 调控网络, 将调节靶基因最多的 miRNAs 作为关键 miRNAs 用作后续分析。

(3) 关键 miRNAs 靶基因的基因本体 (GO) 及京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 富集分析: 将关键 miRNAs 预测得到的靶基因上传至 Matescape (<http://metascape.org>) 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 将输入物种和分析物种均设置为“H. sapiens”, 筛选条件设置为: $P < 0.05$ 、Min Overlap = 2、Min Enrichment = 1.5。

(4) 靶基因的蛋白互作网络构建及核心靶基因筛选: 利用 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 然后将 PPI 网络图上传至 Cytoscape, 使用“cytohubba”插件的 degree 算法分析 PPI 网络结构中的靶基因, 得到核心基因。

(5) 核心基因 BP 功能及信号通路分析: 运用 R 语言中的“clusterProfiler”、“org. Hs. eg. db”、“enrichplot”及“ggplot2”软件包对核心基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并将结果进行可视化。

结 果

1. 差异 miRNAs 筛选结果: 在获得的差异 miRNAs 中有 9 个上调 miRNAs (hsa-miR-708-5p、hsa-miR-193b-3p、hsa-miR-9-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-660-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-22-3p、hsa-miR-32-5p) 及 2 个下调 miRNAs (hsa-miR-486-3p、hsa-miR-486-5p)。

2. 差异 miRNAs 靶基因预测结果: 在 miWALK 数据库中获得差异 miRNAs 在 TargetScan 和 miRTarbase 共预测靶基因 101 个, 其中 has-miR-193b-3p、has-miR-22-3p、has-miR-9-5p 调控的靶基因最多, 且均为上调 miRNAs, 故将这 3 个 miRNAs 作为关键 miRNAs 并进一步分析。

3. 靶基因富集分析结果: 对 has-miR-193b-3p、has-miR-22-3p、has-miR-9-5p 预测得到的全部靶基因进行

富集分析, 发现这些基因主要在调节氧化应激反应、酶联受体蛋白信号通路、细胞生长维持、造血、髓系分化等 BP 过程中富集。在 PI3K-Akt 信号通路、恶性肿瘤中的 miRNAs、内分泌抵抗及细胞自噬等 KEGG 信号通路上富集。

4. 靶基因 PPI 网络分析及核心基因 BP 功能分析: 构建靶基因的 PPI 网络, 使用 CyHubba 插件对 PPI 网络进行分析, 根据 degree 算法筛选出前十的核心基因: ESR1、SIRT1、CCND1、KIT、YWHAZ、BCL2L11、MCL1、TIAM1、CDX2、ACLY。核心基因 GO 富集分析结果表明, 核心基因主要参与的 BP 过程包括生殖系统发育、生殖结构发育及性别分化等; 细胞成分 (CC) 主要集中于转录抑制因子复合物、细胞质膜、纤维中心等; 分子功能 (MF) 主要为转录抑制因子活性、死亡域结合、BH 域绑定等。见图 1。而 KEGG 富集的信号通路有 PI3K-Akt 信号通路、FOXO 信号通路及急性髓系白血病等。见图 2。

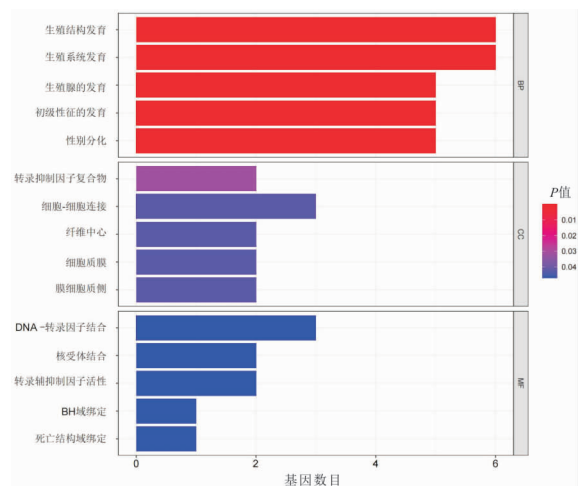


图 1 核心基因的 GO 富集分析

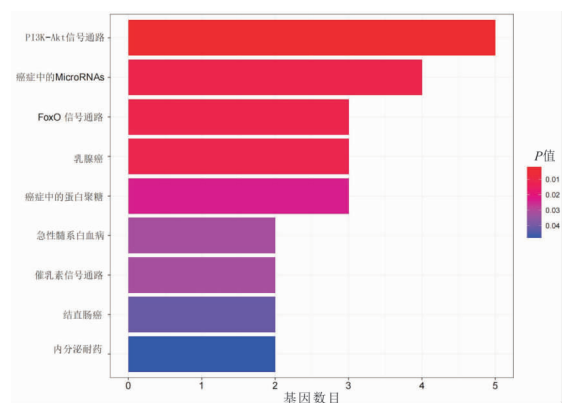


图 2 核心基因的 KEGG 富集分析

讨 论

通过生物信息学分析, 我们筛选出 3 个可能影响

LSCs 的 miRNAs: miR-193b-3p、miR-22-3p、miR-9-5p。在急性髓系白血病(AML)中,miR-193b-3p 通过靶向多个步骤的 MAPK 信号级联来充当肿瘤抑制因子,从而严格控制细胞增殖和细胞周期进程^[6]。所以靶向 miR-193b-3p 可能同样对 LSCs 的生长、死亡等细胞周期活动产生影响;miR-22-3p 能够通过靶向 NET1 来增强膀胱癌中的多重化学耐药,而在急性淋巴细胞白血病(ALL)中有研究发现,NET1 可增强白血病细胞的增殖和耐药^[7],所以在 CML-LSCs 中或可通过同样的作用途径对 TKI 产生耐药;在人白血病 K562 细胞的耐药性研究中发现 miR-9-5p 过表达,导致 K562 细胞中的拓扑异构酶 II A 蛋白降低,使依托泊苷诱导的 DNA 损伤减少,导致细胞耐药^[8]。所以,LSCs 所具有的调控细胞生长、死亡、细胞周期的 BP 行为及对 TKI 的耐药可能通过 miRNAs 的介导发挥作用。

对核心基因的 PPI 网络筛选,得到 10 个核心基因。核心基因富集的通路主要包括 PI3K-Akt 信号通路、恶性肿瘤中的 miRNAs、FOXO 信号通路等。PI3K/AKT 信号通路在 TKI 耐药中发挥重要作用,抑制 PI3K/AKT 活性可恢复对 TKI 的敏感性,被认为是靶向代谢途径之一^[9];FOXO3 是造血干细胞维持的重要转录因子,有研究结果证明,在 CML 中 FOXO3 的过表达能够抑制 CML 细胞的增殖并增强达沙替尼活性^[10],对 CML 有积极作用。其中 SIRT1、CCND1、KIT、YWHAZ、MCL1、BCL2L1 这 6 个基因在 CML 相关通路上富集。CCND1 即细胞周期素 D1,是调控细胞周期 G1 期的关键蛋白,推动细胞周期由 G1 期进入 S 期。CCND1 上调可导致 G1/S 期检测点缺陷从而促进肿瘤发生,导致细胞增殖失控从而恶化。有研究提出在 CML 中,miR-342-5p 可直接干扰 CCND1 的 3' 非翻译区(UTR),导致 CCND1 表达降低,可能间接影响 BCR-ABL1 转录以降低其表达^[11];BCL2L1 又称 BIM 基因,编码产物属于 BCL-2 家族成员之一的 BH3-only 蛋白家族,是活性最强的促凋亡蛋白之一。有研究发现,表达 BCR-ABL1 的细胞低表达 BIM,抑制 BCR-ABL1 酪氨酸激酶会导致 BIM 水平升高,提出细胞凋亡也可能是 CML 治疗的新靶点^[12]。MCL-1 是一种抗凋亡蛋白,BCR-ABL1 的表达与 MCL-1 的上调有关,MCL-1 的抑制使 BCR-ABL1 阳性细胞易发生细胞凋亡^[13]。SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖的蛋白去乙酰化酶,其活化可促进 CML 细胞存活和增殖,抑制 SIRT1 能够使 CML 细胞对伊马替尼诱导的细胞凋亡敏感^[14]。KIT 是干细胞中细胞信号传导的重要组成部分,其参与细胞维持和分化的关键功能,可替代 BCR-ABL1 酪氨酸激酶来激活生存信号^[15],并且能够调控 CML 细胞对 TKI 的敏感性^[16],在 CML 中发挥

重要作用。因此,我们可以推断这些基因可能与 LSCs 促 CML 发生、复发和 TKI 耐药密切相关。此外,根据 miRNA-mRNA 调控网络,可看出这些基因主要受 miR-193b-3p、miR-9-5p 调控,所以 miR-193b-3p、miR-9-5p 可能是消除 CML-LSCs 的潜在治疗靶点。

综上,利用生物信息学可筛选出调控 CML-LSCs 的关键 miRNAs 及其靶基因,为 CML-LSCs 的治疗提供了新的治疗思路和策略。但是,因为本项研究是基于芯片样本的生物信息学分析,目前只停留在前期基础数据分析以及预测方面,结果往往由原始样本决定,很多因素都会对结果产生干扰,所以需要大样本数据以及基础实验对结果进行验证以及更加深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 邹秀平,杨壮志,王雅丹,等. 氟马替尼克服 BCR-ABL1 t317l 突变的慢性髓性白血病一例[J]. 临床内科杂志,2022,39(10):682-683.
- [2] Talati C, Pinilla-Ibarz J. Resistance in chronic myeloid leukemia: definitions and novel therapeutic agents[J]. Curr Opin Hematol, 2018, 25(2):154-161.
- [3] Ng JJ, Ong ST. Therapy Resistance and Disease Progression in CML: Mechanistic Links and Therapeutic Strategies[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2022, 17(6):181-197.
- [4] He B, Zhao Z, Cai Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14):2628-2647.
- [5] Wang WZ, Pu QH, Lin XH, et al. Silencing of miR-21 sensitizes CML CD34⁺ stem/progenitor cells to imatinib-induced apoptosis by blocking PI3K/AKT pathway[J]. Leuk Res, 2015, 39(10):1117-1124.
- [6] Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, et al. Endogenous Tumor Suppressor microRNA-193b: Therapeutic and Prognostic Value in Acute Myeloid Leukemia[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(10):1007-1016.
- [7] Sun H, Zhang Z, Luo W, et al. NET1 Enhances Proliferation and Chemoresistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells[J]. Oncol Res, 2019, 27(8):935-944.
- [8] Kania EE, Carvajal-Moreno J, Hernandez VA, et al. hsa-miR-9-3p and hsa-miR-9-5p as Post-Transcriptional Modulators of DNA Topoisomerase II α in Human Leukemia K562 Cells with Acquired Resistance to Etoposide[J]. Mol Pharmacol, 2020, 97(3):159-170.
- [9] Singh P, Kumar V, Gupta SK, et al. Combating TKI resistance in CML by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway in combination with TKIs: a review[J]. Med Oncol, 2021, 38(1):10.
- [10] Pellicano F, Scott MT, Helgason GV, et al. The antiproliferative activity of kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells is mediated by FOXO transcription factors[J]. Stem Cells, 2014, 32(9):2324-2337.
- [11] Wu YY, Lai HF, Huang TC, et al. Aberrantly reduced expression of miR-342-5p contributes to CCND1-associated chronic myeloid leukemia progression and imatinib resistance[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10):908.
- [12] Mak DH, Wang RY, Schober WD, et al. Activation of apoptosis signaling eliminates CD34⁺ progenitor cells in blast crisis CML independent of response to tyrosine kinase inhibitors[J]. Leukemia, 2012, 26(4):788-794.
- [13] Amarante-Mendes GP, Rana A, Datoguia TS, et al. BCR-ABL1 Tyrosine Kinase Complex Signaling Transduction: Challenges to Overcome Resistance in Chronic Myeloid Leukemia[J]. Pharmaceuticals, 2022, 14(1):215.
- [14] Yuan H, Wang Z, Li L, et al. Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis[J]. Blood, 2012, 119(8):1904-1914.
- [15] Belloc F, Airiau K, Jeanneteau M, et al. The stem cell factor-c-KIT pathway must be inhibited to enable apoptosis induced by BCR-ABL inhibitors in chronic myelogenous leukemia cells[J]. Leukemia, 2009, 23(4):679-685.
- [16] Corbin AS, O'Hare T, Gu Z, et al. KIT signaling governs differential sensitivity of mature and primitive CML progenitors to tyrosine kinase inhibitors[J]. Cancer Res, 2013, 73(18):5775-5786.

(收稿日期:2022-08-10)

(本文编辑:余晓曼)