

· 论 著 ·

# 调控人骨桥蛋白的 miRNA 预测研究

苏 里 赵志军 梅小龙 杨建华 包文平 张春阳

**【摘要】目的** 利用生物信息学方法预测调控人骨桥蛋白的微小 RNA(miRNA),为进一步实验验证特定 miRNA 和人骨桥蛋白基因之间的关系提供依据。**方法** 分别应用 miRGen Targets 和 miRanda 数据库确定与人骨桥蛋白有密切关系的 miRNA 分子。**结果** 经 miRGen Targets 数据库预测出 28 个 miRNA 分子可能作用于人骨桥蛋白基因;miRanda 数据库显示 miR-539,miR-181,miR-340,miR-376c 和 miR-154 5 个 miRNAs 在人骨桥蛋白的负调控过程可能发挥作用;将两个数据库结果交集后发现 miR-539,miR-181,miR-33b 和 miR-377 4 个 miRNA 分子最有可能参与调控人骨桥蛋白。**结论** 利用生物信息学软件可对调控人骨桥蛋白的 miRNA 进行预测,为研究骨桥蛋白的功能和生物学特性提供新手段。

**【关键词】** 微小 RNA;骨桥蛋白;生物信息学;靶基因预测

**【文章编号】** 1009-153X(2016)04-0210-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** Q 786

## Study of the prediction of microRNA regulating human osteopontin

SU Li, ZHAO Zhi-jun, MEI Xiao-lun, YANG Jian-hua, BAO Wen-ping, ZHANG Chun-yang. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Baotou 014010, China

**【Abstract】 Objective** To predict some microRNAs (miRNA) regulating human osteopontin (OPN) with bioinformatic softwares in order to provide a valid theoretical support for further experimental research on the relationship between specific miRNA and human OPN gene. **Methods** Integrated bioinformatic database including miRGen Target and miRanda were respectively applied to identify the number of miRNAs which closely related with human OPN. **Results** The miRGen Target database showed that 28 miRNAs might be involved in the degradation of OPN and miRanda database showed that 4 miRNAs might play an important role in the process of the negative regulation of OPN. The intersection of two database found that miR-539, miR-181, miR-33b and miR-377 were most likely involved in regulation of human OPN. **Conclusion** The prediction of miRNA regulating human OPN with bioinformatical methods can provide a new strategy for the study of the property as well as function of OPN.

**【Key words】** MicroRNA; Osteopontin; Bioinformatics; Target gene prediction

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是 1985 年 Franzen 和 Heinegard<sup>[1]</sup>从小牛长骨分离出来的一种骨基质蛋白。OPN 在人体组织细胞中分布广泛,特别是在骨的活跃沉积和矿化区,且不同阶段的成骨细胞均能合成和分泌 OPN 分子。OPN 参与多种生理和病理过程<sup>[2]</sup>。OPN 被认为是成骨细胞成熟分化的标志,在骨基质的矿化和重吸收过程中起重要作用<sup>[3]</sup>。

近年来,微小 RNA(microRNA, miRNA)成为科学界越来越关注的研究热点。研究已发现 30 多个 miRNA 在骨代谢过程中发挥着重要作用。据推测,人 OPN 基因的表达可能受到 miRNA 分子的调控。有学者发现 miRNA 本身及其与靶基因的相互作用

具有某些规律,可以通过编程进行预测。近几年来,miRNA 的靶基因预测软件迅速兴起并快速发展。本研究利用几种常用的生物信息学软件来预测调控人 OPN 的 miRNA,为进一步研究人 OPN 的特性和功能提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 材料 利用 miRanda 数据库(<http://www.microrna.org/>)和 miRGen Targets 数据库(<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>)来预测调控人 OPN 的 miRNA,并将预测结果进行分析说明。

## 1.2 方法

1.2.1 miRanda(microrna.org)数据库的使用 miRanda 数据库是 Memorial Sloan-Kettering 癌症研究中心的研究人员开发的软件和数据库,是最早利用生物信息学方法对 miRNA 靶基因进行预测的软件。miRanda 基于序列匹配、miRNA 与 mRNA 双链的热稳定性以及靶位点的保守性三个方面进行分析。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.04.006

基金项目:国家自然科学基金项目(81360164);内蒙古自然科学基金项目(2014MS0806)

作者单位:014010 内蒙古包头,包头医学院第一附属医院神经外科(苏 里、赵志军、梅小龙、杨建华、包文平、张春阳)

通讯作者:张春阳,E-mail:zhangchunyang\_1964@aliyun.com

miRanda 数据库具有使用范围广、运行方便的特点。为了获得客观数据,我们设置以下标准对 OPN 基因上靶位点的 miRNA 进行筛选:mirSVR 分值 $\leq -0.1$ ;PhastCons 分值 $\geq 0.5$ 。

1.2.2 miRGen Targets 数据库的使用 miRGen Targets 数据库是一种整合型数据库,利用 DIANA-microT、miRanda (microrna. org)、miRanda (miRBase)、PicTar (4-way)、PicTar (5-way) 和 TargetScans 等软件以分别或组合的方式对调控基因的 miRNA 进行预测。本研究主要对 miRGen Targets 数据库的页面上的 3 个参数进行了设置:第 1 个参数“Organism”是选择物种类型,其下拉菜单中选择“H sapiens”;第 2 个参数“Target Type”是选择所用预测软件的算法,本试验选用 DIANA-microT、miRanda (microrna.org)、miRanda (miRBase)、PicTar (4-way)、PicTar (5-way) 和 TargetScanS 软件预测结果的并集(固定组合);第 3 个参数“Gene ID”是“GenBank Identifier”,本试验采用“Gene Symbol”,然后在其前边空格处填写基因符号,随后点击“Submit Query”完成操作。

2 结果

2.1 miRGen Targets 预测结果 鉴于计算机模拟在预测 miRNA 靶基因时存在一定的局限性,因而本试验采用了这些软件预测结果的并集。采用 miRGen Targets 预测结果显示,对人 OPN 基因有调控作用的 miRNA 分子有 28 个(表 1)。

2.2 miRanda(microrna.org)预测结果 经过合理设置参数,利用 miRanda 数据库预测到对人 OPN 基因有调控作用的 miRNA 有 17 个,调控位点有 17 个(表 2),发现 miR-539、miR-181、miR-340、miR-376c、miR-154 下调基因的可能性较大。

从表 2 中数据可以看出,有些 miRNA 调控 OPN 基因的位点可能不止一个,如 miR-539、miR-154

等;同一位点也可能存在多个 miRNA 调控,如 OPN 基因位点第 90nt 和 409nt 处,miR-181a、miR-181b、miR-181c 和 miR-181d 就有可能共同参与调控。同样,我们发现有许多 miRNA 在 OPN 基因位点上交叉(重叠)调控,部分原因可能是它们来自同一家族。另外,从表中也可以看出,mirSVR 分值都小于-0.1,分值越低,表明 miRNA-mRNA 二者结合的热稳定性越强,相应的 miRNA 下调基因的可能性也就越大。miR-539、miR-181、miR-340、hsa-miR-376c、miR-154 这 5 个 miRNA 的 mirSVR 分值为最低,有可能参与调控 OPN。除此之外,也可从中找出这些 miRNA 调控的潜在位点。PhastCons 分值(衡量人与其它脊椎动物之间 miRNA 保守性)的取值范围都在 0.5~0.7 之间,也进一步说明了上述结论的合理性。

2.3 两个数据库预测结果的交集 将两个数据库预测结果交集后发现,共同的 miRNA 分子有 miR-539、miR-181、miR-33b 和 miR-377,综合以上因素分析后得出 miR-181、miR-539 最有可能参与调控人 OPN。

3 讨论

Bhattacharya 等<sup>[4]</sup>在肝癌细胞株中发现 miR-181a 可降低 OPN 的表达,从而抑制依赖 OPN 的肝癌细胞的转移能力,但是没有关于 OPN 与 miR-539 的报道,为了进一步了解 miR-539,我们采用同样的方法对 miR-539 调控的靶基因进行预测,发现有众多的基因可能被其调控,其中发现包括一些与骨代谢相关的基因和信号通路,如 RUNX2、PTH 和 BMP 信号途径等。因此,可以从理论上认为 miR-539 可能参与成骨细胞的分化,而这些过程又与 OPN 的功能密切相关;而 miR-539 与 OPN 之间的具体关系则需要通过进一步的实验研究与理论分析来阐明。

本研究利用生物信息学方法得出了可能参与调控人 OPN 的 miRNA:miR-539、miR-181、miR-33b 和

表 1 采用 miRGen Targets 数据库预测调控人类骨桥蛋白基因的 miRNA

基因	预测的 miRNAs			
SPP1(骨桥蛋白)	miR-105	miR-126	miR-130a	miR-130b
	miR-151	miR-181a	miR-181b	miR-181c
	miR-181d	miR-219	miR-220	miR-299-5p
	miR-323	miR-33	miR-376a	miR-377
	miR-424	miR-489	miR-508	miR-527
	miR-539	miR-577	miR-579	miR-580
	miR-586	miR-630	miR-802	miR-96

表 2 采用 miRanda 数据库预测调控人类  
骨桥蛋白基因的 miRNA

miRNA	miRNA 调控 OPN 基因位点	mirSVR 分值	PhastCons 分值
miR-539	3	-1.197 7	0.6705
miR-539	72	-0.148 1	0.627 4
miR-340	38	-0.934 4	0.627 4
miR-181a	90	-1.051 7	0.627 4
miR-181a	409	-1.272 0	0.566 0
miR-181b	90	-1.051 7	0.627 4
miR-181b	409	-1.272 0	0.566 0
miR-181c	90	-1.054 3	0.627 4
miR-181c	409	-1.272 0	0.566 0
miR-181d	90	-1.054 3	0.627 4
miR-181d	409	-1.272 0	0.566 0
miR-376c	197	-0.831 4	0.627 4
miR-33b	219	-0.151 2	0.627 4
miR-495	241	-0.417 2	0.627 4
miR-495	341	-0.259 9	0.627 4
miR-495	367	-0.196 5	0.627 4
miR-433	256	-0.373 3	0.627 4
miR-542-3p	327	-0.363 8	0.627 4
miR-377	388	-0.548 2	0.627 4
miR-154	484	-1.032 6	0.504 6
miR-34a	493	-0.253 8	0.504 6
miR-34c-5p	493	-0.256 1	0.504 6
miR-449b	491	-0.258 3	0.504 6
miR-449a	491	-0.258 3	0.504 6

miR-377。但这仅是初步的理论分析,而且存在缺陷,如有些 miRNA 有可能调控 OPN mRNA 的编码部分,这是本研究的预测所达不到的;如果合并考虑 miRNA 的二级结构,则会更复杂。另外,在预测软件的选择方面,为了弥补 miRGen Targets 数据库预测到的 miRNA 数目较少以及缺乏 miRNA 调控 OPN 的数值等缺点,我们采用了 miRanda 数据库,其敏感性尚可,但由于预测数目较多,增加了数据的复杂度,人为设定阈值可能会导致假阴性结果<sup>[5,6]</sup>。不同的计算方法各有优缺点,可能会预测出不同的 miRNA 结合位点,只有使用多种算法进行预测才能得到较客观结果。至于本研究预测到的 4 个 miRNA 是否真的调控人 OPN 基因还有待实验的进一步验证。

目前在已发现的 miRNA 中,只有很少的 miRNA 的功能及机制被阐明,因此发现 miRNA 的靶基因是

理解它们调控作用的关键一步。由于大规模通过试验方法发现 miRNA 靶基因的技术还不成熟,经实验证实的靶基因又很少,所以通过生物信息学方法预测 miRNA 的靶基因仍然是当今的主要手段。一旦生物信息学方法预测成功,即二者的结合位点具有可接近性,就可通过以下标准进行验证:①miRNA/mRNA 共表达;②miRNA/mRNA 相互作用得到验证;③给定 miRNA 对其蛋白表达有可预测的影响,即用此 miRNA 的类似物可减少靶基因表达水平,相反,用此 miRNA 特异性抑制剂可增加靶基因的表达水平;④miRNA 介导靶基因表达的调控导致相应的生物学功能的改变<sup>[7]</sup>。疾病特异性的 miRNA 不断被发掘和鉴定,为疾病相关靶基因的研究提出了新的途径。鉴于 OPN 可参与调控成骨细胞的分化及动脉硬化等过程,与肿瘤、骨代谢疾病和冠心病等疾病密切相关,因此,研究调控人 OPN 基因的 miRNA,能丰富 OPN 在生物体内发挥调节功能的细胞和分子机制,并为一些相关疾病的治疗带来新思路。

【参考文献】

[1] Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix [J]. Biochem J, 1985, 232(3): 715-724.

[2] 何主强,杨国平,赵洪洋. 骨桥蛋白及整合素β3亚基与脑膜瘤恶性程度相关性[J]. 中国临床神经外科杂志, 2014, 19(11): 665-667.

[3] 史欣,张鹏飞,孙玉芬,等. 骨桥蛋白影响矿化液诱导牙髓干细胞成骨分化能力的研究[J]. 口腔医学, 2014, 34(8): 566-569.

[4] Bhattacharya SD, Garrison J, Guo H, et al. Micro-RNA-181a regulates osteopontin-dependent metastatic function in hepatocellular cancer cell lines [J]. Surgery, 2010, 148(2): 291-297.

[5] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. Nature, 2005, 436: 214-220.

[6] Long D, Lee R, Williams P, et al. Potent effect of target structure on microRNA function [J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14: 287-294.

[7] 孙海婷. microRNA 作用靶基因的预测[J]. 科技创新与应用, 2013, 23: 57-58.

(2015-12-17 收稿, 2016-02-09 修回)