

# 人类表皮细胞衰老相关的 microRNA 差异性表达 与信号通路分析

韩银淑

(厦门医学院, 厦门 361023)

**【摘要】** **目的** 探讨衰老过程中表皮稳态的相关机制。**方法** 使用生物信息学分析来鉴定与年龄有关的 microRNAs 以及下游调控的靶基因,通过微阵列数据[基因和 microRNAs(miRNA)]使用 GEO2R 软件进行 GO 分析和 KEGG 信号通路分析。使用 Cytoscape(v. 3. 5. 1)预测 miRNA-基因互作网络和关键基因。**结果** 通过生物信息学技术,确定了人类表皮差异 miRNA 以及其调控的靶基因参与的信号通路。**结论** 表皮信号通路的确定为改善年龄相关性皮肤疾病的治疗提供理论依据。

**【关键词】** microRNA; 表皮; 衰老; 生物信息

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0079-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 10. 013

## Differential expression and signal transduction analysis of microRNA related to aging of human epidermal cells

HAN Yinshu

(Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the mechanisms of epidermal homeostasis during aging. **Methods** Bioinformatic analysis software was used for GO analysis and KEGG signal pathway analysis based on microarray data [genes and microRNAs (miRNAs)]. Cytoscape (v. 3. 5. 1) was used to predict the miRNA-gene interaction network and key genes. **Results** The result of this study revealed the differential expression of miRNAs related to the human epidermis and that their target genes are involved in associated signaling pathways. **Conclusions** The identified epidermal signaling pathways provide a theoretical basis for improving the treatment of age-related skin diseases.

**【Keywords】** microRNA; epidermis; senescence; biological information

人类的表皮是非常重要的天然屏障,用来抵御环境中化学、物理和微生物的影响。位于真皮与表皮连接处的基底层分布有干细胞,它不断的分化成新的角质形成细胞(keratinocytes, KC)以更新表皮,而这些角质形成细胞在表层脱落的过程中分化、死亡。尽管表皮处于不断更新的状态,但随着角质形成细胞更新速率的下降,衰老即产生。衰老与诸如表皮变薄、弹性组织缺失、黑色素细胞损失与皮肤

苍白和透明度增加以及屏障功能降低相关。相反,角质形成细胞过度活化会引起的表皮过度增生及炎症细胞的浸润导致的局部炎症。如银屑病,癌前期病变如光线性角化病,原位癌如 Bowen 病,皮肤癌如基底细胞癌,鳞状细胞癌。角质形成细胞的分子机制和信号传导途径在很大程度上是未知的,本研究试图通过基因调控的视角揭示参与人类表皮组织衰老的分子机制与信号通路。

miRNA 是内源性 22 个核苷酸的小非编码 RNA,其通过靶向 mRNAs 并触发翻译抑制或 RNA 降解来控制基因表达<sup>[1]</sup>。这些非编码 RNA 与靶 mRNA 的 3' 端结合,其结合的特异性主要由 miRNA 的启动区域(从核苷酸 2~8 位)决定。通常情况下 miRNA 可同时调控数百个相同途径的靶基因,并且为了增加这种转录后调节的复杂性,几种 miRNA 可以靶向相同的转录物<sup>[2]</sup>。miRNAs 是生物过程所必需的<sup>[3-4]</sup>。许多 miRNA 以组织特异性方式表达<sup>[5]</sup>。在横纹肌中,miRNA 参与其生理过程,如肌形成、纤维类型转换和再生<sup>[6-8]</sup>。因此,miRNA 表达水平的失调与病理状态有关<sup>[9-10]</sup>。例如,SOD1G93 A 转基因小鼠中 miRNA-206 的抑制诱导严重萎缩<sup>[11]</sup>。然而,miRNA 在人类表皮组织中的参与情况和所调控的信号通路很大程度上是未知的。

为了确定哪些 miRNA 和其调控的信号通路与表皮组织衰老过程相关,本课题组选择了年轻人和老年人的表皮组织 GEO 芯片,检查不同年龄下 miRNA 表达的差异,通过 Cytoscape 软件(v. 3. 5. 1)预测分析下游靶基因并筛选出关键基因分析其参与的细胞活动和参与的信号通路。总之,这些结果在一定程度上提示与衰老相关的 miRNA 在表皮细胞衰老过程中潜在的调控作用,为进一步治疗和抵抗衰老提供新的理论依据和方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 微阵列芯片分析

本研究使用二种芯片,包括基因芯片、miRNA 芯片。使用 GEO2R 软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>)分析芯片数据。在所有实验组中,差异表达的基因,miRNA 均通过显著性水平  $P < 0.05$  或  $|\log_{2}FC| > 1$  来鉴定。

### 1.2 功能富集分析

可视化集成数据库 v. 6. 8 (DAVID v. 6. 8) 用来进行基因注释。“京都基因和基因组百科全书”(KEGG)和基因本体论(GO)用来对基因进行生物功能及通路分析。GO 分析仅限用于生物过程分析。Cytoscape (v. 3. 5. 1) 平台上的 ClueGO 和 CluePedia 插件用于可视化分析。GO 术语基于共享基因的功能性进行连接,并根据功能相似性进行分组。

### 1.3 网络建设和分析

关于蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)的信息来源

于检索相互作用的基因/蛋白质数据库的搜索工具(<https://string-db.org/>)。选择经实验验证,并且得分  $\geq 0.4$  的基因。关于 miRNA 基因相互作用的信息是使用 Cytoscape 上相互作用的 miRNA 基因的检索工具(v. 3. 5. 1)推导。

## 2 结果

### 2.1 通过生物信息学分析鉴定了年轻与老年表皮组织 miRNA 芯片

使用 GEO2R 方法的 GEO 数据库筛选老年(55~66 岁)和年轻人(20~25 岁)角质形成细胞中差异表达的 miRNA 的分层聚类基因芯片(GSE101493)。结果显示 11 个 miRNA 上调,18 个 miRNA 下调(表 1)。

### 2.2 通过生物信息学分析鉴定年龄差异的基因芯片

使用 GEO2R 方法的 GEO 数据库筛选来自年轻人和老年人的表皮组织差异表达基因芯片(GSE18876)。筛查结果显示,基于倍数变化(FC)或  $P$  值( $|\log_{2}FC| > 0.8$  或  $P < 0.05$ ),不同年龄表皮组织基因芯片中有 105 个差异表达基因。其中,有 17 个年龄相关基因共同上调,17 个年龄相关基因共同下调。使用火山图来显示二种微阵列上所有基因的差异(图 1)。

### 2.3 年龄差异的 miRNA 与年龄差异基因的相互作用

为了提高预测的准确性,使用 Cytoscape 软件(v. 3. 5. 1),选择了差异最大的前 5 个上调的 miRNA 和前 5 个下调的 miRNA,预测与它们相互作用基因。然后筛选了与基因芯片共表达的基因,为基因芯片中上调的基因与下调的 miRNA 预测的基因以及下调的基因与上调的 miRNA 预测基因的交集(图 3)。选择差异最大的前 5 个下调的 miRNA 和前 5 个上调的 miRNA 用于互作网络分析(图 4)。上调的 miRNA 预测靶基因与差异基因(下调)交集,如表 2 显示,GO 分析的结果为这些差异基因主要与  $\omega$  羟化酶 P450 途径、NO 生物合成过程、氧化还原酶活性、芳香化酶活性、凋亡过程的正调控、氧结合、细胞增殖负调控等相关。下调的 miRNA 预测靶基因与差异基因(上调)交集,GO 分析的结果显示与细胞成分运动的调节、凋亡过程、蛋白质磷酸化、细胞或亚细胞的运动、程序性细胞死亡等功能相关,见表 3。

表 1 上、下调差异表达的 miRNA 在年轻与老年表皮组织中的表达差异

Table 1 Up and down regulated differentially expressed miRNAs in young and old epidermal tissues

miRNA_ID	LOGFC	P-Value	趋势 (Trend)
oan-miR-29b-5p	1. 76905	0. 011883	down
mmu-miR-3087-5p	1. 670696	0. 009258	down
ppt-miR1039-3p	1. 557771	0. 000367	down
mmu-miR-7056-5p	1. 492088	0. 030339	down
rno-miR-3075	1. 487298	0. 02957	down
mmu-miR-326-5p	1. 438683	0. 040195	down
dme-miR-310-5p	1. 326323	0. 026183	down
tgu-miR-2978	1. 263628	0. 01834	down
mmu-miR-6980-5p	1. 204425	0. 029309	down
mtr-miR5276	1. 169910	0. 001602	down
hsa-miR-7112-5p	1. 155288	0. 031357	down
bmo-miR-31-5p	1. 109728	0. 033239	down
mmu-miR-1962	1. 095323	0. 024889	down
hsa-miR-6824-5p	1. 049195	0. 003465	down
osa-miR319a-3p	1. 043643	0. 016221	down
mmu-miR-7072-5p	1. 043348	0. 012739	down
mmu-miR-6972-5p	1. 037305	0. 032902	down
hsa-miR-4685-5p	1. 02953	1. 77E-05	down
hsa-miR-8060	1. 013315	0. 006764	up
bdi-miR7785-3p	1. 016821	0. 042025	up
hsa-miR-29b-2-5p	1. 025588	0. 018116	up
rno-miR-29b-2-5p	1. 025588	0. 018116	up
sko-miR-4835-3p	1. 045775	0. 001056	up
mmu-miR-431-5p	1. 294817	0. 025468	up
hsa-miR-431-5p	1. 294817	0. 025468	up
rno-miR-431	1. 294817	0. 025468	up
mml-miR-431	1. 294817	0. 025468	up
ptr-miR-431	1. 294817	0. 025468	up
ppy-miR-431	1. 294817	0. 025468	up

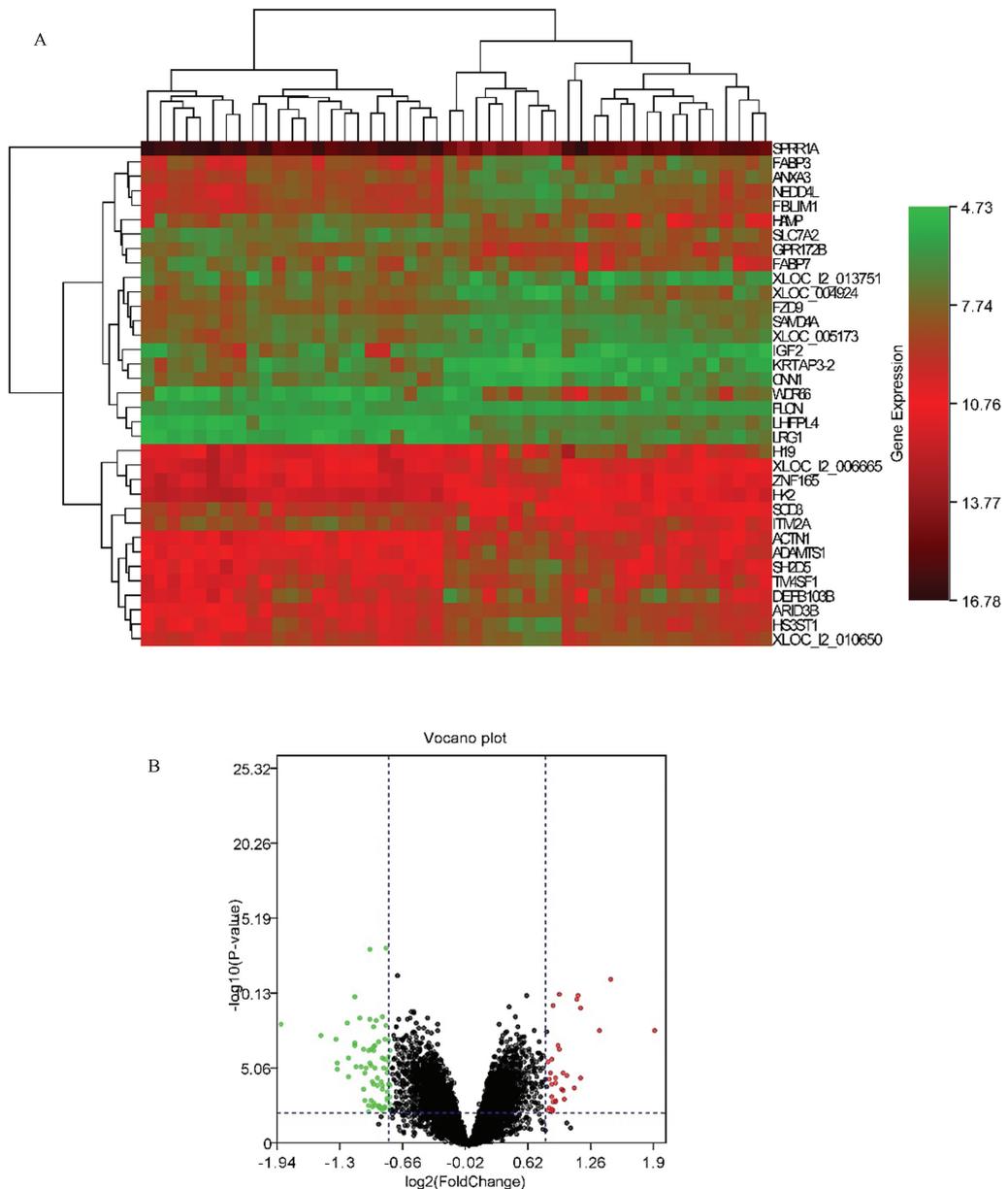
表 2 差异基因的功能富集分析 (下调基因)

Table 2 Functional enrichment analysis of differentially expressed genes (Down-regulated genes)

基因编号 ID	富集功能 GO Features	P 值 P-Value
GO:0051270	regulation of cellular component movement	0. 00
GO:0048522	positive regulation of cellular process	0. 01
GO:0048518	positive regulation of biological process	0. 01
GO:0032879	regulation of localization	0. 03
GO:0006915	apoptotic process	0. 03
GO:0006468	protein phosphorylation	0. 03
GO:0006928	movement of cell or subcellular component	0. 03
GO:0001932	regulation of protein phosphorylation	0. 03
GO:0012501	programmed cell death	0. 03
GO:0042325	regulation of phosphorylation	0. 04
GO:0008219	cell death	0. 04
GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic process	0. 04
GO:0051254	positive regulation of RNA metabolic process	0. 05
GO:0009967	positive regulation of signal transduction	0. 05
GO:0048584	positive regulation of response to stimulus	0. 05
GO:0010604	positive regulation of macromolecule metabolic process	0. 05
GO:0048731	system development	0. 05
GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	0. 05
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	0. 05

注:18 个下调的基因参与的生物学进程。

Note. Enrichment biological process analysis of 18 down-regulated genes.



注:A:由无监督聚类产生的热图,其将样品分成年轻人和老年人。B:两个芯片所有基因的火山图。

图1 差异基因表达和分析

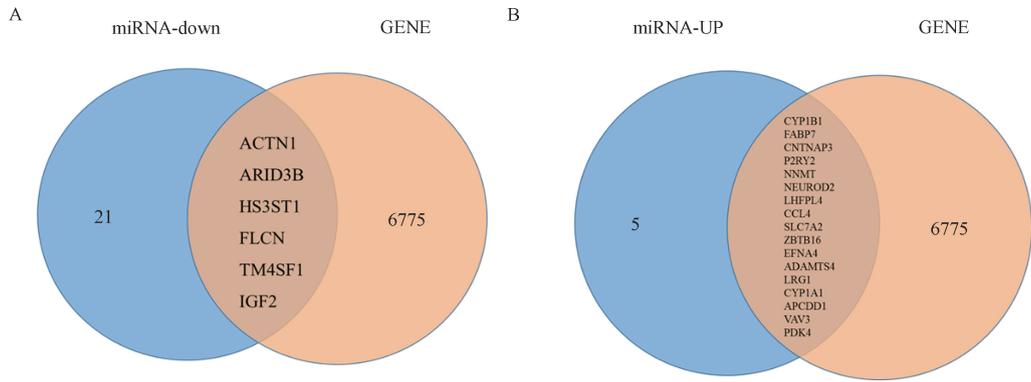
Note. A: Heat map generated by unsupervised clustering, which divided samples into young and old groups. B: Volcano map for all genes of the two chips.

Figure 1 Differential gene expression and analysis

## 2.4 核心基因相互作用和通路富集分析

将共表达的基因使用在线蛋白质相互作用预测软件(<https://string-db.org/>)筛选核心基因。随后,使用 DAVID 在线分析数据库对筛选的核心基因进行 KEGG 通路分析。保留  $P < 0.05$  的通路用于 PPI 作图。下调 miRNA 调控靶基因

KEGG 途径富集分析结果显示,该基因主要富集在局灶性粘连、PI3K/AKT 信号通路、mTOR 信号通路、蛋白质多糖的代谢通路。上调 miRNA 调控靶基因 KEGG 途径富集分析 PPAR 信号通路、趋化因子信号通路、PI3K/AKT 信号通路、色氨酸代谢通路等。



注:A:下调的 miRNA 与基因芯片中上调基因的交集。B:上调的 miRNA 和基因芯片中下调基因的交集。

图 2 miRNA 与基因的相互作用

Note. A: Down regulated miRNA and the intersection of up-regulated genes in the gene chip. B: Up-regulation of miRNA and the intersection of down-regulated genes in the gene chip.

Figure 2 Interactions between miRNAs and genes

表 3 差异基因的功能富集分析(上升基因)

Table 3 Functional enrichment analysis of differentially expressed genes(Up-regulated genes)

基因编号 ID	富集功能 GO Features	P 值 P-Value
GO:0019373	epoxygenase P450 pathway	0.016
GO:0050850	positive regulation of calcium-mediated signaling	0.018
GO:0070330	aromatase activity	0.022
GO:0043065	positive regulation of apoptotic process	0.029
GO:0042493	response to drug	0.029
GO:0008202	steroid metabolic process	0.038
GO:0019825	oxygen binding	0.038
hsa00380	tryptophan metabolism	0.045
GO:0005576	extracellular region	0.047
GO:0004497	monooxygenase activity	0.047
GO:0008285	negative regulation of cell proliferation	0.048

注:11 个上调基因参与的生物学进程。

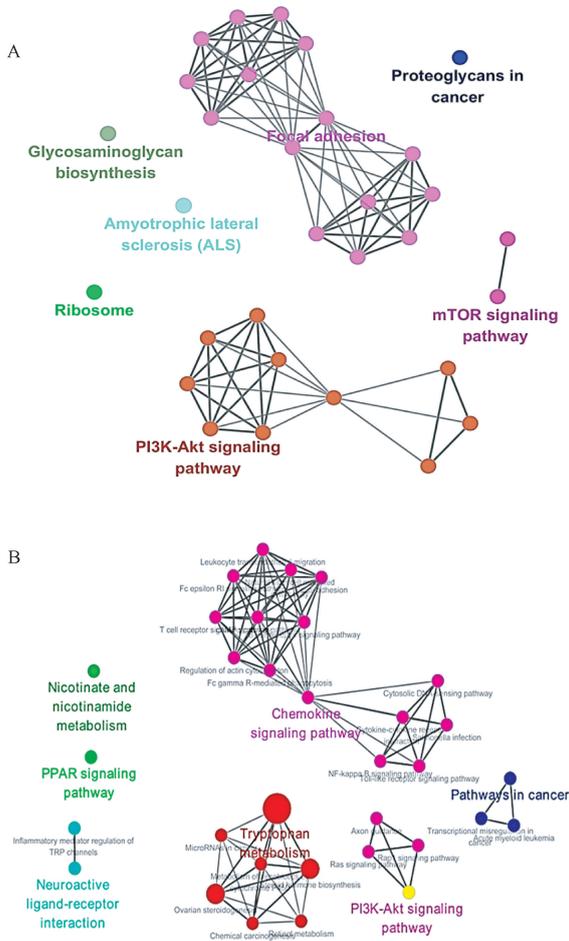
Note. Enrichment biological process analysis of 11 up-regulated genes.

### 3 讨论

这些发现表明, microRNA 参与了人类表皮衰老的微调。最近的研究结果表明, miRNA 作为一种新型基因表达调控因子在银屑病中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。miRNA 的成熟涉及多个步骤, 此过程中依次生成两种中间形式的 miRNA, 即原代 (pri) 和前体 (前) miRNA。同时, RNase III 酶 Drosha 和配偶双链 RNA (dsRNA) 结合蛋白 Dgcr8 切割 pri-miRNAs, 其被 Exportin5 识别并随后从细胞核转运到细胞质的发夹形前 pre-miRNA。另一个 RNase III 酶 Dicer 切割 pre-miRNA 以释放 22nt 核苷酸 (nt) dsRNA 双链体, 即具有 2nt 3' 突出端的 miRNA / miRNA 双链体。miRNA 双链中的一条链保存在 RISC 复合物中, 另一条链则排出复合物外并迅速降解<sup>[13]</sup>。关于银屑病皮肤中异常表达的小 ncRNAs (sncRNAs) 的研究

结果提示 sncRNA 在牛皮癣中的功能作用<sup>[12]</sup>, 大量实验结果显示在皮肤早期发育中占重要部分的 miRNA 也可以在银屑病中以关键的方式起作用。这与“生命早期出现错误可能会在生命后期再次出现错误”的理念是一致的。

为了解这些 miRNA 控制的机制, 本课题组同时筛选了不同年龄表皮的 mRNA 表达谱。在与差异的 miRNA 预测的基因取交集之后, 研究结果显示上调的 miRNA 调控的靶基因主要与细胞运动功能的调节、细胞凋亡、蛋白质磷酸化、细胞程序性死亡、有机氮化合物生物合成过程、RNA 代谢过程的正调控、信号转导的正调控、大分子代谢调控等。下调的 miRNA 调控的靶基因主要与 ω 羟化酶 P450 途径、(NO) 生物合成过程、氧化还原酶活性、芳香化酶活性、凋亡过程的正调控、氧结合、细胞增殖负调控等相关。特别值得注意的是上述信号通路往往



注:A:18个下调基因的 KEGG 通路分析。B:11个上调基因的 KEGG 通路分析。

图3 差异基因的 KEGG 分析

Note. A: KEGG pathway analysis of 18 down-regulated genes. B: KEGG pathway analysis of 11 up-regulated genes.

Figure 3 KEGG analysis of differentially expressed genes

是肿瘤组织异常激活的通路。上述结果提示衰老与肿瘤的发生发展有共同的信号通路参与。上调 miRNA 调控靶基因 KEGG 途径富集分析结果显示其主要富集在局灶性粘连、PI3K/AKT 信号通路、mTOR 信号通路、蛋白质多糖的代谢通路。上调 miRNA 调控靶基因 KEGG 途径富集分析 PPAR 信号通路、趋化因子信号通路、PI3K/AKT 信号通路、色氨酸代谢通路等。值得注意的是,上调与下调 miRNA 调控的靶基因均对 PI3K/AKT 信号通路具有调控作用,同时 mTOR 信号通路、PPAR 信号通路、趋化因子信号通路均在肿瘤的发生发展中起重点作用。这在某种程度上解释了皮肤肿瘤的发生发展病因。

目前在人类表皮衰老领域的 miRNA 研究较少,二代测序在鉴定 miRNA 并分析其在皮肤形态发生和体内平衡中的特定功能方面取得了重大进展。此研究从基因水平和 miRNA 水平多维度确定了参与并调控衰老的潜在原因,所预测的结果为衰老疾病的治疗和预测以及皮肤肿瘤疾病发生发展的机制研究提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy[J]. Dis Model Mech. 2013,6(1), 25-39.
- [2] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. Nature, 2005, 433(7027):769-773.
- [3] Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development[J]. Nat Genet. 2003,35, 215-217.
- [4] Wienholds E, Koudijs MJ, Eeden FJMV, et al. The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development[J]. Nat Genet, 2003, 35(3):217-218.
- [5] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. Curr. Biol. 2002,12, 735-739.
- [6] Zacharewicz E, Lamon S, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease[J]. Front Physiol. 2013, 4, 266.
- [7] Luo W, Nie Q, Zhang X. MicroRNAs involved in skeletal muscle differentiation[J]. J Genet Genomics. 2013, 40, 107-116.
- [8] Williams AH, Liu N, van Rooij E, et al. MicroRNA control of muscle development and disease[J]. Curr Opin Cell Biol. 2009, 21(3), 461-469.
- [9] Eisenberg I, Eran A, Nishino I, et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(43):17016-17021.
- [10] Greco S, De SM, Colussi C, et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia[J]. FASEB J, 2009, 23(10):3335-3346.
- [11] Williams AH, Valdez G, Moresi V, et al. MicroRNA-206 Delays ALS Progression and Promotes Regeneration of Neuromuscular Synapses in Mice[J]. Science, 2009, 326(5959):1549-1554.
- [12] Bian J, Liu R, Fan T, et al. miR-340 Alleviates Psoriasis in Mice through Direct Targeting of IL-17A[J]. J Immunol, 2018, 201(5):1412-1420.
- [13] Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4):642-655.