

# miRNA 调控恶性黑色素瘤细胞上皮-间充质转化的分子网络及机制

王冬<sup>1,4</sup>, 李永君<sup>2</sup>, 丁楠<sup>2,3</sup>, 王均云<sup>2,3</sup>, 杨琼<sup>2,3</sup>, 杨雅冉<sup>2</sup>, 李艳明<sup>2,3</sup>, 方向东<sup>2</sup>, 赵华<sup>1</sup>

1. 中国人民解放军总医院皮肤科, 北京 100853;
2. 中国科学院北京基因组研究所, 中国科学院基因组科学与信息重点实验室, 北京 100101;
3. 中国科学院大学, 北京 100049;
4. 解放军第 309 医院, 北京 100091

**摘要:** 黑色素瘤是一种极易发生转移的恶性皮肤肿瘤, 具有高度的致死性。上皮-间充质细胞转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在胚胎发育过程中起到非常重要的作用, 同时在肿瘤的发生和恶化过程中也扮演着重要的角色。miRNA 具有广谱的调节能力, 对于肿瘤发生和 EMT 形成都能产生不同程度的影响。本文整合黑色素瘤细胞系转录组和 miRNA 组测序数据, 在转录组数据中筛选得到参与肿瘤 EMT 过程的基因, 通过 Mirsystem 软件预测并从 miRNA 组数据中筛选出与之负相关的 11 个 miRNA, 包括 miR-130a-3p、miR-130b-3p、miR-125a-5p、miR-30a-3p、miR-195-5p、miR-345-5p、miR-509-3-5p、miR-374a-5p、miR-509-5p、miR-148a-3p 和 miR-330-3p。经过生物信息学分析 miRNA 靶基因富集的分子网络和信号途径, 发现了两个与细胞发育和细胞间相互作用密切相关的网络, 以及多个参与调控 EMT 过程的信号通路。对 11 个 miRNA 进行分子生物学验证, 发现 miR-195-5p、miR-130a-3p、miR-509-5p 和 miR-509-3-5p 共 4 个可以调节重要肿瘤基因的 miRNA。本研究运用 mRNA 和 miRNA 两种转录组的测序数据筛选 EMT 相关 miRNA 的方法, 为肿瘤多组学数据整合分析提供了新的研究思路, 并以期能为肿瘤精准基因组学的发展发挥重要的推进作用。

**关键词:** 黑色素瘤; 转录组; miRNA 组; 上皮-间充质细胞转化

## Molecular networks and mechanisms of epithelial-mesenchymal transition regulated by miRNAs in the malignant melanoma cell line

Dong Wang<sup>1,4</sup>, Yongjun Li<sup>2</sup>, Nan Ding<sup>2,3</sup>, Junyun Wang<sup>2,3</sup>, Qiong Yang<sup>2,3</sup>, Yaran Yang<sup>2</sup>, Yanming Li<sup>2,3</sup>, Xiangdong Fang<sup>2</sup>, Hua Zhao<sup>1</sup>

1. Department of Dermatology, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China;
2. CAS Key Laboratory of Genome Sciences and Information, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

收稿日期: 2015-01-18; 修回日期: 2015-04-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 31471236) 和国家高技术研究发展计划项目 (863 计划) (编号: 2012AA022502) 资助

作者简介: 王冬, 在读博士研究生, 专业方向: 恶性肿瘤的表现遗传学研究。Tel: 010-84097538; E-mail: wangdong@big.ac.cn;

李永君, 副研究员, 专业方向: 分子生物学。Tel: 010-84097538; E-mail: yjli@big.ac.cn。

王冬和李永君为并列第一作者。

通讯作者: 赵华, 博士, 主任医师, 研究方向: 皮肤肿瘤及变态反应性皮肤病。E-mail: luckhua301@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-022

网络出版时间: 2015-6-1 9:12:26

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150601.0912.002.html>

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;  
4. The 309th Hospital of China People's Liberation Army, Beijing 100091, China

**Abstract:** Melanoma is a malignant cutaneous cancer of high metastasis and lethal rates. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the embryonic developmental process that is often activated during tumorigenesis and metastasis. In this study, we integrated of mRNA and miRNA transcriptome sequencing data of melanocyte and melanoma cell lines to identify genes involved in the process of tumor EMT in the first place, and uncovered 11 miRNAs including miR-130a-3p, miR-130b-3p, miR-125a-5p, miR-30a-3p, miR-195-5p, miR-345-5p, miR-509-3-5p, miR-374a-5p, miR-509-5p, miR-148a-3p and miR-330-3p, negatively related with EMT genes using the Mirsystem software. Bioinformatics analysis with target genes of these miRNAs revealed two networks closely related with cellular development and cell-to-cell interactions, as well as multiple signaling pathways participating in EMT. Validation of the 11 miRNAs with molecular biology experiments demonstrated that four miRNAs regulated oncogenes in melanomas, including miR-195-5p, miR-130a-3p, miR-509-5p, and miR-509-3-5p. Our study integrates two kinds of omics data to screen for EMT-related miRNAs, providing a new research idea in the precision genomics of cancer research.

**Keywords:** melanoma; transcriptome; miRNAome; epithelial-mesenchymal transition

黑色素瘤是一种起源于黑素细胞、极易发生转移的恶性皮肤肿瘤,其中侵袭性黑色素瘤患者的5年生存率仅有15%<sup>[1,2]</sup>。目前,黑色素瘤的治疗手段有限,放、化疗效果不佳,近年来生物治疗取得了相对较好的治疗效果,但是由于黑色素瘤发病机理复杂,复发及转移迅速,很难取得更好的治疗效果<sup>[3]</sup>。上皮-间充质细胞转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是胚胎发育过程中正常的生理过程,在肿瘤中EMT过程中同样扮演着重要的角色<sup>[4]</sup>,对细胞粘附能力丧失、迁移和侵袭能力提高等方面都有重要的作用<sup>[5,6]</sup>。在肿瘤发生过程中,上皮细胞演变成肿瘤细胞,脱离邻近细胞,侵袭入毗连细胞层的过程与EMT紧密相关。研究肿瘤发生和恶化过程中的EMT调控有助于深入了解肿瘤的分子机制,为黑色素瘤诊断、治疗及预后判断提供新的思路。

MicroRNA(miRNA)是存在于真核生物体内、长度约为18~25个核苷酸的内源性非编码单链RNA。自1993年以来<sup>[7]</sup>,已发现超过1300种人类miRNA参与基因转录后表达调控。miRNA与靶基因的mRNA结合形成二聚体,通过诱导沉默复合体造成靶基因降解或者抑制其转录翻译,达到调节基因表达的目的<sup>[2]</sup>。同一个miRNA可以对多个靶基因进行调节,同一个基因也可以受多个miRNA的调控,从而使miRNA调控基因表达的生物学活动复杂多样。在黑色素瘤中,miRNA可以对肿瘤细胞的增殖、分化、代谢、凋亡等多种生理活动进行调控,因此miRNA

很可能成为恶性黑色素瘤的诊断和治疗靶点<sup>[8]</sup>。在生物体内,miRNA既可以通过调节microphthalmia相关转录因子(Microphthalmia-associated transcription factor, MITF)来影响黑色素细胞的分化和发育,调节色素形成,也能够通过调节不同的信号通路来抑制黑色素瘤的形成,如MDM2-P53信号通路以及RAS-RAF-MAPK信号通路<sup>[9, 10]</sup>。在黑色素瘤EMT过程中,miR-21可以促进肿瘤的转移,而miR-let-7与之相反,因此在肿瘤生物学活动中,同一种细胞或组织受到不同的miRNA调控后,能够产生不同的细胞生物学效应<sup>[11]</sup>。

随着第二代测序技术(Next generation sequencing, NGS)的发展,在基因组、转录组、miRNA组和甲基化组等测序通量提高的同时,测序成本却急剧降低<sup>[12~15]</sup>,这给探索肿瘤发病机制的研究带来了革命性的变化,由此产生的大量数据为探索不同肿瘤的发病机制、筛选致病基因和治疗靶点提供了丰富的信息。目前整合各组学信息数据进行综合分析,研究肿瘤的发病机制已经成为一种趋势。本实验室之前已经完成了共3个黑色素痣细胞和黑色素瘤细胞系的转录组<sup>[16]</sup>和miRNA组的测序工作(待发表)。本研究通过整合分析这两组数据,采用生物信息学的方法预测与黑色素瘤EMT相关的miRNA。通过Ingenuity pathway analysis(IPA)软件分析miRNA靶基因参与的信号通路和分子网络,结合分子生物学的实验验证,最终发现可能对黑色素瘤EMT过程具

有调控作用的 miRNA, 为快速、准确定位黑色素瘤发生过程中的关键基因和治疗靶点提供一种新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 转录组和 miRNA 组数据获取策略

利用本实验室已经获得的 1 个黑色素痣细胞 (HEMn) 和两个黑色素瘤细胞系 (A375、A2058) 的转录组<sup>[16]</sup> (NCBI 基因表达综合数据库: GSE35704) 和 miRNA 组的数据 (待发表), 本研究事先设定在 HEMn、A375 和 A2058 细胞系 mRNA 转录组数据中, 以基因表达量逐步增高的 EMT 相关基因为重要关注基因, 通过靶基因预测及利用 miRNA 与靶基因之间的负相关关系, 从 miRNA 转录组数据中筛选出表达呈降低趋势的 miRNA, 依此来探索参与黑色素瘤 EMT 过程的 miRNA。mRNA 转录组数据由 SOLID 平台测序获得, miRNA 转录组数据由 Illumina GAII 平台测序获得。

### 1.2 靶基因预测

统一 miRNA 的多种命名方式, 便于 miRNA 的名称识别和转化。利用在线软件 Mirsystem 整合的 7 个预测 miRNA 靶基因的数据库, 预测出 miRNA 对应的靶基因: 即依据 miRNA 与靶基因之间的负调控关系, 计算两者间表达量的皮尔森积矩相关系数  $r$ , 来反映线性相关程度。限定  $r$  为负值, 当  $r < 0$ , 且  $r$  越接近 -1 时, 则 miRNA 与靶基因的负相关程度越高。同时限定  $P$ -value  $< 0.01$  时, 两者之间为非常显著。然后通过 Ingenuity pathway analysis (IPA) 软件分析靶基因参与的分子网络和信号通路来确定 miRNA 参与的细胞功能。

### 1.3 细胞培养

HEMn 细胞培养于添加了人黑色素细胞生长因子 (Human melanocyte growth supplement, HMGS) 的 254 培养基中; A375 和 A2058 培养于添加了 10% FBS 的 DMEM 培养基中。培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。

### 1.4 miRNA 模拟物转染细胞

取生长状态良好的 A375 细胞用胰酶消化, 计数  $1 \times 10^5$  个细胞接种到 6 孔板准备悬浮转染, 每个 miRNA 模拟物做 4 个复孔。以 100  $\mu$ L Opti-MEM (Life Technologies, CA, USA) 为转染介质, 分别加

lipofectamine 2000 (Life Technologies, CA, USA) 5  $\mu$ L、miRNA 模拟物或阴性对照各 5  $\mu$ L, 静置 5 min 后混合, 混合液室温孵育 20 min, 加入 6 孔板, 10% FBS 的 DMEM 培养液调整培养体积至 2 mL, 使 miRNA 模拟物终浓度为 50 nmol/L, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 48 h。

### 1.5 细胞迁移

用胰酶消化转染 miRNA 模拟物的 A375 细胞, 用不含血清的 DMEM 调整细胞浓度至  $0.5 \times 10^5$  个/mL, 取 200  $\mu$ L 加入上室, 小室下部 24 孔板内加入 600  $\mu$ L 含 20% FBS 的 DMEM 培养液。将 24 孔板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内培养 24 h。移出培养箱, 用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 再进行 H&E 染色, 显微镜下拍照, 计数。

### 1.6 实时定量 PCR

按照厂商操作指南, 用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Life Technologies, CA, USA) 提取总 RNA。用 RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania) 反转录 cDNA。用 Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Lithuania) 进行实时定量 PCR 扩增。

## 2 结果与分析

### 2.1 整合 mRNA 和 miRNA 的组学信息, 筛选调节 EMT 进程的 miRNA

基于“材料和方法”中所述, 为进一步整合两种组学数据, 本研究有针对性地在 KEGG 数据库中选择与 EMT 过程相关的调控通路中所包含的基因, 包括 NF- $\kappa$ B、Notch、TGF- $\beta$ 、Wnt 等信号通路, 以这些通路中的基因为靶基因预测可调节靶基因的 miRNA。根据 HEMn、A375 和 A2058 所代表的黑色素瘤不同发展阶段的模型, 选择在 HEMn A375 A2058 细胞系发展恶化过程中基因与 miRNA 表达趋势呈负相关状态的配对 (附表 1)。EMT 相关基因及对应的 miRNA 表达量的热图见附图 1 和附图 2。以该附表和附图中的数据为依据, 为随后严格筛选呈负相关且差异显著的基因和 miRNA 配对提供数据来源。

### 2.2 候选 miRNA 潜在的调控靶点及 qPCR 验证

在上述 miRNA (附图 2) 中选择可以同时调节两

条以上信号通路的 miRNA, 共得到 11 个 miRNA, 分别是 miR-130a-3p、miR-130b-3p、miR-125a-5p、miR-30a-3p、miR-195-5p、miR-345-5p、miR-509-3-5p、miR-374a-5p、miR-509-5p、miR-148a-3p 和 miR-330-3p。这些 miRNA 在 HEMn、A375 和 A2058 黑色素痣及黑色素瘤细胞系中表达量的热图见图 1A。如图所示, 其中 10 个 miRNA(miR-130a-3p、miR-130b-3p、miR-125a-5p、miR-30a-3p、miR-195-5p、miR-345-5p、miR-509-3-5p、miR-374a-5p、miR-509-5p 和 miR-148a-3p) 在 3 个细胞系中的表达量呈逐步递减的趋势, 而 miR-330-3p 在转移黑色素瘤细胞系中表达量表现为上调。通过皮尔森积矩相关系数  $r$  和  $P$  值预测并筛选 11 个 miRNA 调控的靶基因, 最终得到 41 个靶基因(图 1B)。结果显示, 在对相关性  $r$  值和  $P$  值进行严格限定后, 不同 miRNA 调节靶基因的数量有显著的差异。miR-345-5p 仅有一个靶基因。miR-125a-5p、miR-195-5p、miR-330-3p 则分别有 9、8、8 个靶基因; 而 miR-30a-3p 则没有对应的显著负相关的靶基因。

利用 qPCR 验证 3 个细胞系中 11 个 miRNA 的表达量, 其中 7 个 miRNA(miR-130b-3p、miR-195-5p、miR-509-3-5p、miR-509-5p、miR-130a-3p、miR-148a-3p 和 miR-30a-3p) 的表达趋势与预测相符, 即该 7 个 miRNA 在 HEMn、A375 和 A2058 细胞系中表达量呈逐步递减的趋势, 其中以 miR-509-3-5p、miR-509-5p 和 miR-30a-3p 的变化尤为显著(图 2)。

### 2.3 生物学功能

将得到的 41 个靶基因输入 IPA 软件进行分析。结果显示, 这些基因参与的“细胞与分子功能”排在前 5 位的分别是: “基因表达”、“细胞发育”、“细胞死亡和生存”、“细胞形态”及“细胞生长和增殖”(表 1)。而在参与的疾病分类中, 癌症排在第 2 位(表 2), 显示了这些目标基因与癌症发病关系密切。

### 2.4 潜在调控靶点所构建的调控网络

分子网络的分析结果显示, 41 个靶基因主要参与 3 个网络的构成: 细胞发育(Cellular development, 网络 1); “细胞-细胞信号和相互作用(Cell-to-cell

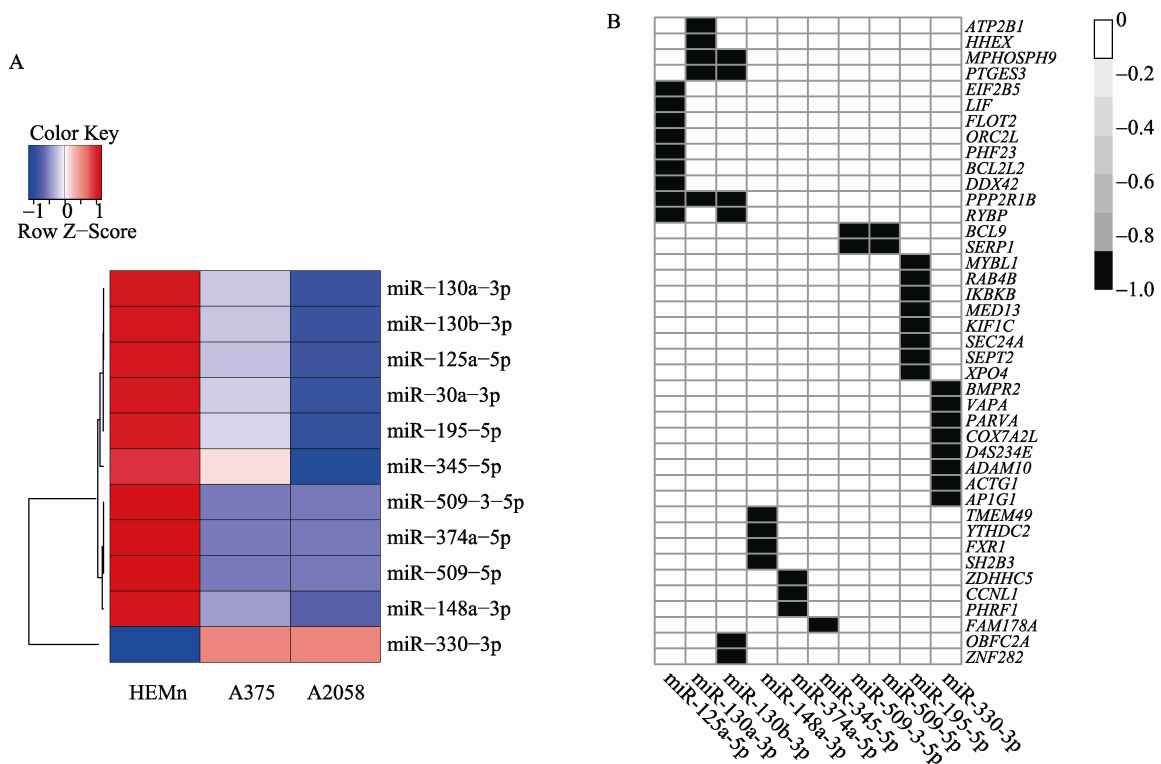


图 1 11 个 miRNA 表达量热图及与靶基因相关性热图

A: 11 个 miRNA 在 3 个黑色素痣及黑色素瘤细胞系中的表达量热图。miRNA 高表达时用红色表示, 低表达 miRNA 用蓝色表示。B: miRNA 与靶基因相关性热图。miR-30a-3p 无对应的显著负相关的靶基因。

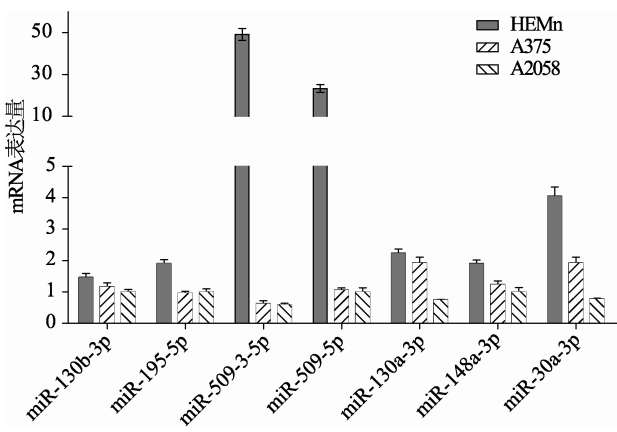


图 2 qPCR 验证 miRNA 表达

表 1 靶基因参与的细胞与分子功能

细胞与分子功能	P 值	参与的靶基因数目
基因表达	2.36E-05–2.06E-02	16
细胞发育	1.55E-04–3.53E-02	11
细胞死亡和生存	2.16E-04–3.72E-02	21
细胞形态	4.64E-04–3.72E-02	10
细胞生长和增殖	7.15E-04–3.47E-02	16

表 2 靶基因参与的疾病分类

疾病	P 值	参与的靶基因数目
神经系统疾病	8.67E-05–2.80E-02	12
癌症	5.83E-04–3.72E-02	11
血液系统疾病	5.83E-04–2.62E-02	5
组织损伤及异常	5.83E-04–3.53E-02	12
传染疾病	6.43E-04–2.50E-02	11

signaling and interaction, 网络 2)”;“细胞生长和增殖(Cellular growth and proliferation, 网络 3)”(表 3), 其中网络 1 和网络 2 的评分远高于网络 3。在 IPA 网络系统中, IPA 评分是评价基因在网络中的富集程度以及该网络对基因列表是否重要的主要评判指标, 因此本文重点关注打分较高的前两个网络。网络 1 中的关键基因包括 *MAPK*、*ERK*、*AKT*、*NF-κB* 和 *PI3K*(图 3A), 网络 2 中的关键基因包括 *FOS*、*ERBB2* 和 *UBC*(图 3B)。

表 3 靶基因构建的 3 个分子网络

网络编号	相关网络功能	评分
1	细胞发育, 胚胎发育	50
2	细胞-细胞信号和相互作用	32
3	细胞生长和增殖, 组织发育	9

2.5 潜在调控靶点所参与的分子信号通路

应用 IPA 软件对 41 个靶基因进行信号通路分析, 结果显示, 有 24 条分子信号通路的 *P* 值<0.05(图 4)(附图 3), 其中与肿瘤发生关系密切的通路包括 Wnt/β-catenin 途径(Wnt/β-catenin signaling)、VEGF 途径(VEGF signaling)、死亡受体途径(Death receptor signaling)、端粒酶途径(Telomerase signaling)、NANOG 在干细胞多潜能中的角色(Role of NANOG in mammalian embryonic stem cell pluripotency)、PTEN 途径(PTEN signaling); PI3K/AKT 途径(PI3K/AKT signaling)及 NF-κB 途径(NF-κB signaling)等, 将 24 条信号通路合并结果显示, 其中 23 条信号通路可以构成一个大型的信号通路网络(图 5)。

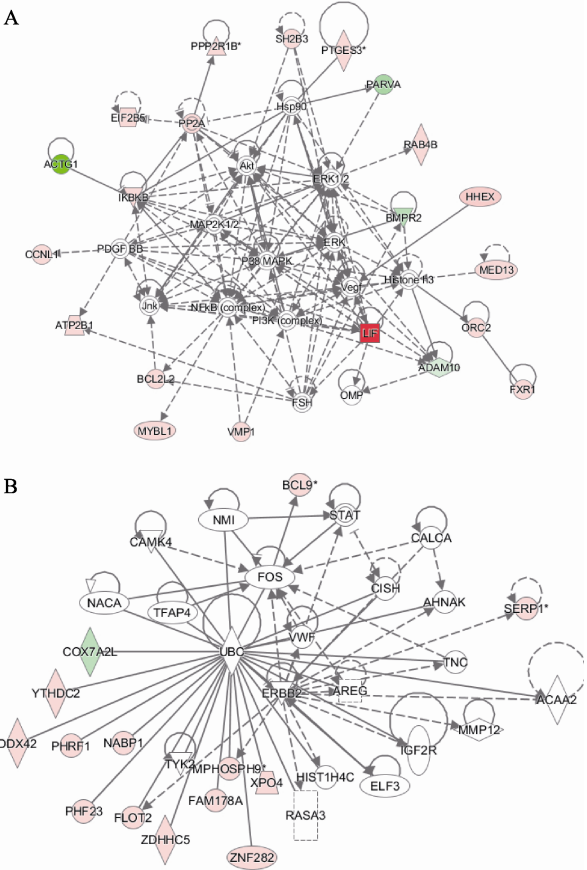


图 3 靶基因构建的分子网络

A: 与细胞发育相关的调控网络; B: 与细胞-细胞信号和相互作用相关的调控网络。

2.6 miRNA 对黑色素瘤细胞系迁移能力的影响

利用 Transwell 实验检测细胞的迁移能力, 结果显示, 经过 miRNA 模拟物及阴性对照分别转染



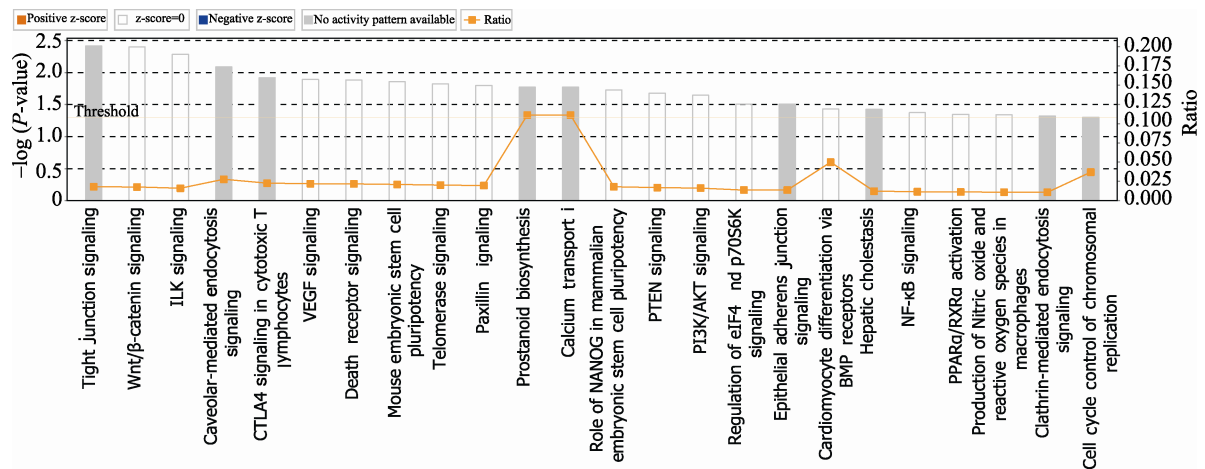


图 4 靶基因富集的信号通路

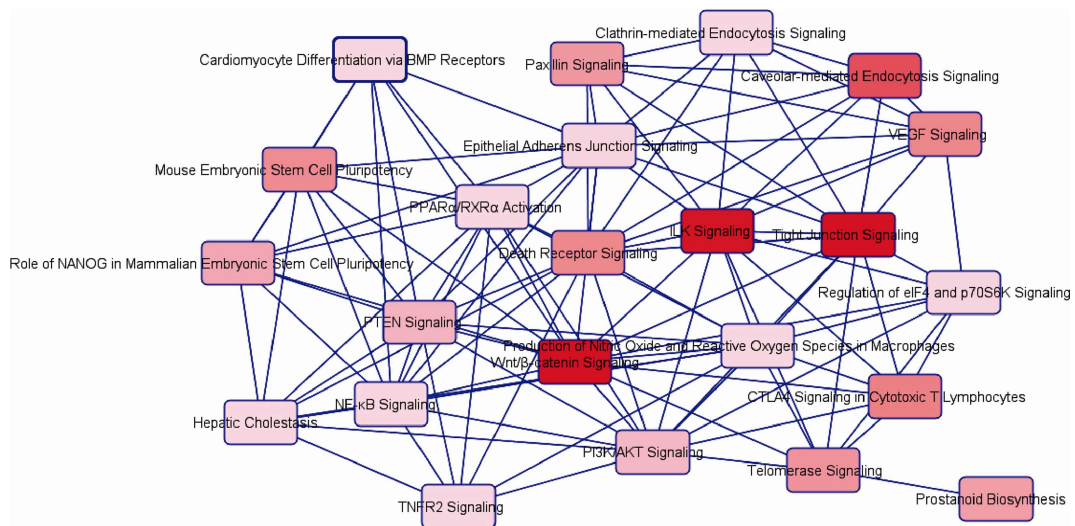


图 5 信号通路网络

A375 细胞系后, 细胞的迁移能力受不同程度的促进 (图 6)。除 miR-195-5p 与阴性对照 miRNA 相比转染细胞后细胞迁移能力改变不显著以外, 其他 6 个 miRNA 对细胞迁移能力的提高有显著的促进作用, 其中 miR-30a-3p 和 miR-130a-3p 对细胞迁移能力的影响最为明显。

## 2.7 miRNA 对黑色素瘤关键致癌基因的影响

为了进一步检测候选 miRNA 在黑色素瘤 EMT 过程中的调控作用, 本文挑选了 12 个 (*AKT1*、*CDH1*、*c-MYC*、*EGF*、*ICAM-1*、*IL-8*、*MMP9*、*SNAIL*、*TP53*、*VEGFA*、*NANOG* 和 *OCT4*) 在肿瘤发生和 EMT 过程中比较重要的功能基因, 通过检测其在黑色素瘤 A375 细胞系中的 mRNA 表达量来评估 miRNA 对

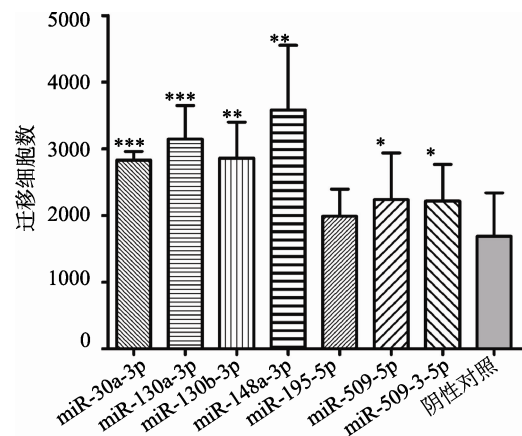


图 6 miRNA 对黑色素瘤细胞迁移能力的影响

用 miRNA 模拟物及阴性对照转染 A375, 将细胞移入 Transwell 小室, 经染色、计数后, 比较穿膜细胞数目。\*:  $P$  值  $< 0.05$ ; \*\*:  $P$  值  $< 0.01$ ; \*\*\*:  $P$  值  $< 0.001$ 。

肿瘤 EMT 过程的影响(图 7)。结果显示 miR-195-5p、miR-130a-3p、miR-509-5p 和 miR-509-3-5p 这 4 个 miRNA 可以对这 12 个基因的表达产生比较明显的调控效果,在 miR-195-5p 和 miR-130a-3p 转染细胞实验中, *AKT1*、*EGF*、*SNAIL*、*TP53* 和

*VEGFA* 表达升高显著。而在 miR-509-5p 和 miR-509-3-5p 转染细胞实验中, *ICAM-1*、*MMP9*、*NANOG* 和 *OCT4* 升高明显,表明 2 组 miRNA 在黑色素瘤 EMT 过程中通过不同的调控通路来发挥作用。

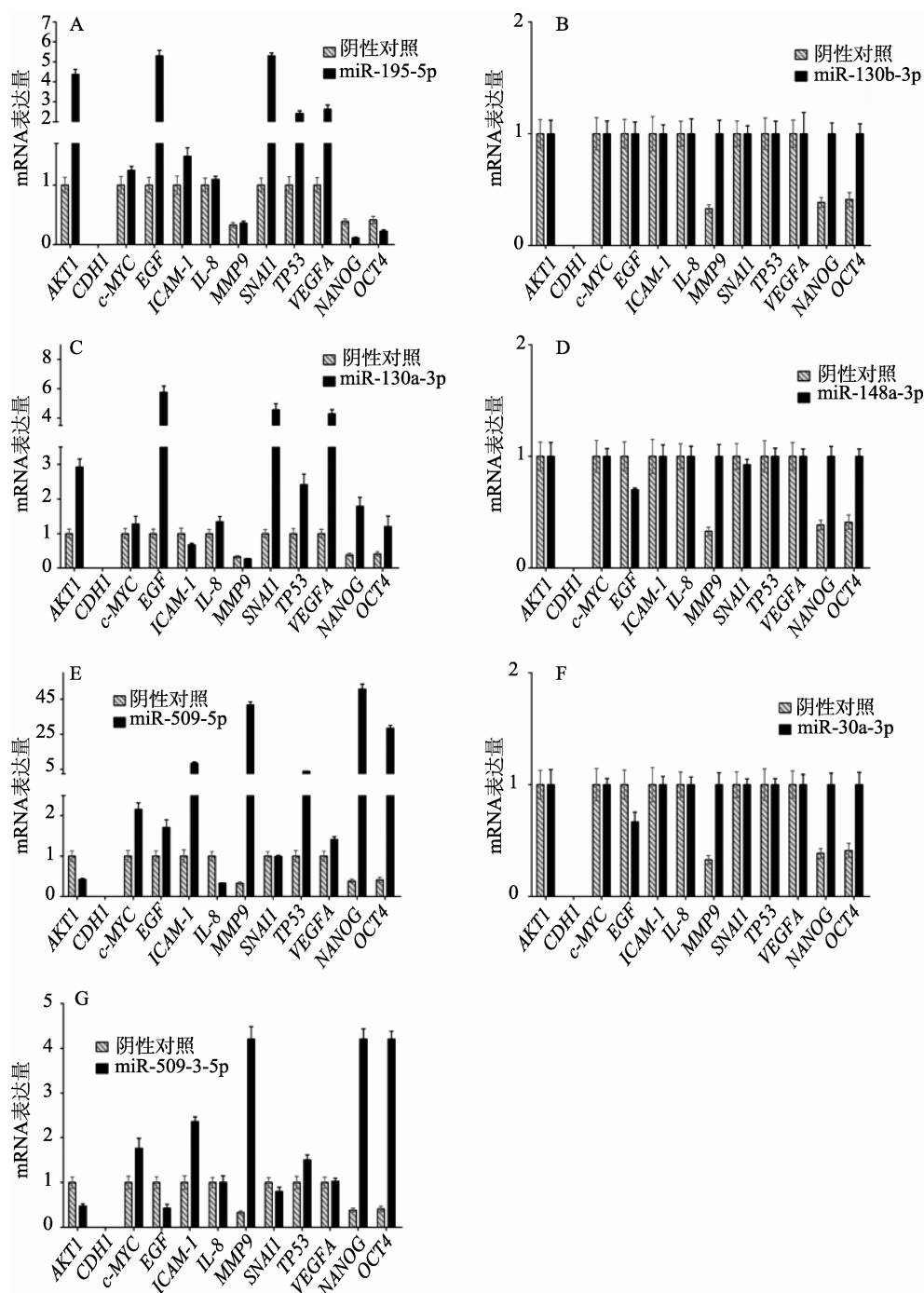


图 7 在 A375 细胞系中检测 miRNA 对黑色素瘤重要致癌基因的影响

A: miR-195-5p; B: miR-130b-3p; C: miR-130a-3p; D: miR-148a-3p; E: miR-509-5p; F: miR-30a-3p; G: miR-509-3-5p。

### 3 讨论

组学研究已经从单一组学分析发展到整合多组学数据进行综合分析的阶段。多个研究团队通过整合基因组、转录组、miRNA 组和甲基化组等多组学数据研究肿瘤的发生与恶化<sup>[17,18]</sup>。本研究整合了本实验室已有的黑色素瘤细胞转录组与 miRNA 组的数据,着重分析可能参与黑色素瘤 EMT 过程的 miRNA 的调控功能,为整合多组学数据研究黑色素瘤提供了一种新的思路。

本研究中预测出的 miRNA 与肿瘤发生之间的相关性只有少量文献报道<sup>[19-22]</sup>,分别涉及乳腺癌、胶质瘤、卵巢癌及肺癌等多种肿瘤,且对其分子机制均无细致深入的探讨。由于 miRNA 通过调控靶基因,可以间接调节多个分子信号通路,因此用生物信息学的方法预测靶基因参与的分子网络与信号通路,可以初步了解这些 miRNA 参与的细胞生物学功能。

本文分子网络分析的结果显示,41 个基因参与构成了两个重要的分子网络,分别涉及细胞发育和细胞相互作用两个复杂的生物学过程。网络中的关键基因均为 *MAPK*、*AKT*、*NF-κB*、*PI3K*、*FOS*、*ERBB* 和 *UBC* 等已知的在正常细胞生物学活动中起重要作用的激酶、转录因子和泛素蛋白,涉及细胞增殖与分化、生存与凋亡、细胞周期和有丝分裂、血管生成、基因表达等广泛的细胞功能<sup>[23,24]</sup>。虽然这 41 个基因并非网络中的核心因子,而是处于网络的边缘和关键基因的下游,但考虑到该 41 个基因参与的细胞发育和细胞相互作用网络在细胞生命活动进程中具有复杂的功能,加之这 41 个基因是由之前预测到的 11 个 miRNA 进行调控,因此当 miRNA 的表达量发生异常时,将有可能通过这些基因干扰细胞发育以及细胞间的信号通路调节,引发细胞紊乱,从而最终导致癌症发生。

黑色素瘤的形成和恶化是一个非常复杂的过程,涉及细胞增殖、生存与分化调控、生长因子调节、细胞迁移以及肿瘤干细胞等诸多因素,包含多条分子信号通路调节<sup>[25]</sup>。通过分析 miRNA 靶基因参与的信号通路可以进一步了解其在细胞内发挥的作用。本研究预测到与 EMT 进程相关的 miRNA,分析表明这些靶基因可以参与调节多达 24 条信号通路。其中一些信号通路的异常与黑色素瘤形成之间的关系

已经得到广泛的研究和证实。Wnt 信号可以通过抑制细胞衰老来加强癌的形成<sup>[26]</sup>,增强 *VEGF* 的表达可以促进黑色素瘤的迁移<sup>[27]</sup>,*NF-κB* 可以促进黑色素瘤细胞迁移和侵袭<sup>[28,29]</sup>。这 3 个通路均在不同程度上参与了 EMT 的发生过程<sup>[4]</sup>。细胞迁移实验结果证明,除 miR-195-5p 外其他 6 个 miRNA 在 A375 细胞系过表达后均可以促进黑色素瘤细胞的迁移。Wnt 蛋白通过和膜受体结合引发胞内的  $\beta$ -catenin 蛋白累积并转入核内,激活 *Snai1*,从而引发 EMT<sup>[30,31]</sup>。在验证成功的 miRNA 中,miR-130a-3p 和 miR-195-5p 过表达后,*Snai1* 的表达增高非常显著。同时,这两个 miRNA 对 *AKT*、*EGF*、*TP53* 和 *VEGFA* 的表达也有很强的促进作用。而 miR-509-5p 和 miR-509-3-5p 过表达后,*ICAM-1*、*MMP9*、*NANOG* 和 *OCT4* 的表达获得升高,表明 miR-509-5p 和 miR-509-3-5p 对黑色素瘤的侵袭和干细胞特性具有重要的影响。因此,以上结果初步表明过表达 4 个 miRNA 可以对黑色素瘤的 EMT 过程产生重要的影响。然而由于在本研究开始时,是以负相关性来筛选 EMT 相关基因与对应的 miRNA,因此该实验结果与预测结果存在一定程度的矛盾。考虑到 miRNA 的多功能性,以及其可能同时调节很多靶基因,加之 EMT 过程的复杂性,所以 miRNA 对黑色素瘤 EMT 过程的最终调控效果应该是多方面因素互相平衡的结果。而 miR-130a-3p、miR-195-5p、miR-509-5p 和 miR-509-3-5p 对于 EMT 过程的确切影响及分子机制阐明还需进行更进一步的功能实验验证。

分析结果还显示,miRNA 的靶基因可以富集到 PTEN 途径和 PI3K/AKT 途径上。且添加 miRNA 模拟物后,结果显示对 *AKT*、*TP53*、*c-MYC* 和 *MMP9* 等重要基因的表达具有促进或抑制的作用。AKT 途径中,*c-MYC* 和 *MMP9* 基因在黑色素瘤中可以促进肿瘤发生,加速细胞生长,增强迁移和侵袭,*p53* 途径在调节细胞衰老和凋亡等一系列生物学活动中具有重要的功能<sup>[32-35]</sup>。另外这些靶基因还能够影响干细胞相关基因 *OCT4* 和 *NANOG* 的表达,显示预测到的 miRNA 有可能在肿瘤干细胞水平对黑色素瘤细胞进行调节。另外信号通路中的某些分子可以同时参与多条通路调控,从而产生更复杂的调控效应,信号通路网络(图 5)显示了这种效应的复杂程度。

综上所述,本文通过整合转录组和 miRNA 组学



的数据,预测到11个参与调控EMT过程的miRNA。生物信息学分析结果显示,这些miRNA调节的靶基因参与多个重要的信号通路。验证结果也显示这些miRNA可以调控多个在肿瘤形成过程中重要基因的表达,其中miR-195-5p、miR-130a-3p、miR-509-5p和miR-509-3-5p这4个miRNA的作用最为显著。而miR-30a-3p、miR-130a-3p则对细胞的迁移能力有很大的影响。因此,本研究整合两种RNA组学数据的分析方法可以快速、高效、有针对性地挖掘到与肿瘤EMT相关的miRNA,并且可以将该方法运用在对肿瘤其他生物学过程的研究中。同时以本研究运用的方法为基础,对多组学数据进行整合分析以及综合判读,必将为今后肿瘤精准医学和靶向治疗发展提供现实的理论依据和产生重要的推动作用。

附录:附图及附表见:WWW.Chinagene.cn.

## 参考文献

- [1] Pacheco I, Buzea C, Tron V. Towards new therapeutic approaches for malignant melanoma. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13: e33. [DOI]
- [2] Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*, 2012, 482(7385): 347–355. [DOI]
- [3] Rigel DS, Russak J, Friedman R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 301–316. [DOI]
- [4] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178–196. [DOI]
- [5] Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139(5): 871–890. [DOI]
- [6] Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 2008, 14(6): 818–829. [DOI]
- [7] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854. [DOI]
- [8] Mione M, Bosserhoff A. MicroRNAs in melanocyte and melanoma biology. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015, 28(3): 340–354. [DOI]
- [9] Dar AA, Majid S, Rittsteuer C, De Semir D, Bezrookove V, Tong S, Nosrati M, Sagebiel R, Miller JR, III, Kashani-Sabet M. The role of miR-18b in MDM2-p53 pathway signaling and melanoma progression. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(6): 433–442. [DOI]
- [10] Poenitzsch Strong AM, Setaluri V, Spiegelman VS. MicroRNA-340 as a modulator of RAS-RAF-MAPK signaling in melanoma. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 563: 118–124. [DOI]
- [11] Aigner A. MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *J Mol Med*, 2011, 89(5): 445–457. [DOI]
- [12] Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(2): 121–132. [DOI]
- [13] Schneeberger K. Using next-generation sequencing to isolate mutant genes from forward genetic screens. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(10): 662–676. [DOI]
- [14] Sarda S, Hannenhalli S. Next-generation sequencing and epigenomics research: a hammer in search of nails. *Genomics Inform*, 2014, 12(1): 2–11. [DOI]
- [15] Danielsson K, Mun LJ, Lordemann A, Mao J, Lin CHJ. Next-generation sequencing applied to rare diseases genomics. *Expert Rev Mol Diagn*, 2014, 14(4): 469–487. [DOI]
- [16] Zhao H, Li YJ, Wang SB, Yang YD, Wang JY, Ruan XY, Yang YR, Cai K, Zhang B, Cui P, Yan JW, Zhao YL, Wakeland EK, Li QZ, Hu SN, Fang XD. Whole transcriptome RNA-seq analysis: tumorigenesis and metastasis of melanoma. *Gene*, 2014, 548(2): 234–243. [DOI]
- [17] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 2014, 511(7511): 543–550. [DOI]
- [18] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 2014, 513(7517): 202–209. [DOI]
- [19] Ouyang M, Li YX, Ye S, Ma JY, Lu LM, Lv WM, Chang GQ, Li XX, Li Q, Wang SM, Wang WJ. MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96228. [DOI]
- [20] Mitra R, Edmonds MD, Sun JC, Zhao M, Yu H, Eischen CM, Zhao ZM. Reproducible combinatorial regulatory networks elucidate novel oncogenic microRNAs in non-small cell lung cancer. *RNA*, 2014, 20(9): 1356–1368. [DOI]
- [21] Ben-Hamo R, Efroni S. MicroRNA-gene association as a prognostic biomarker in cancer exposes disease mechanisms. *PLoS Comput Biol*, 2013, 9(11): e1003351. [DOI]
- [22] Elgaen BV, Olstad OK, Haug KBF, Brusletto B, Sandvik L, Staff AC, Gautvik KM, Davidson B. Global miRNA expression analysis of serous and clear cell ovarian car-

- cinomas identifies differentially expressed miRNAs including miR-200c-3p as a prognostic marker. *BMC Cancer*, 2014, 14: 80. [DOI]
- [23] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100(1): 57–70. [DOI]
- [24] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674. [DOI]
- [25] Sekulic A, Haluska P, Jr., Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, Pulido JS, Salomao DR, Thorland EC, Vile RG, Swanson DL, Pockaj BA, Laman SD, Pittelkow MR, Markovic SN. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(7): 825–846. [DOI]
- [26] Pawlikowski JS, Mcbryan T, Van Tuyn J, Drotar ME, Hewitt RN, Maier AB, King A, Blyth K, Wu H, Adams PD. Wnt signaling potentiates nevogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(40): 16009–16014. [DOI]
- [27] Ni CS, Sun BC, Dong XY, Sun T, Zhao N, Liu YR, Gu Q. Promoting melanoma growth and metastasis by enhancing VEGF expression. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2012, 16(6):526–531. [DOI]
- [28] Hodgson L, Henderson AJ, Dong C. Melanoma cell migration to type IV collagen requires activation of NF- $\kappa$ B. *Oncogene*, 2003, 22(1): 98–108. [DOI]
- [29] Muthusamy V, Piva TJ. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NF $\kappa$ B and TNF $\alpha$  signal transduction pathways. *Arch Dermatol Res*, 2010, 302(1): 5–17. [DOI]
- [30] Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell*, 2012, 149(6): 1192–1205. [DOI]
- [31] Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJR, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H. Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, 2012, 149(6): 1245–1256. [DOI]
- [32] Lassen A, Atefi M, Robert L, Wong DJ, Cerniglia M, Comin-Anduix B, Ribas A. Effects of AKT inhibitor therapy in response and resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Mol Cancer*, 2014, 13: 83. [DOI]
- [33] Box NF, Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 21(5): 525–533. [DOI]
- [34] Lee B, Sandhu S, Mcarthur G. Cell cycle control as a promising target in melanoma. *Curr Opin Oncol*, 2015, 27(2): 141–150. [DOI]
- [35] Uzdensky AB, Demyanenko SV, Bibov MY. Signal transduction in human cutaneous melanoma and target drugs. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(8): 843–866. [DOI]

(责任编辑: 宋旭)

附表 1 调节 EMT 途径 miRNA 的预测结果

Gene	miRNA	R	P-value
IKBKB	hsa-miR-195-5p	-0.999999998	3.73E-05
SIAH1	hsa-let-7f-5p	-0.999999997	5.22E-05
BAMBI	hsa-miR-19a-3p	-0.999999992	7.80E-05
VANGL1	hsa-miR-1293	-0.999999982	0.000120681
BCL10	hsa-miR-106b-5p	-0.999999972	0.000150234
MAML2	hsa-miR-155-5p	-0.999999955	0.000191975
DTX3	hsa-miR-199a-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-498	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-512-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-515-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-515-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-517-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-517c-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-518a-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-518a-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-518b	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-518c-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-518c-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-518d-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-518d-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-518e-3p	-0.999999936	0.000228625

Gene	miRNA	R	P-value
DTX3	hsa-miR-518f-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-519c-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-519d-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-519e-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520a-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520a-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520b	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520c-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520c-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520d-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520d-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520e	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520f-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520g-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-520h	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-524-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-524-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-525-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-525-5p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-526a	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-526b-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-526b-5p	-0.999999936	0.000228625

Gene	miRNA	R	P-value
DTX3	hsa-miR-527	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-548c-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-548f-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-580-3p	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-600	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-765	-0.999999936	0.000228625
DTX3	hsa-miR-944	-0.999999936	0.000228625
MYC	hsa-miR-1287-5p	-0.999999891	0.000297443
CHD8	hsa-miR-1256	-0.999999871	0.000323125
CHD8	hsa-miR-133a-3p	-0.999999871	0.000323125
CHD8	hsa-miR-137	-0.999999871	0.000323125
CHD8	hsa-miR-153-3p	-0.999999871	0.000323125
CHD8	hsa-miR-489-3p	-0.999999871	0.000323125
CHD8	hsa-miR-522-3p	-0.999999871	0.000323125
CHD8	hsa-miR-663a	-0.999999871	0.000323125
CHD8	hsa-miR-939-5p	-0.999999871	0.000323125
FZD5	hsa-miR-532-3p	-0.999999867	0.000328848
DAAM2	hsa-miR-340-3p	-0.999999859	0.000338481
MAP3K7	hsa-miR-1286	-0.999999834	0.000367345
RIPK1	hsa-miR-186-5p	-0.999999811	0.000391323
E2F4	hsa-miR-124-3p	-0.999999805	0.000397552
E2F4	hsa-miR-1243	-0.999999805	0.000397552
E2F4	hsa-miR-1252-5p	-0.999999805	0.000397552
FZD8	hsa-miR-30b-5p	-0.99999979	0.000412656
CUL1	hsa-miR-34a-5p	-0.99999977	0.000432096
TICAM1	hsa-miR-454-3p	-0.999999733	0.000465374
NCOR2	hsa-let-7f-5p	-0.999999722	0.000474838
SLAH1	hsa-miR-1277-3p	-0.999999698	0.000494877
MALT1	hsa-miR-876-3p	-0.999999693	0.000499043
DVL3	hsa-miR-219a-2-3p	-0.999999676	0.000512626
CUL1	hsa-miR-26b-5p	-0.999999637	0.000542131
ROCK2	hsa-miR-876-5p	-0.999999539	0.000611387
TLR4	hsa-miR-148a-3p	-0.999999483	0.000647564
NFKB2	hsa-miR-195-5p	-0.999999475	0.000652465
CSNK1A1L	hsa-miR-361-5p	-0.999999383	0.000707426
CACYBP	hsa-miR-151a-3p	-0.999999308	0.000748888
TBL1XR1	hsa-miR-10b-5p	-0.999999236	0.000786688
PPP3CB	hsa-miR-125b-5p	-0.999999146	0.000831801
LRP6	hsa-miR-338-3p	-0.999999146	0.000832061
TGFBR1	hsa-miR-21-5p	-0.999999086	0.000860774
NCOR2	hsa-miR-1277-3p	-0.999998712	0.00102193
PPP3CB	hsa-miR-452-5p	-0.999998358	0.00115367
VANGL1	hsa-miR-484	-0.999998307	0.00117156
FZD9	hsa-miR-33a-5p	-0.999998157	0.001222345
PPP2R1B	hsa-miR-532-3p	-0.999997871	0.0013136
PPP3CB	hsa-miR-31-5p	-0.999997738	0.001353923
TWIST1	hsa-miR-505-3p	-0.99999771	0.001362485
VANGL1	hsa-miR-425-3p	-0.999997489	0.001426758
TIRAP	hsa-miR-155-5p	-0.999997131	0.00152494
TNFRSF1A	hsa-miR-616-3p	-0.99999693	0.001577476
DTX3	hsa-miR-516b-5p	-0.999996912	0.001582131
FZD1	hsa-miR-340-3p	-0.999996618	0.001655769

Gene	miRNA	R	P-value
RAC1	hsa-miR-181d-5p	-0.999996105	0.001776946
PARP1	hsa-miR-502-5p	-0.999995891	0.001824935
SMAD4	hsa-miR-130a-3p	-0.999995861	0.001831605
PARP1	hsa-miR-499a-5p	-0.999995552	0.001898738
PSENEN	hsa-miR-99a-5p	-0.99999527	0.001958154
AMH	hsa-miR-188-5p	-0.999995124	0.001988086
TLR4	hsa-miR-502-5p	-0.999994829	0.002047325
CHD8	hsa-miR-330-3p	-0.999994707	0.00207132
PPP3R1	hsa-miR-15a-5p	-0.99999457	0.002097857
JUN	hsa-miR-589-3p	-0.999994153	0.002177097
PTGS2	hsa-miR-19a-3p	-0.999993884	0.002226507
NOTCH3	hsa-miR-501-5p	-0.999993867	0.002229674
NFKB2	hsa-miR-26a-5p	-0.999993623	0.002273575
PIAS4	hsa-miR-32-5p	-0.999993622	0.002273672
XIAP	hsa-miR-25-3p	-0.999993359	0.002279395
XIAP	hsa-miR-103a-3p	-0.999993388	0.002279796
FRAT2	hsa-miR-625-5p	-0.999993309	0.002293846
KAT2B	hsa-miR-574-5p	-0.999993362	0.002319689
MAP3K7	hsa-miR-506-3p	-0.999993315	0.002327753
SMURF1	hsa-miR-30e-3p	-0.999992644	0.002441862
DVL2	hsa-miR-26a-5p	-0.999992574	0.002453453
NOTCH1	hsa-miR-651-5p	-0.99999246	0.002472239
SMURF1	hsa-miR-502-3p	-0.999992423	0.002478256
TWIST1	hsa-miR-454-3p	-0.999992422	0.002478342
DTX3	hsa-miR-1323	-0.999992267	0.00250358
CUL1	hsa-miR-374b-5p	-0.999992058	0.002537261
CUL1	hsa-miR-129-5p	-0.999991754	0.002585359
FZD8	hsa-miR-186-5p	-0.999991569	0.002614208
MAP3K7	hsa-miR-510-5p	-0.999991564	0.002614948
SMAD4	hsa-miR-642a-5p	-0.999991407	0.002639185
HES1	hsa-miR-181b-5p	-0.999991358	0.002646691
CACYBP	hsa-miR-500a-5p	-0.999991348	0.002648183
TBL1XR1	hsa-miR-628-5p	-0.999991211	0.002669159
TBL1XR1	hsa-miR-378a-3p	-0.99999115	0.0026784
FZD5	hsa-miR-130b-3p	-0.999990945	0.002709125
CCND1	hsa-miR-214-3p	-0.999990869	0.002720565
TRAF2	hsa-miR-380-3p	-0.99999068	0.002748507
TRAF2	hsa-miR-579-3p	-0.99999068	0.002748507
TRAF2	hsa-miR-624-5p	-0.99999068	0.002748507
EP300	hsa-miR-532-5p	-0.99999051	0.002773466
SMURF1	hsa-miR-129-2-3p	-0.999990137	0.002827548
APC2	hsa-miR-194-5p	-0.999989897	0.002861656
CUL1	hsa-miR-363-3p	-0.999989698	0.002889727
NCOR2	hsa-miR-146a-5p	-0.999989604	0.002902924
IKBKB	hsa-miR-26a-5p	-0.999989166	0.002963381
DTX3	hsa-miR-517a-3p	-0.999988955	0.002992161
DTX3	hsa-miR-517b-3p	-0.999988955	0.002992161
RPS6KB2	hsa-miR-30a-5p	-0.999988833	0.00300861
RBX1	hsa-miR-195-5p	-0.999988777	0.003016115
MAP3K7	hsa-miR-509-3p	-0.999988523	0.003050022
TRADD	hsa-miR-206	-0.999988357	0.003072069
MAPK1	hsa-miR-497-5p	-0.999988341	0.003074224

Gene	miRNA	R	P-value
MAP3K7	hsa-miR-509-5p	-0.999988254	0.003085588
XIAP	hsa-miR-22-3p	-0.999988223	0.003089739
TRADD	hsa-miR-422a	-0.999987956	0.00312449
TGFB1	hsa-miR-125a-5p	-0.999987412	0.003194348
PARP1	hsa-miR-148a-3p	-0.999987171	0.003224696
SMURF1	hsa-miR-206	-0.999987098	0.003233833
BMPR2	hsa-miR-1256	-0.99998698	0.003248684
BMPR2	hsa-miR-133a-3p	-0.99998698	0.003248684
BMPR2	hsa-miR-137	-0.99998698	0.003248684
BMPR2	hsa-miR-153-3p	-0.99998698	0.003248684
BMPR2	hsa-miR-489-3p	-0.99998698	0.003248684
BMPR2	hsa-miR-522-3p	-0.99998698	0.003248684
BMPR2	hsa-miR-663a	-0.99998698	0.003248684
BMPR2	hsa-miR-939-5p	-0.99998698	0.003248684
TGFB1	hsa-miR-628-3p	-0.999986827	0.003267671
ID3	hsa-miR-126-5p	-0.999986796	0.003271522
TWIST1	hsa-miR-15a-5p	-0.9999866	0.00329575
RBX1	hsa-miR-10a-5p	-0.9999859	0.003380724
RIPK1	hsa-miR-30b-5p	-0.999985585	0.003418187
TLR4	hsa-miR-363-3p	-0.99998551	0.003427165
SIAH1	hsa-miR-146a-5p	-0.999985486	0.003429976
ICAM1	hsa-miR-193a-3p	-0.999985193	0.00346445
TRADD	hsa-miR-129-2-3p	-0.999985074	0.003478354
MAPK3	hsa-miR-34c-5p	-0.99998493	0.003495006
TRADD	hsa-miR-1260a	-0.999984661	0.003526126
BCL2A1	hsa-miR-296-3p	-0.999984574	0.003536085
TBL1XR1	hsa-miR-421	-0.999984566	0.003536973
SP1	hsa-miR-542-3p	-0.999984319	0.003565244
DTX3L	hsa-miR-200b-3p	-0.999983682	0.003636936
CSNK1E	hsa-miR-1303	-0.999983234	0.003686518
TLR4	hsa-miR-129-5p	-0.999982822	0.003731534
MAP3K7	hsa-miR-374a-5p	-0.999982784	0.003735566
TLR4	hsa-miR-374b-5p	-0.999982376	0.003779632
NCOR2	hsa-miR-28-5p	-0.999981854	0.003835132
TRADD	hsa-miR-30e-3p	-0.99998158	0.003864039
CDH2	hsa-miR-548p	-0.999980586	0.003966943
APC2	hsa-miR-615-3p	-0.999980304	0.003995576
PPP3R1	hsa-miR-505-3p	-0.999979953	0.004031121
KAT2B	hsa-miR-1255b-5p	-0.999979781	0.004048289
TRADD	hsa-miR-500a-3p	-0.999979752	0.004051277
BIRC2	hsa-miR-1261	-0.99997924	0.004102156
HDAC2	hsa-miR-664a-3p	-0.999978921	0.004133517
PARP1	hsa-miR-590-3p	-0.999978524	0.004172249
BAMBI	hsa-miR-29c-3p	-0.99997835	0.004189159
MAP3K7	hsa-miR-513a-5p	-0.999977805	0.004241504
VANGL1	hsa-miR-1272	-0.999977802	0.004241852
FZD2	hsa-miR-548k	-0.999977745	0.004247311
MAP3K7	hsa-miR-513c-5p	-0.999977288	0.004290698
TICAM1	hsa-miR-505-3p	-0.999977123	0.004306202
SKP1	hsa-miR-296-3p	-0.999977116	0.004306891
PPP2R1B	hsa-miR-130b-3p	-0.999976638	0.004351574
SIAH1	hsa-miR-28-5p	-0.999976524	0.004362184

Gene	miRNA	R	P-value
MAP3K7	hsa-miR-509-3-5p	-0.9999763	0.004383011
TRADD	hsa-miR-30d-5p	-0.999975519	0.004454628
XIAP	hsa-miR-1285-3p	-0.999974362	0.004558714
RAC2	hsa-miR-9-5p	-0.999974273	0.004566539
MAP3K7	hsa-miR-508-5p	-0.999973889	0.004600559
SIAH1	hsa-miR-211-5p	-0.999973154	0.004664803
PSENEN	hsa-miR-323a-3p	-0.999971331	0.004820651
FZD9	hsa-miR-491-5p	-0.999971317	0.00482181
SIAH1	hsa-miR-514a-3p	-0.999971017	0.00484698
ZFYVE16	hsa-miR-760	-0.999970637	0.004878623
AMH	hsa-miR-1285-3p	-0.999969858	0.004942911
MAP3K7	hsa-miR-1178-3p	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-1181	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-1299	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-190a-5p	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-223-3p	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-507	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-513a-3p	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-513b-5p	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-545-3p	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-548a-5p	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-548d-3p	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-548i	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-578	-0.999969657	0.00495938
MAP3K7	hsa-miR-627-5p	-0.999969657	0.00495938
BMPR2	hsa-miR-330-3p	-0.999969196	0.004996879
CTBP1	hsa-miR-651-5p	-0.999969022	0.00501101
ICAM1	hsa-miR-342-3p	-0.999968526	0.005050912
MAP3K7	hsa-miR-508-3p	-0.999968389	0.005061915
CHUK	hsa-miR-324-5p	-0.999968358	0.005064408
DVL3	hsa-miR-125a-3p	-0.999967492	0.005133206
NCOR2	hsa-miR-211-5p	-0.999966745	0.005191856
CTNNB1	hsa-miR-1262	-0.999966129	0.005239722
JUN	hsa-miR-320d	-0.999965698	0.005272953
FRAT2	hsa-miR-543	-0.999965569	0.00528292
CACYBP	hsa-miR-29a-3p	-0.999965205	0.005310709
NCOR2	hsa-miR-1271-5p	-0.999964657	0.005352368
PPP3CB	hsa-miR-573	-0.999964437	0.005369055
NCOR2	hsa-miR-514a-3p	-0.999964371	0.005374032
DVL2	hsa-miR-195-5p	-0.999964298	0.005379492
BCL2A1	hsa-miR-1268a	-0.999963784	0.005418103
SIAH1	hsa-miR-508-3p	-0.999963662	0.005427205
ICAM1	hsa-miR-576-5p	-0.999963454	0.005442692
CCND1	hsa-miR-1304-5p	-0.999963399	0.005446823
CCND1	hsa-miR-485-5p	-0.999963399	0.005446823
APC2	hsa-miR-887-3p	-0.999962485	0.005514386
SIAH1	hsa-miR-1178-3p	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-1181	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-1299	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-190a-5p	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-223-3p	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-507	-0.999962276	0.00552974



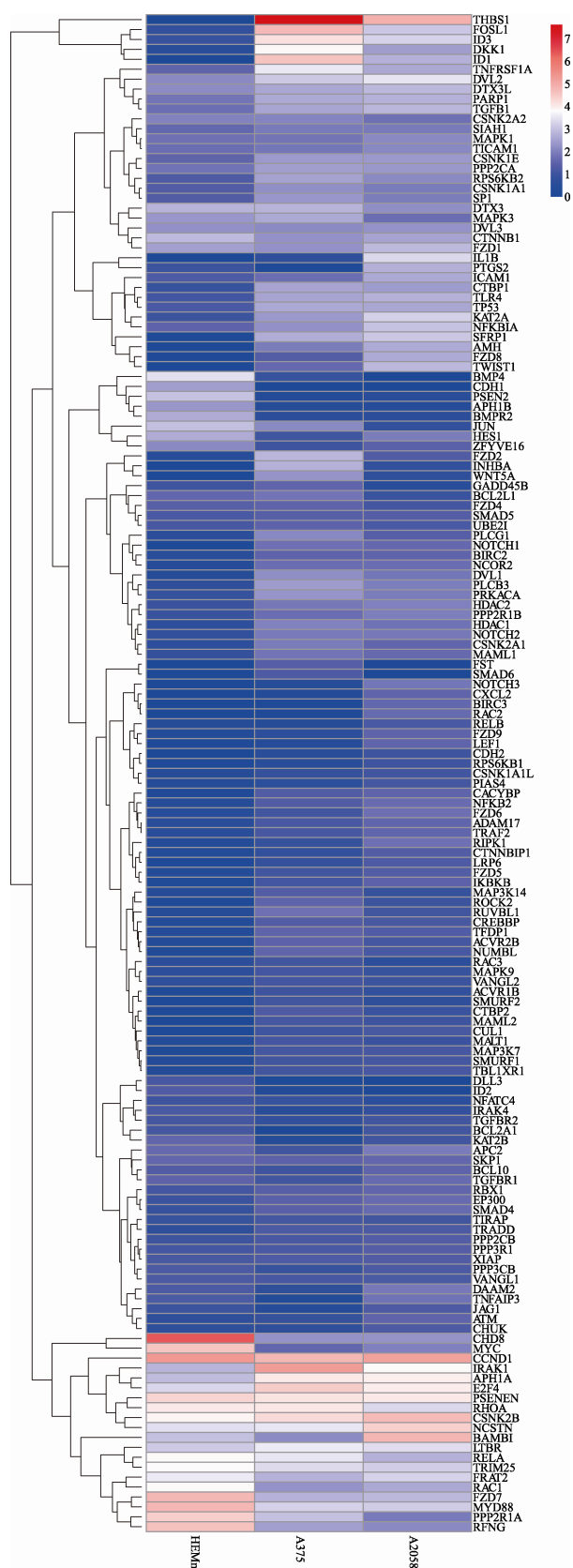
Gene	miRNA	R	P-value
SIAH1	hsa-miR-513a-3p	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-513b-5p	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-545-3p	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-548a-5p	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-548d-3p	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-548i	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-578	-0.999962276	0.00552974
SIAH1	hsa-miR-627-5p	-0.999962276	0.00552974
PARP1	hsa-miR-28-3p	-0.999961904	0.005556916
E2F4	hsa-miR-876-5p	-0.999961667	0.005574236
MYC	hsa-miR-744-5p	-0.999961239	0.005605257
APH1B	hsa-miR-1256	-0.999961165	0.005610593
APH1B	hsa-miR-133a-3p	-0.999961165	0.005610593
APH1B	hsa-miR-137	-0.999961165	0.005610593
APH1B	hsa-miR-153-3p	-0.999961165	0.005610593
APH1B	hsa-miR-489-3p	-0.999961165	0.005610593
APH1B	hsa-miR-522-3p	-0.999961165	0.005610593
APH1B	hsa-miR-663a	-0.999961165	0.005610593
APH1B	hsa-miR-939-5p	-0.999961165	0.005610593
PPP2R1B	hsa-miR-125a-5p	-0.999961076	0.00561703
MAP3K7	hsa-miR-514a-3p	-0.999960727	0.00564214
DVL2	hsa-miR-532-5p	-0.999960424	0.005663832
TLR4	hsa-miR-499a-5p	-0.999958913	0.005770998
ROCK2	hsa-miR-124-3p	-0.999958669	0.00578807
ROCK2	hsa-miR-1243	-0.999958669	0.00578807
ROCK2	hsa-miR-1252-5p	-0.999958669	0.00578807
MAP3K7	hsa-miR-211-5p	-0.99995815	0.005824316
LRP6	hsa-miR-548p	-0.999957915	0.005840665
PIAS4	hsa-miR-1291	-0.999957416	0.005875145
PIAS4	hsa-miR-188-3p	-0.999957416	0.005875145
TBL1XR1	hsa-miR-676-3p	-0.999957374	0.005878062
SIAH1	hsa-miR-1271-5p	-0.999957354	0.005879421
TLR4	hsa-miR-34a-5p	-0.999957276	0.005884797
SIAH1	hsa-miR-508-5p	-0.999957222	0.005888561
EP300	hsa-miR-365a-3p	-0.99995702	0.005902449
LTBR	hsa-miR-98-5p	-0.999956856	0.00591369
VANGL2	hsa-miR-873-5p	-0.99995649	0.005938701
RBX1	hsa-miR-26a-5p	-0.999956439	0.005942154
NCOR2	hsa-miR-508-3p	-0.999956262	0.005954257
VANGL1	hsa-miR-199b-5p	-0.999955699	0.005992459
TGFB1	hsa-miR-766-3p	-0.999955392	0.006013147
NCOR2	hsa-miR-1178-3p	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-1181	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-1299	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-190a-5p	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-223-3p	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-507	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-513a-3p	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-513b-5p	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-545-3p	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-548a-5p	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-548d-3p	-0.999954742	0.006056792

Gene	miRNA	R	P-value
NCOR2	hsa-miR-548i	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-578	-0.999954742	0.006056792
NCOR2	hsa-miR-627-5p	-0.999954742	0.006056792
BIRC2	hsa-miR-95-3p	-0.999954621	0.00606493
SIAH1	hsa-miR-509-3-5p	-0.999954002	0.006106108
SMAD6	hsa-miR-548j-5p	-0.999952964	0.006174662
SKP1	hsa-miR-1268a	-0.999952746	0.00618891
SIAH1	hsa-miR-513c-5p	-0.999952601	0.006198422
TICAM1	hsa-miR-15a-5p	-0.999951971	0.006239466
SIAH1	hsa-miR-513a-5p	-0.999951846	0.006247615
FZD8	hsa-miR-101-3p	-0.999950853	0.006311659
IKBKB	hsa-miR-10a-5p	-0.999950106	0.006359497
ADAM17	hsa-miR-380-3p	-0.99994993	0.006370699
ADAM17	hsa-miR-579-3p	-0.99994993	0.006370699
ADAM17	hsa-miR-624-5p	-0.99994993	0.006370699
AMH	hsa-miR-22-3p	-0.99994928	0.006411886
NCOR2	hsa-miR-508-5p	-0.999949221	0.006415613
XIAP	hsa-miR-362-3p	-0.999948156	0.006482532
PTGS2	hsa-miR-29c-3p	-0.999947979	0.006493643
TGFBR2	hsa-miR-1290	-0.999946945	0.006557802
KAT2B	hsa-miR-1307-3p	-0.9999464	0.006591433
NCOR2	hsa-miR-509-3-5p	-0.999945719	0.006633161
NCOR2	hsa-miR-513c-5p	-0.999944198	0.006725474
SIAH1	hsa-miR-374a-5p	-0.999943731	0.006753554
NCOR2	hsa-miR-513a-5p	-0.999943378	0.006774668
LTBR	hsa-miR-126-3p	-0.999942527	0.00682542
TBL1XR1	hsa-miR-362-5p	-0.999942055	0.006853368
CSNK1A1L	hsa-miR-200b-3p	-0.999942009	0.006856078
LEF1	hsa-miR-181a-5p	-0.999941975	0.006858111
TLR4	hsa-miR-26b-5p	-0.99994196	0.006859024
MAP3K14	hsa-miR-548a-3p	-0.999941881	0.006863656
SMAD4	hsa-miR-130b-3p	-0.999941038	0.006913279
FZD8	hsa-miR-16-5p	-0.999940624	0.006937523
CACYBP	hsa-miR-378a-5p	-0.999940255	0.006958999
CUL1	hsa-miR-148a-3p	-0.999940162	0.006964457
FZD5	hsa-miR-642a-5p	-0.999939839	0.006983219
NFKB2	hsa-miR-10a-5p	-0.999938695	0.007049303
PARP1	hsa-miR-451a	-0.999938661	0.007051232
PPP3CB	hsa-miR-1269a	-0.999936392	0.007180462
BCL10	hsa-miR-874-3p	-0.999935949	0.007205429
AMH	hsa-miR-103a-3p	-0.999935657	0.007221829
CACYBP	hsa-miR-142-5p	-0.999935224	0.007246116
PSEN2	hsa-miR-744-5p	-0.999935053	0.007255655
FZD5	hsa-miR-125a-5p	-0.999934985	0.007259478
NCOR2	hsa-miR-374a-5p	-0.999934606	0.007280606
JAG1	hsa-miR-503-5p	-0.999934535	0.007284522
PARP1	hsa-miR-363-3p	-0.999934267	0.007299425
MYD88	hsa-miR-330-3p	-0.999934265	0.007299554
VANGL1	hsa-miR-183-5p	-0.999934247	0.007300529
APH1B	hsa-miR-330-3p	-0.999933194	0.007358788
BMP4	hsa-miR-889-3p	-0.999932862	0.007377048
SIAH1	hsa-miR-509-5p	-0.999932379	0.007403532

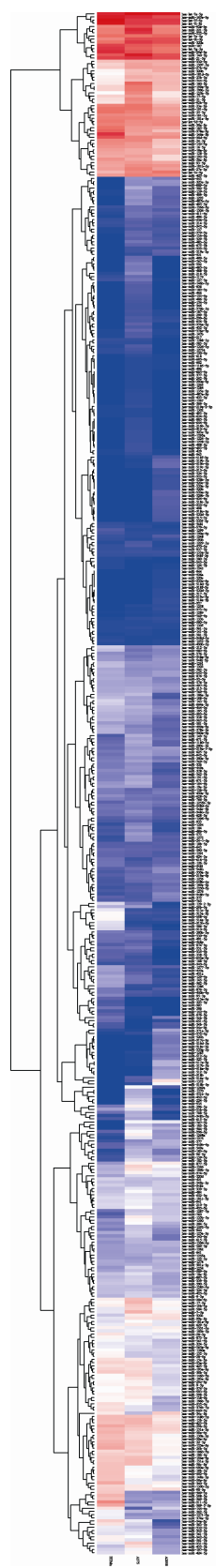
Gene	miRNA	R	P-value
SIAH1	hsa-miR-509-3p	-0.999931728	0.007439098
FZD6	hsa-miR-338-5p	-0.999931215	0.00746697
PSENEN	hsa-miR-877-5p	-0.999929429	0.007563282
HDAC2	hsa-miR-26b-5p	-0.999929234	0.00757373
VANGL1	hsa-miR-1292-5p	-0.999929181	0.007576588
TRIM25	hsa-miR-219a-5p	-0.999929072	0.007582407
PARP1	hsa-miR-129-5p	-0.999928671	0.007603794
SMURF2	hsa-miR-126-3p	-0.999928335	0.007621694
RIPK1	hsa-miR-32-5p	-0.999927876	0.007646075
PARP1	hsa-miR-374b-5p	-0.999927766	0.007651892
FRAT2	hsa-miR-494-3p	-0.999926618	0.007712434
RELB	hsa-miR-9-5p	-0.999926415	0.007723119
NOTCH2	hsa-miR-1271-5p	-0.999926314	0.007728438
RFNG	hsa-miR-889-3p	-0.999926105	0.007739379
TP53	hsa-miR-1271-5p	-0.999925654	0.007762953
FZD5	hsa-miR-130a-3p	-0.99992512	0.007790799
CDH1	hsa-miR-1256	-0.999923988	0.007849446
CDH1	hsa-miR-133a-3p	-0.999923988	0.007849446
CDH1	hsa-miR-137	-0.999923988	0.007849446
CDH1	hsa-miR-153-3p	-0.999923988	0.007849446
CDH1	hsa-miR-489-3p	-0.999923988	0.007849446
CDH1	hsa-miR-522-3p	-0.999923988	0.007849446
CDH1	hsa-miR-663a	-0.999923988	0.007849446
CDH1	hsa-miR-939-5p	-0.999923988	0.007849446
SFRP1	hsa-miR-29b-3p	-0.999923669	0.007865895
FRAT2	hsa-miR-556-3p	-0.999923595	0.007869723
PPP3R1	hsa-miR-454-3p	-0.999923552	0.007871949
SKP1	hsa-miR-31-5p	-0.999923086	0.007895863
KAT2B	hsa-miR-320a	-0.999923018	0.007899346
NCOR2	hsa-miR-509-5p	-0.999922408	0.007930584
NCOR2	hsa-miR-509-3p	-0.999921711	0.00796615
FZD7	hsa-miR-744-5p	-0.999921346	0.007984695
TRADD	hsa-miR-185-5p	-0.999920443	0.008030425
CSNK1E	hsa-miR-340-5p	-0.999920403	0.008032403
TLR4	hsa-miR-590-3p	-0.999920163	0.008044509
APH1A	hsa-miR-651-5p	-0.999919828	0.00806138
SKP1	hsa-miR-452-5p	-0.999919136	0.008096116
DTX3	hsa-miR-371a-5p	-0.99991857	0.008124364
SIAH1	hsa-miR-506-3p	-0.999917827	0.008161366
EP300	hsa-miR-30a-3p	-0.999916721	0.008216092
BCL2A1	hsa-miR-376c-3p	-0.999915046	0.008298329
MAP3K7	hsa-miR-1261	-0.999914525	0.008323726
CUL1	hsa-miR-502-5p	-0.999913691	0.008364218
EP300	hsa-miR-107	-0.999910913	0.008497782
SMURF2	hsa-miR-98-5p	-0.999910164	0.008533424
HDAC2	hsa-miR-34a-5p	-0.999909858	0.008547958
HDAC2	hsa-miR-143-3p	-0.999909627	0.008558908
TRADD	hsa-let-7i-5p	-0.999909569	0.008561628
PLCG1	hsa-miR-548a-3p	-0.999909381	0.008570531
RPS6KB2	hsa-miR-542-3p	-0.999909062	0.008585602
WNT5A	hsa-miR-548k	-0.999908454	0.00861424
PPP2R1B	hsa-miR-642a-5p	-0.999908211	0.008625667

Gene	miRNA	R	P-value
BCL2A1	hsa-miR-31-5p	-0.999907337	0.008666669
NCOR2	hsa-miR-506-3p	-0.999906871	0.008688418
TRADD	hsa-miR-502-3p	-0.999904807	0.008784157
ACVR1B	hsa-miR-30a-5p	-0.999903231	0.008856614
BCL2A1	hsa-miR-452-5p	-0.999903005	0.008866922
BCL2A1	hsa-miR-199a-3p	-0.999902837	0.008874589
BCL2A1	hsa-miR-199b-3p	-0.999902837	0.008874589
BIRC2	hsa-let-7i-5p	-0.999900989	0.008958609
MYD88	hsa-miR-1256	-0.999899009	0.009047749
MYD88	hsa-miR-133a-3p	-0.999899009	0.009047749
MYD88	hsa-miR-137	-0.999899009	0.009047749
MYD88	hsa-miR-153-3p	-0.999899009	0.009047749
MYD88	hsa-miR-489-3p	-0.999899009	0.009047749
MYD88	hsa-miR-522-3p	-0.999899009	0.009047749
MYD88	hsa-miR-663a	-0.999899009	0.009047749
MYD88	hsa-miR-939-5p	-0.999899009	0.009047749
SKP1	hsa-miR-376c-3p	-0.999898531	0.009069135
DAAM2	hsa-miR-192-5p	-0.999897826	0.00910056
MAPK9	hsa-miR-576-3p	-0.999897158	0.009130283
SP1	hsa-miR-30a-5p	-0.999896888	0.009142236
ZFYVE16	hsa-miR-411-5p	-0.999896777	0.00914719
FZD9	hsa-miR-501-5p	-0.999895746	0.009192762
CTNNBIP1	hsa-miR-345-5p	-0.999895256	0.009214316
HES1	hsa-miR-329-3p	-0.999894804	0.009234169
NOTCH2	hsa-miR-28-5p	-0.999894542	0.009245674
TP53	hsa-miR-28-5p	-0.999893753	0.009280189
RIPK1	hsa-miR-101-3p	-0.999892904	0.009317189
RAC1	hsa-miR-27b-3p	-0.999892308	0.009343115
TNFAIP3	hsa-miR-23a-3p	-0.999890911	0.009403491
TLR4	hsa-miR-28-3p	-0.999890314	0.009429176
SMURF1	hsa-miR-422a	-0.999890286	0.009430391
PPP2R1B	hsa-miR-130a-3p	-0.99989022	0.009433247
DTX3L	hsa-miR-188-5p	-0.999889881	0.00944779
BIRC2	hsa-miR-185-5p	-0.999888899	0.009489812
RUVBL1	hsa-miR-548a-3p	-0.999888738	0.00949671
CDH1	hsa-miR-330-3p	-0.999888636	0.009597641
BCL2A1	hsa-miR-100-5p	-0.999888626	0.009601625
SKP1	hsa-miR-199a-3p	-0.999888527	0.009645395
SKP1	hsa-miR-199b-3p	-0.999888527	0.009645395
PPP2CB	hsa-miR-152-3p	-0.9998884513	0.009675347
PARP1	hsa-miR-34a-5p	-0.9998882554	0.009757057
BIRC2	hsa-miR-510-5p	-0.999881253	0.009810934
SMURF1	hsa-miR-1260a	-0.999880742	0.009832027
RPS6KB1	hsa-miR-345-5p	-0.999879967	0.009863928
CACYBP	hsa-let-7g-5p	-0.999879883	0.009867362
APC2	hsa-miR-193a-5p	-0.999879868	0.009867992
LTBR	hsa-miR-542-3p	-0.999878222	0.009935372
RIPK1	hsa-miR-16-5p	-0.999878034	0.009943053
SMAD4	hsa-miR-532-3p	-0.999877832	0.009951252
BCL2A1	hsa-miR-140-3p	-0.999877763	0.009959474
MAP3K7	hsa-miR-1277-3p	-0.999876775	0.009994242

注: has 代表人源的 miRNA。



附图1 HEMn、A375、A2058 细胞系中, EMT 相关基因表达量的热图



附图 2 HEMn、A375、A2058 细胞系中, 与 EMT 相关基因对应的 miRNA 表达量的热图