

本文引文格式:叶雨彤,何骏宇,李书,等.基于全转录组测序的小鼠 HCC 中 miR-122-5p 和 miR-27b-3p 调控 *Top2a* 异常表达的机制分析[J].右江民族医学院学报,2023,45(3):429-434.

【论著与临床报道】

## 基于全转录组测序的小鼠 HCC 中 miR-122-5p 和 miR-27b-3p 调控 *Top2a* 异常表达的机制分析

叶雨彤<sup>1</sup>,何骏宇<sup>1</sup>,李书<sup>2</sup>,黄雁<sup>1</sup>,李根亮<sup>3</sup>

1. 右江民族医学院临床医学院,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;
3. 右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000

**摘要:**目的 基于全转录组测序探讨小鼠肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中 miR-122-5p 和 miR-27b-3p 调控 DNA 拓扑异构酶 2-a(DNA topoisomerase 2-alpha, *Top2a*)异常表达的可能调控机制。方法 通过构建小鼠 HCC 模型、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和全转录组测序等生物信息学手段,以及结合 The Human Protein Atlas(人类蛋白质图谱数据库),分析 *Top2a* 在瘤体组织和正常肝组织中的差异表达,并进一步筛选与 *Top2a* 或其编码蛋白有 PPI 和靶标关系的差异( $q < 0.05$ ,  $q$  为校正的  $P$ )表达基因和 miRNA,分析其功能。构建 *Top2a* 编码蛋白的蛋白质-蛋白质互作图(PPI)和分析 *Top2a* 及相关基因参与的生物学功能。结果 与对照组相比,瘤体组织中 *Top2a* 差异过表达( $P < 0.05$ ),且存在 87 个与 *Top2a* 编码蛋白互作、差异表达的蛋白编码基因。GO 功能富集显示,*Top2a* 及相关基因主要存在于细胞核,且多数具有蛋白结合和 DNA 结合活性,参与 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正向调节、细胞对 DNA 损伤刺激的反应和染色体分离等生物学过程。同时,存在 miR-27b-3p 和 miR-122-5p 这 2 种靶向于 *Top2a* 的 miRNA 在瘤体组织中表达显著低于对照组织。*Top2a* 基因在肝癌组织中 RNA 和蛋白质表达水平均高于正常肝组织,此外,*Top2a* 基因低表达的肝癌患者的生存率明显高于高表达的患者。结论 *Top2a* 基因在 HCC 中过表达是其细胞抑制了 miR-122-5p 和 miR-27b-3p 表达的结果。而 *Top2a* 在细胞核内通过蛋白结合和 DNA 结合等活性,影响转录起始、DNA 损伤刺激反应和染色体分离等生物学过程,则是其在 HCC 中发挥作用的分子机制。*Top2a* 基因可能是预测肝癌预后的重要生物标志物,有一定的临床诊断价值。

**关键词:**癌,肝细胞;拓扑异构酶 2-a; miRNA;全转录组测序;计算生物学

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2023)03-0429-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.03.010

### Mechanism analysis of miR-122-5p and miR-27b-3p regulating *Top2a* abnormal expression in rats with HCC based on whole transcriptome sequencing

Ye Yutong<sup>1</sup>, He Junyu<sup>1</sup>, Li Shu<sup>2</sup>, Huang Yan<sup>1</sup>, Li Genliang<sup>3</sup>

1. School of Clinical Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
3. School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**基金项目:**国家级大学生创新训练计划项目(202010599019);百色市科技计划项目区域多发病联合专项(百科 20224148)

**第一作者简介:**叶雨彤(2000—),女,在读本科生,E-mail:1029651468@qq.com

**通讯作者简介:**李根亮(1970—),男,博士,教授,博士、硕士研究生导师,研究方向:基因表达调控与表现遗传学相关研究,E-mail:ligenliang@163.com

**Abstract:** **Objective** To explore the potential mechanisms of miR-122-5p and miR-27b-3p in regulating the abnormal expression of DNA topoisomerase 2- $\alpha$  (*Top2a*) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues of mice using whole transcriptome sequencing. **Methods** By constructing a mouse HCC model and employing real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and whole transcriptome sequencing, combined with the analysis of The Human Protein Atlas database, differential expression of *Top2a* in tumor tissues and normal liver tissues was analyzed. Differentially expressed genes and miRNAs with protein-protein interaction (PPI) and target relationships with *Top2a* or its encoded proteins ( $q < 0.05$ ,  $q$  is the corrected  $P$  value) were further screened, and their functions were analyzed. A protein-protein interaction (PPI) network of *Top2a*-encoded protein was constructed, and the biological functions of *Top2a* and its related genes were analyzed. **Results** Compared with the control group, *Top2a* showed overexpression in tumor tissues ( $P < 0.05$ ), and 87 protein-coding genes that interacted with *Top2a* and exhibited differential expression were identified. GO functional enrichment analysis showed that *Top2a* and its related genes were mainly located in the nucleus and had protein binding and DNA binding activities, participating in biological processes such as positive regulation of RNA polymerase II promoter transcription, cellular response to DNA damage stimulation, and chromosome segregation. Moreover, in tumor tissues, the expression of miR-27b-3p and miR-122-5p, which target *Top2a*, was significantly lower than in control tissues. The RNA and protein expression levels of the *Top2a* gene were higher in liver cancer tissues than in normal liver tissues. Additionally, HCC patients with low expression of the *Top2a* gene exhibited significantly higher survival rates compared to those with high expression. **Conclusion** The overexpression of the *Top2a* gene in HCC is a result of cellular inhibition of miR-122-5p and miR-27b-3p expression. *Top2a* affects biological processes such as transcription initiation, cellular response to DNA damage stimulation, and chromosome segregation through its activities of protein binding and DNA binding in the nucleus, which represents the molecular mechanism of its role in HCC. The *Top2a* gene may serve as an important biomarker for predicting the prognosis of HCC and has clinical diagnostic value to a certain extent.

**Key words:** cancer, hepatocyte; topoisomerase 2- $\alpha$ ; microRNA; whole transcriptome sequencing; computational biology

全球范围内的恶性肿瘤的发生率和死亡率日益增长,并逐渐趋于低龄化。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全世界第六大最常见的恶性肿瘤,同时死亡率在恶性肿瘤中位列第四<sup>[1]</sup>。我国是肝癌大国,由于早期诊断率低,大多数患者被诊断为 HCC 时已是中晚期,已经严重威胁我国国民的身心健康<sup>[2]</sup>。在 HCC 的发生发展过程中,有大量基因出现了异常表达的现象,如 *Top2a*<sup>[3-4]</sup>。*Top2a* 是一种在转录过程中控制和改变 DNA、染色体分离和细胞周期过程拓扑状态的酶。*Top2a* 基因位于人类第 17 号染色体上,小鼠则为第 11 号染色体上,编码 DNA 拓扑异构酶。*Top2a* 可以诱导胰腺癌、肺癌等恶性肿瘤的发展,并在肿瘤组织中过表达<sup>[5-6]</sup>。例如,*Top2a* 的过表达会通过激活  $\beta$ -连环蛋白途径来驱动胰腺癌的恶性进展<sup>[7]</sup>;或通过激活  $\beta$ -catenin 途径来促进胶质瘤细胞的增殖<sup>[8]</sup>。尤其值得一提的是,在 HCC 相关研究中, PANVICHIAN R 等<sup>[9]</sup>研究表明,72.5% 的 HCC 肿瘤组织中检测到 *Top2a* 过表达,*Top2a* 过表达与 HCC 的发生显著相关。此外, DROZDOV I 等<sup>[10]</sup>以 HCC 组织、丙型肝炎病毒(HCV)肝组织、以及正常肝组织为材料利用 RT-qPCR 技术验证了 *Top2a* 等基因在癌

组织中过表达。由此可见,*Top2a* 在 HCC 等多种恶性肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色。WANG T 等<sup>[11]</sup>的一项新研究表明,*Top2a* 过表达可以促进 HCC 细胞的增殖、侵袭和转移;反之,*Top2a* 的敲低则抑制肿瘤的发展,而 miR-144-3p 则具有调控 *Top2a* 过表达促进 HCC 增殖和转移的功能。但 *Top2a* 参与 HCC 的分子机制及本课题组前期分析中发现的大量异常表达的 miRNA 是否也具有调控 *Top2a* 表达的功能,这还有待进一步明确。本研究旨在通过全转录组测序和生物信息学手段及 RT-qPCR 等方法分析 *Top2a* 参与 HCC 发生发展过程的分子机制,并进一步筛选参与调控 HCC 中 *Top2a* 过表达的 miRNA,为临床精准治疗提供潜在的靶标分子。

## 1 材料和方法

### 1.1 HCC 小鼠模型的构建及样本的测序和数据分析

购置 40 只 25~30 g 肢体健全、活泼健壮、大小一致的健康、洁净级 KM 雄性小鼠(长沙市天勤生物技术有限公司[SCXK(湘)2019-0014],饲养于右江民族医学院 SPF 级实验室,用于构建 HCC 小鼠模型。对小鼠进行随机分组,然后进行动物模型的构建。首先把 40 只小鼠进行随机分组,将 H22 细胞株(上海中乔新

舟生物科技有限公司)注入其中一组 20 只小鼠的右侧腋窝皮下进行肿瘤,将生理盐水注射到剩下一组 20 只小鼠的右侧腋窝皮下作空白对照,注射液的配制以及给小鼠注射的工作各只由一人完成,约 10 d 时取造模成功小鼠的瘤体组织(用 H 表示)及注射生理盐水而未接种 H22 细胞株的小鼠的正常肝组织(用 OO 表示)。在本实验中,为了避免因个体因素导致的误差,使用的样本都是大于 5 只小鼠的混合样本。

1.2 *Top2a* 的表达 通过实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)分析 *Top2a* 在各样本中的表达情况。RT-qPCR 的内参基因为 *Gapdh*,引物通过 NCBI 的 Primer-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)在线软件设计,并由上海生工生物工程股份有限公司(上海生工)合成。*Top2a* 和内参 *Gapdh* 的引物序列分别为:*Top2a* 上游引物为 TGCTCAACCTCTGACGTGATG,下游引物为 CTCCCAGGGATCTCGTGTG;内参 *Gapdh* 的上游引物为 GGTTGTCTCTGCGATTCA,下游引物为 TGGTCCAGGGTTCTTACTCC。

利用总 RNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)提取小鼠正常肝细胞和 HCC 组织的 RNA,再用 BeyoRTTM II cDNA 第一链合成试剂盒(RNase H)(上海碧云天生物技术有限公司)反转录成 cDNA,最后用 Hieff<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix (High Rox Plus)试剂盒配制 PCR 反应混合液,加入上游引物和下游引物,于罗氏 LightCycler96 RT-qPCR 仪(瑞士 Roche 公司)上进行 RT-qPCR。RT-qPCR 的参数设置参照相关试剂说明书。设置程序:两步法 PCR 程序,预变性 95 °C 5 min;变性 95 °C 10 s;退火/延伸 60 °C 30 s;循环 40 次。溶解曲线反应程序,72~95 °C,升温 2.05 °C/s,恒定温度 95 °C 持续 15 s;95~60 °C,升温 -1.71 °C/s,恒定温度 60 °C 持续 60 s;60~95 °C,升温 0.05 °C,恒定 95 °C 持续 15 s,用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算结果。

1.3 *Top2a* 基因 PPI、靶标分析及相关分子筛选 通过华大基因的交互系统(<https://biosys.bgi.com/>)分析 *Top2a* 基因的 PPI 分子及靶向 *Top2a* 的 miRNA,然后筛选出瘤体组织和正常肝组织之间差异表达的基因和 miRNA。两样本间  $|\log FC| > 1$  和  $q < 0.05$  ( $q$  为校正的  $P$ )的基因为有统计学差异分子。与 *Top2a* 基因呈靶向关系的 miRNA 的筛选通过 miRNet(<https://www.mirnet.ca>)、miRanda (<https://www.imdb.com/title/tt1533435>)、RNAhybrid (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16845047>)、miRBase(<https://www.mirbase.org>)、miRTarBase ([\[mirtarbase.cuhk.edu.cn\]\(http://mirtarbase.cuhk.edu.cn\)\) 和 miRWalk \(\[mirwalk.umm.uni-heidelberg.de\]\(http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de\)\)这 6 个平台完成。](https://</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

1.4 *Top2a* 及其相关基因功能分析 通过 STRING 11.0 在线系统(<https://string-db.org/>)构建 *Top2a* 编码蛋白的 PPI 网络图。利用 DAVID7.0 在线软件(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)对 *Top2a* 及其互作分子进行 GO 功能富集。GO 是一种将基因、基因产物和序列注释到潜在生物现象的常用方法,基因功能可分为生物过程(BP)和细胞成分(CC)、分子功能(MF)等。用 Excel 软件、Cytoscape 软件对富集结果和相关基因进行分析和作图,并利用 Cytoscape 中的 Cytohubba 插件筛选 10 个核心基因(Top10 hub-genes)。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据,计量资料均以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,计量资料经正态分布和方差齐性检验后,采用两独立样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

1.6 *Top2a* 基因在 RNA 和蛋白质水平的表达分析

利用 The Human Protein Atlas(人类蛋白质图谱数据库)(<https://www.proteinatlas.org>)基于蛋白组学、转录组学以及系统生物学数据,绘制蛋白质图谱,用免疫组织化学实验验证 *Top2a* 基因在肝癌组织和正常肝组织中 RNA 水平和蛋白质水平的表达情况,以及肝癌患者生存分析。

## 2 结果与分析

2.1 *Top2a* 的 RT-qPCR 结果 利用 SPSS 20.0 软件进行统计分析可知,*Top2a* 在正常肝组织和 HCC 组织中具有不同的表达水平,其中,*Top2a* 在 HCC 组织中的表达明显高于正常肝组织,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

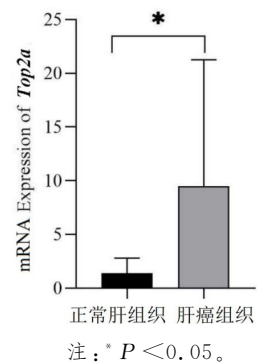


图 1 *Top2a* 在正常肝组织、HCC 组织中的表达情况

2.2 *Top2a* 及相关基因的功能分析 通过华大基因在线分析系统以及利用 STRING 11.0 数据库,共筛选出 87 个在瘤体组织和对照的正常肝组织之间差异



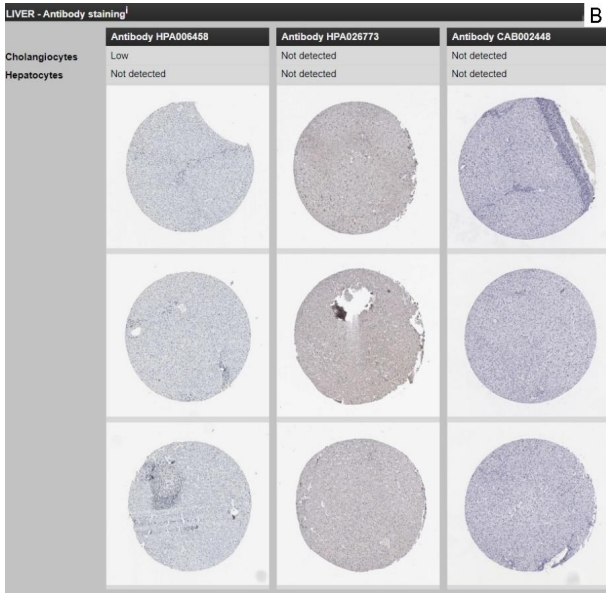
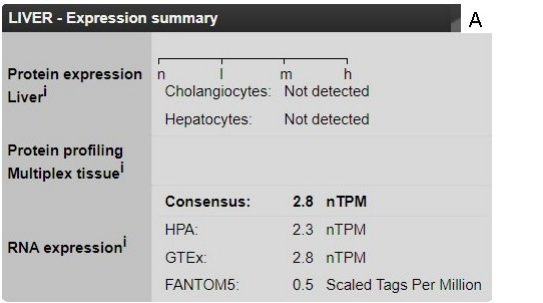


图 4 正常肝组织中 Top2a 蛋白的表达量(A,B)

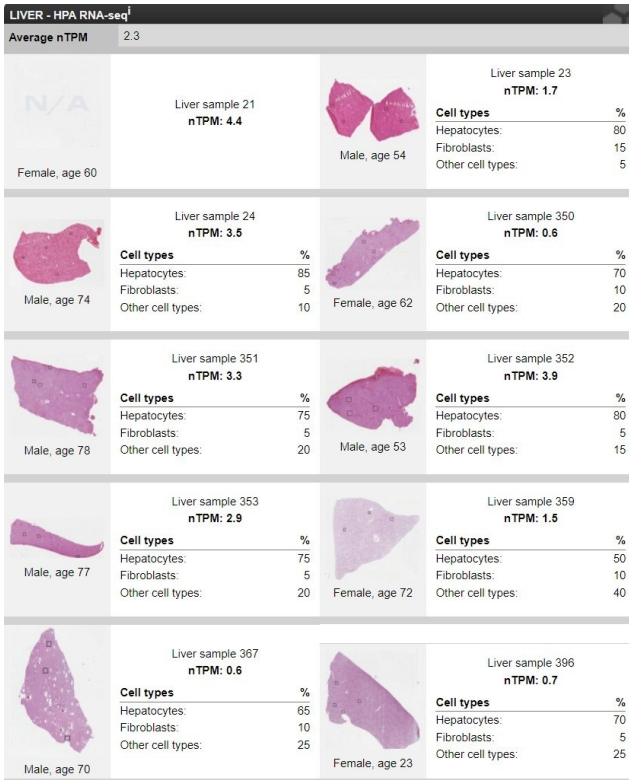


图 5 正常肝组织中 Top2a mRNA 水平的表达量

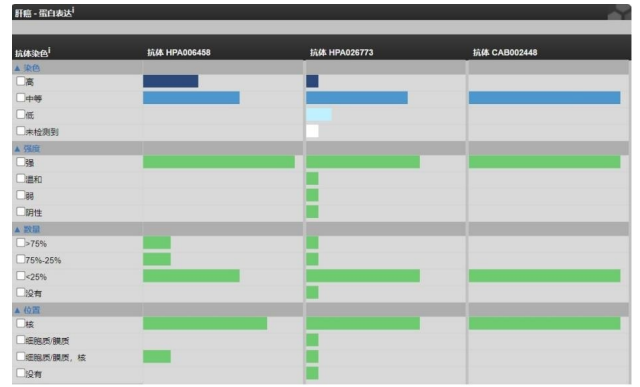


图 6 HCC 组织中 Top2a 蛋白的表达量

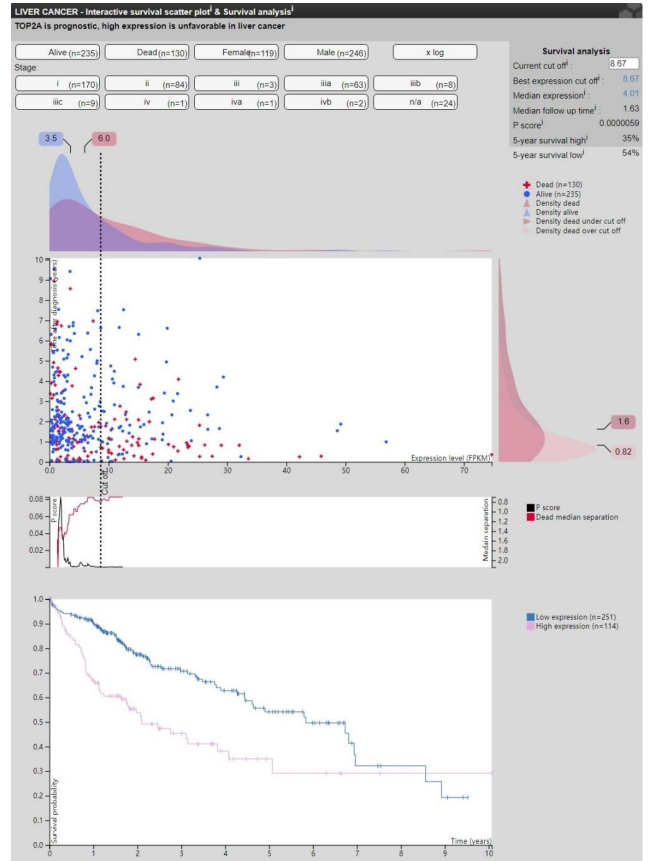


图 7 Top2a 的表达量与 HCC 患者的生存曲线

### 3 讨论

HCC 仍然是全球范围内最常见的难治性恶性肿瘤之一。HCC 的发病率一直居高不下并有逐年增加的趋势<sup>[12]</sup>。大多数患者由于就诊时已处于中晚期而不适合进行手术切除等治疗<sup>[13]</sup>，因此，寻找新的生物标志物和靶点对 HCC 的诊断和治疗具有重要的意义<sup>[14]</sup>。

本课题组的研究表明，存在 87 个与 Top2a 编码蛋白互作的分子，尤其是 Mad211、Snrpd2、Erb2、Trp53bp1 等分子。表明在 HCC 中发挥作用主要与这些分子的协作相关。Top2a 主要存在于细胞核中，并主要在 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正向调节、细胞

对 DNA 损伤刺激的反应、染色体分离等方面发挥作用,表明 *Top2a* 主要在细胞核内与互作分子的协同作用,通过影响转录起始、DNA 损伤刺激反应、染色体分离等生物学过程发挥作用。

miRNA 的失调在癌症的发生发展过程中发挥着重要作用。miRNA 在恶性肿瘤中上调或下调时,可以被看作是癌基因或抑癌基因<sup>[15]</sup>。miR-122-5p 在甲状腺癌的瘤体组织中的表达显著降低<sup>[16]</sup>,而 miR-27b 在原发性肿瘤中的表达显著下调<sup>[17]</sup>。本次研究通过 miRNet 等数据库筛选及全转录组数据分析发现,HCC 小鼠中存在 miR-122-5p 和 miR-27b-3p 这 2 个 miRNA 与 *Top2a* 基因存在靶向关系。因此这 2 个 miRNA 在 HCC 小鼠瘤体组织中 *Top2a* 基因过表达的调控中可能发挥着重要作用。也就是说,HCC 组织细胞通过某些机制抑制了 miR-122-5p 和 miR-27b-3p 的表达,从而解除了它们对 HCC 中 *Top2a* 基因表达的抑制作用。

本次研究以及人类蛋白质图谱数据库表明,*Top2a* 基因在 HCC 组织中,RNA 和蛋白质表达水平均高于正常肝组织,同时,在 HCC 患者中,*Top2a* 基因低表达的患者生存率明显高于高表达的患者。也有相关的研究证实,*Top2a* 基因在 HCC 组织中的高表达与 HCC 患者的预后不良明显相关,因此,*Top2a* 在临床上有较高的诊断价值并可作为预测 HCC 预后的生物标志物<sup>[18]</sup>。

综上所述,与对照组织相比,*Top2a* 基因在 HCC 小鼠瘤体组织中过表达是 HCC 组织细胞抑制了 miR-122-5p 和 miR-27b-3p 表达的结果。而 *Top2a* 在 HCC 中发挥作用的分子机制则是在细胞核内通过蛋白结合和 DNA 结合等活性,影响转录起始、DNA 损伤刺激反应和染色体分离等生物学过程,参与小鼠 HCC 的病理过程。*Top2a* 基因在 HCC 组织中 RNA 和蛋白质表达水平均高于正常肝组织,因此,*Top2a* 基因可能是预测 HCC 预后的重要生物标志物,有一定的临床诊断价值。

#### 参考文献:

[1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.

[2] LUK J M, LIU A M. Proteomics of hepatocellular carcinoma in Chinese patients [J]. *OMICS*, 2011, 15(5): 261-266.

[3] SHEN S, KONG J J, QIU Y W, et al. Identification of core genes and outcomes in hepatocellular carcinoma by bioinformatics analysis [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10069-10081.

[4] ZHAO Q, ZHANG Y, SHAO S C, et al. Identification of hub genes and biological pathways in hepatocellular carcinoma by integrated bioinformatics analysis [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10594.

[5] PEI Y F, YIN X M, LIU X Q. *Top2a* induces malignant character of pancreatic cancer through activating  $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(1): 197-207.

[6] KOU F, SUN H F, WU L, et al. *Top2a* promotes lung adenocarcinoma cells' malignant progression and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma [J]. *J Cancer*, 2020, 11(9): 2496-2508.

[7] PEI Y F, YIN X M, LIU X Q. *Top2a* induces malignant character of pancreatic cancer through activating  $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(1): 197-207.

[8] LIU Y, MA J, SONG J S, et al. DNA topoisomerase II  $\alpha$  promotes the metastatic characteristics of glioma cells by transcriptionally activating  $\beta$ -catenin [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 2207-2216.

[9] PANVICHIAN R, TANTIWETRUEANGDET A, AN-GKATHUNYAKUL N, et al. *Top2a* amplification and overexpression in hepatocellular carcinoma tissues [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 381602.

[10] DROZDOV I, BORNSCHEIN J, WEX T, et al. Functional and topological properties in hepatocellular carcinoma transcriptome [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35510.

[11] WANG T, LU J, WANG R R, et al. *Top2a* promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma regulated by miR-144-3p [J]. *J Cancer*, 2022, 13(2): 589-601.

[12] WANG W Y, WEI C. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Genes Dis*, 2020, 7(3): 308-319.

[13] KIM E, VIATOUR P. Hepatocellular carcinoma: old friends and new tricks [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(12): 1898-1907.

[14] ADENIJI N, DHANASEKARAN R. Genomic Landscape of HCC [J]. *Curr Hepatol Rep*, 2020, 19(4): 448-461.

[15] LEE Y S, DUTTA A. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2009, 4: 199-227.

[16] HU N, TIAN Y H, SONG Y M, et al. miR-122-5p suppresses the oncogenesis of PTC by inhibiting DUSP4 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5).

[17] MATSUYAMA R, OKUZAKI D, OKADA M, et al. MicroRNA-27b suppresses tumor progression by regulating ARFGEF1 and focal adhesion signaling [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(1): 28-35.

[18] CAI H Y, SHAO B F, ZHOU Y, et al. High expression of *Top2a* in hepatocellular carcinoma is associated with disease progression and poor prognosis [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5): 232.

收稿日期:2022-12-20;修回日期:2023-02-15