

基于 GEO 数据库筛选动脉粥样硬化发生的关键差异 circRNA

李晶,张芸*,席建军,程文俊,鸿嘎鲁

(内蒙古医科大学附属医院 全科医学科,内蒙古 呼和浩特 010050)

摘要: **目的:**环状RNA(circRNAs)是一种内源性非编码RNA,与生长发育过程以及神经系统退行性病变、肿瘤以及动脉粥样硬化(AS)等疾病密切相关。然而,circRNAs在AS中的作用尚不清楚。本研究可能为诊断和治疗AS提供候选靶点及理论依据。**方法:**1)我们通过基因表达综合数据库(GEO)分析DECs在外泌体中的表达水平。2)我们通过CSCD在线数据库分析筛选出的hsa_circ_0003645功能,并对靶基因进行预测分析和富集分析。3)通过构建PPI网络筛选出关键基因并进行GO和KEGG富集分析。4)通过Enrichr数据库的DrugMatrix分析与关键基因相互作用的小分子药物。**结果:**1)我们通过GEO数据库分析DECs在外泌体中的表达水平,选择hsa_circ_0003645进行后续研究。2)我们通过CSCD在线数据库鉴定出hsa_circ_0003645具有较高的蛋白质编码能力,含有eIF4AIII和TDP-43两个结合位点,可能与56个miRNA发生相互作用,并对靶基因进行预测分析和富集分析。3)通过构建PPI网络筛选出排名前20的关键基因并进行GO和KEGG富集分析,结果发现hsa_circ_0003645的20个关键基因的主要富集在protein ubiquitination、regulation of cell motility、cell periphery、FoxO signaling pathway、Focal adhesion、Wnt signaling pathway。4)通过Enrichr数据库的DrugMatrix分析与20种关键基因相互作用的小分子药物,这些结果说明这些小分子药物可能具有治疗AS的潜在能力。**结论:**本研究所鉴定的hsa_circ_0003645、eIF4AIII和关键基因有助于我们了解AS的发病机制和进展,也可能有助于为AS的诊断和治疗提供候选靶点。

关键词: 动脉粥样硬化;circRNA;hsa_circ_0003645

中图分类号: R534.5

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2021)02-0132-08

SCREENING OF KEY DIFFERENTIAL CIRC RNA IN ATHEROSCLEROSIS BASED ON GEO DATABASE

LI Jing, ZHANG Yun, XI Jian-jun, et al.

(General Medicine, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050 China)

Abstract: Objective: circular RNA (circRNAs) is a kind of endogenous non-coding RNA, which is closely related to the process of growth and development, neurodegenerative diseases, tumors and atherosclerotic (AS). However, the role of circRNAs in AS is not clear. This study may provide candidate targets and theoretical basis for the diagnosis and treatment of AS. **Methods:** The main results are as follows: 1) We analyzed the expression level of DECs in exosomes by (GEO), which is a comprehensive database of gene expression. 2) We analyzed the function of hsa_circ_0003645 screened by CSCD online database, and carried out predictive analysis and enrichment analysis of target genes. 3) The key genes were screened by constructing PPI network and enriched by GO and KEGG. 4) Small molecular drugs interacting with key genes were analyzed by DrugMatrix in Enrichr database. **Results:** 1) We analyzed the expression level of DECs in exosomes by GEO database, and selected hsa_circ_0003645 for follow-up study. 2) Through CSCD online database, we identified that hsa_circ_0003645 has high protein coding ability, contains two binding sites of eIF4AIII and TDP-43, and may interact with 56 miRNAs, and carry out predictive analysis and enrichment analysis of target genes. 3) Through the construction of PPI network, the top 20 key genes were screened and analyzed by GO and KEGG. The results showed that the 20 key genes of hsa_circ_0003645 were mainly enriched in protein ubiquitination, regulation of cell motility, cell periphery, FoxO signaling pathway, Focal adhesion, Wnt signaling pathway. 4) Through Enrichr database's DrugMatrix analysis with 20 key genes interacting with small molecular drugs, these results indicate that these small molecular drugs may have the potential to treat AS.

收稿日期: 2020-11-04; **修回日期:** 2021-02-06

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY18103);内蒙古自治区自然科学基金项目(2018MS08015);内蒙古医科大学附属医院博士启动金项目(NYFYBS 2018)

作者简介: 李晶(1982-),女,内蒙古医科大学附属医院全科医学科副主任医师。

通讯作者: 张芸,副主任医师,硕士研究生导师,E-mail:1056370989@qq.com 内蒙古医科大学附属医院全科医学科,010050

uitation, regulation of cell motility, cell periphery, FoxO signaling pathway, Focal adhesion and Wnt signaling pathway.4) The small molecular drugs that interact with 20 key genes are analyzed by DrugMatrix in Enrichr database. These results indicate that these small molecular drugs may have the potential to treat AS. **Conclusion:** The identification of hsa_circ_0003645, eIF4AIII and key genes in this study will help us to understand the pathogenesis and progress of AS, and may also help to provide candidate targets for the diagnosis and treatment of AS.

Key words: Atherosclerosis; circRNA; hsa_circ_0003645

1 前言

心血管疾病(cardiovascular disease, CVDs)是导致全球发病和死亡的重要原因,每年影响数百万人。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种涉及不同细胞类型、多种细胞因子和粘附分子的慢性炎症,不稳定的动脉粥样硬化斑块破裂、血管狭窄或血小板聚集和血栓形成引起的闭塞可导致急性心血管疾病^[1-2]。氧化低密度脂蛋白(OxLDL)具有高度的致AS作用,动脉粥样硬化的发病机制与巨噬细胞摄取低密度脂蛋白后转化为泡沫细胞密切相关^[3]。因此,寻找与AS发展相关的生物标志物可以为临床研究提供理论依据。

环状RNAs(circRNAs)是一类广泛存在于各种生物细胞中具有调控基因表达功能的长链内源性非编码RNA,具有结构稳定和组织特异表达等特征^[4],它们通常参与包括肿瘤在内的各种疾病的发生和发展。大量的研究数据表明,circRNAs在多种肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达存在显著性的差异^[5-9]。一些特异性表达的circRNAs可能成为肿瘤等多种疾病诊断和预后的新的生物标志物。Chen L等人发现circRNA_100290可能作为一种竞争性的内源性RNA(ceRNA),通过吸收miR-29b家族成员来调控CDK6在口腔鳞状细胞癌中的表达^[10]。尽管circRNAs在各种疾病中发挥作用,但是与AS相关的circRNAs的表达和功能鲜有研究,进一步研究有望用于预防或治疗AS。

在过去的几十年中,微阵列技术和生物信息学分析被广泛应用于差异基因筛选。在我们的研究中,利用基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)下载并分析微阵列数据集GSE107522,以获得经OxLDL处理得巨噬细胞THP-1实验组和THP-1对照组之间差异表达的circRNA(DEGs)。选择hsa_circ_0003645作为研究基因,并通过CSCD数据库预测hsa_circ_0003645 open reading frame(ORF)、RNA binding protein(RBP)和microRNA response element(MRE)。随后,对预测的靶基因进行Gene Ontology(GO)和Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)的通路富集分析,接着构建PPI网络,

筛选关键基因,以帮助我们了解AS发展的分子机制,分析与关键基因相互作用的小分子药物。本文探讨了circRNAs可能成为AS的潜在标志物,为预防和治疗该疾病提供了理论基础。

2 材料与方法

2.1 GEO数据下载和预处理

在GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载GSE107522数据集(3个巨噬细胞对照样本,3个氧化型低密度脂蛋白(OxLDL)处理的巨噬细胞样本)和GPL19978(Agilent-069978 Arraystar Human CircRNA microarray V1)平台注释文件,通过编写perl脚本用平台注释文件对GSE107522表达矩阵的探针进行注释获得circRNA表达矩阵,接着使用AgilentcircRNA注释文件将circRNA的ID环化为circBase格式的ID。

2.2 差异分析

R软件(R version 3.6.1; <https://www.r-project.org/>)加载limm包,以 $\log_{2}FC > 1$ 或者 $\log_{2}FC < -1$, $P < 0.05$ 为筛选条件筛选差异表达的circRNA(DECs),接着利用pheatmap包对筛选出的DECs进行热图绘制。在circBase(<http://www.circbase.org/>)数据库中检索DECs相关信息。接着在exorbase(<http://www.exorbase.org/>)数据库中检索DECs在外泌体中的表达水平。

2.3 CircRNAs的ORF、RBP和MER预测

通过CSCD^[11]数据库(Cancer-Specific CircRNA Database: <http://gb.whu.edu.cn/CSCD/>)预测circRNAs的open reading frame(ORF)、RNA binding protein(RBP)和microRNA response element(MRE)。接着通过ORFfinder^[7]数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)和circbank数据库(<http://www.circbank.cn/index.html>)预测circRNA的ORF以及编码的蛋白,并在UniProtKB数据库对编码的蛋白进行blast分析。最后我们在Circular RNA Interactome数据库(<https://circinteractome.nia.nih.gov/>)预测circRNA的RBP,再通过venny2.1(<https://bioinfo.gcnb.csic.es/tools/venny/>)在线网站与CSCD预测的RBP取交集。在starbase数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)的通

路模块下对两个数据库共有的RBP进行KEGG富集分析。

2.4 CircRNA MER的靶基因预测及GO和KEGG pathway分析

下载miRDB、miRTarbase和TargetScan三个数据的miRNA靶基因预测文件,对通过perl脚本得到circRNAs MER在三个数据共同预测到的靶基因进行GO和KEGG的富集分析。通过org.Hs.eg.db包将差异基因的Official Symbol转化为基因ID,cluster-Profiler包进行GO和KEGG富集分析,GO plot包^[12]进行聚类分析,且p值和q值都小于0.05才具有显著差异。

2.5 PPI网络构建及关键基因筛选

使用STRING数据库(<https://string-db.org/>)构建circRNA MER靶基因的PPI网络,并且综合数值大于0.9的相互作用才具有统计学意义的。Cyto-Hubba插件按degree方法筛选前20个关键基因。颜色越红色代表基因degree越大。

2.6 关键基因的KEGG和GO富集分析

利用DAVID在线数据库(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)进行生物学分析,P值小于0.05被认为具有统计学意义。通过Enrichr在线数据库(<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>)中的DrugMatrix分析预测可以与关键基因相互作用的小分子化合物。

3 结果

3.1 差异表达的circRNAs筛选

我们对GSE107522进行标准化处理后,得到了9个差异表达的DECS(见图1A)和DECS绘制的热图(见图1B)。与THP-1对照组相比,经oxLDL处理得巨噬细胞THP-1中有8个circRNAs上调,1个circRNAs下调(见表1)。

为了从9个差异表达的circRNA筛选到目标circRNA进行后续分析,我们在circBase数据中检索了这9个circRNA的相关信息。我们发现hsa_circ_0003645和hsa_circ_0005699的基因名称都是C16orf62且在许多样本中都有表达(见表2)。有趣的是通过核酸序列比较发现hsa_circ_0003645的核酸序列大于hsa_circ_0005699,因此我们选择hsa_circ_0003645进行后续分析。

3.2 CircRNA在人血外泌体中的表达水平

我们通过在外泌体(exorbase(<http://www.exorbase.org/>))数据库中检索hsa_circ_0003645在人血外泌体中的

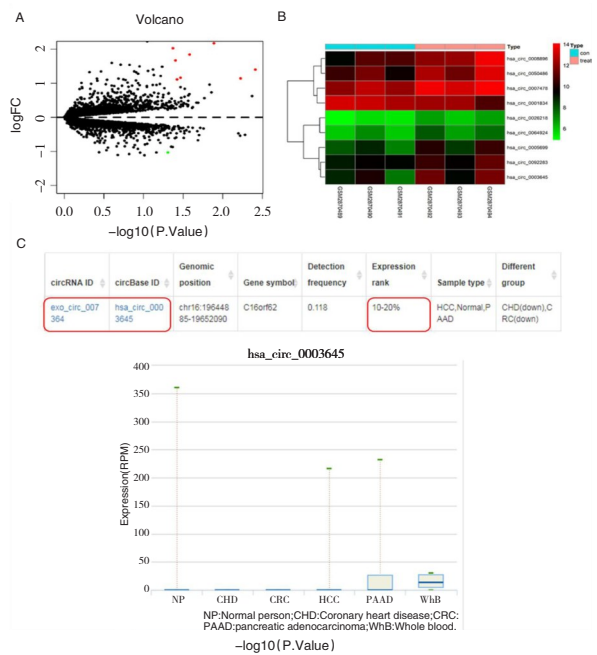


图1 DECS的鉴定及circRNAs的表达

Fig.1 Identification of DECS and expression of circRNAs (A)火山图显示circRNAs的表达情况;(B)DECS的热图;(C) hsa_circ_0003645在5种疾病患者血液外泌体中的表达情况

表1 circRNAs在oxLDL巨噬细胞吞噬中的差异表达

Tab.1 Differential expression of circRNAs in phagocytosis of oxLDL macrophages

circBase ID	logFC	AveExpr	T	B	P.Value
has_circ_0008896	2.18	11.54	3.47	-3.99	0.01
has_circ_0003645	2.03	9.76	2.56	-4.18	0.04
has_circ_0050486	1.84	11.51	2.93	-4.10	0.03
has_circ_0005699	1.67	8.91	2.61	-4.17	0.04
has_circ_0007478	1.40	13.03	4.51	-3.85	0.00
has_circ_0064924	1.16	6.86	2.72	-4.14	0.03
has_circ_0026218	1.14	5.85	4.13	-3.89	0.01
has_circ_0092283	1.11	9.97	2.64	-4.16	0.0
has_circ_0001834	-1.03	12.41	-2.45	-4.21	0.05

表达水平,发现该circRNA在外泌体中有着比较高的表达水平,表达水平排在前10%~20%(expression rank:10%~20%),且hsa_circ_0003645在冠心病和结肠癌患者血液外泌体中表达均下调(见图1C)。这些结果表明,hsa_circ_0003645可能通过外泌体运输到胞外调控相关靶细胞,预示着巨噬细胞可能通过分泌外泌circRNA调控AS进展。

3.3 CircRNA的ORF预测

通过CSCD在线数据库预测hsa_circ_0003645的ORF、RBP和MER(见图2A)。通过ORFinder数

表2 差异表达的circRNA在circbase数据库中检索信息
Tab.2 Information retrieval of differentially expressed circRNA in circbase database

circBase ID	position	strand	Spliced length	samples	Gene symbol
has_circ_0008896	chr10:122273422-122250607	+	280	Hs68_RNase,Hs68_control, Huvec, Bj,Sknshra, diencephalon, cerebellum, occipital_lobe, frontal_cortex, parietal_lobe, temporal_lobe	PPAPDC1A
has_circ_0003645	chr16:19656207-19663412	+	356	Hs68_control, Hs68_RNase, cerebellum, diencephalon, frontal_cortex, occipital_lobe, parietal_lobe, temporal_lobe, A549, Ag04450, Bj, Gm12878, H1hesc, Nhek, Sknshra	C16orf62
has_circ_0050486	chr19:34868407-34868786	+	379	Hepg2, Helas3, Gm12878, Bj, A549, parietal_lobe	GPI
has_circ_0005699	chr:16:19627435-19663412	+	1198	Hs68_control, Hs68_RNase, cerebellum, diencephalon, frontal_cortex, occipital_lobe, parietal_lobe,Sy5y_exp1_D0,Sy5y_exp1_D2, A549, Ag04450, Bj, Gm12878, Helas3, K562, Sknshra	C16orf62
has_circ_0007478	chr12:27143382-27152609	-	622	Hs68_control, Hs68_RNase, cerebellum, diencephalon, frontal_cortex, occipital_lobe, parietal_lobe, A549, Ag04450, Bj, Gm12878, H1hesc, Helas3, Hepg2, Huvec, K562, Sknshra	TM7SF3
has_circ_0064924	chr3:40567269-40567355	+	86	A549,Ag04450,Bj,Gm12878,H1hesc,Helas3, K562,Sknshra	ZNF621
has_circ_0026218	chr12:50529514-50537840	-	675	H1heac,Bj,frontal_cortex	CERS5
has_circ_0092283	chr22:36681395-36681695	-	300	H9	MYH9
has_circ_0001834	chr9:2017333-2017502	+	169	neutr	SMARCA2

数据库预测 hsa_circ_0003645 的 ORF (见表 3), 结果显示 hsa_circ_0003645 的 ORF2 可能编码包含 108 个氨基酸的蛋白。对 hsa_circ_0003645 的 ORF2 相关蛋白进行同源比对, 发现与转录该 circRNA 的 VPS35L 基因 (C16orf62) 编码的蛋白源性最高 (见图 2B)。在 circbank 数据库进一步验证 hsa_circ_0003645 的蛋白编码能力, 结果进一步表明该 circRNA 具有较高的蛋白质编码能力 (见图 2C)。

表3 has_circ_0003645 的 ORF 预测
Tab.3 has_circ_ORF prediction of 0003645

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length(nt ORF2)
ORF2	+	2	29	>355	327 108
ORF5	-	2	<355	35	321 106
ORF4	-	1	233	54	180 59
ORF3	+	3	228	>356	129 42
ORF1	+	1	244	>354	111 36

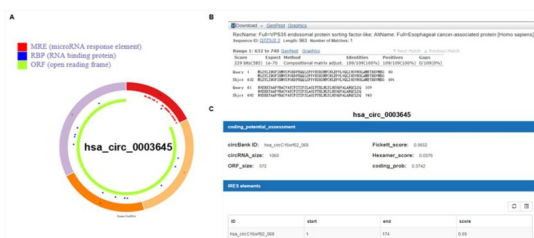


图2 预测 hsa_circ_0003645 的蛋白编码能力
Fig.2 Forecast hsa_circ_Protein coding ability of 0003645
(A) hsa_circ_0003645 的 ORF、RBP 和 MER 的预测;
(B) hsa_circ_0003645 的蛋白同源比对; (C) 验证 hsa_circ_0003645 的蛋白质编码能力

3.4 PBP 预测与 KEGG 富集分析

我们通过 CSCD 数据库和 circRNAs Interactome 数据库共同对 hsa_circ_0003645 进行 RBP 预测分析, 结果显示 hsa_circ_0003645 含有 eIF4AIII 和 TDP-43 的结合位点 (见表 4)。为了解 eIF4AIII 和 TDP-43 的功能, 我们通过 starbase 数据库对 eIF4AIII 和 TDP-43 两个 RBP 进行 KEGG 富集分析, 发现两者都主要富集在 Spliceosome、Cell_Cycle 和 Wnt_Signaling_Pathway 等相关通路上 (见表 5、6)。

表4 circRNAs的RBP分析
Tab.4 RBP analysis of circRNAs

Names	total	RNA binding protein
has_circ_0003645	2	eIF4AIII、TDP-43

表5 TDP-43在KEGG途径中的富集分析
Tab.5 Enrichment analysis of TDP-43 in KEGG pathway

pathwayName	log10(FDR)
KEGG_Spliceosome	-17.50268
KEGG_Ribosome	-16.52373
KEGG_Cell_Cycle	-14.65015
KEGG_Pathways_In_Cancer	-9.38635
KEGG_Pancreatic_Cncer	-7.71461
KEGG_Insulin_Signaling_Pathway	-7.1788
KEGG_Endocytosis	-6.97061
KEGG_Wnt_Signaling_Pathway	-6.5485
KEGG_Renal_Cell_Carcinoma	-6.51828
KEGG_Focal_Adhesion	-6.38993

表6 KEGG途径中eIF4AIII靶标的富集分析
Tab.6 Enrichment analysis of eIF4AIII target in KEGG pathway

pathwayName	log10(FDR)
KEGG_Spliceosome	-10.07172
KEGG_Cell_Cycle	-9.44379
KEGG_Ribosome	-8.32863
KEGG_Pathways_In_Cancer	-7.61845
KEGG_Lysosome	-6.63144
KEGG_Endocytosis	-6.27261
KEGG_Pancreatic_Cancer	-6.23871
KEGG_Focal_Adhesion	-6.22948
KEGG_Mapk_Signaling_Pathway	-4.91146
KEGG_Wnt_Signaling_Pathway	-2.18551

3.5 CircRNA MER 靶基因预测及 GO 和 KEGG pathway 分析

同时,通过 CSCD 数据库 MER 分析发现 hsa_circ_0003645 与 56 个 miRNA 可能发生相互作用。通过 perl 脚本预测 hsa_circ_0003645 的 MER 在 miRDB、miRTarbase 和 TargetScan 三个数据中的共同靶基因,发现 hsa_circ_0003645 的 MER 含有 578 个靶基因,接着对这些靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。Go 分析结果显示(见图 3A):BP 主要富集在 myeloid cell differentiation、response to steroid hormone、cellular response to steroid hormone stimulus。CC 主要富集在 cytoplasmic region、transport vesicle、secretory granule membrane。MF 主要富集在 DNA-

binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific、hormone receptor binding、nuclear hormone receptor binding。并对 GO 富集结果进行聚类分析。KEGG 主要富集在 Endocytosis、Focal adhesion、JAK-STAT signaling pathway、FoxO signaling pathway。并对 KEGG 富集结果进行聚类分析。

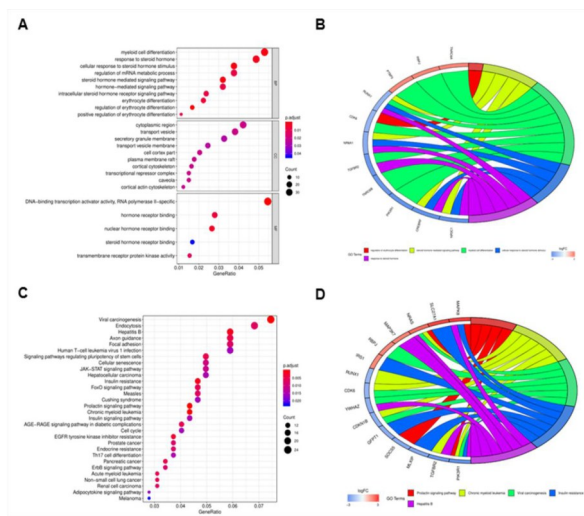


图3 GO和KEGG的富集分析
Fig.3 Enrichment analysis of GO and KEGG
(A)靶基因的GO富集分析;(B)聚集GO富集分析;(C)靶基因的KEGG富集分析;(D)聚集KEGG的富集分析

3.6 PPI 网络构建及关键基因筛选和分析

为确定目标基因之间的关键基因, hsa_circ_0003645 的靶基因通过 STRING 在线数据库构建 PPI 网络(见图 4A), 然后通过 Cytoscape 软件的 NetworkAnalyzer plugin 进行分析靶基因(见图 4B), 最后使用 cytoHubba plugin 的 degree 方法分析关键基因, 排在前 20 的基因被鉴定为关键基因(见图 4C)。接着为了解这些关键基因的功能, 我们通过 DVID 数据库对 hsa_circ_0003645 的 20 个关键基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。结果发现 hsa_circ_0003645 的 20 个关键基因的主要富集在 protein ubiquitination、regulation of cell motility、cell periphery、FoxO signaling pathway、Focal adhesion、Wnt signaling pathway(见表 7)。为了寻找与 20 个关键基因相互作用的小分子药物, 我们通过 Enrichr 数据库的 DrugMatrix 分析, 发现 hsa_circ_0003645 与新霉素、青霉素、氯雷他定三种小分子化合物相互作用(见表 8)。这些结果表明这些小分子药物可能具有治疗动脉粥样硬化的潜在价值。

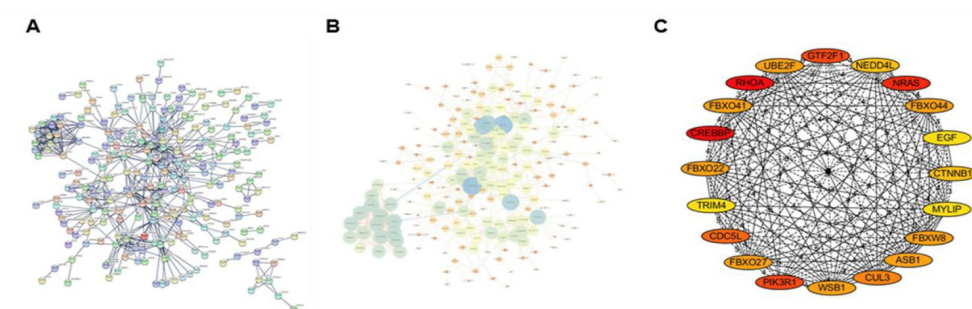


图4 PPI网络和筛选关键基因
Fig.4 PPI network and screening of key genes

(A)构建靶基因的PPI网络结构;(B)Cytoscape软件分析靶基因;(C)cytoHubba分析关键基因

表7 关键基因的GO和KEGG通路富集分析

Tab.7 Enrichment analysis of key genes through GO and KEGG pathways

Category	Term	Count	PValue
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0016567~protein ubiquitination	7	0.00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0038128~ERBB2 signaling pathway	3	0.00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007173~epidermal growth factor receptor signaling pathway	3	0.00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:2000145~regulation of cell motility	2	0.03
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000165~MAPK cascade	3	0.03
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0019005~SCF ubiquitin ligase complex	3	0.00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005622~intracellular	7	0.00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0032993~protein-DNA complex	2	0.02
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0071944~cell periphery	2	0.04
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004842~ubiquitin-protein transferase activity	6	0.00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005515~protein binding	16	0.00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008134~transcription factor binding	4	0.00
KEGG_PATHWAY	hsa05215:Prostate cancer	5	0.00
KEGG_PATHWAY	hsa05200:Pathways in cancer	6	0.00
KEGG_PATHWAY	hsa04015:Rap1 signaling pathway	5	0.00
KEGG_PATHWAY	hsa04068:FoxO signaling pathway	4	0.00
KEGG_PATHWAY	hsa05203:Viral carcinogenesis	4	0.00
KEGG_PATHWAY	hsa04510:Focal adhesion	4	0.00
KEGG_PATHWAY	hsa04012:ErbB signaling pathway	3	0.01
KEGG_PATHWAY	hsa04310:Wnt signaling pathway	3	0.02
KEGG_PATHWAY	hsa05161:Hepatitis B	3	0.02

4 讨论

心血管疾病(CVD)是当代社会普遍存在的问题。AS是导致人群心血管疾病(CVD)高死亡率的主要原因^[13]。Liang Zong 等人发现 circRNA_102231 在肺癌中表达上调, circRNA_102231 沉默显著降低了细胞迁移和侵袭的能力, 抑制了细胞增殖^[14]。然而 circRNAs 在 AS 中的作用还有待进一步探讨。

CircRNAs 是一类在真核转录组中高度表达的非编码 RNA, 可以作为 miRNA 海绵, 从而降低其靶

向 mRNA 的能力, 还参与组织和器官的发育, 并在各种疾病发生过程中发挥作用^[15]。Yan Zhang 等人研究发现 circRNA KIAA1586 作为 ceRNA 吸收了三种 miRNA (hsa-miR-29b、hsa-miR-101、hsa-miR-15a), 其失调可能导致阿尔茨海默症相关生物学功能的异常^[16]。Shen L 等人研究发现 circRNA 0044073 在 AS 中表达上调, 通过靶向 miR107 和激活 JAK/STAT 信号通路促进细胞增殖和侵袭, 可能为 AS 的治疗策略提供新靶点^[17]。这些研究结果有力地表明了 circRNAs 在多种疾病中起着重要作用。

表8 关键基因与16种小分子化合物相互作用分析
Tab.8 Analysis of interaction between key genes and 16 small molecular compounds

Name	P-value	Odds Ratio	Combined Score
Neomycin	4.83E-05	19.23	191.11
Penicillin_G	1.18E-04	15.27	138.06
Loratadine	1.42E-04	14.55	128.82
Cobalt_(II)_Chloride	1.68E-04	13.94	121.15
1-Naphthyl_Isothiocyanate	1.70E-04	13.89	120.55
Salicylamide	1.70E-04	13.89	120.55
Methapyrilene	1.77E-04	13.75	118.76
Cyclophosphamide	1.84E-04	13.61	117.01
Sparteine	1.84E-04	13.61	117.01
Baclofen	1.89E-04	13.51	115.87
Thioguanine	1.91E-04	13.47	115.30
Baclofen	1.96E-04	13.38	114.19
Doxorubicin	1.99E-04	13.33	113.64
Valdecoxib	2.48E-04	12.58	104.41
Venlafaxine	3.00E-04	11.98	97.16
Ofloxacin	4.15E-04	10.99	85.57

本文研究通过微阵列数据集 GSE107522 获得经 OxLDL 处理的巨噬细胞 THP-1 实验组和 THP-1 对照组的 DECs。我们发现共有 9 个差异表达的 circRNAs, 其中有 8 个表达上调, 1 个表达下调。结果显示, 单核细胞衍生的巨噬细胞对 oxLDL 的吞噬作用以及随后巨噬细胞向泡沫细胞的分化是 AS 形成的关键。Chen L 等人研究结果证实了 circRNA_100290 可作为治疗人类口腔鳞癌的靶点^[10]。因此, 这些 DECs 有可能为 AS 提供潜在的生物标志物及治疗靶点。我们根据 circBase 数据库检索 9 个差异表达的 circRNA 筛选出靶标 hsa_circ_0003645 后, 通过 exorbase 数据库分析发现, hsa_circ_0003645 在外泌体中的表达水平较高, 且在 CHD 和 CRC 患者血液外泌体中表达均下调。而有研究表明由砷转化的 L-02 细胞衍生出的外泌体 circRNA_100284 可通过充当 microRNA-217 的海绵, 加速细胞周期, 促进肝细胞增殖^[18]。因此, 我们推测巨噬细胞可能通过分泌外泌 circRNA 调控 AS 进展。同时, 我们还发现 hsa_circ_0003645 有 eIF4AIII 和 TDP-43 的结合位点, 可能与 56 个 miRNA 发生相互作用。circRNAs 可能通过 miRNAs 调控靶基因发挥作用。He JH 等人的研究结果表明 circRNA-ACAP2 可作为 miR-21-5p 的海绵, 通过调控 Tiam1 的表达, 从而影响结肠癌 SW480 细胞的增殖、迁移和侵袭^[19]。此外, 通过 starbase 数据库对 eIF4AIII 和 TDP-43 两个 RBP 进行 KEGG 富集分析发现 eIF4AIII 和 TDP-43 两者均

主要在 Spliceosome、Cell_Cycle 和 Wnt_Signaling_Pathway 等相关通路中富集。由此, 我们推测 hsa_circ_0003645 可能与 eIF4AIII 和 TDP-43 相互作用, 从而调控 AS 相关功能。我们通过 perl 脚本预测 hsa_circ_0003645 的 MER, 发现 hsa_circ_0003645 的 MER 含有 578 个靶基因。有研究表明 lncRNA 和 circRNA 可作为 ceRNA 参与 ceRNA 网络的构建, 可竞争结合相同 miRNA, 与 mRNA 之间相互作用, 影响靶基因的翻译或稳定性, 从而实现转录水平的基因调节, 进而在肿瘤发病机制中发挥作用。有研究报道称 circRNA 0072088 可以通过作为 miR-377-5p 的竞争性 ceRNA 上调 NOVA_2 发挥作用, 从而促进非小细胞肺癌的增殖和迁移^[20]。这与我们的研究类似, 因此, 我们判断 hsa_circ_0003645 可能通过 ceRNA 的作用机制从而影响动脉粥样硬化的发展进程。随后, 我们通过对 hsa_circ_0003645 的靶基因构建 PPI 网络并分析鉴定出 20 个关键基因, 并对这 20 个关键基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。分析结果发现这些关键基因主要富集在 protein ubiquitination、regulation of cell motility、cell periphery、FoxO signaling pathway、Focal adhesion、Wnt signaling pathway。此外, 我们通过 Enrichr 数据库的 DrugMatrix 分析还发现 hsa_circ_0003645 与新霉素、青霉素、氯雷他定三种小分子药物相互作用, 这些结果表明这些小分子药物可能具有治疗动脉粥样硬化的潜在价值。

总之,本文研究鉴定了 hsa_circ_0003645 及其相关的 RBP 和 MER 的分析。研究发现了 20 个关键基因以及与 hsa_circ_0003645 相互作用的 3 种小分子化合物。该项研究可能为 AS 提供新的生物标记物以及具有潜在价值的小分子药物。随着基因测序技术的升级,越来越多的基因组数据库被建立,有许多在线数据库可以用于 circRNAs 的研究,目前仅有少数 circRNAs 被证明与 AS 有关。然而, hsa_circ_0003645 在 AS 形成过程中可能的分子机制仍有待进一步探讨。此外,这些关键基因的生物学功能以及这些分子化合物在 AS 中的可能作用还需要进一步研究。

参考文献

- [1]Nitsa A, Toutouza M, Machairas N, et al, Philippou A and Koutsilieris M. Vitamin D in Cardiovascular Disease. In vivo (Athens, Greece). 2018;32:977-81
- [2]Zhu Y, Xian X, Wang Z, et al. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. Biomolecules. 2018;8(05):12-14
- [3]Shah P, Bajaj S, Virk H, et al. Rapid Progression of Coronary Atherosclerosis: A Review. Thrombosis. 2015; 2015: 634983
- [4]Rong D, Sun H, Li Z, et al. An emerging function of circRNA-miRNAs-mRNA axis in human diseases. Oncotarget. 2017; 8: 732-738
- [5]Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, et al. CircRNA: a novel type of biomarker for cancer. Breast cancer (Tokyo, Japan). 2018; 25: 1-7
- [6]Hu J, Li P, Song Y, et al. Progress and prospects of circular RNAs in Hepatocellular carcinoma: Novel insights into their function. Journal of cellular physiology. 2018;233:4408-4422
- [7]Meng S, Zhou H, Feng Z, et al. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer. Molecular cancer. 2017;16: 94
- [8]Dou Y, Cha DJ, Franklin JL, et al. Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes. Scientific reports. 2016; 6: 37982
- [9]Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, et al. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. Molecular cell. 2015;58: 870-885
- [10]Chen L, Zhang S, Wu J, et al. circRNA_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR-29 family. Oncogene. 2017;36:4551-4561
- [11]Xia S, Feng J, Chen K, et al. CSCD: a database for cancer-specific circular RNAs. Nucleic acids research. 2018; 46: 925-929
- [12]Walter W, Sanchez-Cabo F, Ricote M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. Bioinformatics (Oxford, England). 2015;31:2912-2914
- [13]Torres N, Guevara-Cruz M, Velazquez-Villegas LA, et al. Nutrition and Atherosclerosis. Archives of medical research. 2015; 46: 408-426
- [14]Zong L, Sun Q, Zhang H, et al. Increased expression of circRNA_102231 in lung cancer and its clinical significance. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2018;102:639-644
- [15]Du WW, Zhang C, Yang W, et al. Identifying and Characterizing circRNA-Protein Interaction. Theranostics. 2017; 7: 4183-4191
- [16]Zhang Y, Yu F, Bao S et al. Systematic Characterization of Circular RNA-Associated CeRNA Network Identified Novel circRNA Biomarkers in Alzheimer's Disease. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2019; 7: 222
- [17]Shen L, Hu Y, Lou J, et al. CircRNA0044073 is upregulated in atherosclerosis and increases the proliferation and invasion of cells by targeting miR107. Molecular medicine reports. 2019; 19: 3923-3932
- [18]Dai X, Chen C, Yang Q, et al. Exosomal circRNA_100284 from arsenite-transformed cells, via microRNA-217 regulation of EZH2, is involved in the malignant transformation of human hepatic cells by accelerating the cell cycle and promoting cell proliferation. Cell death & disease. 2018; 9: 454
- [19]He JH, Li YG, Han ZP, et al. The CircRNA-ACAP2/Hsa-miR-21-5p/ Tiam1 Regulatory Feedback Circuit Affects the Proliferation, Migration, and Invasion of Colon Cancer SW480 Cells. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2018; 49: 1539-1550
- [20]Tan Z, Cao F, Jia B, et al. Circ_0072088 promotes the development of non-small cell lung cancer via the miR-377-5p/NOVA2 axis. 2020;17(01):121-122
- [9]I S, M R-H, M K, et al. A positive feedback loop between IL-1 β , LPS and NEU1 may promote atherosclerosis by enhancing a pro-inflammatory state in monocytes and macrophages[J].2018;137:16-28
- [10]陈金庆,叶焕,何宇雨.Hcy、hs-CRP 和颈动脉粥样硬化与冠心病患者伴发房颤的相关性研究[J].中国处方药,2020;18(11):172-173
- [11]Razban M, Eslami M, Bagherzadeh A. The relationship between serum levels of hs-CRP and coronary lesion severity[J]. Clujul medical (1957),2016;89(3):322-326
- [12]Marzolla V, Armani A, Mammi C, et al. Essential role of ICAM-1 in aldosterone-induced atherosclerosis[J]. International journal of cardiology,2017;232:233-242

(上接第 117 页)