

·研究论文·

DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.04.004

联合 TCGA 和 GEO 数据库构建和分析胃癌中 circRNA 相关的 ceRNA 网络

李 让^{a,b}, 廖苑君^{a,b}, 孙胜南^{a,b}, 蓝树金^{a,b}, 赵小蕾^b, 覃继恒^b, 饶绍奇^{b*}

(广东医科大学 a. 公共卫生学院; b. 医学系统生物学研究所, 中国广东 东莞 523808)

摘要: 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类呈闭环状结构的竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA), 其通过竞争性地吸附微 RNA (microRNA, miRNA) 来调节基因表达。circRNA 失调与癌细胞的增殖、分化和侵袭等密切相关。本研究基于生物信息学分析和多数据库的联合应用, 以 ceRNA 为切入点探析胃癌中 circRNA 潜在的致病机制, 以期为胃癌提供潜在的临床诊疗靶点, 并为胃癌的科学研究提供新思路。首先, 通过挖掘胃癌差异表达的 circRNA、miRNA 和 mRNA 构建 circRNA-miRNA-mRNA ceRNA 网络; 随后, 利用网络拓扑属性分析确定核心的节点, 并根据这些核心的节点从原始的 ceRNA 网络中提取子网; 最后, 对子网进行功能学分析和生存分析, 分析网络行使的生物学功能并挖掘预后相关的基因。结果显示: 共挖掘了 6 个核心节点(hsa_circ_0008468、hsa_circ_0005822、hsa_circ_0025842、hsa-miR-940、hsa-miR-944 及 hsa-miR-515-5p); 从原始的 ceRNA 网络中提取了包含 8 对 circRNA-miRNA 和 539 个 miRNA-mRNA 关系对的子网络。功能富集结果表明子网涉及癌症相关的多个生物学过程, 包括代谢途径、cAMP 信号通路、pathways in cancer 信号通路等, 生存分析发现子网中 *ACO2*、*E2F8*、*GHR*、*ITIH5* 等 14 基因与预后显著相关, 这表明 3 个核心 circRNA 介导的 ceRNA 网络与胃癌的发生发展及预后密切相关。

关键词: 竞争性内源 RNA (ceRNA); 胃癌; ceRNA 网络; 环状 RNA (circRNA); 生物信息学分析

中图分类号: Q811.4, Q987.2, R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2020)04-0275-09

Construction and Analysis of circRNA-related ceRNA Network in Gastric Cancer by Combining TCGA and GEO Databases

LI Rang^{a,b}, LIAO Yuan-jun^{a,b}, SUN Sheng-nan^{a,b}, LAN Shu-jin^{a,b},
ZHAO Xiao-lei^b, QIN Ji-heng^b, RAO Shao-qi^{b*}

(a. School of Public Health; b. Institute of Medical Systems Biology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China)

Abstract: Circular RNAs (circRNAs) are a class of competing endogenous RNAs (ceRNAs) with a closed loop structure, which regulate gene expression by competitively adsorbing microRNAs (miRNAs). circRNA dysregulation is closely related to the proliferation, differentiation and invasion of cancer cells. This study uses ceRNAs as an entry point to reveal the potential pathogenic mechanism of circRNAs in gastric cancer cells, and provide potential clinical diagnosis and treatment targets for gastric cancer and also new ideas for the scientific research of gastric cancer based on the joint application of bioinformatics analysis and multiple databases. First, by mining the differentially expressed circRNAs, miRNAs and mRNAs of gastric cancer cells, the circRNA-miRNA-mRNA ceRNA network was constructed. Then, the network topological attribute analy-

收稿日期: 2020-04-16; 修回日期: 2020-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373085); 茂名市人民医院高水平建设科研专项(ZX2020013)

作者简介: 李让(1996—), 男, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事生物信息方面的研究, E-mail: 1257259635@qq.com; *通信作者: 饶绍奇(1962—), 男, 江西上饶人, 博士, 广东医科大学教授, 主要从事遗传统计与生物信息方面的研究, Tel: 0769-22896542, E-mail: raoshaog@gdmu.edu.cn.

sis was used to search the core nodes, and the core node-mediated subnetwork was extracted from the original ceRNA network. Finally, functional enrichment analysis and survival analysis were used to analyze the biological function of the network and mine prognostic genes, respectively. The results showed that a total of 6 core nodes (hsa_circ_0008468, hsa_circ_0005822, hsa_circ_0025842, hsa-miR-940, hsa-miR-944, and hsa-miR-515-5p) were mined out. A subnetwork containing 8 pairs of circRNA-miRNA and 539 pairs of miRNA-mRNA was extracted from the original ceRNA network. Results of functional enrichment indicated that the subnetwork was involved in multiple cancer-related biological processes including metabolic pathways, cAMP signaling pathways, and pathways in cancer, etc. Survival analysis revealed that 14 genes such as *ACO2*, *E2F8*, *GHR*, *ITIH5* in the subnetwork were significantly related to the prognosis, indicating that the three core circRNAs-mediated ceRNA network is closely related to the occurrence, development and prognosis of gastric cancer.

Key words: competing endogenous RNA (ceRNA); gastric cancer; ceRNA network; circular RNA (circRNA); bioinformatics analysis

(*Life Science Research*, 2020, 24(4): 275~283)

作为严重危害人类健康的消化道恶性肿瘤之一,胃癌的发病率和死亡率在恶性肿瘤中分别处于第5位和第3位^[1]。各种治疗手段的应用使得胃癌患者的5年生存率有所上升,但胃癌晚期患者的预后仍然较差。目前,胃癌仍是威胁人类健康的复杂疾病,其发生、发展机制尚未完全明确。

竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)的概念由哈佛大学医学院 Polisenno 等^[2]首先提出,其并非一种全新的 RNA,而是代表了一种新的基因表达调控模式。既往研究表明,微 RNA (microRNA, miRNA)通过与靶 mRNA 的 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合抑制靶 mRNA 的翻译,实现在转录后水平调节基因的表达,从而调控肿瘤细胞的生长、发育^[3]。在 ceRNA 的理论假说中,任何拥有 miRNA 反应元件(miRNA response element, MRE)结构的 RNA 都可以作为 ceRNA,包括环状 RNA (circular RNA, circRNA)、长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA)、mRNA 和假基因转录物等。作为 ceRNA 家族的一员, circRNA 同样能够通过竞争性地结合 miRNA 来调控基因的表达^[4]。 circRNA 因 5'和 3'端通过共价键相连而呈封闭环状结构^[5],相对于线性 RNA,特殊的结构使得 circRNA 拥有更强的稳定性和更高的保守性^[6]。随着高通量测序技术的发展,大量潜在的 circRNA 被发现,并且被证实作为肿瘤的重要调节因子与癌症的发生密切相关^[7-9]。近年来,越来越多的研究表明 circRNA 在胃癌的发生、发展中起着重要作用^[10-11]。此外, circRNA 具有的分布范围广、保守性高、组织表达特

异性高等特点,也预示着其有望成为胃癌诊断的生物标志物或胃癌治疗的靶点^[12-13]。

基于生物信息学分析和多数据库的联合应用,本研究挖掘了胃癌中差异表达的 circRNA、miRNA 和 mRNA 并构建了 ceRNA 网络;随后,利用网络的拓扑属性分析手段,鉴定了核心的 circRNA 并提取了 circRNA 介导的 ceRNA 子网;最后,以 ceRNA 机制为切入点研究了核心 circRNA 在胃癌发生发展中的作用机制,这为胃癌的诊断与治疗提供了潜在靶点,同时也为研究 circRNA 在胃癌中的作用机制提供了新的思路。

1 材料和方法

1.1 数据来源

从 GEO (Gene Expression Omnibus)数据库^[14]中按照以下标准获取胃癌的 circRNA 基因芯片数据:以“gastric cancer”&“circRNA”为关键词检索与胃癌相关的 circRNA 基因芯片;选择物种为“*Homo sapiens*”、研究类型为“expression profiling by array”两个过滤条件进一步筛选数据;最后选定实验设计符合病例对照研究类型并且病例与对照的组织样本数均大于或等于 3 的芯片。根据筛选结果,我们下载了两套胃癌的 circRNA 基因芯片:GS-E13-1414 (包含 3 个胃癌组织和 3 个非癌组织)和 GSE100170 (包含 5 个胃癌组织和 5 个非癌组织)。

作为目前最权威的癌症基因信息数据库,TCGA (The Cancer Genome Atlas)数据库^[15]覆盖 33 种癌症类型,含有超过 30 000 例的肿瘤样本以及 20 000 个基因的表达信息。本研究利用 gdc-client

工具从 TCGA 数据库下载了胃癌的 RNA-seq 和 miRNA-seq 数据,其中 RNA-seq 数据包括 30 个正常样本和 343 个肿瘤样本,miRNA-seq 数据包括 45 个正常样本、446 个肿瘤样本及 406 个病人的生存数据。

1.2 差异表达 RNA 的筛选

利用 R 语言(版本 3.5.0)和 Bioconductor 平台中的 limma 包对芯片数据进行差异分析^[16],筛选差异表达的 circRNA (DE-circRNA),纳入标准为: $P\text{ value}<0.05$, $|\log_2\text{ fold change}(\log_2\text{FC})|>1$ 。取 GSE1-31414 和 GSE100170 芯片中差异表达的 circRNA 的交集作为最终筛选出来的 DE-circRNA。

对于从 TCGA 数据库下载的 RNA-seq 和 miRNA-seq 数据,首先去除平均表达值低于 1 的 mRNA 和 miRNA,随后利用 edgeR 包进行差异分析^[17],最后通过错误发现率(false discovery rate, FDR)校正,以 $\text{FDR}<0.05$ 同时 $|\log_2\text{FC}|>1$ 为标准筛选出差异表达的 miRNA (DE-miRNA)和 mRNA (DE-mRNA)。

1.3 ceRNA 网络的构建

首先,采用 CircInteractome 数据库预测 DE-circRNA 和 DE-miRNA 的调控关系^[18],构建 circRNA-miRNA 关系对。随后,利用 miRDB、miR-TarBase 和 TargetScan 数据库预测 DE-miRNA 和 DE-mRNA 的调控关系^[19],将同时在任意两个或两个以上数据库都被预测到的 miRNA-mRNA 调控关系纳入后续的分析中。最后,基于共享的

miRNA 构建 circRNA-miRNA-mRNA ceRNA 调控网络,并利用 Cytoscape 软件(版本 3.6.1)对调控网络进行可视化^[20]。

1.4 关键网络的提取

研究表明网络中的核心节点(拓扑属性前 10%~20%)在疾病网络中扮演者关键角色^[21-22],而这些核心节点一旦受到破坏,将会影响网络的功能,进而影响疾病的发生发展^[22]。本研究利用 Cytoscape 软件的 NetworkAnalyzer 工具对构建的 ceRNA 网络进行拓扑属性分析^[23],合并度数(degree)、中介中心性(betweenness centrality)、辐射力(radiality) 3 种指标,取网络中处于前 10%的节点作为核心节点,并根据这些核心节点从原始的 ceRNA 网络中提取子网。

1.5 功能富集分析和生存分析

通过在线网站 KOBAS 对子网进行 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路富集分析^[24],分析子网行使的生物学功能。整合来自 TCGA 数据库中胃癌的 RNA 表达数据和生存数据,使用 R 语言的 survival 包对子网进行生存分析,以挖掘预后相关的基因。

本研究遵循上述流程开展,技术路线见图 1。

2 结果

2.1 差异表达的 RNA

芯片数据的差异表达分析结果显示,在 GS-E131414 与 GSE100170 芯片中分别获得了 1 522

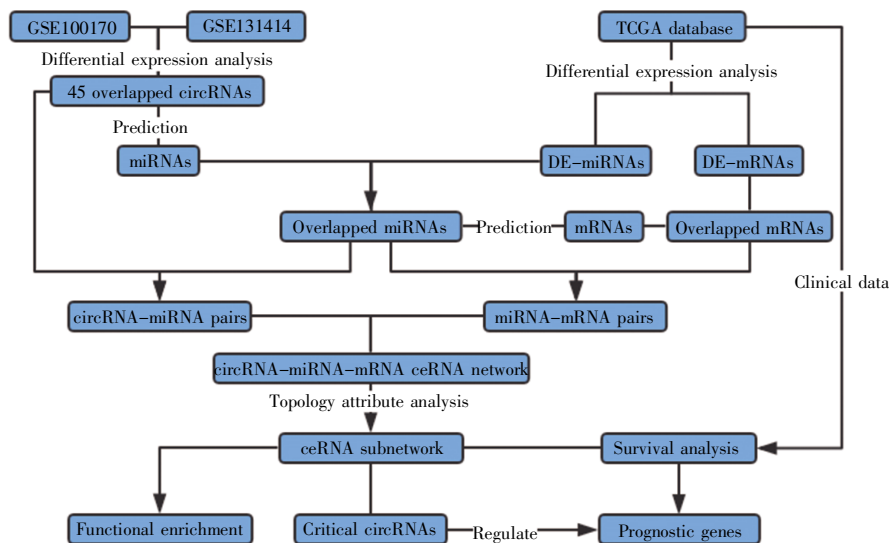


图 1 数据获取及分析流程图

Fig.1 The flow chart of data acquisition and analysis

个和 713 个差异表达的 circRNA, 两者取交集后得到 45 个 circRNA (图 2A~C)。对于 RNA-seq 数据和 miRNA-seq 数据, 差异分析后分别获得了 4 610 个差异表达的 mRNA 和 276 个差异表达的 miRNA (图 2D, E)。

2.2 原始 ceRNA 网络的构建

通过数据库的预测构建了 1 538 对 circRNA-miRNA 和 2 029 个 miRNA-mRNA 关系对。随后, 基于共享 miRNA 构建了一个包含 153 对 circRNA-miRNA 和 2 029 个 miRNA-mRNA 关系对的 ceRNA 调控网络(图 3), 其中包含 39 个 circRNA、30 个 miRNA 和 1 303 个 mRNA。

2.3 circRNA 介导的 ceRNA 子网络

对原始 ceRNA 网络的拓扑属性进行分析后发现, 3 个 circRNA 节点(hsa_circ_0008468、hsa_circ_0005822、hsa_circ_0025842)和 3 个 miRNA 节点(hsa-miR-940、hsa-miR-944、hsa-miR-

515-5p)在 3 种拓扑学指标排名中都处于前 10%, 提示它们为网络的核心节点。根据 3 种指标对节点进行排序, 前 10 个核心节点的拓扑参数见表 1。基于鉴定到的 6 个核心节点, 我们从原始的 ceRNA 网络中提取了子网络, 其中包括 3 个 circRNA、3 个 miRNA 和 501 个 mRNA, 共有 8 对 circRNA-miRNA 和 539 个 miRNA-mRNA 关系对(图 4)。

2.4 子网的功能富集分析

KEGG 通路富集分析结果显示, 子网富集于代谢途径(hsa01100)、cAMP 信号通路(hsa04024)、神经活性配体-受体相互作用(hsa04080)、pathways in cancer (hsa05200)等多个有统计学意义的信号通路(图 5)。

2.5 子网的生存分析

生存分析发现子网中有 14 个基因与胃癌的预后显著相关($P < 0.01$)。其中, *ACO2*、*E2F8* 的高表

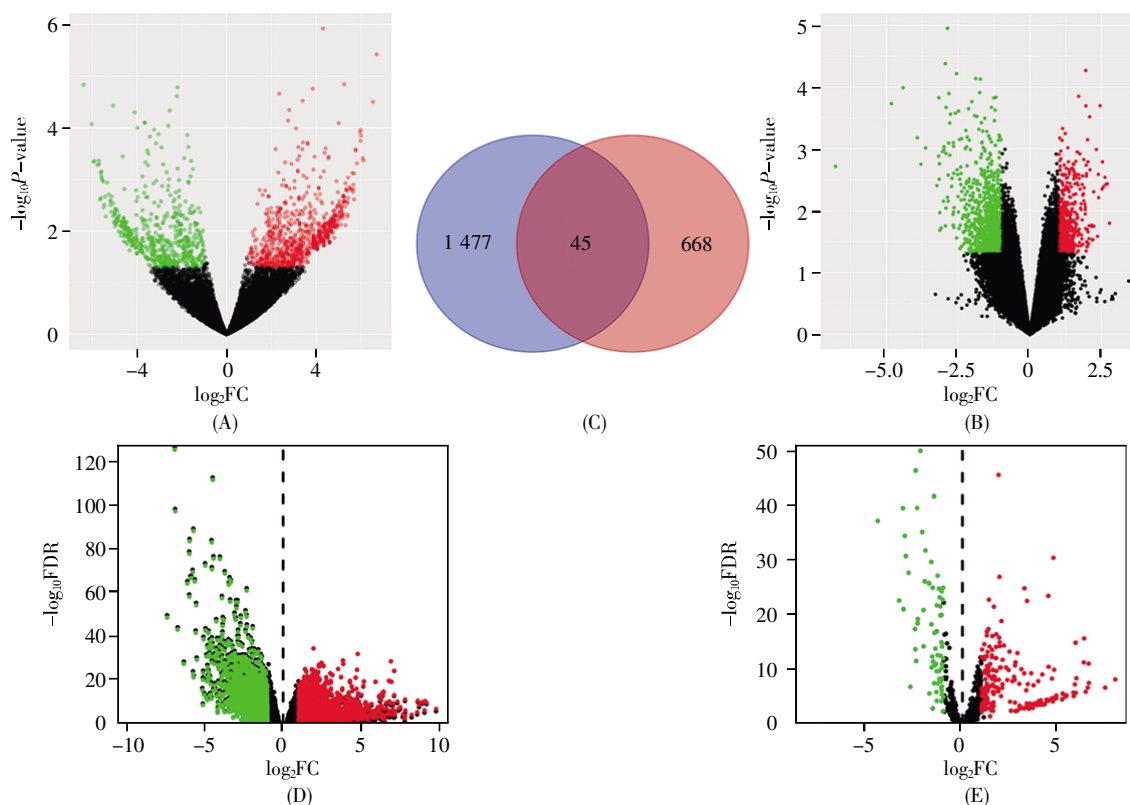


图 2 胃癌中差异表达的 RNA

(A) GSE100170 芯片中差异表达的 circRNA; (B) GSE131414 芯片中差异表达的 circRNA; (C) 芯片中差异表达 circRNA 的韦恩图; (D) TCGA 数据库中差异表达的 mRNA; (E) TCGA 数据库中差异表达的 miRNA。红色和绿色的点分别代表上调和下调的 RNA; 黑色的点代表变化不显著或变化倍数小的 RNA。

Fig.2 The differentially expressed RNAs in gastric cancer

(A) Differentially expressed circRNAs in the GSE100170 chip; (B) Differentially expressed circRNAs in the GSE131414 chip; (C) Venn diagram of differentially expressed circRNAs; (D) Differentially expressed mRNAs in the TCGA database; (E) Differentially expressed miRNAs in the TCGA database. The red and green dots represent up- and down-regulated RNAs, respectively, and black dots represent the RNAs that do not reach the threshold for screening differentially expressed RNAs.

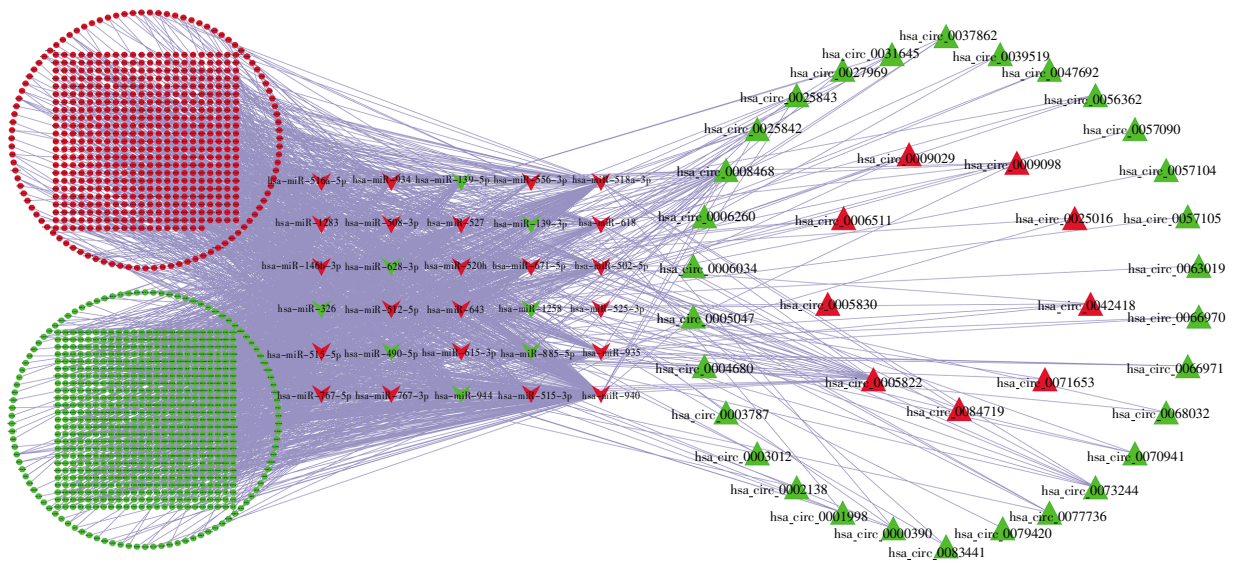


图 3 胃癌中 circRNA 介导的 ceRNA 网络

三角形、倒三角和圆形分别代表差异表达的 circRNA、miRNA 和 mRNA；红色代表上调，绿色代表下调。

Fig.3 The circRNA-mediated ceRNA network in gastric cancer

Triangles, inverted triangles and circles represent DE-circRNA, DE-miRNA and DE-mRNA, respectively. The colors red and green represent up-regulation and down-regulation, respectively.

表 1 原始 ceRNA 网络中排名前 10 的 circRNA 和 miRNA 的拓扑属性

Table 1 Topological properties of the top 10 circRNAs and miRNAs in the primary ceRNA network

RNA	Betweenness centrality	Degree	Radiality
Hsa_circ_0008468	0.162 942 14	27	0.826 525 65
Hsa_circ_0005822	0.099 404 99	23	0.790 542 18
Hsa_circ_0025842	0.011 934 45	7	0.652 200 34
Hsa_circ_0073244	0.006 156 55	7	0.603 330 9
Hsa_circ_0009098	0.007 59	6	0.610 624 85
Hsa_circ_0025843	0.005 813 11	5	0.633 722 34
Hsa_circ_0000390	0.002 278 15	4	0.578 045 22
Hsa_circ_0001998	0.004 661 4	4	0.594 091 9
Hsa_circ_0006511	0.001 365 45	4	0.548 626 31
Hsa_circ_0031645	0.001 441 79	4	0.568 319 96
Hsa-miR-940	0.275 142 16	262	0.733 406 27
Hsa-miR-944	0.145 410 36	154	0.707 148 07
Hsa-miR-515-5p	0.140 817 03	150	0.706 661 8
Hsa-miR-326	0.148 362 22	147	0.705 932 41
Hsa-miR-1283	0.130 095 27	146	0.705 203 01
Hsa-miR-518a-5p	0.064 270 24	122	0.699 854 12
Hsa-miR-527	0.064 270 24	122	0.699 854 12
Hsa-miR-671-5p	0.107 256 27	108	0.695 964 02
Hsa-miR-767-5p	0.068 004 77	76	0.688 183 81
Hsa-miR-767-3p	0.053 559 38	65	0.679 431 07

达组相对于低表达组预后较好；而 *GHR*、*ITIH5*、*KLHDC8A*、*NPAS3*、*PDE2A*、*PDGFD*、*PNMA2*、*RA-B9B*、*RECK*、*SLC24A2*、*TMEM55A*、*TMTC1* 的高表达组相对于低表达组预后较差，结果见图 6。

3 讨论

ceRNA 概念的提出将传统的相互作用模式

由“miRNAs→mRNAs”网络变成更加多元的“RNAs→miRNAs→mRNAs”复杂调控网络^[25]。在“miRNAs→mRNAs”互作网络中，miRNA 通过以单个 miRNA 调节多个不同 mRNA 或以多个不同的 miRNA 调节单个 mRNA 的方式作用于靶基因 3'-UTR 区域，实现对 mRNA 的降解或功能抑制。ceRNA 概念的提出赋予了 circRNA 等非编码

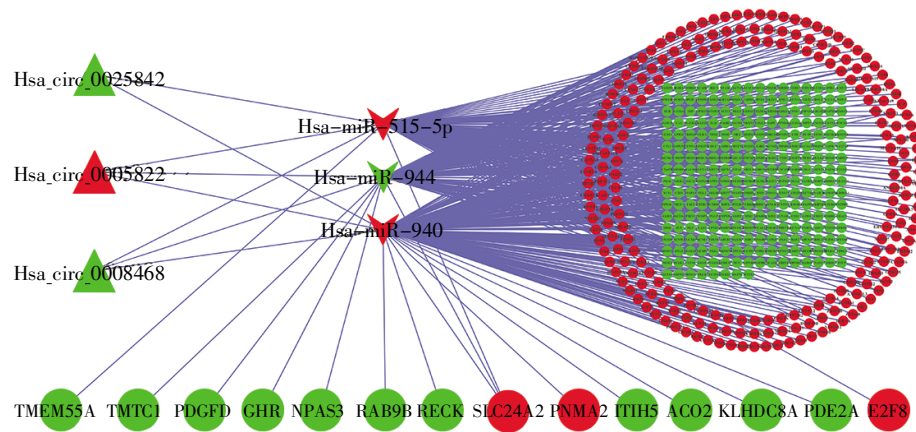


图4 竞争性内源 RNA 子网

三角形、倒三角和圆形分别代表差异表达的 circRNA、miRNA 和 mRNA；红色代表上调，绿色代表下调。

Fig.4 The ceRNA subnetwork

Triangles, inverted triangles and circles represent DE-circRNA, DE-miRNA and DE-mRNA, respectively. The colors red and green represent up-regulation and down-regulation, respectively.

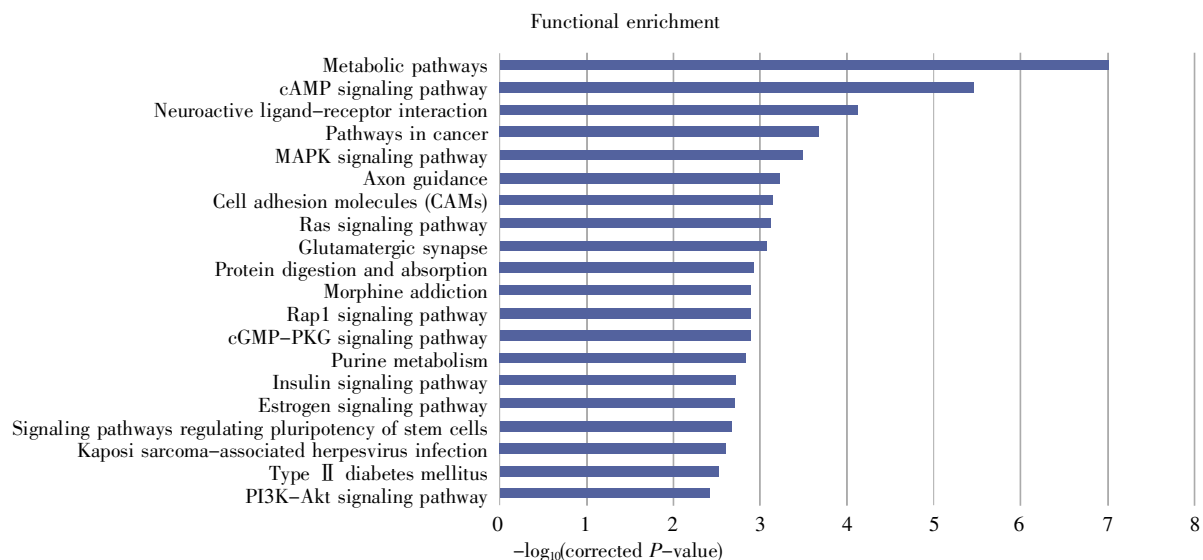


图5 KEGG 功能富集图

Fig.5 The KEGG functional enrichment diagram

RNA 新的生物学功能^[26]，极大地丰富了转录调控网络。ceRNA 竞争性结合 miRNA，降低 miRNA 对靶基因 mRNA 的抑制作用，多种 ceRNA、miRNA 与 mRNA 之间的相互作用形成复杂的 ceRNA 调控网络^[27]，从而参与包括肿瘤发生发展在内的一系列生物学过程^[28-29]。随着对 circRNA 认识的不断加深，circRNA 被证实在肿瘤基因表达中扮演着不可或缺的调控作用^[30]，并且在肿瘤的发生发展中起着重要作用^[31]。本研究通过 GEO 和 TCGA 数据库的联合应用构建了胃癌中由 circRNA 介导的原始 ceRNA 调控网络，并进一步通过网络分析挖掘

了紧密联系的核心节点，提取了关键子网。最后，对关键子网进行了功能富集分析，以判断网络行使的生物学功能；同时，通过生存分析挖掘了与胃癌预后相关的基因。

相关研究发现，miRNA 通过调控靶基因表达参与细胞增殖、凋亡和侵袭等多种生物学行为^[26]。利用网络拓扑属性分析，本研究挖掘了 3 个核心 miRNA，分别为 hsa-miR-940、hsa-miR-944、hsa-miR-515-5p。通过文献搜索发现，这 3 个核心节点已被报道与胃癌密切相关，例如：Fan 等^[32]研究表明，hsa-miR-940 通过 hsa-miR-940/Cbl-b/

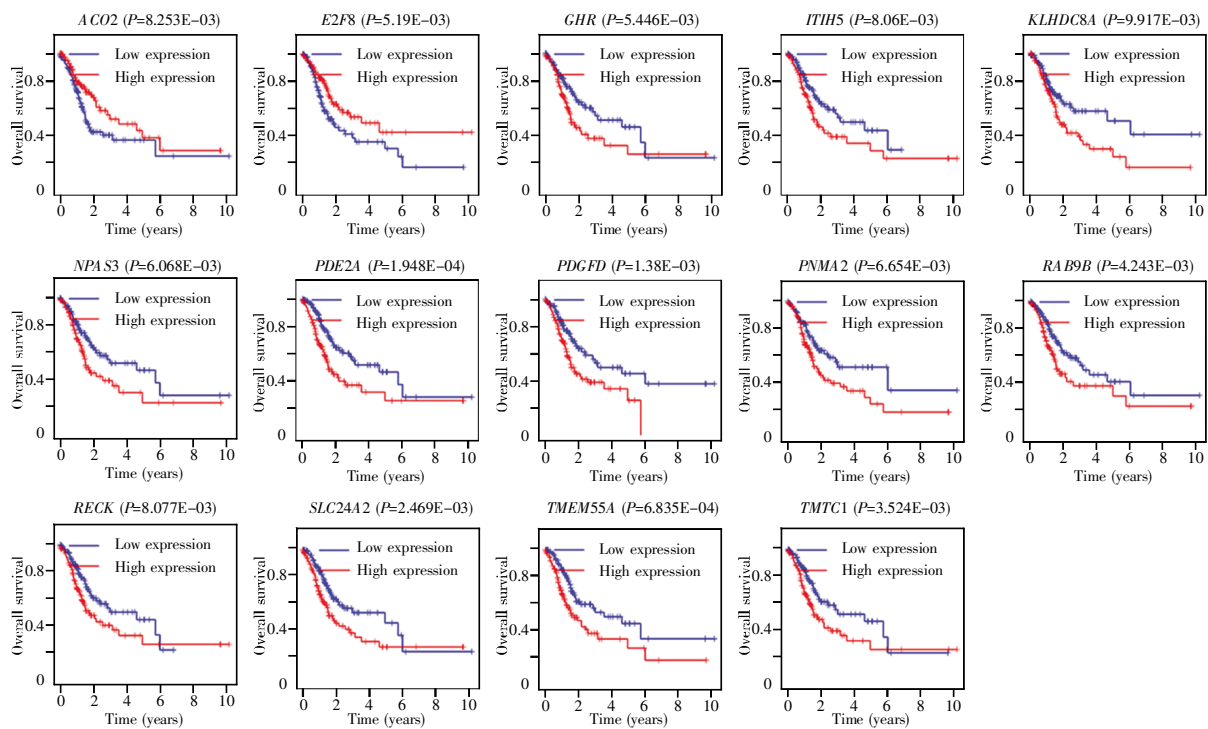


图 6 ceRNA 子网中 14 个预后基因的生存曲线

Fig.6 The survival curves of 14 prognostic genes in ceRNA subnetwork

STAT5a 轴上调 PD-L1 (programmed death ligand-1) 的表达, 从而促进胃癌细胞的增殖和迁移; Pan 等^[33]研究证实, hsa-miR-944 通过与 MACC1 (metastasis-associated in colon cancer 1) 的 3'-UTR 序列结合下调 MACC1 在胃癌细胞中的表达, 从而抑制上皮-间质转化和胃癌的转移; Wang 等^[34]报道, hsa-miR-515-5p 表达水平的上升抑制了胃癌的发生, 并与胃癌细胞的生长和侵袭密切相关。文献检索的结果不仅证实了从原始 ceRNA 网络中鉴定的 3 个核心 miRNA 在胃癌发生发展中扮演着重要角色, 同时也印证了本文分析方法在网络核心节点的识别方面拥有较高的准确性。

通过对 ceRNA 子网进行 KEGG 信号通路的富集分析, 我们发现子网显著富集到代谢途径 (hsa01100)、cAMP 信号通路 (hsa04024)、神经活性配体-受体相互作用 (hsa04080)、pathways in cancer (hsa05200) 等多个有统计学意义的信号通路 (图 5)。其中, 大部分通路已有文献支持与肿瘤发生机制密切相关, 如经典的 PI3K-Akt 信号通路, 当其被酪氨酸激酶受体激活后, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 催化磷脂酰肌醇 4,5-双磷酸磷酸化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸, 导致 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phos-

phoinositide dependent protein kinase 1, PDK1) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB; 也称作 Akt) 募集到质膜并被激活, 而后 Akt 作用于多个下游效应因子, 影响肿瘤细胞的生长、增殖和凋亡^[35]。另外, Yin 等^[36]研究表明, 嘌呤核苷酸是肿瘤细胞增殖的基础和必要条件, 在肿瘤细胞中嘌呤合成途径的酶代谢得到了增强, 而且嘌呤代谢受损与癌症的发展有关。Boroughs 等^[37]研究报道, 癌细胞的生长和繁殖增加了其对营养物质的摄取, 而各种代谢途径可为癌细胞的生长和增殖提供必要的物质支持, 其中代谢重编程被认为是癌症的标志^[38]。以上信息提示, hsa_circ_0008468、hsa_circ_000-5822 和 hsa_circ_0025842 介导的 ceRNA 网络参与了胃癌发生发展的多个生物学过程。

在生存分析中我们发现 circRNA 介导的子网中存在多个与胃癌预后相关的基因 (图 6)。而 3 个核心的 circRNA (hsa_circ_0008468、hsa_circ_000-5822、hsa_circ_0025842) 可能通过 circRNA-miRNA-mRNA 调控轴调节这些预后基因的表达, 从而影响胃癌病人的预后。例如: 在 hsa_circ_002-5842-hsa-miR-940-ACO2 调控轴中, hsa_circ_002-5842 下调、hsa-miR-940 上调、ACO2 下调 (图 4)。hsa_circ_0025842 的低表达会减弱其对 hsa-miR-

940 的竞争性吸附,使得过量的 hsa-miR-940 与 *ACO2* 结合,从而使 *ACO2* 表达水平降低。本研究的生存分析结果(图 6)以及相关研究^[39]都表明, *ACO2* 低表达的胃癌患者相对于 *ACO2* 高表达的患者拥有较低的生存率。因此,我们推测 hsa_circ_0025842 的低表达可能与胃癌病人的不良预后相关。又如:在 hsa_circ_0005822-hsa-miR-944-*SLC24A2* 调控轴中, hsa_circ_0005822 上调、hsa-miR-944 下调、*SLC24A2* 上调(图 4)。这说明 hsa_circ_0005822 的上调可促进 *SLC24A2* 的表达,而本文的生存分析结果显示 *SLC24A2* 高表达的胃癌患者拥有较低生存率(图 6),提示 hsa_circ_0005822 的高表达与胃癌患者不良预后相关。另外,在 hsa_circ_0008468-hsa-miR-940-*PDE2A* 调控轴中, hsa_circ_0008468 下调、hsa-miR-940 上调、*PDE2A* 下调(图 4),提示 hsa_circ_0008468 的下调抑制了 *PDE2A* 的表达。相关研究发现 *PDE2A* 的低表达会抑制肿瘤细胞的生长与侵袭^[40],同时本研究的生存分析表明 *PDE2A* 低表达的胃癌患者拥有更佳的预后。因此,我们推测 hsa_circ_0008468 的低表达可改善胃癌患者的预后。综上所述,在 ceRNA 网络中,3 个核心的 circRNA 可能通过竞争性地结合 miRNA 实现对预后基因的调控,从而影响胃癌患者的预后。

总的来讲,本研究通过生物信息学的方法挖掘了原始 ceRNA 网络中核心的 circRNA,并提取了核心 circRNA 介导的 ceRNA 子网,为 circRNA 的 ceRNA 机制研究提供了参考方向,同时也为胃癌的诊断、治疗提供了新的分子靶点。研究过程采用的方法具有普适性和创新性,为后续深入的实验性研究提供了基础。

参考文献(References):

- [1] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, *et al.* Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J]. *Cancer Communications*, 2019, 39: 22.
- [2] POLISENO L, SALMENA L, ZHANG J, *et al.* A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology[J]. *Nature*, 2010, 465(7301): 1033-1038.
- [3] LIZ J, ESTELLER M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development[J]. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*, 2016, 1859(1): 169-176.
- [4] TAY Y, RINN J, PANDOLFI P P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 344-352.
- [5] WANG Y, WANG Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs[J]. *RNA*, 2015, 21(2): 172-179.
- [6] QU S, YANG X, LI X, *et al.* Circular RNA: a new star of non-coding RNAs[J]. *Cancer Letters*, 2015, 365(2): 141-148.
- [7] GREENE J, BAIRD A M, BRADY L, *et al.* Circular RNAs: biogenesis, function and role in human diseases[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2017, 4: 38.
- [8] NG W L, MOHD MOHIDIN T B, SHUKLA K. Functional role of circular RNAs in cancer development and progression[J]. *RNA Biology*, 2018, 15(8): 995-1005.
- [9] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- [10] ZHANG J, LIU H, HOU L, *et al.* Circular RNA_LARP4 inhibits cell proliferation and invasion of gastric cancer by sponging miR-424-5p and regulating LATS1 expression[J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16: 151.
- [11] YIN G H, GAO F C, TIAN J, *et al.* Hsa_circ_101882 promotes migration and invasion of gastric cancer cells by regulating EMT[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2019, 33(9): e23002.
- [12] MENG S, ZHOU H, FENG Z, *et al.* CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16: 94.
- [13] CHEN S, LI T, ZHAO Q, *et al.* Using circular RNA hsa_circ_0000190 as a new biomarker in the diagnosis of gastric cancer[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2017, 466: 167-171.
- [14] BARRETT T, EDGAR R. Gene Expression Omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis[J]. *Methods in Enzymology*, 2006, 411: 352-369.
- [15] WANG Z, JENSEN M A, ZENKLUSEN J C. A practical guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA)[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1418: 111-141.
- [16] RITCHIE M E, Phipson B, Wu D, *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(7): e47.
- [17] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [18] DUDEKULA D B, PANDA A C, GRAMMATIKAKIS I, *et al.* CircInteractome: a web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs[J]. *RNA Biology*, 2016, 13(1): 34-42.
- [19] WANG J D, ZHOU H S, TU X X, *et al.* Prediction of competing endogenous RNA coexpression network as prognostic markers in AML[J]. *Aging*, 2019, 11(10): 3333-3347.
- [20] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [21] ALBERT R, JEONG H, BARABASI A L. Error and attack tolerance of complex networks[J]. *Nature*, 2000, 406(6794): 378-382.

- [22] XU J, LI Y, LU J, *et al.* The mRNA related ceRNA-ceRNA landscape and significance across 20 major cancer types[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(17): 8169-8182.
- [23] SOBRINHO SANTOS E M, ALMEIDA A C, SANTOS H O, *et al.* Mechanism of Brassica oleracea performance in bovine infectious mastitis by bioinformatic analysis[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 129: 19-29.
- [24] XIE C, MAO X, HUANG J, *et al.* KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Suppl. 2): W316-W322.
- [25] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, *et al.* A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?[J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.
- [26] SU X, XING J, WANG Z, *et al.* microRNAs and ceRNAs: RNA networks in pathogenesis of cancer[J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2013, 25(2): 235-239.
- [27] KARRETH F A, PANDOLFI P P. ceRNA cross-talk in cancer: when ce-bling rivalries go awry[J]. *Cancer Discovery*, 2013, 3(10): 1113-1121.
- [28] LIU K, GUO L, GUO Y, *et al.* AEG-1 3'-untranslated region functions as a ceRNA in inducing epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer by regulating miR-30a activity[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2015, 94(1): 22-31.
- [29] ZHOU X, GAO Q, WANG J, *et al.* Linc-RNA-RoR acts as a "sponge" against mediation of the differentiation of endometrial cancer stem cells by microRNA-145[J]. *Gynecologic Oncology*, 2014, 133(2): 333-339.
- [30] FAN X, WENG X, ZHAO Y, *et al.* Circular RNAs in cardiovascular disease: an overview[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 5135781.
- [31] WANG D, YANG S, WANG H, *et al.* The progress of circular RNAs in various tumors[J]. *American Journal of Translational Research*, 2018, 10(6): 1571-1582.
- [32] FAN Y, CHE X, HOU K, *et al.* MiR-940 promotes the proliferation and migration of gastric cancer cells through up-regulation of programmed death ligand-1 expression[J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 373(1-2): 180-187.
- [33] PAN T, CHEN W, YUAN X, *et al.* miR-944 inhibits metastasis of gastric cancer by preventing the epithelial-mesenchymal transition via MACC1/Met/AKT signaling[J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(7): 905-914.
- [34] WANG D, LIU K, CHEN E. LINC00511 promotes proliferation and invasion by sponging miR-515-5p in gastric cancer[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2020, 25: 4.
- [35] FAES S, DORMOND O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9): 21138-21152.
- [36] YIN J, REN W, HUANG X, *et al.* Potential mechanisms connecting purine metabolism and cancer therapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1697.
- [37] BOROUGHS L K, DEBERARDINIS R J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(4): 351-359.
- [38] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [39] WANG P, MAI C, WEI Y L, *et al.* Decreased expression of the mitochondrial metabolic enzyme aconitase (ACO2) is associated with poor prognosis in gastric cancer[J]. *Medical Oncology*, 2013, 30: 552.
- [40] HIRAMOTO K, MURATA T, SHIMIZU K, *et al.* Role of phosphodiesterase 2 in growth and invasion of human malignant melanoma cells[J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26(9): 1807-1817.