

p53 直接调控 microRNA 及其靶基因的高通量筛选*

郭志云^{1, 2)} 茆灿泉²⁾ 熊莉丽²⁾ 辛洪波^{1)**}

(¹⁾四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室心血管病研究室, 成都 610041; ²⁾西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

摘要 通过对 676 条人 microRNA 进行筛选, 共得到了 53 条新的具有 p53-DNA 结合位点且调控 p53 上游转录因子和下游靶基因的 microRNA。结合已有蛋白质互作关系与 microRNA 调控信息, 构建了 p53-microRNA 相互作用网络图, 其中 FAS 受多条 microRNA 调控, FAS 是介导细胞凋亡的关键因子, 因此, FAS-microRNA 的相互作用可能在细胞凋亡途径中起着关键的作用。随后, 提出了 microRNA 参与 p53 调控的假设机制, 认为 p53 调控靶基因与 microRNA 的同时也受上游转录因子与 microRNA 的调控, 从而形成了以 p53 为中心的一种平衡, 当这种调控平衡一旦被打破则会引起信号通路的紊乱, 从而可能引发相应的疾病。对这 53 条 microRNA 进行靶基因预测, 共得到 15 500 个靶基因, 对这些基因的出现频率进行聚类分析共得到 27 个簇, 将出现频率大于 10 的基因进行功能注释分析, 发现多数基因功能属于近来发现的 p53 靶基因新的功能分类——细胞粘连和细胞运动, 目前研究认为, p53 通过与这些具有细胞粘连和运动功能的靶基因结合来抑制肿瘤的迁移。通过对 15 500 个基因进行功能注释分析, 得到了 30 条感兴趣的参与细胞周期调控、细胞凋亡和细胞增殖的 microRNA, 其中有 9 条 microRNA 于 3 种生物学进程均有参与, 这 9 条 microRNA 分别是: hsa-mir-181a-1、hsa-mir-181b-1、hsa-mir-181c、hsa-mir-181d、hsa-mir-195、hsa-mir-497、hsa-mir-495、hsa-mir-543 和 hsa-mir-548c。这暗示着这 9 条 microRNA 在 p53 信号通路的调节中可能起着关键的作用, 它们互相作用共同调节着多个 p53 信号环路。最后在 36 个物种的基因组中对这 30 条 microRNA 进行了同源性搜索与保守性分析, 结果发现有 10 条高度保守的且为目前数据库所未收录的 microRNA。这 10 条 microRNA 分别是: hsa-mir-497、hsa-mir-495、hsa-mir-543、hsa-mir-19a、hsa-mir-19b-1、hsa-mir-200b、hsa-mir-448、hsa-mir-28、hsa-mir-455 和 hsa-mir-590。

关键词 microRNA, p53, p53-DNA 结合位点, microRNA 靶基因预测

学科分类号 Q52

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00099

p53 作为一种与 DNA 特异性结合的转录因子已被人们广泛研究, 它在 DNA 损伤、NO 或癌基因等应激信号刺激下活化, 从而激活下游靶基因, 引起 DNA 修复、细胞凋亡和细胞周期停滞等一系列生物学效应^[1]。

MicroRNA 是一类长度约为 22nt 的单链非编码小分子 RNA, 在生物进化过程中高度保守, 通过与靶基因序列的 3' 非翻译区特异性结合, 诱导靶 mRNA 降解或阻遏其翻译^[2]。目前研究表明, microRNA 参与多个生物学进程, 包括干细胞维持、骨骼肌肉系统、循环系统以及神经系统的发育、胰岛素分泌和致癌性转化等^[3]。

近些年来, microRNA 参与肿瘤的发生已经成为一个不争的事实, 大量的研究也已经证实 microRNA 具有抑癌和促癌的双重作用, 从而为肿瘤的研究又开辟了一条新的思路。p53 作为一个重

要的抑癌基因在肿瘤的发生中起着至关重要的作用, 近来研究证实约 50% 以上的肿瘤发生与 p53 的突变有关^[4]。那么, microRNA 是否也会参与到 p53 的信号通路中来呢? 这一问题成为近来争论的焦点。Voorhoeve 等^[5]通过遗传筛选人 microRNA, 首次发现, has-mir-372 和 has-mir-373 可能参与到 p53 信号通路中, 并且作为新的癌基因参与睾丸生殖细胞肿瘤的发生。随后 Xi 等^[6]通过分析 HCT-116 (wt-p53) 和 HCT-116 (null-p53) 细胞系表达谱发现, 326 条表达差异显著的 microRNA 中有超过 46% 的 microRNA 在其上游 5 kb 的假定启动子

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA06Z353)。

** 通讯联系人。

Tel: 028-87608754, E-mail: bioinf@swjtu.edu.cn

收稿日期: 2009-02-23, 接受日期: 2009-06-04

区有 p53 结合位点, 从而进一步证明 microRNA 有可能参与到野生型 p53 信号通路中. 近来, 有多篇文章在几乎同一时期证实 has-mir-34a 能够作为 p53 的直接调控靶基因, 参与到细胞分化、凋亡、衰老等生物学过程中^[7~9]. 寻找参与 p53 这一信号通路中的 microRNA 已经成为下一步研究的重点, 但从近几年的报道来看, 目前发现的直接受 p53 调控的 microRNA 数目非常少, 而目前发现的 p53 信号通路中涉及的基因有数百个, 因此我们有理由相信受 p53 直接调控的 microRNA 不应是一种少数现象. 利用现有发现的 microRNA 数据, 高通量筛选新的可能受 p53 直接调控的 microRNA, 可以有效缩减从数百近千个 microRNA 数据中筛选 p53 直接调控 microRNA 的实验周期, 从而为下一步的实验筛选提供重要的理论支撑与初筛数据. 本文对 miRBase^[10]中收录的 676 条人 microRNA 进行筛选, 得到了 53 条新的具有 p53 结合位点且调控 p53 上游转录因子和 p53 下游靶基因的 microRNA, 同时, 根据结果构建了 p53-microRNA 相互作用蛋白网络图, 并提出了 microRNA 参与 p53 调控的可能机制, 最后对这 53 条 microRNA 进行了靶基因预测, 根据功能注释分析, 得到了 30 条感兴趣的参与细胞周期调控、细胞凋亡和细胞增殖的 microRNA, 最后在 36 个物种的基因组中对这 30 条 microRNA 进行了同源性搜索与保守性分析, 结果发现有 10 条高度保守的且为目前数据库所未收录的 microRNA.

1 数 据

我们在 miRBase 数据库中选取了 676 条注释过的人 microRNA, 使用 USCS 数据库中的 Table Browser 工具, 下载得到包含 microRNA 前体序列与其 5' 和 3' 端侧翼各 10 kb 的人类基因组序列作为研究的原始数据.

2 方法与结果

2.1 在 microRNA 上下游 10 kb 区域识别 p53-DNA 结合位点

p53-DNA 结合位点通常由 2 条 10 bp 长的序列所组成, 在这 2 条序列中间有 0~13 bp 长度的空位. 2 条序列的一致序列模式为 5' RRRCWW-GYYY 3' (R = G or A, W = T or A, Y = C or T)^[11]. Saini 等^[12]分析人类全基因组序列发现, 在 microRNA 的 ± 10 kb 区域均发现转录因子结合位

点, 转录因子主要结合在 microRNA 的 -2 kb 至 -6 kb 之间, 且上游位点要多于下游. 鉴于此, 我们将转录因子结合位点的搜索范围定至上下游侧翼各 10 kb, 以保证找到尽可能多的转录因子结合位点. 使用 p53MH 算法识别 676 条 microRNA 的 p53-DNA 结合位点. p53MH 是一种在人类或小鼠基因组中识别可能的 p53-DNA 结合位点的一种算法, 它计算在给定的离散判别模型(discrete discriminant model)下识别可能的 p53-DNA 结合位点并按分数高低排列输出结果^[13]. 我们将 p53MH 的主要参数修改如下: number of order statistics=8, gap sizes=-113, number of bootstrap replicates=100, 其余为默认参数. 通过 p53MH 算法搜索, 在 676 条人 microRNA 的 ± 10 kb 区域共发现 5 480 个 p53-DNA 结合位点, 分值从 100~67.29 由高到低排列, 通常分值大于 85 分的结果被认为已具有足够的可信度, 但为了尽可能地降低假阳性, 选取分值 ≥ 90 分的 p53-DNA 结合位点(401 个)作为后续的数据集进行分析.

2.2 识别调控 p53 上下游基因的 microRNA

为了研究调控 p53 基因转录的转录因子(p53 上游基因)和 p53 作为转录因子调控的靶基因(p53 下游基因)与 microRNA 的调控关系, 我们从 p53 KnowledgeBase^[14] 和 TRED^[15] (transcriptional regulatory element database)数据库下载了 p53 通路已知的 23 个上游转录因子和 75 个下游靶基因. 我们使用 Targetscan、MiRanda 和 MirTarget2 三种算法来预测与 p53 上下游基因互作的 microRNA. Targetscan 基于靶基因跨物种保守和 microRNA-靶基因二聚体热力学特征来预测哺乳类动物靶基因. MiRanda 则采用动态规划算法比对来识别给定 microRNA 在基因组上的靶位点, 然后根据物种间的保守性来寻找可能的靶基因. MiTarget 则是通过支持向量机并基于径向基核函数对 microRNA 和靶基因的二聚体结构、热力学特征以及 microRNA 和靶基因作用的碱基位置等参数进行分类, 实现 microRNA 靶基因的预测. 这三种算法各有优势, 但它们面临的共同问题是假阳性偏高(约 10%~20%), 而采用多个算法组合的形式可以有效地降低假阳性^[16]. 为此, 我们针对每一个基因预测出的 microRNA, 认定三种算法预测一致的结果作为最终的结果.

三种算法一共得到了 5 623 条调控 p53 上下游基因的 microRNA, 由于基因与 microRNA 之间存

在一对多的关系，所以结果中包含了大量的重复 microRNA，在这 5 623 条 microRNA 中有 1 862 条调控 p53 上游基因，3 761 条调控 p53 下游基因，其中 MiRanda 有 628 条调控 p53 上游基因 microRNA，2 158 条调控 p53 下游基因 microRNA。Targetscan 有 933 条调控 p53 上游基因 microRNA，844 条调控 p53 下游基因 microRNA。MirTarget2 有 301 条调控 p53 上游基因 microRNA，759 条调

控 p53 下游基因 microRNA。针对每一个基因的预测 microRNA 结果，将三种算法结果组合之后共得到了 99 条调控 p53 上下游基因的 microRNA，另外排除 p53-DNA 结合位点分值 < 90 分的 microRNA，最终，得到了 53 条调控 p53 上下游基因的 microRNA (表 1)。为了验证三程序整合与 p53-DNA 结合位点这两类属性的相关性，进行了 Fisher's Exact Test^[17] (表 2)。

Table 1 53 microRNAs associated with p53 upstream and downstream genes

Upstream genes	Downstream genes
hsa-mir-346(BCL6)	hsa-mir-633(IL8), hsa-mir-889(IL8), hsa-mir-448(TACSTD1), hsa-mir-509-3(APCS), hsa-mir-455(ABCB1),
hsa-mir-101(FOS)	hsa-mir-632(S100B), hsa-mir-374b(GADD45A), hsa-mir-195(CHEK1), hsa-mir-497(CHEK1),
hsa-mir-222(FOS)	hsa-mir-125a(BAK1), hsa-mir-125b-1(BAK1), hsa-mir-125b-2(BAK1), hsa-mir-578(BAK1),
hsa-mir-183(EGR1)	hsa-mir-19a(IGFBP3), hsa-mir-19b-1(IGFBP3), hsa-mir-655(PTTG1), hsa-mir-220c(SFN),
hsa-mir-361(SP1)	hsa-mir-548c(CRYZ), hsa-mir-625(CRYZ), hsa-mir-587(ODC1), hsa-mir-200b(PLK2), hsa-mir-122(CCNG1),
hsa-mir-374b(SP1)	hsa-mir-342(IER3), hsa-mir-590(TAP1), hsa-mir-653(TAP1), hsa-mir-382(EEF1A1), hsa-mir-543(EEF1A1),
hsa-mir-7(SP1)	hsa-mir-200b(ANLN), hsa-mir-181a-1(FAS), hsa-mir-181b-1(FAS), hsa-mir-181c(FAS), hsa-mir-181d(FAS),
hsa-mir-96(HOXA5)	hsa-mir-190b(FAS), hsa-mir-28(FAS), hsa-mir-376a-1(FAS), hsa-mir-376a-2(FAS), hsa-mir-376b(FAS),
hsa-mir-367(KLF4)	hsa-mir-448(FAS), hsa-mir-548c(FAS), hsa-mir-548d-1(FAS), hsa-mir-548d-2(FAS), hsa-let-7g(SCD),
hsa-mir-29a(KLF4)	hsa-let-7i(SCD), hsa-mir-200b(SCD), hsa-mir-429(SCD), hsa-mir-495(SCD), hsa-mir-362(CD82),
hsa-mir-7 (KLF4)	hsa-mir-142(HSPA8), hsa-let-7g(TRPM2)

Table 2 Contingency table for validated p53-DNA binding sites and integration of three algorithms

		Integration of Targetscan, MiRanda and MirTarget2 algorithms		
		YES	NO	TOTAL
MicroRNAs with validated p53-DNA binding sites	YES	53	214	267
	NO	46	5 310	5 356
	TOTAL	99	5 524	5 623

Left: $P = 1$, Right: $P = 2.44 \times 10^{-45}$, 2-Tail: $P = 2.44 \times 10^{-45}$.

结果具有非常高的统计学意义($P = 2.44 \times 10^{-45}$)，因此，可以表明筛选得到的具有 p53-DNA 结合位点的 53 条 microRNA 与三程序的整合结果(即与 p53 上下游基因相互作用的 microRNA)具有很高的相关性，并非一个随机发生事件。

2.3 MicroRNA 与 p53 上下游蛋白的互作网络构建

基因调控与蛋白质相互作用网络之间的关系一直是分子生物学领域研究的一个主要内容，随着 microRNA 的发现，这种关系变得更加复杂。最近，Liang 等^[18]通过研究发现，人的相互作用蛋白质与 microRNA 调控有着密不可分的关系，而且这种相互作用并不是一个随机的事件。关于 p53 相互作用蛋白网络与 microRNA 的关系目前还不是很清楚，为了给出一个可能的相互作用网络，我们从

BioGRID 数据库下载了 47 377 条蛋白质相互作用数据，从中筛选得到了 38 条 p53 上下游蛋白互作信息，将这些互作信息与表 1 数据结合，使用 Osprey 网络可视化系统(osprey network visualization system)构建了一张 p53 相互作用蛋白网络与 microRNA 互作关系的网络图(图 1)。从图 1 上可以看出，大多数 microRNA 与特定的某个上下游蛋白相互作用，并且上下游蛋白相互作用也以两两互作为主。在图 1 中最引起我们注意的是 FAS 蛋白，FAS 蛋白与 EEF1A1、TP53 以及自身相互作用，并且与 13 条 microRNA 有互作关系，是 p53 相关蛋白中互作关系最多的蛋白质。FAS 蛋白是 TNF 受体超家族成员，也叫做 APO-1 或 CD95，它包括一个“死亡结构域”，通过 FAS 死亡结构域蛋白

(FAS associated death domain protein, FADD)介导活化 caspase-8, 从而引起细胞凋亡。另外研究表明, FAS 在免疫系统、细胞活化、细胞分化以及细

胞增殖方面均有参与^[19]. 因此, 我们推测 FAS 可能和多条 microRNA 以及 p53 共同参与了以细胞凋亡通路为主的一系列信号传递过程.

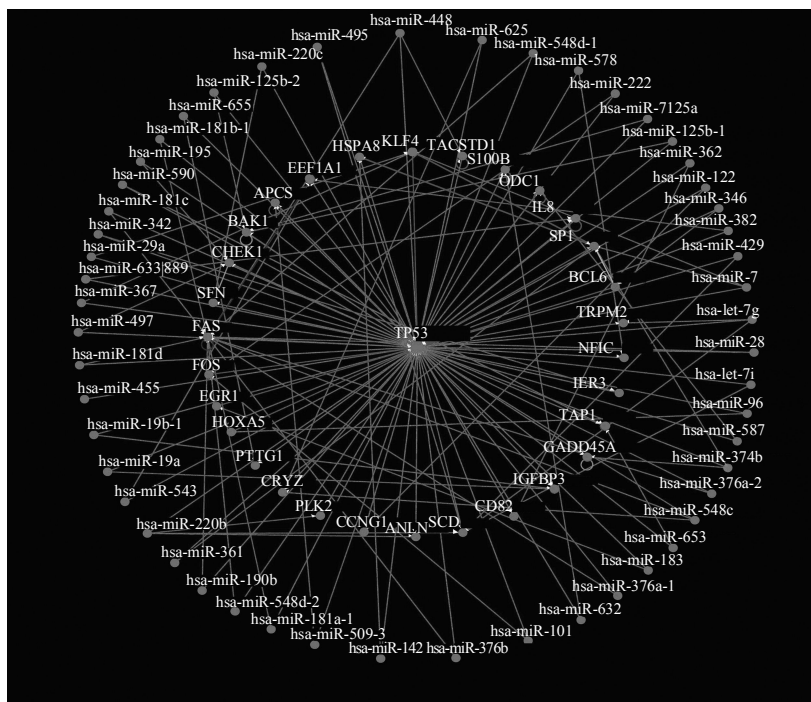


Fig. 1 MicroRNA-regulated protein-protein interaction network

MicroRNAs and protein are represented by light gray circles, the protein interactions are represented by undirected white lines.

2.4 p53 调控网络的构建

十几年前就已经发现, CDK 的抑制因子 p21 是 p53 诱导产生生长停滞的关键。然而, 小鼠中 p21 蛋白被破坏后并没有像人们预期的那样完全终止 p53 信号通路并使其生长停滞^[20]。这就暗示着在这一过程中可能存在着另外的还未发现的作用因子, 也许 microRNA 的出现可以解除这长期以来的疑惑。

目前已经有实验证实, has-mir-34a 可以作为 p53 的直接调控靶基因, 参与到细胞分化、凋亡、衰老等生物学进程中^[7-9]。但目前对于 microRNA 是如何参与到 p53 信号通路中以及如何作用于这条通路并不是很清楚, 基于前面的结果和已有的 p53 信号通路信息我们绘制了一幅 p53-microRNA 信号通路图, 以期阐明 microRNA 参与到 p53 信号通路的可能机制(图 2)。

细胞在 DNA 损伤、癌基因等应激信号的刺激下,引起 p53 上游的一系列调节因子的活化从而调节 p53 活性,在这一过程中,如果 p53 上游转录因

子对其抑制过强则会影响 p53 下游细胞凋亡、细胞周期停滞等功能，从而形成肿瘤。这一过程对于生物体来说可能是致命的，因此有必要引入另一种因子来调节由于 p53 上游因子引起的功能失调，microRNA 可以在转录后水平调节基因表达，它对于 p53 上游调节因子的抑制作用可以有效地防止 p53 活性的过分降低，从而起到抑癌基因的作用。MicroRNA 的活性相反又受到 p53 的调控，p53 通过 p53-DNA 结合位点结合于 microRNA 上下游区域，从而在转录水平调节 microRNA 的活性，使其对于 p53 上游和下游基因的抑制作用在一定程度上受到约束从而达到一种平衡。相反，p53 作为基因来说，同样也受到 microRNA 以及上游调节因子的调控，p53 活性的高低直接影响到它作为一种转录因子对下游靶基因的调控，因此，一旦这一平衡被打破，则可能会引起下游细胞周期停滞、细胞凋亡、DNA 修复等多种生物学功能的失调，从而引发肿瘤。

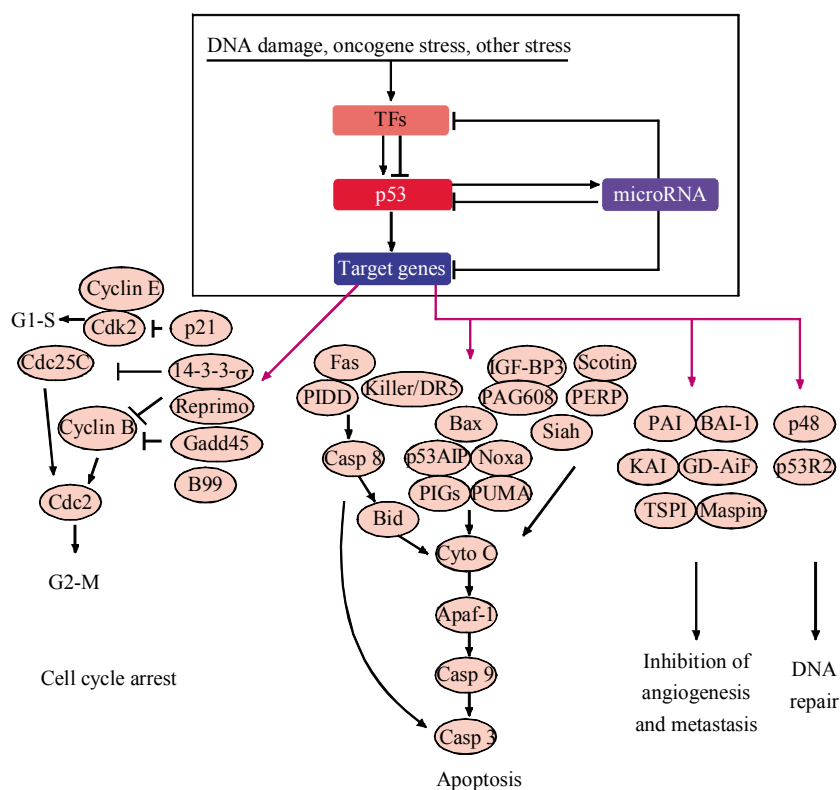


Fig. 2 Schematic illustration of putative p53-microRNA regulatory pathways

Arrows denote stimulatory interactions, whereas horizontal bars instead of arrowheads indicate inhibitory influences.

2.5 调控 p53 上下游基因 microRNA 的靶基因预测

为了找到尽可能多的 microRNA 靶基因, 我们使用 TARGETSCAN4.2 软件对这 53 条调控 p53 上下游基因的 microRNA 进行了靶基因预测, 虽然单一算法的预测可能产生较多种算法组合预测更多的假阳性, 但为了尽可能地不过滤掉阳性结果, 我们采用先放大数据集, 再通过后续的基因功能注释来筛选可能的阳性结果方法来获取尽可能多的 microRNA 靶基因, 以期后续的蛋白质水平检测靶基因表达情况提供尽可能多的选择。通过 TARGETSCAN 预测, 共得到了 15 500 个 microRNA 靶基因, 其中大部分基因在总的靶基因中出现 2 次或 2 次以上, 为此, 根据基因出现的次数对这 15 500 个基因进行了聚类, 共得到 27 个簇(图 3), 簇 1 包含没有重复的基因(共 2 146 个基因), 簇 2 包含重复 2 次的基因(共 1 191 个基因), 簇 3 包含重复 3 次的基因(共 714 个基因), 依次类推。重复次数小于 10 的基因为 5 370 个, 基因数约占总 microRNA 靶基因的 89%, 重复次数大于 10 的基因为 139 个, 基因数约占总 microRNA 靶基因的

11%。为了知道这些出现频率较高的基因功能, 将这 139 个重复次数大于 10 的基因映射到 DAVID 数据库上, 使用功能注释图表工具(Functional Annotation Chart)对这些基因进行了功能聚类, 值得注意的是发现 P 值较低的($P < 5.5 \times 10^{-16}$)多数为含有钙黏蛋白结构域的基因, 这一结果与 Wei 等^[20]的发现相吻合, 他们发现的 122 个新的 p53 靶基因中, 其中有 20 个不属于目前 p53 靶基因的功能分类, 而属于一个新的功能分类——细胞粘连和运动, 他们认为 p53 通过与这些具有细胞粘连和运动功能的靶基因结合来抑制肿瘤的迁移。

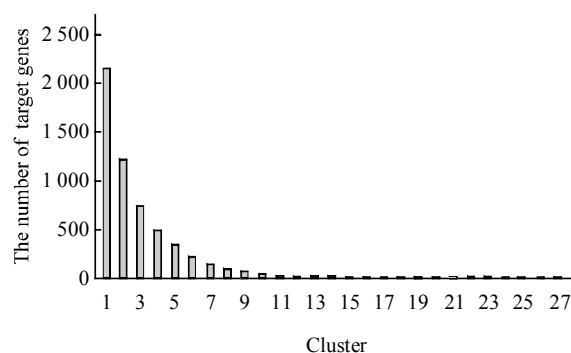


Fig. 3 The number of target genes of cluster 1~27

2.6 p53-microRNA 靶基因功能富集分析(functional enrichment analysis)

细胞周期调控、细胞凋亡和细胞增殖是 p53 活化或突变后介导的主要生物学进程, 为此, 我们将 53 条 microRNA 对应的靶基因(共 15 500 个)分别映射到 DAVID 数据库上, 以期对这些靶基因进行功能分类, 最后, 从这 53 条 microRNA 中筛选得到了 30 条 $P < 0.05$ 的 microRNA 靶基因功能注释信息(表 3). 这些 microRNA 的靶基因参与了细胞周期调控、细胞凋亡和细胞增殖这三个主要的 p53 相关生物学进程. 值得注意的是其中有 9 条 microRNA 在这三种生物进程中均有参与. 这暗示着这 9 条 microRNA 在 p53 信号通路的调节中可能起着关键作用, 它们互相作用共同调节着多个 p53 信号环路(表 4). 其中最值得关注的是 hsa-mir-195 和 hsa-mir-497, 它们成簇聚集于 17 号染色体上, 具有共同的靶基因, 从功能富集分析来看, 它们的靶基因在细胞周期调控上获得了非常低的 P 值 (8.1×10^{-9}), 这意味着它们一起被 p53 调控并主要参与了细胞周期进程. Flavin 等^[22]近来通过比较原发性腹膜癌与卵巢浆液性癌的 microRNA 表达谱后发现, 在原发性腹膜癌中 hsa-mir-195 和 hsa-mir-497

表达明显下调, 分别下降 87.10%和 99.91%, 并且与其位于同一染色体(17p13.1)的 p53 表达也相应下调, 这表明 hsa-mir-195 和 hsa-mir-497 可能在原发性腹膜癌中起着抑癌基因的作用, 但 Flavin 等^[22]并没有直接给出 hsa-mir-195 和 hsa-mir-497 与 p53 的关系. 根据我们的分析, hsa-mir-195 和 hsa-mir-497 受 p53 直接调控, 所以当 p53 活性降低时 hsa-mir-195 和 hsa-mir-497 的表达也相应下调, 这与近来报道的受 p53 直接调控的 has-mir-34a 具有类似的调控机制. 另外, Xi 等^[6]通过比较 HCT116 (WT-p53)和 HCT116 (null-p53)细胞系的 microRNA 表达谱后发现, 在 p53 存在时 hsa-mir-181a-1 和 hsa-mir-181b-1 的表达量分别是 p53 缺失时的 1.34 和 11.87 倍, 但至于是否是受到 p53 直接调控还是通过某个通路间接作用, 目前还不是很清楚. 另外, Yu 等^[23]对人 microRNA 进行聚类后检测 microRNA 在白血病细胞系的表达水平后发现, 同簇的 microRNA 表达往往一致, 最后他们筛选出了一些在造血方面具有特异性的 microRNA, 如 hsa-mir-181c、hsa-mir-181d 和 hsa-mir-29c 等, 并且他们认为这些 microRNA 可能在造血功能和肿瘤形成中起着关键的作用.

Table 3 The 30 significant microRNAs associated with p53 upstream and downstream genes that involved in apoptosis, cell cycle or cell proliferation

MicroRNAs			Number	Apoptosis	Cell cycle/ mitotic cell cycle	Cell proliferation
hsa-mir-181a-1, hsa-mir-181b-1, hsa-mir-181c, hsa-mir-181d, hsa-mir-195, hsa-mir-497, hsa-mir-495, hsa-mir-543, hsa-mir-548c			9	+	+	+
hsa-mir-19a, hsa-mir-19b-1, hsa-mir-200b, hsa-mir-429, hsa-mir-548d-1, hsa-mir-548d-2, hsa-mir-587, hsa-mir-653, hsa-mir-655			9	-	+	+
hsa-mir-220c, hsa-mir-448, hsa-mir-376a-1			3	+	-	-
hsa-mir-28, hsa-mir-374b, hsa-mir-455, hsa-mir-578, hsa-mir-632, hsa-mir-101, hsa-let-7g, hsa-let-7i			8	-	-	+
hsa-mir-590			1	+	-	+

The symbol “+” means positive hits, whereas “-” means negative hits.

Table 4 The functional enrichment analysis of the 9 microRNAs associated with p53 upstream and downstream genes that target known apoptotic, cell cycle and cell proliferation genes

MicroRNA	Total number of predicted targets	Count	Target genes	P-value	
MicroRNAs targeting apoptotic genes	hsa-mir-495	608	40	BCL2L1, HSPA5, TRAF7, PTEN, CADM1, BCLAF1, IGF1R, DEDD, CDH13, SGMS1, UBE2Z, RUNX3, FOXC1, PDCD10, RYBP, RAD21, PHLPP, SNCA, CBX4, PURA, VEGFA GJA1, DDIT4, IHPK3, PLAGL2, BTG1, ACTC1, SCG2, RFFL, SOX9, ACVR1B, PHF17, EIF5A, CROP, PAK7, CCAR1, BIRC4, EP300, TGFB2, TNFRSF21	3.3×10 ⁻³
	hsa-mir-543	466	31	API5, TFDPI, MAPK1, CUL3, PTEN, PURB, SON, KRAS, NF1, UBQLN1, PRKCE, CDH13, SGPP1, BCL6, OSM, SIRT1, RAD21, BIRC6, PURA, VEGFA, NR4A1, IL1A, RNF34, SCG2, PAK7, RRAGA, CCAR1, RNF7, DLX1, EP300, GRIK2	7.5×10 ⁻³

					Continued
MicroRNA	Total number of predicted targets	Count	Target genes	P-value	
MicroRNAs targeting apoptosis genes	hsa-mir-195	712	42	CD28, PIM1, PURB, CADM1, IGF1R, DEDD, B4GALT1, CDK5R1, RAD9A, MNT, ELMO2, BTG2, PLAGL1, RYBP, SEMA6A, SIAH1, BAG5, CBX4, UBE4B, PURA, VEGFA, BCL2, BCL2L2, PIK3R1, CARD10, PCBP4, YWHAH, PDCD4, APP, LITAF, PTH, PPP2R1A, PAK7, SNRK, IHH, SMAD3, CUL2, BFAR, RASSF5, ARHGDI, RNF144B, ADRB2	1.1×10 ⁻²
	hsa-mir-497				
	hsa-mir-181a-1	686	39	MAPK1, HSPA5, CUL3, PTEN, PURB, SH3GLB1, BCLAF1, BCL2L11, B4GALT1, PRKCE, DNAJA3, CDH13, CUL5, UNC5A, BCL6, MCL1, HMGB1, ESR1, SIRT1, RAD21, PAWR, TNFRSF11B, BIRC6, CBX4, IL1A, BCL2, RNF34, ATG5, TIMP3, MAEA, HSP90B1, PDCD4, MAP3K10, PAK7, FAS, CCAR1, CARD11, PHLDA1, GRIK2	3.1×10 ⁻²
	hsa-mir-181c				
MicroRNAs targeting cell cycle/mitotic cell cycle genes	hsa-mir-181d				
	hsa-mir-181b-1				
	hsa-mir-548c	1 295	64	NRG2, ACTN4, PDCD6IP, TIAL1, CUL3, PURB, HIPK3, NFKBIA, BCLAF1, BCL2L11, CDK5R1, NOTCH2, SGK3, SGMS1, E2F4, RAD21, SIRT1, GJB6, CD24, UBE4B, PURA, VEGFA, BCL2, BCL2L2, PIK3R1, CDKN1B, PHF17, PRKAA1, TRAF3, EP300, CADM1, ACVR1, IGF1R, TNFSF12, B4GALT1, PRKCE, MNT, PAK2, MCL1, FOXC1, SEMA6A, SIAH1, TOPORS, TXNDC1, GCLM, GJA1, TP63, PLAGL2, BTG1, DAPK1, ATG5, AKT1, SLTM, HDAC1, ARF6, TBX3, YWHAZ, SMAD3, STAT5B, TAX1BP1, RTN4, MAPK8, TESK2, MAPK8IP2	4.7×10 ⁻²
	hsa-mir-195	712	68	CD28, CDC25A, DMTF1, RECK, PAM, SESN1, CCNE1, E2F3, ALS2CR2, CCNYL1, CDK5R1, RAD9A, PLAGL1, MAPRE1, MYBL1, KIF23, VEGFA, PURA, YWHAQ, BCL2, PPM1D, CCNJL, FOSL1, TACC1, PDCD4, PPP2R1A, PPP6C, CHEK1, SRPK1, MAP2K1, C10orf46, E2F7, RBBP6, CCND2, CYP26B1, CADM1, ANKRD15, LATS2, FGF7, CDC37L1, IGF1R, CCNJ, MNT, DNAJA2, ARHGAP20, MACF1, FGF2, PCTK2, G0S2, CCNT2, SIAH1, PAFAH1B1, PTCH1, CDC27, WEE1, PCBP4, YWHAH, CD2AP, TLK1, MYB, PPP3CB, CUL2, MTSS1, TSPYL2, CCND1, RASSF5, TMEM189-UBE2V1, MAPK3	8.1×10 ⁻⁹
MicroRNAs targeting cell cycle/mitotic cell cycle genes	hsa-mir-497				
	hsa-mir-548c	1 295	94	HSPA2, ACTN4, ADCY3, RAP1A, SENP5, PTP4A1, CUL3, PAM, TGFA, BTG3, CCNL1, SPIN1, FOSB, E2F3, APPL1, PCAF, CCNYL1, DDB1, CDK5R1, NOTCH2, CDC73, CDC14A, PAPD5, PDGFC, POLS, FOXO4, ERH, CAMK2D, RAD21, CSK, MAPRE3, E2F4, TRIM13, PURA, VEGFA, MPHOSPH9, OSGIN2, CP110, CDK7, STAG2, BCL2, CLASP2, CDKN1B, PDS5B, E2F8, FOSL1, ERBB2IP, PLCB1, PPP3CA, PDS5A, MAP2K1, CLASP1, EP300, TCF7L2, ADCYAP1, RBBP6, GTF2H1, PARD6G, KHDRBS1, CDC2L5, CADM1, ACVR1, CITED2, IGF1R, PARD6B, MNT, DNAJA2, FOXC1, SIAH1, NEK1, CLIP1, PAFAH1B1, PPP1CB, VEGFC, MYC, HECA, PTCH1, DAB2IP, TRRAP, UHMK1, ZMYND11, TBX3, PTMA, XRN1, CD2AP, TARDBP, MYB, HDAC4, TOB2, STAT5B, MTSS1, EPHB2, TSPYL2, STAG1	3.6×10 ⁻⁶
	hsa-mir-543	466	40	CTCF, RAP1A, TFDPI, MAPK1, CUL3, CYP26B1, PTEN, SPIN1, KRAS, NF1, SEPT3, BCL6, TSC1, NIPBL, NEK2, RAD21, CCNT2, MAPRE1, PAFAH1B1, PPP1CB, RNF2, PURA, VEGFA, IL1A, PTCH1, UBB, CCNC, YWHAQ, HECA, PDS5B, LATS1, BMP2, NUMA1, PPP3CA, CCAR1, PDS5A, CAMK2G, MAPK6, EP300, E2F7	2.0×10 ⁻⁴
	hsa-mir-495	608	47	KPNA2, PNN, CYP26B1, PTEN, ANAPC1, CADM1, E2F3, FGF7, IGF1R, CDC37L1, PCAF, CDC14A, PSMD2, JAG2, RUNX3, RANBP1, PAPD5, FOXC1, NIPBL, EML4, DUSP1, POLS, RAD21, CCNT2, PPP1CB, VEGFA, PURA, MPHOSPH9, PTCH1, STAG2, ZMYND11, ACVR1B, PDGFD, PPP3CA, PPP6C, CCAR1, TARDBP, TLK1, CDK6, ILF3, CAMK2G, MTSS1, MAPK6, EPHB2, EP300, TGFB2, DUSP6	7.1×10 ⁻⁴
MicroRNAs targeting cell cycle/mitotic cell cycle genes	hsa-mir-181a-1	686	46	CUL3, MAPK1, PTEN, PAM, RECK, ANKRD15, CCNJ, HEXIM1, PCAF, SEPT3, CDC73, PCNP, CUL5, RAN, PAPD5, BCL6, NIPBL, PCTK2, RAD21, CLIP1, PAFAH1B1, PPP1CB, BMPR2, MYBL1, TRIM13, RASSF1, IL1A, HECA, BCL2, CSNK2A2, PDCD4, MAEA, CIT, CCAR1, TARDBP, CD2AP, SPECC1L, ERF, MAP2K1, ILF3, CAMK2G, CLASP1, CCNK, E2F7, DUSP6, STAG1	1.1×10 ⁻⁴
	hsa-mir-181c				
	hsa-mir-181d				
	hsa-mir-181b-1				

					Continued
MicroRNA	Total number of predicted targets	Count	Target genes	P-value	
MicroRNAs targeting cell proliferation genes	hsa-mir-548c	1 295	88	KIT, GLI3, CUL3, PURB, CTNNBIP1, TGFA, BTG3, ODC1, MYCN, NFKBIA, APPL1, MXI1, KLF11, PCAF, ODZ1, CDK5R1, CDC14A, NOTCH2, SKAP2, MXD1, NRP1, MMP14, PDGFC, PDGFRA, FOXO4, CSK, GJB6, NUMB, E2F4, DBP, CD24, VEGFA, PURA, CDK7, BCL2, CDKN1B, PDS5B, EDG1, FOSL1, LRP2, MAP2K1, GAS6, SF1, HDGFRP3, GPC4, ID4, KHDRBS1, CDC2L5, IGF1, TOB1, CADM1, MXD4, ARHGEF2, IGF1R, TNFSF12, B4GALT1, ERBB4, INSIG1, MNT, CTBP1, DNAJA2, PBEF1, FOXC1, SSTR1, BMI1, LIF, TOPORS, LDOC1, PAFAH1B1, MYC, VEGFC, TXNDC1, HHIP, GJA1, ADAMTS1, BHLHB3, PTCH1, BTG1, ZMYND11, TBX3, FLT3, TGFBR2, NUMBL, SMAD3, HDAC4, TOB2, STAT5B, ACSL6	1.0×10 ⁻⁶
	hsa-mir-495	608	46	KLF5, PTEN, IGF1, SSR1, CADM1, FGF7, IGF1R, ETS1, ODZ1, PCAF, CDC14A, ERBB4, CNBP, CDH13, JAG2, RUNX3, EHF, FGFR1L1, FOXC1, BMI1, NAB2, ACVR2A, CD164, VEGFA, GJA1, PURA, BHLHB3, PTCH1, RAP1B, BTG1, ATP8A2, SCG2, ZMYND11, CBFA2T2, SOX9, TIMP2, PDGFD, EPS15, POU3F2, CDK6, NOTCH1, HBEGF, CCDC88A, SF1, TGFB2, NR6A1	1.1×10 ⁻⁴
	hsa-mir-195 hsa-mir-497	712	49	CDC25A, CD28, FGFR1, PURB, SESN1, RBM9, BAI1, PRDM4, CDK5R1, BTG2, MAPRE1, VEGFA, PURA, BCL2, PPM1D, PPAP2A, PDAP1, FOSL1, LRP2, CHEK1, MAP2K1, IHH, CDV3, AXIN2, ADRB2, CCND2, PIM1, CADM1, FGF7, IGF1R, BMPR1A, LAMC1, B4GALT1, DNAJA2, MNT, FGF2, PAFAH1B1, CD164, ACVR2A, BHLHB3, PTCH1, CBFA2T3, CDC27, EFN1, HDGF, POU3F2, SMAD3, CXCL10, CUL2	3.3×10 ⁻⁴
	hsa-mir-181a-1 hsa-mir-181c hsa-mir-181d hsa-mir-181b-1	686	44	ELN, CUL3, PTEN, PROX1, LMO1, PURB, ABI1, ETS1, B4GALT1, PCAF, CDH13, IRS2, CUL5, MMP14, BCL6, TGFBI, PDGFRA, ERG, PAWR, LIF, CTNNBP2, BIRC6, PRKCD, PAFAH1B1, BMPR2, ACVR2A, ADAMTS1, IL1A, CBFA2T3, BCL2, FLT1, ADM, RAP1B, CBFA2T2, EDG1, RBBP7, CYR61, EPS15, CARD11, ERF, MAP2K1, CCDC88A, TGFBR1, NR6A1	3.8×10 ⁻³
	hsa-mir-543	466	30	ID4, TFDP1, CUL3, PTEN, PURB, LMO1, MYCN, ARHGEF2, KRAS, NF1, CDH13, ERBB4, BCL6, OSM, TSC1, TGFBI, MAPRE1, BIRC6, PAFAH1B1, ACVR2A, VEGFA, PURA, IL1A, PTCH1, EPS8, SCG2, PDS5B, RBBP7, BMP2, CYR61	1.6×10 ⁻²

The P-values represent the probability of a microRNA targeting an annotation terms gene purely by chance.

2.7 p53 直接调控 microRNA 同源搜索

为了探明这 30 条 microRNA 在物种间的保守性，我们使用 miRNAmirer 工具(参数为默认值)搜

索了包括人在内的 36 个物种的基因组序列。MiRNAmirer 是一种在基因组中搜索同源 microRNA 的工具。它首先使用 BLAST 在相应的

Table 5 The new discovered microRNAs which not included in other species databases

MicroRNA	Organism															
	ptr	ppy	mim	oga	cpo	ocu	opr	sar	str	dno	eca	ete	fca	laf	tbe	mlu
hsa-mir-497																
hsa-mir-495/																
hsa-mir-543																
hsa-mir-19a																
hsa-mir-19b-1																
hsa-mir-200b																
hsa-mir-448																
hsa-mir-28																
hsa-mir-455																
hsa-mir-590																

The gray box indicates the highly conserved microRNA which have been newly identified by miRNAmirer.

基因组中搜索与 microRNA 前体相匹配的序列, 之后根据一系列的条件来筛选高特异性的同源 microRNA, 这些条件包括: BLAST E 值、RNA 二级结构折叠能量阈值、最小碱基配对阈值、形成 RNA 发夹结构的要素以及 microRNA 前体和成熟 microRNA 的比对分值^[24].

结果发现, 有 10 条 microRNA 是一些物种 microRNA 数据库所未收录的新 microRNA (表 5), 并且这 10 条 microRNA 的保守度均为 1.0, 即在 36 个物种中最为保守 (表 5 中灰色方块), 这 10 条 microRNA 分别分布于 16 个物种中, 而对于其他的 20 个物种并没有找到相应的同源 microRNA. 新发现的这些 microRNA 将为后续相关物种 microRNA 的研究提供一定的信息.

3 讨 论

自 microRNA 发现以来, 已经陆续有数以百计的 microRNA 又被人们所发现, 但仅有个别的 microRNA 被证实直接被 p53 调控, 本文从现有 microRNA 数据库出发, 使用 Targetscan、MiRanda 和 MirTarget2 三种算法组合的方法, 对 p53 上游转录调控因子以及下游靶基因进行了靶 microRNA 预测, 得到了 99 条与 p53 上下游基因调控相关的 microRNA, 其中有 53 条具有高度可信的 p53-DNA 结合位点 (分值 >90), 还有 34 条 microRNA 的 p53-DNA 结合位点分值介于 85 与 90 之间, 可见通过三种算法组合得到的 microRNA 与 p53 具有很高的相关性, 为了排除这种相关性是一个随机事件, 我们进行了 Fisher's exact test, 得到了非常低的 P 值 ($P=2.44\times 10^{-45}$). 因此, 可以肯定的是, 从三种算法整合结果中筛选得到的具有 p53-DNA 结合位点的 microRNA 与整合结果高度相关, 并非是一个随机概率事件. p53 相互作用蛋白网络与 microRNA 是如何相互作用的目前并不是很清楚, 将目前已知的 p53 相互作用数据与这 53 条 microRNA 联系起来, 构建了一张相互作用网络图, 以期发现一些重要的相互作用关系, 其中最值得注意的是 FAS 蛋白, 它与 13 条 microRNA 相互作用, 明显较其他的蛋白质相互作用要多, FAS 蛋白正处在 FAS-Casp 这一细胞凋亡环路中的上游, 对于它的调节会直接影响细胞的凋亡过程, 这一环路的失调极有可能导致细胞增殖而引起肿瘤. 那么 microRNA 是怎样参与到 p53 的信号通路中并发

挥调节作用呢? 为此, 我们基于上述结果构建了一张 p53-microRNA 信号通路图, 以期阐明这一过程的可能机理. 我们的推论是, microRNA 既是 p53 的直接调控基因, 又反过来会对 p53 本身及其上下游基因起到抑制作用, 另外 microRNA 之间也存在着相互作用. 因此, 这种调控是多个因素互相影响的结果, p53 作为一个抑癌基因正是处于这种平衡的中心, 它的突变或缺失直接造成对于 microRNA 调控的失调, 例如, has-mir-34a 可以和其他因子共同作用来抑制细胞增殖, 当 p53 突变或缺失后造成 has-mir-34a 活性降低, 抑制细胞增殖的能力下降, 从而引发肿瘤^[9]. Brugarolas 等^[20]在 10 多年前研究 p53-p21-cdk2-mdm2 环路时就发现小鼠中 p21 蛋白被破坏后并没有像人们预期的那样完全终止 p53 信号通路并使细胞生长停滞. 这一发现说明了在 p53-p21-cdk2-mdm2 这一环路中还存在着其他的作用因子, microRNA 的出现则可以很好地解释这一现象, 根据我们构建的 p53-microRNA 信号通路图来看, 当 p21 突变或缺失后, p53-p21-cdk2-mdm2 环路受到破坏, p21 对 cdk2 的抑制作用降低或消失, 机体为了维持正常的生理功能, 调节 p53 的活性增强, p53 与 cdk2 靶 microRNA 上下游区域结合, 使 microRNA 在转录水平上调从而在转录后水平抑制 cdk2 表达, 因为 microRNA 在 p53-p21-cdk2-mdm2 loop 是起到调控的作用, 它并不能完全替代 p21 的作用, 这也解释了为什么小鼠的 p21 蛋白被破坏后并不会完全终止 p53 的信号通路的原因, 当然是哪些 microRNA 充当了 p21 的角色以及是否是我们假设的机制还需要今后进一步地实验验证.

本文对这 53 条 microRNA 进行了靶基因的预测, 共得到 15 500 个靶基因, 有趣的是这些靶基因中出现频率较高的一些基因多数具有钙黏蛋白结构域, 这一结果与 Wei 等^[21]发现的 p53 靶基因新的功能分类——细胞粘连和运动相吻合, 他们认为 p53 与这些靶基因的结合可能会抑制肿瘤的迁移. 众所周知, 细胞周期调控、细胞凋亡和细胞增殖这三个生物进程与肿瘤的发生密切相关, 为此, 我们将 15 500 个靶基因映射到 DAVID 数据库, 最后得到 30 条统计学意义显著 ($P<0.05$) 的 microRNA 靶基因参与了这三个生物学进程. 其中, 我们一共发现有 9 条 microRNA 均参与了这三个生物学进程, 推测这 9 条 microRNA 可能在 p53 的信号通路中起着关键作用, 它们的失调会导致细胞增殖相关基因

的过量表达或介导细胞凋亡基因的沉默, 从而导致肿瘤的发生. 其中最值得关注的是 hsa-mir-195 和 hsa-mir-497, 它们的 68 个靶基因的功能与细胞周期调控高度相关($P=8.1 \times 10^{-9}$), 有趣的是, 根据我们的预测结果来看, hsa-mir-195 和 hsa-mir-497 调控着 p53 的下游靶基因 CHK1, 而 CHK1 编码的蛋白质为细胞周期检验点蛋白, 它的突变或缺失往往会导致遗传性或偶发性癌症^[2], 因此, hsa-mir-195、hsa-mir-497、p53 和 CHK1 可能组成了 p53 介导的细胞周期调控的一条新的环路. Gottifredi 等^[26]分析发现, p53 是通过 p21 来调控 CHK1, 并且 p53 被诱导会导致 CHK1 蛋白表达量的降低, 这与我们的结果相吻合, 根据我们的分析, 当 p53 被诱导活性升高后作为转录因子 p53 直接调控 hsa-mir-195 和 hsa-mir-497 表达量增高, 它们在转录后水平抑制 CHK1 的表达, 从而使 CHK1 在蛋白质水平表达量下降, 当然, 这一环路是否存在或是还有其他因子的参与还需要更进一步的实验验证.

本文最后在 36 个物种的基因组中对这 30 条 microRNA 进行了同源性搜索与保守性分析, 结果发现, 有 10 条 microRNA 在 16 个物种中存在高度保守的 microRNA (保守度为 1.0), 这 10 条 microRNA 均为目前相应物种 microRNA 数据库所未收录数据, 这也为后续其他物种的研究提供了新的数据.

参 考 文 献

- Harms K, Nozell S, Chen X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61** (7~8): 822~842
- 郭志云, 茆灿泉, 熊莉丽. 计算识别 microRNA 及其靶基因. *中国生物工程杂志*, 2008, **28**(10): 118~123
Guo Z Y, Mao C Q, Xiong L L. *China Biotechnology*, 2008, **28**(10): 118~123
- Hatfield S, Ruohola-Baker H. MicroRNA and stem cell function. *Cell Tissue Res*, 2008, **331**(1):57~66
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*, 2007, **28**(6): 622~629
- Voorhoeve P M, le Sage C, Schrier M, *et al.* A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 2006, **124**(6): 1169~1181
- Xi Y, Shalgi R, Fodstad O, *et al.* Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, **12** (7 Pt 1):2014~2024
- Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, *et al.* Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, 2007, **6**(13): 1586~1593
- He X, He L, Hannon G J. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res*, 2007, **67** (23): 11099~11101
- He L, He X, Lim L P, *et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 2007, **447**(7148): 1130~1144
- Ambros V, Bartel B, Bartel D P, *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 2003, **9**(3): 277~289
- el-Deiry W S, Kern S E, Pietenpol J A, *et al.* Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, 1992, **1**(1): 45~59
- Saini H K, Griffiths-Jones S, Enright A J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (45): 17719~17724
- Hoh J, Jin S, Parrado T, *et al.* The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(13): 8467~8472
- Lim Y P, Lim T T, Chan Y L, *et al.* The p53 knowledgebase: an integrated information resource for p53 research. *Oncogene*, 2007, **26**(11): 1517~1531
- Jiang C, Xuan Z, Zhao F, *et al.* TRED: a transcriptional regulatory element database, new entries and other development. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(Database issue): D137~140
- Sethupathy P, Megraw M, Hatzigeorgiou A G. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Methods*, 2007, **3**(11): 881~896
- Agresti A. Survey of exact inference for contingency tables. *Statist Sci*, 1992, **7**(1): 131~153
- Liang H, Li W H. MicroRNA regulation of human protein protein interaction network. *RNA*, 2007, **13**(9): 1402~1408
- Strasser A, Jost P J, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*, 2009, **30**(2): 180~192
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon J I, *et al.* Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, 1995, **377** (6549): 552~557
- Wei C L, Wu Q, Vega V B, *et al.* A globalMap of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*, 2006, **124**(1): 207~219
- Flavin R J, Smyth P C, Laios A, *et al.* Potentially important microRNA cluster on chromosome 17p13.1 in primary peritoneal carcinoma. *Mod Pathol*, 2009, **22**(2): 197~205
- Yu J, Wang F, Yang G H, *et al.* Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **349**(1): 59~68
- Artzi S, Kiezun A, Shomron N. miRNAMiner: a tool for homologous microRNA gene search. *BMC Bioinformatics*, 2008, **9**: 39
- Stawinska M, Cygankiewicz A, Trzcinski R, *et al.* Alterations of Chk1 and Chk2 expression in colon cancer. *Int J Colorectal Dis*, 2008, **23**(12): 1243~1249
- Gottifredi V, Karni-Schmidt O, Shieh S S, *et al.* p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(4): 1066~1076

The High Throughput Screening of Direct Regulatory microRNA and Their Target Genes*

GUO Zhi-Yun^{1,2)}, MAO Can-Quan²⁾, XIONG Li-Li²⁾, XIN Hong-Bo^{1)**}

⁽¹⁾ Division of Cardiovascular Disease, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

⁽²⁾ School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract 53 new microRNAs which have p53-DNA binding sites and regulated the p53 upstream transcription factor and downstream target genes were screened from 676 human microRNAs. The microRNAs and p53 protein interaction networks was constructed through mined the known interaction of p53 and p53-microRNAs. Remarkably, FAS was found, which is a key factor in the apoptotic pathway regulated by a number of microRNAs. The interaction of FAS-microRNAs maybe play a key role in the apoptotic pathway. A presumptive p53-microRNA regulatory mechanism was proposed: p53 as a transcription factor regulated the target genes and direct regulatory microRNAs, whereas it also is regulated by upstream transcription factor and microRNAs. So, a balance which p53 located in the center would be formed by the factors of p53 pathway, the disease would be caused when this balance is broken. A total of 15 500 genes were predicted as targets of these 53 microRNAs and they are classed by 27 clusters according to the frequency of gene in all the 15 500 genes. Function annotation analysis of genes frequency more than 10 revealed a novel p53 functions, including cell adhesion and migration which suggested that p53 can suppress metastasis through direct transcriptional regulation of this new category of molecular targets. 30 microRNAs which involved in cell cycle, apoptosis and cell proliferation were explored through gene functional enrichment analysis, noticeably, 9/30 microRNAs (hsa-mir-181a-1, hsa-mir-181b-1, hsa-mir-181c, hsa-mir-181d, hsa-mir-195, hsa-mir-497, hsa-mir-495, hsa-mir-543 and hsa-mir-548c) regulated all three biological process, which implies that these 9 microRNAs maybe play a key role in the regulation of p53 signaling pathway and feedback loops through interaction of microRNAs. Finally, the homology and conservation of 30 microRNAs were analyzed in the 36 species and 10 new highly conserved microRNAs (hsa-mir-497, hsa-mir-495, hsa-mir-543, hsa-mir-19a, hsa-mir-19b-1, hsa-mir-200b, hsa-mir-448, hsa-mir-28, hsa-mir-455 and hsa-mir-590) which have not included in the current microRNA database yet were found.

Key words microRNA, p53, p53-DNA binding sites, the prediction of microRNA target genes

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00099

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA06Z353).

**Corresponding author.

Tel: 86-28-87608754, E-mail: bioinf@swjtu.edu.cn

Received: February 23, 2009 Accepted: June 4, 2009