

失调的miRNAs可作为星形细胞瘤的潜在治疗靶点：生物信息学分析

苏晶^{1*}, 彭路², 巫瑞³, 刘国栋^{1#}

¹重庆医科大学附属第二医院神经外科, 重庆

²苏州大学附属第一医院神经外科, 江苏 苏州

³江油市人民医院神经外科, 四川 绵阳

收稿日期: 2024年4月27日; 录用日期: 2024年5月19日; 发布日期: 2024年5月28日

摘要

目的: 在神经系统常见肿瘤中, 胶质瘤属于较难治疗的原发性肿瘤之一, 一般具有预后较差、较高死亡率、常易复发等特点。其中, 最常见的胶质瘤类型为星形细胞瘤, 也是本次研究的目的。以当前的医疗水平, 对胶质瘤尽早诊断和尽快进入规范化诊疗阶段是非常重要的, 而从当前的治疗现状来看仍不尽人意。我们发现一种生物标志物——microRNAs (miRNAs), 在上述疾病诊断及预后过程中存在巨大潜力, 近期的多项研究表明它在星形细胞瘤的发生、发展、转归中都有研究价值。故本研究的主旨是探讨miRNA失调在星形细胞瘤发生发展中的重要性, 并利用生物信息学分析以确定潜在的治疗靶点。方法: 我们从GEO基因表达综合数据库(下称GEO)下载GSE138764和GSE132052两个经筛选后符合要求的微阵列数据集, 并使用Rv3.6.2软件和KEGG通路分析对其进行分析。结果: 综合生物分析结果, 与星形细胞瘤发生、发展与转归呈重要相关的miRNAs或与以下靶点有关: 细胞粘附因子、RNA聚合酶II、钙粘蛋白、泛素蛋白、转录辅助活化子、组蛋白、激素-受体结合体、肿瘤蛋白多糖、细胞衰老、以及多个信号通路(MAPK, PI3K-Akt, Hippo, mTOR)等。随即, 我们从中选择10个在表达中差异最明显的miRNAs进行进一步研究: miR-138-2-3p、miR-377-5p、miR-517c-3p、miR-770-5p、miR-431-3p、miR-29b-2-5p、miR-433、miR-212-5p、miR-517a-3p、miR-490-3p, 并发现, 这些miRNA或与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等生理病理过程有关。结论: 这些发现向我们揭示: 星形细胞瘤的发生、发展及转归可能与miRNAs失调有关, NUPL2, miR-517c-3p和miR-431-3p等基因可能在进一步研究后证明对于星形细胞瘤具有重要的诊断价值, 可以作为潜在的生物治疗靶点进行应用。

关键词

星形细胞瘤, 胶质瘤, 微RNA, 生物标志物, 生物信息学

Dysregulated miRNAs as Potential Therapeutic Targets of Astrocytoma: Bioinformatics Analysis

*第一作者。

#通讯作者。

Jing Su^{1*}, Lu Peng², Rui Wu³, Guodong Liu^{1#}

¹Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

²Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou Jiangsu

³Department of Neurosurgery, Jiangyou People's Hospital, Mianyang Sichuan

Received: Apr. 27th, 2024; accepted: May 19th, 2024; published: May 28th, 2024

Abstract

Purpose: Glioma is one of the primary tumors that are difficult to treat in common nervous system tumors, which is generally characterized by poor prognosis, high mortality, and easy recurrence. Among them, the most common type of glioma is astrocytoma, which is also the purpose of this study. At the current level of medical treatment, early diagnosis and rapid entry into standardized diagnosis and treatment of gliomas are very important, but the current treatment status is still not satisfactory. We found that a biomarker, microRNAs (miRNAs), has great potential in the diagnosis and prognosis of the above-mentioned diseases. Many recent studies have shown that it has research value in the occurrence, development, and outcome of astrocytoma. Therefore, the main purpose of this study is to explore the importance of miRNA disorder in the occurrence and development of astrocytoma, and to use bioinformatics analysis to determine potential therapeutic targets. **Methods:** Two microarray datasets for GSE138764 and GSE132052 were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database and analyzed with software Rv3.6.2, and KEGG Pathway Analysis. **Results:** The miRNAs implicated in astrocytoma were associated with the following targets: cell adhesion molecule, RNA polymerase II, ubiquitin protein, cadherin, transcription coactivator, histone, hormone receptor binding, proteoglycans in cancer, cellular senescence, MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, Hippo signaling pathway, and mTOR signaling pathway. Next, we selected 10 miRNAs with the largest expression differences: miR-138-2-3p, miR-377-5p, miR-29b-2-5p, miR-517c-3p, miR-770-5p, miR-431-3p, miR-433, miR-212-5p, miR-517a-3p, miR-490-3p, and found that they were related to tumor cell proliferation, migration, and invasion. **Conclusion:** These findings suggest that dysregulated miRNAs are implicated in astrocytoma progression, and NUPL2, miR-517c-3p and miR-431-3p could be potential diagnosis biomarkers and therapeutic targets for astrocytoma.

Keywords

Astrocytoma, Glioma, microRNAs, Biomarker, Bioinformatics

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 简介

脑胶质瘤占原发性颅内恶性肿瘤的 80%，其中星形细胞瘤是最常见的类型[1]。根据其形态学特征，世界卫生组织将星形细胞瘤分为毛细胞性星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变性星形细胞瘤和多形性胶质母细胞瘤四个亚型[2]。目前，胶质瘤的早期确诊和规范治疗还很难以令人满意，仍存在经过全切除或亚全切肿瘤，再加上积极放化疗等多种治疗后，星形细胞瘤患者的中位生存期仍在 12~15 个月左右[3]。

最近的研究表明，microRNAs (miRNAs) 在多种癌症的发生发展中扮演着重要角色[4] [5]。miRNAs

可以调节包括细胞增殖、分化、迁移和凋亡在内的多种生物学过程[4]。在神经系统疾病中，miRNAs 被认为是阿尔茨海默病、帕金森病、脑缺血和颅内动脉瘤等神经系统的诊断和预后生物标志物[6] [7] [8] [9]。

生物信息学分析已被应用于揭示潜在的疾病生物标志物，特别是基于对差异表达基因(DEGs)及其相关生物过程和潜在途径的分析。然而，miRNAs 在星形细胞瘤中的作用仍不清楚。综合分析血液、脑组织或脑脊液中 miRNAs 表达异常是否可能是星形细胞瘤的生物标志物，有助于星形细胞瘤患者的早期诊断及提供更合适的治疗方案。因此，本研究旨在系统分析星形细胞瘤中 miRNA 表达异常的报道，并通过生物信息学分析揭示其潜在的治疗靶点。

2. 方法

2.1. 文献检索

根据 PRISMA 指南[10]，从 2010 年 1 月到 2023 年 1 月，用关键词“miRNA”、“胶质瘤”、“星形细胞瘤”搜索 EMBASE、Pub Med、Array Express 和 GEO。根据标题和摘要以及纳入和排除标准筛选合格的文献。检索到合格文献进行全文分析。文献检索和数据提取由两位研究人员独立完成。任何争议都将由第三位研究员解决。在 Array Express 和 GEO 以关键词“astrocytoma”搜索，根据 MIAMET 指南，从基因表达综合数据库(GEO)下载两个数据集 GSE138764 (miRNA Profile)和 GSE132052 (miRNA profile) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。

2.2. 纳入标准

1) 病例对照研究，或前瞻性或回顾性队列研究；2) 定量测定血液或血液成分、脑脊液和脑组织中的 miRNA 水平；3) miRNA 是星形细胞瘤的主要变量之一；4) 设对照组；5) 病人或动物模型；6) 样本量 > 5 。

2.3. 排除标准

1) 无对照组；2) 星形细胞瘤不是变量；3) miRNA 水平未被量化；4) 病例报告或综述文章；5) 全文不可用；6) 未提供分析结果。

2.4. 分析过程

2.4.1. 主成分分析

利用主成分分析(PCA)对临床过程或动物实验中获取的 miRNA 表达异常的数据集进行降维分析以了解样本间有无显著的特征差异。

2.4.2. miRNA 在星形细胞瘤中的表达模式

使用基于方差的前 500 个 miRNAs 进行分层聚类分析以排除任何技术异常样本，并使用 R-package limma 对两个数据集进行差异表达分析。阈值设为 $p < 0.05$ ，倍数变化 > 1.5 或倍数变化 $< 2/3$ 。用非配对 t 检验分析标准化 miRNA 失调(上调或下调)。选取 $p < 0.05$ 的 miRNAs 进行无监督层次聚类分析。然后，通过相关分析(Pearson 相关，Bonferroni-Holm 调整， $\alpha = 0.05$)分析与星形细胞瘤相关的 miRNAs 表达模式。

2.4.3. 基因功能分析

对差异表达的 miRNAs 进行基因本体(GO)富集分析， p 值 < 0.05 为显著富集。进行了京都基因和基因

组百科全书(KEGG)路径分析(<http://www.genome.jp/kegg/>)。

2.5. 免疫浸润分析

Tumor Immune Estimation Resource 提供了对泛癌肿瘤免疫细胞的综合分析(cistrome.dfci.harvard.edu/TIMER/)。我们利用其访问了靶基因中的六种免疫浸润(B 细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞)。利用此网站提供的模块，包括生存和 SCNA 模块，用于探讨免疫细胞浸润和生存之间的关系。采用 Kaplan-Meier 生存曲线、log-rank 检验和单因素 Cox 分析评价免疫相关基因特征和临床特征与总生存率的关系。协变量包括临床因素(年龄、性别、种族、肿瘤分期)和基因表达。SCNA 模块提供了对给定基因不同体细胞拷贝数改变的肿瘤间肿瘤浸润水平的比较。

3. 结果

3.1. 纳入的研究

Table 1. Study design, sample size and related research results

表 1. 研究设计、样本量和相关研究结果

	目的	样本量	样本	变量	研究结果
Xiang Rong Liu 等[37] 2016	探讨 mir124 靶向 iASPP 在胶质瘤中的作用	胶质瘤组(n = 66)和正常对照组(n = 14)	人脑胶质瘤组织	性别, 年龄, KPS 评分, 肿瘤大小	miR-124 靶基因 iASPP 的表达可能与胶质瘤有关
Liu X 等 [38] 2018	推测 microRNA (miRNA)断裂可能在星形细胞瘤的发病机制中起重要作用	18 例星形细胞瘤和 10 例重型颅脑损伤患者作为正常对照	人星形细胞瘤组织	WHO 分级	在星形细胞瘤组织和人星形细胞瘤细胞系中, MiR-128 水平降低, TROVE2 蛋白水平升高, 并且具有等级依赖性
Bookland M 等 [39] 2018	验证青少年毛细胞性星形细胞瘤患者血清中的 miRNA 谱可以成为一种筛选工具	2014 年至 2016 年间在康涅狄格州儿童医疗中心儿科神经外科就诊的所有患者	人类血清	WHO 分级	血清 miR-21、miR-15b、miR-23a 和 miR-146b 水平显著升高, 提示该血清 miRNA 谱可作为筛选和追踪青少年毛细胞性星形细胞瘤患者的生物标志物
Deshpande RP 等[40] 2016	探讨 miR-520d-5p 和 miR-520d-3p 在星形细胞瘤 SIRP α 表达调控中的作用	45 例星形细胞瘤患者和癫痫组织标本作为对照	人星形细胞瘤组织	年龄、性别、WHO 分级	MiR520d-5p 和 miR-520d-3p 可能在 SIRP α 蛋白表达不足的调控中起作用
Zhi F 等 [41] 2010	为了确定 miRNA 的异常表达与星形细胞瘤有关	124 例星形细胞瘤标本和 60 例正常对照	人星形细胞瘤组织	年龄, 性别, WHO 分级	使用 miRNA 分析作为一个强有力的诊断和预后标志物来确定星形细胞瘤的特征和预测术后结果。
Zhi F 等 [42] 2014	探讨 miR181b-5p 的功能作用及其可能的靶基因	25 例星形细胞瘤患者的 90 例星形细胞瘤和正常邻近组织	人星形细胞瘤组织	WHO 分级	MiR-181b-5p 可作为星形细胞瘤的新靶点
Deng D 等 [43] 2015	确定 PIM1 与 miRNAs 之间是否存在密切关系	星形细胞瘤及正常邻近组织 12 例	人星形细胞瘤组织	年龄, 性别, WHO 分级,	通过抑制 PIM1 翻译了解 miR-124-3p 在星形细胞瘤发病中的抑瘤作用

续表

Zhi F 等 [44] 2018	探讨血清 miRNAs 作为星形细胞瘤诊断和预后生物标志物的可能性	90 例星形细胞瘤患者和 110 例健康对照者	人类血清	年龄, 性别, WHO 分级	血清 miRNAs 作为星形细胞瘤诊断和预后新生物标志物的潜力
----------------------	-----------------------------------	-------------------------	------	-------------------	---------------------------------

在从 Pub Med 和 EMBASE 检索的 966 项研究中, 对 15 项研究的全文进行了评估, 9 项研究被纳入数据提取(见表 1)。从 GEO 中筛选出两个较为符合要求的基因集, 其中 GSE138764 含有 33 个星形细胞肿瘤组织和 9 个非肿瘤人脑组织。患者的临床信息见表 2。GSE132052 含有 4 个小鼠星形细胞瘤组织和 3 个小鼠脑组织, 分别取自出生后第 60 天小鼠的新皮质与出生后第 60~150 天小鼠的星形细胞瘤组织的肿瘤组织。

Table 2. Clinical characteristics of patients**表 2.** 患者的临床特征

	分类	肿瘤	非肿瘤
年龄	≤50	22 (66.67%)	3 (33.33%)
	>50	11 (33.33%)	6 (66.67%)
性别	男性	20 (60.61%)	7 (77.78%)
	女性	13 (39.39%)	2 (22.22%)
IDH 变异	野生型	23 (69.70%)	
	变异	10 (30.30%)	
TERT 启动子突变	野生型	14 (42.42%)	
	变异	17 (51.51%)	
	缺失	2 (6.06%)	
1p/19q 缺失	无缺失	28 (84.85%)	
	缺失	5 (15.15%)	
WHO 分级	II~III	17 (51.52%)	
	IV	16 (48.48%)	
MGMT 甲基化	低	12 (36.36%)	
	高	21 (63.64%)	

3.2. 主成分分析

42 例人类标本分为星形细胞瘤组和非肿瘤对照组。7 只小鼠分为小鼠肿瘤组和小鼠对照组。我们分别对这两个数据集进行了主成分分析(见图 1)。人类的胶质瘤样本的特征较为分散, 没有明显的倾向, 而非肿瘤样本的特征相较肿瘤组而言相对集中一些(见图 1(A))。理想状态下, 两个集会呈现完全分离的状态, 代表两组样本差异明显, 我们得出的结果虽然存在交叉, 但考虑到数据集中包含大量的 miRNA 数据, 相互之间可能存在影响, 遂不能断定两组之间无明显差异, 仍需进一步验证。而小鼠的肿瘤组及非肿瘤组则可看出相对明显的特征差异(见图 1(B))。

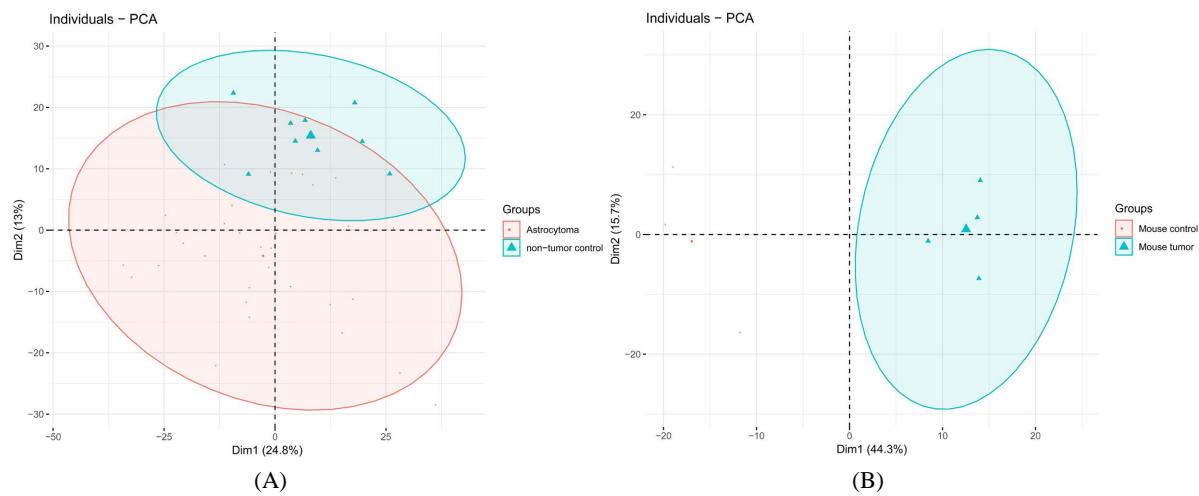


Figure 1. Principal component analysis; (A) Human samples: Astrocytoma samples were compared with non-tumor samples

图 1. 主成分分析; (A) 人类样本: 星形细胞瘤样本和非肿瘤样本相互对照; (B) 小鼠样本: 小鼠肿瘤样本和正常组织相互对照

3.3. 差异 miRNA 的表达模式

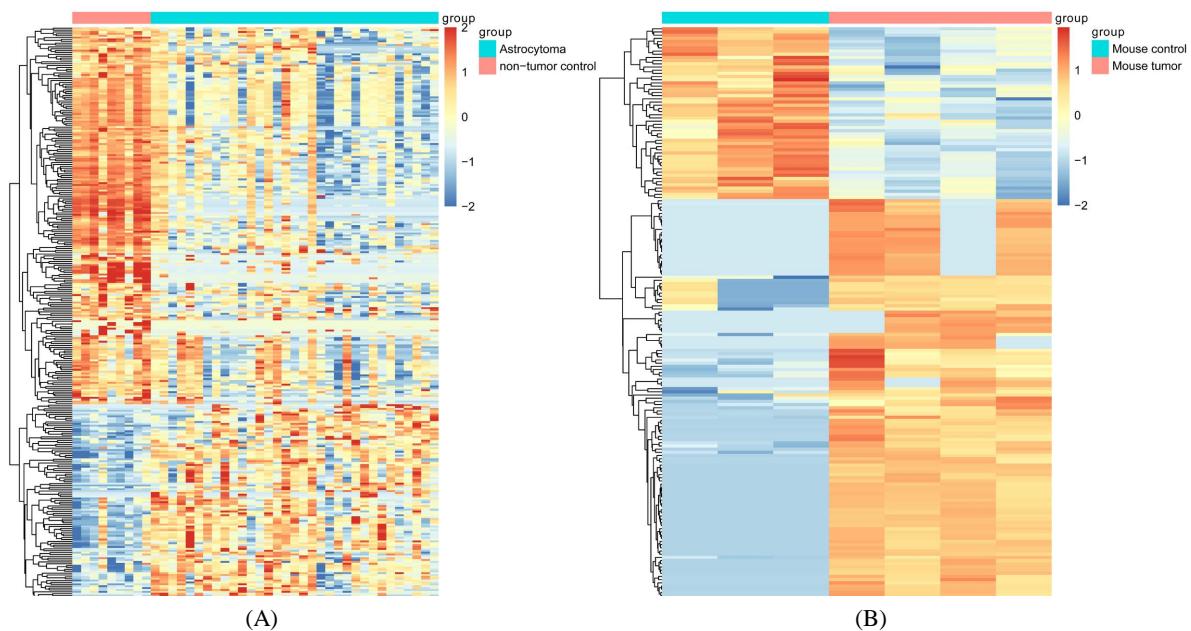


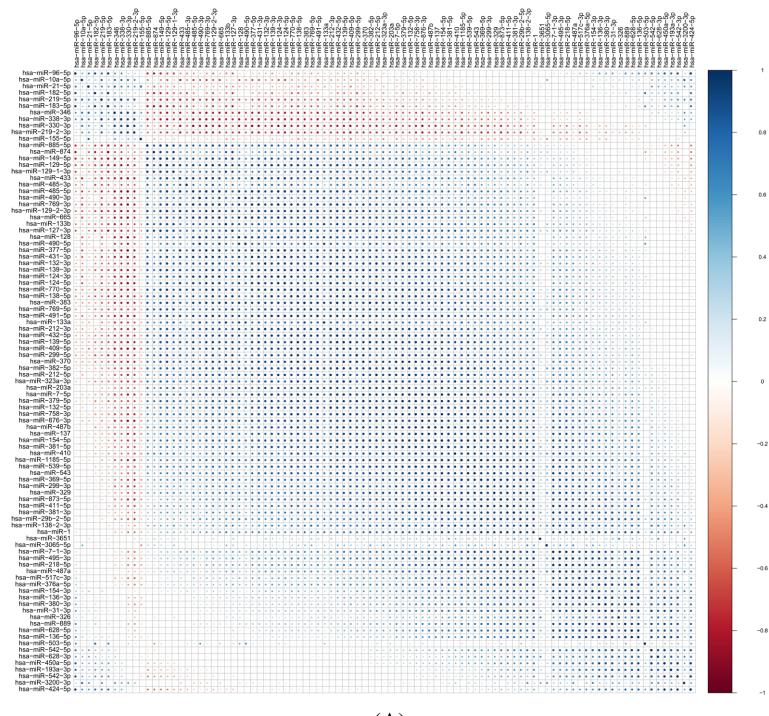
Figure 2. The heat maps display the expression pattern of differential expressed miRNAs. Blue represents low gene expression and red represents high gene expression; (A) The abscissa represents the 42 human samples, and the ordinate represents the 307 differential miRNAs; (B) The abscissa represents the 7 mouse samples, and the ordinate represents the 179 differential miRNAs

图 2. 热图显示差异表达的 miRNAs 的表达模式。蓝色代表低基因表达, 红色代表高基因表达; (A) 横坐标代表 42 个人类样本, 纵坐标代表 307 个差异表达的 miRNAs; (B) 横坐标代表 7 个小鼠样本, 纵坐标代表 179 个不同的 miRNA

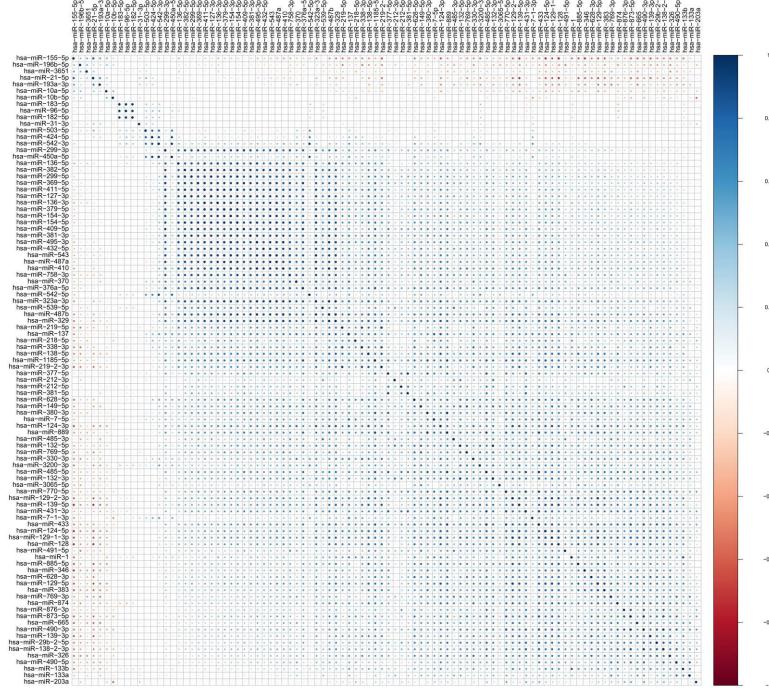
差异 miRNA 的层次聚类显示, 人星形细胞瘤和小鼠肿瘤组中 miRNA 的整体表达模式与对照组有很大差异(见图 2)。在人星形细胞瘤组中, 大多数 miRNAs 表达下调, 而在无肿瘤对照组中, 大多数 miRNAs 表达上调(见图 2(A))。然而, 小鼠样本显示出相反的结果(见图 2(B))。小鼠肿瘤组多数 miRNAs 表达上调,

对照组多数 miRNAs 表达下调。在人和小鼠样本中，肿瘤组的表达模式相似，而对照组的表达模式相似。这些结果显示，人和小鼠样本中的星形细胞瘤都与不同的 miRNAs 相关。此外，我们还选择了 95 个与星形细胞瘤相关的人 miRNAs 和 179 个小鼠 miRNAs 作进一步分析。

3.4. miRNA 表达的相关性



(A)



(B)

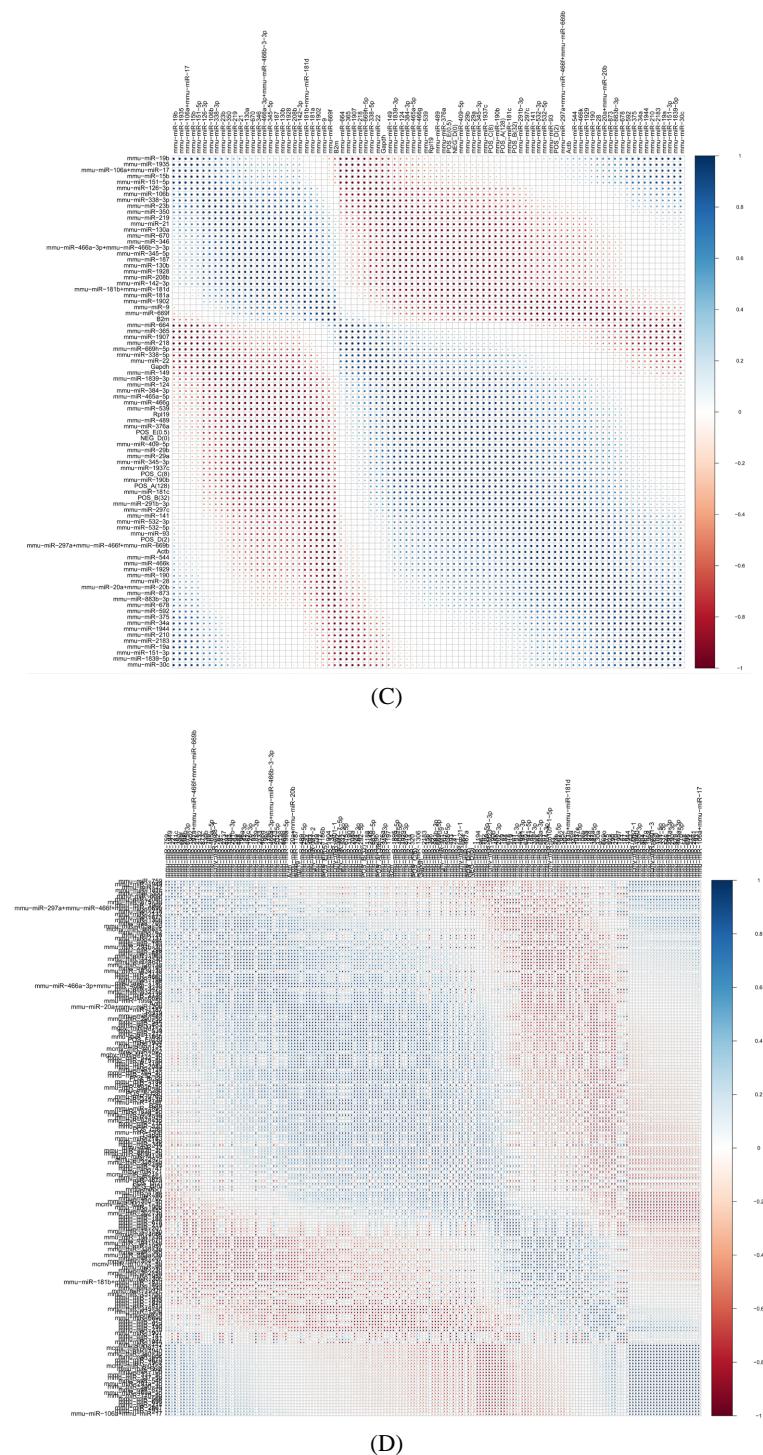


Figure 3. Correlation matrix within miRNAs cluster. (A) Astrocytic and non-tumor control miRNAs in non-tumor control group; (B) Astrocytic and non-tumor control miRNAs in astrocytic group; (C) Mouse tumor and Mouse control differential miRNA in Mouse control; (D) Mouse tumor and Mouse control differential miRNA in Mouse tumor. The color intensities (scale in the side bar) and the numbers indicate the degree of pairwise correlation

图 3. miRNAs 簇内相关矩阵。(A) 星形细胞瘤和非肿瘤样本的差异 miRNA 与非肿瘤对照组对照; (B) 星形细胞瘤和非肿瘤样本的差异 miRNA 与星形细胞瘤对照; (C) 小鼠肿瘤和小鼠正常组织的差异 miRNA 在小鼠正常组织中对照; (D) 小鼠肿瘤和小鼠正常组织的差异 miRNA 在小鼠肿瘤组织中对照。颜色强度(侧栏标度)和数字表明二者之间的相关性

人类 95 个 miRNAs 在星形细胞瘤中的表达大部分呈现强的正相关(见图 3(A)和图 3(B)), 与它们表达模式的热图一致, 并可能为之前的 CPA 主成分分析结果不显著提供解释(见图 1(A))。此外, miRNA 之间的表达相关性在小鼠样本中也很明显(见图 3(C)和图 3(D))。代表他们很可能共同参与星形细胞瘤的共同通路。

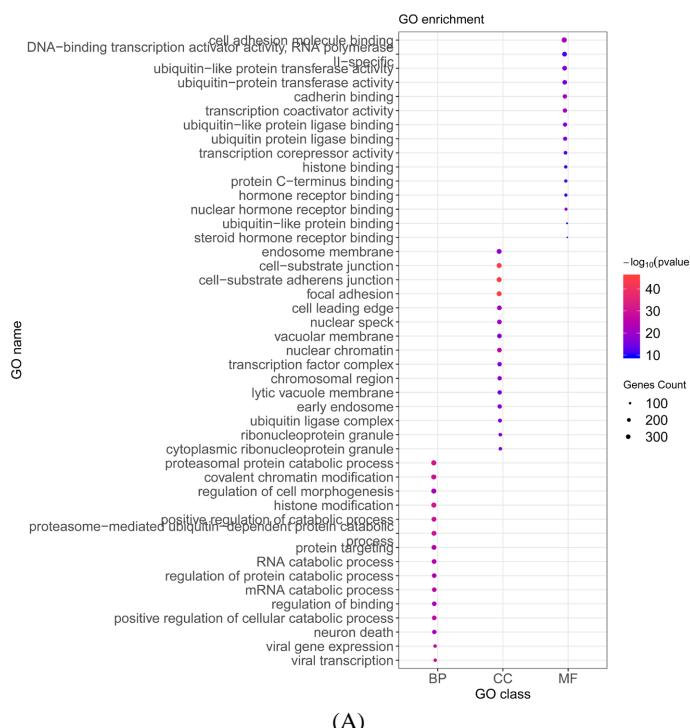
3.5. 验证 miRNAs 簇靶点

GO 富集分析(见图 4)和KEGG 通路分析(见补充表)显示星形细胞瘤相关靶点包括细胞粘附分子、RNA 聚合酶 II、泛素蛋白、钙粘蛋白、转录辅激活因子、组蛋白、激素受体结合、癌中蛋白多糖、细胞衰老、MAPK 信号通路, PI3K-Akt 信号通路, Hippo 信号通路, mTOR 信号通路。这些靶点与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭有关。为了确定调节这些途径的 miRNAs 并揭示新的潜在治疗靶点, 我们选择了 10 个表达差异最大的 miRNAs 进行进一步分析(见表 3)。

Table 3. Hypothesized targets and dysregulation of miRNA

表 3. 失调的 miRNA 和其假设靶点

miRNA 类别	miRNA 在胶质瘤中的相关功能及靶点
miR-138-2-3p	上调 TRIM24 的表达, 进一步激活 Wnt/β-连环蛋白通路促进胶质瘤的发生[45]
miR-377-5p	通过靶向 AKT1 [46]抑制细胞发育、调节细胞周期分布和 EMT
miR-29b-2-5p	靶向 Cbl-b 促进 p53 表达, 抑制细胞增殖, 诱导细胞周期阻滞, 促进细胞凋亡[47]
miR-517c-3p	尚未明确
miR-770-5p	见讨论部分
miR-431-3p	尚未明确
miR-433	见讨论部分
miR-212-5p	见讨论部分
miR-517a-3p	通过结合 FOXJ3 启动子调节 FOXJ3 的表达, 改变细胞增殖、迁移和侵袭能力[48]
miR-490-3p	见讨论部分



(A)

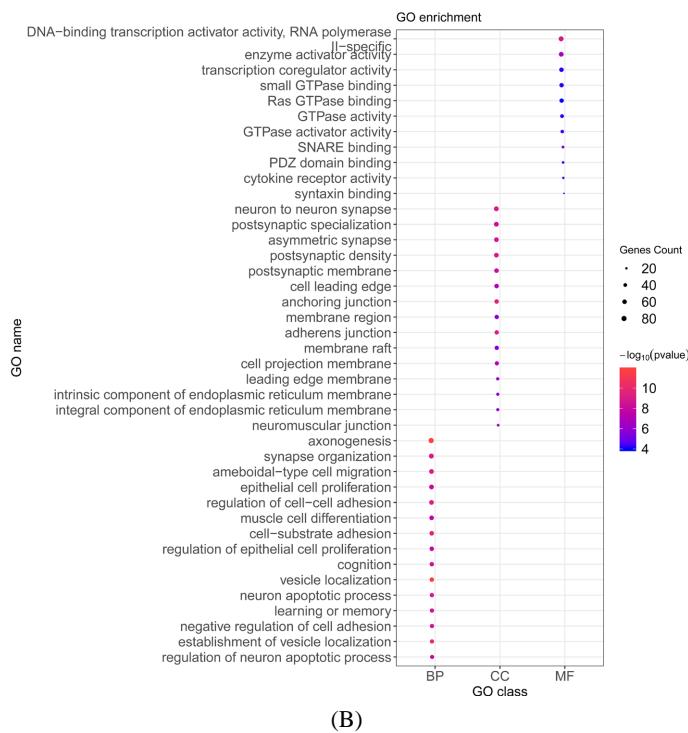


Figure 4. GO enrichment analysis of astrocytic-non-tumor control differential expression miRNAs. BP indicates biological process, CC indicates cellular components, and MF indicates molecular function. The color indicates $-\log_{10}$ (p-value). Dot sizes represent genes count. (A) Human samples; (B) Mouse samples

图 4. GO 富集分析星形胶质细胞 - 非肿瘤对照差异表达 miRNAs。BP 表示生物学过程，CC 表示细胞成分，MF 表示分子功能。颜色表示 $-\log_{10}$ (p 值)。点大小代表基因计数。(A) 人类样本；(B) 小鼠样本

3.6. 免疫浸润验证结论

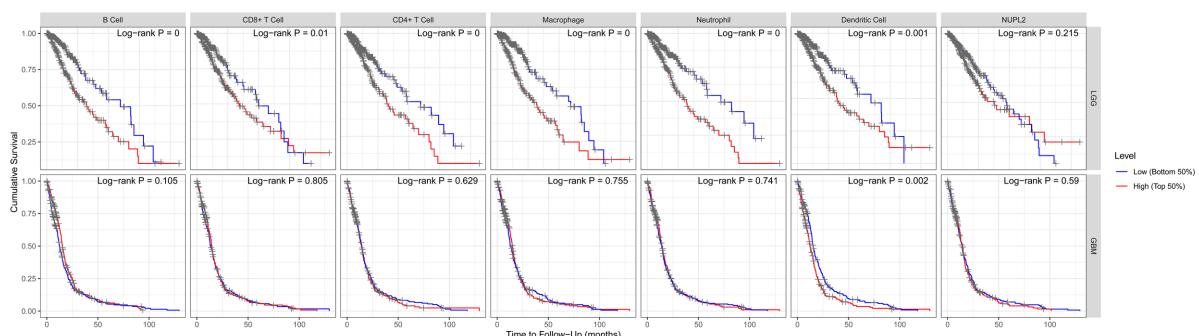


Figure 5. Kaplan-Meier survival curves comparing the high and low expression of NUPL2 in LGG and GBM
图 5. NUPL2 在 LGG 和 GBM 中的高、低表达的 Kaplan-Meier 存活曲线

并在经过 pubmed 和 embase 等文献库进行相关文献检索阅读后，排除其他目前已有相关免疫浸润研究的 miRNA (见表 3)，筛选出目前暂无明确免疫浸润机制研究的基因，miR-517c-3p。筛选出 miR-517c-3p 的靶基因 NUPL2 并研究其对免疫系统的影响。通过生存分析，评估 NUPL2 的表达对胶质瘤预后是否有显著影响。Kaplan-Meier 生存曲线表明，在低级别胶质瘤(LGG)中，高水平 NUPL2 患者的生存期明显短于低水平 NUPL2 患者，但在多形性胶质母细胞瘤(GBM)中，这一点并不明显(见图 5)。接下来，我们通过免疫浸润分析发现免疫细胞浸润水平随着靶基因 NUPL2 的基因拷贝数的变化而变化。一些免疫细胞浸

润水平似乎与 NUPL2 基因拷贝数的改变存在显著相关性，包括 GBM 中的 B 细胞、CD8+T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞；LGG 中的 B 细胞、CD8+T 细胞、CD4+T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞(见图 6)。

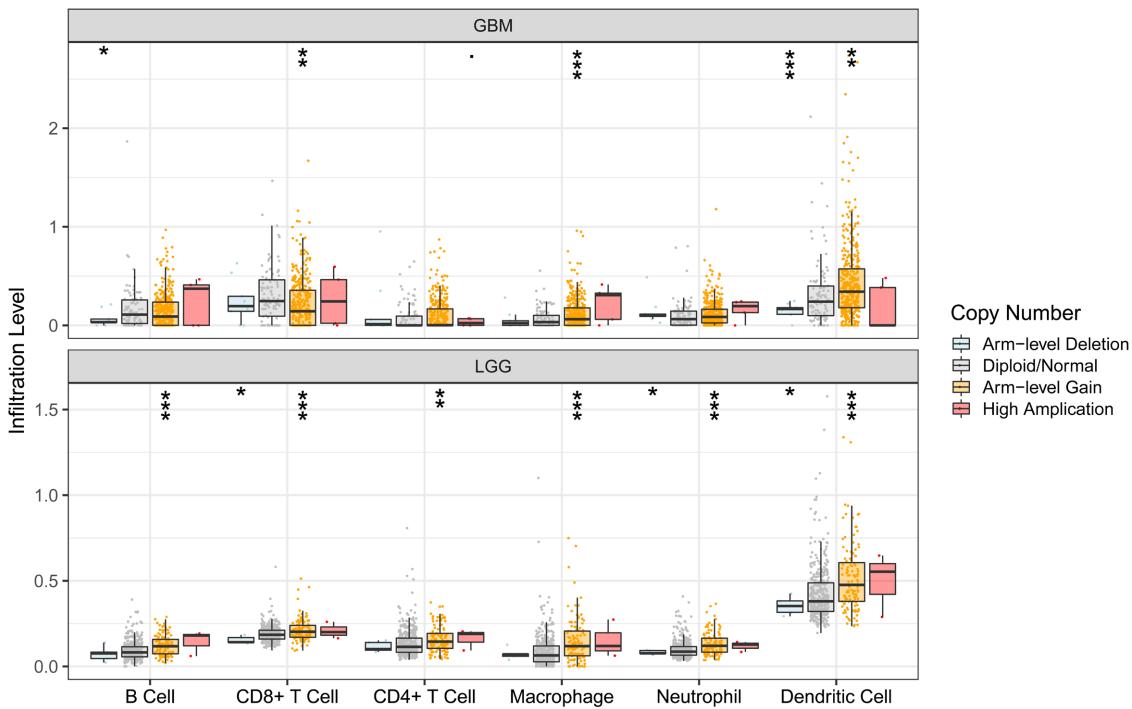


Figure 6. Association between NUPL2 copy numbers and immune cell infiltration levels in GBM and LGG cohorts
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

图 6. GBM 和 LGG 队列中 NUPL2 拷贝数与免疫细胞浸润水平的关系(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4. 讨论

星形细胞瘤是最常见侵袭性脑肿瘤，且现阶段星形细胞瘤的治疗效果不尽人意。然而，miRNAs 现已引起了人们的重视，并逐渐开始发展以 miRNA 为基础的治疗方法。目前已有一些 miRNA 被证实与星形细胞瘤有关，比如有学者发现，miR-221 在高级别胶质瘤中高表达，而 miR-124 在间变性星形细胞瘤中低表达。此外，miR-137 的低表达与星形细胞瘤的临床晚期有关，而 miR-181b 的低表达或 miR-21 的高表达与星形细胞瘤患者的生存率低有关。因此，系统分析星形细胞瘤中的 miRNAs 对于更好地了解它们在星形细胞瘤中的作用具有重要意义。

在这项研究中，我们全面提取和分析了星形细胞瘤患者和动物模型中失调的 miRNAs。此外，我们还进行了 GO 和 KEGG 通路分析，以探讨差异表达的 miRNAs 在星形细胞瘤发病机制中的潜在作用。结果提示，差异化的 miRNAs 可以调控肿瘤细胞的生长、增殖、迁移和侵袭，它们与星形细胞瘤的发生发展密切相关。

我们发现细胞粘附分子、RNA 聚合酶 II、组蛋白、泛素蛋白、钙粘蛋白、转录辅激活因子和激素受体的结合在 GO 分析中存在富集现象。这说明差异表达的 miRNA 可能通过调节上述物质来介导肿瘤的生长、增殖、迁移和侵袭[11] [16]。其中细胞粘附分子的调控与肿瘤的增殖密切相关。目前已有研究报道证实，突触粘附分子 neuroligin-3 (NLGN3) 通过 PI3K-mTOR 途径促进胶质瘤细胞增殖[12]。而 RNA 聚合酶 II 的调控不仅影响着肿瘤细胞的转录和增殖，同时也影响着胶质细胞源性神经营养因子的转录。有研究

者发现，高表达的 Egr-1 可能以非结合方式参与胶质细胞源性神经营养因子启动子 II 中 RNA 聚合酶 II 的募集，从而参与调节高级别胶质瘤细胞中的胶质细胞源性神经营养因子转录[12]。组蛋白是真核生物细胞核中的碱性蛋白质，并作为 DNA 缠绕的线轴，在基因调控中发挥重要作用，且既往研究表明组蛋白乙酰转移酶 KAT6A 可以通过上调 PI3K/AKT 信号以促进细胞增殖[13]。在泛素蛋白中，E3 泛素蛋白连接酶 2 在胶质瘤中的异位表达增强了肿瘤细胞对凋亡的抵抗力[14]，我们推测，失调的 miRNA 可能通过调控泛素蛋白来改变肿瘤细胞的凋亡，从而增加肿瘤细胞的增殖。同样也有学者发现，泛素蛋白连接酶 E3C 在胶质瘤细胞和组织中过度表达，并增加细胞迁移和侵袭[15]，也证实了这一推测。钙粘蛋白是一种同亲型结合、Ca 依赖的细胞粘着糖蛋白，其功能的表达或缺失可能与肿瘤的迁移和侵袭有关。研究表明，若 Fyn 相关激酶过度表达，可以增加 N-钙粘蛋白的蛋白水平，从而抑制了胶质瘤细胞的侵袭和迁移[16]。转录辅激活因子对胶质母细胞瘤的致瘤性至关重要[17]。此外，膜孕酮、雄激素、甲状腺激素和促肾上腺皮质激素的激素受体在调节细胞增殖、迁移和侵袭方面也很重要[18][19][20][21]。

KEGG 通路分析表明，差异化的 miRNAs 参与了不同的信号转导途径，包括肿瘤蛋白多糖、MAPK 信号转导途径、mTOR 信号转导途径和 hippo 信号转导途径。根据现有的研究，我们推测上述途径与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭有关。蛋白多糖调节肿瘤微环境并在肿瘤细胞中驱动多种致癌途径[22][23]。miRNA-499a 通过抑制 MAPK 信号通路促进细胞凋亡，同时抑制胶质瘤细胞增殖[24]。抑制 Hippo 途径转录辅激活因子 YAP/TAZ 抑制胶质母细胞瘤生长[25]。miRNA-451 通过靶向 mTOR 途径抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭[26]。此外，我们发现 PI3K-Akt 通路受小鼠本中 miRNAs 的调控。据报道，胶质瘤的生长和侵袭受 PI3K/AKT 通路的调控[27]。

为了更好地了解 miRNAs 在星形细胞瘤中的作用，我们重点研究了 10 个表达差异最大的 miRNAs，研究表明其中 8 个 miRNA 都可能通过调节细胞增殖、凋亡、侵袭来促进星形细胞瘤的进展。高级别胶质瘤中的肿瘤细胞会释放出含有 miR-770-5p、miR-433 和 miR-212-5p 等 miRNA 的微泡[28][29][30]。miR-433 激活 MAPK 信号通路，通过靶向 Rap1a 抑制乳腺癌细胞生长[28]。在神经系统中，miR-433 在帕金森病中下调[29]。此外，miR-433-3p 通过靶向 CREB 抑制细胞生长[30]。在乳腺癌中，miR-770-5p 的过表达通过调节 AKT 和 ERK 抑制细胞侵袭和运动[31]。miR-770-5p 通过靶向糖尿病肾病中的 TRIAP1 调节足细胞凋亡[32]。在急性髓系白血病患者和细胞系中，miR-212-5p 通过靶向 FZD5 下调和调节细胞增殖和凋亡[33]。miR-212-5p 通过靶向 Ptgs2 [34] 提供抗铁致神经元死亡的保护。此外，miR-212-5p 通过靶向 TBX15 [35] 抑制肾透明细胞癌细胞。迄今为止，miR-770-5p 和 miR-212-5p 在星形细胞瘤中的作用尚未见报道。我们推测它们通过调节上述类似的靶点来促进星形细胞瘤的进展。

值得注意的是，miR-517c-3p 和 miR-431-3p 尚未被报道与胶质瘤相关。在本研究中，我们确定了这两个 miRNAs 的靶基因。另外通过生存分析发现，高水平的 NUPL2 表达与星形细胞瘤患者的不良预后相关。这项研究的另一个重要方面是 NUPL2 与不同的免疫浸润水平相关。NUPL2 在星形细胞瘤中的作用至今未见报道，但在泌尿系统肿瘤中，NUPL2 可能是膀胱癌患者准确预测预后的一个有希望的模型[36]。此外，通过公共数据库分析，我们观察了 NUPL2 与浸润性免疫细胞水平之间的相关性。确定 NUPL2 的特异性抑制如何影响肿瘤浸润性 T 细胞的功能和抗肿瘤活性是一个重要的研究领域。

5. 结论

据我们所知，这是首次对星形细胞瘤 miRNAs 数据库进行系统的生物信息学分析。我们的结果表明，失调的 miRNAs 与星形细胞瘤的临床变量相关，并参与星形细胞瘤细胞增殖、迁移和侵袭的调控。值得注意的是，靶基因 NUPL2，和 miR-431-3p 可能成为星形细胞瘤潜在的诊断生物标志物和治疗靶点。然而，要了解 miRNAs 在星形细胞瘤中的作用并阐明其分子机制还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Wang, W.D.A.R., Wang, M., Wang, T., Qi, L., Jiang, H., *et al.* (2013) Expression of Brain-Specific Angiogenesis Inhibitor 1 Is Inversely Correlated with Pathological Grade, Angiogenesis and Peritumoral Brain Edema in Human Astrocytomas. *Oncology Letters*, **5**, 1513-1518. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1250>
- [2] Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., *et al.* (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, **114**, 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- [3] Chandana, S.R., Movva, S., Arora, M. and Singh, T. (2008) Primary Brain Tumors in Adults. *American Family Physician*, **77**, 1423-1430.
- [4] Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D. and Wang, K. (2011) Extracellular microRNA: A New Source of Biomarkers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **717**, 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004>
- [5] Xu, J., Zhao, J., Evan, G., Xiao, C., Cheng, Y. and Xiao, J. (2012) Circulating microRNAs: Novel Biomarkers for Cardiovascular Diseases. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, **90**, 865-875. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0840-5>
- [6] Li, G., Morris-Blanco, K.C., Lopez, M.S., Yang, T., Zhao, H., Vemuganti, R., *et al.* (2018) Impact of microRNAs on Ischemic Stroke: From Pre- to Post-Disease. *Progress in Neurobiology*, **163-164**, 59-78. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.08.002>
- [7] Tan, J.R., Koo, Y.X., Kaur, P., Liu, F., Armugam, A., Wong, P.T., *et al.* (2011) microRNAs in Stroke Pathogenesis. *Current Molecular Medicine*, **11**, 76-92. <https://doi.org/10.2174/156652411794859232>
- [8] Lau, P., Bossers, K., Janky, R., Salta, E., Frigerio, C.S., Barbash, S., *et al.* (2013) Alteration of the microRNA Network during the Progression of Alzheimer's Disease. *EMBO Molecular Medicine*, **5**, 1613-1634. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201974>
- [9] Grasso, M., Piscopo, P., Confalonini, A. and Denti, M.A. (2014) Circulating miRNAs as Biomarkers for Neurodegenerative Disorders. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **19**, 6891-6910. <https://doi.org/10.3390/molecules19056891>
- [10] Stewart, L.A., Clarke, M., Rovers, M., Riley, R.D., Simmonds, M., Stewart, G., *et al.* (2015) Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses of Individual Participant Data: The PRISMA-IPD Statement. *JAMA*, **313**, 1657-1665. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3656>
- [11] Venkatesh, H.S., Tam, L.T., Woo, P.J., Lennon, J., Nagaraja, S., Gillespie, S.M., *et al.* (2017) Targeting Neuronal Activity-Regulated Neuroligin-3 Dependency in High-Grade Glioma. *Nature*, **549**, 533-537. <https://doi.org/10.1038/nature24014>
- [12] Zhang, B.L., Guo, T.W., Gao, L.L., Ji, G.Q., Gu, X.H., Shao, Y.Q., *et al.* (2017) Egr-1 and RNA POL II Facilitate Glioma Cell GDNF Transcription Induced by Histone Hyperacetylation in Promoter II. *Oncotarget*, **8**, 45105-45116. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15126>
- [13] Lv, D., Jia, F., Hou, Y., Sang, Y., Alvarez, A.A., Zhang, W., *et al.* (2017) Histone Acetyltransferase KAT6A Upregulates PI3K/AKT Signaling through TRIM24 Binding. *Cancer Research*, **77**, 6190-6201. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1388>
- [14] Bai, J., Xiao, L., Tao, Z., Cao, B., Han, Y., Fan, W., *et al.* (2018) Ectopic Expression of E3 Ubiquitin-Protein Ligase 2 in Glioma and Enhances Resistance to Apoptosis through Activating Nuclear Factor κ -Light-Chain-Enhancer of B Cells. *Oncology Letters*, **16**, 4391-4399. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9153>
- [15] Pan, S.J., Zhan, S.K., Ji, W.Z., Pan, Y.X., Liu, W., Li, D.Y., *et al.* (2015) Ubiquitin-Protein Ligase E3C Promotes Glioma Progression by Mediating the Ubiquitination and Degrading of Annexin A7. *Scientific Reports*, **5**, Article No. 11066. <https://doi.org/10.1038/srep11066>
- [16] Shi, Q., Song, X., Wang, J., Gu, J., Zhang, W., Hu, J., *et al.* (2015) FRK Inhibits Migration and Invasion of Human Glioma Cells by Promoting N-Cadherin/ β -Catenin Complex Formation. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, **55**, 32-41. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0355-y>
- [17] Yu, O.M., Benitez, J.A., Plouffe, S.W., Ryback, D., Klein, A., Smith, J., *et al.* (2018) YAP and MRTF-A, Transcriptional Co-Activators of RhoA-Mediated Gene Expression, Are Critical for Glioblastoma Tumorigenicity. *Oncogene*, **37**, 5492-5507. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0301-5>
- [18] González-Orozco, J.C., Hansberg-Pastor, V., Valadez-Cosmes, P., Nicolas-Ortega, W., Bastida-Beristain, Y., Fuente-Granada, M., *et al.* (2018) Activation of Membrane Progesterone Receptor-Alpha Increases Proliferation, Migration, and Invasion of Human Glioblastoma Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **477**, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.06.004>
- [19] Bao, D., Cheng, C., Lan, X., Xing, R., Chen, Z., Zhao, H., *et al.* (2017) Regulation of P53wt Glioma Cell Proliferation

- by Androgen Receptor-Mediated Inhibition of Small VCP/P97-Interacting Protein Expression. *Oncotarget*, **8**, 23142-23154. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15509>
- [20] Davis, F.B., Tang, H.Y., Shih, A., Keating, T., Lansing, L., Hercbergs, A., et al. (2006) Acting via a Cell Surface Receptor, Thyroid Hormone Is a Growth Factor for Glioma Cells. *Cancer Research*, **66**, 7270-7275. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4365>
- [21] Yang, J., Gan, X., Tan, B., Wang, J. and Chen, Y. (2019) Corticotropin-Releasing Factor Suppresses Glioma Progression by Upregulation of Long Non-Coding RNA-P21. *Life Sciences*, **216**, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.003>
- [22] Wade, A., Robinson, A.E., Engler, J.R., Petritsch, C., James, C.D. and Phillips, J.J. (2013) Proteoglycans and Their Roles in Brain Cancer. *The FEBS Journal*, **280**, 2399-2417. <https://doi.org/10.1111/febs.12109>
- [23] Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Tzanakakis, G.N. and Karamanos, N.K. (2010) Proteoglycans in Health and Disease: Novel Roles for Proteoglycans in Malignancy and Their Pharmacological Targeting. *The FEBS Journal*, **277**, 3904-3923. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x>
- [24] Wang, B.Q., Yang, B., Yang, H.C., Wang, J.Y., Hu, S., Gao, Y.S., et al. (2018) microRNA-499a Decelerates Glioma Cell Proliferation While Accelerating Apoptosis through the Suppression of Notch1 and the MAPK Signaling Pathway. *Brain Research Bulletin*, **142**, 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.06.005>
- [25] Liu, Z., Wei, Y., Zhang, L., Yee, P.P., Johnson, M., Zhang, X., et al. (2019) Induction of Store-Operated Calcium Entry (SOCE) Suppresses Glioblastoma Growth by Inhibiting the Hippo Pathway Transcriptional Coactivators YAP/TAZ. *Oncogene*, **38**, 120-139. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0425-7>
- [26] Nan, Y., Guo, H., Guo, L., Wang, L., Ren, B., Yu, K., et al. (2018) miRNA-451 Inhibits Glioma Cell Proliferation and Invasion through the MTOR/HIF-1 α /VEGF Signaling Pathway by Targeting CAB39. *Human Gene Therapy. Clinical Development*, **29**, 156-166. <https://doi.org/10.1089/humc.2018.133>
- [27] Liao, Y.X., Zhang, Z.P., Zhao, J. and Liu, J.P. (2018) Effects of Fibronectin 1 on Cell Proliferation, Senescence and Apoptosis of Human Glioma Cells through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, **48**, 1382-1396. <https://doi.org/10.1159/000492096>
- [28] Zhang, T., Jiang, K., Zhu, X., Zhao, G., Wu, H., Deng, G., et al. (2018) MiR-433 Inhibits Breast Cancer Cell Growth via the MAPK Signaling Pathway by Targeting Rap1a. *International Journal of Biological Sciences*, **14**, 622-632. <https://doi.org/10.7150/ijbs.24223>
- [29] Zhang, X., Yang, R., Hu, B.L., Lu, P., Zhou, L.L., He, Z.Y., et al. (2017) Reduced Circulating Levels of MiR-433 and MiR-133b Are Potential Biomarkers for Parkinson's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **11**, Article No. 170. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00170>
- [30] Sun, S., Wang, X., Xu, X., Di, H., Du, J., Xu, B., et al. (2017) MiR-433-3p Suppresses Cell Growth and Enhances Chemosensitivity by Targeting CREB in Human Glioma. *Oncotarget*, **8**, 5057-5068. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13789>
- [31] Noyan, S., Gurdal, H. and Gur Dedeoglu, B. (2019) Involvement of MiR-770-5p in Trastuzumab Response in HER2 Positive Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, **14**, E0215894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894>
- [32] Zhang, S.Z., Qiu, X.J., Dong, S.S., Zhou, L.N., Zhu, Y., Wang, M.D., et al. (2019) microRNA-770-5p Is Involved in the Development of Diabetic Nephropathy through Regulating Podocyte Apoptosis by Targeting TP53 Regulated Inhibitor of Apoptosis 1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **23**, 1248-1256.
- [33] Lin, J.F., Zeng, H. and Zhao, J.Q. (2018) MiR-212-5p Regulates the Proliferation and Apoptosis of AML Cells through Targeting FZD5. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **22**, 8415-8422.
- [34] Xiao, X., Jiang, Y., Liang, W., Wang, Y., Cao, S., Yan, H., et al. (2019) MiR-212-5p Attenuates Ferroptotic Neuronal Death after Traumatic Brain Injury by Targeting Ptgs2. *Molecular Brain*, **12**, 78. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0501-0>
- [35] Deng, J.H., Zheng, G.Y., Li, H.Z. and Ji, Z.G. (2019) MiR-212-5p Inhibits the Malignant Behavior of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Cells by Targeting TBX15. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **23**, 10699-10707.
- [36] Zhang, C., Gou, X., He, W.Y., Yang, H.A. and Yin, H.B. (2020) A Glycolysis-Based 4-mRNA Signature Correlates with the Prognosis and Cell Cycle Process in Patients with Bladder Cancer. *Cancer Cell International*, **20**, Article No. 177. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01255-2>
- [37] Liu, X., Kang, J., Sun, S., Luo, Y., Ji, X., Zeng, X., et al. (2018) IASPP, a microRNA-124 Target, Is Aberrantly Expressed in Astrocytoma and Regulates Malignant Glioma Cell Migration and Viability. *Molecular Medicine Reports*, **17**, 1970-1978. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8097>

- [38] Xu, J., Liu, Y., Guo, S., Ma, S., Xiao, L., Wei, N., et al. (2016) Expression Profile of MiR-128 in the Astrocytoma Patients and Cell Lines. *Molecular Neurobiology*, **53**, 4631-4637. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9401-1>
- [39] Bookland, M., Tang-Schomer, M., Gillan, E. and Kolmakova, A. (2018) Circulating Serum Oncologic miRNA in Pediatric Juvenile Pilocytic Astrocytoma Patients Predicts Mural Nodule Volume. *Acta Neurochirurgica*, **160**, 1571-1581. <https://doi.org/10.1007/s00701-018-3589-6>
- [40] Deshpande, R.P., Chandra Sekhar, Y.B.V.K., Panigrahi, M. and Babu, P.P. (2017) SIRP Alpha Protein Downregulates in Human Astrocytoma: Presumptive Involvement of Hsa-MiR-520d-5p and Hsa-MiR-520d-3p. *Molecular Neurobiology*, **54**, 8162-8169. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0302-8>
- [41] Zhi, F., Chen, X., Wang, S., Xia, X., Shi, Y., Guan, W., et al. (2010) The Use of Hsa-MiR-21, Hsa-MiR-181b and Hsa-MiR-106a as Prognostic Indicators of Astrocytoma. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, **46**, 1640-1649. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.003>
- [42] Zhi, F., Wang, Q., Deng, D., Shao, N., Wang, R., Xue, L., et al. (2014) MiR-181b-5p Downregulates NOVA1 to Suppress Proliferation, Migration and Invasion and Promote Apoptosis in Astrocytoma. *PLOS ONE*, **9**, e109124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109124>
- [43] Deng, D., Wang, L., Chen, Y., Li, B., Xue, L., Shao, N., et al. (2016) microRNA-124-3p Regulates Cell Proliferation, Invasion, Apoptosis, and Bioenergetics by Targeting PIM1 in Astrocytoma. *Cancer Science*, **107**, 899-907. <https://doi.org/10.1111/cas.12946>
- [44] Zhi, F., Shao, N., Wang, R., Deng, D., Xue, L., Wang, Q., et al. (2015) Identification of 9 Serum microRNAs as Potential Noninvasive Biomarkers of Human Astrocytoma. *Neuro-Oncology*, **17**, 383-391. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou169>
- [45] Huang, L., Li, X., Ye, H., Liu, Y., Liang, X., Yang, C., et al. (2020) Long Non-Coding RNA NCK1-AS1 Promotes the Tumorigenesis of Glioma through Sponging microRNA-138-2-3p and Activating the TRIM24/Wnt/β-Catenin Axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, **39**, 63. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01567-1>
- [46] Wu, H., Liu, H.Y., Liu, W.J., Shi, Y.L. and Bao, D. (2018) MiR-377-5p Inhibits Lung Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Cell Cycle Progression by Targeting AKT1 Signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120**, 8120-8128. <https://doi.org/10.1002/jcb.28091>
- [47] Li, C., Dong, Q., Che, X., Xu, L., Li, Z., Fan, Y., et al. (2018) microRNA-29b-2-5p Inhibits Cell Proliferation by Directly Targeting Cbl-B in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *BMC Cancer*, **18**, Article No. 681. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4526-z>
- [48] Jin, J., Zhou, S., Li, C., Xu, R., Zu, L., You, J., et al. (2014) MiR-517a-3p Accelerates Lung Cancer Cell Proliferation and Invasion through Inhibiting FOXJ3 Expression. *Life Sciences*, **108**, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.05.006>.

附 录

Table S1. Enrichment analysis of differentially expressed miRNAs in astrocytes and non-tumor controls by KEGG pathway (TOP15)

表 S1. KEGG 通路对星形细胞和非肿瘤对照差异表达 miRNAs 的富集分析(TOP15)

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	Count
hsa05205	Proteoglycans in cancer	179/5024	204/8018	4.49E-16	1.45E-13	7.81E-14	179
hsa04218	Cellular senescence	141/5024	160/8018	2.95E-13	4.76E-11	2.56E-11	141
hsa04010	MAPK signaling pathway	239/5024	295/8018	2.60E-12	2.79E-10	1.50E-10	239
hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	125/5024	142/8018	8.16E-12	6.59E-10	3.54E-10	125
hsa04390	Hippo signaling pathway	136/5024	157/8018	1.46E-11	8.60E-10	4.62E-10	136
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	75/5024	79/8018	1.60E-11	8.60E-10	4.62E-10	75
hsa05225	Hepatocellular carcinoma	144/5024	168/8018	2.11E-11	9.75E-10	5.24E-10	144
hsa05131	Shigellosis	194/5024	236/8018	2.58E-11	1.04E-09	5.60E-10	194
hsa05166	Human T-cell leukemia virus 1 infection	181/5024	219/8018	4.89E-11	1.76E-09	9.44E-10	181
hsa05220	Chronic myeloid leukemia	72/5024	76/8018	5.65E-11	1.82E-09	9.81E-10	72
hsa05211	Renal cell carcinoma	66/5024	69/8018	1.02E-10	2.88E-09	1.55E-09	66
hsa04150	mTOR signaling pathway	133/5024	155/8018	1.07E-10	2.88E-09	1.55E-09	133
hsa04110	Cell cycle	109/5024	124/8018	2.25E-10	5.58E-09	3.00E-09	109
hsa04120	Ubiquitin mediated proteolysis	118/5024	136/8018	2.68E-10	6.18E-09	3.32E-09	118
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	90/5024	100/8018	4.87E-10	1.00E-08	5.38E-09	90

Table S2. Enrichment analysis of miRNAs differentially expressed by KEGG pathway in mouse tumor and mouse control (TOP15)**表 S2.** KEGG 通路对小鼠肿瘤和小鼠对照差异表达 miRNAs 的富集分析(TOP15)

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	Count
mmu05168	Herpes simplex virus 1 infection	72/764	437/8743	6.65E-08	2.06E-05	1.36E-05	72
mmu05161	Hepatitis B	35/764	162/8743	3.49E-07	5.41E-05	3.56E-05	35
mmu05215	Prostate cancer	24/764	99/8743	2.95E-06	0.000305	0.000201	24
mmu04371	Apelin signaling pathway	29/764	137/8743	5.41E-06	0.000408	0.000269	29
mmu04211	Longevity regulating pathway	22/764	90/8743	6.58E-06	0.000408	0.000269	22
mmu04151	PI3K-Akt signaling pathway	56/764	355/8743	8.08E-06	0.000417	0.000275	56
mmu04068	FoxO signaling pathway	27/764	131/8743	1.90E-05	0.000788	0.000519	27
mmu04931	Insulin resistance	24/764	110/8743	2.03E-05	0.000788	0.000519	24
mmu04152	AMPK signaling pathway	26/764	126/8743	2.64E-05	0.000908	0.000598	26
mmu04380	Osteoclast differentiation	26/764	128/8743	3.51E-05	0.00109	0.000718	26
mmu05145	Toxoplasmosis	23/764	108/8743	4.52E-05	0.00128	0.00084	23
mmu04150	mTOR signaling pathway	29/764	156/8743	7.09E-05	0.00183	0.00121	29
mmu04620	Toll-like receptor signaling pathway	21/764	99/8743	0.000102	0.00243	0.0016	21
mmu05210	Colorectal cancer	19/764	88/8743	0.000169	0.00348	0.00229	19
mmu05235	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	19/764	88/8743	0.000169	0.00348	0.00229	19