

论著·基础研究

基于基因芯片的前列腺癌生物信息学分析^{*}漆 敏,徐 斌[△]

(重庆市急救医疗中心/重庆大学附属中心医院核医学科,重庆 400014)

摘要:目的 利用生物信息学方法分析前列腺癌(PCa)患者与健康男性血清差异表达基因。方法 将该院收治的PCa病例组和对照组血清进行微小核糖核酸(miRNA)和表达谱芯片检测,每组做3个独立生物学重复。对差异表达的基因进行生物信息学分析,并构建miRNA-mRNA互相作用调控网络图。采用Western blot及qRT-PCR方法检测锌指蛋白转录因子编码基因多形性肿瘤基因2(PLAGL2)、miR-135b-3p表达水平。结果 与对照组相比,病例组有11个miRNA、825个mRNA的表达发生显著变化。KEGG富集的通路有Hippo信号通路、氨基酸生物合成通路等。与对照组相比,病例组PLAGL2水平降低,miR-135b-3p水平升高($P < 0.05$)。PCa血清中PLAGL2表达与PCa患者初诊血清前列腺特异性抗原(PSA)、肿瘤临床分级、Gleason评分显著相关($P < 0.05$)。结论 miR-135b-3p靶向PLAGL2调控Hippo信号通路可能是导致PCa发生、发展的重要原因之一。

关键词:前列腺癌; 微小核糖核酸; 基因芯片; 生物信息学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.007 **中图法分类号:**R737.25

文章编号:1673-4130(2018)16-1958-05

文献标识码:A

Microarray-based bioinformatics analysis in the prostate cancer^{*}QI Min, XU Bin[△]

(Department of Nuclear Medicine, Chongqing Emergency Medical Center/
Chongqing University Central Hospital, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective Bioinformatics method was conducted to analyze the differential expression genes in serum of prostate cancer (PCa) patients and healthy males. **Methods** The serum of PCa patient group and control group in the hospital were detected by microRNA microarray and gene expression profiles microarray, and 3 repetitions was performed for each group. The differentially expressed genes were analyzed by bioinformatics tools, and the miRNA-mRNA interaction network was constructed. The expression level of PLAGL2 and miR-135b-3p were detected by western blot and qRT-PCR. **Results** Compared with control group, 11 miRNA and 825 mRNA have significantly changed in the patient group. KEGG enrichment pathway included Hippo signaling pathway, Biosynthesis of amino acids, and so on. Compared with the control group, the level of PLAGL2 in the case group was significantly decreased, while the level of miR-135b-3p was markedly increased ($P < 0.05$). The PLAGL2 expression in serum of PCa was significantly correlated with initial PSA, tumor clinical grade and Gleason scores ($P < 0.05$). **Conclusion** The regulation of Hippo signaling pathway by miR-135b-3p targeting PLAGL2 may be one of the important reasons for the occurrence and development of PCa.

Key words: prostate cancer; miRNA; microarray; bioinformatics

前列腺癌(PCa)是常见的男性恶性肿瘤之一,多发于55岁以上的老年男性。近年来我国PCa发病率居男性泌尿生殖系恶性肿瘤第二位,且呈逐年上升趋势^[1]。PCa易出现短时间转移导致死亡,且预后差、易复发^[2]。因此,发现一种特异性的肿瘤生物标志物,对PCa的早期发现,评估PCa转移及进展具有重要意义。微小核糖核酸(miRNA)是非编码小分子单

链RNA,在调控基因的表达中发挥重要作用^[3]。研究发现,miRNA的改变与许多肿瘤及病理过程有关,故其常作为一种理想的生物学标志物用以肿瘤诊断、预后评价,也可能成为潜在的治疗靶点^[4]。miRNA通过作用于基因转录出的信使RNA(mRNA)来调节目的基因的表达,引起mRNA降解或抑制其翻译过程,从而影响PCa的发生和发展^[5]。本文通过对PCa

* 基金项目:重庆市渝中区科技计划项目(20130126)。

作者简介:漆敏,女,主管检验师,主要从事人群肿瘤学研究。 △ 通信作者,E-mail:536512319@qq.com。

本文引用格式:漆敏,徐斌.基于基因芯片的前列腺癌生物信息学分析[J].国际检验医学杂志,2018,39(16):1958-1962.

患者血清进行 miRNA 和 mRNA 基因芯片检测,研究 miRNA 和 mRNA 的相互作用关系,寻找 PCa 的生物标志物并揭示其可能的作用机制,为进一步深入研究相应基因的生物学功能奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2016 年收治的 48 例前列腺疾病患者为病例组,患者年龄 56~74 岁,平均年龄 65 岁,患者经直肠指检、术前血清前列腺特异性抗原(PSA)及组织病理诊断确诊为 PCa。病例组 PCa 患者无肿瘤既往史,心肺功能和肝肾功能正常,排除已行手术或药物去势、化疗或放射治疗者。选取同时期该院体检中心相同年龄段的 26 例男性健康体检者为对照组。两组研究对象外周血样本均于清晨空腹采集。统计 PCa 患者初诊血清 PSA、肿瘤临床分期及 Gleason 评分等临床参数。

1.2 主要试剂 逆转录试剂盒及 Real-time PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,Taqman MicroRNA Assays 购自美国 Applied Biosystems 公司,PLAGL2、 β -actin 抗体购自美国 Abcam 公司,BCA 试剂盒及山羊抗兔 IgG 二抗购于碧云天公司,引物由上海生工合成。miRNA 芯片 RiboArrayTM miDETECTTM Human Array、基因表达谱芯片 RiboArrayTM genDETECTTM Human Array 由广州锐博生物有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 miRNA 与基因表达谱芯片检测 按 RNA 试剂盒说明提取 3 例病例组和 3 例对照组血清总 RNA,随后采用聚乙二醇方法分离 miRNA,用 T4 RNA 连接酶标记法对 miRNA 进行荧光标记,无水乙醇沉淀吹干后用于芯片杂交。杂交的芯片经洗涤后用 LUxScan10K-A 双通道激光扫描仪进行扫描。基因芯片检测是将 RNA 合成 cDNA 后用生物素标记

cDNA,将 cDNA 样品片段化和芯片杂交,随后用 Agilent 扫描仪扫描,利用 Agilent GeneSpring GX11.5r 软件对芯片原始数据归一化处理。每个实验组做 3 个独立的生物学重复。

1.3.2 miRNA 靶基因预测与 miRNA-mRNA 相互作用 对上述步骤筛选的差异表达的 miRNAs 采用 Ingenuity Pathways Analysis (IPA) 对 miRNA 的靶基因进行预测。保留与数据库预测靶基因一致的 mRNA 差异表达基因,将所筛选的相同基因进行后续分析。由于 miRNA 和 mRNA 之间的负向调控关系,选择 miRNA 和 mRNA 表达值呈负相关的调控分析其相互作用关系,将筛选基因使用 Cytoscape 分析编辑软件,绘制 miRNA-mRNA 互相作用关系调控网络图。

1.3.3 生物信息学分析 将对照组与病例组男性血清差异表达的 mRNA 通过 DAVID 数据库(the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)对差异基因进行 KEGG 通路富集分析,结果以基因列表中富集的 Terms 为对象,将信息按照计算出来的 P 值排列。

1.3.4 qRT-PCR 检测 PLAGL2、miR-135b-3p 表达水平 总 RNA 按逆转录试剂盒说明操作进行,逆转录反应合成 cDNA。取 cDNA 产物进行荧光定量 PCR,扩增条件 95 °C 3 min,95 °C 5 s,退火温度 50 °C 30 s,共 40 个循环,以 β -actin 作为内参基因。PLAGL2 及 β -actin 引物序列见表 1。逆转录反应合成 cDNA (miRNA+RT 引物),以 miR-135b-3p 和 U6 荧光探针作引物扩增,扩增条件为 90 °C 45 s,95 °C 15 s,60 °C 15 s,45 个循环,以 U6 作为内参基因实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,独立实验重复 3 次。miR-135b-3p 及 U6 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'~3')
PLAGL2(F)	GAT GTA CGG CGG CAC CTA GT
PLAGL2(R)	CTG CGA GTG GCT CTT CTT GA
miR-135b-3p(F)	GTC TCG AGC AGT GCA GGG TCC GAG G
miR-135b-3p(R)	TAA AGC TTC TGG ATA CGA CCA CAT A
β -actin(F)	ACC AAC TGG GAC GAT ATG GAG AAG A
β -actin(R)	ACG ACC AGA GGC ATA CAG GGA CAA
U6(F)	ATT GGA ACG ATA CAG AGA AGA TT
U6(R)	GGA ACG CTT CAC GAA TTT G

1.3.5 Western blot 提取对照组和病例组血清总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后再与 PLAGL2 抗体(1:1 000)、 β -actin 抗体

(1:500)4 °C 孵育过夜。经 TBST 洗涤后用山羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000)室温孵育 2 h,洗膜后采用 ECL 发光试剂盒发光、显影,使用凝胶图像分析系统采集图像,图像采集后使用 Image J 软件处理系统分

析目标条带的光密度值。

1.4 统计学处理 采用 Significance Analysis of Microarrays (SAM, Version2.1) 挑选差异表达的 miRNA 和 mRNA, 设定差异表达倍数变化 > 1.5 或 <-1.5 , $P < 0.05$ 。采用 SPSS16.0 软件进行统计分析; 组间比较采用 t 检验; PLAGL2 表达与临床因素的相关性采用 χ^2 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miRNA 芯片检测结果 与对照组相比, 病例组有 11 个 miRNA 的表达发生显著变化, 其中 4 个 miRNA 上调 (miR-210-3p, miR-203a-5p, miR-30-5p, miR-135b-3p); 7 个 miRNA 下调 (miR-4417, miR-3656, miR-7-5p, miR-663a, miR-33b-3p, miR-375, miR-141-3p), 见图 1。

2.2 差异基因的 KEGG 分析 基因表达谱芯片检测结果显示, 与对照组相比, 病例组有 825 个 mRNA 的表达发生显著变化, 其中 498 个 mRNA 表达增加, 327 个 mRNA 表达下降。如表 2 所示, 对照组和病例组差异基因 KEGG 分析富集的相关通路有: Hippo 信

号通路、氨基酸生物合成通路、PCa 通路、癌症中的蛋白多糖、趋化因子信号通路、调控干细胞多能性的信号通路、核苷酸切除修复等。

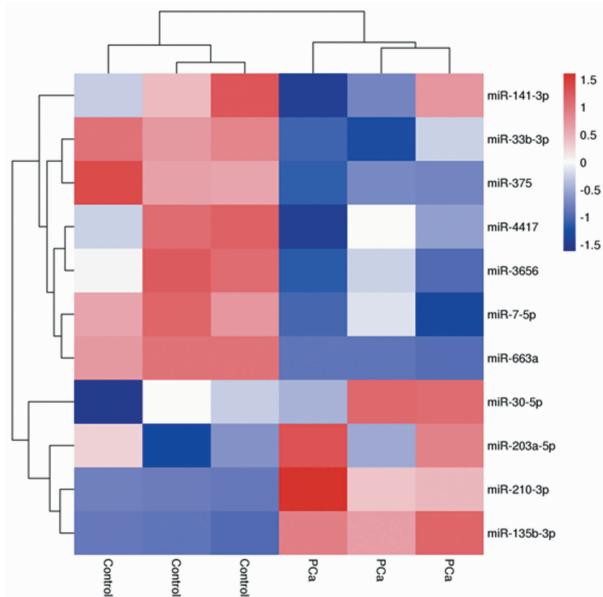


图 1 对照组和病例组差异表达 miRNA 热图

表 2 对照组与病例组差异基因 KEGG 通路富集分析

通路	总基因改变基因 (n)	P	富集倍数		基因
			改变基因 (n)	富集倍数	
Hippo 信号通路	151	8	0.012	3.535	PARD6A、DVL2、ITGB2、FZD2、SNAI2、LLGL2、PLAGL2 等
氨基酸生物合成通路	74	5	0.027	3.175	GLUL、RPE、ACO ₂ 、PRPS1L1、GAPDH
PCa 通路	65	4	0.032	2.725	PDPK1、KRAS、BRAF、CDK2
癌症中的蛋白多糖	200	12	0.038	2.876	EIF4B、PDPK1 KRAS、BRAF、ANK2、ERBB4、TIAM1、ANK3 等
趋化因子信号通路	186	13	0.042	1.932	CCL24、KRAS、BRAF、ADCY7、CCR5、ADCY9 等
调控干细胞多能性的信号通路	160	6	0.046	1.653	DVL2、KRAS、FGFR3、FZD2、WNT2B、DVL1
核苷酸切除修复	47	3	0.048	1.548	RFC2、POLD1、ERCC1

2.3 miRNA-mRNA 相互作用关系 将筛选出的 825 个差异表达的 mRNA 及 11 个 miRNA, 通过使用 IPA 对 miRNA 的靶基因进行预测, 构建出 miRNA-mRNA 相互作用网络, 见图 2。结合表 1 KEGG 富集结果, miR-30-5p 表达升高, 其调控的 KRAS 基因表达下降从而影响 PCa 通路; miR-7-5p 表达降低, 其调控的 ADCY9 基因表达下降从而影响趋化因子信号通路, 根据 KEGG 的富集程度和相关文献得到 PLAGL2 基因是与 PCa 有密切关联的重要基因。PLAGL2 基因表达下调, 靶向 PLAGL2 基因的 miR-135b-3p 表达上调, 调控 Hippo 信号通路。

2.4 PLAGL2、miR-135b-3p 表达情况 qRT-PCR 和 Western bolt 结果见图 3, 与对照组相比, 病例组血清中 PLAGL2 mRNA 和蛋白水平显著降低, miR-135b-3p 水平显著增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。该结果与芯片检测结果一致。

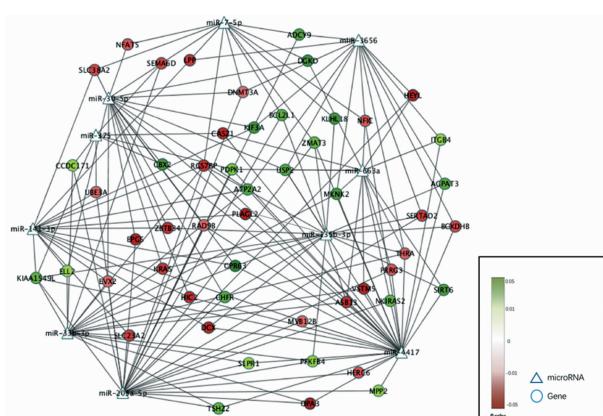
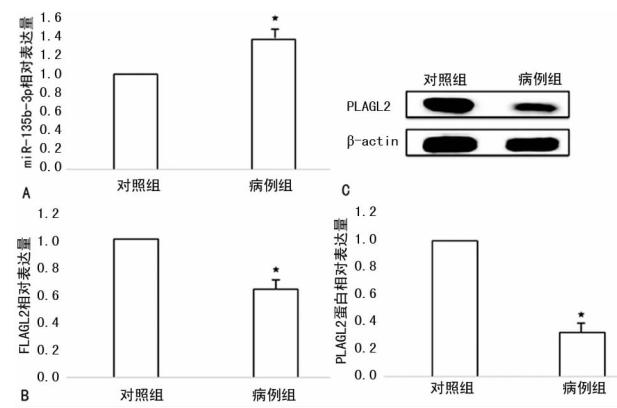


图 2 差异表达的 miRNA 和 mRNA 相互作用图

2.5 PCa 血清 PLAGL2 表达与临床参数相关性分析

PCa 血清中 PLAGL2 表达水平与 PCa 患者的年龄无显著相关性 ($P > 0.05$), 与患者初诊血清 PSA、肿瘤临床分级、Gleason 评分显著相关 ($P < 0.05$), 见

表 3。



注: A 表示 miR-135b-3p mRNA 水平; B 表示 PLAGL2 mRNA 水平; C 表示 PLAGL2 蛋白表达及相对表达结果; 与对照组比较, * $P < 0.05$

图 3 对照组和病例组 miR-135b-3p、PLAGL2 表达情况 (n=48)

表 3 PCa 血清 PLAGL2 表达与临床参数关系 [n(%)]

临床特征	n	PLAGL2 表达		χ^2	P
		升高	降低		
年龄					
<70 岁	22	7(31.8)	15(68.2)	0.229	0.63
≥70 岁	26	10(38.5)	16(61.5)		
PSA					
<4 ng/mL	2	0	2(100)		
4~10 ng/mL	17	4(23.5)	13(76.5)	9.49	0.008
>10 ng/mL	29	19(65.5)	10(34.5)		
肿瘤临床分级					
T2	7	2(28.6)	5(71.4)		
T3	22	3(13.6)	19(86.4)	9.07	0.011
T4	19	11(57.9)	8(42.1)		
Gleason 评分					
≤6 分	13	3(23.1)	10(76.9)		
7 分	24	10(41.7)	14(58.3)	8.61	0.013
≥8 分	11	9(81.81)	2(18.2)		

3 讨 论

PCa 作为男性最常见的恶性肿瘤之一, 是多环节多因素的遗传疾病。结果显示, miRNA 与 mRNA 结合, 在转录后水平调节基因的表达水平, 对一些非编码和编码基因的表达失常或结构改变有重要意义, 对 PCa 的发生起关键性作用^[5]。

本文通过对 PCa 患者和健康男性血清进行 mRNA 芯片检测, 得到 11 个差异表达的 miRNA 和 825 个 mRNA。对差异 mRNA 进行 KEGG 富集分析, 发现富集程度最高的通路是 Hippo 信号通路和氨基酸生物合成通路。Hippo 信号通路可通过转录共激活因子, 调节细胞的生长、存活、增殖, 在机体组织稳态调节中起到重要作用, 该通路的异常调节易使细胞增殖失控, 导致癌症的发生^[6-7]。癌细胞中消耗最多的

营养物质是谷氨酰胺和丝氨酸, 氨基酸生物合成通路异常会合成大量氨基酸为癌细胞的分裂与存活提供能量和营养物质^[8], 提示 Hippo 信号通路、氨基酸生物合成通路可能是 PCa 发生、发展的潜在分子机制之一。

miRNA 可通过调节靶基因的表达对肿瘤的发展过程进行调控, 并为其提供早期发现、预防、诊断和治疗的新策略, 同时在细胞分化、生长和凋亡等基本过程中发挥重要作用^[9-10]。miRNA 在癌症中的异常表达或突变表明它们有可能作为一类新的癌基因或抑癌基因^[11]。根据 miRNA-mRNA 相互作用情况及差异基因差异表达倍数, KEGG 富集程度, 结合现有文献, 得到了分别与调控 PCa、趋化因子信号通路和 Hippo 信号通路有关的 KRAS、ADCY9、PLAGL2 基因。

研究者发现 KRAS 是诱导恶性表型的 PCa 的重要基因^[12]。相关研究也表明, KRAS 外显子突变是 PCa 中最常见的突变, 并且可作为 PCa 早期诊断标志物^[13]。因此, miR-30-5p 靶向调控 KRAS 可能在 PCa 的早期诊断和后期发展中有重要意义。最新研究发现, 炎症是发展 PCa 及其转移进展的主要危险因素, 感染因子、慢性炎性反应等致病的危险因素, 主要由许多促炎大分子如趋化因子及其受体控制有关^[14]。OTTLEY 等^[15]发现, 使用 PCa 抑制剂治疗改变 PCa 细胞中的 9 种 miRNA, 其中 miR-7-5p 表达显著降低。因此, 推测 miR-7-5p 靶向 ADCY9 基因的过表达可能会通过调控趋化因子信号通路导致 PCa 的发生。

WANG 等^[16]发现 miR-135b-3p 在乳腺癌患者中表达增加, 提示其可作为乳腺癌诊断的生物标志物; 乐珍等^[17]发现 miR-135b 可通过调控靶基因 FOXO1 从而促进子宫内膜癌的增殖; AAKULA 等^[18]指出 miR-135b-3p 可在 3'-UTR 区域通过调节雌激素受体 α 、雄激素受体及缺氧诱导因子 1 α 的相互作用促进乳腺癌和 PCa 细胞的增殖。结合本实验研究结果, 笔者认为 miR-135b-3p 可在 PCa 发生、发展中有重要作用。

本研究发现 PCa 血清中 PLAGL2 表达与患者初诊血清 PSA、肿瘤临床分级、Gleason 评分有相关性。PLAGL2 基因是肿瘤抑制因子, 可诱导细胞周期的终止和凋亡^[19]。以往研究表明, 该基因参与各种癌症的进展, 包括肺癌^[20]、直肠癌^[21]、恶性胶质瘤^[22]等。同时, PLAGL2 可抑制人骨髓单核 U937 细胞的增殖, 通过 P73 通路激活 P73 靶基因促进肿瘤的发生、发展^[23]。虽然 PLAGL2 基因已被证明在不同组织中都有致癌性, 但还没有研究报道该基因在 PCa 中的表达和确切作用。

4 结 论

本文通过对 PCa 患者与健康男性血清进行基因芯片检测, 将得出的差异基因进行生物信息学分析,

以 miRNA-mRNA 的相互作用网络为切入点,结合相关文献,笔者推测 miR-135b-3p 靶向 PLAGL2 调控 Hippo 信号通路可能是导致 PCa 发生、发展的重要原因之一,然而其中的具体机制仍待进一步研究。

参考文献

- [1] 韩苏军,张思维,陈万青,等.中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J].临床肿瘤学杂志,2013,18(4):330-334.
- [2] RASTOGI A, ALI A, TAN S H, et al. Autoantibodies against oncogenic ERG protein in prostate cancer: potential use in diagnosis and prognosis in a panel with C-MYC, AMACR and HERV-K Gag [J]. *Genes Cancer*, 2016, 7(11/12):394-413.
- [3] SARAIVA C, FERREIRA L, BERNARDINO L. Traceable microRNA-124 loaded nanoparticles as a new promising therapeutic tool for Parkinson's disease [J]. *Neurogenesis*, 2016, 3(1):1256-1285.
- [4] BARCISZEWSKA A M. MicroRNAs as efficient biomarkers in high-grade gliomas [J]. *Folia Neuropathol*, 2016, 54(4):369-374.
- [5] LEE M, LEE H. DMirNet: Inferring direct microRNA-mRNA association networks [J]. *BMC Syst Biol*, 2016, 10(5):125-145.
- [6] MO J S, PARK H W, GUAN K L. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer[J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(6):642-656.
- [7] XIE S, CHEN L, ZHANG X, et al. An integrated analysis revealed different microRNA-mRNA profiles during skeletal muscle development between Landrace and Lantang pigs [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2516-2527.
- [8] KRISHNAMURTHY R V, SURYAWANSHI Y R, ESSANI K. Nitrogen isotopes provide clues to amino acid metabolism in human colorectal cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2562-2574.
- [9] POGRIBNY I P. MicroRNAs as biomarkers for clinical studies [J]. *Exp Biol Med*, 2017, 36(6):747-752.
- [10] BARBATO S, SOLAINI G, FABBRI M. MicroRNAs in Oncogenesis and Tumor Suppression. [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017, 33(3):229-268.
- [11] CHRIS Z, YUN C, JIA F, et al. miR-634 exhibits anti-tumor activities toward hepatocellular carcinoma via Rab1A and DHX33[J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(10):1532-1541.
- [12] FU M, ZHANG W, SHAN L, et al. Mutation status of somatic EGFR and KRAS genes in Chinese patients with prostate cancer (PCa)[J]. *Virchows Arch*, 2014, 464(5): 575-581.
- [13] SALMANINEJAD A, SADEGHI N, GHADAMI S, et al. Alterations of KRAS Exon 2 Codon 12/13 Mutation Status in Prostatic Adenocarcinoma; Bioinformatics Aspects [J]. *MedPub J*, 2016, 75(2):1-8.
- [14] SINGH R K, SUDHAKAR A, LOKESHWAR B L. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Prostate Cancer Development and Progression[J]. *J Cancer Sci Ther*, 2010, 2(4):89-94.
- [15] OTTLEY E C, NICHOLSON H D, GOLD E J. Activin A regulates microRNAs and gene expression in LNCaP cells [J]. *Prostate*, 2016, 76(11):951-953.
- [16] WANG L, ZHU M J, REN A M, et al. A Ten-MicroRNA Signature Identified from a Genome-Wide MicroRNA Expression Profiling in Human Epithelial Ovarian Cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):964-972.
- [17] 乐珍,沈君菁,黄启涛,等. miR-135b 通过靶向 FOXO1 促进子宫内膜癌细胞的增殖[J]. 南方医科大学学报,2016, 36(5):675-680.
- [18] AAKULA A, LEIVONEN S K, HINTSANEN P, et al. MicroRNA-135b regulates ERalpha, AR and HIF1AN and affects breast and prostate cancer cell growth [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(7):1287-1300.
- [19] LANDRETTE S F, KUO Y H, HENSEN K, et al. Plagl1 and Plagl2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11 [J]. *Blood*, 2017, 105(7):2900-2907.
- [20] YANG Y S, YANG M C, WEISSLER J C, et al. Pleiomorphic adenoma gene-like 2 expression is associated with the development of lung adenocarcinoma and emphysema[J]. *Lung Cancer*, 2011, 74(1):12-24.
- [21] YONG P, PENG T, ZHI Z, et al. Pleiomorphic adenoma gene like-2 induces epithelial-mesenchymal transition via Wnt/β-catenin signaling pathway in human colorectal adenocarcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(4):1961-1970.
- [22] ZHENG H, YING H, WIEDEMAYER R, et al. PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas [J]. *Cancer cell*, 2010, 17(5):497-509.
- [23] HANKS T S, GAUSS K A. PLAGL1, Pleiomorphic adenoma gene-like 2 regulates expression of the p53 family member, p73, and induces cell cycle block and apoptosis in human promonocytic U937 cells[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(3):236-247.

(收稿日期:2017-12-20 修回日期:2018-03-16)