

肿瘤内分泌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002354

靶向 EGR1 对泌乳素瘤的潜在治疗作用

韩 丹, 刚晓坤, 赫广玉, 邱 月, 喻 露, 王桂侠

(吉林大学第一医院内分泌代谢科、吉林大学第一医院转化研究院肿瘤中心研究室, 长春 130021)

【摘要】目的:从基因分子水平出发,探究泌乳素瘤(prolactinoma,PRL)患者差异表达基因,从而探究疾病发展的核心驱动基因。旨在为泌乳素瘤患者的临床诊断、治疗及预后提供潜在的靶标。同时针对核心驱动基因,预测治疗泌乳素瘤患者的分子靶向药物。**方法:**从 GEO(gene expression omnibus)数据库获取泌乳素瘤患者基因表达谱数据,进行泌乳素瘤组织和正常组织差异表达基因(differential expressed genes,DEG)筛选。同时进行加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis,WGCNA)、蛋白质相互作用网络分析(protein-protein interaction,PPI),确定泌乳素瘤发生发展的核心驱动基因。同时进行 GO(gene ontology)分析、KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)分析及 GSEA(gene set enrichment analysis)分析,探究泌乳素瘤患者发生改变的生物功能和信号通路,探究肿瘤发生发展的分子机制。此外,进行体外划痕实验、克隆形成测定、CCK-8 实验及流式细胞术实验,验证分子靶向药物的潜在治疗效果。**结果:**共鉴定出 1 201 个差异表达基因,其中 EGR1、MAPK1、MYC、BCL2 和 CALM1 居于重要地位;GO 和 KEGG 分析结果表明,泌乳素瘤的形成主要与纺锤极发生改变、卵母细胞减数分裂受到影响相关;泌乳素瘤很可能与帕金森病存在一定的同源性。同时进行 CCK-8 测定、克隆形成测定和体外划痕测定,验证了 EGR1 激动剂 Genipin 具有潜在抗泌乳素瘤的作用。流式细胞术分析结果显示,随着 Genipin 药物剂量增加,肿瘤细胞的凋亡百分比增加。**结论:**EGR1、MAPK1、MYC、BCL2 和 CALM1 是泌乳素瘤的核心驱动基因,对泌乳素瘤的发生发展具有重要影响。EGR1 的激动剂 Genipin 能够在体外抑制泌乳素瘤细胞的增殖和迁移,Genipin 对泌乳素瘤具有潜在治疗作用。同时,本研究筛选出了泌乳素瘤发生的高风险信号通路,为其临床诊治提供了新的靶标,具有重要意义。

【关键词】泌乳素瘤;差异表达基因;加权基因共表达网络分析;生物信息学;基因靶向治疗

【中图分类号】R739141

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-10-22

Targeting EGR1 showed potential therapeutic effects on prolactinoma

Han Dan, Gang Xiaokun, He Guangyu, Qiu Yue, Yu Lu, Wang Guixia

(Department of Endocrinology and Metabolism, The First Hospital of Jilin University/ Laboratory of Cancer Center, Institute of Transformation, The First Hospital of Jilin University)

【Abstract】Objective: To explore the differentially expressed genes in patients with prolactinoma(PRL) from the molecular level of genes, for studying the core driving gene of disease development; to provide potential targets for clinical diagnosis, treatment and prognosis in patients with RPL and predict molecular targeted drugs for treating patients with RPL by focusing on core driving genes.

Methods: Gene expression profile data of PRL patients were obtained from the gene expression omnibus(GEO) database, and the differentially expressed genes(DEG) of PRL tissues and normal tissues were screened. At the same time, weighted gene co-expression network analysis(WGCNA) and protein-interaction analysis(PPI) were used to determine the core driver genes of PRL development. At the same time, gene ontology(GO) analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) analysis and gene set enrichment analysis(GSEA) were conducted to explore the altered biological functions and signaling pathways in PRL patients, and to explore the molecular mechanism of tumor development. In addition, *in vitro* wound-healing test, clone formation assays, CCK-8 assays and flow cytometry experiments were performed to validate potential therapeutic effects of molecular-targeted drugs. **Results:** A total of 1 201 differentially expressed genes were identified, of which EGR1, MAPK1, MYC, BCL2 and CALM1 were important. The results of GO and KEGG analysis indicated that the formation of PRL was mainly related with changes of spindle pole and influenced oocyte meiosis. PRL was likely to have some homology with Parkinson's disease. Simultaneously, CCK-8 assay, clone formation assay and *in vitro* wound-healing test confirmed that EGR1 agonist of Genipin had potential effect on anti-prolactinoma. Results of flow cytometry

作者介绍: 韩 丹, Email: handan_jdyy@126.com,

研究方向: 内分泌与代谢病基础与临床研究。

通信作者: 王桂侠, Email: wgx_jdyy@126.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20191125.1325.006.html>

(2019-11-26)

analysis showed that the apoptosis percentage of tumor cells was increased as the dose of Genipin increased. **Conclusion:** EGR1, MAPK1, MYC, BCL2 and CALM1 are core driving genes of PRL, which have important impacts on the PRL development. Genipin, an agonist of EGR1, inhibiting the proliferation and

migration of PRL cells *in vitro*, shows a potential therapeutic effect on PRL. At the same time, this study screened a high-risk signaling pathway for the PRL development, providing a new target for clinical diagnosis and treatment, with great significance.

【Key words】prolactinoma; differentially expressed genes; weighted gene co-expression network analysis; bioinformatics; gene targeted therapy

泌乳素瘤源自垂体腺前部的激素分泌上皮细胞,是最常见的中枢神经系统功能性垂体瘤之一。泌乳素瘤分为 ACTH 分泌型垂体腺瘤、分泌生长激素的垂体腺瘤和催乳素瘤。根据 2016 年 WHO 的肿瘤分类,催乳素瘤属于 I/II 级,被认为是良性肿瘤^[1-3]。泌乳素瘤的 MRI 影像诊断可以清楚地显示催乳素瘤的大小、形状和位置,以及它与周围结构的关系。药物治疗是这类良性肿瘤治疗的首选,而手术治疗、基因治疗和分子治疗等被用作辅助治疗手段。多巴胺激动剂是催乳素瘤的最佳治疗药物,可以减少催乳素的分泌,但治疗效果有限;选择性切除泌乳素瘤是常见的手术治疗方法,但容易导致垂体后叶分泌不足,临床上泌乳素瘤患者的预后情况并不令人满意。据报道,分子靶向药物能够有效辅助泌乳素型患者的治疗,截至目前,被报道出有明确治疗效果的小分子药物还比较少,仍需进一步研究^[4-6]。使用生物信息学手段,综合运用生物学、计算机科学和信息技术分析泌乳素瘤患者基因表达谱芯片数据,筛选分子治疗靶标,进而开发泌乳素瘤的新型药物治疗策略,同时从分子水平上进一步理解泌乳素瘤的成瘤机制,具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料

基因表达谱数据 GEO (gene expression omnibus) 数据库下载基因表达谱数据集 GSE2175、GSE26966 及 GSE36314, 共计 13 个正常垂体样本和 19 个泌乳素瘤样本数据。其中 GSE2175 含有 1 个正常垂体样本和 1 个泌乳素瘤样本; GSE26966 含有 9 个正常垂体样本和 14 个泌乳素瘤样本; GSE36314 含有 3 个正常垂体样本和 4 个泌乳素瘤样本。

1.2 实验方法

1.2.1 DEG 的鉴定 使用 GeneSpring 软件 (版本 11.5, Agilent, USA), 应用分层聚类分析和主成分分析 (PCA) 来确定 GeneSpring 中的探针质量控制。使用“通过表达式过滤探针组”选项过滤掉强度值低于 20 百分位数的探针。使用经典 *t* 检验来识别变化 >2 倍的 DEGs, 检验水准 $\alpha=0.01$ 。之后使用维恩图分析, 鉴定了 3 个基因表达谱数据集中、泌乳素瘤样品和正常样品之间共同的差异表达基因。

1.2.2 加权基因共表达网络分析 加权基因共表达网络分

析 (WGCNA) 从基因表达谱数据出发, 将 GSE26966 数据集中前 5 000 个变化最大、最重要和疾病高度关联的 DEGs 依据无尺度网络分析, 进行邻接矩阵计算, 得到皮尔森相关系数, 构建分层聚类树。将表达高度相近的一组基因划为共表达模块, 根据模块特征值进行疾病高风险基因筛选。该分析方法基于 R 语言程序中 ([HTTP://www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)) 的 WGCNA 软件包提供的函数实现。

1.2.3 DEGs 的生物功能和信号通路富集分析 使用基因注释在线数据库 DAVID (database for annotation, visualization and intergrated discovery) 探究差异表达基因背后的生物学意义。GO 分析是一种分析基因功能、细胞成分和基因参与的生物学过程方法。KEGG 分析可以探究基因发挥功能所在的重要信号通路中。同时使用 GSEA 分析 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) 进一步验证分析结果。

1.2.4 基因共表达模块选择以及构建蛋白互作网络 结合 WGCNA 分析得出的重要共表达模块基因, 通过在线检索数据库 STRING 构建 PPI 网络, 使用 Cytoscape 软件进行网络可视化, 并进行分子复合物检测 (MCODE), 进一步筛选出重要基因互作小模块。同时对小模块中的基因进行 GO 分析及 KEGG 分析。

1.2.5 CCK-8 测定 将泌乳素瘤细胞接种于 96 孔板, 在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养适当时间后, 加入不同剂量药物作用 24 h, 向每个孔中加入 10 μ L CCK-8, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h, 通过在 450 nm 处测量的吸光值揭示细胞活力。

1.2.6 克隆形成试验 在培养皿中培养 GT1-1 细胞, 密度为 50 个细胞/ cm^2 。在体外培养催乳素瘤 24 h, 然后分别用不同剂量的 Genipin 处理催乳素瘤细胞。体外培养 10 d 后, 用 PBS 冲洗菌落, 用 4% 多聚甲醛固定, 用 5% 结晶紫染色半小时后清水冲洗 2 次, 进行拍照观察。

1.2.7 体外划痕试验 将 GT1-1 细胞在 24 孔 Permax™ 平板上培养至贴壁。使用 10 μ L 微量移液管的尖端划痕来创建无细胞区域, 使用 DMEM 将松散的细胞轻轻洗出。然后, 加以不同剂量的 Genipin 作用。分别于 0、12、24 h 使用倒置相差显微镜进行拍照, 测量划痕宽度。

1.2.8 流式细胞术测细胞凋亡 将对数生长期的催乳素瘤细胞接种到密度为 2×10^5 个细胞/孔的 6 孔板中, 用不同剂量的 Genipin 处理细胞。培养 48 h 后, 使用 accutase 脱离溶液 (Sigma Aldrich, USA) 收集细胞, 并根据制造商的说明进行膜联蛋白-V-FITC/PI 标记。应用流式细胞仪分析染色的细胞, 并用 FACSDiva 版本 6.2 进行计算。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 进行统计学分析。定量数据采用独立样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 DEGs 的鉴定及 WGCNA 分析

GSE2175 中共 20 504 个, 11 798 个表达上调, 8 706 个表达下调; GSE26966 中共 5 965 个, 2 652 个表达上调, 3 313 个表达下调; GSE36314 中共 6 472 个, 其中 2 520 个表达上调, 3 952 个表达下调。维恩图显示 3 个数据集中共筛选出 1 201 个 DEGs, 如图 1A 所示。共鉴定出 570 个相互上调的基因和 631 个相互下调的基因, 其中 GSE26966 数据集全基因表达情况显示如图 1B 所示, 绿色代表表达下调的基因, 红色代表表达上调的基因。利用 R 中 WGCNA 包计算得到基因表达谱的最佳划分软阈值 $\beta=16$ (图 1C), 利用得到的软阈

值进一步划分基因模块, 结果显示绿松石色模块内的基因与泌乳素瘤关联性最高 ($\text{cor}=0.97, P=1e^{-200}<0.01$) (图 1D、E、F)。

2.2 差异表达基因的生物学功能和信号通路富集分析

为了进一步在分子水平上理解泌乳素瘤的发生机制, 使用 DAVID 在线网络分析工具进行 DEGs 的 GO 分析和 KEGG 分析。GO 分析结果显示, 对于生物过程 (biological processes, BP), 上调的 DEGs 明显富集于环核苷酸代谢过程及环核苷酸磷酸二酯酶的正调节, 同时对激素的反应增加; 而下调的 DEGs 主要富集于肽基酪氨酸磷酸化过程、细胞信号转导及细胞周期的调控。对于细胞成分 (cell component, CC), 上调的基因主要富集于细胞质、核质、纺锤体极等; 下调的 DEGs 主要富集在细胞质、质膜整体成分。对于分子功能 (molecular function, MF), 上调的 DEGs 参与蛋白质结合、N-末

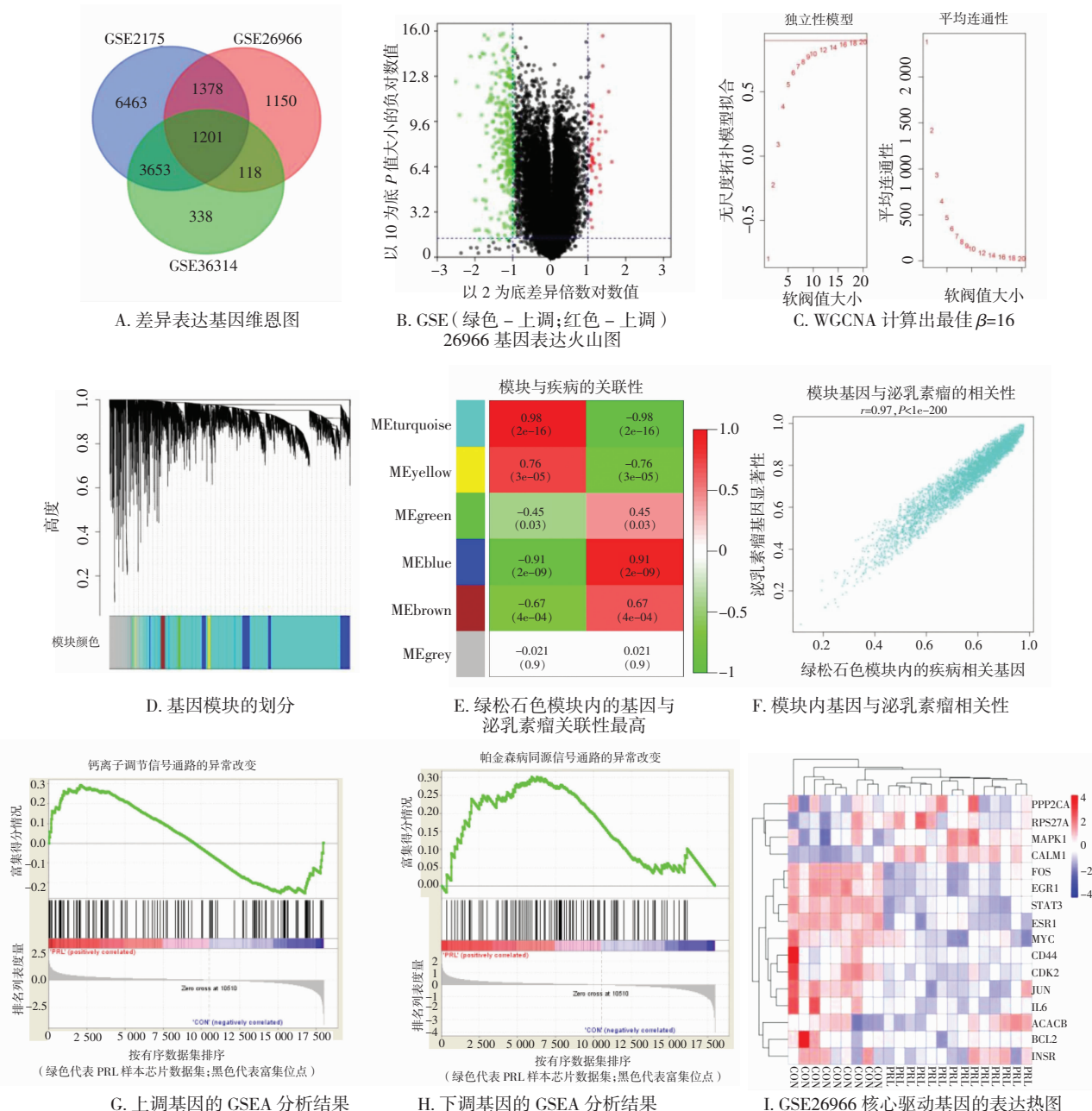


图 1 生物信息学手段分析泌乳素瘤患者基因表达谱信息

端豆蔻酰化结构域结合、磷脂酶结合;下调的 DEGs 倾向于富集蛋白质结合、蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性。KEGG 分析结果表明,上调的 DEGs 主要参与卵母细胞减数分裂及 cGMP-PKG 信号通路;下调的 DEGs 主要参与细胞癌变、黏着斑改变及 PI3K-Akt 信号通路,结果详见表 1。与此同时,GSEA 分析的结果表明,泌乳素瘤的钙信号传导途径显著改变,并可能与帕金森病有一定的同源性,如图 1G、H 所示。

表 1 差异表达基因的功能和信号通路富集分析

表达	类别	条目	计数	P 值
上调	BP	GO:0030801~循环核苷酸代谢过程的正调节	3	1.721E-04
		BP GO:0009725~对激素的反应	5	2.881E-04
		BP GO:0051343~环核苷酸磷酸二酯酶活性的正调节	3	5.679E-04
		BP GO:1901841~调节高压门控钙通道活性	3	1.181E-03
		BP GO:0043388-DNA 结合的正调节	4	1.233E-03
		CC GO:0005829~细胞质	45	1.368E-05
	CC	GO:0005654~核质	35	8.994E-04
		CC GO:0000922~主轴杆	6	1.105E-03
	CC	GO:0005634~核	55	2.628E-03
		CC GO:0005622~细胞内	20	2.858E-03
	MF	GO:0005515~蛋白质结合	89	5.457E-05
		MF GO:0031997~N-末端豆蔻酰化结构域结合	3	1.676E-04
	MF	GO:0043274~磷脂酶结合	4	3.124E-04
		MF GO:0072542~蛋白磷酸酶活化剂活性	3	8.259E-04
	MF	GO:0030235~一氧化氮酶调节剂活性	3	1.526E-03
		KEGG hsa05214;胶质瘤	5	3.700E-03
	KEGG	hsa04114;卵母细胞减数分裂	6	4.220E-03
		KEGG hsa04022;cGMP-PKG 信号通路	7	5.618E-03
	KEGG	hsa04728;多巴胺能突触	6	8.282E-03
		KEGG hsa04910;胰岛素信号通路	6	1.126E-02
下调	BP	GO:0018108~肽基酪氨酸磷酸化	13	2.949E-08
		BP GO:0007165~信号转导	31	6.222E-07
	BP	GO:0045787~细胞周期的正调节	6	1.743E-05
		BP GO:0007169~跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路	8	3.964E-05
	BP	GO:0008284~细胞增殖的正调节	16	4.645E-05
		CC GO:0005737~细胞质	75	4.954E-06
	CC	GO:0043235~受体复合物	9	1.961E-05
		CC GO:0005887~质膜的组成部分	28	1.560E-04
	CC	GO:0005829~细胞质	50	1.741E-04
		CC GO:0005886~质膜	55	1.527E-03
	MF	GO:0005515~蛋白质结合	116	1.133E-08
		MF GO:0004713~蛋白酪氨酸激酶活性	12	3.950E-08
	MF	GO:0004714~跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性	8	4.774E-08
		MF GO:0004871~信号传感器活动	12	2.906E-06
	MF	GO:0042802~相同的蛋白质结合	21	1.757E-05
		KEGG hsa05200;癌症的途径	23	9.936E-09
	KEGG	hsa04510;黏着斑	15	6.840E-07
		KEGG hsa04151;PI3K-Akt 信号通路	17	1.570E-05
	KEGG	hsa05161;乙型肝炎	11	2.672E-05
		KEGG hsa05220;慢性粒细胞白血病	8	5.284E-05

2.3 PPI 网络构建及重要模块筛选同时确定核心驱动基因

基于 STRING 数据库关系及 WGCNA 差异基因共表达情况构建 PPI 互作网络,结果表明在所有的差异表达基因中,EGR1、MAPK1、MYC、BCL2 和 CALM1 居于重要地位,且未被报道。这些基因处于相互作用的核心,被鉴定为促泌乳素瘤发生发展的核心驱动基因(表 2、图 1I)。此外,MCODE 分析得到了含 157 个节点和 797 个边的互作关系网络,并从中筛选出了 3 个最重要的基因共表达小模块(图 2)。模块基因功能的注释表明,模块 1 的基因与细胞结构相关,如内质网腔、细胞外基质组织、胶原三聚体;模块 2 的基因主要与癌症、GABA 能神经突触、吗啡成瘾有关;模块 3 的基因与 I 型干扰素信号传导途径、核质、PI3K-Akt 信号传导途径相关,见表 3。

表 2 泌乳素型垂体瘤核心差异表达基因

基因	logFC	P 值	权重	中心中介性
MAPK1	0.121	2.699E-02	183	0.088
JUN	-0.258	6.700E-05	163	0.057
MYC	-0.490	4.169E-04	147	0.065
FOS	-1.192	1.470E-07	123	0.026
EGR1	-0.737	2.870E-07	120	0.014
BCL2	-0.056	1.058E-02	119	0.027
CALM1	0.337	2.820E-08	116	0.069
STAT3	-0.383	8.820E-10	108	0.027
ESR1	-0.875	3.520E-08	103	0.033
CDK2	-0.266	5.251E-04	73	0.023

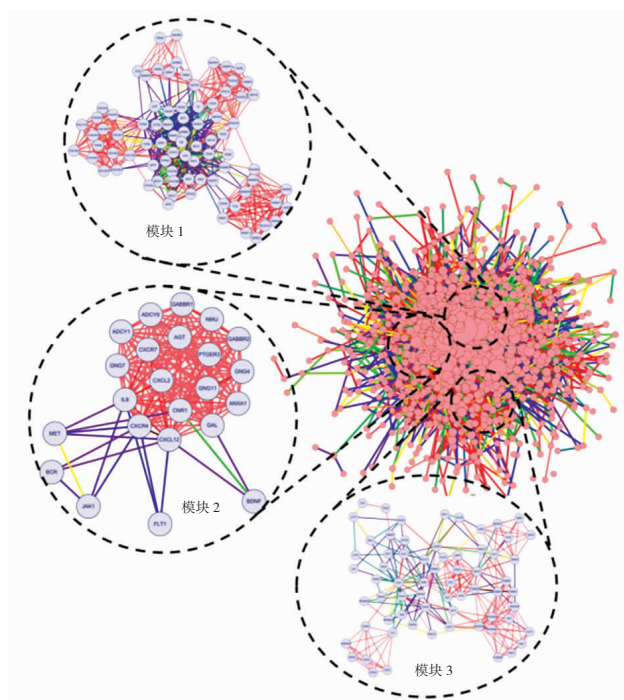
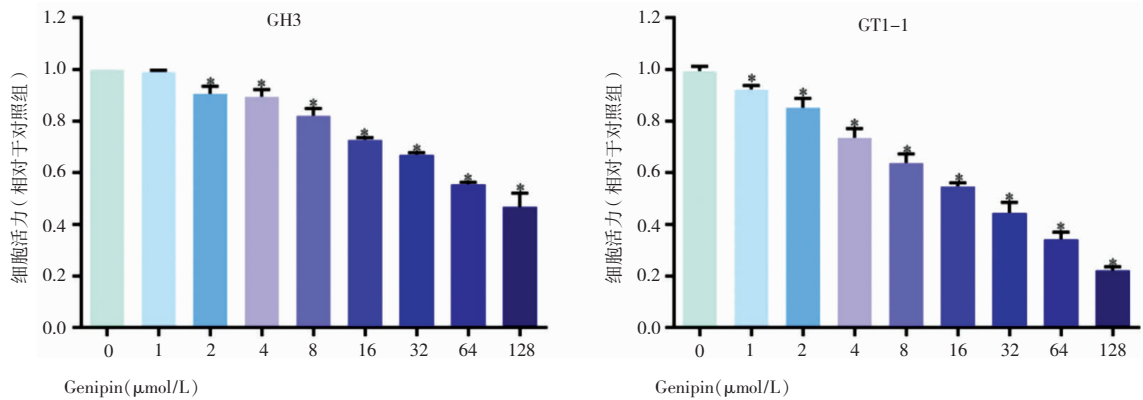


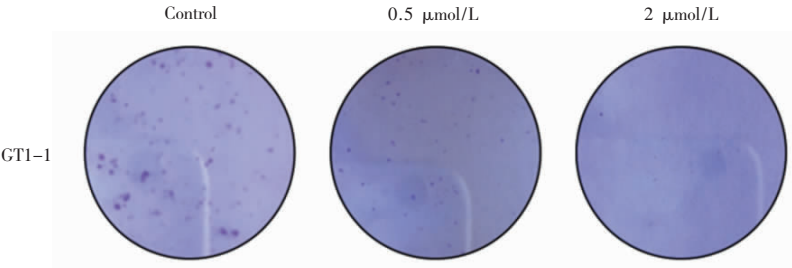
图 2 差异表达基因的蛋白相互作用网络以及前 3 个重要模块

表 3 重要模块互作基因的功能和信号通路富集分析

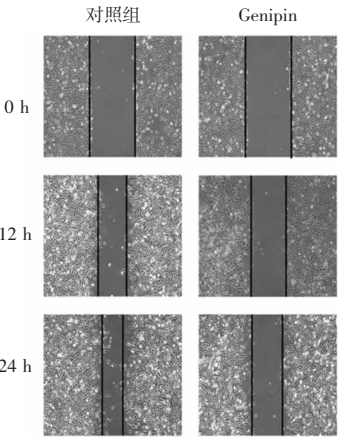
模块	类别	P 值	FDR
模块 1	GO:0005788~ 内质网腔 (CC)	4.18E-07	4.93E-04
	GO:0030198~ 细胞外基质组织 (BP)	8.27E-07	1.23E-03
	GO:0005581~ 胶原蛋白三聚体 (CC)	3.06E-06	3.61E-03
模块 2	hsa05200:癌症途径 (KEGG)	4.30E-09	4.68E-06
	hsa04727:GABA 能神经突触 (KEGG)	3.22E-08	3.50E-05
	hsa05032:吗啡成瘾 (KEGG)	4.87E-08	5.29E-05
模块 3	GO:0060337-I 型干扰素信号通路 (BP)	4.29E-09	5.96E-06
	GO:0005654~ 核质 (CC)	5.93E-06	6.46E-03
	hsa04151:PI3K-Akt 信号通路 (KEGG)	9.02E-06	1.05E-02



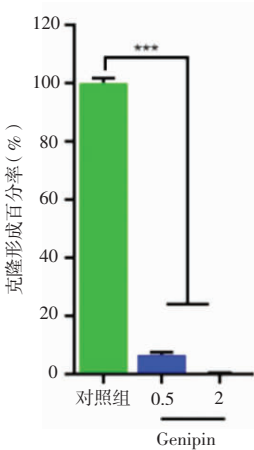
A. 不同剂量药物处理下泌乳素瘤细胞的存活率



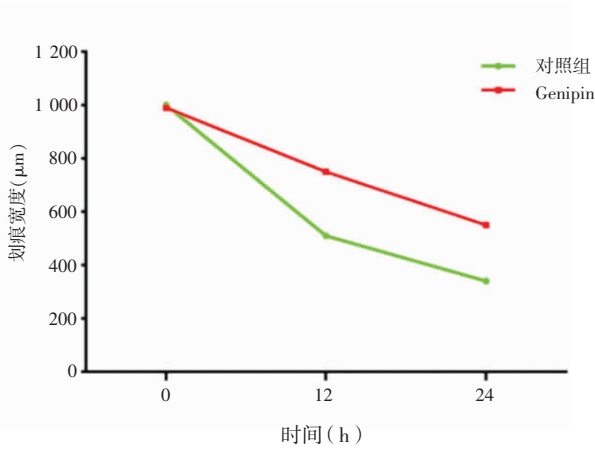
B. 不同剂量药物培养皿中的克隆形成情况



C. 不同剂量药物组的培养皿中划痕愈合情况



D. 克隆形成百分比



E. 对照组和药物组的划痕宽度

图 3 Genipin 药物对泌乳素瘤细胞的体外作用效果

2.4 Genipin 减少泌乳素瘤细胞的增殖

进行 CCK-8 测定以评估 Genipin 的抗催乳素瘤作用显示,随着药物浓度的增加,GH3、GT1-1 细胞的存活率明显下降,如图 3A 所示。克隆形成实验结果表明,Genipin 培养皿中克隆形成的数量少于对照组,对照组克隆形成百分比明显高于药物组(0.5 $\mu\text{mol/L}$, 2 $\mu\text{mol/L}$),且 2 种不同药物剂量组的克隆形成百分比差异明显(图 3B、D)。

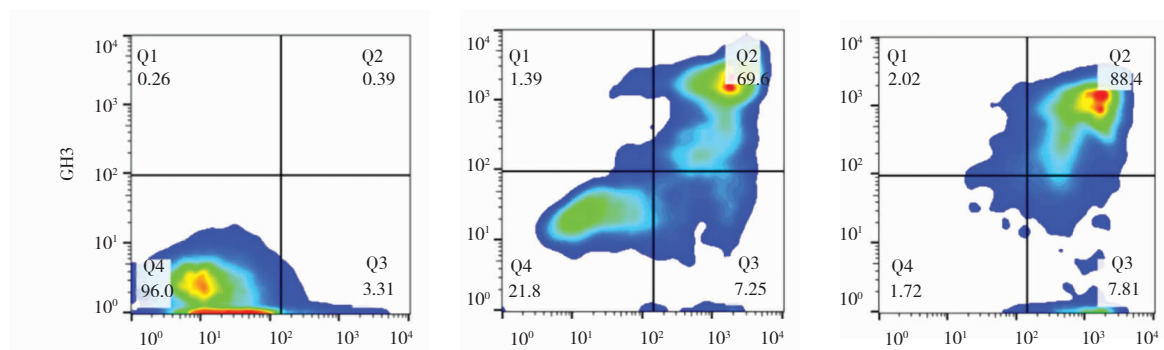
2.5 Genipin 阻碍泌乳素瘤细胞迁移

体外划痕试验表明(图 3C、E),对照组 12 h 后划痕宽度明显减小,而 Genipin 组略有下降,而 24 h 后,对照组伤口明显小于 Genipin 组。随着时间的推移,对照组和 Genipin 组的伤口宽度均减少,对照组与 Genipin 组相比明显下降,

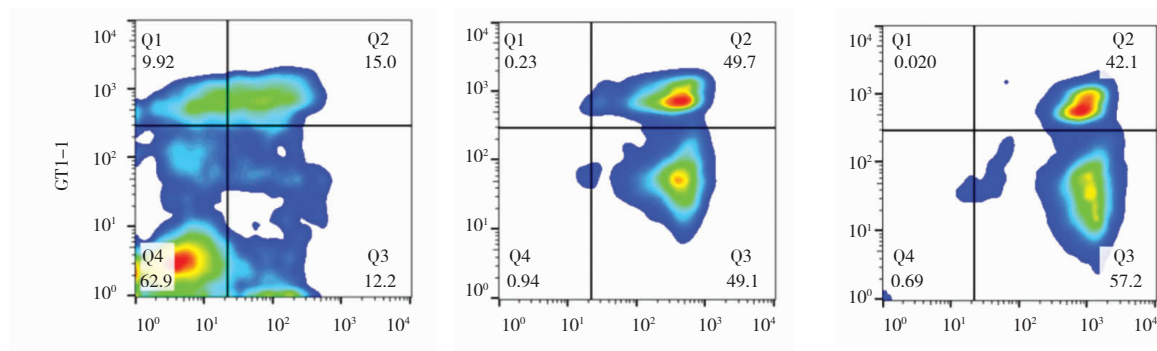
Genipin 能够阻碍泌乳素瘤细胞的迁移。

2.6 Genipin 诱导泌乳素瘤细胞凋亡

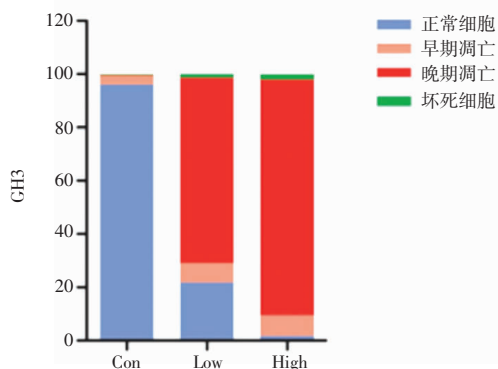
为进一步研究 Genipin 抑制泌乳素瘤的潜在机制,用不同剂量的 Genipin 培养泌乳素瘤细胞 48 h 后,使用流式细胞仪测定细胞的凋亡情况。结果显示经药物作用的细胞凋亡明显增加。对照组 GH3 细胞正常、坏死、晚期凋亡和早期凋亡的百分比分别为 96.0%、0.26%、0.39%和 3.31%;低剂量药物组为 21.8%、1.39%、69.6%和 7.25%;高剂量药物组为 1.72%、2.02%、88.4%、7.81%(图 4A、B)。GH3 在对照组中正常生长的肿瘤细胞占优势;在低剂量组中,晚期和早期凋亡细胞的百分比都升高;在高剂量组中,凋亡细胞几乎取代了所有正常生长的肿瘤细胞(图 4C、D)。



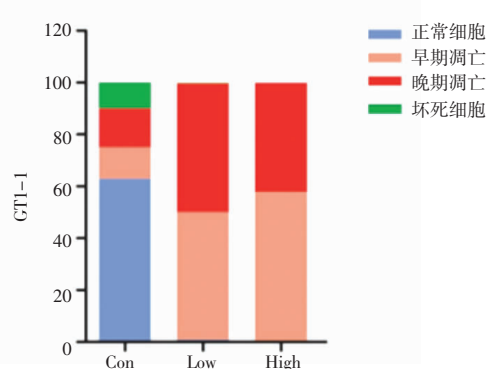
A. 不同剂量药物组的 GH3 细胞凋亡分布情况



B. 不同剂量药物组的 GT1-1 细胞凋亡分布情况



C. GH3 的凋亡细胞百分比



D. GT1-1 的凋亡细胞百分比

图 4 Genipin 诱导泌乳素瘤细胞凋亡的流式分析

3 讨论

泌乳素瘤是单克隆腺瘤,是最常见的具有分泌功能的垂体瘤,通常是良性的,但会分泌过多的激素,可能导致明显的内分泌系统综合征^[7]。临床上泌乳素瘤的治疗效果目前尚不能令人满意,虽有许多关于泌乳素瘤的研究报道,但针对泌乳素瘤核心驱动基因进行靶向治疗及泌乳素瘤的分子发生机制的相关研究仍不足。本研究鉴定的肿瘤核心驱动基因可以作为泌乳素瘤临床诊断、治疗和患者预后的标志物,同时探究差异表达基因的生物学功能对进一步阐述肿瘤发生机制具有重要意义。DEGs 的相关研究表明,上调的 DEG 主要与卵母细胞减数分裂过程相关,参与细胞核功能的改变,cGMP-PKG 信号通路的异常活化,从而促进肿瘤发生;重要信号转导中的基因下调、细胞质和受体复合物受损,这些改变意味着细胞正常功能衰退、细胞之间的相互联系作用减弱、黏着性下降、PI3K-Akt 信号通路发生改变,进一步促进肿瘤的形成和转移。肽基-酪氨酸磷酸化基因表达下调很可能导致一系列原癌基因的激活、抑癌基因的功能失调。此外 GSEA 分析结果显示,泌乳素瘤与帕金森病密切相关。据报道,一些泌乳素瘤患者常常并发原因不明的运动功能障碍^[8]。多巴胺可通过降低细胞内 cAMP 的水平和钙摄取来降低催乳素的释放^[9]。多巴胺受体激动剂,如卡麦角林和溴隐亭,是临床治疗垂体腺瘤的一线药物,同时也被用于帕金森病的治疗^[10]。基于上述事实和本研究结果,推测泌乳素瘤很可能与帕金森病存在一定的同源性,换言之,泌乳素瘤患者罹患帕金森病的风险较高。但是,详细的机制仍有待进一步探究。

利用生物信息学方法对差异表达基因进行进一步研究,使用 WGCNA 分析及 PPI 蛋白互作网络构建,从而进一步确定泌乳素瘤形成的致病高风险因子,即核心驱动基因为 EGR1、MAPK1、MYC、BCL2 和 CALM1。EGR1(early growth response 1)是一种编码 DNA 结合锌指蛋白的主要反应基因,在多种癌症如胃癌、结肠癌及乳腺癌等的肿瘤转移和肿瘤侵袭中发挥重要作用。该基因受促性腺激素释放激素的调控,Lhb 是促性腺激素释放激素的反应性基因

之一,且 Lhb 的表达与催乳素的释放有关。EGR1 受 GnRH 影响,通过调节 Lhb 的表达发挥促泌乳素瘤发生的作用^[11-13]。本研究中 EGR1 表达明显下调,鉴于 EGR1 对泌乳素瘤发生的核心驱动地位,其激动剂药物 Genipin 很可能通过促进 EGR1 功能进而达到抑制泌乳素瘤生长的作用,因此在体外实验中进一步验证了其抗肿瘤的潜在治疗效果。在 CCK-8 测定中,细胞系 GH3 和 GT1-1 的细胞活力随着 Genipin 的药物剂量增加而降低;克隆形成实验中,Genipin 组的克隆形成数量和大小明显少于对照组,并且药物抑制效果依赖于剂量;在划痕实验中,对照组的划痕宽度随时间减少,并且在 24 h 后明显小于 Genipin 组,表明 Genipin 可用于抑制体外催乳素瘤细胞的迁移。同时,流式细胞术测细胞凋亡显示,随着 Genipin 剂量的增加,凋亡细胞的百分比增加。各种体外细胞实验表明 Genipin 通过促进 EGR1 功能可发挥潜在治疗泌乳素瘤的作用,并且治疗效果呈剂量依赖性。MAPK1(mitogen-activated protein kinase 1)是体内一系列磷酸化事件的重要枢纽基因,参与细胞内重要的信号转导,并传递细胞外信号,调节细胞生长、分化、增殖、凋亡和迁移^[14]。MAPK1 被其上游的激酶磷酸化后,进入细胞核,调节其下游众多基因的表达,一方面发挥其本身的激酶活性,另一方面还可以充当转录阻遏物,促进泌乳素瘤细胞发生癌变。同时有研究结果显示,抑制 MAPK 及 ESR 信号通路可有效抑制泌乳素瘤细胞活力^[15]。MYC(MYC proto-oncogene,bHLH transcription factor)是一种在淋巴瘤中广泛表达的原癌基因,在细胞周期、细胞凋亡及细胞分化中发挥作用。MYC 高表达患者常具有临床侵袭性疾病,通常表现为晚期、结外受累和高血清 LDH 水平。MYC 引起的高血清 LDH 水平与泌乳素瘤的发生相关,该基因的异常表达使细胞正常生理功能紊乱,改变细胞内环境,促进着泌乳素瘤的发展^[16]。BCL2(B-cell lymphoma-2)首先在 B 细胞恶性肿瘤中被发现,同时它也在包括 T 细胞的正常淋巴细胞中表达。该基因编码完整的线粒体外膜蛋白,阻止细胞程序性死亡,其高表达赋予泌乳素瘤细胞“不死性”。据报道,氟维司群能够明显改变 BCL-2 的表达水平,并能抑制 MAPK 信号通路杀伤泌乳素瘤细胞。调节 BCL2 水平对泌乳素瘤的治疗具有重要的辅助作用^[17-18]。CALM1(calmodulin

1)通过调节 CaM 作用于多种靶蛋白,在转录激活、蛋白质合成、糖原代谢、细胞分裂等一系列细胞功能中发挥重要作用。CaM 调节系统对癌细胞生理学改变十分重要,如肿瘤相关血管生成、肿瘤生长和转移等。CALM1 参与多巴胺能神经信号传递通路,并通过调节 CaM 激活 PI3K,引起 MAPK 信号通路的改变。该基因与 MAPK1 协同作用,最终导致泌乳素瘤的发生发展^[19-20]。

综上所述,本研究从基因分子水平出发,探究泌乳素瘤差异表达基因,鉴定了 EGR1、MAPK1、MYC、BCL2 和 CALM1 是泌乳素瘤的核心驱动基因。这些基因是潜在的精确诊断生物标志物、分子治疗靶点,可作为泌乳素瘤患者预后水平的预测因素,并可在基因靶向药物筛选以及治疗中发挥重要作用。E-GR1 的激动剂 Genipin 能够在体外抑制泌乳素瘤细胞的增殖和迁移,诱导泌乳素瘤细胞凋亡,对泌乳素瘤具有潜在治疗作用,值得进一步研究。同时本研究使用生物信息学方法,进一步阐述了泌乳素瘤发生的分子机制、泌乳素瘤的形成主要与纺锤极发生改变、卵母细胞减数分裂受到影响相关;泌乳素瘤很可能与帕金森病存在一定的同源性。本研究为此类良性内分泌肿瘤的进一步研究提供了新思路。但由于患者样本例数较少,实验方法不足,所得结论仍需在未来进一步验证。

参 考 文 献

- [1] 田沁森,李国亮,葛鹏飞. 泌乳素瘤发病机制的研究进展[J]. 中国妇幼保健,2018,33(9):2155-2158.
- [2] 季立津,鹿 斌,史虹莉. 泌乳素瘤发病机制研究进展[J]. 医学综述,2016,22(1):55-59.
- [3] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary[J]. Acta Neuropathol, 2016, 131(6):803-820.
- [4] Gao Z, Cai L, Lu J, et al. Expression of stem cell markers and dopamine D2 receptors in human and rat prolactinomas[J]. Med Sci Monit, 2017, 23:1827-1833.
- [5] 陈思璇,张志强,卢光明. 垂体泌乳素瘤药物疗效的影像学研究进展[J]. 放射学实践,2018,33(9):970-973.
- [6] 王 雯,姚伟峰. 不同剂量溴隐亭对催乳素瘤临床疗效、血清催乳素水平及肿瘤体积的影响[J]. 中国药房,2017,28(26):3681-3684.
- [7] Malli A, Melissaris S, Dimitriadi A, et al. A coexisting pilocytic astrocytoma and a prolactinoma: a case report of collision tumors and literature review[J]. Cureus, 2019, 11(6):e4911.
- [8] Bhatoe HS. Movement disorders caused by brain tumours[J]. Neurol India, 1999, 47(1):40-42.
- [9] Judd AM, Login IS, Kovacs K, et al. Characterization of the MMQ cell, a prolactin-secreting clonal cell line that is responsive to dopamine[J]. Endocrinology, 1988, 123(5):2341-2350.
- [10] Thondam SK, Alusi S, O'Driscoll K, et al. Impulse control disorder in a patient on long-term treatment with bromocriptine for a macroprolactinoma[J]. Clin Neuropharmacol, 2013, 36(5):170-172.
- [11] Cooper O, Mamelak A, Bannykh S, et al. Prolactinoma ErbB receptor expression and targeted therapy for aggressive tumors[J]. Endocrine, 2014, 46(2):318-327.
- [12] Wang R, MoYung KC, Zhao YJ, et al. A mechanism for the temporal potentiation of genipin to the cytotoxicity of cisplatin in colon cancer cells[J]. Int J Med Sci, 2016, 13(7):507-516.
- [13] Yan L, Wang Y, Liang J, et al. MiR-301b promotes the proliferation, mobility, and epithelial-to-mesenchymal transition of bladder cancer cells by targeting EGR1[J]. Biochem Cell Biol, 2017, 95(5):571-577.
- [14] Xiao Y, Liu H, Yu J, et al. MAPK1/3 regulate hepatic lipid metabolism via ATG7-dependent autophagy[J]. Autophagy, 2016, 12(3):592-593.
- [15] Li C, Sun Z, Gui S, et al. Effects of fulvestrant, an estrogen receptor antagonist, on MMQ cells and its mechanism[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2009, 30(2):268-274.
- [16] Li S, Lin P, Young KH, et al. MYC/BCL2 double-hit high-grade B-cell lymphoma[J]. Adv Anat Pathol, 2013, 20(5):315-326.
- [17] Cameron BD, Traver G, Roland JT, et al. Bcl2-expressing quiescent type B neural stem cells in the V-SVZ are resistant to concurrent temozolomide/X-irradiation[J]. Stem Cells, 2019[Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/stem.3081.
- [18] Lv H, Li C, Gui S, et al. Effects of estrogen receptor antagonist on biological behavior and expression of growth factors in the prolactinoma MMQ cell line[J]. J Neurooncol, 2011, 102(2):237-245.
- [19] Berchtold MW, Villalobo A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(2):398-435.
- [20] Ziemba BP, Swisher GH, Masson G, et al. Regulation of a coupled MARCKS-PI3K lipid kinase circuit by calmodulin: single-molecule analysis of a membrane-bound signaling module[J]. Biochemistry, 2016, 55(46):6395-6405.

(责任编辑:唐秋姗)