

胃 疾 病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002280

胃癌中 *IBSP* 基因表达及预后的生物信息学分析孙灯众¹, 史维俊¹, 于子嫣², 吴华彰², 刘牧林¹

(1. 蚌埠医学院第一附属医院胃肠外科, 蚌埠 233003; 2. 蚌埠医学院生物科学系, 蚌埠 233003)

【摘要】目的:通过生物信息学分析筛选出胃癌和正常胃黏膜间差异表达基因, 分析并预测其在胃癌发生发展及预后中的价值。**方法:**从癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库下载胃癌患者 RNA-seq 数据, 使用软件 R-Studio 筛选差异表达基因, 运用 DAVID 进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析, 研究 PI3K-Akt 通路中表达差异最明显的基因, 通过网站 UALCAN 对其进行表达量及临床病理特征分析, 利用在线网站 STRING 构建蛋白互作网络, 同时利用 Kaplan-Meier Plotter 在线分析其与胃癌患者预后的相关性。**结果:**共获得 5 704 个差异表达基因, 包括 1 225 个上调和 1 479 个下调的蛋白编码基因; KEGG 通路分析确定骨涎蛋白(integrin binding sialoprotein, IBSP)为目的基因; *IBSP* 基因在胃癌组织中明显高表达($P < 0.001$); 且与胃癌患者的临床病理特征及不良预后明显相关($P < 0.05$)。**结论:***IBSP* 基因作为胃癌中潜在的癌基因, 可能通过 PI3K-Akt 信号通路调控胃癌的早期进展, 进而导致胃癌患者预后不良, 有望成为胃癌新的临床诊断和预后标志物。

【关键词】胃癌; *IBSP* 基因; 差异表达基因; 预后; 生物信息学分析**【中图分类号】**R573**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-04-13Bioinformatics analysis of *IBSP* gene expression and prognosis in gastric cancerSun Dengzhong¹, Shi Weijun¹, Yu Ziyang², Wu Huazhang², Liu Mulin¹

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Bengbu Medical College;

2. Department of Biological Sciences, Bengbu Medical College)

【Abstract】Objective: To screen differentially expressed genes between gastric cancer and normal gastric mucosa by bioinformatics analysis; to analyze and predict its value in the development and prognosis of gastric cancer. **Methods:** RNA-seq data from gastric cancer patients were downloaded from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and differentially expressed genes were screened using the software R-Studio. The DAVID database was used to perform genetic ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis for differentially expressed genes. The gene with the most significant difference in expression in the PI3K-Akt signaling pathway was identified for further study; its expression level and clinicopathological were analyzed using UALCAN, the website STRING was used to construct its protein-protein interaction networks, and Kaplan-Meier Plotter was used to analyze its correlation with the prognosis of gastric cancer patients. **Results:** A total of 5704 differentially expressed genes were obtained, including 1225 up-regulated and 1479 down-regulated protein-coding genes; KEGG pathway analysis identified integrin binding sialoprotein (IBSP) as the key gene. *IBSP* was highly expressed in gastric cancer tissues ($P < 0.001$), which was significantly associated with the clinicopathological features and poor prognosis in patients with gastric cancer ($P < 0.05$). **Conclusion:** As a

potential oncogene in gastric cancer, *IBSP* may regulate the early progress of gastric cancer through PI3K-Akt signaling pathway and lead to poor prognosis of gastric cancer patients, and it is expected to become a new clinical diagnosis and prognostic marker for gastric cancer.

【Key words】gastric cancer; *IBSP* gene; differentially expressed genes; prognosis; bioinformatics analysis

作者介绍:孙灯众, Email: sdz199292@163.com,

研究方向: 胃、肠、胰腺疾病基础与临床。

通信作者:刘牧林, Email: liumulin66@aliyun.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号: 21707002); 安徽省高校

自然科学研究资助项目(编号: KJ2017A213, KJ2017A219、

gxyq2018035); 研究生创新计划资助项目(编号: Byy-

ex1825)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190917.1046.024.html>

(2019-09-18)

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,在我国的癌症发病率中居首位^[1-2]。在过去的几十年中,新的治疗策略和药物开发已取得了很大进展,然而胃癌患者的生存率仍然较低,且治疗效果不理想,主要原因是胃癌被确诊基本位于中晚期^[3-4],而晚期胃癌的侵袭和转移是导致患者死亡的主要原因^[5]。因此,了解胃癌早期的分子机制对诊断和治疗非常重要。

高通量基因表达谱集成了多种肿瘤的基因组测序,重新整合和分析这些数据集可能会为新研究找到一些有意义的线索。目前,已有研究对胃癌及相关数据进行了多次分析,获得大量的差异基因^[6-8],这些基因具有不同的功能,参与人体的各种生物学过程。本研究通过对 TCGA 数据库胃癌样本进行生物信息学分析,挖掘胃癌中潜在的癌基因及其可能的分子机制,为胃癌患者的临床诊断、治疗及预后提供策略。

1 材料与方法

1.1 筛选胃癌组织与正常胃组织之间的差异表达基因

从 TCGA 数据库^[9]下载胃癌的 RNA-seq 数据,共有 375 个胃癌组织和 32 个正常胃黏膜组织样本^[10],得到 56 753 个基因表达谱矩阵。安装 R 包(edge-R)的软件 R-studio 用来筛选差异基因^[11]。筛选差异基因的标准如下:| Fold Change | > 1.5, $P < 0.01$,将得到的差异基因绘制热图和火山图。

1.2 差异基因的富集分析

将差异基因进行 GO^[12]功能富集,从细胞组分、分子功能以及生物功能 3 个方面对其富集结果进行分析,把基因按照不同的功能进行注释和分类。同时将差异基因进行 KEGG^[13]通路分析,从信号通路角度对其富集分析。本研究中,利用网站 DAVID^[14](<https://david.ncicrf.gov/>)分别对表达上调和表达下调的蛋白编码基因进行富集分析, P 值小于 0.05 作为筛选标准,软件 R-studio 对富集的结果进行可视化。

1.3 目的基因在肿瘤中的表达

在线网站 UALCAN^[15]集成了 TCGA 数据库中 31 种类型癌症的基因表达谱,利用 UALCAN 验证目的基因在胃癌组织中的表达情况。同时,利用 UALCAN 对目的基因与胃癌患者临床病理特征的相关性进行研究分析。

1.4 构建蛋白互作网络

利用在线网站 STRING^[16]构建目的基因的蛋白相互作用网络,STRING(<http://string-db.org/>)是一种在线的生物信息学分析网站,包含大量已知蛋白和预测蛋白之间相互作用的数据库,包括蛋白之间直接的物理关联或间接的功能关联^[17]。将目的基因输入网站,研究目的蛋白与其他蛋白相互作用关系。

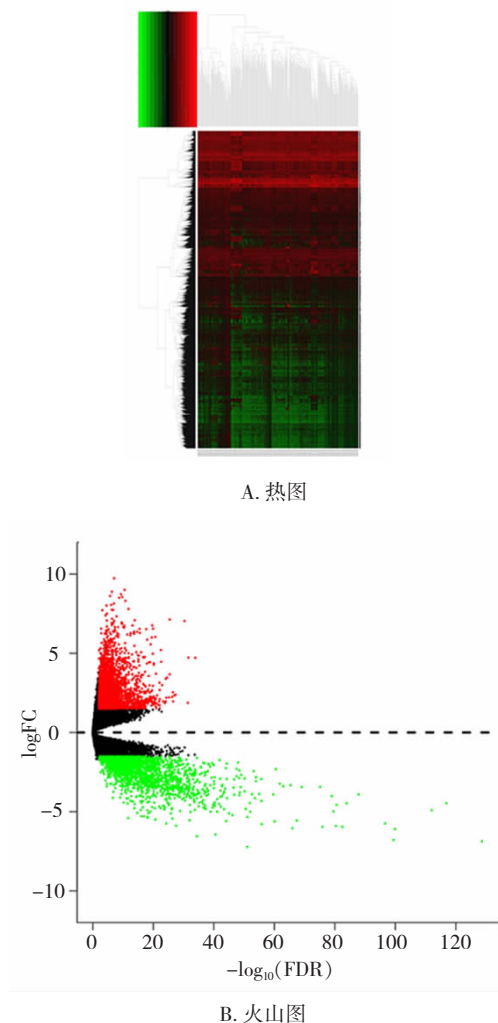
1.5 生存分析

在线分析网站 Kaplan-Meier Plotter^[18-19]用于评估目的基因与胃癌患者后进展期生存率(post-progression survival, PPS)的相关性。目前,该数据库具有 4 种癌症类型的表达数据,包括乳腺癌、肺癌、卵巢癌和胃癌^[20-23]。其中,胃癌的 882 例患者相关数据信息是从 TCGA 和 GEO 数据库提取并绘制而成的。简而言之,将目的基因输入该网站分别获得不同情况下胃癌患者生存率的情况,以了解目的基因的表达量与胃癌患者的预后是否相关。

2 结果

2.1 差异表达的基因

共得到 5 704 个差异表达基因,结果以热图和火山图展示(图 1)。其中蛋白编码基因共有 2 704 个,长链非编码基因共有 461 个。蛋白编码基因中包括 1 225 个上调和 1 479 个下调基因。



注:红色,表达上调;绿色:表达下调

图 1 差异表达基因

2.2 GO 和 KEGG 富集分析

GO 分析显示上调基因的功能主要富集在 DNA 结合以及急性期反应,下调基因主要富集在蛋白水解以及免疫应答的调控(图 2、图 3)。KEGG 分析显示上调的差异基因主要富集在 PI3K-Akt 通路;细胞周期以及细胞因子的相互作用(表 1),下调的差异基因主要富集在化学致癌作用;药物代谢

和胃酸分泌(图 3)。大量研究表明,PI3K-Akt 信号通路参与调控胃癌的发生发展^[24-25],*IBSP* 基因作为此通路表达差异最明显的基因(log FC=6.8),因此选取 *IBSP* 基因作为目的基因。

2.3 *IBSP* 基因在癌症中的表达

研究发现,*IBSP* 基因不仅在胃癌组织中高表达,在其他类型的癌症组织中表达量依然明显(图 4),包括肺癌、结直

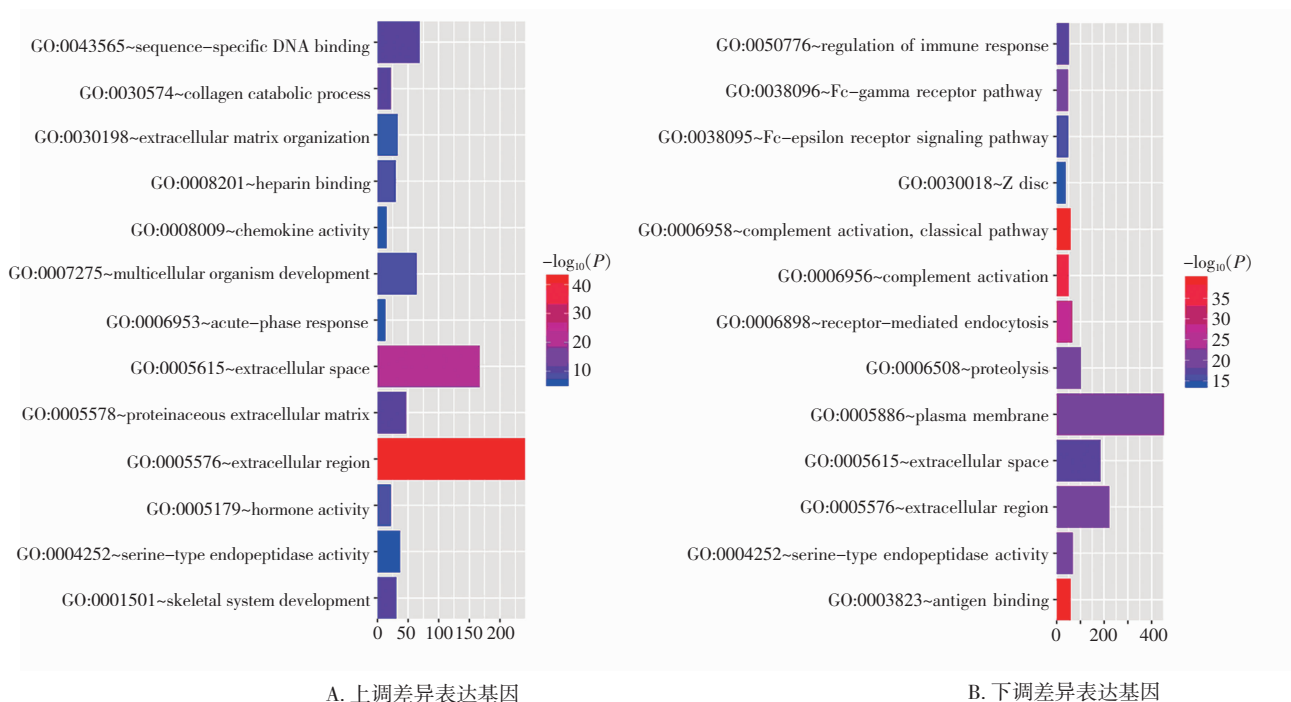


图 2 差异基因 GO 功能分析 (前十三 GO 条目, $P < 0.05$)

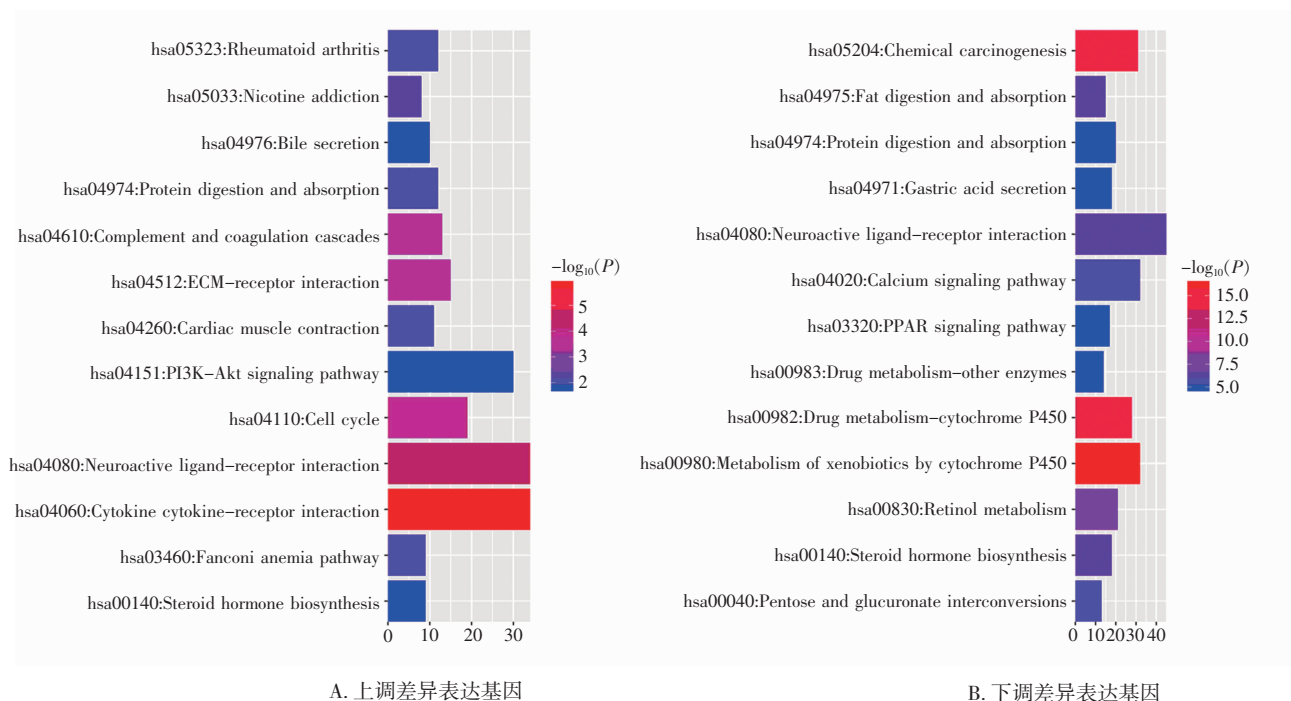


图 3 差异基因 KEGG 信号通路分析 (前十三信号通路, $P < 0.05$)

表 1 胃癌中上调差异基因的 KEGG 通路富集分析 ($P<0.05$)

信号通路	基因数	P 值	富集基因 (前五)
hsa04060: Cytokine-cytokine receptor interaction	34	0.000	CXCL1、CSF2、CCL3、CXCL5、CXCL9
hsa04080: Neuroactive ligand-receptor interaction	34	0.000	CALCR、F2RL2、CSH1、DRD1、CSH2
hsa04110: Cell cycle	19	0.000	CDC7、E2F1、CDC6、CDK1、DBF4
hsa04512: ECM-receptor interaction	15	0.000	IBSP、COL3A1、ITGA11、VTN、COL5A2
hsa04610: Complement and coagulation cascades	13	0.000	KNG1、F5、FGB、SERPINF2、F2
hsa05033: Nicotine addiction	8	0.006	GABRD、GABRR1、GRIN2B、GABRA3、GRIN2D
hsa04260: Cardiac muscle contraction	11	0.008	FXYD2、CACNG8、TNNC1、COX7B2、CACNG6
hsa03460: Fanconi anemia pathway	9	0.008	BLM、FANCD2、FANCI、EME1、BRCA2
hsa05323: Rheumatoid arthritis	12	0.009	CSF2、CCL3、TNFSF11、CXCL5、CCL20
hsa04974: Protein digestion and absorption	12	0.009	FXYD2、COL9A1、COL9A3、COL3A1、COL22A1
hsa04976: Bile secretion	10	0.013	PRKACG、FXYD2、SLCO1B3、BAAT、SLCO1B7
hsa00140: Steroid hormone biosynthesis	9	0.014	HSD3B2、CYP17A1、HSD3B1、CYP11B1、UGT2B4
hsa04151: PI3K-Akt signaling pathway	30	0.016	IBSP、FGF19、CSH1、FGFR4、CSH2

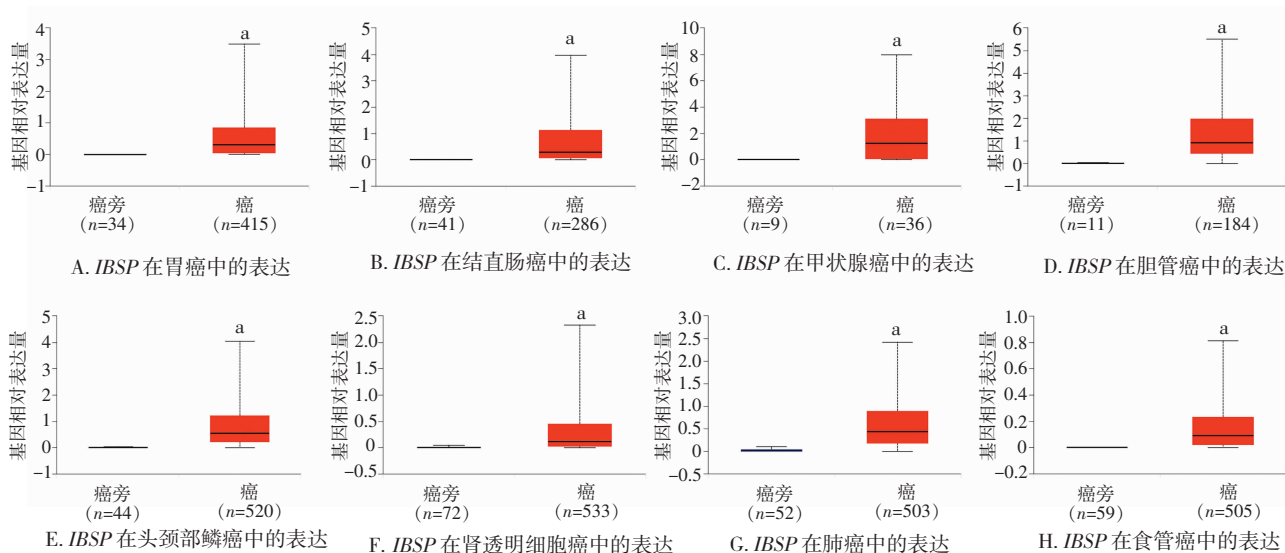
注: a, 与 Normal 组相比, $P<0.05$

图 4 IBSP 基因在多种癌症组织中表达明显上调

肠癌、甲状腺癌、胆管癌、食管癌、头颈部鳞癌和肾透明细胞癌。此外,高表达的 IBSP 基因与胃癌患者的年龄、性别、肿瘤分期、肿瘤分级、幽门螺杆菌感染状态及组织亚型均存在相关性(图 5)。

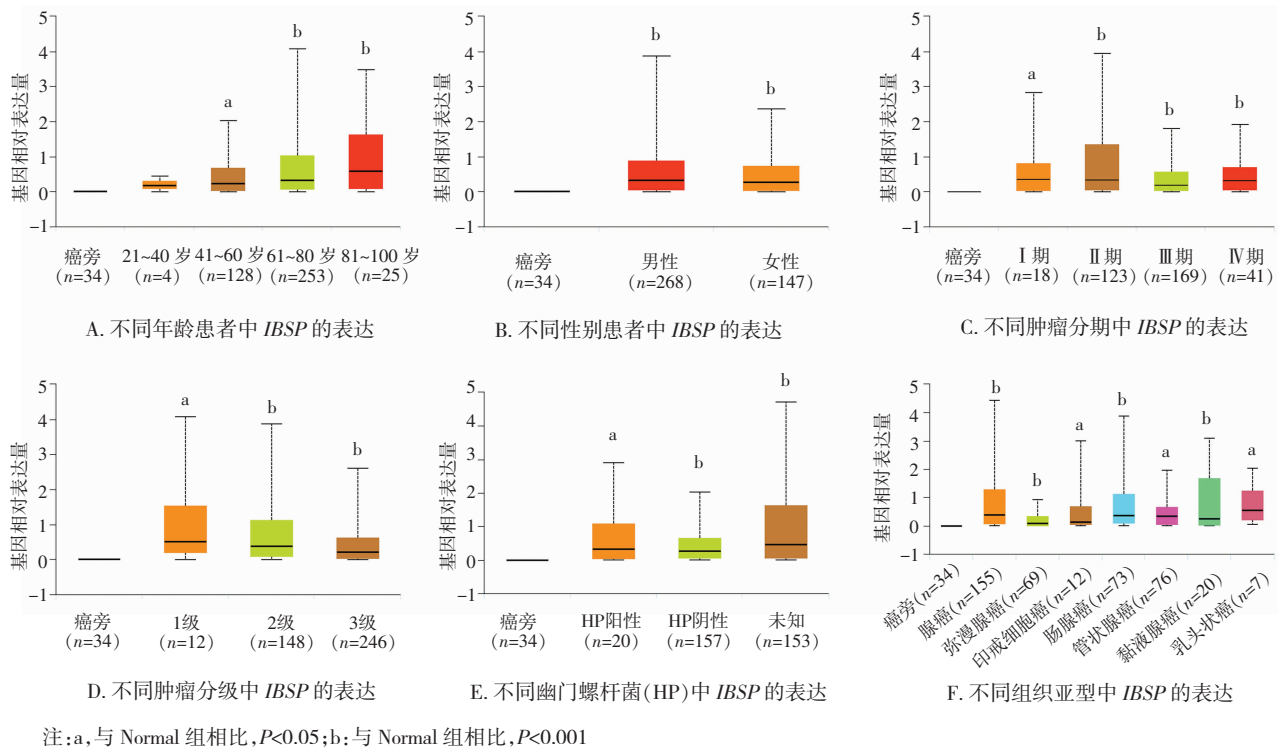
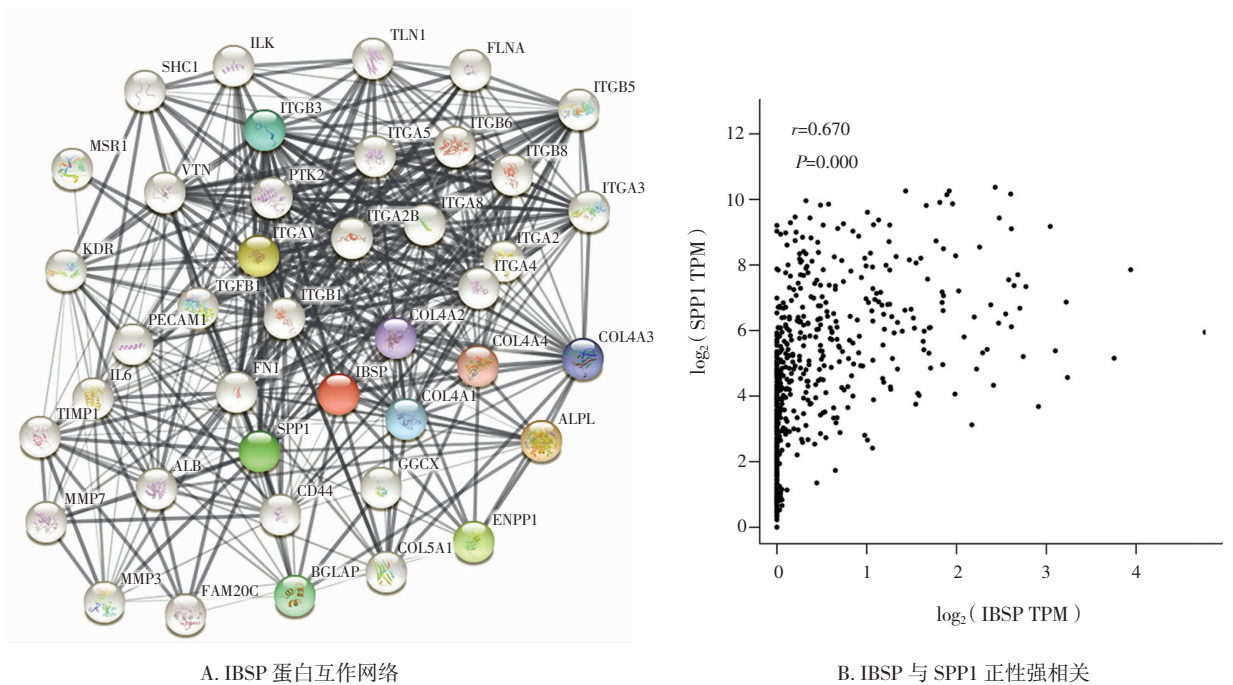
2.4 构建 IBSP 基因的蛋白互作网络

共有 40 个蛋白基因与 IBSP 基因相互作用(图 6A)。其中,CD44、MMP3、MMP7、PTK2、IL6、FNI、SPPI、TGF- β 1 等蛋白基因已经被证实参与胃癌的发生发展。例如, circFND3B 分子通过 CD44 的表达来促进胃癌细胞的侵袭和迁移^[26]; MMP3 和 MMP7 与感染幽门螺旋杆菌胃癌患者的预后相关^[27];通过抑制 PTK2 的表达,高甲基化的 KCNMA1 可以抑制胃癌进展^[28];CAF 可通过 IL-6/JAK2/STAT3 信号途径促进胃癌的进展^[29];FNI 可被 miR-200c 竞争性结合从而抑制胃癌

的增殖和转移^[30];SPPI 在胃癌中调控 PI3K/AKT 信号通路^[31]; TGF- β 1 则可诱导胃癌发生上皮-间质转化(EMT)^[32]。注意到基因 IBSP 基因富集在 PI3K-Akt 信号通路上,本研究通过 GEPIA 网站 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 验证 IBSP 基因与 SPPI 的相关性,结果显示(图 6B)胃癌中 IBSP 基因与 SPPI 具有强相关性($R=0.67$, $P<0.0001$)。

2.5 生存分析

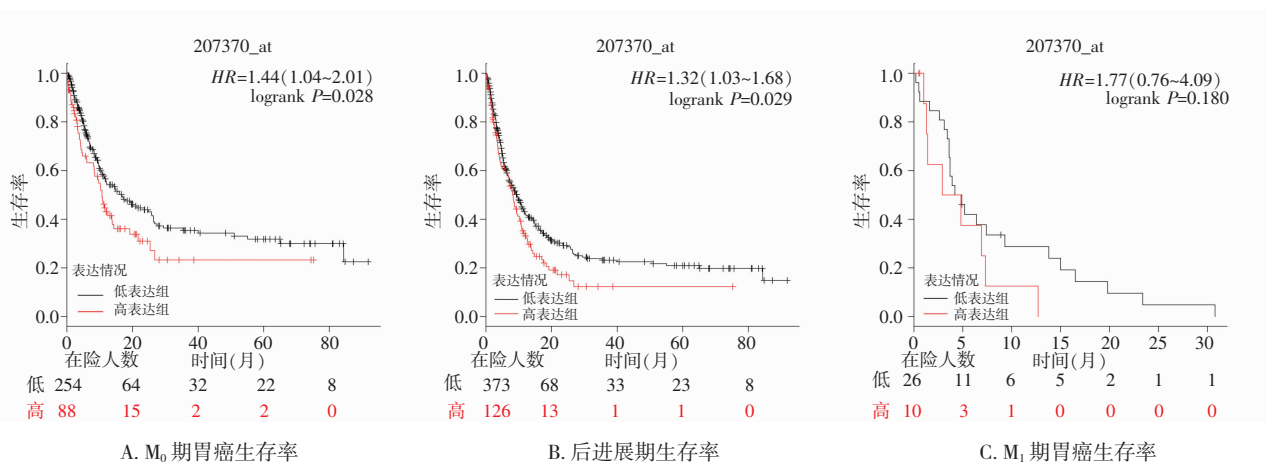
高表达的 IBSP 基因会降低胃癌患者的生存率($P=0.029$,图 7B),提示预后不良。同时,IBSP 基因与未发生远处转移(M_0 期)的胃癌患者生存相关($P=0.028$,图 7A),而与发生了远处转移(M_1 期)的胃癌患者预后则不具有相关性($P=0.180$,图 7C)。

图5 *IBSP* 基因与胃癌患者的临床病理特征图6 构建 *IBSP* 蛋白互作网络及验证相关性

3 讨论

本研究对 TCGA 数据库 407 例胃癌临床样本分析,筛选出差异表达蛋白基因共 2 704 个,其中

1 225 个上调,1 479 个下调。分别对上调和下调基因进行功能富集分析后发现,*IBSP* 基因是富集在 PI3K-Akt 通路且表达差异最明显的基因。进一步研究发现,包括胃癌在内的多种癌症类型中 *IBSP* 基因均存在明显高表达,提示 *IBSP* 基因参与这些肿

图7 *IBSP* 基因与胃癌患者生存率

瘤的发生发展,且高表达的 *IBSP* 基因与胃癌患者的临床病理特征相关;生存分析提示高表达的 *IBSP* 基因的胃癌患者生存率较低,与未发生远处转移(M₀期)的胃癌患者预后相关,而与发生了远处转移(M₁期)的胃癌患者预后不具有相关性,表明 *IBSP* 基因可能在胃癌早期发挥其生物学功能,这对探讨早期胃癌的分子机制具有重要意义。同时,构建的 *IBSP* 基因蛋白互作网络结果显示,部分与 *IBSP* 基因相互作用的蛋白基因已被证实参与胃癌的发生发展和转移,提示 *IBSP* 基因可能与胃癌的进展和转移有关,其中 *SPPI* 通过调控PI3K-Akt 信号通路促进胃癌发生发展,这与 *IBSP* 基因富集在 PI3K-Akt 信号通路的分析结果一致。

IBSP 基因位于人类 5 号染色体上,已有研究发现其在前列腺癌中表达上调,并且参与了前列腺癌的骨转移^[33],然而 *IBSP* 基因在胃癌中的表达及功能目前尚未有任何相关报道。大量研究发现,PI3K-Akt 信号通路肿瘤的发生发展密切相关^[34],PI3K 通过活化 ATK 导致下游的基因发生改变,调控细胞的增殖与转移。本研究富集分析结果显示,*IBSP* 基因富集在 PI3K-Akt 信号通路,蛋白互作网络结果显示,*IBSP* 基因与通过 PI3K-Akt 信号通路促进胃癌进展的 *SPPI* 基因强相关,并且 *IBSP* 基因与早期胃癌患者的预后有关。这些结果共同支持了 *IBSP* 基因可能通过 PI3K-Akt 信号通路促进胃癌早期的发生发展。

综上所述,本研究通过生物信息学分析筛选出差异基因 *IBSP*,并对其表达及预后进行系统而深入

的分析,并指出 *IBSP* 基因的分子机制涉及 PI3K-Akt 信号通路,这一研究发现可以为早期胃癌患者寻找新的临床诊断、预后标志物及治疗靶点提供一定的理论依据。另一方面,由于生物信息学分析缺乏实验验证,因此本研究也存在一定不足,有待后续进一步实验证实。

参 考 文 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Lazăr DC, Avram MF, Romosan I, et al. Prognostic significance of tumor immune microenvironment and immunotherapy: novel insights and future perspectives in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(32):3583-3616.
- [3] Zhang H, Wang X, Huang H, et al. Hsa_circ_0067997 promotes the progression of gastric cancer by inhibition of mir-515-5p and activation of x chromosome-linked inhibitor of apoptosis(xiap)[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):308-318.
- [4] Wang YN, Xu F, Zhang P, et al. Microrna-575 regulates development of gastric cancer by targeting pten[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 113:108716.
- [5] Zhai YJ, Su YP, Wang SJ, et al. A phase II trial of post-operative chemoradiotherapy for completely resected gastric cancer with D2 lymphadenectomy[J]. Oncol Lett, 2014, 8(4):1844-1848.
- [6] Liu J, Liu Z, Zhang X, et al. Bioinformatic exploration of OLFML2B overexpression in gastric cancer base on multiple analyzing tools[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):227.
- [7] Chen ZX, Zou XP, Yan HQ, et al. Identification of putative drugs for gastric adenocarcinoma utilizing differentially expressed genes and connectivity map[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2):1004-1015.

- [8] Fukamachi H, Kim SK, Koh J, et al. A subset of diffuse-type gastric cancer is susceptible to mtor inhibitors and checkpoint inhibitors[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 127.
- [9] Wang Y, Chen L, Wang G, et al. Fifteen hub genes associated with progression and prognosis of clear cell renal cell carcinoma identified by coexpression analysis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 10225–10237.
- [10] Zhao L, Jiang L, He L, et al. Identification of a novel cell cycle-related gene signature predicting survival in patients with gastric cancer[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 6350–6360.
- [11] Zheng MJ, Gou R, Zhang WC, et al. Screening of prognostic biomarkers for endometrial carcinoma based on a cerna network[J]. Peer J, 2018, 6: e6091.
- [12] Gene ontology consortium. Gene ontology consortium: going forward[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue): 1049–1056.
- [13] Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, et al. Kegg for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Database issue): 355–360.
- [14] Zhao B, Baloch Z, Ma Y, et al. Identification of potential key genes and pathways in early-onset colorectal cancer through bioinformatics analysis[J]. Cancer Control, 2019, 26(1): 1073274819831260.
- [15] Long S, Yuan C, Wang Y, et al. Network pharmacology analysis of *damnacanthus indicus* c.F.Gaertn in gene-phenotype[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 1368371.
- [16] Wang XQ, Tu WZ, Guo JB, et al. A bioinformatic analysis of microRNAs' role in human intervertebral disc degeneration[J]. Pain Med, 2019, 20(12): 2459–2471.
- [17] Hao L, Leng J, Xiao R, et al. Bioinformatics analysis of the prognostic value of tripartite motif 28 in breast cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 13(4): 2670–2678.
- [18] Bai Y, Qiao L, Xie N, et al. Expression and prognosis analyses of the Tob/BTG antiproliferative (APRO) protein family in human cancers[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0184902.
- [19] Hou GX, Liu P, Yang J, et al. Mining expression and prognosis of topoisomerase isoforms in non-small-cell lung cancer by using oncomine and kaplan-meier plotter[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174515.
- [20] Szász AM, Lánckzy A, Nagy Á, et al. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients[J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49322–49333.
- [21] Györfy B, Lánckzy A, Szállási Z. Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients[J]. Endocr Relat Cancer, 2012, 19(2): 197–208.
- [22] Györfy B, Surowiak P, Budezies J, et al. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82241.
- [23] Györfy B, Lánckzy A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(3): 725–731.
- [24] Wei R, Xiao Y, Song Y, et al. Fat4 regulates the emt and autophagy in colorectal cancer cells in part via the p13K-Akt signaling axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 112.
- [25] Cen D, Huang H, Yang L, et al. Long noncoding RNA STXBP5-AS1 inhibits cell proliferation, migration, and invasion through inhibiting the p13K/Akt signaling pathway in gastric cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 1929–1936.
- [26] Hong Y, Qin H, Li Y, et al. FNDC3B circular RNA promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via the regulation of E-cadherin and CD44 expression[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 19895–19910.
- [27] Yeh YC, Sheu BS, Cheng HC, et al. Elevated serum matrix metalloproteinase-3 and -7 in *H. pylori*-related gastric cancer can be biomarkers correlating with a poor survival[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(6): 1649–1657.
- [28] Ma G, Liu H, Hua Q, et al. Kcnma1 cooperating with PTK2 is a novel tumor suppressor in gastric cancer and is associated with disease outcome[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 46.
- [29] Wu X, Tao P, Zhou Q, et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 20741–20750.
- [30] Zhang H, Sun Z, Li Y, et al. MicroRNA-200c binding to FN1 suppresses the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88: 285–292.
- [31] Song SZ, Lin S, Liu JN, et al. Targeting of SPP1 by microRNA-340 inhibits gastric cancer cell epithelial-mesenchymal transition through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2019 [Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/jcp.28497.
- [32] Gen Y, Yasui K, Kitaichi T, et al. ASPP2 suppresses invasion and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting Smad7 degradation mediated by E3 ubiquitin ligase ITCH in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2017, 398: 52–61.
- [33] Gordon JA, Sodek J, Hunter GK, et al. Bone sialoprotein stimulates focal adhesion-related signaling pathways: role in migration and survival of breast and prostate cancer cells[J]. J Cell Biochem, 2009, 107(6): 1118–1128.
- [34] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. Gene, 2019, 698: 120–128.

(责任编辑: 冉明会)