

泌尿生殖器肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002513

肌层与非肌层浸润性膀胱癌差异基因的生物信息学分析

李攀, 曹金龙, 姚志强, 汉大黎, 吴昊, 张向向, 陈朝虎, 田俊强

(兰州大学第二医院泌尿外科, 兰州 730030)

【摘要】目的:筛选膀胱癌(bladder cancer, BC)进展关键基因, 探讨其生物学作用并为寻找潜在的治疗靶点提供依据。**方法:**从 GEO 数据库中检索获取 BC 患者的基因芯片数据, 经 R 软件筛选肌层浸润性膀胱癌(muscular invasive bladder cancer, MIBC)与非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 并用 clusterProfiler 软件包进行 DEGs 功能注释、通路分析。利用 STRING 在线数据库联合 Cytoscape 软件进行蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析, 筛选中枢基因。用 GEPIA 在线分析工具中的 TCGA 数据库进行预后分析, 筛选关键基因。在 Oncomine 肿瘤数据库中验证关键基因表达水平, 并导入 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。再基于 THE HUMAN PROTEIN ATLAS 免疫组化结果, 验证关键基因在不同侵袭性 BC 中的表达水平。**结果:**共筛选出 DEGs 193 个, 其中表达上调 116 个, 表达下调 77 个。这些基因主要涉及细胞外基质组织的生物过程、细胞组分构成、分子功能及 MAPK 信号通路。PPI 分析获得 65 个中枢基因, 预后分析得到 6 个关键基因的表达水平与 BC 患者总生存时间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。Oncomine 数据库验证表明 CXCL12、ANXA5、ACTA2、TAGLN、COL6A2 等 5 个关键基因在 MIBC 中明显上调, PPARG 在 MIBC 中明显下调($P < 0.05$)。**结论:**细胞外基质的生物作用、MAPK 通路及 6 个关键基因(CXCL12、ANXA5、ACTA2、TAGLN、COL6A2、PPARG)对肿瘤侵袭的改变可能成为抑制 BC 进展的潜在治疗靶点。

【关键词】膀胱癌; 生物信息学; 基因芯片; 差异表达基因

【中图分类号】R737.14

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-10-23

Bioinformatics analysis of differential genes between muscular and non-muscle invasive bladder cancer

Li Pan, Cao Jinlong, Yao Zhiqiang, Han Dali, Wu Hao, Zhang Xiangxiang, Chen Chaohu, Tian Junqiang

(Department of Urology, Lanzhou University Second Hospital)

【Abstract】Objective: To screen key genes in the progression of bladder cancer(BC) and explore their biological effects, providing a basis for finding potential therapeutic targets. **Methods:** The data of BC patients were retrieved from the GEO database. Differentially expressed genes(DEGs) of muscular invasive bladder cancer(MIBC) and non-muscle invasive bladder cancer(NMIBC) were screened by R software; the cluster Profiler software package was used for DEGs function annotation and path analysis. The STRING online database combined with Cytoscape software was used to analyze protein-protein interaction(PPI) network and screen central genes and key templates. TCGA database of GEPIA online analysis tool was used for prognostic analysis and screening key genes. The expression level of key genes was validated in Oncomine Tumor Database and imported into SPSS 22.0 for statistical analysis. The

作者介绍: 李攀, Email: lip18@lzu.edu.cn,

研究方向: 泌尿系肿瘤的基因治疗。

通信作者: 田俊强, Email: ery_tianjq@lzu.edu.cn。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(编号: 561219007); 甘肃省卫生行业科研计划资助项目(编号: GSWSKY2017-10); 甘肃省兰州市城关区科技局科技攻关类资助项目(编号: 2017KJGG0052); 兰州大学第二医院博士科研启动基金资助项目(编号: ynbskyjj2015-2-7); 兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划资助项目(编号: CY2017-BJ16); 兰州大学第二医院萃英研究生指导教师培育计划资助项目(编号: 201704)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200526.0959.006.html>
(2020-05-27)

expression level of key genes in different invasive BC were verified based on the immunohistochemical results of The HUMAN PROTEIN ATLAS. **Results:** A total of 193 DEGs were screened, among which 116 were up-regulated and 77 were down-regulated, which were mainly involved in the biological processes of extracellular matrix tissues, cellular component composition, molecular functions, and signaling pathways such as MAPK. A total of 65 central genes were obtained after PPI analysis, and the prognostic analysis of central genes showed that expression levels of six key genes were significantly correlated with the overall survival time of BC patients, with statistically significant differences($P < 0.01$). Oncomine database

validation showed that five key genes of *CXCL12*, *ANXA5*, *ACTA2*, *TAGLN* and *COL6A2*, were significantly up-regulated in MIBC, while *PPARG* was significantly down-regulated in MIBC ($P < 0.05$). **Conclusion:** Changes of biological effects of extracellular matrix, MAPK pathway and six key genes (*CXCL12*, *ANXA5*, *ACTA2*, *TAGLN*, *COL6A2* and *PPARG*) on tumor invasion may become potential therapeutic targets to inhibit the progression of BC.

[Key words] bladder cancer; bioinformatics; gene chip; differentially expressed gene

膀胱癌(bladder cancer, BC)在全球肿瘤中发病率排第 9 位,是泌尿系常见肿瘤之一,具有容易复发、容易进展的生物学特点^[1]。根据其浸润程度分为肌层浸润性膀胱癌(muscular invasive bladder cancer, MIBC)与非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)。10%~30%的 NMIBC 可进展为 MIBC,其生物学行为及预后状况大不相同^[2]。在 NMIBC 进展为 MIBC 的过程中涉及相关基因的筛选与确认未见报道。基因芯片检测技术已成为检测特定生物体中基因组表达水平的重要工具。本研究通过分析 GEO 数据库中不同 BC 基因芯片,筛选出 MIBC 与 NMIBC 的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),进行生物信息分析并在 Oncomine 肿瘤数据库验证其表达水平。在基因水平分析 NMIBC 进展为 MIBC 的机制,为防治膀胱癌进展及探索其潜在的治疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源

在 GEO 数据库中选择 2 个 BC 基因表达谱的数据集,登记号为 GSE89、GSE31684,根据 TNM 分期将基因表达谱分为 NMIBC 与 MIBC 两组。GSE89 微阵列数据基于 GPL80 (affymetrix human full length hugenev1 array, affymetrix, santa clara, CA, USA)测得,纳入 40 例膀胱组织,包括 9 例 MIBC 和 31 例 NMIBC。GSE31684 基于 GPL570 平台(affymetrix human genomeu133 plus 2.0 array, affymetrix, santa clara, CA, USA)测得,纳入 93 例 BC 组织,包括 78 例 MIBC 和 15 例 NMIBC。

1.2 DEGs 的筛选

将 BC 基因表达谱中的数据芯片在 R 3.6.1 中运用 limma 软件包进行归一化处理,筛选差异表达基因,将 $|FC|$ (fold change) ≥ 2 和 $P < 0.05$ 作为差异基因的筛选标准。用 ggplot2 和 ggrepel 软件包绘制火山图。为降低假阳性率,将 2 个数据集筛选出的差异基因利用 venn. diagram 函数绘制韦恩图,取交集作为最终 DEGs。

1.3 GO 和 KEGG 通路富集分析

GO 分析是对基因的生物学功能、分子功能、细胞成分的不同层次及维度进行描述,KEGG 可以将序列高度相似且行使相同功能的基因聚在一起,运行 clusterProfiler 软件包、对 DEGs 进行富集与通路分析^[3]。Gplot 软件包可视化基因富集结果,在 GenomeNet(<https://www.genome.jp>)中找出重要通路 DEGs 作用的关键位点。

1.4 蛋白互作网络构建

将 DEGs 导入 STRING 在线数据库(<https://string-db.org>),以相互得分大于 0.4 作为阈值,构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,简称蛋白互作网络。利用 Cytoscape v3.6.1 中的 cytoHubba 插件,以度值大于 10 筛选中枢基因。

1.5 DEGs 的总生存期分析

用 GEPIA 在线分析工具中的 TCGA 数据库(<http://gepia.a.cancer-pku.cn>)对中枢基因进行总生存分析, $P < 0.01$ 作为关键基因的筛选标准。

1.6 关键基因表达水平及侵袭性分析

通过 Oncomine 肿瘤在线数据库(<https://www.oncomine.org>)检索浅表性膀胱癌与浸润性膀胱癌 mRNA 表达芯片,获取关键基因在数据集中标准化后表达水平(log2 中位数比值),运用 limma 包内置函数对 GSE89、GSE31684 芯片数据标准化。将关键基因在各数据集标准化后表达水平数据导入 SPSS 22.0,分析其在 MIBC 与 NMIBC 中的差异,正态分布计量资料采用独立样本 t 检验,非正态分布计量资料采用独立样本非参数检验,以 $P < 0.05$ 作为关键基因在不同 BC 分组有明显差异标准。基于 THE HUMAN PROTEIN ATLAS(<https://www.proteinatlas.org>)免疫组化结果,验证关键基因在不同级别膀胱癌中的表达水平。

2 结果

2.1 MIBC 与 NMIBC 进行差异性基因分析

通过差异性表达基因筛选,获得 GSE89 数据集中差异表达基因 632 个,其中上调 292 个,下调 340 个。获得 GSE31684 数据集中差异表达基因 1 250 个,上调 725 个,下调 545 个,将 2 个数据集取交集获得共同上调差异基因 116 个,下调差异基因 77 个(图 1)。

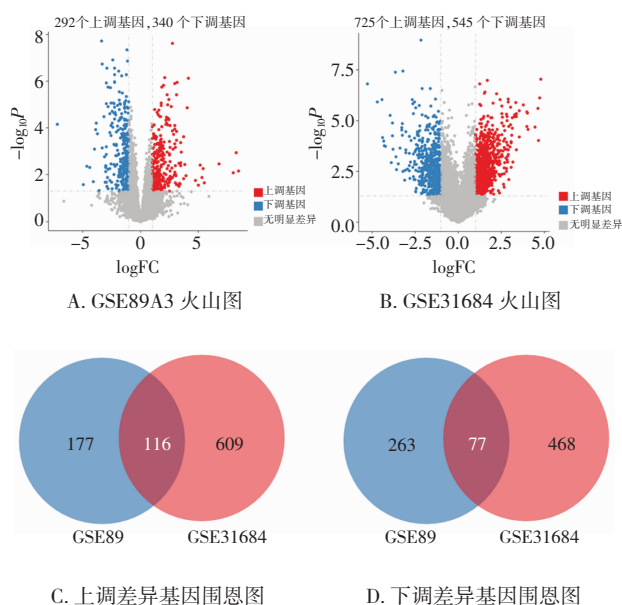


图 1 上调与下调的 DEGs 结果

2.2 DEGs 的 GO 分析

对上调差异性基因和下调差异性基因分别进行 GO 分析,发现上调基因主要涉及细胞外基质组织降解、细胞外结构组织重组、白细胞迁移、血小板及中性粒细胞脱颗粒等生物过程;参与胶原蛋白细胞外基质、三级颗粒、内质网腔、胶原蛋白三聚体等细胞成分组成;富集于细胞外基质结构组成、整合素的结合、细胞外基质结构拉伸强度改变、细胞黏附分子结合、血小板衍生生长因子结合等分子功能。下调基因主要涉及调节脂肪细胞分化、肿瘤对雌激素反应、肿瘤对酒精反应、肿瘤对有毒物质反应等生物过程;参与在细胞间连接、基底外膜等细胞成分的构成;富集于跨膜受体蛋白磷酸酶活性、单羧酸结合、细胞黏附分子结合、阳离子同向转运体活性等分子功能中(表 1)。

2.3 DEGs 的 KEGG 分析

对差异性基因进行 KEGG 分析,参与的前 10 条通路包括白细胞跨内皮迁移、黏着力、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、癌症通路、癌症中的蛋白多糖作用、阿米巴病发生、百日咳发生、MAPK 信号通路、补体和凝血级联反应、

表 1 上调及下调差异性基因的 GO 分析

表达	类别	GO编号	术语	数目	百分比/%	P 值
上调	生物过程	GO:0030198	细胞外基质组成	20	17.54	2.88E-14
		GO:0043062	细胞外结构组成	20	17.54	4.53E-13
		GO:0050900	白细胞迁移	20	17.54	1.41E-11
		GO:0002576	血小板脱颗粒	10	8.77	8.84E-09
		GO:0043312	中性粒细胞脱颗粒	17	14.91	1.13E-08
	细胞成分	GO:0062023	细胞外基质胶原	29	25.89	1.48E-23
		GO:0031012	细胞外基质	29	25.89	1.30E-21
		GO:0070820	三级颗粒	10	8.93	5.42E-08
		GO:0005788	内质网内腔	12	10.71	3.09E-07
		GO:0005581	胶原三聚体	7	6.25	8.39E-07
	分子功能	GO:0005201	细胞外基质结构成分	15	13.16	1.65E-13
		GO:0005178	整合素结合	10	8.77	4.37E-09
		GO:0030020	细胞外基质抗张结构	6	5.26	2.99E-07
		GO:0050839	细胞黏附分子的结合	13	11.40	8.89E-06
		GO:0048407	血小板衍生生长因子结合	3	2.63	4.69E-05
下调	生物过程	GO:0043627	对雌激素的反应	6	8.00	5.99E-07
		GO:0045444	脂肪细胞分化	8	10.67	4.06E-06
		GO:0097305	对酒精的反应	8	10.67	5.61E-06
		GO:0009636	对有毒物质的反应	11	14.67	6.87E-06
		GO:0045598	脂肪细胞的分化调节	6	8.00	1.82E-05
	细胞成分	GO:0005913	细胞黏附连接	5	6.76	1.53E-05
		GO:0016323	基底外侧质膜	6	8.11	1.45E-04
		GO:0005911	细胞间连接	8	10.81	2.29E-04
	分子功能	GO:0005001	跨膜受体蛋白酪氨酸磷酸酶活性	3	4.00	5.39E-05
		GO:0019198	跨膜受体蛋白磷酸酶活性	3	4.00	5.39E-05
		GO:0033293	一元羧酸结合	4	5.33	1.33E-04
		GO:0050839	细胞黏附分子结合	9	12.00	1.44E-04
		GO:0015294	溶质:阳离子同向转运体	4	5.33	2.59E-04

蛋白质消化吸收等通路(表 2)。

12 个基因参与 MAPK 信号通路,其中上调基因 8 个(*CDC25B*、*AKT3*、*FLNA*、*IL1R2*、*CD14*、*FAS*、*TGFB3*、*HSPA6*),下调基因 4 个(*CACNA1D*、*MAPK10/JNK3*、*PTPRR/PTP*、*FGFR3*),主要参与该通路中的 p38MAPK、JNK 通路(图 2)。

2.4 DEGs 的 PPI 网络分析与中枢基因的筛选

将 DEGs 导入 STRING 数据库,结果导入 Cytoscape 计算网络及各个节点的拓扑特性,过滤到 PPI 复合体中获得 175

个节点(包括上调基因 109 个,下调基因 66 个),859 对 PPI 关系。疾病发生发展的潜在驱动因素之一是“中枢基因”,他们在 PPI 网络中处于关键位置,与周围的基因关系密切。运用 cytoHubba 插件,度值大于 10 的差异性基因 65 个(中枢基因),其中上调基因 54 个,下调基因 11 个(表 3)。

2.5 中枢基因的生存分析

筛选出的中枢基因运用 GEPIA 在线分析工具对其进行总生存期分析。54 个上调中枢基因中有 5 个关键基因

表 2 DEGs 显著富集的 10 个 KEGG 通路

KEGG 编号	通路	数目	P 值	基因
hsa04670	白细胞跨内皮迁移	12	2.01E-12	<i>CXCR4</i> 、 <i>ITGB2</i> 、 <i>CYBB</i> 、 <i>MMP9</i> 、 <i>THY1</i> 、 <i>NCF2</i> 、 <i>ITGAM</i> 、 <i>VCAM1</i> 、 <i>MSN</i> 、 <i>63ACTN1</i> 、 <i>MYL9</i> 、 <i>ACTN1</i>
hsa04510	局部黏附	13	5.46E-11	<i>COL1A2</i> 、 <i>CAV1</i> 、 <i>AKT3</i> 、 <i>FN1</i> 、 <i>FLNA</i> 、 <i>MAPK10</i> 、 <i>MYL9</i> 、 <i>ITGA7</i> 、 <i>COL6A3</i> 、 <i>COL6A2</i> 、 <i>ACTA25</i> 、 <i>COL6A1</i> 、 <i>ACTN1</i>
hsa04933	糖尿病合并症 AGE-RAGE 信号通路	10	1.85E-10	<i>COL1A2</i> 、 <i>AKT3</i> 、 <i>FN1</i> 、 <i>SMAD3</i> 、 <i>COL3A1</i> 、 <i>VCAM1</i> 、 <i>CYBB</i> 、 <i>TGFB3</i> 、 <i>MAPK10</i> 、 <i>ACTA25</i>
hsa05200	肿瘤通路	16	2.25E-10	<i>CSF1R</i> 、 <i>AKT3</i> 、 <i>FN1</i> 、 <i>SMAD3</i> 、 <i>EDNRA</i> 、 <i>CDH1</i> 、 <i>63ACTN1</i> 、 <i>MAPK10</i> 、 <i>CXCR4</i> 、 <i>MMP9</i> 、 <i>FAS</i> 、 <i>TGFB3</i> 、 <i>PPARG</i> 、 <i>ACTA25</i> 、 <i>FGFR3</i> 、 <i>FZD2</i>
hsa05205	肿瘤中蛋白多糖作用	12	8.07E-10	<i>CAV1</i> 、 <i>AKT3</i> 、 <i>FN1</i> 、 <i>MMP9</i> 、 <i>FLNA</i> 、 <i>MSN</i> 、 <i>FAS</i> 、 <i>SDC2</i> 、 <i>ACTA25</i> 、 <i>ERBB3</i> 、 <i>PLAU</i> 、 <i>FZD2</i>
hsa05146	阿米巴病	9	3.34E-09	<i>COL1A2</i> 、 <i>ITGB2</i> 、 <i>COL3A1</i> 、 <i>FN1</i> 、 <i>ITGAM</i> 、 <i>CD14</i> 、 <i>IL1R2</i> 、 <i>TGFB3</i> 、 <i>ACTN1</i>
hsa05133	百日咳	8	7.42E-09	<i>ITGB2</i> 、 <i>C1S</i> 、 <i>C1R</i> 、 <i>C1QB</i> 、 <i>ITGAM</i> 、 <i>CD14</i> 、 <i>MAPK10</i> 、 <i>SERPING1</i>
hsa04010	MAPK 信号通路	12	8.36E-09	<i>CDC25B</i> 、 <i>CACNA1D</i> 、 <i>AKT3</i> 、 <i>FLNA</i> 、 <i>IL1R2</i> 、 <i>CD14</i> 、 <i>FAS</i> 、 <i>TGFB3</i> 、 <i>MAPK10</i> 、 <i>HSPA6</i> 、 <i>PTPRR</i> 、 <i>FGFR3</i>
hsa04610	补体和凝血级联反应	8	1.08E-08	<i>ITGB2</i> 、 <i>C1S</i> 、 <i>C1R</i> 、 <i>C1QB</i> 、 <i>SERPINA1</i> 、 <i>ITGAM</i> 、 <i>SERPING1</i> 、 <i>PLAU</i>
hsa04974	蛋白质消化吸收	8	2.78E-08	<i>COL1A2</i> 、 <i>DPP4</i> 、 <i>SLC15A1</i> 、 <i>COL3A1</i> 、 <i>COL6A2</i> 、 <i>COL6A3</i> 、 <i>COL5A2</i> 、 <i>COL6A1</i>

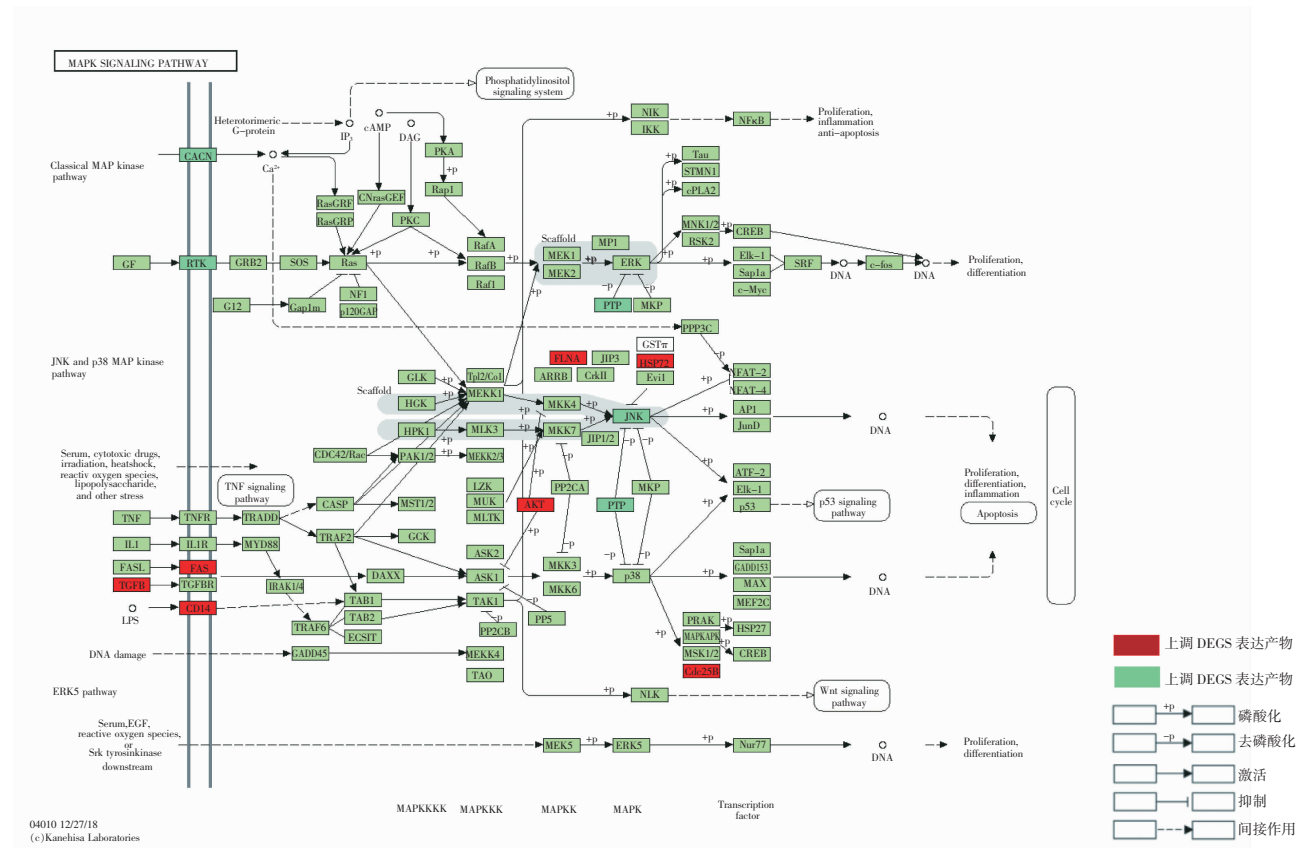


图 2 DEGs 参与 MAPK 信号通路

(*CXCL12*、*ANXA5*、*ACTA2*、*TAGLN*、*COL6A2*) 表达水平与患者总生存期负相关分析有显著意义($P<0.01$)。11 个下调中枢基因中有 1 个关键基因(*PPARG*)表达水平与患者总生存期正相关分析有显著意义($P<0.01$)(图 3)。

2.6 关键基因表达水平及侵袭性分析

在 Oncomine 肿瘤数据库中,对筛选出的 6 个关键基因在 NMIBC 中进行验证,各数据集中表达水平如图 4A 所示。获取 6 个关键基因在 Oncomine 肿瘤数据集集中的 log2 中位数比值以及其在 GSE89、GSE31684 中标准化后表达值,利用

SPSS 22.0 分析其在 MIBC 与 NMIBC 之间的表达差异,结果显示 *CXCL12*、*ANXA5*、*ACTA2*、*TAGLN*、*COL6A2* 等 5 个关键基因表达水平在 MIBC 中明显上调,PPARG 在 MIBC 中明显下调,差异有统计学意义($P<0.05$),并绘制箱线图(图 4B、C、D),揭示 5 个上调关键基因可能增强膀胱癌侵袭性,促进 NMIBC 进展为 MIBC。基于 THE HUMAN PROTEIN ATLAS 免疫组化结果,*CXCL12*、*ANXA5*、*ACTA2*、*TAGLN*、*COL6A2* 等 5 个关键基因阳性细胞数在高级别 BC 中明显高于低级别 BC,结果证实 5 个上调关键基因促进膀胱癌侵袭性(图 5)。

表 3 PPI 网络图中中枢基因连接度的统计结果

上调($n=54$)		下调($n=11$)	
基因	度值	基因	度值
<i>FN1</i>	64	<i>COL3A1</i>	23
<i>MMP9</i>	49	<i>POSTN</i>	21
<i>ITGAM</i>	34	<i>MKI67</i>	21
<i>ITGB2</i>	31	<i>CSF1R</i>	20
<i>VCAM1</i>	30	<i>FBN1</i>	20
<i>CAV1</i>	26	<i>ACTA2</i>	19
<i>THY1</i>	26	<i>HMOX1</i>	18
<i>CXCL12</i>	26	<i>CCL4</i>	18
<i>CXCR4</i>	26	<i>CD53</i>	18
<i>BGN</i>	25	<i>HCK</i>	18
<i>COL1A2</i>	25	<i>S100A8</i>	17
<i>CYBB</i>	25	<i>CIQB</i>	17
<i>ANXA5</i>	23	<i>FOXMI</i>	17
<i>FLNA</i>	23	<i>TAGLN</i>	16
		<i>COL6A1</i>	16
		<i>MNDA</i>	15
		<i>SRGN</i>	15
		<i>ACTN1</i>	15
		<i>PLAU</i>	15
		<i>SERPINA1</i>	15
		<i>TGFB3</i>	15
		<i>FCER1G</i>	15
		<i>VCAN</i>	15
		<i>TIMP2</i>	15
		<i>NCF2</i>	15
		<i>COL6A3</i>	14
		<i>BCL2A1</i>	13
		<i>LCPI</i>	13
		<i>TGFB1</i>	13
		<i>CD14</i>	13
		<i>COL6A2</i>	13
		<i>CDKN3</i>	12
		<i>COL5A2</i>	12
		<i>ALOX5AP</i>	11
		<i>FCGR3B</i>	11
		<i>LGALS1</i>	11
		<i>CCL11</i>	11
		<i>PCOLCE</i>	11
		<i>MYBL2</i>	11
		<i>CDC20</i>	11
		<i>CCND1</i>	43
		<i>CDH1</i>	41
		<i>SMAD3</i>	25
		<i>PPARG</i>	19
		<i>GATA3</i>	19
		<i>KRT19</i>	17
		<i>S100A4</i>	15
		<i>FYB</i>	12
		<i>MAPK10</i>	12
		<i>NQO1</i>	11
		<i>KRT18</i>	11
		—	—
		—	—
		—	—

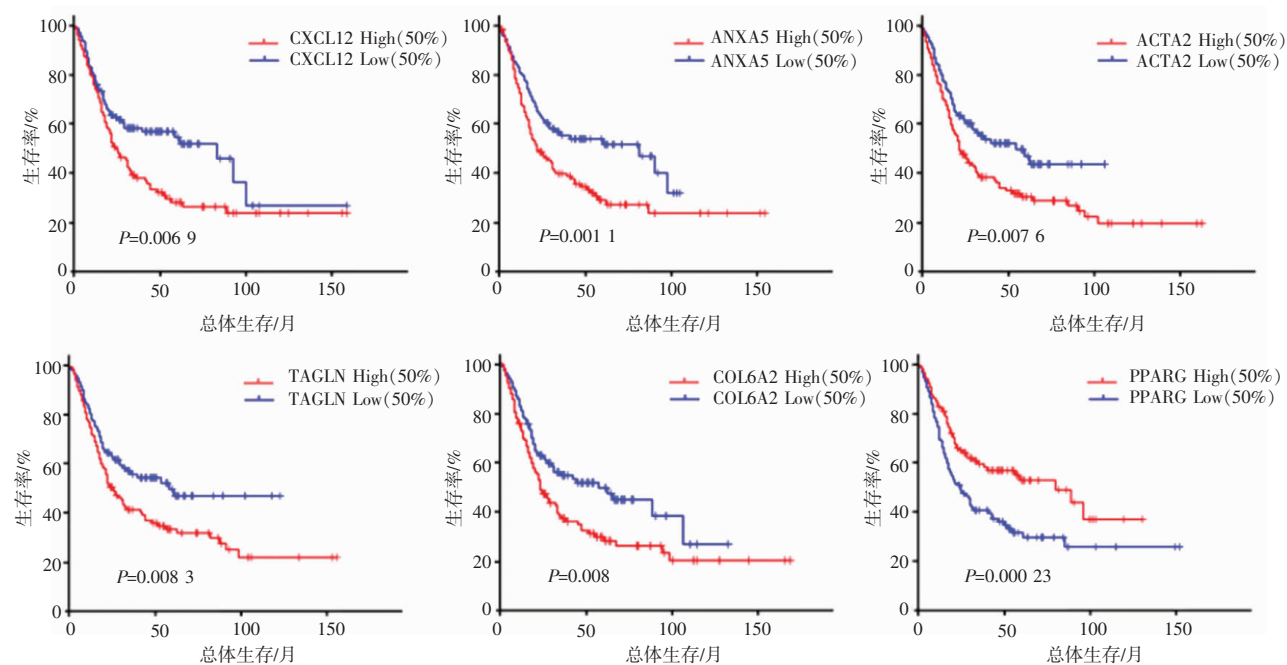


图 3 与预后显著相关的 6 个基因

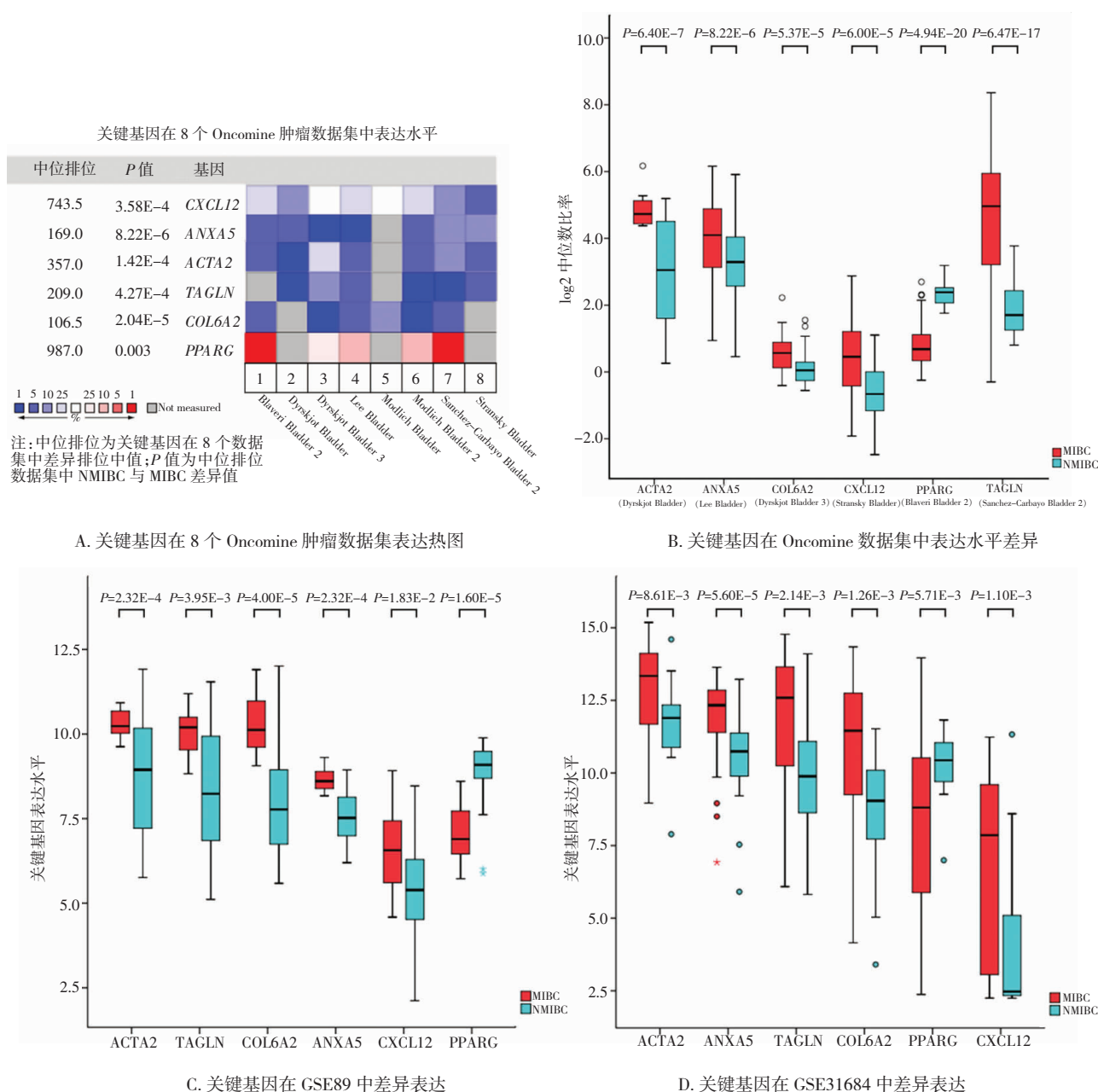


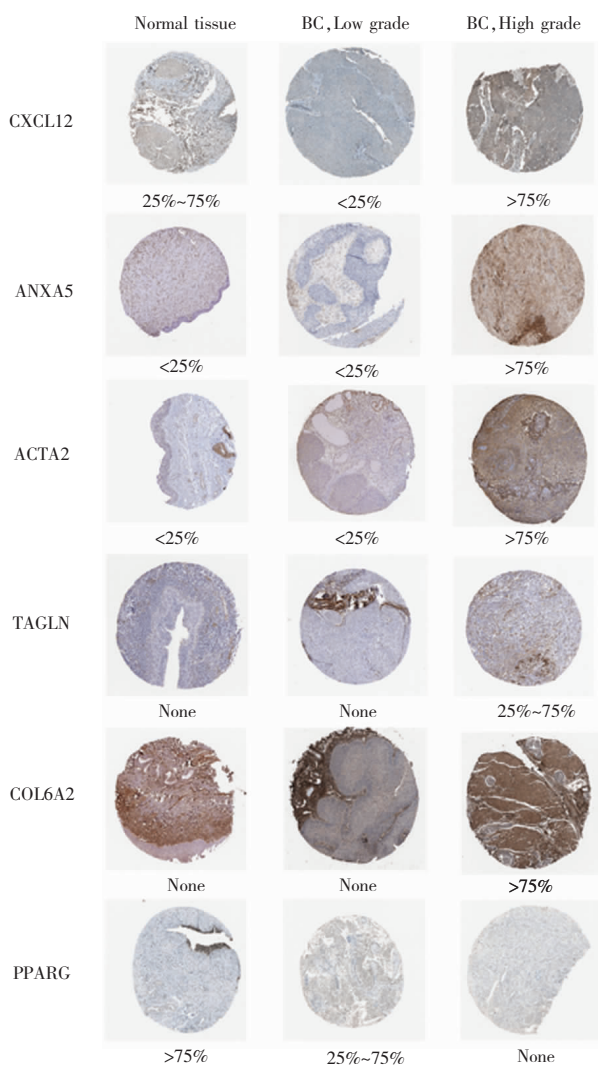
图 4 肿瘤数据库中关键基因表达水平

3 讨论

BC是全球常见恶性肿瘤之一,NMIBC 患者术后生物学行为及预后优于 MIBC,但其肿瘤复发、进展为 MIBC 概率大,成为当前诊疗过程中的难题^[4]。研究表明,延迟治疗超过 3 个月的 MIBC 患者术后病理级别更高,疾病进展率增高,疾病的特异性及总体生存率更差^[5]。因而对于已进展为 MIBC 的患者早期诊治尤为重要。通过本研究,在基因水平揭示

了 MIBC 与 NMIBC 的生物学差异性,并进而预测 BC 进展的潜在基因靶点。

本研究获得 MIBC 与 NMIBC 的 DEGs 主要富集在细胞外基质组织降解、细胞外结构组织重组的生物学功能中。细胞外基质是细胞在多个信号控制下合成和分泌大分子物质,主要分为间质基质和周围基质^[6]。这些大分子物质既影响已形成的基质网络的整体结构和生物力学性质,也影响传递给细胞的信号,从而调节细胞生长、迁移、存活、胞内平衡和形态等功能^[7]。MIBC 与 NMIBC 的临床病理鉴别依



注:图底百分比为免疫组化后尿路上皮细胞阳性细胞数

图5 关键基因基于 The Human Protein Atlas 的免疫组化

据是肿瘤细胞是否突破基底膜。基底膜是一种间质基质,为上皮细胞提供粘连蛋白聚合物及稳定结构的胶原网络。在差异性基因表达产物的作用下,肿瘤细胞产生刺激因子,导致细胞外基质发生改变,使细胞迁移性、形态及基底膜拉伸强度发生变化。导致 BC 细胞更容易突破基底膜,NMIBC 进展为 MIBC。本研究对 DEGs 进行 KEGG 分析发现,有 12 个基因参与 MAPK 信号通路,主要参与该通路中的 p38MAPK、JNK 通路。MAPK 在 BC 细胞处于对数生长期的阶段被激活,该通路的激活是 BC 进展及转移的重要事件^[8]。有研究报道 p38MAPK 可以调节 MMP-2、MMP-9 的表达,不仅降解细胞外基质,增强肿瘤细胞的侵袭性,同时可以维持肿瘤生长的微环境,对

肿瘤的生长有重要的作用^[9]。JNK 通路可以维持正常细胞的生长和促进肿瘤细胞的凋亡,但同时又会增加肿瘤细胞对抗肿瘤药物的耐药性,是一把双刃剑^[10]。因此,该通路对 BC 的转移及增加其侵袭性有着重要的作用。

本研究筛选出 6 个与 BC 进展的显著相关的关键基因,其中 CXCL12 是趋化因子 CXCR4 受体的配体,两者结合后通过 SHH、Wnt 等信号通路,促进上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),使细胞黏附性丧失进而使肿瘤细胞进展转移。有研究报告,上调 CXCL12 能激活 p38MAPK 通路,增加 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的表达,进而使胰腺癌细胞侵袭增加^[11]。CXCL12 mRNA 在膀胱正常尿路上皮细胞中不表达,而在 BC 尿路上皮细胞中,其表达量随 BC 浸润深度(临床分级、病理 pT 分级)增加^[12-14]。ANXA5 是 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,其表达水平在淋巴结阳性原发性 BC 组织中增加,具体机制可能与细胞凋亡及凋亡细胞相关炎性活动有关^[15]。TAGLN 属于微丝连接蛋白家族,通过改变细胞骨架和功能促使癌变,增强其侵袭力。在 BC 中 TAGLN 可以与 notch、TGF- β 、TNF- α 、NF- κ B 等多种信号通路作用,而这将促进肿瘤血管内皮细胞和周细胞生成,影响抗肿瘤药物的敏感性,成为 BC 晚期患者预后的关键因素,通过该机制使 TAGLN 可以成为一种潜在的抗肿瘤治疗靶点^[16]。ACTA2 及 COL6A2 在促进 BC 侵袭性的机制尚未见相关报道。研究显示,ACTA2 编码的细胞骨架蛋白可与磷酸甘油酸变位酶 1 相互作用,调节肌动蛋白丝组装、细胞运动和癌细胞迁移,促进乳腺癌的转移^[17]。在小鼠乳腺癌模型中,COL6A2 在 C5 结构域作用下,促进乳腺腺泡细胞 EMT,进而促进肿瘤生长和转移^[18]。PPARG 是转录因子的核激素受体超家族,在天然激动剂 15-d-PGJ2 的作用下,导致 BC 细胞的凋亡、生长抑制或分化,其表达和肿瘤的低复发有着密切关系。有研究报道该机制参与卡介苗抗肿瘤作用^[19-20]。上述分析揭示了这 6 个基因与 BC 侵袭性的密切关系,为治疗靶点提供了潜在可能。

综上所述,本研究通过对 MIBC 与 NMIBC 差异基因进行生物学分析,发现 DEGs 生物学作用主要

集中在对细胞外基质结构改变、MAPK 通路作用促进肿瘤的进展,而 *CXCL12*、*ANXA5*、*ACTA2*、*TAGLN*、*COL6A2*、*PPARG* 等 6 个预后相关基因可作为潜在的生物标志物,有助于 MIBC 早期诊断与靶向治疗,并为后续实验研究提供指导。

参 考 文 献

- [1] Liu X, Jiang J, Yu C, et al. Secular trends in incidence and mortality of bladder cancer in China, 1990–2017: a joinpoint and age-period-cohort analysis[J]. *Cancer Epidemiol*, 2019, 61: 95–103.
- [2] Sylvester RJ. Editorial comment on: prognostic factors in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin; multivariate analysis of data from four randomized CUETO trials [J]. *Eur Urol*, 2008, 53(5): 1002.
- [3] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284–287.
- [4] Bruins HM, Veskimäe E, Hernandez V, et al. The impact of the extent of lymphadenectomy on oncologic outcomes in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer: a systematic review[J]. *Eur Urol*, 2014, 66(6): 1065–1077.
- [5] Masic S, Smaldone MC. Treatment delays for muscle-invasive bladder cancer[J]. *Cancer*, 2019, 125(12): 1973–1975.
- [6] Theodoris AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 4–27.
- [7] Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(5): 830–833.
- [8] Kumar B, Sinclair J, Khandrika L, et al. Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(6): 1557–1564.
- [9] Kumar B, Koul S, Petersen J, et al. p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 832–841.
- [10] Yan D, An G, Kuo MT. C-Jun N-terminal kinase signalling pathway in response to cisplatin[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(11): 2013–2019.
- [11] Pan F, Ma S, Cao W, et al. SDF-1 α upregulation of MMP-2 is mediated by p38 MAPK signaling in pancreatic cancer cell lines[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(7): 4139–4146.
- [12] Li Y, Chen M, Yuan J, et al. CXCR4 expression in bladder transitional cell carcinoma and its relationship with clinicopathological features[J]. *Urol Int*, 2014, 92(2): 157–163.
- [13] Yang DL, Xin MM, Wang JS, et al. Chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 expressions and clinical significance in bladder cancer[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 17699–17707.
- [14] Batsi O, Giannopoulou I, Nesseris I, et al. Immunohistochemical evaluation of CXCL12–CXCR4 axis and VEGFR3 expression in primary urothelial cancer and its recurrence[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(7): 3537–3542.
- [15] Peng B, Guo C, Guan H, et al. Annexin A5 as a potential marker in tumors[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 427: 42–48.
- [16] Zhao F, Zhou LH, Ge YZ, et al. MicroRNA-133b suppresses bladder cancer malignancy by targeting TAGLN2-mediated cell cycle[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4910–4923.
- [17] Zhang D, Jin N, Sun W, et al. Phosphoglycerate mutase 1 promotes cancer cell migration independent of its metabolic activity[J]. *Oncogene*, 2017, 36(20): 2900–2909.
- [18] Lamandé SR, Bateman JF. Collagen VI disorders: insights on form and function in the extracellular matrix and beyond[J]. *Matrix Biol*, 2018, 71–72: 348–367.
- [19] Matsuyama M, Yoshimura R. A novel approach to anticancer therapies: peroxisome proliferator activator-receptor- γ as a new target therapy in the treatment of human urological cancer[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2009, 9(1): 76–83.
- [20] Langle Y, Lodillinsky C, Belgorosky D, et al. Role of peroxisome proliferator activated receptor- γ in bacillus Calmette-Guérin bladder cancer therapy[J]. *J Urol*, 2012, 188(6): 2384–2390.

(责任编辑:张学颖)