

泌尿生殖医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002559

烟草暴露对孕妇胎盘组织基因表达谱的影响

侯燕, 孙媛

(宁夏医科大学总医院产科, 银川 750004)

【摘要】目的:通过生物信息学分析烟草暴露与非暴露孕妇的差异表达基因谱(differentially expressed genes, DEGs), 对 DEGs 涉及的功能进行分析预测, 并找出关键基因。**方法:**从公共基因芯片数据平台(gene expression omnibus, GEO)检索吸烟对孕妇基因表达谱作用研究的 mRNA 基因芯片数据集 GSE30032, 通过 GEO2R 分析得到 DEGs, 并进一步用 DAVID 数据库对靶基因进行基因本体论(gene ontology, GO)和 KEGG 信号通路富集分析, 应用 Cytoscape 软件对模块中基因的共表达关系可视化, 筛选关键基因; 应用 GeneMANIA 数据库进一步对蛋白相互作用进行分析。**结果:**共筛选出 34 个烟草暴露与非暴露孕妇的差异表达基因, 其中 24 个 mRNA 表达上调, 10 个 mRNA 表达下调(筛选标准: $FC \geq 1.5$, $P < 0.05$)。GO 分析显示 DEGs 生物学过程主要涉及转录正向调控($P=0.009$)、细胞对铁离子的反应($P=0.013$)等; KEGG 分析显示 DEGs 主要和肿瘤相关通路($P=0.016$)和乙型肝炎($P=0.038$)等信号通路有关。蛋白质相互作用网络筛选出 *CDKN1A*、*SFN* 和 *TFAP2A* 等 8 个关键基因; GeneMANIA 数据库显示蛋白之间相互作用中蛋白共表达和物理相关性共占 91.62%, 是其相互作用的主要方式。**结论:**本课题通过多平台数据库有效筛选和分析孕妇烟草暴露后的相关差异表达基因, 为进一步探讨烟草作用的靶点及分子机制提供思路。

【关键词】烟草; 孕妇; Hub 基因; 生物信息学; 蛋白互作网络

【中图分类号】R114

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-02-14

Effects of tobacco exposure on gene expression profile in maternal placental tissue

Hou Yan, Sun Yuan

(Department of Obstetrics, General Hospital of Ningxia Medical University)

【Abstract】Objective: To explore significant differentially expressed genes (DEGs) through bioinformatics in tobacco exposed pregnant women and find Hub genes by analyzing and predicting the involved function of DEGs. **Methods:** The human mRNA gene chip dataset GSE30032 was extracted from common gene chip data platform of gene expression omnibus (GEO). GEO2R analysis was performed to obtain DEGs, gene ontology (GO) and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) signal pathway enrichment analysis were performed on the basis of DAVID database, the cytoscape software was used to construct the pathway network and GeneMANIA database was utilized for further protein interaction analysis. **Results:** A total of 34 DEGs were screened, of which 24 mRNAs were up-regulated and 10 mRNAs were down-regulated ($FC \geq 1.5$ & $P < 0.05$). GO analysis indicated that several functional pathways, such as positive regulation of transcription ($P=0.009$) and cellular response to iron ion ($P=0.013$) were enriched, and KEGG analysis showed the DEGs were enriched in prostate cancer ($P=0.016$) and hepatitis B ($P=0.038$) KEGG pathways. Eight genes including *CDKN1A*, *SFN*, *TFAP2A* and others were identified as Hub genes. GeneMANIA database showed that protein co-expression and physical interactions were the primary interaction pattern, accounting for 91.62%. **Conclusion:** This paper effectively screens and analyzes DEGs after pregnant women exposing to tobacco via various databases, providing thoughts for further investigating tobacco-functioned targets and molecular mechanism.

【Key words】 tobacco; pregnant women; Hub gene; bioinformatics; PPI network

作者简介: 侯燕, Email: 2497047680@qq.com,

研究方向: 妊娠期高血压及妊娠期糖尿病。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200618.1551.028.html>

(2020-06-19)

基础研究到临床观察多项证据显示,孕妇烟草暴露是多种不良妊娠结局的危险因素^[1-2]。孕妇在孕前、孕期主动或被动吸烟,出现胎儿畸形、生长受限及低出生体质量、神经精神系统疾病、呼吸系统等疾病的概率大大增加^[3]。

多环芳香烃、烟草特异性亚硝胺和芳香胺等是香烟烟雾中的有毒化学物质。这些化合物在怀孕期间可以转移到胎儿体内。胎盘是这些有毒物质的主要屏障。孕妇在妊娠早期吸烟可能造成绒毛膜缺氧,同时可能影响血管生成和细胞凋亡^[4]。有报道显示,孕妇烟草暴露可能会损害脐带血中单核细胞的细胞活力并破坏脐带结构,这个效应可能由氧化应激介导^[5]。孕期暴露在尼古丁环境中的大鼠,其子代成年后会出现明显的脂肪细胞肥大、胰岛变小,同时出现葡萄糖耐受不良和胰岛素抵抗^[6]。此外,吸烟与肺癌、食管癌、前列腺癌、宫颈癌和卵巢癌等多种肿瘤均呈较强的因果关系^[3]。由此可见,烟草暴露可能是由多种机制介导的影响机体多组织的分子过程。目前关于烟草暴露对机体生理和病理的分子机制研究虽然相对较多,但具体机制仍不清晰,尤其是关于烟草暴露对孕妇及胚胎发育影响的机制更是知之甚少。本课题侧重对孕妇胎盘组织的转录组学研究,分析妊娠期间吸烟和不吸烟妇女胎盘组织的转录谱,从而阐明烟草烟雾暴露独特和共同的基因组效应,探究孕期烟草暴露对孕妇机体作用的关键基因,为下一步机制研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 基因芯片的选取

本研究从美国国立生物技术信息中心的基因芯片数据平台(gene expression omnibus, GEO)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)搜索基因芯片数据集 GSE30032,芯片共包含 57 例样本,其中包含暴露于环境烟草烟雾(environmental tobacco smoke, ETS)的被动吸烟组胎盘组织($n=23$)和未暴露于 ETS 的胎盘组织($n=34$),其基因芯片平台是 Illumina Human Ref-8v3.0 expression beadchip。

1.2 差异表达基因的筛选

通过 GEO2R 分析,设定筛选条件 $P<0.05$,变化倍数(fold change, FC) ≥ 1.5 ,将得到的差异表达基因(differential gene expression, DEGs)去重,并删除无对应名称的基因片段,筛选

差异表达基因。

1.3 DEGs 的 GO 和 KEGG 分析

GO 的主要功能是注释基因或其产物并识别高通量基因组或转录组数据的特征生物学特性。GO 分析是从生物途径(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、细胞定位(cellular component, CC)对基因进行注释和分类^[7]。此外,KEGG 数据库可供查询通路信息和信号通路检索^[8]。本研究通过 DAVID(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8, <https://david.ncifcrf.gov/>)在线分析提供所需的 GO 生物功能富集数据和 KEGG 信号通路分析,以发现差异表达的基因可能参与的生物学通路^[9]。使用 Fisher Exact 或 EASE Score 统计方法,GO 各项和 KEGG 各项均以 $P<0.05$ 为筛选条件^[7]。

1.4 DEGs 关键基因筛选

本研究将筛选的 DEGs 植入 STRING(版本 11.0, <https://string-db.org/>)分析工具分析它们之间潜在的联系。把 STRING 的计算结果导入 Cytoscape(版本 3.7.2)^[10],应用 Cytohubba 插件筛选出 PPI 网络中处于关键位置的前 8 个 Hub 基因,并应用 Genecards 数据库获取这 8 个 Hub 基因的基本信息^[11]。

1.5 蛋白质相互作用关系分析

应用 GeneMANIA 数据库构建蛋白互作网络图。GeneMANIA 在线分析可以生成关于基因功能的假设,分析基因列表,并对功能分析的基因进行排序。将筛选得到的差异表达基因以标准基因名的形式上传到 GeneMANIA 数据库,进行蛋白相互作用分析,得到蛋白质相互作用网络图^[12]。

2 结果

2.1 筛选 DEGs

本研究选用基因表达芯片 GSE30032,共筛选出 34 个 DEGs,其中 24 个 mRNA 表达上调,10 个 mRNA 表达下调($FC \geq 1.5, P<0.05$)。

2.2 DEGs 的 GO 和 KEGG 分析结果

采用 DAVID 对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析,结果见表 1。其中生物学过程主要涉及转录正向调控和细胞对铁离子的反应等作用;分子功能主要涉及序列特异性 DNA 结合和 RNA 聚合酶 II 转录因子活性功能;KEGG 分析显示差异表达基因主要和肿瘤相关通路和乙型肝炎等有关。

2.3 DEGs 的 PPI 网络分析结果

将 DEGs 导入 STRING 和 Cytoscape 进行分析后得到 PPI 网络,根据 Degree 为标准,将前 20 个基因进行可视化展示(图 1A)。其中红色代表上调基因,蓝色代表下调基因。本研究按 MCC 为标准,最终筛选出处于关键位置的 8 个核心

基因(图 1B),分别用黄色、橙色和红色标注,颜色越深表明在网络中越关键,这些基因分别为 *CDKN1A*、*SFN*、*TFAP2A*、*SNAI2*、*CDK16*、*HFE*、*ANKHD1* 和 *NR2F2*。应用 Genecards 数据库获取这 8 个 Hub 基因的基本信息,见表 2。根据功能描述,发现这几个关键蛋白与细胞周期、转录调节等功能有关。

2.4 蛋白质相互作用关系分析

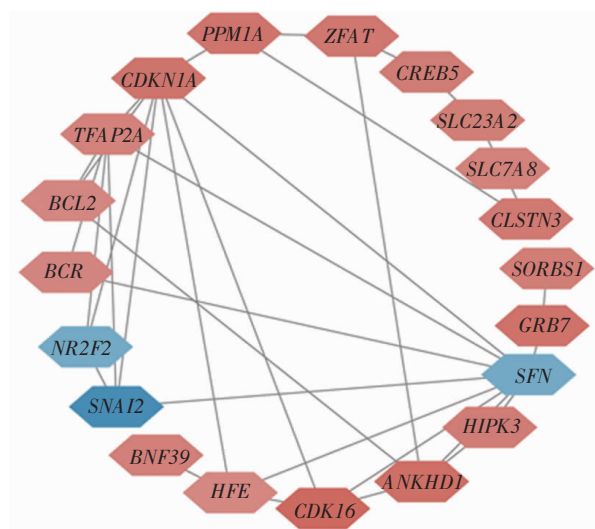
应用 GeneMANIA 数据库进一步挖掘 DEGs 作用模式,结果显示蛋白之间相互作用包括蛋白共表达、物理相关性、预测、共定位和基因相关性。不同类型相互作用所占比例如图 2 所示。蛋白共表达和物理相关性共占总作用模式的 91.62%,说明这 2 种作用模式是其主要方式。

表 1 与烟草暴露相关的 DEGs 的 GO 富集分析和 KEGG 分析

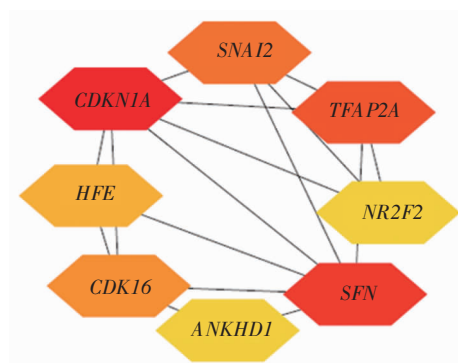
类别	名称	数目	P 值
GOTERM_BP_DIRECT	转录正向调控	4	0.009
GOTERM_BP_DIRECT	细胞对铁离子的反应	2	0.013
GOTERM_BP_DIRECT	线粒体细胞色素 C 释放	2	0.030
GOTERM_CC_DIRECT	细胞质	5	0.042
GOTERM_MF_DIRECT	序列特异性 DNA 结合	3	0.009
GOTERM_MF_DIRECT	RNA 聚合酶 II 转录因子活性	2	0.047
KEGG_PATHWAY	前列腺癌	5	0.016
KEGG_PATHWAY	乙型肝炎	6	0.038
KEGG_PATHWAY	肿瘤相关通路	4	0.048

表 2 8 个核心基因详细信息

mRNA 名称	Ensembl ID 序号	位置 (GRCh38/hg38)	基因描述	FC	P 值
<i>CDKN1A</i>	ENSG00000124762.13	chr6:36,676,460–36,687,339	周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A	1.69	0.011
<i>SFN</i>	ENSG00000175793.11	chr1:26,863,142–26,864,456	上皮细胞标记蛋白 1	1.53	0.007
<i>TFAP2A</i>	ENSG00000137203.10	chr6:10,393,186–10,419,659	激活增强子结合蛋白 2	1.58	0.002
<i>SNAI2</i>	ENSG0000019549.8	chr8:48,917,598–48,921,740	Snail 家族锌指转录因子 2	1.87	0.007
<i>CDK16</i>	ENSG00000102225.15	chrX:47,217,860–47,229,997	细胞周期蛋白依赖性激酶 16	1.80	0.002
<i>HFE</i>	ENSG0000010704.18	chr6:26,087,281–26,098,343	稳态铁调节器	1.53	0.008
<i>ANKHD1</i>	ENSG00000131503.20	chr5:140,401,814–140,539,856	锚蛋白重复序列和 KH 域蛋白 1	1.74	0.012
<i>NR2F2</i>	ENSG00000185551.12	chr15:96,325,928–96,340,263	核受体 2 亚族 F 组 2 号成员	1.52	0.011



A. Cytoscape 构建的差异表达基因互作网络图



B. 应用 cytohubba 插件筛选出的前 8 个 Hub 基因

图 1 DEGs 的 PPI 网络构建和关键基因筛选

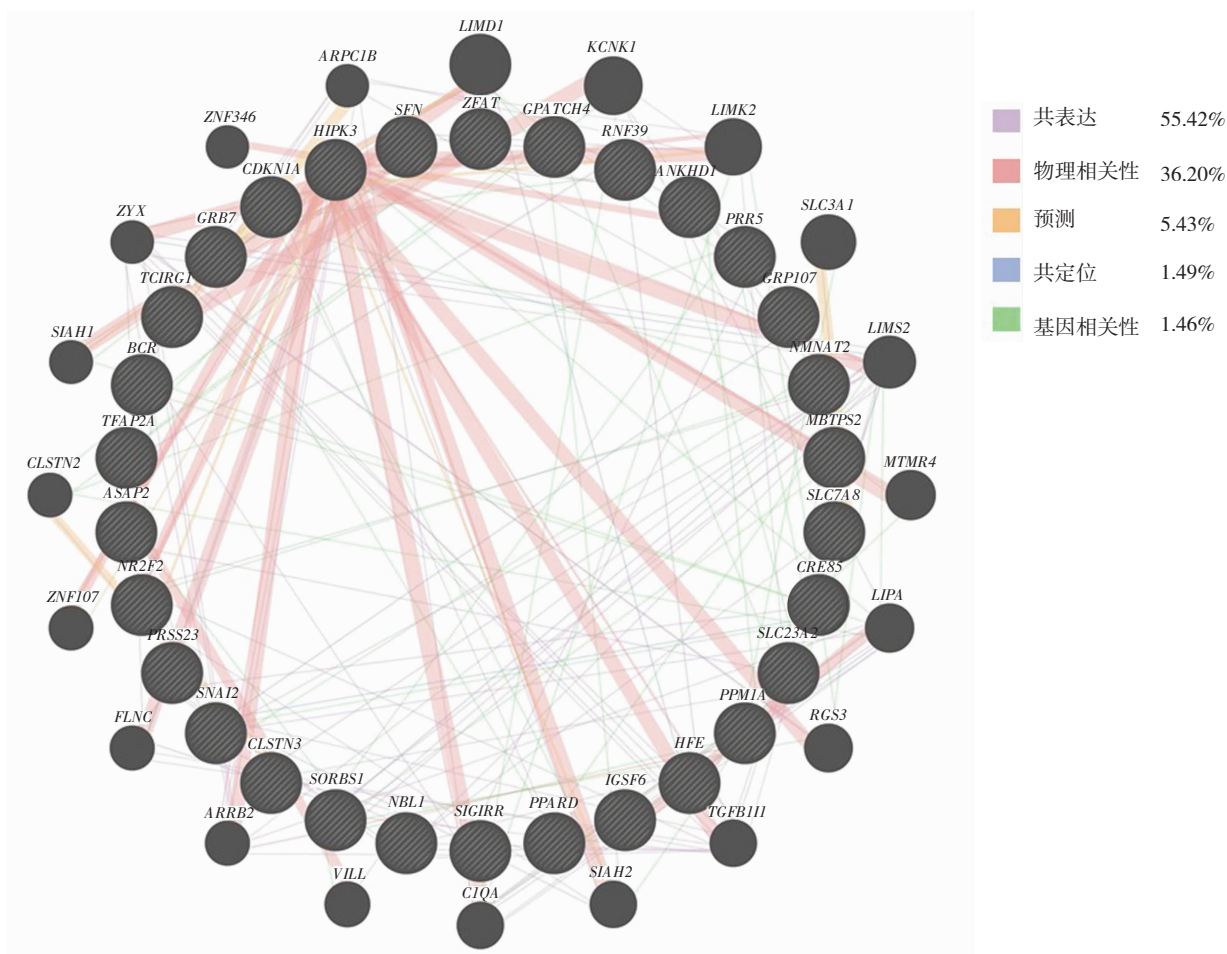


图2 GeneMANIA 构建的互作网络

3 讨论

孕妇烟草暴露已被证实为多种不良妊娠结局的危险因素^[2]。本研究的 GO 分析结果显示,差异表达基因生物学过程涉及转录正向调控。已有研究表明,烟草在体内可以调控多种基因表达。对妊娠期暴露于香烟烟雾的小鼠胎儿肝脏的研究表明,烟草暴露可使缺氧相关基因表达增加,并与白细胞增殖和分化有关^[1]。有报道显示,吸烟者胎盘中与异种代谢、抗氧化基因、滋养细胞和血管化基因相关的基因表达上调^[13]。

本研究结果显示,差异表达基因生物学过程还涉及细胞对铁离子的反应。过渡金属铁离子在生物体内氧自由基生成中起重要作用^[14]。烟草的主要成分尼古丁具有与游离铁络合的能力,从而降低其反应活性^[15]。有报道称,吸烟不仅会产生自由基,还会

消耗保护机体免受氧自由基有害影响的抗氧化系统,从而增加氧化应激。吸烟引起的胎儿生物分子氧化损伤增加与 100 多种疾病的发病机制有关^[16]。

此外,吸烟还与体内多种肿瘤具有直接或间接的相关性,包括肺癌、食道癌、前列腺癌等^[13]。本研究结果中 KEGG 信号通路富集分析也支持这一结论。此外,KEGG 结果显示差异表达基因富集到乙型肝炎信号通路。有报道显示,烟草的主要成分尼古丁能够刺激骨髓来源的树突状细胞,通过激活 PI3K-Akt 通路增强乙型肝炎病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞启动^[17]。综上所述,本课题综合多平台数据库能够有效预测孕妇烟草暴露后相关差异表达基因富集的生物功能和通路,可以为进一步探讨烟草作用的靶点及分子机制提供参考。

本研究通过蛋白质相互作用网络筛选出的关键基因中,CDKN1A 是细胞周期调节蛋白,在细胞增殖、分化、凋亡中起重要调控作用。研究显示,给

予尼古丁和可替宁(尼古丁代谢物),能够增加小鼠 *cdkn1a* 基因的表达^[18]。这提示此基因可能介导烟草暴露对机体的毒理作用。SFN 属于细胞周期检查点蛋白。有研究报道其为致癌基因,在致癌物尼古丁衍生物诱导的小鼠肿瘤中 *SFN* 基因表达量明显高于对照组^[19]。*TFAP2A* 作为转录因子,能够调控下游基因的转录水平,从而影响子宫内膜癌的发生发展^[20]。*ANKHD1* 被认为是一种支架蛋白,可能参与 caspases 的调控,已被发现是多种癌症的潜在生物标志物^[21]。其余的几个关键基因也都与细胞周期、转录调节等功能有关,通过影响细胞的增殖、周期、氧化应激等功能,进而可能在烟草对孕妇或胎儿的作用中发挥重要调控功能。GeneMANIA 数据库结果显示,蛋白共表达占总作用模式的 55.42%,说明这些差异表达基因可能是在促进肿瘤或氧化应激等作用中,通过协同的表达模式来发挥作用。本课题由于未进行相应的验证,所以具有一定的局限性。后续研究将结合分析结果在人胎盘组织及动物体内对本研究进行进一步的分析确定。总之,烟草暴露是由多种机制介导的影响机体多组织的分子过程,本课题研究结果为探究烟草暴露对孕妇或胎儿的作用机制提供了新的视角。

参 考 文 献

- [1] Brody JS. Transcriptome alterations induced by cigarette smoke[J]. Int J Cancer, 2012, 131(12):2754–2762.
- [2] Argalasova L, Zitnanova I, Vondrova D, et al. Self-reported exposure to ETS(environmental tobacco smoke), urinary cotinine, and oxidative stress parameters in pregnant women—the pilot study[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(9):E1656.
- [3] Chamberlain C, O'mara-Eves A, Porter J, et al. Psychosocial interventions for supporting women to stop smoking in pregnancy[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 2:CD001055.
- [4] Kawashima A, Koide K, Ventura W, et al. Effects of maternal smoking on the placental expression of genes related to angiogenesis and apoptosis during the first trimester[J]. PLoS One, 2014, 9(8):e106140.
- [5] Rua Ede A, Porto ML, Ramos JP, et al. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates[J]. J Biomed Sci, 2014, 21: 105.
- [6] Somm E, Schwitzgebel VM, Vauthay DM, et al. Prenatal nicotine exposure alters early pancreatic islet and adipose tissue development with consequences on the control of body weight and glucose metabolism later in life[J]. Endocrinology, 2008, 149(12):6289–6299.
- [7] 刘 慧, 陆嘉骏, 樊 璐, 等. 基于网络药理学和生物信息学的辛伐他汀分子生物学机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(14):1510–1513.
- [8] 柴 毅, 谭 峰, 樊巧玲. 用生物信息学分析预测绝经后骨质疏松症核心基因与互作 miRNA 的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(10):1267–1272.
- [9] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1):44–57.
- [10] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003, 13(11):2498–2504.
- [11] 张 远, 何 霞, 申俊兰, 等. 利用生物信息学数据库筛选药物药理学、药效学相关基因及其多态性位点[J]. 实用药物与临床, 2018, 21(9):1073–1077.
- [12] Max F, Harold R, Christian L, et al. GeneMANIA update 2018[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1):W60–W64.
- [13] Demarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review[J]. Mutat Res, 2004, 567(2–3):447–474.
- [14] Malczewska-Jaskóła K, Jasiewicz B, Mrówczyńska L. Nicotine alkaloids as antioxidant and potential protective agents against in vitro oxidative haemolysis[J]. Chem Biol Interact, 2016, 243:62–71.
- [15] Bridge MH, Williams E, Lyons ME, et al. Electrochemical investigation into the redox activity of Fe(II)/Fe(III) in the presence of nicotine and possible relations to neurodegenerative diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1690(1):77–84.
- [16] Hussain MS, Tripathi V. Smoking under hypoxic conditions: a potent environmental risk factor for inflammatory and autoimmune diseases[J]. Mil Med Res, 2018, 5(1):11.
- [17] Jin HJ, Li HT, Sui HX, et al. Nicotine stimulated bone marrow-derived dendritic cells could augment HBV specific CTL priming by activating PI3K–Akt pathway[J]. Immunol Lett, 2012, 146(1–2):40–49.
- [18] Chen X, Wang KS, Cederbaum AI, et al. Suppressed hepatocyte proliferation via a ROS–HNE–P21 pathway is associated with nicotine- and cotinine-enhanced alcoholic fatty liver in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 512(1):119–124.
- [19] Kim Y, Shiba-Ishii A, Ramirez K, et al. Carcinogen-induced tumors in SFN-transgenic mice harbor a characteristic mutation spectrum of human lung adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2019, 110(8):2431–2441.
- [20] Guangyu Z, Anjun M, Yuqin J, et al. LncRNA SNHG16 induced by TFAP2A modulates glycolysis and proliferation of endometrial carcinoma through miR-490-3p/HK2 axis[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(11):7137–7145.
- [21] Zhenyu Z, Hai J, Kangsheng T, et al. ANKHD1 is required for SMYD3 to promote tumor metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Canc Res, 2019, 38(1):18.

(责任编辑:冉明会)