

运用生物信息学方法探究肾上腺皮质癌的关键基因

戚蕙玥, 周益红, 戴英波

(中南大学湘雅三医院泌尿外科, 长沙 410013)

【摘要】目的:运用生物信息学方法筛选肾上腺皮质癌(adrenal cortical carcinoma, ACC)的差异表达基因, 为 ACC 诊疗提供新的生物标志物。**方法:**从 GEO 数据库中选择基因数据集 GSE14922、GSE19776、GSE12368, 通过 GEO2R 工具在线分析, 筛选出肾上腺皮质癌组织与正常肾上腺组织的差异表达基因。利用 DAVID 和 STRING 在线分析差异表达基因并构建蛋白-蛋白相互作用网络。运用 Cytoscape 软件筛选关键基因, 使用 GEPIA 在线分析关键基因与 ACC 预后的关系。**结果:**共筛选出 229 个差异表达基因, 其中上调基因 51 个, 下调基因 178 个。分析显示其显著富集于细胞周期、P53 信号通路, 分子功能主要涉及细胞骨架蛋白组合、生长因子结合功能。MCC 筛选出 8 个关键基因, 分别是 cyclinB1 (CCNB1)、cyclinA2 (CCNA2)、cyclin-dependent kinases (CDK1)、threonine-protein kinase BUB1 beta (BUB1B)、mitotic arrest deficient 2 like 1 (MAD2L1)、ribonucleotide reductase M2 (RRM2)、targeting protein for xenopus kinesin-like protein2 (TPX2)、aurora kinase A (AURKA), 通过 GEPIA 在线验证其在 ACC 中高表达且与 ACC 患者总体生存率及无病生存率密切相关。**结论:**CCNB1、CCNA2、CDK1、BUB1B、MAD2L1、RRM2、TPX2、AURKA 这 8 个基因可能作为协助 ACC 诊疗的新生物标志物。

【关键词】肾上腺皮质癌; 差异表达基因; 生物信息学分析

【中图分类号】R318.04

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-10-09

Exploring hub genes of adrenal cortical carcinoma by bioinformatics

Qi Huiyue, Zhou Yihong, Dai Yingbo

(Department of Urology, The Third Xiangya Hospital of Central South University)

【Abstract】Objective: To explore differentially expressed genes of adrenal cortical carcinoma (ACC) through bioinformatics, so as to provide new biomarkers for diagnosing ACC. **Methods:** Gene data sets of GSE14922, GSE19776 and GSE12368 were selected from the GEO database, and the differentially expressed genes of adrenocortical carcinoma tissues and normal adrenal tissues were screened by GEO2R tool online analysis. DAVID and STRING online databases were used to online analyze differentially expressed genes and construct a protein-protein interaction network. Cytoscape software was used to screen for hub genes. GEPIA was used to analyze the relationship between hub genes and ACC prognosis. **Results:** A total of 229 differentially expressed genes were screened out, of which 51 genes were up-regulated and 178 genes were down-regulated. Analysis showed that they were significantly enriched in the cell cycle and P53 signaling pathway and its molecular functions were mainly related to cytoskeletal protein combination and growth factor binding function. MCC selected eight key genes, namely cyclinB1 (CCNB1), cyclinA2 (CCNA2), cyclin-dependent kinases (CDK1), three-protein kinase BUB1 beta (BUB1B), mitotic arrest deficient 2 like 1 (MAD2L1), ribonucleotide reductase M2 (RRM2), targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2 (TPX2) and aurora kinase A (AURKA); GEPIA online database was used to verify they were highly expressed in ACC and were closely related to the overall survival rate and disease-free survival rate of ACC patients. **Conclusion:** Eight genes, including CCNB1, CCNA2, CDK1, BUB1B, MAD2L1, RRM2, TPX2 and AURKA, may be used as new biomarkers to assist the diagnosis and treatment of ACC.

【Key words】adrenal cortical carcinoma; differentially expressed gene; bioinformatics analysis

肾上腺皮质癌(adrenal cortical carcinoma, ACC)是一种较为罕见的恶性肿瘤, 发病率为每年每一百

万人中有 0.5~2 个新病例^[1], 并且在儿童时期和 40~50 岁有所增加^[2]。由于肾上腺皮质癌早期发病特征不明显, 导致 70% 的肾上腺皮质癌患者在被确诊时已处于 III 期或 IV 期^[3-4]。目前, 肾上腺皮质癌的治疗方法有手术、化疗和放疗等, 但是治疗效果均不理想^[5]。因此, 迫切需要了解肾上腺皮质癌发病的分子基础, 从而有助于发现新的诊断和治疗方法。本文

作者介绍: 戚蕙玥, Email: csqhyue@163.com,

研究方向: 泌尿外科。

通信作者: 戴英波, Email: daiyingbo@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81470925)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200423.0857.002.html>

(2020-04-23)

将尝试通过生物信息学方法从分子水平来探究肾上腺皮质癌的发病机制,以发现能用于指导临床诊断和治疗的分子标志物。

近年来,生物信息学分析方法飞速发展,为肿瘤研究不断提供新的方向和依据。本研究通过对 GEO 数据库的挖掘,筛选出肾上腺皮质癌的差异表达关键基因,有利于了解肾上腺皮质癌的发生发展过程,为肾上腺皮质癌的诊疗提供新的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 基因芯片数据获取

本研究从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)选择 GSE14922、GSE19776、GSE12368 三个基因数据集,共包含 75 例肾上腺皮质癌组织样本和 14 例正常肾上腺组织样本的基因表达数据。

1.2 筛选差异表达基因

利用 GEO2R 对 GSE14922、GSE19776、GSE12368 三个基因数据集进行分析,以 $P < 0.01$, $|\log_2FC| \geq 1$ 为截断标准分别筛选出 3 个数据集中的差异表达基因。

1.3 差异表达基因的 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)在线分析软件对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析并将其可视化,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

1.4 蛋白-蛋白互作网络构建与关键基因验证

将差异表达基因导入在线数据库 String^[8](<http://www.string-db.org/>)中进行分析,并利用 Cytoscape^[9]软件构建蛋白-蛋白互作网络,其中上调基因标记为红色,下调基因标记为蓝色。随后,使用插件 MCODE 挖掘蛋白-蛋白互作网络中连接紧密的模块(设置参数为:Degree Cutoff:2, Node Score Cutoff:0.2, K-Core:2, Max Depth:100)。最后,运用 MCC 算法筛选出 8 个关键基因。

1.5 GEPIA 分析验证

基于 TCGA 和 GTEx 数据库使用 GEPIA^[10](<http://gepia.cancer-pku.cn>)在线分析 8 个关键基因的表达与总体存活率(overall survival, OS)及无病生存期(disease free survival, DFS)之间的关联。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 肾上腺皮质癌与正常组织的差异表达基因

通过 GEO2R 在线分析,在基因芯片数据集 GSE14922、GSE19776、GSE12368 中分别筛选出 1 536、1 972 及 2 039 个差异表达基因,利用 VENN 图(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)将 3 个数据集基因取交集。在 3 个基因芯片数据集中共筛选出 229 个基因,其中上调 51 个基因,下调 178 个基因(图 1)。

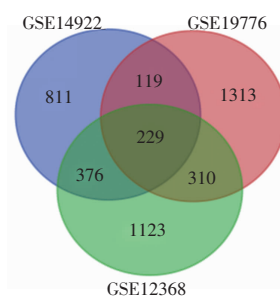


图 1 GSE14922、GSE19776、GSE12368 的差异表达基因

2.2 差异表达基因 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析

GO 功能富集分析表明肾上腺皮质癌中差异表达基因主要参与细胞周期进程、有丝分裂等生物学过程(图 2A);细胞组成分析提示这些差异基因主要定位在细胞外基质区域(图 2B);分子功能主要涉及细胞骨架蛋白结合、生长因子结合、内肽酶抑制剂活性等(图 2C)。KEGG 富集通路分析显示主要的信号通路包括细胞周期通路、P53 信号通路、卵母细胞减数分裂和肿瘤信号通路等过程(图 2D)。

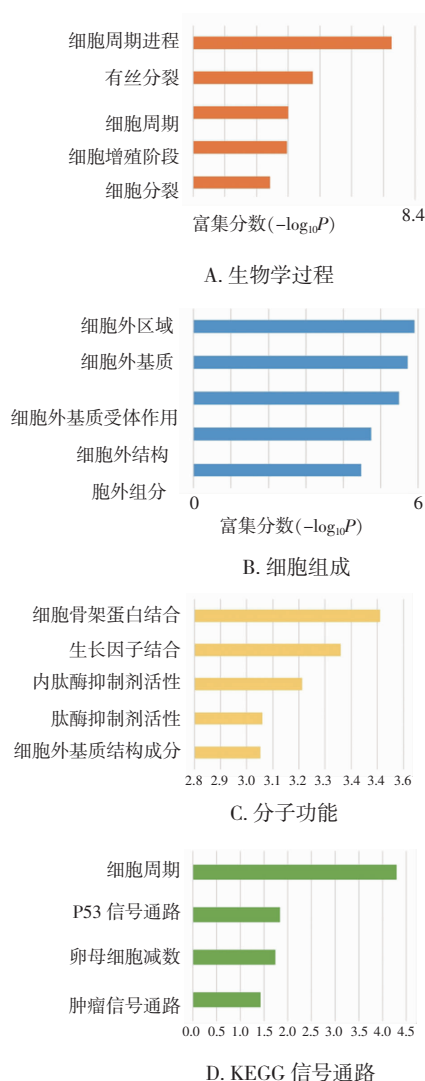


图 2 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析

2.3 差异表达基因的 PPI 网络分析

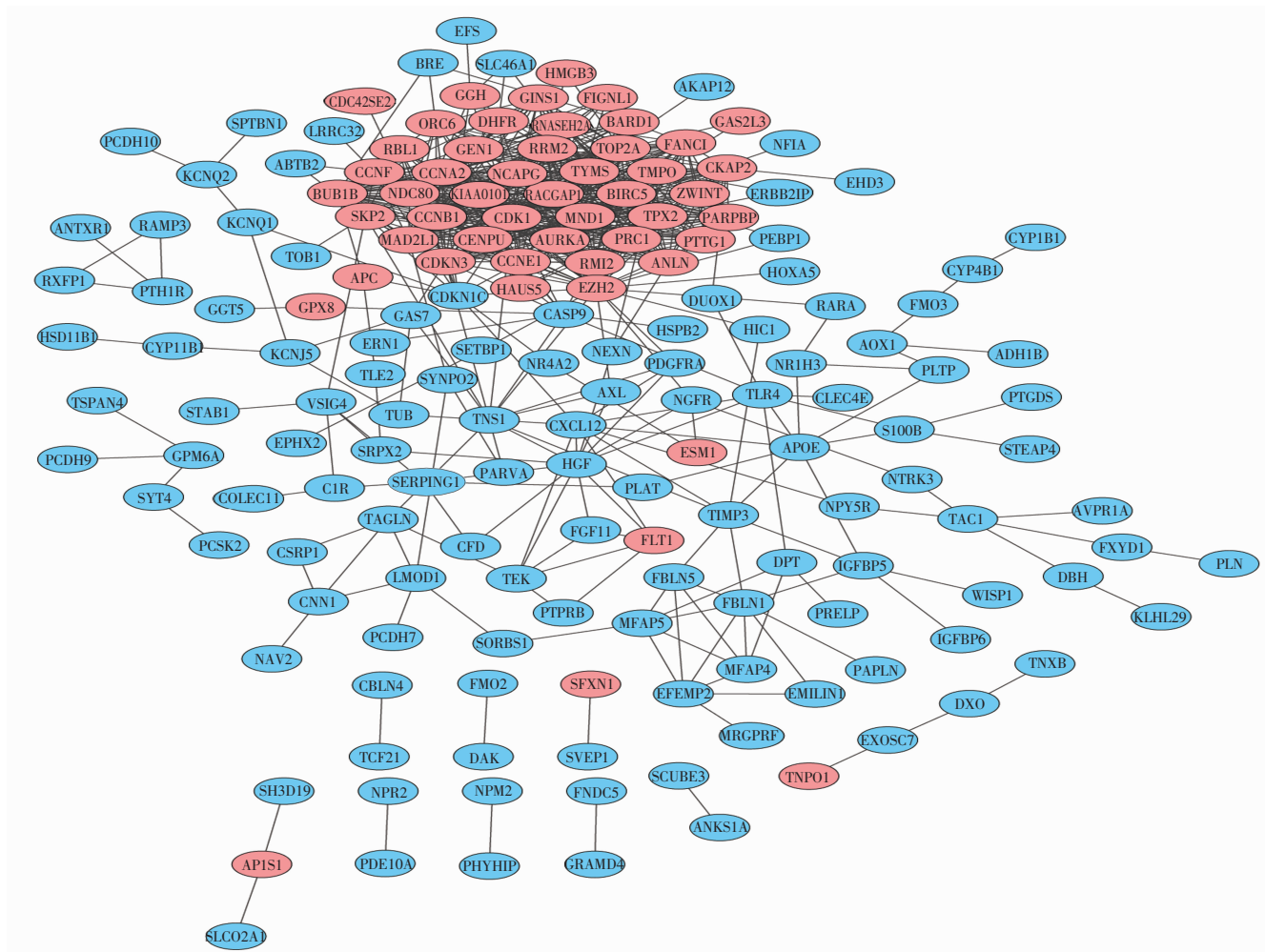
将差异表达基因导入 STRING 进行分析后得到 PPI 网络(图 3A),该网络由 173 个节点蛋白和 693 条相互作用关系构成。接着运用 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件生成连接紧密的模块,以 MCODE_Score 为依据展示联系最紧密的模块(图 3B)。再用 CytoHubba 插件的 MCC 算法筛选出前 8 个关键基因,分别为 *CCNB1*、*CCNA2*、*CDK1*、*BUB1B*、*MAD2L1*、*RRM2*、*TPX2*、*AURKA*(图 3C)。可以发现这 8 个关键基因均位于连接紧密的模块(图 3B)中。

2.4 关键基因表达验证

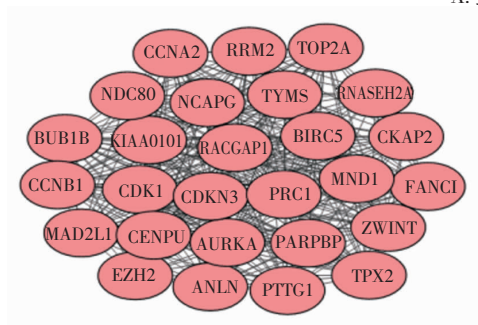
将筛选出的 8 个关键基因通过 GEPIA 分析其在 TCGA 和 GTEx 数据库中表达情况, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。发现与正常肾上腺组织对比,上述筛选出的 8 个关键基因在肾上腺皮质癌中均为高表达(图 4)。

2.5 关键基因的生存曲线分析

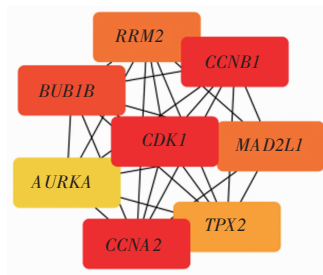
将筛选出的 8 个关键基因通过 GEPIA 分析其在高表达与低表达时总生存期和无病生存期对比情况(图 5,图 6), $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。结果提示 8 个关键基因表达趋势与肾上腺皮质癌的 OS 及 DFS 均呈负相关。



A. 蛋白相互作用网络

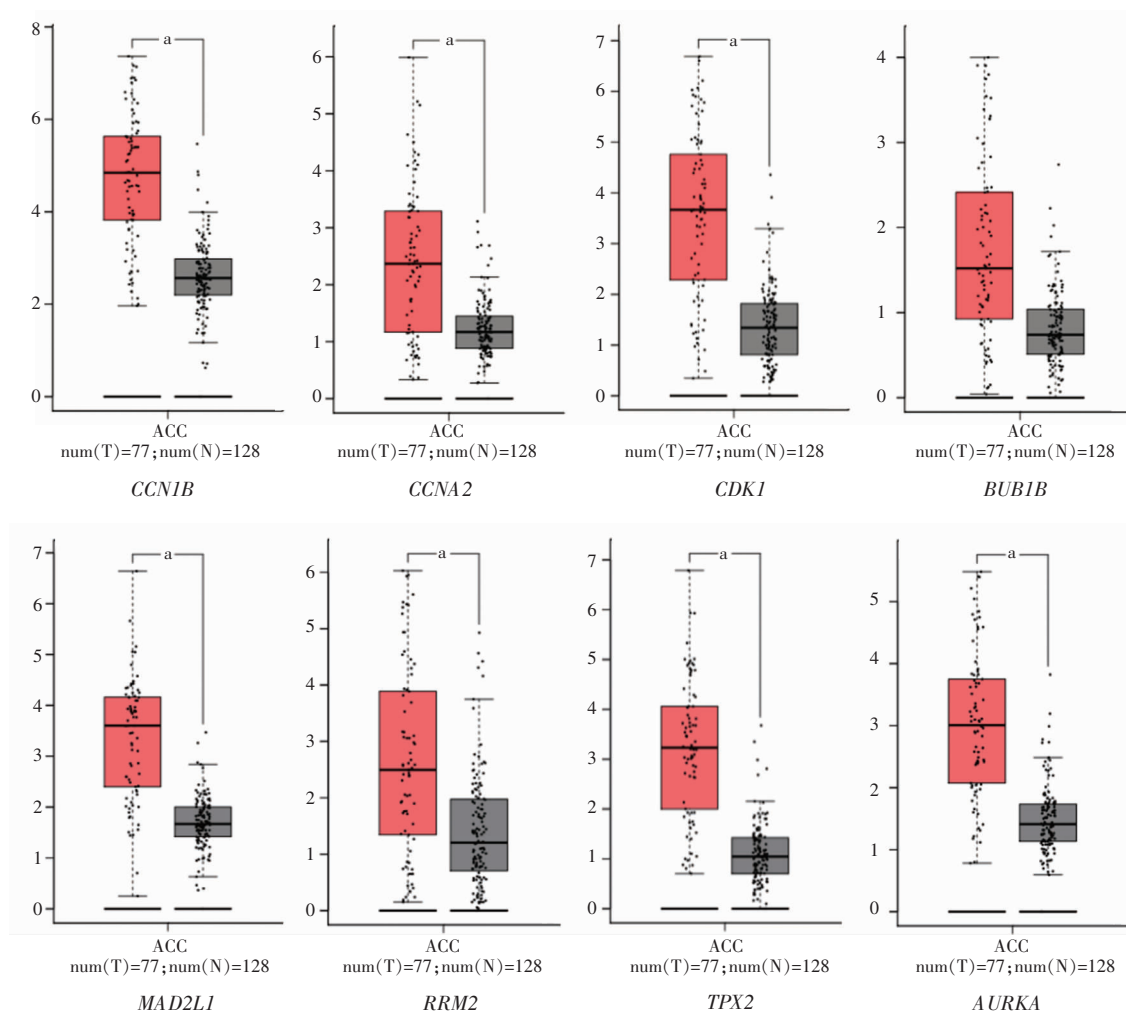


B. 核心模块



C. 关键基因

图 3 差异表达基因蛋白相互作用图、子模块相互作用图及关键基因



注: 红色为肾上腺皮质癌组织; 灰色为正常肾上腺组织; a 表示 $P < 0.05$

图 4 肾上腺皮质癌与正常肾上腺组织关键基因表达比较

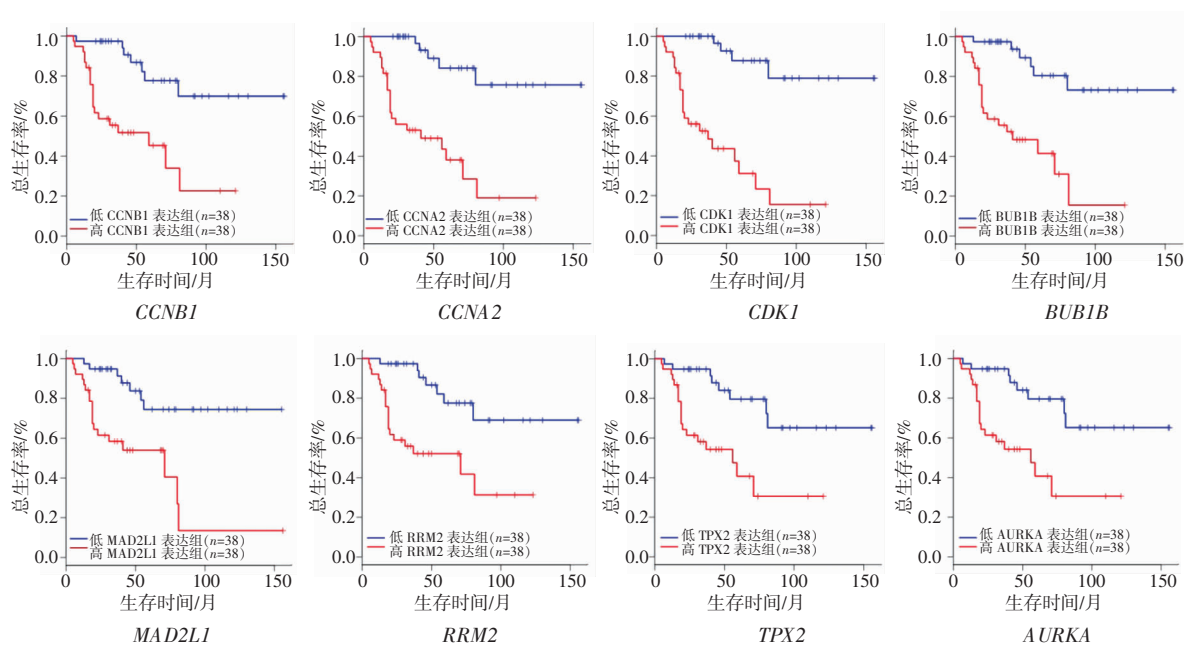


图 5 关键基因总生存率曲线分析

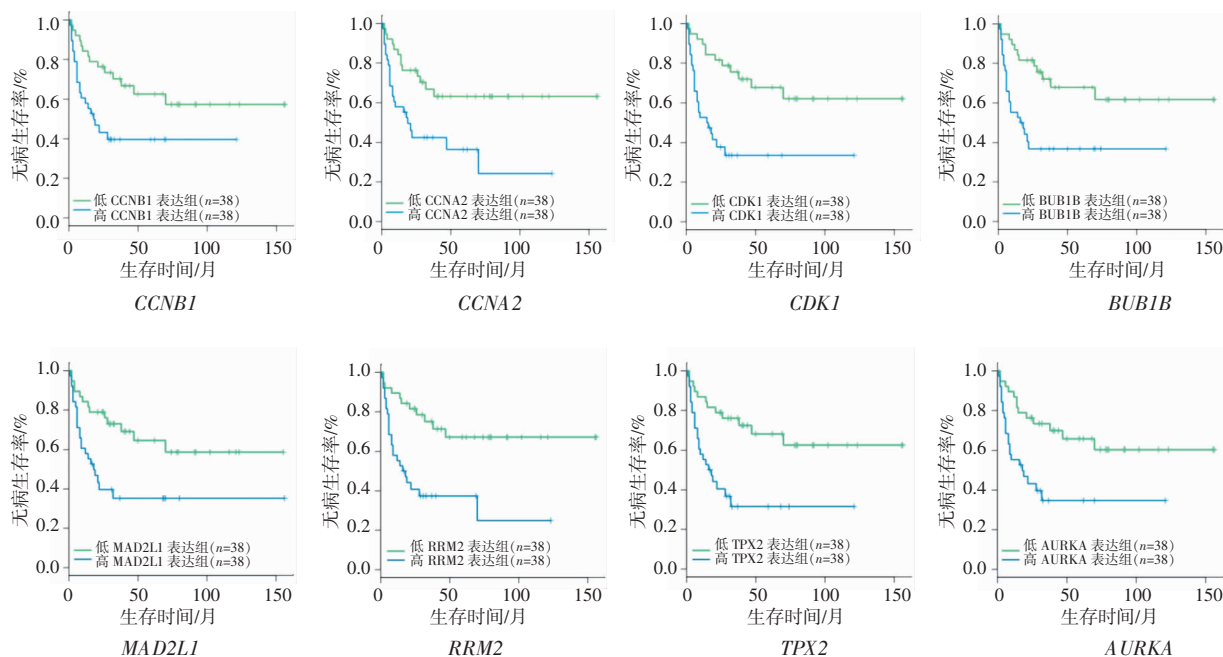


图6 关键基因无病生存率曲线分析

3 讨论

3.1 关键基因的生物作用

本研究通过 GEO2R 在线分析,从基因芯片数据集 GSE14922、GSE19776、GSE12368 中筛选出 229 个差异表达基因,其中上调 51 个基因,下调 178 个基因(图 1)。GO 功能注释富集分析和 KEGG 通路富集分析显示筛选出的差异表达基因主要参与细胞外基质及细胞周期的调节。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是一种由胶原蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白等组成的非细胞三维大分子网络。一方面,ECM 能够调节细胞结构形态及多种细胞功能,并且对维持体内平衡至关重要^[11]。另一方面,ECM 通过激发生化和物理信号以影响细胞黏附和迁移继而影响肿瘤进展^[12]。细胞周期有 4 个连续阶段,它的启动点位于复杂致癌信号网络汇聚点的下游,并且其反常表现是所有癌症异常细胞增殖的显著特征,因此细胞周期启动点是癌症中有希望的诊断和治疗靶标^[13]。本研究筛选的关键基因可能通过调节细胞周期来影响肾上腺皮质癌。

3.2 关键基因与肿瘤

研究发现,细胞周期蛋白 B1(cyclinB1,CCNB1)属于高度保守的细胞周期蛋白家族,并且在各种癌症类型中显著过表达^[14]。CCNB1 在调节和形成与

CDK1 的复合物中起关键作用,以促进从细胞周期的 G₂ 期向有丝分裂的转变^[15]。与肾上腺皮质腺瘤相比,ACC 中 CCNB1 的表达明显升高。细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinases,CDK1)属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族。作为一种高度保守的蛋白激酶复合物,它对真核细胞周期过程中的 G₁/S 和 G₂/M 期转变至关重要。Glover AR 等^[16]描述了肾上腺皮质癌组织样本中 CDK1 的上调。有丝分裂检查点丝氨酸/苏氨酸激酶 B(threonine-protein kinase BUB1 beta,BUB1B)是用于调节有丝分裂期间染色体分离主轴检查点的一个组成部分,大量报道证明,BUB1B 的过表达与膀胱癌、胃癌、食管鳞状细胞癌、乳腺癌、肝细胞癌等其他癌症进展及肿瘤复发相关联^[17-21]。Mete O 等^[22]研究证实 ACC 样品中 BUB1B 表达上调及随着肾上腺皮质癌级别越高 BUB1B 的表达也升高,且 BUB1B 显示出与有丝分裂显著相关。核糖核苷酸还原酶亚基 M2(ribonucleotide reductase M2,RRM2)作为细胞周期依赖性表达的基因在肾上腺皮质癌中与肾上腺腺瘤相比过表达。体外研究表明,吉西他滨对增殖和凋亡具有强烈的作用,然而,吉西他滨治疗后 RRM2 上调可能有助于对吉西他滨的耐药性研究,这有可能成为临床新的研究方向^[23]。细胞周期蛋白 A2(cyclinA2,CCNA2)属于高度保守的细胞周期蛋白家族,在控制 G₁/S 和 G₂/M 转换的细胞周期中起关键作用^[24]。Gao T 等^[25]发现,在

ER+乳腺癌中,CCNA2 高表达与他莫昔芬治疗的抗性和无病生存期不良预后相关。Xklp2 靶向驱动蛋白(targeting protein for xenopus kinesin-like protein2, TPX2)是有丝分裂过程的关键因素,Neumayer G 等^[26]总结了 TPX2 在细胞骨架形成和信号传导方面与癌症治疗相关的生物学作用,被确定可用来作为协助恶性肿瘤诊断和预后的标志物。TCGA 数据库和 cBioPortal 数据库的大数据挖掘,发现了涉及 DNA 损伤的基因极光激酶 A(aurora kinase A, AURKA),证实 AURKA 的过表达与肾上腺皮质癌患者较差的总体存活率相关^[27]。

综上所述,本研究筛选出的关键基因参与的生物过程及信号通路可能与肾上腺皮质癌的发病紧密相关。本次生物信息学分析为肾上腺皮质癌发病机制研究提供了新的方向,有助于寻找预测肿瘤发生发展的分子标志物,研发新的抗肿瘤靶向药物,这将有助于肿瘤的个体化治疗。

参 考 文 献

- [1] Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, et al. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7(6):323-335.
- [2] Kiseljak-Vassiliades K, Zhang Y, Bagby SM, et al. Development of new preclinical models to advance adrenocortical carcinoma research[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(4):437-451.
- [3] Bharwani N, Rockall AG, Sahdev A, et al. Adrenocortical carcinoma: the range of appearances on CT and MRI[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2011, 196(6):W706-W714.
- [4] Fay AP, Elfiky A, Teló GH, et al. Adrenocortical carcinoma: the management of metastatic disease[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 92(2):123-132.
- [5] Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(6):2027-2037.
- [6] Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1):207-210.
- [7] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1):44-57.
- [8] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):D362-D368.
- [9] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11):2498-2504.
- [10] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1):W98-W102.
- [11] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97:4-27.
- [12] Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10):E3028.
- [13] Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer[J]. *J Pathol*, 2012, 226(2):352-364.
- [14] Ding K, Li W, Zou Z, et al. CCNB1 is a prognostic biomarker for ER+ breast cancer[J]. *Med Hypotheses*, 2014, 83(3):359-364.
- [15] Fang Y, Yu H, Liang X, et al. Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(9):1268-1279.
- [16] Glover AR, Zhao JT, Gill AJ, et al. MicroRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34):36675-36688.
- [17] Yamamoto Y, Matsuyama H, Chochi Y, et al. Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 174(1):42-47.
- [18] Ando K, Kakeji Y, Kitao H, et al. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(3):639-645.
- [19] Tanaka K, Mohri Y, Ohi M, et al. Mitotic checkpoint genes, hsp-MAD2 and BubR1, in oesophageal squamous cancer cells and their association with 5-fluorouracil and cisplatin-based radiochemotherapy[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2008, 20(8):639-646.
- [20] Yuan B, Xu Y, Woo JH, et al. Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2):405-410.
- [21] Liu AW, Cai J, Zhao XL, et al. The clinicopathological significance of BUBR1 overexpression in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(11):1003-1008.
- [22] Mete O, Gucer H, Kefeli M, et al. Diagnostic and prognostic biomarkers of adrenal cortical carcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2018, 42(2):201-213.
- [23] Grolmusz VK, Karósi K, Micsik T, et al. Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(9):2041-2053.
- [24] Arsic N, Bendris N, Peter M, et al. A novel function for Cyclin A2: control of cell invasion via RhoA signaling[J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(1):147-162.
- [25] Gao T, Han Y, Yu L, et al. CCNA2 is a prognostic biomarker for ER+ breast cancer and tamoxifen resistance[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e91771.
- [26] Neumayer G, Belzil C, Gruss OJ, et al. TPX2: of spindle assembly, DNA damage response, and cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(16):3027-3047.
- [27] Subramanian C, Cohen MS. Over expression of DNA damage and cell cycle dependent proteins are associated with poor survival in patients with adrenocortical carcinoma[J]. *Surgery*, 2019, 165(1):202-210.

(责任编辑:张学颖)