

临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002579

生物钟相关基因在原发性肝细胞癌中的表达及临床意义 ——基于 TCGA 数据集分析

赵作梁, 吴奕隆, 商天宇, 林 苏, 朱月永

(福建医科大学附属第一医院肝病中心, 福州 350005)

【摘要】目的:探究生物钟相关基因在原发性肝细胞癌(简称肝癌)中的表达及意义。**方法:**从美国癌症和肿瘤基因图谱数据库(The Cancer Genome Atlas, TCGA)中下载肝癌数据 424 例,包括 374 例肝癌患者样本及 50 例正常对照样本。运用 DECenter 软件对 51 个生物钟相关基因进行差异表达分析,比较生物钟基因在肝癌患者及正常样本之间的表达情况。运用 DAVID 在线工具分析差异基因的 GO 及 KEGG 功能富集通路,并通过 STRING 数据库构建差异基因之间蛋白质相互作用网络。了解生物钟基因肝癌发生发展过程中的主要作用。**结果:**在 374 例肝癌患者样本的 51 个生物钟相关基因中,有 21 个基因在肝癌样本中表达上调($P<0.05$),3 个基因表达下调($P<0.05$)。生物钟基因高表达样本主要富集于 Wnt 信号通路、Hedgehog 信号通路及 Hippo 信号通路($P<0.001$)。参与调节昼夜节律和细胞代谢的 10 个生物钟基因在蛋白质相互作用网络中相关性最为紧密($P<0.001$)。GO 分析差异基因集中作用于调节昼夜节律、细胞代谢过程、基因表达等通路($P<0.001$)。**结论:**生物钟相关基因通过调节人体昼夜节律和细胞代谢参与原发性肝细胞癌的发生发展。

【关键词】原发性肝细胞癌;生物钟基因;TCGA**【中图分类号】**R735.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-10-20

Expression and clinical significance of circadian genes on primary hepatocellular carcinoma:an analysis study based on TCGA database

Zhao Zuoliang, Wu Yilong, Shang Tianyu, Lin Su, Zhu Yueyong

(Liver Research Center, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the relationship between primary hepatocellular carcinoma(HCC) and the expression of circadian genes. **Methods:** The profiles containing 424 samples were downloaded from The Cancer Genome Atlas(TCGA) of the United States, including 374 cases of hepatoma samples and 50 cases of normal samples. Fifty-one circadian genes were analyzed by DECenter, so as to obtain the differentially expressed genes(DEGs). The gene ontology(GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway enrichments of DEGs were performed by DAVID online analyses. The protein-protein interaction(PPI) networks of the DEGs were constructed through the STRING database. The circadian genes were studied on its main role in the occurrence and development of HCC. **Results:** A total of 51 DEGs were identified from 374 cases, among which 21 genes were upregulated($P<0.05$) and 3 genes were downregulated($P<0.05$). DEGs were mainly involved in the Wnt signaling pathway, Hedgehog signaling pathway and Hippo signaling pathway($P<0.001$). Ten DEGs involving in circadian rhythm and regulation of metabolic process were closely associated in the PPI network($P<0.001$). GO analysis showed that the biological functions of DEGs focused primarily on circadian rhythm, regulation of metabolic process and regulation of gene expression($P<0.001$). **Conclusion:** DEGs participate in the development of primary HCC through the pathway of circadian rhythm and cell metabolism.

【Key words】primary hepatocellular carcinoma; circadian gene; The Cancer Genome Atlas

原发性肝癌是常见的消化系肿瘤,成人以原发

性肝细胞癌(简称肝癌)最为多见^[1]。近年来肝癌发病率逐渐上升,成为全球第三大癌症死因^[2]。我国每年约有 11 万人死于肝癌,占全世界肝癌死亡人数的 45%。肝癌有早期症状不明显、恶性度高、进展快、预后差等特点,初级及二级预防尤为重要。

生物钟是广泛存在于人及其他哺乳动物中的

作者介绍:赵作梁, Email: 15280152338@163.com,

研究方向:病毒性肝炎及肝癌研究。

通信作者:朱月永, Email: zhuyueyong@fjmu.edu.cn。

基金项目:卫生厅中青年骨干资助项目(编号:2018-ZQN-54)。

优先出版:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200619.1517.016.html

(2020-06-22)

一种接近 24(19~28) h 的生物周期,生物钟通过调节昼夜节律使机体能够适应外界环境的变化^[3]。目前已发现 14 个生物钟核心基因与 37 个生物钟相关基因与人体生物节律的调节有关^[4-5]。此外,生物钟基因还能通过调控细胞周期、损坏 DNA 结构、参与细胞代谢等途径促进肿瘤的发生发展^[6-9]。乳腺癌、胃癌等均已被证实与生物节律紊乱有关^[10-11]。目前生物钟基因的异常表达与肝癌的关系尚不明确。本研究通过美国癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)公共数据集对 51 个生物钟基因在肝癌样本中进行表达汇编及富集分析,以进一步明确生物钟相关基因在肝癌组织中的表达情况,探索其临床价值。

1 一般资料与方法

1.1 数据资料收集

通过 TCGA 下载工具下载并预处理 424 例肝细胞癌患者数据集,包括 miRNA 表达、RNA_seqV2 数据及患者的临床数据集。

1.2 生物钟基因差异性表达分析

将数据集中 51 个生物钟基因的表达情况进行筛选重组并制成表达矩阵,导入 DECenter 软件。按 tumor vs. normal 对 424 例样本进行分组,作为分组文件导入 DECenter。采用 limma 包对数据进行差异分析(FDR=0.05,log₂ fold change=1)。通过 UALCAN 分析网站(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)对 51 个生物钟基因在肝癌中的表达情况进行在线生存分析并可视化。

1.3 KEGG 通路富集

采用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)进行在线富集分析。将生物钟基因输入 DAVID 数据库筛选转换后得出 KEGG 富集结果($P<0.05$),所得出的富集结果通过 Cytoscape 软件进行可视化。

1.4 蛋白质相互作用网络

利用 STRING 在线数据库(<https://string-db.org/>)对 24 个生物钟基因表达情况生成蛋白质相互作用(the protein-protein interaction,PPI)网络。相互作用的置信度设置为 40%,以剔除独立及相关性低的基因,并做可视化处理。采用 MCODE 软件计算网络中的核心作用模块,同时使用 bingo 软件将分析得到的核心模块进行基因功能富集分析。

2 结果

2.1 生物钟基因

调节人体生物钟的基因共 51 个,分别为 14 个生物钟核心基因及 37 个生物钟相关基因。具体见表 1。

2.2 生物钟基因差异表达情况

51 个生物钟基因中有 21 个表达上调(FDR<0.05),包括 ARNTL2 与 NPAS2 两个生物钟核心基因;3 个表达下调(FDR<0.05);27 个基因表达与正常对照组无明显差异(FDR>0.05),具体表达结果见表 2。利用 UALCAN 分析网站对 51 个生物钟基因进行生存分析,共 17 个基因与肝癌患者预后相关,14 个生物钟基因上调后患者生存期明显下降($P<0.05$),但核心基因 PER1、CRY2 高表达有利于患者预后($P=0.022$ 、 $P=0.015$),主要生物钟核心基因生存曲线如图 1 所示。

2.3 KEGG 富集通路分析情况

KEGG 富集分析后,上调基因主要富集于细胞节律($P<0.001$)、Wnt 信号通路($P<0.001$)、Hedgehog 信号通路($P<0.001$)以及 Hippo 信号通路($P<0.001$)等。其中 Wnt 信号通路与细胞不对称分裂、细胞分化、干细胞增殖相关,Hedgehog 信号通路与细胞增殖、组织构型、干细胞维持和发育相关。富集通路情况见表 3 及图 2。

2.4 PPI 网络

共有 21 个上调生物钟基因形成 48 对互作关系。PPI 节点度的前十位基因分别是 CSNK1E、CSNK1D、GSK3B、BTRC、NPAS2、PPP1CA、FBXW11、CSNK2B、PRKCA、PPARG。它们经过 GO 富集后,富集于调节昼夜节律、细胞代谢过程、基因表达节律等信息通路。PPI 网络如图 2 所示。

表 1 已知的生物钟基因

类别	名称
生物钟核心基因	PER1、RORA、PER3、RORB、CRY2、PER2、RORC、CRY1、NR1D2、CLOCK、ARNTL、NPAS2、NR1D1、ARNTL2
生物钟相关基因	HLF、TEF、PRKAA2、FBXL3、PPARG、NFIL3、NR1I3、FBXL21、PRKCA、TNF、PPARA、ALAS1、SIRT1、BHLHE41、CREB1、CSNK2B、FBXW11、BHLHE40、CSNK2A2、BTRC、EP300、IFNA1、PPP1CC、PPP5C、GNB2L1、CSNK1D、CREBBP、WDR5、PPP1CA、GSK3B、CSNK2A1、AHR、PARP1、CSE1L、NONO、CSNK1E、DBP

表 2 生物钟基因在肝癌样本中差异表达情况

类别	名称
上调	EF、PPARG、PRKCA、CREB1、CSNK2B、FBXW11、BTRC、PPP1CC、GNB2L1、CSNK1D、WDR5、PPP1CA、GSK3B、CSNK2A1、NPAS2、ARNTL2、PARP1、CSE1L、NONO、CSNK1E、DBP
下调	NFIL3、ALAS1、BHLHE40

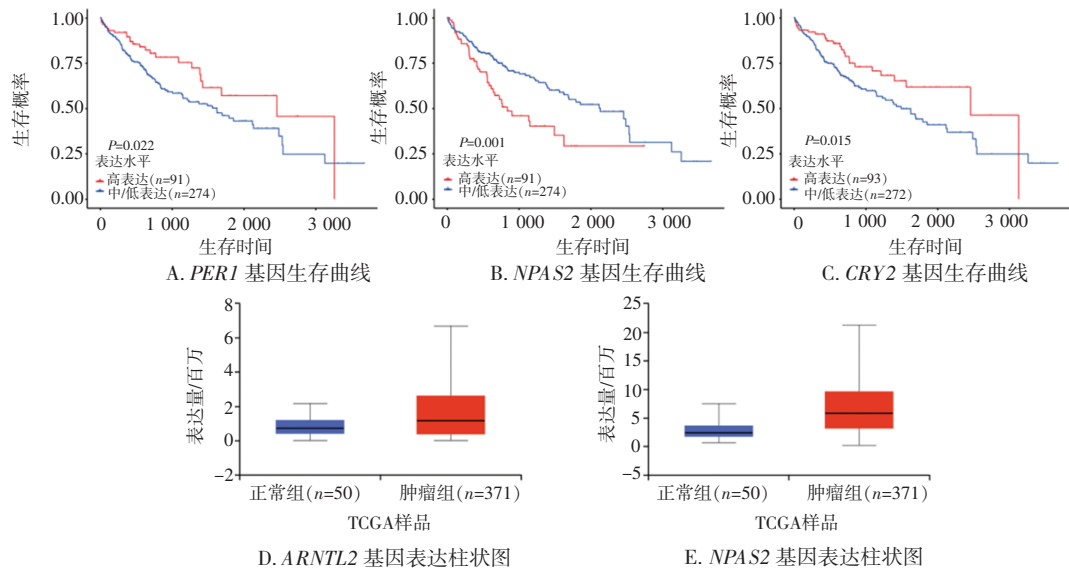


图 1 生物钟核心基因表达与肝癌的关系

表 3 KEGG 富集结果

通路通路	ID	基因数目	P 值	基因	功能
Circadian rhythm	hsa04710	5	< 0.001	NPAS2、FBXW11、CSNK1D、BHLHE40、CREB1	调节昼夜节律
Dopaminergic synapse	hsa04728	5	< 0.001	PRKCA、PPP1CC、PPP1CA、GSK3B、CREB1	调节多巴胺代谢
Wnt signaling pathway	hsa04310	5	< 0.001	FBXW11、CSNK2A1、PRKCA、GSK3B、CSNK2B	不对称分裂、细胞代谢
Hippo signaling	hsa04390	5	< 0.001	FBXW11、CSNK1D、PPP1CC、PPP1CA、GSK3B	细胞增殖、组织构型
Amphetamine addiction	hsa05031	4	< 0.001	PRKCA、PPP1CC、PPP1CA、CREB1	中枢兴奋
Insulin resistance	hsa04931	4	< 0.001	PPP1CC、PPP1CA、CREB1、GSK3B	胰岛素抵抗
Hedgehog signaling pathway	hsa04340	3	0.001 11	FBXW11、CSNK1D、GSK3B	细胞增殖、干细胞维持和发育
Herpes simplex infection	hsa05168	4	0.004 29	CSNK2A1、PPP1CC、PPP1CA、CSNK2B	单纯疱疹易感
Focal adhesion	hsa04510	4	0.005 98	PRKCA、PPP1CC、PPP1CA、GSK3B	细胞增殖分化
Melanogenesis	hsa04916	3	0.014 5	PRKCA、GSK3B、CREB1	黑色素生成
Measles	hsa05162	3	0.024 9	CSNK2A1、GSK3B、CSNK2B	麻疹易感
Tight junction	hsa04530	3	0.026 3	CSNK2A1、PRKCA、CSNK2B	细胞连接
Insulin signaling pathway	hsa04910	3	0.026 7	PPP1CC、PPP1CA、GSK3B	胰岛素信号通路
Oxytocin signaling pathway	hsa04921	3	0.034 3	PRKCA、PPP1CC、PPP1CA	催产素信号通路
cGMP-PKG signaling pathway	hsa04022	3	0.037 6	CREB1、PPP1CC、PPP1CA	糖原分解、细胞凋亡

3 讨论

本研究通过 TCGA 数据库在线分析了 51 个生物钟基因在各数据集中的表达情况。共有 21 个生物钟基因在 374 例肝癌样本中表达上调,并集中富集于 Wnt 信号通路、Hedgehog 信号通路和 Hippo 信号通路。其中在肝癌患者中表达上调的 NPAS2 是目前人类发现最大的生物钟核心基因,属于转录因子 bHLH-PAS 家族^[12]。干扰 NPAS2 正常表达能抑制正常细胞周期和 DNA 损失修复相关基因,可能诱发乳腺癌和非霍奇金淋巴瘤^[13]。相关研究指出,NPAS2 基因中的 2 个 SNP 位点,rs1053096 和 rs2305160 的

多态性与肝癌患者的生存率显著相关^[14]。本研究发现 NPAS2 基因高表达的肝癌患者生存率明显下降,提示生物钟基因 NPAS2 表达异常可能促进肿瘤的发生发展。PER1 和 CRY2 是重要的核心钟基因,也是肿瘤抑制基因。它们可以调节许多重要的下游蛋白,并与临床分期及淋巴结转移密切相关^[15]。PER1 和 CRY2 通过 cyclin CDK-CKI 通路导致细胞周期和增殖能力改变,从而与肝癌的发生发展相关^[16],其异常表达影响患者的预后和生存率。

本研究中生物钟基因所富集的 Wnt 信号通路是偶联生物钟基因和细胞周期的关键^[17]。全基因组染色质免疫沉淀测序(ChIP-Seq)分析显示,生物钟核心基因 ARNTL(BMAL)是核心生物钟中枢的正

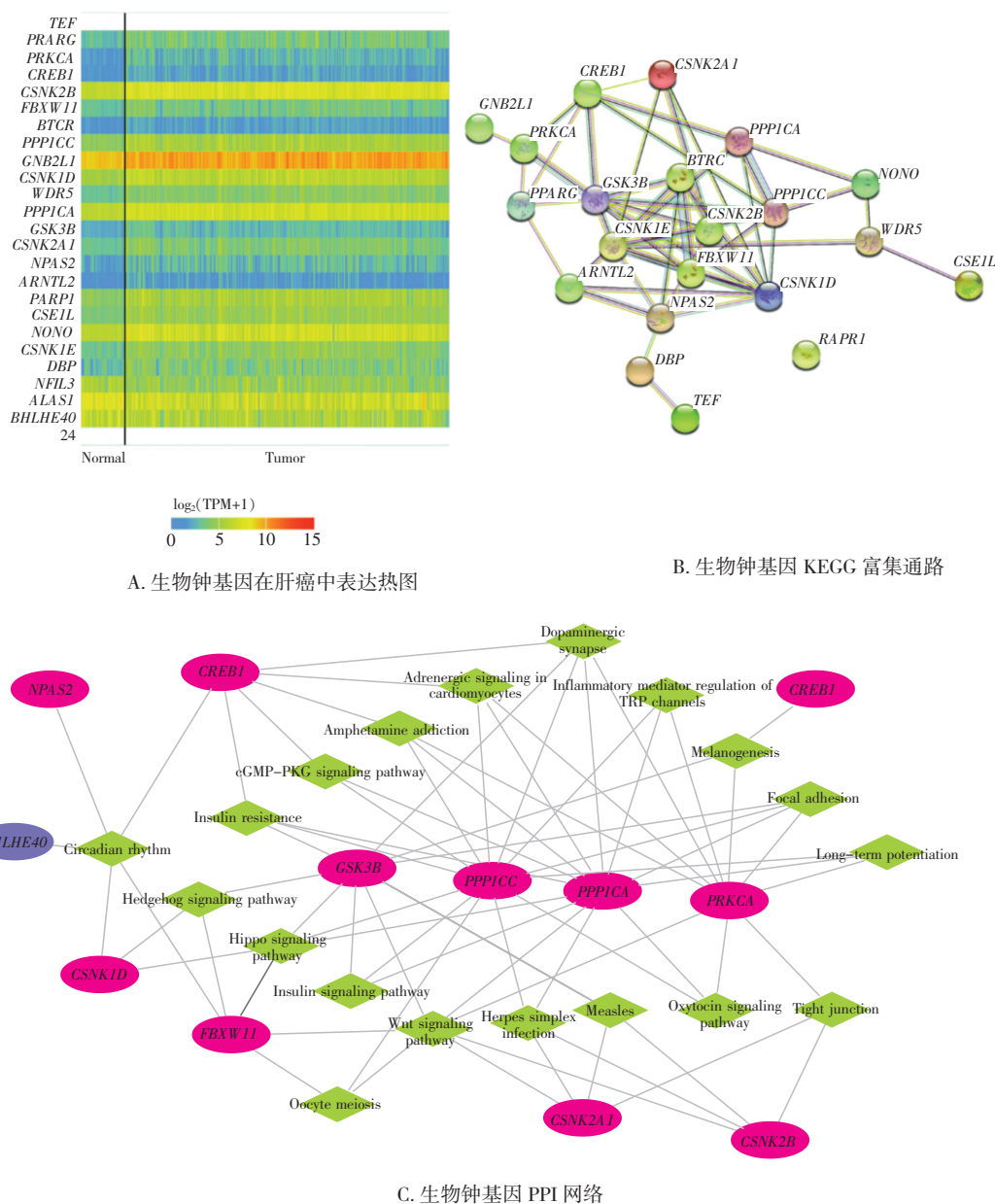


图 2 生物钟基因在肝癌中的表达情况及功能网络

调控因子,同时也占据了 Wnt 信号通路中的诸多位点^[18-19]。大量研究证实 Wnt 信号通路激活能够导致通路核心蛋白过度堆积,引起细胞异常增殖进而诱发癌变^[20-22]。不仅仅是 Wnt 通路,生物钟基因富集的 Hedgehog 信号通路、Hippo 信号通路也影响肝癌的发生发展^[23-24]。Hedgehog 信号通路机制是通过改变肝癌组织中 sonic hedgehog 异构体的表达量来调控癌细胞的增殖和参与癌细胞自噬作用^[25-27]。另有学者指出,肝癌的转移潜能和 Hedgehog 信号通路的激活成正相关^[28]。而 Hippo 信号通路对肝脏生长发育起到交通枢纽作用^[29],它通过改变 YAP 因子的路线,抑制肝细胞生长、诱导细胞凋亡、控制肝脏大小及

抑制肝脏肿瘤形成,但其通路中的调节因子发生突变也可能会导致组织器官发育异常和肿瘤形成^[30]。本研究通过生物钟基因构建 PPI 网络,生物钟基因翻译的蛋白可以影响正常细胞代谢和基因表达,这些同样与肝癌的发生密切相关。PPI 网络结果从另一个角度佐证了本次研究的结论。

本研究的优势在于利用 TCGA 数据库,通过大量临床数据研究特定生物钟基因在人体内的表达及作用。数据集经在线网络工具分析,易于获取、便于操作且简单直观。其不足之处在于:基于 TCGA 数据库的生信分析只是大数据理论分析,该数据库只提供了 mRNA 水平的数据,并无法完全代表差异基

因在肝癌样本中的蛋白表达情况。生物钟基因表达随人体的昼夜节律时刻变化,数据库只提供某一特定时间的表达情况,仍需在生物样本中进一步探索生物钟基因在不同时间点对人体导致肝癌的作用及其机制。

综上所述,以生物钟基因为靶点设计肿瘤治疗方法是当前肿瘤研究领域的热点之一。本研究提示生物钟基因可能通过 Wnt 信号通路、Hedgehog 信号通路和 Hippo 信号通路等调节人体生理节律及细胞代谢,进而参与肝癌的发生发展。这为以后深入研究肝癌的发生机制提供了线索和依据,同时在肝癌样本中异常表达的生物钟基因也为展开精准治疗提供可能的作用靶点。

参 考 文 献

- [1] Ozturk M, Batur T, Ekin U, et al. Molecular pathogenesis of liver cancer[J]. J Gastrointest Cancer, 2017, 48(3): 222–224.
- [2] Bertuccio P, Turati F, Carioli G, et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality[J]. J Hepatol, 2017, 67(2): 302–309.
- [3] Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics[J]. Science, 2010, 330(6009): 1349–1354.
- [4] Ye YQ, Xiang Y, Ozguc FM, et al. The genomic landscape and pharmacogenomic interactions of clock genes in cancer chronotherapy[J]. Cell Syst, 2018, 6(3): 314–328.e2.
- [5] Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(12): 886–896.
- [6] El-Athman R, Genov NN, Mazuch J, et al. The Ink4a/Arf locus operates as a regulator of the circadian clock modulating RAS activity[J]. PLoS Biol, 2017, 15(12): e2002940.
- [7] Lamia KA. Ticking time bombs: connections between circadian clocks and cancer[J]. F1000Research, 2017, 6: 1910.
- [8] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Kang TH, et al. Circadian clock control of the cellular response to DNA damage[J]. FEBS Lett, 2010, 584(12): 2618–2625.
- [9] Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P. Metabolism and the circadian clock converge[J]. Physiol Rev, 2013, 93(1): 107–135.
- [10] Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 350–361.
- [11] Keith LG, Oleszczuk JJ, Laguens M. Circadian rhythm chaos: a new breast cancer marker[J]. Int J Fertil Womens Med, 2001, 46(5): 238–247.
- [12] Yi CH, Zheng TZ, Leaderer D, et al. Cancer-related transcriptional targets of the circadian gene NPAS2 identified by genome-wide chip-on-chip analysis[J]. Cancer Lett, 2009, 284(2): 149–156.
- [13] Zhu Y, Leaderer D, Guss C, et al. Ala394Thr polymorphism in the clock gene NPAS2: a circadian modifier for the risk of non-Hodgkin's lymphoma[J]. Int J Cancer, 2007, 120(2): 432–435.
- [14] Yuan P, Wang S, Zhou F, et al. Functional polymorphisms in the NPAS2 gene are associated with overall survival in transcatheter arterial chemoembolization-treated hepatocellular carcinoma patients[J]. Cancer Sci, 2014, 105(7): 825–832.
- [15] Wang T, Wang Z, Yang P, et al. PER1 prevents excessive innate immune response during endotoxin-induced liver injury through regulation of macrophage recruitment in mice[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(4): e2176.
- [16] Mteyrek A, Filipski E, Guettier C, et al. Clock gene Per2 as a controller of liver carcinogenesis[J]. Oncotarget, 2016, 7(52): 85832–85847.
- [17] Matsu-ura T, Dovzhenok A, Aihara E, et al. Intercellular coupling of the cell cycle and circadian clock in adult stem cell culture[J]. Mol Cell, 2016, 64(5): 900–912.
- [18] Rey G, Cesbron F, Rougemont J, et al. Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver[J]. PLoS Biol, 2011, 9(2): e1000595.
- [19] Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals[J]. Nature, 2002, 418(6901): 935–941.
- [20] Geng M, Cao YC, Chen YJ, et al. Loss of Wnt5a and Ror2 protein in hepatocellular carcinoma associated with poor prognosis[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(12): 1328–1338.
- [21] Alvaro D, Mancino MG. New insights on the molecular and cell biology of human cholangiopathies[J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1/2): 50–57.
- [22] Loeppen S, Koehle C, Buchmann A, et al. A beta-catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrome P450 isoforms in mouse liver tumors[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(1): 239–248.
- [23] Zheng X, Yao YM, Xu QR, et al. Evaluation of glioma-associated oncogene 1 expression and its correlation with the expression of sonic hedgehog, E-cadherin and S100a4 in human hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2010, 3(6): 965–970.
- [24] Zheng X, Vittar NB, Gai XH, et al. The transcription factor GLI1 mediates TGFβ1 driven EMT in hepatocellular carcinoma via a SNAI1-dependent mechanism[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49581.
- [25] Efroni S, Meerzaman D, Schaefer CF, et al. Systems analysis utilising pathway interactions identifies sonic hedgehog pathway as a primary biomarker and oncogenic target in hepatocellular carcinoma[J]. IET Syst Biol, 2013, 7(6): 243–251.
- [26] Wang Y, Han C, Lu L, et al. Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Hepatology, 2013, 58(3): 995–1010.
- [27] Huang SH, He J, Zhang XL, et al. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(7): 1334–1340.
- [28] Zheng X, Gai XH, Han SS, et al. The human sulfatase 2 inhibitor 2,4-disulfonylphenyl-tert-butyl nitron (OKN-007) has an antitumor effect in hepatocellular carcinoma mediated via suppression of TGFB1/SMAD2 and Hedgehog/GLI1 signaling[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2013, 52(3): 225–236.
- [29] Kowalik MA, Saliba C, Pibiri M, et al. Yes-associated protein regulation of adaptive liver enlargement and hepatocellular carcinoma development in mice[J]. Hepatology, 2011, 53(6): 2086–2096.
- [30] van Rensburg HJJ, Yang XL. The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis[J]. Cell Signal, 2016, 28(11): 1761–1772.

(责任编辑:唐秋姗)