

网络出版时间: 2021-9-7 14:28 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1403.021.html>

胃癌嘌呤代谢通路差异基因筛选及其与预后关系的研究

吴思滢¹, 向丽娟², 包楚阳², 汪圣毅³, 王亚雷⁴, 刘虎¹

摘要 目的 探讨嘌呤代谢相关基因与胃癌患者预后的关系。方法 收集胃癌组织标本 91 例和癌旁组织标本 30 例, 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析胃癌嘌呤代谢相关通路中的关键基因 (KGS), 转录组测序筛选胃癌组织与癌旁组织之间的差异表达基因 (DEGs), 运用一系列数据库, 包括基因表达谱分析 (GEP) 和 Kaplan-Meier 绘图, 研究 DEGs 在胃癌患者中的独特表达和预后价值。结果 在嘌呤代谢通路上富集 85 个基因, 进行差异基因分析发现差异表达基因 25 个, 上调基因 15 个, 下调基因 10 个。进一步发现 5 个差异基因与胃癌的肿瘤分期明显相关 ($P < 0.05$)。检测到有 20 个基因与胃癌预后密切相关 ($P < 0.05$)。其中磷酸二酯酶 8B (PDE8B) 和磷酸二酯酶 9A (PDE9A) 对胃癌患者的生存预测显著, 风险率 (HR) 分别

为 1.87 和 1.58。结论 嘌呤代谢通路上的差异基因可能是胃癌潜在的预后标志物, 这为寻找胃癌生物标志物提供了新方向。

关键词 胃癌; 嘌呤代谢; 差异基因; 临床意义

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)11-1802-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.024

2021-07-29 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号: 81472750); 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH171)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院肿瘤内科, 合肥 230001

² 中国科学技术大学附属第一医院西区(安徽省肿瘤医院) 肿瘤化疗科, 合肥 230031

安徽医科大学第一附属医院³ 普外科、⁴ 消化内科, 合肥 230022

作者简介 吴思滢, 女, 硕士研究生;

刘虎, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: drliuhu@yahoo.com

我国是胃癌高发国家, 胃癌发病人数和死亡人数均位居恶性肿瘤第二位, 新发病例和死亡病例约占全球 42.6% 和 45.0%^[1]。胃癌的高发病率和病死率对公众健康造成重大威胁。大多数胃癌发现时已是中晚期, 且目前尚缺乏有效的预后及疗效预测生物标志物, 故进一步从分子水平上研究胃癌相关机制, 探索预测性标志物对改善胃癌患者的预后意义重大。

肿瘤代谢途径的失调和肿瘤的生长增殖密切相关, 肿瘤需要增加能量消耗来维持高代谢率, 这导致关键代谢途径的改变。肿瘤细胞的代谢活动与正常细胞有明显不同, 而嘌呤代谢是物质代谢的重要组成部分, 为 DNA 和 RNA 提供必要的成分, 嘌呤合成途径的基因也在肿瘤领域产生影响。现通过研究与嘌呤代谢相关的基因, 探讨其对胃癌预后的预测性

fasting insulin (FINS), fasting plasma glucose (FPG) levels of the two groups were analyzed. At the same time, the BMI level was divided into 4 intervals, and the distribution characteristics of insulin and blood glucose in the two groups under different intervals were compared. Then the variables with statistically significant differences were selected for Logistic regression analysis. **Results** The FPG, FINS and HOMA-IR indexes of the RSA group were higher than those of the control group ($P < 0.01$); The detection rates of impaired fasting blood glucose (IFG) and insulin resistance (IR) in the RSA group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The occurrence rate of abnormal BMI and glucose metabolism in the RSA group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The generation rate of abnormal glucose metabolism in overweight and obese patients in the RSA group was higher than that in the control group ($P < 0.05$); the detection rate of IR in normal weight patients in the RSA group was higher than that in the control group ($P < 0.01$). Multivariate analysis showed that IR was a risk factor for RSA. **Conclusion** The occurrence of RSA is related to IR and abnormal glucose metabolism. Overweight or obese patients with RSA are more likely to have glucose metabolism disorders, and attention should be paid to the endocrine metabolism status of women with RSA of normal weight.

Key words recurrent spontaneous abortion; body mass index; glucose metabolism; insulin resistance

潜在意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料 本研究收集了安徽医科大学第一附属医院 2017 年 4 月 6 日–12 月 22 日住院的胃癌患者术后组织标本 91 例及相应癌旁正常组织标本 30 例。本研究经过大学伦理委员会批准(批准号: 20140141)。纳入标准: 所有癌症组患者均是经过手术病理证实的原发性胃癌; 良性对照均经过胃镜病理报告证实; 入组患者均签署知情同意书。排除标准: 癌症组患者均未进行过任何放疗、化学治疗以及靶向治疗; 入组患者均无其他恶性肿瘤病史; 入组患者均无心脏、肝脏、肺、肾脏等重大器官病史; 入组患者均无免疫系统病史和代谢疾病; 入组患者均无口腔疾病且在短期内均无上呼吸道感染病史。

1.2 数据库数据 从 GEPIA 数据库提取数据: GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 是由北京大学研制订开发的用于整合分析癌症表达谱数据的交互式服务器^[2], 包含来自 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 的 9 736 肿瘤样本和 8 587 个正常样本, 覆盖 33 种癌症。本研究通过 GEPIA 数据库分析 DEGs 转录水平与肿瘤分期的关系。

Kaplan-Meier plotter (www.kmplot.com) 是一个包含微阵列基因表达数据和生存信息的在线数据库, 该数据库来源于 GEO (gene expression Omnibus)、TCGA 和癌症生物医学信息网格, 包含临床胃癌患者的基因表达数据和生存信息^[3]。应用 Kaplan-Meier plotter 来评估 DEGs 的预后价值。通过中值表达量将患者分为两组(高表达 vs 低表达), 评估总生存期(overall survival, OS)。

1.3 转录组测序主要仪器和耗材 琼脂糖凝胶电泳系统购于 Nanodro 公司(美国); Nano Photometer® 分光光度计购于 Implen 公司(德国); 安捷伦 2100 生物分析仪购于 Agilent 公司(美国); Qubit® 2.0 荧光计购于 Invitrogen 公司(美国); HiSeq Xten 测序仪购于 Illumina 公司(美国); TruSeq PE 簇生成试剂盒 v3-cBot-HS 购于 Illumina 公司(美国); NEB Next® Ultra™ RNA 文库制备试剂盒、Oligo d(T) 25 磁珠、25X Fragmentation Buffer 购于 NEB 公司(美国); Superscript II 逆转录试剂盒、TRIzol 试剂购于 Invitrogen 公司(美国); 核酸纯化试剂盒 AMPure XP 购于 Beckman Coulter 公司(美国)。

1.4 标本处理 取 200 mg 组织标本提取 RNA, 采

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 是否发生降解及有无 DNA 污染。确认后检测 RNA 的纯度、浓度以及完整性。随后在 NEBNext 碎片缓冲液中用二价阳离子将得到的 mRNA 随机打断, 按照 NEB 普通建库方式或链特异性建库方式进行建库。文库构建完成后, 先使用 Qubit 2.0 荧光剂进行初步定量, 符合预期后, 使用 qRT-PCR 对文库有效浓度进行准确定量(文库有效浓度高于 2 nmol/L) 以保证文库质量。库检合格后上机测序。经过测序错误率检查、胃癌含量分布检查及原始数据(raw read) 过滤, 获得后续待分析数据(clean reads), 采用 STAR(v2.5.1b) 软件对获得的 clean reads 进行比对分析, 使用 HT-Seq(v0.6.0) 进行基因水平定量分析, RSEM(v1.2.28) 进行转录本水平的定量分析。

1.5 统计学处理 采用 clusterProfiler(v3.0.5) 软件对基因集进行 KEGG 通路富集分析, 寻找与代谢通路相关的基因, 以筛选差异表达的基因, 将 \log_2 Fold Change > 1 且显著性 P 值(P -value) < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异基因表达 通过 KEGG 富集分析, 有 85 个基因映射到嘌呤代谢通路上, 见表 1。将这些基因通过 edgeR 软件筛选差异基因。将 \log_2 Fold Change

表 1 胃癌组织与正常组织在嘌呤代谢通路上富集的基因

KEGG 通路编号	通路编号的功能描述	基因数	注释到通路的基因
hsa00230	嘌呤代谢	85	ADA/PAPSS1/ADPRM/GUCY2C/PDE8B/ PAICS/POLD1/AMPD2/GMPR/PGM2/ RRM2/POLD3/NME5/ADCY3/ADCY8/ PRIM2/POLR3G/POLE2/NT5C1A/ POLR1A/ENTPD6/GUCY1A3/PKM/ AMPD1/GUCY1A2/FHIT/PDE3A/ NUDT5/PPAT/NME2/ADSSL1/PDE4D/ PFAS/PNPT1/POLR1B/ADCY7/NT5C3A/ PDE1C/POLE3/PDE4A/PDE9A/ENTPD2/ PDE4B/PAPSS2/GART/NT5E/GMPS/ PRIM1/POLR3GL/PRPS2/ADSL/GMPR2/ NME7/POLR2D/GDA/ITPA/XDH/ POLR1C/ENTPD1/POLR3A/PRPS1/ POLA1/RRM1/POLR1D/POLR3D/ ATIC/PNP/POLE4/PGM1/AK4/ POLE/PDE3B/AK5/POLR3B/PDE7A/ NT5M/ENTPD5/DGUOK/ENPP3/PDE6A/ POLR2J2/GUCY1B3/ADCY9/ADCY1/NME1

的绝对值大于1且显著性 P 值(P -value) < 0.05 作为胃癌组织和癌旁正常组织差异表达基因筛选标准,一共检测出差异常表达基因25个,其中上调基因15个,下调基因10个,火山图表明了胃癌组织和正常组织间差异有统计学意义的表达基因分布情况,见图1,上调基因用红点表示,下调基因用绿点表示。

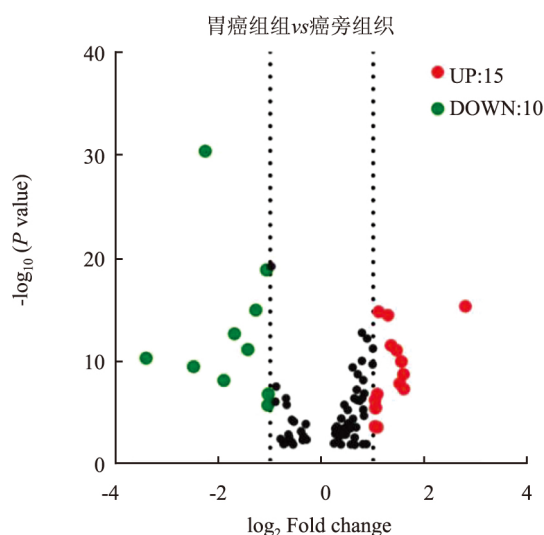


图1 胃癌组织与癌旁组织差异表达基因火山图

2.2 嘌呤代谢通路 DEGs 的预后分析 进一步通过 Kaplan-Meier 绘图分析,初步评估了所有 DEGs 的预后意义。有20个差异基因与 OS 密切相关($P < 0.05$)。森林图(图2)显示单变量 COX 回归分析的 HR 值,其中 $HR > 1$ 是危险因素,包括 GDA($HR = 1.47$, 95% CI 1.24 ~ 1.74)、ADCY3($HR = 1.38$, 95% CI 1.17 ~ 1.64)、ADCY8($HR = 1.32$, 95% CI 1.12 ~ 1.57)、ADPRM($HR = 1.54$, 95% CI 1.24 ~ 1.91)、ADSSL1($HR = 1.3$, 95% CI 1.05 ~ 1.61)、ENTPD2($HR = 1.42$, 95% CI 1.2 ~ 1.69)、GMPR($HR = 1.27$, 95% CI 1.07 ~ 1.5)、GUCY1A2($HR = 1.44$, 95% CI 1.21 ~ 1.7)、GUCY1A3($HR = 1.32$, 95% CI 1.12 ~ 1.67)、NME5($HR = 1.25$, 95% CI 1.05 ~ 1.48)、PDE3A($HR = 1.4$, 95% CI 1.18 ~ 1.66)、PDE8B($HR = 1.87$, 95% CI 1.5 ~ 2.33)、PDE9A($HR = 1.58$, 95% CI 1.33 ~ 1.88)、POLD1($HR = 1.32$, 95% CI 1.12 ~ 1.57)、XDH($HR = 1.5$, 95% CI 1.27 ~ 1.78)。 $HR < 1$ 是保护因素,包括 NME2($HR = 0.8$, 95% CI 0.58 ~ 0.95)、GUCY2C($HR = 0.76$, 95% CI 0.64 ~ 0.91)、PAICS($HR = 0.77$, 95% CI 0.64 ~ 0.91)、PDE4B($HR = 0.69$,

95% CI 0.55 ~ 0.82)、RRM2($HR = 0.73$, 95% CI 0.61 ~ 0.86)。其中, PDE8B、PDE9A 对胃癌患者的生存预测显著, HR 分别为 1.87 和 1.58。

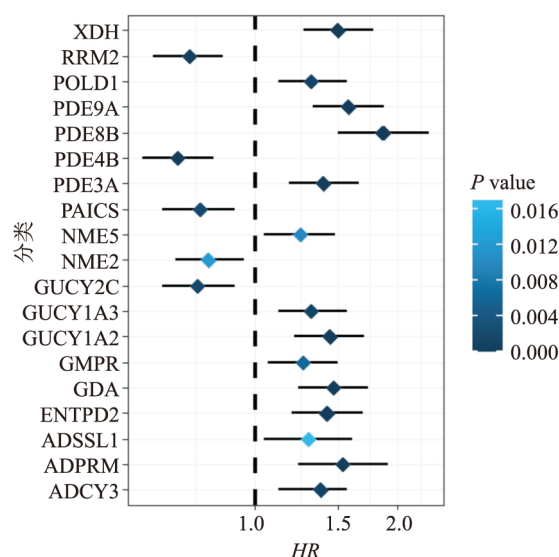


图2 DEGs 单因素 COX 回归分析 HR 值的森林图

2.3 GEPIA 数据库分析 利用 GEPIA 数据集分析胃癌患者 DEGs 转录水平与肿瘤分期的关系,见图3。结果显示 PDE3A、PDE4B、ADCY7、AMPD1、GUCY1A3 的 mRNA 表达与胃癌分期的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

嘌呤是杂环双环芳香族有机分子,它包括 DNA、RNA、核苷和核苷酸、AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP 和循环形式 cAMP 和 cGMP 等各种衍生物,参与各种代谢途径和细胞信号传导。本研究通过对胃癌患者进行转录组学、KEGG 嘌呤通路富集分析,筛选出差异常基因,通过综合的生物信息学分析筛选得到胃癌预后的潜在关键基因,揭示了嘌呤代谢通路基因在肿瘤中预测性的潜在意义。

肿瘤组织旺盛的增殖和代谢能力是肿瘤细胞的特征之一,肿瘤需要增加能量消耗来维持高代谢率,这导致癌细胞的代谢活动与健康细胞有明显的不同,大多数癌细胞由于加速增殖而处于缺氧状态,这种现象被称为华堡效应。提示癌细胞更喜欢无氧糖酵解,而不是氧化磷酸化来进行能源生产^[4]。这使癌细胞的代谢与正常细胞存在差异,有研究^[5]证明多种脂肪酸、碳水化合物、核酸和氨基酸代谢物已经被鉴定出来可以区别胃癌与正常组织和良性胃疾病。

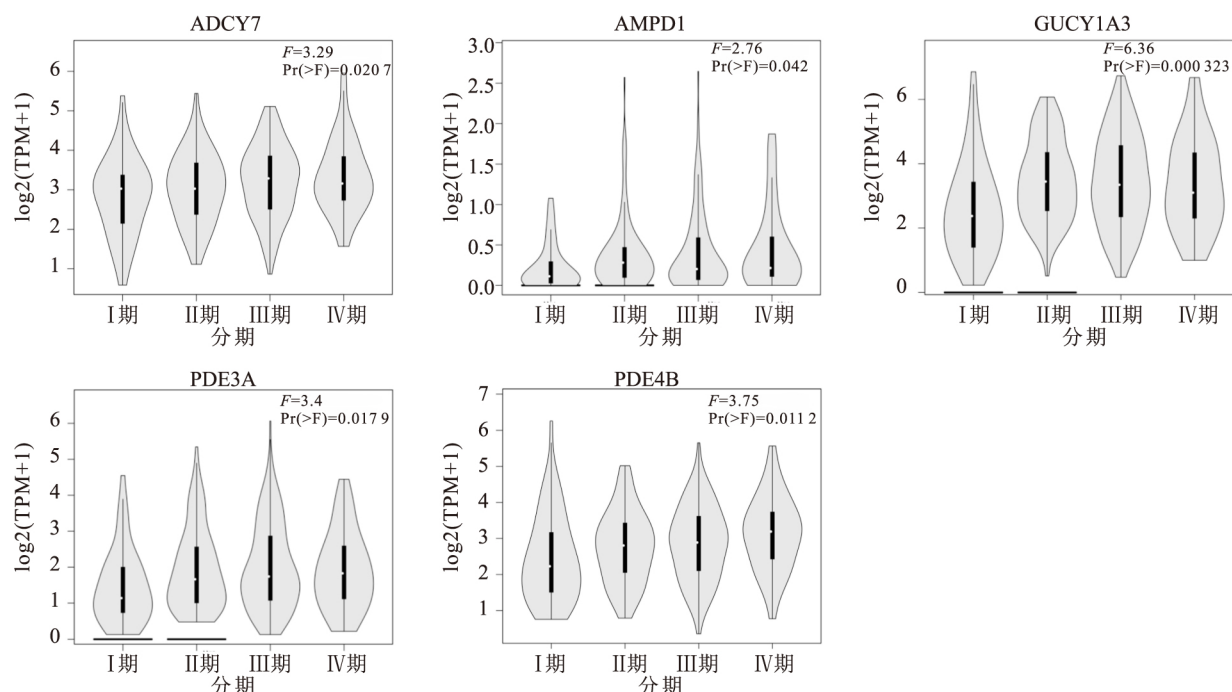


图3 DEGs表达与胃癌患者肿瘤分期相关性的小提琴图

嘌呤代谢属于核苷酸代谢,是生物代谢过程中重要的组成部分,肿瘤细胞高度依赖于嘌呤和嘧啶核苷酸的新生生物合成,并且这些途径中涉及的酶在癌细胞中大幅上调^[6]。而嘌呤从头合成途径的基因也在肿瘤领域产生影响,例如在前列腺癌细胞的增殖和侵袭中发挥作用,并且研究建议将其作为有效的治疗靶点^[7]。这些研究提高了对驱动基因及其对癌症代谢影响的理解,并强调了代谢失调在癌症进展中的重要性。

环核苷酸磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)构成一个庞大且复杂的超族,包含11个PDE基因家族(PDE1至PDE11)。PDE家族编码的是具有独特功能的通过催化cAMP和cGMP的水解来终止环核苷酸信号传导的酶。它们是细胞内cAMP和cGMP浓度及其信号通路和下游生物学效应的关键调节剂^[8],也参与嘌呤代谢的调节。环状核苷酸信号的调节被认为是参与肿瘤细胞增殖和功能的途径之一。实际上,在肿瘤发生中观察到导致cAMP和cGMP信号传导途径关键成分激活或失活的各种改变。细胞cAMP水平的升高可以阻止肝细胞癌^[9]和结肠癌细胞^[10]的生长,诱导凋亡并减弱癌细胞的迁移和生长。

磷酸二酯酶9A(phosphodiesterase 9A, PDE9A)是一种蛋白质编码基因,可以编码蛋白质(高亲和力的cGMP特异性3',5'-环磷酸二酯酶9A)催化cAMP和cGMP水解为相应的单磷酸,编码的蛋白

质通过调节这些环状核苷酸的细胞内浓度在信号转导中发挥作用。有研究^[11]显示PDE9A与机体的某些疾病如心脏病、B细胞性白血病和淋巴瘤相关,并且PDE9A抑制剂可通过caspase 3(含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3)激活诱导乳腺癌细胞凋亡。磷酸二酯酶8B(phosphodiesterase 8B, PDE8B)是一个编码高亲和力cAMP特异性磷酸二酯酶的基因。有研究显示PDE8B的表达在去分化甲状腺癌中明显下降^[12],而且它的基因特征与分期、淋巴结转移显著相关^[13]。

课题组发现PDE编码的蛋白在各个疾病中都起着关键性的作用,通过降解cGMP和cAMP调节细胞外传导通路来参与各项生理病理功能。磷酸二酯酶抑制剂也被建议用于治疗不同类型的癌症,例如急性早幼粒细胞白血病^[14]和恶性神经胶质瘤^[15]。因此,PDE9A、PDE8B作为编码重要蛋白质的基因,也参与嘌呤代谢通路,在胃癌的发生发展中起着重要作用,但其具体分子机制尚需进一步研究。

本研究存在一定的不足:首先,仅纳入91例胃癌石蜡包埋组织标本,样本量相对较小,可能会影响研究的统计学效能;其次,胃癌患者的随访时间不够,不足以计算患者的总生存时间,下一步对预后进一步随访,深入研究在胃癌中的生物学作用及机制。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China,

- 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–32.
- [2] 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): W98–102.
- [3] Gyorffy B, Lanczky A, Szallasi 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.
- [4] Gillies R J, Gatenby R A. Metabolism and its sequelae in cancer evolution and therapy [J]. *Cancer J*, 2015, 21(2): 88–96.
- [5] Chan A W, Gill R S, Schiller D, et al. Potential role of metabolomics in diagnosis and surveillance of gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(36): 12874–82.
- [6] Bahreyni A, Samani S S, Rahmani F, et al. Role of adenosine signaling in the pathogenesis of breast cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 1836–43.
- [7] Chakravarthi B V, Goswami M T, Pathi S S, et al. Expression and role of PAICS, a de novo purine biosynthetic gene in prostate cancer [J]. *Prostate*, 2017, 77(1): 10–21.
- [8] Azevedo M F, Faucz F R, Bimpaki E, et al. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs) [J]. *Endocr Rev*, 2014, 35(2): 195–233.
- [9] Massimi M, Ragusa F, Cardarelli S, et al. Targeting cyclic AMP signalling in hepatocellular carcinoma [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1511.
- [10] McEwan D G, Brunton V G, Baillie G S, et al. Chemoresistant KM12C colon cancer cells are addicted to low cyclic AMP levels in a phosphodiesterase 4-regulated compartment *via* effects on phosphoinositide 3-kinase [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(11): 5248–57.
- [11] Saravani R, Karami-tehrani F, Hashemi M, et al. Inhibition of phosphodiesterase 9 induces cGMP accumulation and apoptosis in human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-468 [J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(3): 199–206.
- [12] Weinberger P, Ponny S R, Xu H, et al. Cell cycle m-phase genes are highly upregulated in anaplastic thyroid carcinoma [J]. *Thyroid*, 2017, 27(2): 236–52.
- [13] Ma B, Jiang H, Wen D, et al. Transcriptome analyses identify a metabolic gene signature indicative of dedifferentiation of papillary thyroid cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(9): 3713–25.
- [14] Perez D R, Smagley Y, Garcia M, et al. Cyclic AMP efflux inhibitors as potential therapeutic agents for leukemia [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 33960–82.
- [15] Safitri D, Harris M, Potter H, et al. Elevated intracellular cAMP concentration mediates growth suppression in glioma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 174: 113823.

Screening of differential genes of purine metabolic pathway in gastric cancer and its relationship with prognosis

Wu Sihan¹, Xiang Lijuan², Bao Chuyang², et al

^[1]Dept of Medical Oncology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

^[2]Dept of Oncology and Chemotherapy, The First Hospital of University of Science and Technology of China West (Anhui Provincial Cancer Hospital), Hefei 230031]

Abstract Objective To investigate the relationship between purine metabolism related genes and prognosis of patients with gastric cancer (GC). **Methods** Ninety-one gastric cancer tissue specimens and 30 paraneoplastic tissue specimens were collected, and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was used to enrich and analyze key genes (KGS) in purine metabolism-related pathways in gastric cancer, and transcriptome sequencing was used to screen differentially expressed genes (DEGs) between gastric cancer tissues and paraneoplastic tissues, and a series of databases were used to overanalyze including Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) and Kaplan-Meier plotter, to investigate the unique expression and prognostic value of DEGs in gastric cancer patients. **Results** Eighty-five genes were enriched in the purine metabolic pathway, and differential gene analysis was performed to identify 25 differentially expressed genes, 15 up-regulated genes and 10 down-regulated genes. Five differential genes were further found to be significantly associated with tumor stage in GC. Twenty genes were detected to be closely associated with gastric cancer prognosis. Among them, PDE8B and PDE9A were significantly predictive of survival in GC patients with hazard rate (HR) of 1.87 and 1.58. **Conclusion** Differential genes in the purine metabolic pathway may be potential prognostic markers for gastric cancer, which will provide a new direction for the search of gastric cancer biomarkers.

Key words gastric cancer; purine metabolism; differential genes; clinical significance