

网络出版时间: 2020/5/29 13:03 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.015.html>

PRMT1 影响胃癌 PI3K-AKT 通路基因表达的转录组分析

刘蒙蒙¹, 姜浩¹, 楼文晖¹, 宋超², 孙剑勇¹, 吴伟新²

摘要 目的 探讨胃癌中蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 (PRMT1) 对 PI3K-AKT 通路的基因表达的影响情况。方法 转录组测序筛选 2 例胃癌及对应 2 例癌旁组织之间的差异表达基因, 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析影响胃癌相关通路中的关键基因并利用免疫组化进行验证。结果 高通量测序获得 758 个长度 >200 bp 的差异表达基因。KEGG 富集分析表明 25 条显著富集代谢通路, 其中 PI3K-AKT 代谢通路显著异常活化, 共有 15 个基因显著上调; 利用 cBioportal 数据库相关性分析, 显示 PRMT1 与 PI3K-AKT 信号通路上的关键基因 (PPP2R3A、THBS4) 表达呈现负相关关系; 免疫组化结果进一步表明低表达 PRMT1 的胃癌组织高表达 p-AKT (473Ser), 并且 PRMT1 与 p-AKT (473Ser) 呈现负相关关系, 说明 PRMT1 与 PI3K-AKT 信号活性负相关。结论 PRMT1 可能通过 PPP2R3A、THBS4 影响胃癌中 PI3K-AKT 信号通路的活性, 为寻求胃癌诊断标志物及治疗靶点提供了线索。

关键词 胃癌; 转录组测序; PRMT1; PI3K-AKT; 关键基因

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)06-0901-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.015

近年来胃癌发病率逐年升高, 虽然通过手术及化疗, 患者生存期显著延长, 但总体死亡率仍居高不下^[1]。蛋白精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyltransferase, PRMT1) 在体内广泛存在, 发挥着重要作用, 多年来的研究^[2]表明 PRMT1 广泛参与了细胞内信号转导、转录调节、DNA 损伤修复以及 mRNA 剪接等多种细胞生理活动过程。因此, 对 PRMT1 的研究有助于进一步了解细胞生长与增殖调控和肿瘤的发生发展, 有望寻求肿瘤药物治疗的新靶点。转录组是连接生物功能与基因组遗传信息

的桥梁, 在探索疾病的发生发展及基因调控等方面发挥了重要作用。现通过高通量测序对胃癌组织标本与癌旁组织的差异表达谱进行京都基因与基因组百科全书富集分析 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG), 探讨胃癌中 PRMT1 影响代谢通路的基因表达情况, 从转录组学和代谢组学层面为胃癌诊治寻找新线索。

1 材料与方法

1.1 组织样本及主要试剂

1.1.1 病例资料 选取复旦大学附属中山医院青浦分院 2018 年 9 月胃癌患者术后新鲜胃癌组织标本 2 例及相应癌旁正常组织标本 2 例, 正常对照来自手术边界 5 cm 以上, 均经病理学诊断证实。其中男 1 例 60 岁; 女 1 例 72 岁。其病理均为胃中-低分化腺癌。患者术前无放化疗及靶向等肿瘤相关治疗, 无高血压、糖尿病等合并症。并选取 2018 年 1~9 月间在复旦大学附属中山医院青浦分院普外科行胃癌根治手术患者的组织蜡块。共入组 25 例, 其中男 15 例, 女 10 例, 年龄 64~82 (64±9.385) 岁。纳入标准: ①均经病理学诊断明确为胃腺癌; ②术前无肿瘤相关治疗。所有患者签署知情同意书。该实验经复旦大学附属中山医院青浦分院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂及仪器 胃癌组织标本总 RNA 提取试剂 TRIzol[®] Reagen、定量试剂 TBS380 Pi-cogreen、mRNA 分离仪器磁力架、Superscript 逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 建库试剂 Truseq-qTM RNA sample prep Kit、桥式扩增试剂簇生成试剂盒 cBot Truseq PE Cluster Kit v3-cBot-HS 购自美国 Illumina 公司; RNA 质控仪器安捷伦 2100 生物分析仪购自美国 Agilent 公司; NanoPhotometre 分光光度计购自德国 Implen 公司; Oligo d (T) 25 磁珠购自美国 NEB 公司; 琼脂糖凝胶电泳系统购自美国 Nanodrop 公司; RNA 保存于 -80℃ 超低温冰箱 DW86L262 购自青岛海尔集团。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 文库构建及质检 ① 从胃癌组织标

2020-01-15 接收

基金项目: 青浦区卫生和计划生育委员会科研课题计划 (编号: W2017-25); 上海市科学技术委员会科研计划项目 (编号: 19140901700)

作者单位: ¹ 复旦大学附属中山医院, 上海 200433

² 复旦大学附属中山医院青浦分院, 上海 200433

作者简介: 刘蒙蒙, 女, 住院医师, 硕士;

吴伟新, 男, 副主任医师, 本科, 责任作者, E-mail: 113949442@qq.com

本中提取总 RNA ,按照 TRIzol 试剂说明书操作 ,随后质控 ;检测所提 RNA 完整性及浓度和纯度 ,并利用 Agilent 2100 测定 RIN 值 ;② 利用 Oligo(dT) 磁珠富集 mRNA ,在 NEB Next 碎片缓冲区随机打断 mRNA ;③ mRNA 片段为模板合成 cDNA 第一条链 ,降解 RNA 链 ,随后以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第 2 条链 ;④ 筛选 150 ~ 200 bp 的 cDNA 片段 ,PCR 扩增并纯化 ;⑤ 最后对文库进行初步定量 ,并检测插入片段大小 ,准确定量文库的有效浓度 (大于 2×10^9 mol/L) 。

1.2.2 上机测序及数据分析 桥式 PCR 扩增利用 cBot Truseq PE Cluster Kit v3-cBot-HS 簇生成试剂盒 v3-cBot-HS 生成 clusters ,利用 Hiseq Xten 平台行双端 150 bp 测序。为避免影响后续组装的质量及生物信息分析的准确性 ,检查鸟嘌呤和胞嘧啶含量分布及原始测序数据测序错误率并对原始数据进行过滤 ,获得后续待分析数据。应用 STAR(v2. 5. 1b) 软件对其进行比对分析 ,RSEM(v1. 2. 28) 进行转录本水平的定量分析。采用 edge R(v3. 12. 1) 软件进行表达差异显著性分析 ,clusterProfiler(v3. 0. 5) 软件对差异基因集行 KEGG 通路富集分析。

1.2.3 免疫组化 25 例胃癌组织标本常规甲醛固定及石蜡包埋 ,将蜡块切成 5 μ m 厚的组织切片 ,覆盖于预先经过防脱处理的载玻片上 ,经过烤片、水化、抗原修复 ,分别滴加一抗 PRMT1(1 : 300) 、AKT(1 : 200) ,二抗: HRP-conjugated IgG(1 : 500) ,DAB 显色 ,中性树脂封片。光学显微镜拍照。每个标本选 5 个 40 $\times$ 的视野 ,评出染色深度: 无或弱染色为 1 分 ,中阳染色为 2 分 ,强阳为 3 分 ;阳性面积: < 25% 为 1 分 ,25% ~ 50% 为 2 分 ,> 50% ~ 75% 为 3 分 ,> 75% 为 4 分。将上述 2 项分值相乘取平均 ,得到 1 ~ 12 分的总分区间。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17. 0 进行统计分析 ,采用进行统计描述 ,组间差异采用单因素方差分析进行比较 ,如方差分析结果显示组间差异有统计学意义 ,则进一步采用 *t* 检验进行组间差异的两两比较。 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组文库构建及 RNA-seq 数据处理 TR- Izol 法提取的胃癌和癌旁组织总 RNA 的各项质量指标均达标 ,分离 mRNA 并成功合成 cDNA 文库 ,质检合格并测序。4 个样本进行过滤和比对分析的待分析数据均占相应原始数据的 90 % 以上。然后对

RNA-seq 测序数据进行比对分析、基因水平定量及标准化处理。2 组的唯一比对率 77. 4% ~ 88. 9% 、91. 5% ~ 97. 3% 的 reads 可以比对到人类参考基因组上。见表 1。

表 1 测序数据比对人参考基因组比对率

	CTQ-N	HLD-N	CTQ-C	HLD-C
比对率	0. 968	0. 915	0. 967	0. 969
唯一比对率	0. 883	0. 774	0. 882	0. 895

2.2 差异表达分析 利用 edge R 软件筛选差异基因 $\alpha < 0. 05$ 作为基因筛选标准。2 组取交集共获得 758 个长度大于 200 bp 的差异表达基因 ,与正常胃黏膜组织相比 ,胃癌中表达下调基因 251 个 ,包括 PRMT1 ;表达上调基 507 个。通过 heatmap 软件包对 2 组差异表达基因进行聚类分析并得到热图 ,表明了胃癌样本组织中和正常组织间有统计学意义的差异表达基因的分布情况。见图 1。

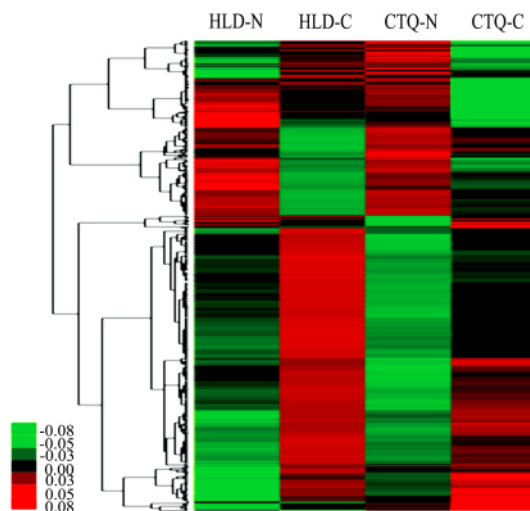


图 1 胃癌样本组织中和正常组织间有差异基因热图
绿色: 下调基因; 红色: 上调基因

2.3 KEGG 分析 本次 KEGG 富集分析利用 KO-BAS ,并通过 Fisher 精确检验计算。采用 BH(FDR) 方法多重检验控制假阳性率 ,校正的 $P < 0. 05$,满足此条件的定义为在差异表达基因中显著富集的 KEGG 通路。见图 2。KEGG 富集分析发现 25 条显著富集代谢通路 ,由于肿瘤的异质性 ,将富集通路中基因数最多的 10 条代谢通路进行列表。见表 2。

2.4 PRMT1 对 PI3K-AKT 通路关键基因表达相关性分析 在 PI3K-AKT 信号通路中共有 19 个基因显著富集。见表 2。利用 cBioportal 数据库将 PRMT1 分别对 PI3K-AKT 信号通路中该 19 个基因

表2 胃癌和正常组织差异表达基因的 KEGG 显著富集通路($P < 0.05$)

PathwayID	PathwayTerm	DifGene	P 值	基因
PATH: 04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	25	0	TNFSF9/INHBA/IL6/CSF3R/CXCR1/CCL8/NGFR/CCL25/CXCR4/CXCL2/CNTFR/CXCL1/BMPRI1B/CCL3L1/IL1B/IL17B/EDAR/CCR8/OSM/CXCR2/CCR3/CCL4L1/CXCL8/PRLR/EGF
PATH: 04151	PI3K-Akt signaling pathway	19	0.002	MYB/THBS2/TLR2/IL6/COL1A2/CSF3R/NGFR/COL4A1/PPP2R3A/TLR4/SPP1/LPAR4/THBS4/OSM/COL11A1/PRLR/LPAR3/EGF/NGF
PATH: 04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	17	0.002	FPR1/GABRG2/HTR2A/NPY4R/CH17-360D5.1/CTSG/AGTR1/GABRA4/LPAR4/FPR2/CALCRL/PRLR/HTR1D/LPAR3/GABRD/C5AR1/TBXA2R
PATH: 05146	Amoebiasis	15	0.002	TLR2/IL6/COL1A2/SERPINF4/COL4A1/SERPINF2/CTSG/TLR4/CXCL1/CD14/IL1B/ARG1/COL11A1/CXCL8/SERPINF3
PATH: 04145	Phagosome	14	0	THBS2/DYNC1H1/TLR2/OLR1/CLEC7A/CTSL/NCF2/FCGR3A/TLR4/FCGR3B/CD14/THBS4/MSR1/FCGR2A
PATH: 04062	Chemokine signaling pathway	14	0.003	CXCR1/CCL8/CCL25/CXCR4/CXCL2/HCK/CXCL1/FGR/CCL3L1/CCR8/CXCR2/CCR3/CCL4L1/CXCL8
PATH: 05152	Tuberculosis	12	0.002	TLR2/IL6/CLEC7A/CLEC4E/FCGR3A/TLR4/FCER1G/FCGR3B/CD14/IL1B/ITGAX/FCGR2A
PATH: 05202	Transcriptional misregulation in cancer	12	0.008	SIX1/IL6/CEBPA/NGFR/SIX4/MEIS1/SPI1/HIST1H3C/BCL2A1/CD14/NUPR1/CXCL8
PATH: 05132	Salmonella infection	11	0	DYNC1H1/IL6/NLRC4/CXCL2/TLR4/CXCL1/CCL3L1/CD14/IL1B/CCL4L1/CXCL8
PATH: 04620	Toll-like receptor signaling pathway	10	0.003	TLR2/IL6/TLR4/IRF7/SPP1/CCL3L1/CD14/IL1B/CCL4L1/CXCL8

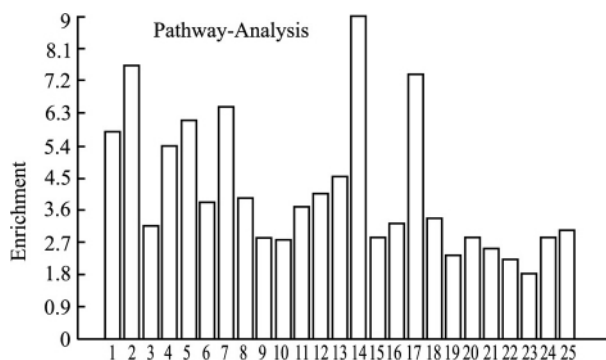


图2 KEGG 通路富集结果

1: Amoebiasis; 2: Legionellosis; 3: Cytokine-cytokine receptor interaction; 4: Salmonella infection; 5: NOD-like receptor signaling pathway; 6: Phagosome; 7: Malaria; 8: Toll-like receptor signaling pathway; 9: Tuberculosis; 10: Rheumatoid arthritis; 11: Leishmaniasis; 12: Staphylococcus aureus infection; 13: Folate biosynthesis; 14: Osteoclast differentiation; 15: NF-kappa B signaling pathway; 16: Renin-angiotensin system; 17: Transcriptional misregulation in cancer; 18: Chagas disease (American trypanosomiasis); 19: Platelet activation; 20: cGMP-PKG signaling pathway; 21: PI3K-Akt signaling pathway; 22: ECM-receptor interaction; 23: Basal cell carcinoma; 24: Chemokine signaling pathway; 25: Pertussis

进行相关性分析,分析显示 PRMT1 与 PI3K-AKT 信号通路上的 PPP2R3A [$P = 2.070 \times 10^{-14}$ (Spearman), $P = 1.590 \times 10^{-14}$ (Pearson)] 和 THBS4 [$P = 3.257 \times 10^{-4}$ (Spearman), $P = 2.882 \times 10^{-3}$ (Pearson)] 基因负相关,说明 PRMT1 可能影响 PI3K-AKT 信号通路。见图3。

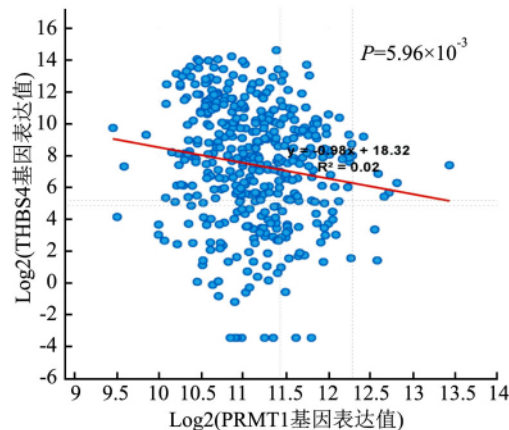
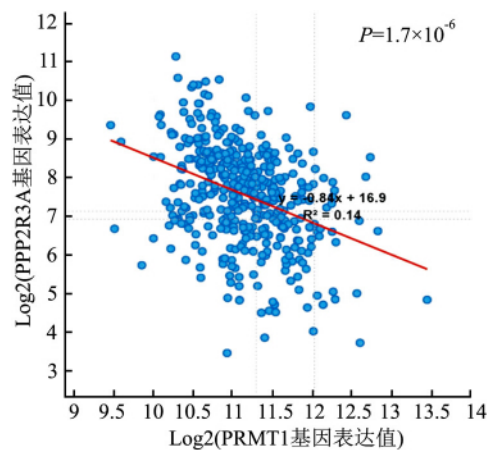


图3 胃癌样本中 PRMT1 基因与 PPP2R3A、THBS4 表达相关性分析

2.5 胃癌组织中 PRMT1 与 AKT 蛋白 为了进一步验证 PRMT1 影响 PI3K-AKT 信号通路的活性,课题组选取临床 25 例胃癌组织标本,分别利用 PRMT1 抗体和 P-AKT(473Ser) 抗体进行免疫组化染色并打分进行分析,发现在下调的 PRMT1 胃癌组织中 AKT 473 丝氨酸磷酸化蛋白水平上调 ($P < 0.001$),说明 PRMT1 的表达与 AKT 的活性负相关,暗示了 PRMT1 可能抑制 PI3K-AKT 信号。见图 4。

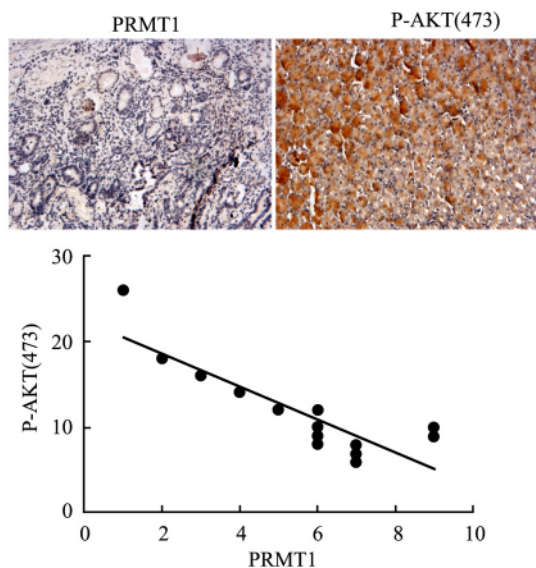


图4 免疫组化染色及相关性分析 $\times 10$

3 讨论

PRMT1 在 PRMT 家族最主要成员中,活性最高,占总催化活性的一半以上。PRMTs 催化将 S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosyl methionine, SAM) 甲基转移到精氨酸胍基氮原子上,形成对称或不对称的甲基精氨酸^[3]。PRMT1 属于 I 型 PRMTs,哺乳动物中,PRMT1 是主要的精氨酸不对称二甲基化酶,占不对称二甲基化酶的 90% 以上,可以识别多肽 RGG/RG 序列^[4]。在结构上,PRMT1 的同源二聚体上含有 1 个中间腔和 2 个相对应的活性位点。PRMT1 是第 1 个被克隆的真核 PRMT,并且已有证据^[5]表明其与 p300/CREB 结合蛋白、组蛋白乙酰转移酶以及 PRMT4/CARM1 可以一起充当核受体,作为介导基因转录激活的共激活剂。多年来的研究^[6]表明 PRMT1 广泛参与了细胞内信号转导、转录调节、DNA 损伤修复以及 mRNA 剪接等多种细胞生理活动过程。该研究显示 PRMT1 基因在胃癌组织中下调,这与以前的研究结果相吻合^[7]。

PI3K-AKT 信号通路作为恶性肿瘤细胞存活的关键调控因子,已成为人们关注的焦点,许多 Akt 信

号通路抑制剂被发现具有多种功能和特异性。然而,目前对于该信号通路的调控及其在肿瘤生长、侵袭转移中的作用机制尚不明确。课题组利用 KEGG 对鸟嘌呤和胞嘧啶差异表达基因行富集分析,分析表明显著富集的 PI3K/AKT 代谢通路中 15 个基因显著上调。为分析 PRMT1 是否对 PI3K/AKT 代谢通路活化起作用,进一步利用 cBioportal 数据库相关性分析,PRMT1 与其中 2 个基因(PPP2R3A、THBS4) 紧密相关。

蛋白磷酸酶 2A 调节亚基 B (“protein phosphatase 2 regulatory subunit B” alpha, PPP2R3A) 从属 B”/PR72 家族,为 PP2A 的调节亚基,有学者^[8]发现 PPP2R3A 可受 DNA 甲基化而失活,其 C-端甲基化可促进核心酶结合 B 亚基。PPP2R3A 可作为 PP2A 的调节亚基可促进肝癌的发生发展,具有潜在的促细胞转移作用。有研究^[9]指出 PP2A 抑制剂 LB100 可以通过作用 Thr308 和 Ser473 位点抑制 AKT 的磷酸化从而抑制肿瘤增值。然而有趣的是,在一些特定的肿瘤中,PP2A 抑制剂也能促进 AKT 的磷酸化^[10]。但其在胃癌中的作用及机制尚未见报道,本研究从 mRNA 水平发现在胃癌组织中 PPP3R2A 显著上调。这些数据提示,PPP3R2A 可能是胃癌治疗的潜在靶点。

THBS4 基因是凝血酶敏感蛋白家族(thrombospondins, THBS) 新成员,其结构各有一个氨基端和一个羧基端。参与调节细胞间接触、黏附、游走、增殖及血小板聚集。在肿瘤中的研究较少,有的学者^[11]指出 THBS4 在结直肠癌中表达减低,可能与其基因甲基化相关。而 THBS4 在肝癌中普遍高表达,是预后不良的独立危险因素。Liu et al^[12]发现下调 THBS4 前列腺癌细胞的侵袭转移能力显著下降。Chen et al^[13]证实胃癌组织中 THBS4 蛋白高表达,促进胃癌生长和转移。课题组从 mRNA 水平的研究结果与之一致,本研究显示 THBS4 在胃癌 PI3K/AKT 代谢通路中富集明显,但具体机制尚不明确,其具体的调控途径还需要进一步的实验的验证。

为了进一步验证 PRMT1 影响 PI3K-AKT 信号通路的表达,选取临床 25 例胃癌组织标本,分别利用 PRMT1 抗体和 P-AKT(473Ser) 抗体进行免疫组化并打分进行分析,发现在下调的 PRMT1 胃癌组织中 AKT 473 丝氨酸磷酸化蛋白水平上调 ($P < 0.001$),说明了 PRMT1 蛋白影响了 AKT 蛋白的磷酸化,暗示了 PRMT1 可能抑制 PI3K-AKT 信号,这

与 KEGG 分析结果吻合。

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] Yu Z , Chen T , Hébert J , et al. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation [J]. *Mol Cell Biol* , 2009 , 29(11) : 2982 - 96.
- [3] Yang Y , Hadjikyriacou A , Xia Z , et al. PRMT9 is a type II methyltransferase that methylates the splicing factor SAPI45 [J]. *Nat Commun* , 2015 , 6: 6428.
- [4] Dhar S , Vemulapalli V , Patananan A N , et al. Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging by other PRMTs [J]. *Sci Rep* , 2013 , 3: 1311.
- [5] Abramovich C , Yakobson B , Chebath J , et al. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor [J]. *EMBO J* , 1997 , 16(2) : 260 - 6.
- [6] Chen C , Zhou H , Zhang X , et al. PRMT1 potentiates chondrosarcoma development through activation of YAP activity [J]. *Mol Carcinog* , 2019 , 58(12) : 2193 - 206.
- [7] Altan B , Yokobori T , Ide M , et al. Nuclear PRMT1 expression is associated with poor prognosis and chemosensitivity in gastric cancer patients [J]. *Gastric Cancer* , 2016 , 19(3) : 789 - 97.
- [8] Dunwell T L , Hesson L B , Pavlova T , et al. Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Epigenetics* , 2009 , 4(3) : 185 - 93.
- [9] Liu L , Wang H , Cui J , et al. Inhibition of protein phosphatase 2A sensitizes mucoepidermoid carcinoma to chemotherapy *via* the PI3K-AKT pathway in response to insulin stimulus [J]. *Cell Physiol Biochem* , 2018 , 50(1) : 317 - 31.
- [10] Bai X , Zhi X , Zhang Q , et al. Inhibition of protein phosphatase 2A sensitizes pancreatic cancer to chemotherapy by increasing drug perfusion *via* HIF-1 α -VEGF mediated angiogenesis [J]. *Cancer Lett* , 2014 , 355(2) : 281 - 7.
- [11] Greco S A , Chia J , Inglis K J , et al. Thrombospondin-4 is a putative tumour-suppressor gene in colorectal cancer that exhibits age-related methylation [J]. *BMC Cancer* , 2010 , 10: 494.
- [12] Liu J , Cheng G , Yang H , et al. Reciprocal regulation of long non-coding RNAs THBS4-003 and THBS4 control migration and invasion in prostate cancer cell lines [J]. *Mol Med Rep* , 2016 , 14(2) : 1451 - 8.
- [13] Chen X , Huang Y , Wang Y , et al. THBS4 predicts poor outcomes and promotes proliferation and metastasis in gastric cancer [J]. *J Physiol Biochem* , 2019 , 75(1) : 117 - 23.

Transcriptome analysis of the effect of PRMT1 on PI3K-AKT pathway gene expression in gastric cancer

Liu Mengmeng , Jiang Hao , Lou Wenhui , et al

(Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University , Shanghai 200433)

Abstract Objective To investigate the effect of protein arginine methyltransferase (PRMT1) on gene expression of PI3K-AKT pathway in gastric cancer. **Methods** The differentially expressed genes between 2 cases of gastric cancer and 2 cases of adjacent tissues were screened by transcriptome sequencing. The key genes affecting the pathway of gastric cancer were enriched and analyzed by kyoto gene encyclopedia of genome (KEGG) and verified by immunohistochemistry. **Results** 758 differentially expressed genes with length greater than 200 bp were obtained by high throughput sequencing. KEGG enrichment analysis revealed 25 significant enrichment metabolic pathways , of which PI3K-AKT metabolic pathway was significantly abnormally activated containing 15 genes significantly up-regulated. cBioportal database correlation analysis showed that PRMT1 was negatively correlated with the expression of key genes (PPP2R3A , THBS4) in PI3K-AKT signaling pathway. Immunohistochemical results further showed that there was a high expression of p-AKT (473Ser) in gastric cancer tissues with low PRMT1 expression , moreover , there was a negative correlation between PRMT1 and p-AKT (473Ser) , indicating that PRMT1 was negatively correlated with PI3K-AKT signal activity. **Conclusion** PRMT1 may affect the activity of PI3K-AKT signaling pathway in gastric cancer through PPP2R3A and THBS4 , which may provide clues for finding diagnostic markers and therapeutic targets of gastric cancer.

Key words gastric cancer; transcriptome sequencing; PRMT1; PI3K-AKT; key genes