

胃萎缩性炎症恶变过程中基因表达谱的变化

丁西平 毛玉娣 汪朝靓 周欢程 前

摘要 目的 研究胃萎缩性炎症恶变至胃癌过程中基因表达谱的变化。方法 收集5例重度萎缩胃炎伴肠上皮化生组织和5例进展期胃癌组织进行基因芯片检测,筛选差异性表达的基因。通过生物信息学分析的方法对差异性表达的基因富集的生物过程、信号通路、基因编码蛋白之间相互关系进行分析。结果 通过基因芯片检测,筛选出2 779个差异性表达的基因,并对变化最明显的前15个上调及前15个下调的基因进行总结,其中包括CPA2、HCA3、BCL2A1、ITGAX等新发现的胃癌相关基因。此外,生物信息学分析显示了差异性表达基因所代表的生理意义,如炎症反应、细胞迁移、TNF信号通路、NF- κ B信号通路、Toll样受体信号通路、趋化因子信号通路等。结论 萎缩性胃炎恶变至胃癌过程中基因表达谱发生明显变化,并代表了相应的生理意义。

关键词 炎症恶变; 胃癌; 萎缩性胃炎; 基因表达谱; GO分析; KEGG信号通路; PPI网络分析

中图分类号 R 735.2; R 573.3+2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0402-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.013

胃癌是我国常见的恶性肿瘤,具有较高的发病率和死亡率^[1]。早期胃癌无明显的症状和体征,极大限制了早期的诊断率,并且错过了治疗的最佳时期,因此,目前胃癌的5年生存率仍然不令人满意^[2]。胃癌在病理特征上常继发于慢性萎缩性胃炎和异型增生,其中包含众多遗传与表观遗传的改变,基因表达调控网络复杂多元。例如,以往的研究^[3]证明多种促炎基因之间相互作用参与胃癌的发生发展。为了提高胃癌早期诊断率,寻找新的临床标志物和治疗靶点,该文应用高通量基因芯片技术,研究胃萎缩性炎症恶变过程基因表达谱的变化,并且通过生物信息学分析基因间的相互作用及所涉及的生物过程和信号通路。

2018-11-15 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1808085MH304); 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 16040804018)

作者单位: 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)老年消化科,合肥 230001

作者简介: 丁西平,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: dingxipingyx@163.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 临床标本的收集由中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。所有标本均来自中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)内镜中心,包括5例慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生组织和5例进展期胃癌组织,并符合病理学诊断标准。两组临床标本均来自于男性患者,年龄分别为42~64(55 \pm 10.03)岁和45~65(57 \pm 9.14)岁($P=0.77$)。所有胃癌患者均未接受任何治疗包括手术、化疗、放疗以及生物治疗等。内镜下夹取的标本立即放入RNA later(美国Thermo Fisher公司)溶液中稳定RNA,防止降解,然后储存于-80℃冰箱中。

1.2 RNA提取与定量 TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)用来提取各临床标本中总RNA,并进一步采用NucleoSpin® RNA clean-up试剂盒(740.948.250)对总RNA进行过柱纯化。使用分光光度法(Nanodrop 2000,美国Thermo Scientific公司)检测RNA的纯度与总量,合格标准为吸光度A_{260/280} \geq 1.80且RNA总量 \geq 1 μ g。琼脂糖凝胶电泳用来检测RNA完整性。

1.3 基因芯片检测 提取各组织中的总RNA先合成cDNA,并在体外转录成cRNA,既而反转录合成cDNA,经Nucleospin® Extract II试剂盒(MN公司, Cat. No. 740609.250)纯化后使用紫外分光光度计定量,然后经荧光染料标记后与mRNA表达谱芯片V4.0(GeeDom)进行杂交。基因芯片杂交、清洗和扫描由北京博奥生物有限公司完成。

1.4 GO富集和KEGG信号通路分析 GO(Gene Ontology)富集分析包括细胞组分、分子功能和生物过程三个独立的分析体系,可以整合生物信息学数据库中的资源。KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)信号通路和GO分析用来探索差异性表达的基因参与的信号通路及生物过程。Cytoscape V3.2.1软件用来解读差异性基因相关的信号通路及功能,显著性的检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

1.5 PPI(Protein-Protein Interaction)网络分析

STRING 数据库是检索基因间相互作用的搜索工具,可以提供实验性和预测性的基因之间的相互作用和联系。STRING 10.0 版本用于绘制和分析差异性表达基因间的相互作用。

1.6 统计学处理 Agilent Feature Extraction 软件用于处理基因芯片扫描图并得到原始数据, Gene-Spring 软件将原始数据进行归一化分析并以 Excel 格式输出数据。通过 SPSS 17.0 软件进行双样本 T 检验, 差异表达基因筛选标准为 Fold Change(FC, 变化倍数) ≥ 2.0 且 $P < 0.05$; Cluster 3.0 软件用于聚类分析, GraphPad Prism 6 软件用于图形展示。

2 结果

2.1 胃萎缩性炎症恶化过程中基因表达谱的变化

为了全面分析胃萎缩性炎症恶化至胃癌过程中基因表达谱的变化, 本研究收集了 5 例慢性重度萎缩胃炎伴肠上皮化生组织和 5 例进展期胃癌组织进行高通量基因芯片检测。转录组基因芯片分析技术显示了萎缩性胃炎组织及胃癌组织中基因表达谱的变化, 共 2 779 个具有明确注释的基因差异性表达 ($FC > 2$ 且校正后 $P < 0.05$ 认为是具有显著差异性表达), 与萎缩性胃炎组织相比, 有 1 288 个基因在胃癌组织中高表达, 1 491 个基因在胃癌组织中低表达。火山图可以更加清晰的显示差异性基因的表达情况, 绿色表示在萎缩性胃炎组织中低表达的基因, 红色表示在萎缩性胃炎组织中高表达的基因, 黑色标记的基因表示没有显著性变化的基因, 但是它们的变化倍数可能很大, 或者 P 值可能极小, 见图 1。

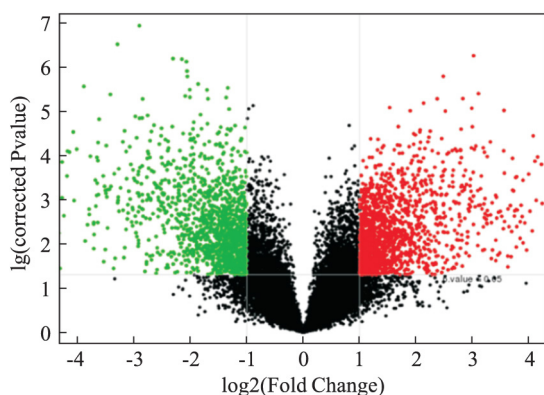


图1 全部检测基因火山图差异比较

以变化倍数(fold change, FC)的 \log_2 为横轴, 以校正后 P 值的 \lg 值负数为纵轴, 绘制火山图, 分析全部检测基因的差异; 图中灰色横线是校正后 P 值 = 0.05 的位置, 两条灰色的竖线是 $FC = 2$ 的位置

2.2 胃萎缩性炎症恶化过程中变化最显著的基因在基因芯片检测筛选的 2 779 个差异性表达的基

因中, 其中在萎缩性炎症恶化过程中变化最为显著的基因, 如上调的有 *CXCL1*、*S100A9*、*CXCL8*、*CHI3L1*、*S100A8*、*BCL2A1*、*SAA1*、*PI3*; 下调的有 *DAZ2*、*DAZ1*、*GAST*、*MSMB*、*C6orf58*、*DAZL*、*KCNE2*、*GIF*、*ATP4B*、*KRT20*。具体信息见表 1。此外, 为了更加直观的显示这 30 个显著差异表达的基因在萎缩性胃炎组织及胃癌组织中的表达水平, 使用 Cluster 3.0 软件进行聚类分析, 结果用热图展示, 见图 2。

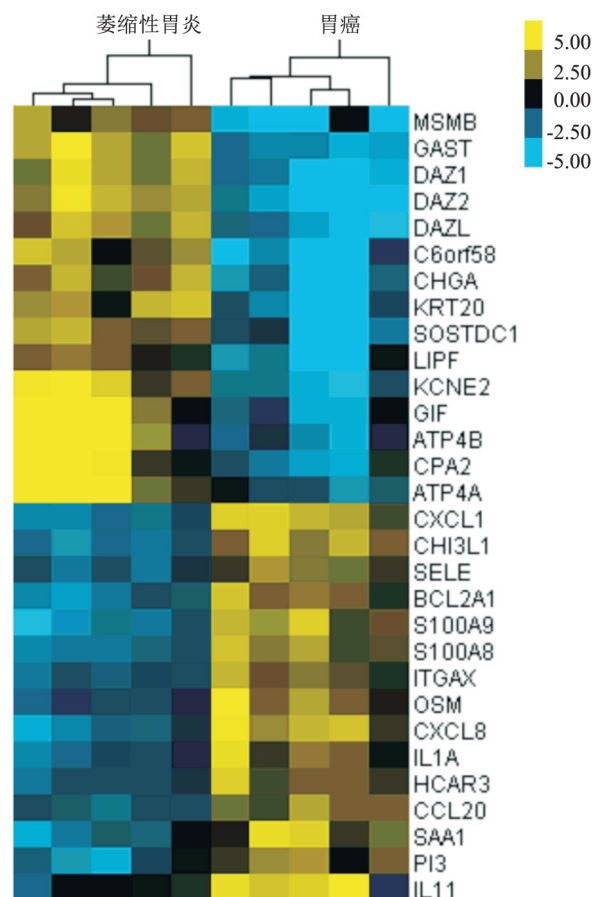


图2 热图分析展示

聚类分析热图展示了在胃萎缩性炎症恶化至胃癌过程中变化最明显的 15 个下调基因和 15 个上调基因, 颜色的深浅表示各个差异性基因在各个组织中的表达情况, 黄色表示上调, 蓝色表示下调

2.3 胃萎缩性炎症恶化过程中差异性表达基因的

GO 富集分析 为了探索萎缩性胃炎与胃癌组织中差异性基因表达所代表的生物学功能, 对这些基因进行了 GO 富集分析, GO 富集分析是生物信息学研究中非常重要的工具。共筛选出 130 个富集的生物过程(校正后的 $P < 0.05$) 及每个生物过程中所包含的差异性表达的基因。其中前 10 个富集的生物过程分别是炎症反应、白细胞趋化作用、细胞迁移、血管生成、对细菌来源分子的反应、细胞运动、细胞黏附

表1 在胃癌组织中变化最明显的15个下调基因和15个上调基因

基因	P 值	变化倍数	表达	基因	P 值	变化倍数	表达
DAZ2	4.50E-06	144.1174	下调	CXCL1	4.01E-06	101.4665	上调
DAZ1	6.51E-05	112.2296	下调	SI00A9	1.46E-06	99.16628	上调
GAST	1.56E-07	60.82295	下调	CXCL8	4.26E-05	89.86220	上调
MSMB	0.009132	57.60907	下调	CHI3L1	2.71E-05	73.50259	上调
C6orf58	0.001031	56.14291	下调	SI00A8	5.35E-07	56.20382	上调
DAZL	9.55E-06	55.05070	下调	BCL2A1	3.95E-05	51.58114	上调
KCNE2	0.000623	54.03938	下调	SAA1	0.000257	47.40801	上调
GIF	0.006505	52.19546	下调	PI3	0.000351	31.63046	上调
ATP4B	0.008314	52.02116	下调	OSM	0.000135	29.36919	上调
KRT20	0.001673	50.59230	下调	CCL20	1.18E-05	28.42427	上调
CHGA	0.000244	43.93823	下调	IL1A	0.000324	28.03076	上调
LIPF	0.014050	43.05273	下调	ITGAX	9.16E-06	26.86630	上调
CPA2	0.012145	32.33233	下调	SELE	7.49E-05	26.11433	上调
SOSTDC1	0.002095	31.97321	下调	HCAR3	3.62E-05	25.61802	上调
ATP4A	0.003185	31.75156	下调	IL11	0.005620	25.34393	上调

作用、血管内皮生长因子的调节、趋化因子介导信号通路、脂多糖介导信号通路。图3直观地显示了差异性表达的基因与富集的生物过程的关联程度。

2.4 胃萎缩性炎症恶变过程中KEGG信号通路分析 为进一步研究从胃萎缩性炎症恶变至胃癌过程中所涉及的信号通路,对异常表达的基因进行了KEGG信号通路分析。结果显示,在KEGG PATHWAY数据库中,以 $P < 0.05$ 为检验标准,共筛选出31条信号通路,其中包括TNF信号通路、NF-kappa

B信号通路、化学致癌作用、趋化因子信号通路、NOD样受体信号通路等。图4总结了前15个差异性最为显著的信号通路。

2.5 差异性表达基因PPI网络分析 为了解差异性表达基因编码蛋白质的功能及蛋白与蛋白之间的功能,将前100名差异性表达最为显著的基因输入STRING 10.0数据库中,绘制PPI网络图(图5)。研究显示,在胃萎缩性炎症恶变至胃癌过程中,差异性表达基因编码的蛋白质CXCL1、PPBP、CCL20、

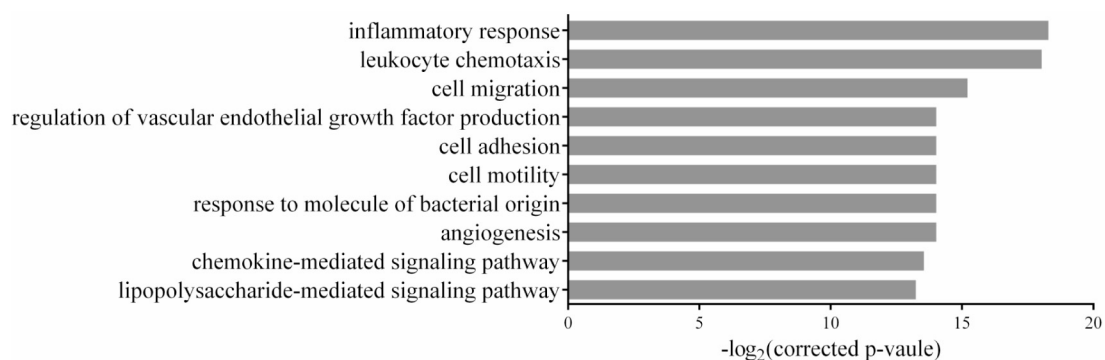


图3 GO分析显示差异性表达的基因富集最显著的前10个生物过程

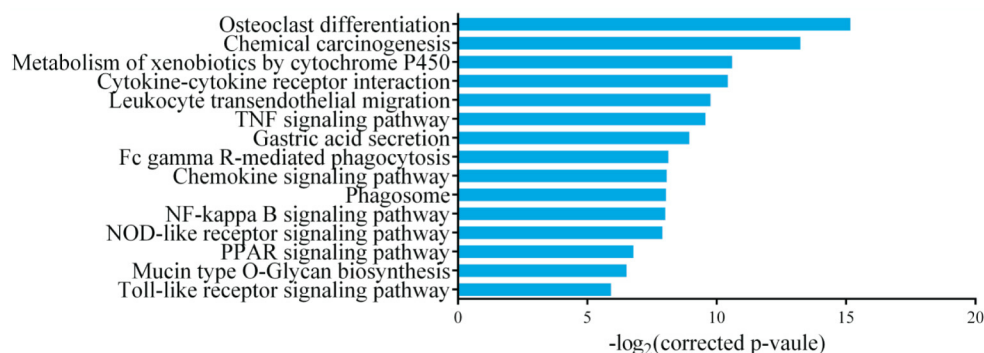


图4 在KEGG PATHWAY数据库中差异性表达的基因富集最明显的15条信号通路

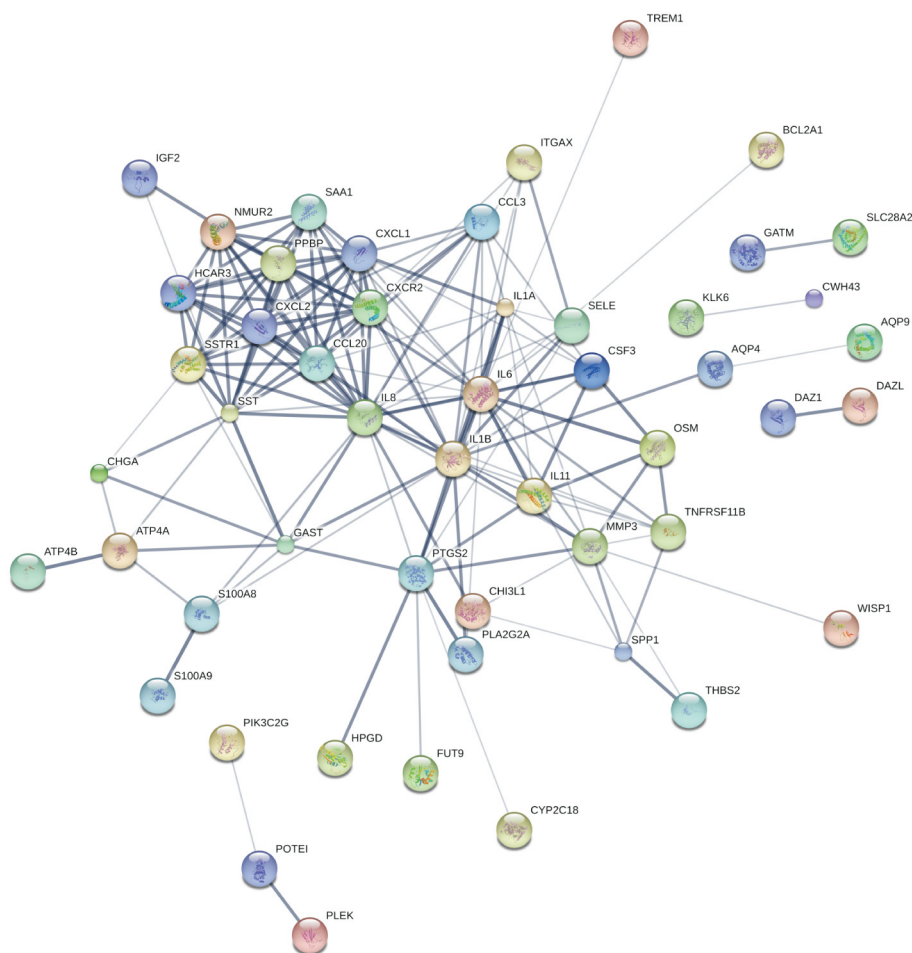


图5 PPI网络图

PPI网络图显示了变化最明显的前100个基因编码蛋白之间的相互作用关系,两个蛋白标签之间连线的粗细表示信度(confidence),连线越粗表示两者之间的关联越强,相互作用的证据越多

CXCR2、IL8、STT和SAA1关联程度强;IL6、IL11、MMP3、CSF3和OSM之间也具有明显的相互作用。

3 讨论

慢性炎症在肿瘤的发生过程中发挥重要作用,研究^[4]证明高达25%的恶性肿瘤继发于慢性炎症,例如胃癌。胃癌在我国仍具有相当高的发病率,发病机制不清楚,一般认为在萎缩性胃炎基础上出现肠上皮化生、异型增生,进而发展为胃癌。从萎缩性胃炎恶变至胃癌过程中,分子机制复杂多元,其在遗传和表观遗传改变的积累驱动炎症细胞进行性转化为恶性衍生物成为研究热点。此外,胃癌早期诊断对临床预后起着很重要的作用,通过对胃癌分子机制的研究,探讨胃癌早期诊断显得非常重要。

为了更加全面的了解胃癌的发病机制,本研究收集了萎缩性胃炎和胃癌组织进行基因芯片检测,共筛选出2 779个差异性表达的基因,总结了变化最明显

的15个上调基因及15个下调基因。以往的研究已经证明了一些基因在胃癌的发生发展过程中发挥重要作用,例如,基因芯片结果显示在胃癌组织中高表达的CXCL8可以增加慢性炎症恶变至肿瘤的风险,并且可以促进胃癌的增殖和转移^[5]。S100A9和S100A8是一类钙结合蛋白,两者在多种肿瘤中高表达,可以激活MMP-2的表达和NF- κ B促进胃癌细胞侵袭和迁移的,并且可以作为胃癌临床诊断标志物^[6-8]。在胃癌组织中低表达的KCNE2、SOSTDC1、ATP4A和ATP4B均被报道与胃癌的病理机制及临床特征相关^[9-11]。这些基因在胃癌中的表达情况与我们基因芯片检测的结果一致,说明它们在胃萎缩性炎症恶变过程中发挥重要作用。

此外,本研究发现了一些在胃癌中未见报道的肿瘤相关基因。基因芯片结果显示CPA2在胃癌组织中低表达,最新的研究证明CPA2缺失与胰腺癌的发生有关^[12];HCAR3的高表达与乳腺癌有

关^[13] 本研究显示其在胃癌发生过程中上调。BCL2A1 是 BCL-2 蛋白家族成员,调控细胞凋亡,有研究^[14]表明它可以作为 MYC 的靶分子诱导发生白血病 B 细胞白血病。这些肿瘤相关基因在胃萎缩性炎症恶变过程中差异性表达非常显著,为胃癌发病分子机制的研究指出新的方向。

为了探索差异性表达基因所表示的生理意义,本研究进行了生物信息学分析。GO 分析和 KEGG 信号通路分析分别展示了在胃萎缩性炎症恶变过程中富集的生物过程和信号通路。如 CXCL1、CXCL8、CCL20、IL11 共同参与炎症反应和趋化因子信号通路, BCL2A1 参与 NF- κ B 信号通路, ATP4A 和 ATP4B 共同参与胃酸分泌。ITGAX 参与细胞迁移、黏附和运动。肿瘤发生涉及复杂基因网络的改变,本研究使用了 PPI 网络分析胃萎缩性炎症恶变过程中基因网络的改变,更加清晰地显示基因编码蛋白之间的联系程度。高表达 IL8、CCL2、TNF- α 和 OSM 的胃癌干细胞 GC-MSCs 的培养液可以活化嗜中性粒细胞,进而激活 IL6-STAT3 信号途径促进胃癌的迁移^[15],此点在 PPI 基因网络图谱中得到同样的体现。

本文提供了在胃萎缩性炎症恶变过程中宏观基因表达谱的变化,将为今后的研究提供重要的参考依据。并且这些差异性表达的基因可能与胃癌的发病机制和临床特征相关,但是仍然需要更多的样本和实验进一步验证。

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] Luebeck E G, Curtius K, Jeon J, et al. Impact of tumor progression on cancer incidence curves [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1086–96.
- [3] Tsujimoto H, Ono S, Ichikura T, et al. Roles of inflammatory cytokines in the progression of gastric cancer: friends or foes? [J]. *Gastric cancer*, 2010, 13(4): 212–21.
- [4] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436–44.
- [5] Verbeke H, Geboes K, Van Damme J, et al. The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(1): 117–29.
- [6] Yong H Y, Moon A. Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(1): 75–81.
- [7] Kwon C H, Moon H J, Park H J, et al. S100A8 and S100A9 promotes invasion and migration through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent NF- κ B activation in gastric cancer cells [J]. *Mol Cells*, 2013, 35(3): 226–34.
- [8] Husi H, Skipworth R J, Cronshaw A, et al. Programmed cell death 6 interacting protein (PDCD6IP) and Rabenosyn-5 (ZFYVE20) are potential urinary biomarkers for upper gastrointestinal cancer [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2015, 9(5–6): 586–96.
- [9] Li X, Cai H, Zheng W, et al. An individualized prognostic signature for gastric cancer patients treated with 5-Fluorouracil-based chemotherapy and distinct multi-omics characteristics of prognostic groups [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8743–55.
- [10] Gopal G, Raja U M, Shirley S, et al. SOSTDC1 down-regulation of expression involves CpG methylation and is a potential prognostic marker in gastric cancer [J]. *Cancer Genet*, 2013, 206(5): 174–82.
- [11] Raja U M, Gopal G, Rajkumar T. Intragenic DNA methylation concomitant with repression of ATP4B and ATP4A gene expression in gastric cancer is a potential serum biomarker [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(11): 5563–8.
- [12] Liu C, Yang W, Devidas M, et al. Clinical and genetic risk factors for acute pancreatitis in patients with acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(18): 2133–40.
- [13] Staubert C, Broom O J, Nordstrom A. Hydroxycarboxylic acid receptors are essential for breast cancer cells to control their lipid/fatty acid metabolism [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19706–20.
- [14] Deng J. How to unleash mitochondrial apoptotic blockades to kill cancers? [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(1): 18–26.
- [15] Zhu Q, Zhang X, Zhang L, et al. The IL-6-STAT3 axis mediates a reciprocal crosstalk between cancer-derived mesenchymal stem cells and neutrophils to synergistically prompt gastric cancer progression [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1295.

Changes of gene expression profiles during malignant transformation of atrophic gastritis

Ding Xiping, Mao Yudi, Wang Chaoliang, et al

[Dept of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of USTC (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001]

Abstract Objective To analyze changes of gene expression profile during the malignant transformation of atrophic gastritis. **Methods** 5 atrophic gastritis tissues with intestinal metaplasia and 5 human advanced gastric cancer

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.014.html>

蛋白激酶抑制剂 LY333531 对大鼠烟雾吸入性肺损伤氧化应激的影响

程浩^{1,2}, 宋立成², 吴剑波², 陈丽娜², 陈旭昕², 韩志海^{1,2}

摘要 目的 探索蛋白激酶抑制剂(LY333531)对大鼠烟雾吸入后氧化应激的作用。方法 6~8周龄SD雄性SPF级大鼠40只,随机分为空白对照组、抑制剂对照组、烟雾吸入组和烟雾吸入+抑制剂组。抑制剂对照组大鼠和烟雾吸入+抑制剂组大鼠在烟雾吸入实验前1周按1 mg/(kg·d)腹腔注射LY333531。1周后,于自制产烟箱建立大鼠烟雾吸入性肺损伤模型。12 h后解剖,留取动脉血、肺组织和肺泡灌洗液。对各组大鼠进行湿干比(W/D)、肺泡灌洗液(BALF)蛋白浓度、丙二醛(MDA)、一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和衔接蛋白(P66Shc)的检测。制作HE染色切片,在光学显微镜下观察肺组织病理学特点。结果 与空白对照组和抑制剂对照组相比,烟雾吸入组大鼠肺组织W/D、肺泡灌洗液蛋白浓度均明显上升($P < 0.05$);肺组织及血清中MDA、NOS浓度明显上升($P < 0.05$);SOD、CAT活性明显下降($P < 0.05$);衔接蛋白(P66Shc)及活化后的p-P66Shc表达明显增加;病理切片可见明显肺泡壁增厚、肺泡断裂、渗出、炎性细胞浸润等。与烟雾吸入组相比,烟雾吸入+抑制剂组大鼠肺组织W/D、肺泡灌洗液蛋白浓度均有所降低($P < 0.05$);血清MDA、NOS有

所降低($P < 0.05$);SOD以及CAT活性增加($P < 0.05$);衔接蛋白(P66Shc)及活化后的p-P66Shc表达减少;肺泡断裂、渗出、炎性细胞浸润等病理改变减轻。结论 LY333531能减轻大鼠烟雾吸入后的氧化应激效应,减轻氧化应激对机体的损伤。

关键词 LY333531; 烟雾吸入; 氧化应激; 肺损伤

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0407-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.014

烟雾吸入后,其固有的高温及富含有毒有害颗粒等特性可导致气管及肺实质的直接和间接损害,从而引发烟雾吸入性肺损伤(smoke inhalation induced acute lung injury, SI-ALI)。火灾中若合并有烟雾吸入性肺损伤,死亡率将上升至60%~80%^[1]。烟雾吸入后,氧化应激的加强对肺损伤的加重起着重要作用^[2]。近年来学者发现激活PKC β /P66Shc信号通路会加强机体氧化应激,致使机体损伤加重^[3-4]。而特异性PKC β 抑制剂LY333531能够抑制该通路激活,减少机体氧化应激的损伤。目前,已有研究证实,应用LY333531后能有效减轻高氧刺激对细胞的损伤^[5]。但是,在烟雾吸入性肺损伤中,LY333531是否能够通过抑制PKC β /P66Shc信号通路进而减轻氧化应激损伤,尚不明确。因此,本实验拟通过建立SD大鼠烟雾吸入性

2018-10-10 接收

基金项目:军队后勤科研计划重点项目(编号:BJH16J011)

作者单位:¹安徽医科大学海军临床学院,北京 100048

²海军总医院呼吸与危重症医学科,北京 100048

作者简介:程浩,男,硕士研究生;

韩志海,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: hanzhihai@hotmail.com

tissues were collected for examining the gene expression changes by human genome microarray. Bioinformatics analysis was used to identify the enriched pathways and biological processes by the deregulated genes, meanwhile, the interaction of the gene encoding proteins were also analyzed. **Results** Gene expression profile analysis showed that 2 779 deregulated genes during the malignant transformation of atrophic gastritis, the top 15 up-regulated and the top 15 down-regulated genes were selected for a brief summary, including some novel gastric cancer related genes, such as *CPA2*, *HCAR3*, *BCL2A1*, *ITGAX*. Moreover, bioinformatics analysis showed the physiological significance of deregulated genes, such as inflammation, cell migration, TNF signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway. **Conclusion** During the process of atrophic gastritis malignant transformation to gastric cancer, the gene expression profile changes obviously and represents the corresponding physiological significance.

Key words inflammation malignant; gastric carcinoma; atrophic gastritis; gene expression profile; GO analysis; KEGG pathway; PPI network analysis