

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.003

Affymetrix 基因表达谱芯片在新疆维吾尔族与汉族胰腺癌组织样本间差异表达基因筛选中的运用 *

易 超¹ 苏雅婷² 依马木买买提江·阿布拉¹ 张 波³ 李海军^{3Δ} 丁 伟^{1Δ}

(1 新疆医科大学附属第三医院肝胆外科 新疆 乌鲁木齐 830000;

2 新疆医科大学附属第五医院医务部 新疆 乌鲁木齐 830000; 3 深圳市罗湖区人民医院普外科 广东 深圳 518001)

摘要 目的:运用基因表达谱芯片筛选并分析新疆维吾尔族与汉族胰腺癌组织样本间的差异表达基因。**方法:**收集我院 2014 年 1 月至 2016 年 6 月间行手术切除的维吾尔族与汉族胰腺导管细胞癌组织并提取总 RNA,选取经 Nanodrop 2000 与 Agilent 2100 仪器质检合格的样本总 RNA 采用 Affymetrix 基因表达谱芯片筛选出差异表达基因并绘制统计图,运用基因本体(GO)分析及信号通路(Pathway)分析对这些差异表达基因的生物信息进行汇总分析。**结果:**通过基因表达谱芯片分析,新疆维吾尔族与汉族胰腺癌组织样本间共检测到 1063 个基因存在差异表达,在维吾尔族胰腺癌标本中显著上调表达的基因共 281 个,差异表达倍数最高的为 IGLV1-44 基因(差异倍数:9.99)下调表达的基因共 782 个,差异表达倍数最高的为 CPB1 基因(差异倍数:33.76);在 Gene Ontology 数据库中共检索到 815 个上述差异表达基因具有明确的 GO 分类,差异表达倍数最高的为 CPB1 基因(差异倍数:33.76);Pathway 分析中共检测到 30 条信号通路包含有上述差异表达基因,共涉及 196 个基因,其中以 FAK 信号通路差异表达基因富集程度最高,差异表达倍数最高的基因为 COL11A1 基因(差异倍数:5.02)。**结论:**基因表达谱芯片分析结果显示,在新疆维吾尔族与汉族胰腺癌组织样本间存在大量的差异表达基因,这些基因与胰腺癌的增殖分化、侵袭转移及多药耐药等特性密切相关,且参与了多条生物体内重要信号转导通路的调控。

关键词:胰腺导管细胞癌;Affymetrix 基因表达谱芯片;基因差异表达;基因本体分析;通路分析;维吾尔族

中图分类号:R-33;R735.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)32-6215-09

Screening Differentially Expressed Genes between Pancreatic Cancer Tissues and Adjacent Tissues by Affymetrix Gene Chip*

YI Chao¹, SU Ya-ting², Yimamumaimaitijiang·Abula¹, ZHANG Bo³, LI Hai-jun^{3Δ}, DING Wei^{1Δ}

(1 The department of hepatobiliary surgery, The Third Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 2 The department of hepatobiliary surgery, The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 3 The department of general surgery, Shenzhen Luohu People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518001, China)

ABSTRACT Objective: To screen and analyze differentially expressed genes in pancreatic carcinoma tissues taken from Uighur and Han patients by Affymetrix Genechip. **Methods:** Pancreatic ductal cell carcinoma tissues were collected from the Uighur and Han patients undergoing resection in the Hospital during January 2014 to June 2016 and the total RNA was extracted. Differentially expressed genes were selected from the total RNA qualified by Nanodrop 2000 and Agilent 2100 using Affymetrix and a cartogram was drawn; The gene ontology (GO) analysis and Pathway analysis were used for the collection and analysis of biological information of these differentially expressed genes. **Results:** Through the microarray analysis of gene expression, 1063 differentially expressed genes were detected by comparing pancreatic cancer tissue samples between Xinjiang Uygur and Han patients. A total of 281 genes were significantly up-regulated in pancreatic cancer tissue samples in Uygur patients. IGLV1-44 gene had the highest multiple of differential expression (difference multiple: 9.99). A total of 782 genes were down-regulated and CPB1 gene had the highest multiple of differential expression (difference multiple: 33.76). In the Gene Ontology database, 815 differentially expressed genes were identified with clear GO classification, and CPB1 gene had the highest multiple of differential expression (difference multiple: 33.76). The Pathway analysis detected 30 signaling pathways that included these differentially expressed genes, involving a total of 196 genes. Among these pathways, the enrichment of differentially expressed genes in the FAK signaling pathway was the highest and COL11A1 gene had the highest multiple difference (multiple difference: 5.02). **Conclusions:** The results of microarray analysis of gene expression profiles showed that there are a large number of differentially expressed genes in pancreatic cancer tissue samples compared between Xinjiang Uygur and Han

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81360328)

作者简介:易超(1985-),硕士,博士研究生,主要从事肝胆胰腺肿瘤外科临床与基础研究,

电话:15214804845, E-mail: yinlanglf000@163.com

Δ 通讯作者:李海军,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事普外科疾病的临床与基础研究, E-mail: suyating128@163.com;

丁伟,硕士,主任医师,副教授,硕士研究生导师,主要从事肝胆胰腺肿瘤的临床与基础研究, E-mail: 410173524@qq.com

(收稿日期:2017-04-15 接受日期:2017-05-09)

populations. These genes are closely related to the proliferation, differentiation, invasion and metastasis and multi-drug resistance of pancreatic cancer and are involved in the regulation of multiple important signaling pathways in organisms.

Key words: Pancreatic ductal cell carcinoma; Affymetrix gene expression profile; Gene differential expression; GO analysis; Pathway analysis; Uighur

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)32-6215-09

前言

胰腺癌是目前死亡率最高的消化系统恶性肿瘤之一,其起病隐匿、进展迅速,多数患者一经发现已属晚期,丧失了最佳的治疗机会,因此,探寻特异且敏感的早期诊断手段对于改善胰腺癌患者的预后并延长生存时间尤为重要^[1]。随着人类基因组计划全核苷酸测序的完成,特别是近年间逐步发展成熟的基因芯片技术,为高通量分析肿瘤的发生发展提供大量的数据信息,使得基因诊断成为多数肿瘤理想的早期诊断方法^[2],如能通过对胰腺癌恶性生物学特性产生与维持过程中相关基因的分析阐明其分子机制,则势必可令胰腺癌的早期基因诊断成为现实。本研究通过采用 Affymetrix 基因表达谱芯片筛选新疆维吾尔族与汉族胰腺癌标本中的差异表达基因并进一步的基因功能分析,以期阐明胰腺癌发生发展的分子机制提供重要的参考数据与实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

所需试剂 Agilent RNA 6000 Nano Kit、GeneChip 3' IVT Express Kit、GeneChip Hybridization Wash and Stain Kit、Trizol 试剂盒、QIAGEN RNeasy Total RNA Isolation kit 均由吉凯基因技术有限公司提供。

研究中使用到的主要仪器包括 Thermo Nanodrop 2000、Agilent 2100、GeneChip Hybridization Oven 645、GeneChip Fluidics Station 450 及 GeneChip Scanner 3000。

1.2 研究样本

收集新疆医科大学附属第三医院 2014 年 1 月至 2016 年 6 月间行手术切除的胰腺恶性肿瘤患者的新鲜肿瘤组织标本共 48 例,并按如下的纳入与排除标准初步筛选出其中的 33 例拟用于后续基因表达谱芯片检测的研究标本。

纳入标准:(1)经病理证实为胰腺导管细胞癌;(2)经本院首次确诊的新发病例;(3)患者年龄 ≥ 18 岁;(4)患者本人及患者家属同意留取组织标本并用于研究,允许研究资料交流发表。

排除标准:(1)经病理证实存在局部脉管侵犯、区域淋巴结转移;(2)经我院相关检查或术中探查发现存在远处转移;(3)合并有其他恶性肿瘤或糖尿病、高血压、心脑血管疾病等全身系统性疾病;(4)术前已接受放疗、化疗或其他抗肿瘤药物治疗患者;(5)近三年内有手术史。

患者一般资料:33 例患者中:维吾尔族 18 例,汉族 15 例;男性 16 例,女性 17 例;平均年龄 57.92 岁,年龄最小为 44 岁,最高为 72 岁;高分化 12 例,中分化 19 例,低分化 2 例。

1.3 样本总 RNA 提纯与质检

上述收集到的样本经 Trizol 试剂盒与 QIAGEN RNeasy Total RNA Isolation kit 试剂盒提纯并纯化后获得样本总 RNA,采用 Nanodrop 2000 与 Agilent 2100 仪器进行样本检测,根据样本 RNA 浓度、A260 与 A280 值、RIN 值及 28S/18S 值对样本进行评估,当样本同时满足 $1.7 < A260/A280 < 2.2$ 、 $RIN < A26$ 且 $28S/18S > 0.7$ 时样本合格,上述过程均严格参照试剂与仪器说明书操作。

1.4 基因芯片杂交

参照 GeneChip 3' IVT Express Kit 试剂盒说明书,将上述经纯化的总 RNA 与内参照 poly-A RNA 混匀配制成混合液后合成双链 cDNA 模板,通过体外反转录获得携带生物素标记的 aRNA(amplified RNA),利用试剂盒内的纯化试剂纯化 aRNA 后将其片段化配制杂交反应液,杂交反应液 98°C 加热 10 min 后将至 45°C 加热 3 min 后 45°C 保持,同时,将试剂盒中的预杂交液取 130 μL 注入芯片, 45°C 杂交炉内预杂交 10 min 后弃去预杂交液后向芯片内注入杂交反应液 130 μL 杂交炉内 45°C , 60 rpm 杂交 16 h,完成杂交后用 GeneChip Fluidics Station 450 仪器进行自动洗染,洗染完成后进行扫描获取数据。

1.5 数据处理与统计学分析

上述扫描获得的数据采用 R-Project 软件进行如下数据分析:

(1)将处于所有芯片探针信号强度排序最低的 20%范围内的芯片作为背景噪音,予以滤除;

(2)采用软件绘制基因芯片探针信号强度分布曲线图与探针相对对数信号强度箱线图评估差异表达谱芯片检测结果的可靠性与可重复性;

(3)采用基于经验贝叶斯分布的线性模型计算两组基因表达显著差异水平的 P 值,显著性差异基因表达的筛选标准定义为差异倍数(Fold Change) $\rightarrow > 3.0$ 且 $P\text{-value} < 0.05$;

(4)采用软件,依据两组样本芯片信号强度绘制散点图,依据两组样本间基因表达的差异倍数 Fold Change 与差异显著性检验得到的 P 值绘制火山图;

(5)采用层次聚类分析从样本和基因差异表达模式两个维度对上述芯片结果进行初步分类;

(6)基因本体(Gene Ontology, Go)分析:上述差异表达基因从参与的生物学过程(Biological Process, BP)、具有的分子功能(Molecular Function, MF)和所处的细胞组分(Cellular Component, CC)三个方面对这些基因进行分类,并采用 Fisher 精确检验评价这些差异表达基因在各分类中的富集程度($\alpha=0.05$);

(7)信号通路(Pathway)分析:通过检索 KEGG 和 BioCarta 数据库,采用 Fisher 精确检验分析计算各信号通路中所包含的上述差异表达基因富集度的显著水平,从而评估受到显著影响

的信号通路($\alpha=0.05$)。

2 结果

2.1 样本总 RNA 质检

经总 RNA 质检,33 例样本共 24 例样本总 RNA 合格可用于后续研究,随机筛选出汉族与维吾尔族患者胰腺癌标本各 10 例;汉族患者中,男性 7 例,女性 3 例,高分化 3 例,中分化 5 例,低分化 2 例;维吾尔族患者中,男性 6 例,女性 4 例,高分化 6 例,中分化 4 例。

2.2 差异表达基因检测结果与质量评估

(1)经降噪处理后,选择芯片所包含的 49395 组探针中的 38291 组探针用于后续分析。

(2)经分析,上述 38291 组探针中共有 1063 个基因存在差异表达,差异表达率为 2.78%;相较于汉族,维吾尔族患者胰腺癌标本中上述差异表达基因存在显著上调表达的基因共 281 个,表达显著下调的基因共 782 个。

(3)数据质量评估:芯片信号强度分布曲线见图 1,纵坐标表示芯片探针组数,横坐标表示探针信号强度区间,由图可见,各样本芯片探针信号强度分布曲线重合度较好,证实该组芯片分析结果数据可靠。

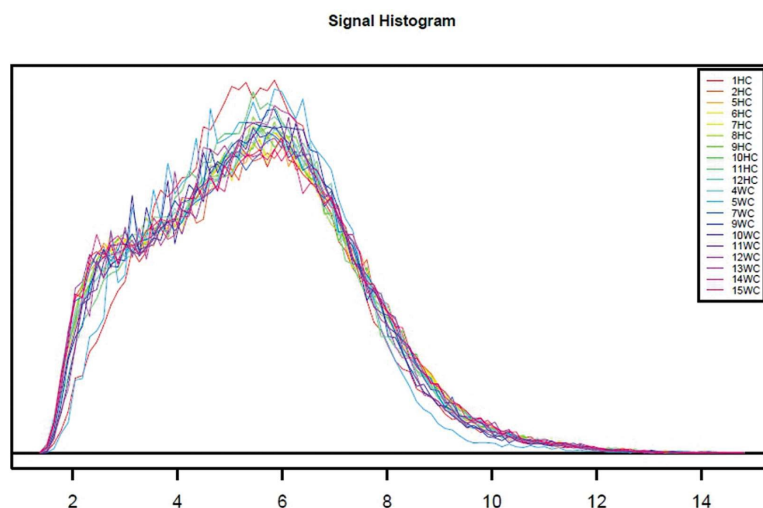


图 1 芯片探针信号强度分布曲线

Fig. 1 Signal Histogram

相对对数信号强度箱式图见图 2,纵坐标为相对对数信号强度,横坐标为样本名,由图可见,箱式图各探针相对对数信号强度分布接近证实数据可重复性良好。

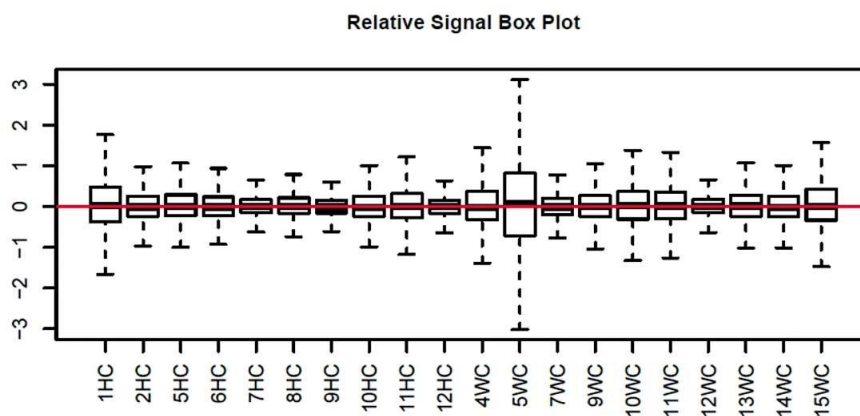


图 2 芯片探针相对对数信号强度箱式图

Fig. 2 Relative Signal Box Plot

2.3 样本基因表达显著性差异分析

(1)散点图见图 3,纵坐标代表维吾尔族胰腺癌患者标本探针信号强度,横坐标代表汉族胰腺癌患者标本探针信号强度,图中的点代表一个探针组在汉族和维吾尔族标本中的信号强度,绿色线间的区间内的点代表无显著差异表达的基因,线外区域为存在显著差异表达的基因,红色点表示上调表达的基

因,绿色点表示为下调表达的基因。

(2)图 4 为软件依据基因表达差异倍数及显著性检验的 P 值绘制的火山图,纵坐标为 P 值,横坐标为经以 2 为底数的对数变换后的差异倍数,红色点表示符合上述显著性差异表达筛选条件的差异表达基因。

(3)图 5 为层次聚类分析热点图,该图为对两组样本间显

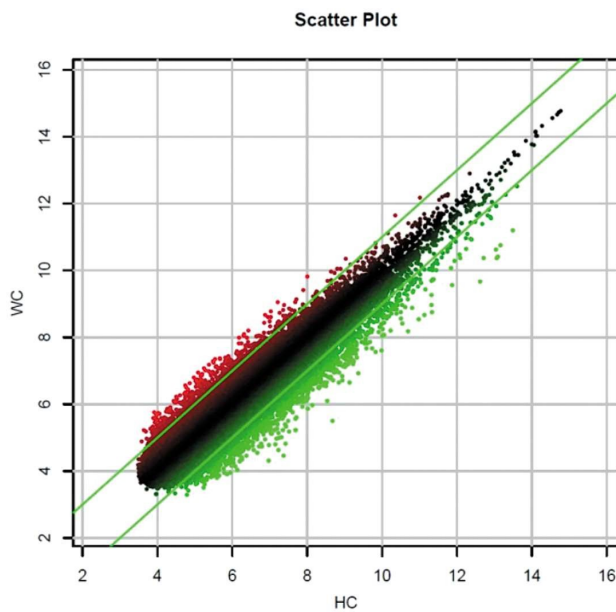


图3 散点图

Fig. 3 Scatter Plot

著性差异表达基因表达谱的聚类分析结果,图中列代表样本,行代表差异表达基因,结果显示,在多数样本中同民族样本具有相似差异基因表达谱;依据图中左侧树状图显示,部分基因间具有相似的表达模式,这些基因可能具有相似的功能或参与同一生物学过程,可将这些基因以差异表达倍数最高的基因命名为基因簇,如 RASA2 基因簇包括 BIRC2、RASA2、ADAM17、RECQL、LYAR 及 SDHD 基因,其中以 RASA2 差异表达倍数最高,为 2.36 倍。

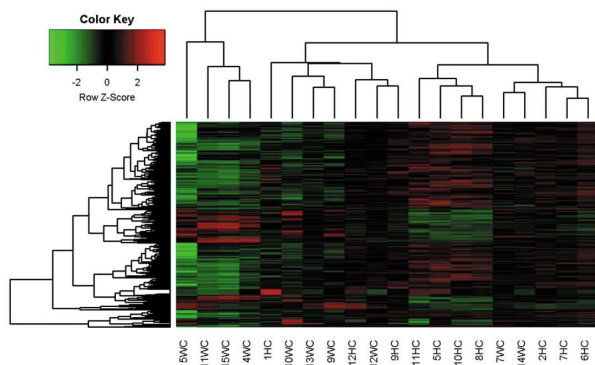


图5 聚类分析热图

Fig. 5 Hierarchical Clustering

2.4 差异表达基因生物信息分析

(1)GO 分析:依据上述差异表达基因筛查结果,共在 Gene Ontology 数据库中检索到 815 个差异表达基因,在 GO 分析的三大类别中:BP 分类共包含 615 个差异表达基因,MF 分类共包含 665 个基因,CC 分类共包含 590 个差异表达基因;图 6 是根据差异表达基因富集程度筛选出的上述三大分类排名前 10 位的 GO 分类,结果显示,两组样本间显著差异表达的基因中,与生物学过程相关的基因中主要编码与调控机体免疫系统、免疫应答、细胞信号转导、细胞对刺激的反应及多种反馈调节等分子机制的蛋白;分子功能相关的基因主要编码与内肽酶活

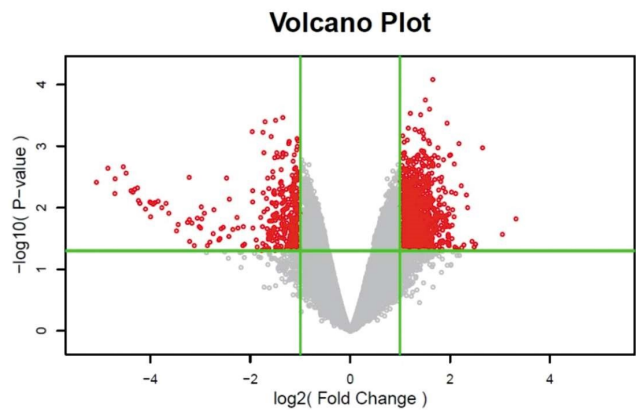


图4 火山图

Fig. 4 Volcano Plot

性、相同蛋白结合能力、酶调节活性、细胞骨架蛋白结合能力、蛋白结构域特定结合能力、蛋白分子功能调控相关的蛋白;与细胞组分相关的基因主要编码参与质膜结构、细胞液泡、内质网、细胞缝隙连接、细胞外基质等结构组成的蛋白。

(2)Pathway 分析:经检索 KEGG 和 BioCarta 数据库,两组样本间共有 30 条细胞信号通路存在基因差异表达,涉及 196 个基因,见图 7;表 1、2、3 分别为差异基因富集程度最高的三条通路 Focal adhesion、Pathways in cancer 及 Regulation of actin cytoskeleton 通路中所包含的差异表达基因的详细列表。

3 讨论

胰腺癌的发生发展受多种因素的影响,已有大量的研究显示不同地域、种族甚至民族间胰腺癌的发病率存在明显的差异,如 Wormann SM^[3]在其报道中指出,种族差异是胰腺癌发病的高危因素之一;Ma J^[4]的调查显示,1970 年至 2009 年间,美国白人与黑人胰腺癌死亡率的变化趋势截然相反,提示胰腺癌的预后可能与不同人种遗传背景的差异有关。目前国内有关新疆维吾尔族人群胰腺癌相关的研究鲜有见到,尚无有力的证据证实维吾尔族与汉族或其他少数民族胰腺癌患病率与预后存在显著差异。孙岩娜等人^[5]对新疆医科大学第一附属医院 2002 年至 2011 年 10 年间 353 例胰腺癌患者的回顾分析结果显示,维吾尔族患者共有 53 例,其 6 个月、1、2、5 年生存率分别为 47.1%、23.6%、11.4%及 4.2%,与汉族患者相比无显著差异;杨媚等人^[6]对新疆某院 2008 年至 2013 年 8713 例消化系统恶性肿瘤的调查研究结果显示维吾尔族患者共有 66 例,构成比为 5.0%,而汉族患者则共计 292 例,构成比为 4.7%。本研究采用 Affymetrix 基因表达谱芯片检测并分析了新疆维吾尔族与汉族胰腺癌患者手术切除的胰腺癌组织样本间差异表达的基因及其生物学信息,从分子学水平探讨不同民族胰腺癌发生发展过程中可能存在的差异,为进一步阐明胰腺癌恶性生物血特性的产生与维持提供了真实可靠的参考依据。

本研究中通过对维吾尔族与汉族胰腺癌组织样本的差异表达基因筛选研究发现,两组样本间具有显著性差异表达的基因共 1063 个,占总有效检测基因数的 2.78%,与汉族相比,维吾尔族胰腺癌组织中上调表达的基因共 281 个,下调表达的基因共 782 个。通过基因本体分析研究显示,上述检测到的差异

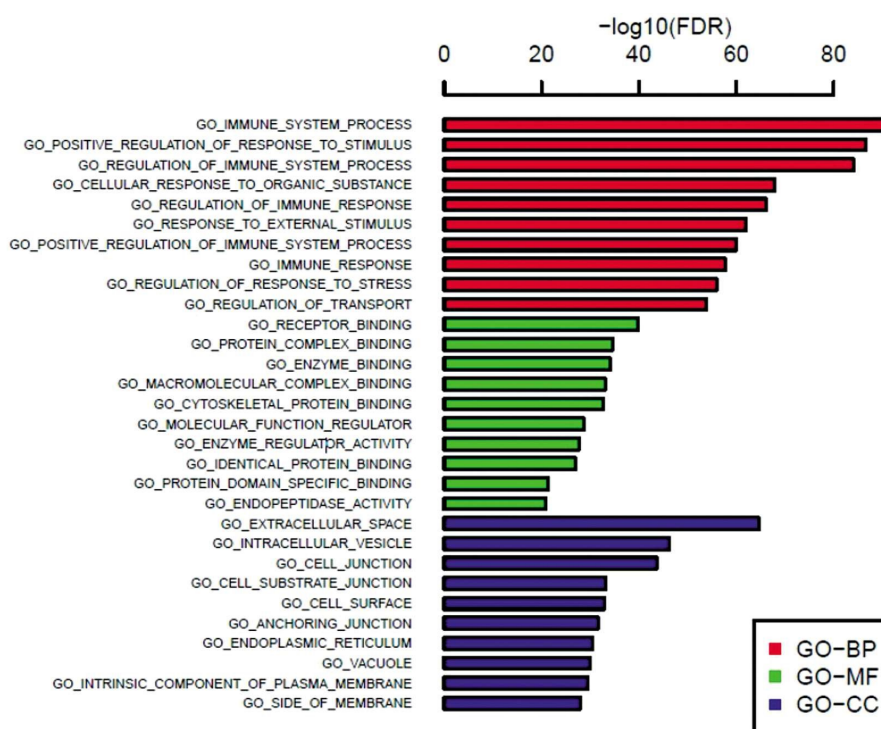


图 6 GO 分析结果示意图

Fig. 6 Gene Ontology analysis

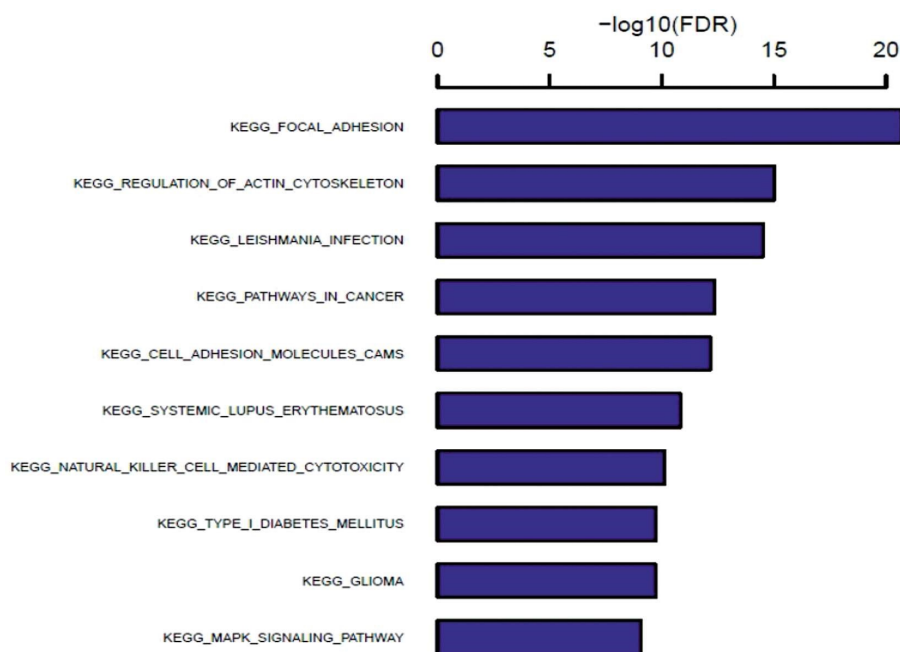


图 7 Pathway 分析结果示意图

Fig. 7 Pathway analysis

表达基因中共有 815 个基因在数据库中具备完整的注释,依据数据库中基因生物学功能的注释证实,这些差异表达的基因主要与胰腺癌细胞的增殖分化、侵袭转移及多药耐药性密切相关。与生物学过程相关的基因中差异表达倍数与显著性差异检验综合评分最高的为 PLA2G1B (Phospholipase A2, group IB) 基因,该基因在维吾尔族胰腺癌组织样本中表达明显下调,差异倍数为 18.51 倍。PLA2G1B 基因编码的蛋白为磷脂酶 A2, 此酶在胰腺炎症和组织损伤时膜通道的活化、信息传递、血流

动力学及病理生理过程中起关键性作用^[7,8]。另外,Abbenhardt C 等^[9]的研究显示,PLA2G1B 基因的单核苷酸多态性与直肠癌的易感性密切相关,但目前国内外有关该基因与胰腺癌发生发展的关联研究却鲜有报道;分子功能相关的基因中差异表达倍数与显著性差异检验综合评分最高的为 CPB1 (Carboxypeptidase B1) 基因,与汉族相比,此基因在维吾尔族胰腺癌组织中显著下调表达,差异倍数为 33.76 倍,CPB1 基因主要编码胰凝乳蛋白酶,该酶是胰腺功能紊乱的重要血清标志物^[10,11]。近年来有关

表 1 Focal Adhesion 通路差异表达基因
Table 1 The differentially expressed genes in Focal Adhesion pathway

Gene Symbol	Gene Id	Fold Change	logFC	Regulation	P-value
ITGA4	3676	2.51	1.33	up	0.0482
BIRC3	330	3.47	1.80	up	0.0138
PAK4	10298	-2.33	-1.22	down	0.0048
COL1A1	1277	2.24	1.16	up	0.0390
FN1	2335	2.90	1.53	up	0.0344
PDGFD	80310	2.40	1.26	up	0.0167
COL11A1	1301	5.02	2.33	up	0.0061
PTEN	5728	2.01	1.01	up	0.0262
ITGB1	3688	2.14	1.10	up	0.0342
PIK3R2	5296	2.16	1.11	up	0.0148
COL5A1	1289	3.06	1.62	up	0.0427
PAK3	5063	-3.42	-1.77	down	0.0491
BIRC2	329	2.21	1.14	up	0.0089
PAK2	5062	2.26	1.18	up	0.0091
SHC2	25759	-2.08	-1.06	down	0.0063
MYL12A	10627	2.57	1.36	up	0.0050
PXN	5829	2.06	1.04	up	0.0274
PIK3R1	5295	2.30	1.20	up	0.0179
PPP1CB	5500	2.02	1.01	up	0.0124
RHOA	387	2.31	1.21	up	0.0176
EGFR	1956	3.69	1.88	up	0.0088
COL1A2	1278	3.90	1.97	up	0.0281
RAP1A	5906	2.14	1.10	up	0.0439
PDGFC	56034	2.39	1.26	up	0.0141
CAPN2	824	2.17	1.11	up	0.0177
THBS2	7058	3.61	1.85	up	0.0340
COL6A3	1293	2.87	1.52	up	0.0326
VCL	7414	2.09	1.06	up	0.0317
CAV2	858	2.17	1.12	up	0.0363
RAP1B	5908	2.48	1.31	up	0.0162
COL3A1	1281	2.59	1.37	up	0.0397
COL5A2	1290	2.66	1.41	up	0.0498
PIK3CG	5294	2.57	1.36	up	0.0194
CCND1	595	2.12	1.09	up	0.0187
FLT1	2321	2.40	1.27	up	0.0245
PPP1R12A	4659	2.09	1.06	up	0.0083
ITGAV	3685	2.96	1.57	up	0.0036

CPB1 与恶性肿瘤的关联研究较少,金霆等^[12]的研究显示 CPB1 在部分乳腺癌患者中存在显著的异常表达,Bouchal P 等^[13]的研究也提示 CPB1 的异常表达可能与乳腺癌的淋巴结转移有关;与细胞组分相关的基因中差异表达倍数与显著性差异检验

表 2 Regulation of actin cytoskeleton 通路差异表达基因

Table 2 The differentially expressed genes in Regulation of actin cytoskeleton pathway

Gene Symbol	Gene Id	Fold Change	logFC	Regulation	P-value
PIK3CG	5294	2.57	1.36	up	0.0194
ARPC5	10092	2.17	1.12	up	0.0263
ARHGEF6	9459	2.29	1.19	up	0.0376
ITGAV	3685	2.96	1.57	up	0.0036
PPP1R12A	4659	2.09	1.06	up	0.0083
VCL	7414	2.09	1.06	uup	0.0317
NCKAP1L	3071	2.04	1.03	up	0.0328
PDGFC	56034	2.39	1.26	up	0.0141
PIK3R1	5295	2.30	1.20	up	0.0179
PXN	5829	2.06	1.04	up	0.0274
GNA13	10672	2.65	1.41	up	0.0109
KRAS	3845	2.28	1.19	up	0.0017
TMSB4X	7114	2.54	1.34	up	0.0074
FGF7	2252	2.89	1.53	up	0.0315
EGFR	1956	3.69	1.88	up	0.0088
RHOA	387	2.31	1.21	up	0.0176
PPP1CB	5500	2.02	1.01	up	0.0124
PAK2	5062	2.26	1.18	up	0.0091
NRAS	4893	2.31	1.21	up	0.0193
ARPC3	10094	2.08	1.06	up	0.0147
IQGAP2	10788	2.06	1.05	up	0.0188
MYL12A	10627	2.57	1.36	up	0.0050
ITGB1	3688	2.14	1.10	up	0.0342
PAK3	5063	-3.42	-1.77	down	0.0491
F2R	2149	2.88	1.53	up	0.0151
PIK3R2	5296	2.16	1.11	up	0.0148
MSN	4478	2.61	1.38	up	0.0190
FN1	2335	2.90	1.53	up	0.0344
PDGFD	80310	2.40	1.26	up	0.0167
ITGA4	3676	2.51	1.33	up	0.0482
INS	3630	-3.31	-1.73	down	0.0115
PAK4	10298	-2.33	-1.22	down	0.0048

综合评分最高的同样为 CPB1 基因,该基因可能与胰腺癌细胞外基质的结构成分有关。各 GO 分类中差异基因的富集程度可在一定程度上反应维吾尔族与汉族胰腺癌在上述不同生物学分类中的差异程度,但单纯以此结果评价维吾尔族与汉族胰腺癌生物学特性的差异并不准确,尚需考虑上述分类在所有人群胰腺癌相关基因中的分布情况。

Pathway 分析是目前最常用于基因表达谱芯片差异基因生物信息分析的研究方法,该法通过检索 KEGG 和 BioCarta 两

大权威数据库中生物体信号转导通路的详细信息,以通路为单位,以芯片上包含的全部基因为背景,分析计算各通路中差异表达基因的富集程度的显著水平,从而确定受到显著影响的代谢和信号转导途径,明确差异基因生物学功能的分子调控机制。通过 Pathway 分析,我们共检测到 30 条信号通路在维吾尔族与汉族胰腺癌组织样本间存在基因的差异表达,共涉及 196 个基因,其中以 FAK(Focal Adhesion Kinase,即黏着斑激酶)通路差异表达基因富集程度最高,共 37 个成员存在显著的表达

表 3 Leishmania infection 通路差异表达基因

Table 3 The differentially expressed genes in Leishmania infection pathway

Gene Symbol	Gene Id	Fold Change	logFC	Regulation	P-value
HLA-DPA1	3113	2.33	1.22	up	0.0373
TLR4	7099	2.05	1.03	up	0.0441
IFNGR1	3459	3.07	1.62	up	0.0165
C3	718	2.54	1.34	up	0.0274
FCGR3A	2214	3.61	1.85	up	0.0141
NCF2	4688	2.90	1.54	up	0.0030
HLA-DRA	3122	3.09	1.63	up	0.0445
HLA-DQA1	3117	2.43	1.28	up	0.0240
PTGS2	5743	3.42	1.77	up	0.0074
ITGA4	3676	2.51	1.33	up	0.0482
FCGR2A	2212	2.72	1.45	up	0.0331
FCGR2C	9103	2.72	1.45	up	0.0331
STAT1	6772	2.63	1.40	up	0.0279
HLA-DOA	3111	2.49	1.32	up	0.0466
HLA-DMB	3109	2.50	1.32	up	0.0407
ITGB1	3688	2.14	1.10	up	0.0342
HLA-DPB1	3115	2.66	1.41	up	0.0431
FCGR1A	2209	2.33	1.22	up	0.0049
FCGR3B	2215	3.61	1.85	up	0.0141
IFNGR2	3460	2.04	1.03	up	0.0271

差异,其中上调表达的 34 个,下调表达的 3 个,差异表达倍数与显著性差异检验综合评分最高的为 COL11A1 基因,差异倍数为 5.02 倍,该基因在维吾尔族胰腺癌组织中显著上调表达。FAK 信号通路可整合来自细胞外的多种信号调节下游分子的表达,从而控制细胞的增殖与凋亡,该通路与生物体内多条信号转导通路级联,是细胞内外信号转导的中枢环节^[14,15]。目前已有大量的研究证实 FAK 信号通路的异常激活与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关^[16-18]。胰腺癌研究方面,Gao Z 等^[19]报道,依赖于 FAK 磷酸化水平的 SRPX2 (Sushi repeat-containing protein, X-linked 2) 过表达与胰腺癌发生局部浸润及远处转移过程密切相关。Hsieh YJ 等^[20]的研究也显示在新发现的泛素水解酶家族成员 USP22 促进胰腺癌细胞发生侵袭转移的过程中,FAK 信号通路起到了极为关键的作用。Dao P 等^[21]在其报道中指出,内在获得性耐药是影响肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL, 一类极具潜力的抗癌药物,目前正处于临床研究阶段) 的临床疗效的关键因素,而新近发现的 FAK 抑制剂 PH11 则可诱导 TRAIL 耐药的 PANC-1 细胞迅速凋亡,说明 FAK 信号通路的过度激活可能与胰腺癌的多药耐药特性相关。

胰腺癌的发生与发展是一个多因素参与的复杂过程,大量循证医学证据表明不同人群胰腺癌的易感性与发病率存在着显著的差异。本研究通过基因表达谱芯片分析,筛选出新疆维

吾尔族与汉族胰腺癌组织样本中的显著差异表达基因,并针对这些基因的功能与调控机制进行了分析,为后续更进一步研究胰腺癌恶性生物学特性产生与维持过程的分子机制提供了大量的基因位点与参考数据。但因胰腺癌手术切除率较低所获得的样本量较少,结果存在一定的局限性,尚需多中心大样本的家系研究,才可进一步明确新疆维吾尔族胰腺癌发生发展的特点及其分子生物机制,最终更具针对性的制定防治措施,为新疆地区胰腺癌患者带来福音。

参考文献 (References)

- [1] Fogel EL, Shahda S, Sandrasegaran K, et al. A Multidisciplinary Approach to Pancreas Cancer in 2016: A Review [J]. Am J Gastroenterol, 2017, 112(4): 537-554
- [2] Negi SK, Guda C. Global gene expression profiling of healthy human brain and its application in studying neurological disorders [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 897
- [3] Wormann SM, Algul H. Risk Factors and Therapeutic in Pancreatic Cancer[J]. Front Oncol, 2013, 3: 282
- [4] Ma J, Siegel R, Jemal A. Pancreatic cancer death rates by race among US men and women, 1970-2009[J]. J Natl Cancer Inst, 2013, 105(22): 1694-1700
- [5] 孙岩娜, 张华, 张瑞丽, 等. 新疆维吾尔族与汉族入院治疗胰腺癌患者 353 例预后因素分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(18): 1436-1440

- Sun Yan-na, Zhang Hua, Zhang Rui-li, et al. Prognostic analysis of 353 pancreatic cancer patients in hospital treatment between Uyghur and Han nationality in Xinjiang[J]. Chin J Cancer prev treat, 2013, 20(18): 1436-1440
- [6] 杨媚, 艾尼瓦尔·艾木都拉, 张月芬, 等. 8713 例消化系统恶性肿瘤统计分析[J]. 中国病案, 2014, 15(11): 56-57
- Yang Mei, Ainiwaer Aimudula, Zhang Yue-fen, et al. Epidemiological Analysis of 8713 cases of digestive system malignant tumor[J]. Chinese Medical Record, 2014, 15(11): 56-57
- [7] Zhang KJ, Zhang DL, Jiao XL, et al. Effect of phospholipase A2 silencing on acute experimental pancreatitis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(24): 3279-3284
- [8] Zhang MS, Zhang KJ, Zhang J, et al. Phospholipases A-II (PLA2-II) induces acute pancreatitis?through activation of the transcription factor NF-kappaB [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(8): 1163-1169
- [9] Abbenhardt C, Poole EM, Kulmacz RJ, et al. Phospholipase A2G1B polymorphisms and risk of colorectal neoplasia [J]. Int J Mol Epidemiol Genet, 2013, 4(3): 140-149
- [10] Nakano E, Geisz A, Masamune A, et al. Variants in pancreatic carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 309(8): G688-694
- [11] Szabó A, Pilsak C, Bence M, et al. Complex Formation of Human Proelastases with Procarboxypeptidases A1 and A2 [J]. J Biol Chem, 2016, 291(34): 17706-17716
- [12] 金霆, 费政芳. Cpb1 基因在乳腺癌中差异表达的初步研究 [J]. 分子诊断与防治杂志, 2009, 1(1): 10-13
- Jin Ting, Fei Zheng-fang. Preliminary study of differential expression of Cpb1 genes in breast cancer [J]. J Mol Diagn Ther, 2009, 1(1): 10-13
- [13] Bouchal P, Dvořák M, Roumeliotis T, et al. Combined Proteomics and Transcriptomics Identifies Carboxypeptidase B1 and Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Associated Proteins as Putative Biomarkers of Metastasis in Low Grade Breast Cancer [J]. Mol Cell Proteomics, 2015, 14(7): 1814-1830
- [14] Sophors P, Kim YM, Seo GY, et al. A synthetic isoflavone, DCMF, promotes human keratinocyte migration by activating Src/FAK signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(2): 332-338
- [15] Ungewiss C, Rizvi ZH, Roybal JD, et al. The microRNA-200/Zeb1 axis regulates ECM-dependent β 1-integrin/FAK signaling, cancer cell invasion and metastasis through CRKL[J]. Sci Rep, 2016, 6: 18652
- [16] Béraud-Dufour S, Devader C, Massa F, et al. Focal Adhesion Kinase-Dependent Role of the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3/Sortilin in Colorectal Cancer Cell Dissociation [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11)
- [17] Kang CG, Lee HJ, Kim SH, et al. Zerumbone Suppresses Osteopontin-Induced Cell Invasion Through Inhibiting the FAK/AKT/ROCK Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells[J]. J Nat Prod, 2016, 79(1): 156-160
- [18] Trerotola M, Ganguly KK, Fazli L, et al. Trop-2 is up-regulated in invasive prostate cancer and displaces FAK from focal contacts [J]. Oncotarget, 2015, 6(16): 14318-14328
- [19] Gao Z, Zhang J, Bi M, et al. SRPX2 promotes cell migration and invasion via FAK dependent pathway in pancreatic cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 4791-4798
- [20] Ning Z, Wang A, Liang J, et al. USP22 promotes epithelial-mesenchymal transition via the FAK pathway in pancreatic cancer cells[J]. Oncol Rep, 2014, 32(4): 1451-1458
- [21] Dao P, Smith N, Scott-Algara D, et al. Restoration of TRAIL-induced apoptosis in resistant human pancreatic cancer cells by a novel? FAK inhibitor PH11[J]. Cancer Lett, 2015, 360(1): 48-59

(上接第 6392 页)

- [25] 刘攀攀, 全灿, 李红梅, 等. 非对称场流分离技术用于纳米颗粒的表征[J]. 分析化学, 2013, 41(07): 1063-1068
- Liu Pan-pan, Quan Can, Li Hong-mei, et al. Characterization of Nanoparticle Diameter by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(07): 1063-1068
- [26] 鄂云龙, 全灿, 金君素, 等. 基于非对称流场流分离技术的蛋白分离研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2015, 42(02): 30-34
- E Yun-long, Quan Can, Jin Jun-Su, et al. Research of Protein Separation Based on Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2015, 42(02): 30-34
- [27] John C, Langer K. Asymmetrical flow field-flow fractionation for human serum albumin based nanoparticle characterisation and a deeper insight into particle formation processes [J]. J Chromatogr A, 2014, 1346(01): 97-106
- [28] Haiyang Dou, Bing Zhou, Hae-Dong Jang, et al. Study on antidiabetic activity of wheat and barley starch using asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiangle light scattering [J]. J Chromatogr A, 2014, 1340(01): 115-120
- [29] Chon J H, Zarbis-Papastoitis G. Advances in the production and downstream processing of antibodies [J]. New Biotechnol, 2011, 28(5): 458-463
- [30] Cramer S M, Holstein M A. Downstream bioprocessing: recent advances and future promise [J]. Curr Opin Chem Eng, 2011, 1(01): 27-37
- [31] Guiochon G, Beaver L A. Separation science is the key to successful biopharmaceuticals[J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(49): 8836-8858
- [32] Janson J C. Protein purification: principles, high resolution methods, and applications[M]. John Wiley & Sons, 2012
- [33] 尹海燕, 左春桢. 场流分离蛋白质技术研究进展 [J]. 现代化工, 2013, 33(1): 34-36
- Yin Hai-yan, Zuo Chun-cheng. Field flow fractionation in protein: recent trends[J]. Modern Chemical Industry, 2013, 33(1): 34-36