

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.040

老年胃癌相关基因的生物信息学差异表达基因初步分析*

刘 静^{1#} 何蓉蓉^{2#} 余云华³ 张冬梅^{3Δ}

(1 蚌埠医学院教学医院联勤保障部队第九〇〇医院干部病房二科 福建 福州 350025;

2 第二军医大学附属公利医院全科医学科 上海 200135; 3 联勤保障部队第九〇〇医院干部病房二科 福建 福州 350025)

摘要 目的:通过生物信息学方法分析老年胃癌与正常癌旁组织间的差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)。方法:从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库下载基因表达谱,使用 R 软件筛选 DEGs,通过 STRING 数据库构建 DEGs 蛋白互作网络,采用 Cytoscape 软件筛选网络中关键模块,运用 FunRich 软件对关键模块基因进行富集分析,并且对网络中的基因进行总生存期分析。**结果:**共筛选出 163 个 DEGs,富集结果显示:关键模块基因的分子功能主要富集在 MHC 受体活性;生物过程主要富集在免疫反应;生物通路富集在 Notch 信号通路;生存分析发现高表达的 SP8 转录因子(SP8 transcription factor, SP8)基因导致老年胃癌患者总生存率降低。**结论:**通过本研究生物信息学方法分析的老年胃癌所富集的信号通路和 SP8 基因可能在老年胃癌的发生中具有作用。

关键词:老年胃癌;差异表达基因;生物信息学分析

中图分类号:Q-33;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1381-04

Preliminary Analysis of Differentially Expressed Genes in Bioinformatics of Elderly Gastric Cancer Related Genes*

LIU Jing^{1#}, HE Rong-rong^{2#}, YU Yun-hua³, ZHANG Dong-mei^{3Δ}

(1 Department II of Geriatrics, 900 Hospital of the Joint Logistics Team, Bengbu Medical College Teaching Hospital, Fuzhou, Fujian, 350025, China; 2 Department of General Practice, Gongli Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200135, China;

3 Department II of Geriatrics, 900 Hospital of the Joint Logistics Team, Fuzhou, Fujian, 350025, China)

ABSTRACT Objective: To analyse the differentially expressed genes (DEGs) between elderly gastric cancer and normal adjacent tissues by bioinformatics methods, and to explore the pathogenesis of gastric cancer in the elderly at the molecular level, and to provide new ideas for its diagnosis and prognosis. **Methods:** Download gene expression profiles from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database and screen DEGs using R software, construction of DEGs protein-protein interaction network through STRING database, using Cytoscape software to screen the key module in the network, enrichment analysis of key module genes using FunRich software and the overall survival analysis of the genes in the network is performed. **Results:** A total of 163 DEGs were screened out. The enrichment results showed that molecular function of key module genes was mainly enriched in MHC receptor activity; Biological process was mainly enriched in the immune response; Biological pathway was enriched in the Notch signaling pathway; Survival analysis found that the high expression of SP8 transcription factor (SP8) gene leads to a decrease in overall survival in elderly patients with gastric cancer. **Conclusions:** The signal pathway and SP8 gene enriched in elderly gastric cancer analyzed by bioinformatics methods in this study may have a role in the development of gastric cancer in the elderly.

Key words: Gastric cancer in the elderly; DEGs; Bioinformatics analysis

Chinese Library Classification (CLC): Q-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)07-1381-04

前言

老年人群的胃癌目前尚缺乏有效的早期诊断措施及预后标志物^[1,2],了解老年胃癌的发病机制及寻找有效的诊断及预后标志物非常重要。随着高通量基因芯片技术的发展,生物信息

学为研究疾病的诊断、预后及机制等方面带来了便捷^[3,4]。通过利用生物信息学的方法进一步探讨老年胃癌的发病机制,可为老年胃癌的早期诊断及预后提供新的依据。本研究通过深入分析 TCGA 数据库中患有胃癌人群的相关数据,借此机会为老年胃癌发病机制提出新的见解。

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2018J01354)

为共同第一作者

作者简介:刘静(1993-),女,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:老年医学,E-mail: 2283371092@qq.com

Δ 通讯作者:张冬梅,女,硕士生导师,教授,主要研究方向:老年医学,E-mail: zdm073@163.com

(收稿日期:2019-09-23 接受日期:2019-10-18)

1 材料与方法

1.1 下载数据与筛选 DEGs

于 2019 年 6 月 23 日从 TCGA 数据库^[5](<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载胃癌基因表达谱及对应病人的临床信息,分别选取年龄超过 65 岁的胃癌及癌旁样品,整理获得老年胃癌患者的基因表达矩阵。利用 R 软件^[6]筛选 DEGs,筛选条件如下: $|\log FC| > 5, P < 0.01$,将筛选结果以火山图及热图的形式展示。

1.2 蛋白互作网络分析

STRING 数据库^[7](<https://string-db.org/>)用于构建 DEGs 的蛋白互作网络,将 DEGs 输入网站中,选择人源物种,结合指数 > 0.4 ,然后将 STRING 数据库构建的蛋白互作网络导入 Cytoscape 软件^[8]中可视化,运用其插件 MCODE^[9]将网络分为不同的功能模块,根据插件 MCODE 评分筛选蛋白互作网络中的关键模块。

1.3 关键模块基因的富集分析

通过富集分析阐明关键模块基因可能参与的生物功能及信号通路,将关键模块基因输入到 FunRich 软件^[10]进行富集分析,分别从分子功能、生物功能及生物通路三个角度对其富集结果进行分析,筛选条件均为 $P < 0.05$ 。

1.4 生存分析

为了寻找老年胃癌可能的预后标志物,将蛋白互作网络中的基因进行总生存期分析。整理老年胃癌样本中的基因表达量与生存时间,利用 "survival" 包^[11]进行多基因的总生存期分析,筛选条件均为 $P < 0.05$ 。同时,绘制相关基因的散点差异图。

2 结果

2.1 筛选的 DEGs

本研究中,利用 TCGA 数据库的临床病理信息,整理得到 227 例老年胃癌样品,其中老年癌旁样品 20 例,老年胃癌样品 207 例。利用 R 软件筛选分析,得到 DEGs 共 163 个(图 1),其中上调 DEGs 99 个,下调 DEGs 64 个。

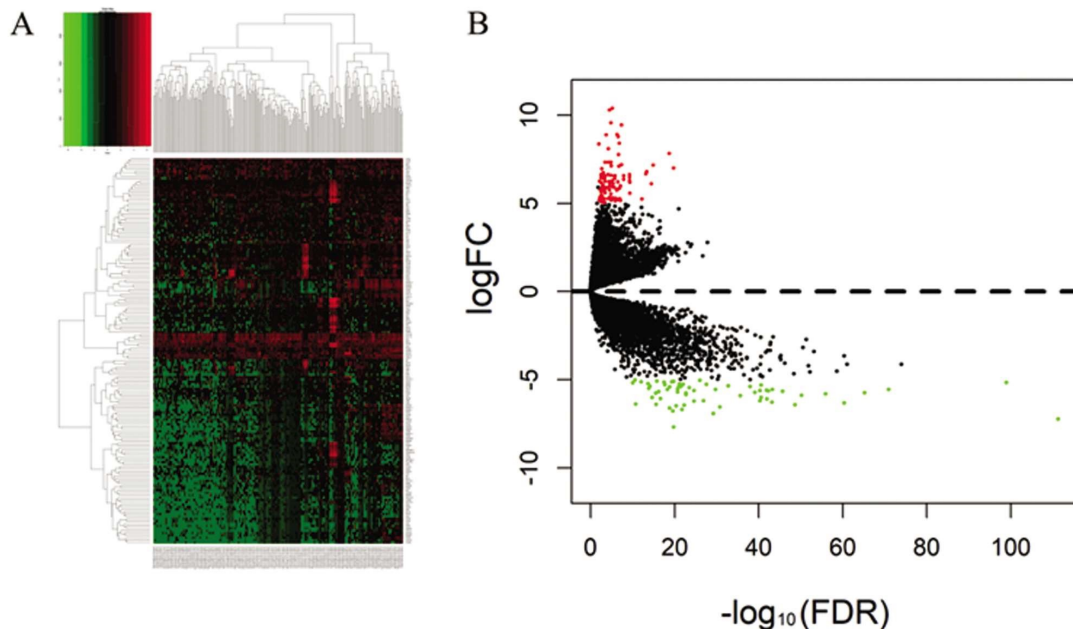


图 1 DEG 火山图(A)及热图(B)。红色:上调;绿色:下调

Fig.1 DEG volcano map (A) and heat map (B). Red: up-regulated; Green: down-regulated

2.2 蛋白相互作用网络构建与关键模块的筛选

STRING 数据库构建的蛋白互作网络图:包括 127 个节点和 306 条关系(图 2A)。利用 Cytoscape 软件中插件 MCODE,将蛋白互作网络分为 7 个功能模块,通过 score 值确定关键的功能模块(图 2B)。其中,关键模块包含 11 个基因:MAGEA2、MAGEA12、MAGEC2、PRAME、MAGEA3、MAGEA6、CSAG1、CTAG2、MAGEA1、MAGEC1 及 GAGE1。

2.3 关键模块基因的富集分析

以下是关键模块中 11 个基因在不同层面的富集结果(图 3)。分子功能主要富集在 MHC 受体活性;生物过程主要富集在免疫反应;生物通路主要富集在 Notch 信号通路。

2.4 生存分析

蛋白互作网络中多基因的生存分析结果(图 4)显示,SP8 基因^[12,13]的表达会影响老年胃癌患者的总生存期($P < 0.05$),并

且差异散点图的结果与生存分析的结果是一致的。两者共同解释了老年胃癌样品中高表达的 SP8 基因会导致患者总生存期降低,提示该部分患者预后不良。

3 讨论

本研究从生物信息学方法对老年胃癌进行筛选分析,以期探索老年胃癌的发病机制及寻找临床诊断及预后标志物。基于 TCGA 数据库中胃癌相关数据集及临床病理信息,整理得到年龄均超过 65 岁的胃癌及癌旁样品。利用 R 软件筛选得到 DEGs,通过构建蛋白互作网络过滤部分 DEGs 中散落的蛋白基因,然后将网络图导入 Cytoscape 中,使用插件 MCODE 进一步对网络进行模块聚类分析,再对其中的关键模块基因进行富集分析,结果显示关键模块基因主要涉及免疫反应及 Notch 信号通路。同时,为了寻找老年胃癌可信的诊断及预后标志物,

本研究对网络中的蛋白基因进行了生存分析。结果发现 SP8 基因与老年胃癌患者的总生存期明显相关,且表达及生存分析结果也表明 SP8 基因高表达的老年胃癌患者总生存期降低,提示这部分患者预后不良。此外,为了验证 SP8 基因在不同年龄段

胃癌组织中的表达,我们通过 UALCAN 数据库[14]研究发现胃癌患者随年龄不断增长,SP8 基因在胃癌组织中的表达量也逐渐上升(图 5)。

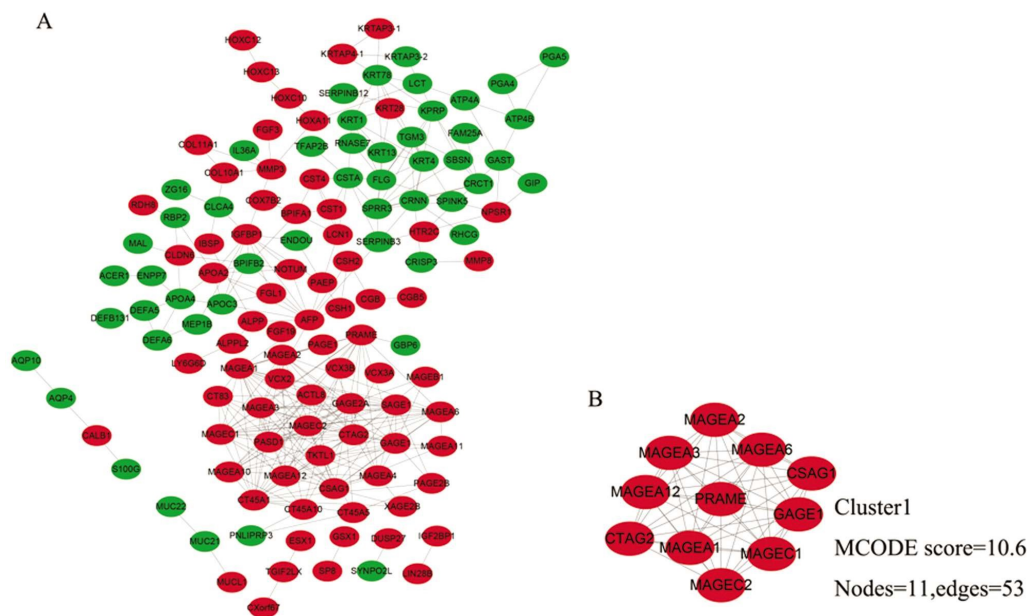


图 2 DEGs 蛋白互作网络(A)及关键模块(B)红色:上调;绿色:下调

Fig.2 DEGs protein-protein interaction network (A) and the key module (B).Red: up-regulated; Green: down-regulated

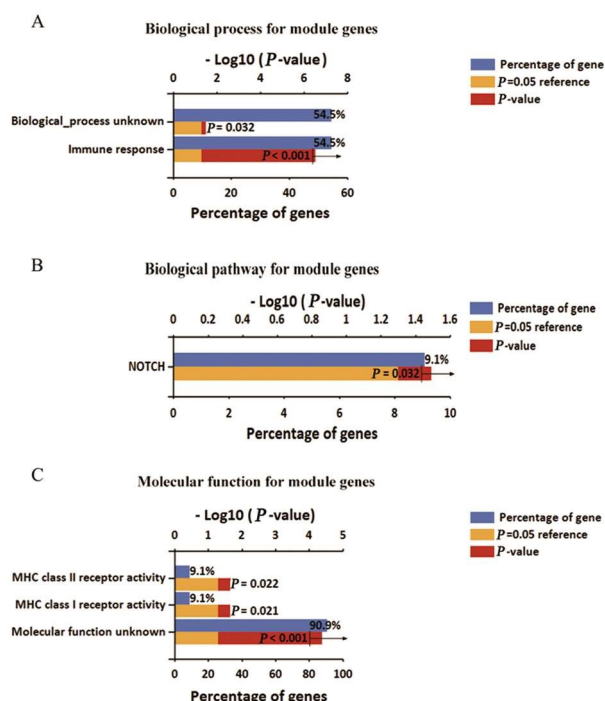


图 3 关键模块基因基因在分子功能(A)、生物过程(B)及生物通路(C)的富集结果

Fig.3 Enrichment results of key module genes in molecular function (A), biological process (B) and biological pathway (C)

研究报道,Notch 信号通路可调控包括胃癌^[15]、乳腺癌^[16]及肺癌^[17]等多种癌症的发生、发展^[18-20]。随着肿瘤靶向治疗的不断研究,有学者发现通过阻断 Notch 信号通路可以显著抑制肺癌^[21]的进展,尽管该研究停留在临床应用的起步阶段,但是阻断

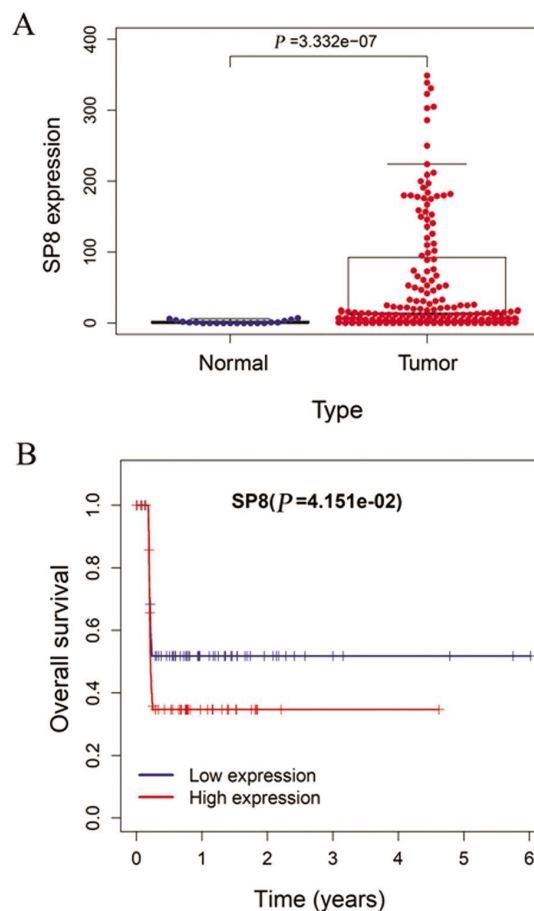


图 4 SP8 基因高表达(A)的老年胃癌患者预后较差(B)

Fig.4 Elderly patients with gastric cancer with high SP8 gene expression (A) have a poor prognosis (B)

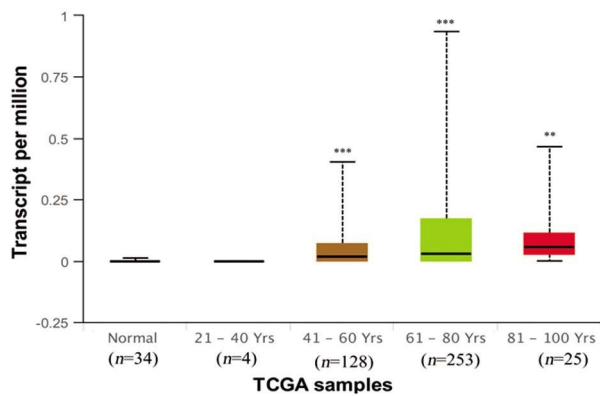


图 5 SP8 基因的表达量随胃癌患者年龄增长而增加

Fig.5 The expression level of SP8 gene increases with the age of gastric cancer patients (** $P < 0.01$ vs Normal; *** $P < 0.001$ vs Normal)

Notch 信号通路对于老年胃癌靶向研究依然具有理论及借鉴意义。同样,老年胃癌患者中高表达的 SP8 基因提示患者预后不良,且随着年龄的增加,SP8 基因的表达量逐渐上升,有望成为老年胃癌新的临床诊断及预后标志物。

综上,本研究首次以高标准筛选老年胃癌中的 DEGs 及关键模块基因的富集分析,指出老年胃癌的发病机制可能涉及免疫调控及 Notch 信号通路,并且鉴定了 SP8 基因作为老年胃癌潜在的临床诊断及预后标志物,为进一步深入揭示老年胃癌发病的分子机制、临床诊断、预后及治疗靶标提供了新的研究方向和理论基础。

参考文献(References)

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424
- [2] Hirahara T, Arigami T, Yanagita S, et al. Combined neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio predicts chemotherapy response and prognosis in patients with advanced gastric cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 672
- [3] Chai RC, Wu F, Wang QX, et al. M (6)a rna methylation regulators contribute to malignant progression and have clinical prognostic impact in gliomas[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(4): 1204-1225
- [4] Bai Y, Long J, Liu Z, et al. Comprehensive analysis of a cerna network reveals potential prognostic cytoplasmic lncrnas involved in hcc progression[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18837-18848
- [5] Murugan AK, Qasem E, Al-Hindi H, et al. Gpcr-mediated pi3k pathway mutations in pediatric and adult thyroid cancer [J]. Oncotarget, 2019, 10(41): 4107-4124
- [6] Ory L, Nazih EH, Daoud S, et al. Targeting bioactive compounds in natural extracts - development of a comprehensive workflow combining chemical and biological data [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1070: 29-42
- [7] Xu Y, Han W, Xu WH, et al. Identification of differentially expressed genes and functional annotations associated with metastases of the uveal melanoma [J]. J Cell Biochem, 2019, 120: 19202-19214
- [8] Jang BS, Chang JH. Socioeconomic status and survival outcomes in elderly cancer patients: A national health insurance service-elderly sample cohort study[J]. Cancer Med, 2019, 8(7): 3604-3613
- [9] Liu J, Zhou S, Li S, et al. Eleven genes associated with progression and prognosis of endometrial cancer (ec) identified by comprehensive bioinformatics analysis[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 136
- [10] Li MW, Gao L, Dang YW, et al. Protective potential of mir-146a-5p and its underlying molecular mechanism in diverse cancers: A comprehensive meta-analysis and bioinformatics analysis [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 167
- [11] Jiao Y, Li Y, Jiang P, et al. Pgm5: A novel diagnostic and prognostic biomarker for liver cancer [J]. PeerJ, 2019, 7: e7070
- [12] Tao G, Li Z, Wen Y, et al. Transcription factors sp8 and sp9 regulate medial ganglionic eminence-derived cortical interneuron migration [J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12: 75
- [13] Kennedy MW, Chalamalasetty RB, Thomas S, et al. Sp5 and sp8 recruit beta-catenin and tcf1-lef1 to select enhancers to activate wnt target gene transcription [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(13): 3545-3550
- [14] Luo Y, Chen L, Wang G, et al. Pparalpha gene is a diagnostic and prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma by integrated bioinformatics analysis[J]. J Cancer, 2019, 10(10): 2319-2331
- [15] Hibdon ES, Razumilava N, Keeley TM, et al. Notch and mtor signaling pathways promote human gastric cancer cell proliferation [J]. Neoplasia, 2019, 21(7): 702-712
- [16] Liubomirski Y, Lerrer S, Meshel T, et al. Notch-mediated tumor-stroma-inflammation networks promote invasive properties and excl8 expression in triple-negative breast cancer [J]. Front Immunol, 2019, 10: 804
- [17] Sellers K, Allen TD, Bousamra M, et al. Metabolic reprogramming and notch activity distinguish between non-small cell lung cancer subtypes [J]. Br J Cancer, 2019, 121(1): 51-64
- [18] Jang BS, Chang JH. Socioeconomic status and survival outcomes in elderly cancer patients: A national health insurance service-elderly sample cohort study[J]. Cancer Med, 2019, 8(7): 3604-3613
- [19] Sakurai K, Kubo N, Tamamori Y, et al. Long-term survival estimates in older patients with pathological stage i gastric cancer undergoing gastrectomy: Duocentric analysis of simplified scoring system [J]. J Geriatr Oncol, 2019, 10(4): 604-609
- [20] Luo Y, Chen L, Wang G, et al. Pparalpha gene is a diagnostic and prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma by integrated bioinformatics analysis[J]. J Cancer, 2019, 10(10): 2319-2331
- [21] Liu C, Cheng X, Chen J, et al. Suppression of yap/taz-notch1-nicd axis by bromodomain and extraterminal protein inhibition impairs liver regeneration[J]. Theranostics, 2019, 9(13): 3840-3852