

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.05.013

• 临床研究 •

肺癌基因异常表达与化疗药物的相关性分析

齐 鲁, 丁彦青

Correlation of Aberrantly Expressed Lung Cancer Genes and Chemotherapy Drugs

QI Lu, DING Yanqing

Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding Author: DING Yanqing, E-mail: dyq@fimmu.com



Abstract: Objective To explore the relationship between aberrantly expressed genes in lung cancer genes and after chemotherapy by gene expression profile. **Methods** In this article, expression profile of lung cancer tissue and normal lung tissue were compared to screen out the differentially expressed genes by statistical method. The aberrant expressed genes of lung cancer cells were clarified. Then the up-regulated aberrantly expressed genes were upregulated by the chemotherapy drugs were selected by association analysis. Finally, the genes which could correspond to many chemotherapy drugs were screened and analyzed by network regulation, to clarify the possible regulation relationship between these genes. **Results** Three hundred and ninety-seven up-regulated aberrantly expressed genes induced by 6 kinds of related chemotherapy drugs in lung cancer tissue were screened out. Among them, TOP2A, MAD2L1, BIRC5 corresponded to many chemotherapy drugs and MAD2L1 may control the biological function of TOP2A and BIRC5 through P53. **Conclusion** The up-regulated expression genes, TOP2A, MAD2L1 and BIRC5, may have correlation with the effect of chemotherapy of lung cancer. MAD2L1 may influence the biological function of TOP2A and BIRC5.

Key words: Lung cancer; Bioinformatics; Screen; Chemotherapy drugs

摘 要: 目的 通过肺癌基因表达谱分析与肺癌相关的化疗药物, 探讨化疗药物与肺癌基因表达异常的相关性。**方法** 首先通过统计学方法比较肺癌组织以及正常肺组织的表达谱数据, 筛选出这两类组织的差异表达基因。明确肺癌组织基因的异常表达情况。然后通过差异表达基因与药物的关联分析, 筛选肺癌组织中上调的差异表达基因所对应的化疗药物, 最后筛选能够与多个化疗药物均相对应的基因, 对这些基因进行网络调控分析, 明确这些基因间的可能调控关系。**结果** 筛选出在肺癌组织中表达上调的异常表达基因共397个, 对应的常用化疗药物有6种, 其中TOP2A、MAD2L1、BIRC5这三种基因对应着多个化疗药物, 且MAD2L1可能通过P53直接或间接调控TOP2A和BIRC5的生物学功能。**结论** 肺癌组织中表达上调的基因TOP2A, MAD2L1, BIRC5与肺癌的化疗效果可能有一定相关性, MAD2L1可能影响TOP2A, BIRC5的生物学功能。

关键词: 肺癌; 生物信息学; 筛选; 化疗药物

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

0 引言

肺癌的危险因素有很多, 包括吸烟、大气污染、职业因素、遗传等。其中吸烟是促进肺癌发生的重要因素之一^[1], 由于香烟中含有大量对人体有害成分包括尼古丁、焦油、苯、氨、一氧化碳、氰化物等, 因此吸烟能够促进支气管上皮细胞恶变, 增加肺癌的发生

率^[2]。虽然吸烟是肺癌发生的其中一个因素, 但肿瘤的发生发展影响因素很多, 许多肺癌患者并无吸烟习惯。用于治疗肺癌的化疗药物有很多, 明确肺癌基因表达异常与化疗药物之间的相关性, 对阐明化疗药物的作用机制有着重要意义。因此本文主要通过对肺癌表达谱数据进行分析, 筛选吸烟相关及非吸烟相关肺癌的差异表达基因, 对这些差异表达基因通过相关化疗药物数据库进行富集分析, 筛选出与肺癌可能相关的化疗药物, 进一步通过分析化疗药物所对应的异常表达基因所参与的信号调控网络, 明确这些化疗药物在肺癌治疗中可能的作用机制。

收稿日期: 2013-04-17; 修回日期: 2013-08-20
作者单位: 510515 广州, 南方医科大学基础医学院病理学系
通信作者: 丁彦青, E-mail: dyq@fimmu.com
作者简介: 齐鲁(1986-), 男, 硕士, 主要从事生物信息学研究

1 资料和方法

1.1 资料

选取来源于NCBI的GEO^[3]表达谱数据库的表达谱数据GSE31210进行差异表达基因的筛选。GSE31210表达谱数据包含正常肺组织表达谱数据20例,肺癌组织表达谱数据226例,根据患者吸烟情况的不同,将表达谱数据分为有吸烟习惯的病例数据和无吸烟习惯的病例数据。其中有吸烟习惯患者正常肺组织数据12例,肺癌组织数据111例。无吸烟习惯患者正常肺组织数据8例,肺癌组织数据115例。

1.2 方法

由于吸烟这种因素对肺癌的影响较大,因此,将表达谱分为吸烟组和非吸烟组,分别筛选两组的差异表达基因。两组的筛选方法一致,均使用统计学方法对正常肺与肺癌组织数据使用Benjamini Hochberg法进行差异表达基因的筛选。筛选过程中调整*P*值小于0.01。选择变化倍数大于两倍的基因,对吸烟组和非吸烟组筛选出的差异表达基因取交集,然后对筛选出的差异表达基因进行相关化疗药物富集分析,分析与差异表达基因相关的化疗药物,选择其中较为重要的化疗药物对应的差异表达基因进行蛋白相互作用网络调控分析,分析这些化疗药物与肺癌基因异常表达的相关性及这些化疗药物对肺癌的可能作用机制。

2 结果

2.1 差异表达基因筛选结果

经过统计学筛选,数据GSE31210中吸烟组表达上调的差异表达探针有1 580个,下调的差异表达探针有2 634个。非吸烟组表达上调的差异表达探针有802个,下调的差异表达探针有1 368个。从差异表达基因探针的数目可以看出,吸烟状态下肺癌组织异常表达基因的数目多于非吸烟状态下的肺癌组织。将上述筛选出上下调的差异表达探针分别取交集,得到表达上调的交集基因探针有

556个,对应着397个基因。下调的差异表达基因探针有1 204个,对应着741个基因。

2.2 差异表达基因相关化疗药物筛选结果

对肺癌组织中表达上调的差异基因通过WebGestalt^[4]工具进行相关化疗药物的富集分析。根据富集分析结果,得到与肺癌表达异常基因相关的化疗药物,其中部分化疗药物为非肿瘤相关治疗药物,部分为肿瘤相关治疗药物,分别为紫杉醇、米托蒽醌、丝裂霉素、顺铂、多西他赛、表柔比星等,见表1。紫杉醇和顺铂为化疗的常用药物,在肺癌的治疗中有着重要应用^[5-6],其中紫杉醇能够抑制微管的解聚,保持微管蛋白的稳定,抑制细胞有丝分裂,促进细胞凋亡^[7]。还能够使肿瘤细胞的细胞周期停滞于G₂/M期^[8],因此紫杉醇主要影响肿瘤细胞的细胞周期,抑制肿瘤细胞的增殖。从肺癌的上调差异表达基因的药物富集结果中可以发现,与紫杉醇相关的10个基因与细胞周期密切相关,所以紫杉醇在肺癌治疗过程中可能是通过此10个基因发挥细胞周期阻滞的作用。而米托蒽醌^[9],丝裂霉素^[10],多西他赛^[11-12],表阿霉素^[13]均有较多的临床试验与肺癌化疗相关。

2.3 肿瘤相关化疗药物对应基因的筛选与网络调控分析

富集结果中能够用于肿瘤治疗的药物包括紫杉醇、米托蒽醌、丝裂霉素、顺铂、多西他赛、表柔比星。这些药物均对应着部分在肺癌组织中表达上调的基因。对这些基因进行交集筛选可以得到六种化疗药物中,五种药物共同对应基因为TOP2A,四种药物共同对应基因为MAD2L1、BIRC5。因此TOP2A, MAD2L1, BIRC5在化疗药物对肺癌的治疗过程中可能发挥着重要作用。为了明确这三个基因间的调控机制,使用Visant工具对上述三个基因进行网络调控分析。首先分析三个基因对应蛋白的相互作用蛋白,分别得到三个基因对应蛋白的直接作用蛋白,然后再展开各自的相互作用蛋白,分别得到三个基因对应蛋白的间接作用蛋白,蛋白与蛋白相互作用形成复杂

表1 肺癌组织中上调差异表达基因相关药物富集结果

Table1 Enrichment results of drugs which related to up-regulated aberrantly expressed genes in lung cancer tissue

Drugs	<i>n</i>	Genes
Paclitaxel	10	TOP2A,WFDC2,BIRC5,MAD2L1,CENPF,AURKA,BUB1,BUB1B,KIF2C,CDK1
Collagenase	10	MMP12,SPP1,MMP11,EHF,TFAP2A,PTK2,MMP13,SDC1,ETV4,SFN
Mitoxantrone	5	TOP2A,ABCC3,CD24,KRT8,SFN
Mitomycin	8	ESCO2,RAD54L,NQO1,UBE2T,BRIP1,FANCA,FBXO16,MAD2L1
Progesterone	9	TOP2A,MUC1,CCNA2,MKI67,TFAP2C,CCNB1,SRD5A1,SFN,TOX3
Cisplatin	9	TOP2A,CDC25A,RDM1,BIRC5,MAD2L1,RRM2,AURKA,ABCC3,FANCA
Docetaxel	6	TOP2A,RRM2,GDF15,BUB1B,BIRC5,MAD2L1
Epirubicin	5	TOP2A,BIRC5,PHLDA2,SFN,MKI67
Hyaluronan	7	HMMR,SPP1,COL11A1,CTTN,HABP2,TPX2,MIR21
Biotin	6	FUT3,PDCD6,PC,SDC1,SLC2A1,MKI67

网络,然后计算三个蛋白间的最短回路,提取回路中的蛋白节点,构建三个蛋白间的相互调控网络。由于UBC蛋白为泛素蛋白C,其相互作用蛋白很广泛,因此在网络中去掉。最终得到TOP2A, MAD2L1, BIRC5间的相互调控关系,见图1。从图中可以看出, MAD2L1通过调控P53基因影响其下游基因RB1、PRKDC、H2AFX、XPO1,而这四个基因又能直接作用TOP2A和BIRC5。其中P53基因还可直接调控TOP2A,进一步说明了TOP2A在此信号传递过程中的重要作用。

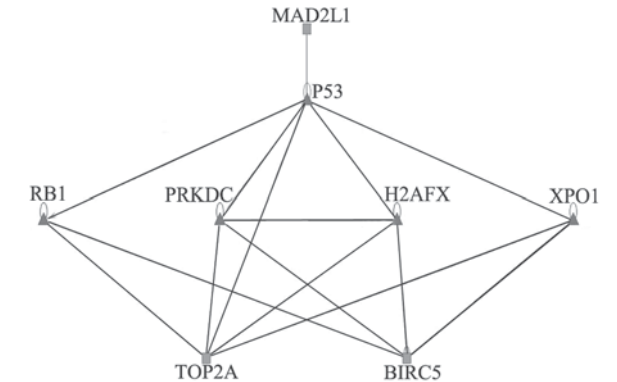


图1 TOP2A,MAD2L1,BIRC5间相互作用网络调控关系图
Figure1 Network regulation diagram of the interaction among TOP2A,MAD2L1 and BIRC5

2.4 TOP2A, MAD2L1, BIRC5表达异常与肺癌患者生存期的相关性分析

为了明确TOP2A, MAD2L1, BIRC5与肺癌患者生存期的相关性,由于表达谱数据GSE31210具有肺癌患者生存时间数据,因此可用此表达谱数据对上述三个基因进行生存分析。为了更好的分组,226例肺癌组织表达谱数据选择180例进行生存分析。分别将上述三个基因的表达值从小到大进行排序并分为低,中,高三组,每组包含60例病例,三组之间是递增关系。使用Kaplan-Meier生存分析的方法分析三组之间的生存率,得出生存曲线,见图2。结果

TOP2A ($P=0.0035$)、MAD2L1 ($P=0.0056$)、BIRC5 ($P=0.0015$)均与患者生存期明显相关。从三组曲线关系可以看出,基因表达越高,患者生存率越低。说明这些基因与肺癌的发生发展密切相关。

3 讨论

在肺癌组织中,表达上调的差异表达基因对肺癌的发生发展有着重要意义,要阐明抗肿瘤的化疗药物在肺癌治疗过程中的作用机制,需要分析这类异常表达基因与常用化疗药物的相关性。WebGestalt工具能够基于PharmGKB数据库^[14]对基因与药物的关系进行注释以及归类。本研究通过对肺癌差异表达基因关联的化疗药物进行分析,进一步明确了肺癌中上调的差异基因与肺癌的相关性。其中化疗药物紫杉醇能够促进微管蛋白的稳定进而抑制细胞的有丝分裂,顺铂则可通过抑制DNA的合成抑制肿瘤细胞的增殖^[15],促进凋亡。由于肺癌中上调的基因多与肿瘤细胞周期以及有丝分裂相关,因此化疗药物所对应的基因同样与肿瘤细胞周期以及有丝分裂相关。由于TOP2A, MAD2L1, BIRC5这三个基因在六种肺癌相关化疗药物中所对应的基因重复较多,说明这三个基因在化疗药物对肺癌的治疗过程中起着重要作用。已有报道TOP2A^[16], MAD2L1^[17], BIRC5^[18]与肺癌患者生存期相关,与此次分析结果一致,而此次分析结果中三组曲线相互之间均有较为明显的差异,进一步说明了这三个基因与患者生存期有着紧密联系。

TOP2A基因主要编码拓扑异构酶,由于DNA是双螺旋结构,因此其在DNA的复制以及转录过程中都起着重要作用,所以此基因与细胞增殖密切相关。而此基因在肺癌组织中表达增高,且能够提高化疗药物的敏感度^[19-20],进一步说明了其在化疗作用中的地位。MAD2L1为纺锤体组

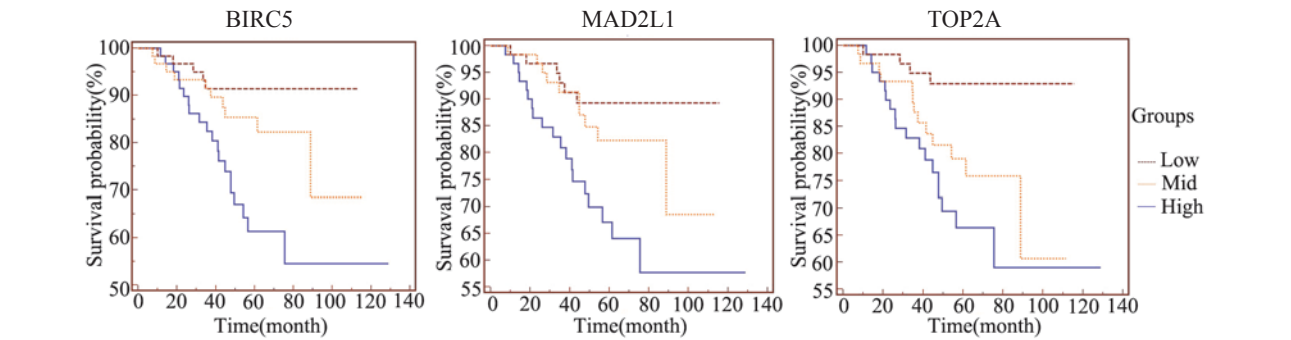


图2 TOP2A、MAD2L1和BIRC5的表达与肺癌患者生存关系分析
Figure2 Relationship between the survival of lung cancer patients and the expression of TOP2A, MAD2L1 and BIRC5 respectively

装检查点的关键部分，纺锤体组装检查点能够在有丝分裂过程中调控纺锤体微管附着染色体的着丝粒，其表达与卵巢浆液性肿瘤的化疗抵抗相关^[21]，因此其表达与肿瘤的化疗敏感度相关。BIRC5即Survivin，其在肿瘤中的相关研究较多。本研究筛选了三个与肺癌化疗药物较为相关的基因，由于这些基因与肿瘤细胞增殖相关，因此与肿瘤的关系已有较多的研究，从网络调控结果看来，MAD2L1能通过P53基因间接调控TOP2A和BIRC5，说明MAD2L1在肺癌的化疗过程中可能更为重要。化疗是肿瘤治疗中重要的治疗手段，而现有的化疗药物特异性不高，不良反应较大，化疗强度往往与肿瘤患者耐受程度相关，极大地影响着肿瘤的治疗。因此提高化疗药物的敏感度，寻找在化疗过程中对化疗效果起着重要影响的关键基因，对肿瘤的治疗有着积极的意义。本研究探讨了肺癌中表达上调的差异基因与化疗药物之间的关系，进一步阐明了化疗药物对肺癌细胞的可能作用机制，对进一步开发出抑制肺癌的新型药物有着一定的指导意义。

参考文献：

[1] Handler S. Lung cancer and smoking[J]. CA Cancer J Clin,1991,41(6):371.

[2] Lubin J H, Caporaso N, Wichmann H E, *et al.* Cigarette smoking and lung cancer: modeling effect modification of total exposure and intensity[J]. Epidemiology,2007,18(5):639-48.

[3] Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, *et al.* NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update[J]. Nucleic Acids Res,2007,35(Database issue):D760-5.

[4] Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts[J]. Nucleic Acids Res,2005,33(Web Server issue):W741-8.

[5] von Pawel J, Wagner H, Niederle N, *et al.* Phase II study of paclitaxel and cisplatin in patients with non-small cell lung cancer[J]. Semin Oncol,1996,23(6 Suppl 16):47-50.

[6] Dimitroulis J, Rapti A, Stathopoulos GP, *et al.* Comparison of cisplatin-paclitaxel combination versus cisplatin-etoposide in patients with small-cell lung cancer: a Phase III study[J]. Oncol Rep,2008,20(4):879-84.

[7] Xiao H, Verdier-Pinard P, Fernandez-Fuentes N, *et al.* Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2006,103(27):10166-73.

[8] Ling X, Bernacki RJ, Brattain MG, *et al.* Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest[J]. J Biol Chem,2004,279(15):15196-203.

[9] Feun LG, Savaraj N, Solomon J, *et al.* Phase II trial of mitoxantrone and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer[J]. Am J Clin Oncol,1996,19(2):190-2.

[10] Sculier JP, Ghisdal L, Berghmans T, *et al.* The role of mitomycin in the treatment of non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis of the literature[J]. Br J Cancer,2001,84(9):1150-5.

[11] Radhakrishnan A, Bitran JD, Milton DT, *et al.* Docetaxel and oxaliplatin as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer: a phase II trial[J]. J Chemother,2009,21(4):439-44.

[12] Park SH, Hong J, Kim YS, *et al.* Phase II trial of weekly docetaxel and gemcitabine for previously untreated, advanced non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer,2008,62(1):72-7.

[13] Kretzschmar A, Drings P. Epirubicin weekly in combination chemotherapy with cyclophosphamide and vincristine in untreated small cell lung cancer: a phase II trial[J]. Onkologie,1990,13(2):141-2.

[14] Thorn CF, Klein TE, Altman RB. Pharmacogenomics and bioinformatics: PharmGKB[J]. Pharmacogenomics,2010,11(4):501-5.

[15] Metcalfe SA, Cain K, Hill BT. Possible mechanism for differences in sensitivity to cis-platinum in human prostate tumor cell lines[J]. Cancer Lett,1986,31(2):163-9.

[16] Perumal D, Singh S, Yoder S J, *et al.* A novel five gene signature derived from stem-like side population cells predicts overall and recurrence-free survival in NSCLC[J]. PLoS One,2012,7(8):e43589.

[17] Kato T, Daigo Y, Aragaki M, *et al.* Overexpression of MAD2 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2011,74(1):124-31.

[18] Lu B, Gonzalez A, Massion PP, *et al.* Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer[J]. Br J Cancer,2004,91(3):537-40.

[19] Arivazhagan A, Kumar DM, Sagar V, *et al.* Higher topoisomerase 2 alpha gene transcript levels predict better prognosis in GBM patients receiving temozolomide chemotherapy: identification of temozolomide as a TOP2A inhibitor[J]. J Neurooncol,2012,107(2):289-97.

[20] Konecny GE, Pauletti G, Untch M, *et al.* Association between HER2, TOP2A, and response to anthracycline-based preoperative chemotherapy in high-risk primary breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat,2010,120(2):481-9.

[21] Nakano Y, Sumi T, Teramae M, *et al.* Expression of the mitotic-arrest deficiency 2 is associated with chemotherapy resistance in ovarian serous adenocarcinoma[J]. Oncol Rep,2012,28(4):1200-4.

[编辑：周永红；校对：安 凤]