

基于生物信息学筛选卵巢透明细胞癌发生的关键基因和治疗

靶点分析

柳英兰 韩晗 牛荔

哈尔滨医科大学附属第一医院妇产科 黑龙江哈尔滨 150001

摘要:目的 基于生物信息分析卵巢透明细胞癌(OCCC)的关键基因,进而找到有效的诊断靶标和治疗方法。方法 通过 GEO 数据库、limma 差异分析差异基因、WGCNA 等生物信息学方法发现 hub 基因,通过蛋白质相互作用网络建议和 Friends 分析方法发现潜在的关键基因。结果 通过 GEO 数据库生物信息学分析,发现 669 个基因出现差异性表达,可能与 OCCC 发生发展密切相关的 313 个基因表达上调,356 个基因表达下调。通过 WGCNA 分析获得了 17 个共表达模块,通过与差异基因基因合并,获取 302 个 hub 基因。对 302 个 hub gene 进行 PPI 网络分析,并通过 cytohubba 获取 10 个关键基因,分别是 SERPINE1, MET, FGF7, VCAM1, MMP2, CXCL12, JUN, KIT, SNAI2, PDGFRB。通过 Friends 分析 PDGFRB 为 OCCC 的关键基因。STAT1, STAT3 和 ETS1 三个 TF 可以对关键基因 PDGFRB 起调控作用。结论 PDGFRB 是 OCCC 发生的核心基因,是治疗 OCCC 的潜在靶点。

关键词: 生物信息学分析; 卵巢透明细胞癌; 血小板衍生生长因子受体

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)是癌症的主要形式,约占所有卵巢癌(ovarian cancers, OC)的 90%^[1]。全球每年约有 239000 例新发 EOC 病例, 152000 例死亡。世界卫生组织(The World Health Organization, WHO)将卵巢透明细胞癌(ovarian clear cell cancer, OCCC)定义为一种恶性卵巢肿瘤,由透明、嗜酸性和类肿瘤细胞组成,呈管状、乳头状和实体结构^[2]。OCCC 作为 EOC 的一种特殊病理类型,具有独特的临床表现、生物学行为、组织病理学、分子特征和内在的化疗耐药性^[3]。此外,大多数 OCCC 患者在诊断时比其他 EOC 亚型更年轻,处于早期阶段^[4]。然而,只有 20-25% 的 OCCC 患者针对 EOC 的常规化疗药物有反应,目前并没有提出治疗 OCCC 的有效策略^[5]。因此探索新的 OCCC 发病机制,并发觉新的治疗靶点对延长 OCCC 患者生存意义重大。

生物信息学是一门随着生命科学和计算机科学迅猛发展而兴起的新兴交叉学科。它主要通过综合运用生物学、数学和信息科学等多领域的方法和工具,对生物信息进行获取、加工、存储、分析和解释,以阐明大量生物数据所包含的生物学意义^[6]。因此我们尝试应用生物信息学技术,

通过获取公共数据库(GEO)OCCC 相关的遗传信息,对 OCCC 的疾病进行分析,以期 OCCC 的机制深入研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 数据获取

从 GEO(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 数据库中筛选并下载 OCCC 相关数据集 GSE6008 中 12 例样本,其中 8 例透明细胞癌组织,4 例正常卵巢组织。

1.2 差异基因分析

使用 R 软件包 limma(version 3.40.6) 进行差异分析,以获得不同比较组与对照组间的差异基因。参数调整为差异倍速大于 1.5 倍,显著阈值小于 0.05,获取差异基因 DEGs

1.3 富集分析

对于基因集功能富集分析我们使用 R 软件包 org.Hs.eg.db(3.1.0) 中的基因的 GO 注释,以及 KEGG rest API(<https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html>) 获取了最新的 KEGG Pathway 的基因注释,以此作为背景,将基因映射到背景集合中。

使用 R 软件包 clusterProfiler(version 3.14.3) 进行富集分

析, 以获得基因集富集的结果。设定最小基因集为 5, 最大基因集为 5000, 显著阈值小于 0.05, FDR 小于 0.25 获取富集结果。

1.4 WGCNA 网络构建

我们使用基因表达谱来计算每个基因的 MAD (平均绝对偏差), 去除 MAD 最小的前 50% 的基因。我们还使用 R 软件包 WGCNA 的 GoodSamplesGenes 方法去除异常值和样本, 并使用 WGCNA 进一步构建了一个无标度共表达网络。

然后用 Pearson 法分析基因之间的相关性, 获得关系矩阵, 选择相关性最高的作为关键基因模块。

1.5 hub 基因的筛选

将 WGCNA 分析得出的关键模块的基因与 GSE6008 的 DEGs 取交集, 筛选出重叠基因作为关键差异表达基因, 这些基因可能与 OCCC 的发生发展高度相关。

1.6 蛋白质互作网络 (PPI) 分析

我们通过 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 创建了 PPI 网络, 我们将所需的最小相互作用分数设置为最高置信度 (0.900), 并隐藏断开的节点以生成 PPI 网络。使用 Cytoscape (版本 3.9.0) 软件进一步呈现和整合生物分子相互作用网络。随后, 我们使用了 cytohubba (<http://apps.cytoscape.org/apps/cytohubba>) 对网络的中心或目标元素进行排名和筛选。

1.7 Friends 分析

Friends 分析是通过构建基因相互作用网络, 利用网络拓扑结构参数计算每个基因的重要性, 并进一步分析和预测不同基因在相关生物过程中的功能和调控机制。

对输入的分子列表进行 ID 转换后, 使用 R 软件包 GOSemSim (2.22.0) 进行 Friends 分析。

1.8 核心基因的调控网络构建

应用 NetworkAnalyst (<https://www.networkanalyst.ca/> NetworkAnalyst/) 对核心基因进行网络调控分析, 分析可以对目标基因进行调控的调控因子 (TF) 和 microRNA。

2 结果

2.1 差异基因 (DEGs) 分析

我们通过对 GSE6008 数据库中 OCCC 与 Normal 的样本进行分析, 共获取差异基因 669 个, 其中上调基因 313 个, 下调基因 356 (图 1)。

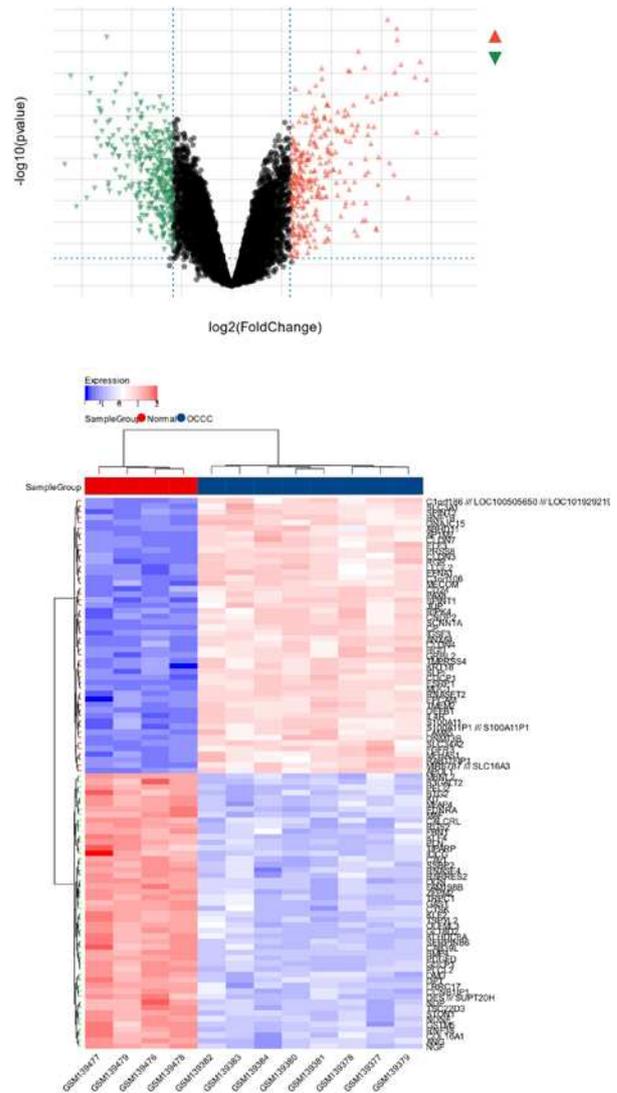


图 1 差异分析

2.2 富集分析

GO 分析显示, 差异基因主要富集在细胞组成 (extracellular region part, extracellular space, extracellular region, extracellular vesicle, extracellular organelle 和 extracellular exosome) 和生物过程 (tissue development, animal organ development, regulation of multicellular organismal process); KEGG 分析显示, 差异基因主要富集在 Fluid shear stress and atherosclerosis, Drug metabolism - cytochrome P450, Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, Drug metabolism - other enzymes, Chemical carcinogenesis, Central carbon metabolism in cancer, Pathways in cancer, Melanoma,

Platinum drug resistance, Osteoclast differentiation (图 2)。

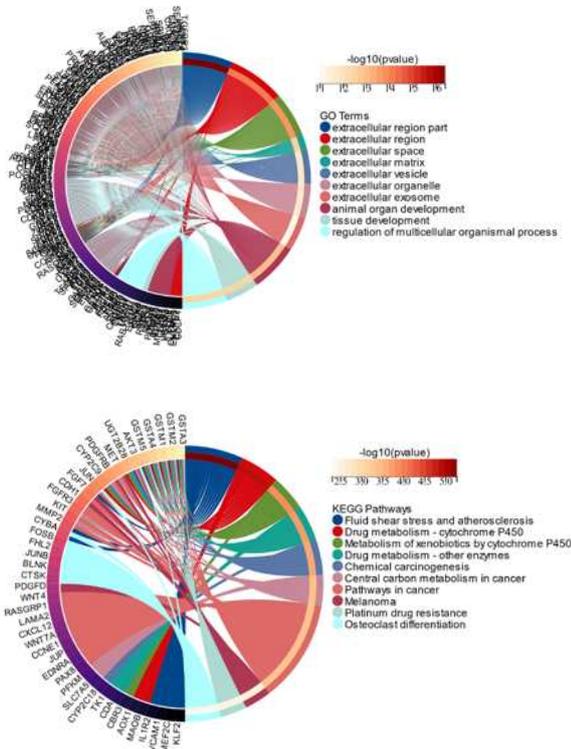
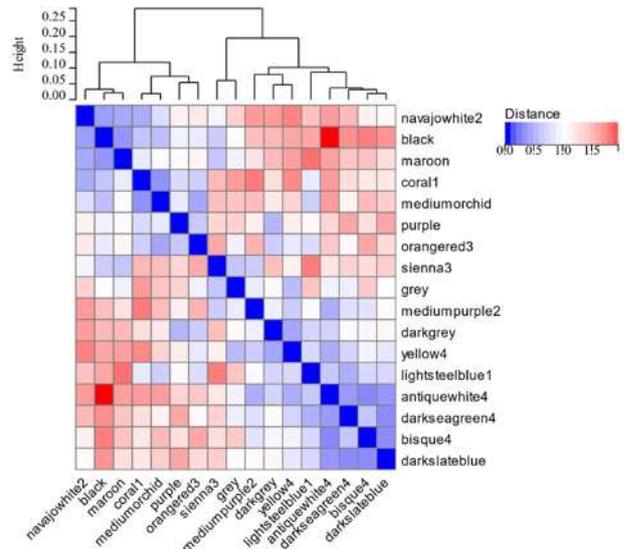
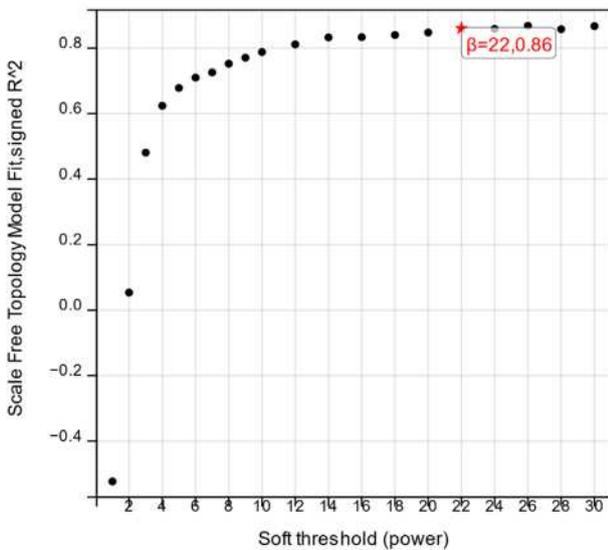
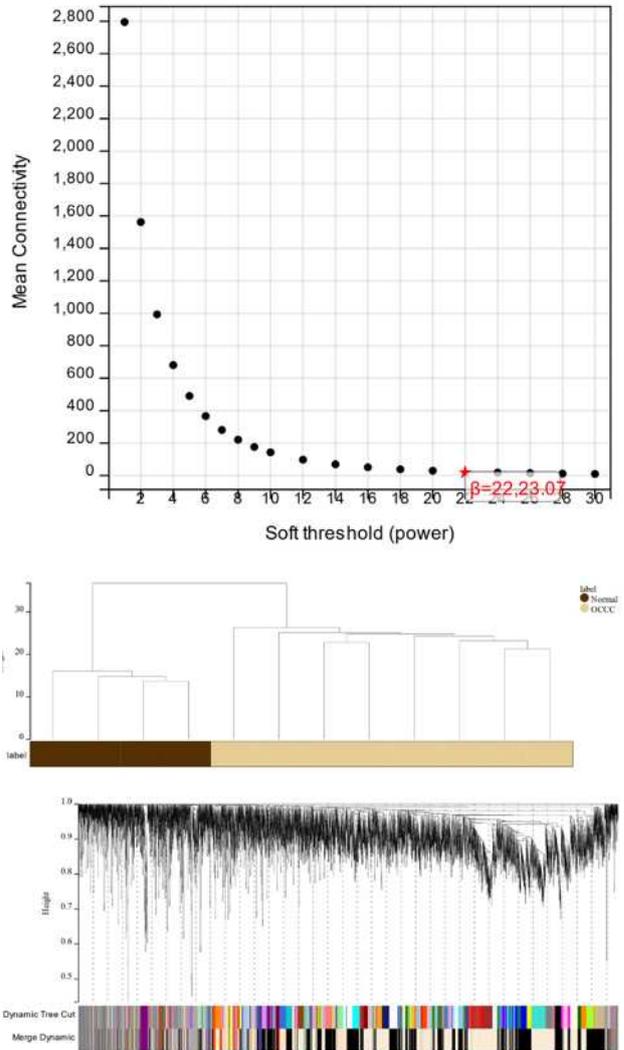


图 2 富集分析

2.3 WGCNA 分析

通过 WGCNA 分析获得了 17 个共表达模块,通过计算模块特征向量与基因的表达相关性,最终获取 1207 个与临床表现相关的基因。通过与 DEGs 基因合并,获取 302 个 hub 基因(图 3)。



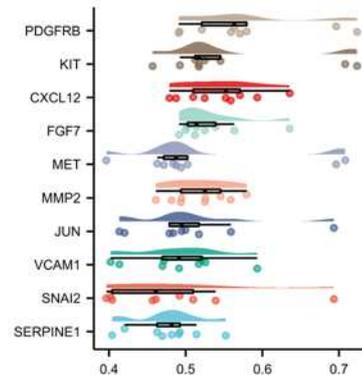
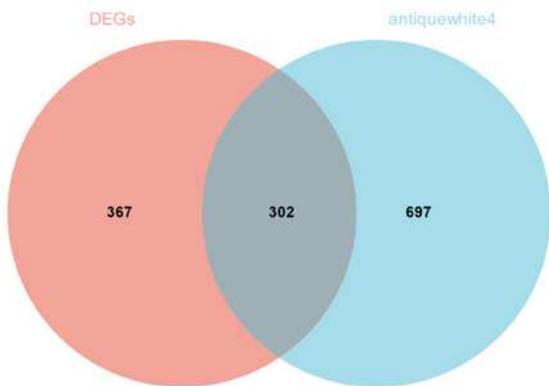
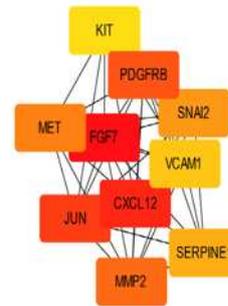
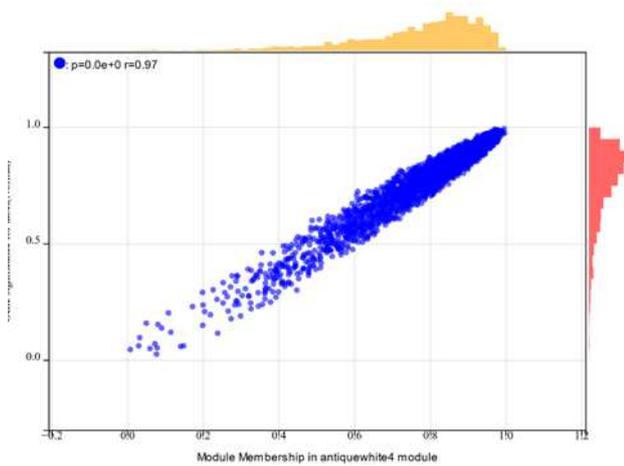
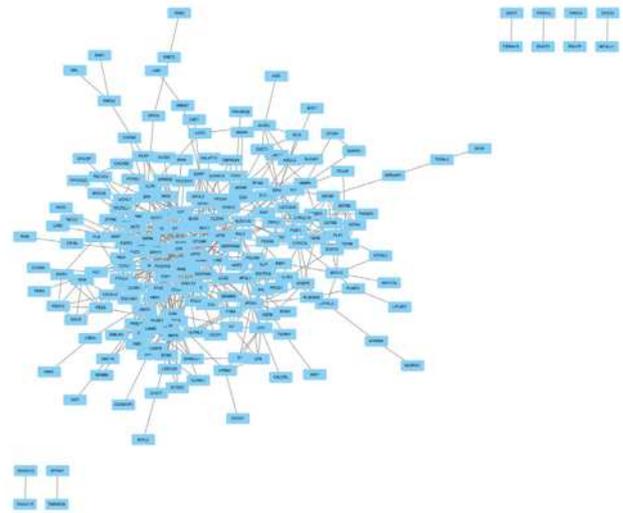
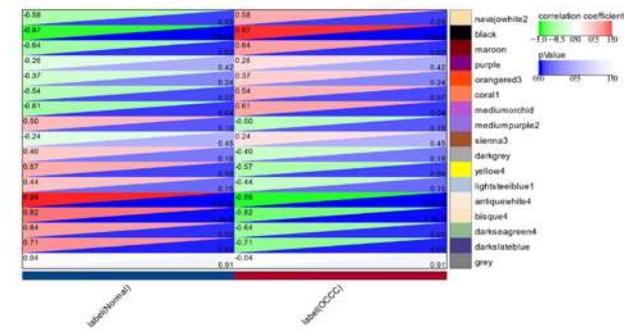


图4 关键基因分析

图3 WGCNA分析 hub 基因

2.4 关键基因分析

对 302 个 hub gene 进行 PPI 网络分析, 并通过 cytohubba 获取 10 个关键基因, 分别是 SERPINE1, MET, FGF7, VCAM1, MMP2, CXCL12, JUN, KIT, SNAI2, PDGFRB。通过 Friends 分析 PDGFRB 为 OCCC 的关键基因(图 4)。

2.5 关键基因调控网络分析

STAT1, STAT3 和 ETS1 三个 TF 可以对关键基因 PDGFRB 起调控作用(图 5)。

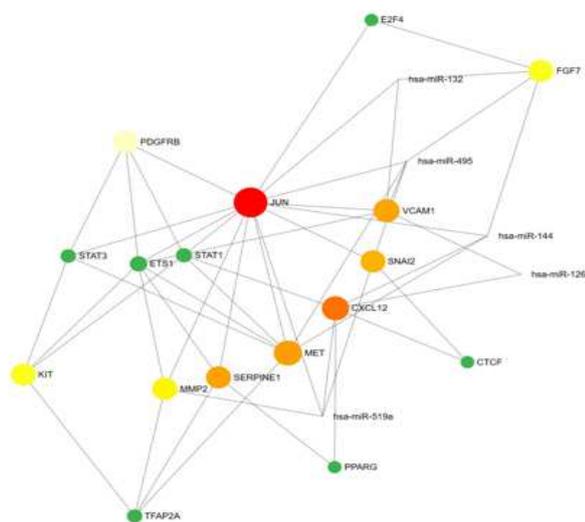


图5 关键基因调控网络

3 讨论

卵巢透明细胞癌是上皮性癌症的一种罕见亚型，具有独特的临床病理特征。晚期和复发性卵巢透明细胞癌的特征是对标准护理细胞毒性化疗的耐药性和预后不良^[7]。尽管卵巢透明细胞癌具有明显的分子特征，但目前对这种亚型上皮性癌症的治疗效果仍然欠佳^[8,9] potentially favouring carcinogenesis across a spectrum from benign disease with cancer-like characteristics, through an atypical phase, to frank malignancy. In this review, we focus on mTOR dysregulation in endometriosis and EAOCs, investigating cancer driver gene mutations and their potential interaction with the mTOR pathway. Additionally, we explore the complex pathogenesis of transformation, considering environmental, hormonal, and epigenetic factors. We then discuss postmenopausal endometriosis pathogenesis and propensity for malignant transformation. Finally, we summarize the current advancements in mTOR-targeted therapeutics for endometriosis and EAOCs.”, ” container-title” :” Cancers” ,” -DOI” :” 10.3390/cancers16112160” ,” ISSN” :” 2072-6694” ,” issue” :” 11” ,” journalAbbreviation” :” Cancers (Basel). 本研究通过生物信息学方法确定了 PDGFRB 是 OCCC 治疗的潜在靶点，并通过建立调控因子 microRNA 调控网络确定了对 PDGFRB 具有调节作用的三个调控因子。

血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptors, PDGFRs) 属于受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine

kinases, RTK) 家族^[10]。PDGFRs 有两种亚型, PDGFR α 和 PDGFR β , 分别由两个不同的基因 PDGFRA 和 PDGFRB 编码^[11]。五种不同的配体 (PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC 和 PDGFDD) 可以以二聚体状态结合一种或两种 PDGFR^[12]their integral roles include maintaining tissue architecture through the production of key extracellular matrix components, and participation in wound healing after injury. Fibroblasts are also key mediators in disease progression during fibrosis, cancer, and other inflammatory diseases. Under these perturbed states, fibroblasts can activate into inflammatory fibroblasts or contractile myofibroblasts. Fibroblasts require various growth factors and mitogenic molecules for survival, proliferation, and differentiation. While the activity of mitogenic growth factors on fibroblasts in vitro was characterized as early as the 1970s, the proliferation and differentiation effects of growth factors on these cells in vivo are unclear. Recent work exploring the heterogeneity of fibroblasts raises questions as to whether all fibroblast cell states exhibit the same growth factor requirements. Here, we will examine and review existing studies on the influence of fibroblast growth factor receptors (FGFRs).

PDGFRB 与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关, 其可能涉及的机制包括基因突变、信号通路异常、促进血管生成以及作为药物靶点等方面^[13]。PDGFRB 基因位于人染色体 5 的 q32 位上, 包含 25 个外显子。该基因的突变, 如小的缺失和染色体易位, 可能导致 PDGFRB 与至少 30 个基因中的任何一个之间融合, 进而引发各种形式的潜在恶性骨髓疾病^[14]。例如, 这些突变可能与骨髓增生性肿瘤的发生有关, 该疾病通常涉及嗜酸性粒细胞增多、嗜酸性粒细胞诱导的器官损伤, 并且可能进展为侵袭性白血病。PDGFRB 编码的蛋白是一种酪氨酸激酶受体, 在细胞增殖等信号通路中起重要作用。当 PDGFRB 发生突变时, 可能导致其编码的蛋白功能异常, 进而干扰正常的细胞增殖、分化和凋亡过程, 促进肿瘤细胞的过度增殖和恶性转化^[15]。PDGFRB 与血管生成密切相关, 当 PDGFRB 或其编码的蛋白发生异常时, 可能促进肿瘤组织的血管生成, 为肿瘤提供充足的营养和氧气供应, 加速肿瘤的生长和扩散^[11]。由于 PDGFRB 在恶性肿瘤中的重要作用, 它已成为抗肿瘤药物开发的重要靶点之一。例如, 舒尼替尼 (Sunitinib) 等酪氨酸激酶受体抑制剂已被发

现能够预防 PDGFRB 基因突变导致的小鼠动脉瘤的发生, 这为开发治疗相关恶性肿瘤的药物提供了可能^[16]。因此针对 PDGFRB 的深入研究有助于我们更好地理解恶性肿瘤的发病机制, 并开发更有效的治疗方法。

转录因子 (Transcription Factor, 简称 TF) 是生物体内一类特殊的蛋白质, 它们在基因表达调控中扮演着至关重要的角色。转录因子通过与 DNA 序列中的特定区域 (通常称为启动子或增强子) 结合, 来影响 RNA 聚合酶的活性, 进而控制基因转录的起始、速率和特异性^[17]。我们尝试对 PDGFRB 的调控机制进行分析, 发现 STAT1, STAT3 和 ETS1 三个 TF 可以对核心基因 PDGFRB 起调控作用。

STAT1 (信号转导与转录激活因子 1) 是参与细胞信号转导和转录激活的重要分子, 特别是在免疫反应和抗病毒防御中起关键作用^[18]。STAT3 (信号转导与转录激活因子 3) 是 STAT 家族中的一个成员, 它在多种细胞过程中都发挥着重要作用, 包括细胞生长、存活、分化和凋亡等^[19]。STAT3 也与多种疾病相关, 特别是癌症^[20]。ETS1 (Ets-1 转录因子) 是一种 ETS 家族的转录因子, 参与调控细胞增殖、分化、凋亡和血管生成等过程^[21]。

综上所述, PDGFRB 是 OCCC 发生的核心基因, 是治疗 OCCC 的潜在靶点。

参考文献:

[1] XIE Y, KONG W, LUO D, 等 . Ovarian Clear Cell Carcinoma: Genomic Characterization, Pathogenesis and Targeted Therapy[J/OL]. *Anticancer Research*, 2023, 43(8): 3401–3410. DOI:10.21873/anticancer.16515.

[2] GADDUCCI A, MULTINU F, COSIO S, 等 . Clear cell carcinoma of the ovary: Epidemiology, pathological and biological features, treatment options and clinical outcomes[J/OL]. *Gynecologic Oncology*, 2021, 162(3): 741–750. DOI:10.1016/j.ygyno.2021.06.033.

[3] 金燕露, 于爱军, 段萍, 等 . 卵巢透明细胞癌的诊断及治疗研究进展 [J]. *肿瘤学杂志*, 2023, 29(7): 544–553.

[4] 田媛 . 卵巢透明细胞癌临床特征及预后分析 [D/OL]. 昆明医科大学, 2023[2024-07-16]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=pVWNQ14Rae_72vbJLmE540Y8FXAjFrX9IYxEpNG5G8EcqBgC7W4r0BuGWhOF9CGJXCex7aJ5yOhCWljBhB12NeDpgNTbCKXah56VVLt6vX6tcjV5qdUqHO6joUJng2Rp_

c-QHFHMhatlek0LxH_tciK3UaT9SurMKNgDUbtAgmw8oqqRFhVivq9glxTnzKHPpu3MBWBi_1k=&uniplatform=NZKPT&language=CHS. DOI:10.27202/d.cnki.gkmyc.2022.000157.

[5] FURUTAKE Y, YAMAGUCHI K, YAMANOI K, 等 . YAP1 suppression by ZDHHC7 is associated with ferroptosis resistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma[J/OL]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2024. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-24-0145.

[6] AKALIN P K. Introduction to bioinformatics[J/OL]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2006, 50(7): 610–619. DOI:10.1002/mnfr.200500273.

[7] Drug-Resistant Epithelial Ovarian Cancer: Current and Future Perspectives – PubMed[EB/OL]. [2024-07-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38805125/>.

[8] HABLASE R, KYROU I, RANDEVA H, 等 . The “Road” to Malignant Transformation from Endometriosis to Endometriosis-Associated Ovarian Cancers (EAOs): An mTOR-Centred Review[J/OL]. *Cancers*, 2024, 16(11): 2160. DOI:10.3390/cancers16112160.

[9] TANG L, BIAN C. Research progress in endometriosis-associated ovarian cancer[J/OL]. *Frontiers in Oncology*, 2024, 14: 1381244. DOI:10.3389/fonc.2024.1381244.

[10] PDGF receptor mutations in human diseases – PubMed[EB/OL]. [2024-07-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33449152/>.

[11] Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor – PubMed[EB/OL]. [2024-07-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508235/>.

[12] CHENG M F, ABDULLAH F S, BUECHLER M B. Essential growth factor receptors for fibroblast homeostasis and activation: Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR), Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR), and Transforming Growth Factor β Receptor (TGF β R)[J/OL]. *F1000Research*, 2024, 13: 120. DOI:10.12688/f1000research.143514.2.

[13] PDGFRB/EGR1/PD-L1 调控轴在黑素瘤免疫治疗中的作用及机制研究 – 中国知网 [EB/OL]. [2024-07-16]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=pVWNQ14Rae-A7VXuAw3iQ_k5Xs8oYJh8X5gxaGzp5GrEU1cHVIc_3TSwPw

DTNiQ0CsDbfN_PcJnNOap1bKLp3TAaorlNPdJQQc7N13xO8w
HK5wSZ9Tlp5ePDnzRRxUo3I7-9m1QKhUjwLlhVW8F45KYIU
ftJX1P&uniplatform=NZKPT&language=CHS^[14] 何瑰, 张文博.
PDGFRB 基因重排检测方法的建立 [J]. 分子诊断与治疗杂志,
2014, 6(1): 15-18.

[15]ROSENKRANZ S, KAZLAUSKAS A. Evidence
for distinct signaling properties and biological responses
induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes[J/OL].
Growth Factors (Chur, Switzerland), 1999, 16(3): 201-216.
DOI:10.3109/08977199909002130.

[16]Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase
inhibitor in the era of molecular cancer therapies - PubMed[EB/
OL]. [2024-07-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19894779/>.

[17]胡慧. 人类转录因子数据整合分析及其在 CAR-T
治疗中的调控研究 [D/OL]. 华中科技大学, 2022[2024-07-16].
https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=pVWNQl4Rae8_VDoH1qEWGL_394z_DvuUVFbFsplpMvIPQqjRCvCC1oFWo_5lCJP-7-CrljbwebbzN7gmp9DziV1ThSM5Cp4oMpPxYNooq7gxVhDxZV3t890Zg0_jkVz1TVaiD-IETwC4czo9RSn6d7KOK6Whs4tJ0CyLt2_5w5hefSMFN1DXfwACJGo8t3N-yc-wr7u0nE=&uniplatform=NZKPT&language=CHS.DOI:10.27157/d.cnki.

ghzku.2020.002052.

[18]STAT1 in cancer: friend or foe? - PubMed[EB/OL].
[2024-07-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28950072/>.

[19]The role of STAT3 in autophagy - PubMed[EB/OL].
[2024-07-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25951043/>.

[20]Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy -
PubMed[EB/OL]. [2024-07-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32972405/>.

[21]DITTMER J. The biology of the Ets1 proto-oncogene[J/
OL]. Molecular Cancer, 2003, 2: 29. DOI:10.1186/1476-4598-2-
29.

作者简介:

柳英兰 (1975—), 女, 副主任医师, 博士研究生,
医学博士后, 硕士研究生导师, 从事妇产科专业工作近 20 年。
主要研究方向为妇科恶性肿瘤的综合治疗。在长期临床实践
中积累了大量丰富的临床经验, 擅长各种常见病, 多发病,
疑难病的诊治及对妇科恶性肿瘤的综合治疗。担任医疗组长
8 年余, 可以以术者完成。

基金项目: 项目支持: 黑龙江省卫生健康委科研课题
资助项目。项目编号, 2020—108。