

上皮细胞型与混合型葡萄膜黑色素瘤的生物信息学分析

陈源, 黄正如

引用: 陈源, 黄正如. 上皮细胞型与混合型葡萄膜黑色素瘤的生物信息学分析. 国际眼科杂志 2020;20(2):300-306

作者单位: (215500) 中国江苏省常熟市第二人民医院眼科

作者简介: 陈源, 毕业于苏州大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 黄正如, 毕业于南京医科大学, 博士, 主任医师, 科主任, 研究方向: 白内障、眼底病. ccl2cox@163.com

收稿日期: 2019-08-01 修回日期: 2020-01-07

摘要

目的: 通过生物信息学方法分析上皮细胞型和混合型葡萄膜黑色素瘤之间的差异表达基因及关键基因。

方法: 自 GEO 数据库中下载基因芯片数据集 GSE22138, 从中筛选出上皮细胞型和混合型葡萄膜黑色素瘤之间的差异基因, 通过 DAVID 数据库对差异基因行功能富集分析; 通过 STRING 及 Cytoscape 构建蛋白-蛋白互作网络并从中找出关键基因; cBioportal 构建关键基因的协作基因网络; 应用 GEPIA 数据库对关键基因进行生存分析。

结果: 本研究共筛选到符合条件的差异基因 241 个。其中下调的基因 116 个和上调的 125 个。差异基因功能主要富集于细胞粘附、药物反应、凋亡的调控以及内皮细胞的增殖等方面。共筛选出 10 个关键基因, 生存分析显示这些关键基因与葡萄膜黑色素瘤的预后有关。

结论: 通过生物信息学方法对差异基因和关键基因进行分析, 有助于阐释上皮细胞型和混合型葡萄膜黑色素瘤不同生物学特征及其机制。

关键词: 黑色素瘤; 葡萄膜肿瘤; 差异表达基因; 基因芯片; 富集分析; 蛋白-蛋白互作网络; 生存分析

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.2.25

Bioinformatic analysis between epithelioid and mixed uveal melanoma

Yuan Chen, Zheng-Ru Huang

Department of Ophthalmology, Changshu No.2 People's Hospital of Jiangsu Province, Changshu 215500, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zheng - Ru Huang. Department of Ophthalmology, Changshu No. 2 People's Hospital of Jiangsu Province, Changshu 215500, Jiangsu Province, China. ccl2cox@163.com

Received: 2019-08-01 Accepted: 2020-01-07

Abstract

• **AIM:** To explore the differentially expressed genes and

crucial genes between epithelioid and mixed uveal melanoma (UM) based on bioinformatics analysis.

• **METHODS:** Microarray datasets GSE22138 was extracted from gene expression omnibus database (GEO). The differentially expressed genes (DEGs) were screened out between epithelioid and mixed UM, and functional enrichment analysis were performed with DAVID database. STRING and cytoscape was applied to explore the protein-protein interaction (PPI) network and hub genes. Subsequently, cBioPortal was applied to explore the network of the hub genes, and GEPIA was adopted to study the survival analysis of hub genes.

• **RESULTS:** Overall, 241 DEGs including 125 upregulated and 116 down regulated genes were identified. The DEGs mainly enriched in cell adhesion, response to drug and Positive regulation of endothelial cell proliferation. A total of 10 hub genes were identified. Survival analysis revealed the hub genes was associated with the prognosis of UM.

• **CONCLUSION:** DEGs and hub genes identified by Bioinformatics analysis in the present study would be beneficial to understand mechanism and biological characteristics between epithelioid and mixed UM.

• **KEYWORDS:** melanoma; uveal neoplasms; differentially expressed genes; microarray; enrichment analysis; protein-protein interaction; kaplan-meier curve

Citation: Chen Y, Huang ZR. Bioinformatic analysis between epithelioid and mixed uveal melanoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(2):300-306

0 引言

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是一种少见的, 但也是成人最常见的原发性眼内恶性肿瘤, 约占眼部恶性黑色素瘤的 85%^[1]。UM 的治疗方式主要有激光、放射治疗、眼球摘除及眶内容剜除术。但该病的疗效较差、患者生存率较低, 5a 总生存率为 69%, 15a 为 55%, 25a 为 51%^[2]。根据 1980 年 WHO 分类法, UM 可分为: 梭形细胞型、上皮细胞型、混合型和其他型。UM 的恶性程度与病理类型有关, 以上皮细胞型恶性程度最高, 混合细胞型次之, 梭形细胞型相对较好^[3-4]。UM 的基因表达变化与该病的发展、转移等相关^[5-6]。针对 UM 的病理分型和基因表达进行研究, 对揭示该病的病理机制、治疗及预后具有重要的意义。近年来, 基因芯片技术和生物信息学分析方法被广泛应用于多种疾病特别是肿瘤的研究中。筛选差异基因 (differentially expressed genes, DEGs) 及其功能富集分析等生物信息学方法有助于从基因层面揭示肿瘤的病理机制, 并为临床治疗及预后评估提供支持。本研究使用

生物信息学方法,通过对基因芯片数据库进行数据挖掘,对上皮型和混合型 UM 进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 数据下载所用的数据来自美国国立生物技术信息中心 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。所用数据集 GSE22138 使用的是 Affymetrix 公司基因芯片,其平台号为 GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array。该数据集中含有 23 例混合型及 21 例上皮细胞型人葡萄膜黑色素瘤的基因芯片信息。

1.2 方法

1.2.1 差异基因的筛选和功能富集分析 GEO2R 是 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) 内含的交互式的网络工具,能够通过 R 语言筛选出不同实验条件下的差异表达基因。本研究通过 GEO2R 筛选出上皮型相对于混合型葡萄膜黑色素瘤的差异基因。设置筛选标准为: $\log_{2}FC \geq 1$ 及 $\log_{2}FC \leq -1$, $P < 0.05$, 挑选出有明显表达差异且有统计学意义的基因;再通过 R 语言作火山图对结果进行表达。

1.2.2 差异基因的功能富集分析 DAVID 生物信息数据库 (<http://david.ncifcrf.gov>) 是一款在线的整合了生物学数据和数据库的分析工具,该数据库为大规模的基因或蛋白列表提供系统整合的生物功能注释信息。京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 是系统分析基因功能的数据库,被广泛应用于整合和解释基因组测序和其他高通量实验中得到的大规模数据集。基因本体论 (Gene Ontology, GO) 是多种生物本体语言中的一种,提供了三层结构的系统定义方式,如生物学途径 (biological process, BP), 细胞组件 (cellular component, CC), 分子功能 (molecular function, MF), 用于描述基因产物的功能。本研究通过 DAVID 数据库对差异基因的功能进行富集分析,取有统计学差异且排名前 10 位的富集结果,通过 R 语言作气泡图对结果进行表达;并对上调和下调的差异基因作表对富集结果进行表达。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2.3 蛋白-蛋白互作网络的构建和关键基因的筛选及其相互作用分析 STRING 数据库 (<http://string-db.org>) 可用于搜寻已知蛋白质之间和预测蛋白质之间的相互作用,便于更加深入地了解蛋白质的功能及调控机制。本研究通过 STRING 查找差异基因的蛋白-蛋白互作网络 (protein-protein interaction network, PPI network), 以综合评分 > 0.4 为有统计学意义。Cytoscape 是用于可视化分子互作网络的工具,其 MCODE 插件是基于拓扑结构寻找具有密切相互作用网络结构的插件。本研究应用 Cytoscape 中的 MCODE 插件,以 MCODE Scores > 5 , Degree Cutoff = 2, Node Score cutoff = 0.2, Max Depth = 100 及 K-Core = 2 为标准,筛选关键基因。cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) 为癌症基因组研究提供了一个网页版用来浏览、可视化和分析多维度的癌症基因组数据。对于调控网络 cBioPortal 通过基因互作数据库,寻找与候选基因相关联的基因,通过分析互作强弱并构建调控网络。

本研究应用 cBioPortal 分析和构建关键基因的关联基因调控网络。

1.2.4 关键基因 在 UM 中的生存分析 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 为分析癌症的差异基因表达、降维分析、相关性分析、类似基因检测和生存分析等提供支持。本研究应用 GEPIA 数据库对关键基因在 UM 中的作用进行了生存分析。

2 结果

2.1 上皮型和混合型人葡萄膜黑色素瘤中的差异基因及其筛选 本研究共筛选到 UM 两种病理型(上皮细胞型和混合型)之间的差异基因 241 个。上皮细胞型相对于混合型 UM,下调的差异基因 116 个和上调 125 个(图 1A)。

2.2 差异基因的 KEGG 和 GO 功能富集分析 本研究应用网络工具 DAVID 对进入纳入标准的差异基因进行了功能富集分析。综合而言,生物学途径 (BP), 差异基因功能主要富集于细胞粘附、药物反应以及内皮细胞的增殖等方面;细胞组件 (CC), 主要富集于内质网、细胞质、线粒体等;分子功能 (MF) 主要富集于蛋白质同聚活性、微管结合、TAU 蛋白结合等;KEGG 信号通路 (KEGG pathway) 则主要富集于局部粘附、钙信号通路、缝隙连接及氨基酸的生物合成等方面(图 1B、C)。分别就上、下调的差异基因而言,下调的基因中, BP 主要富集于细胞及生物粘附、凋亡、细胞程序性死亡及细胞分化等, CC 主要富集于细胞突起、IkappaB 激酶复合物及不溶解组分等, MF 主要富集于 TAU 蛋白结合、蛋白二聚化、相同蛋白质结合等;上调的基因, BP 主要富集于 DNA 的解聚、细胞增殖、细胞大分子分解过程、细胞内传递及对放疗的反应等, CC 主要富集于细胞囊泡、线粒体及其组分、细胞质囊及细胞质膜结合囊泡等; MF 主要富集于辅酶、核苷及 FAD 结合等;KEGG 富集于 Ca^{2+} 信号通路和聚糖生物合成,见表 1。

2.3 蛋白-蛋白互作网络的构建和关键基因的筛选及其协作基因网络分析 本研究中应用 Cytoscape 对 DEGs 构建 PPI 的可视化结果见图 2A, 运用 MCODE 插件筛选出 PPI 的显著组件见图 2B, 根据设置的标准,筛选出的 10 个关键基因如下:表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、纤维生长因子 13 (fibroblast growth factor 13, FGF13)、干扰素 α 诱导蛋白 6 (interferon alpha inducible protein 6, IFI6)、干扰素诱导蛋白的四肽重复序列 1 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1, IFIT1)、ISG15 泛素样修饰剂 (ISG15 ubiquitin like modifier, ISG15)、JUN 原癌基因 AP-1 转录因子亚基 (Jun Proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit, JUN)、GTP 酶样发动蛋白 MX (MX Dynamin like GTPase 1, MX1)、2'-5'-寡腺苷酸合成酶 1 (2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1, OAS1)、SRY 盒 9 (SRY-Box 9, SOX9)、分泌型磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1)。其中 Node Degree 最高的为 EGFR, 具有 29 个关联节点,提示该基因在 UM 中起着枢要作用。通过 cBioportal 对关键基因的协作基因网络的实现可视化,结果见图 2C。

2.4 关键基因在 UM 中的生存分析 关键基因的表达高低其对 UM 的生存影响的分析见图 3,结果表明对于总体

表1 上调、下调差异基因的GO和KEGG通路富集分析

类别	注释	倍率	P
上调基因			
生物学途径	DNA 分解代谢过程	4	0.007875
生物学途径	细胞增殖	9	0.00959
生物学途径	细胞大分子分解代谢过程	12	0.009985
生物学途径	胞内信号级联	17	0.010126
生物学途径	对放疗的反应	6	0.011711
生物学途径	神经元投射的形态发生	6	0.015032
生物学途径	细胞运动	9	0.015453
生物学途径	高分子分解过程	12	0.016675
生物学途径	乙酰辅酶 A 代谢过程	3	0.018718
生物学途径	单糖转运	3	0.018718
细胞组件	囊泡	14	0.001082
细胞组件	线粒体部分	13	0.001226
细胞组件	线粒体	18	0.001977
细胞组件	细胞质囊泡	13	0.002325
细胞组件	细胞膜结合囊泡	11	0.006562
分子功能	辅酶结合	6	0.008435
分子功能	核苷结合	20	0.01345
分子功能	黄素腺嘌呤二核苷酸结合	4	0.013617
分子功能	连接酶活性,形成碳硫键	3	0.014906
分子功能	电子载体活性	6	0.018669
KEGG_PATHWAY	钙信号通路	6	0.026148
KEGG_PATHWAY	O-聚糖生物合成	3	0.033334
下调基因			
生物学途径	细胞粘附	13	0.000888
生物学途径	生物粘附	13	0.000899
生物学途径	凋亡调控	14	0.000917
生物学途径	细胞程序性死亡的调控	14	0.001005
生物学途径	细胞死亡的调控	14	0.001039
生物学途径	细胞发育调控	7	0.001421
生物学途径	水解酶活性负调节	4	0.002946
生物学途径	中性脂质代谢过程	4	0.00331
生物学途径	细胞分化过程中的形态变化	7	0.003403
生物学途径	神经元投射发育	7	0.004302
细胞组件	细胞投射	10	0.017316
细胞组件	Ikappab 激酶复合物	2	0.039309
细胞组件	膜片段	10	0.040116
细胞组件	不可溶解片段	10	0.048676
分子功能	Tau 蛋白结合	3	0.000361
分子功能	蛋白质二聚活性	10	0.00551
分子功能	相同蛋白结合	10	0.015404
分子功能	磷脂酰胆碱-甾醇 O-酰基转移酶活性	2	0.030061
分子功能	细胞骨架蛋白结合	8	0.033437

生存率 (overall survival, OS) 而言, EGFR、FGF13、IFI6、IFIT1、ISG15、JUN、MX1、OAS1 高表达的人群生存率更低, 而基因如 SOX9、SPP1 高表达的人群则生存率更高。

3 讨论

UM 来源于虹膜、睫状体及脉络膜, 根据 1980 年 WHO 分类法, 病理分型为梭形细胞型、上皮细胞型、混合细胞型和其他类型: 如坏死型、气球状细胞型等。其中混合型是指瘤组织由上皮型、梭形细胞、小多边形细胞等多种形态

的瘤细胞构成。梭形细胞型的瘤细胞是一种黏合细胞, 具有较强的凝合力, 故不易发生转移; 而上皮样瘤细胞为非黏合细胞, 活动度大, 凝合力差, 很容易发生转移, 其预后亦更差^[3]。既往研究证实基因表达改变与 UM 的发展相关; 位于内质网的 BAP1, 参与泛素化修饰、促进细胞的凋亡; 当 BAP1 发生突变表达降低时, 细胞凋亡受抑制, 导致 UM 的发生^[6]。而 SPANX-C 在转移性的 UM 中较非转移表达明显升高的特点, 使该基因成为 UM 发生转移的潜在

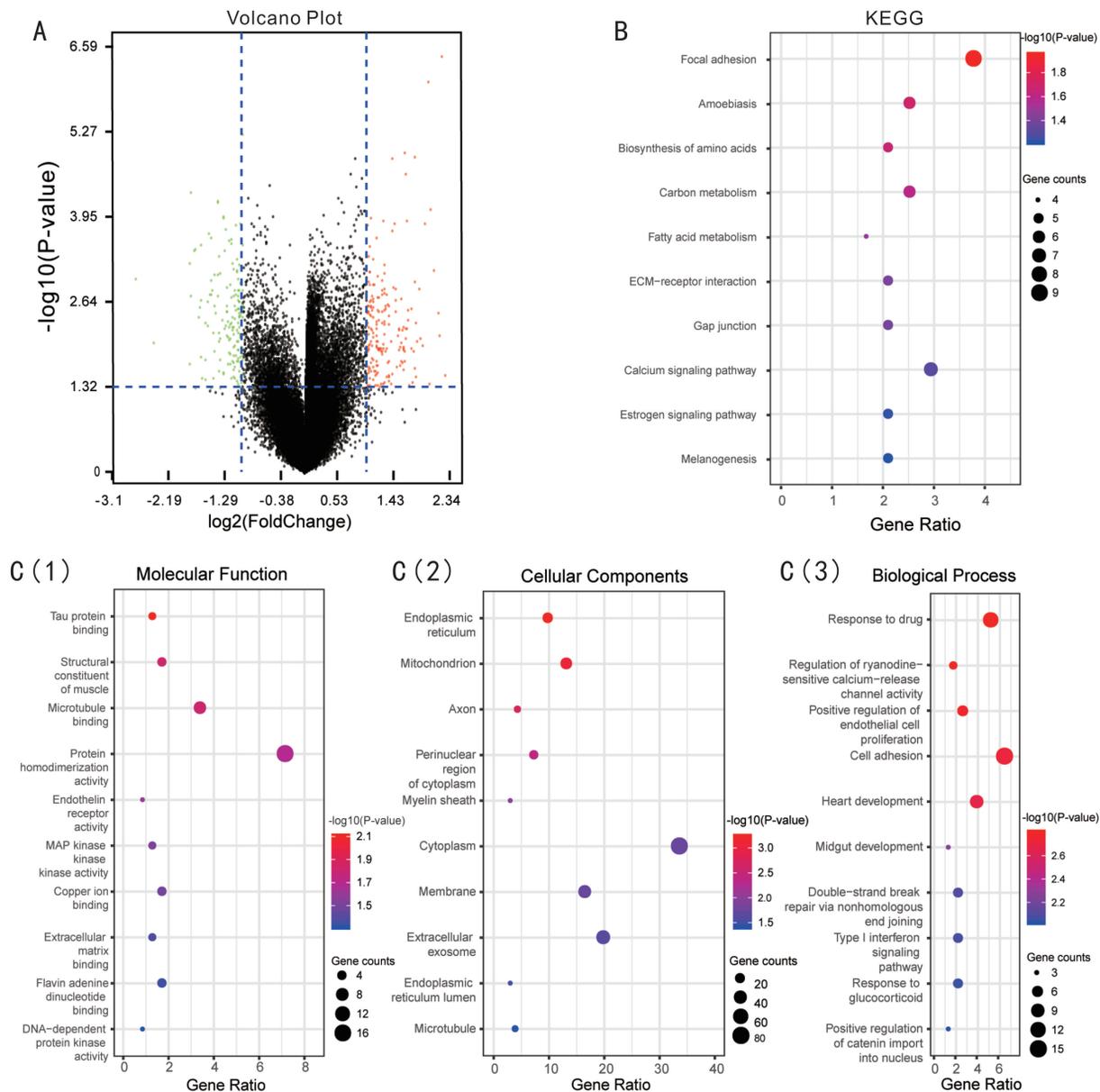


图1 差异基因及其功能富集分析 A:上皮细胞型相较混合型UM,在符合条件 $\log_2FC \geq 1$ 及 $\log_2FC \leq -1, P < 0.05$ 条件的差异基因中,下调的基因116个(绿色)和上调125个(红色);B:KEGG通路富集分析;C:GO功能富集分析,(1)分子功能富集分析;(2)细胞组件富集分析;(3)生物学途径富集分析。

分子标准物^[5]。

在本研究中,共筛选出差异基因241个。相较于混合型,上皮细胞型UM下调的基因BP主要富集于细胞及生物粘附、凋亡、细胞程序性死亡及细胞分化等,上调的基因BP主要富集于DNA的解聚、细胞增殖等,这些功能富集结果与上皮细胞型UM恶性程度更高,发展更快且易转移等临床特征一致。

本研究通过Cytoscape所筛选出10个关键基因,均有与恶性肿瘤相关的实验验证的报道。在PPI中,基因EGFR的Node Degree最高,提示其与UM发展最为密切。EGFR位于细胞膜表面,是一种跨膜的糖蛋白,当其与相应的细胞因子结合后,则发生酪氨酸自磷酸化,信号传导入胞内,发生细胞增殖。目前,EGFR与UM癌症关系已经被实验所证实^[7]。FGF13是纤维生长因子家族成员。FGF家族广泛参与了有丝分裂和促细胞生存。在乳腺癌的研究^[8]中发现FGF13能够促进肿瘤的增殖和转移;在子宫颈癌中,高表达FGF13的癌细胞对化疗药物表现出

更高的抵抗作用^[9]。IFI6由于干扰素诱导产生,能够抑制细胞的凋亡,在乳腺癌的研究^[10]中发现IFI6可通过诱导mROS进而抑制乳腺癌细胞凋亡并促进其转移。而IFI1的表达增加与鳞状细胞癌的转移密切相关^[11],同时,该基因亦被认为是乳腺癌的预后指标之一^[12]。ISG15基因编码的蛋白质是一种泛素样蛋白。研究者在胰腺导管细胞癌的研究中,敲减ISG15后,发现PDAC细胞受到抑制,提示ISG15具有抑制胰腺导管细胞癌的作用^[13]。原癌基因JUN的产物为c-JUN,c-JUN表达增高导致酒精相关性癌症发生率上升^[14]。MX1在持续暴露于紫外线的黑色素瘤细胞中表达明显升高,该基因的表达上调能够抑制黑色素瘤细胞的凋亡,推测该基因与黑色素瘤的发生发展相关^[15]。OAS1由于干扰素诱导产生,研究报道前列腺癌的发生与OAS1的基因多态性相关^[16]。SPP1可以通过促进细胞增殖^[17]、肿瘤转移^[18]及耐药^[19]促进癌症的生存及发展,在SPP1高表达的情况下,其生存率更低。SOX9在肝癌、乳腺癌、膀胱癌及胃癌中表达升高,则患者预后更差^[20]。

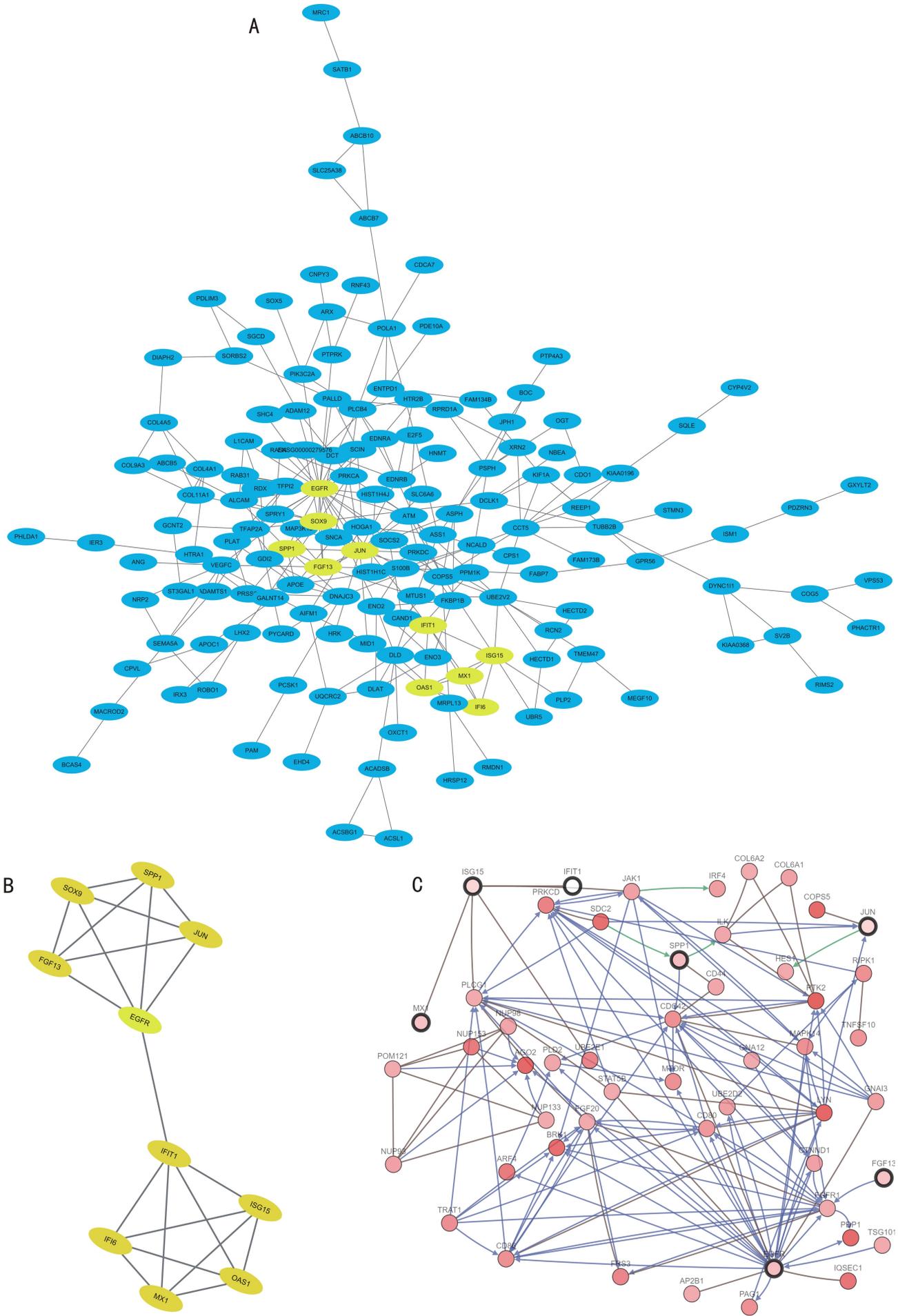


图2 蛋白-蛋白互作网络的构建和关键基因的筛选及其互作基因分析 A: 差异基因的蛋白互作网络, 黄色为关键基因; B: 通过 MCODE 插件筛选出的关键基因组件; C: 关键基因的协作基因网络。

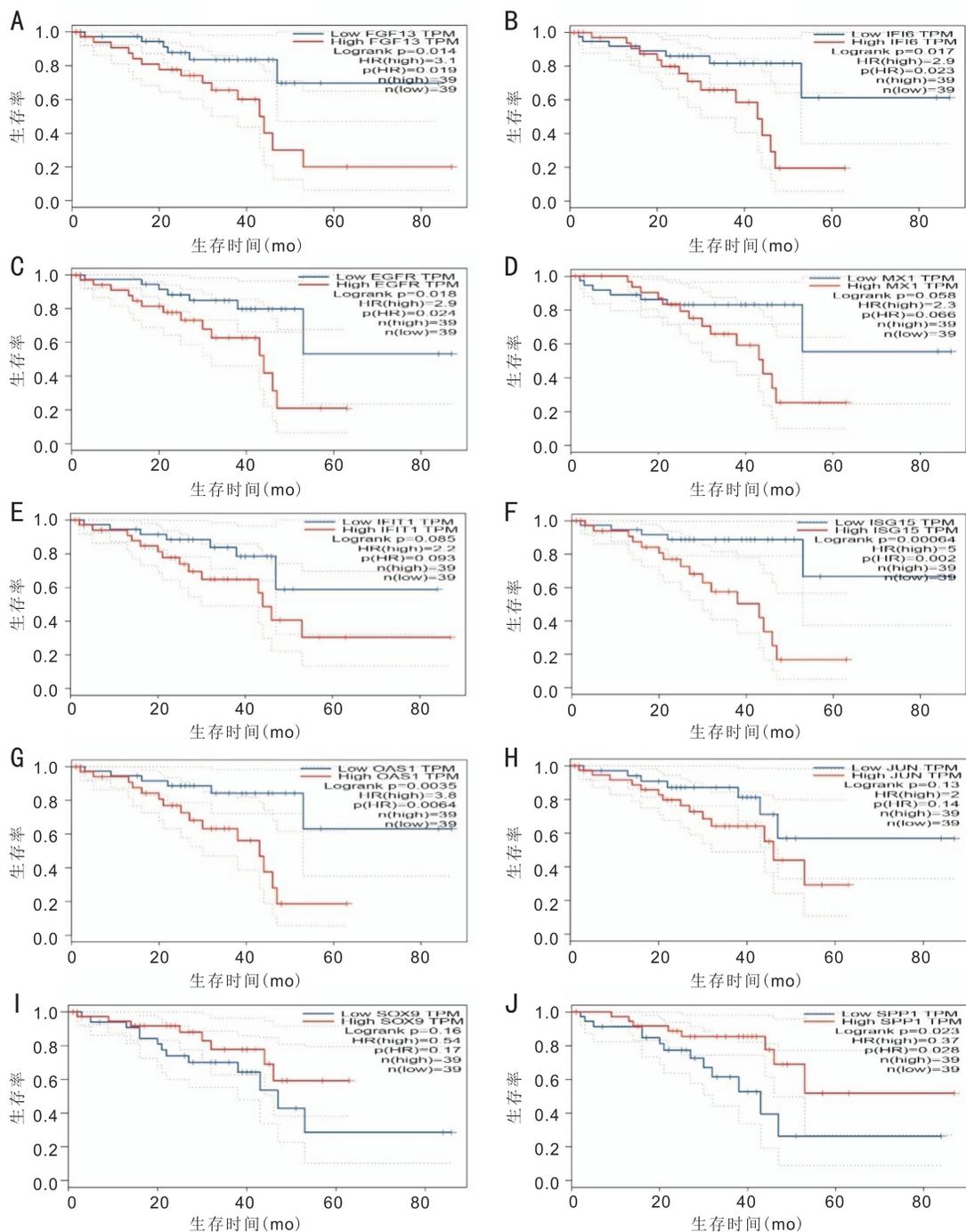


图3 关键基因的表达高低对UM的总体生存率的影响 A-H:FGF13、IFI6、EGFR、MX1、IFIT1、ISG15、OAS1、JUN基因高表达时生存率更低,低表达时生存率更高;I,J:SOX9、SPP1基因高表达时生存率更高,低表达时生存率更低。

但本研究中,通过基因SPP1和SOX9在UM中的生存分析,结果显示:这两种基因在高表达时,患者的总体生存率更高,这一结果不同于两种基因在其他癌症中的生存分析结果,其中原因需待进一步研究。根据生物信息学筛选的这10个关键基因,我们查阅文献,暂未见于上皮型及混合型UM病理分型之间的报道。

综上,本研究通过生物信息学方法对不同病理类型(混合型、上皮细胞型)UM的差异基因进行了分析,筛选到了241个差异基因,其中关键基因10个,通过对这些基因的分析,对能够更好地理解发病机制,对疾病的治疗和预后评估有一定的意义。本研究不足之处在于没有在梭形细胞型及上皮型UM之间进行分析,其原因是所查的数据中无梭形细胞型UM的数据。同时,由于本研究纳入的

样本量较小,尚需更大规模的临床资料及生物学实验研究对结果进行证实。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- Yonekawa Y, Kim IK. Epidemiology and management of uveal melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2012;26(6):1169-1184
- Krantz BA, Dave N, Komatsubara KM, *et al.* Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. *Clin Ophthalmol* 2017;11:279-289
- 燕玉清,赵红. 脉络膜黑色素瘤的病理特点与预后. *眼科新进展* 2019;39(1):75-78
- 李彬,项晓琳. 从眼科病理学角度深入认识眼内肿瘤. *中华实验眼科杂志* 2015;33(11):965-968
- Salvatorelli L, Puzzo L, Russo A, *et al.* Immunorexpression of SPANX-

C in metastatic uveal melanoma. *Pathol Res Pract* 2019;29:152431

6 Violanti SS, Bononi I, Gallenga CE, *et al.* New Insights into Molecular Oncogenesis and Therapy of Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)* 2019;11(5):694

7 Topcu - Yilmaz P, Kiratli H, Saglam A, *et al.* Correlation of clinicopathological parameters with HGF, c-Met, EGFR, and IGF-1R expression in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2010;20(2):126-132

8 Song JJ, Li W. MiR-10b suppresses the growth and metastasis of colorectal cancer cell by targeting FGF13. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23(2):576-587

9 Okada T, Murata K, Hirose R. Upregulated expression of FGF13/FHF2 mediates resistance to platinum drugs in cervical cancer cells. *Sci Rep* 2013;3:2899

10 Cheriya V, Kaur J, Davenport A, *et al.* G1P3 (IFI6), a mitochondrial localised antiapoptotic protein, promotes metastatic potential of breast cancer cells through mtROS. *Br J Cancer* 2018;119(1):52-64

11 Pidugu VK, Wu MM, Yen AH. IFIT1 and IFIT3 promote oral squamous cell carcinoma metastasis and contribute to the anti-tumor effect of gefitinib via enhancing p-EGFR recycling. *Oncogene* 2019;38(17):3232-3247

12 Danish HH, Goyal S, Taunk NK, *et al.* Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1) as a prognostic marker for local control in T1-2 N0 breast cancer treated with breast-conserving surgery and radiation therapy (BCS + RT). *Breast J* 2013;19(3):231-239

13 Li XY, Yan J, Sun J, *et al.* BAG3 deletion suppresses stem cell-like features of pancreatic ductal adenocarcinoma via translational suppression of ISG15. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2019;1866(5):819-827

14 Shi G, Zhong S. Alcohol-associated cancer and deregulation of Pol III genes. *Gene* 2017;612:25-28

15 Zhang K, Anumanthan G, Scheaffer S, *et al.* HMGB1/RAGE Mediates UVB-Induced Secretory Inflammatory Response and Resistance to Apoptosis in Human Melanocytes. *J Invest Dermatol* 2019;139(1):202-212

16 Mandal S, Abebe F, Chaudhary J. 2'-5' oligoadenylate synthetase 1 polymorphism is associated with prostate cancer. *Cancer* 2011;117(24):5509-5518

17 Song SZ, Lin S, Liu JN, *et al.* Targeting of SPP1 by microRNA-340 inhibits gastric cancer cell epithelial-mesenchymal transition through inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway. *J Cell Physiol* 2019;234(10):18587-18601

18 Pang X, Gong K, Zhang X, *et al.* Osteopontin as a multifaceted driver of bone metastasis and drug resistance. *Pharmacol Res* 2019;144:235-244

19 Chen X, Xiong D, Ye L, *et al.* SPP1 inhibition improves the cisplatin chemo-sensitivity of cervical cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2019;83(4):603-613

20 Aguilar-Medina M, Avendaño-Félix M, Lizárraga-Verdugo E, *et al.* SOX9 Stem-Cell Factor; Clinical and Functional Relevance in Cancer. *J Oncol* 2019;2019:6754040