

文章编号 1006-8147(2019)05-0463-03

论 著

基于 TCGA 数据库分析甲基化促进精原细胞瘤进程的作用机制

陈赛鹏,王嘉南,王 林,彭华红,肖龙飞,杨 阔

(天津医科大学第二医院泌尿外科,天津市泌尿外科研究所,天津 300211)

摘要 目的:通过生物信息学分析寻找甲基化促进精原细胞瘤进展的作用机制。方法:获取 TCGA 数据库精原细胞瘤数据,对Ⅱ期、Ⅲ期和Ⅰ期样本之间的差异甲基化位点、差异基因进行查找和关联分析,筛选精原细胞瘤Ⅱ期、Ⅲ期和Ⅰ期之间可能通过甲基化导致基因改变并影响精原细胞瘤的潜在机制。结果:分析显示 KCNC1 的表达与甲基化呈显著负相关,并显著影响精原细胞瘤患者的生存期。结论:利用生物信息学技术对不同分期的精原细胞瘤芯片数据分析,可发现高甲基化水平会导致基因 KCNC1 低表达,进而促进精原细胞瘤的进展,为靶向治疗精原细胞瘤提供精确方向。

关键词 精原细胞瘤;甲基化;TCGA 数据库;KCNC1

中图分类号 R737

文献标志码 A

Integrated analysis of the mechanism of methylation promoting the progress of seminomas based on the TCGA database

CHEN Sai-peng, WANG Jia-nan, WANG Lin, PENG Hua-hong, XIAO Long-fei, YANG Kuo

(Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism of methylation promoting the development of seminomas. **Methods:** Transcriptome sequencing data of seminomas patients from TCGA database were downloaded, correlation analysis of the differential methylation probeds and differential genes of stage Ⅱ/Ⅲ and Ⅰ periods seminomas was carried. The mechanism by which methylation may lead to changes in gene expression and affect the progress of seminomas was analyzed. **Results:** Analysis showed that the expression of KCNC1 was negatively correlated with methylation and significantly affected the survival of patients with seminoma. **Conclusion:** Using bioinformatics technology to analyze the microarray data of seminomas in different stages, it we have found that high methylation level may lead to low expression of gene KCNC1, thus promoting the progress of seminomas and providing support for targeted treatment of seminomas.

Key words iminomas; methylation; TCGA; KCNC1

睾丸生殖细胞瘤 (Testicular Germ Cell Tumor, TGCTs) 占睾丸原发性恶性肿瘤的 90% 以上,是 15~35 岁男性最常见的实体瘤^[1]。临床上将 TGCT 分为精原细胞瘤和非精原细胞瘤两大类,后者可细分为胚胎细胞瘤、绒毛膜瘤、卵黄囊瘤和畸胎瘤^[2]。American Joint Committee on Cancer(AJCC)根据精原细胞瘤的增殖和转移的程度分为精原细胞瘤Ⅰ期、Ⅱ期和Ⅲ期。Ⅰ期精原细胞瘤术后通过密切随访,药物辅助化疗和辅助放疗可以完全治愈^[3]。然而,Ⅱ期、Ⅲ期的术后的存活率较低,术后一般以放疗和化疗为主^[4]。目前精原细胞瘤的组学研究进展尚不完善,因此,探索精原细胞瘤的基因表达谱对了解原始生殖细胞与肿瘤形成的关系是非常重要的。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰,它可以在不改变 DNA 序列的情况下改变基因组的表达。DNA 甲基

化的主要机制是将甲基(CH₃)与 CG 二核苷酸的细胞因子结合,从而改变染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性,以及诱导 DNA 与蛋白质相互作用以控制基因表达的方式^[5]。许多研究表明,DNA 甲基化在肿瘤的发生发展过程中起着至关重要的作用,主要表现为 DNA 甲基化模式和 DNA 甲基转移酶表达水平的改变^[6]。然而,到目前为止还没有系统的分析甲基化在精原细胞瘤进展中的作用。TCGA(The Cancer Genome Atlas) 中有 156 例精原细胞瘤的 450K 甲基化数据和 156 例精原细胞瘤的 RNA seq 数据。因此笔者将 TCGA 甲基化芯片数据与 RNA seq 数据进行整合,分析甲基化调控的基因表达在精原细胞瘤恶性进展过程中发挥作用。

1 资料与方法

1.1 差异基因的筛选 从 TCGA 数据库中下载 106 例精原细胞瘤Ⅱ期、Ⅲ期和 26 例Ⅰ期样本的转录组测序数据,使用 GDCRNAtools R 软件包进行差异基因

作者简介 陈赛鹏(1991-),男,硕士在读,研究方向:泌尿外科;通信作者:杨阔,E-mail:ykuoster@126.com。

分析,并取 fold change 为 2,FDR 为 0.05 作为筛选阈值,并将筛选的差异基因进行 KEGG 信号通路分析。

1.2 甲基化差异位点的筛选 在分析甲基化数据时,使用 ELMER R 软件包来进行甲基化差异位点分析。ELMER R 包参数设定

createMAE 函数:linearize.exp = TRUE

get.diff.meth 函数:minSubgroupFrac = 1, sig.dif = 0.2, cores=1, pvalue=0.05, mode="supervised"

GetNearGenes 函数:numFlankingGenes=20

get.pair 函数:minSubgroupFrac=1, raw.pvalue = 0.05, filter.probe=FALSE, cores=1, mode="supervised", Pe = 0.05

enriched.motif.hyper 函数:min.incidence = 10, lower.OR=1.1

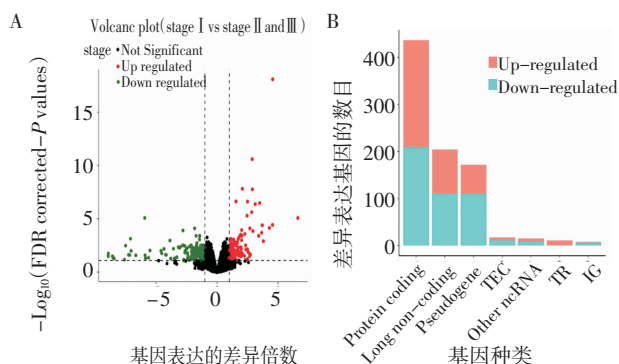
其他参数保持默认。对 TCGA 数据库中的 156 例精原细胞瘤标本的 450K 甲基化数据进行差异表达分析,每个芯片有 485 577 个甲基化检测位点,获取 II 期、III 期和 I 期的差异甲基化位点,然后将关联差异甲基化位点的前后 20 个基因作为可能受甲基化调控的基因。

1.3 差异甲基化位点的差异基因配对分析 将获得差异甲基化位点的关联基因与 II 期、III 期和 I 期的差异基因取交集,找出差异甲基化位点周围有显著表达差异的基因,并将基因表达量与甲基化位点的甲基化水平进行相关性分析。

1.4 差异基因的生存曲线分析 将差异甲基化位点-差异基因配对进行生存分析,寻找显著影响精原细胞瘤患者的生存情况的受甲基化调节的差异基因。

2 结果

2.1 通过差异基因分析,笔者找到了 864 个差异基因,其中上调基因有 410 个,下调基因有 456 个,差异表达火山图如图 1A 所示,差异基因类型的分布如图 1B 所示。



A.所有上调与下调的差异基因火山图;B.差异基因的类型分部

图 1 精原细胞瘤差异基因的筛选及分类

Fig 1 Screening and classification of differential genes in seminoma

2.2 将甲基化数据进行差异甲基化位点的分析,显示 II 期、III 期精原细胞瘤的平均甲基化水平高于 I 期,如图 2。笔者对 II 期、III 期精原细胞瘤与 I 期精原细胞瘤之间的差异甲基化位点进行了分析,显示 162 个在 II 期、III 期精原细胞瘤中甲基化水平升高的位点。

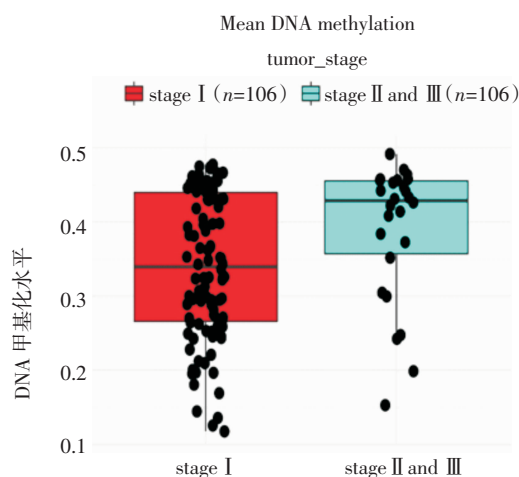


图 2 II 期 III 期和 I 期的差异甲基化水平分析

Fig 2 Analysis of differential methylation levels of stage II & III and stage I

2.3 将筛选出来的差异甲基化位点与前后最近的 20 个基因进行关联,并且将这些基因与差异表达基因取交集,找出表达水平受甲基化调节的基因,得到 22 个差异甲基化位点-差异表达基因配对。对配对的甲基化水平和基因表达水平进行了 Pearson 相关分析,最终得到了差异基因的表达与甲基化水平存在负相关的基因 KCNC1,具有较强的相关性,结果如图 3。

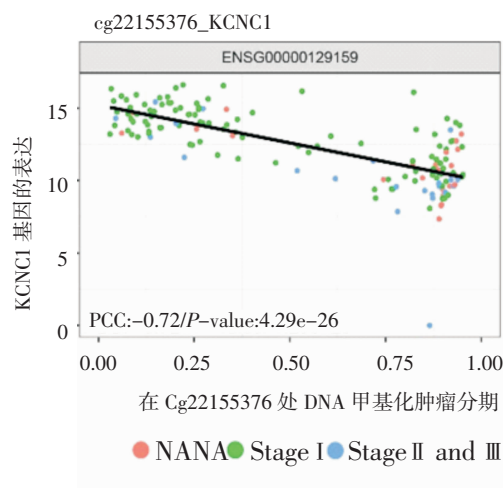
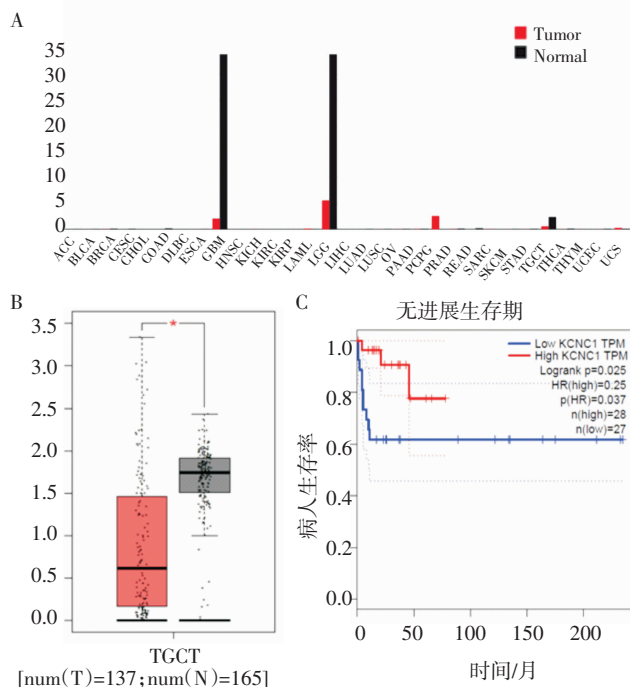


图 3 高甲基化与 KCNC1 表达的关系分析

Fig 3 Analysis of the relationship between hypermethylation and the expression of KCNC1

2.4 GEPIA 在线工具(<http://gepia.cancer-pku.cn>)对 22 个差异甲基化位点-差异表达基因配对的基因进行了生存分析,发现 KCNC1 对精原细胞瘤患者的生存期有显著影响,高甲基化与 KCNC1 的低表达相关,并且 KCNC1 的低表达与更差的预后有关。笔者比较了 KCNC1 在精原细胞瘤和正常睾丸组织之间的差异,结果显示精原细胞瘤中的 KCNC1 表达量较低,在正常睾丸组织以及 I 期和 II 期、III 期精原细胞瘤中的表达呈递减趋势,如图 4。



A.KCNC1 在所有的肿瘤样本和配对的正常组织的样本的基因表达谱;B.KCNC1 在精原细胞瘤组织和正常组织中的表达;C.KCNC1 在精原细胞瘤中的无进展生存期

图 4 KCNC1 在所有肿瘤和正常组织中的表达及在精原细胞瘤中的无进展生存期分析

Fig 4 Expressions of KCNC1 in all tumors and normal tissues and disease-free survival in seminoma

3 讨论

目前,对于精原细胞瘤的实验研究进展不是很完善,最近的全基因组关联研究 (GWAS) 发现 KITLG、SPRY4、T1、TERT、ATF7IP 与睾丸生殖细胞瘤的易感性相关^[7-12]。对于精原细胞瘤的基因组学的研究也在逐渐开展。

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰,在肿瘤的发生发展过程中起着至关重要的作用,然而不同基因中肿瘤特异性甲基化的改变被证明具有不同的生物学效应。一些研究表明,低甲基化通过激活不同肿瘤中的致癌基因而促进肿瘤的发生^[13]。也有证据表明,高甲基化可以抑制肿瘤抑癌基因的表达,从而促进肿瘤的进展。例如,在视网膜母细胞瘤

中高甲基化可以使肿瘤抑制基因 Rb 的表达相比无甲基化减少到 8%^[6,13]。

本文通过生物信息学技术,分析筛选了 TCGA 上传的精原细胞瘤患者的转录组测序数据,确定了 22 个差异基因在 II 期 III 期精原细胞瘤中表达随着甲基化的程度降低,因此考虑高甲基化在精原细胞瘤中通过抑制了这些基因的表达,进而促进了精原细胞瘤的进展。通过分析差异基因的生存曲线,发现高甲基化导致基因 KCNC1 低表达的精原细胞瘤患者生存期短,有统计学差异。随着精准医疗的推广,精原细胞瘤的治疗不仅仅局限于手术治疗,通过基因的靶向药物治疗,可以抑制精原细胞瘤的进展,从而改善患者的预后。

KCNC1 这个基因编码了一个完整膜蛋白家族,该家族可介导兴奋膜的电压依赖性钾离子渗透性^[14]。K⁺通道是质膜中种类最丰富的离子通道,广泛分布于包括癌细胞在内的各种细胞中。能与生化信号级联进行串扰,通过调节细胞内 K 浓度、产生膜电位、介导细胞体积变化、参与 Ca 信号传递、与膜受体和下游效应子在分子复合物内直接相互作用等方式,几乎调控所有细胞过程。在肿瘤细胞表现出 K 通道的异常表达和活性模式通常通过影响 Ca 激活的 IK 或者 BK 通道,进而驱动肿瘤细胞的肿瘤转化、恶性进展、转移或耐药^[15-16]。也有研究表明,K⁺通道在乳腺癌中影响肿瘤细胞增殖和细胞周期进展^[17]。K⁺通道在精原细胞瘤中缺乏研究,在精原细胞瘤中发挥的作用也不清楚,本文通过筛选得到 KCNC1 基因,高甲基化会降低 KCNC1 的表达并且促进了精原细胞瘤的进展。已有的研究表明 KCNC1 能介导兴奋膜的电压依赖性钾离子渗透性,促进 K⁺通道的激活,抑制精原细胞瘤的进展。

参考文献:

- [1] Gonzalez-Exposito R, Merino M, Aguayo C. Molecular biology of testicular germ cell tumors[J]. Clin Transl Oncol, 2016,18(6):550
- [2] Di Pietro A, Vries E G, Gietema J A, et al. Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours[J]. Int J Biochem Cell B, 2005, 37(12):2437
- [3] Richie J P. Re: Management of seminomatous testicular cancer: A binational prospective population-based study from the swedish norwegian testicular cancer study group[J]. J Urology, 2011, 186(6):2255
- [4] Chung P W, Gospodarowicz M K, Panzarella T J, et al. Stage II testicular seminoma: patterns of recurrence and outcome of treatment[J]. Eur Urol, 2004, 45(6):754
- [5] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. Gene Dev, 2002, 16(1):6

(下转第 470 页)

- Endocrinol Metab Clin North Am, 2013, 42(4): 747
- [4] 魏晓, 欧三桃. 综合防治, 延缓进展—2014 年版《中国糖尿病肾病防治专家共识》解读[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(1): 1
 - [5] 韩立坤, 李明举, 毛宇, 等. 糖尿病肾病大鼠铁超载对内皮功能及氧化应激的影响[J]. 中国老年学, 2017, 37(22): 5515
 - [6] 张学磊, 金明花, 王莹, 等. 糖尿病肾病患者血清瘦素水平变化与氧化应激的关系[J]. 中国医药导报, 2016, 13(16): 54
 - [7] 张冬燕, 刘保林, 刘康. 氧化应激与胰岛素抵抗分子机制之联系[J]. 海峡药学, 2012, 24(9): 1
 - [8] 姚志灵, 陈亮, 王志胜, 等. 老年冠心病病人不同糖代谢状态与氧化应激水平的相关性研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(19): 2273
 - [9] 凌厉, 陈立波, 劳国娟, 等. 雷公藤多苷对糖尿病大鼠肾小球足细胞病变的保护作用[J]. 中国慢性病预防与控制, 2016, 24(7): 489
 - [10] 高清. 雷公藤甲素对糖尿病肾病的疗效及其机制的研究[D]. 南京: 南京大学, 2010
 - [11] 王丹妮, 于蕊. 雷公藤甲素对糖尿病肾病大鼠肾组织 TNF- α 与 MCP-1 表达的影响[J]. 解剖科学进展, 2017 (1): 71
 - [12] 崔进, 陈晓, 苏佳灿. 雷公藤甲素药理作用研究新进展[J]. 中国中药杂志, 2017(14): 2655
 - [13] 林君容, 林兵, 宋洪涛. 雷公藤甲素与雷公藤红素的体内药动学研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(3): 528
 - [14] 吕佳璇, 李月红. 糖尿病肾病的研究进展[J]. 临床内科杂志, 2016, 33(5): 296
 - [15] 高清, 刘志红, 秦卫松, 等. 雷公藤甲素治疗 db/db 糖尿病小鼠的疗效观察[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2009, 18(6): 519
 - [16] 李柯桢, 栾健, 隋爱华, 等. 厄贝沙坦联合雷公藤甲素对 2 型糖尿病大鼠肾脏 ANGPTL2、VEGF 表达影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(11): 959
 - [17] 李焱. 氧化应激与胰岛素抵抗及其对策[J]. 实用糖尿病杂志, 2007, 3(3): 6
 - [18] 殷松楼, 周冬梅, 奚钰, 等. 2 型糖尿病患者氧化应激指标的变化[J]. 徐州医科大学学报, 2010, 30(1): 63
 - [19] 程雯, 王华, 陈淑雯, 等. 2 型糖尿病患者同型半胱氨酸水平与糖尿病肾病、胰岛素抵抗及糖脂代谢的关系探讨[J]. 上海预防医学, 2016, 28(2): 125
 - [20] 操轩, 胡亚琳, 陈健. 早期糖尿病肾病与胰岛素抵抗及微炎症状态之间关系的研究[J]. 临床内科杂志, 2016, 33(1): 28
 - [21] Kashiwara N, Haruna Y, Kondeti V K, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(34): 4256
 - [22] Jha J C, Ho F, Dan C, et al. A causal Link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes[J]. Clin Sci, 2018, 132(16): 1811
 - [23] Malekiyan R, Abdanipour A, Sohrabi D, et al. Antioxidant and neuroprotective effects of lycopene and insulin in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Biomed Rep, 2019, 10(1): 47
 - [24] Neelofar K, Arif Z, Arafat M Y, et al. A study on correlation between oxidative stress parameters and inflammatory markers in type 2 diabetic patients with kidney dysfunction in North Indian population [Z]. 2018
 - [25] 夏莉莉, 汤瑜斌, 邵侃. 前列地尔对糖尿病肾病患者血液流变学、免疫功能及 MDA、SOD、ROS 的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(14): 1528
 - [26] 唐莉. DBDCT 致肝毒性的蛋白质组学及 Trx1 介导的氧化应激机制研究[D]. 山西医科大学, 2013
 - [27] Ji D, Li M, Zhan T, et al. Prognostic role of serum AZGP1, PEDF and PRDX2 in colorectal cancer patients[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6): 1265
 - [28] Zhou S L, Han Q L, Wang R, et al. PRDX2 protects hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells from oxidative stress[J]. Oncol Lett, 2016, 12(3): 2217
 - [29] 卢伟东. Prdx2 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控结肠癌细胞生长的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014
 - [30] Xu J, Zhang S R, Wang R, et al. Knockdown of PRDX2 sensitizes colon cancer cells to 5-FU by suppressing the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Biosci Rep, 2017, 37 (3): pii: BSR20160447. doi: 10.1042/BSR20160447

(2019-01-02 收稿)

(上接第 465 页)

- [6] Costello J F, Plass C. Methylation matters[J]. J Med Genet, 2001, 38(5): 285
- [7] Rapley E A, Turnbull C, Al Olama A A, et al. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor[J]. Nat Genet, 2009, 41(7): 807
- [8] Kanetsky P A, Mitra N, Vardhanabhuti S, et al. A second independent locus within DMRT1 is associated with testicular germ cell tumor susceptibility[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(15): 3109
- [9] Kratz C P, Greene M H, Bratslavsky G, et al. A stratified genetic risk assessment for testicular cancer[J]. Int J Androl, 2011, 34(4 Pt 2): e98
- [10] Kanetsky P A, Mitra N, Vardhanabhuti S, et al. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer[J]. Nat Genet, 2009, 41(7): 811
- [11] Karlsson R, Andreassen K E, Kristiansen W, et al. Investigation of six testicular germ cell tumor susceptibility genes suggests a parent-of-origin effect in SPRY4[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(16): 3373
- [12] Ruark E, Seal S, McDonald H, et al. Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14[J]. Nat Genet, 2013, 45(6): 686
- [13] Akhavan-Niaki H, Samadani A A. DNA methylation and cancer development: molecular mechanism[J]. Cell Biochem Bioph, 2013, 67(2): 501
- [14] Perney T M, Marshall J, Martin K A, et al. Expression of the mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain[J]. J Neurophysiol, 1992, 68(3): 756
- [15] Stegen B, Klumpp L, Misovic M E, et al. K (+) channel signaling in irradiated tumor cells[J]. Eur Biophys J Bioph, 2016, 45(7): 585
- [16] Edalat L, Stegen B, Klumpp L, et al. BK K+ channel blockade inhibits radiation-induced migration/brain infiltration of glioblastoma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(12): 14259
- [17] Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A. K+ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis[J]. J Membrane Biol, 2008, 221(1): 1

(2018-12-04 收稿)