

文章编号 1006-8147(2018)06-0501-04

论著

乳腺癌他莫昔芬耐药相关基因及通路的筛选

柴慈曼, 杨绍时

(天津医科大学第二医院甲状腺乳腺外科, 天津 300211)

摘要 目的:利用美国国家生物技术信息中心基因表达数据库中雌激素受体阳性乳腺癌表达谱芯片进行生物信息学分析,筛选他莫昔芬耐药的关键基因和信号通路。方法:利用基因芯片 GSE26459, R 软件分析得到差异基因, DAVID 进行 Gene Ontology 和 KEGG 富集分析, STRING 绘制蛋白作用网络。GSEA 富集分析得到耐药相关通路及基因。结合蛋白作用网络筛选目标基因并验证。结果:筛选出差异基因 1 516 个, 上调基因 505 个, 下调基因 624 个。通路富集分析发现脂肪酸代谢通路、细胞粘附、胰岛素抵抗等信号通路在乳腺癌的他莫昔芬耐药中起重要作用, 并在富集通路中筛选出 ACSL1 等候选目标基因并验证。结论:利用生物信息学有效分析他莫昔芬耐药的基因芯片数据, 为他莫昔芬耐药的治疗靶点提供重要依据。

关键词 他莫昔芬耐药; 乳腺癌; 生物信息学

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Identification of keygenes and pathwaysoftamoxifen-resistancein breast cancer

CHAI Ci-man, YANG Shao-shi

(Department of Thyroid and Breast Surgery, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To screen and explore the candidate genes and the molecular signaling pathwaysoftamoxifen resistance in ER-positive breast cancerbased on the Gene Expression Omnibus (GEO). **Methods:** Differentially expressed genes (DEGs) were identified in tamoxifen-sensitive samples and were compared with tamoxifen-resistance samples based on the microarray GSE26459usingthe R software,and then were subjected togene ontology enrichment analysisand pathway enrichment analysis by DAVID database. In addition, we analyzed the protein protein interaction (PPI) network of DEGs with Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) database. Western-blot verified the expression of the candidate gene. **Results:** There were 1 516 DEGs between in tamoxifen-sensitive and resistance breast cancer, which contained 505up-regulated and 624 down-regulated genes. GO categories andKEGG analysis showed DEGs were mainly enriched inFatty acid metabolism,cell adhesion, and insulin resistance pathways. ACSL1 might be the key gene in the enriched pathways. **Conclusion:** The study may provide some basis of for treatment of tamoxifen-resistance breast cancerby bioinformatics analysis.

Key words tamoxifenresistance; breast neoplasms; bioinformatics

根据《2015 年中国肿瘤登记年报》,乳腺癌在我国女性恶性肿瘤中高居榜首,占女性癌症总人数的 15%,且发病率逐年递增,2015 年我国新发乳腺癌 27.24 万人,死亡 7.07 万人^[1]。根据乳腺癌分子分型,约 70%是雌激素受体(ER)和或孕激素受体(PR)阳性型,肿瘤生长具有雌激素依赖性^[2]。对于这类患者,阻断雌激素相关通路的内分泌治疗是经济、有效、低毒性的治疗方法,也是目前国内外乳腺癌诊治指南中的标准治疗方案,临床上他莫昔芬作为乳腺癌内分泌治疗的经典药物,在治疗过程中常发生耐药现象,约 40%的 ER 阳性乳腺癌患者初始治疗即对他莫昔芬不敏感(即原发性耐药),另有约 25%的患者初始治疗有效,长期用药后出现耐药(即获得性耐药)^[3]。目前对于他莫昔芬治疗出现耐药而发

生复发转移的病人并没有针对性的治疗方法。虽然对此问题的研究逐年增多^[4-5],但目前仍然缺乏确切有效的治疗靶点。本研究利用 Gene Expression Omnibus (GEO) 公共数据库提取 ER 阳性乳腺癌 mRNA 表达谱芯片测序数据,应用生物信息学方法,筛选 ER 阳性型乳腺癌患者群体中出现他莫昔芬耐药的关键分子和信号通路,从而深入了解乳腺癌他莫昔芬耐药的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 从 NCBI 的基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)下载获取乳腺癌他莫昔芬敏感和耐药细胞系的 mRNA 表达谱芯片,芯片号 GSE26459,提交者为 Gonzalez-Malerva L 等。mRNA 表达谱数据来源于 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 实验平台,平台号 GPL570,包含和 24 个样本(12 个 MCF7 和 12 个 MCF7TAM),样本号为 GSM649484~GSM649507,样本分 4 组处理:(1)去雌

基金项目 天津医科大学第二医院青年基金项目资助(2017ydey05)
作者简介 柴慈曼(1985-),女,医师,博士在读,研究方向:乳腺癌内分泌耐药机制;通信作者:杨绍时, E-mail: chaiciman@vip.sina.com。

激素血清(对照组);(2)雌激素(9~10 mol/L);(3)他莫昔芬(1 μ mol/L);(4)雌激素+他莫昔芬同时处理。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 数据处理与差异表达基因分析 从 GEO 数据库中选取生物芯片 GSE26459 下载的 mRNA 表达谱芯片数据集导入到 R 3.4.3 软件 (<https://cran.r-project.org/>), 其中 bioconductor 具有强大的生物信息分析处理功能。基于 clusterProfiler 中的 raw 实现数据标准化, 利用 limma 筛选出两组差异表达基因。选择他莫昔芬耐药细胞系 MCF7TAM 与他莫昔芬敏感细胞系 MCF7 两组进行 *t* 检验, 以 P -value<0.05 并且 FDR<0.1 并且 Fold Change>2 为标准, 筛选他莫昔芬耐药细胞系 MCF7TAM 与他莫昔芬敏感细胞系 MCF7 的 mRNA 差异表达, 利用 R 软件中的 ggplot2 绘制热图。

1.2.2 差异基因的 Gene Ontology(GO)富集和 KEGG 通路富集分析 利用基因功能注释分析工具 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 版本 6.8 对差异基因中显著上调和下调的基因进行 Gene Ontology 富集分析和 KEGG 通路富集分析 (筛选标准: P <0.01), 发现与 ER 阳性乳腺癌细胞系中他莫昔芬耐药潜在的显著相关生物学过程。

1.2.3 差异基因的相互作用网络分析 利用 STRING(<http://string-db.org/>) 版本 10.5, 将获得的差异基因进行蛋白相互作用网络分析。获得中心节点蛋白, 及其与其他蛋白的相互作用关系。

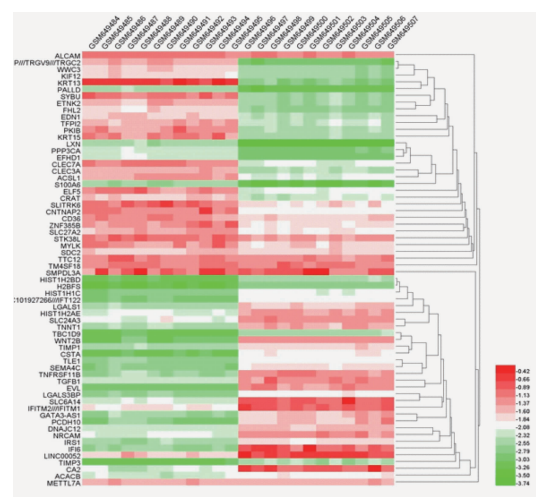
1.2.4 GSEA 富集分析 利用 GSEA 软件(Gene set enrichment analysis, 网址 <http://gsea.org/>) 版本 3.0, 利用已筛选出的差异基因集, 将差异基因按照在两类样本(他莫昔芬耐药细胞系和他莫昔芬敏感细胞系)中的差异表达程度排序, 然后检验预先设定的基因集合是否在这个排序表的顶端或者底端富集, number of permutations=1 000。

1.2.5 验证候选目标分子-ACSL1 结合乳腺癌内分泌耐药中关键机制及相关分子筛选出候选目标分子-ACSL1。Western-blotting 验证 ER 阳性乳腺癌他莫昔芬耐药细胞中 ACSL1 的表达变化情况。同时

结合 CCLE 数据库(<https://portals.broadinstitute.org/ccle>) 在 RNA-seq 芯片中验证 ACSL1 的组织表达情况, 在 GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 验证 ACSL1 组织表达情况, 同时分析乳腺癌患者中 ACSL1 高表达组和低表达组的生存差异。

2 结果

2.1 数据处理与差异表达基因 分析数据标准化后, 对筛选出来的差异基因进行聚类分析绘制热图, 见图 1。



纵轴显示差异表达基因名称, 横轴为样本名称, 其中 GSM649484~495 为他莫昔芬敏感的 MCF7 细胞系样本, GSM649496~507 为他莫昔芬耐药的 MCF7TAM 细胞系样本, 颜色越深表达升高或者降低的程度越大

图1 他莫昔芬耐药细胞系 MCF7TAM 与敏感细胞系 MCF7 对照共差异基因热图

Fig 1 Heat map of DEGs expression in tamoxifen-resistance group and tamoxifen-sensitive group

2.2 Gene Ontology 富集分析结果和 KEGG 通路富集结果 GO 富集分析结果显示分子功能富集到辅酶A 连接酶的活性、细胞骨架蛋白连接、蛋白酶连接等功能结构域(表1)。KEGG 通路富集到 PPAR 信号通路、细胞粘附因子、脂肪酸代谢信号通路、胰岛素抵抗通路、AMPK 信号通路、FoxO 信号通路等信号通路(表2)。

2.3 差异基因的蛋白-蛋白作用网络 蛋白-蛋白作用网络结果分析显示, 整个网络以 ACSL1、ACACB、

表1 Gene Ontology 富集分析结果(分子功能)

Tab 1 GO categories of DEGs(Molecular Function)

表达	描述	数目	比例	P
上调	GO:0102391~癸酸盐-辅酶 A 连接酶的活性	2	0.039 0	0.016 5
	GO:0008092~细胞骨架蛋白连接	6	0.113 9	0.026 0
	GO:0004467~长链脂肪酸辅酶 A 连接酶的活性	2	0.038 0	0.026 7
下调	GO:0002020~蛋白酶连接	3	0.089 9	0.014 7
	GO:0008191~金属内切蛋白酶抑制剂活性	2	0.059 9	0.024 4
	GO:0004866~肽链内切酶抑制剂活性	3	0.089 9	0.027 2

表2 KEGG 通路富集结果(前12条)

Tab 2 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis

表达	描述	P	FDR
上调	PPAR 信号通路	0.000 5	0.096 8
	过氧化物酶体	0.000 6	0.096 8
	细胞粘附因子	0.002 8	0.282 9
	脂肪酸代谢通路	0.010 3	0.621 8
	胰岛素抵抗通路	0.024 5	1.000 0
	脂肪酸生物合成	0.029 1	1.000 0
下调	蛋白聚糖	0.005 6	0.703 5
	脂肪因子代谢通路	0.007 6	0.703 5
	胰岛素抵抗	0.018 2	0.703 5
	AMPK 信号通路	0.022 5	0.703 5
	FoxO 信号通路	0.025 0	0.703 5
	脂肪酸生物合成	0.025 0	0.703 5

IRS1、TGFB1、COLOA1、CD36、EDN1、TIMP1、TIMP3、LGALS3BP、HIST1H4J、HIST1H2BK、HIST1H2AE、HIST1H2BH、DNAJC12、SLC30A4 等蛋白在蛋白作用网络中心位置,是蛋白作用网络的关键节点(图2)。

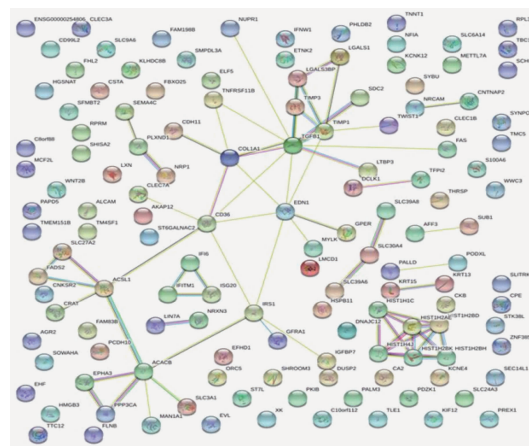


图2 差异基因对应蛋白相互作用网络分析

Fig 2 Protein-protein interaction network

2.4 GSEA 富集结果 GSEA 富集分析得到了差异基因富集的通路,其中以脂肪酸代谢通路为代表,ES 值为正数,提示基因富集在他莫昔芬耐药组。在脂肪酸代谢通路中富集的差异基因,其中 ACSL1 基因在他莫昔芬耐药组比在敏感组中显著高表达且差异最显著(图3)。

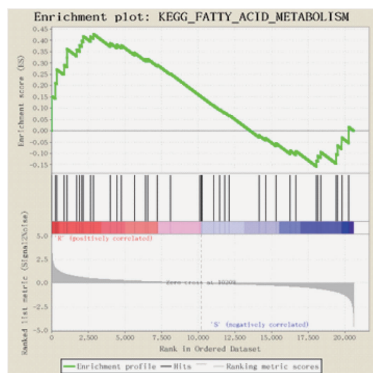


图3 GSEA 富集分析部分结果-脂肪酸代谢通路

Fig 3 Gene Set Enrichment Analysis(GSEA) report □ Fatty acid metabolism

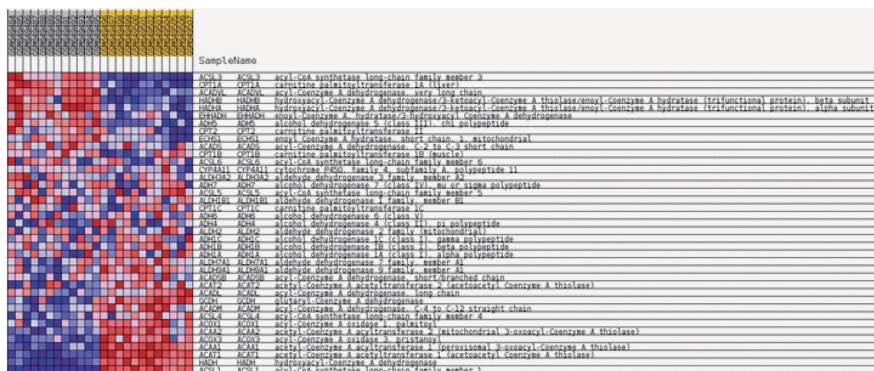


图4 WB 验证耐药细胞系中 ACSL1 表达变化

Fig 4 Western-blotting shows the differences of ACSL1 expression

GSM649484~GSM649495 为他莫昔芬敏感细胞系 MCF7, GSM649496~GSM649507 为他莫昔芬耐药细胞系 MCF7TAM, 通路富集结果为耐药组 vs 敏感组

2.5 验证候选目标分子-ACSL1

2.5.1 western-blotting 实验验证 ACSL1 表达 WB 实验结果显示 ACSL1 在通过 MCF7 诱导的他莫昔芬耐药细胞系(MCF7TAM)中 ACSL1 蛋白表达显著高于他莫昔芬敏感的(MCF7)细胞系(图4)。

2.5.2 数据库验证 ACSL1 组织表达差异和生存差异 在 CCLE 数据库和 GEPIA 数据库中查找 ACSL1 在不同组织中表达情况得到了相似的结果, ACSL1 在脂肪组织和乳腺组织中均有较高表达。

GEPIA 数据库分析乳腺癌患者中 ACSL1 高表达组和低表达组的生存曲线(图5)。发现高表达 ACSL1 的患者总生存时间有低于 ACSL1 低表达组的趋势。ACSL1 在他莫昔芬耐药中表达量显著变化,提示其可能是他莫昔芬耐药过程中的重要分子。

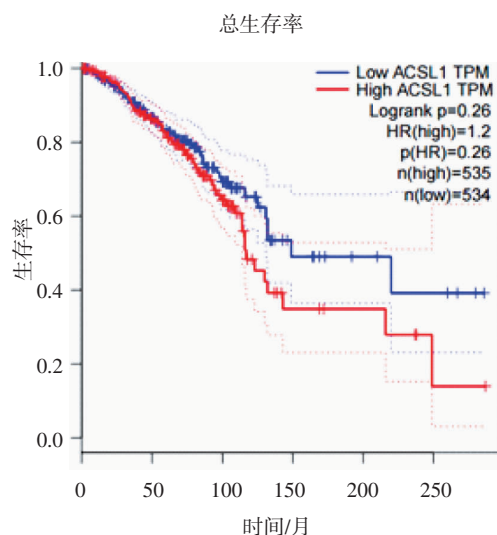


图 5 GEPIA 数据库中 ACSL1 不同表达量情况下的总生存差异

Fig 5 Over survival with different expression quantities of ACSL1 in GEPIA database

3 讨论

本研究经过乳腺癌他莫昔芬耐药相关基因及通路的筛选分析发现,差异基因中在脂肪酸代谢相关的生物学过程中显著富集。这提示耐药机制中与脂肪酸代谢相关的分子信号通路和生物学过程发生了改变,从而引起耐药的发生和 ER 阳性乳腺癌的进展。近年来研究发现肥胖与乳腺癌发生及侵袭转移有很高的相关性^[6],而这一通路中涉及胰岛素抵抗、脂肪酸代谢、糖异生等代谢相关的生物学改变^[7],本研究的分析结果高度提示这些信号通路在他莫昔芬耐药的过程中也扮演了重要的角色。

本研究筛选出他莫昔芬耐药乳腺癌中的候选关键基因,也是脂肪酸代谢信号通路中的关键分子 ACSL1。ACSL1 属于长链脂肪酸连接酶 A 家族的同工酶,这个家族的所有同功酶促进游离长链脂肪酸转化为脂肪酰酯,从而在脂质合成和脂肪酸降解中发挥关键作用。ACSL 有 4 种类型,包括 ACSL1、ACSL2、ACSL3、ACSL4,其中在转移性乳腺癌中 ACSL1 表达情况 ER 阳性型显著低于其他类型^[8],但是在耐药细胞系中 ACSL1 却明显异常高表达,提示 ACSL1 与他莫昔芬耐药相关。本研究进一步对 ACSL1 进行了实验和数据库的双重验证,显示 ACSL1 在 ER 阳性乳腺癌内分泌治疗耐药过程中是候选关键基因,ACSL1 表达上调参与诱导内分泌耐药发生,降低患者生存率和生存时间。

本研究富集到了脂肪酸代谢、细胞粘附因子、胰岛素抵抗等他莫昔芬耐药相关分子信号通路。(1)脂肪酸代谢通路可能在他莫昔芬耐药机制中起了关键作用。脂肪酸代谢是细胞生命活动中的重要

一环,对于癌细胞生存来说尤为重要,不停生长的癌细胞需要大量脂肪酸来组成它的磷脂膜以及提供能量。脂肪代谢参与肿瘤调控,可能的作用机制最近有新的研究报道,脂肪细胞中的 P62 蛋白失活会抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,从而促进前列腺肿瘤细胞关闭脂肪组织耗能过程,使得肿瘤细胞吸收脂肪酸和其他能量,加快肿瘤生长和转移^[9]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂已经被应用在很多癌症的治疗上^[10],为新的肿瘤治疗靶点提供了理论依据。脂肪酸代谢途径中关键酶-脂肪酸合成酶(Fatty AcidSyntheses,FAS)在乳腺癌细胞比正常乳腺细胞显著高表达,而 FAS 拮抗剂则可以抑制肿瘤细胞的生长,同时 FAS 被认为是乳腺癌复发的可靠预测指标^[11-12]。脂肪酸代谢过程受到固醇调节元件结合蛋白(SREBP)调节,它在受到生长因子包括胰岛素、表皮生长因子等刺激后,激活 FAS、ACSL 等脂质合成的靶基因,促进内源脂质的合成,而内源脂质是肿瘤细胞主要脂质来源,从而促进肿瘤生长^[13],也有学者提出生长因子通过 Akt-SREBP-FAS 信号途径调节脂质代谢^[14]。耐药过程中很可能发生了脂肪酸代谢通路中关键基因的改变,脂肪酸代谢通路被异常激活,促进了乳腺癌细胞增殖或迁移。但该机制尚待进一步验证。另一个可能的机制是脂肪因子通过激活 FoxO 信号通路参与内分泌耐药。已有的研究证实 PI3K-AKT-FoxO 信号轴是一个雌激素非依赖性乳腺癌进展的关键因素。PI3K-AKT 途径的激活,导致 FoxO 肿瘤抑制功能下调,驱动乳腺癌的增殖^[15]。(2)胰岛素抵抗途径通过调控了 AMPK 信号通路,激活 PI3K 信号通路,激活 c-Jun NH2,从而参与乳腺癌的进展^[16]。(3)细胞粘附因子通路与已经发表的实验结论相符,实验证实雌激素抵抗的乳腺癌的内分泌耐药机制中细胞粘附通路起到重要作用,其中 c-src 激酶是一个重要节点^[17],非雌激素依赖的乳腺癌中细胞粘附分子如 E-钙粘蛋白表达下调,在细胞间粘附不强的乳腺癌细胞中,src 激酶过度活化可以激活多种信号途径,促进乳腺癌细胞的增殖。

本研究利用生物信息学有效分析他莫昔芬耐药乳腺癌的基因芯片数据,获取他莫昔芬耐药机制的关键信息,为筛选重要的分子标志物提供依据。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115
- [2] Turner N C, Neven P, Loibl S, et al. Advances in the treatment of advanced oestrogen-receptor-positive breast cancer[J]. Lancet, 2017, 389(187):2403

(下转第 512 页)

路的患者会越来越多,那么延长 CVC 的使用寿命就显得尤为重要。我们可以通过改善患者营养状态、控制患者血糖水平,避免导管感染,使用生物相容性较好的透析器可以降低患者微炎症状态,从而增加 CVC 的使用寿命。间断尿激酶封管也是一个可行的选择。本研究是基于单中心的数据得出的初步结论,尚需多中心大样本的前瞻性研究进一步证实。

参考文献:

- [1] NKF-KDOQI Vascular Access Work Group. Clinical practice guidelines for vascular access[J]. Am J Kidney Dis, 2006, 48 (Suppl 1): S248
- [2] Valliant A M, Chaudhry M K, Yevzlin A S, et al. Tunneled Dialysis Catheter Exchange with Fibrin Sheath Disruption is not Associated with Increased Rate of Bacteremia[J]. J Vasc Access, 2015, 16(1): 52
- [3] Allon M, Brouwer-Maier D J, Abreo K A, et al. Recommended clinical trial end points for dialysis catheters[J]. Clin J Amer Soc Nephrol, 2018, 13(3):495
- [4] 王博,姜埃利,王立华,等.中心静脉导管作为透析通路的使用情况及其影响因素[J].天津医药,2013,41(10):1002
- [5] Hemmelgarn B R, Moist L M, Lok C E, et al. Prevention of dialysis catheter malfunction with recombinant tissue plasminogen activator[J]. N Engl J Med, 2011, 364(4):303
- [6] 朱虹.长期中心静脉导管功能不良的影响因素及处理[D].大连:大连医科大学,2017
- [7] 王博,王立华,张瑞宁,等.血液透析长期中心静脉导管留置功能不良的影响因素分析[J].临床荟萃,2013,28(11):1216
- [8] Shi M, Cui T L, Ma L, et al. Catheter failure and mortality in hemodialysis patients with tunneled cuffed venous catheters in a single center[J]. Blood Purif, 2017, 43(4):321
- [9] 张晓娟,郭华,张沙丽.经皮下隧道留置的带涤纶套血液透析用长期导管使用的影响因素分析[J].中国血液净化,2014,13(1):41
- [10] 邱创业.颈内留置带涤纶套透析管功能不良发生率及其影响因素[D].广州:暨南大学,2016
- [11] Chan M R. Hemodialysis central venous catheter dysfunction[J]. Semin Dial, 2008, 21(6):516
- [12] 刘雪彬,刘奕深,林钊,等.带涤纶套中心静脉长期导管在 MHD 患者中的生存情况及其危险因素分析[J].临床医学工程,2017, 24(10):1465
- [13] 杜渊,杜浩昌,李春庆,等.带涤纶套中心静脉长期导管在血液透析患者中的生存状况及影响因素分析[J].中国现代医学杂志,2011, 21(27):3400

(2018-04-26 收稿)

(上接第 504 页)

- [3] Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: Atlas, a randomised trial[J]. Lancet, 2013, 381(9869):805
- [4] Zhang Y J, Leonard M, Shu Y, et al. Overcoming tamoxifen resistance of human breast cancer by targeted gene silencing using multifunctional pRNA nanoparticles[J]. ACS Nano, 2017, 11(1):335
- [5] Johnston S R. Enhancing endocrine therapy for hormone Receptor-Positive advanced breast cancer: cotargeting signaling pathways[J]. J Natl Cancer Inst, 2015, 107(10):djv212
- [6] Neuhaus M L, Aragaki A K, Prentice R L, et al. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(5):611
- [7] Rose D P, Kominou D, Stephenson G O. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer[J]. Obes Rev, 2004, 5(3):153
- [8] Yen M C, Kan J Y, Hsieh C J, et al. Association of long-chain acyl-coenzyme A synthetase 5 expression in human breast cancer by estrogen receptor status and its clinical significance[J]. Oncol Rep, 2017, 37(6):3253
- [9] Huang J F, Duran A, Reina-Campos M A, et al. Adipocyte p62/SQSTM1 suppresses tumorigenesis through opposite regulations of metabolism in adipose tissue and tumor[J]. Cancer Cell, 2018, 33(4): 770
- [10] Steelman L S, Martelli A M, Cocco L, et al. The therapeutic potential of mTOR inhibitors in breast cancer[J]. Br J Clin Pharmacol, 2016, 82(5):1189
- [11] Porta R, Blancafort A, Casoliva G, et al. Fatty acid synthase expression is strongly related to menopause in early-stage breast cancer patients[J]. Menopause, 2014, 21(2):188
- [12] Yang Y J, Kim K M, An J H, et al. Clinical significance of fatty liver disease induced by tamoxifen and toremifene in breast cancer patients[J]. Breast, 2016, 28(4):67
- [13] Bao J S, Zhu L P, Zhu Q, et al. SREBP-1 is an Independent prognostic marker and promotes invasion and migration in breast cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 12(4):2409
- [14] Liu W, Furuta E, Shindo K, et al. Calalol, a natural sesquiterpene, induces apoptosis in breast cancer cells by modulating Akt-SREBP-FAS signaling pathway[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 128(1):57
- [15] Bullock M. FOXO factors and breast cancer: outfoxing endocrine resistance[J]. Endocr Relat Cancer, 2016, 23(2):R113
- [16] Lewis-Wambi J S, Jordan V C. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit[J]. Breast Cancer Research, 2009, 11(3):206
- [17] Guest S K, Ribas R, Pancholi S, et al. Src is a potential therapeutic target in Endocrine-Resistant breast cancer exhibiting low estrogen Receptor-Mediated transactivation[J]. PLoS One, 2016, 11(6):e0157397

(2018-04-17 收稿)