

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.032

肝癌患者外周血环状 RNAs 诊断价值分析*

郭长春¹, 朱鹏², 李凤艳², 曾启昂^{2△}

广东省深圳市坪山区人民医院:1. 麻醉科;2. 中心实验室, 广东深圳 518118

摘要:目的 探讨原发性肝癌(PLC)患者外周血中环状 RNAs(circRNAs)作为 PLC 分子标志物的临床诊断价值。方法 利用 circRNAs 微阵列芯片技术检测 4 例 PLC 患者(PLC 组)和 4 例健康对照者(对照组)外周血 circRNAs 的表达谱,并进行组间差异分析,基因本体/基因功能(GO/KEGG)分析差异表达的 circRNAs 明显富集的潜在功能和信号通路。结果 与对照组比较,PLC 组中共有 26 种 circRNAs 具有差异表达,包括上调的 14 种 circRNAs 和下调的 12 种 circRNAs,亲本基因为: NFATC3、UBQLN1、SKA3、OAT、DENND4A、MGEA5、N4BP2L2、MKLN1、RANBP9、PICALM、SPECC1、LRP5、FAM64A、RPS8、FLI1、PCNXL2、RPL13、LINC00340、KIF26B、WBSR17、NUP214、GPI、GRB10。GO/KEGG 分析发现,亲本基因多涉及转录因子活性、RNA 转运 RT 及通过内质网蛋白质加工、泛素介导的蛋白质水解和参与 cGMP-PKG 信号通路等功能。结论 PLC 患者外周血存在明显差异表达的 circRNAs,其亲本基因可能参与 PLC 复杂的发病机制。

关键词:原发性肝癌; 环状 RNAs; 微阵列芯片; 差异表达**中图分类号:**R735.7**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2021)10-1459-04

环状 RNAs(circRNAs)是一种内源性非编码 RNA,不含蛋白质编码基因,在体内同时调节多个基因,具有结构稳定性、高序列保守性、丰度和特异性表达等特点^[1]。有研究发现,circRNAs 与癌症、系统性红斑狼疮和炎症感染等疾病有关^[2]。circRNAs 能够抑制 miRNA 的表达,从而起到 miRNA 海绵的作用,以此来减弱 miRNA 调控 mRNA 的功能^[3]。ZHAO 等^[4]研究发现,circFADS2 通过调节 miR-498 的表达促进肺癌的发展,而 circFADS2 的高表达与非小细胞肺癌(NSCLC)的 TNM 分期、淋巴结转移、分化差、总生存期短有关。最近有报道显示,circRNAs 还调节或降解 RNA 结合蛋白,并影响 RNA 表达的翻译^[5],如 ZHANG 等^[6]发现,ankyrin 重复结构域 52 在细胞核中丰富源于基因内含子,能积极调节 RNA 聚合酶 II。因此,circRNAs 参与了生物的发生、发展和疾病过程,有望成为一类新的临床生物标志物。原发性肝癌(PLC)是最常见的五大癌症之一,全球每年大约有 841 000 例新发病例和 782 000 例死亡病例,其中大约一半发生在中国^[7-8]。PLC 的发展和形成机制非常复杂,早期临床症状不明显,大多数患者就诊时已为中晚期,失去了最佳治疗时机。有研究显示,circRNAs 可作为肝癌早期诊断和预后评估的新型生物标志物^[9-10],PLC 患者外周血中 circRNAs 的分布如何改变,以及它们是否可用于 PLC 的诊断或预后评估尚不清楚。因此,本研究通过微阵列芯片技术鉴定 PLC 患者外周血中 circRNAs 表达谱的差异,结合生物信

息学分析,发现其可作为 PLC 诊断或预后评估的潜在生物标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取深圳市某三甲医院 4 例 PLC 患者(PLC 组)和 4 例健康对照者(对照组)外周血。本研究经本院伦理委员会审查批准,所有受试者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 总 RNA 提取试剂 TRIzol 和用于去除线性 RNA 的 Rnase R,以及 circRNAs 芯片的选择、探针设计及数据分析等均由上海康成生物公司提供。

1.3 方法 总 RNA 提取:分别将 PLC 组和对照组 4 例受试者外周血标本混合(每份标本 0.5 mL),应用抽提试剂 TRIzol 按照试剂说明分别从两组标本中提取总 RNA。使用 NanoDrop ND-1000 进行 RNA 纯度和浓度测定,同时应用标准变性凝胶电泳对 RNA 完整性和纯度进行评估;RNA 标记:使用 Rnase R 试剂处理 RNA,富集 circRNAs,然后采用 Arraystar Super RNA Labeling 转录和扩增 circRNAs 成荧光标记的 circRNAs;芯片杂交:将上述所得 circRNAs 纯化后在 circRNAs 芯片上杂交,并在 Agilent 杂交炉上以 65 °C 孵育 17 h;芯片扫描:杂交后的芯片进行洗片,最后用 Agilent ScannerG2505C 进行扫描。

1.4 统计学处理 将芯片扫描得到的微阵列图片导入 Agilent Feature Extraction 软件提取原始数据,应用 R 软件包对原始数据进行归一化处理,两组标本间

* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(JCYJ20170307153704628);广东省深圳市坪山区卫生系统科研项目(201714)。

△ 通信作者,E-mail:504784599@qq.com。

本文引用格式:郭长春,朱鹏,李凤艳,等.肝癌患者外周血环状 RNAs 诊断价值分析[J].检验医学与临床,2021,18(10):1459-1462.

差异表达的 circRNAs 通过差异表达 (fold change) 值进行筛选。

2 结果

2.1 差异表达的 circRNAs 相对于对照组, PLC 组共有 26 种 circRNAs 具有 fold change, 其绝对值 ≥ 4.0 , 其中 14 种表达上调, 12 种表达下调, 见表 1。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 circRNAs 的基因本体(GO)分析 PLC 组 fold change 的 26 种 circRNAs 中上调的 14 种 circRNAs 的亲本基因包括: NFATC3、UBQLN1、SKA3、OAT、DENND4A、MGEA5、N4BP2L2、MKLN1、RANBP9、PICALM、SPECC1; 下调的 12 种 circRNAs 的亲本基因包括: LRP5、FAM64A、RPS8、FLI1、PCNXL2、RPL13、LINC00340、KIF26B、WBSCR17、NUP214、GPI、GRB10。将分析得到的明显 fold change 的 circRNAs 的亲本基因从细胞组件、分子功能和生物学进程 3 个方面进行 GO 功能注释。选择富集程度较明显的前 10 位, 较为明显的生物过程为有丝分裂纺锤体组织、核仁输出核糖体小亚单位及细胞质分裂的调节, 较为明显的细胞功能为核质, 较为明显的分子功能为组蛋白丝氨酸激酶活性和转录因子活性。见图 1。

2.2.2 基因功能(KEGG) pathway 分析 进一步对有明显差异的 circRNAs 的亲本基因与 KEGG 数据库进行 pathway 注释, 得到差异基因参与的富集 pathway term, 较为明显的离子通路为 RNA 转运及内质网中蛋白质的加工, 特别是在大肠癌和胰腺癌中, 见图 2。

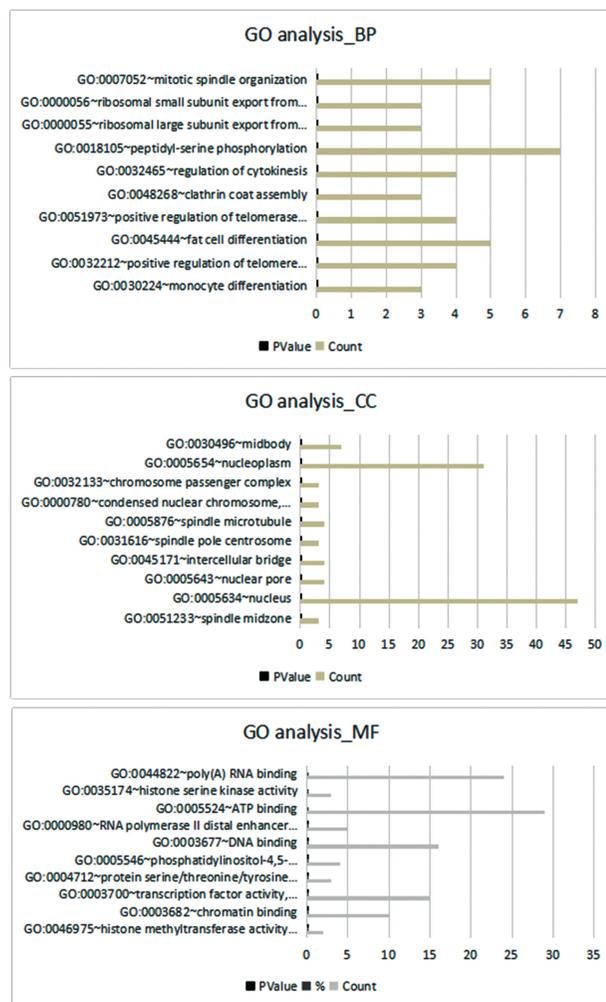


图 1 fold change 的 circRNAs GO 富集分析

表 1 表达差异 log 值 ≥ 2.0 的 circRNAs

| 编号 | circRNAs | log fold change | Regulation | chrom | GeneSymbol |
|----|--------------------|-----------------|------------|-------|------------|
| 1 | hsa_circRNA_101837 | 2.0254333 | 上调 | chr16 | NFATC3 |
| 2 | hsa_circRNA_104808 | 2.0381683 | 上调 | chr9 | UBQLN1 |
| 3 | hsa_circRNA_101231 | 2.0519269 | 上调 | chr13 | SKA3 |
| 4 | hsa_circRNA_100705 | 2.0978353 | 上调 | chr10 | OAT |
| 5 | hsa_circRNA_101563 | 2.1077813 | 上调 | chr15 | DENND4A |
| 6 | hsa_circRNA_100669 | 2.1908539 | 上调 | chr10 | MGEA5 |
| 7 | hsa_circRNA_101245 | 2.2576789 | 上调 | chr13 | N4BP2L2 |
| 8 | hsa_circRNA_104804 | 2.2601757 | 上调 | chr9 | UBQLN1 |
| 9 | hsa_circRNA_101836 | 2.280973 | 上调 | chr16 | NFATC3 |
| 10 | hsa_circRNA_101835 | 2.3429473 | 上调 | chr16 | NFATC3 |
| 11 | hsa_circRNA_104490 | 2.5245965 | 上调 | chr7 | MKLN1 |
| 12 | hsa_circRNA_104062 | 2.6567613 | 上调 | chr6 | RANBP9 |
| 13 | hsa_circRNA_100923 | 2.8738465 | 上调 | chr11 | PICALM |
| 14 | hsa_circRNA_101996 | 3.1775471 | 上调 | chr17 | SPECC1 |
| 15 | hsa_circRNA_100861 | -2.0830133 | 下调 | chr11 | LRP5 |
| 16 | hsa_circRNA_101967 | -2.1381401 | 下调 | chr17 | FAM64A |
| 17 | hsa_circRNA_400008 | -2.1476202 | 下调 | chr1 | RPS8 |
| 18 | hsa_circRNA_100989 | -2.1878384 | 下调 | chr11 | FLI1 |
| 19 | hsa_circRNA_100492 | -2.2257586 | 下调 | chr1 | PCNXL2 |
| 20 | hsa_circRNA_400029 | -2.2767979 | 下调 | chr16 | RPL13 |
| 21 | hsa_circRNA_104084 | -2.2931511 | 下调 | chr6 | LINC00340 |
| 22 | hsa_circRNA_100508 | -2.4162019 | 下调 | chr1 | KIF26B |

续表 1 表达差异 log 值 ≥ 2.0 的 circRNA

| 编号 | circRNA | log fold change | Regulation | chrom | GeneSymbol |
|----|--------------------|-----------------|------------|-------|------------|
| 23 | hsa_circRNA_104387 | -2.510774 | 下调 | chr7 | WBSR17 |
| 24 | hsa_circRNA_104940 | -2.5834293 | 下调 | chr9 | NUP214 |
| 25 | hsa_circRNA_102513 | -2.6602342 | 下调 | chr19 | GPI |
| 26 | hsa_circRNA_104374 | -2.7869364 | 下调 | chr7 | GRB10 |

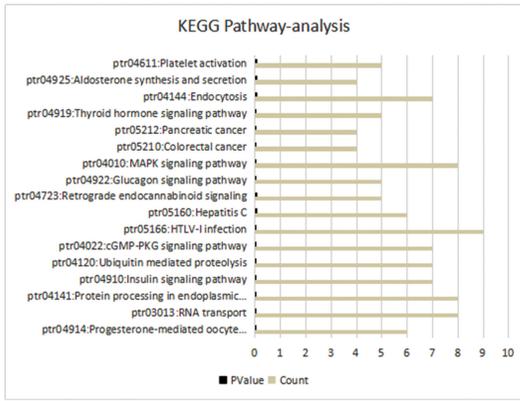


图 2 fold change 的 circRNAs KEGG pathway 分析

3 讨论

PLC 的恶性程度高,目前血液检测项目血清甲胎蛋白的灵敏度不高,仍有早期肝癌漏诊病例,迫切需要新的生物学诊断标志物,以提高 PLC 的诊断效率。有研究显示,相对于蛋白类标志物, circRNAs 在肿瘤的发展中较先出现,并且能够在血清中稳定表达,具有很好的临床应用前景^[11]。近年来,由于生物信息学的快速发展,众多 circRNAs 及其功能逐渐被发现,如 circRNAs 调节其亲本基因的表达、circRNAs 翻译蛋白等^[12]。

目前,对 PLC 发生机制的了解尚不足,以往的研究大多局限在单个基因对肿瘤的影响,事实上在肝癌的发展过程中会不断出现多个基因突变和表观遗传学改变,并且基因之间存在相互作用,并通过调控网络发挥作用^[13]。陈林波等^[14]用 R 语言从肝癌芯片表达谱中筛选出 fold change 基因,对其进行功能注释及通路分析,并构建蛋白质相互作用网络,筛选出 TOP2A、CENPF、ASPM 等 10 个关键基因,显示与肿瘤细胞碳代谢等通路有关,证明生物信息学能有效筛选和分析肝癌相关 fold change 基因。2017 年白文萱等^[15]应用 JMP 等软件对另一组肝癌芯片数据进行分析发现,除磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)在肝癌中表达上调外, MBL2、sDs、sLCO1B3、TD02、sAA4、sPP2 在肝癌中均表达下调。表明 GPC3 有望成为肝癌特异性的免疫治疗靶点。因此,从多基因水平及它们的相互作用网络分析肿瘤基因表达谱,有助于更好地探索发病机制,基因芯片作为新一代高通量检测技术,可以同时检测上万个基因的表达水平,是一种研究基因组和基因间相互作用的强有力的工具。

本研究将 PLC 患者与对照者进行比较,发现两组人群中出现了 fold change 的 circRNAs,同时用生物信息学技术对亲本基因进行富集分析,结果显示,

fold change 的 circRNAs 的 GO term 富集主要涉及转录因子活性、序列特异性 DNA 结合、RNA 转运 RT 等功能,通过内质网蛋白质加工、泛素介导的蛋白质水解、cGMP-PKG 信号通路等参与肝癌的疾病进展,其中 fold change 较为明显的为 NFATC3、FLI1、UBQLN1、SPECC1 等亲本基因。由此可见, PLC 的发生和发展与基因的调控有一定关联,可能存在新的路径或通路。同时也从一定程度上验证了与全基因组测序相同的结论, PLC 的发病与基因调控存在一定的关联性。迄今为止已发现多种基因与 PLC 相关,本研究也发现,相对于对照组, PLC 组 Fli1 呈明显 fold change。Fli1 属于 Ets 家族中的一个转录因子,参与多种基因的转录调控,近年来越来越多的研究发现, Fli1 表达失衡可参与多种肿瘤的发生和发展^[16-17]。Fli1 可能在肿瘤的发展过程中发挥癌基因的作用,这是因为高表达的 Fli1 可激活 Rho GTPase 信号通路,最终导致肿瘤细胞的侵袭和迁移。王慧玲^[18]应用 Western blot 和实时荧光定量聚合酶链反应检测肝癌组织和肝癌细胞株中 Fli1 的表达,分析其与肝癌患者临床病理的相关性,结果发现, Fli1 过表达组的肝癌细胞克隆、迁移和侵袭能力均明显增强, Fli1 敲减组情况相反,大部分细胞内调控信号随着肝癌的侵袭转移也发生了改变,如 PI3K-AKT、Integrin 及 Wnt 等信号通路。信号的改变说明它们在肝癌的侵袭转移过程中发挥了作用,并且 Fli1 在肝癌中发挥了癌基因的功能。SPECC1L 蛋白是一种细胞骨架蛋白,具有 3 个螺旋卷曲结构域和一个钙调蛋白结构域,能够同时与细胞微管蛋白及肌动微丝蛋白相互作用,具有稳定细胞微管蛋白、参与纺锤体形成的功能,对细胞黏附发挥重要调控作用,并参与 Integrin 信号、PI3K-AKT 及 Wnt 信号通路的调节。2018 年中南大学湘雅医院发明了专利 CN201810051721.3,明确了 SPECC1L 在治疗肝癌或术后预防肝癌复发药物中的应用。

综上所述,从多基因水平及它们的相互作用网络分析肿瘤基因表达谱有助于更好地探索 PLC 的发病机制,从而发现新的治疗靶点。目前缺乏对肝癌早期诊断和预后评估的新型生物标志物,因此,还需要进一步对 PLC 基因进行新位点鉴定,对新发现的相关基因及相关蛋白进行深入研究。本研究以微阵列芯片表达谱为基础,通过生物信息学技术分析 PLC 患者外周血中 fold change 的 circRNAs 及它们的亲本基因,发现了明显改变的基因,但具体发病机制及亲本基因参与的通路还需深入研究。

参考文献

[1] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(5): 453-461.

[2] 陈玲玲, 冯珊珊, 范祖森, 等. 非编码 RNA 研究进展[J]. 中国科学(生命科学), 2019, 25(12): 1573-1605.

[3] 孙毓筱, 刘强, 徐畅. 环状 RNA 在肺癌中的作用及研究进展[J]. 生命科学, 2019, 32(10): 1004-1011.

[4] ZHAO F C, HAN Y R, LIU Z Z, et al. CircFADS2 regulates lung cancer cells proliferation and invasion via acting as a sponge of miR-498[J]. Biosci Rep, 2018, 38(4): 180570.

[5] SEBASTIAN M, MARVIN J, ANTIGONI E, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature, 2013, 495(7441): 333-338.

[6] ZHANG Y, ZHANG X O, CHEN T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. Molecular Cell, 2013, 51(6): 792-806.

[7] FREDDIE B, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[8] 赵小龙, 金琦智, 尹树君, 等. 原发性肝癌的局部治疗进展[J]. 实用医院临床杂志, 2018, 15(2): 231-234.

[9] IAN Y T, LU Y Q, RUI C, et al. Potential significance of circular RNA in human placental tissue for patients with preeclampsia[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(4): 1380-1390.

[10] HAN Y N, XIA S Q, ZHANG Y Y, et al. Circular RNAs; a

novel type of biomarker and genetic tools in cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 64551-64563.

[11] LI T W, SHAO Y F, FU L Y, et al. Plasma circular RNA profiling of patients with gastric cancer and their droplet digital RT-PCR detection[J]. J Mol Med (Berl), 2018, 96(1): 85-96.

[12] DU W W, YANG W, LIU E B, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(6): 2846-2858.

[13] 周方, 宋宜. TSC22 基因在肝癌中的应用前景[J]. 肝脏, 2019, 24(12): 1473-1476.

[14] 陈林波, 李先鹏, 姜昊, 等. 肝癌相关基因的生物信息学分析及功能预测[J]. 温州医科大学学报, 2018, 48(11): 828-832.

[15] 白文莹, 高健, 钱程, 等. 肝癌相关差异表达基因的生物信息学分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(6): 435-439.

[16] BAE H J, NOH J H, KIM J K, et al. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2014, 33(20): 2557-2567.

[17] 金丽艳, 金建华, 陆文斌, 等. miR-33b 和高迁移率族蛋白 A2(HMGA2)在食管鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(9): 1238-1242.

[18] 王慧玲. miR-33b 调控 Fli-1 抑制肝癌发生发展的分子机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2018.

(收稿日期: 2020-08-03 修回日期: 2021-01-06)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.033

促红细胞生成素联合环孢素 A 治疗老年获得性纯红细胞再生障碍性贫血的疗效及相关机制

王丽丽, 韩明明[△]

河北省保定市第二中心医院检验科, 河北保定 072750

摘要:目的 探讨促红细胞生成素联合环孢素 A 治疗老年获得性纯红细胞再生障碍性贫血(PRCA)的疗效及相关机制。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2020 年 4 月该院收治的老年获得性 PRCA 患者 80 例作为研究对象, 采用信封密封法随机分为对照组(给予环孢素 A 治疗)和研究组(给予促红细胞生成素联合环孢素 A 治疗), 每组各 40 例。比较两组患者临床疗效、T 淋巴细胞亚群、可溶性 Fas 分子(sFas)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-2(IL-2)水平。**结果** 研究组患者治疗总有效率高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。研究组患者治疗前 CD4⁺、CD25⁺、CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺/CD4⁺水平均低于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两组患者治疗后 sFas、TNF-α、IL-2 水平均较治疗前降低, 且研究组均低于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 促红细胞生成素联合环孢素 A 治疗老年获得性 PRCA 效果佳, 治疗有效率高, 能有效调节患者免疫功能, 改善造血障碍, 值得临床推广应用。

关键词:促红细胞生成素; 获得性纯红细胞再生障碍性贫血; 可溶性 Fas 分子; 肿瘤坏死因子-α; 白细胞介素-2

中图分类号: R556.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)10-1462-03

纯红细胞再生障碍性贫血(PRCA)是骨髓红细胞系选择性再生障碍所导致的一组少见综合征, 包括获

[△] 通信作者, E-mail: zuz1744@163.com.

本文引用格式: 王丽丽, 韩明明. 促红细胞生成素联合环孢素 A 治疗老年获得性纯红细胞再生障碍性贫血的疗效及相关机制[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(10): 1462-1464.