

肾透明细胞癌 Caki-1 细胞系差异表达基因的生物信息学分析

朱合欢 赵虎 林智文 王洁 路君 谭建明

【摘要】 **目的** 比较肾透明细胞癌 Caki-1 细胞系与正常肾上皮细胞系 ASE-5063 中的差异表达基因(DEGs),寻找潜在的肾透明细胞癌特异性分子标志物。**方法** 利用 GEO 数据库自带的 GEO2R 在线分析工具分析基因芯片 GSE78179,将筛选出的 DEGs 分别导入 Metascape、STRING 以及 Cytoscape 进行综合分析并筛选出核心基因。最后使用 FunRich 等软件对筛选出的核心基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。**结果** 共筛选出 562 个 DEGs,其中上调基因 345 个,下调基因 217 个。进一步使用 MCODE 筛选出 36 个关键基因,GO 功能分析发现这些基因与细胞粘附分子活性、趋化因子活性、细胞通讯和信号转导等密切相关;KEGG 通路富集结果则表明差异基因主要集中在趋化因子信号通路、TNF 信号通路以及 NF- κ B 信号通路等多种与肿瘤相关的通路上。**结论** 运用生物信息学方法筛选出肾透明细胞癌 Caki-1 细胞系中 DEGs,其中数个核心基因广泛参与多种肿瘤的病理进程,但尚未在肾透明细胞癌有相关研究报道,提示其可能是治疗肾透明细胞癌的潜在靶点。

【关键词】 肾透明细胞癌; 生物信息学; 差异表达基因

Bioinformatics analysis of differentially expressed genes in clear cell renal cell carcinoma Caki-1 cell line Zhu Hehuan, Zhao Hu, Lin Zhiwen, Wang Jie, Lu Jun, Tan Jianming. Fujian Provincial Key Laboratory of Transplant Biology, Affiliated Dongfang Hospital (Fuzhou General Hospital), Xiamen University, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: Lu Jun, Email: junlu.heather@xmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To analyze the differentially expressed genes in the renal clear cell carcinoma Caki-1 cell line with the normal renal epithelial cell line ASE-5063 for searching for potential molecular markers of renal clear cell carcinoma. **Methods** GEO2R online analysis tool provided by the GEO database was used to analyze the gene chip GSE78179, and the differentially expressed genes were acquired and introduced into Metascape, STRING, and Cytoscape for comprehensive analysis and the core genes were screened out. Finally, GO and KEGG enrichment analysis was performed on the selected core genes using software such as FunRich. **Results** A total of 562 differentially expressed genes were screened out, including 345 up-regulated genes and 217 down-regulated genes. 36 key genes were further screened using MCODE. GO function analysis revealed that these genes were closely related to cell adhesion molecule activity, chemokine activity, cell communication, and signal transduction; KEGG pathway enrichment results indicated that the differential genes were mainly concentrated in chemokine signaling pathways, TNF signaling pathways, and NF- κ B signaling pathways which were involved in a variety of tumor-related pathways. **Conclusion** The differentially expressed genes in the renal clear cell carcinoma Caki-1 cell line were screened using bioinformatics methods. Several core genes were widely involved in the pathological process of multiple tumors, but there have been no studies in renal clear cell carcinoma, suggesting that they may be potential targets for the treatment of renal clear cell carcinoma.

【Key words】 Clear cell renal cell carcinoma; Bioinformatics; Differentially expressed genes

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2018.02.003

基金项目: 国家自然科学基金(81570748); 福州总医院杰出青年培养专项(2017Q05)

作者单位: 350025 福州, 厦门大学附属东方医院(福州总医院)、福建省移植生物学重点实验室

通信作者: 路君, Email: junlu.heather@xmu.edu.cn

肾癌作为一种常见的实体肿瘤,约占成人恶性肿瘤的2%~3%,在泌尿系统中发病率仅次于膀胱癌。据CA-Cancer J Clin报道,美国仅在2015年就有大约60 000新发肾癌病例,且有14 000人左右死于该病^[1]。肾透明细胞癌是肾癌中最常见的病理类型,约占肾癌各种类型的70%,因为其缺乏有效的早期诊断及特定的生物标志物,30%的患者在初次诊断时已有远处转移^[2]。由于肾透明细胞癌对放疗化疗均不敏感,其治疗手段目前仍以外科手术为主。然而肾透明细胞癌具有转移性的特点,部分患者即使经过手术治疗,仍旧会出现转移现象,且转移后的患者预后明显较差^[3]。随着分子医学及相关技术(如基因芯片技术)的快速发展,大量肿瘤生物标志物相继被发现并逐步应用于临床^[4-6]。然而,当前尚未有肾透明细胞癌的诊断标志物在临床上投入使用。因此,探讨肾透明细胞癌发生发展机制,并找到在该过程中起关键作用的基因及相关信号通路,对肾透明细胞癌的靶向治疗具有重要指导作用。

本研究利用生物信息学方法对基因芯片GSE78179中的2种肾脏细胞系(转移性肾透明细胞癌Caki-1细胞系和胚胎起源的正常肾上皮细胞(ASE-5063细胞系)进行分析,筛选出差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),同时对DEGs进行聚类综合分析,同时构建蛋白互作网络进而找到核心基因及相关重要信号通路,为肾透明细胞癌进一步研究其诊断及治疗提供了理论基础。

材料与方法

一、材料

(一) 数据材料

利用NCBI中GEO芯片数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)对目标芯片进行检索,检索词为“clear cell renal cell carcinoma, Homo”。经筛选后,采用由Khan等^[7]提交的芯片数据(GSE78179),该芯片以Agilent-026652 Whole Human Genome Microarray 4x44K v2 (Probe Name version)为平台,共收集了6例细胞样本,其中3例为肾透明细胞癌Caki-1细胞系样本,3例为正常肾组织ASE-5063细胞系样本。

(二) 分析软件及数据库

GEO2R基因在线分析工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), Metascape基因聚类在线分析工具(<http://metascape.org/gp/index.html>),

STRING蛋白互作网络在线分析工具(<http://string-db.org/>), Cytoscape绘图软件(<http://www.cytoscape.org/>)及其插件“MCODE”; Funrich基因富集分析软件(<http://www.funrich.org/>)。

二、方法

采用GEO数据库的GEO2R在线分析工具对两种细胞系细胞进行分析,筛选出差异表达的基因。筛选标准为: $|\logFC| \geq 5$, $\text{adj.}P \leq 0.01$ 。将筛选出的差异表达导入Metascape中进行GO (Gene Ontology) 功能富集及京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)等通路的综合分析,然后将DEGs导入STRING中进行基因相互作用的可视化。接着将STRING的结果导入Cytoscape中,并利用MCODE筛选出核心基因互作网络,最后对核心互作网络中的基因进行GO与KEGG通路分析。

结 果

(一) DEGs 筛选结果

按照设定的筛选条件,与ASE-5063细胞系相比进行分析,在Caki-1细胞系中共筛选出562个DEGs,其中345个上调,217个下调。筛选结果按照 $|\logFC|$ 值排序,上调与下调排名前5名的基因见表1。

表1 上调与下调排名前5名的差异表达基因

GENE_SYMBOL	logFC	adj.P.Val	P.Value
UCHL1	1.30E+01	2.55E-07	1.39E-09
RPS4Y1	1.30E+01	1.58E-07	4.71E-10
MYADM	1.27E+01	1.27E-06	2.90E-08
RPS4Y2	1.24E+01	1.90E-06	5.87E-08
IGFBP5	1.18E+01	1.09E-07	1.18E-11
LCN2	-1.35E+01	1.09E-07	4.75E-11
IGFN1	-1.15E+01	1.33E-07	2.18E-10
ALDH1A1	-1.06E+01	1.09E-07	1.34E-11
RARRES2	-9.98	1.33E-07	1.35E-10
ITGB2	-9.68	1.33E-07	2.27E-10

注: GENE_SYMBOL为基因名称, logFC为倍数改变对数值, adj. P.Val为校正后P值, P.Value为P值

(二) DEGs 综合分析

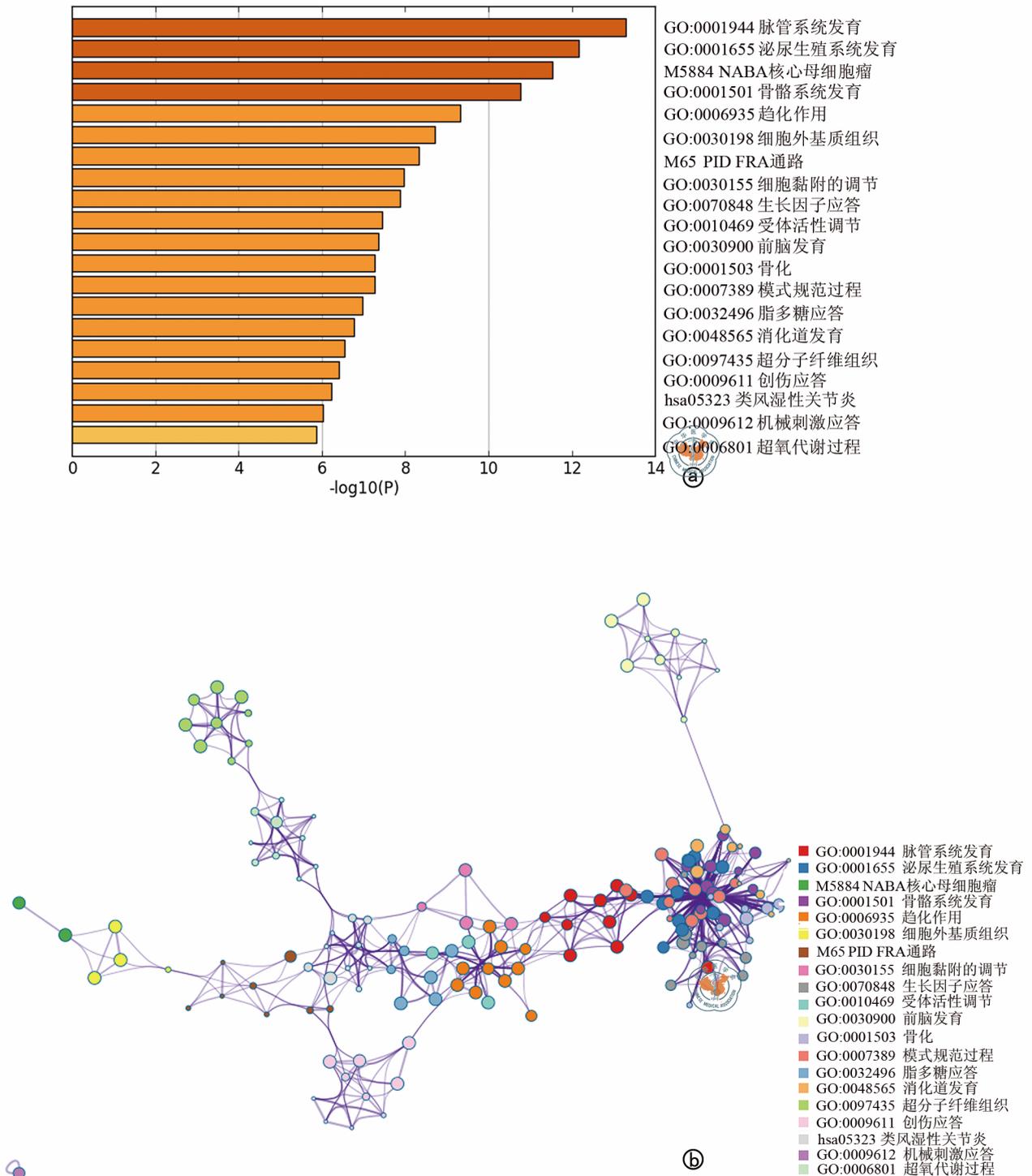
在Metascape中对DEGs进行功能及通路富集分析,按照P值大小排序,前20名富集结果见图1a。P值最小的2个GO富集结果表明这些差异基

因与脉管系统的发育(vasculature development)以及泌尿生殖系统发育(urogenital system development)密切相关。前 20 名富集功能相互关联的网络图见图 1b。

(三) DEGs 相互作用可视化及核心网络筛选

结果

将 DEGs 在 STRING 中可视化分析, 除去孤立无互作的基因节点(node), 将分析结果导入 Cytoscape, 筛选出 302 个具有相互作用关系节点, 构成了一个包涵 859 个互作关系对(edge)的复杂



注: a 图为差异基因富集热图, 包含按 P 值大小排序前 20 名富集结果; b 图为差异基因富集相互作用图, 包含 20 组富集结果

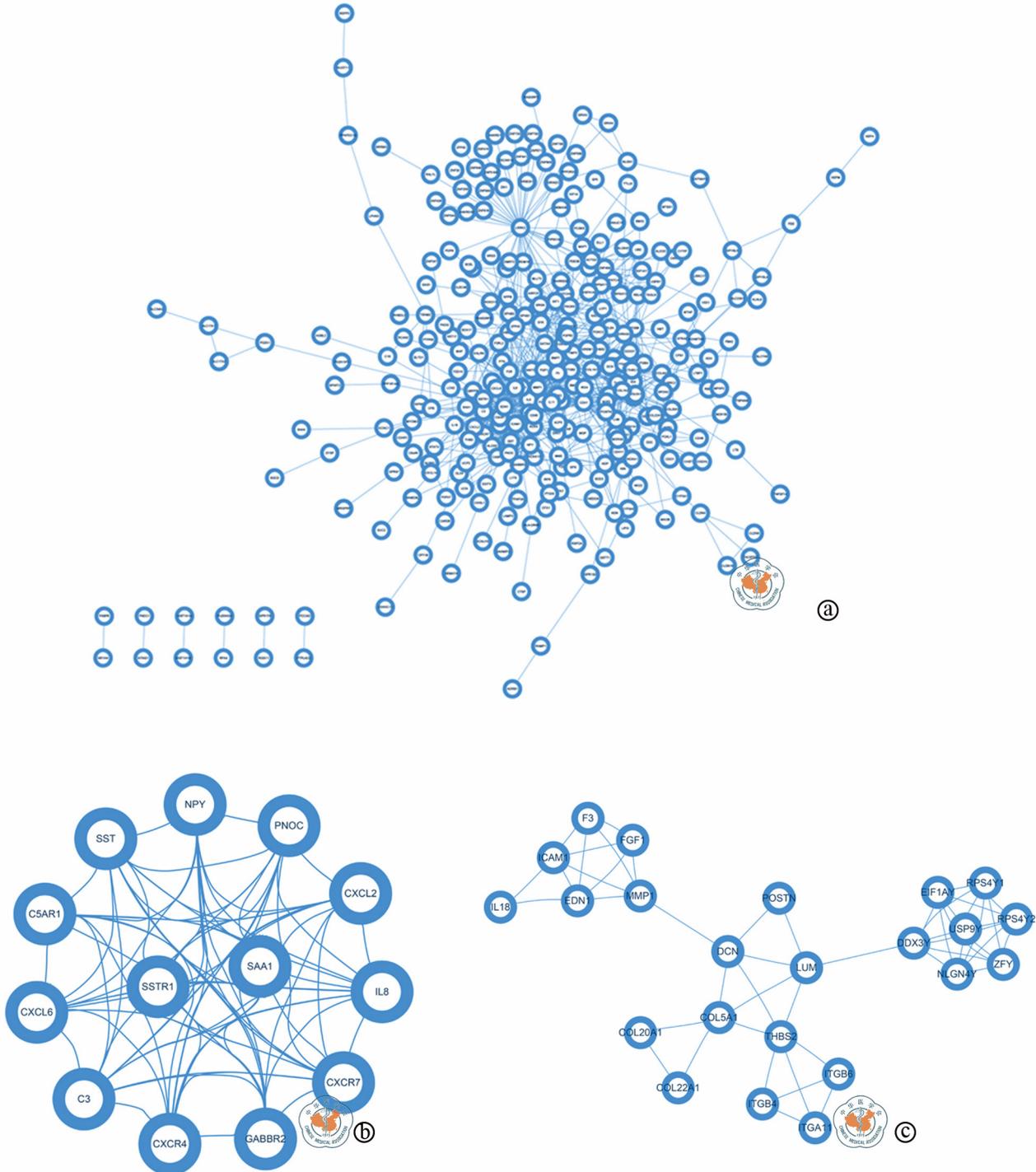
图 1 差异表达基因 Metascape 分析结果

网络(图 2a)。利用 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件,对图 2a 中的网络中进行 K 核解析(k-core decomposition),筛选出网络中的稳定结构。最终筛选出了 2 个得分最高的子网络,分别为由 13 个关键基因(Key Genes)及 78 个相互作用对组成的图 2b 和由 23 个关键基因及 52 个相互作用对组成的

图 2c。

(四)子网络 GO 功能分析及 KEGG 通路富集情况

通过将子网络中的 36 个关键基因导入 FunRich 软件进行 GO 功能分析,发现关键基因在分子功能(molecular function)上主要富集细胞黏附



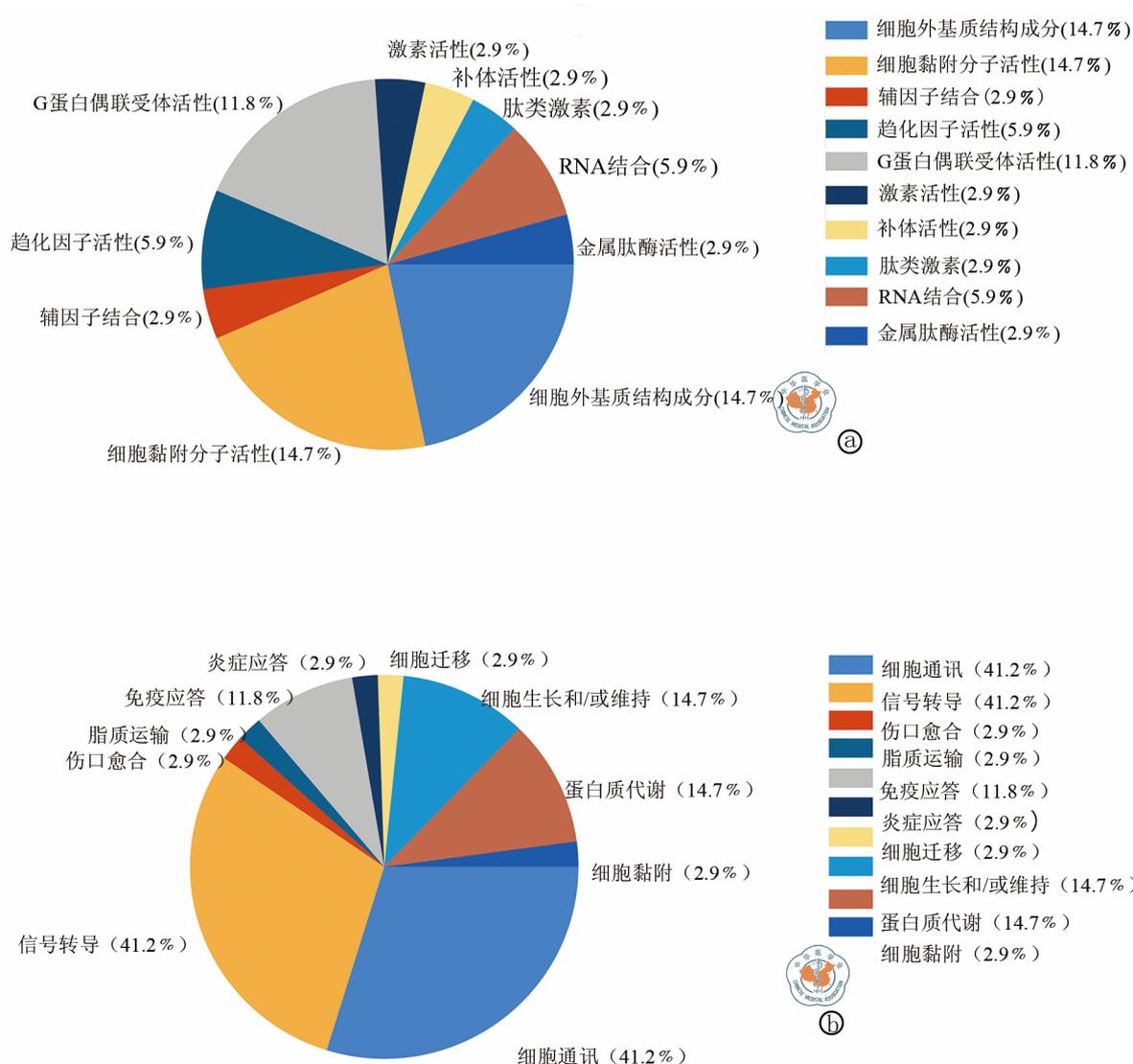
注: a 图为差异表达基因互作网络图; b、c 图为核心基因互作网络图,其中 b 图包含 13 个关键基因及 78 个相互作用对; c 图包含 23 个关键基因及 52 个相互作用对

图 2 差异、核心基因互作网络图

分子活性(cell adhesion molecule activity)、辅因子结合(cofactor binding)、趋化因子活性(chemokine activity)等相关功能上(图 3a),而这些功能在生物学进程(biological process)上主要与细胞通讯(cell communication)和信号转导(signal transduction)等密切相关(图 3b)。在 STRING 中的 KEGG 通路分析表明这些关键基因与趋化因子信号通路(chemokine signaling pathway)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)以及 NF-κB 信号通路(NF-kappa B signaling pathway)等有着紧密的联系(表 2),为使结果更加清晰可读,其中部分通路及与之相关的基因的关系对在 Cytoscape 中进行可视化(图 4)。

讨 论

肿瘤的整体发生发展进程往往有着多个基因参与,现阶段随着基因组学、比较基因组学、蛋白质组学等方面的快速发展,各种类型的肿瘤逐渐在全基因组水平上被系统的深入研究^[8]。在此研究中,通过分析肾透明细胞癌 Caki-1 细胞系和正常的肾细胞 ASE-5063 细胞系,发现在 Caki-1 细胞系中高表达的基因 345 个,低表达基因 217 个。通过 Metascape 中的 GO 分析发现这个 DEGs 与脉管系统发育及泌尿生殖系统发育密切相关。随后使用 K 核解析筛选出这些 DEGs 中的关键基因如 CXCL2、IL8 和 FGF1 等,这些关键基因 GO 功能分析和



注: a 图为核心基因的分子功能分析结果; b 图为核心基因的生物学进程分析结果

图 3 核心基因 GO 功能富集分析

表2 核心基因 KEGG 通路富集分析

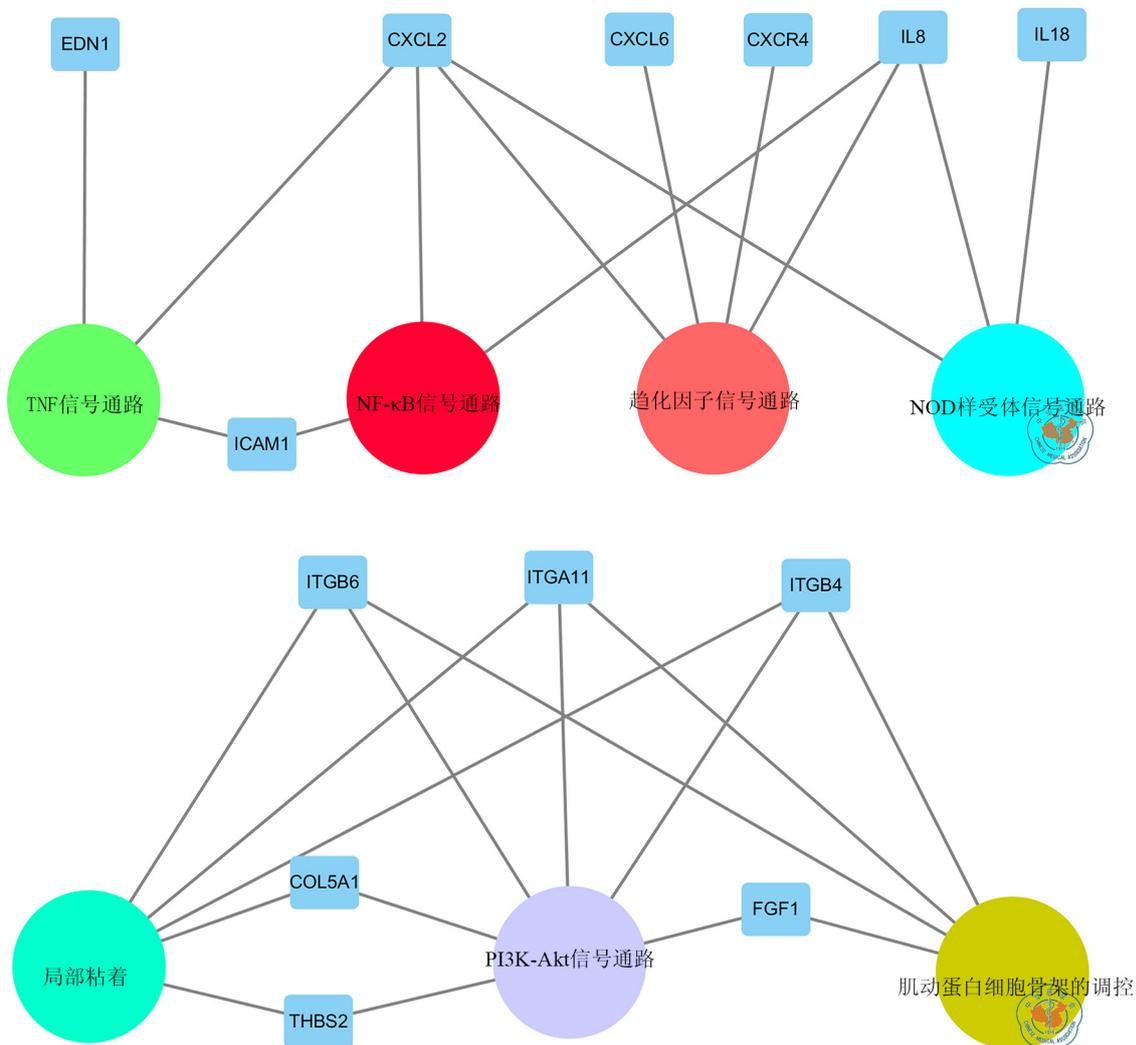
通路名称	基因名称	False Discovery Rate
细胞外基质受体相互作用	COL5A1, ITGA11, ITGB4, ITGB6, THBS2	5.37E-05
类风湿性关节炎	CXCL6, ICAM1, IL18, IL8, MMP1	5.37E-05
疟疾	ICAM1, IL18, IL8, THBS2	0.000120
军团杆菌病	C3, CXCL2, IL18, IL8	0.000160
细胞因子 - 细胞因子受体相互作用	CXCL2, CXCL6, CXCR4, CXCR7, IL18, IL8	0.000323
PI3K-Akt 信号通路	COL5A1, FGF1, ITGA11, ITGB4, ITGB6, THBS2	0.001080
局部粘着	COL5A1, ITGA11, ITGB4, ITGB6, THBS2	0.001080
金黄色葡萄球菌感染	C3, C5AR1, ICAM1	0.003530
NOD 样受体信号通路	CXCL2, IL18, IL8	0.004150
趋化因子信号通路	CXCL2, CXCL6, CXCR4, IL8	0.006280
补体途径	C3, C5AR1, F3	0.006280
百日咳	C3, CXCL6, IL8	0.006280
致心律失常性右室心肌病	ITGA11, ITGB4, ITGB6	0.006310
沙门氏菌感染	CXCL2, IL18, IL8	0.007710
肥厚型心肌病	ITGA11, ITGB4, ITGB6	0.007710
NF- κ B 信号通路	CXCL2, ICAM1, IL8	0.007900
肌动蛋白细胞骨架的调控	FGF1, ITGA11, ITGB4, ITGB6	0.007900
扩张型心肌病	ITGA11, ITGB4, ITGB6	0.007900
TNF 信号通路	CXCL2, EDN1, ICAM1	0.012900
非洲锥虫病	ICAM1, IL18	0.022000
膀胱癌	IL8, MMP1	0.026400
甲型流感	ICAM1, IL18, IL8	0.040200

注: False Discovery Rate (FDR) 为错误发现率,表中列举了核心基因富集的所有信号通路名称及对应的基因名称(FDR < 0.05)

KEGG 通路富集主要集中在趋化因子活性、TNF 信号通路和 NF- κ B 信号通路等。众所周知,肿瘤细胞较正常细胞而言具有生长旺盛的特点,因而 Caki-1 细胞系中的差异基因富集结果中有脉管系统发育以及参与细胞生长的信号转导因子的各种信号通路,证实了筛选基因方法的合理性。富集通路中的趋化因子等信号通路提示 Caki-1 细胞具有一定的侵袭迁移能力,这也与目前诸多关于该细胞系的研究报道相符^[9-11]。

本研究中筛选出的与肾透明细胞癌 Caki-1 细胞系相关的核心基因,如 IL-8 (白细胞介素 8) 能够影响治疗肾透明细胞癌药物舒尼替尼的抗血管生成能力,是舒尼替尼发生耐药的重要促成因素^[12]。另外,KEGG 分析结果表明 IL-8 参与了 NOD 样受体信号通路、趋化因子信号通路以及 NF- κ B 信号通路,已有大量相关文献报道了这些通路于肾透明细胞癌有着密不可分的联系^[13-15]。CXCL2 (CXC 趋化因子配体 2) 虽然尚未有研究报道其直接参与肾透明细胞癌的病理过程,但多个研究报道其在其他多种肿瘤疾病中发挥着重要作用。如在前列腺癌患者中 CXCL2 能够显著促进患者的骨溶解,并能促进前列腺癌的转移^[16]; 同样,在乳腺癌患者中 CXCL2 也能促进癌症的远处转移^[17]。和 IL-8 类似,KEGG 分析结果表明 CXCL2 同样参与了大量与肾透明细胞癌病程相关的信号通路如 TNF 信号通路^[18]、NOD 样受体信号通路、趋化因子信号通路以及 NF- κ B 信号通路。其他核心基因如 ITGB4 (又名 CD104),根据图 4 结果表明其参与了 PI3K-Akt 信号通路、局部粘附和肌动蛋白骨架的调节。据 Nature 报道,癌症基因组图谱研究网络(the Cancer Genome Atlas Research Network) 的研究人员利用多个平台对 400 余例肾透明细胞癌肿瘤进行了综合分析,鉴定出 19 个重要的突变基因,而与这些突变基因最为相关的信号通路则是 PI3K-Akt 信号通路,该通路涉及特定的 DNA 甲基化发生过程,从而在该肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用^[19]。其他研究则表明局部粘附和肌动蛋白骨架的调节与细胞的迁移侵袭能力直接相关^[20-21]。因此,与这三条

他多种肿瘤疾病中发挥着重要作用。如在前列腺癌患者中 CXCL2 能够显著促进患者的骨溶解,并能促进前列腺癌的转移^[16]; 同样,在乳腺癌患者中 CXCL2 也能促进癌症的远处转移^[17]。和 IL-8 类似,KEGG 分析结果表明 CXCL2 同样参与了大量与肾透明细胞癌病程相关的信号通路如 TNF 信号通路^[18]、NOD 样受体信号通路、趋化因子信号通路以及 NF- κ B 信号通路。其他核心基因如 ITGB4 (又名 CD104),根据图 4 结果表明其参与了 PI3K-Akt 信号通路、局部粘附和肌动蛋白骨架的调节。据 Nature 报道,癌症基因组图谱研究网络(the Cancer Genome Atlas Research Network) 的研究人员利用多个平台对 400 余例肾透明细胞癌肿瘤进行了综合分析,鉴定出 19 个重要的突变基因,而与这些突变基因最为相关的信号通路则是 PI3K-Akt 信号通路,该通路涉及特定的 DNA 甲基化发生过程,从而在该肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用^[19]。其他研究则表明局部粘附和肌动蛋白骨架的调节与细胞的迁移侵袭能力直接相关^[20-21]。因此,与这三条



注：图中正圆形代表信号通路，长方形代表核心基因

图4 部分核心基因及其参与的信号通路

信号通路密切相关的 ITGB4 基因有可能是肾透明细胞癌潜在的治疗靶点,值得后续进行更加深入的研究。

此研究通过生物信息学方法在肾透明细胞癌 Caki-1 细胞系中筛选出了数个核心基因,包括 IL-8 这种在肾透明细胞癌中被广泛报道的基因,以及 CXCL2 和 ITGB4 这种广泛参与多种肿瘤的病理进程但尚未在肾透明细胞癌中报道的基因。通过对这些基因进行功能分析及通路富集分析,有助于对肾透明细胞癌的发病机制及病程进展的进一步研究。同时,筛选出的这些核心基因可通过后续进一步的实验验证,可能会找到肾透明细胞癌的特异性临床诊断标志物并为其靶向治疗提供有力支持,这为肾透明细胞癌的早期诊断以及后续靶向治疗的研究提

供了研究基础。

参 考 文 献

- 1 Kopp RP, Stratton KL, Glogowski E, et al. Utility of prospective pathologic evaluation to inform clinical genetic testing for hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2017, 123(13): 2452-2458.
- 2 Shingarev R, Jaimes EA. Renal cell carcinoma: new insights and challenges for a clinician scientist[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 313(2):F145-F154.
- 3 Ni D, Ma X, Li HZ, et al. Downregulation of FOXO3a promotes tumor metastasis and is associated with metastasis-free survival of patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(7):1779-1790.
- 4 Kirwan A, Utratna M, O'dwyer ME, et al. Glycosylation-Based serum biomarkers for cancer diagnostics and prognostics[J]. Biomed Res Int, 2015:490531.

- 5 Liloglou T, Bediaga NG, Brown BR, et al. Epigenetic biomarkers in lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(2, SI):200-212.
- 6 Mazzone PJ, Sears CR, Arenberg DA, et al. Evaluating molecular biomarkers for the early detection of lung cancer: when is a biomarker ready for clinical use? an official American thoracic society policy statement[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(7):e15-e29.
- 7 Khan MI, Dębski KJ, Dabrowski M, et al. Gene set enrichment analysis and ingenuity pathway analysis of metastatic clear cell renal cell carcinoma cell line[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(2):F424-F436.
- 8 Katheder NS, Khezri R, O'farrell F, et al. Microenvironmental autophagy promotes tumour growth[J]. *Nature*, 2017, 541(7637):417-420.
- 9 Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, et al. Leptin promotes invasiveness of murine renal cancer cells via extracellular signal-regulated kinases and rho dependent pathway[J]. *J Urol*, 2006, 176(4 Pt 1):1636-1641.
- 10 Pei X, Li M, Zhan J, et al. Enhanced IMP3 expression activates NF- κ B pathway and promotes renal cell carcinoma progression[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0124338.
- 11 Zhu J, Cui L, Xu A, et al. MEIS1 inhibits clear cell renal cell carcinoma cells proliferation and *in vitro* invasion or migration[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1):176.
- 12 Huang D, Ding Y, Zhou M, et al. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(3):1063-1071.
- 13 Castaño-Rodríguez N, Kaakoush NO, Goh KL, et al. The NOD-like receptor signalling pathway in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer: a case-control study and gene expression analyses[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e98899.
- 14 Matušan-Ilijaš K, Damante G, Fabbro D, et al. EGFR expression is linked to osteopontin and Nf-kappaB signaling in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(1):65-71.
- 15 Tsaur I, Noack A, Waaga-Gasser AM, et al. Chemokines involved in tumor promotion and dissemination in patients with renal cell cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2011, 10(5):195-204.
- 16 Hardaway AL, Herroon MK, Rajagurubandara E, et al. Marrow adipocyte-derived CXCL1 and CXCL2 contribute to osteolysis in metastatic prostate cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2015, 32(4):353-368.
- 17 Bachmeier BE, Mohrenz IV, Mirisola V, et al. Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFkappaB[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(4):779-789.
- 18 Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, et al. Expression of TNF- α and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(7):1504-1514.
- 19 Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Nature*, 2013, 499(7456):43-49.
- 20 Kim DH, Wirtz D. Predicting how cells spread and migrate: focal adhesion size does matter[J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(3):293-296.
- 21 Lin WC, Wang LC, Pang TL, et al. Actin-binding protein G (AbpG) participates in modulating the actin cytoskeleton and cell migration in *Dictyostelium discoideum*[J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(6):1084-1097.

(收稿日期:2018-03-15)

(本文编辑:蔡晓珍)

朱合欢,赵虎,林智文,等. 肾透明细胞癌 Caki-1 细胞系差异表达基因的生物信息学分析 [J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版),2018,8 (2): 80-87.