

小细胞肺癌中信号通路及蛋白相互作用网络分析

王东梅¹, 张展英²

(1.上海其明信息技术有限公司, 上海 200000;

2.美艾利尔<上海>诊断产品有限公司, 上海 200000)

摘要:目的 分析小细胞肺癌相关的信号通路, 构建蛋白相互作用网络, 探究小细胞肺癌相关的关键基因。方法 从 cBioPortal 数据库下载 110 例小细胞肺癌患者临床和全基因组测序数据, 采用 R 软件分析数据的基本信息, KEGG 信号通路富集分析, 构建蛋白质相互作用网络。结果 共收集 110 例小细胞肺癌患者, 其中男性多于女性, 大部分患者年龄在 60 岁及以上, 且吸烟人数多于戒烟人数, 吸烟患者的突变位点数 ($n=345.4$) 高于戒烟组 ($n=299.70$), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 信号通路富集显示, 发生突变的基因主要与 Wnt 信号通路、钙粘蛋白信号通路、烟碱乙酰胆碱受体信号通路有关。蛋白相互作用网络显示, 与小细胞肺癌相关的基因有 10 个, 其中 PIK3CG 和 ERBB4 的度最大。结论 小细胞肺癌与吸烟有关, 且吸烟可引起基因突变位点数增多。小细胞肺癌与 Wnt 信号通路、钙粘蛋白信号通路、烟碱乙酰胆碱受体信号通路有关, 与 PIK3CG、ERBB4 基因关系密切。

关键词:小细胞肺癌; 基因突变; 信号通路; 蛋白相互作用网络

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.01.025

文章编号: 1006-1959(2020)01-0081-04

Analysis of Signal Pathways and Protein Interaction Networks in Small Cell Lung Cancer

WANG Dong-mei¹, ZHANG Zhan-ying²

(1.Shanghai Qiming Information Technology Co., Ltd., Shanghai 200000, China;

2.Mayer<Shanghai>Diagnostic Products Co., Ltd., Shanghai 200000, China)

Abstract: Objective To analyze the signaling pathways related to small cell lung cancer, construct a protein interaction network, and explore key genes related to small cell lung cancer. Methods The clinical and whole-genome sequencing data of 110 small cell lung cancer patients were downloaded from the cBioPortal database. The basic information of the data was analyzed using R software, and the KEGG signal pathway enrichment analysis was performed to construct a protein interaction network. Results A total of 110 small cell lung cancer patients were collected, including more men than women, most of whom were aged 60 years and over, and the number of smokers was more than the number of people who quit, the number of mutation sites ($N=345.4$) in smoking patients was higher than that in the smoking cessation group ($N=299.70$), the difference was statistically significant ($P<0.05$). The enrichment of signaling pathways showed that the genes that mutated were mainly related to the Wnt signaling pathway and calcium adhesion Protein signaling pathway and nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway are related. The protein interaction network showed that there were 10 genes related to small cell lung cancer, of which PIK3CG and ERBB4 had the highest degree. Conclusion Small cell lung cancer is related to smoking, and smoking can increase the number of gene mutation sites. Small cell lung cancer is related to the Wnt signaling pathway, the cadherin signaling pathway, and the nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway, and is closely related to the PIK3CG and ERBB4 genes.

Key words: Small cell lung cancer; Gene mutation; Signaling pathway; Protein interaction network

受生活环境、习惯和遗传等因素的影响, 肺癌的死亡人数不断增加, 目前已成为全球发病率和死亡率最高的癌症之一。Torre LA 等^[1]报道, 2012 年全球新增肺癌患者约 180 万, 占癌症总人数的 12.9%, 肺癌死亡人数约 159 万, 占癌症总死亡人数的 19.4%。在我国, 肺癌的发病率和死亡率均居于恶性肿瘤之首, 因此预防、治疗肺癌成为亟需解决的问题。目前肺癌的发病机制尚未完全明确, 大量资料表明, 长期大量吸烟是肺癌的一个重要致病因素, 吸烟可增加肺癌的发生风险。Dong J 等^[2]对肺癌新发易感位点与吸烟的交互作用研究发现, 肺癌患者一些基因突变位点与吸烟量相关。García Campelo MR 等^[3]报道, Wnt 信号通路作为细胞信号传导系统之一, 在肺癌的发生发展中起重要作用。本研究选择 cBioPortal 数据库中小细胞肺癌的临床和全基因组测序数据, 通过信号通路分析, 构建蛋白质相互作用网络, 发现关键基因, 旨在为发现小细胞肺癌的发病机理提供帮助, 报道如下。

作者简介: 王东梅 (1982.1-), 女, 江苏盐城人, 硕士, 工程师, 主要从事遗传学研究

1 材料与方法

1.1 数据来源 从 cBioPortal 数据库 (<http://www.cbioportal.org/>) 中获取 110 例小细胞肺癌患者的临床和基因测序数据。检索式为 (“Lung Cancer”) AND (NOT “MIXED CANCER TYPES”) AND (NOT “Lung Squamous Cell Carcinoma”) AND (NOT “Lung Adenocarcinoma”) AND (NOT “Non-Small Cell Lung Cancer”), 获得 Small Cell Lung Cancer (CLCGP, Nat Genet 2012)、Small Cell Lung Cancer (Johns Hopkins, Nat Genet 2012)、Small Cell Lung Cancer (U Cologne, Nature 2015) 3 个数据集。选择临床资料丰富 (包含性别、年龄、吸烟等信息) 的数据集作为研究对象: Small Cell Lung Cancer (U Cologne, Nature 2015)。

1.2 方法 采用 R 软件对收集到的临床数据进行整理和统计, 获得数据的基本特征。根据过滤条件对分子数据进行预处理, 预处理规则如下: ①根据 Variant_Type 类型, 挑选 SNP、INS、DEL 三种变异类型; ②保留编码区变异位点, 排除非编码区域的变异位

点;③排除热点突变位点;④排除胚系变异位点。对基因进行 Pathway 的富集分析,由于 Pathway 的条目中包含很多条信号通路,且每个信号通路所包含基因的数目变化较大,采用 Fisher 精确检验计算 P 值($P < 0.05$),再通过多重比较检验,确定 Pathway 的 FDR 值。检索 KEGG 数据库获得蛋白相互作用关系,导入 Cytoscape v3.7.1 软件构建蛋白相互作用网络,采用 NetworkAnalyzer 工具计算网络的拓扑参数。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 数据基本情况 共收集 110 例小细胞肺癌患者,其中男 70 例(63.64%),女 40 例(36.36%)。患者平均年龄为 64.59 岁,其中 60 岁及以上的共 80 例(72.73%)。吸烟 53 例(48.18%),戒烟 42 例(38.18%),无吸烟经历 2 例(1.81%),吸烟状态信息缺失 13 例(11.82%)。统计每个样本的突变总数,去除离群值后,进行单因素的方差分析,结果显示吸烟患者的突变位点数($n=345.4$)高于戒烟组($n=299.70$),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 Pathway 富集分析 在吸烟(Current)和戒烟(Former)患者中,以超过 10%的突变基因为研究对象,进行 Pathway 富集分析,结果显示,发生突变的基因主要与 Wnt 信号通路(吸烟: $P=6.48E-6$, $FDR=3.54E-4$;戒烟: $P=8.27E-9$, $FDR=1.36E-6$)、钙粘蛋白信号通路(吸烟: $P=1.40E-5$, $FDR=5.73E-4$;戒烟: $P=9.70E-7$, $FDR=5.30E-5$)、烟碱乙酰胆碱受体信号通路(吸烟: $P=3.09E-5$, $FDR=1.01E-3$;戒烟: $P=2.59E-3$, $FDR=3.85E-2$)有关,见图 1。

2.3 蛋白质相互作用网络 以吸烟中超过 10%的突变基因为研究对象,检索 KEGG 数据库中蛋白相互作用关系,构建蛋白相互作用网络,见图 2。用 NetworkAnalyzer 工具计算网络中的拓扑参数,结果显示度大于 10 的基因有 PIK3CG、ERBB4、NOTCH3、NOTCH1、MYLK、EP300、CREBBP、TP53、ARAF、GRM5、GRM1、ADCY8、GNAL、ADRBK2、GLI3、ARRB2、RB1,其中 PIK3CG 基因在网络中度最大为 83,ERBB4 基因次之为 36,且 PIK3CG 和 ERBB4 是网络中介数中心性和紧密中心性最大的 2 个基因,见表 1。

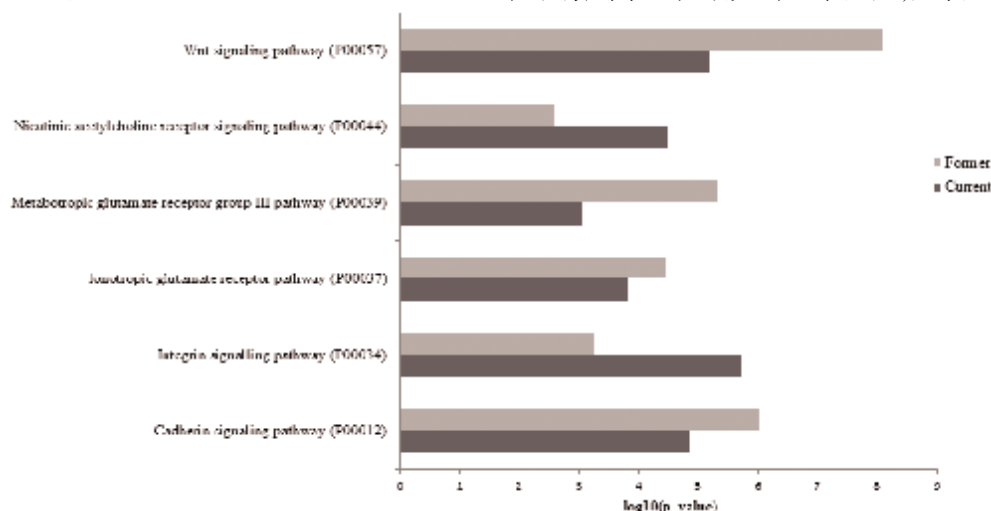


图 1 小细胞肺癌患者突变基因的 Pathway 富集分析

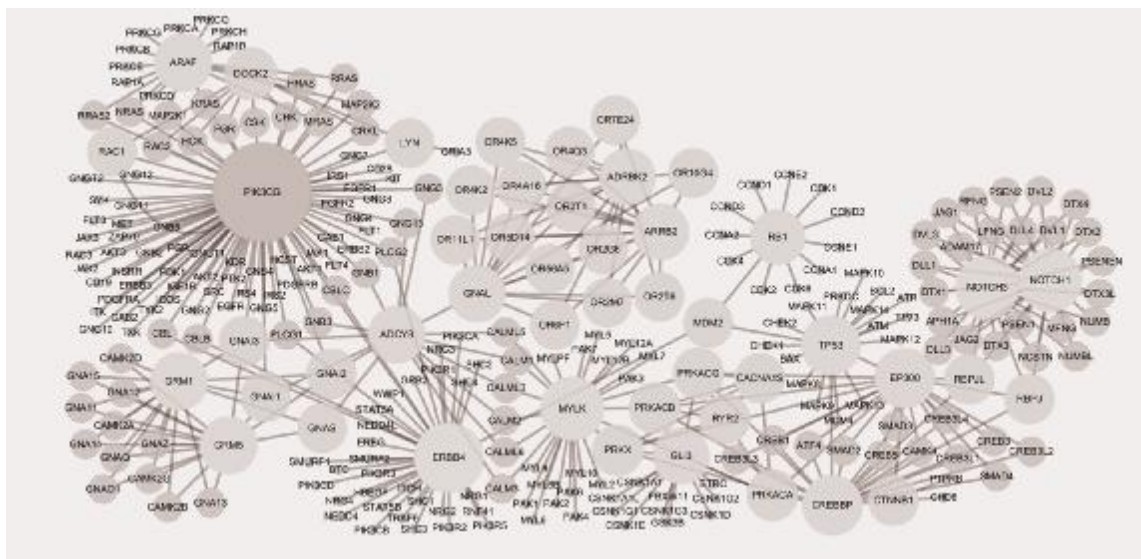


图 2 蛋白质相互作用网络

表 1 蛋白相互作用网络的拓扑参数

基因	介数中心性	紧密中心性	聚类系数	度
PIK3CG	0.5907697	0.30518018	0.00150557	83
ERBB4	0.41246475	0.2974753	0.00793651	36
MDM2	0.31524458	0.28082902	0	3
TP53	0.30901475	0.26234269	0	19
ADCY8	0.28077965	0.25469925	0	15
MYLK	0.24008411	0.22849916	0	26
EP300	0.17041814	0.24658781	0	20
CREBBP	0.17041814	0.24658781	0	20
GNAL	0.11235023	0.20814132	0	15
RBPJ	0.08670462	0.20608365	0	4
RBPJL	0.08670462	0.20608365	0	4
NOTCH3	0.08446768	0.17654723	0	26
NOTCH1	0.08446768	0.17654723	0	26
RB1	0.07967746	0.22341303	0	12
GLI3	0.07259806	0.18574366	0	14
ARAF	0.06581932	0.19694767	0	17

3 讨论

3.1 小细胞肺癌的基本特征 Chen W 等^[4]研究显示,中国肺癌患者中男性的发病率为 69.45%,女性发病率为 30.55%。本研究统计了小细胞肺癌患者的性别比例,发现男性患小细胞肺癌的比例高于女性,表明小细胞肺癌可能与性别有关。本研究中小细胞肺癌患者的平均年龄为 64.59 岁,且大部分为 60 岁及以上的老年人,表明小细胞肺癌最常见于 60 岁以上的老年人。吸烟人数占总人数的 48.18%,戒烟人数占 38.18%,有吸烟经历的患者占 86.36%,表明小细胞肺癌的发生与吸烟有关。这与 Tonini G 等^[5]的研究结论一致,说明吸烟是肺癌的一个最重要的危险因素,其中 87% 的肺癌患者死亡与吸烟有关。同时,吸烟患者的基因突变位点数高于戒烟患者^[6],表明吸烟容易引起与癌症相关的基因突变。

3.2 Pathway 富集分析 目前已有研究显示,Wnt 信号通路、烟碱乙酰胆碱受体信号通路与肺癌的发生密切相关。Wnt 信号通路参与细胞的增殖、分化、运动及凋亡等过程,为细胞发育所需,调节细胞的行为及细胞的相互作用,Vaughan AE 等^[7]发现激活 Wnt 信号通路可增加肿瘤发生的概率。尼古丁对中枢神经系统的作用主要通过尼古丁乙酰胆碱受体实现,除中枢神经系统的神经元,全身许多细胞如淋巴细胞、巨噬细胞、树突细胞、脂肪细胞、角质细胞、内皮细胞及肠道和肺的上皮细胞均表达尼古丁乙酰胆碱受体。Schuller HM^[8]研究表明,尼古丁及尼古丁乙酰胆碱受体在肺癌的发生、发展中起着重要的作用,包括调控细胞增殖、细胞凋亡、新生血管的形成等。本研究显示,发生突变的基因主要与 Wnt 信号通路、

钙粘蛋白信号通路、烟碱乙酰胆碱受体信号通路有关。Wnt 信号通路主要通过 3 种途径进行传导:①经典 Wnt 信号途径(Wnt/ β -catenin 信号通路),该通路激活后将募集细胞质内的 β -catenin,随后 β -catenin 进入细胞核内激活靶基因表达,而在没有 Wnt 信号存在时, β -catenin 则被 APC-Axin-GSK3 β -CK 复合体泛素化降解,通路即关闭;②Wnt/PcR 通路:主要作用可能是参与调控胚胎发育时期细胞骨架的重排;③Wnt/Ca²⁺ 途径:该通路由 Wnt-5a 或 Wnt-11 激活,活化后的 CDK2 和 PKC 使胞内钙离子浓度升高,导致 NFAT 在核内蓄积诱导靶基因的表达。E-钙粘蛋白是参与细胞间粘附连接的重要分子,发挥着维持细胞极性和组织结构完整性的功能,其主要通过与 β -连环蛋白形成复合体介导同质细胞之间的相互粘附抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭;同时 E-钙粘蛋白竞争性和 β -连环蛋白结合,降低细胞内游离型 β -连环蛋白水平,从而抑制其参与 Wnt 信号通路细胞增殖基因的表达。E-钙粘蛋白复合体的异常可能会引起细胞之间的黏附能力减弱以及肿瘤细胞的运动能力增强,从而导致细胞容易脱离、侵袭和转移。小细胞肺癌和非小细胞肺癌细胞系均存在尼古丁乙酰胆碱受体,目前发现尼古丁在肺癌细胞中的主要作用为促进肿瘤组织细胞增殖和抑制药物诱导的细胞凋亡。

3.3 蛋白相互作用网络 本研究构建的蛋白相互作用网络中,度大于 10 的基因有 PIK3CG、ERBB4、NOTCH3、NOTCH1、MYLK、EP300、CREBBP、TP53、ARAF、GRM5、GRM1、ADCY8、GNAL、ADRBK2、GLI3、ARRB2、RB1,提示这些基因可能与小细胞肺癌密切

相关,其中 PIK3CG、ERBB4 是网络中度最大的 2 个基因,表明 PIK3CG 和 ERBB4 基因在网络中起重要的作用。这与很多研究的结论类似,如:PIK3CA 基因编码的蛋白是 PI3Ks 的催化亚单位,PI3Ks 是一种脂激酶家族。PIK3CA 基因的突变可以导致 PI3Ks 的催化活性异常增强,促使细胞发生癌变,其机制主要为 PI3K/AKT 通路是细胞信号传导中一个重要通路,PI3Ks 能特异性磷酸化磷脂酰肌醇的 3 位羟基,产生第二信使肌醇类物质如 PIP3,PIP3 可促使 AKT 转移到细胞膜上并被 PDK1/PDK2 活化,AKT 则是 PI3K/AKT 信号通路中核心因子,异常活化的 AKT 会导致肿瘤发生。Kurppa KJ 等^[10]发现在非小细胞肺癌中存在 ERBB4 致癌突变,该基因编码的蛋白属于表皮生长因子受体家族,该家族包括 HER1、HER2、HER3 及 HER4,也属于受体酪氨酸激酶家族。ERBB4 可被 neuregulins 等蛋白激活,从而磷酸化下游蛋白,参与细胞的有丝分裂和分化,其突变与多种癌症有关。Westhoff B 等^[13]在原代 NSCLC 上皮细胞培养过程中,发现 Notch1 基因突变的细胞被 ν -分泌酶抑制剂选择性地杀死,提示肿瘤细胞增殖的优势依赖 Notch 信号。Notch 基因编码一类高度保守的细胞表面受体,这些受体调节多种细胞的发育,从而 Notch 信号影响细胞正常形态发生的多个过程,包括多能祖细胞的分化、细胞凋亡、细胞增殖及细胞边界的形成。Fernandez-Cuesta L 等^[14]的研究表明,参与细胞周期调控的重要抑癌基因 TP53 是小细胞肺癌的特征性基因变异。TP53 基因又称为 P53,是一种抑癌基因,该基因的异常与超过半数的肿瘤相关。p53 还是一个转录因子,与很多靶基因有关,影响细胞凋亡或细胞周期的调控过程,比如编码细胞周期依赖性蛋白激酶抑制蛋白的 p21 基因和凋亡前体蛋白 BAX 的编码基因等。

综上所述,本研究发现小细胞肺癌与吸烟有关,且吸烟会引起基因突变位点数量的增加。小细胞肺癌与 Wnt 信号通路、钙粘蛋白信号通路、烟碱乙酰胆碱受体信号通路有关,可能与 PIK3CG、ERBB4 基因密切相关。

参考文献:

[1]Torre LA,Bray F,Siegel RL,et al.Global cancer statistics,2012[J].CA Cancer J Clin,2015,65(2):87-108.

[2]Dong J,Hu Z,Wu C,et al.Association analyses identify multiple new lung cancer susceptibility loci and their interactions with smoking in the Chinese population [J].Nat Genet,2012,44(8):895-899.

[3]García Campelo MR,Alonso Curbera G,Aparicio Gallego G,et al.Stem cell and lung cancer development:blaming the Wnt, Hh and Notch signalling pathway [J].Clin Transl Oncol,2011,13(2):77-83.

[4]Chen W,Zheng R,Baade PD,et al.Cancer statistics in China, 2015[J].CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.

[5]Tonini G,D'Onofrio L,Dell'Aquila E,et al.New molecular insights in tobacco-induced lung cancer [J].Future Oncol,2013(9): 649-655.

[6]Wallis CJD,Satkunasivam R,Butaney M,et al.Association Between Smoking and Survival Benefit of Immunotherapy in Advanced Malignancies:A Systematic Review and Meta-Analysis[J].Am J Clin Oncol,2019,42(9):1.

[7]Vaughan AE,Halbert CL,Wootton SK,et al.Lung cancer in mice induced by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is not maintained by rare cancer stem cells,but tumorigenicity does correlate with Wnt pathway activation[J].Mol Cancer Res, 2012,10(1):86-95.

[8]Schuller HM.Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors[J].Nat Rev Cancer,2009,9(3):195-205.

[9]Kase S,Sugio K,Yamazaki K,et al.Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance[J].Clin Cancer Res,2000,6(12):4789-4796.

[10]Kurppa KJ,Denessiouk K,Johnson MS,et al.Activating ERBB4 mutations in non-small cell lung cancer [J].Oncogene, 2016,35(10):1283-1291.

[11]Tan X,Chen M.MYLK and MYL9 expression in non-small cell lung cancer identified by bioinformatics analysis of public expression data[J].Tumour Biol,2014,35(12):12189-12200.

[12]Peifer M,Fernández-Cuesta L,Sos ML,et al.Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer[J].Nat Genet,2012,44(10):1104-1110.

[13]Westhoff B,Colaluca IN,D'Ario G,et al.Alterations of the Notch pathway in lung cancer [J].Proc Natl Acad Sci USA, 2009,106(52):22293-22298.

[14]Fernandez-Cuesta L,Peifer M,Lu X,et al.Frequent mutations in chromatin-remodelling genes in pulmonary carcinoids[J].Nat Commun,2014(5):3518.

收稿日期:2019-09-02;修回日期:2019-10-24

编辑/钱洪飞