

·专题·

# 基于生物信息学检测 NSUN2 基因在胶质瘤中的表达及临床意义

张 群<sup>1</sup>, 田秋思<sup>2</sup>, 唐铖铖<sup>1</sup>, 冯 光<sup>1</sup>, 路宏朝<sup>1</sup>

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000;

2. 三二〇一医院神经外科, 陕西 汉中 723000)

**摘要:**目的 探究 NSUN2 基因在多形性胶质瘤 (GBM) 中的表达及临床意义。方法 从 TCGA 数据库下载正常脑组织和 GBM 组织测序数据及临床信息, 采用 R 语言分析 NSUN2 基因的表达差异及其与临床病理特征的关系, 利用单因素和多因素 Cox 回归模型分析 GBM 发生发展相关风险因素, CSEA 软件分析 NSUN2 基因可能参与的信号通路, 实时荧光定量 PCR (qPCR) 和免疫组织化学 (IHC) 对胶质瘤组织和癌旁组织进行 mRNA 和蛋白质表达水平验证分析。结果 GBM 组织中 NSUN2 表达高于正常组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 不同年龄、WHO 分级、应答深度及 IDH 分型的 GBM 组织中 NSUN2 表达比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 单因素和多因素 Cox 回归分析显示, NSUN2 基因可作为 GBM 的独立预后因素。CSEA 结果显示, NSUN2 高表达与肿瘤相关通路相关; qPCR 和 IHC 实验显示, 与癌旁组织相比, 胶质瘤组织中 NSUN2 基因的 mRNA 和蛋白质表达水平更高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 GBM 组织中 NSUN2 基因高表达且和病理特征相关, 可能通过参与蛋白质相关的代谢促进 GBM 的发展, 可作为 GBM 的预后标志物。

**关键词:** 胶质瘤; NSUN2; 癌症基因组图谱; 肿瘤标志物

中图分类号: R737.11

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2022.04.001

文章编号: 1006-1959(2022)04-0001-05

## Detection of NSUN2 Gene Expression in Glioma Based on Bioinformatics and its Clinical Significance

ZHANG Qun<sup>1</sup>, TIAN Qiu-si<sup>2</sup>, TANG Cheng-cheng<sup>1</sup>, FENG Guang<sup>1</sup>, LU Hong-chao<sup>1</sup>

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, Shaanxi, China;

2. Department of Neurosurgery, 3201 Hospital, Hanzhong 723000, Shaanxi, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the expression and clinical significance of NSUN2 gene in glioblastoma multiforme (GBM). **Methods** The sequencing data and clinical information of normal brain tissue and GBM tissue were downloaded from TCGA database. The expression difference of NSUN2 gene and its relationship with clinical pathological characteristics were analyzed by R language. The risk factors related to the occurrence and development of GBM were analyzed by univariate and multivariate Cox regression models. CSEA software was used to analyze the possible signaling pathways involved in NSUN2 gene. Real-time quantitative PCR (qPCR) and immunohistochemistry (IHC) were used to verify and analyze the mRNA and protein expression levels tissues and adjacent tissues. **Results** The expression of NSUN2 in GBM was higher than that in normal tissues, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression of NSUN2 in GBM tissues with different age, WHO grade, response depth and IDH classification was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Univariate and multivariate Cox regression analysis showed that NSUN2 gene was an independent prognostic factor for GBM. CSEA results showed that the high expression of NSUN2 was related to tumor-related pathways; qPCR and IHC experiments showed that the mRNA and protein expression levels of NSUN2 gene in glioma tissues were higher than those in adjacent tissues, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The high expression of NSUN2 gene in GBM tissue is related to pathological characteristics, which may promote the development of GBM by participating in protein-related metabolism and can be used as a prognostic marker of GBM.

**Key words:** Glioma; NSUN2; Cancer genome map; Tumor markers

人脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤, 预后差, 其中以多形性胶质瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 恶性程度最高, 患者总生存时间仅 10~15 个月<sup>[1]</sup>。人脑胶质瘤的发病机制非常复杂, 具体机制仍不清楚。相关基因表达异常在人脑胶质瘤尤其是 NSUN2 的发生、发展中起着至关重要的作用<sup>[2]</sup>。因此, 筛选人脑胶质瘤特异且敏感的差异表达基因有助于认识人脑胶质瘤, 同时有利于人脑胶质瘤的早期诊断和精准治疗。5-甲基细胞嘧啶 (m5C) 通过 RNA 代谢调节, 特别是 RNA 稳

定性、RNA 导出 RNA、mRNA 翻译和 RNA 处理参与肿瘤的发生<sup>[3,4]</sup>。NOP2/Sun 结构域家族成员 2 (NSUN2) 也被称为 MYC 诱导的 SUN 结构域含蛋白 (Misu), 是催化 m5C 形成的主要 m5C 修饰酶。根据免疫组化 (IHC) 分析, NSUN2 在各种肿瘤中均高度表达, 包括食管、肝脏、胰腺、子宫颈、肾、胃、甲状腺和乳腺癌<sup>[5-8]</sup>。研究表明<sup>[4]</sup>, NSUN2 通过与其 3'-UTR 中的 m5C 修饰位点结合稳定 HDGF 癌基因的 mRNA 来促进膀胱癌的进展。然而, 关于 NSUN2 在神经胶质瘤中的作用的研究还很少。本研究使用癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据集分析 NSUN2 基因在正常脑组织与 GBM 中的表达差异, 以及 NSUN2 与 GBM 患者临床病理特征的相关性, 旨在为深入研究 GBM 的靶向治疗提供思路。

作者简介: 张群 (1990.12-), 女, 陕西汉中, 硕士研究生, 主要从事细胞生物学研究

通讯作者: 路宏朝 (1980.10-), 女, 陕西勉县人, 博士, 教授, 主要从事细胞工程学研究

## 1 资料与方法

**1.1 数据来源** 从 TCGA (<https://cancergenome.nih.gov/>) 数据库下载 GBM 的 mRNA 表达谱数据, 包含 1150 例正常脑组织和 689 例 GBM 组织, 同时下载对应的患者临床资料, 采用 R 软件和 Perl 语言预处理数据。

**1.2 数据集筛选和差异表达分析** 剔除 TCGA 数据集中临床病理参数不完整及缺乏预后随访资料的样本, 仅保留同时包含临床参数和生存数据的样本, 利用 Wilcoxon 秩和检验确定 NSUN2 基因在正常脑组织和 GBM 组织中的表达差异, 采用 R 软件 (3.5.2) 的 “limma” 软件包完成差异分析并绘制差异散点图<sup>[9]</sup>。

**1.3 生存分析与临床相关性分析** 根据样本中 NSUN2 基因表达的中位值将 NSUN2 分为高表达组和低表达组, 采用 R 软件的 “survival” 软件包进行生存分析, 采用 “survminer” 软件包绘制生存曲线, 单因素和多因素 Cox 风险模型分析临床参数与 GBM 预后的关系, 并计算风险比 (hazard ratio, HR)。

**1.4 基因集富集分析** 采用 CSEA 软件 (4.0.2) (<http://lsoftware.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) 进行富集分析。采用 CSEA 网站的 MsigDB 数据库获取 c2.cp.kegg.v7.0.symbols.gmt 数据集, 设置分析置换次数为 1000 次, 显著富集基因集需满足以下条件: 错误发现率 (false discovery rates, FDR) < 0.25,  $P < 0.05$ 。

**1.5 mRNA 和蛋白质表达验证实验** 选取符合纳入和排除标准 9 例胶质瘤组织与癌旁正常组织标本作为本实验的验证对象。纳入标准: 在西安交通大学附属三二〇一医院明确诊断为 GBM 的患者; IBM 为 18.5~25 kg/m<sup>2</sup>; 年龄 20~65 岁。排除标准: 存在严重的心、肺、肾等严重的内科合并症; 临床资料不完整。按照 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA 后, 采用逆转录试剂盒 (Accurate) 进行 RNA 逆转录实验。逆转录后的 cDNA 用于进行实时荧光定量实验, 以小鼠 GAPDH 作为内参。同时, 选取的 5 例患者标本

所制作的 5 组 GBM 组织和癌旁组织的石蜡切片, 将 5 组患者胶质瘤与癌旁标本通过三步法进行 NSUN2 作为一抗的免疫染色, 观察免疫染色后的阳性结果的表达, 本实验采用 DAB 染色, 阳性结果显色为黄褐色。其中一抗采用 Cell Signaling Technology 的 NSUN2 兔源多克隆抗体。引物序列见表 1。

表 1 各蛋白基因引物序列

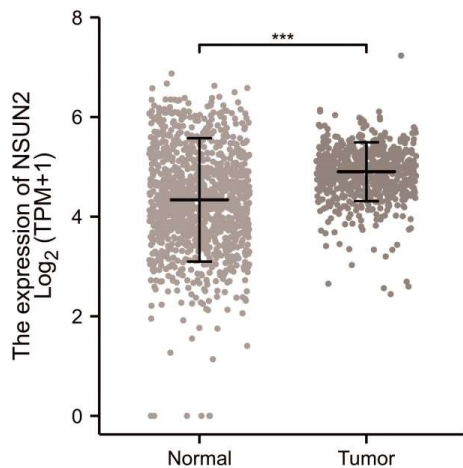
基因	引物
NSUN2	上游: 5'-CTGCTACCTGCTCGTCC-3'
	下游: 5'-TCATAGTGCCGTCTCCA-3'
GAPDH	下游: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'
	下游: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用配对  $t$  检验; 计数资料以 (%) 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验, 采用单因素和多因素 Cox 回归分析挑选预后相关因子, 相关性分析采用皮尔森相关分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 NSUN2 在 GBM 组织中的表达情况** NSUN2 在 GBM 组织中的表达高于正常脑组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

**2.2 NSUN2 表达情况与 GBM 患者临床病理特征的关系** NSUN2 表达与 GBM 患者预后呈负相关, 见图 2。不同年龄、临床分期、TP53 分型的 GBM 患者 NSUN2 表达比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 不同性别的 GBM 患者 NSUN2 表达比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 3。单因素 Cox 回归分析显示, NSUN2 mRNA 的高表达、WHO 分级、应答深度、1p/19q 杂合性缺失以及 IDH1 基因野生型可降低患者的总生存期, 性别与患者预后无关; 将上述有统计学意义的因素纳入多因素的 Cox 回归模型分析, 结果显示治疗结果、IDH1 基因野生型和年龄是患者总生存期的独立影响因素, 见表 2。



注: \*\*\* $P < 0.05$

图 1 NSUN2 在 GBM 组织中的表达情况

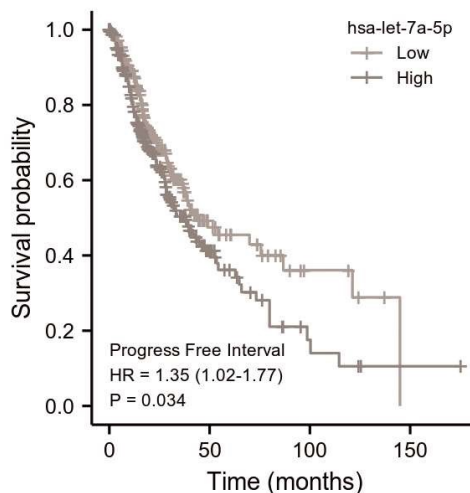
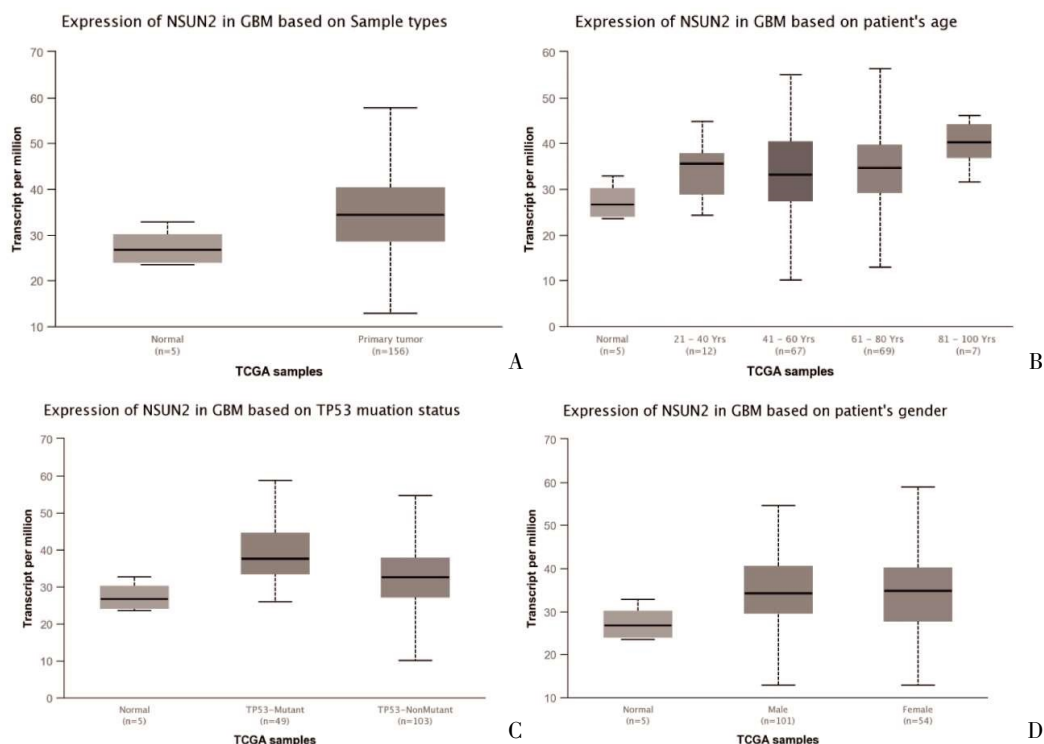


图 2 NSUN2 基因 mRNA 表达与 GBM 患者预后的相关性



注: A、B、C、D 分别表示 NSUN2 表达水平与肿瘤类型、患者年龄、TP53 分型、患者性别的关系

图 3 NSUN2 表达与临床病理特征的关系

表 2 GBM 预后影响因素的单因素、多因素 Cox 回归分析

项目	n	单因素分析		多因素分析	
		HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
WHO 分级(G <sub>3</sub> &G <sub>4</sub> vs. G <sub>2</sub> )	634	5.642 (3.926~8.109)	0.000	1.652 (1.023~2.669)	0.040
1p/19q 杂合性缺失(non-codel vs. codel)	688	4.428 (2.885~6.799)	0.000	1.725 (0.960~3.101)	0.068
治疗结果(PR&CR vs. PD&SD)	461	0.209 (0.120~0.366)	0.000	0.298 (0.161~0.553)	0.000
性别(男 vs. 女)	695	1.262 (0.988~1.610)	0.062	1.603 (1.036~2.481)	0.034
年龄(>60 岁 vs. ≤60 岁)	695	4.668 (3.598~6.056)	0.000	3.972 (2.414~6.537)	0.000
IDH 突变(Mut vs. WT)	685	0.117 (0.090~0.152)	0.000	0.384 (0.237~0.622)	0.000
NSUN2(High vs. Low)	695	1.378 (1.084~1.750)	0.009	1.310 (0.852~2.016)	0.219

2.3 基因集富集分析 GSEA 分析结果表明,NSUN2 基因高表达组 GBM 样本主要富集于视网膜母细胞瘤、合成蛋白、整合素、反应性胶原形成信号通路,见图 4。

2.4 NSUN2 mRNA 在 GBM 组织中的表达情况 q-PCR 实验显示,NSUN2 mRNA 的表达在 GBM 组织中上调,见图 5,其中 NSUN2 mRNA 在 GBM 组织中的表达量高于癌旁组织,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。IHC 实验结果显示,NSUN2 在 GBM 组织呈中等程度的胞核阳性,且 NSUN2 mRNA 在 GBM 组织的表达水平高于癌旁组织,见图 6。

### 3 讨论

本研究显示,NSUN2 在 GBM 中的表达高于癌旁组织组,NSUN2 高表达组的总生存期低于低表达组( $P<0.05$ ),提示 NSUN2 高表达是 GBM 患者预后的危险因素。另外,本研究采用 qPCR 技术和 IHC 实

验验证了胶质瘤组织中 NSUN2 表达上调。有报道显示,包括 NSUN2 在内的几种 RNMT 的表达在 DNA 拷贝数和 mRNA 表达之间具有正相关性,并且与乳腺癌患者的更高级别侵袭性亚型和不良预后相关<sup>[10]</sup>。在皮肤癌中,NSUN2 的表达缺失与恶性肿瘤的增加相关<sup>[11]</sup>。在卵巢癌中,NSUN2 低表达和 IGF2 高表达的患者具有较差的总体和无疾病进展生存率,因此 NSUN2/IGF2 信号已被确定具有预后生存价值<sup>[12]</sup>。另有研究发现,NSUN2 在头颈部鳞状细胞癌(HN-SCC)中的表达上调约 2 倍,这与患者的总生存期缩短和较高的死亡率风险相关<sup>[13]</sup>。此外,NSUN2 高表达与 HNSCC 中的 T 细胞活化相关,NSUN2 低表达患者的 T 细胞活化评分与死亡率之间存在正相关,这表明 HNSCC 中 NSUN2 表达可作为免疫检查点的标志物<sup>[14]</sup>。有研究明确了 NSUN2 在胃癌中的作用,发现 NSUN2 通过以 m5C 依赖的方式抑制细胞

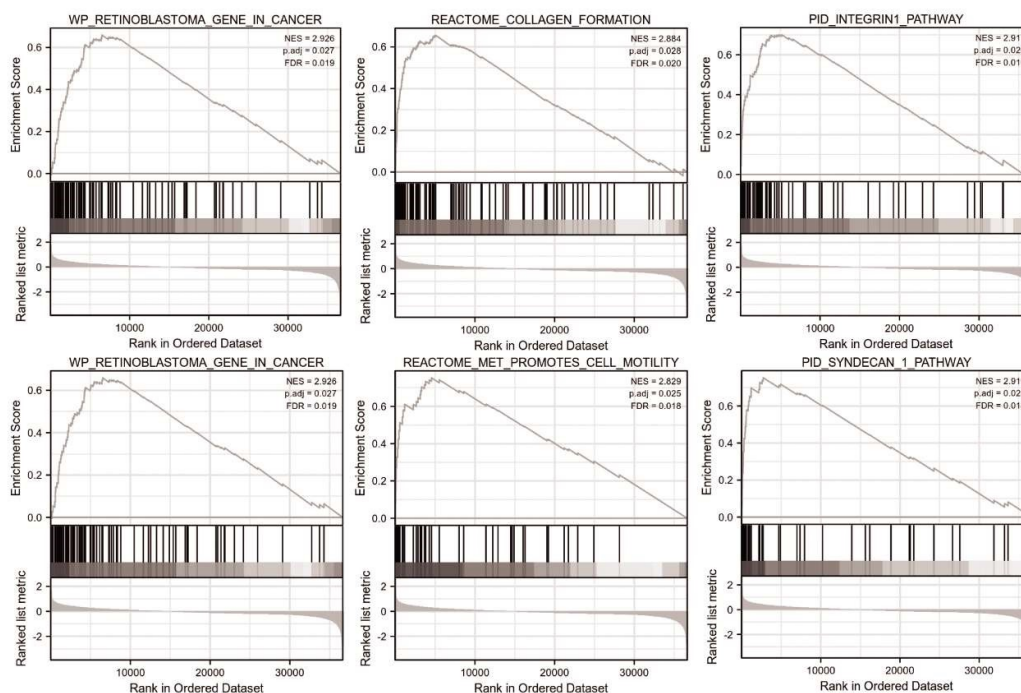


图 4 NSUN2 相关富集基因集

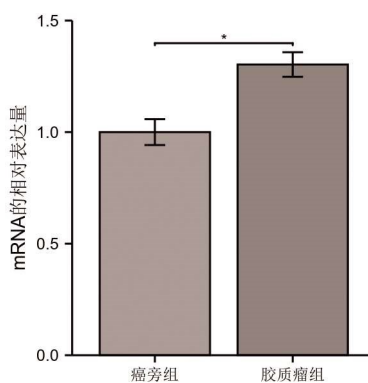


图 5 NSUN2 mRNA 在 GBM 组织和癌旁组织的表达比较

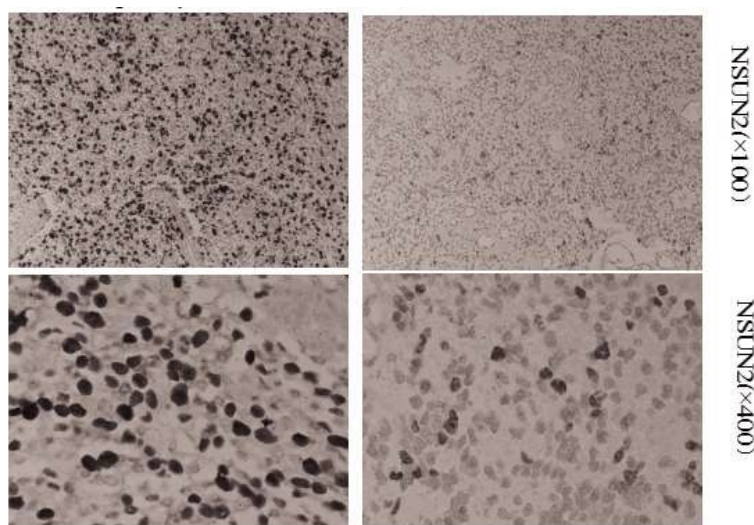


图 6 NSUN2 蛋白在 GBM 组织和癌旁组织的表达比较

周期蛋白依赖性激酶 p57Kip2, 在体外和体内促进癌细胞增殖<sup>[15]</sup>。这些研究均证明了 NSUN2 在肿瘤中的重要作用, 但 NSUN2 在胶质瘤中的作用还需

要进一步阐明。

本研究中, 单因素和多因素 Cox 的分型显示, NSUN2 和病理分级在 GBM 中是两个独立预后因



子。在与 GBM 患者临床特征关系的研究中发现,不同年龄、病理分级、性别以及肿瘤分期的 GBM 患者 NSUN2 表达均有差异。进一步对 NSUN2 高低表达组进行差异分析,并对所得的差异基因进行功能富集,发现差异基因主要和整合素及蛋白聚糖相关通路有关,这也提示蛋白代谢可能参与 GBM 的发生发展。蛋白质合成是所有细胞的基本过程,但其在发育、干细胞和癌症中的精确调控作用尚不清楚。研究显示,NSUN2 在 m5C 转录后甲基化转移 RNA (TRNA) 是一种新的抑制蛋白质合成的机制<sup>[16,17]</sup>。NSUN2 的缺失导致 tRNA 的低甲基化,使血管生成素能够内切 tRNA,并积累 5'tRNA 片段<sup>[16-19]</sup>,这些片段可抑制帽依赖的蛋白质翻译<sup>[20-22]</sup>,这与 GSEA 富集的结果一致。还有研究显示<sup>[23]</sup>,NSUN2 基因双等位基因功能的缺失变异与青少年白内障或脑异常疾病相关,提示 NSUN2 与 GBM 存在的相关性。GSEA 分析显示,NSUN2 高表达组在视网膜母细胞瘤相关通路中有显著富集。

综上所述,GBM 组织中 NSUN2 基因呈高表达状态,并且与患者的临床病理特征密切相关,可以为 GBM 诊断和治疗的提供新思路。

#### 参考文献:

- [1]刘宝辉,董慧敏,胡伟国,等.脑胶质瘤多学科诊疗模式的必要性及策略[J].中国临床神经外科杂志,2020,25(10):731-733.
- [2]Li X,Meng Y.Construction of a SUMOylation regulator-based prognostic model in low-grade glioma[J].J Cell Mol Med, 2021,25(12):5434-5442.
- [3]Trixl L,Lusser A.The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark[J].Wiley Interdiscip Rev RNA,2019,10(1):e1510.
- [4]Chen X,Li A,Sun BF,et al.5-methylcytosine promotes pathogenesis of bladder cancer through stabilizing mRNAs[J].Nat Cell Biol,2019,21(8):978-990.
- [5]Okamoto M,Hirata S,Sato S,et al.Frequent increased gene copy number and high protein expression of tRNA (cytosine-5)-methyltransferase (NSUN2) in human cancers[J].DNA Cell Biol,2012,31(5):660-671.
- [6]Frye M,Dragoni I,Chin SF,et al.Genomic gain of 5p15 leads to over-expression of Misu (NSUN2) in breast cancer[J].Cancer Lett,2010,289(1):71-80.
- [7]Chen RX,Chen X,Xia LP,et al.N(6)-methyladenosine modification of circNSUN2 facilitates cytoplasmic export and stabilizes HMGA2 to promote colorectal liver metastasis[J].Nat Commun,2019,10(1):4695.
- [8]Li Y,Li J,Luo M,et al.Novel long noncoding RNA NMR promotes tumor progression via NSUN2 and BPTF in esophageal squamous cell carcinoma[J].Cancer Lett,2018(430):57-66.
- [9]Ritchie ME,Phipson B,Wu D,et al.limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J].Nucleic Acids Res,2015,43(7):e47.
- [10]Manning M,Jiang Y,Wang R,et al.Pan-cancer analysis of RNA methyltransferases identifies FTSJ3 as a potential regulator of breast cancer progression[J].RNA Biol,2020,17(4):474-486.
- [11]Blanco S,Bandiera R,Popis M,et al.Stem cell function and stress response are controlled by protein synthesis[J].Nature, 2016,534(7607):335-340.
- [12]Yang JC,Risch E,Zhang M,et al.Association of tRNA methyltransferase NSUN2/IGF-II molecular signature with ovarian cancer survival[J].Future Oncol,2017,13(22):1981-1990.
- [13]Lu L,Zhu G,Zeng H,et al.High tRNA Transferase NSUN2 Gene Expression is Associated with Poor Prognosis in Head and Neck Squamous Carcinoma[J].Cancer Invest,2018,36(4):246-253.
- [14]Lu L,Gaffney SG,Cannataro VL,et al.Transfer RNA methyltransferase gene NSUN2 mRNA expression modifies the effect of T cell activation score on patient survival in head and neck squamous carcinoma[J].Oral Oncol,2020(101):104554.
- [15]Mei L,Shen C,Miao R,et al.RNA methyltransferase NSUN2 promotes gastric cancer cell proliferation by repressing p57(Kip2) by an m(5)C-dependent manner[J].Cell Death Dis, 2020,11(4):270.
- [16]Blanco S,Dietmann S,Flores JV,et al.Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders[J].EMBO J,2014,33(18):2020-2039.
- [17]Tuorto F,Liebers R,Musch T,et al.RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis[J].Nat Struct Mol Biol,2012,19(9):900-905.
- [18]Jeltsch A,Ehrenhofer-Murray A,Jurkowski TP,et al.Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation[J].RNA Biol,2017,14(9):1108-1123.
- [19]Spriggs KA,Bushell M,Willis AE.Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress[J].Mol Cell, 2010,40(2):228-237.
- [20]Gebetsberger J,Zywicki M,Kunzi A,et al.tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii* [J].Archaea,2012(2012):260909.
- [21]Li Q,Hu B,Hu GW,et al.tRNA-Derived Small Non-Coding RNAs in Response to Ischemia Inhibit Angiogenesis[J].Sci Rep,2016(6):20850.
- [22]Keam SP,Sobala A,Ten HS,et al.tRNA-Derived RNA Fragments Associate with Human Multisynthetase Complex (MSC) and Modulate Ribosomal Protein Translation[J].J Proteome Res,2017,16(2):413-420.
- [23]Kato K,Mizuno S,Morton J,et al.Expanding the phenotype of biallelic loss-of-function variants in the NSUN2 gene: Description of four individuals with juvenile cataract, chronic nephritis, or brain anomaly as novel complications[J].Am J Med Genet A,2021,185(1):282-285.

收稿日期:2021-08-19;修回日期:2021-08-30

编辑/成森