

基于生物信息学方法筛选 PTCL-NOS 关键基因及治疗药物

张洪禄^{1,2}, 滕悦¹, 汤唯艳¹, 汤依群², 吴剑秋¹

(1.江苏省肿瘤医院内科, 江苏 南京 210000;

2.中国药科大学基础医学与临床药学院, 江苏 南京 210000)

摘要:目的 分析非特指性外周 T 细胞淋巴瘤(PTCL-NOS)表达出现差异的基因和信号通路并预测可能对 PTCL-NOS 产生治疗效果的药物,为今后的研究提供线索。方法 从基因数据库(GEO)中下载基因数据集 GSE132550,使用 R 语言软件及其附加包进行分析获得 PTCL-NOS 中的差异基因,将差异基因上传到在线数据库进行基因富集分析,并构建蛋白质交互网络;使用 Cytoscape 软件进行关键基因筛选,并使用 DGIdb 数据库进行针对关键基因的药物预测。结果 共获得 1139 个存在差异表达的基因,包括 670 个上调基因和 469 个下调基因;KEGG 信号通路中差异基因主要富集于 PI3K-AKT 信号通路,细胞外基质受体相互作用通路和阿米巴病相关信号通路;BP 注释中差异基因主要存在于细胞外基质组织、细胞外结构组织和细胞连接组件;CC 注释中差异基因主要涉及胶原蛋白-细胞外间质、基底膜和胶原三聚体的组成成分;MF 注释中差异基因与细胞外基质结构成分、生长因子结合和胶原蛋白结合密切相关;差异基因主要包含在 G 蛋白偶联受体信号通路、胞外区和质膜中;药物-基因相交作用分析发现了 105 个药物(其中包括 90 种针对 ADRA2A 的药物)靶向 9 个特定基因(ADRA2A, S1PR1, S1PR3, S1PR4, CP, FN1, APOE, SERPINA1, C3)。结论 PI3K-AKT 信号通路可能成为 PTCL-NOS 潜在的临床干预靶点,芬戈莫德、西尼莫得等药物可能对 PTCL-NOS 的治疗提供新的方向。

关键词:非特指性外周 T 细胞淋巴瘤;差异基因;药物筛选;PI3K-AKT 信号通路;芬戈莫德;西尼莫得

中图分类号:R733.4

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.12.008

文章编号:1006-1959(2022)12-0032-06

Screening of PTCL-NOS Key Genes and Therapeutic Drugs Based on Bioinformatics Methods

ZHANG Hong-lu^{1,2}, TENG Yue¹, TANG Wei-yan¹, TANG Yi-qun², WU Jian-qiu¹

(1.Department of Internal Medicine, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210000, Jiangsu, China;

2.College of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To analyze the different expression genes and signal pathways of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified (PTCL-NOS), and to predict the drugs that may have therapeutic effect on PTCL-NOS, in order to provide clues for future research. **Methods** The gene data set GSE132550 was downloaded from the gene database (GEO), and the differential genes were obtained by using R language software and its additional package. The differential genes were uploaded to the online database for gene enrichment analysis, and the protein interaction network was constructed. Cytoscape software was used for key gene screening, and DGIdb database was used for drug prediction for key genes. **Results** A total of 1139 differentially expressed genes were obtained, including 670 up-regulated genes and 469 down-regulated genes. The differential genes in the KEGG signaling pathway were mainly enriched in the PI3K-AKT signaling pathway, the extracellular matrix receptor interaction pathway and the Amiba disease-related signaling pathway. The differential genes in BP annotation mainly existed in extracellular matrix tissues, extracellular structure tissues and cell junctional components; the differential genes in CC annotation mainly involve the components of collagen-extracellular matrix, basement membrane and collagen trimer; the differential genes in MF annotation were closely related to the structural components of extracellular matrix, growth factor binding and collagen binding. Differential genes were mainly included in G protein-coupled receptor signaling pathway, extracellular region and plasma membrane; drug-gene interaction analysis showed that 105 drugs (including 90 drugs for ADRA2A) targeted 9 specific genes (ADRA2A, S1PR1, S1PR3, S1PR4, CP, FN1, APOE, SERPINA1, C3). **Conclusion** PI3K-Akt signaling pathway may become a potential clinical intervention target of PTCL-NOS. Fingolimod, siponimod, and other drugs may provide a new direction for the treatment of PTCL-NOS.

Key words: Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified; Differential genes; Drug screening; PI3K-AKT signaling pathway; Fingolimod; Siponimod

非特指性外周 T 细胞淋巴瘤(PTCL-NOS)是外周 T 细胞淋巴瘤(PTCL)中最常见的类型,超过 30%的 PTCL 患者被归类于 PTCL-NOS^[1]。由于 PTCL-NOS 具

有高度异质性和耐药性,目前所采用的一线方案是沿袭 B 细胞淋巴瘤治疗方案而来,绝大部分治疗方案缺乏高水平的证据或生物学基础^[2]。虽然近年来不断有针对 PTCL-NOS 的新药面世,但此类患者与 B 细胞淋巴瘤患者相比仍存在预后差、复发率高的问题,因此阐明 PTCL-NOS 的分子机制和寻找有效药物对该病的治疗尤为重要。近年来,生物信息学技术在确定疾病潜在的关键基因靶点、信号途径,疾病诊断和疾病发生的预测等多方面发挥着越来越重要的作用。本研究使用 R 语言软件与在线生物信息学

基金项目:1.江苏省卫生健康委科研项目(编号:H2019100);2.希思科-罗氏肿瘤研究基金(编号:Y-2019Roche-075)

作者简介:张洪禄(1996.11-),男,黑龙江鸡西人,硕士研究生,主要从事肿瘤学研究

通讯作者:吴剑秋(1970.2-),男,江苏南京人,博士,主任医师,主要从事淋巴瘤的诊治研究

分析工具,筛选影响 PTCL-NOS 的关键信号通路和差异表达基因,并对可能对 PTCL-NOS 产生治疗作用的药物进行筛选,以期为 PTCL-NOS 的研究和治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 GEO 基因芯片的获取和分析 登录美国国立生物中心基因数据库(NCBI-GEO)网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),将筛选研究类型设置为 expressionprofilingbyarray,筛选种属为 homospiciens,检索词为 expression data from PTCL 后,检索到 GSE132550 芯片数据集,GSE132550 芯片数据集中包含了 68 个 PTCL-NOS 患者的样本,18 个 Lennert 淋巴瘤患者样本和 16 个来自于健康志愿者 T 细胞的样本。下载 GSE132550 的表达谱(.txt 格式文件)和相关临床信息(.soft 格式文件)。应用 GPL18281 平台对其进行表达谱注释分析。选取 GSE132550 芯片数据集中 PTCL-NOS 和健康志愿者的样本进行进一步研究。

1.2 差异基因表达分析 通过 R 语言对芯片数据进行质量分析和标准化处理。为提高差异基因分析的准确性,将差异基因分析阈值设定为 $|\text{Log}_2\text{FC}(\text{fold-change})| > 4, P < 0.01$ 。在 R 语言中加载附加模块 Limma 包和 affyPLM 包,对 PTCL-NOS 样本和健康 T 细胞样本进行差异基因的表达分析^[3]。

1.3 基因本体论与 KEGG 途径富集分析 将之前所

获得的差异基因上传至生物信息学微阵列分析数据库 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) 以获得基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路分析结果。GO 的结果包括生物学的 3 个方面:细胞构成(cell components,CC)、分子功能(molecular functions,MF)和生物学过程(biological processes,BP)。

1.4 差异基因的蛋白质交互网络富集分析 STRING (11.0 版)(<https://string-db.org/>) 是一个在线数据库,包含已知和预测的蛋白质-蛋白质相交互用(PPI)^[4]。将所有差异基因上传到 STRING 中,并将最小交互分数设置为 0.9(最高条件)以上作为显著阈值。将所获得的 PPI(.TSV 格式文件)上传到 Cytoscape 软件以构建 PPI 网络^[5]。随后,采用 Cytoscape 软件内的分子复合物检测(MCODE)-app 技术来识别关键基因间的连接网络。MCODE 中的所有参数设置为 default。

1.5 药物-基因相互作用分析 DGIdb(<https://www.dgldb.org>) 是一个基于数十个可信数据库的,用于筛选分析药物-基因相互作用的在线数据库^[6]。将 MCODE 获得的关键基因上传到 DGIdb 中,以搜索现有的药物-基因相互作用,并利用与药物匹配的关键基因进行功能富集分析。

1.6 统计学分析 所有的统计分析均由 R 软件(4.0.2)进行,整个分析流程见图 1。

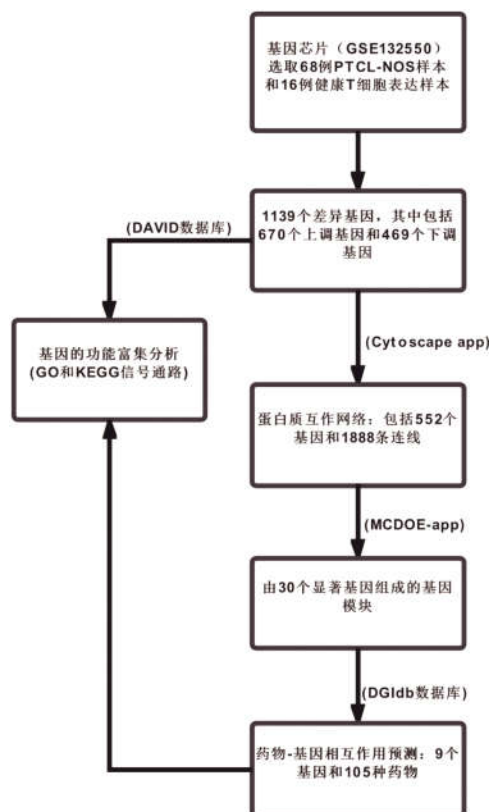


图 1 数据分析流程

2 结果

2.1 差异表达基因的获取 用 R 软件分析 GSE132550 数据集中 PTCL-NOS 样本和健康 T 细胞样本,根据 $|\text{Log}_2\text{FC}| > 4$, $P < 0.01$ 的筛选标准,共获得 1139 个存在差异表达的基因,其中包括 670 个上调基因和 469 个下调基因,见图 2。

2.2 GO 与 KEGG 信号通路的富集分析 将所有的差异基因上传到 DAVID 数据库进行 GO 富集分析,得到差异基因的主要富集项目,包括 KEGG 信号通路、BP、CC 和 MF。在 KEGG 信号通路中差异基因主要富集于 PI3K-AKT 信号通路,细胞外基质受体相互作用通路和阿米巴病相关信号通路,见图 3;BP 注释中差异基因主要存在于细胞外基质组织、细胞外结构组织和细胞连接组件,见图 4;CC 注释中差异基因主要涉及胶原蛋白-细胞外间质、基底膜和胶原三聚体的组成成分,见图 5;MF 注释中差异基

因与细胞外基质结构成分、生长因子结合和胶原蛋白结合密切相关,见图 6。

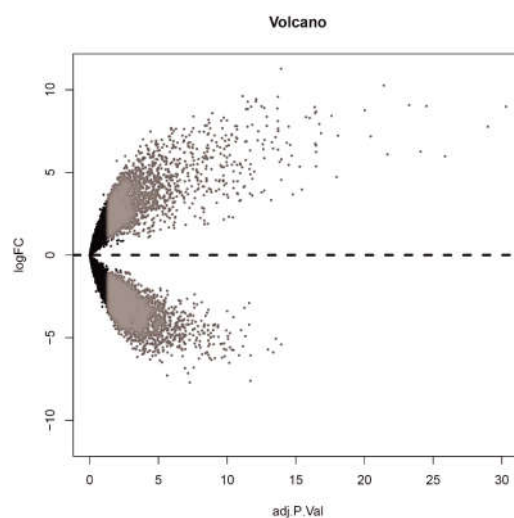


图 2 1139 个差异基因的火山图

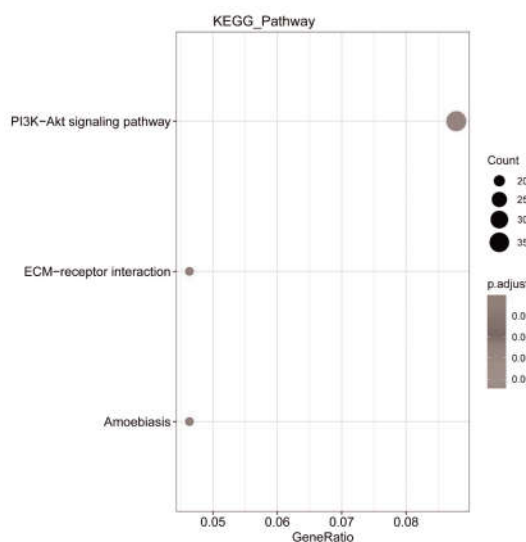


图 3 KEGG 信号通路富集结果

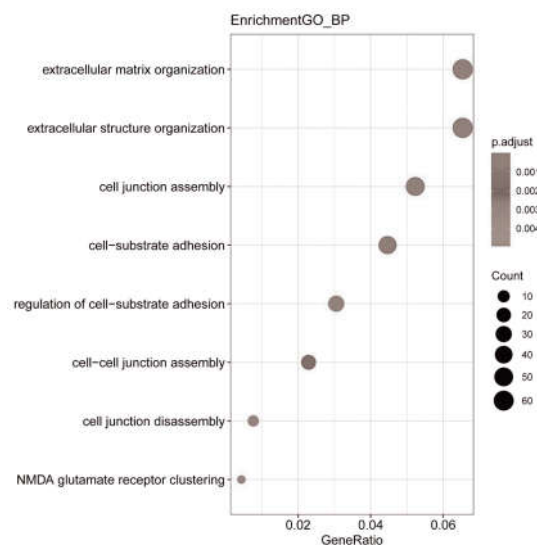


图 4 BP 富集结果

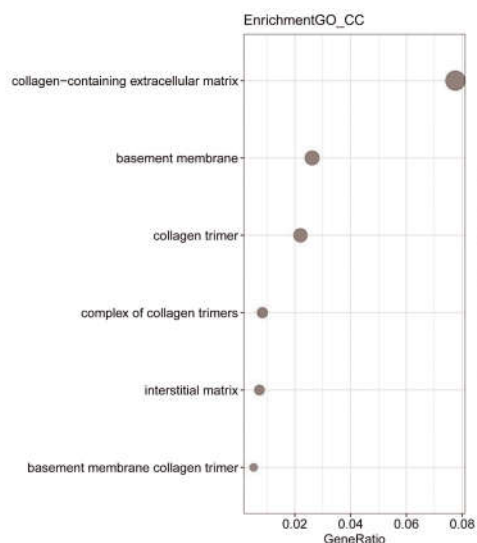


图 5 CC 富集结果

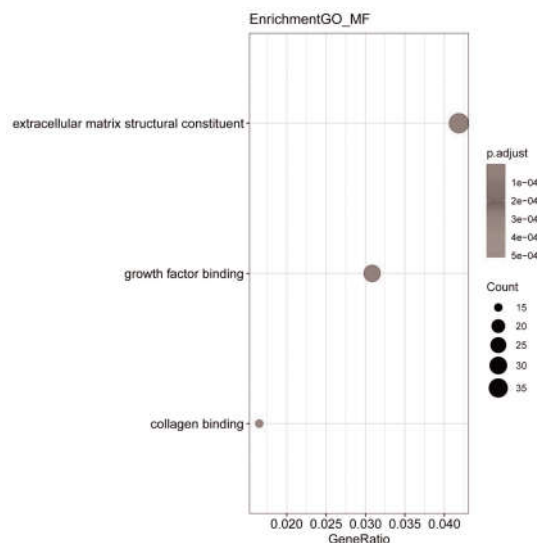


图 6 MF 富集结果

2.3 PPI 富集分析 将 1139 个差异基因上传到 STRING 数据库进行 PPI 富集分析,得到包含 552 个基因节点和 1888 条连线的 PPI 网络,使用 Cytoscape 软件中的 MCODE-app 筛选出包含显著差异基因的模块,交互模块(分数:15.655)涉及 30 个基因节点和 227 条连线,模块中的差异基因主要包含在 G 蛋白偶联受体信号通路、胞外区和质膜中,见图 7。

2.4 药物与基因的相交互用及潜在基因功能富集分

析 将 2.3 中模块 1 的 30 个 MCODE 基因上传到 DGIdb 数据库中进行药物-基因相交互用分析,在筛选出与基因存在特定交互关系的药物后,发现了 105 个药物靶向 9 个特定基因(其中包括 90 种针对 ADRA2A 的药物),所有的药物都有其初始适应证,见表 1; 这些基因主要富集在 G 蛋白偶联受体信号通路(BP)、质膜(CC)和神经活性配体-受体相交互用(KEGG 通路),见图 8、表 2。

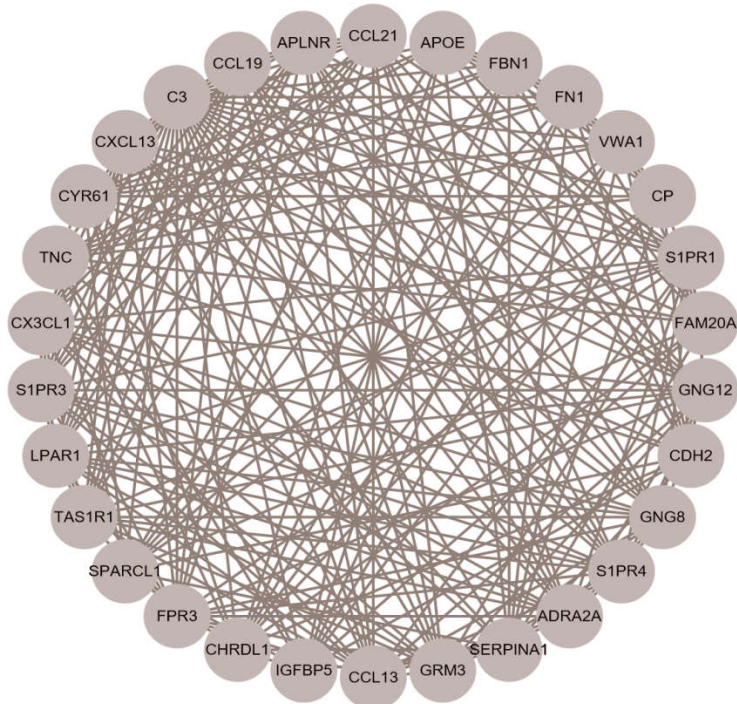


图 7 30 个显著基因组成的蛋白交互网络

表 1 基因-药物相互作用

基因	药物	相互作用关系	基因	药物	相互作用关系
ADRA2A**	BRIMONIDINE	agonist	S1PR1	SIPONIMOD	agonist
ADRA2A	LAMOTRIGINE	inhibitor	S1PR1	FINGOLIMOD	modulator,agonist
ADRA2A	APOMORPHINE	agonist	S1PR1	FINGOLIMODHYDROCHLORIDE	agonist
ADRA2A	DIHYDROERGOTAMINE	agonist	S1PR3	SIPONIMOD	agonist
ADRA2A	PROCHLORPERAZINE	antagonist	S1PR3	FINGOLIMOD	modulator
FN1	ZINCCHLORIDE	modulator,ligand	S1PR3	FINGOLIMODHYDROCHLORIDE	agonist
FN1	OCRIPLASMIN	cleavage	S1PR4	FINGOLIMOD	modulator
APOE	ZINCCHLORIDE	antagonist	S1PR4	FINGOLIMODHYDROCHLORIDE	agonist
CP	ZINCCHLORIDE	ligand	S1PR4	SIPONIMOD	agonist
C3	ZINCCHLORIDE	Inhibitor,ligand	SERPINA1	ZINCCHLORIDE	ligand

注:** 仅展示了 90 种针对 ADRA2A 药物中的 5 个

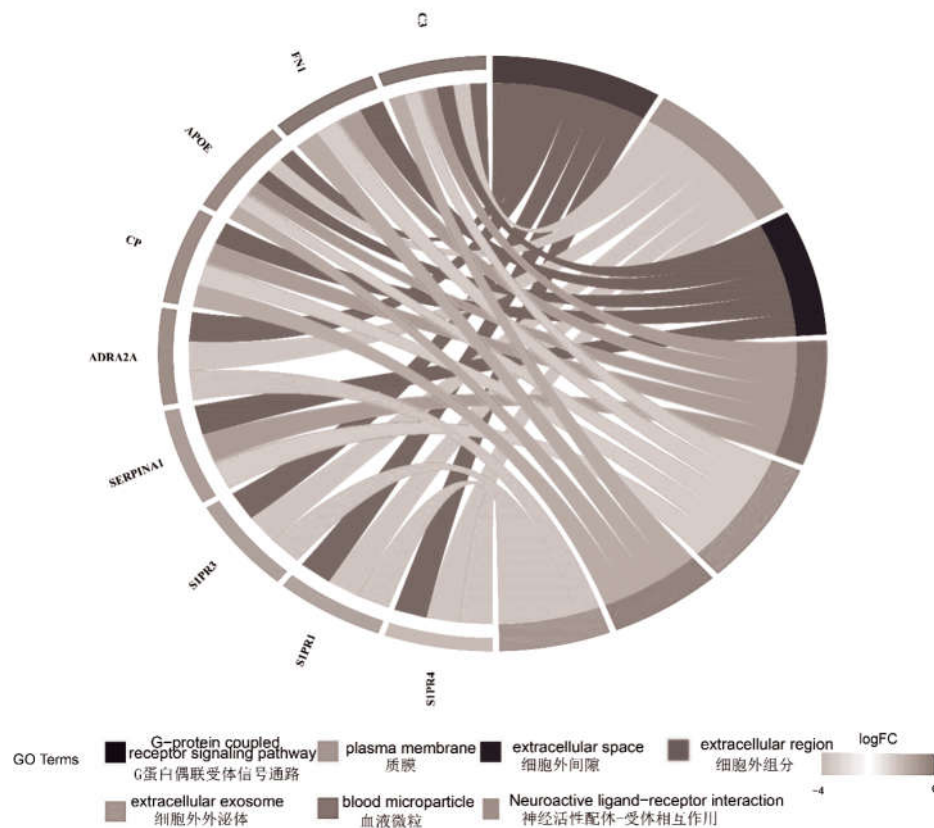


图 8 9 个存在药物-基因相交互的基因富集弦图

表 2 具有基因-药物交互结果的 9 个基因富集分析

类别	项目	基因	P
BP	G-protein coupled receptor signaling pathway	C3, S1PR1, S1PR3, APOE, S1PR4, ADRA2A	2.13E-05
CC	plasma membrane	C3, S1PR1, S1PR3, APOE, S1PR4, ADRA2A	0.017759
CC	extracellular space	C3, SERPINA1, FN1, APOE, CP	0.001633
CC	extracellular region	C3, SERPINA1, FN1, APOE, CP	0.003176
CC	extracellular exosome	C3, SERPINA1, FN1, APOE, CP	0.023489
CC	blood microparticle	C3, FN1, APOE, CP	3.09E-05
KEGG	Neuroactive ligand-receptor interaction	S1PR1, S1PR3, S1PR4, ADRA2A	0.003111

3 讨论

PTCL-NOS 是 PTCL 最常见的亚型, 通常表现出侵袭的临床过程且分子机制尚未完全阐明^[7]。几乎所有 PTCL-NOS 的治疗方案都缺乏高水平的证据、分子或生物学基础^[8]。目前, 其一线治疗方案主要来源于侵袭性 B 细胞淋巴瘤的治疗方案, 存在复发率高、远期疗效差等问题^[9]。近年来, 随着转录组学的发展, 许多疾病的分子特征和靶向药物的发现, 为个体化治疗提供了可能。本研究旨在通过对 PTCL-NOS 基因组学和转录组学的分析, 采用生物信息学方法寻找 TCL-NOS 关键基因和靶向药物。

本研究发现, PTCL-NOS 患者的部分 KEGG 信号通路活动发生了明显改变, 其中 PI3K-Akt 信号通路的改变最为显著, 共有 36 个包含在该通路内的

基因发生了表达改变。磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKTe)/雷帕霉素(mTOR)信号通路的哺乳动物靶点在包括代谢、凋亡、血管生成和细胞增殖在内的生物调节中起着重要作用, 也是人类癌症中最常见的失调信号通路之一^[10]。PI3K 是磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3)的脂类激酶。PIP3 是 AKT 的对接位点, 通过激活下游效应子 mTOR 信号通路促进细胞生长、蛋白质合成、细胞运动和存活^[11]。PTEN 是 PI3K 的负性调节因子, 能抑制 PI3K 抑制肿瘤生长。在癌症环境下, PTEN 的突变使其失去对 PI3K 的调节能力, 进而失调下游通路^[12]。总之, 在癌症中, PI3K/AKT/mTOR 通路的过度激活增强了营养转运蛋白和代谢酶的活性, 导致细胞代谢改变, 从而为肿瘤细胞的生长提供了合成代谢需求, 同时也增

加了肿瘤细胞的耐药性^[13]。

根据 DGIdb 数据库的基因-药物相交交互用分析,共有 105 种治疗 PTCL-NOS 的潜在药物(其中有 90 种药物针对 ADRA2A),靶向 9 个基因(ADRA2A、S1PR1、S1PR3、S1PR4、CP、FN1、APOE、SERPINA1、C3)。ADRA2A 被认为是多种肿瘤细胞系的潜在调节因子^[14]。SERPINA1 过表达显著改善了癌细胞迁移、集落形成和对细胞凋亡的抵抗力^[15]。APOE 可通过与膜受体结合介导循环脂蛋白和组织之间的脂质转移^[16]。APOE 可通过 LR8 受体直接抑制循环髓源性抑制细胞的存活,并在激活免疫系统中发挥抗肿瘤作用^[17]。FN1 在多种癌症中上调,沉默 FN1 可促进肿瘤生长和转移^[18,19]。S1P-S1PRs 信号通路诱导免疫细胞从淋巴器官流入血液,从而影响抗肿瘤免疫反应^[20,21]。西尼莫得是一种高效的 S1PRs 拮抗剂,已被批准用于治疗多发性硬化症,其安全性和有效性已被证实。另一种 S1PRs 抑制剂芬戈莫德也证明了其治疗癌症的潜力^[20]。

综上所述,本研究发现 9 个与 PTCL-NOS 有关的关键基因(ADRA2A、S1PR1、S1PR3、S1PR4、CP、FN1、APOE、SERPINA1、C3)和 105 个 FDA 批准的药物,如芬戈莫德、西尼莫得、氯化锌、丙氯拉嗪等。另外 PI3K-AKT 信号通路对于 PTCL-NOS 疾病的作用也值得关注。但由于本研究获得的关键基因和药物是基于软件统计处理和数据库分析,它们是否能在 PTCL-NOS 中发挥作用仍需进一步的分子生物学实验来验证。

参考文献:

- [1]Broccoli A,Zinzani PL.Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified[J].Blood,2017,129(9):1103-1112.
- [2]Zain JM.Aggressive T-cell lymphomas: 2019 updates on diagnosis, risk stratification, and management [J].Am J Hematol, 2019,94(8):929-946.
- [3]Costa-Silva J,Domingues D,Lopes FM.RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool[J].PLoS One,2017,12(12):e0190152.
- [4]Szkarczyk D,Gable AL,Lyon D,et al.STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J].Nucleic Acids Res,2019,47(D1):D607-D613.
- [5]Doncheva NT,Morris JH,Gorodkin J,et al.Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data[J].J Proteome Res,2019,18(2):623-632.
- [6]Freshour SL,Kiwala S,Cotto KC,et al.Integration of the Drug-Gene Interaction Database (DGIdb 4.0) with open crowdsourcing efforts[J].Nucleic Acids Res,2021,49 (D1):D1144-D1151.

- [7]Carson KR,Horwitz SM,Pinter-Brown LC,et al.A prospective cohort study of patients with peripheral T-cell lymphoma in the United States[J].Cancer,2017,123(7):1174-1183.
- [8]Oluwasanjo A,Kartan S,Johnson W,et al.Peripheral T-Cell Lymphoma, not Otherwise Specified (PTCL-NOS)[J].Cancer Treat Res,2019,176:83-98.
- [9]Gisselbrecht C,Sibon D.New perspectives in the therapeutic approach of peripheral T-cell lymphoma [J].Curr Opin Oncol, 2018,30(5):285-291.
- [10]Alzahrani AS.PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside[J].Semin Cancer Biol,2019,59:125-132.
- [11]Xu F,Na L,Li Y,et al.Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J].Cell Biosci,2020,10:54.
- [12]Chen CY,Chen J,He L,et al.PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator[J].Front Endocrinol (Lausanne),2018,9:338.
- [13]Liu R,Chen Y,Liu G,et al.PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers [J].Cell Death Dis, 2020,11(9):797.
- [14]Wang W,Guo X,Dan H.alpha2A-Adrenergic Receptor Inhibits the Progression of Cervical Cancer Through Blocking PI3K/AKT/mTOR Pathway [J].Onco Targets Ther,2020,13: 10535-10546.
- [15]Ercetin E,Richtmann S,Delgado BM,et al.Clinical Significance of SERPINA1 Gene and Its Encoded Alpha1-antitrypsin Protein in NSCLC[J].Cancers (Basel),2019,11(9):1306.
- [16]Huebbe P,Rimbach G.Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors[J].Ageing Res Rev,2017,37:146-161.
- [17]Tavazoie MF,Pollack I,Tanqueco R,et al.LXR/ApoE Activation Restricts Innate Immune Suppression in Cancer[J].Cell, 2018,172(4):825-840.
- [18]Cai X,Liu C,Zhang TN,et al.Down-regulation of FN1 inhibits colorectal carcinogenesis by suppressing proliferation, migration, and invasion[J].J Cell Biochem,2018,119(6):4717-4728.
- [19]Glasner A,Levi A,Enk J,et al.NKp46 Receptor-Mediated Interferon-gamma Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis[J].Immunity,2018,48(1):107-119.
- [20]Huwiler A,Zangemeister-Wittke U.The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives [J].Pharmacol Ther, 2018,185:34-49.
- [21]Lupino L,Perry T,Margielewska S,et al.Sphingosine -1-phosphate signalling drives an angiogenic transcriptional programme in diffuse large B cell lymphoma [J].Leukemia,2019,33 (12):2884-2897.

收稿日期:2021-09-07;修回日期:2021-09-24

编辑/成森