

Multi-Target Study of Osteosarcoma Based on Microarray Analysis

Zhiping Liu, Xin Zhou, Tianchang Lin, Lijia Cheng*

Medical School, Chengdu University, Chengdu Sichuan
Email: *chenglijia@cdu.edu.cn

Received: Jun. 13th, 2019; accepted: Jun. 26th, 2019; published: Jul. 3rd, 2019

Abstract

Objective: In recent years, both standardized and single targeting methods have not been effective in the treatment of osteosarcoma; therefore, multi-target therapy is the trend of development on osteosarcoma. **Methods:** The differentially expressed genes in normal bone and osteosarcoma microarray were analyzed and the interactive network was constructed through searching for osteosarcoma related chip GSE16088 in gene database. Finally, multiple targets were identified based on these highly interacting genes. **Results:** The strongest differentially expressed genes were collagen (COL) genes based on analyzing the differentially expressed genes between osteosarcoma and normal bone tissues. And the pathogenicity related pathway was COL-MMPs-RhoA-JNK pathway through the construction of interactive network. **Conclusion:** COL-MMPs-RhoA-JNK pathway could be used to multiple-target osteosarcoma, which provides more ideas for clinical treatment of osteosarcoma.

Keywords

Osteosarcoma, Gene Chip, Multi-Target Therapy, Collagen

基于基因芯片分析的骨肉瘤多靶点研究

刘志萍, 周鑫, 林天昌, 程丽佳*

成都大学医学院, 四川 成都
Email: *chenglijia@cdu.edu.cn

收稿日期: 2019年6月13日; 录用日期: 2019年6月26日; 发布日期: 2019年7月3日

摘要

目的: 近年来, 标准化和单靶向疗法对骨肉瘤都没有显著效果, 因此, 多靶向治疗骨肉瘤是目前发展的趋势。**方法:** 通过基因数据库寻找到骨肉瘤相关芯片GSE16088, 对正常骨和骨肉瘤芯片中基因的差异

*通讯作者。

表达进行分析,并构建交互网络,最后基于其相互作用性强的基因进行骨肉瘤信号通路机制分析并找出多个靶点。结果:通过对骨肉瘤和正常骨组织基因芯片的差异表达分析,得出其差异表达最强的是胶原(Collagen, COL)系基因,并通过构建交互网络发现其致病相关通路为COL-MMPs-RhoA-JNK通路,基于此通路,可同时进行细胞质机制重塑和药物多靶向治疗。结论:多靶向COL-MMPs-RhoA-JNK通路中的关键基因是治疗骨肉瘤的一个新思路,为临床靶向治疗骨肉瘤提供更多的切入点。

关键词

骨肉瘤, 基因芯片, 多靶向治疗, 胶原

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

骨肉瘤是一种自发恶性程度较高具有间充质恶性的较为罕见的骨肿瘤,来源于骨间叶细胞。其在年龄上存在着双峰分布,在青少年晚期和成年初期达到第一次高峰,在年后期即60岁左右出现第二次高峰,且致残致死率极高[1][2][3]。有关骨肉瘤的治疗通常采用药物治疗,例如,特异性药物甲氨蝶呤的细胞周期性调节治疗,环氧化酶2的特异性靶向治疗等[4][5][6];但机体对药物治疗会产生耐药性等副作用使其药效降低。随后,单靶向治疗掀起了一股热潮,但由于其靶向抗体单一,而骨肿瘤细胞表面存在着多种抗原,因而根据抗原抗体的特异性结合特性,其抗体少于抗原,从而使其治疗效果较差。近年来,骨肉瘤治疗的研究聚焦于对致病机制通路的多靶向治疗[7][8]。在骨肉瘤致病因子以及靶向治疗方面,大量的研究发现,其致病因素主要在于骨组织内通路发生了一系列的位置转移或局部缺失,如P53通路的5个突变,眼视网膜母细胞基因(RBI)的突变等导致疾病[8]。目前的靶向治疗趋向于多分子的生物靶向,达到准确的靶向而特异性抑制肿瘤,减少患者的病痛。本研究将应用基因芯片法对骨组织样本芯片进行分析(14个骨肉瘤芯片,6个正常骨组织芯片),深入探讨其肿瘤形成机制和相关信号通路,达到多靶向治疗的目的,为临床多靶向治疗骨肉瘤提供更多的切入点。

2. 实验方法

2.1. 骨肉瘤的相关基因表达谱

基因表达数据GSE16088来源于美国癌症研究所遗传分支学实验室上传于基因表达综合数据库,本研究共检测了20例样本,基因数据样本来源于美国斯隆凯瑟琳纪念医院外科和流行病生物信息科1982年7月~2012年5月收治的骨外骨肉瘤患者,纳入的20例样本中,女性12例,男性8例;其中14例为下肢股骨肿瘤病变,6例正常样本分别取软骨,肝脏,肾脏各2例作为阴性对照;年龄10~88岁,平均年龄64岁;该研究通过成都大学伦理委员会审批。

2.2. 表达数据预处理

下载保存Affy的表达式原始数据,格式为.CEL。

2.3. 基因差异表达分析

利用GCBI学院中的差异基因分析程序,进行骨肉瘤和正常骨组织间的差异表达分析。通过方案设

计、参数设置、结果分析,测序了 d Score, Fold Chang, Gene Feature 等数据筛选得到的基因被认为是具有高置信度的差异表达基因。利用这些差异表达的基因,根据 $Q < 0.05$, $P < 0.002$, $Fold\ Change > 1.2$, $|\log FC| > 1$ 的阈值,识别骨肉瘤与正常对照样本之间的异常基因。

2.4. 构建互动网络

通过严格的检测方法,对差异表达的基因进行高置信度的筛选,利用检索相互作用基因(String)的搜索工具对差异表达的基因产物的交互对象进行搜索,构建蛋白质交互网络。

2.5. 分析网络模块

对得到的差异分析数据进行 Pathway 分析和 Go 分析,使得整个数据得到分解和功能注释。根据此结果,预测出诱导骨肉瘤的相关信号通路并进行分析。

3. 结果

3.1. 数据预处理结果

将所选样本进行分组后得到其样本几乎都在同一水平线上(图 1(A))。如图,蓝色方框是肿瘤组织,

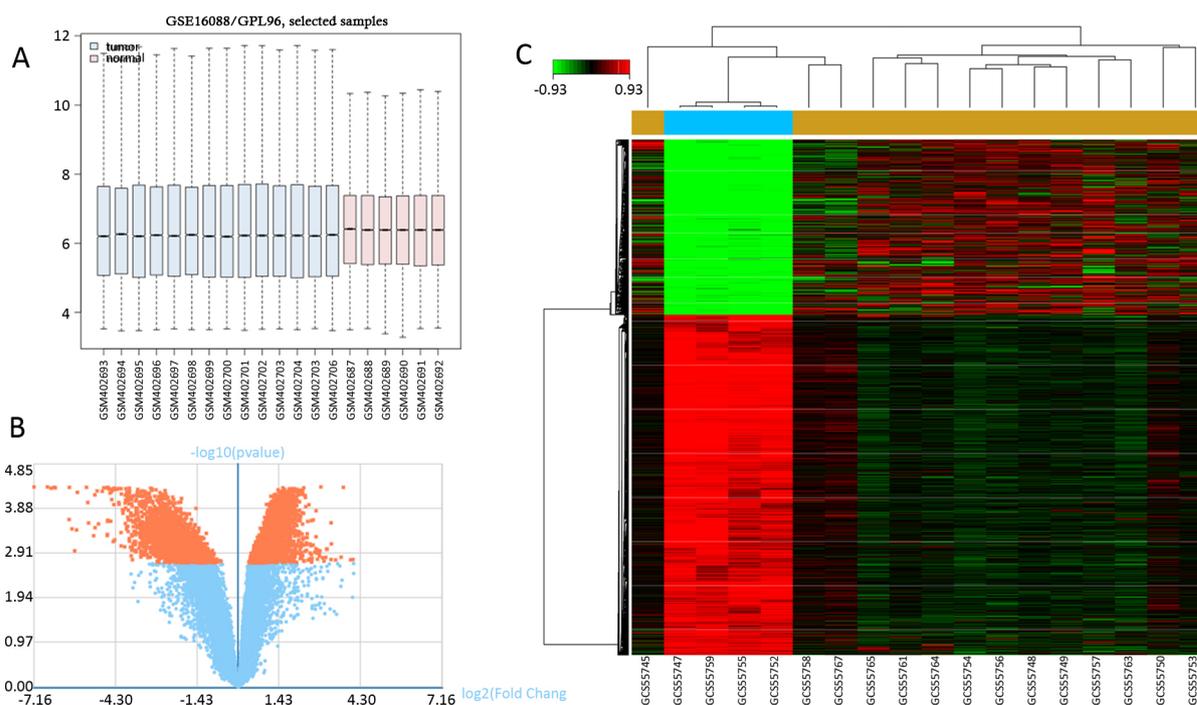


Figure 1. (A) Sample Analysis Chart: the blue frame in the picture is the osteosarcoma sample chip, the pink is the normal bone tissue chip, and the bisection of each rectangle is on a straight line (red line in the figure) to illustrate the feasibility of the sample. Its feasibility is high. (B) Differential volcanic map, horizontal coordinates represent $\log_2(\text{Fold Change})$, vertical coordinates $-\log_{10}(\text{P value})$, each point represents one gene, red points represent differentially expressed genes, blue spots represent no differentially expressed genes. The graph can show the distribution of different genes in. (C) Cluster diagram, the horizontal coordinates represent sample clustering, and the vertical coordinates represent gene clustering. Class. Color level represents gene expression abundance, red and green represent up-regulation and down-regulation respectively

图 1. (A) 样本分析图: 图片中蓝色框为骨肉瘤样本芯片, 粉红色为正常骨组织芯片, 每个矩形的平分线均在一条直线(图中红线)上说明样本可行, 其可行性高。(B) 差异火山图, 横坐标代表 $\log_2(\text{Fold Change})$, 纵坐标表示 $-\log_{10}(\text{P 值})$, 每个点代表一个基因, 图中红色点代表差异表达基因, 蓝色点代表没有差异基因, 其图可以显示其差异基因的分布情况。(C) 聚类图, 横坐标代表样本聚类, 纵坐标代表基因聚类。色阶代表基因表达丰度, 红色, 绿色分别代表上调和下调

粉色方框为正常组织，其分组后样本在一条直线上，说明样本的可行性大。

3.2. 差异表达基因分析

选取 $Q < 0.05$, $P < 0.002$, $\text{Fold Change} > 1.2$, $|\log\text{FC}| > 1$ 范围进行分析，获得火山图和聚类图，都可以看到 P 值与 $\log\text{FC}$ 之间的联系都较为显著(图 1(B))，根据差异表达数据值的大小可以筛选出表达差异大的基因，即为差异表达基因(图 1(C))，表达差异最大的三个基因分别是 COL1A2, COL5A2, COL11A1，其表达系数均位于前列，在骨肉瘤发病相关基因中其表达差异倍数高于 10 倍以上，足以说明此类基因引起发病的系数大(表 1)。

Table 1. Differentially expressed genes

表 1. 差异表达基因

Gene Symbol	D Score	Fold Change	P-value	Q-value	Gene expression
COL1A2	27.443828	162.724166	4.5e-05	0	up
COL5A2	25.430578	109.149718	4.5e-05	0	up
COL1A1	23.825618	94.313576	4.5e-05	0	up
SPARC	21.952641	54.395178	4.5e-05	0	up
TTC3	21.141971	21.309207	4.5e-05	0	up
XPOT	21.093397	18.905301	4.5e-05	0	up
TARS	21.293767	16.708261	4.5e-05	0	up
TMED2	22.565422	9.274505	4.5e-05	0	up

3.3. 交互网络构建结果

选择差异表达倍数大的基因 COL1A2, COL5A2, COL11A1 等通过 STRING 系统进行构建基因交互网络，将其差异表达的基因之间的联系放大倍数后，便可观察到其网络中与其差异基因联系紧密的其他基因(图 2(A))，这些基因便可预测其在骨肉瘤中的发病机制，研究其与 COL 系胶原之间的联系，进行药物靶向治疗。

3.4. 网络模块分析结果

通过 GO (Gene Ontology)分析和 Pathway 分析得到富集性(图 2(B))和显著性分析图表(图 2(C))。GO 分析对实验结果有提示作用，通过 GO 差异分析，可以找到有关于富集差异基因信息的 GO 分析条目，进而分析其差异基因与相关基因在集体内的功能；Pathway 分析可以将具有差异的基因聚集在 pathway 项目下，从而更快捷清晰地寻找差异基因与相应基因通路的关系。通过分析网络交互情况，即可找出其与 COL 系基因有关的其他作用基因。通过此方法，本研究发现 COL-MMPs-RhoA-JNK 通路为引发骨肉瘤疾病的一条重要通路。

4. 讨论

本研究通过比较正常骨和骨肉瘤组织的表达数据，确定了最显著上调表达基因为 COL 系，其中 COL1A2、COL5A2、COL11A1 基因差异表达系数最大。用 COL1A2, COL5A2 构建网络，分析与骨肉瘤相关基因之间的相互作用，发现 COL-MMPs-RhoA-JNK 通路可能为引发骨肉瘤疾病的一条重要通路。

胶原蛋白是高分子物质，主要存在于动物的结缔组织内，分布范围广，占蛋白质总质量的 25%~30%，

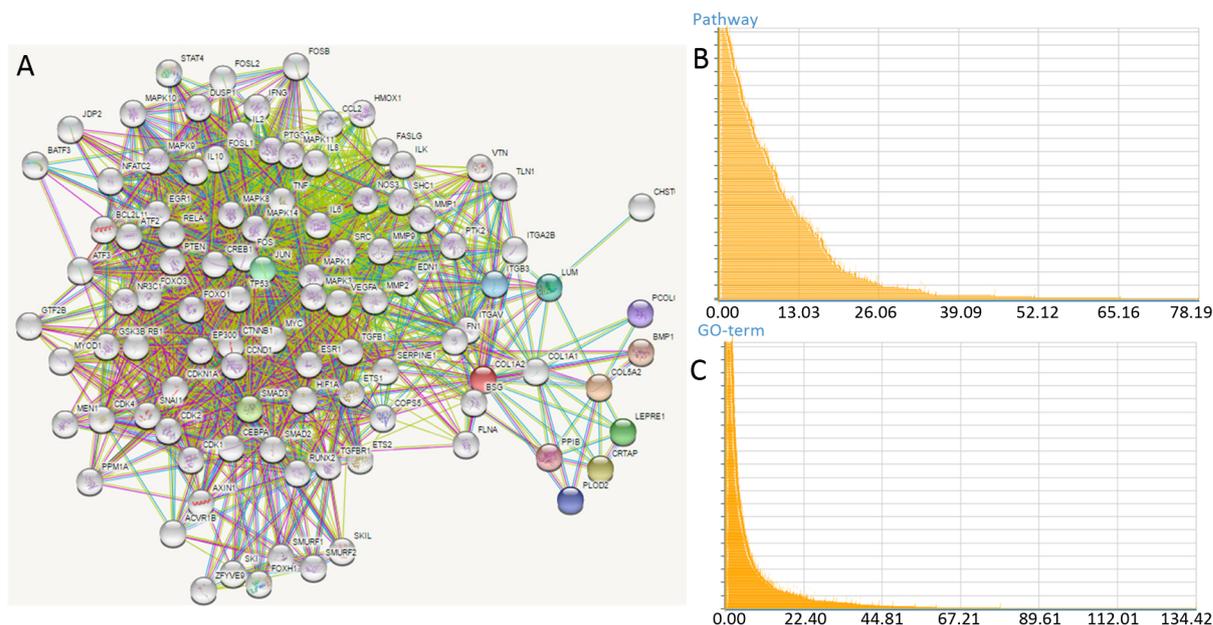


Figure 2. (A) Gene interaction network diagram: it is constructed by selecting genes with large differentially expressed multiple to observe the significant analysis of gene. (B) Associated with differentially expressed genes: horizontal coordinate representation- \log_{10} (P-value), Vertical coordinates represent Pathway, through genes aggregated under its pathway project to quickly and clearly search for the relationship between differential genes and the corresponding gene pathway. (C) Enrichment analysis chart: horizontal coordinates represent Enrichment, coordinates represent Go-term, through the pictures, we can get the relevant GO analysis columns, and use them to enrich the information

图 2. (A) 基因交互网络图:其通过选择差异表达倍数大的基因进行网络构建,观察其与差异表达基因相关联的基因。(B) 显著分析图:横坐标表示 $-\log_{10}$ (P-value),纵坐标表示 Pathway,通过其 pathway 项目下聚集的基因,快捷清晰地寻找差异基因与相应基因通路的关系。(C) 富集分析图:横坐标表示 Enrichment,纵坐标表示 Go-term,通过图片可以得到有关 GO 分析条目,利用其富集信息分析其差异基因与相关基因在集体内的功能

某些生物体内甚至高达 80%以上,骨的有机质组成中,胶原的成分占到 90% [9] [10],同时胶原蛋白也是重要的蛋白质矩阵,因此不同的 COL 系胶原降解都会不同程度地引起骨类疾病;在本研究网络图中分析得到,其 COL 系基因如 COL5A2 等与基质金属蛋白酶类(Matrix metalloproteinase, MMPs)存在着相互联系, MMP 是侵袭性癌症的标志之一,其种类约 20 种[11] [12] [13],其大部分亚类都主要作用于细胞外基质,降解胶原纤维引起一系列骨肉瘤疾病,如 MMP-9,该亚类为明胶酶,其可水解细胞外基质的明胶和胶原,从而破坏细胞基底膜屏障作用,引起骨肉瘤的发生和转移[9] [11],同时, MMPs 中的 MMP-14 与膜结合后导致其基质中 COL 胶原纤维减少形成侵袭屏障[8],因此可知 MMPs 对骨肉瘤的诱导起重要作用,同时其发生与 COL 系胶原存在着直接关系[14] [15] [16],因此,利用 COL 系胶原的重塑及使用药物抑制 MMPs 的诱导作用可减少对机体产生的侵袭性和转移性的骨肉瘤疾病;有研究表明, MMPs 作用通路受 RhoA-JNK 通路的调控,当抑制其 RhoA-JNK 的作用机制便可抑制其 MMPs 产生的作用[14] [16] [17],综上所述我们将其影响机制之间的联系整合得到相关通路 COL-MMPs-RhoA-JNK。Fromigué O 等人通过小鼠体内外,转染实验等研究发现,他汀类药物诱导的 hMG-coA 还原酶通过抑制 jnk-c-jun-MMP 2 通路减少了骨肉瘤细胞的迁移和侵袭[18],他汀类药物对肿瘤细胞迁移的抑制作用主要是由于基质金属蛋白酶(MMPs)活性降低所致[19],故我们发现在 COL-MMPs-RhoA-JNK 中,通过他汀类药物抑制 MMPs 的作用及 MMPs 与 COL, RhoA, JNK 之间的相互作用,使得 COL 系胶原受损降低,同时其中的 HMG-CoA 的信号越高会大量激活 RhoA-JNK 通路发生作用,降低骨肉瘤的恶性侵袭和转移[19] [20] [21] [22]。因此,通过他汀类药物及 COL 系细胞外基质的重塑作用于 COL-MMPs-RhoA-JNK 通路,可能在骨肉瘤的靶向通路治疗中有重要作用, COL-MMPs-RhoA-JNK 通路可能为一条重要的骨肉瘤机制通路。

5. 总结

通过基因芯片分析构建基因交互网络得到骨肉瘤发病机制通路图,发现以 COL 系基因表达差异最强,且 MMPs 与其相关性大,通过对 COL, MMPs 等基因的作用机制及相关基因进行分析发现它们之间的相关性,并构建 COL-MMPs-RhoA-JNK 通路。通过细胞外基质重塑和他汀类药物的双向作用于 COL-MMPs-RhoA-JNK,可能实现多靶向治疗达到较好的治疗预后。本研究可以为临床骨肉瘤的治疗提供新的切入点。然而骨肉瘤的发病机制至今仍未研究透彻,因此以后的研究重点应聚焦骨肉瘤致病基因,以期对骨肉瘤的发生实现可预防。

基金项目

本文由四川省科技厅项目(2018JY0348),国家自然科学基金项目(51402027),国家级大学生创新创业训练计划项目(201811079019)和成都大学大学生创新创业训练计划项目(CDU_CX_2019392, CDU_CX_2019393, CDU_CX_2019394, CDU_CX_2019395, CDU_CX_2019396)资助。

参考文献

- [1] 曾新歆, 王胜涛, 贵鹏, 吴昊, 李朝旭. 骨肉瘤免疫靶向治疗相关机制的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(2): 236-239.
- [2] 张德绸, 王廷帆, 葛建华. 骨肉瘤最新治疗及研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2018, 41(5): 473-476.
- [3] 黄成校, 郭卫春, 郭哲. 骨肉瘤的治疗进展[J]. 医学综述, 2013, 19(11): 1979-1982.
- [4] 郭长升, 樊青霞. 骨肉瘤基因研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(33): 4158-4164.
- [5] 李胜, 王威, 李建军. 骨肉瘤手术治疗方式的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(32): 95-97.
- [6] 刘怀毫, 梁振, 梁沛杰. 骨肉瘤化学治疗的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2018, 11(3): 311-314.
- [7] 朱翔, 董扬. 骨肉瘤分子生物靶向治疗的研究进展[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2011, 10(6): 602-606.
- [8] Ho, X.D., et al. (2017) Whole Transcriptome Analysis Identifies Differentially Regulated Network between Osteosarcoma and Normal Bone Samples. *Experimental Biology and Medicine*, **242**, 1802-1811. <https://doi.org/10.1177/1535370217736512>
- [9] Botter, S.M., Neri, D. and Fuchs, B. (2014) Recent Advances in Osteosarcoma. *Current Opinion in Pharmacology*, **16**, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.02.002>
- [10] 王海彬, 樊粤光, 何伟. 人成骨细胞的 I 型胶原合成及基因表达[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2003, 11(4): 11-15.
- [11] 聂立华, 孙保勇. 软组织肉瘤靶向治疗药物的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(16): 104-107.
- [12] 喻紫晨, 肖兢, 徐海声. 四肢骨肉瘤患者的治疗及预后分析[J]. 实用癌症杂志, 2014, 29(2): 199-201.
- [13] 张熙, 王东伟, 刘爽. Wnt 信号通路在骨肉瘤发生机制中作用的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(23): 4005-4007.
- [14] 陈校国, 肖扬, 伍旭辉. 骨肉瘤靶向治疗的研究进展[J]. 西南军医, 2017, 5(19): 438-443.
- [15] 王丹, 张涵瑜, 刘亮. 人骨肉瘤发生的分子基础和潜在治疗靶点[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2017, 18(6): 747-750.
- [16] 陈至鑫, 章静波. 治疗骨肉瘤的潜在靶向蛋白[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(1): 29.
- [17] Mohseny, A.B., Cai, Y., Kuijjer, M., et al. (2012) The Activities of Smad and Gli Mediated Signalling Pathways in High-Grade Conventional Osteosarcoma. *European Journal of Cancer*, **48**, 3429-3438. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.06.018>
- [18] Fromigué, O., Hamidouche, Z. and Marie, P.J. (2008) Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 Cascade by Atorvastatin Reduces Osteosarcoma Cell Invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 30549-30556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801436200>
- [19] Pakos, E.E., Kyzas, P.A. and Ioannidis, J.P. (2004) Prognostic Significance of TP53 Tumor Suppressor Gene Expression and Mutations in Human Osteosarcoma: A Meta-Analysis. *Clinical Cancer Research*, **10**, 6208-6214. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0246>

- [20] 章磊, 流小舟, 孙畅, 黎承军. 多途径靶向给药系统在骨肉瘤治疗中的研究进展[J]. 东南国防医药, 2016, 18(6): 632-635.
- [21] Kirpensteijn, J., Kik, M., Teske, E. and Rutteman, G.R. (2008) TP53 Gene Mutations in Canine Osteosarcoma. *Veterinary Surgery*, **37**, 454-460. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2008.00407.x>
- [22] Yang, Q.J., Zhou, L.Y., Mu, Y.Q., *et al.* (2012) All-Trans Retinoic Acid Inhibits Tumor Growth of Human Osteosarcoma by Activating Smad Signaling-Induced Osteogenic Differentiation. *International Journal of Oncology*, **41**, 153-160.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8976, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjbm@hanspub.org