

肺腺癌动态5节点ceRNA调控网络预测及机理分析

刘梦曦, 赵宇, 李悦, 张小轶*

北京工业大学化学与生命科学学院, 北京

收稿日期: 2024年2月29日; 录用日期: 2024年4月18日; 发布日期: 2024年4月28日

摘要

目的: 构建肺腺癌发生发展过程中的动态五节点ceRNA调控网络, 挖掘核心基因, 为肺腺癌诊断及预后提供新思路。方法: 从TCGA及GEO数据库获得肺腺癌mRNA、lncRNA、miRNA、circRNA、TF表达数据, 将患者样本根据临床分期分为癌旁样本、早期样本(stage I期)、晚期样本(stage II、III、IV期), 并将癌旁与早期、早期与晚期分别进行差异分析, 将两组差异结果取交集, 基于ChipBase、HOCOMOCO V11、AnimalTFDB、GTRD、TransmiR、TRRUST、CircBank、Starbase、miR2Disease、miRecords、miRTarBase和TarBase、LncBase、LncLocator数据库获得调控关系对, 构建五节点ceRNA调控网络, 对网络中的靶基因进行GO富集以及构建PPI网络挖掘核心基因。结果: 构建了随分期动态变化的LUAD 5节点ceRNA调控网络, 网络中的靶基因主要富集在脂肪酸代谢和突触成熟等生物过程中, 最后获得与肺腺癌发生发展有关的8个核心基因NEFL、RBP4、FGA、SLC2A1、ALB、AFP、SLC7A5、DKK1。结论: 调控网络中靶基因富集的相关通路以及8个核心基因NEFL、RBP4、FGA、SLC2A1、ALB、AFP、SLC7A5、DKK1为肺腺癌发生发展过程的机制分析、诊断及预后提供新思路。

关键词

生物信息学, ceRNA, 调控网络, LUAD

Predictive and Mechanistic Analysis of Dynamic 5-Node ceRNA Regulatory Network in Lung Adenocarcinoma

Mengxi Liu, Yu Zhao, Yue Li, Xiaoyi Zhang*

College of Chemistry and Life Science, Beijing University of Technology, Beijing

Received: Feb. 29th, 2024; accepted: Apr. 18th, 2024; published: Apr. 28th, 2024

*通讯作者。

Abstract

Objective: To construct a dynamic 5-node ceRNA regulatory network during the development of lung adenocarcinoma, to mine the core genes, and to provide new ideas for lung adenocarcinoma diagnosis and prognosis. **Methods:** Lung adenocarcinoma mRNA, lncRNA, miRNA, circRNA and TF expression data were obtained from TCGA and GEO databases, and the patient samples were divided into paraneoplastic samples, early samples (stage I), and advanced samples (stage II, III, IV) according to the clinical staging and the differences between the paraneoplastic and the early, early and the late stage were analyzed separately, and the differences between the two groups were analyzed. The results were taken as intersection, based on ChipBase, HOCOMOCO V11, AnimalTFDB, GTRD, TransmiR, TRRUST, CircBank, Starbase, miR2Disease, miRecords, miRTarBase, and TarBase, LncBase, LncLocator database to obtain regulatory pairs, construct 5-node ceRNA regulatory network, GO enrichment of target genes in the network as well as construction of PPI network to mine core genes. **Results:** A LUAD 5-node ceRNA regulatory network that changes dynamically with staging was constructed, and the target genes in the network were mainly enriched in biological processes such as fatty acid metabolism and synaptic maturation, and finally eight core genes related to lung adenocarcinoma development were obtained, NEFL, RBP4, FGA, SLC2A1, ALB, AFP, SLC7A5, and DKK1. **Conclusion:** The pathways involved in the enrichment of target genes in the regulatory network, as well as the eight core genes NEFL, RBP4, FGA, SLC2A1, ALB, AFP, SLC7A5, and DKK1, provide new insights for the mechanism analysis, diagnosis, and prognosis of lung adenocarcinoma.

Keywords

Bioinformatics, ceRNA, Regulatory Network, LUAD

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

肺癌是世界范围内致死率居于首位的癌症[1], 大约 85%的癌症病例被诊断为非小细胞肺癌, 其中肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)是最常见的类型[2]。尽管针对 LUAD 的早期诊断和治疗有了很大改善, 据美国肺协会(American Lung Association)的 2023 年《肺癌状况》报告揭示, 国际范围内整体肺癌五年生存率从 2015 年到 2019 年上增加了 22% [3]。但由于肿瘤的快速进展转移, 患者的长期预后仍然较差, LUAD 患者的 5 年总生存率仅有 5%~18% [4]。然而, LUAD 复杂的分子生物学机制尚未完全阐明, 潜在的治疗靶点有限, 需要进一步探索潜在的分子机制并确定新的 LUAD 治疗靶点或生物标志物。

生物系统内部癌症的恶化机制十分复杂, 并且癌症发生发展是一个动态变化的过程。越来越多的研究表明非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)的异常表达在癌症的发生发展中也扮演了重要角色[5]。研究非编码 RNA 在癌症中作用的重大发现是关于一个内源性竞争 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)假说的提出, Pandolfi 等于 2011 年在 cell 上发表了研究同时提出了“ceRNA 假说”。该假说的理论核心为: 微小 RNA (microRNA, miRNA)是一种内源性的小分子非编码 RNA, 通常由 20~25 个核苷酸组成, 大部分在细胞质中。在编码蛋白的基因转录本上的信使 RNA (messenger RNA, mRNA)的 3' UTR 非编码区存在多种 miRNA 的应答元件(miRNA response element, MRE), miRNA 可通过 MRE 与 mRNA 结合, 导致 mRNA 降解或者抑制其翻译, 从而导致靶基因表达下调。而在细胞中除 mRNA 之外, 还存

在另外一些 RNA 分子, 例如长非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA)、环状 RNA (circular RNA, circRNA) 也存在 MRE, 当 lncRNA、circRNA 与 mRNA 存在相同的 MRE 时, 他们之间构成了竞争相同种类 miRNA 的关系[6]。也就是说, lncRNA、circRNA 通过 MRE 这个桥梁, 参与调控了 mRNA 的表达水平, 从而调控细胞功能。同时, 转录因子(TF)作为基因调控网络和细胞信号传导的中枢, 参与正常组织和肿瘤组织生长发育过程中的转录调控[7]。在转录水平, mRNA、lncRNA、circRNA 和 miRNA 均受到转录因子 TF 的调控[8] [9] [10] [11]。TF 和 mRNA 之间的相互作用是通过基因转录调控机制实现的, 转录因子可以调节基因的转录过程, 从而影响 mRNA 的合成[12] [13] [14] [15]。人们普遍认为, 转录失调在大量癌症的癌变、转移、预后和药物依赖中同样起着关键作用[16]。

随着 ceRNA 假说的提出, 越来越多的研究人员利用基因组学数据分析 ceRNA 网络探究癌症的潜在分子机制, 或者构建以 TF 为主导的转录调控网络寻找与疾病有关的失调网络寻找潜在生物标志物[17] [18] [19]。然而, 当前大部分基于 ceRNA 的研究忽略了转录阶段 TF 与 ceRNA 靶向结合关系, miRNA、lncRNA、circRNA、TF 和 mRNA 在 LUAD 中结合癌症分期的特异性全转录组调控机制有待进一步阐明。本研究整合 TF、mRNA、miRNA、lncRNA、circRNA 构建表达量随分期动态变化的 LUAD ceRNA 五节点调控网络, 揭示 LUAD 发生发展的分子机制, 挖掘有助于 LUAD 诊断及预后的关键基因, 为 LUAD 早期的诊断和治疗提供新思路。

2. 材料与方法

2.1. 数据获取

从 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载 LUAD mRNA、lncRNA 和成熟体 miRNA 表达谱。从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载 LUAD circRNA 数据集 GSE101586、GSE101684 及人类 circRNA ID 映射文件。

2.2. 数据预处理

将 TCGA 数据库 miRNA、lncRNA、mRNA 表达谱临床样本中不包括分期信息的样本剔除, 剩余样本分为癌旁样本(normal)、早期样本(Stage I)、晚期样本(Stage II & III & IV)。

在 GEO 数据集中, 对 circRNA 表达量进行标准化处理, 用分位值法检查样本的数据分布, 如果 99% 分位数大于 100 或最大值与最小值的差大于 50 且 25%分位数大于 0 则对该样本数据进行 \log_2 对数转换。其次根据 soft 文件对样本进行注释并将 Arraystar Human circRNA microarray V2 ID 映射人类 circRNA 标准化 7 位 ID。

2.3. 差异分析

使用 R “Deseq2” 包对 miRNA、lncRNA、mRNA 表达谱分别进行早期与癌旁、晚期与早期差异分析, 阈值为 $|\log_2FC| > 0.58$, 校正后 $P < 0.05$ (FC: fold change, 差异倍数), 将差异分析结果取交集, 获得差异表达 mRNA (differentially expressed mRNA, DEMRNA)、差异表达 miRNA (differentially expressed miRNA, DEMiRNA)和差异表达 lncRNA (differentially expressed lncRNA, DELncRNA)。

使用 R “limma” 包对 GSE101586、GSE101684 数据集 circRNA 癌症样本和癌旁样本进行差异分析, 阈值为 $|\log_2FC| > 0.58$, 校正后 $P < 0.05$, 将两个数据集差异结果取交集, 获得差异表达 circRNA (differentially expressed circRNA, DEcircRNA)。

2.4. 五节点动态 ceRNA 调控网络构建

基于已经发表的经实验鉴定的数据库 HOCOMOCO V11、AnimalTFDB 手动整理人类转录因子数据

集, 并从 DEmRNA 中选出充当 TF 的基因。基于 ChipBase 实验数据库中筛选转录起始位点附近-30 KB 到 10 kb 区域内的 DEIncRNA-TF; 基于 GTRD 预测数据库及 TransmiR 实验数据库中取交集获得 DEmiRNA-TF; 在 GTRD 预测数据库和 TRRUST 实验数据库中取交集获得 DEmRNA-TF。

基于 CircBank 数据库和 Starbase 数据库筛选 DEmiRNA-DEcircRNA 相互作用。其中 Circbank 数据库采用 miRanda 和 Targetscan 算法对 140790 条 human circRNA 以及 1917 条 human miRNA 的结合位点进行预测, 筛选其中预测分数 > 200 的相互作用对。使用 miR2Disease、miRecords、miRTarBase、TarBase、Starbase 5 个实验数据库筛选 DEmiRNA-DEmRNA。其中 miR2Disease、miRecords、miRTarBase 和 TarBase 4 个数据库的数据主要来自高通量和低通量等生物实验, 其中选择 miR2Disease 和 miRecords 中的所有靶标对, 选择 miRTarBase 中强实验验证的靶标对, 选择 TarBase 数据库中直接验证的靶标对。使用 LncBase 实验数据库和 Starbase 预测数据库筛选 DEmiRNA-DEIncRNA 相互作用。

由于 lncRNA 具有组织特异性, 根据定位不同产生不同的作用机制。对 lncRNA 进行亚细胞定位首先在 UCSC 数据库中下载筛选出的 lncRNA 的序列, 将序列输入 lncLocator 数据库中预测 lncRNA 亚细胞定位。

利用 cytoscape 整合以上相互作用, 构建转录和转录后水平表达量随分期动态变化的 TF、mRNA、miRNA、lncRNA、circRNA 五节点 ceRNA 调控网络。

2.5. 基因本体论(Gene Ontology, GO)富集分析

利用 cytoscape 中的 cluego 插件对靶基因进行 GO 富集分析, 筛选其中 $P < 0.05$ 的通路。

2.6. 蛋白互作(Protein-Protein Interaction Network, PPI)网络构建

利用 String 构建五节点调控网络中靶基因的蛋白互作 PPI 网络, 筛选 MCC 排名前 8 的基因作为核心基因。

3. 结果

3.1. 数据获取及预处理

下载 TCGA 包含 16,869 个 lncRNA、19,937 个 mRNA (539 个 LUAD 样本, 59 个癌旁样本)以及 2213 个成熟体 miRNA (521 个 LUAD 样本, 46 个癌旁样本), GSE101586 包含 5490 个 circRNA (LUAD 样本 5 个, 癌旁样本 5 个), 预处理后, TCGALUAD 数据集包含 16,414 个 lncRNA、19,494 个 mRNA (296 个 LUAD 早期样本, 235 个 LUAD 晚期样本, 58 个癌旁样本)以及 2212 个成熟体 miRNA (283 个 LUAD 早期样本, 231 个 LUAD 晚期样本, 46 个癌旁样本)。

下载 GSE101586 包含 5490 个 circRNA (LUAD 样本 5 个, 癌旁样本 5 个), GSE101684 包含 9114 个 circRNA (LUAD 样本 4 个, 癌旁样本 4 个)。

3.2. 差异基因筛选

癌旁与早期差异 miRNA 共 541 个, 其中 300 个上调 241 个下调, 差异 lncRNA 共 6699 个, 其中 5150 个上调 1549 个下调。DEmRNA 共 8140 个, 其中 5303 个上调、2837 个下调。

早期与晚期差异 miRNA 共 41 个, 其中 8 个上调 23 个下调。差异 lncRNA 共 2115 个, 其中 371 个上调 1744 个下调。mRNA 共 1149 个, 其中 300 个上调、849 个下调。

GSE101684 中差异 circRNA 共 2125 个, 其中 1124 个上调, 1001 个下调。GSE101586 中差异 circRNA 共 182 个, 其中 154 个上调, 28 个下调。

取交集后, 在早晚期两组差异分析结果中均差异表达 23 个 DEmiRNA、1441 个 DEIncRNA 和 880 个 DEmRNA, 45 个 DEcircRNA。在差异基因中筛选出 27 个 TF (图 1)。

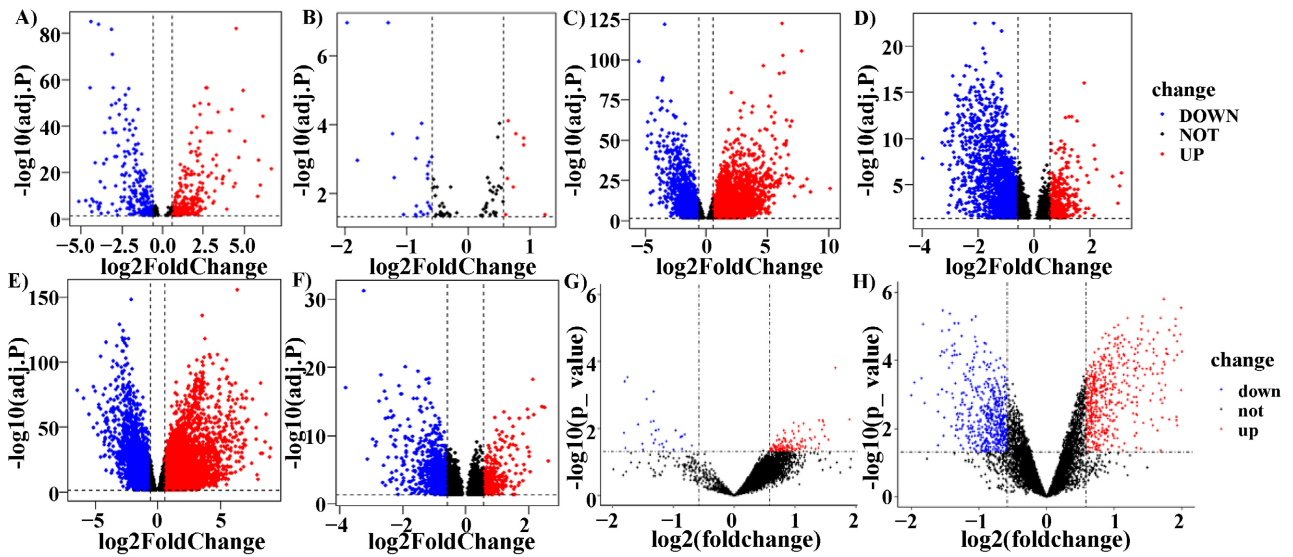


Figure 1. Differential analysis volcano plot; (A) paraneoplastic vs. early differential expression of miRNA; (B) early vs. late differential expression of miRNA; (C) paraneoplastic vs. early differential expression of lncRNA; (D) early vs. late differential expression of lncRNA; (E) paraneoplastic vs. early differential expression of mRNA; (F) early vs. late differential expression of mRNA; (G) GSE101684 differentially expresses circRNA; (H) GSE101586 differentially expresses circRNA, the blue color in the plot represents down-regulation, the red color represents up-regulation

图 1. 差异分析火山图; (A) 癌旁与早期差异表达 miRNA; (B) 早期与晚期差异表达 miRNA; (C) 癌旁与早期差异表达 lncRNA; (D) 早期与晚期差异表达 lncRNA; (E) 癌旁与早期差异表达 mRNA; (F) 癌旁与早期差异表达 mRNA; (G) GSE101684 差异表达 circRNA; (H) GSE101586 差异表达 circRNA, 图中蓝色代表下调, 红色代表上调

3.3. 构建五节点动态 ceRNA 调控网络

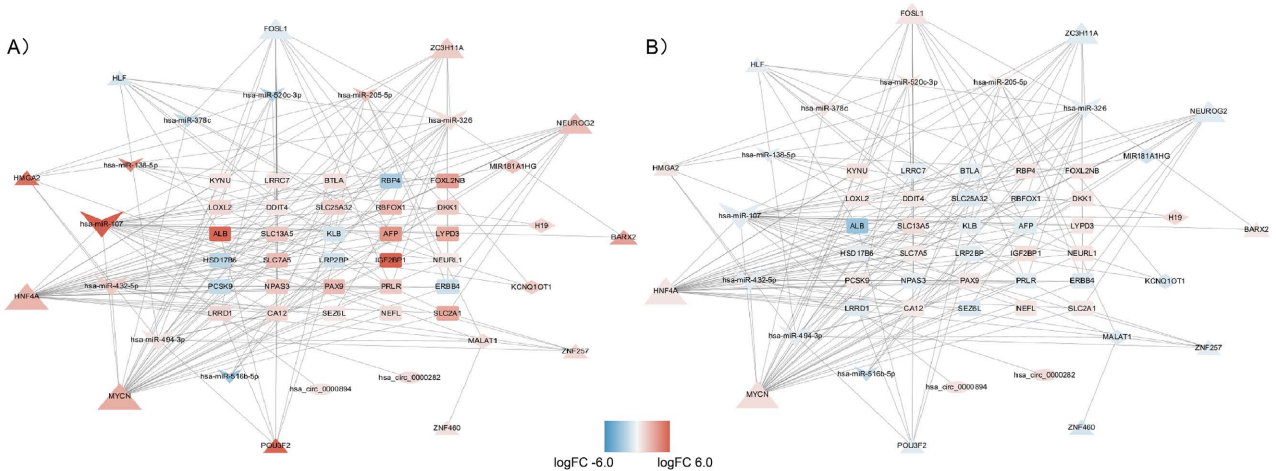


Figure 2. 5-node dynamic ceRNA regulatory network; (A) paraneoplastic vs. early stage differential regulatory network; (B) early vs. late stage differential regulatory network, where triangles represent TFs, squares represent mRNAs, V-shape represents miRNAs, ovals represent circRNAs, and diamonds represent lncRNAs

图 2. 五节点动态 ceRNA 调控网络; (A) 癌旁与早期差异调控网络; (B) 早期与晚期差异调控网络, 其中三角形代表 TF, 方形代表 mRNA, V 型代表 miRNA, 椭圆形代表 circRNA, 菱形代表 lncRNA

基于差异表达结果, 在数据库中得到转录关系对: 4 对 DE miRNA-TF, 其中 1 个 lncRNA、4 个 TF; 29 对 DE miRNA-TF, 其中 7 个 miRNA、9 个 TF; 87 对 DE mRNA-TF, 其中 32 个 mRNA、9 个 TF。转录后关系对: 31 对 DE circRNA-miRNA, 其中 15 个 miRNA 18 个 circRNA; DE mRNA-miRNA 共 58 对,

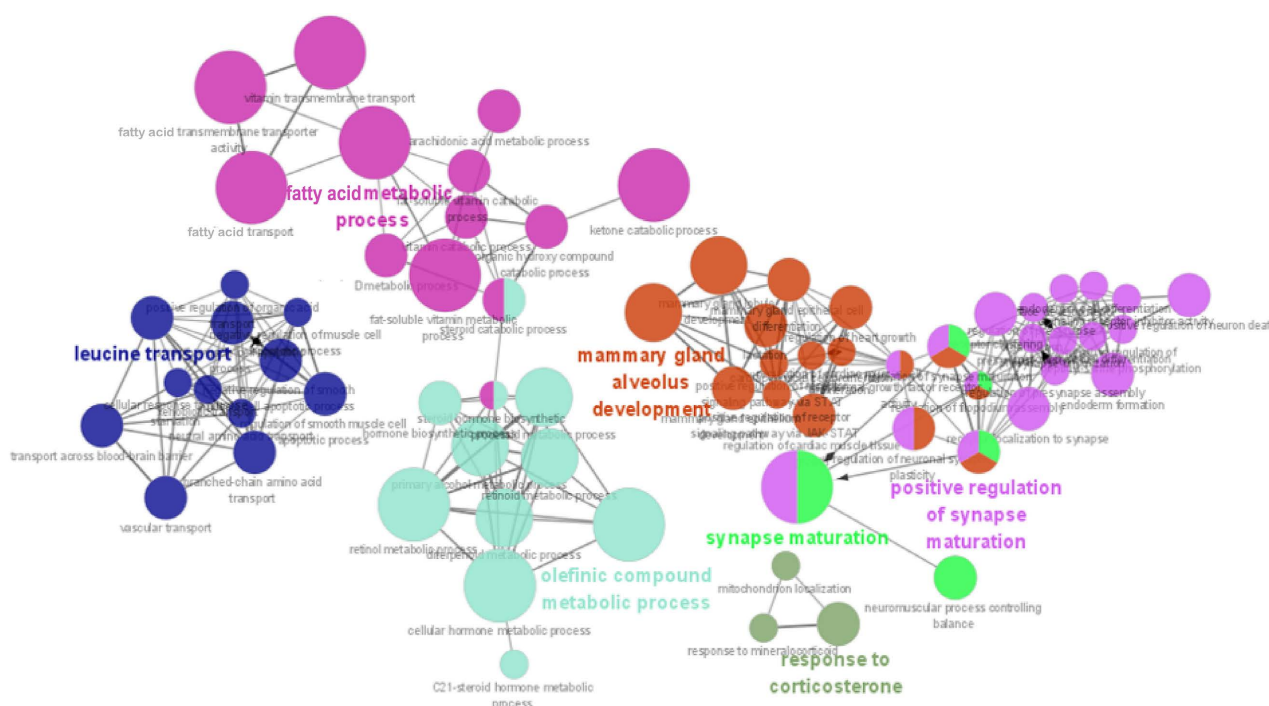
其中 miRNA 13 个、mRNA 45 个；DELncRNA-miRNA 共 70 对相互作用，其中 43 个 lncRNA、12 个 miRNA。亚细胞定位结果显示，4 个 lncRNA 定位于细胞质中。

整合的转录水平和转录后水平的 ceRNA 调控网络中共 50 个节点 174 对调控关系，其中 miRNA 9 个、circRNA 2 个、lncRNA 4 个、mRNA 30 个、TF 11 个。最终得到早晚期表达量动态变化的五节点 ceRNA 网络(图 2)，图中蓝色节点代表下调，红色节点代表上调，颜色深浅代表差异表达 logFC 的大小，节点大小代表度的大小。

从以上分期网络中可见随疾病分期显著动态表达的关键调控因子和基因。如 ALB 在早期表达量相比于癌旁显著上调(logFC = 5.8, adj.P < 0.01)，而在晚期的表达量显著下调(logFC = -3.2, adj.P < 0.01)。HNF4A 在早期表达量相比于癌旁显著上调(logFC = 2.7, adj.P < 0.01)，晚期的表达量持续上调(logFC = 0.7, adj.P < 0.01)。RBP4 在早期表达量相比于癌旁显著下调(logFC = -2.6, adj.P < 0.01)，而在晚期的表达量上调(logFC = 0.7, adj.P < 0.01)。ERBB4 在早期表达量相比于癌旁显著下调(logFC = -1.4, adj.P < 0.01)，晚期的表达量持续下调(logFC = 0.8, adj.P < 0.01)。

3.4. 基因本体论(Gene Ontology, GO)富集分析

靶基因主要富集在亮氨酸运输、脂肪酸代谢、突触成熟，以及乳腺肺泡发育等生物过程中(图 3)。



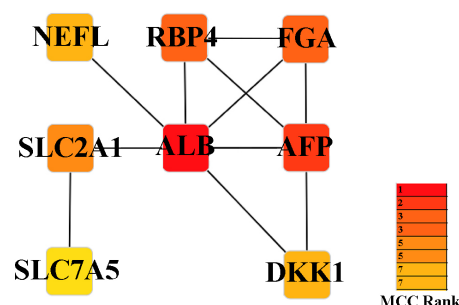
图中不同颜色代表富集不同的生物学过程，其中紫色代表脂肪酸代谢过程，深蓝色代表色氨酸运输，黄色代表乳腺肺泡发育，粉色代表突触成熟，圆圈大小代表富集生物种类中包含的通路数量，圆圈越大代表富集到的通路数量越多。

Figure 3. GO enrichment analysis

图 3. GO 富集分析

3.5. 蛋白相互作用(Protein-Protein Interaction Network, PPI)网络的构建

通过 String 构建核心基因蛋白互作网络(图 4)，最终得到 MCC 排名前 8 的关键靶基因，分别为 NEFL、RBP4、FGA、SLC2A1、ALB、AFP、SLC7A5、DKK1。



颜色越深代表 MCC 值越大。

Figure 4. PPI network interoperability diagram

图 4. PPI 网络互作图

4. 讨论

通过构建的表达量随分期动态变化的 LUAD 5 节点 ceRNA 调控网络, 得到的靶基因主要富集在营养物质代谢和运输、突触成熟、以及乳腺肺泡发育等生物学过程, 这些过程都和 LUAD 发生发展有紧密联系。代谢重编程是恶性肿瘤的标志之一, 主要表现为糖酵解增强、谷氨酰胺代谢活跃及脂质代谢异常[20]。肺癌中, 肿瘤细胞糖酵解产生的乳酸诱导微环境中调节性 T 细胞上的程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1)表达上调, 导致 PD-1 免疫阻断疗法的失效[21]。而抑制葡萄糖转运蛋白阻碍 LUAD 糖酵解, 可减缓 LUAD 发展[22]。哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)是细胞生命活动和代谢调控中的关键因素[23]。它包含两种复合体, mTORC1 和 mTORC2, 其中 mTORC1 在氨基酸充足时激活, 促进细胞生长通过增加合成代谢和抑制分解代谢。研究发现 SAR1B 通过控制亮氨酸依赖的 mTORC1 信号来影响肿瘤发生, 特别是在人 LUAD 中, SAR1B 常缺失, 导致亮氨酸敏感性消失和 mTORC1 的结构性激活。通过实验模型, 研究证明 SAR1A 和 SAR1B 的缺失不仅促进皮下和肺内肿瘤生长, 而且促进肿瘤的代谢重编程和增殖[24]。此外, 神经元还可以和肿瘤细胞形成肿瘤-神经突触。这些信号传导机制通常会激活促进肿瘤生长的典型致癌信号通路[25]。下丘脑-垂体轴及其产生的激素 α -MSH 可以介导肿瘤诱导的髓系造血(MDSCs)和免疫抑制, 研究人员通过肿瘤模型发现, 非小细胞肺癌(NSCLC)患者血清中 α -MSH 浓度显著升高并与外周血中的 MDSCs 比例呈正相关[26]。另外, 乳腺癌与肺癌的发生存在某些共同机制, 如基因、晚期糖基化终产物受体、雌激素及烟草等。乳腺癌放疗则通过一些直接和间接作用在一定程度上促进第二原发性肺癌的发生[27]。

通过构建的网络的靶基因构建的 PPI 网络, 获得了 NEFL、RBP4、FGA、SLC2A1、ALB、AFP、SLC7A5、DKK1 这 8 个核心基因, 它们都与肿瘤发生发展有关。

神经丝轻链多肽(NEFL)是细胞骨架的关键成分。NEFL 基因被证明为一种抑癌基因, 位于人类染色体 8p21, 而这一区域富含抑癌基因[28]。研究人员通过对 108 例肺癌患者的 NEFL 的表达进行免疫组化检测和随访观察发现, NEFL 的表达与肺癌淋巴结转移有关系, 并且其阳性表达与患者预后呈正相关[29]。

视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)是一种在肝脏合成的 RBP 家族分泌分子[30]。流行病学研究表明, RBP4 与多种恶性肿瘤的发生和发展有关, 在肝癌、胰腺癌、急性白血病等肿瘤中高表达[31] [32]。胡等人将 256 例确诊的 NSCLC 病例和 256 例年龄和性别匹配的健康对照组病例进行对照研究, 发现 NSCLC 患者血清 RBP4 水平明显高于健康对照组(36.05 ± 8.28 vs 29.54 ± 7.71 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0.05$)。血清 RBP4 水平升高与 NSCLC 风险增加相关($P\text{-value} = 0.001$) [33]。

纤维蛋白原 α 链(FGA), 是纤维蛋白原的 α 成分[34]。研究人员使用 CRISPR/Cas9 基因组编辑在两个 LUAD 细胞系 A549 和 H1299 中进行实验, 发现敲除 FGA 可促进 LUAD 细胞的生长、迁移和侵袭, 但

服用 FGA 可抑制 LUAD 细胞在肺部的表达。在体外 LUAD 细胞和体内异种移植肿瘤模型中进行功能分析显示, FGA 通过凋亡和 EMT 介导的肿瘤生长和转移调控还参与了整合素-AKT 信号通路。研究结果表明, FGA 对 LUAD 细胞的生长和转移起着抑制作用[35]。

溶质运载家族 2 促进葡萄糖转运体成员 1 (SLC2A1)是细胞能量代谢途径中的一种重要蛋白质。在正常组织中, SLC2A1 仅限于在红细胞和血脑屏障的内皮细胞上表达[36]。最近, SLC2A1 被证明是恶性肿瘤细胞中葡萄糖转运的关键限速因子, 并在几种不同类型的人类癌症中过度表达, 包括肝癌、胰腺癌、子宫内膜癌、乳腺癌和肺癌[37] [38] [39]。一项研究表明, SLC2A1 表达的升高与 LUAD 患者的预后密切相关, 同时, 敲除 SLC2A1 可抑制 LUAD 细胞的增殖、集落形成、侵袭和葡萄糖利用[40]。

溶质载体家族 7 成员 5 (SLC7A5)是色氨酸转运蛋白[41]。一项基于血清代谢变化和体外实验的研究发现, 在 A549 肺癌细胞中敲除 SLC7A5 后, 色氨酸的细胞水平显著降低, 糖酵解活性的减弱, 表明 SLC7A5 在促进肺癌的糖酵解过程中起重要作用[42]。

Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1)是 Wnt/B-catenin 信号通路的典型抑制剂, 属于 DKK 家族[43]。DKK1 作为一种分泌型糖蛋白, 主要通过 Wnt 蛋白竞争性结合 LRP5/6 受体, 拮抗 Wnt/ β -catenin 信号通路活性, 调节细胞增殖、分化及癌变, 影响细胞凋亡、瘤细胞侵袭和转移[44]。Wnt 拮抗剂启动子高甲基化导致的基因沉默发生在 LUAD 的早期阶段, 并随着恶性肿瘤的发展而不断累积[45]。

血清白蛋白(ALB)水平是血液学指标中最常用的一项评估指标[46]。血浆 ALB 水平降低会引起体内环境紊乱, 导致机体代谢异常, 多项研究表明血浆 ALB 降低与肿瘤不良预后相关[47]。血浆白蛋白可以反映人体营养状态及凝血功能, 机体的营养状态及凝血功能可以用于判断恶性肿瘤患者的预后[48] [49] [50], 近年来 ALB 被广泛应用于判断恶性肿瘤患者的预后[51] [52] [53]。

甲胎蛋白(AFP)是胚胎期血浆蛋白的主要成分, 其功能与结构都与白蛋白有很多相似之处(属于类白蛋白家族) [54]。AFP 在免疫应答中发挥作用, 认为其具有免疫抑制的作用, 是 T 细胞和 B 细胞的免疫调节剂, 主要表现为抑制母体对胚胎发育的免疫应答以及肿瘤患者对肿瘤的免疫应答[55]。AFP 是当前诊断肝癌常用的方法和最重要的肿瘤指标, 约 60%~70%肝癌患者 AFP 升高, 其中约 18%肝癌患者 AFP 低浓度升高[56]。

5. 结论

综上所述, 本研究基于生物信息学构建了 LUAD 动态五节点 ceRNA 调控网络, 通过数据处理、差异分析、数据库预测与筛选得到了关键调控因子与关键基因, 并通过富集分析及 PPI 蛋白互作网络构建筛选出 8 个核心基因, 初步探索 LUAD 发生发展的机制, 此结果有助于为 LUAD 诊断与治疗提供新思路。然而, 由于目前能收集到的 circRNA 数据有限, 后续的研究应该结合包含 circRNA 临床分期样本的表达数据构建调控网络, 进一步挖掘分子机制。同时, 后续的研究应该进一步结合相关临床数据和实验对上述研究结果进行验证。

参考文献

- [1] Torre, L.A., Siegel, R.L. and Jemal, A. (2016) Lung Cancer Statistics. In: Ahmad, A. and Gadgeel, S., Eds., *Lung Cancer and Personalized Medicine*, Springer, Berlin, 1-19. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_1
- [2] Wu, C., Xu, B., Zhou, Y., Ji, M., Zhang, D., Jiang, J. and Wu, C. (2016) Correlation between Serum IL-1 β and MiR-144-3p as Well as Their Prognostic Values in LUAD and LUSC Patients. *Oncotarget*, 7, 85876-85887. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13042>
- [3] Wang, Z., Zhang, J., Shi, S., Ma, H., Wang, D., Zuo, C., Zhang, Q. and Lian, C. (2023) Predicting Lung Adenocarcinoma Prognosis, Immune Escape, and Pharmacomic Profile from Arginine and Proline-Related Genes. *Scientific Reports*, 13, Article No. 15198. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42541-z>

- [4] Wu, K., House, L., Liu, W. and Cho, W.C.S. (2012) Personalized Targeted Therapy for Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 11471-11496. <https://doi.org/10.3390/ijms130911471>
- [5] Su, K., Wang, N., Shao, Q., Liu, H., Zhao, B. and Ma, S. (2021) The Role of a CeRNA Regulatory Network Based on LncRNA MALAT1 Site in Cancer Progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **137**, Article ID: 111389. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111389>
- [6] Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L. and Pandolfi, P.P. (2011) A CeRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell*, **146**, 353-358. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>
- [7] Morita, K., Suzuki, K., Maeda, S., *et al.* (2017) Genetic Regulation of the RUNX Transcription Factor Family Has Antitumor Effects. *The Journal of Clinical Investigation*, **127**, 2815-2828. <https://doi.org/10.1172/JCI91788>
- [8] Le, T.D., Liu, L., Zhang, J., Liu, B. and Li, J. (2015) From MiRNA Regulation to MiRNA-TF Co-Regulation: Computational Approaches and Challenges. *Briefings in Bioinformatics*, **16**, 475-496. <https://doi.org/10.1093/bib/bbu023>
- [9] Gurung, R., Masood, M., Singh, P., Jha, P., Sinha, A., Ajmeriya, S., Sharma, M., Dohare, R. and Haque, M.M. (2024) Uncovering the Role of Aquaporin and Chromobox Family Members as Potential Biomarkers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma via Integrative Multiomics and *in Silico* Approach. *Journal of Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s13353-024-00843-6>
- [10] Alsayed, R., Sheikhan, K., Alam, M.A., Buddenkotte, J., Steinhoff, M., Uddin, S. and Ahmad, A. (2023) Epigenetic Programming of Cancer Stemness by Transcription Factors-Non-Coding RNAs Interactions. *Seminars in Cancer Biology*, **92**, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.04.005>
- [11] Vinchure, O.S. and Kulshreshtha, R. (2021) MiR-490: A Potential Biomarker and Therapeutic Target in Cancer and Other Diseases. *Journal of Cellular Physiology*, **236**, 3178-3193. <https://doi.org/10.1002/jcp.30119>
- [12] Giannareas, N., Zhang, Q., Yang, X., *et al.* (2022) Extensive Germline-Somatic Interplay Contributes to Prostate Cancer Progression through HNF1B Co-Option of TMPRSS2-ERG. *Nature Communications*, **13**, Article No. 7320. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34994-z>
- [13] Wang, H., Li, J., Wang, S., *et al.* (2021) Contribution of Structural Accessibility to the Cooperative Relationship of TF-LncRNA in Myopia. *Briefings in Bioinformatics*, **22**, bbab082. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab082>
- [14] Zhang, X., Liang, Z., Zhang, Y., Dai, K., Zhu, M., Wang, J. and Hu, X. (2020) Comprehensive Analysis of Long Non-Coding RNAs Expression Pattern in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis. *Genomics*, **112**, 1970-1977. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.11.009>
- [15] Tong, Z., Cui, Q., Wang, J. and Zhou, Y. (2019) TransmiR V2.0: An Updated Transcription Factor-MicroRNA Regulation Database. *Nucleic Acids Research*, **47**, D253-D258. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1023>
- [16] Terekhanova, N.V., Karpova, A., Liang, W.W., *et al.* (2023) Epigenetic Regulation during Cancer Transitions across 11 Tumour Types. *Nature*, **623**, 432-441. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06682-5>
- [17] Ding, D., Xu, C., Zhang, J., *et al.* (2024) Revealing Underlying Regulatory Mechanisms of LINC00313 in Osimertinib-Resistant LUAD Cells by CeRNA Network Analysis. *Translational Oncology*, **43**, Article ID: 101895. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.101895>
- [18] Wei, X., Yi, X., Liu, J., Sui, X., Li, L., Li, M., Lv, H. and Yi, H. (2024) Circ-Phkb Promotes Cell Apoptosis and Inflammation in LPS-Induced Alveolar Macrophages via the TLR4/MyD88/NF-KB/CCL2 Axis. *Respiratory Research*, **25**, Article No. 62. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02677-6>
- [19] Zhang, C., Yu, Z., Yang, S., Liu, Y., Song, J., Mao, J., Li, M. and Zhao, Y. (2024) ZNF460-Mediated CircRPPH1 Promotes TNBC Progression through ITGA5-Induced FAK/PI3K/AKT Activation in a CeRNA Manner. *Molecular Cancer*, **23**, Article No. 33. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-01944-w>
- [20] Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- [21] Kumagai, S., Koyama, S., Itahashi, K., *et al.* (2022) Lactic Acid Promotes PD-1 Expression in Regulatory T Cells in Highly Glycolytic Tumor Microenvironments. *Cancer Cell*, **40**, 201-218.E9.
- [22] Contat, C., Ancey, P.B., Zangger, N., *et al.* (2020) Combined Deletion of Glut1 and Glut3 Impairs Lung Adenocarcinoma Growth. *ELife*, **9**, e53618. <https://doi.org/10.7554/eLife.53618>
- [23] Saxton, R.A. and Sabatini, D.M. (2017) MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, **168**, 960-976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- [24] Chen, J., Ou, Y., Luo, R., *et al.* (2021) SAR1B Senses Leucine Levels to Regulate MTORC1 Signalling. *Nature*, **596**, 281-284. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03768-w>
- [25] Shi, D.D., Guo, J.A., Hoffman, H.I., *et al.* (2022) Therapeutic Avenues for Cancer Neuroscience: Translational Frontiers and Clinical Opportunities. *The Lancet. Oncology*, **23**, E62-E74. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00596-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00596-9)

- [26] Xu, Y., Yan, J., Tao, Y., *et al.* (2022) Pituitary Hormone α -MSH Promotes Tumor-Induced Myelopoiesis and Immunosuppression. *Science (New York, N.Y.)*, **377**, 1085-1091. <https://doi.org/10.1126/science.abj2674>
- [27] Chen, D., Xiao, Y. and Zhong, K. (2022) Risk Factors and Pathogenic Mechanism for Secondary Primary Lung Cancer in Breast Cancer Patients: A Review. *Chinese Journal of Lung Cancer*, **25**, 750-755.
- [28] Imbert, A., Chaffanet, M., Essioux, L., *et al.* (1996) Integrated Map of the Chromosome 8p12-p21 Region, a Region Involved in Human Cancers and Werner Syndrome. *Genomics*, **32**, 29-38. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0073>
- [29] Shen, Z., Chen, B., Gan, X., *et al.* (2016) Methylation of Neurofilament Light Polypeptide Promoter Is Associated with Cell Invasion and Metastasis in NSCLC. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **470**, 627-634. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.094>
- [30] Wlodarczyk, B., Gasiorowska, A., Borkowska, A. and Malecka-Panas, E. (2017) Evaluation of Insulin-Like Growth Factor (IGF-1) and Retinol Binding Protein (RBP-4) Levels in Patients with Newly Diagnosed Pancreatic Adenocarcinoma (PDAC). *Pancreatology*, **17**, 623-628. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.04.001>
- [31] Wang, D.D., Zhao, Y.M., Wang, L., *et al.* (2011) Preoperative Serum Retinol-Binding Protein 4 Is Associated with the Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma after Curative Resection. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **137**, 651-658. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0927-3>
- [32] Tang, W., Li, X., Ma, Z.Z. and Li, C.Y. (2018) Significance of Retinol-Binding Protein Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Experimental Hematology*, **26**, 417-421.
- [33] Hu, X., Huang, W., Wang, F., Dai, Y., Hu, X., Yue, D. and Wang, S. (2020) Serum Levels of Retinol-Binding Protein 4 and the Risk of Non-Small Cell Lung Cancer: A Case-Control Study. *Medicine*, **99**, E21254. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001254>
- [34] Mosesson, M.W. (2005) Fibrinogen and Fibrin Structure and Functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, **3**, 1894-1904. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x>
- [35] Wang, M., Zhang, G., Zhang, Y., *et al.* (2020) Fibrinogen Alpha Chain Knockout Promotes Tumor Growth and Metastasis through Integrin-AKT Signaling Pathway in Lung Cancer. *Molecular Cancer Research: MCR*, **18**, 943-954. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-1033>
- [36] Pardridge, W.M., Boado, R.J. and Farrell, C.R. (1990) Brain-Type Glucose Transporter (GLUT-1) Is Selectively Localized to the Blood-Brain Barrier. Studies with Quantitative Western Blotting and in Situ Hybridization. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 18035-18040. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)38267-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)38267-X)
- [37] Amann, T., Maegdefrau, U., Hartmann, A., *et al.* (2009) GLUT1 Expression Is Increased in Hepatocellular Carcinoma and Promotes Tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, **174**, 1544-1552. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080596>
- [38] Krzeslak, A., Wojcik-Krowiranda, K., Forma, E., Jozwiak, P., Romanowicz, H., Bienkiewicz, A. and Brys, M. (2012) Expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose Transporters in Endometrial and Breast Cancers. *Pathology Oncology Research: POR*, **18**, 721-728. <https://doi.org/10.1007/s12253-012-9500-5>
- [39] Wachi, S., Yoneda, K. and Wu, R. (2005) Interactome-Transcriptome Analysis Reveals the High Centrality of Genes Differentially Expressed in Lung Cancer Tissues. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **21**, 4205-4208. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti688>
- [40] Wang, Y., Shi, S., Ding, Y., Wang, Z., Liu, S., Yang, J. and Xu, T. (2017) Metabolic Reprogramming Induced by Inhibition of SLC2A1 Suppresses Tumor Progression in Lung Adenocarcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **10**, 10759-10769.
- [41] Nemkov, T., Stephenson, D., Erickson, C., *et al.* (2024) Regulation of Kynurenine Metabolism by Blood Donor Genetics and Biology Impacts Red Cell Hemolysis *In Vitro* and *In Vivo*. *Blood*, **143**, 456-472. <https://doi.org/10.1182/blood.2023022052>
- [42] Yao, Y., Wang, X., Guan, J., *et al.* (2023) Metabolomic Differentiation of Benign vs Malignant Pulmonary Nodules with High Specificity via High-Resolution Mass Spectrometry Analysis of Patient Sera. *Nature Communications*, **14**, Article No. 2339. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37875-1>
- [43] Chu, H.Y., Chen, Z., Wang, L., *et al.* (2021) Dickkopf-1: A Promising Target for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article ID: 658097. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.658097>
- [44] Zhu, G., Song, J., Chen, W., Yuan, D., Wang, W., Chen, X., Liu, H., Su, H. and Zhu, J. (2021) Expression and Role of Dickkopf-1 (Dkk1) in Tumors: From the Cells to the Patients. *Cancer Management and Research*, **13**, 659-675. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S275172>
- [45] Licchesi, J.D., Westra, W.H., Hooker, C.M., Machida, E.O., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2008) Epigenetic Alteration of Wnt Pathway Antagonists in Progressive Glandular Neoplasia of the Lung. *Carcinogenesis*, **29**, 895-904. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn017>

- [46] Shimura, T., Toiyama, Y., Hiro, J., *et al.* (2018) Monitoring Perioperative Serum Albumin Can Identify Anastomotic Leakage in Colorectal Cancer Patients with Curative Intent. *Asian Journal of Surgery*, **41**, 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2016.07.009>
- [47] Wu, M.T., He, S.Y., Chen, S.L., Li, L.F., He, Z.Q., Zhu, Y.Y., He, X. and Chen, H. (2019) Clinical and Prognostic Implications of Pretreatment Albumin to C-Reactive Protein Ratio in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *BMC Cancer*, **19**, Article No. 538. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5747-5>
- [48] Mantzorou, M., Koutelidakis, A., Theocharis, S. and Giaginis, C. (2017) Clinical Value of Nutritional Status in Cancer: What Is Its Impact and How It Affects Disease Progression and Prognosis? *Nutrition and Cancer*, **69**, 1151-1176. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1367947>
- [49] Gras, J. (2012) Semuloparin for the Prevention of Venous Thromboembolic Events in Cancer Patients. *Drugs of Today (Barcelona, Spain)*, **48**, 451-457. <https://doi.org/10.1358/dot.2012.48.7.1838374>
- [50] Ravasco, P., Monteiro-Grillo, I. and Camilo, M. (2012) Individualized Nutrition Intervention Is of Major Benefit to Colorectal Cancer Patients: Long-Term Follow-Up of a Randomized Controlled Trial of Nutritional Therapy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **96**, 1346-1353. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.018838>
- [51] Egenvall, M., Mörner, M., Martling, A. and Gunnarsson, U. (2018) Prediction of Outcome after Curative Surgery for Colorectal Cancer: Preoperative Haemoglobin, C-Reactive Protein and Albumin. *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, **20**, 26-34. <https://doi.org/10.1111/codi.13807>
- [52] Vazeille, C., Jouinot, A., Durand, J.P., Neveux, N., Boudou-Rouquette, P., Huillard, O., Alexandre, J., Cynober, L. and Goldwasser, F. (2017) Relation between Hypermetabolism, Cachexia, and Survival in Cancer Patients: A Prospective Study in 390 Cancer Patients before Initiation of Anticancer Therapy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **105**, 1139-1147. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.140434>
- [53] Zhang, Y. and Xiao, G. (2019) Prognostic Significance of the Ratio of Fibrinogen and Albumin in Human Malignancies: A Meta-Analysis. *Cancer Management and Research*, **11**, 3381-3393. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S198419>
- [54] Mizejewski, G.J. (2004) Biological Roles of Alpha-Fetoprotein during Pregnancy and Perinatal Development. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, **229**, 439-463. <https://doi.org/10.1177/153537020422900602>
- [55] Yang, J.Y., Li, X., Gao, L., Teng, Z.H. and Liu, W.C. (2012) Co-Transfection of Dendritic Cells with AFP and IL-2 Genes Enhances the Induction of Tumor Antigen-Specific Antitumor Immunity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **4**, 655-660. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.635>
- [56] Llovet, J.M., Montal, R., Sia, D. and Finn, R.S. (2018) Molecular Therapies and Precision Medicine for Hepatocellular Carcinoma. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, **15**, 599-616. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0073-4>