doi:10.11659/jjssx.09E023132

·基础研究·

卵巢癌组织长链非编码RNA PVT1表达及其靶基因生物信息学预测研究

刘 莹,范 丽 (湖北医药学院附属人民医院妇产科,湖北 十堰 442000)

[摘 要] **目的** 检测长链非编码RNA浆细胞瘤多样异位基因1(lncRNA PVT1)在卵巢癌组织中的表达并预测其靶基因,进而对靶基因进行生物信息学分析。**方法** 收集2019年6月至2019年12月于我院行手术治疗的125例卵巢癌患者的癌组织及其切缘正常组织。RT-PCR检测癌组织及其切缘正常组织lncRNA PVT1的表达;比较不同临床病理特征患者卵巢癌组织lncRNA PVT1表达;应用在线工具Annolnc2数据库、GEPIA2数据库、UALCAN数据库分别筛选出lncRNA PVT1靶基因取交集;采用DAVID数据库对筛选出的lncRNA PVT1靶基因进行GO功能和KEGG通路富集分析。**结果** 与切缘正常组织相比,癌组织中lncRNA PVT1相对表达水平升高($P<0.05$);TNM分期Ⅲ~Ⅳ期、低/未分化程度的卵巢癌患者癌组织中lncRNA PVT1的相对表达水平分别高于TNM分期Ⅰ~Ⅱ期、中/高分化程度的卵巢癌患者($P<0.05$);lncRNA PVT1的靶基因有44个,GO功能分析发现靶基因功能主要富集于细胞周期调控、RNA聚合酶Ⅱ启动子的转录调控、转录因子活性、赖氨酰氧化酶活性、细胞外基质、细胞质等;KEGG通路分析显示其参与的通路主要富集于癌症相关信号通路、转化生长因子-β(TGF-β)信号通路、细胞外基质受体的相互作用、环磷酸鸟苷酸(cGMP)-蛋白激酶G(PKG)信号通路、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)-蛋白激酶B(AKT)信号通路等。**结论** lncRNA PVT1在卵巢癌组织中表达上调,其靶基因富集于细胞组分、分子功能和生物调节等多个生物学过程及TGF-β、cGMP-PKG等肿瘤相关信号通路上,lncRNA PVT1通过调控靶基因的表达在卵巢癌中发挥作用。

[关键词] 卵巢癌;lncRNA PVT1;靶基因;生物信息学
[中图分类号] R737.31 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-09-30

Expression of long non-coding RNA PVT1 and bioinformatics prediction of its target gene in ovarian cancer

LIU Ying, FAN Li (Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Shiyan Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To detect the expression of long non-coding RNA plasma-cytoma variant translocation gene 1 (lncRNA PVT1) in ovarian cancer tissues and predict its target gene, and then conduct bioinformatics analysis of the target gene. **Methods** The cancer tissues and incisal margin normal tissues of 125 patients with ovarian cancer who underwent surgical treatment in our hospital from June 2019 to December 2019 were collected. The expression of lncRNA PVT1 in cancer tissues and incisal margin normal tissues was detected by RT-PCR. The expression of lncRNA PVT1 in ovarian cancer tissues of patients with different clinicopathological characteristics was compared. The lncRNA PVT1 target genes were screened out by the online tools Anolnc2 database, GEPIA2 database, and UALCAN database to obtain the intersection. DAVID database was used to analyze the GO function and KEGG pathway enrichment of the screened lncRNA PVT1 target gene. **Results** Compared with incisal margin normal tissues, the relative expression of lncRNA PVT1 in cancer tissues significantly increased ($P<0.05$). The relative expression of lncRNA PVT1 in cancer tissues of ovarian patients with TNM stage Ⅲ to Ⅳ, poorly differentiated or undifferentiation were higher than those of ovarian patients with TNM stage Ⅰ to Ⅱ, moderately or well differentiated, respectively ($P<0.05$). There were 44 target genes of lncRNA PVT1. GO function analysis found that the target gene functions were mainly enriched in cell cycle regulation, transcription regulation of RNA polymerase Ⅱ promoter, transcription factor activity, lysine oxidase activity, extracellular matrix, cytoplasm, etc. KEGG pathway analysis showed that the pathway it participated in were mainly enriched in cancer-related signal pathway, transforming growth factor-β (TGF-β) signal pathway, extracellular matrix receptor interaction, cyclic guanosine phosphate (cGMP)-protein kinase G (PKG) signal pathway, phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)-RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT) signal pathway, etc. **Conclusion** The expression of lncRNA PVT1 is up-regulated in ovarian cancer tissues. Its target genes are enriched in multiple biological processes such as cell components, molecular functions, biological regulation and tumor-related signaling pathways such as TGF-β, CGMP-PKG. lncRNA PVT1 plays a role in ovarian cancer by regulating the expression of target genes.

Keywords: ovarian cancer; lncRNA PVT1; target gene; bioinformatics

卵巢癌作为妇科常见的恶性肿瘤,其发病率居妇科恶性肿瘤第3位,病死率居首位[1]。据全球癌症数据显示,2020年全球卵巢癌新发病例约310 000例,死亡约210 000例,已成为威胁女性生命健康的重要因

[基金项目] 湖北省卫生健康委科研项目(WJ2023M169)

素[2]。卵巢癌早期不易被发现,致使多数患者确诊时已是晚期,预后差,5年生存率只有26%[3]。近几年新兴的分子靶向治疗在多种恶性肿瘤的治疗中均显示出较好的疗效,但目前有关卵巢癌的靶点治疗十分有限,因此,寻找卵巢癌新的生物标志物对改善患者预后有重要意义。研究表明,长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)可在多种层面上调控基因的表达,参与人类多种疾病及肿瘤的发生[4]。浆细胞瘤多样异位基因1(plasma-cytoma variant translocation gene 1,PVT1)是近年新发现的一种lncRNA,于多种恶性肿瘤组织中异常表达,与肿瘤的发生发展密切相关[5]。既往研究显示,卵巢癌组织中lncRNA PVT1表达水平显著升高,有望成为卵巢癌的临床诊断标志物和治疗靶点[6]。但lncRNA PVT1在卵巢癌中的调控靶基因及其生物学过程和信号通路尚未完全明确。因此,本研究对卵巢癌组织中lncRNA PVT1的表达情况及其靶基因进行检测和生物信息学分析,以探究lncRNA PVT1在卵巢癌发生发展中可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2019年6月至2019年12月于我院行手术治疗的125例卵巢癌患者,年龄28~76岁,平均(49.59±7.30)岁,其中≥60岁47例,<60岁78例;病理类型:浆液性79例,黏液性33例,其他13例;TNM分期:Ⅰ~Ⅱ期55例,Ⅲ~Ⅳ期70例;肿瘤分化程度:未分化4例,低分化62例,中分化39例,高分化20例;肿瘤位置:单侧74例,双侧51例。纳入标准:①经影像学及病理学检查确诊为卵巢癌;②行手术治疗。排除标准:①术前接受过细胞治疗、免疫治疗、放化疗等;②合并其他妇科疾病;③合并其他部位恶性肿瘤或其他严重疾病;④认知功能障碍。本研究经我院医学伦理委员会批准(伦理批号:院准字2019第025号),患者及家属均签署对本研究的知情同意书。

1.2 实验试剂及仪器

PCR试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,批号:90408-1),TRIzol试剂盒(上海一基实业有限公司,批号:YIJI10254655),逆转录试剂盒(美国Fermentas公司,批号:K1622);CFX Opus 96型实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司),Forma 88000型超低温冰箱(美国Thermo Fisher公司),Sorvall LYNX 4000型低温高速离心机(美国Thermo Fisher公司)。

1.3 lncRNA PVT1表达检测

取患者癌组织及切缘正常组织制成组织匀浆,加入TRIzol试剂提取组织总RNA,逆转录得到cDNA,以cDNA为模板,根据PCR试剂盒说明进行扩增。其中lncRNA PVT1正向引物5′-TCCGATAAGAGCTTACGTACT-3′,反向引物5′-CGTAAGTACGATACGTAC-3′,产物长度275 bp;U6正向引物5′-GTATACAGGGTACAGTA-3′,反向引物5′-AATGCCCGATATGCCAGAGT-3′,产物长度339 bp,上述引物由上海生工合成。反应参数:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性5 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,合计40个循环。以U6为内参,通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算lncRNA PVT1的相对表达量。观察患者癌组织及切缘正常组织的lncRNA PVT1表达差异;并观察不同临床病理特征患者的卵巢癌组织lncRNA PVT1表达差异,其中临床病理特征包括年龄、病理类型、TNM分期、分化程度、肿瘤位置。

1.4 lncRNA PVT1靶基因预测

应用在线工具Annolnc2数据库(http://annolnc.gao-lab.org/)、GEPIA2数据库(https://http://gepia2.cancer-pku.cn/#index)、UALCAN数据库(http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html)分别筛选出可能与lncRNA PVT1表达水平相关的基因,利用在线软件VENNY2.1(http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)取交集,确定lncRNA PVT1靶基因集合范围。

1.5 lncRNA PVT1预测靶基因GO功能和KEGG通路富集分析

用GO数据库(http://geneontology.org/)对lncRNA PVT1的靶基因集合进行功能富集分类,GO包括细胞组分(cellular component,CC)、分子功能(molecular function,MF)和生物学过程(biological process,BP)3个本体。应用DAVID数据库(https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp)对预测出的lncRNA PVT1靶基因交集进行GO功能富集分析,以本物种的全部基因作为背景基因,以$P<0.05$为显著性阈值,得到相对于背景基因有统计学意义的lncRNA PVT1靶基因的富集信息。利用DAVID数据库对lncRNA PVT1靶基因集合进行基于KEGG数据库(https://www.kegg.jp/)的信号通路富集分析,以$P<0.05$为显著性阈值,得到相对于背景基因有统计学意义的lncRNA PVT1靶基因富集的信号通路。

1.6 统计学分析

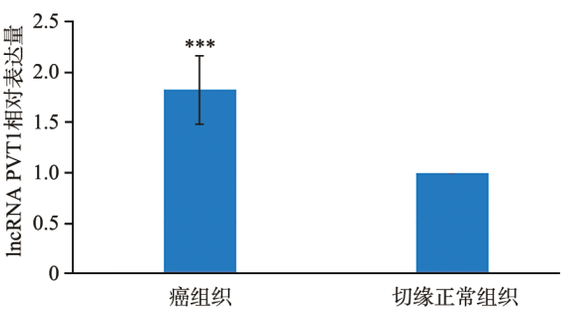
应用SPSS 22.0软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2样本比较采用独立样本t检验,多样本比较采用单因素方差分

析,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织与切缘正常组织lncRNA PVT1的相对表达量

与切缘正常组织相比,癌组织中lncRNA PVT1相对表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图1。



***:与切缘正常组织比较,$P<0.001$

图1 癌组织及切缘正常组织lncRNA PVT1相对表达量比较

2.2 不同临床病理特征患者癌组织lncRNA PVT1相对表达水平比较

不同年龄、病理类型和肿瘤位置卵巢癌患者癌组织中lncRNA PVT1相对表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);TNM分期Ⅲ~Ⅳ期、低/未分化程度患者中lncRNA PVT1的相对表达水平分别高于TNM分期Ⅰ~Ⅱ期、中/高分化程度的患者($P<0.05$),见表1。

表1 不同临床病理特征患者癌组织lncRNA PVT1相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

临床病理特征		n	lncRNA PVT1	t/F	P
年龄	≥60岁	47	1.79±0.30	1.213	0.226
	<60岁	78	1.84±0.35		
病理类型	浆液性	79	1.84±0.36	0.970	0.333
	黏液性	33	1.79±0.31		
	其他	13	1.77±0.32		
TNM分期	Ⅰ~Ⅱ期	55	1.74±0.30	2.238	0.027
	Ⅲ~Ⅳ期	70	1.88±0.38		
分化程度	低/未分化	66	1.95±0.40	6.336	<0.001
	中/高分化	59	1.67±0.29		
肿瘤位置	单侧	74	1.85±0.37	1.600	0.111
	双侧	51	1.78±0.32		

2.3 lncRNA PVT1的靶基因预测

在Annolnc2数据库中发现779个lncRNA PVT1的靶基因;在GEPIA2数据库中发现418个lncRNA PVT1的潜在靶基因;在UALCAN数据库中发现1 085个lncRNA PVT1的靶基因。通过VENNY2.1绘制Venn图,得到3个数据库交集靶基因共44个,见图2。

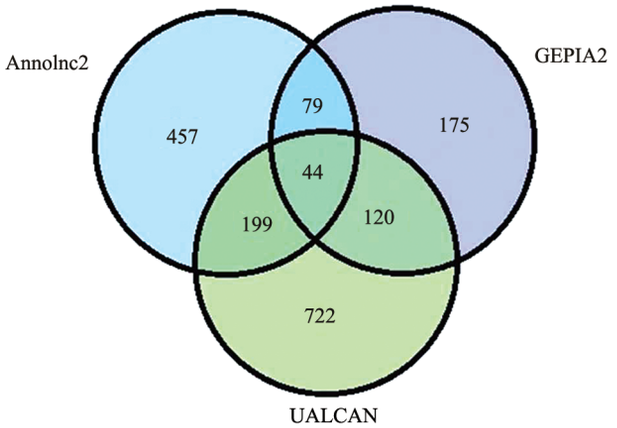


图2 lncRNA PVT1预测靶基因Venn图

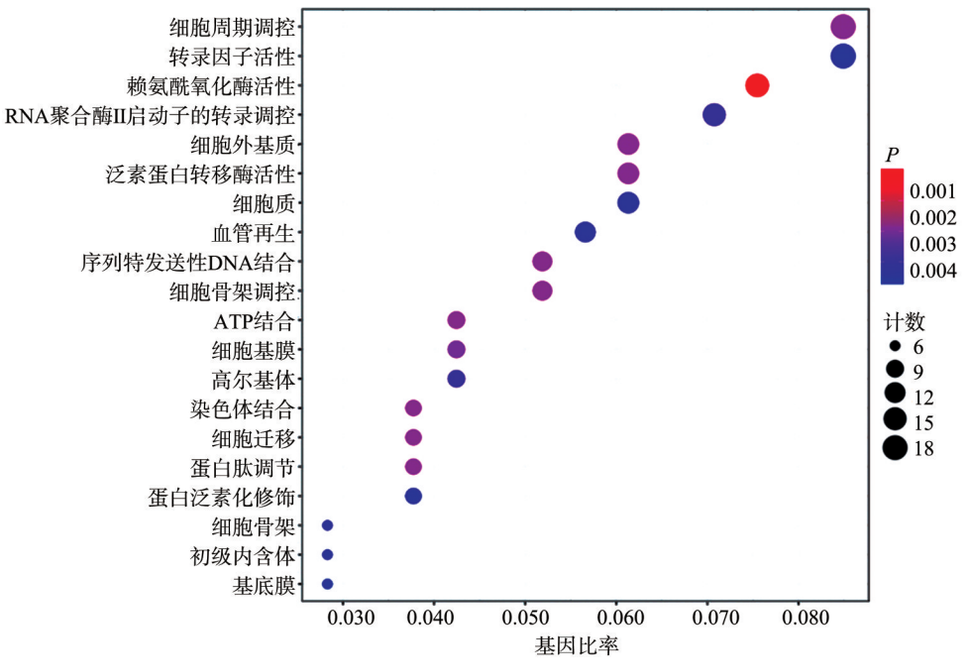
2.4 lncRNA PVT1靶基因GO功能和KEGG通路富集分析

lncRNA PVT1靶基因GO功能和KEGG通路富集分析分别得到251个条目和36条通路,分别选取前20个最显著的GO条目或KEGG通路以气泡图的形式展现。结果显示,lncRNA PVT1靶基因的BP主要富集于细胞周期调控、RNA聚合酶Ⅱ启动子的转录调控、血管再生等;MF主要富集于转录因子活性、赖氨酰氧化酶活性、泛素蛋白转移酶活性等;CC主要富集于细胞外基质、细胞质、细胞基膜等。lncRNA PVT1靶基因的信号通路主要富集于癌症相关信号通路、转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)信号通路、细胞外基质受体的相互作用、环磷酸鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate,cGMP)-蛋白激酶G(protein kinase G,PKG)信号通路、磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositide 3-kinases,PI3K)-蛋白激酶B(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase,AKT)信号通路等,见图3、4。

3 讨论

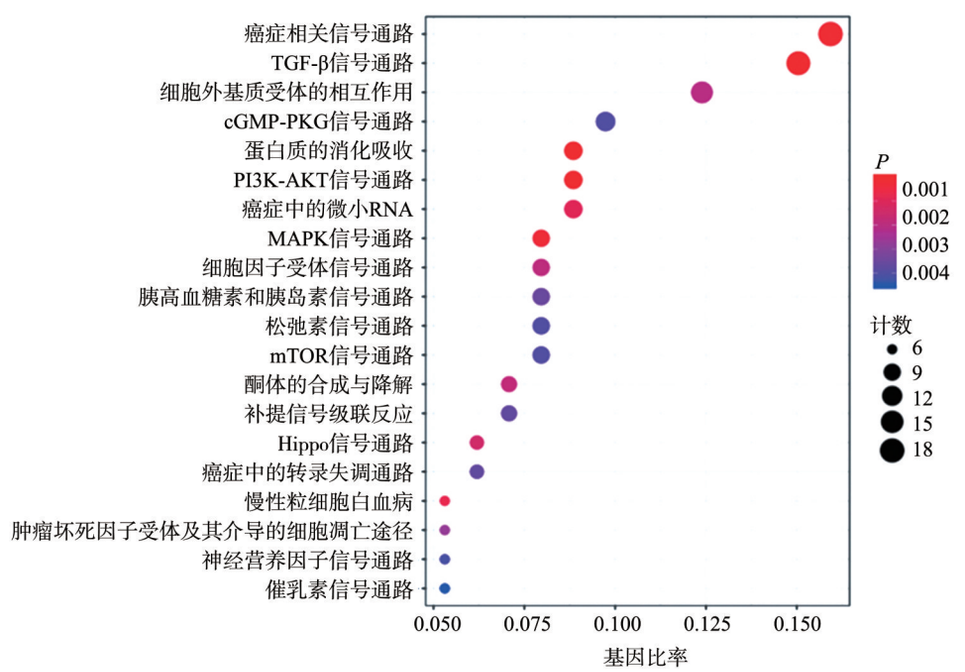
卵巢癌的具体发病原因尚不十分明确,目前考虑可能与遗传、环境、不良生活习惯、内分泌紊乱等因素有关[7]。手术切除仍然是卵巢癌主要的治疗手段,但多数患者治疗后容易复发,导致病死率较高,长期预后不佳[8]。近年来新兴的分子靶向治疗为卵巢癌的治疗提供了新的选择,因此,提高对卵巢癌发病机制的认识并探究新的治疗靶点,对卵巢癌的早期诊断、治疗和改善预后有重要意义。

本研究结果显示,与切缘正常组织相比,癌组织中lncRNA PVT1相对表达水平升高,且lncRNA PVT1在TNM分期Ⅲ~Ⅳ期、低/未分化程度患者中的相对表达水平分别高于TNM分期Ⅰ~Ⅱ期、中/高分化程度的患者,提示lncRNA PVT1在卵巢癌中发挥促癌基



注:横坐标为富集到该条目基因占总基因的比例,气泡越大代表富集基因数越多,气泡颜色越红代表富集显著性越高

图3 lncRNA PVT1靶基因GO富集分析气泡图



注:横坐标为富集到该条目基因占总基因的比例,气泡越大代表富集基因数越多,气泡颜色越红代表富集显著性越高

图4 lncRNA PVT1靶基因KEGG富集分析气泡图

因作用。既往研究显示,不少lncRNA已被证实是肿瘤新的预测性生物标志物,可对肿瘤进行早期诊断并评估肿瘤的进展和预后[9]。PVT1基因位于染色体8q24区,长度超过300 bp,是一种在肿瘤细胞中特异性高表达的lncRNA[10]。有研究显示,lncRNA PVT1在卵巢癌组织中过表达,其通过叉头框蛋白M1的表观遗传和转录后调节促进卵巢癌的恶性行为并诱导其化学耐药性[11]。Qu等[12]采用RT-PCR检测发现,PVT1在卵巢癌组织和细胞系中的表达水平明显高于切缘正常组织及细胞,且高水平的PVT1与患者5年总生存率较低显著相关。Dong等[13]研究表明,lncRNA PVT1通过调节结缔组织生长因子促进卵巢癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮-间充质转化过程。本研究结果与上述研究结果相一致,提示lncRNA PVT1表达升高可能通过多种途径促进卵巢癌细胞的恶性生物学行为,

参与肿瘤的发生和进展,可尝试通过抑制lncRNA PVT1表达抑制卵巢癌进展,但该治疗思路在临床中应用的可行性尚需进一步探讨分析。

本研究利用生物信息学方法预测lncRNA PVT1的靶基因,并基于GO、KEGG数据库对预测的靶基因集合进行了功能和信号转导通路富集分析。最终确定lncRNA PVT1的靶基因有44个,GO功能分析发现靶基因功能主要富集于细胞周期调控、RNA聚合酶Ⅱ启动子的转录调控、转录因子活性、赖氨酰氧化酶活性、细胞外基质、细胞质等,提示上述BP、CC和MF及其富集的基因或蛋白分子在卵巢癌的发生发展中可能发挥重要作用;KEGG通路分析显示其参与的通路主要富集于癌症相关信号通路、TGF-β信号通路、cGMP-PKG信号通路、细胞外基质受体的相互作用、PI3K-AKT信号通路等,提示lncRNA PVT1可能是通过靶向上述信号通路参与调控卵巢癌的病理进程。TGF-β可以作为上皮性卵巢癌的肿瘤启动因子,在转录和转录后水平上促进上皮-间充质转化进而发挥促癌作用[14]。Lan等[15]研究显示,活化的PKG可减弱表皮细胞生长因子诱导的卵巢癌细胞的增殖和迁移,cGMP-PKG轴可能是卵巢癌治疗的潜在靶标。Li等[16]研究指出,PI3K-AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路与肿瘤细胞周期调控、增殖、凋亡、侵袭、转移以及血管形成等生物学过程密切相关,在多种肿瘤的进展过程中发挥关键作用,因此,以PI3K-AKT为靶点的治疗方案成为近年来肿瘤治疗的研究新热点。以上均提示上述信号通路参与肿瘤的发生发展,本研究结果与上述研究相一致,进一步证实了本研究结果的可靠性,同时表明下调卵巢癌lncRNA PVT1表达能通过调控癌症相关信号通路、TGF-β信号通路、cGMP-PKG信号通路、细胞外基质受体的相互作用、PI3K-AKT信号通路等抑制肿瘤生长,对卵巢癌治疗药物的开发具有重要的指导意义。

综上所述,lncRNA PVT1在卵巢癌组织中的表达上调,其靶基因富集于CC、MF和BP等多个生物进程及TGF-β、cGMP-PKG等肿瘤相关信号通路上,lncRNA PVT1通过调控靶基因的表达在卵巢癌中发挥作用。本研究对卵巢癌组织lncRNA PVT1表达及其靶基因生物信息学进行了初步检测分析,为进一步深入研究lncRNA PVT1在卵巢癌中的分子调控机制及成为卵巢癌临床诊断和治疗靶点潜在的生物标志物提供理论依据。

[参考文献]

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30. doi: 10.3322/caac.21590.

[2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. doi: 10.3322/caac.21660.

[3] Bruno A, Noonan DM, Valli R, et al. Human RNASET2: a highly pleiotropic and evolutionary conserved tumor suppressor gene involved in the control of ovarian cancer pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9074. doi: 10.3390/ijms23169074.

[4] Lin W, Zhou Q, Wang CQ, et al. LncRNAs regulate metabolism in cancer[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(7): 1194-1206. doi: 10.7150/ijbs.40769.

[5] Liu K, Xu Q. LncRNA PVT1 regulates gallbladder cancer progression through miR-30d-5p[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(3): 875-883. doi: 10.23812/20-180-A-32.

[6] Wu Y, Gu W, Han X, et al. LncRNA PVT1 promotes the progression of ovarian cancer by activating TGF-β pathway via miR-148a-3p/AGO1 axis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(17): 8229-8243. doi: 10.1111/jcmm.16700.

[7] Mahima M, Mahmood T, Ved A, et al. An in-depth analysis of ovarian cancer: pathogenesis and clinical manifestation[J]. Drug Res (Stuttg), 2022, 72(8): 424-434. doi: 10.1055/a-1867-4654.

[8] Friedrich M, Friedrich D, Kraft C, et al. Multimodal treatment of primary advanced ovarian cancer[J]. Anticancer Res, 2021, 41(7): 3253-3260. doi: 10.21873/anticanres.15111.

[9] Chen F, Yang J, Fang M, et al. Necroptosis-related lncRNA to establish novel prognostic signature and predict the immunotherapy response in breast cancer[J]. J Clin Lab Anal, 2022, 36(4): e24302. doi: 10.1002/jcla.24302.

[10] Tsang SV, Rainusso N, Liu M, et al. LncRNA PVT-1 promotes osteosarcoma cancer stem-like properties through direct interaction with TRIM28 and TSC2 ubiquitination[J]. Oncogene, 2022, 41(50): 5373-5384. doi: 10.1038/s41388-022-02538-w.

[11] Lin X, Zhuang S, Chen X, et al. lncRNA ITGB8-AS1 functions as a ceRNA to promote colorectal cancer growth and migration through integrin-mediated focal adhesion signaling[J]. Mol Ther, 2022, 30(2): 688-702. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.08.011.

[12] Qu C, Dai C, Guo Y, et al. Long non-coding RNA PVT1-mediated miR-543/SERPINI1 axis plays a key role in the regulatory mechanism of ovarian cancer[J]. Biosci Rep, 2020, 40(6): BSR20200800. doi: 10.1042/BSR20200800.

[13] Dong L, Wang H, Gao Y, et al. Long non-coding RNA PVT1 promotes the proliferation, migration and EMT process of ovarian cancer cells by regulating CTGF[J]. Oncol Lett, 2022, 25(2): 71. doi: 10.3892/ol.2022.13657.

[14] Kumari A, Shonibare Z, Monavarian M, et al. TGFβ signaling networks in ovarian cancer progression and plasticity[J]. Clin Exp Metastasis, 2021, 38(2): 139-161. doi: 10.1007/s10585-021-10077-z.

[15] Lan T, Li Y, Wang Y, et al. Increased endogenous PKG I activity attenuates EGF-induced proliferation and migration of epithelial ovarian cancer via the MAPK/ERK pathway[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(1): 39. doi: 10.1038/s41419-023-05580-y.

[16] Li H, Prever L, Hirsch E, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(14): 3517. doi: 10.3390/cancers13143517.

(编辑:贺绍梅)