

· 基础研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.11.007

## 前列腺癌诊断/预后和耐药分子标志物的筛选及其临床意义

王丽惠, 邹春林(广西医科大学 长寿与老年相关疾病教育部重点实验室暨转化医学研究中心, 广西 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:**基于已发表的芯片数据通过生物信息学方法筛选差异表达基因,以发现前列腺癌诊断/预后和耐药相关分子标志物。**方法:**筛选GEO数据库中已发表的前列腺癌mRNA芯片数据GSE6956和前列腺癌细胞多烯紫杉醇耐药mRNA芯片数据GSE33455进行差异表达分析;通过生物学功能注释、基因通路富集分析、蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction, PPI)分析等生物信息学方法发现和识别与差异表达基因相关的生物学功能和信号通路;比对TCGA数据库,验证差异表达基因在前列腺癌组织及癌旁组织中的表达,并通过Kaplan-Meier分析差异表达基因对前列腺癌患者生存率的影响;用qPCR方法验证差异表达基因在前列腺癌细胞株PC3及多烯紫杉醇耐药细胞PC3-DTX中的表达情况。**结果:**共筛选出227个在前列腺癌和前列腺癌多烯紫杉醇耐药细胞芯片数据中共同差异表达基因。差异表达基因主要富集到了癌症相关通路(Lysosome、Sphingolipid、FoxO、Acute myeloid leukemia),并主要参与细胞黏附、自噬和胞内蛋白转运等生物学过程。构建PPI网络选取18个连接度最高的基因作为Hub基因。Hub基因和共同差异表达基因中,上调基因CITED2、LRP12和RPL17-C18orf32与前列腺癌患者的不良预后显著相关。qPCR验证显示CITED2在多烯紫杉醇耐药细胞PC3-DTX中高表达。**结论:**通过生物信息学方法筛选出在前列腺癌组织和耐药细胞中共同差异表达,且与前列腺癌患者的不良预后密切相关的基因,为前列腺癌诊断/预后和耐药分子标志物的研究提供了新的思路。

**[关键词]** 前列腺癌;化疗耐药;诊断/预后分子标志物;生物信息学分析

**[中图分类号]** R737.25;R730.4;R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)11-1246-09

## Screening and validation of diagnosis/prognosis and drug resistance marker in prostate cancer

WANG Lihui, ZOU Chunlin (Key Laboratory of Longevity and Ageing-related Diseases & Center for Translational Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To screen the differentially expressed gene (DEGs) and to identify potential diagnostic/prognostic markers as well as drug resistance markers in prostate cancer (PC) by bioinformatics analysis of published microarray data sets. **Methods:** Differential expression analyses were performed in available mRNA microarray datasets including prostate cancer tissues dataset GSE6956 and prostate cancer cell taxotere resistance dataset GSE33455 from the GEO database. Gene Ontology enrichment analysis (GO), gene pathway enrichment analysis and protein-protein interaction (PPI) network analysis were performed to identify the biological function and signaling pathways related to DEGs. The expression level of DEGs in PC tissues and para-cancerous tissues was verified by comparing TCGA datasets. Kaplan-Meier method was adopted to detect the influence of DEGs on the survival of PC patients. The expression of DEGs in PC3 cells and taxotere resistant PC3-DTX cells was detected by qPCR. **Results:** There were a total of 227 genes that differentially co-expressed in taxotere resistant prostate cancer cells and prostate cancer tissues. The functional enrichment analysis showed that these differentially co-expressed genes were mainly enriched in cancer related pathways (Lysosome, Sphingolipid, FoxO, Acute myeloid leukemia) and involved in cell-cell adhesion, autophagy and intracellular protein transportation etc. PPI network screened 18 most connected genes as Hub genes. Among the Hub genes and differentially co-expressed genes, the upregulated CITED2, LRP12 and RPL17-C18orf32 were significantly associated with poor outcomes of PC patients. qPCR validated that CITED2 was upregulated in PC3 and PC3-DTX cells. **Conclusion:** The present study identified a number of DEGs that differentially co-expressed in prostate cancer tissues and drug resistance cells and significantly associated with the poor prognosis of PC patients by bioinformatical analysis. These results may provide a new idea for identifying potential diagnostic/prognostic and drug

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81803564; No. 81670750);中国博士后科学基金资助项目(No. 2018M633619XB)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81803564; No. 81670750), and the Postdoctoral Science Foundation Grant of China (No. 2018M633619XB)

**[作者简介]** 王丽惠(1986-),女,博士,助理研究员,主要从事肿瘤耐药机制和分子诊断标志物研究,E-mail:hellowanglihui@hotmail.com

**[通信作者]** 邹春林(ZOU Chunlin, corresponding author),研究员,硕士生导师,主要从事病理学研究,E-mail:zouchunlin@sohu.com

resistant markers for prostate cancer.

**[Key words]** prostate cancer; drug resistance; diagnostic/prognostic molecular marker; bioinformatics analysis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(11): 1246-1254. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.11.007]

近年来我国恶性肿瘤发病率和病死率呈明显上升趋势,前列腺癌作为最常见的男性泌尿生殖系统恶性肿瘤逐渐引起人们重视。以美国为例,前列腺癌占男性新发癌症病例的五分之一,在恶性肿瘤致死率中位居第二位。在中国70岁以上老年男性中,前列腺癌发病率位居所有泌尿生殖系统疾病之首。但是令人遗憾的是,由于临床上缺乏高特异性的前列腺癌诊断/预后标志物,导致大多数前列腺癌患者在确诊时就已经是晚期并且发生转移。多烯紫杉醇类药物是临床上治疗前列腺癌的一线抗癌药,但是50%以上的晚期前列腺癌患者在接受现有化疗药物治疗后会出现化疗药物耐药,不得不采取其他临床效果不佳的姑息疗法。因此迫切需要探索前列腺癌诊断/预后和耐药相关分子标志物。本研究通过生物信息学分析方法挖掘与前列腺癌发生发展及耐药相关的基因和信号通路,以期明确前列腺癌耐药分子机制和筛选前列腺癌分子诊断/预后标志物提供线索和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

人前列腺癌细胞株PC3购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC),置于含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养基中培养。多烯紫杉醇耐药PC3细胞株PC3-DTX由本课题组利用PC3细胞经多烯紫杉醇诱导培养获得<sup>[1]</sup>,置于含有10 nmol/L多烯紫杉醇、10% FBS、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养基中培养。细胞均置于含5% CO<sub>2</sub>的37 °C细胞培养箱中培养。

### 1.2 qPCR检测PC3和PC3-DTX细胞中CITED2基因的表达

采用TRIzol® Reagent(Ambion, Cat.15596)并根据试剂说明书提取PC3和PC3-DTX细胞中总RNA,使用High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit试剂盒(Applied Biosystems, Cat. 4374966)并根据试剂盒说明书合成cDNA备用。采用试剂盒PowerUp™ SYBR® Green Master Mix(Applied Biosystems, Cat. A25777)根据说明书配置qPCR反应体系,于ABI 7300 Real-Time PCR仪中检测,对结果采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析,选用GAPDH作为内参基因。CITED2基因的PCR引物为正向(5'-3')CACAGCTCATTGTTG-GCAGC、反向(5'-3')ATTCGAGCCGTTCCCTTTT。

### 1.3 已发表的芯片数据收集

前列腺癌耐药细胞GSE33455芯片数据和前列腺癌和癌旁组织GSE6956芯片数据来源于美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的开源GEO数据库(Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。GSE33455为Marín-Aguilera M等发表的包括2对前列腺癌耐药细胞系各3次重复的Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array芯片测序结果<sup>[2]</sup>。GSE6956为Wallace TA等公布的包括18例前列腺癌旁组织和69例前列腺癌组织的Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array芯片测序结果<sup>[3]</sup>。下载并获得原始CEL文件之后采用Robust Multi-array Average (RMA)方法将数据归一化用于之后分析。

### 1.4 差异表达基因的筛选

以下列条件分别筛选出在多烯紫杉醇耐药细胞GSE33455数据库中和前列腺癌患者GSE6956数据库中差异表达的基因:|log<sub>2</sub> fold change (FC)|≥0.5且校正后P<0.05。将两个数据库中的差异表达基因取交集,采用Cluster3.0进行聚类分析并用TreeView进行数据可视化,筛选在前列腺癌组织中和前列腺癌多烯紫杉醇耐药细胞中均差异表达的基因作为备选基因。

### 1.5 差异表达基因的蛋白质相互作用(protein protein interaction, PPI)网络构建

通过STRING(<https://string-db.org/>)<sup>[4]</sup>进行差异表达蛋白相互作用分析。使用Cytoscape软件对PPI网络数据进行可视化,通过CytoHubba插件中的12种算法(Betweenness、BottleNeck、Closeness、Clustering Coefficient、Degree、DMNC、EcCentricity、EPC、MCC、MNC、Radiality和Stress)分别计算蛋白质间的连接情况,筛选12种算法中有8种都排名前30的基因作为Hub基因。

### 1.6 差异表达基因的表达验证及患者生存分析

通过TCGA数据(The Cancer Genome Atlas database)可视化网站GEPIA(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, <http://gepia.cancer-pku.cn/>)<sup>[5]</sup>,进行差异表达基因在TCGA前列腺癌数据库中(包括492例前列腺癌组织和152例癌旁组织)的差异表达验证。筛选条件为PRAD数据集,当|Log<sub>2</sub>FC|≥1并且P<0.05时被认为在前列腺癌和正常组织之间差异表达。通过GEPIA网站对前列腺癌数据进行在线生存分析,筛选条件为PRAD数据集,95%置信区间。使

用Kaplan-Meier生存分析的log-rank法来检验差异表达基因在前列腺癌患者中的生存差异,以log-rank检验结果 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 1.7 统计学处理

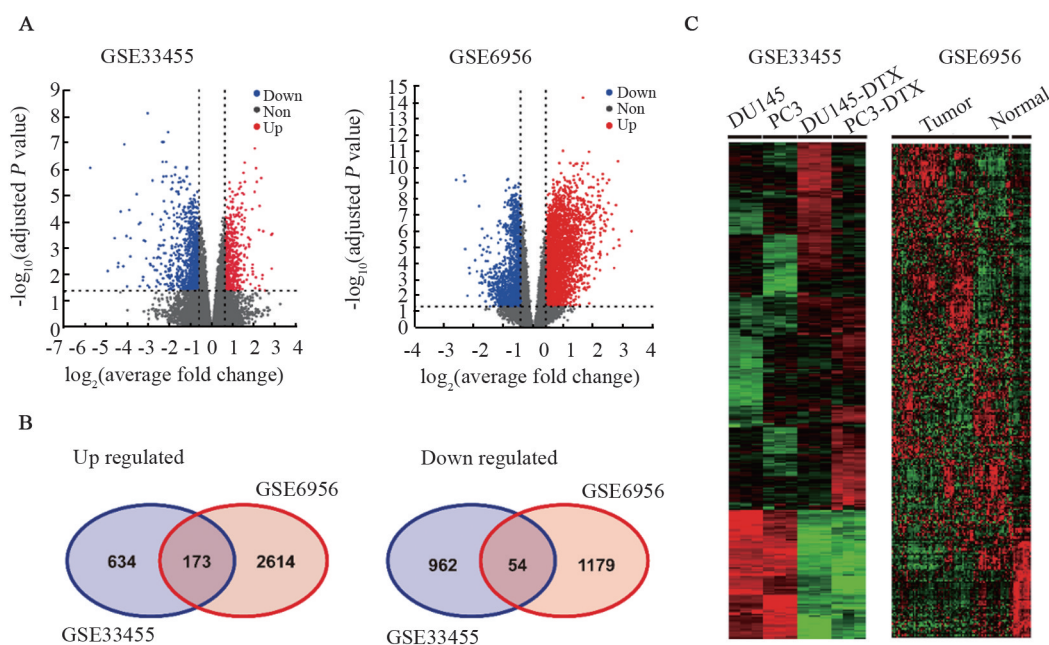
采用SPSS20.0统计学软件进行统计学分析,GraphPad Prism 5.0软件作图,呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用Student *t*检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 发现和识别潜在的前列腺癌多烯紫杉醇耐药分子标志物

经过初步筛选后在GSE33455数据库(包括前列腺癌亲本细胞DU145、PC3和多烯紫杉醇耐药细胞DU145-DTX、PC3-DTX)中共得到1 596个在前列

腺癌多烯紫杉醇耐药细胞DU145-DTX和PC3-DTX中差异表达的基因,其中与亲本细胞相比,在耐药细胞中高表达的基因634个,低表达基因962个。在GSE6956数据库(包括18例前列腺癌旁正常组织和69例前列腺癌组织)中共筛选得到3 793个差异表达基因,其中前列腺癌组织中高表达的基因2 614个,低表达的基因1 179个(图1A)。对GSE6956和GSE33455中获得的差异表达基因取交集,共有173个基因在前列腺癌组织和耐药细胞中共同高表达,54个基因在前列腺癌组织和耐药细胞中共同低表达(图1B)。采用Cluster3.0和TreeView进行聚类分析和可视化处理,结果(图1C)显示,这些差异表达基因分别在这两个数据库中呈现显著特异性。选取这227个基因作为前列腺癌组织和多烯紫杉醇耐药细胞共同差异表达基因进行下一步的分析。



A: Volcano plots reflecting significant differentially expressed genes in GSE33455 (2 parental prostate cancer cells vs 2 taxotere resistance prostate cancer cells) and GSE6956 (69 prostate tumors vs 16 normal) micro RNA array data sets; B: 173 up and 54 down regulated genes in both GSE33455 and GSE6956 data sets; C: Heat maps showing 227 different expressed genes from GSE33455 and GSE6956 data sets (Columns represent samples, and rows genes, red is high expression and green low expression)

图1 前列腺癌组织和前列腺癌多烯紫杉醇耐药细胞中差异表达基因

Fig.1 Differentially expressed genes in prostate cancer tissues and taxotere resistant prostate cancer cells

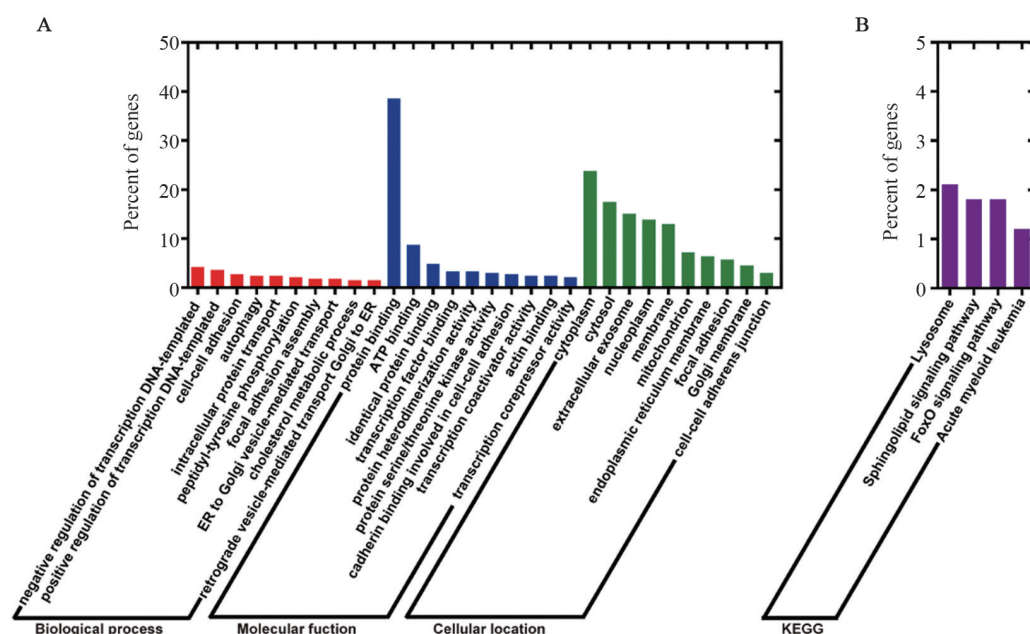
### 2.2 共同差异表达基因的GO分析和KEGG信号通路分析

通过DAVID网站进行GO和KEGG的富集分析。GO分析信号通路分析结果显示,前列腺癌组织和多烯紫杉醇耐药细胞中共同差异表达基因,主要参与转录的负调控,DNA模板(negative regulation of transcription, DNA-templated,  $P=0.0043$ ),转录的正调控,DNA模板(positive regulation of transcription,

DNA-templated,  $P=0.032$ ),细胞间黏附(cell-cell adhesion,  $P=0.012$ ),自噬(autophagy,  $P=0.00077$ ),胞内蛋白质转运(intracellular protein transport,  $P=0.018$ )等生物学进程;其主要分子功能为蛋白质结合(protein binding,  $P=0.000033$ ),ATP结合(ATP binding,  $P=0.0055$ ),相同蛋白结合(identical protein binding,  $P=0.023$ ),转录因子结合(transcription factor binding,  $P=0.0015$ ),蛋白质异源

二聚体活性 (protein heterodimerization activity,  $P=0.039$ ); 主要与细胞质 (cytoplasm,  $P=0.00083$ ), 胞液 (cytosol,  $P=0.00019$ ), 胞外分泌体 (extracellular exosome,  $P=0.00046$ ), 核质 (nucleoplasm,  $P=0.0038$ ), 细胞膜 (membrane,  $P=0.00020$ ) 等细胞组分相关 (图2A)。KEGG结果显示差异表达基因主要和溶酶

体 (Lysosome,  $P=0.0057$ ), 鞘脂类信号通路 (Sphingolipid signaling pathway,  $P=0.023$ ), FoxO 信号通路 (FoxO signaling pathway,  $P=0.035$ ), 急性髓系白血病 (Acute myeloid leukemia,  $P=0.040$ ) 相关 (图2B)。



A: Top ten Biological process, molecular function and cellular location analysis of 227 co-differentially expressed genes ( $P<0.05$ );

B: KEGG analysis of 227 co-differentially expressed genes ( $P<0.05$ )

图2 差异表达基因的GO分析和KEGG信号通路分析

Fig.2 Gene ontology and KEGG pathway analysis of differentially co-expressed genes in prostate cancer tissues and taxotere resistance prostate cancer cells

### 2.3 差异表达基因的PPI构建及Hub基因筛选

通过STRING进行蛋白相互作用分析,构建PPI网络,Cytoscape软件可视化(图3)。运用Cytoscape软件中CytoHubba插件的12种算法分别计算蛋白质间连接度,选取12种算法中有8种都排名前30的18个基因作为Hub基因。Hub基因中有15个在前列腺癌和耐药细胞中上调基因:肌肉Z-线 $\beta$ 亚单位的帽状肌动蛋白(capping actin protein of muscle Z-line subunit beta, CAPZB)、CCAAT增强子结合蛋白 $\alpha$  (CCAAT enhancer binding protein alpha, CEBPA)、衣被蛋白复合体I $\alpha$ 亚单位(coat protein complex I subunit alpha, COPA)、皮层肌动蛋白(cortactin, CTTN)、高尔基体蛋白A2(golgin A2, GOLGA2)、组蛋白簇1 H2B家族成员d(histone cluster 1 H2B family member d, HIST1H2BD)、HIST1H2BH、胰岛素样生长因子2受体(insulin like growth factor 2 receptor, IGF2R)、核因子 $\kappa$ B激酶 $\beta$ 亚基抑制剂(inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit

beta, IKKB)、KDEL内质网蛋白保留受体1(KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 1, KDELR1)、凝集素,甘露糖结合1(lectin, mannose binding 1, LMAN1)、核受体共活化剂3(nuclear receptor coactivator 3, NCOA3)、脯氨酸4-羟化酶 $\beta$ 亚基(prolyl 4-hydroxylase subunit beta, P4HB)、鞘脂激活蛋白原(prosaposin, PSAP)、SEC24D (SEC24 homolog D, COPII coat complex component); 3个为下调基因:EPRS (glutamyl-prolyl-TRNA synthetase)、NPC细胞内胆固醇转运蛋白2 (NPC intracellular cholesterol transporter 2, NPC2)、核仁磷酸蛋白1 (nucleophosmin 1, NPM1)。

2.4 共同差异表达基因CITED2、LRP12和RPL17-C18orf32在前列腺癌中高表达并且和前列腺癌的不良预后相关

应用GEPIA网站进行差异表达基因在TCGA数据库中表达情况的验证。结果显示18个差异表达的Hub基因中,CEBPA、COPA、IGF2R、KDELR1、

LMAN1、P4HB( $P<0.05$ )、PSAP在TCGA数据库中前列腺癌组织中的表达高于正常组织,且与GSE6956基因芯片分析结果一致。然而生存分析结果显示,Hub基因与前列腺癌生存无显著相关性(数据未列出)。因此笔者对前列腺癌组织和前列腺癌多烯紫杉醇耐药细胞中共同差异表达的227个基因进行了生存分析,结果显示,前列腺癌中CITED2、LRP12和RPL17-C18orf32基因高表达的患者OS显著性缩短( $\log\text{-rank } P<0.05$ )(图4A),而其他共同差异表达基因与前列腺癌患者生存无显著相关性。同时,在TCGA数据库中验证了CITED2、LRP12和RPL17-C18orf32

的表达情况。结果与GSE6956基因芯片分析结果一致(图4B),CITED2、LRP12和RPL17-C18orf32在前列腺癌中的表达均高于癌旁正常组织,然而除RPL17-C18orf32的表达具有显著性差异之外,CITED2、LRP12虽然在前列腺癌中具有高表达趋势,但是却无显著性差异(图4C)。该结果提示CITED2、LRP12可能在前列腺癌发展过程中发挥作用,而不是在前列腺癌发生早期。CITED2、LRP12和RPL17-C18orf32具备成为前列腺癌诊断/预后标志物的潜能。

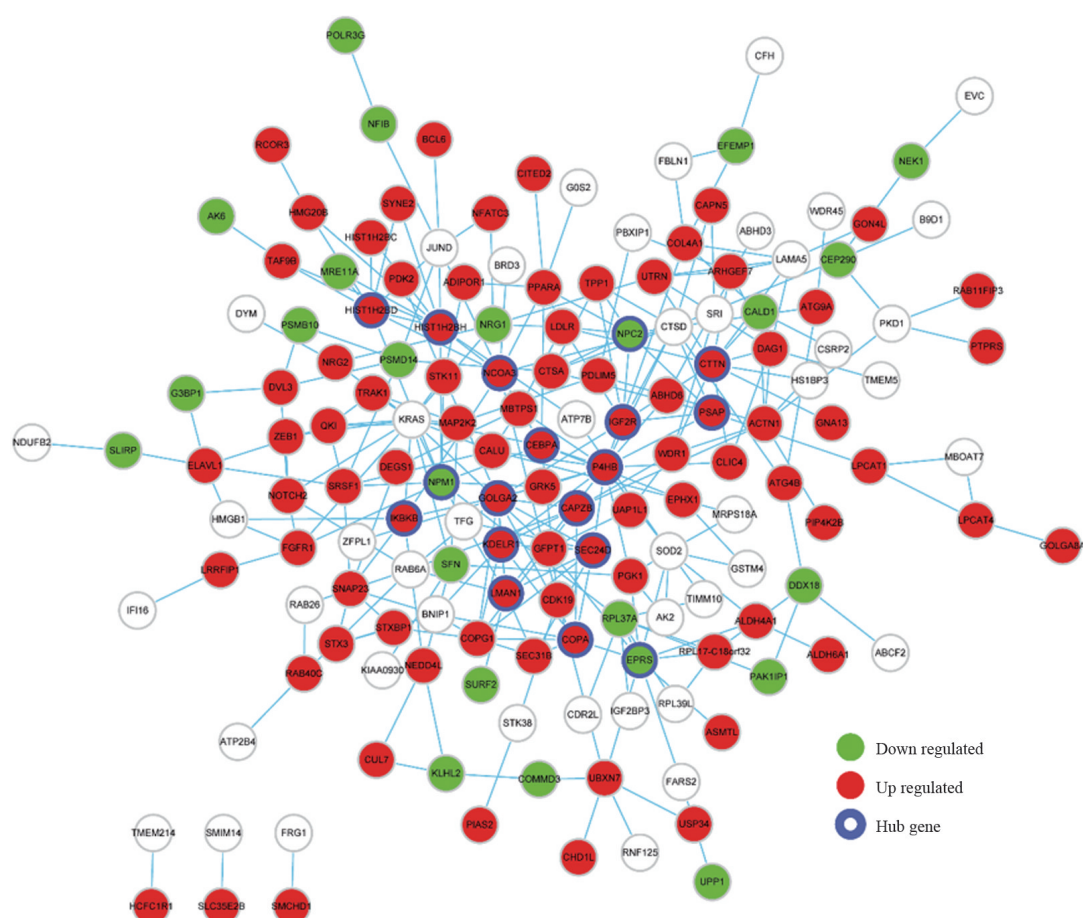


图3 差异表达基因构建的PPI网络

Fig.3 The PPI analysis about differentially expressed genes

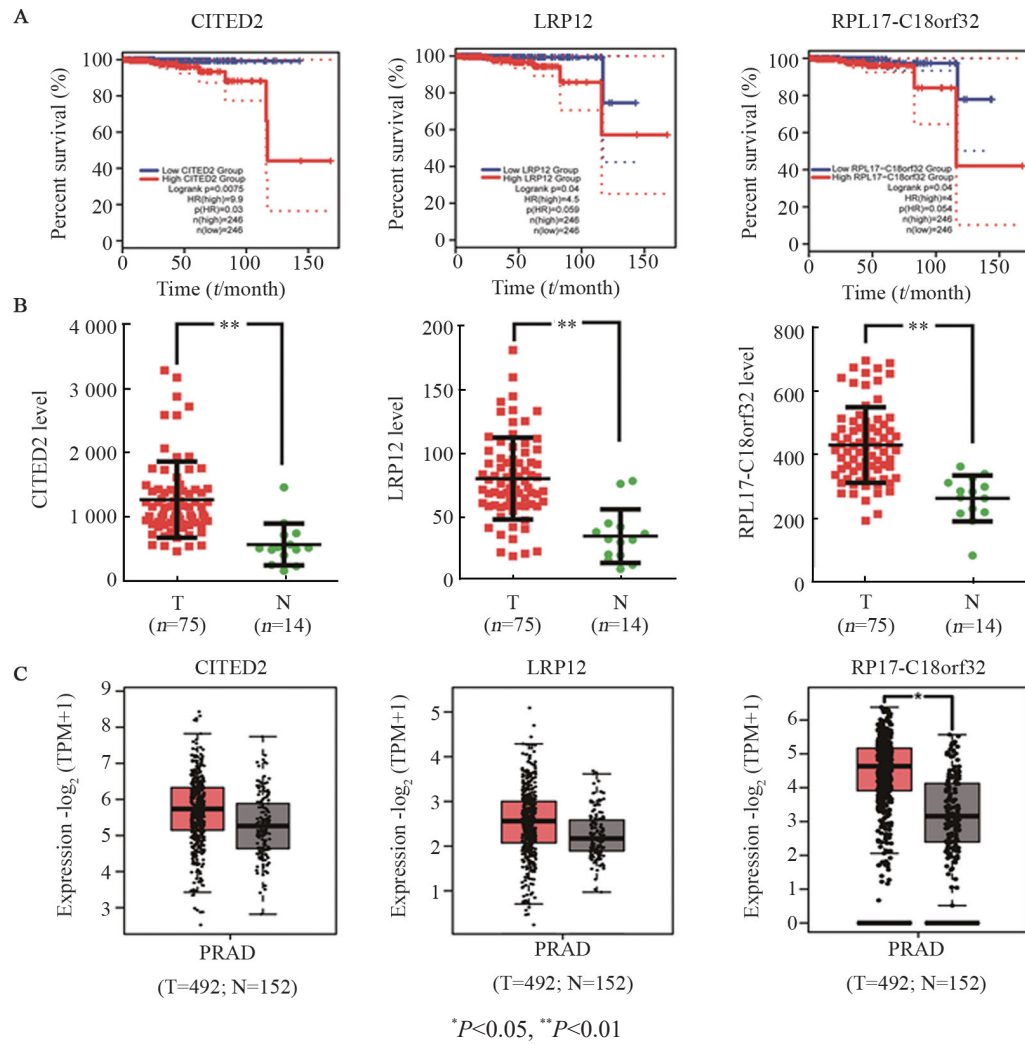
### 2.5 CITED2在前列腺癌多烯紫杉醇耐药细胞中的表达水平显著高于亲本细胞

选取综合表现最好的CITED2基因进行细胞水平验证。根据GSE33455基因芯片分析结果发现,与亲本细胞(DU145,PC3)相比,CITED2在多烯紫杉醇耐药细胞(DU145-DTX,PC3-DTX)中显著性高表达(图5A)。为了明确CITED2在前列腺癌多烯紫杉醇耐药细胞中的表达,采用qPCR在已有的前列腺癌亲本细胞PC3[IC<sub>50</sub>=(15.85±1.14 nmol/L)]和耐药细胞

PC3-DTX[IC<sub>50</sub>=(180.50±1.04 nmol/L)](图5B)中检验了CITED2的表达,结果(图5C)显示CITED2在耐药细胞PC3-DTX的表达显著性高于在亲本细胞PC3中的表达( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

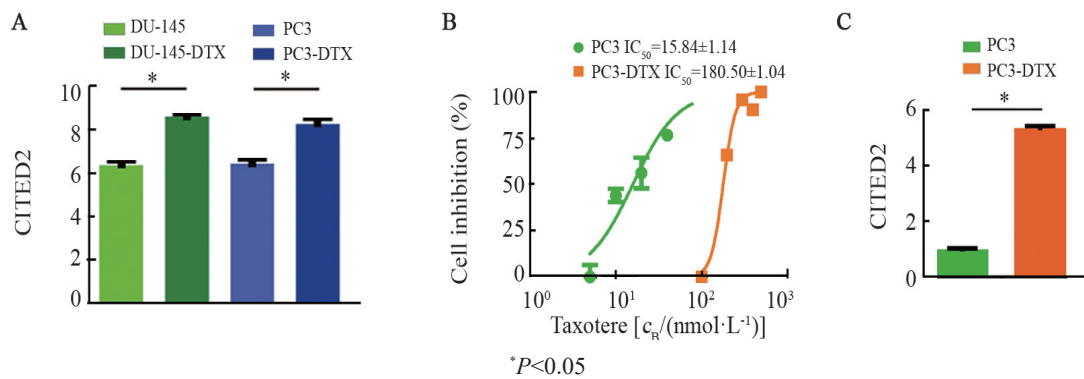
近几年来前列腺癌在中国的发病率呈显著上升趋势,已经超过膀胱癌成为中国男性泌尿生殖系统发病率最高的癌症,尤其在老年男性中更加显著<sup>[6]</sup>。



T: Prostate tumor group, N: Normal group

A: Kaplan-Meier curves and log-rank test of CITED2, LRP12 and RPL17-C18orf32 in TCGA (492 prostate tumors) data set; B: CITED2, LRP12 and RPL17-C18orf32 expression levels in prostate tumor and normal tissue samples in GSE6956 data set; C: Boxplot indicated CITED2, LRP12 and RPL17-C18orf32 expression were increased in TCGA (492 prostate tumors vs 152 normal) data set

图4 共同差异表达基因 CITED2、LRP12 和 RPL17-C18orf32 在前列腺癌中高表达并且和前列腺癌的不良预后显著相关  
Fig.4 CITED2, LRP12 and RPL17-C18orf32 were increased and significantly associated with poor prognosis in prostate cancer patients



A: CITED2 expression levels in GSE33455 (2 parental prostate cancer cells vs 2 taxotere resistance prostate cancer cells) micro RNA array data sets (parental prostate cancer cells vs taxotere resistance prostate cancer cells); B: *In vitro* inhibition of taxotere in PC3 and PC3-DTX tested by MTS assay; C: Validation of CITED2 expression in PC3 and PC3-DTX cells by qPCR

图5 在前列腺癌多烯紫杉醇耐药细胞 PC3-DTX 中验证 CITED2 表达水平  
Fig.5 Validation of CITED2 expression in PC3 and PC3-DTX cells

目前前列腺癌特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)是唯一应用于早期前列腺癌临床诊断的标志物,然而由于其肿瘤特异性差的缺陷(前列腺炎、良性前列腺增生等疾病均可导致总PSA水平升高),目前临床上仍缺乏更精准有效的前列腺癌诊断/预后标志物。化疗在癌症治疗中起重要作用,但是随之而来的耐药反应反而进一步促进癌症的恶化,同时还提高了治疗难度。肿瘤耐药性又称肿瘤抗药性,是指肿瘤细胞对化疗药物产生耐受性。目前认为是肿瘤细胞对化疗药物的一种自然进化现象<sup>[7]</sup>。一旦发生耐药,化疗药物对肿瘤的治疗作用显著降低,同时存活下来的耐药细胞发生变化,其恶性程度更高<sup>[8]</sup>。紫杉烷类药物(紫杉醇 paclitaxel; 多烯紫杉醇 docetaxel/DTX/texotere)是治疗前列腺癌的常用化疗药物,它的治疗靶点是肿瘤细胞的微管。紫杉醇类药物与其他药物联用用于治疗激素抵抗类的前列腺癌,虽然已经显示出一些治疗效果,但由于细胞耐药的发生疗效并不理想。由此可见,找出与前列腺癌紫杉烷类耐药和前列腺癌诊断/预后相关的标志物,对于前列腺癌的临床诊断/治疗具有十分重要的意义。

本次研究通过对已发表的GSE33455数据库和GSE6956数据库进行基因差异表达分析发现,在前列腺癌组织和耐药细胞中共同高表达的基因173个,共同低表达的基因54个。随后对这227个共同差异表达基因进行GO和KEGG信号通路富集分析,结果显示这些共同差异表达基因主要参与细胞黏附、自噬和胞内蛋白转运等生物学过程。与细胞质、细胞质液、外泌体和核质等细胞组分相关,与蛋白结合、ATP结合和转录因子结合等分子功能相关。KEGG通路分析发现差异表达基因主要富集的通路,其中包括鞘磷脂信号通路<sup>[9-11]</sup>、FoxO信号通路<sup>[12-16]</sup>等已被证实与前列腺癌发生发展和肿瘤耐药密切相关的信号通路。随后对这227个差异表达基因构建PPI蛋白网络。选取蛋白连接度最高的18个基因作为Hub基因,其中15个为上调基因(CAPZB、CEBPA、COPA、CTTN、GOLGA2、HIST1H2BD、HIST1H2BH、IGF2R、IKBKB、KDELRL1、LMAN1、NCOA3、P4HB、PSAP、SEC24D),3个为下调基因(EPRS、NPC2、NPM1)。应用GEPIA网站进行差异表达基因在TCGA数据库中表达情况的验证。结果显示18个差异表达的Hub基因中,CEBPA、COPA、IGF2R、KDELRL1、LMAN1、P4HB( $P<0.05$ )、PSAP在TCGA数据库中前列腺癌组织中的表达高于正常组织,且与GSE6956基因芯片分析结果一致。

差异表达的Hub基因CEBPA在前列腺癌中的作

用具有双面性,有学者认为CEBPA在前列腺癌中起抑癌基因作用,其在前列腺癌中低表达并且与ERG基因融合、抑癌基因PTEN缺失相关<sup>[17]</sup>。研究<sup>[18]</sup>发现,CEBPA在前列腺癌中的表达要显著性高于正常前列腺组织,且其表达与前列腺癌分期相关,过表达CEBPA后可促进前列腺癌细胞增殖、克隆形成能力并促进细胞周期进程,其机制与激活AKT相关。除此之外,CEBPA还与口腔鳞状细胞癌顺铂耐药相关<sup>[19]</sup>。P4HB与前列腺癌细胞自噬相关并且具备成为前列腺癌诊断/预测标志物的潜能。COPA在肝癌和前列腺癌组织中高表达,并且可促进前列腺癌细胞增殖<sup>[20-21]</sup>。在一项对14万多名欧洲后裔的数据分析中发现,IGF2R具备成为前列腺癌风险预测血液蛋白生物标志物的潜能<sup>[22]</sup>。IGF2R在晚期非小细胞肺癌中的表达与患者的化疗反应及预后有关<sup>[23]</sup>。PSAP具备成为前列腺癌血清检测标志物的潜能<sup>[24]</sup>,同时PSAP还与前列腺癌病理分期密切相关<sup>[25]</sup>。除了上述提到的这些差异表达Hub基因,关于其他的Hub基因的研究较少,这意味着对有必要进行进一步的研究,以揭示它们对前列腺癌发生发展和化疗耐药中的作用。

随后,本研究检测了差异表达的Hub基因与前列腺癌患者生存率之间的关系,以求明确差异表达的Hub基因中是否存在成为前列腺癌预后标志物的基因。遗憾的是根据生存分析结果,Hub基因与前列腺癌生存无显著相关性( $P>0.05$ )。因此对前列腺癌组织和前列腺癌多烯紫杉醇耐药细胞中共同差异表达的227个基因进行了生存分析,发现CITED2、LRP12和RPL17-C18orf32不但在多烯紫杉醇耐药细胞PC3-DTX中高表达,而且在前列腺癌组织中高表达,且与前列腺癌不良预后密切相关( $P<0.05$ )。CITED2基因全称为CBP/p300-interacting transactivator with E/D-rich carboxy-terminal domain-2<sup>[26]</sup>,是与转录共激活剂p300/CBP相伴的转录辅助调节因子。CITED2在胚胎干细胞分化和肝脏、肺、心等重要器官发育中起重要作用。随着研究不断深入,近年来有报道显示CITED2参与多种肿瘤的发生发展。高表达的CITED2可通过lnk4a/Arf和Trp53维持成熟造血干细胞的功能,扰乱髓细胞分化程序从而介导急性髓性白血病的发生发展<sup>[27-28]</sup>。GINS2通过调节CITED2和LOXL2促进甲状腺癌细胞增殖,抑制细胞凋亡<sup>[29]</sup>。CITED2在乳腺癌中高表达,并且和乳腺癌的不良预后显著相关,过表达CITED2后可促进乳腺癌细胞MCF-7和SKBR-3的侵袭转移。CITED2与乳腺癌盐酸表柔比星和5氟尿嘧啶耐药相关<sup>[30]</sup>。CITED2通过调节肿瘤细胞产生的趋化因子CCL20参与调节巨

噬细胞的募集,从而参与乳腺癌生长<sup>[31]</sup>。近期有研究<sup>[26]</sup>表明,CITED2在转移性前列腺癌中异常高表达,并且高表达的CITED2与前列腺癌不良预后相关。其机制与CITED2激活nucleolin-AKT信号通路从而促进前列腺癌转移相关。

LRP12参与胚胎期皮质板形成、神经元极化和生长调控等重要过程。近年来有研究<sup>[32]</sup>指出LRP12与肿瘤发生和肿瘤细胞耐药相关。LRP12基因DNA甲基化程度和非小细胞肺癌患者卡铂耐药相关,且高LRP12甲基化程度提示肺癌患者的不良预后。LRP12在B细胞淋巴瘤患者中甲基化程度高,提示LRP12作为B细胞淋巴瘤表观遗传标志物的潜能<sup>[33]</sup>。LRP12在口腔鳞状细胞癌患者组织中也呈现高表达趋势<sup>[34]</sup>。RPL17-C18orf32为相邻基因RPL17(ribosomal protein L17)和C18orf32(chromosome 18 open reading frame 32)自然发生顺式通读转录(read-through transcription)而产生的融合基因<sup>[35]</sup>。融合基因是一种典型的致病基因突变,对肿瘤发生发展起着重要作用。目前对RPL17-C18orf32基因的研究报道较少,仅有一篇<sup>[35]</sup>研究显示RPL17-C18orf32在胃癌细胞系和患者中高表达,提示该基因与胃癌发生相关。之后本研究选择综合表现最好的CITED2在前列腺癌亲本细胞PC3和耐药细胞PC3-DTX进行细胞水平验证,发现CITED2在耐药细胞PC3-DTX的表达显著高于在亲本细胞PC3中的表达。由此可见CITED2具备成为前列腺癌诊断/预后和多烯紫杉醇耐药分子标志物的潜能。

综上所述,本研究通过生物信息学手段,对前列腺癌细胞耐药数据库GSE33455和前列腺癌组织数据库GSE6956进行分析,发现在前列腺癌组织耐药细胞中共同差异表达的基因227个,包括前列腺癌中高表达基因173个,低表达基因54个。对共同差异表达基因进行功能注释分析发现,前列腺癌和耐药的发生发展与细胞黏附、自噬和胞内蛋白转运等生物学过程和鞘磷脂信号通路、FoxO信号通路密切相关。差异表达基因CITED2、LRP12和RPL17-C18orf32在前列腺癌中高表达并且其高表达与前列腺癌的不良预后显著相关,具备成为前列腺癌和耐药分子诊断/预后和耐药分子标志物的潜能。虽然需要进一步的实验研究来验证这些结果,但是本研究为进一步研究前列腺癌发生发展和耐药的分子机制和前列腺癌的诊断/预后及耐药分子标志物提供了参考依据。

#### [参考文献]

- [1] YANG Y, LU Y, WANG L, et al. Skp2 is associated with paclitaxel resistance in prostate cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1): 559-566. DOI:10.3892/or.2016.4809.
- [2] MARÍN-AGUILERA M, CODONY-SERVAT J, KALKO S G, et al. Identification of docetaxel resistance genes in castration-resistant prostate cancer[J]. *Mol. Cancer Ther.*, 2012, 11(2): 329-339. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-11-0289.
- [3] WALLACE T A, PRUEITT R L, YIM, et al. Tumor immunobiological differences in prostate cancer between African-American and European-American men[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 927-936. DOI:10.1158/0008-5472.can-07-2608.
- [4] SZKLARCZYK D, GABLE A L, 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. DOI: 10.1093/nar/gky1131.
- [5] TANG Z F, LI C W, KANG B X, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-W102. DOI: 10.1093/nar/gkx247.
- [6] CÁNOVAS V, PUÑAL Y, MAGGIO V, et al. Prostate Tumor Overexpressed-1 (PTOV1) promotes docetaxel-resistance and survival of castration resistant prostate cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 59165-59180. DOI:10.18632/oncotarget.19467.
- [7] ISLAM S U, SHEHZAD A, SONN J K, et al. PRPF overexpression induces drug resistance through actin cytoskeleton rearrangement and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 56659-56671. DOI:10.18632/oncotarget.17855.
- [8] QIAO L, LIU X Y, TANG Y C, et al. Knockdown of long non-coding RNA prostate cancer-associated ncRNA transcript 1 inhibits multidrug resistance and c-Myc-dependent aggressiveness in colorectal cancer Caco-2 and HT-29 cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 441(1/2): 99-108. DOI:10.1007/s11010-017-3177-8.
- [9] SEDIĆ M, GRBČIĆ P, PAVELIĆ S K. Bioactive sphingolipids as biomarkers predictive of disease severity and treatment response in cancer: current status and translational challenges[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(1): 41-56. DOI:10.21873/anticancer.13078.
- [10] HAJJ C, HAIMOVITZ-FRIEDMAN A. Sphingolipids' role in radiotherapy for prostate cancer[M]//*Sphingolipids in Disease*. Vienna: Springer Vienna, 2013: 115-130. DOI:10.1007/978-3-7091-1511-4\_6.
- [11] JUNG J H, TANIGUCHI K, LEE H M, et al. Comparative lipidomics of 5-fluorouracil-sensitive and-resistant colorectal cancer cells reveals altered sphingomyelin and ceramide controlled by acid sphingomyelinase (SMPD1)[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6124. DOI:10.1038/s41598-020-62823-0.
- [12] LIU Q, ZHANG Y Y, WANG P Q, et al. Deciphering the scalene association among type-2 diabetes mellitus, prostate cancer, and chronic myeloid leukemia via enrichment analysis of disease-gene network[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5): 2268-2277. DOI: 10.1002/cam4.1845.
- [13] SHAN Z F, LI Y W, YU S Q, et al. CTCF regulates the FoxO signaling pathway to affect the progression of prostate cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3130-3139. DOI:10.1111/jcmm.14138.
- [14] SHUKLA S, BHASKARAN N, MACLENNAN G T, et al. Deregulation of FoxO3a accelerates prostate cancer progression in TRAMP mice[J]. *Prostate*, 2013, 73(14): 1507-1517. DOI:10.1002/



- pros.22698.
- [15] SALCHER S, SPODEN G, HAGENBUCHNER J, et al. A drug library screen identifies carbenoxolone as novel FOXO inhibitor that overcomes FOXO3-mediated chemoprotection in high-stage neuroblastoma[J]. *Oncogene*, 2020, 39(5): 1080-1097. DOI: 10.1038/s41388-019-1044-7.
- [16] BERETTA G L, CORNO C, ZAFFARONI N, et al. Role of FoxO proteins in cellular response to antitumor agents[J]. *Cancers*, 2019, 11(1): 90. DOI:10.3390/cancers11010090.
- [17] MINNER S, LUTZ J, HUBE-MAGG C, et al. Loss of CCAAT-enhancer-binding protein alpha (CEBPA) is linked to poor prognosis in PTEN deleted and TMPRSS2: ERG fusion type prostate cancers[J]. *Prostate*, 2019, 79(3): 302-311. DOI: 10.1002/pros.23736.
- [18] YIN H, LOWERY M, GLASS J. In prostate cancer C/EBP $\alpha$  promotes cell growth by the loss of interactions with CDK2, CDK4, and E2F and by activation of AKT[J]. *Prostate*, 2009, 69(9): 1001-1016. DOI:10.1002/pros.20947.
- [19] WU H T, CHEN W T, LI G W, et al. Analysis of the differentially expressed genes induced by cisplatin resistance in oral squamous cell carcinomas and their interaction[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1328. DOI:10.3389/fgene.2019.01328.
- [20] IGLESIAS-GATO D, WIKSTRÖM P, TYANOVA S, et al. The proteome of primary prostate cancer[J]. *Eur Urol*, 2016, 69(5): 942-952. DOI:10.1016/j.eururo.2015.10.053.
- [21] WONG N, CHAN A, LEE S W, et al. Positional mapping for amplified DNA sequences on 1q21-q22 in hepatocellular carcinoma indicates candidate genes over-expression[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(3): 298-306. DOI:10.1016/S0168-8278(02)00412-9.
- [22] WU L, SHU X, BAO J D, et al. Analysis of over 140, 000 European descendants identifies genetically predicted blood protein biomarkers associated with prostate cancer risk[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(18): 4592-4598. DOI:10.1158/0008-5472.can-18-3997.
- [23] ZHANG T, RONG N, CHEN J, et al. SIRT1 expression is associated with the chemotherapy response and prognosis of patients with advanced NSCLC[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79162[2020-04-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24223900/>. DOI:10.1371/journal.pone.0079162.
- [24] VITALI A, ARDOINO S, DURANTE P, et al. Correlation between immunohistochemical patterns and serum levels of PSA and PSAP in prostatic pathology: evaluation of 198 prostatic fine needle biopsies[J]. *Anticancer Res*, 1994, 14(4a): 1503-1507.
- [25] GUNIA S, KOCH S, MAY M, et al. Expression of prostatic acid phosphatase (PSAP) in transurethral resection specimens of the prostate is predictive of histopathologic tumor stage in subsequent radical prostatectomies[J]. *Virchows Arch*, 2009, 454(5): 573-579. DOI:10.1007/s00428-009-0759-1.
- [26] SHIN S H, LEE G Y, LEE M, et al. Aberrant expression of CITED2 promotes prostate cancer metastasis by activating the nucleolin-AKT pathway[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4113. DOI: 10.1038/s41467-018-06606-2.
- [27] KRANC K R, SCHEPERS H, RODRIGUES N P, et al. Cited2 is an essential regulator of adult hematopoietic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(6): 659-665. DOI:10.1016/j.stem.2009.11.001.
- [28] KORTHUIS P M, BERGER G, BAKKER B, et al. CITED2-mediated human hematopoietic stem cell maintenance is critical for acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2015, 29(3): 625-635. DOI: 10.1038/leu.2014.259.
- [29] YE Y, SONG Y N, HE S F, et al. GINS2 promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis in thyroid cancer by regulating CITED2 and LOXL2[J]. *Cancer Gene Ther*, 2019, 26(3/4): 103-113. DOI: 10.1038/s41417-018-0045-y.
- [30] MINEMURA H, TAKAGI K, SATO A, et al. CITED2 in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with proliferation, migration and chemoresistance[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(12): 1898-1908. DOI:10.1111/cas.13081.
- [31] JAYARAMAN S, DOUCET M, KOMINSKY S. CITED2 attenuates macrophage recruitment concordant with the downregulation of CCL20 in breast cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 871-878. DOI: 10.3892/ol.2017.7420.
- [32] GRASSE S, LIENHARD M, FRESE S, et al. Epigenomic profiling of non-small cell lung cancer xenografts uncover LRP12 DNA methylation as predictive biomarker for carboplatin resistance[J]. *Genome Med*, 2018, 10(1): 55. DOI:10.1186/s13073-018-0562-1.
- [33] BETHGE N, HONNE H, ANDRESEN K, et al. A gene panel, including LRP12, is frequently hypermethylated in major types of B-cell lymphoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e104249. DOI:10.1371/journal.pone.0104249.
- [34] GARNIS C, COE B P, ZHANG L W, et al. Overexpression of LRP12, a gene contained within an 8q22 amplicon identified by high-resolution array CGH analysis of oral squamous cell carcinomas[J]. *Oncogene*, 2004, 23(14): 2582. DOI:10.1038/sj.onc.1207367.
- [35] CHOI E S, LEE H, LEE C H, et al. Overexpression of KLHL23 protein from read-through transcription of PHOSPHO2-KLHL23 in gastric cancer increases cell proliferation[J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(11): 1155-1164. DOI:10.1002/2211-5463.12136.

[收稿日期] 2020-04-18

[修回日期] 2020-09-17

[本文编辑] 黄静怡