

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-05-005

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

## 肾癌中 THBS 家族基因表达数据生物信息学挖掘<sup>①</sup>

刘红云<sup>1②</sup>, 杨 婷<sup>1②</sup>, 李国庆<sup>1</sup>, 孟莉娟<sup>2③</sup>

(1.南华大学衡阳医学院基础医学院细胞生物学与遗传学教研室,湖南 衡阳 421001;2.南华大学衡阳医学院附属第二医院超声医学科,湖南 衡阳 421001)

**摘要** 目的:应用生物信息学方法挖掘血小板反应蛋白 (THBS) 家族各成员与肾癌的关系,预测肾癌治疗、诊断及预后新的标志物。方法:运用 ONCOMINE、GEPIA、KM-plotter 及 cBioPortal 等数据库对 THBS 家族在肾癌中的 mRNA 表达水平及预后生存率进行分析,使用 GeneMANIA 及 DAVID 数据库对 THBS 家族的功能及生物途径进行分析。结果:与正常组织相比,THBS1/THBS2/THBS3 在肾癌中的 mRNA 表达水平下调,且在肾癌肿瘤病理分期中,THBS2/THBS3/THBS5 的表达情况与病理分期具有相关性,低水平 THBS2/THBS3/THBS4/THBS5 或高水平 THBS1 的肾癌患者预计具有较高总生存率 (OS)。结论:THBS1/THBS2/THBS3 可能是肾癌患者精准治疗的潜在目标,THBS2/THBS3/THBS4/THBS5 可作为肾癌预后新的标志物。

**关键词:** 血小板反应蛋白;肾癌;生物信息学

中图分类号:R737.11

文献标志码:A

文章编号:1008-2409(2023)05-0029-09

## Bioinformatics mining of THBS family gene expression data in renal carcinoma<sup>①</sup>

LIU Hongyun<sup>1②</sup>, YANG Ting<sup>1②</sup>, LI Guoqing<sup>1</sup>, MENG Lijuan<sup>2③</sup>

(1.Dept. of Cell Biology and Genetics, School of Basic Medical Sciences, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001; 2. Dept. of Ultrasound Medicine, the Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China.)

**Abstract** Objective: To investigate the relationship between thrombospondin (THBS) family and renal carcinoma by bioinformatics, predicting new biomarkers for the treatment, diagnosis and prognosis. Methods: ONCOMINE, GEPIA, KM-plotter and cBioPortal databases were used to analyze the mRNA expression level and prognostic survival rate of THBS family in renal cancer. GeneMANIA and DAVID database were used to analyze the function and biological pathway of THBS family. Results: THBS1/

① 基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(21A0268);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4530);衡阳市科学技术项目(2020-67-9)。

② 第一作者简介:刘红云,助理实验师,研究方向为生物信息学;杨婷,硕士研究生在读,研究方向为生物信息学。

③ 通信作者:孟莉娟,E-mail:lijuanmeng@usc.edu.cn。

THBS2/THBS3 mRNA expression had been found down-regulated in renal carcinoma compared to normal tissues, and THBS2/THBS3/THBS4/THBS5 expression was correlated with pathological stage of renal carcinoma. Patients with low levels of THBS2/THBS3/THBS4/THBS5 or high levels of THBS1 were expected to have higher overall survival (OS). Conclusion: THBS1/THBS2/THBS3 may be a potential target for precise treatment for patients with renal carcinoma, and THBS2/THBS3/THBS4/THBS5 can be used as a new biomarker for the prognosis of renal cancer.

**Keywords:** thrombospondin; renal carcinoma; bioinformatics

血小板反应蛋白(thrombospondin, THBS)家族介导细胞与细胞和细胞与基质的相互作用。THBS 家族含有 5 个成员,根据结构划分为三聚体 A 亚组(THBS1 和 THBS2)和五聚体 B 亚组(THBS3、THBS4 和 THBS5)。其中,THBS5 也称为软骨寡聚基质蛋白(cartilage oligomeric matrix protein, COMP)。这些钙结合糖蛋白参与调控血管生成、增殖、NO-cGMP 依赖的蛋白激酶途径和 TGF- $\beta$  活化等过程,通过与多种细胞表面蛋白作用激活其下游信号通路来调节细胞表型<sup>[1-2]</sup>。在既定的组织微环境中促血管生成因子和抗血管生成因子之间的平衡决定血管生成表型,THBS 家族在肿瘤血管生长、发展和分化中扮演着极为重要的角色<sup>[3]</sup>。

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)病理分型主要分为三类,即肾透明细胞癌(clear cell RCC, ccRCC),肾乳头状细胞癌(papillary RCC, pRCC),嫌色肾细胞癌(chromophobe RCC, chRCC),分别占比 75%~80%、10%~15%和 6%~11%。肾细胞癌的发病率一直在增加,并且常伴有较高的转移率和死亡率<sup>[4]</sup>。此外,研究发现与正常肾组织相比,肾癌细胞 THBS1 分泌减少,同时肾透明细胞癌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)会增加,这促进了肾细胞癌血管的生成<sup>[5]</sup>。目前,THBS 家族其他成员与肾癌的相关性尚未清晰,因此肾癌的诊断标志物有待进一步发现。利用生物信息学数据库,对 THBS 家族在肾癌中的表达情况及预后进行分析,以期找到用于诊断、精准治疗及预后新的标志物,来提高肾癌的早期诊断率,降低肾癌患者的死亡率,利于肾癌患者预后生存率的分析,为临床

诊断、治疗及肾癌预后的判断提供理论依据。

## 1 方法

### 1.1 THBS 家族在肾癌中的表达水平及预后生存率分析

使用在线癌症微阵列数据库 ONCOMINE ([www.oncomine.org](http://www.oncomine.org))分析不同癌症中 THBS 家族的转录水平。运用 Student's *t* 检验将临床肿瘤标本中 THBS 的 mRNA 表达与正常对照组织进行差异显著性分析。通过 GEPIA (gene expression profiling interactive analysis) 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>)对 THBS 家族在肾癌及正常组织中的差异表达进行分析<sup>[6]</sup>,还分析了 THBS 家族与肾癌病理分期的相关性。

运用 KM-plotter (Kaplan-Meier plotter) 对 THBS 家族的 mRNA 表达情况来评估预后情况,如总生存率(overall survival, OS)和无复发生存期(relapse-free survival, RFS)等<sup>[7]</sup>。该数据库共收录 807 例肾癌病例,通过中位表达(高表达 vs 低表达)将所有病例分为两组,用风险比(hazard ratio, HR)为 95%的置信区间和 logrank 检验来预估 THBS 家族不同表达情况对肾癌患者生存率的影响。cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) 数据库是分析癌症基因组学数据的主要资源之一,包括所有 TCGA 项目和从文献中得到的许多数据集<sup>[8]</sup>。共选择 538 例肾癌样本对 THBS 家族与肾癌的关系进行进一步分析,运用 cBioPortal 对 THBS 家族各成员之间的关系及其在肾癌中的突变情况进行分析。

## 1.2 THBS 家族的功能及生物途径分析

GeneMANIA (<http://www.genemania.org>) 提供了一个非常灵活的界面来查询基因组、蛋白质组和基因功能数据<sup>[9]</sup>。采用 GeneMANIA 得到 THBS 家族各成员及其联系紧密的基因之间的网络关系图。为了表征 THBS 家族的功能,采用 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 进行了分子功能 (molecular functions, MF)、生物过程 (biological processes, BP) 和细胞成分 (cellular components, CC) 的 GO 富集分析,并筛选  $P < 0.05$ ,还进行了 KEGG 富集分析。

## 2 结果

### 2.1 THBS 家族在肾癌中的转录水平

目前, THBS 家族由 5 个成员组成,采用 ONCOMINE 数据库对 THBS 家族各成员在不同种类癌症中与正常组织中的转录水平进行比较分析。在 Jones 等<sup>[10]</sup>、Cutcliffe 等<sup>[11]</sup>、Yusenko 等<sup>[12]</sup> 数据库中,与正常肾组织相比, THBS1/THBS2/THBS3 在各类肾细胞癌中表达均下调, THBS4/THBS5 相关数据没有收录(表 1)。

表 1 THBS 家族在不同类型肾癌和肾组织中的表达水平的显著变化

THBS 家族成员	肾细胞癌类型 vs 正常肾组织	倍性变化	<i>P</i>	<i>t</i>
THBS1	嫌色肾细胞癌 vs 正常肾组织	-3.799	8.27E-16	-21.672
	肾透明细胞癌 vs 正常肾组织	-4.015	4.05E-6	-6.824
	肾乳头状细胞癌 vs 正常肾组织	-2.265	7.32E-5	-4.582
THBS2	嫌色肾细胞癌 vs 正常肾组织	-2.346	1.30E-8	-11.647
THBS3	肾盂尿路上皮癌 vs 正常肾组织	-2.550	5.48E-7	-12.230
THBS4	NA	NA	NA	NA
THBS5 (COMP)	NA	NA	NA	NA

NA 表示没有相关数据。

### 2.2 THBS 家族与肾癌患者临床病理参数的关系

THBS 家族各成员 mRNA 的表达水平与肾癌临床病理分期的相关性进行分析(图 1)。结果表明,

THBS2/THBS3/THBS5 与肾癌临床病理分期具有显著相关性,而 THBS1/THBS4 与肾癌临床病理分期不具有显著相关性。

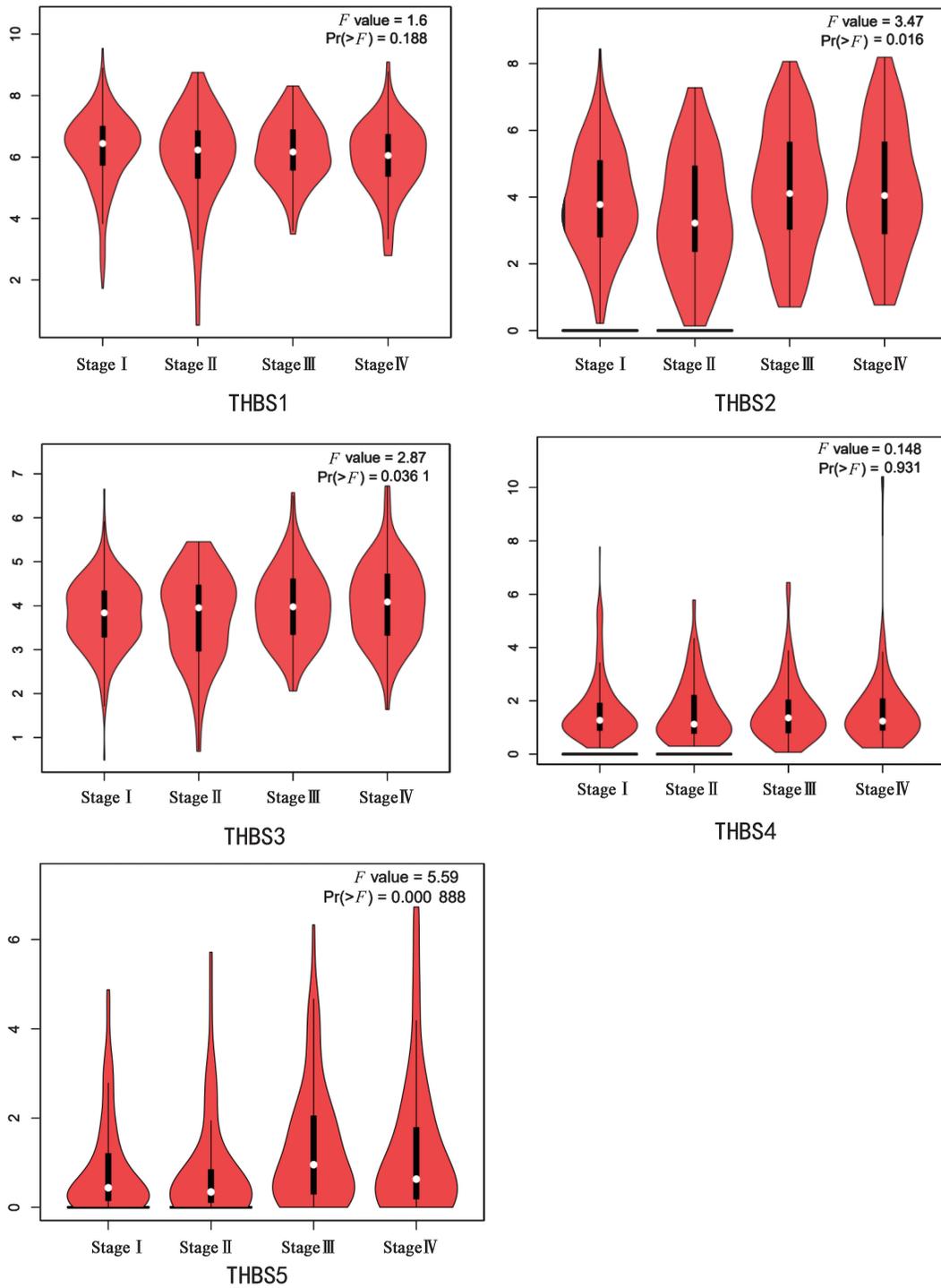


图 1 THBS 家族在肾细胞癌中的表达水平及与肾脏肿瘤分期的关系

### 2.3 THBS 家族的 mRNA 表达水平与肾癌患者预后的关系

使用 KM-plotter 数据库,进一步分析 THBS 家族对肾癌患者生存率的影响,并对肾癌患者的 OS 及 RFS 进行分析。THBS2/THBS3/THBS4 及

COMP mRNA高表达或THBS1 mRNA低表达的肾癌患者 OS 预后较差( $P < 0.05$ ),如图 2 所示。而 RFS 的预后差异不明显( $P > 0.05$ ),如图 3 所示。所以在肾癌患者中,低表达 THBS2/THBS3/THBS4 及 COMP 或高表达 THBS1 的患者预后具有较高的 OS。

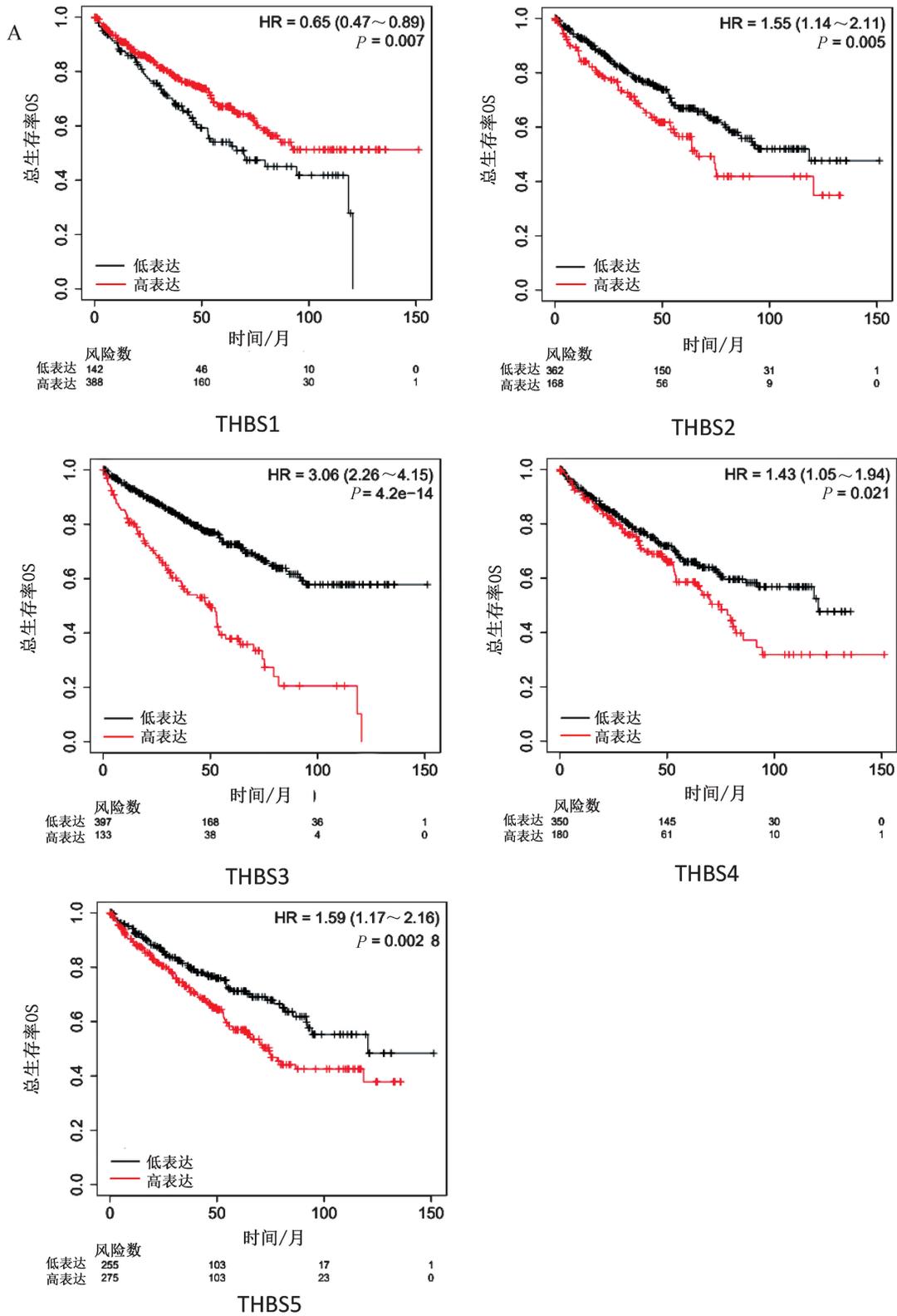


图 2 THBS 家族基因表达与肾癌患者 OS 的关系分析

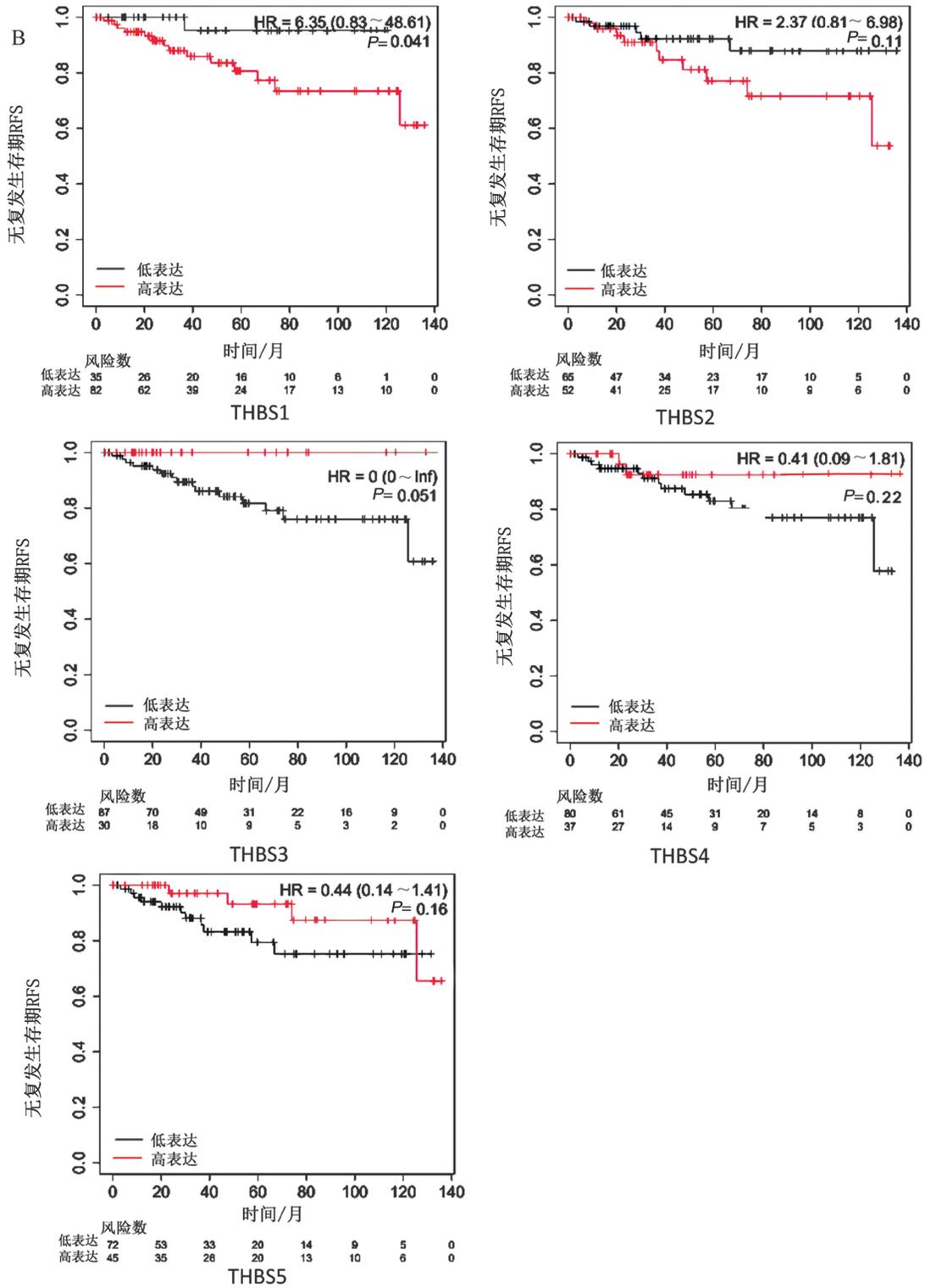
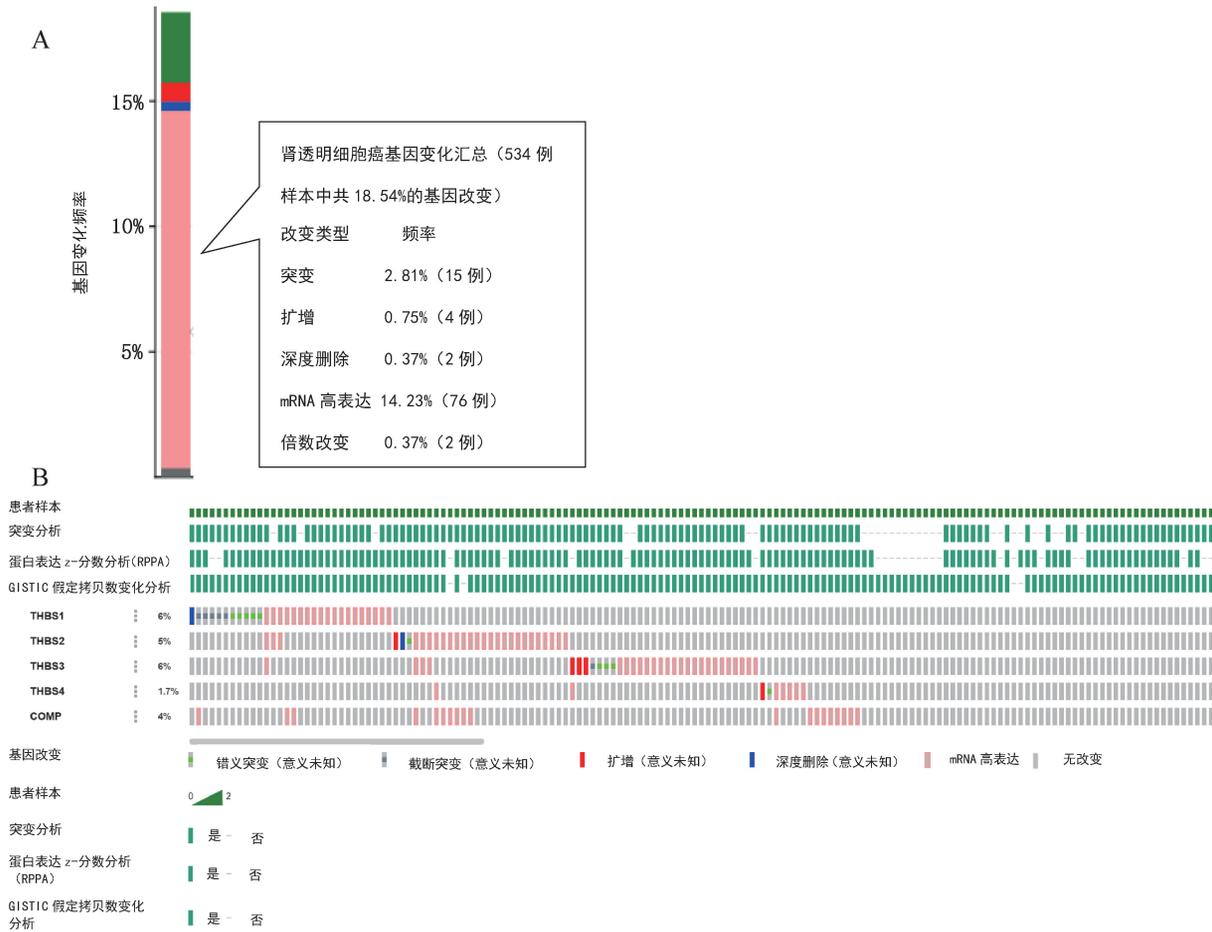


图 3 THBS 家族基因表达与肾癌患者 RFS 的关系分析

### 2.4 预测 THBS 家族的功能和作用途径

采用在线分析工具 cBioPortal 对肾癌中 THBS 家族的突变情况进行分析。THBS 家族在肾癌中的基因突变分析如图 4 所示。在 534 例肾癌样本中，

THBS 家族发生突变的有近 100 例，占 18.54% (图 4A)。发生突变的样本中有大部分的 mRNA 高表达，还有部分发生了单突变或多次突变(图 4B)。



A.THBS 家族在肾癌中的基因突变情况汇总;B.THBS 家族成员的基因突变。

图 4 THBS 家族在肾癌中的基因突变分析

运用 GeneMANIA 数据库构建了 THBS 家族 5 个成员之间及其与多个相邻蛋白之间的关系图。THBS 家族与相邻蛋白的关系及 THBS 的主要功能如图 5 所示。研究发现, CD47、CD36、COL9A1 及 MATN3 等与 THBS 家族联系较为紧密。由该蛋白相互作用网络图也可发现 VEGFA 与 THBS1 具有相关性,还可发现 THBS 家族的功能主要是影响细胞外结构构建、细胞外基质结构构建、细胞-基质黏附、白细胞迁移、血管发育与血管生成等。

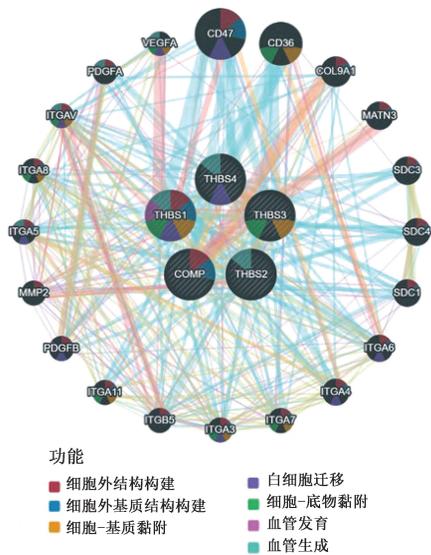


图 5 THBS 家族与相邻蛋白的关系及 THBS 的主要功能

此外,通过使用 DAVID 数据库进行了 GO 和 KEGG 分析预测 THBS 家族的功能及与 THBS 家族

改变显著相关的基因。GO 富集分析从 3 个方面进行,包括生物过程、细胞成分和分子功能。GO:0001525(血管生成)、GO:0048010(血管内皮生长因子受体信号通路)和 GO:0030198(细胞外基质构建)等途径与 THBS 家族的联系较为紧密,GO:0005739(线粒体)、GO:0005925(黏着斑<sup>[13]</sup>)、GO:0015629(肌动蛋白细胞骨架)及 GO:0098641(钙黏蛋白结合参与细胞与细胞的黏附)与 THBS 家族具有相关性。由 KEGG 分析可发现,hsa04510(黏着斑)、hsa04810(肌动蛋白细胞骨架调节)、hsa04611(血小板激活)及 hsa05211(肾细胞癌)等与 THBS 家族的联系较为紧密。

### 3 讨论

大量研究发现,THBS 家族在肝癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌等癌症中扮演着重要角色<sup>[14-17]</sup>。THBS1 在血管生成和肿瘤发生中均起重要作用,THBS1 下调,协同 VEGF 增加,使得肾癌组织血管生成增多,促进肿瘤的发生和发展<sup>[5]</sup>。THBS1 的抗肿瘤活性可能与连接 CD47 受体时触发程序性细胞死亡的能力和通过与 CD36 的相互作用抑制血管内皮生长因子 A 的能力有关<sup>[18]</sup>。本研究使用 ONCOMINE 及 GEPIA 数据库得到的结果显示,THBS1 在肾癌组织中表达下调,但其与肾癌临床病理分期无相关性。使用 KM-plotter 数据库得到的生存率分析可知,THBS1 低表达水平的肾癌患者具有较高的 OS,预计 THBS1 可作为肾癌临床诊断及治疗的潜在目标。

THBS2 是一个钙结合蛋白,结合并失活基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)基因参与组织形成和修复<sup>[19]</sup>。THBS2 是一种多功能的细胞外基质糖蛋白,有着多种受体结合位点以及能与多种细胞因子,如 VEGF、转化生长因子及 MMP 等相互作用而发挥不同的生物学功能<sup>[20]</sup>。本研究发现,THBS2 在肾癌中的表达减少,且与肾癌的病理分期具有相关性。由 GeneMANIA 得到的基因网络图可知,THBS2 的功能主要是影响血管的生成,且与 CD36 具有联系,通过 KM-plotter 得到的生存率曲线可知,高表达 THBS2 的肾癌患者具有更高的 OS,THBS2 可能作为肾癌预后新的标志物。

THBS3 介导细胞与细胞间相互作用的糖蛋白细

胞外基质<sup>[1]</sup>。本研究使用 ONCOMINE 及 GEPIA 数据库得到的结果显示,与正常组织相比,在肾癌中 THBS3 的 mRNA 表达水平较低,且 KM-plotter 的曲线图看出,THBS3 高表达的患者总生存率更高,而且基因网络图上 THBS3 的主要作用为细胞与基质之间的黏附,通过影响黏附,进而与肿瘤的进展相关。有研究表明,THBS3 升高则预示肾透明细胞癌的总生存率低<sup>[21]</sup>。因此,THBS3 有望成为肾癌精准治疗或预后的靶标。

THBS4 是一种进化上保守,以五聚体球状复合体形式分泌的钙结合糖蛋白,被认为是细胞外基质的一部分,参与关键的细胞活动过程,如增殖、附着、黏附和迁移等<sup>[14]</sup>。COMP 作为人体血管壁组成中的重要成分,相关研究表明<sup>[22]</sup>,当人体基质水解酶被激活后,COMP 可在其酶反应下发生降解,对血管平滑肌细胞的迁移、转化产生诱导作用。ONCOMINE 及 GEPIA 数据库没有收录关于 THBS4 及 COMP 在肾癌中 mRNA 表达的数据,THBS4 与临床病理分期无明显相关性,COMP 与肾癌病理分期有关,且 THBS4 和 COMP 高表达的患者有更高的总生存率。从基因网络图可以看出,THBS4 的主要功能是影响血管生成和白细胞迁移,而 COMP 的主要作用是细胞外基质结构构建等。THBS4 及 COMP 的生物信息学分析数据不够充分,预测其可能通过细胞黏附等影响肿瘤的发生发展及迁移,还需进一步的研究证实。此外,THBS 家族为一类钙调节蛋白,从 GO 及 KEGG 富集分析的结果可知,THBS 的作用途径包括钙结合发生细胞黏附,且还会影响线粒体及肌动蛋白的活性,可预测 THBS 家族与肿瘤细胞的生长繁殖及癌症的转移具有相关性。

综上所述,THBS 家族对肾癌的发生发展有重要作用。THBS1/THBS2/THBS3 可能是肾癌患者精准治疗的潜在目标,THBS2/THBS3/THBS4/THBS5 可作为肾癌预后新的标志物。真正将肾细胞癌潜在的生物标志物纳入临床常规检查,还应研究潜在的肾细胞癌生物标志物与疾病的相关性及临床适用价值,不断提高肾细胞癌复查的灵敏度和特异度。

#### 参考文献:

- [1] ADAMS J C, LAWLER J. The thrombospondins[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(10): a009712.

- [2] 郑常松,吕云波,王辉波,等.血小板反应蛋白与心肌重构的关系[J].生命的化学,2022,42(10):1858-1865.
- [3] 李秋霞,周芸,汪来来.血小板反应蛋白、血管生成素与复发性流产患者绒毛组织的关系研究[J].深圳中西医结合杂志,2023,33(3):60-63.
- [4] 付玉麟,黄颺,周秀梅.肾细胞癌血清蛋白标志物的研究进展[J].中国细胞生物学学报,2022,44(10):2013-2020.
- [5] VELICEASA D, IVANOVIC M, HOEPFNER F T, et al. Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma[J]. FEBS J,2007,274(24):6365-6377.
- [6] 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.
- [7] LACNY S, WILSON T, CLEMENT F, et al. Kaplan-Meier survival analysis overestimates cumulative incidence of health-related events in competing risk settings: a meta-analysis[J]. J Clin Epidemiol,2018,93:25-35.
- [8] GAO J J, AKSOY B A, DOGRUSOZ U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal[J]. Sci Signal,2013,6(269):p11.
- [9] FRANZ M, RODRIGUEZ H, LOPES C, et al. GeneMANIA update 2018[J]. Nucleic Acids Res,2018,46(W1):W60-W64.
- [10] JONES J, OTU H, SPENTZOS D, et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer[J]. Clin Cancer Res,2005,11(16):5730-5739.
- [11] CUTCLIFFE C, KERSEY D, HUANG C C, et al. Clear cell sarcoma of the kidney: up-regulation of neural markers with activation of the sonic hedgehog and Akt pathways[J]. Clin Cancer Res,2005,11(22):7986-7994.
- [12] YUSENKO M V, KUIPER R P, BOETHE T, et al. High-resolution DNA copy number and gene expression analyses distinguish chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas[J]. BMC Cancer,2009,9:152.
- [13] LIN J W, HUANG Y M, CHEN Y Q, et al. Dexamethasone accelerates muscle regeneration by modulating kinesin-1-mediated focal adhesion signals [J]. Cell Death Discov,2021,7(1):35.
- [14] 李雅睿,张旭,郭丹,等.血小板反应蛋白4通过诱导肿瘤相关巨噬细胞M2型极化促进肝癌细胞转移[J].中国生物化学与分子生物学报,2022,38(11):1504-1510.
- [15] GENTILE F, LA CIVITA E, VENTURA B D, et al. A neural network model combining [-2] proPSA, freePSA, total PSA, cathepsin D, and thrombospondin-1 showed increased accuracy in the identification of clinically significant prostate cancer [J]. Cancers (Basel), 2023, 15(5):1355.
- [16] XU C J, GU L, KUERBANJIANG M, et al. Thrombospondin 2/Toll-like receptor 4 axis contributes to HIF-1 $\alpha$ -derived glycolysis in colorectal cancer [J]. Front Oncol,2020,10:557730.
- [17] CHEN X B, HUANG Y S, WANG Y B, et al. THBS4 predicts poor outcomes and promotes proliferation and metastasis in gastric cancer[J]. J Physiol Biochem,2019,75(1):117-123.
- [18] KALAS W, SWIDEREK E, SWITALSKA M, et al. Thrombospondin-1 receptor mediates autophagy of RAS-expressing cancer cells and triggers tumour growth inhibition[J]. Anticancer Res,2013,33(4):1429-1438.
- [19] JIAO H, ZENG L X, ZHANG J P, et al. THBS2, a microRNA-744-5p target, modulates MMP9 expression through CUX1 in pancreatic neuroendocrine tumors [J]. Oncol Lett,2020,19(3):1683-1692.
- [20] 夏雨,邱志胜,达明绪.血小板反应蛋白2在胃肠道肿瘤中的研究进展[J].新医学,2021,52(10):729-733.
- [21] WANG G, QU F F, ZHOU J C, et al. Elevated THBS3 predicts poor overall survival for clear cell renal cell carcinoma and identifies lncRNA/RBP/THBS3 mRNA networks[J]. Cell Cycle,2023,22(3):316-330.
- [22] 吕莉,侯新风,李楠,等.血清COMP、ADAMTS-7对骨关节炎患者心血管疾病患病风险的预测价值[J].数理医学杂志,2023,36(2):127-133.

[收稿日期:2023-04-06]

[责任编辑:杨建香 英文编辑:阳雨君]