

• 论 著 •

膜联蛋白 A2 在神经胶质瘤中的表达及调控表型 关键基因的生物信息学分析*

谢守嫔¹, 颜伟姗², 王 瑛³, 周迎霞¹, 彭小兰¹, 李海龙^{4△}

甘肃省兰州市第一人民医院: 1. 神经科; 2. 感染管理科, 甘肃兰州 730050; 3. 兰州大学第二医院
放射影像科, 甘肃兰州 730030; 4. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 甘肃兰州 730000

摘 要:目的 探讨膜联蛋白 A2(ANXA2)在胶质瘤中的表达和预后,并对相关基因进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析,为探索胶质瘤的肿瘤标志物提供依据。**方法** 通过 UALCAN、GEPIA 和 ONCOMINE 在线软件分析 ANXA2 在胶质瘤与癌旁组织的表达;使用 UALCAN 软件分析与 ANXA2 差异表达有相关性的基因;使用 DAVID 6.8 软件对 ANXA2 相关基因开展 KEGG 分析;使用 Human protein atlas 分析 ANXA2 相关基因的生存期;使用 STRING 软件进行 ANXA2 基因蛋白互作(PPI)分析。**结果** ANXA2 在胶质瘤中表达上调。生存期分析结果显示,ANXA2 在胶质瘤中高表达后生存期缩短。KEGG 分析结合生存期分析结果显示,胶质瘤中高表达的 15 个基因的无病生存期缩短,12 个基因的总生存期缩短。PPI 结合这些基因的预后分析结果显示,TNFRSF1A、TGFB1、ITGB5 是参与 ANXA2 调控表型的关键基因。**结论** ANXA2 是胶质瘤中潜在的癌基因,并通过肿瘤相关信号通路调控 TNFRSF1A、TGFB1、ITGB5 参与胶质瘤的发生、发展及预后。

关键词:膜联蛋白 A2; 胶质瘤; 京都基因与基因组百科全书; 总生存期; 无病生存期

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.01.006 **中图法分类号:**R739.41

文章编号:1673-4130(2021)01-0025-05 **文献标志码:**A

Expression of annexin A2 in glioma and bioinformatics analysis of key genes regulating phenotype*

XIE Shoubin¹, YAN Weishan², WANG Ying³, ZHOU Yingxia¹, PENG Xiaolan¹, LI Hailong^{4△}

1. Department of Neurology; 2. Department of Infection Management, the First People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou, Gansu 730050, China; 3. Department of Radiology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China; 4. First Clinical Medical College of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and prognosis of annexin A2 (ANXA2) in gliomas, and to analyze the related genes by the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), so as to provide the basis for exploring tumor markers of glioma. **Methods** The expression of ANXA2 in gliomas and paracancerous tissues were analyzed using UALCAN, GEPIA and ONCOMINE online software; the genes related to the differential expression of ANXA2 were analyzed by using the software of UALCAN; the KEGG analysis of ANXA2 related genes was performed with DAVID 6.8 software; the survival time of ANXA2 related genes was analyzed with Human protein atlas; and the protein interaction (PPI) of ANXA2 was analyzed with STRING software. **Results** The expression of ANXA2 was up-regulated in gliomas. The results of survival analysis showed that the survival time was shortened after overexpression of ANXA2 in gliomas. KEGG analysis combined with survival time analysis showed that the disease-free survival time of 15 genes with high expression was shortened, and the overall survival time of 12 genes was shortened. The prognostic analysis of PPI combined with these genes showed that TNFRSF1A, TGFB1 and ITGB5 were the key genes involved in ANXA2 regulation phenotype. **Conclusion** ANXA2 is a potential oncogene in gliomas, and TNFRSF1A, TGFB1 and ITGB5 are involved in the occurrence, development and prognosis of gliomas.

Key words: annexin A2; glioma; Kyoto encyclopedia of genes and genomes; overall survival; disease-free survival

* 基金项目: 甘肃省教育厅高等学校科研项目(2018A-049)。

作者简介: 谢守嫔, 女, 副主任医师, 主要从事神经系统疾病相关研究。 △ 通信作者, E-mail: gszl860931@163.com。

本文引用格式: 谢守嫔, 颜伟姗, 王瑛, 等. 膜联蛋白 A2 在神经胶质瘤中的表达及调控表型关键基因的生物信息学分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(1): 25-29.

膜联蛋白 A2(ANXA2)是一种钙依赖性磷脂结合蛋白,在脊椎动物细胞中广泛表达。有研究表明,ANXA2 在人神经胶质瘤等多种肿瘤细胞中异常高表达,且其表达与预后不良有关,是胶质瘤独立预后指标^[1-4]。据报道,沉默 ANXA2 可抑制胶质瘤细胞株 U251 和 U87 的增殖,相反,上调 ANXA2 的表达可以促进 U251 细胞增殖^[4]。沉默 ANXA2 可抑制信号传导与转录激活因子 3 和细胞周期蛋白 D1 的表达,将细胞周期阻滞在 G1~S 期^[5]。研究表明,ANXA2 参与恶性胶质瘤的血管生成、侵袭和转移^[6-7]。ANXA2 的泛素化和降解,S100 钙结合蛋白 A11(S100A11)与 ANXA2 相互作用,参与调节核因子 κ B(NF- κ B)信号通路。此外,NF- κ B 在转录水平上正向调节 S100A11,证明了 S100A11 在神经胶质瘤生长中的作用。为进一步明确 ANXA2 在神经胶质瘤中的表达及参与胶质瘤恶性表型形成的机制,本研究拟借助于生物信息学软件,分析 ANXA2 在神经胶质瘤中的表达、预后及其相关信号通路的分子机制。

1 资料与方法

1.1 ANXA2 基因在人胶质瘤及癌旁组织中的表达分析 选择基于癌症基因组图谱数据库的生物信息学分析软件开展 ANXA2 在胶质瘤及癌旁组织的表达分析,这些在线软件包括:UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>),ONCOMINE(<https://www.oncomine.org/resource/login.html>)和 GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)。

1.2 ANXA2 基因在人胶质瘤组织异常表达的生存分析 利用在线分析网站 Human protein atlas(<https://www.proteinatlas.org/>)对 ANXA2 基因分别在高表达和低表达胶质瘤患者中的临床样本进行无

病生存期和总生存期分析。

1.3 与 ANXA2 基因有相关性的基因信号通路富集分析 使用 UALCAN 软件检索与 ANXA2 基因有相关性的基因,其中表达上调的相关基因的相关系数(r)在 0.30~0.99,表达下调的相关基因的 r 在 -0.61~-0.30,并分别将上调和下调的基因全部输入 DAVID 6.8 软件(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。

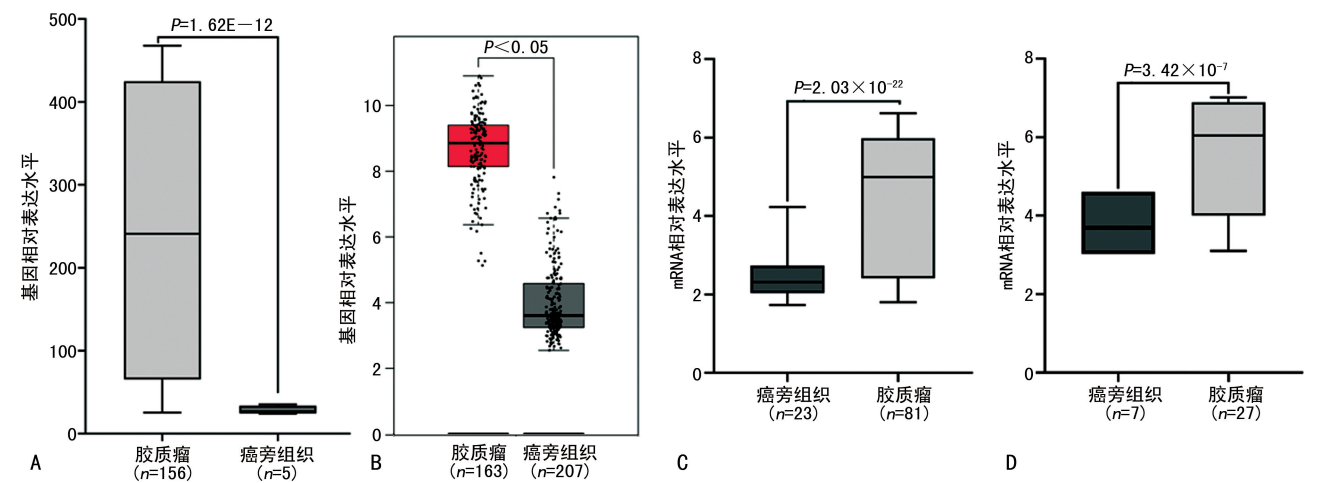
1.4 与 ANXA2 有相关性的肿瘤基因蛋白互作(PPI)网络分析 选择在线 STRING (<https://string-db.org/>)数据库,将 34 个与 ANXA2 有相关性的肿瘤基因输入在线软件 STRING 进行 PPI 网络分析。并观察节点,寻找节点最多的关键基因。

1.5 与肿瘤有相关性的通路基因的表达情况及生存期分析 分析 1.3 中相关基因富集的信号通路,选择与肿瘤有相关性的信号通路,以及关键基因,利用 GEPIA 在线软件分析这些关键基因的表达对生存期的影响。

1.6 统计学处理 富集分析结果的差异比较采用 Fisher 检验;PPI 网络分析采用 K-means 聚类算法,以 $n=3$ 进行聚类分析;生存分析方法采用 Log-rank 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ANXA2 基因在人胶质瘤及癌旁组织中的表达 检索 3 个生物信息学分析软件 UALCAN、GEPIA 和 ONCOMINE 的结果表明,与癌旁组织比较,ANXA2 基因在人胶质瘤组织中表达上调($P<0.05$),见图 1。



注:A 为 UALCAN 生物信息学分析软件基因相对表达水平;B 为 GEPIA 生物信息学分析软件基因相对表达水平;C 为 ONCOMINE 生物信息学分析软件作者 SUN 提供的 mRNA 相对表达水平;D 为 ONCOMINE 生物信息学分析软件作者 SHAI 提供的 mRNA 相对表达水平。

图 1 ANXA2 基因在人胶质瘤及癌旁组织中的表达

2.2 ANXA2 基因在人胶质瘤及癌旁组织中的生存分析 采用 Human protein atlas 分析预后生存期显

示,与 ANXA2 基因低表达组比较,胶质瘤中 ANXA2 基因高表达组生存期缩短,预后相对较差($P<0.05$)。

见图 2。

2.3 与 ANXA2 基因有相关性的基因的信号通路富集分析 通过 UALCAN 和 DAVID 6.8 软件分析发现,与 ANXA2 基因有相关性的上调基因共有 1 396 个,富集在 35 个信号通路中,其中与肿瘤有相关性的有 10 个,分别是 Wnt 信号通路、结直肠癌、cAMP 信号通路、AMPK 信号通路、细胞周期、ErbB 信号通路、子宫内膜癌、慢性粒细胞白血病、癌症中的胆碱代谢、mTOR 信号通路;与 ANXA2 基因有相关性的下调基因共有 1 152 个,富集在 59 个信号通路中,其中与肿瘤有相关性的有 11 个,分别是细胞因子受体相互作用、肿瘤坏死因子信号通路、局灶性粘连、细胞外受体相互作用、癌症中的蛋白多糖、NF-κB 信号通路、NOD 样受体信号通路、细胞黏附分子、细胞凋亡、Jak-STAT 信号通路和 MAPK 信号通路,以上分析以富集倍数大于 2 的信号通路为筛选标准。见表 1、2。

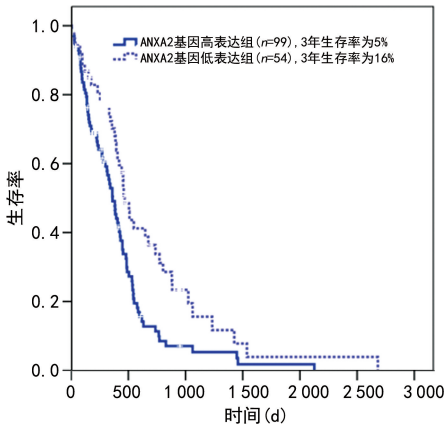


图 2 ANXA2 基因在人胶质瘤及癌旁组织中的生存分析

2.4 PPI 网络分析结果 筛选出与肿瘤有相关性的信号通路,再将 34 个基因富集在与肿瘤有相关性的信号通路中,进行 PPI 分析,并将其聚类在 3 个模块中。分析其节点,发现 TNFRSF1A、ICAM1、TG-

FB1、ITGB5、ITGB1 是节点最多的基因,由此提示,这 5 个基因在 ANXA2 基因调控胶质瘤的生物表型中发挥重要作用。

2.5 与肿瘤有相关性的通路基因的表达情况及生存期分析 相关基因表达分析显示,与 ANXA2 表达有相关性的 34 个基因均为肿瘤组织中高表达的癌基因 ($P<0.05$)。总生存期分析显示,THBS1、RRAS、OSMR、IL13RA1、COL6A1、PLAUR、SOCS3、ITGB5、TNFRSF1A、ITGA5、IQGAP1、HSPB1 共 12 个基因的表达与总生存期相关 ($P<0.05$)。无病生存期分析显示, TNFRSF12A、TGFB1、OSMR、LIF、ITGA5、ITGB5、TNC、THBS1、CACNA2D4、IL13RA1、COL6A1、CD276、ITGA3、CCL2、SOCS3 共 15 个基因的表达与无病生存期相关 ($P<0.05$)。其中,THBS1、OSMR、ITGA5、ITGB5、SOCS3、COL6A1、IL13RA1 共 7 个基因的总生存期和无病生存期分析结果均显示,其基因的异常表达与预后关系密切。综合相关基因表达预后分析和 PPI 分析,除 ICAM1 和 ITGB1 外, TNFRSF1A、TGFB1 和 ITGB5 均为与预后相关性的基因。见表 3。

表 1 与 ANXA2 基因有相关性的上调基因富集的肿瘤相关信号通路

信号通路	<i>P</i>	富集倍数	错误发现率	Fisher 精确值
Wnt 信号通路	5.00×10^{-4}	2.6	6.50×10^{-1}	1.70×10^{-4}
结直肠癌	3.50×10^{-3}	3.2	4.40×10^1	9.40×10^{-4}
cAMP 信号通路	4.80×10^{-3}	2.0	6.00×10^1	2.20×10^{-3}
AMPK 信号通路	8.40×10^{-3}	2.3	1.00×10^1	3.40×10^{-3}
细胞周期	9.00×10^{-3}	2.2	1.10×10^1	3.60×10^{-3}
ErbB 信号通路	1.10×10^{-2}	2.5	1.40×10^1	4.00×10^{-3}
子宫内膜癌	1.40×10^{-2}	3.1	1.70×10^1	4.10×10^{-3}
慢性粒细胞白血病	2.70×10^{-2}	2.5	3.00×10^1	9.60×10^{-3}
癌症中的胆碱代谢	2.90×10^{-2}	2.2	3.20×10^1	1.20×10^{-2}
mTOR 信号通路	6.90×10^{-2}	2.4	6.10×10^1	2.50×10^{-2}

表 2 与 ANXA2 基因有相关性的下调基因富集的肿瘤相关信号通路

信号通路	<i>P</i>	富集倍数	错误发现率	Fisher 精确值
细胞因子受体相互作用	4.4×10^{-14}	3.3	5.70×10^{-11}	1.10×10^{-14}
肿瘤坏死因子信号通路	2.8×10^{-12}	4.3	3.70×10^{-9}	5.00×10^{-13}
局灶性粘连	1.6×10^{-9}	2.9	2.10×10^{-6}	4.90×10^{-10}
细胞外受体相互作用	1.1×10^{-8}	4.0	1.50×10^{-5}	2.20×10^{-9}
癌症中的蛋白多糖	3.0×10^{-7}	2.6	3.90×10^{-4}	1.00×10^{-7}
NF-κB 信号通路	1.0×10^{-5}	3.2	1.30×10^{-2}	2.60×10^{-6}
NOD 样受体信号通路	2.8×10^{-5}	4.0	3.60×10^{-2}	5.50×10^{-6}
细胞黏附分子	7.9×10^{-4}	2.2	1.00	3.30×10^{-4}
细胞凋亡	8.9×10^{-4}	3.0	1.20	2.50×10^{-4}
Jak-STAT 信号通路	1.5×10^{-3}	2.1	1.90	6.20×10^{-4}
MAPK 信号通路	4.5×10^{-2}	2.5	4.50×10^1	2.80×10^{-2}

表 3 与肿瘤有相关性的通路基因的表达情况及生存期分析

基因名称	<i>r</i>	肿瘤组织中位数	癌旁组织中位数	相差倍数(Log2)	总生存期分析(<i>P</i>)	无病生存期分析(<i>P</i>)
TICAM2	0.61	3.31	1.12	1.024	>0.05	>0.05
ITGA3	0.53	26.80	12.42	1.051	>0.05	0.031
TNFRSF1A	0.55	132.98	13.90	3.169	0.039	>0.05
BCL3	0.60	15.18	5.68	1.276	>0.05	>0.05
MYL12A	0.67	215.88	29.14	2.847	>0.05	>0.05
RELB	0.51	9.93	2.40	1.685	>0.05	>0.05
TGFB1	0.52	43.16	5.04	2.870	>0.05	0.048
CCL2	0.53	99.54	2.58	4.812	>0.05	0.002
RRAS	0.52	40.14	13.59	1.496	0.009	>0.05
HSPB1	0.52	472.57	157.70	1.577	0.013	>0.05
RAC2	-0.61	14.81	1.64	2.582	>0.05	>0.05
LIF	0.58	4.12	0.09	2.232	>0.05	0.012
THBS1	0.51	7.85	1.20	2.008	0.048	0.003
ICAM1	0.51	16.23	1.57	2.745	>0.05	>0.05
TNC	0.56	133.34	0.80	6.222	>0.05	0.036
IQGAP1	0.69	62.76	15.27	1.970	0.041	>0.05
OSMR	0.49	18.38	1.86	2.760	0.003	<0.001
MYL9	0.51	55.40	17.08	1.641	>0.05	>0.05
IFNGR2	0.51	87.53	28.07	1.607	>0.05	>0.05
ITGA5	0.56	34.32	3.09	3.110	0.021	0.015
ITGB5	0.50	49.47	11.93	1.965	0.012	0.020
SDC2	0.49	51.09	18.62	1.409	>0.05	>0.05
CD276	0.55	98.12	15.05	2.627	>0.05	0.010
TNFRSF12A	0.63	98.06	1.25	5.460	>0.05	0.029
SOCS3	0.48	34.09	3.15	3.080	0.032	0.010
CAV1	0.64	44.61	3.80	3.248	>0.05	>0.05
PLAUR	0.66	27.01	2.01	3.218	0.030	>0.05
FAS	0.57	11.88	3.11	1.648	>0.05	>0.05
COL6A1	0.57	124.38	50.16	1.293	0.006	0.027
IL13RA1	0.52	28.75	3.72	2.656	0.015	0.007
PLAU	0.66	21.02	0.58	3.801	>0.05	>0.05
CACNA2D4	0.52	4.81	0.52	1.934	>0.05	0.015
ITGB1	0.56	101.53	17.48	2.472	>0.05	>0.05
CD44	0.62	209.73	2.17	6.055	>0.05	>0.05

3 讨 论

胶质瘤约占中枢神经系统原发恶性肿瘤的 80%，世界卫生组织将胶质瘤分为Ⅰ～Ⅳ级，Ⅰ级和Ⅱ级属于低级别胶质瘤，Ⅲ级和Ⅳ级属于高级别胶质瘤，其恶性程度越来越高。每个等级的临床治疗和预后不同；但绝大部分胶质瘤是Ⅲ级的间变性胶质细胞瘤和Ⅳ级的胶质母细胞瘤，基本无法治愈^[8-9]。近年来对神经胶质瘤的研究趋向于基因治疗学及分子生物学，发现某些细胞因子的表达能通过下游相关信号通路

的变化，影响神经胶质瘤的恶性演变，加速或延缓病情的进展。因此，针对不同通路的靶向治疗也成了研究热点，随着研究的深入，从分子水平调控神经胶质瘤的发生、发展成为可能。

本研究基于生物信息学分析软件 UALCAN、GEPIA 和 ONCOMINE 的结果均显示，ANXA2 基因在胶质瘤中是明显高表达的癌基因。与 ANXA2 基因有相关性的上调基因共有 1 396 个，富集在 35 个信号通路中，其中与肿瘤有相关性的有 10 个；与

ANXA2 基因有相关性的下调基因共有 1 152 个,富集在 59 个信号通路中,其中与肿瘤有相关性的有 11 个。ANXA2 基因参与了细胞周期调控,这与邓正海等^[5]的研究,在 U251 和 U87 胶质瘤细胞株中沉默 ANXA2 基因的表达,可以抑制细胞周期蛋白 D1 的表达,将细胞周期阻滞在 G1~S 期的结果一致。ANXA2 基因参与 NF- κ B 信号通路,这与文献^[6-7]报道的 ANXA2 基因参与 NF- κ B 信号通路介导的恶性胶质瘤血管生成、侵袭和转移的结果一致。因此,借助于生物信息学软件,明显有助于开展肿瘤标志物的表型和机制研究,能避免机制研究的盲目性。

PPI 分析发现 TNFRSF1A、ICAM1、TGFB1、ITGB5、ITGB1 是节点最多的基因,这 5 个基因在 ANXA2 基因调控胶质瘤的生物表型中发挥重要作用,而且,综合相关基因表达预后分析和 PPI 分析,除 ICAM1 和 ITGB1 外, TNFRSF1A、TGFB1、ITGB5 均为与预后相关性的基因。这一结果为后期深入探讨分子机制,提供了思路和研究切入点。

使用 Human protein atlas 分析预后生存期显示,与 ANXA2 基因低表达组比较,ANXA2 基因高表达组生存期缩短,预后相对较差。与肿瘤有相关性的信号通路的 34 个基因中,12 个基因的表达与总生存期相关;15 个基因的表达与无病生存期相关。ANXA2 基因可能是胶质瘤中潜在的癌基因,与肿瘤有相关性并富集在 20 个信号通路中的基因的异常表达与胶质瘤预后明显相关。因此,ANXA2 基因表达上调在胶质瘤中的发生、发展及预后过程中发挥重要作用,并有望成为判断胶质瘤患者预后的重要的肿瘤标志物。

近年来,采用生物信息学的方法,开展驱动基因、肿瘤标志物和信号通路的筛选,以及分子机制的研究,受到越来越多的关注,也越来越被学术界认可^[10-15],本研究主要从 ANXA2 基因表达水平改变、预后分析、参与的信号通路分析,以及高度相关基因的预后生存分析入手,对其基因的功能表型及调控胶质瘤进展的分子机制进行了生物信息学的研究和分析,结果对深入开展该基因调控胶质瘤表型的机制研究提供了依据,ANXA2 基因有望成为胶质瘤诊断和治疗的生物学标志物。

综上所述,本研究借助于生物信息学软件和数据库分析后发现,ANXA2 是胶质瘤中潜在的癌基因,筛选相关基因后进行信号通路富集分析,将获得的肿瘤相关信号通路基因进行生存期分析和 PPI 分析,最终发现 TNFRSF1A、TGFB1、ITGB5 是 ANXA2 参与胶质瘤发生、发展及预后的关键基因。

参考文献

- [1] MAULE F, BRESOLIN S, RAMPAZZO E, et al. Annexin 2A sustains glioblastoma cell dissemination and proliferation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 54632-54649.
- [2] GAO H, YU B, YAN Y, et al. Correlation of expression levels of ANXA2, PGAM1, and CALR with glioma grade and prognosis[J]. *J Neurosurg*, 2013, 118(4): 846-853.
- [3] 郭继东, 丁照义, 王策. 膜联蛋白 A2 在脑胶质瘤组织中的表达及其与细胞凋亡的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(2): 417-418.
- [4] 杨斌, 刘献志, 李进军, 等. ANXA 2 和 EGFR 在人脑胶质瘤中的表达及临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(3): 274-276.
- [5] 邓正海, 侯颖智. 胶质瘤组织中膜联蛋白 A2 和锌指转录因子 Snail 的表达及相应 siRNA 对胶质瘤细胞的调节作用[J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(23): 2793-2796.
- [6] CHEN L, LIN L, XIAN N, et al. Annexin A2 regulates glioma cell proliferation through the STAT3 cyclin D1 pathway[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(1): 399-413.
- [7] ONISHI M, ICHIKAWA T, KUROZUMI K, et al. Annexin A2 regulates angiogenesis and invasion phenotypes of malignant glioma[J]. *Brain Tumor Pathol*, 2015, 32(3): 184-194.
- [8] 韩新旺. 神经胶质瘤靶向治疗的研究进展[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
- [9] 张亚, 丁晓, 陆海军. 恶性胶质瘤靶向治疗研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(5): 350-356.
- [10] 郑立影, 吕红, 林赋桂, 等. 脑胶质瘤治疗策略及其研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2016, 37(1): 50-53.
- [11] WEI L, HE F, ZHANG W, et al. Bioinformatics analysis of microarray data to reveal the pathogenesis of diffuse intrinsic pontine glioma[J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 26.
- [12] XU Y, WANG J, XU Y, et al. Screening critical genes associated with malignant glioma using bioinformatics analysis[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6580-6589.
- [13] ZHANG B, WU Q, XU R, et al. The promising novel biomarkers and candidate small molecule drugs in lower-grade glioma: evidence from bioinformatics analysis of high-throughput data[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15106-15118.
- [14] 华实. 基于生物信息学分析高表达 GALNT7 和 MRC2 对胶质瘤细胞增殖、侵袭性的影响[D]. 山东: 山东大学, 2019.
- [15] 李福斌. 基于生物信息学技术筛选长生存期胶质母细胞瘤预后相关基因的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2017.

(收稿日期: 2020-05-02 修回日期: 2020-08-10)