

· 论著 ·

〔文章编号〕 1007-0893(2023)10-0001-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.10.001

神经母细胞瘤中 MYCN 相关长链非编码核糖核酸的功能研究

刘方杰 乔晓亮

(郑州市妇幼保健院, 河南 郑州 450000)

〔摘要〕 目的: 筛选神经母细胞瘤(NB)中 MYCN 相关的长链非编码核糖核酸(lncRNA), 分析其功能及对患者预后的影响, 寻找潜在治疗靶点和分子标志物。方法: 分别从 TARGET 及 GEO 数据库下载基因表达数据, 并将两组数据分成 MYCN 高表达组和低表达组, R 语言筛选出两组差异表达 lncRNA, 取共同差异表达 lncRNA; 通过 ENCORI 数据库预测与 lncRNA 互作的核糖核酸(RNA), DAVID 数据库分析相关基因的功能与信号通路的富集情况; TARGET 数据库进行相关生存分析。结果: TARGET 数据库中共筛选出差异倍数在两倍以上的 lncRNA 1104 个, GEO 数据库筛选出差异基因 2849 个, 两个数据库中共同差异表达 lncRNA 59 个, ENCORI 数据库预测与这些基因互作 mRNA 547 个, 功能分析发现这些基因主要富集在调控神经系统疾病的相关通路, 并通过调控转录、蛋白绑定等发挥相关生物学功能。利用 TARGET 数据库进行生存分析发现其中 VPS9D1-AS1、LINC00649、LINC01234 的异常表达可以影响患者生存。结论: 运用生物信息学通过对 MYCN 相关差异表达 lncRNA 的分析发现 VPS9D1-AS1、LINC00649、LINC01234 可能与 NB 的发生发展密切相关, 可为后续的研究提供方向与思路。

〔关键词〕 长链非编码基因; MYCN 癌基因; 神经母细胞瘤; 生物信息学

〔中图分类号〕 R 739.4 〔文献标识码〕 A

Function Analysis of Long Noncoding RNA Associated with Expression of MYCN in Neuroblastoma

LIU Fang-jie, QIAO Xiao-liang

(Women & Infants Hospital of Zhengzhou, Henan Zhengzhou 450000)

〔Abstract〕 Objective To screen long noncoding RNA (lncRNA) associated with MYCN expression in neuroblastoma (NB), analyzing its effect on the patients' prognosis, and finding potential therapeutic targets. Methods Gene expression data were downloaded from TARGET and GEO databases, and the two groups were divided into MYCN high expression group and low expression group, respectively. R language was used to screen the differentially expressed genes, and obtained common differentially expressed lncRNAs. The mRNAs interacting with those lncRNAs were predicted by public ENCORI database; DAVID database was used to analyze the functions of these genes. Survival analysis of the differentially expressed lncRNAs was performed by TARGET database. Results A total of 1104 the differentially expressed lncRNAs were screened out from TARGET database, 2849 differentially expressed genes were screened from geo database, 59 common differentially expressed lncRNAs were identified after intersection with GEO identified; and 547 mRNAs were predicted to interact with them by ENCORI database. These differentially expressed lncRNAs were significantly enriched in the protein binding, negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, and Alzheimer disease signaling pathway. TARGET database was used for further survival analysis, showed that VPS9D1-AS1, LINC00649 and LINC01234 could affect the survival of patients. Conclusion Through bioinformatics analysis of differentially expressed lncRNAs related to MYCN expression, it was found that VPS9D1-AS1, LINC00649 and LINC01234 may be closely related to the occurrence and development of NB, providing direction and ideas for subsequent research.

〔Keywords〕 Long noncoding genes; MYCN oncogene; Neuroblastoma; Bioinformatics

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童最常见的转移导致死亡,但也有少部分不经治疗或者经治疗后完全外周神经系统肿瘤,发病率在儿童恶性肿瘤中占第4位^[1]。消退。目前主要采取的治疗手段有手术、化疗及放疗、NB 临床表现差异比较大,有的患者病情进展快速发生转造血干细胞移植及免疫维持治疗,但治疗效果有限,其

〔收稿日期〕 2023-03-21

〔基金项目〕 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20191136)

〔作者简介〕 刘方杰,女,主管技师,主要从事临床检验诊断工作。

长期生存率仅为 30%，对儿童健康也存在危害^[2]。有关研究显示，NB 中 MYCN 癌基因扩增和过度表达是其临床分期、迅速发展和预后不良的指标，可作为选择治疗方案的参考依据^[3]。MYCN 癌基因在大约 25% 原发未治疗的 NB 肿瘤中有扩增表达，与 NB 细胞的增殖和分化相关，并导致该疾病的恶性表型和快速进展。近年来发现，MYCN 可通过调控酪氨酸激酶受体 b (tyrosine kinase receptor B, TRKB)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent-kinases4, CDK4)、DKK1 (Dickkopf-1)、p53 基因，血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、钙粘附蛋白 E (E-cadherin) 等多种信号分子^[4-6]，在 NB 细胞生长、增殖、细胞周期、凋亡、血管生成和侵袭转移等方面发挥重要作用，因此研究 MYCN 过度表达的机制具有重要的临床意义。长链非编码核糖核酸 (long noncoding ribonucleic acid, lncRNA) 是一类转录本长度大于 200 bp 的核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA)，其本身缺乏明显的开放阅读框，位于细胞核内或胞质中，不参与蛋白质编码功能，以 RNA 形式在表观遗传学、转录调控及转录后调控等三个方面实现基因表达的调控^[7-8]。本研究利用 TARGET (therapeutically applicable research to generate effective treatments)^[9] (该数据库针对儿童肿瘤提供了大量的基因组学数据) 和 GEO (gene expression omnibus)^[10] 数据库 (公共高通量数据) 筛选 MYCN 相关差异表达的 lncRNA，并对其进行了生物学功能分析及生存分析，旨在为 NB 的发病机制与治疗提供新的研究思路。

1 资料和方法

1.1 表达谱数据

从 TARGET 下载 NB 患儿的表达谱数据 TARGET-NBL，共 150 例，其中 33 例为 MYCN 扩增患儿，116 例为 MYCN 非扩增患儿，1 例 MYCN 的表达情况未知不纳入研究。自 GEO 数据库中下载 NB 细胞系基因表达谱芯片 GSE89413，该芯片基于 GPL18573 平台 Illumina NextSeq 500 (Homo sapiens)，标本为 39 株目前常用的 NB 细胞系，包括 14 株 MYCN 低表达细胞系及 25 株 MYCN 高表达细胞系。

1.2 差异 lncRNA 筛选及互作信使核糖核酸预测

把 TARGET、GEO 数据库中下载的表达谱数据根据 MYCN 的表达情况分成两组，MYCN 高表达组和 MYCN 低表达组，使用 R 语言软件 (Version 4.2.0) 的 limma 包分别对两组数据进行差异分析，根据标准为：差异倍数 (fold change, FC) 大于 2，错误发现率 (false discovery rate, FDR) 小于 0.05，既 $|\log_2FC| > 1$ ， $FDR < 0.05$ 筛选差异表达的 lncRNA。用 ENCORI (the encyclopedia of RNA interactomes) 数据库预测与共同差异表达 lncRNA 相互作用的信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid,

mRNA)，以进一步研究 lncRNA 的功能。

1.3 差异 lncRNA 的功能分析

使用 DAVID (the database for annotation, visualization and integrated discovery) 数据库对互作 mRNA 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 功能注释与京都基因和基因组大百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。在 TARGET 数据库中，下载 NB 患儿信息并提取生存数据，其中随访信息的样本 149 例。利用 survival、survminer、Cairo 包对差异表达的 lncRNA 进行 Kaplan-Meier 法、单因素 COX 回归分析，筛选出两种方法均 $P < 0.05$ 的 lncRNA 并绘制生存曲线。

2 结果

2.1 GEO、TARGET 数据库中差异 lncRNA 的筛选

在 TARGET 数据库 150 例标本分成两组，其中 MYCN 扩增病例 33 例，MYCN 非扩增病例 116 例，筛选标准为 $|\log_2FC| > 1$ ，校正后 $P < 0.05$ ，得到差异表达 lncRNA 共 1104 个，上调 372 个，下调 732 个。GEO 数据库中 39 株常见 NB 细胞系的表达谱数据分成 MYCN 低表达组包含 14 株细胞，及 MYCN 高表达组包含 25 株细胞，按照上述标准进行差异分析得到差异表达的 lncRNA 共 2849 个，其中上调 247 个，下调 2602 个，见插页 1 图 1。

2.2 差异 lncRNA 的互作 mRNA 的预测

对两个数据库中差异表达的基因取交集，得到共同差异表达 lncRNA 59 个，其中表达上调 8 个，下调 51 个，见插页 1 图 2。利用 ENCORI 数据库预测与其相互作用的 RNA，结果发现其中 21 个 lncRNA 有互作 RNA 801 个，包括 mRNA 547 个，见表 1，且结果显示 VPS9D1-AS1 可能直接调控 MYC 的表达。

2.3 GO 和 KEGG 分析

为进一步研究 lncRNA 的生物学功能，对与其互作的 mRNA 进行了 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。结果显示这些基因参与的生物学过程 (biological process, BP) 为通过 RNA 聚合酶 II、脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) 模板等负向调控相关转录功能；细胞定位 (cellular component, CC) 在胞质与核浆中；分子功能 (molecular function, MF) 主要参与 RNA 结合和蛋白质的结合。同时也多富集于阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症等神经系统相关的信号通路中，见插页 2 图 3。

2.4 重要 lncRNA 的生存分析

为探索上述 21 个具有生物学功能的 lncRNA 对患者生存的影响，利用 TARGET 数据库进行生存分析，结果显示有 3 个差异表达基因 VPS9D1-AS1 ($HR = 1.73$)、LINC00649 ($HR = 0.60$)、LINC01234 ($HR = 1.84$) 影响患者预后 ($P < 0.05$)，见插页 2 图 4。

表 1 lncRNA 的互作 mRNA (部分)

基因 ID	基因名称	配对基因名称	互作 RNA 数	验证次数	高通量测序类型数	总读取数	自由能	对齐得分(史密斯-沃特曼算法)
ENSG00000228223	HCG11	MEX3A	1	1	1	1	-72.6	45.0
ENSG00000227195	MIR663AHG	PPP6R1	1	1	1	1	-70.6	37.0
ENSG00000227195	MIR663AHG	RPL21	1	1	1	1	-62.3	17.5
ENSG00000227195	MIR663AHG	PERP	1	1	1	1	-61.7	38.0
ENSG00000227195	MIR663AHG	ARPC1B	1	1	1	1	-61.1	34.0
ENSG00000227195	MIR663AHG	AC004922.1	1	1	1	1	-61.1	34.0
ENSG00000261373	VPS9D1-AS1	TIMP2	1	1	1	1	-60.9	37.5
ENSG00000228223	HCG11	RGMA	1	1	1	1	-60.8	29.0
ENSG00000231789	PIK3CD-AS2	KIAA2013	1	1	1	1	-60.5	32.5
ENSG00000225756	DBH-AS1	ITPA	1	1	1	1	-59.8	37.5
ENSG00000261373	VPS9D1-AS1	MYC	1	1	1	1	-30.9	27.5

注: lncRNA 一长链非编码核糖核酸; mRNA 一信使核糖核酸。

3 讨论

NB 中 MYCN 基因的扩增可显著影响病情的转归及预后,但目前对 MYCN 扩增的机制尚未完全研究透彻,而近年来非编码基因的研究给笔者的研究提供了思路,目前在 NB 中 lncRNA 相关研究也正如火如荼,定位于 17q25.1 的 lncRAN 在 NB 肿瘤中表达显著增加,并与患儿的不良预后相关^[11]; T-UCRs (transcribed-ultraconserved regions) 在 NB 患儿肿瘤组织表达显著增加^[12]; NBAT1 (neuroblastoma associated transcript-1) 与 NB 患儿的高危风险和预后密切相关,其表达降低将导致 NB 细胞的恶性增殖和侵袭能力增强^[13]; lncUSMycN 与 MYCN 表达成正相关,通过结合到 RNA 连接蛋白 NonO 促发 MYCN 上调和细胞增殖^[14]; LINC00467 和 RD3 启动子区域竞争性与 MYCN 结合,通过诱导 DKK1 表达,抑制 NB 细胞增殖^[15],这些研究均证实 lncRNA 异常表达参与了 NB 的发生发展,而且介导了 NB 中 MYCN 的表达调控,但是直接 lncRNA 引起 MYCN 扩增和过度表达的分子机制尚未完全阐明。

本研究利用 GEO 和 TARGET 两个数据库分别在 NB 细胞系和 NB 患者中筛选出共同差异表达的 lncRNA 59 个,其中表达上调的 8 个,下调 51 个,包括已经在 NB 中被证实非编码基因 MYCNOS 和 MYCNUT,证明了筛查结果的可靠性。

lncRNA 发挥功能的主要途径包括:招募染色质重构复合体介导某些基因的表达沉默、作为诱饵与转录因子结合抑制 mRNA 的转录、海绵作用吸收微小 RNA 或直接与 mRNA 结合降解或抑制 mRNA 的翻译,以及蛋白结合激活或抑制蛋白活性。总之 lncRNA 最终通过影响 mRNA 的表达及功能产生一系列的生物学效应。为了研究筛选出的差异表达 lncRNA 主要影响哪些 mRNA 的表达,本研究借助 ENCORI 数据库预测与 lncRNA 关联的 RNA,该数据库中的数据并不是完全基于预测得到的,有免疫共沉淀的实验数据支持,数据相对来说还是比较可

信,研究价值较高。结果显示有 21 个 lncRNA 与 801 个 RNA 相互作用,其中 mRNA 有 547 个,用 DAVID 数据库对这些 lncRNA 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,结果发现这些基因主要富集在阿尔兹海默症、帕金森疾病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症等神经系统相关的通路中,进一步证明了这些基因对神经系统的影响,与此同时这些基因也可以通过 DNA 聚合酶 II, DNA 模板等的负向调控发挥相关的生物学功能。为了进一步筛选重点基因,缩小研究范围,笔者利用 TARGET 数据库对 21 个明确有生物学功能的 lncRNA 进行生存分析,结果发现 VPS9D1-AS1, LINC00649, LINC01234 可明显影响患者预后,其中 VPS9D1-AS1 预测能与 MYC 蛋白相互作用,提示该基因在 MYCN 扩增 NB 中可能有重要作用,可将其作为后续研究的重点。

综上所述,通过数据库筛选出在 NB 中差异表达的 lncRNA 为 VPS9D1-AS1、LINC00649、LINC01234,这些基因的表达与 MYCN 的扩增密切相关,对其进行功能分析可为后续的研究提供有效支持,并对 NB 的发病机制及治疗提供研究方向。

〔参考文献〕

- (1) Luksch R, Castellani MR, Collini P, et al. Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours) (J). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016, 107(1): 163-181.
- (2) Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, et al. Neuroblastoma (J). *Lancet*, 2007, 369(9579): 2106-2120.
- (3) Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN (J). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, 3(10): a014415.
- (4) Higashi M, Sakai K, Fumino S, et al. The roles played by the MYCN, Trk, and ALK genes in neuroblastoma and neural development (J). *Surgery today*, 2019, 49(9): 721-727.
- (5) Manhani R, Cristofani LM, Filho V, et al. Concomitant p53 mutation and MYCN amplification in neuroblastoma (J). *Pediatric Blood & Cancer*, 2015, 29(3): 206-207.

- (6) Sun Y, Bell JL, Carter D, et al. WDR5 Supports an N-Myc Transcriptional Complex That Drives a Protumorigenic Gene Expression Signature in Neuroblastoma (J). *Cancer Res*, 2015, 75(23): 5143-5154.
- (7) Yang G, Lu X, Yuan L. lncRNA: A link between RNA and cancer (J). *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2014, 1839(11): 1097-1109.
- (8) Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer (J). *Nature Medicine*, 2015, 21(11): 1253.
- (9) Bolouri H, Farrar JE, Triche T, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions (J). *Nature Medicine*, 2018, 24(1): 103-112.
- (10) Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository (J). *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 207-210.
- (11) Yu M, Ohira M, Li Y, et al. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma (J). *International Journal of Oncology*, 2009, 34(4): 931-938.
- (12) Scaruffi P. The Transcribed-Ultraconserved Regions: A Novel Class of Long Noncoding RNAs Involved in Cancer Susceptibility (J). *Scientificworldjournal*, 2014, 11(2): 340-352.
- (13) Pandey GK, Mitra S, Subhash S, et al. The Risk-Associated Long Noncoding RNA NBAT-1 Controls Neuroblastoma Progression by Regulating Cell Proliferation and Neuronal Differentiation (J). *Cancer cell*, 2014, 26(5): 722-737.
- (14) Liu PY, Erriquez D, Marshall GM, et al. Effects of a novel long noncoding RNA, lncUSMycN, on N-Myc expression and neuroblastoma progression (J). *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(7): dju113.
- (15) Atmadibrata B, Liu PY, Sokolowski N, et al. The novel long noncoding RNA linc00467 promotes cell survival but is down-regulated by N-Myc (J). *PLoS One*, 2014, 9(2): e88112.

〔文章编号〕 1007-0893(2023)10-0004-05

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.10.002

改良桃红四物汤对使用止血带后肢体缺血再灌注损伤保护作用的临床研究

撒忠秋 周 熙^{*} 白志林 徐达成 蔡旭东

(昆山市中西医结合医院, 江苏 昆山 215332)

〔摘要〕 目的: 探究改良桃红四物汤对使用止血带后肢体缺血再灌注损伤的保护作用。方法: 选取昆山市中西医结合医院 2020 年 7 月至 2021 年 12 月期间收治的四肢创伤性闭合性骨折患者 80 例为研究对象, 采用随机数字表法分为观察组和对照组, 各 40 例。对照组患者术后采用 20% 甘露醇注射液静脉滴注。观察组患者术后采用改良桃红四物汤口服治疗。比较观察两组患者治疗前后肿胀、疼痛、关节活动、末梢循环度等情况; 分析两组患者治疗前后血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、血栓素 B2 (TXB2)、前列环素 (PGI2) 水平变化, 全面评估临床疗效。结果: 治疗后两组患者的患肢肿胀程度、疼痛程度、关节活动度评分均有不同程度下降, 末梢循环评分均有不同程度上升, 且治疗后观察组患者的患肢肿胀程度、疼痛程度、关节活动度评分均低于对照组, 末梢循环评分高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗后两组患者的血清 TNF- α 、IL-6 水平均有不同程度降低, TXB2、PGI2 水平有不同程度升高, 且治疗后观察组患者的 TNF- α 、IL-6 水平均低于对照组, TXB2、PGI2 水平均高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。观察组患者治疗总有效率为 97.50%, 高于对照组的 82.50%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 改良桃红四物汤用于肢体缺血再灌注损伤患者的疗效优异, 可通过降低患者血清 TNF- α 、IL-6 水平及升高 TXB2、PGI2 水平以改善患者机体炎症反应和血液高凝状态, 从而有效缓解患者肢体肿胀、疼痛等临床症状并改善患者关节活动度及末梢循环状态。

〔关键词〕 缺血再灌注损伤; 肢体缺血; 改良桃红四物汤

〔中图分类号〕 R 658 〔文献标识码〕 B

〔收稿日期〕 2023-03-01

〔基金项目〕 昆山市级科技项目 (KSZ2117)

〔作者简介〕 撒忠秋, 男, 副主任医师, 主要研究方向是四肢创伤骨折、骨质疏松。

〔*通信作者〕 周熙 (E-mail: 940364526@qq.com)