

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.22.007
文章编号: 1005-8982 (2021) 22-0033-06

泌尿系统疾病专题·论著

前列腺纤维性增生的差异表达基因 筛选及富集研究*

万少平¹, 蔡季², 肖靛琨³

(1. 岳阳市人民医院 泌尿外科, 湖南 岳阳 414000; 2. 织金县人民医院 泌尿外科,
贵州 织金 552100; 3. 岳阳市人民医院 外科, 湖南 岳阳 414000)

摘要: 目的 筛选和初步鉴定良性前列腺纤维性增生的差异表达基因(DEGs), 发现新的良性前列腺纤维性增生的基因片段, 为临床监测和治疗前列腺纤维性增生提供潜在的基因位点和标志物依据。**方法** 收集前列腺等离子电切术后组织标本, 根据标本病理诊断结果, 将标本分成纤维组和结节组。标本冷冻保存, 分别提取前列腺结节性增生标本和纤维性增生标本的组织总RNA, 构建转录组文库, 通过二代高通量测序, 对两组mRNA进行定量及差异分析, 再做差异基因的GO、KEGG、网络互作分析。**结果** 两组标本总共发现差异表达基因1598个, 与结节组相比, 纤维组相对表达量上调基因1063个, 相对表达量下调基因535个。通过GO富集分析发现, DEGs主要富集在离子转运、细胞黏附、细胞外基质组等生物学过程中, 富集在近端启动子DNA结合转录激活剂、RNA聚合酶II、DNA结合转录激活剂、信号受体结合等活性分子功能上, 以及富集在细胞膜、细胞外区域、质膜等细胞部位。KEGG通路分析发现, DEGs主要富集在细胞外基质-受体作用、细胞因子与细胞因子受体作用等信号通路上。构建DEGs的PPI网络互作筛选出10个重要基因, 发现PPBP、OPRM1、GAL 3个基因在前列腺纤维性增生组织中上调。**结论** PPBP、OPRM1、GAL等DEGs参与前列腺纤维性增生的发生、发展, 可能是良性前列腺纤维性增生监测和治疗的潜在分子标志物。

关键词: 良性前列腺增生; 结节; 纤维; microRNA; 差异表达基因

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

Screening and identification of differentially expressed genes in benign prostatic fibrous hyperplasia and the enrichment analysis*

Shao-ping Wan¹, Ji Cai², Liang-kun Xiao³

(1. Department of Urology, Yueyang People's Hospital, Yueyang, Hunan 414000, China; 2. Department of Urology, Zhijin County People's Hospital, Zhijin, Guizhou 552100, China; 3. Yueyang People's Hospital, Yueyang, Hunan 414000, China)

Abstract: Objective To screen and preliminarily identify differentially expressed genes (DEGs) in benign prostatic fibrous hyperplasia, and to discover novel gene fragments involved in the occurrence of benign prostatic fibrous hyperplasia, thereby providing potential target gene loci and biomarkers for the diagnosis and treatment of benign prostatic fibrous hyperplasia. **Methods** Prostate tissues were collected from 14 patients after transurethral plasma kinetic prostatectomy. According to the pathological diagnosis, all the specimens were divided into fibrous group and nodular group. The specimens were cryopreserved, and the total RNA was extracted respectively to construct a transcriptome library. Through the second-generation high-throughput sequencing, the mRNA in the two groups was quantified and the DEGs between the groups were determined. Then Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and protein-protein interaction (PPI) analyses based on the DEGs

收稿日期: 2021-05-13

* 基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(No: 2017JJ2259)

were carried out. **Results** A total of 1598 DEGs were found between the two groups. As compared with the nodular group, there were 1,063 up-regulated genes and 535 down-regulated genes in the fibrous group. The GO functional enrichment analysis showed that DEGs were enriched in biological processes such as the ion transport, cellular adhesion, and extracellular matrix organization, molecular functions such as the proximal promoter DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding, DNA-binding transcription activator activity, and signaling receptor binding, and cellular components such as integral component of membrane, extracellular region, and plasma membrane. In addition, KEGG pathway analysis exhibited that DEGs were mainly enriched in extracellular matrix-receptor interaction and cytokine-cytokine receptor interaction. The construction of PPI network of DEGs identified 10 hub genes and found that *PPBP*, *OPRM1* and *GAL* were up-regulated in benign prostatic fibrous hyperplasia. **Conclusions** *PPBP*, *OPRM1*, *GAL* and other DEGs are involved in the occurrence and development of benign prostatic fibrous hyperplasia, and can be established as potential biomarkers for treating benign prostatic fibrotic hyperplasia and monitoring the disease activity.

Keywords: benign prostatic hyperplasia; nodular; fibrous; mRNA; differentially expressed genes

良性前列腺增生是引起中老年男性排尿障碍最常见的良性疾病之一^[1], 随着年龄增长, 少数患者会出现尿潴留^[1-3]。临床经尿道前列腺电切治疗男性下尿路症状和尿潴留时, 发现大多数患者良性前列腺增生是尿道周围腺体的扩大增生, 导致排尿困难; 显微镜下观察电切前列腺组织, 前列腺增生多呈结节性改变, 以不同比例间质和腺上皮构成; 少数排尿困难的患者, 前列腺扩大增生不明显, 术中发现前列腺稍增大, 甚至变小, 呈纤维性收缩, 电切组织显微镜下观察组织间质以胶原纤维增生为主, 仅见少量增生腺体^[4-8]。本研究通过差异基因(differentially expressed genes, DEGs)比较的方法, 认识纤维性增生的致病基因, 不仅可以深入认识其病理发生的分子本质, 为良性前列腺纤维性增生提供基因诊断方法, 而且可以指导该类型前列腺增生的治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 2 月—2019 年 12 月岳阳市人民医院和织金县人民医院收治的前列腺增生患者 14 例, 年龄 60 ~ 91 岁。所有患者出现尿潴留, 前列腺特异性抗原 < 4 ng/L。入院后行前列腺等离子电切手术治疗, 病理诊断为良性前列腺增生, 其中纤维性增生 7 例(纤维组), 结节性增生 7 例(结节组)。

所有标本在手术切除后, 用生理盐水冲洗 3 次, 去除血迹, 30 min 内放入液氮速冻, 置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。

1.2 主要试剂及仪器

Trizol RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司),

Agilent 2100 bioanalyzer(美国 Agilent Technologies 公司), 六碱基随机引物(深圳华大基因公司), QiaQuick PCR 试剂盒(美国 Qiagen 公司), qPCR TaqMan Probe(美国 Yeasen 公司)。NanoDrop 分光光度计和 Qubit 荧光计(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 提取总 RNA 标本送深圳华大基因公司, 按照 Trizol RNA 提取试剂盒说明书进行操作, 提取结节性前列腺增生组织及纤维性前列腺增生组织 RNA。采用 Nanodrop 检测 RNA 的纯度(260 ~ 280 nm 光波处的 OD 值), 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 程度以及是否被污染, Qubit 定量检验 RNA 浓度; Agilent 2100 检测 RNA 的完整性。

1.3.2 文库制备 检测总 RNA 样本合格后, 采用 Oligo(dT)磁珠富集 mRNA, 将 mRNA 打断成短片段模板, 用六碱基随机引物合成 cDNA 链。cDNA 链经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化, 洗脱, 末端修复, 连接测序接头, 琼脂糖凝胶电泳, PCR 扩增富集 cDNA, 完成文库制备。

1.3.3 测序 文库构建完成后, Qubit 2.0 初步定量, Agilent 2100 检测文库的 Insert size, qPCR TaqMan Probe 准确定量文库的有效浓度(> 2 nm)。合格后, 通过 MGISEQ-2000 测序平台进行 PE150 测序。

1.4 统计学方法

测序数据采用 SOAPnuke (v1.5.2) 过滤, 过滤后的数据采用 Bowtie2 (v2.2.5) 进行比对, 基因相对表达量用 RSEM (v1.2.12) 计算, 用 DESeq2 (v1.4.5) 进行差异基因分析, 将校正后的 $P < 0.05$, 且差异倍数 ≥ 2 作为筛选标准。将差异表达基因进行 GO 富集分析, 用 DAVID 工具分析 KEGG 信号通路富集情况。

2 结果

2.1 差异基因相对表达量分析

对比两组后发现差异表达基因 1 598 个; 相较于结节组, 纤维组有 1 063 个基因相对表达量上调, 535 个基因相对表达量下调。见图 1。

2.2 差异基因的 GO 富集分析

GO 富集分析将 DEGs 分为 3 类: 生物学过程、分子功能、细胞组分。在生物学过程中, DGEs 主要富集在离子转运、细胞黏附、细胞外基质等生物学过程中(见图 2)。在分子功能中, DGEs 主要富集在近端启动子 DNA 结合转录激活剂、RNA 聚合酶 II、DNA 结合转录激活剂、信号受体结合等活性分子功能上(见图 3)。在细胞组分中, DGEs 主要富集在细胞膜、细胞外区域、质膜等细胞部

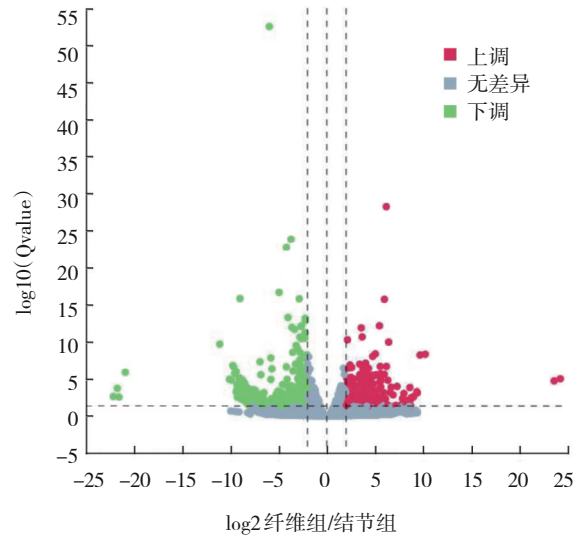


图 1 差异基因相对表达量的火山图

位(见图 4)。

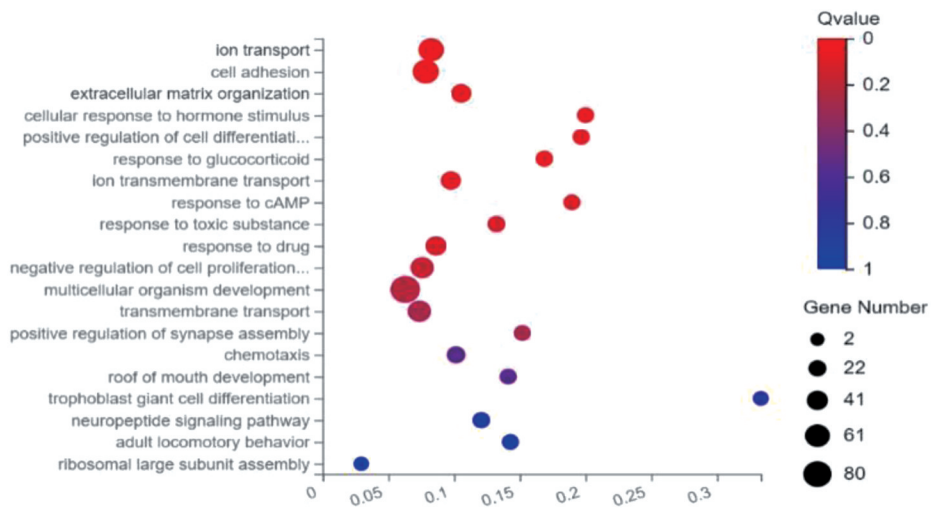


图 2 GO 富集分析中生物过程组气泡图

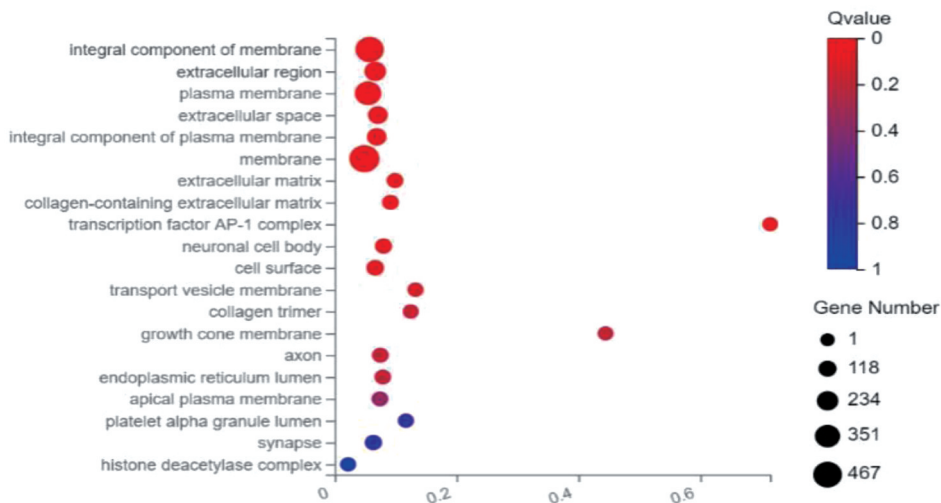


图 3 GO 富集分析中细胞组分组气泡图

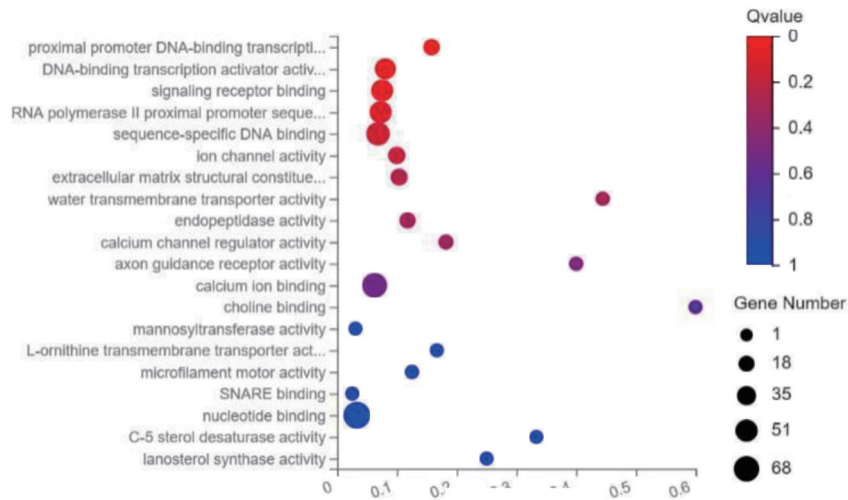


图 4 GO 富集分析中分子功能组气泡图

2.3 差异基因的KEGG通路分析

通过 DAVID 工具对 DEGs 进行 KEGG 信号通路

分析后发现，DEGs 主要富集在细胞外基质—受体、细胞因子与细胞因子受体等信号通路上（见图 5）。

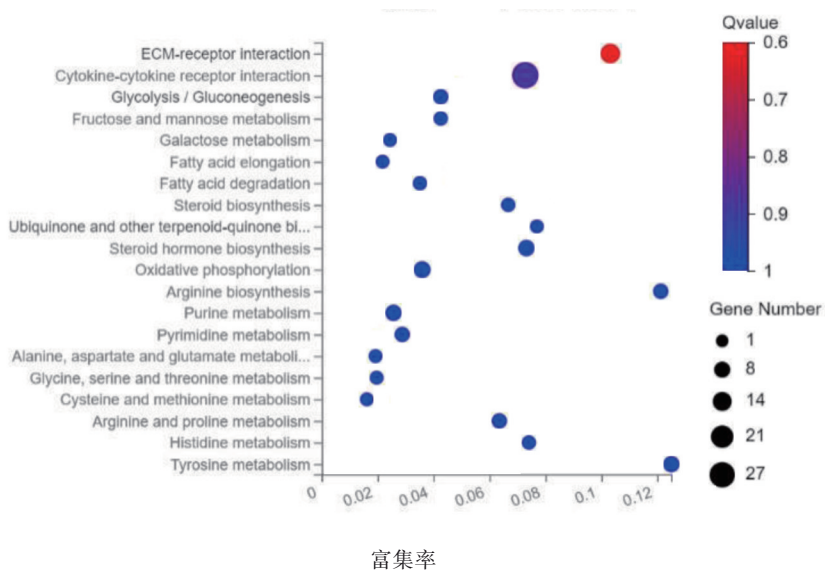


图 5 KEGG 富集分析气泡图

2.4 差异基因 PPI 互作网络分析

将两组样本 DEGs 所编码的蛋白质利用 String 数据库进行 PPI 网络互作，预测 DEGs 间相互作用，选取 PPI 网络中连通度排序前 10 位为核心基因并排序。结果为 *FOS*、*GNG13*、*CXCR4*、*CCL2*、*OPRM1*、*PPBP*、*GAL*、*OPRK1*、*JUN*、*EGR1*。对纤维性增生组而言，*PPBP*、*OPRM1*、*GAL* 为上调，其余基因均为下调。这些关键基因的关系见图 6。

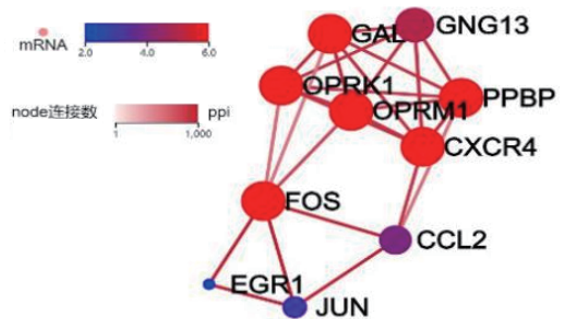


图 6 前列腺纤维性与结节性增生关键差异基因的联系

3 讨论

临床良性前列腺结节性增生非常常见, 良性前列腺纤维性增生相对较少, 本研究从两类患者的基因水平发现其不同, 为其发生、发展的作用机制及治疗提供新思路。本研究共发现 1 598 个差异表达基因, 与结节性增生组织相比, 纤维性增生组织中相对表达量上调基因 1 063 个, 相对表达量下调基因 535 个。对这些基因进行 GO 富集分析后发现, DGEs 主要富集在离子转运、细胞黏附、细胞外基质组生物学过程, 和富集在近端启动子 DNA 结合转录激活剂、RNA 聚合酶 II, 信号受体结合等活性分子功能中。KEGG 富集通路分析发现, DEGs 主要富集在细胞外基质—受体相互作用、细胞因子与细胞因子受体相互作用等信号通路上。细胞外基质是由动物细胞合成, 并分泌到胞外, 分布在细胞表面和细胞之间, 是多糖、蛋白质或蛋白聚糖等物质。这些物质不属于任何细胞, 但可为细胞生存提供重要的结构支架和组织连接, 并通过信号转导系统影响细胞的形态、增殖、分化、迁移、代谢和功能等^[9]。

从 PPI 互作网络分析可以发现, 与纤维性前列腺增生相关的最主要 3 个基因为 *PPBP*、*OPRM1*、*GAL*。*PPBP* 基因编码的蛋白质是血小板衍生的生长因子, 属于趋化因子家族, 是中性粒细胞的有效化学吸引剂和活化剂, 该蛋白具有杀菌和抗真菌作用, 是抗微生物的蛋白质^[10-11]。*GAL* 编码的蛋白质在泌尿生殖道广泛表达神经内分泌肽——甘丙肽及其相关肽, 其已被证明具有抗真菌活性, 并被认为是先天免疫系统的一部分^[12-13]。本研究筛选出的 *PPBP* 和 *GAL* 基因, 均可以表达抗菌活性物质, 提示前列腺纤维性增生的发生、发展可能与微生物感染有关, 至于微生物是细菌或真菌, 还未明确。

OPRM1 基因位于人类第 6 号染色体 6q24 ~ q25 位置上, 长度 96.31 kB, 包括转录调控区、3 个内含子和 4 个外显子。*OPRM1* 通过神经活性配体-受体相关作用, 调节雌激素信号通路来调节前列腺的增生^[14-16], *OPRM1* 和上述 *GAL* 基因对细胞的增殖为负调控, 需要证实的是该负调控可能在前列腺纤维增生过程中的作用机制。

本研究筛选出了 3 个与纤维性增生相关的核心差异表达基因, 以及若干相关的富集生物位点和生物通路, 为临床监测和治疗前列腺纤维性增生提供潜在的生物标志物及靶点。但是本研究病例数不够, 可能存在一些偏倚, 此外需要进一步完善分子生物学实验来确认这些基因的具体功能。

参考文献:

- [1] ROWHRBORM C G, MCCONNELL J D. Etiology, pathophysiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. In: Campbell's Urology[M]. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 2002: 1297-1330.
- [2] 万少平, 胡礼泉, 刘源, 等. 武汉市 2 811 例男性下尿路症状问卷调查[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(9): 585-587.
- [3] BERRY M J, COFFEY D S, WALSH P C, et al. The development of human benign prostatic hyperplasia with age[J]. J Urol, 1984, 132(3): 474-479.
- [4] 吴阶平. 良性前列腺增生概论. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 1127-1139.
- [5] 张祥华, 张骞, 李学松, 等. 良性前列腺增生合并组织学前列腺炎的检出率--两种不同诊断标准的比较研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2007, 1(7): 29-31.
- [6] NICKEL J C, ROEHRBORN C G, O'LEARY M P, et al. The relationship between prostate inflammation and lower urinary tract symptoms: 12 examination of baseline data from the REDUCE trial[J]. Eur Urol, 2008, 54(6): 1379-1384.
- [7] SONG L M, ZHU Y C, HAN P, et al. A retrospective study: correlation of histologic inflammation in biopsy specimens of Chinese men undergoing surgery for benign prostatic hyperplasia with serum prostate-specific antigen[J]. Urology, 2011, 77(3), 688-692.
- [8] ZLOTTA A R, EGAWA S, PUSHKAR D, et al. Prevalence of inflammation and benign prostatic hyperplasia on autopsy in Asian and Caucasian men[J]. Eur Urol, 2014, 66(4): 620-622.
- [9] NITA M, STRZALKA-MROZIK B, GRZYBOWSKI A, et al. Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix [J]. Med Sci Monit, 2014, 20(6): 1003-1016.
- [10] QIAN D, LI E C, LIU Y G, et al. CTAPIII/CXCL7: a novel biomarker for early diagnosis of lung cancer[J]. Cancer Med, 2018, 7(2): 325-335.
- [11] KUBOTA Y, ALONSO A, FOLSOM A R. β -thromboglobulin and incident cardiovascular disease risk: the atherosclerosis risk in communities study[J]. Thromb Res, 2017, 155: 116-120.
- [12] KESZLER G, MOLNÁR Z, RÓNAI Z, et al. Association between anxiety and non-coding genetic variants of the galanin neuropeptide[J]. PLoS One, 2019, 14(12): DOI: 10.1371/journal.pone.0226228.

- [13] TYRRELL C, TOYOOKA A, KHAN F, et al. The neuropeptide galanin promotes an anti-thrombotic phenotype on endocardial endothelial cells from heart failure patients[J]. *Auton Neurosci*, 2017, 206: 35-42.
- [14] LIAO S Y, TAN K, FLOYD C, et al. Probing biased activation of mu-opioid receptor by the biased agonist PZM21 using all atom molecular dynamics simulation[J]. *Life Sci*, 2021, 269: DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119026.
- [15] HU X M, LIU B J, WU P, et al. LncRNA Oprm1 overexpression attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by increasing endogenous hydrogen sulfide via Oprm1/miR-30b-5p/CSE axis[J]. *Life Sci*, 2020, 254: DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117699.
- [16] KONJEVOD M, PERKOVIC M N, STRAC D S, et al.

Significant association of mu-opioid receptor 1 haplotype with tobacco smoking in healthy control subjects but not in patients with schizophrenia and alcohol dependence[J]. *Psychiatry Res*, 2020, 291: DOI: 10.1016/j.psychres.2020.113278.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 万少平, 蔡季, 肖靓琨. 前列腺纤维性增生的差异表达基因筛选及富集研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(22): 33-38.

Cite this article as: WAN S P, CAI J, XIAO L K. Screening and identification of differentially expressed genes in benign prostatic fibrous hyperplasia and the enrichment analysis[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(22): 33-38.