

本文引文格式:王荣,廖碧云,石凤,等.整合分析 KPNA2 基因在肺腺癌中表达及临床意义[J].右江民族医学院学报,2020,42(5):563-567,596.

【论著与临床报道】

整合分析 KPNA2 基因在肺腺癌中表达及临床意义

王荣,廖碧云,石凤,庞晓霞,刘中林,王俊利

(右江民族医学院医学检验学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 利用生物信息学的方法探讨 KPNA2 基因在肺腺癌中的表达和临床意义。方法 我们综合运用 Oncomine 和 TCGA 等数据库中储存的关于 KPNA2 数据,进行二次荟萃分析和临床信息关系进行分析。结果 荟萃分析发现 KPNA2 的 mRNA 在肺腺癌组织中表达高于正常组织 ($P < 0.001$)。数据库的综合分析发现 KPNA2 在肺腺癌组织高于正常组织 ($P < 0.001$)。免疫组化显示 KPNA2 在肺腺癌中表达较高 ($P < 0.05$)。在不同肿瘤分期和性别间, KPNA2 表达存在差异 ($P < 0.001$)。高表达 KPNA2 的患者预后较差。KPNA2 表达与 $CD8^+$ T 细胞、 $CD4^+$ T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的浸润有关。结论 对公共数据库中纳入的肿瘤数据分析,提示 KPNA2 的 mRNA 和蛋白在肺腺癌组织中高于正常组织,与患者性别、肺腺癌分期、预后和免疫细胞浸润有关,且涉及复杂生物学通路,有望成为肺腺癌防治的靶点。

关键词: KPNA2 基因;生物信息学;肺腺癌

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2020)05-0563-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.05.006

Integrated analysis of the expression and clinical significance of gene KPNA2 in lung adenocarcinoma

Wang Rong, Liao Biyun, Shi Feng, Pang Xiaoxia, Liu Zhonglin, Wang Junli

(School of Laboratory Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression and clinical significance of gene KPNA2 in lung adenocarcinoma by bioinformatics. **Methods** The data on KPNA2 stored in Oncomine and TCGA databases were used comprehensively for secondary Meta-analysis and clinical information correlation analysis. **Results** Meta-analysis showed that the mRNA expression of KPNA2 in lung adenocarcinoma tissues was higher than that in normal tissues ($P < 0.001$). Comprehensive analysis of the database showed that KPNA2 expression was higher in lung adenocarcinoma tissues than normal tissues ($P < 0.001$). Immunohistochemistry revealed that KPNA2 was highly expressed in lung adenocarcinoma ($P < 0.05$). The expressions of KPNA2 were different between different tumor stages and genders ($P < 0.001$). Patients with high expression of KPNA2 had a poor prognosis. The expression of KPNA2 was associated with the infiltration of $CD8^+$ T cells, $CD4^+$ T cells, B cells, macrophages and neutrophils. **Conclusion** The analysis of the tumor data included in public database suggested that the mRNA and protein expressions of KPNA2 are higher in lung adenocarcinoma tissues than those in normal tissues. They are related to patients' gender, stage of lung adenocarcinoma, prognosis and immune cell infiltration and involves complex biological pathways as well. Therefore, the expression of KPNA2 is expected to be a target for prevention and treatment of lung adenocarcinoma.

Key words: gene KPNA2; bioinformatics; lung adenocarcinoma

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560461)

第一作者简介: 王荣(1991-),男,硕士,检验技师,研究方向:肿瘤学和免疫学, E-mail: rongwang50@163.com

通讯作者简介: 王俊利(1979-),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤学, E-mail: baisedwangjunli@163.com

至今,肺癌仍然是一种发病率和死亡率极高的恶性肿瘤,严重危及人类的健康。非小细胞肺癌构成了肺癌患者中的主要类型,而非小细胞肺癌患者中大部分是肺腺癌,其成为研究的主要对象。肺腺癌的发生发展涉及诸多基因和复杂的信号通路,揭示该过程是当前基础研究的热点。由于大多患者诊断时已到晚期,肺腺癌的 5 年生存低于 15%,寻找肺腺癌新标志物对肺腺癌防治有重要意义^[1-2]。KPNA2 蛋白作为一种核转运蛋白,含有 N 端、C 端和重复的 ARM 序列,它结合核蛋白,进入细胞核发挥蛋白质转运作用^[3]。近年,越来越多报道表明 KPNA2 在肿瘤中扮演重要角色,和肿瘤的进展、预后等密切相关^[4]。本研究将运用生物信息学方法和软件分析 Oncomine 数据库等的数据库,阐明 KPNA2 在肺腺癌中表达情况和临床意义。

1 资料与方法

1.1 从平台获取数据 Oncomine 作为全球大型的癌基因芯片数据库及整合数据平台,为挖掘肿瘤数据信息提供了重要资料^[5]。进入数据库,根据研究目的在数据库设置数据获取条件。UALCAN 平台包含大量的癌症数据信息,是基于 TCGA 数据库进行癌症数据挖掘^[6]。我们分析 KPNA2 在肺腺癌中表达,研究其与肿瘤分期及不同性别的联系,此外,采用 Kaplan-Meier Plotter 分析 KPNA2 表达水平与肺腺癌患者的预后关系。人蛋白质数据库(Human Protein Atlas, HPA)含有 26000 种人类蛋白质在组织和细胞分布,也有多种肿瘤组织中免疫组化情况^[7]。因此,我们采用数据分析 KPNA2 基因在正常组织和肺腺癌组织中的免疫组化及在 A549 细胞中表达情况。cBioPortal 获取大规模癌症的基因组学的分子谱和临床预后相关性,能够将这些丰富的数据集作为生物学解释和临床应用。TIMER 数据库是目前使用较多研究基因和肿瘤免疫细胞浸润之间的关系的数据库,TIMER 提供多种免疫细胞,比如 B 细胞,CD4⁺ T 细胞,CD8⁺ T 细胞等的浸润情况。因此,我们使用上述数据库进行 KPNA2 多层次的生物信息学整合分析。

1.2 统计学方法 运用 SPSS 23.0 软件作 t 检验对比正常组织和肺腺癌组织之间 KPNA2 表达差异。Kaplan-Meier 统计 KPNA2 表达与肺腺癌预后之间的关系。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KPNA2 在不同类型肿瘤中表达 Oncomine 分析总共获得 445 项 KPNA2 在肿瘤研究结果,包括 79 项有显著差异结果,表达增高 74 项,低表达 5 项。在 10 项肺腺癌研究结果中,KPNA2 均呈现高表达。TIMER 数据库分析也发现 KPNA2 在许多肿瘤包括

肺腺癌中高表达,见图 1。

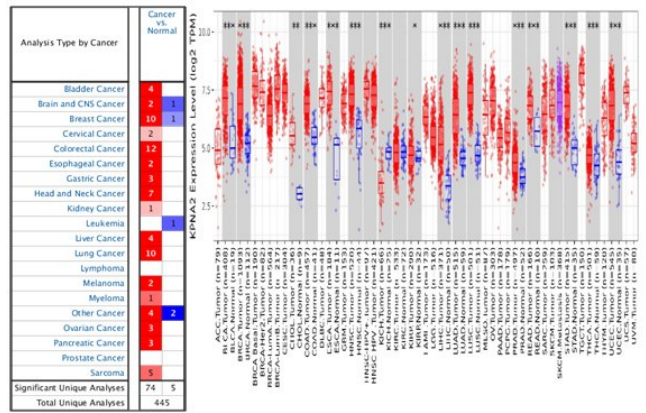


图 1 KPNA2 在 Oncomine 数据库中不同肿瘤的表达

2.2 KPNA2 在肺腺癌中表达 我们再次在 UALCAN 平台分析,发现 KPNA2 在肺腺癌中的表达水平也显著高于正常组织 ($P < 0.001$),见图 2。免疫组化分析发现 KPNA2 蛋白在多个样本中呈阳性,见图 3A。肺腺癌组织中的表达水平高于正常组织,见图 3B、图 3C。该蛋白主要定位于胞核和胞浆,见图 3D。在 A549 细胞中免疫荧光实验显示,KPNA2 在胞浆和胞核中,见图 4。Oncomine 数据库一共有 9 项研究关于 KPNA2 在肺腺癌和正常组织的 mRNA 表达。经数据库中的 Meta 分析作二次分析,和对照组相比,KPNA2 在肺腺癌中表达升高 ($P < 0.001$),见图 5。

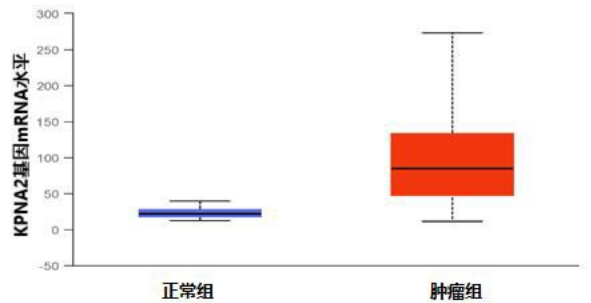
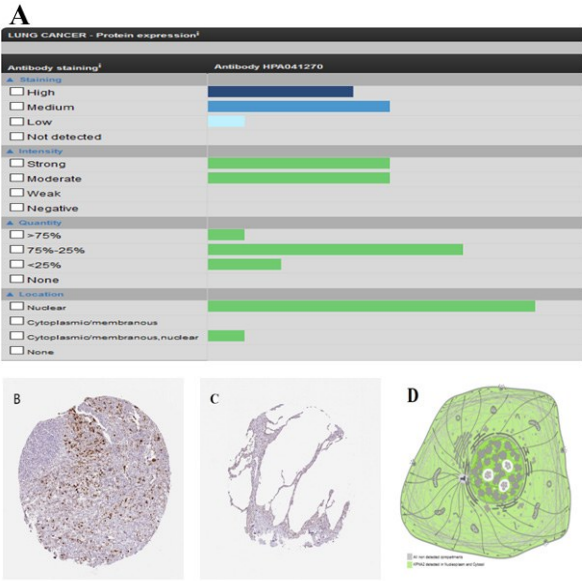


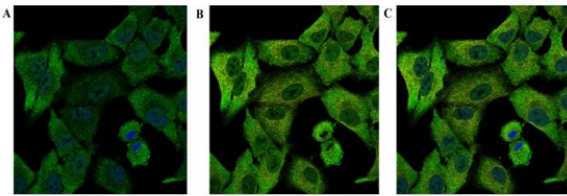
图 2 UALCAN 数据库中 KPNA2 基因 mRNA 在肺腺癌的表达

2.3 KPNA2 基因表达与临床特征间关系 通过 UALCAN 平台分析 KPNA2 表达在 TCGA 数据库中患者的临床病理特征的关系。结果发现,KPNA2 表达与肿瘤分期有密切关系。各个分期和正常组织间的表达均存在显著差异 ($P < 0.001$),见图 6A。不同性别的肺腺癌中 KPNA2 基因表达水平存在显著差异 ($P < 0.001$),见图 6B。



注:A:免疫组化结果;B:肺腺癌组织;C:正常组织;D:细胞定位。

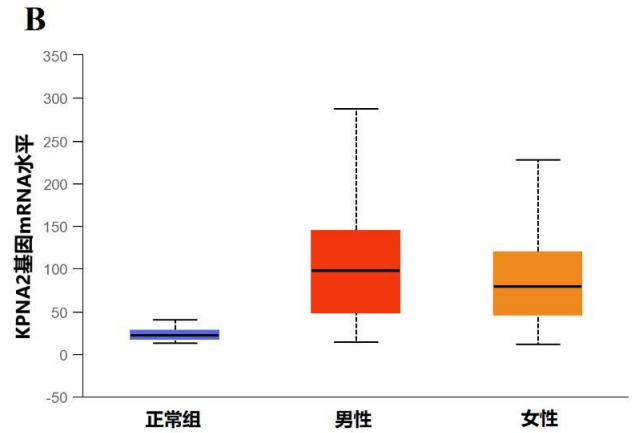
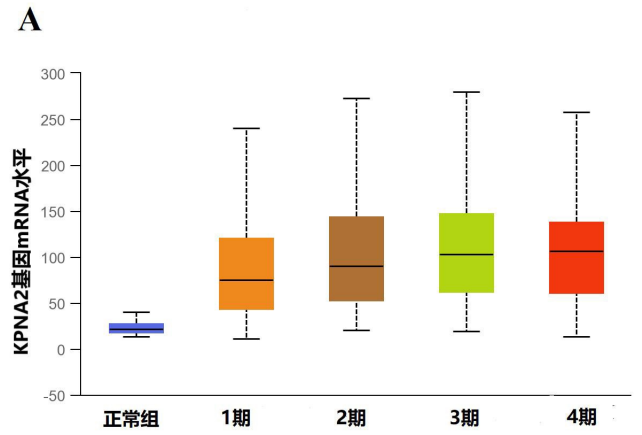
图 3 KPNA2 蛋白在 HPA 数据库中表达分析



A:KPNA2 用绿色荧光标记,细胞核用蓝色荧光标记;B:ER 染色为黄色,细胞核染色为蓝色;C:(A)与(B)合并图像。

图 4 KPNA2 蛋白在 A549 细胞中免疫荧光染色

预后存在高度相关性。KPNA2 基因高表达水平的患者生存时间较短,低表达患者的预后较好 ($P < 0.001$),见图 7。



注:A:KPNA2 基因表达和肺腺癌的肿瘤分期;B:KPNA2 基因表达和不同性别之间关系。

图 6 KPNA2 基因表达和肺腺癌的肿瘤分期及不同性别之间关系

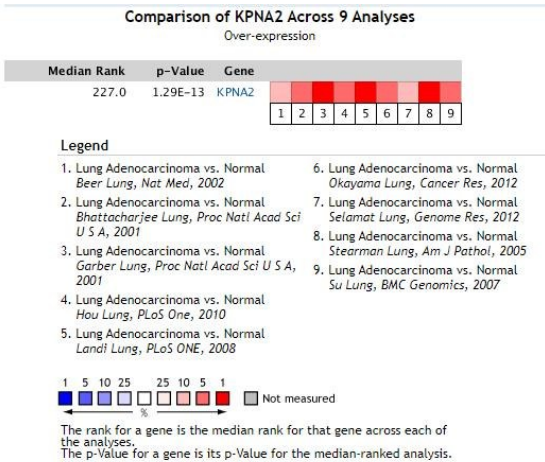


图 5 KPNA2 基因在 Oncomine 数据库的 Meta 分析中表达

2.4 KPNA2 与肺腺癌预后间的关系 在数据库之中进行分析,发现 KPNA2 在肺腺癌中表达增高。我们获取 TCGA 数据中相关的临床信息,继而确定该基因和肺腺癌患者预后之间的关系。在 Kaplan-Meier Plotter 分析后,我们发现 KPNA2 基因表达和肺腺癌

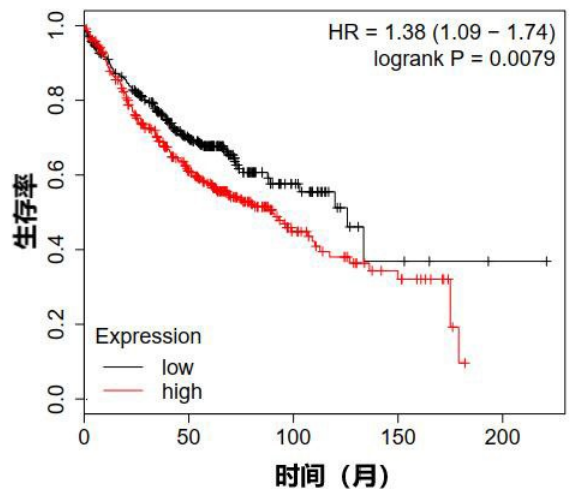


图 7 KPNA2 基因表达和肺腺癌患者预后的关系

2.5 KPNA2 共表达基因分析 为进一步阐释 KPNA2 的作用方式,我们采用 cBioPortal 数据库进行 KPNA2 基因的共表达基因分析。在相关系数 > 0.8 和 $P < 0.01$ 的条件下,获得 78 个与其有显著相关性的基因,再采用 DAVID 进行功能富集分析,结果发现 GO 分析的 BP 模块包含有丝分裂姐妹染色单体分离、

微管运动、染色体分离、有丝分裂胞质分裂和纺锤体组装。CC 模块富集到细胞质、核浆、细胞核、胞膜和中心体。KEGG 分析发现,它们和细胞周期、卵母细胞减数分裂、黄体酮介导的卵母细胞成熟、P53 信号通路和 FOXO 信号通路。见表 1。

表 1 KPNA2 共表达基因的 GO 分析和 KEGG 分析

GO 编号	功能	本体	数目	P
GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	BP	8	2.77E-12
GO:0007018	microtubule-based movement	BP	8	3.56E-08
GO:0007059	chromosome segregation	BP	7	1.13E-07
GO:0000281	mitotic cytokinesis	BP	6	7.20E-08
GO:0090307	mitotic spindle assembly	BP	6	1.85E-07
GO:0005737	cytoplasm	CC	30	6.05E-06
GO:0005654	nucleoplasm	CC	24	2.42E-08
GO:0005634	nucleus	CC	22	0.005033841
GO:0016020	membrane	CC	13	8.69E-04
GO:0005813	centrosome	CC	11	2.65E-06
cfa04110	Cell cycle	KP	16	4.85E-20
cfa04114	Oocyte meiosis	KP	10	1.81E-10
cfa04914	Progesterone-mediated oocyte maturation	KP	8	3.07E-08
cfa04115	p53 signaling pathway	KP	5	1.16E-04
cfa04068	FOXO signaling pathway	KP	4	0.014871272

注:BP,biological process; CC,cellular component; GO,gene ontology; KP,KEGG pathway; MF,molecular function.

2.6 KPNA2 和免疫细胞浸润关系 我们利用 TIMER 数据库对 KPNA2 与免疫细胞浸润关系进行了相关性探索。KPNA2 的表达与 CD8⁺T 细胞、巨噬细胞

和中性粒细胞的浸润呈正相关 ($P < 0.001$)。KPNA2 的表达与 CD4⁺T 细胞、B 细胞的浸润呈负相关 ($P < 0.001$),见图 8。

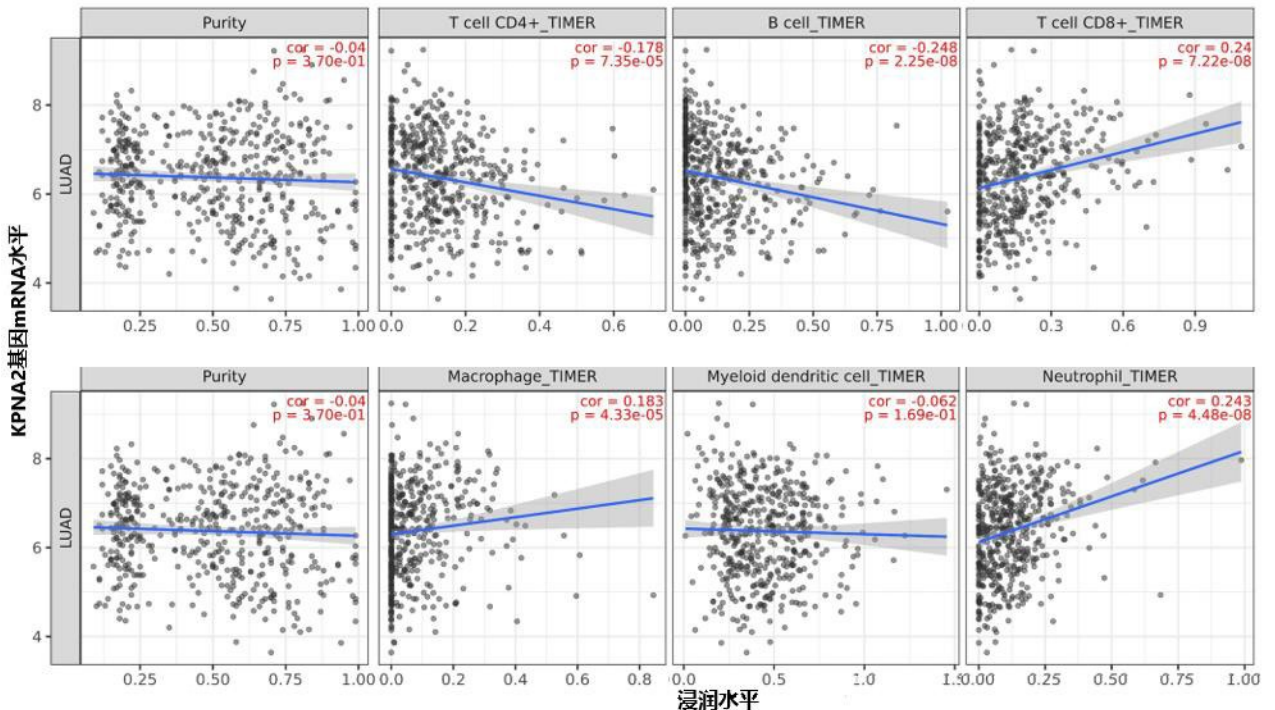


图 8 KPNA2 基因表达和免疫细胞浸润的关系

3 讨论

核转运蛋白由输入蛋白家族和输出蛋白家族两大类组成,有着蛋白质转运的作用。其中,最具特征是输入蛋白家族,包括 Karyopherin α 和 Karyopherin β 两个家族。Karyopherin α 家族含有 7 个成员, Karyopherin $\alpha 1$ (KPNA2) 是其中之一。KPNA2 基因定位在染色体 17q23-q24, KPNA2 编码有 529 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 58 kDa。该基因有 3 个结构单元组成, N 端和 importin β 结合, 核定位信号结合点和入核蛋白结合, C 端的功能尚不明确。KPNA2 基因参与细胞的复杂的信号通路, 有着广泛的生物学功能。

目前, 已经有针对 KPNA2 在部分肿瘤的报道。学者发现下调 KPNA2 基因可以减弱结肠癌细胞的增殖能力和克隆形成、迁移形成和裸鼠的成瘤能力, 且结肠癌组织中 mRNA 水平和蛋白水平均高于正常组织^[8]。在膀胱癌 5637 细胞株中, siRNA 干扰技术下调的 KPNA2 可抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭^[9]。此外, 食管鳞癌中检测发现, KPNA2 在癌组织的表达高于癌旁食管组织。而且高表达与肿瘤的分期、病理分级呈正相关, 可作为判断肿瘤恶性程度和潜在转移能力的标志物^[10]。在肿瘤代谢方面, 有研究指出 KPNA2 通过双重作用于 c-myc, 从而参与调控胶质瘤细胞的糖酵解代谢重编程过程^[11]。李倩等^[12]通过分子生物学和细胞实验发现 KPNA2 通过 Erk 信号通路与其下游因子参与卵巢癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和顺铂敏感性等生物学行为的调控。李杰等^[13]学者检测到 KPNA2 在胶质瘤中表达水平增高, 与肿瘤分级呈正相关的关系, 而与肿瘤预后呈负相关。敲出 KPNA2 基因, 肿瘤细胞的增殖能力、迁移能力和侵袭能力减弱。谢明等^[14]的研究表明 KPNA2 在结直肠癌组织中表达显著升高, 对结直肠癌的预后判断有重要价值。分析 KPNA2 基因在恶性黑色素瘤和正常组织中表达, 结果显示 mRNA 水平在正常皮损组织中低于恶性黑色素瘤组织。生存分析揭示 mRNA 表达水平高的肿瘤患者预后比较差^[15]。在舌鳞癌细胞 CAL-27 中转入 siRNA, 干扰后的 KPNA2 降低 CAL-27 细胞迁移侵袭能力^[16]。转染 KPNA2 的过表达质粒, 随后利用 qPCR 和 Western blot 检测到基因在骨肉瘤细胞 143B 细胞内表达水平显著上调。CCK-8 实验、平板克隆形成实验展现出 KPNA2 上调促进了细胞增殖, 过表达 KPNA2 加快细胞周期进程^[17]。KPNA2 在自噬过程中发挥作用依赖 p53, 通过调控 p53 的易位促进口腔鳞状细胞癌细胞的化疗耐药和转移^[18]。这些研究几乎都指出 KPNA2 作为促癌基因参与肿瘤的增殖、迁移

和侵袭等过程。

EGF 和缺氧通过同时抑制 IRF1 表达和提高肺腺癌细胞的 E2F1 表达来促进 KPNA2 的表达^[19]。这涉及该基因在细胞层次的机制研究。本研究从生物信息学方向探讨了 KPNA2 在肺腺癌中的表达及其和临床病理、预后的关系。通过 Oncomine 和 TCGA 数据库等中的资料分析, 发现 KPNA2 在肺腺癌中表达升高, 和肺腺癌的预后密切相关。KPNA2 涉及 P53 和 FOXO 信号通路, 还和部分免疫细胞浸润有关。结果表明 KPNA2 可以在肺腺癌中发挥促癌作用。本研究采用了权威的数据库进行分析, 增加了结论的可信度。因此, 这对后续开展基础实验有重要的意义, 也为防治肺腺癌的确切新靶点提供了依据。

参考文献:

- [1] Calvayrac O, Pradines A, Pons E, et al. Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma[J]. Eur Respir J, 2017, 49(4):1601734.
- [2] 武二伟, 司志刚, 王琰, 等. 局部晚期非小细胞肺癌同步放化疗与序贯放化疗疗效分析[J]. 右江民族医学院学报, 2019, 41(4):404-406, 417.
- [3] Han Y, Wang X. The emerging roles of KPNA2 in cancer[J]. Life Sci, 2020, 241:117140.
- [4] Zhou LN, Tan Y, Li P, et al. Prognostic value of increased KPNA2 expression in some solid tumors: A systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(1):303-314.
- [5] Rhodes DR, Yu J, Shanker K, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform[J]. Neoplasia, 2004, 6(1):1-6.
- [6] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses[J]. Neoplasia, 2017, 19(8):649-658.
- [7] Pontén F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas-a tool for pathology[J]. J Pathol, 2008, 216(4):387-393.
- [8] Zhang Y, Zhang M, Yu F, et al. Karyopherin alpha 2 is a novel prognostic marker and a potential therapeutic target for colon cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34:145.
- [9] 史本涛, 苏博兴, 方冬, 等. RNAi 沉默 KPNA2 对人膀胱癌细胞系 5637 转移潜能的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(11):832-835, 845.
- [10] 蔡礼涛. KPNA2 在食管鳞癌中的表达及临床意义研究[D]. 泸州: 泸州医学院, 2011.

- mctive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male; a committee opinion[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(3): e18-e25.
- [10] Coughlan C, Clarke H, Cutting R, et al. Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(4): 681-685.
- [11] 男性生殖遗传学检查专家共识编写组, 商学军, 陈亮, 等. 男性生殖遗传学检查专家共识[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(12): 1138-1142.
- [12] 陆金春. 精子 DNA 损伤的相关因素研究进展[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(8): 675-680.
- [13] Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, et al. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation; Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress[J]. *Mol Med*, 2015, 21(1): 109-122.
- [14] 姜辉, 邓春华, 商学军, 等. 维生素 E 在男性不育中临床应用专家共识(2014 版)[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(3): 277-279.
- [15] 林爱琴, 卜文婕, 窦德宇, 等. 五没食子酰基葡萄糖对 H_2O_2 诱导的肾小球系膜细胞氧化损伤及凋亡的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(6): 601-604, 609.
- [16] 郭静秋, 徐望明. ROS 与精子质量的关系综述[J]. *中国性科学*, 2017, 26(12): 88-90.
- [17] 刘建国, 赵红乐, 金保方. 氧化应激与男性不育研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(9): 2104-2106.
- [18] Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(4): 829-843.
- [19] 柯鑫文, 武政华, 冯少勇, 等. 茶多酚对精索静脉曲张大鼠睾丸组织氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2015, 20(7): 505-508.
- [20] 王飞, 赵子高, 张珂, 等. 蚕茸柱天胶囊治疗少、弱精子症的临床观察[J]. *云南医药*, 2019, 40(3): 206-209.
- [21] 陈向锋, 李铮, 平萍, 等. 天然维生素 E 辅助治疗特发性少弱精子症多中心前瞻性随机对照研究(附 106 例报告)[J]. *中华男科学杂志*, 2012, 18(5): 428-431.
- [22] Omu AE, Al-Azemi MK, Kehinde EO, et al. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy[J]. *Med Princ Pract*, 2008, 17(2): 108-116.
- [23] Ross C, Morriss A, Khairy M, et al. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility[J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(6): 711-723.
- [24] 章振保, 杨庆涛. 淫羊藿甙抗大鼠雄激素部分缺乏的实验研究[J]. *中国男科学杂志*, 2006, 20(3): 47-50.

收稿日期: 2020-05-15; 修回日期: 2020-06-04

(上接第 567 页)

- [11] Li J, Liu Q, Liu Z, et al. KPNA2 promotes metabolic reprogramming in glioblastomas by regulation of c-myc[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 194.
- [12] 李倩, 高洁凡, 齐冰丽. 沉默结肠癌转移相关基因 KPNA2 对卵巢癌细胞增殖、凋亡、侵袭和顺铂敏感性的影响及其机制[J]. *山东医药*, 2018, 58(35): 54-57.
- [13] 李杰, 何东, 张睿, 等. 核转运蛋白 $\alpha 2$ 在胶质瘤中的表达及其生物学行为的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2018, 56(12): 47-54, 78.
- [14] 谢明, 钟海林, 雷光炜, 等. KPNA2 在结直肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *诊断病理学杂志*, 2019, 26(1): 34-37.
- [15] 宋毓平, 张庆华, 李瑞, 等. 核转运蛋白基因 2 的表达在皮肤恶性黑色素瘤临床预后中的作用[J]. *临床皮肤杂志*, 2019, 48(3): 141-144.
- [16] 高丽, 郁雷, 李春明, 等. 沉默 KPNA2 的表达对舌鳞癌细胞 CAL-27 迁移侵袭能力的影响[J]. *现代口腔医学杂志*, 2017, 31(4): 198-201.
- [17] 董文刚, 刘锐, 王飞, 等. KPNA2 表达载体的构建及其对骨肉瘤细胞生长的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(17): 2988-2991.
- [18] Lin F, Gao L, Su Z, et al. Knockdown of KPNA2 inhibits autophagy in oral squamous cell carcinoma cell lines by blocking p53 nuclear translocation[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(1): 179-194.
- [19] Huang JX, Wu YC, Cheng YY, et al. IRF1 Negatively Regulates Oncogenic KPNA2 Expression Under Growth Stimulation and Hypoxia in Lung Cancer Cells[J]. *Oncol Targets Ther*, 2019, 12: 11475-11486.

收稿日期: 2020-07-17; 修回日期: 2020-07-28