

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00275

## PPP4R1 基因与肿瘤相关性的生物信息学预测及在胃癌组织中的初步验证

徐兴兴<sup>1</sup>, 常文军<sup>1</sup>, 翟羽佳<sup>1,2</sup>, 林丽萍<sup>1</sup>, 刘小康<sup>3</sup>, 马立业<sup>3\*</sup>, 张宏伟<sup>1\*</sup>, 曹广文<sup>1</sup>

1. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

2. 海军航空工程学院青岛分院, 青岛 266041

3. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的:**应用生物信息学分析方法预测基因 PPP4R1 与胃癌发生和转移的关系, 并采用 RT-PCR 进行验证。 **方法:**利用基因功能模块原理, 通过 IntNetDB 找到基因 PPP4R1 的伙伴基因, 应用 CFinder 工具找其社团基因, Chilibot 在线工具分析社团基因与肿瘤的关系, 继而推测 PPP4R1 与胃癌的联系。采用 RT-PCR 法检测 18 对分别来自同一患者的转移和原位肿瘤组织、12 对分别来自同一患者的原位肿瘤和癌旁正常组织 PPP4R1 基因表达, 对上述生物信息学分析的结果进行验证。 **结果:**生物学分析结果表明, PPP4R1 的社团基因有 CTDSP2、PPP2R5E、CTDP1、CTDSP1、FLJ22405、MTMR4、PPP1CA、PPP1CB、PPP1CC、PPP2R2A、PPP2R5A、PPP2R5C、PPP3CC, 其中与癌相关的基因有 9 个, 与癌及转移相关的基因有 2 个。PCR 验证结果表明: 18 例原位胃癌组织中有 15 例基因 PPP4R1 表达高于其对应的转移组织 ( $P < 0.01$ ); 12 例正常组织有 9 例高于其对应的癌组织 ( $P < 0.01$ )。 **结论:**基因 PPP4R1 可能与胃癌的发生和转移相关; 生物信息学可能成为研究基因功能快速而有效的新方法。

**[关键词]** 胃肿瘤; 生物信息学; 功能基因组学; 磷蛋白磷酸酶; PPP4R1 基因

**[中图分类号]** R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0275-04

### Bioinformatic prediction of the relationship between PPP4R1 gene with tumor and its preliminary application in gastric cancer

XU Xing-xing<sup>1</sup>, CHANG Wen-jun<sup>1</sup>, ZHAI Yu-jia<sup>1,2</sup>, LIN Li-ping<sup>1</sup>, LIU Xiao-kang<sup>3</sup>, MA Li-ye<sup>3\*</sup>, ZHANG Hong-wei<sup>1\*</sup>, CAO Guang-wen<sup>1</sup>

1. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Qingdao Branch, Institute of Naval Aeronautical Engineering, Qingdao 266041

3. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the relationship of PPP4R1 gene with the oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma by using bioinformatics analysis, and to verify the result by RT-PCR. **Methods:** IntNetDB was used to search for the neighborhoods of gene PPP4R1 and cliques by CFinder; Chilibot was used to explore the association between the cliques and carcinoma, then the association of PPP4R1 with gastric carcinoma was deduced. Eighteen pairs of primary and metastatic specimens from the same patient and 12 pairs primary carcinoma and the adjacent normal specimens from the same patient were analyzed by RT-PCR for PPP4R1 expression. **Results:** It was found that the community genes of PPP4R1 included PPP2R5E, MTMR4, PPP3CC, CTDP1, CTDSP1, FLJ22405, PPP1CB, PPP1CC, PPP2R2A, PPP2R5A, PPP2R5C, CTDSP2, and PPP1CA as searched by Cfinder2.0 when  $k = 14$ . Nine of the genes were associated with carcinoma and 2 associated with carcinoma and metastasis. The result of RT-PCR showed that higher expression of PPP4R1 was found in 15 of the 18 primary gastric cancer specimens compared with the paired metastatic specimens ( $P < 0.01$ ); higher expression was also found in 9 of the 12 adjacent normal specimens compared with the paired cancer specimens ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Gene PPP4R1 may be associated with the oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma; bioinformatics is an efficient way to investigate function of new genes.

**[KEY WORDS]** stomach neoplasms; bioinformatics; functional genomics; phosphoprotein phosphatase; PPP4R1 gene

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3):275-278]

**[收稿日期]** 2008-08-07 **[接受日期]** 2008-12-17

**[作者简介]** 徐兴兴, 硕士生. E-mail: xingxingxu2008@yahoo.cn

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871061, E-mail: hwzhang@smmu.edu.cn; Tel: 021-81873337, E-mail: malydr@163.com

Kloeker 等<sup>[1]</sup>从牛的睾丸中分离出丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶-4 (protein serine/threonine phosphatase 4, PP4), 发现其含 PPP4R1 (PP4-associated protein) 和 PP4C (PP4 catalytic subunit) 两种复合物。PPP4R1 作为一种结合蛋白及 PP-4 的调节因子, 在机体内的蛋白质磷酸化和脱磷酸化过程中发挥着重要作用。而磷酸化和脱磷酸化在细胞对外界信号的持续反应中具有重要意义。有报道<sup>[2]</sup> PPP4R1 在胃癌组织中的表达低于外周血, 提示 PPP4R1 可能与胃癌发生相关。由于该项研究采用基因芯片进行, 而芯片上探针的有限性及偏移性, 使其用各种方法确定差异表达基因都存在较大的假阳性和假阴性问题<sup>[3]</sup>, 该结果有待进一步证实。

在后基因组时代, 功能基因组学的一个目标是研究已破译基因的生物学功能并且利用它们。越来越多的研究表明, 基因通过组成功能模块的方式行使功能<sup>[4]</sup>, 而且近邻相互作用的蛋白质具有相似的功能<sup>[5]</sup>。本研究正是从这个角度利用生物信息学分析方法对基因 PPP4R1 与肿瘤发生发展和转移的关系进行预测, 并利用胃癌、胃正常组织及胃癌转移标本进行验证。

## 1 材料和方法

1.1 生物信息学分析 PPP4R1 伙伴基因来自 Int-NetDB 数据库 (<http://hanlab.genetics.ac.cn/sys/>), 全称 Integrated protein interaction network database, 是 Xia 等<sup>[6]</sup> 基于贝叶斯网络方法于 2006 年开发出进行基因相互作用研究的工具; 利用 CFinder 2.0 软件寻找其社团基因; 用 Chilibot 在线工具 (<http://www.chilibot.net/>) 寻找各基因和癌症及转移的相关关系。

1.2 标本的获取及保存 胃癌、癌旁及胃癌转移标本均来自第二军医大学长海医院。18 对转移和原位标本, 转移部位均系肝脏, 其中男性 15 例, 女性 3 例; 年龄 32~79 岁, 平均 (61.3±10.8) 岁; 年龄 >61 岁 10 例, ≤61 岁 8 例。12 对原位和正常组织, 男性 7 例, 女性 5 例; 年龄 36~78 岁, 平均年龄 (63.2±9.4) 岁; 年龄 >63 岁 8 例, ≤63 岁 4 例。标本于手术切除后立即取材 (离体 60 min 内) 并投入液氮, 随后转入 -80℃ 低温冰箱保存备用。

1.3 RT-PCR 验证 对冻存组织应用 TRIzol 法抽提总 RNA, 用 RNA 逆转录酶合成 cDNA 第一链, 反应体系为 20 μl, 含 1 μg 的总 RNA, 0.4 μl 的逆转录酶, 1 μl Oligo(dT) 逆转录引物, 其余按照 Promega 逆转录试剂盒说明书操作, 所得 cDNA -20℃ 保存。

利用 Primer5.0 设计 PPP4R1 基因引物。上游引物序列: 5'-ATG TTG TAC CTC AGG CGT TGT-3'; 下游引物: 5'-TGC AAG CTC GTG GAT GG-3'。PCR (Eppendorf) 反应条件: 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 1 min, 退火温度为 55℃, 72℃ 延伸 1 min, 循环数 27, 最后 72℃ 补齐 10 min。反应产物经 2% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min。溴化乙啶染色, UV 灯观察。Taq Plus 酶、dNTP、Buffer 均来自北京天根生化科技有限公司。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件包, 统计学处理采用 Fisher 确切概率法。

## 2 结果

2.1 生物信息学分析结果 以 PPP4R1 作为种子基因寻找其伙伴基因, 共有 190 个 PPIs (protein-protein interactions)。为更全面地找到与 PPP4R1 功能相似的基因, 本研究将其中的所有基因放进 CFinder 2.0 中, 该工具是 Palla 等<sup>[7]</sup> 利用他们新提出的派系过滤算法分析互相重叠的社团结构时的原理而编成的应用软件, 其背后连接的是 NCBI Entrez、UniProt 及 BIND 等 3 个生物信息数据库, 且其在基因功能预测方面已得到实际验证<sup>[8-9]</sup>。

随着对网络性质的物理意义和数学特性的深入研究, 人们发现许多实际网络都具有一个共同性质, 即社团结构, 也就是说, 整个网络是由若干个社团构成的<sup>[10]</sup>。一个社团从某种意义上可以看成是一些互相连通的“小的全耦合网络”(即完全图)的集合。这些“全耦合网络”称为“派系”(Clique), 而  $k$ -派系则表示该全耦合网络的节点数目为  $k$ 。根据文献<sup>[11]</sup>  $k$  值一般取 4~6, 但我们发现, 当  $k=14$  时, 各个基因之间形成了一个紧凑的社团, 分别为 CTDSP2、PPP2R5E、PPP4R1、CTDP1、CTDSP1、FLJ22405、MTMR4、PPP1CA、PPP1CB、PPP1CC、PPP2R2A、PPP2R5A、PPP2R5C、PPP3CC。然后利用 Chilibot 在线工具, 搜索  $k=14$  时的各社团基因与 Cancer、Tumor、Aversion、Metastatic、Metastasis、Displace 为关键词的关联, 发现 11 个基因与癌(转移)相关, 其中与癌相关的基因有 PPP2R5A、PPP2R5C、CTDP1、MTMR4、PPP1CB、PPP1CC、PPP2R2A、CTDSP1、PPP3CC, 与癌和转移相关的基因有 CTDSP2、PPP1CA。

2.2 RT-PCR 验证结果 在 12 对正常组织和原位癌中, 有 9 例原位癌的 PPP4R1 基因的表达强度低于正常组织 ( $P<0.01$ ), 2 例没有差异和 1 例高于正常组织 (图 1); 在 18 对转移和原位癌中, 有 15 例转

移癌中 PPP4R1 基因的表达强度低于该基因在原位癌中的表达强度 ( $P < 0.01$ ), 2 例没有差异和 1 例高于原位癌组织 (图 2)。

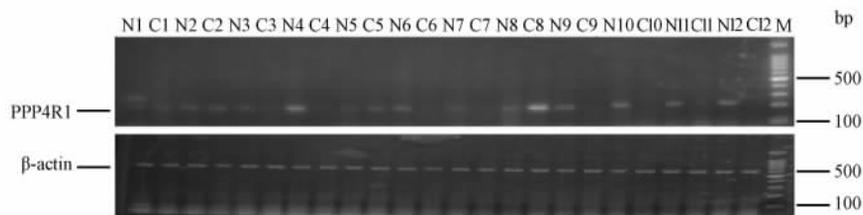


图 1 半定量 RT-PCR 检测正常和原位癌组织样本中 PPP4R1 的表达

Fig 1 Expression of PPP4R1 in normal and primary cancer specimens by semi-quantitative RT-PCR

M: Marker; N1-12: Normal tissue specimens; C1-12: Matched primary cancer specimens

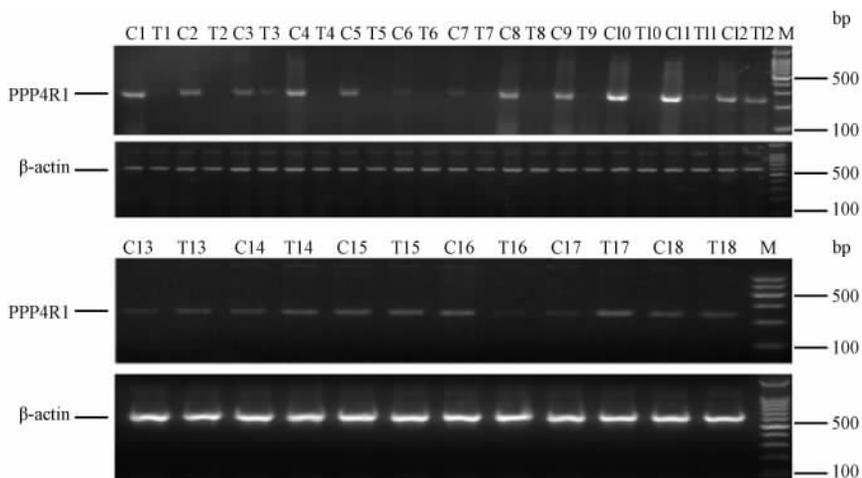


图 2 半定量 RT-PCR 检测原位和转移癌组织样本中 PPP4R1 的表达

Fig 2 Expression of PPP4R1 in primary and metastatic specimens by semi-quantitative RT-PCR

M: Marker; C1-18: Primary cancer specimens; T1-18: Matched metastatic cancer specimens

### 3 讨论

胃癌是威胁人类生命和健康的最常见的恶性肿瘤之一,也是我国常见的恶性肿瘤。本研究通过生物信息学的途径,就基因 PPP4R1 与胃癌的发生和转移之间的关系进行探讨。传统流行病学研究提示,遗传因素、N-亚硝基化合物、饮食因素、Hp 感染、吸烟、饮酒、地球化学因素以及精神心理因素被认为是胃癌发病的重要因素,但其分子生物学发病机制仍未完全明了。经过几十年的研究,已认识到,胃癌的发病是一个多基因、多步骤的过程,涉及多种癌基因、抑癌基因、细胞周期调节因子、DNA 修复基因等的改变,而这个过程,并不是简单的线性关系,是多基因参与、相互作用的结果。传统的分子生物学的研究对象一般局限于生物个体分子,通过纵深解析某系统的特定的基因或者蛋白质,从而推演生命现象的物质基础和生命过程的基本活动规律。但

是随着大量的自发突变体的研究,人们越来越清楚,一个基因控制一个性状的关系是不存在的,所有复杂性状都受控于许多基因<sup>[12]</sup>。在这过程中,一个基因的表达受其他基因的影响,而这个基因又影响其他基因的表达,这种相互影响、相互制约的关系构成了复杂的基因表达调控网络。简言之,任何一种生物学功能都涉及分子相互作用网络<sup>[13]</sup>。IntNetDB 正是基于类似的思想为研究基因相互作用而编制的数据挖掘工具。

本研究利用包括 IntNetDB 在内的 3 个相对比较成熟的基因功能分析工具,找到 PPP4R1 的伙伴基因及其社团基因,发现在这个社团中有 11 个基因与癌(转移)相关。由于同一社团中的基因存在结构或功能方面的统一,推测 PPP4R1 与胃癌的形成和转移存在着联系,后续的 RT-PCR 结果也证实了此前的推测。

虽然利用这种网络关系研究基因与肿瘤的发生

和发展,可以提供丰富的、有价值的生物学信息,甚至是一些未曾期待的信息,其仍然可能存在一定的不足;而且我们的推测是建立在 mRNA 水平之上,其后的转录和翻译过程也会影响到 PPP4R1 蛋白的功能。因此,即使 PPP4R1 在胃癌的形成和发展中扮演着重要角色,但其具体作用机制还需作进一步的研究,也需大量的临床样本进行验证。

[参考文献]

[1] Kloeker S, Wadzinski B E. Purification and identification of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 5339-5347.  
 [2] 牟瀚舟,余传定,许沈华,姜志明,顾琳慧,朱赤红,等. 胃癌患者外周血与癌组织基因差异表达比较[J]. 肿瘤学杂志, 2005, 11: 185-187.  
 [3] 喻辉,郭政,李霞. 基于 GO 与基因表达谱挖掘特征基因功能类[J]. 生物信息学, 2003, 1: 15-19.  
 [4] Hartwell L H, Hopfield J J, Leibler S, Murray A W. From molecular to modular cell biology[J]. Nature, 1999, 402(6761 Suppl): C47-C52.  
 [5] Rives A W, Galitski T. Modular organization of cellular net-

works[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 1128-1133.  
 [6] Xia K, Dong D, Han J D. IntNetDB v1. 0: an integrated protein-protein interaction network database generated by a probabilistic model[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7: 508.  
 [7] Palla G, Derényi I, Farkas I, Vicsek T. Uncovering the overlapping community structure of complex networks in nature and society[J]. Nature, 2005, 435: 814-818.  
 [8] Jonsson P F, Cavanna T, Zicha D, Bates P A. Cluster analysis of networks generated through homology: automatic identification of important protein communities involved in cancer metastasis[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7: 2.  
 [9] Jonsson P F, Bates P A. Global topological features of cancer proteins in the human interactome[J]. Bioinformatics, 2006, 22: 2291-2297.  
 [10] 解,汪小帆. 复杂网络中的社团结构分析算法研究综述[J]. 复杂系统与复杂性科学, 2005, 2: 1-12.  
 [11] Sharan R, Ulitsky I, Shamir R. Network-based prediction of protein function[J]. Mol Syst Biol, 2007, 3: 88.  
 [12] Watson J D. 基因分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 20.  
 [13] Kanehisa M. 后基因组信息学[M]. 北京: 清华大学出版社, 2002: 113.

[本文编辑] 贾泽军

· 读者 作者 编者 ·

中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(十七)

| 汉语拼音名         | 中文名  | 拉丁名  | 英文名   |
|---------------|------|--|---|
| Mubiezi       | 木鳖子  | <i>Semen Momordicae</i>  | Cochinchina Momordica Seed                            |
| Mucaoc        | 母草   | <i>Herba Linderniae Crustaceae</i>                             | Brittle Falsepimpernel Herb                           |
| Mudanpi       | 牡丹皮  | <i>Cortex Moutan</i>   | Tree Peony Bark                                       |
| Mufangji      | 木防己  | <i>Radix Cocculi Trilobi</i>                                   | Japanese Snailseed Root                               |
| Mufurongye    | 木芙蓉叶 | <i>Folium Hibisci Mutabilis</i>                                | Cottonrose Hibiscus Leaf                              |
| Mugua         | 木瓜   | <i>Fructus Chaenomelis</i>                                     | Common Floweringquince Fruit                          |
| Muhao         | 牡蒿   | <i>Herba Artemisiae Japonicae</i>                              | Japanese Wormwood Herb                                |
| Muhudie       | 木蝴蝶  | <i>Seem Oroxyli</i>  | Indian Trum etflower Seed                             |
| Mujingye      | 牡荆叶  | <i>Folium Viticis Cannabifoliae</i>                            | Hemleaf Negundo ChastetreeLeaf                        |
| Muli          | 牡蛎   | <i>Concha Ostreae</i>  | Oyster Shell  |
| Mumianhua     | 木棉花  | <i>Flos Bombacis Malabarici</i>                                | Common Bombax Flower                                  |
| Mutong        | 木通   | <i>Caulis Akebiae</i>  | Akebia Stem   |
| Mutouhui      | 墓头回  | <i>Radix Patriniae Heterophyllae / Radix Patriniae Scabrae</i> | Diversifolious Patrinia Root / Scabrous Patrinia Root |
| Muxiang       | 木香   | <i>Radix Aucklandiae</i>                                       | Costustoot  |
| Muzei         | 木贼   | <i>Herba Equiseti Hiemalis</i>                                 | Common Scouring Rush Herb                             |
| Nanguazi      | 南瓜子  | <i>Semen Cucurbitae</i>  | Cushaw Seed   |
| Nanhanshuishi | 南寒水石 | <i>Calcitum</i>  | Calcite   |
| Nanheshi      | 南鹤虱  | <i>Fructus Dauci Carotae</i>                                   | Wild Carrot Fruit                                     |
| Nanshashen    | 南沙参  | <i>Radix Adenophorae</i>                                       | Ladybell Root   |
| Nanshetenggen | 南蛇藤根 | <i>Radix Celastris Orbiculati</i>                              | Oriental Bittersweet Root                             |
| Naosha        | 硝砂   | <i>Sai Ammoniacus</i>  | Sal Ammoniac  |
| Naoyanghua    | 闹羊花  | <i>Flos Rhododendri Mollis</i>                                 | Chinese Azalea Flower                                 |
| Niubangzi     | 牛蒡子  | <i>Fructus Arctii</i>  | Great Burdock Achene                                  |
| Niudali       | 牛大力  | <i>Radix Millettiae Speciosae</i>                              | Beautiful Millettia Root                              |
| Niuhuang      | 牛黄   | <i>Calculus Bovis</i>  | Bezoar  |
| Niujincao     | 牛筋草  | <i>Herba Eleusines Indicae</i>                                 | Goosegrass Herb                                       |
| Niuxi         | 牛膝   | <i>Radix Achyranthis Bidentatae</i>                            | Twotooth Achyranthes Root                             |