

基于基因数据库分析 *GRB2* 在肾癌中的表达及其与患者预后的关系

解宸¹ 杨亚楠² 王硕¹ 赵万东¹ 吕志远¹ 宋静宜¹ 何宁宁¹

(1 青岛大学基础医学院特种医学系, 山东 青岛 266071; 2 青岛恒星科技学院健康学院护理学教研室)

[摘要] 目的 探讨生长因子受体结合蛋白 2(*GRB2*) 基因在肾癌中的表达及其对患者预后的影响。方法 挖掘 ONCOMINE 数据库中肾癌 *GRB2* 基因相关数据进行基因表达分析, 结合在 TCGA 数据库中挖掘的 *GRB2* 基因在肾癌组织和正常组织中的表达差异, 获得 *GRB2* 基因的表达与患者预后的关系。并通过 STRING 数据库, 构建 *GRB2* 基因的蛋白质-蛋白质互作网络图。采取实时荧光定量 PCR 的方法检测 6 例肾癌组织及其癌旁正常组织中 *GRB2* 基因的相对表达量。结果 与正常肾组织相比, *GRB2* 基因在肾癌组织中的表达明显升高, 差异具有统计学意义($t=8.21, P<0.05$), *GRB2* 基因在肾癌组织中的表达升高与肾癌患者预后相关($\chi=2.71, P<0.05$)。进一步对 *GRB2* 相关的 14 个相互作用蛋白进行分析显示, *GRB2* 主要参与了细胞的增殖和凋亡过程。肾癌组织中 *GRB2* 基因相对表达量显著高于其癌旁正常组织($t=6.98, P<0.001$)。结论 *GRB2* 基因在肾癌组织中高表达, 且其基因表达水平与肾癌患者的预后明显相关。

[关键词] 肾肿瘤; *GRB2* 衔接蛋白质; 预后; 基因表达谱; 蛋白质相互作用图; 数据库; 遗传学; 数据挖掘

[中图分类号] R737.11

[文献标志码] A

EXPRESSION OF THE GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN-2 GENE IN RENAL CARCINOMA AND ITS ASSOCIATION WITH PATIENT PROGNOSIS BASED ON GENE DATABASE ANALYSIS XIE Chenyi, YANG Yanan, WANG Shuo, ZHAO Wandong, LYU Zhiyuan, SONG Jingyi, HE Ningning

(Department of Special Medicine, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of the growth factor receptor-bound protein-2 (*GRB2*) gene in renal carcinoma and its influence on prognosis. **Methods** The ONCOMINE database was used to obtain the data on the expression of the *GRB2* gene in renal carcinoma, and the TCGA database was used to analyze the difference in the expression of the *GRB2* gene between renal carcinoma tissue and normal tissue, as well as the association between the expression of the *GRB2* gene and the prognosis of patients. The STRING database was used to construct the protein-protein interaction network of the *GRB2* gene. Quantitative real-time PCR was used to measure the relative expression level of the *GRB2* gene in six renal carcinoma tissue samples and corresponding adjacent normal tissue samples. **Results** The expression of the *GRB2* gene in renal carcinoma tissue was significantly higher than that in normal renal tissue ($t=8.21, P<0.05$), and the increased expression of the *GRB2* gene in renal carcinoma tissue was associated with the prognosis of renal carcinoma ($\chi=2.71, P<0.05$). Further analysis of the 14 *GRB2*-related interacting proteins showed that *GRB2* was mainly involved in cell proliferation and apoptosis. The relative expression level of the *GRB2* gene in renal carcinoma tissue was significantly higher than that in the corresponding adjacent normal tissue ($t=6.98, P<0.001$). **Conclusion** The *GRB2* gene is highly expressed in renal carcinoma tissue, and its expression level is significantly associated with the prognosis of patients with renal carcinoma.

[KEY WORDS] Kidney neoplasms; *GRB2* adaptor protein; Prognosis; Gene expression profiling; Protein interaction maps; Databases; genetic; Data mining

肾癌是一种常见的致死性泌尿系统疾病^[1], 发病人群主要集中在 50~60 岁^[2], 并且男性更为多发, 约为女性发病率的 2 倍^[3]。由于多数肾癌被发现时已经处于晚期, 失去了最佳的治疗时机, 故而早期发现、早期治疗非常重要。

生长因子受体结合蛋白 2(*GRB2*) 是一种在细胞中广泛表达的衔接蛋白, 作为细胞信号通路的重

要节点蛋白在细胞内的众多信号传导通路中发挥着重要的调控作用^[4-5]。*GRB2* 高表达可影响生长因子家族成员的激活, 促进癌细胞 DNA 扩增, 导致患者癌细胞扩散或者转移风险的增加^[6-7]。研究证明, *GRB2* 主要在 MAPK 信号转导过程中起作用, 通过级联 Ras-Raf-MAPKK-MAPK 通路, 调控细胞增殖和分化^[8-11]。这些信号通路的活动对正常个体发育及成熟稳定是至关重要的, 当这些通路存在异常或受到干扰时易导致肿瘤的发生^[12-13]。既往研究显示 *GRB2* 基因与肿瘤的发生发展有关^[14], 但关于 *GRB2*

[收稿日期] 2022-08-24; **[修订日期]** 2022-10-03

[基金项目] 青岛市博士后应用研究项目(2016061)

[通讯作者] 何宁宁, Email: heningning@qdu.edu.cn

基因在肾癌中表达的情况尚不清楚。

本研究利用 ONCOMINE 数据库和 TCGA 数据库分析人 *GRB2* 基因在肾癌患者中的表达情况,通过建立 *GRB2* 的蛋白质-蛋白质相互作用网络,挖掘与肾癌密切相关的重要蛋白质,为进一步研究 *GRB2* 基因在肾癌发生发展中的机制提供线索和思路。

1 材料和方法

1.1 检索 *GRB2* 基因在所有肿瘤类型中表达情况

利用 ONCOMINE 数据库 (<https://www.oncomine.org>, 版本 4.5) 检索 *GRB2* 基因在肿瘤患者中表达的研究数据,检索条件设定为:① $P < 0.05$; ② 倍数变化 ≥ 1.5 ; ③ 使用全部的基因排序,记录 *GRB2* 在 20 种肿瘤中的表达情况。

1.2 比较 *GRB2* 基因在正常组织和肾癌组织中的差异表达情况

利用 ONCOMINE 数据库检索 *GRB2* 在正常肾组织和肾癌组织中表达的所有研究数据,进行汇总分析后,筛选出 *GRB2* 在正常组织和肾癌组织中的差异表达情况。

1.3 分析 *GRB2* 表达与肾癌患者预后的关系

登录 cBioportal 在线分析工具 (www.cbioportal.org) 中的 TCGA 数据库,研究类型选择为“肾癌”,基因资料(阈值设定为 2.0)为“mRNA Expression z-score”,检索词为“基因 *GRB2*”,结果输出时选择“Survival”,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。根据 Kaplan-Meier 分析中基因表达量的中位数进行分组,分为高表达组和低表达组,用以分析 *GRB2* 基因表达和肾癌患者预后的相关性。

1.4 构建 *GRB2* 蛋白质-蛋白质互作网络

通过蛋白质-蛋白质相互作用数据库 STRING (<https://string-db.org/>),以“实验数据”作为证据来源,构建 *GRB2* 蛋白互作网络图。对筛选出的互作蛋白再通过 KEGG 通路分析预测其生物学功能。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测肾癌及其癌旁正常组织中 *GRB2* 的表达

选取青岛大学附属医院 2020 年 1 月—2022 年 12 月确诊为肾癌的 6 例患者手术切除的癌组织和癌旁正常组织标本各 100 mg,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,研磨成组织匀浆以后提取总 RNA。利用逆转录试剂盒提取 cDNA,*GRB2* 基因以及内参照基因 *GAPDH* 的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(*GRB2* 正向引物:5'-CCTGGACTTAGC-ATTGTGAG-3',反向引物:5'-TTATCATCAGC-

AGGGAGAGC-3';*GAPDH* 正向引物:5'-GGTT-GTCTCCTGCGACTTCA-3',反向引物:5'-TGGT-CCAGGGTTTCTTACTCC-3')。利用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 PCR 试剂盒进行 PCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。实验重复 3 次,实验结果取均值。本研究通过了青岛大学医学部伦理委员会审批(QDU-HEC-2022250)。

1.6 统计学分析

正常组织与肾癌组织 *GRB2* 基因表达比较采用 *t* 检验,采用 Kaplan-Meier 法计算 *GRB2* 基因表达与肾癌预后的关系。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *GRB2* 基因在所有类型肿瘤中的表达情况

在 ONCOMINE 数据库中共检索到 *GRB2* 基因在不同类型肿瘤中表达情况的研究结果 446 个,其中有 80 个研究结果显示 *GRB2* 基因在乳腺癌、白血病、淋巴瘤、头颈部癌等肿瘤组织中高表达,29 个结果显示 *GRB2* 基因在白血病和淋巴瘤等肿瘤组织中低表达(图 1)。图中蓝色方框中数字表示显著低表达的研究结果数量,红色方框中数字表示显著高表达研究结果数量。在 ONCOMINE 数据库中,检索到 9 个关于 *GRB2* 在正常组织和肾癌组织表达的研究结果,共包含 376 例样本。其中在肾癌的统计结果中,有 7 个结果显示 *GRB2* 基因在肾癌组织中高表达($R^2 = 2.65, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 *GRB2* 在正常组织和肾癌组织中的表达情况比较

进一步对 ONCOMINE 数据库中的 *GRB2* 基因在正常肾组织和肾癌组织中的表达情况进行分析。其中肾癌(肾乳头状肾细胞癌)组织中 *GRB2* 基因的表达水平明显高于正常肾组织(胎儿肾组织或者正常肾组织),且差异具有统计学意义(差异倍数为 1.857, $t = 8.21, P < 0.05$)。肾癌(肾透明细胞癌)组织中的 *GRB2* 基因表达水平也明显高于正常肾脏组织,且其差异具有统计学意义(差异倍数为 1.593, $t = 9.54, P < 0.05$)。

2.3 *GRB2* 表达与肾癌患者预后的关系

通过 cBioportal 在线分析工具中的 TCGA 数据库,利用 Kaplan-Meier 生存曲线验证 *GRB2* 表达水平与肾癌患者预后的关系。结果显示,*GRB2* 高表达组($n = 133$)患者的生存率低于 *GRB2* 低表达组($n = 398$),差异具有显著性($z = 2.71, P < 0.05$)。

可诱导受体及非受体酪氨酸激酶降解,参与细胞内信号通路的负调控,有抑癌作用^[22]。EGFR 是一种跨膜糖蛋白,是构成酪氨酸激酶受体 ErbB 家族的四个成员之一^[23]。研究表明 EGFR 的生理功能是促进上皮组织的发育和调节体内稳态。在病理情况下,在多种实体肿瘤(肺癌、乳腺癌和成胶质细胞瘤)中存在 EGFR 基因突变以及 EGFR 蛋白水平的高表达或异常表达,因此可以推测,EGFR 可能是肿瘤发生的驱动因素^[24]。SHC1 又称 SHCA 或 SHC,属于 SHC 蛋白家族,该家族的蛋白在传递来自活化的酪氨酸激酶受体信号到下游信号分子中起着极其重要作用^[25]。本研究再进一步对与 GRB2 蛋白具有相互作用关系的蛋白进行生物学功能分析后发现,GRB2 具有对细胞增殖和凋亡的调节作用,参与了 ERBB 信号通路和 EGFR 信号通路,与目前的研究结果一致^[26]。

综上所述,本研究通过对 ONCOMINE 数据库中肿瘤基因表达的深入挖掘,发现 GRB2 基因在肾癌中高表达,且其表达量与肾癌患者的预后密切相关。同时,GRB2 基因可能是通过调控 ERBB 以及 EGFR 信号通路影响细胞增殖和凋亡促进肾癌的发生和发展。此将为进一步阐明 GRB2 基因在肾癌发生发展中的作用奠定理论基础,为肾癌的临床诊断和治疗以及寻找可能的药物靶标提供数据参考。

作者声明:何宁宁、解宸一、杨亚楠参与了实验设计;何宁宁、解宸一、王硕、赵万东、吕志远、宋静宜、杨亚楠参与了论文写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] YANG D C, CHEN C H. Potential new therapeutic approaches for renal cell carcinoma[J]. *Semin Nephrol*, 2020,40(1): 86-97.
- [2] SHUCH B, VOURGANTI S, RICKETTS C J, et al. Defining early-onset kidney cancer: Implications for germline and somatic mutation testing and clinical management[J]. *J Clin Oncol*, 2014,32(5):431-437.
- [3] HSIEH J J, PURDUE M P, SIGNORETTI S, et al. Renal cell carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017,3:17009.
- [4] 王雅楠,马庆久,徐建庆,等. EphA2 通过调控 Grb2 表达参与肝癌细胞侵袭的机制探讨[J]. *现代肿瘤医学*, 2021,29(01): 32-37.
- [5] SCHLAEPFER D D, HANKS S K, HUNTER T, et al. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase[J]. *Nature*, 1994,372(6508):786.
- [6] WANG W Y, XU S W, YIN M M, et al. Essential roles of Gab1 tyrosine phosphorylation in growth factor-mediated signaling and angiogenesis[J]. *Int J Cardiol*, 2015,181:180-184.
- [7] 文姬,李贝,邓雪松,等. α -硫辛酸下调 Grb2 抑制 A549 细胞增殖的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2018,18(21):4012-4016.
- [8] HOWES J E, AKAN D T, BURNS M C, et al. Small molecule-mediated activation of RAS elicits biphasic modulation of phospho-ERK levels that are regulated through negative feedback on SOS1[J]. *Mol Cancer Ther*, 2018,17(5):1051-1060.
- [9] YE Z, XU S, SHI Y, et al. GRB2 enforces homology-directed repair initiation by MRE11 [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(32): eabe9254.
- [10] IJAZ M, WANG F, SHAHBAZ M, et al. The Role of Grb2 in Cancer and Peptides as Grb2 Antagonists[J]. *Protein Pept Lett*, 2018,24(12):1084-1095.
- [11] GALLIHER-BECKLEY AJ, SCHIEMANN WP. Grb2 binding to Tyr284 in TbetaR-II is essential for mammary tumor growth and metastasis stimulated by TGF-beta[J]. *Carcinogenesis*, 2008,29(2):244-51.
- [12] RONKINA N, GAESTEL M. MAPK-Activated Protein Kinases: Servant or Partner? [J]. *Annu Rev Biochem*, 2022,91: 505-540.
- [13] YUAN J, DONG X, YAP J, et al. The MAPK and AMPK signalings: Interplay and implication in targeted cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2020,13(1):113.
- [14] SU J, WU G, YE Y, et al. NSUN2-mediated RNA 5-methylcytosine promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via LIN288-dependent GRB2 mRNA stabilization[J]. *Oncogene*, 2021,40(39):5814-5828.
- [15] PERAZELLA M A, DREICER R, ROSNER M H. Renal cell carcinoma for the nephrologist[J]. *Kidney Int*, 2018,94(3): 471-483.
- [16] MAKHOV P, JOSHI S, GHATALIA P, et al. Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: Mechanisms and management strategies[J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(7):1355-1364.
- [17] AKHTAR M, AL-BOZOM I A, AL HUSSAIN T. Papillary renal cell carcinoma (PRCC): An update [J]. *Adv Anat Pathol*, 2019,26(2):124-132.
- [18] BARATA P C, RINI B I. Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2017,67(6):507-524.
- [19] ATKINS M B, TANNIR N M. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018,70:127-137.
- [20] DING L, DONG HY, ZHOU TR, et al. PD-1/PD-L1 inhibitors-based treatment for advanced renal cell carcinoma: Mechanisms affecting efficacy and combination therapies [J]. *Cancer Med*, 2021,10(18):6384-6401.
- [21] ZHU J, ARMSTRONG A J, FRIEDLANDER T W, et al. Biomarkers of immunotherapy in urothelial and renal cell carcinoma: PD-L1, tumor mutational burden, and beyond[J]. *J Immunother Cancer*, 2018,6(1):1-10. (下转第 80 页)

- mellitus [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2021, 9(1): e001416.
- [6] SUCCURRO E, ANDREOZZI F, CARNEVALE R, et al. Nox2 up-regulation and hypoalbuminemia in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 168:1-5.
- [7] BOUABOUT G, AYME-DIETRICH E, JACOB H, et al. Nox4 genetic inhibition in experimental hypertension and metabolic syndrome[J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2018, 111(1):41-52.
- [8] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2019[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(Suppl 1):S13-S28.
- [9] DOMANSKI G, LANGE A E, ITTERMANN T, et al. Evaluation of neonatal and maternal morbidity in mothers with gestational diabetes: A population-based study[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2018, 18(1):367.
- [10] PIRAS C, NERI I, PINTUS R, et al. First trimester metabolomics 1H-NMR study of the urinary profile predicts gestational diabetes mellitus development in obese women[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2022, 35(25):8275-8283.
- [11] WANG Q Y, YOU L H, XIANG L L, et al. Current progress in metabolomics of gestational diabetes mellitus[J]. *World J Diabetes*, 2021, 12(8):1164-1186.
- [12] WEI W W, HE Y J, WANG X, et al. Gestational diabetes mellitus: The genetic susceptibility behind the disease [J]. *Horm Metab*, 2021, 53(8):489-498.
- [13] 韦春莲, 陈颖, 徐瑛蕾, 等. TGF- β 1 基因多态性与妊娠期糖尿病遗传易感性关系[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2018, 54(2): 176-179.
- [14] 熊静, 王梓炫, 陈飞宇, 等. Abl 相互作用蛋白 3 的生物学功能及与疾病关系的研究进展[J]. *精准医学杂志*, 2019, 34(4): 357-361.
- [15] 季慧慧, 郑中华, 邬博逸, 等. 女性 2 型糖尿病患者外周血全基因组 DNA 甲基化的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2020, 28(8): 568-575.
- [16] AGIDIGBI T S, KIM C. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3576.
- [17] 郑莉芳, 陈佩杰, 肖卫华. 活性氧对骨骼肌胰岛素抵抗的调控及其机制[J]. *中国糖尿病杂志*, 2020, 28(2):153-157.
- [18] BROWN O I, BRIDGE K I, KEARNEY M T. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases in glucose homeostasis and diabetes-related endothelial cell dysfunction [J]. *Cells*, 2021, 10(9):2315.
- [19] JOO E H, KIM Y R, KIM N, et al. Effect of endogenous and exogenous oxidative stress triggers on adverse pregnancy outcomes; Preeclampsia, fetal growth restriction, gestational diabetes mellitus and preterm birth[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18):10122.
- [20] JHA J C, DAI A Z, HOLTERMAN C E, et al. Endothelial or vascular smooth muscle cell-specific expression of human NOX5 exacerbates renal inflammation, fibrosis and albuminuria in the Akita mouse[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(9):1712-1726.
- [21] YEUNG K R, CHIU C L, PIDSLEY R, et al. DNA methylation profiles in preeclampsia and healthy control placentas[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(10): H1295-H1303.
- [22] 郭占荣, 刘晓莉. 血清 Hcy、Cys-C、SOD 及尿 NAG 对妊娠期糖尿病患者早期肾损伤的诊断价值[J]. *包头医学院学报*, 2021, 37(3):46-49.
- [23] ZHENG W, HUANG W Y, LIU C, et al. Weight gain after diagnosis of gestational diabetes mellitus and its association with adverse pregnancy outcomes: A cohort study[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2021, 21(1):216.
- [24] GUO F, LONG W, ZHOU W B, et al. FTO, GCKR, CDKAL1 and CDKN2A/B gene polymorphisms and the risk of gestational diabetes mellitus: A meta-analysis[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 298(4):705-715.
- [25] XU Y H, SHI L, BAO Y P, et al. Association between sleep duration during pregnancy and gestational diabetes mellitus: A meta-analysis[J]. *Sleep Med*, 2018, 52:67-74.
- (本文编辑 耿波 厉建强)
-
- (上接第 76 页)
- [22] LYLE C L, BELGHASEM M, CHITALIA V C. C-cbl: An important regulator and a target in angiogenesis and tumorigenesis[J]. *Cells*, 2019, 8(5):498.
- [23] SINGH D, ATTRI B K, GILL R K, et al. Review on EGFR inhibitors: Critical updates[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(14):1134-1166.
- [24] SIGISMUND S, AVANZATO D, LANZETTI L. Emerging functions of the EGFR in cancer[J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(1): 3-20.
- [25] URSINI-SIEGEL J, MULLER WJ. The ShcA adaptor protein is a critical regulator of breast cancer progression[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(13):1936-43.
- [26] BHAT S S, ANAND D, KHANDAY F A. p66Shc as a switch in bringing about contrasting responses in cell growth: Implications on cell proliferation and apoptosis[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1):1-12.
- (本文编辑 耿波 厉建强)