浙江理工大学学报(自然科学版),第 37 卷,第 3 期,2017 年 5 月
Journal of Zhejiang Sci-Tech University (Natural Sciences)
Vol. 37, No. 3, May 2017

DOI:10.3969/j.issn.1673-3851.2017.05.023

乳腺癌癌症干细胞的特异基因识别

郭鹏飞,贺平安

(浙江理工大学理学院,杭州 310018)

摘　要:乳腺癌是一种严重威胁女性健康的恶性肿瘤,癌症干细胞假说的提出为乳腺癌的起因以及治疗提供了新的模型。对 746 个乳腺癌样本中的 18409 个基因和 1035 个 miRNAs,通过生物信息学方法构建共表达网络,将其划分到不同的共表达模块中;利用胚胎干细胞和间充质干细胞的特性进一步筛选模块,得到两个大小分别为 2019 和 859 且与上述两类干细胞相关的基因集;最后通过构建这两个基因集的调控网络,筛选出两个胚胎干细胞的特异性关键基因 *TPX2* 和 *MCM10*,以及间充质干细胞的特异基因 *COL5A2*。这些基因可以作为癌症干细胞的候选特异性标志物,有望成为潜在的乳腺癌治疗标靶。

关键词:乳腺癌;胚胎干细胞;间充质干细胞;基因调控网络;关键基因

中图分类号:Q612　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673-3851 (2017) 03-0451-10

0　引　言

乳腺癌是全世界女性最常见的一种恶性肿瘤,其发病率占女性全身其他恶性肿瘤的 10%左右。据统计,每年约有 120 万新发乳腺癌病例,乳腺癌已成为女性发病率最高的癌症[1]。随着医学的发展和治疗手段的进步,乳腺癌患者的生存率已经得到很大改善,但它的耐药性以及预后复发等问题依然困扰着许多研究者。

癌症干细胞假说认为癌症是由一小群癌症干细胞造成的,即癌症干细胞是癌症异常增殖、侵袭、转移、耐药以及复发等的根源。Wicha 等[2]利用不同的细胞表面标记物对细胞进行标记,验证了乳腺癌中存在着癌症干细胞,这为癌症干细胞的研究提供了坚实基础。此后,Takebe 等[3]研究发现 Notch、Hedgehog (HH) 和 Wnt 等细胞通路在癌症干细胞的致癌方面起着至关重要的作用,并对通过抑制这些通路从而控制干细胞复制、存活和分化这一新治疗策略进行了研究。

此外,许多研究者从基因层面研究癌症干细胞涉及到的相关生物过程。Xu 等[4]研究发现 *miR-214* 在调控卵巢癌干细胞性质方面起着至关重要的作用,并且 *miR-214* 可作为治疗卵巢癌的潜在的治疗靶标。Li 等[5]研究发现长链非编码 RNA(long noncoding RNAs, lncRNAs)能够抑制其标靶 mRNA 在胶质母细胞瘤干细胞(glioblastoma stem cells, GSCs)中分化,并利用这种方法识别出一些可用来治愈 GSCs 的候补 lncRNAs。此外,Kalamohan 等[6]应用加权的基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis,WGCNA)和富集度分析的方法分析胃癌的 mRNA 数据,发现胃癌的两种亚型分别与不同的干细胞特征相关。

以上研究表明,癌症干细胞假说能更好地解释癌症的起源,并指导癌症治疗。本文基于以上研究的成果,利用多种生物信息学方法分析现有数据库中乳腺癌的基因表达谱数据,期望可以辨别出某些与癌症干细胞相关的关键基因。该研究结果有助于人们更好地理解乳腺癌的发生、发展机制。

收稿日期:2016－11－22　　网络出版日期:2017－03－28

基金项目:国家自然科学基金项目(61170110, 61272312);浙江省自然科学基金项目(LY14F020049)

作者简介:郭鹏飞(1990－),男,山西忻州人,硕士研究生,主要从事生物信息学方面的研究。

通信作者:贺平安,E-mail:pinganhe@zstu.edu.cn

1 数据和方法

1.1 数据及数据预处理

本文研究的乳腺癌的 miRNASeq、RNASeqV2 数据以及乳腺癌患者的临床数据，均下载于 The Cancer Genome Atlas（TCGA）数据库，其中 RNASeqV2 和 miRNASeq 数据是分别通过 RNA 测序和 miRNA 测序得到的样本的基因表达和 miRNA 表达数据。

由于某些 miRNAs 可以通过调控基因表达进而参与调控细胞分化和癌症生成等重要生命过程，故本文合并两种数据用于研究分析。首先，如果某个基因或 miRNA 在超过 50%的样本中其原始数据缺失，则将该基因或 miRNA 删除；然后使用 LIMMA package[7]将处理过的基因和 miRNAs 原始数据转化为基因表达值，并将二者合并；最后使用反分位数归一化(inversely normalize)的方法处理合并的基因表达数据，使其处于同一水平进行后续分析。经过预处理后得到一个由 746 个乳腺癌样本中的 18409 个基因和 1035 个 miRNAs 的表达值构成的数据集 $\boldsymbol{D}=(d_{ij})_{19444\times 746}$，其中 d_{ij} 表示第 i 个基因在第 j 个样本中的表达值。

另外，从 The Gene Expression Omnibus（GEO）数据库下载了胚胎干细胞(GSE29625)和间充质干细胞(GSE28974)的 mRNA 表达谱数据。

1.2 构建基因共表达网络

WGCNA 算法[8]是一种从表达谱数据中挖掘模块(module)信息的算法。在该算法中模块被定义为一组具有类似表达谱的基因，即如果某些基因在一个生理过程或不同组织中总是具有相类似的表达变化，则将其定义为一个模块。

在划分模块过程中，首先计算任意两个基因间的相关系数，得到一个实对称矩阵 $\boldsymbol{S}=(s_{ij})$，其中 $s_{ij}=|\ \mathrm{cor}(d_i,d_j)\ |=\left|\dfrac{C}{\sqrt{AB}}\right|$ 为基因 i 和基因 j 间的皮尔森相关系数，这里

$$A=\sum_k d_{ik}^2-\frac{(\sum_k d_{ik})^2}{m} \tag{1}$$

$$B=\sum_k d_{jk}^2-\frac{(\sum_k d_{jk})^2}{m} \tag{2}$$

$$C=\sum_k d_{ik}d_{jk}-\frac{\sum_k d_{ik}\sum_k d_{jk}}{m} \tag{3}$$

如何设定基因间的相关系数阈值将基因对划分为相关或不相关是一个难点。为此将相关性矩阵 $\boldsymbol{S}$ 转换为邻接矩阵 $\boldsymbol{A}=(a_{ij})$，其中 $a_{ij}=|s_{ij}|^{\beta}$ 作为基因对 i 和 j 的相关性指标。该算法通过无尺度网络原则训练加权系数 β，其训练标准为：连接节点个数为 i 的对数值 $(\log_{10}(i))$ 与 i 出现的概率的对数值 $(-\log_{10}(p(i)))$ 是相关的，且相关性系数的平方 R^2 至少应达到 0.8。

另外考虑到基因 i 可以通过基因 μ 与基因 j 相互作用，故将邻接矩阵被转换成拓扑矩阵 $\boldsymbol{\Omega}=(w_{ij})$，其中：

$$w_{ij}=\frac{l_{ij}+a_{ij}}{\min\{k_i,k_j\}+1-a_{ij}} \tag{4}$$

这里 $l_{ij}=\sum_u a_{iu}a_{uj}$，表示与基因 i、j 都相邻的基因 μ 之间的邻接系数乘积和；$k_i=\sum_u a_{iu}$ 为基因 i 单独连接的节点的邻接系数的和。

最后，节点间的相异程度用 $q_{ij}^w=1-w_{ij}$ 来衡量，并根据 q_{ij}^w 进行分层聚类，从而将基因划分到不同模块中。

1.3 基因集富集度分析(gene set enrichment analysis，GSEA)

理论上，胚胎干细胞和间充质干细胞在原发性肿瘤，以及癌细胞的循环过程和转移器官中都可以检测到。因此本文选择这两种干细胞为代表通过基因集的富集度分析[9]，查找与癌症干细胞相关的基因。为此，从 MSigDB(molecular signatures database) 数据库[10]下载了 15 个与胚胎干细胞特性相关的基因集以及 10 个跟间充质干细胞特征相关的基因集，作为背景基因进行富集度分析。

基因集的富集度分析基于超几何分布，服从超几何分布$(k-1,K,N-K,n)$ 的概率 p 可通过式(5)来计算：

$$p(X=k-1)=\frac{\binom{K}{k-1}\binom{N-K}{n-k+1}}{\binom{N}{n}} \tag{5}$$

其中：n 表示模块中基因的个数；K 表示与胚胎干细胞特性相关的基因集或者跟间充质干细胞特征相关的基因集中基因的个数；k 和 N 分别为上述模块和基因集的交集和并集中基因的个数。错误发现率[11](false discovery rate，*FDR*)用于评价基因模块是否富集于与两种干细胞相关的基因集。

1.4 优化与癌症干细胞相关的基因集

通过基因集的富集度分析得到两个分别与胚胎干细胞和间充质干细胞相关的基因集，为了优化这

两个基因集,本文应用多尺度嵌合基因共表达网络分析(multiscale embedded gene co-expression network analysis, MEGENA)算法[12]对二者重新进行精确分类。

MEGENA 算法首先计算任意两个基因之间的相关性,并依据相关性的大小对基因对排序;接着通过平面最大过滤图算法(planar maximally filtered graph , PMFG)将其嵌入拓扑网络,从而构建平面滤波网络(planar filtered networks, PFNs);然后通过最短路径距离、本地路径索引和整体模块性三个标准对最初的 PFNs 进行多次迭代处理,得到更精确的分类。

1.5　基因表达的调控网络的建立

随机森林算法[13]是一种基于决策树模型的算法,它主要通过一个重要性评分矩阵来推断调控网络。相比于其他构建调控网络的方法,随机森林算法可以得到一个有向的调控网络,使得基因间的调控关系更加明确。故本文利用随机森林算法在与癌症干细胞相关的基因集中构建基因调控网络。

随机森林算法将预测 n 个基因间的调控网络的问题转化为求解 n 个不同的回归问题。首先选取一个基因作为靶基因(因变量),其余 n-1 个基因作为输入基因(自变量),做回归分析预测靶基因。每个输入基因在预测靶基因过程中计算相应的变量重要性评分(variable importance measure,*VIM*),并以此作为推定基因间调控关系的指标。将得到的所有靶基因与输入基因之间的调控关系依据其大小排序,从而构造调控网络。本文用 R 语言中的 randomForest package[14]构建有向的基因调控网络,同时用 Cytoscape 软件[15]实现基因调控网络的可视化。

在有向的基因调控网络中,基因的顶点出度是以该点为起点的边的个数。本文根据基因的顶点出度的大小筛选与癌症干细胞相关的关键基因。

1.6　Kaplan-Meier 生存分析

生存分析是将事件的结果和出现这一结果所经历的时间结合起来分析的一种统计分析方法[16]。Kaplan-Meier生存分析将乘积极限法应用于临床数据中样本生存或死亡这两种状态所对应的生存时间,从而计算出样本的生存率及其标准误差。然后利用 log-rank 检验来比较两组或多组生存率,并通过 *p-value* 来评价不同组的生存率是否相同。

对得到的关键基因,本文通过构建 Kaplan-Meier 生存曲线来验证它们对乳腺癌的重要性。

2　结　果

2.1　表达数据的聚类分析

利用 WGCNA 算法,输入数据集 $\boldsymbol{D}$ 中的数据,首先计算任意两个基因之间的皮尔森相关性系数得到相关性矩阵。接着通过无尺度网络原则确定 β。如图 1 所示,当 $\beta=5$ 时 $R^2=0.8220$,因此本文选择 $\beta=5$ 作为加权系数将相关性矩阵转化为邻接矩阵。最后利用节点的相异程度进行分层聚类,结果 746 个乳腺癌样本中的 18409 个基因和 1035 个 miRNAs 被聚类到 47 个不同的模块中。47 个模块分别被记作 M1—M47,并且每个模块的大小从 33 到 2598 数目不等。由于这些共表达基因倾向于功能相关的,故这种聚类方式也意味着乳腺癌的转录组包括 47 个不同或相关的生物过程。而这些生物过程有助于研究乳腺癌中的分子机制和关键性驱动因子,因此这些模块值得深入研究[6]。

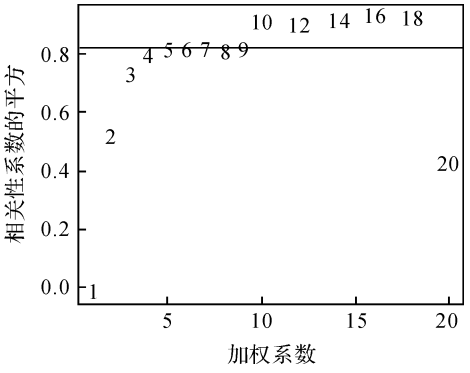


图 1　加权系数 β 的选取

2.2　识别与胚胎干细胞和间充质干细胞相关的模块

将 WGCNA 算法得到的模块和 MSigDB 数据库中下载的与两种干细胞特性相关的基因集作为输入数据进行富集度分析,本文以 $FDR<0.05$ 为标准来确定结果。

在与胚胎干细胞特性相关的基因集的富集度分析结果中,有 8 个基因模块与胚胎干细胞特性相关,它们分别是 M1—M8,具体结果见表 1。另一方面,有 6 个模块富集于间充质干细胞,分别为 M2、M5、M6、M8、M9 和 M10,其结果如表 2 所示。

表 1 与胚胎干细胞性质相关的模块的富集度分析结果

模块	模块大小	排序	*FDR*	基因集名称
M1	922	1	2.07×10^{-7}	BENPORATH_ES_WITH_H3K27ME3
M1	922	2	3.83×10^{-6}	BENPORATH_PRC2_TARGETS
M2	864	1	7.38×10^{-19}	BENPORATH_ES_WITH_H3K27ME3
M2	864	2	1.31×10^{-14}	BENPORATH_SUZ12_TARGETS
M2	864	3	1.01×10^{-12}	BENPORATH_EED_TARGETS
M2	864	4	9.54×10^{-12}	BENPORATH_PRC2_TARGETS
M3	1012	1	1.77×10^{-58}	WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE
M3	1012	2	6.74×10^{-40}	BENPORATH_ES_1
M3	1012	3	8.63×10^{-38}	MUELLER_PLURINET
M4	604	1	2.95×10^{-10}	WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE
M4	604	2	2.31×10^{-7}	MUELLER_PLURINET
M5	1149	1	4.09×10^{-7}	BENPORATH_ES_WITH_H3K27ME3
M5	1149	2	4.74×10^{-6}	BENPORATH_SUZ12_TARGETS
M6	1031	1	7.58×10^{-11}	BENPORATH_EED_TARGETS
M6	1031	2	2.04×10^{-10}	BENPORATH_SUZ12_TARGETS
M6	1031	3	8.32×10^{-10}	BENPORATH_ES_WITH_H3K27ME3
M7	123	1	5.32×10^{-10}	WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE
M8	46	1	6.16×10^{-14}	BENPORATH_EED_TARGETS

表 2 与间充质干细胞特征相关的模块的富集度分析结果

模块	模块大小	排序	*FDR*	基因集名称
M2	864	1	2.55×10^{-8}	RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_UP
M5	1149	1	2.53×10^{-5}	RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_UP
M6	1031	1	4.73×10^{-24}	RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_DN
M6	1031	2	3.17×10^{-9}	NAKAMURA_ADIPOGENESIS_EARLY_DN
M6	1031	3	3.17×10^{-9}	NAKAMURA_ADIPOGENESIS_LATE_DN
M6	1031	4	1.35×10^{-7}	CORRE_MULTIPLE_MYELOMA_DN
M6	1031	5	7.24×10^{-5}	NAKAMURA_ADIPOGENESIS_EARLY_UP
M8	46	1	2.80×10^{-4}	RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_UP
M9	267	1	4.16×10^{-2}	MISHRA_CARCINOMA_ASSOCIATED_FIBROBLAST_UP
M10	84	1	2.91×10^{-2}	NAKAMURA_ADIPOGENESIS_EARLY_UP

在表 1 和表 2 中，第一列和第二列分别表示模块及其大小，第四列是每个模块与从 MSigDB 数据库中得到的任一基因集进行一次富集度分析得到的 *FDR* 值，第三列是根据 *FDR* 的值从小到大的排序，第五列是每个基因模块中富集于 MSigDB 数据库中的基因集。

为了进一步分析这些基因，本文将与胚胎干细胞性质相关的 8 个模块合并成一个基因集 E1，内含 5751 个基因；同时将富集于间充质干细胞的 6 个模块合并成一个基因集 E2，内含 3441 个基因。

2.3 分别确定与胚胎干细胞和间充质干细胞相关的基因集

在 WGCNA 算法的结果中，有 4 个模块 M2、M5、M6、M8 同时富集于胚胎干细胞和间充质干细胞，这使得基因集 E1 和 E2 中包含许多相同的基因。为了优化上述两个基因集，本文对这些基因模块作如下处理：

首先，合并两个基因集 E1 和 E2 得到新的基因集 E3，它包含 6102 个基因。对于 E3 中的基因，根据由乳腺癌样本中基因和 miRNAs 的表达值构成的数据集 $\boldsymbol{D}$ 构造它的一个子矩阵 $\boldsymbol{D}_1=(d_{ij})_{6102\times746}$。使用 MEGENA 算法对该数据重新分类得到新的模块，并对新的模块进行基因集富集度分析，重新筛选出与两种干细胞相关的模块，最后合并模块得到新的与两种干细胞相关的基因集。在这一过程中，本文得到两个基因个数分别为 2009 和 572 的且与胚胎干细胞和间充质干细胞相关的基因集 F1 和 F2。

其次，对基因集 E1 中的基因，重复上述过程，得到分别由 1824 和 802 个基因构成的与胚胎干细胞和间充质干细胞相关的基因集 F3 和 F4，并且 F3

和 F4 无交集。

然后,对基因集 E2 中的基因,重复上述过程,得到两个分别与胚胎干细胞和间充质干细胞相关的无交集基因集 F5 和 F6,其大小分别为 57 和 386。

最后,取 F1、F3 和 F5 的并集,得到一个包含 2019 个与胚胎干细胞相关的基因集 G1;取 F2、F4 和 F6 的并集,得到一个大小为 859 的与间充质干细胞相关的基因集 G2。而且新得到的基因集 G1 和 G2 没有交集。表 3—表 4 为上述三组数据利用 MEGENA 算法分类后,新的模块进行富集度分析的结果。

表 3　MEGENA 算法分类与胚胎干细胞性质相关的模块的富集度分析结果

分类	模块	模块大小	排序	*FDR*	基因集名称
E1 分类	E1_comp1_5	1241	1	1.34×10^{-20}	WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE
	E1_comp1_5	1241	2	2.50×10^{-12}	MUELLER_PLURINET
	E1_comp1_5	1241	3	3.32×10^{-8}	BENPORATH_ES_1
E2 分类	E1_comp1_19	583	1	6.64×10^{-3}	WONG_EMBRYONIC_STE・M_CELL_CORE
	E2_comp1_9	46	1	2.22×10^{-4}	BENPORATH_EED_TARGETS
E3 分类	E3_comp1_4	1370	1	9.00×10^{-19}	WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE
	E3_comp1_4	1370	2	1.62×10^{-11}	MUELLER_PLURINET
	E3_comp1_4	1370	3	4.60×10^{-7}	BENPORATH_ES_1
	E3_comp1_24	611	1	7.76×10^{-3}	WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE
	E3_comp1_44	28	1	8.28×10^{-3}	BENPORATH_EED_TARGETS

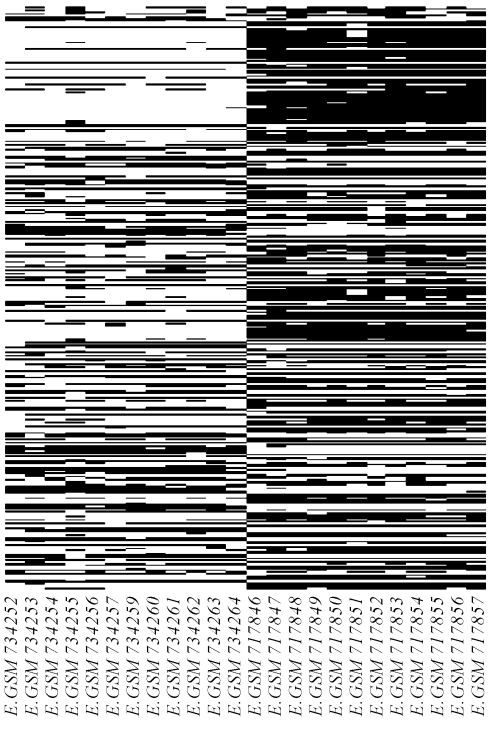
表 4　MEGENA 算法分类与间充质干细胞特征相关的模块的富集度分析结果

分类	模块	模块大小	排序	*FDR*	基因集名称
E1 分类	E1_comp1_8	715	1	7.28×10^{-4}	RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_DN
	E1_comp1_8	715	2	8.41×10^{-3}	CORRE_MULTIPLE_MYELOMA_DN
	E1_comp1_35	87	1	8.09×10^{-3}	NAKAMURA_ADIPOGENESIS_LATE_UP
E2 分类	E2_comp1_21	146	1	9.36×10^{-3}	RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_DN
	E2_comp1_42	19	1	6.76×10^{-3}	MISHRA _ CARCINOMA _ ASSOCIATED _ FIBROBLAST_UP
	E2_comp1_53	221	1	7.23×10^{-4}	NAKAMURA_ADIPOGENESIS_EARLY_DN
	E2_comp1_53	221	2	7.24×10^{-3}	NAKAMURA_ADIPOGENESIS_LATE_DN
E3 分类	E3_comp1_13	572	1	4.47×10^{-7}	RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_DN

2.4　验证基因集 G1 和 G2

为了进一步验证上述过程得到的两个与胚胎干细胞和间充质干细胞相关的基因集。首先合并从 GEO 数据库下载的癌症胚胎干细胞(*GSE*29625)和间充质干细胞(GSE28974)的 mRNA 表达谱数据,然后分别使用分位数归一化[17]和反分位数归一化的方法处理合并后的数据,最终得到一个由 10195 个基因构成的基因表达数据 $\boldsymbol{T}_1=(t_{ij})_{10195\times24}$,这里 t_{ij} 为第 i 个基因在第 j 个样本中的表达值。$\boldsymbol{T}_1$ 用于验证上述过程得到的两个与胚胎干细胞和间充质干细胞相关的基因集 G1 和 G2。

图 2(a)是由与胚胎干细胞相关的基因集 G1 在数据 $\boldsymbol{T}_1$ 中的表达值构成的热图,图中每个小方格表示一个基因在样本中的表达量,颜色表示表达量的大小。其中首字母为 E 的是 GSE29625 中的样本,首字母为 M 的是 GSE28974 中的样本。图中结果表明该基因集的大部分基因在整合数据中的 GSE29625 样本中具有显著的高表达,在 GSE28974 样本中具有显著的低表达。类似地,图 2(b)是由与间充质干细胞相关的基因集在整合数据 $\boldsymbol{T}_1$ 中的表达值构成的热图。该基因集中的大部分基因在整合数据中的 GSE28974 样本中具有显著的高表达。



(a) G1

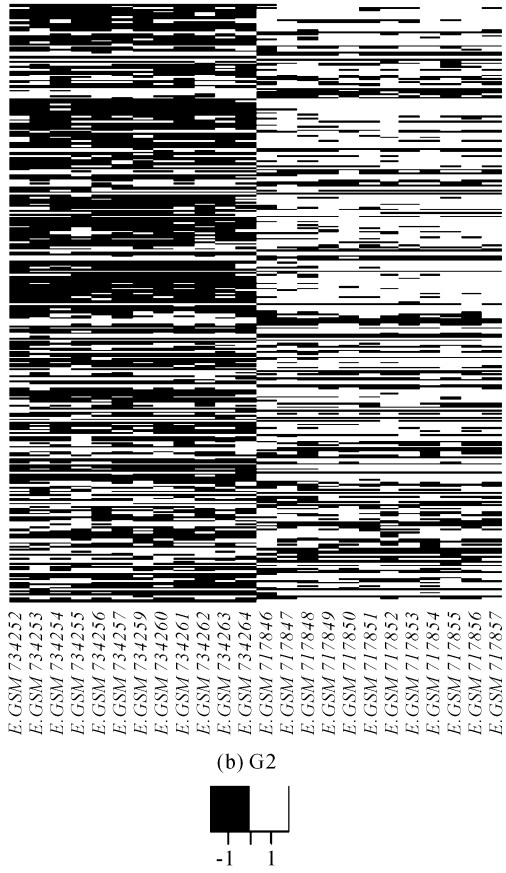


图 2 与胚胎干细胞相关的基因集和与间充质干细胞的基因集在两种干细胞的整合数据中的表达模式

基因集 G1 和 G2 在整合数据 T_1 中的不同表达模式表明二者与两类干细胞具有明显的相关性，进一步说明使用本文方法得到的结果具有较强的可靠性。

2.5 构建基因调控网络

对与胚胎干细胞相关的基因集 G1 中的 2019 个基因，利用其在数据集 ***D*** 中的表达值，使用 R 语言中的 randomForest package[14] 构建它们的调控网络。随机森林算法中最重要的参数有两个：一个是建立决策树的个数，本文取 1000；另一个是每个节点可选择的候选输入基因个数，在本文中该参数取全部输入基因数的平方根。

利用多重假设检验，求出重要性评分矩阵的每一个值的 *FDR* 值，首先取 $FDR<0.01$ 的边来控制调控网络的大小，得到一个包含 53298 条边的调控网络。图 3 是由此网络中全部基因之间的 *VIM* 值绘制的直方图，从图中可以看出大部分基因间的重要性评分值小于 0.01。为了进一步控制调控网络的规模，本文仅选取基因之间的重要性评分值大于 0.01 的边。最后得到了一个含有 15720 条边的有向调控网络。

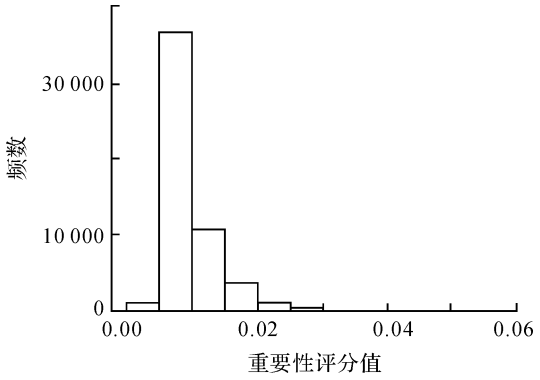


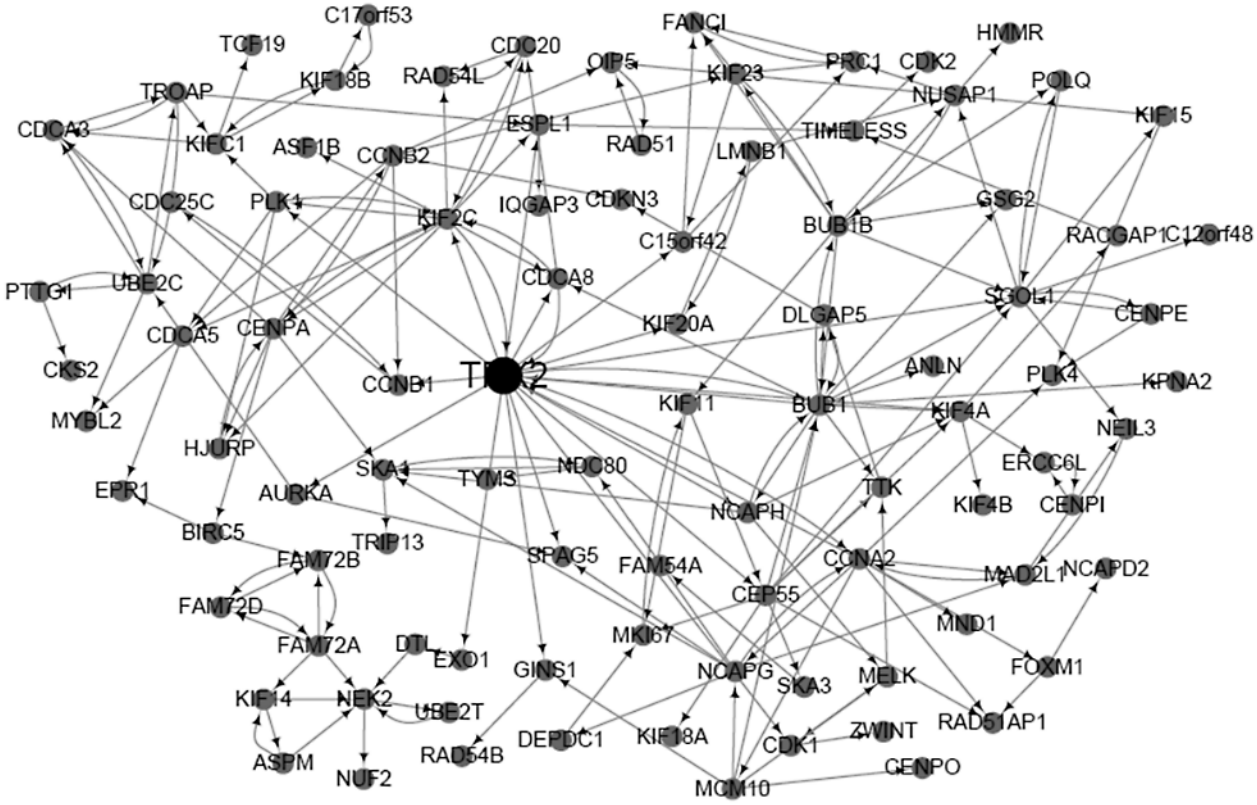
图 3 53298 个基因对的 *VIM* 值的频率分布直方图

在构造的有向调控网络中，如果一个基因同时调控多个基因，那么它肯定在某个生物过程中起重要作用，所以文本重点关注那些处于调控关系上游的基因。本文使用 R 语言中的 igraph package[18] 计算网络中每个顶点的出度，并根据其大小进行排序。在这个有向调控网络中，*TPX 2*、*MCM10*、*CEP55*、*BUB1*、*NCAPG*、*NCAPH* 和 *BUB1B* 等基因有较大的顶点出度，具体结果如表 5 所示。特别是 *TPX2* 和 *MCM10* 这两个基因调控下游基因的个数都超过 110，所以本文认为这两个基因是与胚胎干细胞相关的关键基因。图 4(a)—(b)是以基因 *TPX2* 和 *MCM10* 为核心，以及它们调控的基因之间的调控关系构成的调控子网络。为了显示清晰，该调控子网络中仅画出了 *VIM* 值大于 0.02 的边。

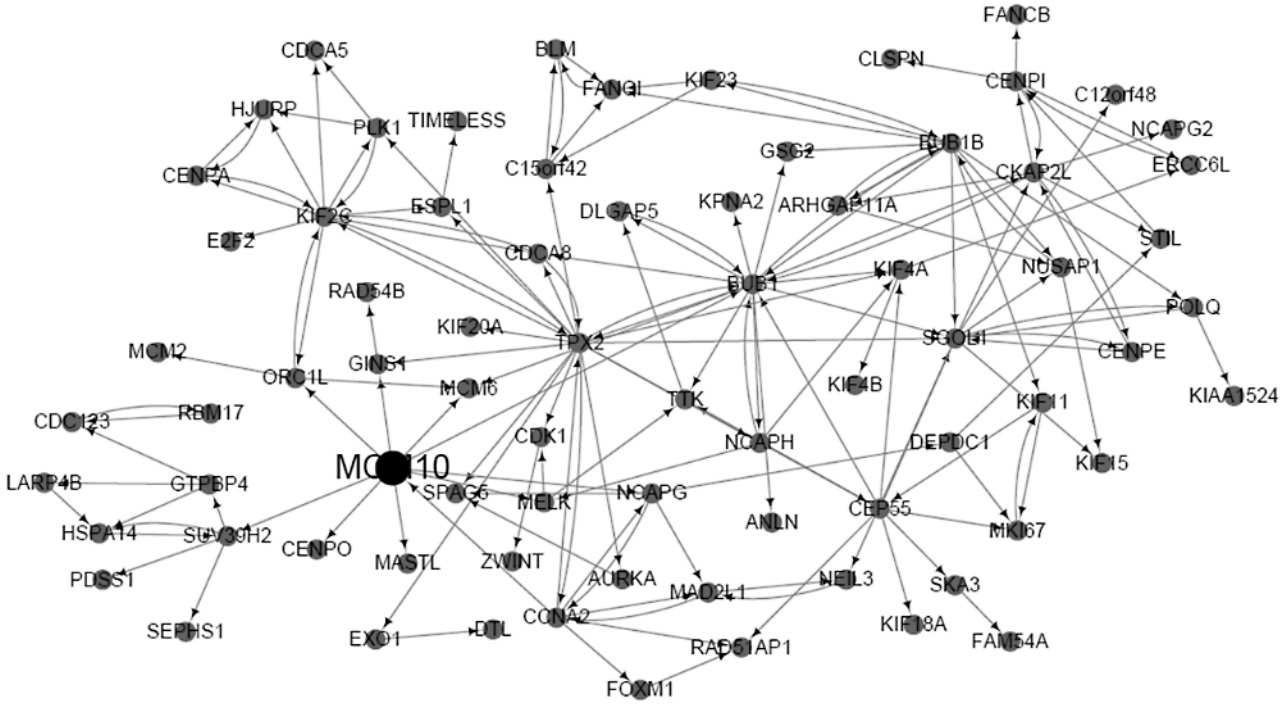
表 5 基因集 G1 调控网络中 Top12 基因的顶点出度

基因	顶点出度	基因	顶点出度
TPX2	130	*CCNB2*	91
MCM10	117	*NCAPH*	91
CEP55	108	*BUB1B*	86
BUB1	102	*SGOL1*	85
CCNA2	99	*CKAP2L*	84
NCAPG	95	*UBE2C*	80

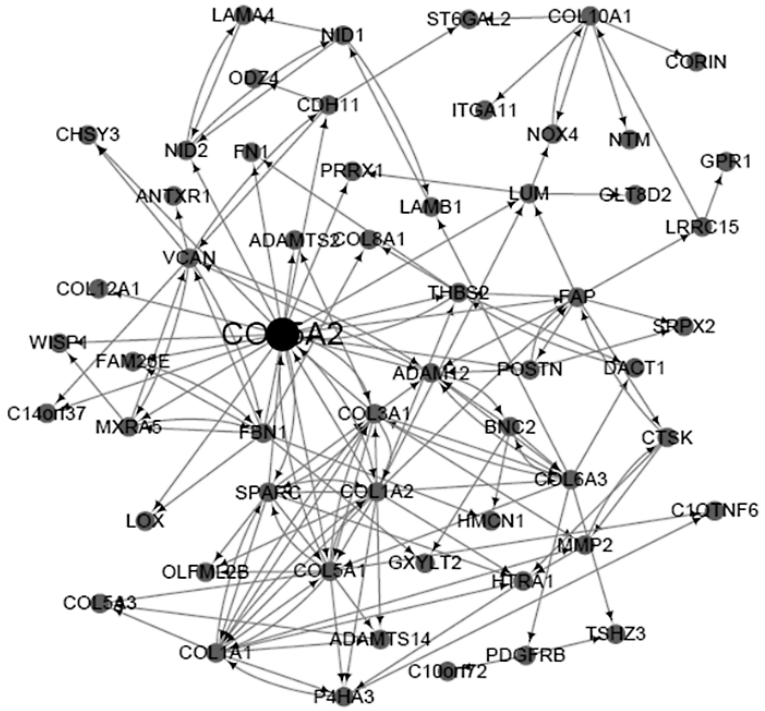
对于包含 859 个与间充质干细胞相关的基因集 G2，本文重复同样的过程。结果发现，在与间充质干细胞相关的基因集的调控网络中，*COL5A2*、*FBN1* 和 *COL1A2* 等基因具有较大的顶点出度，具体结果如表 6 所示。其中 *COL5A2* 基因调控的基因数超过 100。因此，基因 *COL5A2* 被看作是与间充质干细胞相关的关键基因。它的调控子网络见图 4(c)。



(a)*TPX2*



(b)*MCM10*



(c)*COL5A2*

图 4 三个关键基因及其下游调控基因构成的调控子网络

表 6 基因集 G2 的调控网络中 Top10 基因的顶点出度

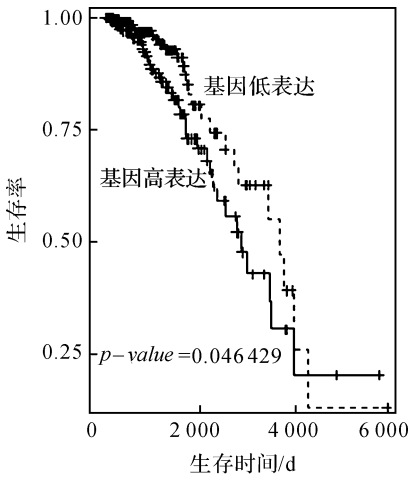
基因	顶点出度	基因	顶点出度
COL5A2	102	*COL6A3*	71
FBN1	87	*VCAN*	67
COL1A2	87	*LUM*	67
COL3A1	74	*BNC2*	66
THBS2	72	*CDH11*	65

由于上述 3 个基因在相应的调控网络中具有极高的顶点出度，说明 *TPX2*、*MCM10* 和 *COL5A2* 在癌症的胚胎干细胞和间充质干细胞的自我更新、分化过程中具有重要作用。故上述三个基因可作为辨别乳腺癌的癌症干细胞的特征基因，以及治愈乳腺癌的潜在的生物靶基因。

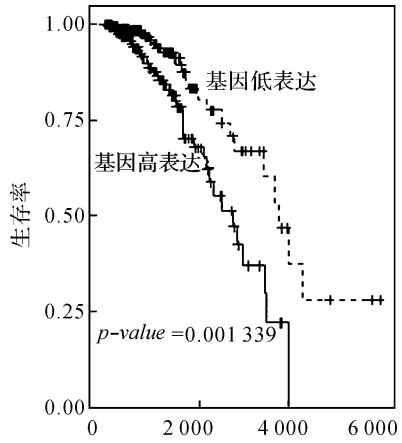
2.6 关键基因的生物学分析

本文将 3 个关键基因的表达谱数据与 TCGA 数据库中的临床数据整合成一个由 657 个样本构成的新数据 $\boldsymbol{T}_2$ 进行 Kaplan-Meier 生存分析，从而进一步研究关键基因的表达方式对乳腺癌患者的生存率的影响，结果如图 5 所示。在图 5 中，对应的曲线分别为在基因 *TPX2* 和 *MCM10* 的高表达和低表达情况下乳腺癌患者的生存曲线，其中 x 轴表示乳腺癌患者的生存时间，y 轴表示患者的生存率；*event* =1 代表患者死亡。观察图 5 发现处于 *TPX2* 和 *MCM10* 高表达组的癌症患者相比于低表达组的患者有明显高的死亡率。而且假设检验的 *p-value* 都小于 0.05，也表明关键基因的不同表达方式对乳腺癌患者生存率的影响显著不同。

基因 *COL5A2* 没有上述结论，但 Weng 等[19] 通过研究血小板反应蛋白 2(thrombospondin2，THBS2)的表达模式在肺癌发展中的作用，发现 *COL5A2* 基因作为 THBS2 的一个共表达基因，它们的高表达使得肺癌患者具有较低存活率。此外，Fischer 等[20] 通过对比胶原蛋白的基因在结肠直肠癌患者和正常结肠上皮的组织样品中的差异表达，发现基因 *COL5A2* 在基质中的表达与结肠直肠癌相关。Zhang 等[21] 利用 TCGA 数据库中的卵巢癌数据构建了贝叶斯网络，其中基因 *COL5A2* 同样被发现是关键基因。



(a) 乳腺癌_*TPX2*



(b) 乳腺癌_*MCM10*

图 5　关键基因在乳腺癌临床数据中当 *event*=1 时的生存分析

3　结　论

癌症干细胞假说认为癌症很可能起源于干细胞的非正常分化,那么通过中断癌症干细胞的自我更新从而造成其自我更新障碍,完全可以成为一种治疗癌症的理想方式。本文基于这一思想,利用生物信息学中 WGCNA 算法和 MEGENA 算法分析乳腺癌的基因和 miRNA 混合表达数据,将其划分为具有不同或相似生物功能的基因共表达模块,同时利用 MSigDB 数据库中与胚胎干细胞特性和间充质干细胞特征相关的基因集进行富集度分析,得到了两个分别与乳腺癌胚胎干细胞和间充质干细胞相关的且由 2019 个基因和 859 个基因组成的基因集。另外从 GEO 数据库中下载了癌症胚胎干细胞和间充质干细胞的 mRNA 表达谱数据,并通过查看上述两个基因集在 mRNA 表达谱数据中的表达模式,验证了本文得到的两个基因集是可靠的。

进一步利用随机森林算法在上述两个基因集中构建有向的调控网络。通过调控网路的分析,发现了 3 个在癌症的胚胎干细胞和间充质干细胞自我更新、分化过程中起重要作用的关键基因:*TPX2*、*MCM10* 和 *COL5A2*。生存分析和已有的结果进一步说明这三个基因是与乳腺癌密切相关的,可以作为治疗乳腺癌的潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] BENSON J R, JATOI I, KEISEH M, et al. Early breast cancer [J]. Lancet,2009,373(9673):1463-1479

[2] WICHA M S, DONTU G, AL-HAJJ M, et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer[J]. Breast Cancer Research,2003,36(1):59-72.

[3] TAKEBE N, MIELE L, HARRIS P J, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update [J]. Nature Reviews Clinical Oncology,2015,12(8):445-464.

[4] XU C X, XU M, TAN L, et al. MicroRNA miR-214 regulates ovarian cancer cell stemness by targeting p53/Nanog [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(42):34970-34978.

[5] LI H. Differential long non-coding RNA and mRNA expression in differentiated human glioblastoma stem cells [J]. Mol Med Rep,2016,14(3):2067-2076.

[6] KALAMOHAN K, PERIASAMY J, BHASKAR R D, et al. Transcriptional co-expression network reveals the involvement of varying stem cell features with different dysregulations in different gastric cancer subtypes [J]. Molecular Oncology,2014,8(7):1306-1325.

[7] LAW C W, CHEN Y, SHI W, et al. Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts [J]. Genome Biology,2014,15(2):1417.

[8] 宋长新,雷萍,王婷. 基于 WGCNA 算法的基因共表达网络构建理论及其 R 软件实现[J]. 基因组学与应用生物学,2013,32(1):135-141.

[9] RIVALS I, PERSONNAZ L, TAING L, et al. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test ? [J]. Bioinformatics,2007,23(4): 401-407.

[10] LIBERZON A, SUBRAMANIAN A, PINCHBACK R, et al. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0[J]. Bioinformatics,2011,27(12):1739-1740.

[11] BENJAMINI Y. Discovering the false discovery rate[J]. Journal of the Royal Statistical Society,2010, 72(4):405-416.

[12] SONG W M, ZHANG B. Multiscale embedded gene co-expression network analysis [J]. Plos Computational Biology,2015,11(11),e1004574.

[13] 侯艳,杨凯,李康. 基于随机森林回归的网络构建方法及应用[J]. 中国卫生统计,2015,32(4):558-561.

[14] LIAW A, WIENER M. Classification and regression by randomforest [J]. R News,2002,2(3):18-22.

[15] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res,2003,13(11):2498-2504.

[16] 孙振球. 医学统计学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2014:306-313.

[17] BOLSTAD B M. A comparison of normalization

methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias[J]. Bioinformatics,2003,19(2):185-193.

[18] CSARDI G, NEPUSZ T. The igraph software package for complex network research[J]. InterJournal Complex Systems,2006,1695(5):1-9.

[19] WENG T Y, WANG C Y, HUNG Y H, et al. Differential expression pattern of THBS1 and THBS2 in Lung Cancer: clinical outcome and a systematic-analysis of Microarray Databases [J]. Plos One,2016,11(8):e0161007.

[20] FISCHER H, STENLING R, RUBIO C, et al. Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2 [J]. Carcinogenesis,2001,22(6):875-878.

[21] ZHANG Q, BURDETTE J E, WANG J P. Integrative network analysis of TCGA data for ovarian cancer[J]. BMC Systems Biology,2014,8(1):1-18.

Identification of Specific Genes of Cancer Stem Cells of Breast Cancer

GUO Pengfei, *HE Pingan*

(School of Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Breast cancer is a kind of malignant tumor which seriously threats the health of global female. However, the hypothesis of cancer stem cell (CSC) provides a new model for breast cancer causes and treatment. In the paper, coexpression network was constructed with the bioinformatics method for 18409 genes and 1035 miRNA in 746 breast cancer samples, and they were divided into different coexpression modules. The characteristics of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells were utilized to further screen the modules, and two gene sets related to the above two types of stem cells (size: 2019 and 859) were gained respectively. Finally, regulatory network for the two gene sets were constructed to screen specific hub genes *TPX2* and *MCM10* of two embryonic stem cells as well as specific gene *COL5A2* of mesenchymal stem cells. These genes can be considered as candidate specific biomarkers of CSC and potential therapeutic targets in the treatment of breast cancer.

Key words: breast cancer; embryonic stem cells; mesenchymal stem cells; gene regulatory network; hub genes

(责任编辑: 康 锋)