

缺氧微环境对多发性骨髓瘤转录组和预后的影响及其治疗策略研究

李颖^{1a}, 郑蓓^{1a}, 蒋慧芳^{1b}, 应茵^{1a}, 韩冰^{1a}, 张美玲^{1a}, 汪一帆^{1c}, 王强凤², 李功华^{1a*} (1.浙江省立同德医院, a.药剂科, b.血液科, c.中西医结合肿瘤研究所, 杭州 310012; 2.浙江大学医学院附属第一医院肿瘤内科, 杭州 310003)

摘要: 目的 利用生物信息学的方法分析肿瘤缺氧微环境对多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)转录组的影响, 筛选差异基因, 为探索细胞耐受缺氧环境的分子机制提供信息。方法 从 GEO 数据库获得缺氧培养下的 MM 细胞株以及患者骨髓来源 CD38 阳性细胞的表达谱芯片, 利用 Limma 包分析缺氧环境下一致性较好的差异基因, 对这些差异基因进行 GO 和 KEGG 分析, 并用 TCGA 数据库研究其表达水平与 MM 患者生存的关系。最后利用差异基因预测抑制缺氧微环境的潜在药物。结果 针对 2 种数据集共筛选得到 28 个一致性较好的差异基因, 这些基因主要参与细胞代谢途径、线粒体结构、自噬等, 这可能与 MM 的缺氧耐受有关。生存分析显示: *ANXA1*、*CLU*、*DPYSL3*、*CEP128*、*DDIT4*、*HMGCS1* 基因的高表达导致 MM 患者预后变差。CMap 分析提示 PARP 抑制剂可抑制缺氧相关信号通路。结论 本研究利用生物信息学手段筛选得到了缺氧影响 MM 的差异基因, 发现其中部分基因的高表达可导致 MM 患者预后变差, 这可能与缺氧环境导致肿瘤细胞生存增强有关。PARP 抑制剂可能成为缺氧抑制剂, 与其他化疗药物联合使用实现更好的治疗效果。

关键词: 多发性骨髓瘤; 缺氧; 肿瘤微环境; 转录组; 生物信息学

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)02-0148-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.02.004

引用本文: 李颖, 郑蓓, 蒋慧芳, 等. 缺氧微环境对多发性骨髓瘤转录组和预后的影响及其治疗策略研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 148-155.

Study on Effect of Hypoxic Microenvironment on the Transcriptome and Survival of Multiple Myeloma and Its Potential Therapeutic Strategy

LI Ying^{1a}, ZHENG Bei^{1a}, JIANG Huifang^{1b}, YING Yin^{1a}, HAN Bing^{1a}, ZHANG Meiling^{1a}, WANG Yifan^{1c}, WANG Qiangfeng², LI Gonghua^{1a*} (1. Tongde Hospital of Zhejiang Province, a. Department of Pharmacy, b. Department of Hematology, c. Cancer Institute of Integrative Medicine, Hangzhou 310012, China; 2. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the transcriptome of multiple myeloma(MM) affected by hypoxia and obtain the differential expressed genes(DEGs), which facilitate the mechanism of cellular hypoxic resistance. **METHODS** The expression profile of MM cell lines cultured under hypoxia and CD38 positive cells derived from patient bone marrow was obtained from GEO database. The DEGs with high consistent under hypoxia were analyzed by Limma package. GO and KEGG analysis were performed on the DEGs. Additionally, the expression levels of the DEGs on MM patient survival were studied by TCGA database. Finally, the potential drugs against hypoxia were predicted by the DEGs. **RESULTS** Totally 28 consistent DEGs were selected from the two datasets, which involved in cell metabolism, mitochondrial structure, autophagy and etc. These DEGs might contribute to the pro-survival effect in MM under hypoxia. The high expression of *ANXA1*, *CLU*, *DPYSL3*, *CEP128*, *DDIT4*, *HMGCS1* suggested poor prognosis in MM patients which shorten the survival periods. The CMap analysis suggested that PARP inhibitors could be used as a hypoxic antagonist. **CONCLUSION** DEGs under hypoxia in MM were obtained by bioinformatic analysis, some of which indicated the poor prognosis in MM patients. This may be associated with the pro-survival effect of hypoxia in tumor cells. PARP inhibitors may be used to inhibit the negative effect of hypoxia and combined with other chemotherapeutic drugs to achieve better therapeutic effect in MM.

KEYWORDS: multiple myeloma; hypoxia; tumor microenvironment; transcriptome; bioinformatics

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种好发于中老年人群的恶性浆细胞肿瘤, 在血液系统恶性肿瘤中排第 2 位, 目前尚无治愈的方法。

随着中国社会老龄化, MM 的危害形势日益严峻。近年来研究发现肿瘤微环境与肿瘤细胞耐药、转移及血管新生等密切相关, 特别是缺氧微环境是

基金项目: 浙江省科技计划项目(2016F10026); 浙江省自然科学基金项目(LQY20H300001); 浙江省中医药科技计划项目(2019ZB028); 浙江省医药卫生科技计划面上项目(2018KY396); 浙江省药学会医院药学专项科研资助项目(2020ZYY25)

作者简介: 李颖, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0571)89972240 E-mail: liying19831121@163.com *通信作者: 李功华, 男, 主任药师 Tel: (0571)89972236 E-mail: ligonghua88@163.com

大部分肿瘤预后差的标志,其中缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是关键转录因子,参与调控缺氧环境下细胞表达谱的变化^[1]。

骨髓本身被认为处于缺氧微环境中,而MM细胞发生于骨髓,因此缺氧可能对MM的发生、进展产生重大影响^[2]。本研究利用公共数据库收集缺氧对MM细胞影响的研究,利用生物信息学的方法,筛选缺氧环境下MM的差异基因,探讨差异基因的功能及对MM患者生存的影响。最后通过这些差异基因寻找可能逆转缺氧影响的潜在药物,为克服缺氧环境提供新的策略。

1 方法

1.1 公共数据集的筛选

以关键词“hypoxia”和“multiple myeloma”从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)筛选并下载2个MM在缺氧培养下的基因表达谱数据集GSE110113(GPL6244平台)和GSE80545(GPL17077平台)。利用GEOquery包下载2个数据集的表达矩阵,GEO数据库说明提示表达矩阵已进行标准化处理,消除样本间的差异。

1.2 差异基因筛选

根据GEO数据库的GPL探针注释文件首先将表达矩阵的探针名转换为基因名,对于一个基因名存在重复对应探针的情况,使用多个探针中的最大值。利用R语言Limma包分析缺氧和常氧培养下的差异基因。满足表达倍数2倍以上 $[\log_2(\text{Foldchange}) > 1]$ 并且 P 值 < 0.05 的认为是缺氧相关的差异基因。

1.3 差异基因功能富集及注释

利用DAVID数据库分析缺氧相关差异基因富集的KEGG信号通路和GO功能(<https://david.ncifcrf.gov>)。GO注释从生物过程(biological process, BP),细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3部分分析差异基因可能的生物学功能。

1.4 生存分析

从TCGA数据库的MM项目(MMRF-COMMPASS)下载MM患者的临床信息和表达谱数据(<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/MMRF-COMMPASS>)。该项目提供787例患者的临床信息(含生存时间)以及表达谱数据。利用survival和survminer包计算缺氧差异基因表达高低与MM患者生存时间的关系。

1.5 CMAP 分析

利用CMAP数据库(<https://clue.io>)预测差异基因相关的化合物。选择正负相关性最高的10种化合物,分析其与缺氧环境的关系。

2 结果

2.1 符合条件的数据集信息

数据集GSE110113选用4种MM细胞株(RPMI8226、KMS11、U266、IM9)缺氧条件(1% O₂)下培养24 h,常氧条件(20% O₂)下培养为对照,芯片平台为Affymetrix GeneChip® human Gene 2.0 ST Array。不同处理下,每种细胞株均有2个重复。数据集GSE80545使用MM患者(共4人)骨髓来源CD38阳性细胞在缺氧条件下培养48 h,对照组为同样CD38阳性细胞常氧培养,缺氧组和对照组各4个重复,芯片平台为Agilent-039494 SurePrint G3 Human GE v2 8x60K Microarray。

2.2 缺氧下MM差异基因的数量与表达

首先对数据集GSE110113的原始表达矩阵以热图形式展示(图1A),红色为高表达基因,蓝色为低表达基因。聚类结果显示,缺氧处理在同种细胞株聚类明显,说明缺氧可以对基因表达造成影响,但是细胞之间的本身差异大于缺氧处理,可以明显观察到相同的细胞株更易聚类。表明不同细胞株对缺氧环境的响应性可能不同。

Limma包分析不同细胞株的差异基因结果见图1B和图1C:大部分基因变化范围在1~4倍(logFC 1~2),幅度变化在4~8倍(logFC 2~3)的也较常见,但大幅度变化的基因(logFC ≥ 3)在各细胞株中均不多。

除了RPMI8226细胞,其余3种MM细胞株的上调基因数量和幅度均大于下调基因数。其中U266和IM9细胞株对缺氧具有较明显的反应,而KMS11细胞对缺氧环境反应较小,差异基因数非常少,仅有17个上调基因和6个下调基因。RPMI8226细胞的下调基因数量大于上调基因数,可能与其他细胞存在较大差异。

2.3 缺氧对不同MM细胞株差异基因的影响

以火山图展示4株MM细胞的差异基因(图2A):红色点代表上调基因,蓝色点代表下调基因,黄色为稳定基因。改变最为显著的6个基因标示如下:RPMI8226细胞中PAGE1、IL2RG、CD48、GATM、CAPN6显著上调,SNORD113-4显著下调;

KMS11 细胞中 *BNIP3*、*LGMN*、*TXNIP*、*PFKFB3*、*P4HA1*、*DDIT4* 显著上调；U266 细胞中 *DOCK10*、*AK4*、*LAPTM5*、*TXNIP*、*TEMN3*、*MUSK* 显著上调；IM9 细胞中 *CNBD1*、*ROBO2*、*BMP4* 显著上调，*AFAP1-AS1*、*HMGCS1*、*ME1* 显著下调。韦恩图对几种细胞共同的差异基因进行展示(图 2B)，

结果表明，不同 MM 细胞株在缺氧处理后差异基因的种类存在较大差异，仅有少部分存在共性，这些在缺氧处理后表达一致性较好的基因可能对 MM 细胞耐受缺氧环境发挥重要作用。由于 KMS11 细胞的差异基因数量太少，未放入韦恩图展示。

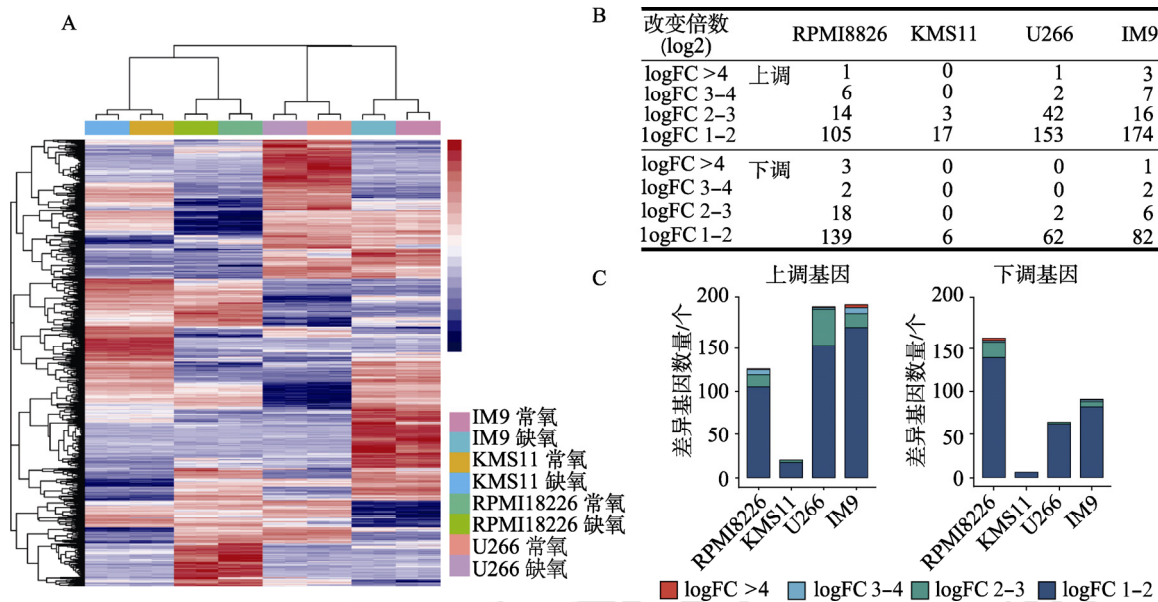


图 1 缺氧处理下不同 MM 细胞株的差异基因 A-原始表达矩阵热图；B-差异基因的显著性/数量统计；C-差异基因数量柱状图。

Fig. 1 Differential expressed genes of MM cell lines under hypoxia

A-heatmap of original expression; B-significance/quantity statistics of differential expressed genes; C-bar plot of the number of differential expressed genes.

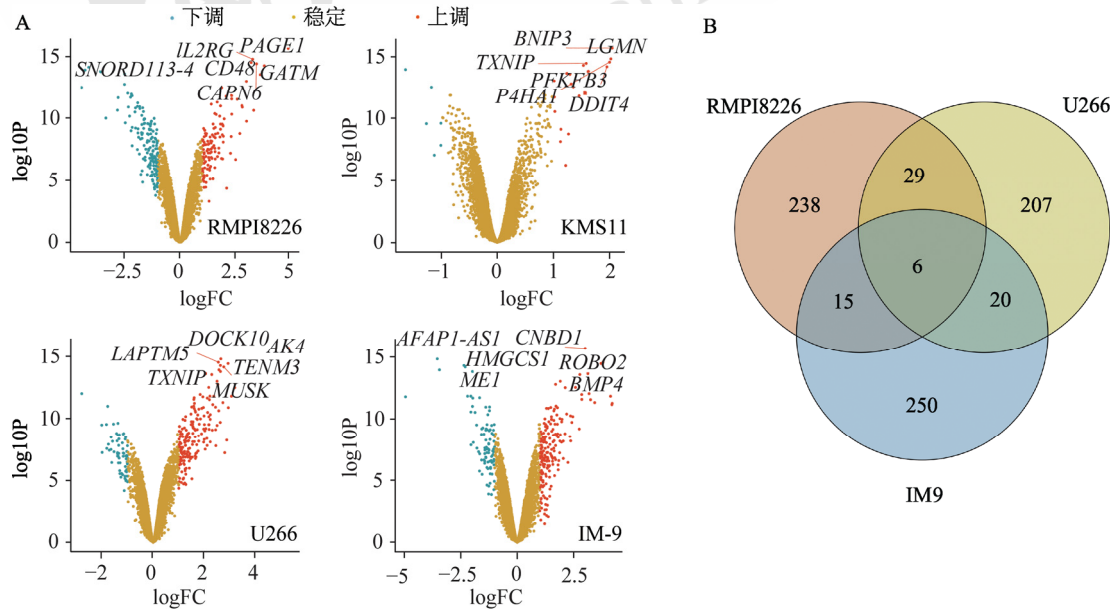


图 2 MM 细胞株缺氧处理后差异基因的火山图(A)和不同细胞株差异基因的韦恩图(B)

Fig. 2 Differential expressed genes of MM cell lines under hypoxia Volcano plot(A) and Venn plot(B) of different expressed genes of cell lines

为了获得在不同 MM 细胞株之间一致性较好的差异基因,筛选了在 ≥ 2 株 MM 细胞中都存在显著差异的基因,结果见表 1。在 4 株细胞中都存在显著差异的仅有 *BNIP3* 和 *NDRG1*, 大部分差异基因只在 2 种细胞中存在一致性。后续的富集分析对这部分缺氧共同响应的基因进一步研究。

表 1 在不同 MM 细胞株具有一致表达的差异基因
Tab. 1 Consistent differential expressed genes among different MM cell lines

一致表达基因的数量	差异基因名
4	<i>BNIP3</i> , <i>NDRG1</i>
3	<i>AK4</i> , <i>ALDOC</i> , <i>HMGCS1</i> , <i>LGMN</i> , <i>LSS</i> , <i>P4HA1</i> , <i>PFKFB4</i>
2	<i>ALOX5AP</i> , <i>ANXA1</i> , <i>BAMBI</i> , <i>BNIP3L</i> , <i>CEP128</i> , <i>CLMN</i> , <i>CLU</i> , <i>DDIT4</i> , <i>DPY19L2P2</i> , <i>DPYSL3</i> , <i>GBE1</i> , <i>HAVCR2</i> , <i>HMOX1</i> , <i>KDM3A</i> , <i>PAM</i> , <i>PDK1</i> , <i>PPP4R3C</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>SLCO2B1</i> , <i>TXNIP</i> , <i>ZNF716</i>

2.4 缺氧影响下的差异基因相关信号通路及 MF

DAVID 数据库的 GO 分析结果表明大部分差异基因功能归类于 BP 或 CC。从 BP 看,差异基因主要参与了细胞对缺氧的响应,以及细胞周期,凋亡,自噬等;从 CC 看,细胞的线粒体发生明显变化,包括线粒体膜蛋白及代谢蛋白都发生了改变。此外,细胞膜、细胞浆、内质网也发生了变化,结果见图 3。值得注意的是,缺氧处理下细胞分泌外泌体也有显著变化。

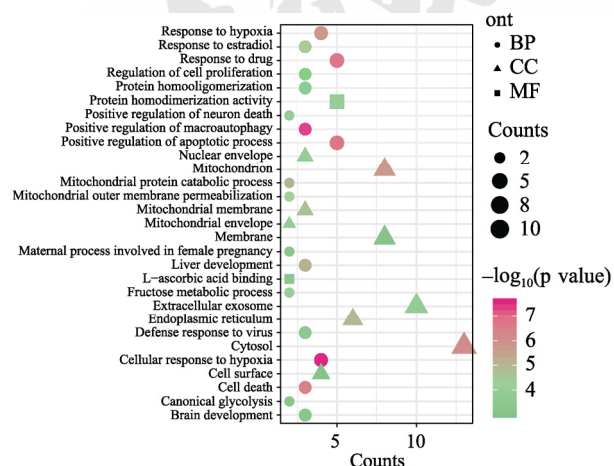


图 3 差异基因的 GO 富集分析
Fig. 3 GO analysis of differential expressed genes

KEGG 分析富集到的信号通路并不多,代谢有关信号通路明显富集,缺氧相关的明星通路 HIF1 也有显著改变,此外富集到的信号通路还有果糖甘露糖代谢,肿瘤碳代谢等,结果见图 4。提示缺氧条件下 MM 细胞代谢途径发生改变。

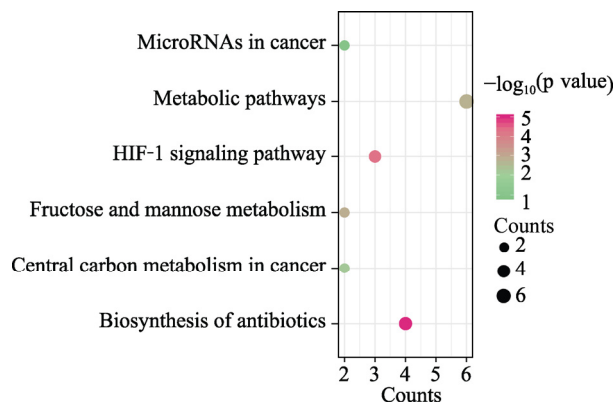


图 4 差异基因的 KEGG 富集分析
Fig. 4 KEGG analysis of differential expressed genes

2.5 缺氧对骨髓来源 CD38⁺细胞的影响

同样方法分析缺氧条件下 MM 患者骨髓来源 CD38⁺细胞的差异基因,火山图结果显示患者来源细胞对缺氧也具有较高的响应性,上调基因数量也大于下调基因,结果见图 5A。将表 1 从细胞株筛选到的差异基因与患者来源骨髓细胞进行比较,进一步获得细胞株与人体对缺氧响应性较一致的基因,结果以热图展示,见图 5B。MM 患者来源的细胞大部分表现与 MM 细胞株较一致,其对缺氧的差异基因表达谱与 KMS11、U266 这 2 株细胞最为相似,而与 RPMI8226 细胞相差最大,这与之前对细胞株差异基因的统计结果一致。

2.6 缺氧相关基因对预后的影响

TCGA 数据库的 MMRF 项目提供了大量 MM 患者的临床资料、表达谱以及基因突变的数据(临床信息见表 2)。基因按其表达水平分为 2 类(高于中位数为高表达,低于中位数为低表达,单位: FPKM)。将图 5B 筛选获得差异基因按表达量高低计算其与 MM 患者生存率的关系。按 *P* 值显著性分类结果见表 3: *CLU*、*DDIT4* 高表达极显著降低生存时间($P<0.001$); *ANXA1*、*DPYSL3* 高表达很显著降低生存时间($P<0.01$); *BAMBI*、*CEP128*、*DPY19L2P2*、*GBE1*、*HMGCS1* 高表达显著降低生存时间($P<0.05$)。部分基因低表达反而造成预后差: *PAM*($P<0.001$), *ALDOC*、*CLMN*、*HMOX1*、*PDK1*($P<0.05$)。还有部分基因的水平与患者生存没有显著联系,但其中 *ALOX5AP*($P=0.22$), *BNIP3L*($P=0.11$)的高表达也有降低生存的趋势,但尚未达到显著水平。总体而言,大部分缺氧差异基因的高表达是 MM 患者预后差的标志,这些基因的高表达可能促进肿瘤细胞在缺氧环境中的存活。

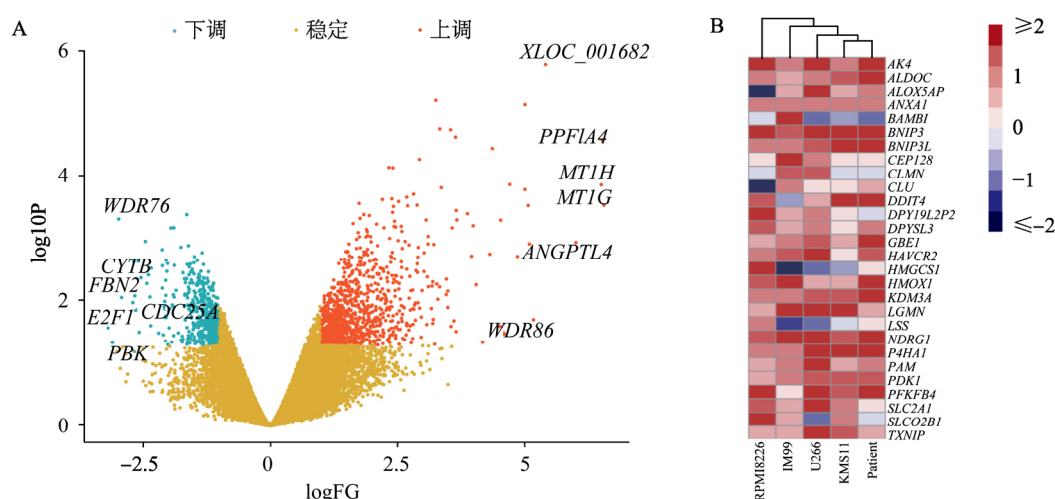


图5 MM患者骨髓来源CD38⁺细胞缺氧下差异基因的火山图(A)和差异基因的热图展示(B)

Fig. 5 Differential expressed genes of CD38⁺ cells derived from MM patients under hypoxia(A) and Volcano plot heatmap(B)

表2 TCGA数据库患者信息

项目	生存(n=624)	死亡(n=163)	总体(n=787)
性别			
女	272(43.6)	53(32.5)	325(41.3)
男	352(56.4)	110(67.5)	462(58.7)
年龄			
平均值(标准差)	62.6(10.1)	67.1(11.3)	63.6(10.6)
中位数[最小, 最大]	63.1[27.8, 88.6]	67.2[37.0, 88.1]	63.6[27.8, 88.6]
缺失	32(5.1)	2(1.2)	34(4.3)
阶段			
I	242(38.8)	24(14.7)	266(33.8)
II	219(35.1)	57(35.0)	276(35.1)
III	148(23.7)	75(46.0)	223(28.3)
缺失	15(2.4)	7(4.3)	22(2.8)

表3 缺氧差异基因表达水平与MM患者生存时间的关系
Tab. 3 Relationship between hypoxic differential expressed genes and survival of MM patients

基因表达与预后关系	P值	基因名
高表达/预后差	<0.001	CLU, DDIT4
	<0.01	ANXA1, DPYSL3
	<0.05	BAMBI, CEP128, DPY19L2P2, GBE1, HMGCS1
低表达/预后差	<0.001	PAM
	<0.01	/
	<0.05	ALDOC, CLMN, HMOX1, PDK1
无关联	>0.05	AK4, ALOX5AP, BNIP3, BNIP3L, HAVCR2, KDM3A, LGMN, LSS, NDRG1, P4HA1, PFKFB4, SLC2A1, TXNIP

缺氧相关差异基因的生存曲线(红色为高表达, 蓝色为低表达生存曲线), 结果见图6。ANXA1、CLU、DPYSL3、CEP128、DDIT4、HMGCS1的高表达均非常显著地减少了生存时间。同时检验了

缺氧信号通路明星分子HIF1A对MM患者预后的影响, 发现其高表达同样显著降低患者生存, 但是另一个缺氧诱导基因HIF3A未对MM患者生存造成显著影响。这表明缺氧环境可能会导致MM患者预后变差, 特别存在显著差异的ANXA1、CLU、DPYSL3、CEP128、DDIT4、HMGCS1这些基因可能在缺氧诱导的肿瘤生存中发挥重要作用。

2.7 基于差异基因的抗缺氧药物预测

CMAP数据库可通过差异基因变化趋势预测小分子药物对细胞的作用, 得分为正值表明药物显示与差异基因一致的作用, 产生协同效应; 而得分为负值则提示药物可能产生与差异基因相反的调控作用, 产生拮抗效应。

PARP抑制剂已进入临床使用, 目前, 在卵巢癌和乳腺癌2个领域均获批。大部分PARP抑制剂引起模型细胞表达谱变化与缺氧环境呈显著负相关, 表明PARP抑制剂可能负向调控缺氧相关信号通路。PARP类药物可对缺氧诱导基因产生拮抗作用(得分为负值), 而HIF激活剂产生诱导作用与缺氧环境下的基因表达谱一致(得分为正值), 这与设想一致。而大部分PARP类药物都显示出缺氧诱导基因表达谱较高的负相关性, 提示其对缺氧信号通路可能存在反向调控作用, 结果见表4。这提示PARP类药物可能具备抑制缺氧环境的作用, 可与其他药物合用逆转缺氧环境导致的肿瘤耐药, 转移等问题。其中鲁卡帕利显示出最高的负相关性, 且在国外已有上市产品, 可能具备缺氧抑制剂的应用前景, 见表5。

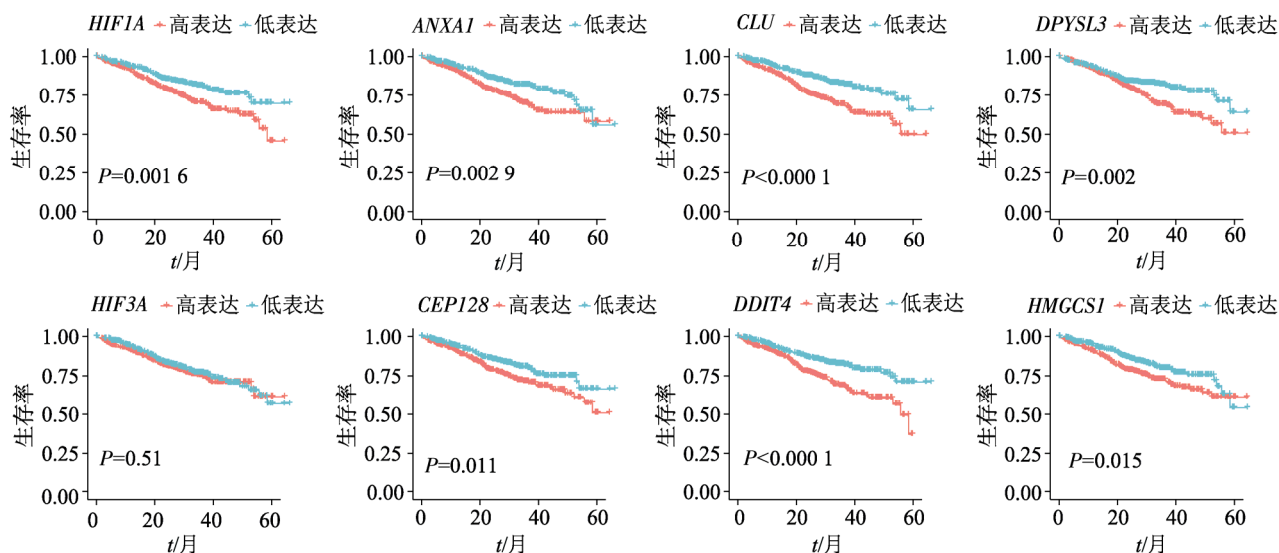


图6 缺氧相关基因与MM患者生存时间的关系

Fig. 6 Relationship between hypoxia related genes and survival time of MM patients

表4 与缺氧基因表达谱正向、反向相关排名前5位的药物
Tab. 4 Top 5 drugs with positive and negative correlation with hypoxia gene expression profile

得分	化合物类别
100	V 型 ATP 酶功能缺失突变
100	HIF 活化剂
99.99	维生素 D 受体激动剂
99.98	BCL 抑制剂
99.8	TGF- β 受体抑制剂
-99.52	丝氨酸蛋白酶获得功能突变
-99.67	PARP 抑制剂
-99.95	P38 MAPK 抑制剂
-100	转录中介功能缺失突变
-100	细菌 DNA 螺旋酶抑制剂

表5 PARP 抑制剂与缺氧基因表达的相关性

Tab. 5 Relationship of PARP inhibitors and hypoxia gene expression

得分	PARP 抑制剂名称
98.35	Olaparib(奥拉帕利)
54.86	IWR-1-ENDO
20.73	Phenanthridone
-29.36	DR-2313
-38.86	NU-1025
-61.80	CS-1657
-82.72	AG-14361
-85.35	3-amino-benzamide
-95.85	Veliparib
-98.91	PJ-34
-99.86	Rucaparib(鲁卡帕利)

3 讨论

缺氧在实体肿瘤中研究相对较多，实体肿瘤中细胞生长代谢迅速但缺乏有效血管化，其高氧耗无法得到满足，从而导致肿瘤深部严重缺氧，进而诱导耐药发生、肿瘤转移、血管新生等^[3]。缺氧环境下，HIF 降解减少并在胞内累积，可以增强下游靶基因血管内皮生长因子及耐药蛋白 Pgp 表达增加，引起血管增生和耐药增强^[4]。也有研究认为缺氧微环境为肿瘤干细胞的生存提供了条件，缺氧环境下肿瘤细胞可通过增加自噬的途径提高对化疗药物的抗性，促进其存活^[5]。目前关于缺氧与非实体瘤的研究相对较少，MM 属于血液肿瘤，然而其大部分存在骨髓中，骨髓也属于缺乏氧供的部位^[6]，因此研究缺氧对 MM 细胞的影响同样必要，可为 MM 的治愈提供线索^[2,7]。

通过生物信息学的方法，发现 4 株 MM 细胞的表达谱在缺氧环境下都发生变化，但是响应性明显不同。不同 MM 细胞的基因表达谱本身存在较大差异，此外，MM 染色体不稳定存在超二倍体及非超二倍体等亚型，均可能对 MM 缺氧耐受性造成影响。因此探寻不同 MM 细胞中存在一致性的差异基因可能是调控缺氧相关信号通路的关键性基因。本研究对细胞株来源和 MM 患者来源的 2 种数据集进行了探索，共筛选到了 28 个存在一致性的差异基因，并通过 GO 和 KEGG 分析探索其可能的功能，发现这些基因确实与缺氧响应密切相关，并且参与细胞代谢途径的改变，此外从 CC 看线粒体相关基因发生了明显改变。在常氧

条件下,细胞可进行有氧呼吸,更有效地利用葡萄糖,但缺氧条件下,细胞被迫转入糖酵解途径,对糖分的利用率相对降低。因此,在缺氧条件下,细胞的碳代谢会发生改变,但是也有研究发现部分肿瘤细胞即使在氧供充足的条件下,仍优先使用糖酵解途径,该现象被称为 Warburg 效应,可导致肿瘤耐药与侵袭性增强^[8]。果糖代谢在 GO 和 KEGG 中都提示显著上调,近年来研究发现其也是一种应激环境下的保护机制^[9]。GO 分析还提示 MM 细胞缺氧条件下大自噬明显上调,这可能与 MM 的缺氧耐受有关。多项研究显示,自噬能提高一些肿瘤细胞对化疗药物的抗性,促进其在恶劣条件下生存^[10-11]。这些结果提示差异基因可能通过代谢途径改变以及自噬帮助细胞耐受缺氧等环境,提高肿瘤细胞的生存能力。

为了进一步研究这些差异基因与 MM 患者预后的关系,考察了基因表达与生存时间的关系,发现部分缺氧相关差异基因的高表达导致生存期缩短,这些基因可能是缺氧环境导致预后变差的关键。*CLU* 和 *DDIT4* 高表达极显著降低生存时间。*CLU* 是一种 75~80 kDa 的蛋白,与细胞凋亡和碎片吞噬有关。在应激条件下(如放/化疗),过表达 *CLU* 可以产生抗凋亡的作用从而保护细胞。*CLU* 在多种肿瘤细胞中存在过表达现象,可能帮助肿瘤逃逸并存活^[12]。多项研究表明,缺氧可导致 *CLU* 上调,而一项低压缺氧的模拟试验显示,人体在 30 min 的缺氧刺激下血清中 *CLU* 水平即显著上升,提示 *CLU* 上调可能通过抗凋亡帮助细胞耐受缺氧^[13]。*DDIT4* 调控细胞增殖与生存,同样与细胞的应激反应有关,可通过 DNA 修复产生保护作用。Foltyn 等^[14]发现 *DDIT4* 对胶质母细胞瘤有保护作用,*DDIT4* 基因敲减可以使肿瘤细胞对缺氧敏感,而 *DDIT4* 过表达则细胞克隆形成能力增强,对替莫唑胺、放疗和缺氧的耐受性均提高。*DDIT4* 还可以发挥对 HIF1A 的调控作用,因此其可能在缺氧相关信号通路中发挥重要作用^[15]。目前,*CLU* 和 *DDIT4* 在 MM 中的作用尚未见研究,而根据对缺氧下 MM 的多个数据集分析,表明这 2 个基因可能发挥重要作用,可作为抗缺氧治疗的潜在靶点,或缺氧状态的分子标志并预测 MM 患者预后。

CMAP 数据库分析发现以下 PARP 抑制剂类药物可对缺氧诱导基因产生抑制作用。研究表明,

PARP1 与 HIF-1 结合能激活 HIF-1 依赖的基因表达,PARP 缺失细胞的 HIF-1 活性下降,提示 PARP 抑制剂可能通过调控 HIF-1 抑制缺氧相关信号通路^[16]。另一方面,PARP 抑制剂可增加化疗或放疗敏感性^[15]。对 MM 的研究显示, PJ34(PARP 抑制剂)可以逆转 MM 细胞对美法仑的耐药性^[17]。Viziteu 等^[7]发现缺氧抑制剂 Chetomin 具有较好的抗 MM 效果,表明抑制缺氧也是 MM 治疗的可行策略之一。本研究结合 CMAP 数据库与缺氧下差异基因,发现 PARP 抑制剂可能抑制 HIF 信号通路,可为其在 MM 的应用提供理论依据。

综上所述,本研究利用生物信息学的方法对缺氧影响的 MM 基因表达谱进行了探索,筛选了缺氧调控的关键基因,探讨这些差异基因的功能及对 MM 患者生存的影响,最后预测获得逆转缺氧的潜在药物,为克服缺氧环境提供新的策略。

REFERENCES

- [1] YE I C, FERTIG E J, DIGIACOMO J W, et al. Molecular portrait of hypoxia in breast cancer: A prognostic signature and novel HIF-regulated genes[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(12): 1889-1901.
- [2] FILIPPI I, SALTARELLA I, ALDINUCCI C, et al. Different adaptive responses to hypoxia in normal and multiple myeloma endothelial cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(1): 203-212.
- [3] HORSMAN M R, VAUPEL P. Pathophysiological basis for the formation of the tumor microenvironment[J]. *Front Oncol*, 2016(6): 66. Doi: 10.3389/fonc.2016.00066.
- [4] HARRISON H, PEGG H J, THOMPSON J, et al. HIF₁-alpha expressing cells induce a hypoxic-like response in neighbouring cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 674. Doi: 10.1186/s12885-018-4577-1.
- [5] ROTHE K, PORTER V, JIANG X Y. Current outlook on autophagy in human leukemia: Foe in cancer stem cells and drug resistance, friend in new therapeutic interventions[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 461. Doi: 10.3390/ijms20030461.
- [6] ELIASSON P, JÖNSSON J I. The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(1): 17-22.
- [7] VIZITEU E, GRANDMOUGIN C, GOLDSCHMIDT H, et al. Chetomin, targeting HIF-1 α /p300 complex, exhibits antitumour activity in multiple myeloma[J]. *Br J Cancer*, 2016, 114(5): 519-523.
- [8] ICARD P, SHULMAN S, FARHAT D, et al. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells?[J]. *Drug Resist Updat*, 2018(38): 1-11.
- [9] ALVA N, ALVA R, CARBONELL T. Fructose 1, 6-bisphosphate: A summary of its cytoprotective mechanism

- [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(39): 4396-4417.
- [10] YANG X Y, YIN H B, ZHANG Y Z, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes gemcitabine resistance in human bladder cancer cells through hypoxia-inducible factor 1 α activation[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(1): 215-224.
- [11] MINASSIAN L M, COTECHINI T, HUITEMA E, et al. Hypoxia-induced resistance to chemotherapy in cancer[J]. *Hypoxia Cancer Metastasis*, 2019(1136): 123-139
- [12] MING X, BAO C Y, HONG T, et al. Clusterin, a novel DEC1 target, modulates DNA damage-mediated cell death[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(11): 1641-1651.
- [13] HINKELBEIN J, JANSEN S, IOVINO I, et al. Thirty minutes of hypobaric hypoxia provokes alterations of immune response, haemostasis, and metabolism proteins in human serum[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1882. Doi: 10.3390/ijms18091182.
- [14] FOLTYN M, LUGER A L, LORENZ N I, et al. The physiological mTOR complex 1 inhibitor DDIT4 mediates therapy resistance in glioblastoma[J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(5): 481-487.
- [15] GHARIBI B, GHUMAN M, HUGHES F J. DDIT4 regulates mesenchymal stem cell fate by mediating between HIF1 α and mTOR signalling[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 36889. Doi: 10.1038/srep36889.
- [16] ELSEER M, BORSIG L, HASSA P O, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes tumor cell survival by coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(2): 282-290.
- [17] XIONG T, WEI H, CHEN X Q, et al. PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) inhibitor, reverses melphalan-resistance and inhibits repair of DNA double-strand breaks by targeting the FA/BRCA pathway in multidrug resistant multiple myeloma cell line RPMI8226/R[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1): 223-232.
- 收稿日期: 2020-02-25
(本文责编: 沈倩)