

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.05.006

· 临床研究 ·

## 整合多数据库分析 PM20D1 基因与弥漫大 B 细胞淋巴瘤缺氧相关性及其预后的关系

张园园<sup>1,2</sup>, 潘静<sup>2</sup>, 李光明<sup>1</sup>, 焦霞霞<sup>3</sup>, 赵文理<sup>2</sup>(1. 安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232000; 2. 上海市奉贤区中心医院血液内科, 上海 201499; 3. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000)

**[摘要]** **目的:**探讨肽酶 M20 结构域 1 (peptidase M20 domain containing 1, PM20D1) 在人弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphomas, DLBCL) 细胞中的表达及其与缺氧相关性和预后的关系。 **方法:**通过 GDC、TCGA、GTEx 公共数据库分析 PM20D1 表达对 DLBCL 细胞增殖、迁移和凋亡的影响及其与患者预后的关系。通过对不同分组患者的富集分析及 PM20D1 与 CD274 相关性分析验证 PM20D1 是否为 DLBCL 的缺氧相关基因; 采用 ChEA、ENCODE 和 hTFtarget 数据库分析上游调控 PM20D1 表达的转录因子 (TF) 和 miRNA, 以及差异表达 PM20D1 与化疗药物敏感性的关系。采用 WB 法检测 PM20D1 在正常淋巴细胞和 DLBCL 细胞中的表达水平, 通过设计 PM20D1 的 siRNA 序列敲减目的基因, 并采用 qPCR 和 WB 法检测验证 SUDHL2 和 SUDHL10 细胞中 PM20D1 的敲减效率, 采用 CCK-8 法和 Transwell 实验分别检测敲减 PM20D1 对细胞增殖和迁移能力的影响, 流式细胞术检测细胞凋亡水平。 **结果:**PM20D1 在 DLBCL 组织中高表达且患者预后差 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 富集分析显示, PM20D1 高表达组与 ssGSEA 高分组主要涉及细胞电耦合通讯、甘油三酯代谢过程调节和细胞质翻译起始复合物过程, 且 PM20D1 表达与免疫检查点 CD274 表达呈正相关 ( $P < 0.01$ ,  $r = 0.757$ )。在 SUDHL2 和 SUDHL10 细胞中敲减 PM20D1 后, 细胞的增殖和迁移均显著降低 (均  $P < 0.05$ ), 细胞凋亡明显增加 ( $P < 0.05$ )。 **结论:**PM20D1 基因在 DLBCL 组织和细胞中高表达且与患者预后密切相关; PM20D1 可能通过促进 DLBCL 细胞的增殖、迁移并抑制凋亡, 从而促进 DLBCL 的发生发展。

**[关键词]** 肽酶 M20 结构域 1 (PM20D1); 弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL); 肿瘤缺氧; 增殖; 迁移; 凋亡

**[中图分类号]** R733.4; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)05-0401-11

## The relationship between PM20D1 gene and hypoxia and prognosis in diffuse large B-cell lymphoma was analyzed by integrating multiple databases

ZHANG Yuanyuan<sup>1,2</sup>, PAN Jing<sup>2</sup>, LI Guangming<sup>1</sup>, JIAO Xiaxia<sup>3</sup>, ZHAO Wenli<sup>2</sup> (1. Medical College, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232000, Anhui, China; 2. Department of Hematology, Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201499; 3. Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of peptidase M20 domain 1 (PM20D1) in human diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) cells and its relationship with hypoxia and prognosis. **Methods:** The effects of PM20D1 expression on proliferation, migration and apoptosis of DLBCL cells and its relationship with patients' prognosis were analyzed through GDC, TCGA and GTEx public databases. The enrichment analysis of patients in different groups and the correlation analysis between PM20D1 and CD274 were used to validate whether PM20D1 was the hypoxia-related gene of DLBCL. ChEA, ENCODE and hTFtarget databases were used to analyze the transcription factors (TFs) and miRNAs that upstream regulate PM20D1 expression and the relationship between differential expression of PM20D1 and chemotherapeutic drug sensitivity. The expression level of PM20D1 in normal lymphocytes and DLBCL cells was detected by WB method, the target gene was reduced by the siRNA sequence of PM20D1, and the knockdown efficiency of PM20D1 in SUDHL2 and SUDHL10 cells was verified by qPCR and WB methods. The effect of PM20D1 on cell proliferation and migration ability after knockdown was detected by CCK-8 method and Transwell assays, respectively, and the apoptosis level was detected by flow cytometry. **Results:** PM20D1 was highly expressed in DLBCL tissues and was correlated with a poor prognosis ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Enrichment analysis showed that the PM20D1 high expression group and high ssGSEA score group were mainly involved in cellular electrocoupling communication, triglyceride metabolism process regulation and cytoplasmic translation initiation complex process, and PM20D1 expression was positively correlated with CD274 expression at immune

**[基金项目]** 上海市卫生健康委员会重点科研项目 (No. 201640028)

**[作者简介]** 张园园 (1996—), 女, 硕士生, 主要从事弥漫大 B 细胞淋巴瘤靶向治疗的临床研究, E-mail: yyz\_96@163.com

**[通信作者]** 赵文理, E-mail: wenlizhao69@163.com

checkpoint ( $P < 0.01$ ,  $r = 0.757$ ). After knocking down PM20D1 in SUDHL2 and SUDHL10 cells, the proliferation and migration of cells decreased significantly (all  $P < 0.05$ ), and apoptosis increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PM20D1 gene was highly expressed in DLBCL tissues and cells, and is closely related to patient prognosis. PM20D1 may promote the occurrence and development of DLBCL by promoting the proliferation, migration and inhibiting the apoptosis of DLBCL cells.

**[Key words]** peptidase M20 domain containing 1 (PM20D1); diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL); tumor hypoxia; proliferation; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(5):401-411. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2023.05.006]

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 是成人非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 中最常见的一种类型, 约占所有恶性淋巴瘤的 40%。患者通常表现为进行性淋巴结肿大、淋巴结外病变或两者兼有。虽然一部分患者可以通过前期联合治疗 R-CHOP 方案 (利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松) 治愈, 但对于前期治疗未缓解或缓解后复发的患者而言, 预后较差<sup>[1-3]</sup>。DLBCL 是一种临床和遗传异质性疾病, 目前临床上根据细胞起源的不同将其分为生发中心 B 细胞样 (GCB), 活化 B 细胞样 (ABC) 和无法分类三种亚型。随着精准医学的发展, 最近多平台基因组使用聚类方法揭示了 DLBCL 遗传亚型的存在, 其根据遗传特征将已患有 DLBCL 的患者在细胞起源不同的基础上又将其分为七种遗传亚型, 这些遗传亚型参与不同的致癌途径以及具有不同的基因表达谱、免疫微环境、存活率和潜在的治疗靶点<sup>[4-5]</sup>。因此, 需要进一步研究发现 DLBCL 新的标志物和治疗靶点以不断提高患者的生存率。肽酶 M20 结构域 1 (peptidase M20 domain containing 1, PM20D1) 是一种分泌酶, 其在 DLBCL 中的研究目前鲜见报道。本研究通过全面分析 DLBCL mRNA-seq 图谱, 包括基因差异分析、生存分析、基因集富集分析和免疫浸润分析等, 致力于探索 PM20D1 在 DLBCL 中更多的表达特征和潜在的生物学信息, 并结合体外细胞实验进一步探索有价值的生物标记物。

## 1 资料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

人正常淋巴细胞 HMy2、CIR、人 DLBCL 细胞 SUDHL2、SUDHL4、SUDHL10、DB、Farage 均购自上海酶研生物科技有限公司。MolPure@CellRNAKit 培养细胞 RNA 提取试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司, 逆转录试剂盒、SYBR Green 预混混型 qPCR 试剂盒 (AG11718) 均购自艾科瑞生物公司, PM20D1、GAPDH 引物序列由上海生物工程有限公司构建, RIPA 裂解液购自新赛美生物科技有限公司, BCA 蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, SDS-PAGE 试剂盒购自上海雅酶生物医药科技

有限公司, siRNA 及 siRNA-PM20D1 购自上海吉玛基因有限公司, Lipofectamine™ 3000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, 兔源性 PM20D1 一抗抗体购自 Novus 公司、鼠源性 GAPDH 一抗抗体购自 Proteintech 公司, HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗抗体购自碧云天公司, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自诺唯赞公司, CCK-8 试剂购自 APEX BIO 公司, Transwell 小室购自 Corning 公司。

### 1.2 数据获取与处理

从 GDC (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 和 TCGA 数据库中下载 DLBCL 的临床、RNA 测序及变异数据, 从 GTEx 数据库中下载对应正常组织的 mRNA-seq 数据及分组信息。获取信息如下: TCGA 数据库中包括 48 个 DLBCL 样本, GTEx 中包括 929 个正常组织样本。用 edgeR<sup>[6]</sup> 包中的 CPM 将 counts 数据标准化为 CPM 数据。

### 1.3 差异表达基因测定和单样本基因集富集分析 (ssGSEA)

根据 DLBCL 中各基因表达量及缺氧相关基因集, 利用 GSVA<sup>[7]</sup> 包中的 ssGSEA 法对 48 个 DLBCL 组织样本进行 ssGSEA。最终得到各组织样本对应缺氧基因集的 ssGSEA 得分, 并根据 ssGSEA 得分中位数将样本分为高、低评分两组。利用 edgeR 包对整合的 48 个肿瘤组织样本和 929 个正常组织样本及 ssGSEA 高、低评分组进行基因差异表达分析 (差异参数  $FC \geq 1.5$ ,  $P < 0.05$ )。

### 1.4 ssGSEA 高、低分组与 DLBCL 患者的生存关系分析

利用 survival 包, 根据不同分组信息及临床数据进行生存分析。采用 Log-Rank 法比较不同分组的生存差异。构建单基因数据集 ROC 生存曲线, 分析基因与疾病的预测能力。

### 1.5 免疫浸润丰度 (CIBERSORT) 及基因富集分析 (GSEA)

首先根据癌症组织样本表达量, 基于 R 语言 (版本 v.4.0.5) 利用 CIBERSORT 软件<sup>[8]</sup> 进行免疫细胞浸润分析; 然后利用 Wilcoxon 秩和检验不同分组间各免疫细胞得分的差异情况。根据基因表达情况及 GO<sup>[9]</sup> 和 KEGG<sup>[10]</sup> 数据库, 利用 GSEA<sup>[11]</sup> clusterPofiler

包进行基因集富集分析, 预测其潜在功能。

### 1.6 转录因子及 miRNA 预测

根据数据库 (ChEA<sup>[12]</sup>、ENCODE<sup>[13]</sup> 和 hTFtarget) 中基因与转录因子 (transcription factor, TF) 的关系找出候选基因对应的转录因子。根据 miRNA 与 mRNA 结合数据库 (miRmap<sup>[14]</sup>、miRanda<sup>[15]</sup>、miRDB<sup>[16]</sup>、TargetScan<sup>[17]</sup> 及 miRTarBase<sup>[18]</sup>) 研究基因对应的 miRNA。

### 1.7 化疗药物敏感性分析

根据各癌症样本的表达量以及 GDSC2 数据库 (<https://www.cancerrxgene.org>), 利用 R 包 oncoPredict<sup>[19]</sup> 进行化疗药物敏感性分析, 包括 198 种化疗药物, 计算 PM20D1 高、低表达间化疗药物敏感性得分在两组间的差异情况。

### 1.8 细胞培养与转染

将 HMy2、CIR、SUDHL2、SUDHL4、SUDHL10、DB、Farage 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 °C、5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度的恒温箱内培养, 待细胞密度达到 1×10<sup>6</sup> 个/mL 时进行细胞转染。选择生长状态良好的细胞按 1~1.8×10<sup>6</sup> 个/孔接种于 6 孔板中, 同时加入 Lipofectamine™ 3000 试剂和 PM20D1 的 siRNA 序列混合物。PM20D1 的 siRNA 序列: Si-PM20D1-NC F 为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', R 为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; Si-PM20D1-1 F 为 5'-CCCUUAACCAAUGCAAUAATT-3', R 为 UUAUUGCAUUGGUUAAGGGTT-3'; Si-PM20D1-2 F 为 5'-CAGUCAACUCCGGAUUCATT-3', R 为 5'-UGAAUCCGGAAGUUGACUGTT-3'。通过 Lipofectamine™ 3000 试剂将所有 siRNA 转染至细胞。

### 1.9 WB 法检测 PM20D1 对 DLBCL 细胞增殖的影响

离心后收集细胞并使用 RIPA 裂解液裂解细胞, 采用 BCA 蛋白检测试剂盒检测细胞总蛋白质水平。将细胞裂解物与蛋白上样缓冲液混合, 并煮沸 5 min 以制备蛋白样品。用 SDS-PAGE 分离蛋白质样品并转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后先后加入特异性一抗 (稀释最终浓度为 1.0 μg/mL)、二抗 (稀释比例为 1:1 000) 充分反应, 最后使用凝胶成像系统进行成像, 用 Image J 1.8.0 软件分析目的蛋白条带的灰度值, 以 GAPDH 为内参。

### 1.10 qPCR 法检测 DLBCL 细胞中 mRNA 的表达水平

按照细胞 RNA 快速提取试剂盒说明书操作步骤进行总 RNA 提取, 使用去除 gDNA 的 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒反转录得到 cDNA, 并使用 SYBR Green 预混型 qPCR 试剂盒进行 qPCR 检测。以 GAPDH 的表达量作为内参, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基

因的表达量, 由 GraphPad Prism 8 软件绘图。qPCR 引物序列: PM20D1 F 为 5'-AGAAGTCCAATACTA CAGCCCT-3', R 为 5'-CACCACATCAAAGTGAGC CAT-3'; GAPDH F 为 5'-GCACCGTCAAGGCTGAG AAC-3', R 为 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。

### 1.11 Transwell 实验检测细胞迁移能力

使用 Transwell 小室进行细胞迁移能力检测。转染 48 h 后收集调整各组细胞密度为 1×10<sup>5</sup> 个/mL, 细胞离心后与无血清培养基重悬种植于上室, 下室含 30% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。细胞培养 48 h 后, 取出小室用 4% 多聚甲醛固定迁移细胞 30 min, 用 0.1% 结晶紫染色过夜, 使用倒置显微镜拍照计数。

### 1.12 CCK-8 法和流式细胞术检测细胞增殖能力和凋亡

采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡。6 孔板中, 细胞在 siRNA 转染 48 h 后, 收集细胞离心后的一部分用于细胞增殖能力检测, 一部分用于细胞凋亡水平检测。转染后的细胞按照每孔 8 000 个细胞密度均匀铺于 96 孔板中, 加入 CCK-8 溶液, 37 °C 反应 2 h, 用酶标仪测定各孔 450 nm 波长处的光密度 (D) 值。另一部分细胞使用预冷磷酸盐缓冲溶液洗 2 遍, 随后按照细胞凋亡检测试剂盒说明书操作步骤对细胞进行染色, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。

### 1.13 统计学处理

所有数据均取自 3 次独立实验。研究中主要采用 R 语言软件 (V.4.0.5) 和 GraphPad Prism 8、Image J 1.8.0 等软件进行统计学分析和图像处理。正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间均数比较采用双侧 *t* 检验, 计数资料以百分率表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 各组间免疫细胞浸润得分差异采用 Wilcoxon 秩和检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 和 Log-Rank 检验, 以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异有统计学意义。

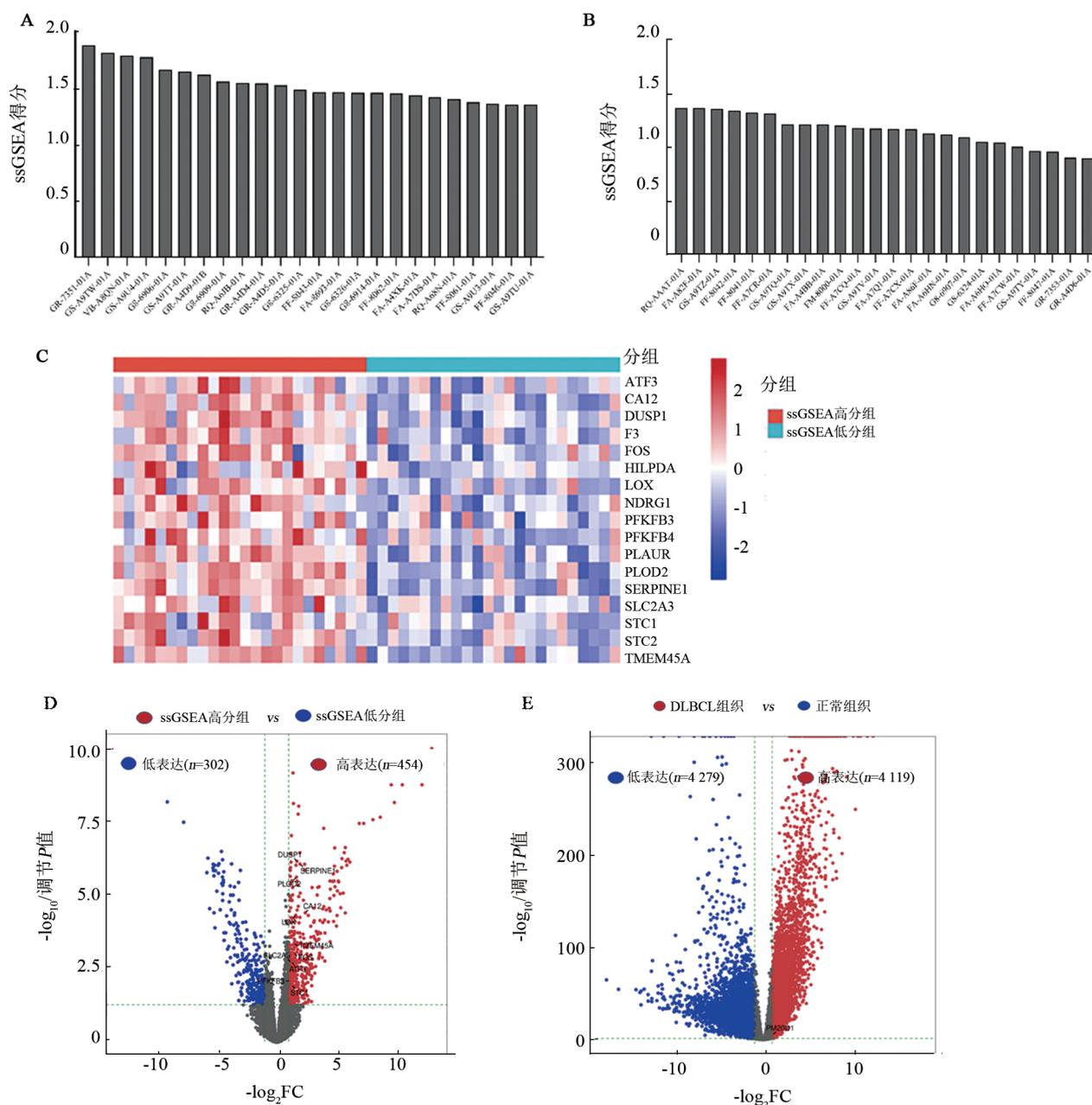
## 2 结果

### 2.1 PM20D1 基因在 DLBCL 组织中呈高表达

根据缺氧相关基因以及 DLBCL 表达数据, 使用 ssGSEA 法对每个样本进行评分 (图 1A、B), 并根据 ssGSEA 得分中位数 (1.113) 将样本分为 ssGSEA 高、低分两组。热图分析 (图 1C) 显示, 两组样本在多个缺氧基因中存在表达差异, 选取差异明显的基因予以可视化展示。对两组样本进行差异基因表达分析发现, 454 个缺氧相关基因呈高表达, 302 个基因呈低表达 (图 1D)。由于 TCGA 数据库缺乏足够的对应正

常组织表达数据,本研究进一步整合TCGA数据库中DLBCL的表达数据与GTEX数据库对应正常组织的mRNA-seq进行差异分析发现,有4 119个基因在

肿瘤组织中表达上调(包括PM20D1),4 279个基因表达降低(图1E)。以上结果表明,PM20D1基因在DLBCL组织中呈高表达。



A、B:48个DLBCL样本经ssGSEA法样本评分后的得分分布情况;C:根据ssGSEA法样本评分结果分组并分析组间样本缺氧差异基因表达;D:ssGSEA高分和ssGSEA低分组间差异表达基因分析;E:肿瘤与正常组织间差异表达基因分析

图1 PM20D1基因在DLBCL和正常组织中的表达

### 2.2 ssGSEA高、低分组患者的DFS、PFS差异显著

ssGSEA评分后对ssGSEA高、低得分组患者采用Log-Rank方法进行生存分析,结果显示,两组样本的DFS和PFS的差异均具有显著的统计学意义(图2A、D,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),OS和疾病特异性生存期(disease specific survival, DSS)指标无明显统计学差异(图2B、C)。

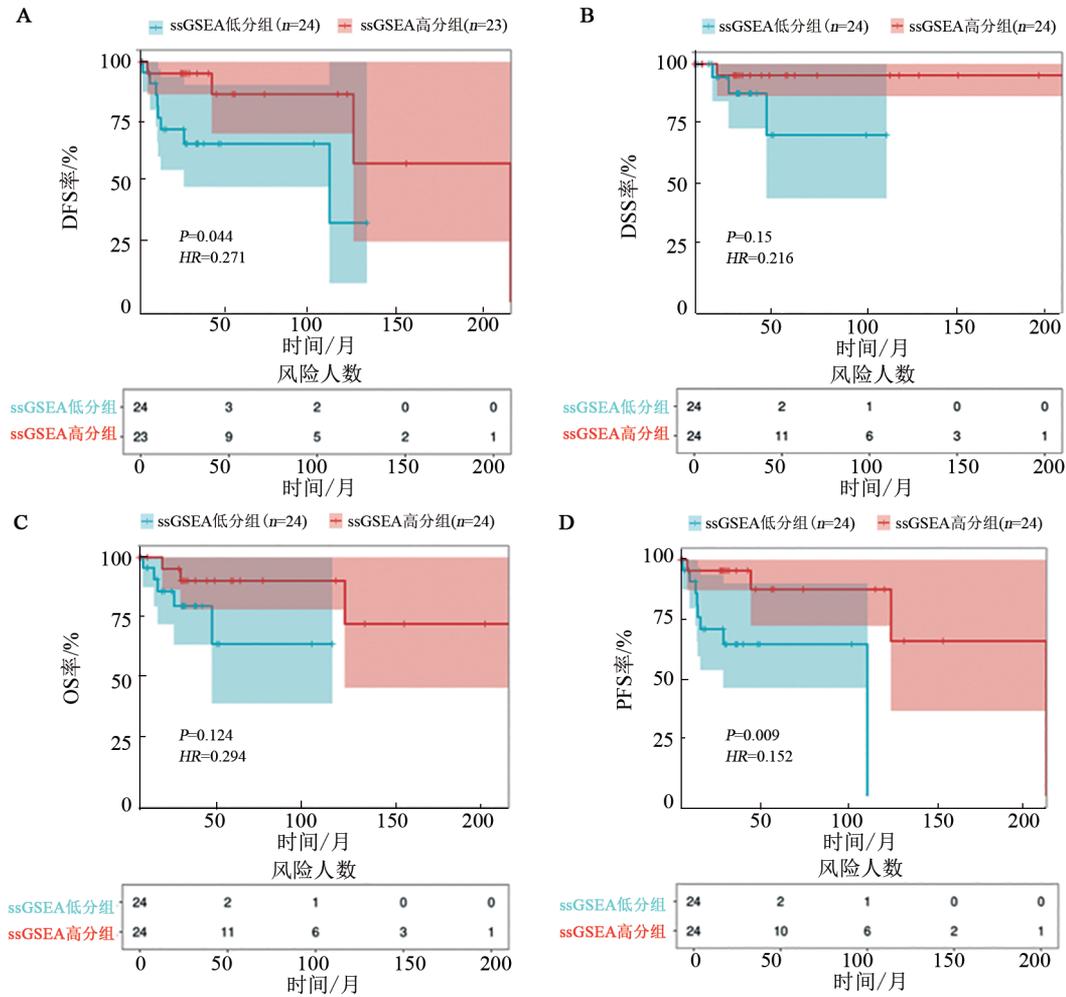
### 2.3 免疫检查点CD274与ssGSEA高低分组及多种

### 免疫细胞浸润呈正相关

CD274作为肿瘤微环境缺氧途径中关键的一个免疫检查点,阻断其可以部分消除髓源性抑制细胞(MDSC)带来的T细胞抑制<sup>[20]</sup>。据此,本研究分析发现,在ssGSEA高、低分组与CD274基因表达差异具有显著的统计学意义(图3A,  $P < 0.01$ ),且CD274表达与多种免疫细胞浸润成正相关(图3B,  $P < 0.01$ )。之后进一步分析了全部肿瘤患者的免疫细胞浸润比例

(图 3C) 及组间免疫细胞表达差异情况 (图 3D)。同时进一步展示组间记忆 B 细胞、初始 B 细胞、M0 巨噬细胞、滤泡性辅助 T 细胞表达存在显著差异 (图 3E)。

以上结果表明, ssGSEA 高、低分组与 CD274 基因以及多种免疫细胞浸润呈正相关。



A: DFS 生存指标; B: DSS 生存指标; C: OS 生存指标; D: PFS 期生存指标

图 2 ssGSEA 高、低分患者生存期差异表达基因

#### 2.4 高表达 PM20D1 基因的 DLBCL 患者 OS 率低

通过与差异基因相关性分析发现, PM20D1 与 CD274 基因表达呈显著正相关 (图 4A,  $P < 0.01$ )。差异基因生存分析结果显示, 相较 PM20D1 低表达组, PM20D1 高表达患者预后更差, OS 率差异明显 (图 4D,  $P < 0.05$ ), 其他指标差异无统计学意义 (图 4B、C、E)。构建 PM20D1 生存 ROC 分析曲线 (图 4F) 显示, 8 年  $AUC = 0.635$ , 10 年和 12 年  $AUC = 0.686$ , 表明 PM20D1 基因在 DLBCL 组织中的表达水平具有一定的疾病预测能力。上述结果与免疫细胞浸润分析结果一致 (图 4G)。

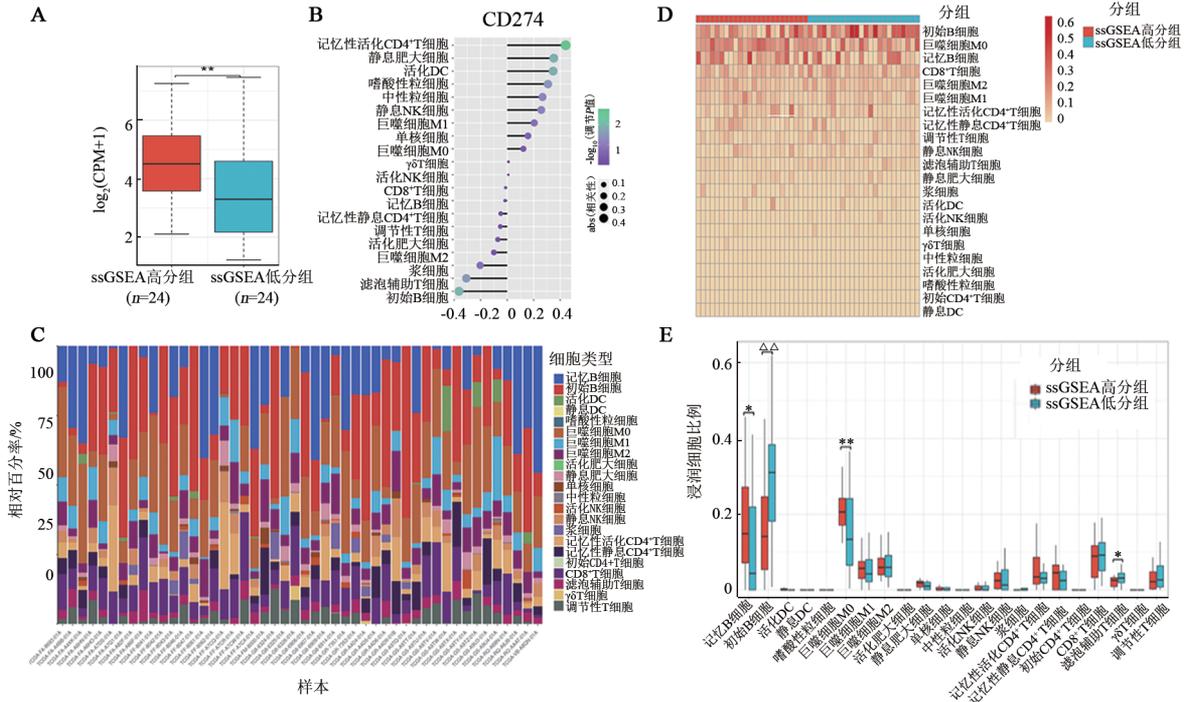
#### 2.5 PM20D1 基因可能与 DLBCL 的缺氧微环境相关

为了进一步探究 PM20D1 涉及的生物学通路, 对 ssGSEA 高、低分组及 PM20D1 高、低表达组间采用包括基因本体 GO (gene ontology consortium) 与京都基

因和基因组百科全书 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库进行基因富集分析。ssGSEA 高、低分组组间富集分析结果见图 5A、B、C、D; PM20D1 高、低表达组间富集分析结果见图 5E、F、G、H。基因富集分析结果显示, GO 数据库中生物过程 ssGSEA 高分组和 PM20D1 高表达组主要涉及细胞电耦合通讯、甘油三酯代谢过程调节和细胞质翻译起始复合物过程, 相应 ssGSEA 低分组和 PM20D1 低表达组主要涉及 ATP 合成耦合质子传输、线粒体电子传递和线粒体呼吸链复合体 I 组装途径 (图 5A、E)。细胞组分分析发现, ssGSEA 高得分组和 PM20D1 高表达组主要涉及细胞囊泡内吞、真核细胞 48S 小亚基翻译起始复合物途径 (图 5B、F), ssGSEA 低分组和 PM20D1 低表达组主要涉及 NADH 脱氢酶复合物、质子转运 ATP 合酶复合物和转运 ATP 合酶

复合物。分子功能分析结果显示,ssGSEA 高分组和 PM20D1 高表达组主要涉及蛋白质-激素受体、活化的离子通道和脱氧核糖核酸酶活性,ssGSEA 低分部和 PM20D1 低表达组更多富集于 NADH 脱氢酶活性和低聚糖结合(图 5C、G)。KEGG 数据库分析显示,ssGSEA 高分组和 PM20D1 高表达组主要富集在抗坏血酸和醛酸代谢、亚油酸代谢和泛酸及辅酶 A 生物合

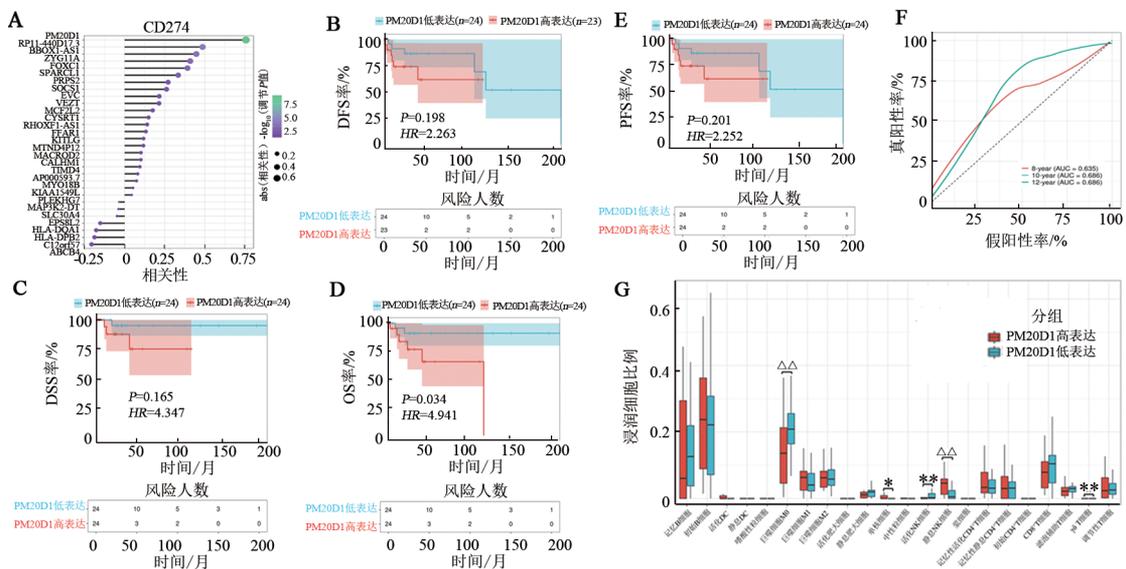
成,ssGSEA 低分部和 PM20D1 低表达组则更多富集于同种异体移植排斥反应、中性粒细胞胞外陷阱形成和系统性红斑狼疮(图 5D、H)。通过 GO 和 KEGG 数据库基因富集分析发现,PM20D1 高表达组和 ssGSEA 高分组富集在相同通路,说明 PM20D1 基因可能与 DLBCL 缺氧微环境相关。



与 ssGSEA 低分组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P < 0.001$

A: 组间 CD274 表达差异; B: CD274 与免疫细胞相关性分析; C、D: 肿瘤患者免疫细胞浸润比例; E: 组间免疫细胞浸润差异

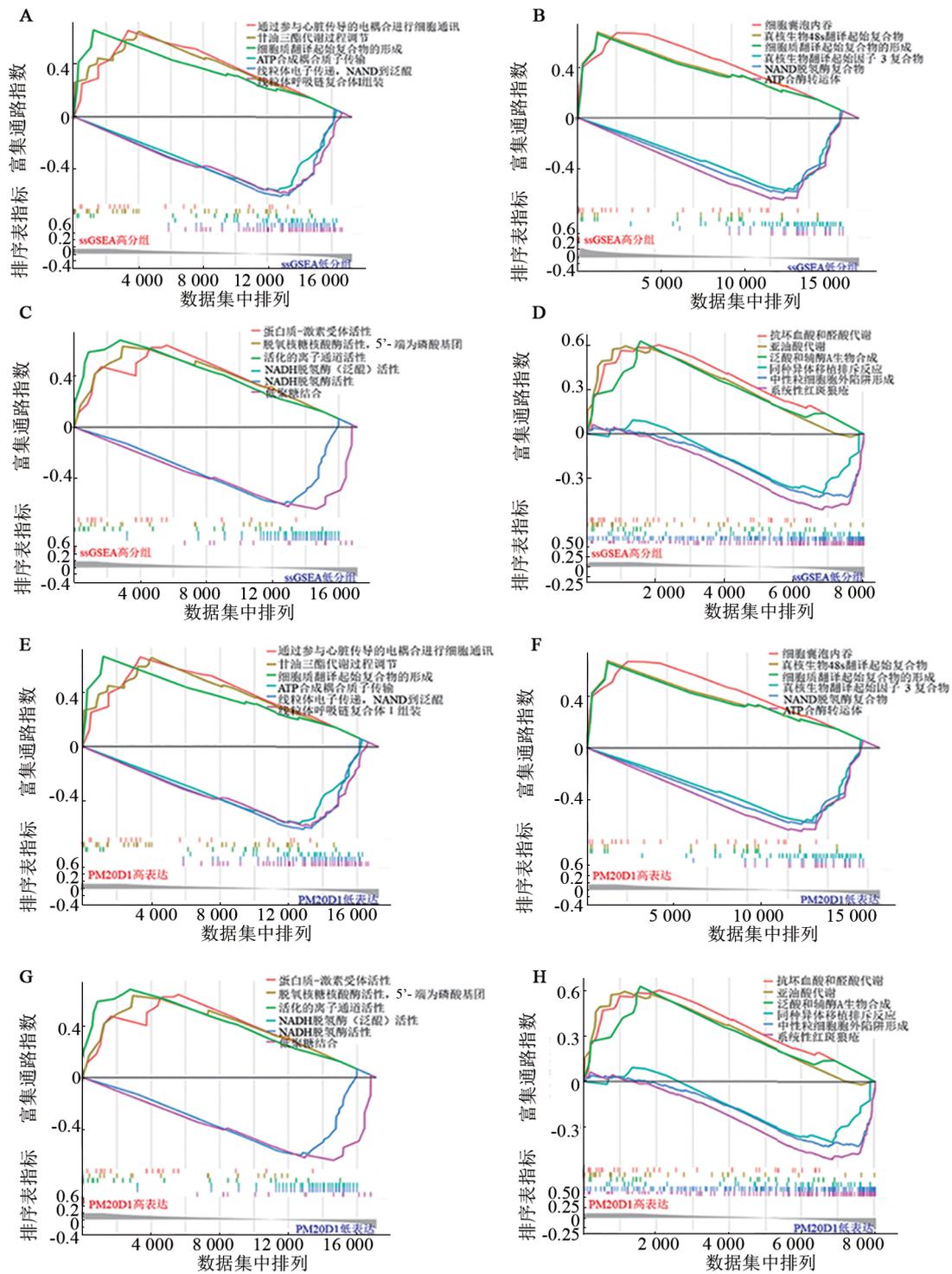
图3 PM20D1 基因表达与 DLBCL 组织中免疫细胞浸润的关系



与 PM20D1 低表达组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P < 0.001$

A: PM20D1 与 CD274 差异基因表达相关性分析; B、C、D、E: DFS、DSS、OS、PFS 生存指标分析结果; F: 数据集 ROC 曲线构建; G: 免疫浸润差异表达; AUC: 模型评估指标 (area under the ROC curve, AUC)

图4 PM20D1 基因表达在 DLBCL 中的预后价值



A、B、C、D:ssGSEA 高、低分组间富集分析结果;E、F、G、H:PM20D1 高、低表达组间富集分析结果;

A、B、C、E、F、G:GO 数据库富集分析;D、H:KEGG 数据库富集分析

图5 不同组间基因富集分析

### 2.6 CTCF 可能是 PM20D1 对应的转录因子

利用多个数据库探究 PM20D1 上游的调控机制。从 ChEA、ENCODE 和 hTFtarget 数据库中分析探究 PM20D1 对应的转录因子,发现 CTCF 转录因子同时存在于 NCODE 和 hTFtarget 数据库,有可能是 PM20D1 对应的转录因子(图 6A)。进一步采用 miRMap、miRanda、miRDB、miTarBase 和 TargetScan

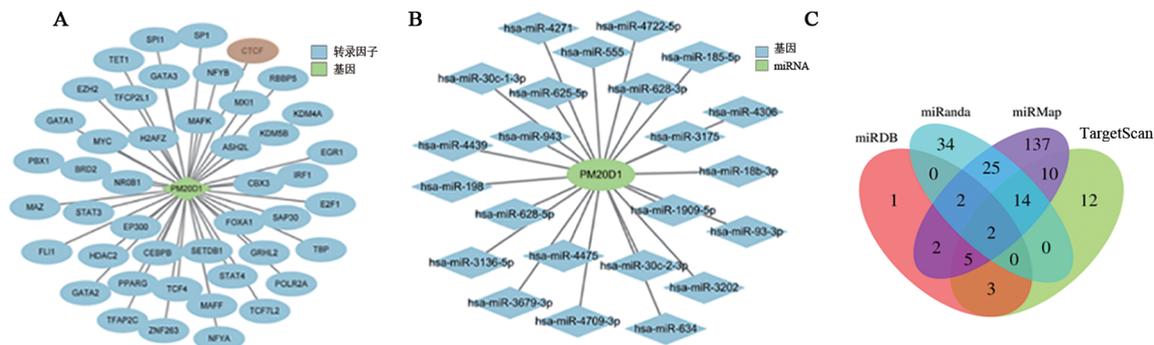
软件分析调控 PM20D1 表达的上游 miRNA,图 6B 总结了同时存在于 3 个及以上数据库总计 23 个 miRNA,图 6C 展示多个数据库目的 miRNA 的数量及交集情况。

### 2.7 DLBCL 相关基因 PM20D1 差异表达与化疗药物敏感性相关

结合 GDSC2 数据库,对每一个肿瘤组织样本进

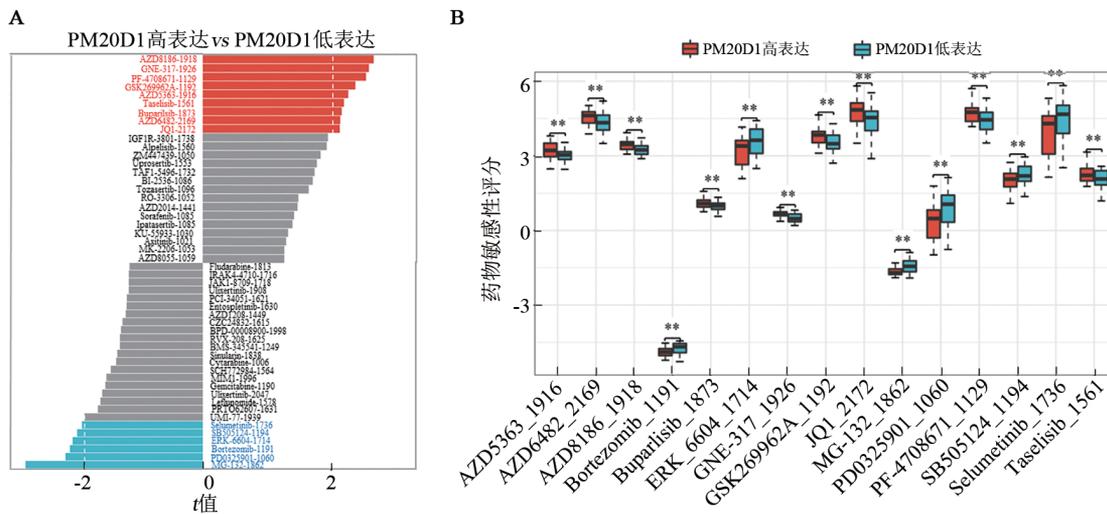
行药物敏感性评分,这可能为之后靶基因不同表达下的治疗带来更精确的药物指导。PM20D1 不同表

达情况绝对值前 50 敏感药物见图 7A,PM20D1 不同差异表达最显著的 15 种药物展示见图 7B。



A: 多个数据库 TF 网络图; B: 多个数据库同时存在于两个及以上 miRNA 网络图; C: 多个数据库目的 miRNA 的数量及交集情况

图 6 靶基因 TF 及 miRNA 预测



与 PM20D1 低表达组比较,  $t/t < 2$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P < 0.001$

A: 不同组表达敏感性最高的药物绝对值; B: 差异显著药物展示  
图 7 DLBCL 相关基因 PM20D1 差异表达与化疗药物敏感性分析

### 2.8 敲减 PM20D1 可显著抑制 DLBCL 细胞的增殖和迁移能力并促进其凋亡

为了证实 PM20D1 的功能,本研究收集了包括人正常淋巴细胞在内的 6 种细胞。通过与正常人淋巴细胞系相比较, WB 法检测结果(图 8A)表明, PM20D1 蛋白在 DLBCL 细胞(包括 SUDHL2、SUDHL4、SUDHL10、DB 和 Farage 细胞)中高表达( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。本实验还设计了两个靶向 PM20D1 不同位点的 siRNA, qPCR 和 WB 检测结果(图 8B、C)显示,两种 siRNA 在敲低 PM20D1 表达方面具有优异的效率( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。同时实验观察到敲低 PM20D1 可以显著抑制 DLBCL 细胞的增殖和迁移(图 8D、E,  $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ )。流式细胞术检测结果(图 8F)显示,敲减 PM20D1 基因可使晚期 DLBCL 细胞发生凋亡显著增加( $P < 0.05$

或  $P < 0.01$ )。

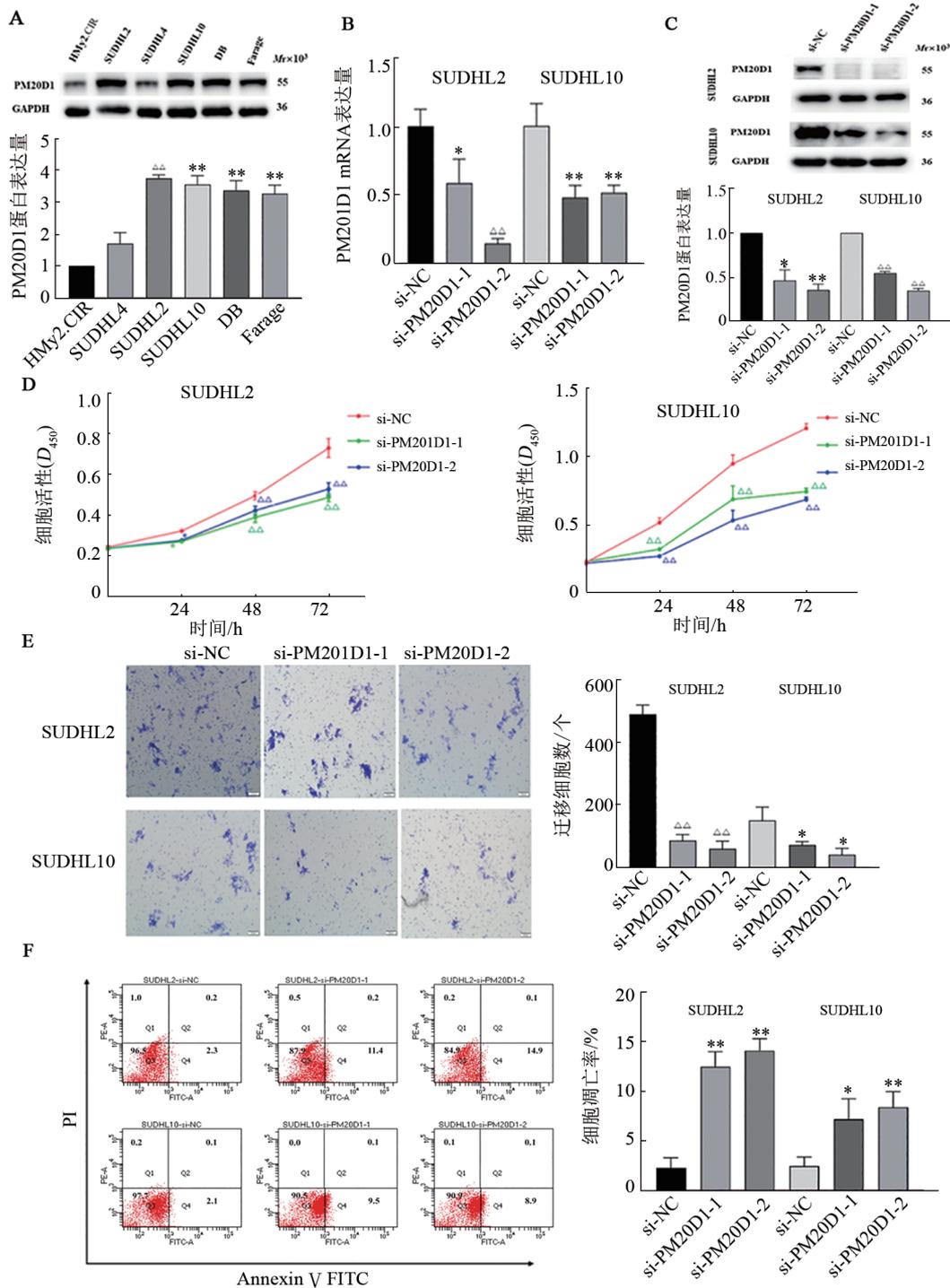
### 3 讨论

DLBCL 是 NHL 中最常见的一种类型。寻找新的肿瘤生物标志物有助于提高 DLBCL 的治疗效率。DLBCL 主要的有益预后生物标志物已经被报道,新的生物标志物正在不断地被探索。生物信息学分析是促进新生物标记物发现的有力策略。因此,本研究旨在寻找新的预后因素。

缺氧是肿瘤微环境的重要组成部分,是大多数包括血液系统恶性肿瘤在内的特征,对各种代谢途径具有深远的影响<sup>[21]</sup>。近年来, BHALLA 等<sup>[22]</sup>在原发性 DLBCL 患者样本筛查中发现缺氧靶点编码己糖激酶 2 的 HK2 表达与 DLBCL 表型显著相关,敲低 HK2 基因后发现 HK2 是促进缺氧状态下迫使

DLBCL 生长所必需的;此外,LIU 等<sup>[23]</sup>开发了 DLBCL 与缺氧相关的新型亚型,发现了与 DLBCL 微环境相关的 5 个缺氧相关基因,并提供了一个预后预测模型。PD-L1 又称为 CD274,是一种在巨噬细胞、DC、成纤维细胞和 T 细胞表面表达的抑制性受体,并作为

调节免疫反应的重要检查点,且在缺氧恶性肿瘤中的表达显著增加,并且与预后不良有关<sup>[24]</sup>。此外,HU 等<sup>[25]</sup>回顾性分析发现,CD274 在 DLBCL 患者肿瘤细胞中的表达与预后不良显著相关,且 CD274 在肿瘤微环境中的表达也与一线化疗耐药性相关。



与 HMy2.CIR (人 B 淋巴瘤细胞) 或 si-NC 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P < 0.001$

A: WB 法检测验证 PM20D1 在 DLBCL 细胞中高表达; B、C: qPCR 和 WB 法检测验证 siRNA 表达效率;  
D: CCK-8 法检测表明敲减 PM20D1 可以明显抑制细胞增殖; E: 细胞迁移实验表明敲减 PM20D1 可以显著减少细胞迁移( $\times 100$ );  
F: 细胞凋亡分析发现敲减 PM20D1 可显著增加细胞凋亡数量

图 8 PM20D1 在 DLBCL 细胞中表达上调并与体外增殖和迁移相关

此外,有研究<sup>[26]</sup>表明,在40%多发性骨髓瘤患者样本中发现缺氧诱导因子/血管内皮生长因子/特异性酪氨酸激酶受体通路上调,并与血管生成增加有关。WANG等<sup>[27]</sup>发现,在常氧状态下缺氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )信号在小鼠淋巴瘤和人类急性髓性白血病(AML)的干细胞中被选择性激活。敲低HIF-1 $\alpha$ 和HIF抑制剂可消除小鼠淋巴瘤和人AML造血干细胞集落形成单位的活性。以上研究虽然都涉及到了相关的机制研究,但仍然有必要以动物模型为主进一步了解PM20D1基因对缺氧及其相关通路机制的影响,从而更好地指导临床新的治疗策略和未来的试验设计。

PM20D1主要富集在棕色和米色脂肪细胞中,在体外被证明是一种双向酶,它既能催化脂肪酸和游离氨基酸缩合生成N-酰基氨基酸(NAA),也可以将NAA水解生成氨基酸和游离脂肪酸。有研究<sup>[28]</sup>表明,在超重/肥胖者血清中发现PM20D1及其催化产物NAA水平显著增高,发现其与肥胖相关的葡萄糖调节异常、胰岛素抵抗和代谢综合征密切相关,可作为诊断和监测这些疾病的临床生物标志物。一些研究数据<sup>[29-30]</sup>表明,敲低PM20D1的小鼠,NAA在葡萄糖稳态、能量代谢和体内疼痛感中都具有内源性生理功能。但是对于PM20D1本身的内源性生理功能尚未开展研究。

PM20D1被发现是LONG等<sup>[29]</sup>编译了一个与解偶联蛋白1在体内共同表达的核心产热基因集,假设这种基因集可用于鉴定在适应性产热中起重要作用的分泌蛋白,实验通过这种分析发现了一种以前未研究过的分泌酶PM20D1,并证明PM20D1是体内一类N-脂质氨基酸的生物合成酶。之后,PM20D1被发现在阿兹尔海默症患者中始终显示启动子高甲基化,并被证明在疾病的不同阶段起着动态作用<sup>[31-32]</sup>。LIU等<sup>[33]</sup>研究发现,在油酸诱导的脂质沉积于C2C12成肌细胞后,mmu-miR-324-5p通过抑制PM20D1促进了肌内脂质沉积。2021年SONG等<sup>[34]</sup>研究还发现,在Kir6.2基因被敲除的小鼠中,通过PM20D1诱导N-酰基乙醇胺酰化酶(N-AAA)的增加可促进线粒体的损伤及减少ATP的产生,从而介导了中脑神经元的形态缺陷,最终导致了Kir6.2基因敲除小鼠的行为障碍。

鉴于PM20D1基因的表达模式尚未在DLBCL中建立,本研究从DLBCL缺氧特征入手,收集来自于TCGA中DLBCL的表达谱和临床资料并对DLBCL患者根据缺氧相关基因的表达水平进行缺氧状态评估。与免疫检查点CD274相关性进行分析,进一步探究了PM20D1涉及的生物学通路发现,PM20D1可能充当了DLBCL中的缺氧相关基因,且其高表达可导致DLBCL患者预

后较差。本实验设计PM20D1 siRNA序列转染细胞,结果显示,敲减PM20D1基因后SUDHL2、SUDHL10细胞增殖能力降低,细胞迁移能力显著下降,细胞晚期凋亡显著增加。本研究还首次发现PM20D1蛋白在DLBCL细胞中表达显著高于正常淋巴细胞。因此,本研究初步得出结论,PM20D1可以通过促进肿瘤细胞增殖、迁移并抑制肿瘤细胞凋亡,从而促进DLBCL的发生发展过程。

综上,PM20D1在DLBCL中高表达,通过对DLBCL细胞SUDHL2和SUDHL10中敲低PM20D1,证实PM20D1可促进SUDHL2和SUDHL10细胞增殖、迁移并抑制细胞凋亡。实验结果为PM20D1在DLBCL中发挥功能作用提供了重要的实验依据和研究价值。本课题组将进一步探究PM20D1促进DLBCL疾病进展的细胞功能的具体作用机制,以期对DLBCL的发生发展机制及临床治疗提供新的生物学标志物和治疗靶点。

## [参考文献]

- [1] LIU Y, BARTA S K. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment[J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(5): 604-616. DOI: 10.1002/ajh.25460.
- [2] TESTONI M, ZUCCA E, YOUNG K H, *et al.* Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(6): 1069-1080. DOI: 10.1093/annonc/mdv019.
- [3] TAKAHARA T, NAKAMURA S, TSUZUKI T, *et al.* The immunology of DLBCL[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(3): 835[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9913124/>. DOI: 10.3390/cancers15030835.
- [4] WRIGHT G W, HUANG D W, PHELAN J D, *et al.* A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B cell lymphoma with therapeutic implications[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(4): 551-568.e14. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.015.
- [5] SCHMITZ R, WRIGHT G W, HUANG D W, *et al.* Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(15): 1396-1407. DOI: 10.1056/nejmoa1801445.
- [6] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- [7] HÄNZELMANN S, CASTELO R, GUINNEY J. GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data[J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 7[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3618321/>. DOI: 10.1186/1471-2105-14-7.
- [8] CHEN B B, KHODADOUST M S, LIU C L, *et al.* Profiling tumor infiltrating immune cells with CIBERSORT[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1711: 243-259. DOI: 10.1007/978-1-4939-7493-1\_12.
- [9] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-29. DOI: 10.1038/75556.
- [10] OGATA H, GOTO S, SATO K, *et al.* KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 29-34.

- DOI: 10.1093/nar/27.1.29.
- [11] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15545-15550. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.
- [12] LACHMANN A, XU H L, KRISHNAN J, *et al.* ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2438-2444. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq466.
- [13] DAVIS C A, HITZ B C, SLOAN C A, *et al.* The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D794-D801[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753278/>. DOI: 10.1093/nar/gkx1081.
- [14] VEJNAR C E, BLUM M, ZDOBNOV E M. miRmap web: comprehensive microRNA target prediction online[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Web Server issue): W165-W168[2023-02-5]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3692044/>. DOI: 10.1093/nar/gkt430.
- [15] MIRANDA K C, HUYNH T, TAY Y, *et al.* A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes[J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1203-1217. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.031.
- [16] WONG N, WANG X W. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D146-D152[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383922/>. DOI: 10.1093/nar/gku1104.
- [17] NIELSEN C B, SHOMRON N, SANDBERG R, *et al.* Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs[J]. *RNA*, 2007, 13(11): 1894-1910. DOI: 10.1261/rna.768207.
- [18] HUANG H Y, LIN Y C D, LI J, *et al.* miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database [J/OL]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 48(1): 148-154[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7145596/>. DOI: 10.1093/nar/gkz896.
- [19] MAESER D, GRUENER R F, HUANG R S. oncoPredict: an R package for predicting *in vivo* or cancer patient drug response and biomarkers from cell line screening data[J/OL]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(6): bbab260[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8574972/>. DOI: 10.1093/bib/bbab260.
- [20] NOMAN M Z, DESANTIS G, JANJI B, *et al.* PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(5): 781-790. DOI: 10.1084/jem.20131916.
- [21] CIOROIANU A I, STINGA P I, STICLARU L, *et al.* Tumor microenvironment in diffuse large B-cell lymphoma: role and prognosis [J/OL]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2019, 2019: 8586354[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6942707/>. DOI: 10.1155/2019/8586354.
- [22] BHALLA K, JABER S, NANAJI N M, *et al.* Role of hypoxia in diffuse large b-cell lymphoma: metabolic repression and selective translation of HK2 facilitates development of DLBCL[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 744[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5768748/>. DOI: 10.1038/s41598-018-19182-8.
- [23] LIU C, LIU L. Hypoxia-related tumor environment correlated with immune infiltration and therapeutic sensitivity in diffuse large B-cell lymphoma[J/OL]. *Front Genet*, 2022, 13: 1037716 [2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9614142/>. DOI: 10.3389/fgene.2022.1037716.
- [24] HU M, LI Y F, LU Y T, *et al.* The regulation of immune checkpoints by the hypoxic tumor microenvironment[J/OL]. *Peer J*, 2021, 9: e11306[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8109006/>. DOI: 10.7717/peerj.11306.
- [25] HU L Y, XU X L, RAO H L, *et al.* Expression and clinical value of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study[J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1): 1-11. DOI: 10.1186/s40880-017-0262-z.
- [26] GIATROMANOLAKI A, BAI M, MARGARITIS D, *et al.* Hypoxia and activated VEGF/receptor pathway in multiple myeloma[J/OL]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7): 2831-2836[2023-02-05]. <https://ar.iiarjournals.org/content/30/7/2831.long>.
- [27] WANG Y, LIU Y, MALEK S N, *et al.* Targeting HIF1 $\alpha$  eliminates cancer stem cells in hematological malignancies[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(4): 399-411. DOI: 10.1016/j.stem.2011.02.006.
- [28] YANG R Y, HU Y, LEE C H, *et al.* PM20D1 is a circulating biomarker closely associated with obesity, insulin resistance and metabolic syndrome[J]. *Eur J Endocrinol*, 2021, 186(2): 151-161. DOI: 10.1530/EJE-21-0847.
- [29] LONG J Z, SVENSSON K J, BATEMAN L A, *et al.* The secreted enzyme PM20D1 regulates lipidated amino acid uncouplers of mitochondria[J]. *Cell*, 2016, 166(2): 424-435. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.071.
- [30] LONG J Z, ROCHE A M, BERDAN C A, *et al.* Ablation of PM20D1 reveals *N*-acyl amino acid control of metabolism and nociception[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(29): E6937-E6945[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6055169/>. DOI:10.1073/pnas.1803389115.
- [31] SANCHEZ-MUT J V, HEYN H, SILVA B A, *et al.* PM20D1 is a quantitative trait locus associated with Alzheimer's disease[J]. *Nat Med*, 2018, 24(5): 598-603. DOI: 10.1038/s41591-018-0013-y.
- [32] WANG Q, CHEN Y H, READHEAD B, *et al.* Longitudinal data in peripheral blood confirm that PM20D1 is a quantitative trait locus (QTL) for Alzheimer's disease and implicate its dynamic role in disease progression[J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 1-18. DOI: 10.1186/s13148-020-00984-5.
- [33] LIU Y, WANG J, ZHOU X, *et al.* MiR-324-5p inhibits C2C12 cell differentiation and promotes intramuscular lipid deposition through lncDUM and PM20D1[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 722-732[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7593507/>. DOI: 10.1016/j.omtn.2020.09.037.
- [34] SONG N S, FANG Y Q, ZHU H, *et al.* Kir6.2 is essential to maintain neurite features by modulating PM20D1-reduced mitochondrial ATP generation[J/OL]. *Redox Biol*, 2021, 47: 102168[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8577462/>. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102168.

[收稿日期] 2023-02-10

[修回日期] 2023-04-20

[本文编辑] 阮芳铭