

# 肺腺癌骨转移癌痛患者外周血转录组学分析及其初步验证

赵洋<sup>1</sup>, 林世清<sup>2</sup>, 陈兰兰<sup>3</sup>, 窦云凌<sup>2</sup>, 林中原<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>贵州医科大学附属医院麻醉科, 贵州贵阳 550004; <sup>2</sup>中山大学附属第一医院麻醉科, 广东广州 510080; <sup>3</sup>中山大学附属第一医院呼吸科, 广东广州 510080

[中图分类号] R441.1 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0926.2024.0731

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 赵洋, 林世清, 陈兰兰, 等. 肺腺癌骨转移癌痛患者外周血转录组学分析及其初步验证[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(4): 427-435.

[收稿日期] 2023-07-04

[录用日期] 2024-02-27

[上线日期] 2024-07-31

**[摘要]** **目的** 分析并初步验证肺腺癌骨转移癌痛(MBP)患者外周血转录组中的关键基因和通路, 以探究其发生机制。**方法** 选择2020年5月—2021年5月在中山大学附属第一医院就诊的9例肺腺癌骨转移患者进行回顾性分析, 其中4例疼痛视觉模拟评分 $\geq 4$ 分(设为MBP组), 5例疼痛视觉模拟评分为0分(设为对照组)。采集两组患者外周血进行mRNA测序, 筛选获得差异表达基因(DEGs)并对其进行功能富集分析和蛋白-蛋白互作(PPI)网络分析。利用Cytoscape软件进行可视化并获得关键蛋白表达模块和关键基因。通过Targetscan和lncBase数据库预测调控关键基因的miRNA及长链非编码RNA(lncRNA)。将得到的lncRNA、miRNA及mRNA三者的调控关系进行可视化, 构建竞争性内源RNA(ceRNA)网络, 并采用荧光定量PCR(qPCR)对得到的ceRNA网络节点进行初步验证。**结果** 共获得DEGs 1466个, 其中表达上调666个, 表达下调800个; CXCR3(趋化因子受体3)、POMC(促阿片-黑素细胞皮质素原)、NMUR1(神经调节肽U受体1)、CCL2(趋化因子配体2)和CNRI(内源性大麻素受体1)为肺腺癌MBP的关键基因。DEGs主要富集于破骨细胞分化、核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)样受体信号通路、I型干扰素信号通路、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路、凋亡/自噬通路、趋化因子信号通路、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 通路。根据ceRNA调控理论, 筛选出MALAT1-hsa-miR-124-3p、2-CCL2和NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3两条关键基因的调控网络。qPCR检测结果显示, MBP组中CCL2、CXCR3、MALAT1、NEAT1和hsa-miR-325的表达均高于对照组( $P < 0.05$ )。**结论** CXCR3、POMC、NMUR1、CCL2和CNRI可能为MBP发生的关键基因, 可作为MBP的重要调控靶点; 肺腺癌MBP的发生可能与MALAT1-hsa-miR-124-3p、2-CCL2和NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3网络失调有关。

**[关键词]** 肺腺癌; 骨转移癌痛; 转录组学; 竞争性内源RNA

## Transcriptome profiling of peripheral blood and preliminary verification in lung adenocarcinoma patients with metastatic bone pain

Zhao Yang<sup>1</sup>, Lin Shi-Qing<sup>2</sup>, Chen Lan-Lan<sup>3</sup>, Dou Yun-Ling<sup>2</sup>, Lin Zhong-Yuan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

<sup>2</sup>Department of Anesthesiology, <sup>3</sup>Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China

\*Corresponding author, E-mail: linzhy58@mail2.sysu.edu.cn

**[Abstract]** **Objective** To analyze and preliminarily verify key genes and pathways in the transcriptome of peripheral blood of lung adenocarcinoma patients with metastasis bone pain (MBP), and to explore its underlying mechanism. **Methods** Nine lung adenocarcinoma patients with bone metastasis treated in the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from May 2020 to May 2021 were selected for retrospective analysis, including 4 patients with typical MBP clinical manifestations and visual analogue scale (VAS)  $\geq 4$  (MBP group) and 5 patients without suffering any pain (control group). Peripheral blood mRNA sequencing was performed to identify differentially expressed genes (DEGs), followed by functional pathways analysis and protein-protein interaction (PPI) network analysis. The most significant modules and hub genes were confirmed and visualized using Cytoscape software. The

**[作者简介]** 赵洋, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事液体治疗及疼痛管理方面的研究

**[通信作者]** 林中原, linzhy58@mail2.sysu.edu.cn

target miRNAs regulating these hub genes were predicted using TargetsCan database, and long non-coding RNA (lncRNA) interacting with these miRNAs were also predicted using lncBase database. The relationships among lncRNA, miRNA and mRNA were visualized to construct a competing endogenous RNA (ceRNA) network through Cytoscape software, and the nodes of this network were verified using quantitative PCR (qPCR). **Results** A total of 1466 DEGs were identified, including 666 up-regulated genes and 800 down-regulated genes. Chemokine receptor 3 (CXCR3), pro-opiomelanocortin (POMC), neuromedin U receptor 1 (NMUR1), chemokine ligand 2 (CCL2) and endocannabinoid receptor 1 (CNRI) were identified as hub genes. The most significant enriched processes and pathways of DEGs included osteoclast differentiation, NOD like receptor signal transduction pathway, type I interferon signal pathway, nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) signal pathway, apoptosis/autophagy pathway, chemokine signal pathway, interleukin (IL)-1 $\beta$  pathway. Two ceRNA networks were identified: MALAT1-hsa-miR-124-3p-2-CCL2 and NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3. qPCR results showed that the expression levels of CCL2, CXCR3, MALAT1, NEAT1 and hsa-miR-325 were higher in MBP group than these in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** CXCR3, POMC, NMUR1, CCL2 and CNRI may serve as key genes in the occurrence of MBP and could be important regulatory targets for MBP. The development of MBP in lung adenocarcinoma may be associated with the dysregulation of the networks: MALAT1-hsa-miR-124-3p-2-CCL2 and NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3.

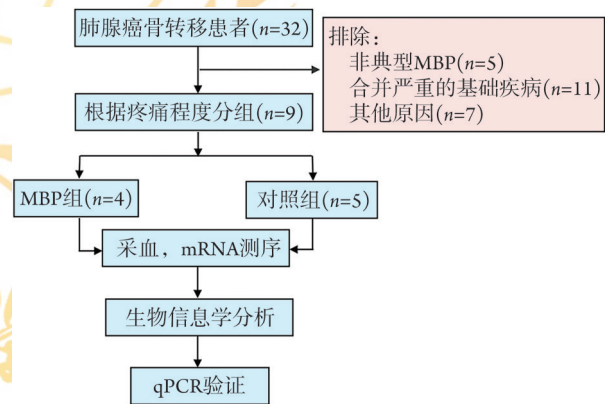
**[Key words]** lung adenocarcinoma; metastatic bone pain; transcriptomics; competing endogenous RNA

骨转移癌痛(metastatic bone pain, MBP)是指由原发于骨组织以外的恶性肿瘤转移至骨组织引起的疼痛,是癌症患者常见的症状,可见于约1/3的骨转移患者。MBP致使患者身心遭受巨大痛苦,严重影响患者的生活质量。MBP发生机制复杂,即使积极应用癌痛三阶梯疗法,仍有45%的患者未能得到有效镇痛<sup>[1]</sup>。当前针对癌症患者疼痛的治疗仍主要基于经验性用药,缺乏个体化的治疗方案,一定程度上限制了癌痛的诊治<sup>[2]</sup>。因此,深入探索MBP发生的生物学机制具有重要的临床意义。既往单基因、单蛋白的机制研究在筛选治疗靶点方面效率较低,存在明显不足。本研究筛选典型MBP患者并进行mRNA测序,采用生物信息学方法分析肺腺癌MBP的关键基因和通路,筛选调控关键基因的竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)网络并加以验证,以期对肺腺癌MBP发生机制研究提供新的思路。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 本研究获中山大学附属第一医院伦理委员会批准(伦审[2020]161号)。选择2020年5月—2021年5月在中山大学附属第一医院就诊的肺腺癌骨转移9例进行回顾性分析。纳入标准:(1)年龄18~65岁;(2)组织学或细胞学明确诊断为肺腺癌;(3)骨病变活检为肺癌转移或具备典型的胸腰椎椎体转移影像学表现,其中局限病灶需磁共振成像(MRI)/正电子发射计算机断层显像(PET-CT)/骨组织活检明确诊断,广泛病灶需PET-CT/CT/X线/MRI明确诊断。排除标准:(1)非典型MBP,合并其他慢性疼痛、放疗引起的疼痛、非上述骨转移部位的疼痛、肿瘤明显压迫脊髓或神经根引起的疼痛;(2)合并急/慢性感染性疾病、血液系统疾病、肝肾功能不全等引起血细胞数量明显变化;(3)存在控制

不良的合并症,如高血压、冠心病等;(4)不能准确描述疼痛部位及进行疼痛评分。根据病例报告表(见附加材料1)收集患者的一般资料及疼痛情况。按照疼痛程度进行分组,其中疼痛视觉模拟评分 $\geq 4$ 分者纳入MBP组( $n=4$ ),疼痛视觉模拟评分为0分者纳入对照组( $n=5$ )。采集两组患者外周血进行mRNA测序及生物信息学分析,并采用荧光定量PCR(qPCR)对生物信息学分析结果进行初步验证。肺腺癌骨转移患者纳入及试验流程如图1所示。



MBP. 骨转移癌痛; qPCR. 荧光定量PCR

图1 肺腺癌骨转移患者纳入及试验流程图

**Fig. 1** Flow chart of inclusion and trial of lung adenocarcinoma patients with bone metastasis

**1.2 主要试剂及仪器** RNA提取试剂(RNAiso Plus, 美国Bio-Rad公司); Poly(A) mRNA磁珠分离模块试剂盒、mRNA illumina文库制备试剂盒(美国NEB公司); 双链DNA(dsDNA)荧光定量检测试剂盒(美国Thermo Fisher公司); KAPA文库定量试剂盒(瑞士Roche公司); NovaSeq S4试剂盒(美国Illumina公司)。NovaSeq基因测序仪(NovaSeq6000, 美国Illumina公司); 荧光定量PCR仪(Via7, 美国Thermo Fisher公司); PAX gene血液RNA储存管(美国BD公司)。

**1.3 全血 RNA 测序** 清晨 7:00—10:00 采用 PAX gene 血液 RNA 储存管抽取患者外周血 2.5 ml, 按照 PAX gene 血液 RNA 管使用说明书储存并运送至海普洛斯基因公司(深圳)进行全血 RNA 测序。

**1.4 RNA 提取、文库构建及测序** 利用 Trizol 法提取全血 RNA, 取 0.1~1.0  $\mu\text{g}$  总 RNA, 使用 Poly(A) mRNA 磁珠分离模块试剂盒分离 mRNA, 利用 NEBNext Poly(A) mRNA 磁性分离模块从分离的总 RNA 中提取完整的 poly(A) +RNA; 利用 mRNA illumina 文库制备试剂盒构建 mRNA 文库。使用 dsDNA 荧光定量检测试剂盒测定文库浓度, D1000 Screen Tape 检测文库片段分布, KAPA 文库定量试剂盒精准测定文库摩尔浓度, 并使用 NovaSeq 6000 基因测序仪及配套的 NovaSeq S4 试剂盒进行文库测序。

### 1.5 生物信息学分析

**1.5.1 表达谱数据预处理** 使用 R 软件包 affy (version 1.5) 读取 Affymetrix 平台的原始数据, limma (version 3.10.3) 读取 illumina 平台的原始数据。采用 RMA (robust multi-array average) 算法进行数据标准化预处理(包括背景校正、归一化处理 and 表达值计算)。随后利用平台注释文件对探针进行注释, 去除未匹配到基因(gene symbol)的探针, 当不同探针映射到同一基因时, 取不同探针的均值作为该基因最终的表达值。

**1.5.2 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 筛选** 使用 R 软件 DESeq2 包<sup>[3]</sup> 对上述 RNA 测序数据进行标准化并筛选 DEGs。筛选标准: DESeq2 中的错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05;  $\log_2$  差异倍数 (fold change, FC)  $\leq -0.5$  或  $\log_2$  FC  $\geq 0.5$ 。使用 ggplot2 软件包在 R 软件中绘制火山图。

**1.5.3 DEGs 的功能富集分析和蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析** 将筛选出的 DEGs 导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 在线分析网站进行基因本体论 (gene ontology, GO) 及京都基因和基因组数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 功能富集分析<sup>[4]</sup>, 分析其中涉及肺腺癌 MBP 的相关通路, 以  $P < 0.05$  为阈值筛选 DEGs 的富集分析结果。

将 DEGs 导入 STRING (<https://string-db.org/>) 在线分析网站进行 PPI 网络分析。利用 Cytoscape 软件对上述 PPI 网络分析结果进行可视化, 并使用 MCODE 插件筛选出关键蛋白表达模块及与 MBP 密切相关的基因。设置参数程度阈值 (degree cutoff)  $\geq 6$ , 排除最大连接数 (K-core)  $\geq 2$ , 以允许偏离核心程度 (NodeScore cut-off)  $\geq 0.2$  及最大延伸 (Max.Depth) = 100 作为筛选标准<sup>[5]</sup>。

**1.5.4 生存分析** 将关键蛋白表达模块内的基因导

入 GEPIA 工具 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)<sup>[6]</sup>, 绘制 Kaplan-Meiers 生存曲线, 并进行 log-rank 检验; 计算风险比 (hazard ratio, HR), 分析关键节点基因与患者预后的关系,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。同时将模块内的基因与 DisGeNET 疾病基因数据库 (<https://www.disgenet.org/home/>) 中 “Pain” 条目进行比对, 筛选与疼痛功能相关的基因<sup>[7]</sup>。

**1.5.5 构建 ceRNA 网络** 利用 Targetscan 数据库对可能调控关键基因的 miRNAs 进行预测并得到一系列的 miRNAs<sup>[8]</sup>。利用 lncBase 数据库收集 miRNA-lncRNA 之间的相互关系, 得到与 miRNAs 竞争性结合的关键基因的 lncRNAs<sup>[9]</sup>。然后采用 Cytoscape 软件将得到的 lncRNAs、miRNAs 以及 mRNAs 之间的关联网进行可视化, 构建 ceRNA 网络。根据 ceRNA 网络调控理论条件进一步筛选最可能的 ceRNA。ceRNA 调控理论条件主要包括: (1) 网络中的 lncRNA、miRNA 和 mRNA 均为某一病理变化的常见调控因子, 在功能上发挥着类似作用, 这是构建 ceRNA 调控网络的前提; (2) miRNA 可通过结合 mRNA 对其进行负向调控, 而 lncRNA 通过结合 miRNA 解除了 miRNA 对于 mRNA 的抑制, 因此 lncRNA 的上调与 mRNA 的表达呈正相关<sup>[1]</sup>。

**1.6 qPCR 检测** 经过以上步骤筛选出与 MBP 可能相关的 lncRNA、miRNA 和 mRNA。为了验证这些基因在人体中的表达水平是否与生物信息学分析结果一致, 采用 qPCR 对两组患者外周血中关键的枢纽基因的表达水平进行检测。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。对计量资料进行正态性检验, 符合正态分布者以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验, 不符合正态分布者以  $M(Q_1, Q_3)$  表示, 两组间比较采用 Mann-whitney  $U$  检验。计数资料以例 (%) 表示, 两组间比较采用 Fisher 确切概率法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 两组临床资料比较** MBP 组患者疼痛程度 (静息痛、爆发痛) 及 ECOG-PS 评分均明显高于对照组, 疼痛病程长于对照组 ( $P < 0.05$ , 表 1); 两组患者年龄、BMI、性别及肺癌临床分期比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 1、2)。

**2.2 DEGs 筛选结果** 共筛选得到差异表达的蛋白编码基因 1466 个, 包括 666 个表达上调 (红色) 的基因和 800 个表达下调 (绿色) 的基因, 其中趋化因子受体 3 (CXCR3)、趋化因子配体 2 (CCL2) 和内源性大麻素受体 1 (CNRI) 明显上调, 促阿片-黑素细胞皮质激素原 (POMC)、神经调节肽 U 受体 1 (NMUR1) 明显下

表1 两组肺腺癌骨转移患者临床资料比较

Tab.1 Comparison of clinical data between two groups of lung adenocarcinoma patients with bone metastasis

指标	对照组(n=5)	MBP组(n=4)	P
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$ )	52.6 $\pm$ 5.7	58.5 $\pm$ 2.6	0.089
BMI(kg/m <sup>2</sup> , $\bar{x}\pm s$ )	22.1 $\pm$ 1.6	23.8 $\pm$ 3.7	0.379
性别[男, 例(%)]	2(40.0)	2(50.0)	0.643
疼痛程度			
静息痛(分, $\bar{x}\pm s$ )	0	4.2 $\pm$ 0.5	0.011
爆发痛(分, $\bar{x}\pm s$ )	0	5.7 $\pm$ 0.5	0.011
疼痛病程(d, $\bar{x}\pm s$ )	0	80.3 $\pm$ 16.5	0.001
ECOG-PS 评分(分, $\bar{x}\pm s$ )	1.6 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.5	0.002

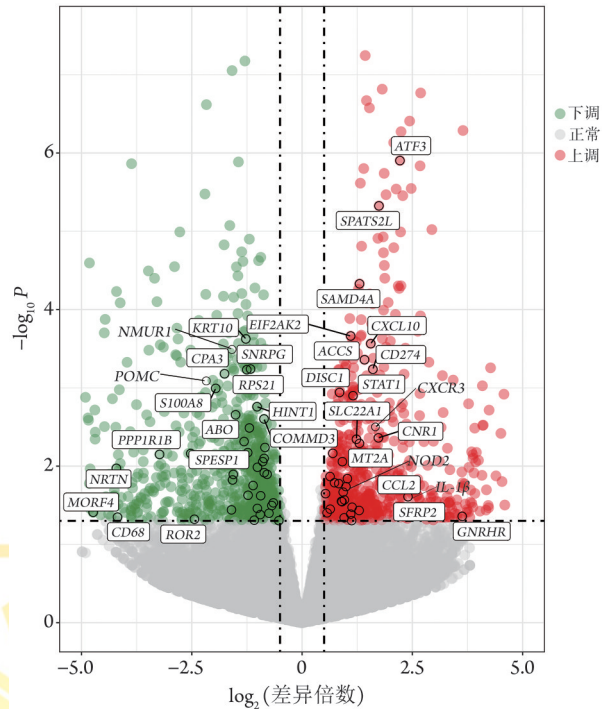
MBP. 骨转移癌痛; BMI. 体重指数; ECOG-PS. 美国东部肿瘤协作组体力状况评分

调(图2)。

**2.3 DEGs的功能富集分析** KEGG富集分析显示, 上调的DEGs主要富集于破骨细胞分化和核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)样受体信号通路等(图3A); GO富集分析显示, 上调的DEGs主要富集于I型干扰素信号通路、NF- $\kappa$ B信号通路、凋亡/自噬通路、趋化因子信号通路、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 通路等(图3B)。

**2.4 PPI网络分析及关键基因筛选** 将DEGs导入STRING在线分析网站并进行可视化分析, 筛选出PPI网络中蛋白表达模块。PubMed数据库内检索发现该模块内部基因与疼痛关系密切, 初步认为其为关键蛋白表达模块(图4)。对该模块的基因进行生存分析及DisGeNET疾病基因数据库比对, 得到5个关键基因(图4, 红色圆形)。其中CXCR3、POMC、NMURI与肺腺癌患者预后密切相关( $P<0.05$ , 图5), CXCR3、POMC、CCL2和CNRI已被纳入DisGeNET数据库中“Pain”相关基因。

**2.5 ceRNA网络构建** 在Cytoscape软件中, 将lncRNA-miRNA-mRNA之间的关系可视化后, 各个节



小方框标注的为DisGeNET疾病基因数据库“Pain”相关基因

图2 DEGs火山图

Fig.2 Volcano map of differentially expressed genes (DEGs)

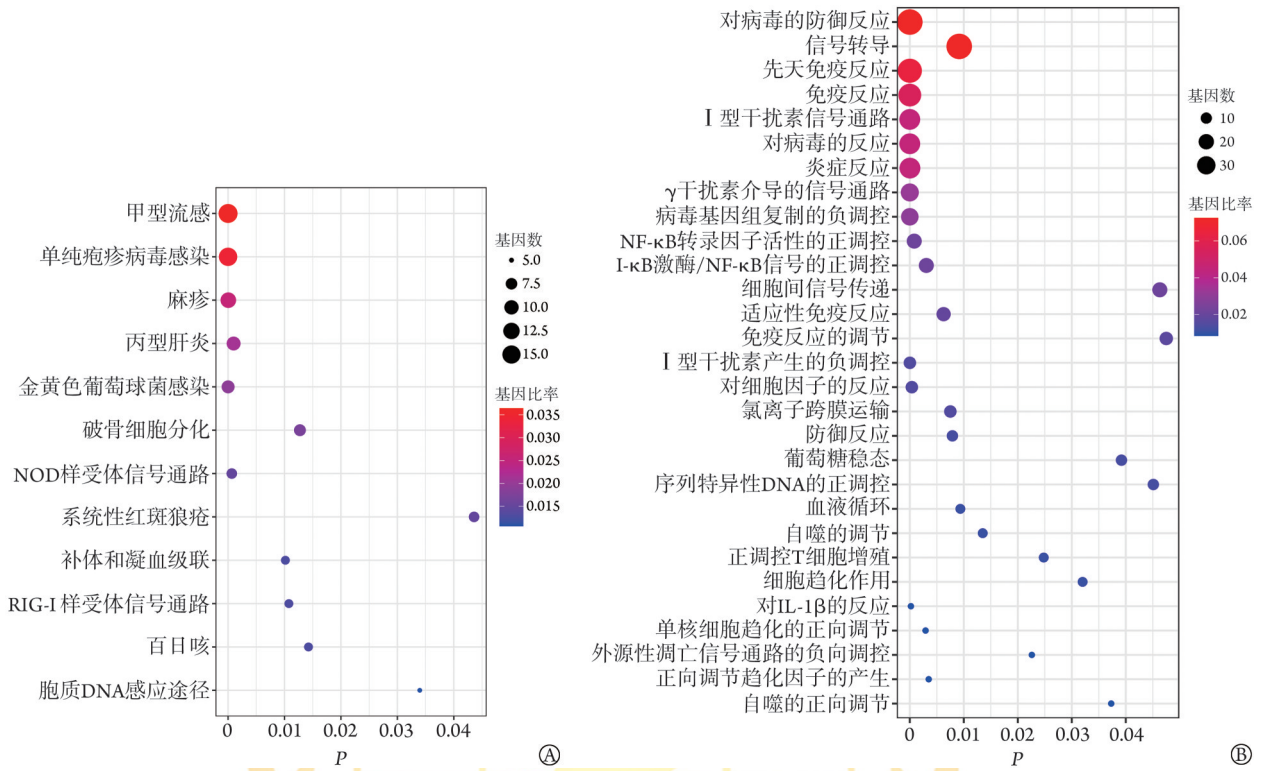
点都代表一个RNA。图6为lncRNA-miRNA-mRNA的可视化网络关系图, 其中绿色节点表示lncRNA, 橙色节点表示mRNA, 黄色节点表示miRNA。通过可视化图形得到miRNA(hsa-miR-124-3p.2、hsa-miR-506-3p、hsa-miR-325-3p、hsa-miR-384、hsa-miR-488-3p、hsa-miR-18a-5p、hsa-miR-18b-5p、hsa-miR-4735-3p、hsa-miR-483-3p和hsa-miR-668-3p; 图6A-E, 黄色三角形)、lncRNA(NEAT1、MALAT1和RPPH1; 图6A、B, 绿色圆形)和mRNA(CXCR3、CCL2、CNRI和POMC; 图6A-E, 橙色圆形)。选择在功能上与疼痛密切相关的miRNA(hsa-miR-124-3p.2, 图6A; has-miR-325-3p, 图6B)和lncRNA(MALAT1, 图6A; NEAT1, 图6B)作

表2 两组肺腺癌骨转移患者的临床资料

Tab.2 Descriptive clinical data of lung adenocarcinoma patients with bone metastasis

患者编号	骨转移灶	疼痛部位	合并症	TNM分期	临床分期
MBP 1	T <sub>11</sub> 椎体、T <sub>12</sub> 椎体、右侧胸锁关节、左侧第2前肋	T <sub>11</sub> 、T <sub>12</sub>	无	T <sub>2a</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1c</sub>	IVB
MBP 2	T <sub>10</sub> 、C <sub>7</sub> 椎体	T <sub>10</sub>	无	T <sub>3</sub> N <sub>2b</sub> M <sub>1c</sub>	IVB
MBP 3	T <sub>1/2/5/12</sub> 、C <sub>7</sub> 、L <sub>1</sub> 椎体	T <sub>12</sub> 、L <sub>1</sub>	高脂血症, 胸腔积液	T <sub>2a</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1c</sub>	IVB
MBP 4	T <sub>10</sub> 椎体、右侧第8后肋和左侧第10后肋	T <sub>10</sub>	高血压病, 控制良好	T <sub>3</sub> N <sub>2b</sub> M <sub>1c</sub>	IVB
对照1	右侧颞骨、右肩胛骨、T <sub>1</sub> 椎体, 左侧第6后肋	无	无	T <sub>2a</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1c</sub>	IVB
对照2	L <sub>1/2/4</sub> 椎体、双侧髌髌关节和双侧第11后肋	无	高血压病, 控制良好	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1c</sub>	IVB
对照3	T <sub>1</sub> 、L <sub>1</sub> 椎体	无	无	T <sub>2a</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1c</sub>	IVB
对照4	T <sub>2/9/10/11</sub> 、L <sub>1</sub> 、L <sub>3</sub> 椎体	无	无	T <sub>2b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1c</sub>	IVB
对照5	C <sub>7</sub> 、T <sub>1</sub> 、T <sub>2</sub> 椎体及骨盆多发转移	无	无	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1c</sub>	IVB

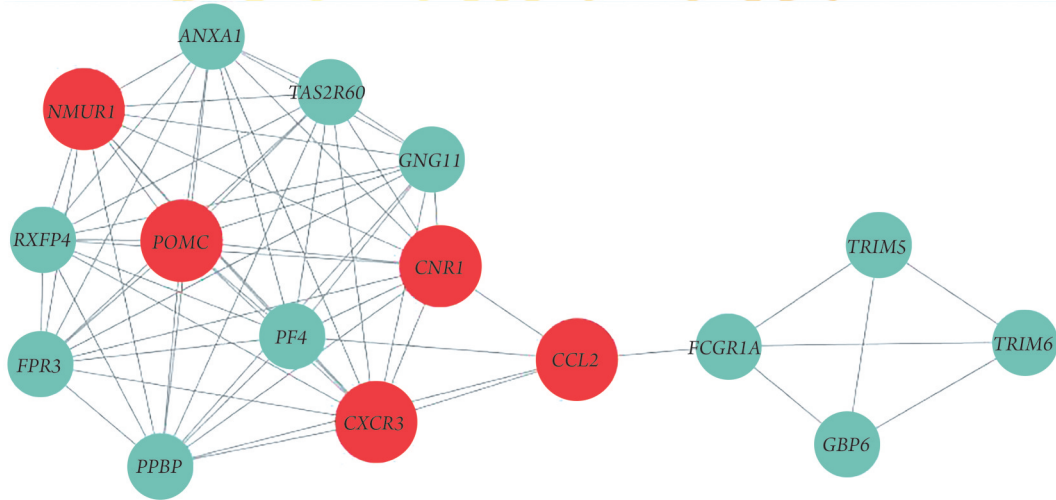
MBP. 骨转移癌痛



NOD. 核苷酸结合寡聚化结构域; RIG-I. 视黄酸诱导基因 I 型; NF- $\kappa$ B. 核因子- $\kappa$ B; IL-1 $\beta$ . 白细胞介素-1 $\beta$ ; KEGG. 京都基因和基因组数据库; GO. 基因本体论; A. 上调DEGs的KEGG功能富集分析; B. 上调DEGs的GO富集分析

图3 肺腺癌骨转移的差异表达基因(DEGs)的功能富集分析

Fig.3 Functional enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) in lung adenocarcinoma with bone metastasis



红色代表关键基因

图4 肺腺癌骨转移患者转录组测序中关键蛋白表达模块

Fig.4 The key protein expression module in lung adenocarcinoma patients with bone metastasis

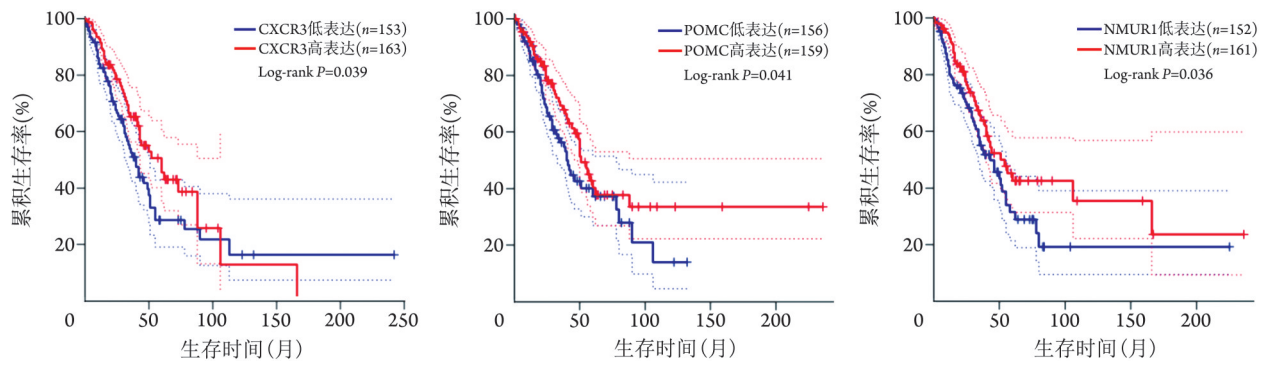
为关键节点，由此确定了两条lncRNA-miRNA-mRNA竞争性内源网络：MALAT1-hsa-miR-124-3p.2-CCL2和NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3。

2.6 ceRNA各节点表达水平 采用qPCR对上述两条ceRNA网络中的CCL2、hsa-miR-124-3p.2、MALAT1、CXCR3、hsa-miR-325-3p和NEAT1的表达水平进行检测，结果如图7所示，MBP组患者的CCL2、CXCR3、

NEAT1、MALAT1和hsa-miR-325-3p表达水平均高于对照组( $P < 0.05$ )，而hsa-miR-124-3p.2表达水平低于对照组( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

生物信息学数据具有“小样本、大数据”的特点，单次的转录组测序能够产生30万个以上的碱基



CXCR3. 趋化因子受体3; POMC. 促阿片-黑素细胞皮质素原; NMUR1. 神经调节肽U受体1

图5 肺腺癌骨转移患者中CXCR3、POMC和NMUR1基因差异表达者的生存曲线

Fig. 5 Survival curves in patients with bone metastases from lung adenocarcinoma with differential expression of CXCR3, POMC, and NMUR1 genes

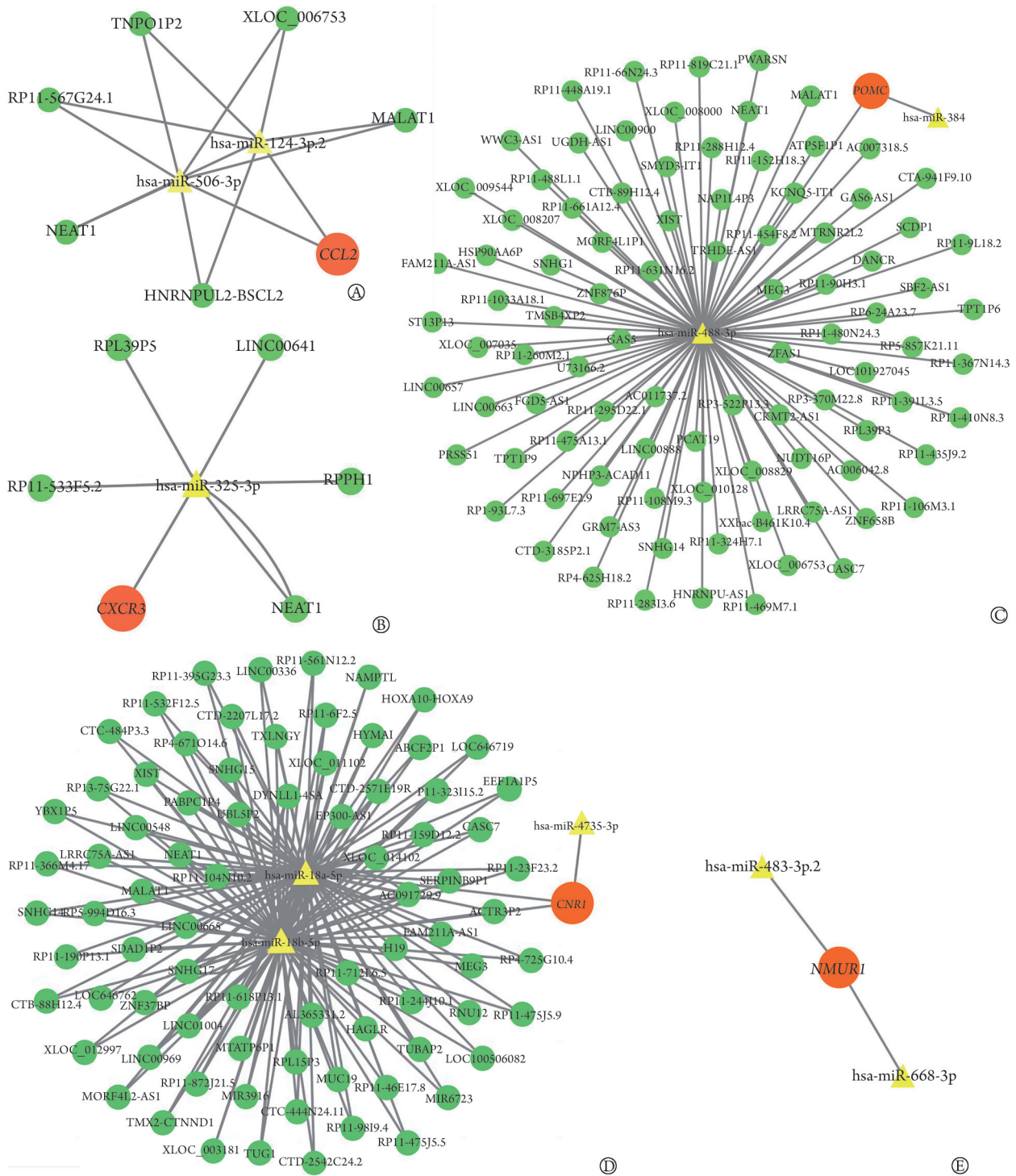
序列。对于主要差异显著且基线控制良好的临床样本，目前认为每组3个及以上样本比较即具有临床意义<sup>[10-11]</sup>。目前疼痛领域的生物信息学研究主要集中于神经病理性疼痛、术后疼痛及炎性疼痛，而关于MBP的研究较少，且当前的MBP转录组学研究主要针对实验动物。笔者检索该领域最常用的两大公共数据库癌症基因组图谱(TCGA)和基因表达综合数据库(GEO)均未发现与肺腺癌MBP相关的临床数据。本课题组前期研究发现，MBP组与对照组间存在明显的基因表达差异，并分析得到疼痛相关差异基因CXCL1、CXCL10、CXCR4和GNG7<sup>[12]</sup>，但该研究未对差异基因的调控关系进行分析和验证。本研究重新筛选两组患者，对肺腺癌骨转移患者进行详细的临床评估，筛选得到4例典型MBP患者和5例肺腺癌骨转移不伴癌痛患者，通过进一步生物信息学分析得到关键节点基因CXCR3、POMC、NMUR1、CCL2和CNR1，其中趋化因子相关的基因(CXCR3和CCL2)仍是主要的差异基因。另外，本研究还发现与内源性阿片肽相关的基因POMC显著低表达。进一步对上述基因间的调控关系进行分析，得到MALAT1-hsa-miR-124-3p-2-CCL2和NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3两条调控网络并进行qPCR验证。

临床上，尽管有近1/3的骨转移患者发生MBP，然而具备静息痛及爆发痛的典型MBP临床表现的患者较少。这是由于MBP的产生原因众多，如特殊的转移部位、巨大的转移灶或合并神经根产生压迫等情况。为筛选典型MBP患者，本研究对骨转移部位的影像学特点、疼痛原因和类型(躯体性、内脏性或神经病理性)、疼痛发作情况和止痛治疗等进行全面、量化、动态评估，结果显示，两组患者骨转移病灶多数位于胸腰椎椎体，未见合并明显的周围神经压迫等影像学表现，且两组的年龄、BMI、合并症等一般情况也无明显差异(表1、2)。因此笔者认

为两组人群的主要差异源于MBP的生物学特性。

对筛选得到的肺腺癌骨转移患者血液样本进行mRNA测序，得到1466个DEGs，进一步功能富集分析发现，MBP组的上调DEGs大部分富集于破骨细胞分化、NOD样受体信号转导通路、I型干扰素信号通路、NF- $\kappa$ B信号通路、凋亡/自噬通路、趋化因子信号通路、IL-1 $\beta$ 通路，表明多种机制参与了MBP的发生。首先，趋化因子在MBP中显著富集，提示炎性疼痛可能是MBP的重要成分。这是因为多种经典趋化因子高表达是炎性疼痛的重要特征<sup>[13]</sup>，本研究中趋化因子相关基因CCL2、CXCR3等也存在明显的差异表达。在构建ceRNA调控网络时，进一步筛选得到两条趋化因子相关的ceRNA调控网络。其次，神经元外源性凋亡信号通路在MBP组中显著富集，提示神经病理性疼痛是MBP的重要成分。神经元或小胶质细胞凋亡是神经病理性疼痛的主要特点，而与MBP有关的神经元凋亡研究较少<sup>[14]</sup>。KEGG富集分析结果(图3A)显示，DEGs显著富集于NOD样受体信号通路，而NOD样信号通路被认为广泛参与了神经病理性疼痛的发生<sup>[15]</sup>。周围神经损伤时，NOD2配体表达增多，同时，外周巨噬细胞中的NOD2信号通路被肿瘤坏死因子和IL-1 $\beta$ 激活，从而介导了神经病理性疼痛的发生<sup>[15]</sup>。本研究中MBP患者外周血NOD2及其下游的IL-1 $\beta$ 也存在明显的差异表达(图2)，提示神经元凋亡引起的神经病理性疼痛可能促进了MBP的发生。以上结果表明，经典的趋化因子相关通路、凋亡相关通路介导的炎性疼痛及神经病理性疼痛可能是MBP发生的重要机制。

本研究发现，MBP具有不同于炎性疼痛和神经病理性疼痛的特点。MBP组中破骨细胞分化通路上的基因显著富集，提示骨组织本身的变化是MBP发生的原因之一。关键基因NMUR1、POMC和CNR1



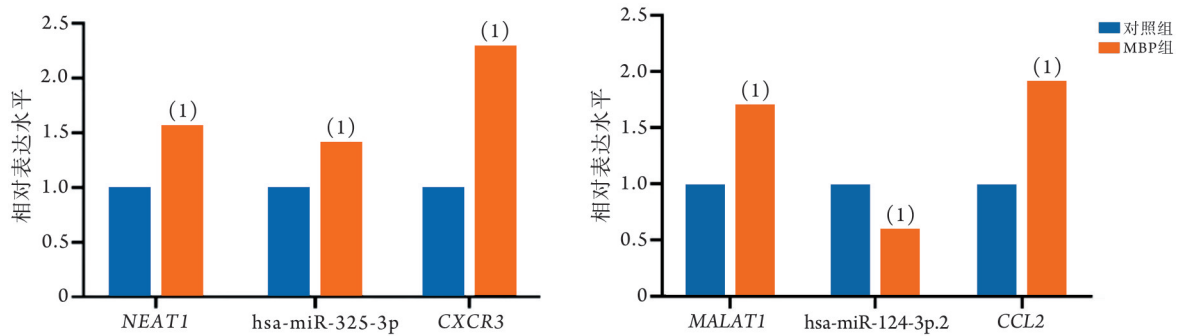
CCL2, 趋化因子配体2; CXCR3, 趋化因子受体3; POMC, 促阿片-黑素细胞皮质素原; CNR1, 内源性大麻素受体; NMUR1, 神经调节肽U受体1; A. CCL2的ceRNA调控网络; B. CXCR3的ceRNA调控网络; C. POMC的ceRNA调控网络; D. CNR1的ceRNA调控网络; E. NMUR1的ceRNA调控网络

图6 CCL2、CXCR3、POMC、CNR1和NMUR1的ceRNA网络图  
Fig.6 ceRNA network of CCL2, CXCR3, POMC, CNR1 and NMUR1

的显著差异表达也提示MBP具备不同于炎性疼痛和神经病理性疼痛的特点。神经调节肽U(NMU)是一种高度保守的肽，广泛表达于中枢神经系统及外周组织，多项研究显示其可通过NMUR1介导外周镇痛<sup>[16-17]</sup>。NMUR1在外周组织中表达丰富，可在小到

中等直径的外周神经元中表达，具有降低外周神经元兴奋性及外周镇痛的作用<sup>[18]</sup>。本研究中MBP患者中NMUR1表达明显下调(图2)，提示MBP患者可能存在外周镇痛不全。

POMC是一种经典的内源性阿片前体肽，水解



MALAT1. 人类肺腺癌转移相关转录本 1; CCL2. 趋化因子配体 2; NEAT1. 核富集转录本 1; CXCR3. 趋化因子受体 3; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$

图7 NEAT1、hsa-miR-325-3p、CXCR3、MALAT1、hsa-miR-124-3p.2、CCL2的表达水平(qPCR检测)

Fig.7 Expression levels of NEAT1, hsa-miR-325-3p, CXCR3, MALAT1, hsa-miR-124-3p.2 and CCL2 (detected by qPCR)

后可产生阿片肽, 并与阿片受体结合导致神经元兴奋的抑制, 从而起到缓解疼痛的作用<sup>[19]</sup>。临床上慢性疼痛患者持续存在的静息痛常提示内源性阿片介导的镇痛机制存在功能障碍<sup>[20]</sup>。本研究发现, MBP患者中POMC表达显著下调, 提示其内源性阿片镇痛机制存在功能障碍。另外, CNR1在MBP患者中表达明显上调(图2)。有研究显示, 在急性疼痛的外周和中枢敏化临床前模型中, 内源性大麻素系统的变化与疼痛信号的转导密切相关<sup>[21]</sup>。慢性疼痛易感性的机制涉及内源性大麻素循环数量的变化<sup>[22]</sup>, 有研究比较了急性腰痛与慢性腰痛患者外周血mRNA的表达差异, 发现内源性大麻素相关蛋白CNR2、TRPV1及FAAH在慢性腰痛患者中呈高表达, 提示内源性大麻素相关蛋白介导了急慢性痛的转化<sup>[23]</sup>。本研究CNR1在MBP患者中明显呈高表达, 提示CNR1可能参与了肺腺癌MBP的急慢性痛转化过程。功能富集分析及NMUR1、POMC、CNR1基因的显著差异表达提示骨组织内部微环境改变, 外周神经抗痛觉作用减退、内源性阿片镇痛机制功能障碍以及内源性大麻素循环数量变化介导的疼痛慢性转化可能是MBP发病机制的显著特点。

本研究从lncRNA-miRNA-mRNA网络关系得到5条ceRNA网络, 根据ceRNA网络调控理论, 最终得到2条ceRNA网络: MALAT1-hsa-miR-124-3p.2-CCL2和NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3。首先, MALAT1-hsa-miR-124-3p.2-CCL2网络中的lncRNA、miRNA和mRNA均为疼痛发生的常见调控因子, 在功能上发挥着类似作用, 这是构建ceRNA调控网络的前提。(1)MALAT1是肺腺癌骨转移的重要调控基因, 在神经病理性疼痛中发挥重要作用。MALAT1可调控多条miRNA/mRNA轴参与神经病理性疼痛的发生<sup>[3]</sup>。近期研究发现, MALAT1可通过miR-206/ZEB2轴抑制神经炎症, 从而抑制神经性疼痛的进展<sup>[24]</sup>。(2)hsa-miR-124-3p可通过调控突触足蛋白参与

MBP的发生, 也可通过调控增强型多聚组蛋白同源体2(*Ezh2*)基因参与神经病理性疼痛的发生<sup>[25]</sup>。(3)多项研究证实, MALAT1-hsa-miR-124-3p.2-CCL2中的下游基因CCL2介导了MBP等多种类型疼痛的发生<sup>[26-27]</sup>。其次, MBP组lncRNA和mRNA表达均上调, 表明lncRNA和mRNA的表达呈同向变化关系, 符合ceRNA内部的变化规律。根据ceRNA调控理论, miRNA可通过结合mRNA对其进行负向调控, 而lncRNA通过竞争性结合miRNA解除miRNA对于mRNA的抑制, 因此lncRNA与mRNA变化的一致性也初步验证了本研究得到的ceRNA网络。

NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3中的lncRNA、miRNA和mRNA均为疼痛的常见调控因子。NEAT1可通过miR-381/高迁移率族蛋白B1(HMGB1)轴和miR-128-3p/水通道蛋白4(AQP4)轴参与神经病理性疼痛的发展<sup>[28]</sup>。hsa-miR-325-5p已被证实可通过调控CCL2介导大鼠腹痛的发生<sup>[29]</sup>; 而下流的CXCR3作为一种趋化因子受体, 可与脊髓的CXCL10结合, 介导小鼠MBP的发生<sup>[30]</sup>。综上, 首先, 该条网络中lncRNA-miRNA-mRNA在功能上与疼痛的发生关系紧密。其次, qPCR检测结果显示, NEAT1与CXCR3在肺腺癌MBP患者中的表达均上调, 表明mRNA与lncRNA的表达呈正相关, 提示NEAT1可能通过miR-325/CXCR3轴调控MBP的发生。

本研究的不足之处在于测序样本来源于血液而不是癌和癌旁组织。尽管血液样本常作为转录组测序的检测样本, 但其中包含了较多的混杂信息, 后续将采集癌和癌旁组织进行转录组分析。另外, 本研究仅对实验结果进行qPCR验证, 后续将在动物模型中对ceRNA网络节点进行验证。

综上所述, 本研究结果显示, 破骨细胞分化、NOD样受体信号转导通路、凋亡/自噬通路、趋化因子信号通路和IL-1 $\beta$ 通路的基因差异表达可能是肺腺癌MBP发生的重要机制, 其中CXCR3、CCL2、

POMC、NMUR1 和 CNR1 可能是肺腺癌 MBP 的关键基因, 此外, 骨转移患者产生疼痛差异的原因还可能与炎症相关的 MALAT1-hsa-miR-124-3p、2-CCL2 和 NEAT1-hsa-miR-325-3p-CXCR3 调控网络有关, 该结果为临床治疗肺腺癌 MBP 提供了参考依据。

#### 【参考文献】

- [1] Edrington J, Sun A, Wong C, *et al.* Barriers to pain management in a community sample of Chinese American patients with cancer[J]. *J Pain Symptom Manage*, 2009, 37(4): 665-675.
- [2] Takei D, Tagami K. Management of cancer pain due to bone metastasis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2023, 41(3): 327-336.
- [3] Fan W, Lu N, Shen Z, *et al.* Generic synthesis of small-sized hollow mesoporous organosilica nanoparticles for oxygen-independent X-ray-activated synergistic therapy[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1241.
- [4] Sherman BT, Hao M, Qiu J, *et al.* DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-W221.
- [5] Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, *et al.* Cytoscape StringApp: network analysis and visualization of proteomics data[J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(2): 623-632.
- [6] Li C, Tang Z, Zhang W, *et al.* GEPIA2021: integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W242-W246.
- [7] Piñero J, Ramirez-Anguita JM, Saüch-Pitarch J, *et al.* The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D845-D855.
- [8] Agarwal V, Bell GW, Nam JW, *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J]. *Elife*, 2015, 4: e05005.
- [9] Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Tastsoglou S, *et al.* DIANA-lncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D101-D110.
- [10] Liu Y, Zhou J, White KP. RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication? [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(3): 301-304.
- [11] 林美佳, 雷宇清, 叶洲杰, 等. IDH1 基因在肝内胆管癌细胞 HuCCT1 增殖与迁移中的作用及其初步机制[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(2): 194-203.
- [12] 林中原, 王益敏, 张辉, 等. 肺腺癌骨转移癌痛患者外周血转录组学研究[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(21): 2953-2957.
- [13] Machairiotis N, Vasilakaki S, Thomakos N. Inflammatory mediators and pain in endometriosis: a systematic review[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(1): 54.
- [14] Liao MF, Lu KT, Hsu JL, *et al.* The role of autophagy and apoptosis in neuropathic pain formation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2685.
- [15] Santa-Cecilia FV, Ferreira DW, Guimaraes RM, *et al.* The NOD2 signaling in peripheral macrophages contributes to neuropathic pain development[J]. *Pain*, 2019, 160(1): 102-116.
- [16] Gilbert AK, Puma C, Xu X, *et al.* Neuromedin U receptor 2 does not play a role in the development of neuropathic pain following nerve injury in mice[J]. *Eur J Pain*, 2013, 17(8): 1147-1155.
- [17] Gajjar S, Patel BM. Neuromedin: an insight into its types, receptors and therapeutic opportunities[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(3): 438-447.
- [18] Zhang Y, Jiang D, Zhang Y, *et al.* Neuromedin U type 1 receptor stimulation of A-type K<sup>+</sup> current requires the  $\beta\gamma$  subunits of Go protein, protein kinase A, and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in sensory neurons[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(22): 18562-18572.
- [19] Harno E, Gali Ramamoorthy T, Coll AP, *et al.* POMC: the physiological power of hormone processing[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2381-2430.
- [20] Carniglia L, Ramírez D, Durand D, *et al.* Neuropeptides and microglial activation in inflammation, pain, and neurodegenerative diseases[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 5048616.
- [21] Donvito G, Nass SR, Wilkerson JL, *et al.* The endogenous cannabinoid system: a budding source of targets for treating inflammatory and neuropathic pain[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2018, 43(1): 52-79.
- [22] Romero-Sandoval EA, Kolano AL, Alvarado-Vázquez PA. Cannabis and cannabinoids for chronic pain[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(11): 67.
- [23] Ramesh D, D'Agata A, Starkweather AR, *et al.* Contribution of endocannabinoid gene expression and genotype on low back pain susceptibility and chronicity[J]. *Clin J Pain*, 2018, 34(1): 8-14.
- [24] Chen ZL, Liu JY, Wang F, *et al.* Suppression of MALAT1 ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats *via* modulating miR-206 and ZEB2[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 15647-15653.
- [25] Zhang Y, Liu HL, An LJ, *et al.* miR-124-3p attenuates neuropathic pain induced by chronic sciatic nerve injury in rats *via* targeting EZH2[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5747-5755.
- [26] Li L, Liu Y, Hu W, *et al.* Peripheral CCL2 induces inflammatory pain *via* regulation of I<sub>h</sub> currents in small diameter DRG neurons[J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1144614.
- [27] Midavaine É, Brouillette RL, Théberge E, *et al.* Discovery of a CCR2-targeting pepducin therapy for chronic pain[J]. *Pharmacol Res*, 2024, 205: 107242.
- [28] Xia LX, Ke C, Lu JM. NEAT1 contributes to neuropathic pain development through targeting miR-381/HMGB1 axis in CCI rat models[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7103-7111.
- [29] Wu R, Zhang PA, Liu X, *et al.* Decreased miR-325-5p contributes to visceral hypersensitivity through post-transcriptional upregulation of CCL2 in rat dorsal root ganglia[J]. *Neurosci Bull*, 2019, 35(5): 791-801.
- [30] Bu H, Shu B, Gao F, *et al.* Spinal IFN- $\gamma$ -induced protein-10 (CXCL10) mediates metastatic breast cancer-induced bone pain by activation of microglia in rat models[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 143(2): 255-263.

(责任编辑: 纪方方)