

宋姗姗,陈昊,张强,等. 基于数据库分析 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 79-84.

Song SS, Chen H, Zhang Q, et al. Expression and clinical significance of *RASAL1* and *RASAL2* in non-small cell lung cancer: a database analysis [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(10): 79-84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.10.014

基于数据库分析 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义

宋姗姗¹, 陈 昊¹, 张 强², 王永芳¹, 聂艳红^{1*}

(1.徐州医科大学附属连云港市第一人民医院,江苏 连云港 222061; 2.连云港市第二人民医院,江苏 连云港 222023)

【摘要】 目的 通过生物数据库,综合分析 Ras 蛋白激活类似物 1(*ras protein activator like 1, RASAL1*)和大鼠肉瘤蛋白活化因子 2(*ras protein activator like 2, RASAL2*)在 NSCLC 中的表达及与临床预后的意义。**方法** 全面检索 Oncomine 及 Kaplan-Meier Plotter 数据库,分析 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在 NSCLC 组织与正常组织中的表达差异及与患者临床预后的关系。**结果** Oncomine 数据库中分析发现,*RASAL1* 在 NSCLC 中表达增高 ($P<0.05$),*RASAL2* 在 NSCLC 中表达降低 ($P<0.05$)。Kaplan-Meier Plotter 数据库分析发现,低表达的 *RASAL1* 和高表达的 *RASAL2* 在 NSCLC 中与良好的预后相关,且低表达的 *RASAL1* 与接受放疗的 NSCLC 患者的良好预后相关。**结论** 在 NSCLC 组织中 *RASAL1* 高表达,*RASAL2* 低表达,且均与患者的预后相关。*RASAL1* 可能作为促癌基因,*RASAL2* 作为抑癌基因参与 NSCLC 的发生发展。*RASAL1* 对 NSCLC 患者预后的影响还与放疗效果相关,其可能是 NSCLC 的潜在治疗靶点。

【关键词】 非小细胞肺癌;*RASAL1*;*RASAL2*;生物数据库

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 10-0079-06

Expression and clinical significance of *RASAL1* and *RASAL2* in non-small cell lung cancer: a database analysis

SONG Shanshan¹, CHEN Hao¹, ZHANG Qiang², WANG Yongfang¹, NIE Yanhong^{1*}

(1. First People's Hospital of Lianyungang, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Lianyungang 222061, China.
2. Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222023)

【Abstract】 Objective This database analysis was performed to analyze the expression and clinical significance of Ras protein activator like 1 (*RASAL1*) and Ras protein activator like 2 (*RASAL2*) in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Using Oncomine, we comprehensively compared the differential expression of *RASAL1* and *RASAL2* genes in NSCLC and normal lung tissues. The relationship between the expressions of *RASAL1* and *RASAL2* and the prognosis of NSCLC was retrieved from the Kaplan-Meier plotter database. **Results** In the Oncomine data analysis, *RASAL1* was increased and *RASAL2* was decreased in NSCLC ($P<0.05$ for both). The Kaplan-Meier plotter data analysis indicated that low expression of *RASAL1* and high expression of *RASAL2* were closely associated with a good prognosis, including overall survival and post-progression survival. Furthermore, low expression of *RASAL1* was associated with a good prognosis in

[作者简介] 宋姗姗(1991—),女,硕士研究生,研究方向:肿瘤病理。E-mail: 956878887@qq.com

[通信作者] 聂艳红(1986—),女,主治医师。E-mail: nieyanhong2006@163.com

patients with NSCLC receiving chemotherapy and radiotherapy. **Conclusions** In NSCLC, *RASAL1* is increased and *RASAL2* is decreased, and they are associated with patients' clinical prognosis. *RASAL1* may promote and *RASAL2* may suppress the development of NSCLC. The effect of *RASAL1* on the prognosis of patients with NSCLC is also related to radiotherapy and chemotherapy, and *RASAL1* may thus be a potential therapeutic target for NSCLC.

[Keywords] NSCLC; *RASAL1*; *RASAL2*; biological databases

肺癌的发病率和死亡率位于全球恶性肿瘤的第一位,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌的 85%,且多数患者在确诊时已处于晚期^[1]。靶向治疗是 NSCLC 晚期患者的重要治疗手段,虽然目前的分子靶向治疗已使部分患者受益,但总体预后仍然较差,故寻找有效的分子靶标仍具有重要的临床意义。Ras 蛋白激活类似物 1(ras protein activator like 1, *RASAL1*)和大鼠肉瘤蛋白活化因子 2(ras protein activator like 2, *RASAL2*)均属于 RasGTP 酶活化蛋白家族(GTPase-activating protein, RasGAP)中的 GAP1 家族的成员。*RASAL1* 定位于人第 12 号染色体(12q24.13),而 *RASAL2* 基因定位于人第 1 号染色体(1q25),编码的蛋白由 1139 个氨基酸组成。两者均具有 GTP 酶的活性,能水解 GTP 为 GDP 使 Ras 蛋白失活,从而参与肿瘤的发生发展及转移^[2-3]。国内外已有 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在多种肿瘤中的研究报道^[3-7],但 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在肺癌中的研究还较少。本文基于全球最大的癌基因芯片数据库 Oncomine 和生存相关的 Kaplan-Meier Plotter 数据库的大数据信息,综合分析 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在 NSCLC 中的表达及与生存预后的关系,为后期实验及潜在的临床价值提供指导。

1 材料和方法

1.1 数据库来源和方法

利用 Oncomine 数据库(<https://www.oncomine.org/>)分析 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在 NSCLC 中的表达差异。登录 Oncomine 数据库首页,设定条件:1) Gene: *RASAL1/2*; 2) Analysis Type: Cancer vs Normal Analysis。进一步分析 *RASAL1/2* 在 NSCLC 中的表达:① Cancer Type: Non-Small cell Lung carcinoma; ② Data Type: mRNA; ③ 临界值设定条件: P value < $1E-4$, fold change > 2, gene rank = top 10%; ④ 其他为数据库默认设定。最后勾选 NSCLC 相关研究进行 compare 的二次分析。

基于 Kaplan-Meier Plotter 数据库(<http://kmplot.com/analysis/>)分析 *RASAL1* 和 *RASAL2* 与 NSCLC 患者临床生存预后的关系。登录 Kaplan-

Meier Plotter 数据库首页,选择肺癌页面(Lung cancer),设定条件:① Gene: *RASAL1/2*; ② Split patients by: Auto select best cutoff; ③ Survival: OS/PPS; ④ Histology: adenocarcinoma/squamous cell carcinoma; ⑤ 勾选需要分析的分层指标; ⑥ 其他为数据库默认设定。

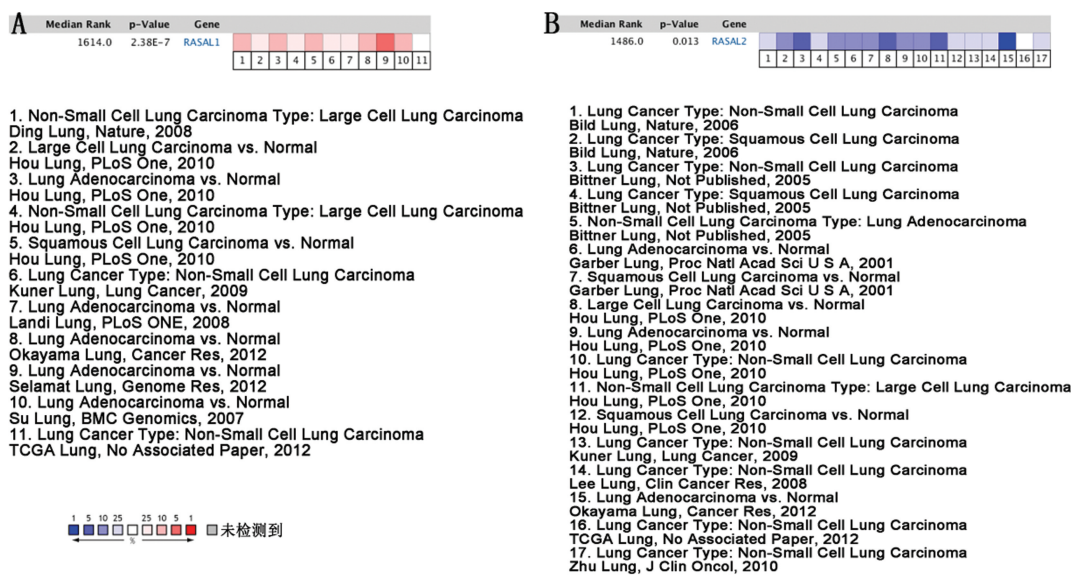
1.2 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,检验均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。*RASAL1* 和 *RASAL2* 在正常组织与 NSCLC 组织中的表达差异采用 t 检验。Kaplan-Meier 模型分析 *RASAL1* 和 *RASAL2* 与 NSCLC 患者临床生存预后之间的关系。

2 结果

2.1 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在 NSCLC 与正常组织中的表达差异

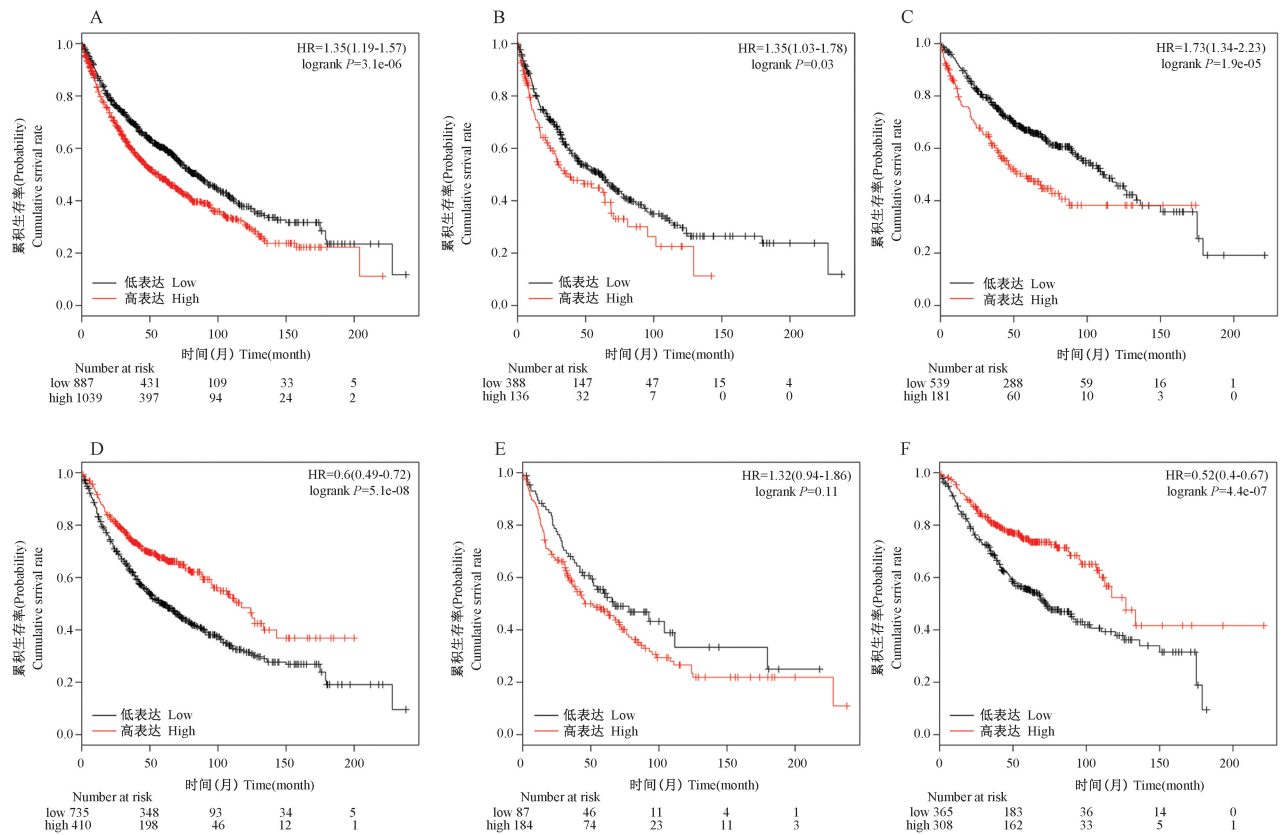
Oncomine 数据库包含 715 个基因表达数据集和 86733 个样本数据,其中 *RASAL1* 基因有 549 个数据集,样本数据为 72466 个, *RASAL2* 基因有 641 个数据集,样本数据为 78639 个。Oncomine 数据库中, *RASAL1* 基因有 355 项不同类型的研究结果,其中 16 项差异有统计学意义,4 项表达增高,12 项表达降低, *RASAL1* 在肺癌中高表达; *RASAL2* 基因有 426 项不同类型的研究结果,其中 23 项差异有统计学意义,表达增高的研究有 13 项,降低的有 10 项, *RASAL2* 在肺癌中低表达。综合分析 11 项(见附件参考文献 8-15)关于 *RASAL1* 在 NSCLC 组织与正常组织中表达的研究,发现 *RASAL1* 在 NSCLC 所有差异表达基因中的中位数排名是 1614.0, $P = 2.38E-7$,表明 *RASAL1* 在 NSCLC 中高表达(见图 1)。对 *RASAL2* 在 NSCLC 组织与正常组织中表达的 17 项研究^[8,11,14-15]分析发现,在 NSCLC 所有差异表达基因中 *RASAL2* 的中位数排名是 1486.0, $P = 0.013$,表明 *RASAL2* 在 NSCLC 中低表达(见图 1)。另外,分析不同病理类型 NSCLC 组织中 *RASAL1* 和 *RASAL2* 的表达水平发现, *RASAL1* 在 NSCLC 中均高表达, *RASAL2* 均低表达($P < 0.05$,见表 1,表 2)。



2.2 RASAL1 和 RASAL2 与 NSCLC 患者临床预后的关系

Kaplan-Meier Plotter 数据库中 RASAL1 在 NSCLC 中的研究样本为 1926 个, RASAL2 的样本为 1145 个, 结果显示 RASAL1 低表达组及 RASAL2 高表达组的 NSCLC 患者的生存预后较好。RASAL1 低表达组和 RASAL2 高表达组患者的总生存时间(overall survival, OS)和复发后生存(post-progression survival, PPS)均显著增高($P<0.05$, RASAL1 的 HR 分别为 1.35、1.39, 95% CI 分别为 1.19~1.54、1.05~1.83, RASAL2 的 HR 分别为 0.6、0.56, 95% CI 分别为 0.49~0.72、0.35~0.88)。进一步亚型分析, 低表达 RASAL1 的肺鳞状细胞癌和肺腺癌患者及高表达 RASAL2 的肺腺癌患者的生存时间均显著长于

高表达组(HR 分别为 1.35、1.73、0.52, 95% CI 分别为 1.03~1.78、1.34~2.23、0.4~0.67), 而 RASAL2 的表达与肺鳞状细胞癌患者的生存预后无相关性。(图 2)。低表达的 RASAL1 与接受放化疗的 NSCLC 患者的良好生存预后相关(样本量分别为 73、178, HR 分别为 2.12、1.59, 95% CI 为 1.23~3.68、1.05~2.40), 与未接受放化疗的患者的生存预后无关。而在 RASAL2 与 NSCLC 患者预后关系的研究中, 接受放化疗的研究的样本例数较少, 无法统计。此外, 低表达的 RASAL1 和高表达的 RASAL2 与早期患者(I 期和 II 期)的良好预后相关, 在男、女及吸烟、不吸烟的患者中均与预后相关。而与分级和晚期(III 期和 IV 期)患者的生存预后差异无统计学意义。



注: A~C: RASAL1 在 NSCLC、肺鳞状细胞癌、肺腺癌中; D~F: RASAL2 在 NSCLC、肺鳞状细胞癌、肺腺癌中。

图 2 RASAL1 和 RASAL2 与 NSCLC 患者预后的关系

Note. A-C: RASAL1 in NSCLC, lung squamous cell carcinoma, lung adenocarcinoma. D-F: RASAL2 in NSCLC, squamous cell carcinoma, and lung adenocarcinoma.

Figure 2 Relationship between RASAL1 and RASAL2 expressions and prognosis in patients with NSCLC

3 讨论

NSCLC 是肺癌最常见的病理类型, 包括腺癌、大细胞癌和鳞状细胞癌, 但确诊时多已错失手术治

疗时间, 故预后相对较差^[16-17]。近年来, 随着生物标志物的不断发现, 靶向药物的临床应用, 患者的生存预后有所改善^[18-19]。但肺癌的高发病率及死亡率仍持续增长, 故亟需寻找新的生物标志物以提

高诊断、治疗及预后评估^[20]。

Ras 是最早发现的人类癌基因,其失调与肿瘤的发生发展密切相关。*RASAL1* 和 *RASAL2* 作为 Ras 的调节基因,也与肿瘤的形成密切相关^[21-22]。在胃癌中,Chen 等^[3]发现低表达的 *RASAL1* 能促进胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移,显示了 *RASAL1* 的抑癌作用。Liu 等^[23]研究发现,上调甲状腺癌中的 *RASAL1* 同样能抑制癌细胞的生长、迁移和侵袭。此外,在肝癌^[6]、结直肠癌^[24]等多种肿瘤中的研究均显示 *RASAL1* 表达降低,从而促使肿瘤的发生,且低表达的 *RASAL1* 与不良预后相关。但尚未见 *RASAL1* 与 NSCLC 的相关报道。*RASAL2* 在肿瘤中的研究尚存争议,Hui 等^[5]发现,*RASAL2* 在膀胱癌中抑制肿瘤的发生,但在肝癌中,*RASAL2* 上调促进肿瘤细胞的增殖和转移^[25]。即使在同一种肿瘤或同一种肿瘤的不同分型中,*RASAL2* 的研究结果也不同。在结直肠癌中,Jia 等^[4]研究表明,下调 *RASAL2* 能促进结直肠癌细胞的增殖,上皮-间质转化和转移,而 Pan 等^[26]发现,*RASAL2* 在结直肠的原发肿瘤及转移瘤中表达增加,且高表达的 *RASAL2* 与患者的不良预后相关。在乳腺癌中,伴随 *RASAL2* 的失活,LuminalB 型乳腺癌发生侵袭和转移^[27],但过表达的 *RASAL2* 对三阴性乳腺癌起促侵袭和转移的作用^[28]。目前,关于 *RASAL2* 在肺癌中的研究,仅报道了其对于肺腺癌的抑制作用^[29]。鉴于此,我们通过生物数据库分析 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在 NSCLC 中的表达差异及与患者临床生存预后的关系,为进一步研究 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在 NSCLC 中的作用提供参考和理论依据。

利用 Oncomine 数据库检索 *RASAL1* 基因发现:共 12 项研究,包括脑、食管和头颈部等多部位的肿瘤,显示 *RASAL1* 低表达;共 4 项研究,包括结直肠癌、卵巢癌及肺癌组织,显示 *RASAL1* 高表达。*RASAL1* 在 NSCLC 组织中的研究共 11 项,对其二次分析发现,*RASAL1* 在 NSCLC 中的表达较正常组织增加。*RASAL1* 在肺癌中的表达与已报道的在其他肿瘤中的表达结果相反,可能是由于组织特异性导致的,这与数据库中分析的 *RASAL1* 在不同部位肿瘤中的表达不同相符,也可能是样本量小导致的误差,具体原因及机制还有待于大量实验验证。*RASAL2* 基因的数据集有 641 个,样本数为 78639 个,有统计学差异的研究有 23 项。23 项研究中,包括结直肠癌、食管癌、肾脏肿瘤及肺癌等多部位共

10 项研究显示 *RASAL2* 表达降低,在乳腺癌、结直肠癌及胃癌等多部位共 13 项研究显示 *RASAL2* 表达增加。*RASAL2* 在结直肠癌中的文献报道既有高表达的也有低表达的,这与数据库的结果符合,猜测 *RASAL2* 的表达差异可能与肿瘤亚型相关。对 17 项关于 NSCLC 组织和正常组织中 *RASAL2* 的研究深入分析发现,*RASAL2* 在 NSCLC 中表达降低,这与 Li 等^[29]的研究结果一致。综上,我们得出 *RASAL1* 和 *RASAL2* 的表达在不同肿瘤中存在差异,在同一肿瘤中可能还与肿瘤亚型相关;在 NSCLC 中,*RASAL1* 表达增加,*RASAL2* 表达降低。Kaplan-Meier Plotter 数据库分析表明,低表达的 *RASAL1* 和高表达的 *RASAL2* 与 NSCLC 患者的良好预后相关,结合 *RASAL1* 和 *RASAL2* 在 NSCLC 中的表达水平,猜测 *RASAL1* 可能在 NSCLC 中起促进癌发生的作用,而 *RASAL2* 可能作为抑癌基因而存在。进一步分析,*RASAL1* 在鳞癌和腺癌中均与患者预后相关,*RASAL1* 的表达可能不与 NSCLC 的病理类型相关;*RASAL2* 只在腺癌中与患者生存预后相关,*RASAL2* 可能与 NSCLC 的病理类型相关,亦或样本量小(271 个样本)引起的实验误差。此外,低表达的 *RASAL1* 与接受放化疗的 NSCLC 患者的良好预后相关(*RASAL2* 样本量小无法分析),表明 *RASAL1* 可能是潜在的治疗靶点;*RASAL1* 和 *RASAL2* 在早期患者中的表达与生存预后相关,表明其可能在疾病的早期发挥作用,但仍需大量的研究来验证。

总之,在 NSCLC 中,*RASAL1* 高表达,*RASAL2* 低表达,且低表达的 *RASAL1* 和高表达的 *RASAL2* 与早期患者良好的临床预后相关,故猜测 *RASAL1* 在 NSCLC 的早期形成中可能起促进作用,*RASAL2* 起抑制作用。*RASAL1* 对 NSCLC 患者预后的影响还与放化疗相关,其可能是改善辅助治疗的重要靶点。*RASAL1* 和 *RASAL2* 可能是 NSCLC 诊断、治疗及预后评估的潜在生物标志物,但限于数据库的研究范围及样本量,上述猜测还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Maertens O, Cichowski K. An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer [J]. Adv Biol Regul, 2014, 55: 1-14.
- [3] Chen H, Yang Y, Wang J, et al. miR-130b-5p promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells via targeting *RASAL1* [J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 6361-6367.

- [4] Jia Z, Liu W, Gong L, et al. Downregulation of *RASAL2* promotes the proliferation, epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1379-1385.
- [5] Hui K, Wu S, Yue Y, et al. *RASAL2* inhibits tumor angiogenesis via p-AKT/ETS1 signaling in bladder cancer [J]. *Cell Signal*, 2018, 48: 38-44.
- [6] Meng F, Zhang W, Wang Y. *RASAL1* inhibits HepG2 cell growth via HIF2 α mediated gluconeogenesis [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7344-7352.
- [7] 王昭昕, 李淑琴, 王培顺, 等. 乳腺癌组织中 *RASAL2* 的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2018, 58(9): 66-68.
- [8] Okayama H, Kohno T, Ishii Y, et al. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(1): 100-111.
- [9] Selamat SA, Chung BS, Girard L, et al. Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression [J]. *Genome Res*, 2012, 22(7): 1197-1211.
- [10] Su LJ, Chang CW, Wu YC, et al. Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap re-sampling scheme [J]. *Bmc Genomics*, 2007, 8(1): 140.
- [11] Hou J, Aerts J, Hamer BD, et al. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10312.
- [12] Landi MT, Dracheva T, Rotunno M, et al. Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival [J]. *PLoS One*, 2008, 3(2): e1651.
- [13] Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2008, 455: 1069-75.
- [14] Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(24): 13784-13789.
- [15] Bild AH, Yao G, Chang JT, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies [J]. *Nature*, 2006, 439(7074): 353-357.
- [16] Reck M, Popat S, Reinmuth N, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(3): iii27-iii39.
- [17] Jin B, Jin H, Wu HB, et al. Long non-coding RNA SNHG15 promotes CDK14 expression via miR-486 to accelerate non-small cell lung cancer cells progression and metastasis [J]. *Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7164-7172.
- [18] Hsieh NT, Huang CY, Li CC, et al. MED28 and forkhead box M1 (FOXO1) mediate matrix metalloproteinase 2 (MMP2)-dependent cellular migration in human nonsmall cell lung cancer (NSCLC) cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11265-11275.
- [19] Liu Y, Qian L, Yang J, et al. The expression level and prognostic value of HIPK3 among non-small-cell lung cancer patients in China [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 7459-7469.
- [20] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [21] Jin W, Chen L, Cai X, et al. Long non-coding RNA TUC338 is functionally involved in sorafenib-sensitized hepatocarcinoma cells by targeting *RASAL1* [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 273-280.
- [22] Hui K, Gao Y, Huang J, et al. *RASAL2*, a RAS GTPase-activating protein, inhibits stemness and epithelial-mesenchymal transition via MAPK/SOX2 pathway in bladder cancer [J]. *Cell death & disease*, 2016, 195(4): e616-e616.
- [23] Liu H, Li Z, Li L, et al. EBP1 suppresses growth, migration, and invasion of thyroid cancer cells through upregulating *RASAL* expression [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(11): 8325-8331.
- [24] Bernards A, Settleman J. Loss of the ras regulator *RASAL1*: another route to ras activation in colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 46-48.
- [25] Fang JF, Zhao HP, Wang ZF, et al. Upregulation of *RASAL2* promotes proliferation and metastasis, and is targeted by miR-203 in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2720-2726.
- [26] Pan Y, Tong JHM, Lung RWM, et al. *RASAL2* promotes tumor progression through LATS2/YAP1 axis of hippo signaling pathway in colorectal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 102.
- [27] Sears R, Gray JW. Epigenomic inactivation of RasGAPs activates Ras signaling in a subset of luminal B breast cancers [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(2): 131-133.
- [28] Yan M, Li X, Tong D, et al. miR-136 suppresses tumor invasion and metastasis by targeting *RASAL2* in triple-negative breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1): 65-71.
- [29] Li N, Li S. *RASAL2* promotes lung cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 455(3-4): 358-362.

[收稿日期] 2019-04-08