

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.09.009

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.09.009>

ENO2 在肾透明细胞癌中的表达及临床意义

方春天, 席春生

(中国人民解放军联勤保障部队第940医院肾内科, 兰州 730050)

[摘要] 目的: 分析 $ENO2$ 基因在肾透明细胞癌及正常组织中的表达及其对预后的影响。方法: 挖掘Oncomine及GEPIA数据库分析肾透明细胞癌及正常组织 $ENO2$ 基因的相关数据, 利用MethHc数据库分析 $ENO2$ 基因在肾透明细胞癌及正常组织的甲基化水平, 利用GEPIA数据库分析 $ENO2$ 基因与肾透明细胞癌病理分期及生存期的相关性。结果: Oncomine及GEPIA数据库的数据显示与正常肾组织相比, $ENO2$ 在肾透明细胞癌中显著高表达; MethHc数据库的数据显示 $ENO2$ 在肾透明细胞癌中的甲基化水平低于正常组织; $ENO2$ 基因的表达量与肾透明细胞癌预后存在负相关。结论: $ENO2$ 在肾透明细胞癌中高表达是影响预后的重要因素, $ENO2$ 可能是肾透明细胞癌潜在的预后生物学标志物。

[关键词] $ENO2$; 肾透明细胞癌; 数据库分析

Expression of $ENO2$ in clear cell renal cell carcinoma and its clinical influence

FANG Chuntian, XI Chunsheng

(Department of Nephrology, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China)

Abstract **Objective:** To analyze the expression changes of $ENO2$ in clear cell renal cell carcinoma and normal tissues and its effect on prognosis. **Methods:** The Oncomine and GEPIA databases were used to analyze the data of $ENO2$ gene in clear cell renal cell carcinoma and normal kidney tissues. The MethHc database was used to analyze the methylation level of $ENO2$ in clear cell renal cell carcinoma and normal kidney tissues. GEPIA database was used to analyze the correlation between $ENO2$ gene and pathological stage and survival time of patients with clear cell renal cell carcinoma. **Results:** The Oncomine and GEPIA databases showed that $ENO2$ was significantly higher in clear cell renal cell carcinoma than normal kidney tissue; the MethHc database showed that $ENO2$ was lower in methylation in clear cell renal cell carcinoma than in normal tissues; The expression of $ENO2$ gene is negatively correlated with the prognosis of clear cell renal cell

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-22

通信作者 (Corresponding author): 席春生, Email: chunshxi@sina.com

基金项目 (Foundation item): 甘肃省自然科学基金 (1606RJZA135)。This work was supported by Gansu Natural Science Foundation, China (1606RJZA135).

carcinoma. **Conclusion:** High expression of ENO2 in clear cell renal cell carcinoma is an important factor affecting the prognosis. ENO2 may be a potential prognostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma.

Keywords ENO2; renal clear cell carcinoma; database analysis

肾细胞癌(renal cell cancer, RCC)是起源于肾小管上皮系统最常见的肾实质恶性肿瘤,按照世界卫生组织分类和国际癌症联合会指南推荐分为16个亚型,其中肾透明细胞癌(clear cell renal cell cancer, ccRCC)是最常见的组织学类型,约占75%,其次是乳头状癌,约占10%,嫌色细胞癌约占5%,其余很少见^[1]。ccRCC早期首选手术治疗,早期术后5年生存率约70%,约30%的患者术后3~5年内复发^[2]。局部复发或转移性ccRCC患者的预后较差,目前尚没有减少肿瘤复发和使用血管生成抑制剂防止术后转移的辅助治疗^[3]。人神经元特异性 γ -烯醇酶(ENO2)参与的糖酵解功能以及其对促进肿瘤细胞生长及迁移的影响是癌症治疗的潜在靶点^[4]。因此,研究ENO2可能对肾透明细胞癌的治疗及预后有一定的指导意义。烯醇酶是一种二聚体组成的具有功能活性的酶,包括3种非共价连接的亚基 α -(α), β -(β)和 γ -(γ)组织特异性同工酶,以反平行方式彼此相对,可形成五个同源二聚体或异二聚体同工酶。异酶 $\alpha\alpha$ (α -烯醇酶)在所有胎体组织和大多数成年哺乳动物组织中普遍存在,在组织发育期间,逐渐被骨骼肌和心肌细胞中的 β -烯醇化酶以及神经元细胞中 γ -烯醇酶同种型取代。 γ -烯醇酶是由433个氨基酸组成的酸性二聚体蛋白,包括两个烯醇化酶同工酶 $\gamma\gamma$ 和 $\alpha\gamma$,又称为神经元特异性烯醇化酶,主要在成熟神经元和神经元起源细胞中表达^[5],在糖酵解过程中起重要作用,促进 β -甘油磷酸转化为磷酸二羟丙酮,同时形成高能化合物(ATP和NADH)。而有氧糖酵解是肿瘤细胞的主要能量来源^[6],糖酵解增强促进肿瘤细胞增殖、侵袭^[7]。

近年来,基因芯片技术以及数据的整合分析已在多种肿瘤分析中广泛应用。Oncomine数据库是目前世界上最大的肿瘤基因挖掘数据平台,包含19种常见肿瘤类型,收集的芯片样本数据庞大,且仍在不断扩展中。GEPIA数据库是由北京大学研发的用于比较基因在正常和肿瘤组织中表达差异的在线应用数据库,包括TCGA和GTEx来源的9 000多个肿瘤样本和8 000多个正常样本的RNA测序表达数据^[8]。目前,ENO2基因在ccRCC中的表达及与预后关系鲜见报道,笔者利用Oncomine和GEPIA数据库分析,通过二次分析ENO2和

ccRCC可能存在的关系,为进一步研究ENO2在ccRCC发生发展的作用机制提供线索和依据。

1 资料与方法

1.1 Oncomine 数据库

Oncomine数据库挖掘肿瘤基因信息,与正常组织比较,基因表达谱分析鉴定肿瘤样品中的许多差异表达基因。提取Oncomine数据库数据:在数据库中设定自己需要筛选和挖掘数据的条件。Oncomine数据库中挖掘ccRcc中高表达基因。设定筛选条件:Clear Cell Renal Cell Carcinoma VS Normal Analysis; mRNA and DNA; Over-expression。从oncomine数据库中筛选出ENO2基因后,设定搜索条件为gene: ENO2。

1.2 GEPIA 数据库

本研究还使用GEPIA数据库中TCGA来源数据^[8],与Oncomine数据库相互验证基因在肿瘤组织中的表达;GEPIA数据库中,在“gene”中输入“ENO2”“cancer name”中选择“KIRC”(ccRcc)。

1.3 MethHc 数据库

MethHc数据库是包括正常组织和肿瘤组织DNA甲基化和mRNA/microRNA基因表达的综合数据库,其中包含18种人类肿瘤中6 000多个样本,6 548个微阵列和12 567个RNA测序数据,这些数据可以帮助研究人员识别对致癌作用很重要的表观遗传模式。使用MethHc数据库可以区分基因甲基化水平在正常组织和肿瘤中的差异以及基因甲基化的主要区域^[9]。在MethHc数据库中,选择“KIRC”(ccRcc),在“gene search”中输入“ENO2”“gene region”中选择“promoter”。

2 结果

2.1 Oncomine 数据库分析 ccRcc 中表达水平上调基因

在ccRcc高表达的基因中,尚未见ENO2表达的报道,且ENO2高表达患者与预后的关系差

异有统计学意义，因此本研究选择ENO2基因(图1)。

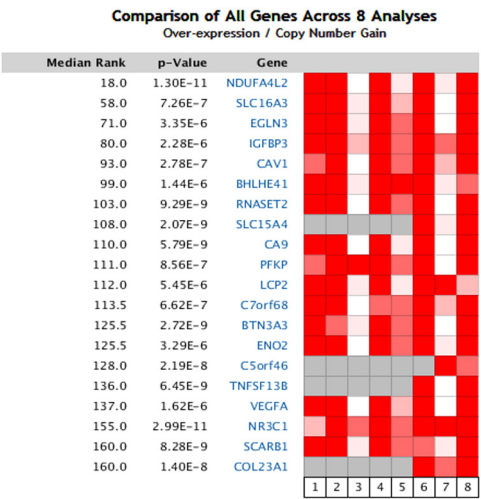


图1 Oncomine数据库分析ccRCC中表达上调基因
Figure 1 Oncomine database analysis of up-regulated genes in clear cell renal cell carcinoma

2.2 Oncomine 数据库中 ENO2 在不同肿瘤类型中表达的研究

按上述Oncomine检索条件，选择ENO2基因，可见Oncomine数据库共收集了447个不同类型的研究结果，其中关于ENO2表达差异有统计学意义的研究结果有41项，在29项研究中ENO2高表达，主要包括肺癌、胰腺癌、骨肉瘤等，在12项研究ENO2低表达。在泌尿系统肿瘤中，有7项研究发现肾癌中ENO2高表达，ENO2在膀胱癌中表达没有差异，1项研究发现前列腺癌中ENO2低表达(图2)。

2.3 ENO2 在 ccRcc 中的表达结果

Oncomine数据库显示：自2003年开始，共有8个研究涉及ENO2在ccRCC组织和正常组织中的表达。文章分别发表于Cancer Research, BMC Cancer, Clinical Cancer Research等期刊。8项Meta分析结果发现：与正常组织相比，ENO2在ccRcc中高表达($P=3.29 \times 10^{-6}$ ，图3)。

GEPIA数据库分析TCGA来源的623个样本，其中包括正常肾组织100个样本，ccRCC组织523个样本，发现ENO2基因在ccRCC组织中的表达量明显高于正常肾组织($P<0.05$)，与Oncomine数据库结果相互验证(图4)。

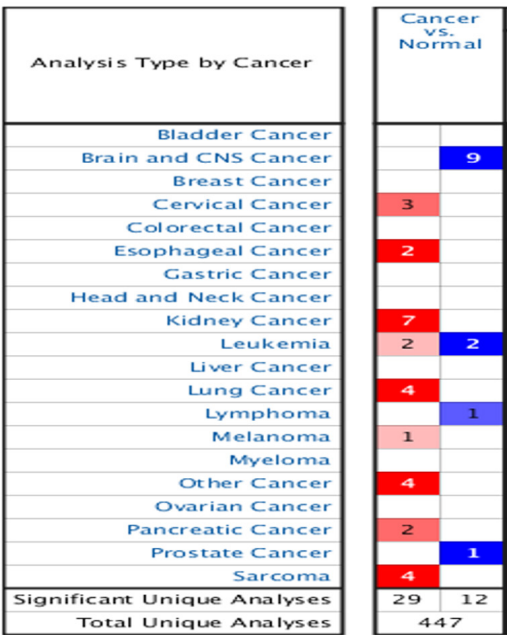


图2 Oncomine数据库中ENO2在不同肿瘤类型中的表达结果
Figure 2 Expression of ENO2 in different tumor types in Oncomine database

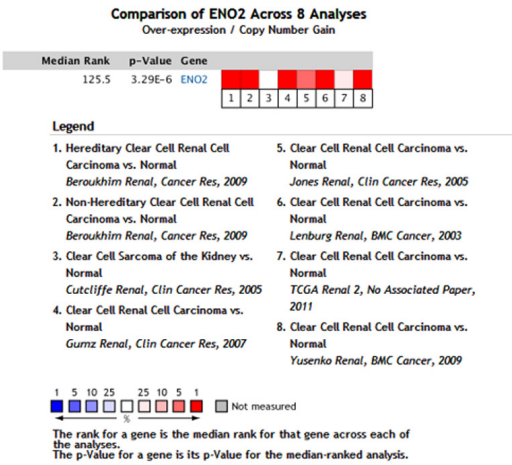


图3 Oncomine数据库中ENO2在ccRCC中的表达
Figure 3 Expression of ENO2 in clear cell renal cell carcinoma in Oncomine database

2.4 ENO2 在不同 ccRCC 研究数据集中肿瘤组织和正常组织的表达差异

Oncomine数据库中ENO2在不同ccRCC研究芯片数据集中肿瘤与正常组织比较的表达结果见图5，分别发表在在Gumz Renal, Jones Renal, Lenburg Renal, Yusenko Renal的4项研究中，ENO2在ccRCC中的表达量显著高于正常肾组织。

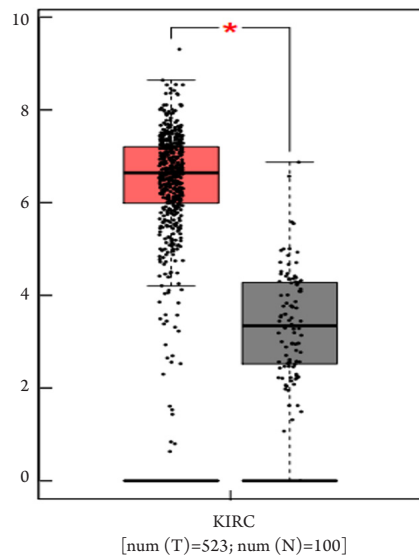


图4 GEPIA数据库中ENO2在ccRCC和正常组织中的表达差异
Figure 4 Expression differences of ENO2 in clear cell renal cell carcinoma and normal tissues in GEPIA database
* $P<0.05$.

2.5 ccRcc 中 ENO2 基因启动子区 DNA 甲基化水平分析

MethHc数据库中显示ENO2的甲基化转录模板NM.001975, ENO2在正常组织中的甲基化水平比ccRCC高, 差异具有统计学意义($P<0.005$, 图6)。

2.6 ENO2 基因表达水平与 ccRCC 病理分期的关系分析

选择TCGA的KIRC(肾透明细胞癌)数据库, 可得出ccRCC分4期, 分期越高, ENO2基因表达量相对较高, 但差异无统计学意义($P=0.0681$, 图7)。

2.7 ENO2 基因表达水平与 ccRCC 患者预后的关系

ccRCC(KIRC)患者ENO2基因高表达与低表达患者各258例样本的生存曲线(图8)显示: 在ccRcc中ENO2基因高表达患者的总体生存期百分数低于低表达患者, 提示ccRcc ENO2高表达者预后不良(Log-rank $P=0.019$)。其中HR=1.4, $P(\text{HR})=0.02$ 。

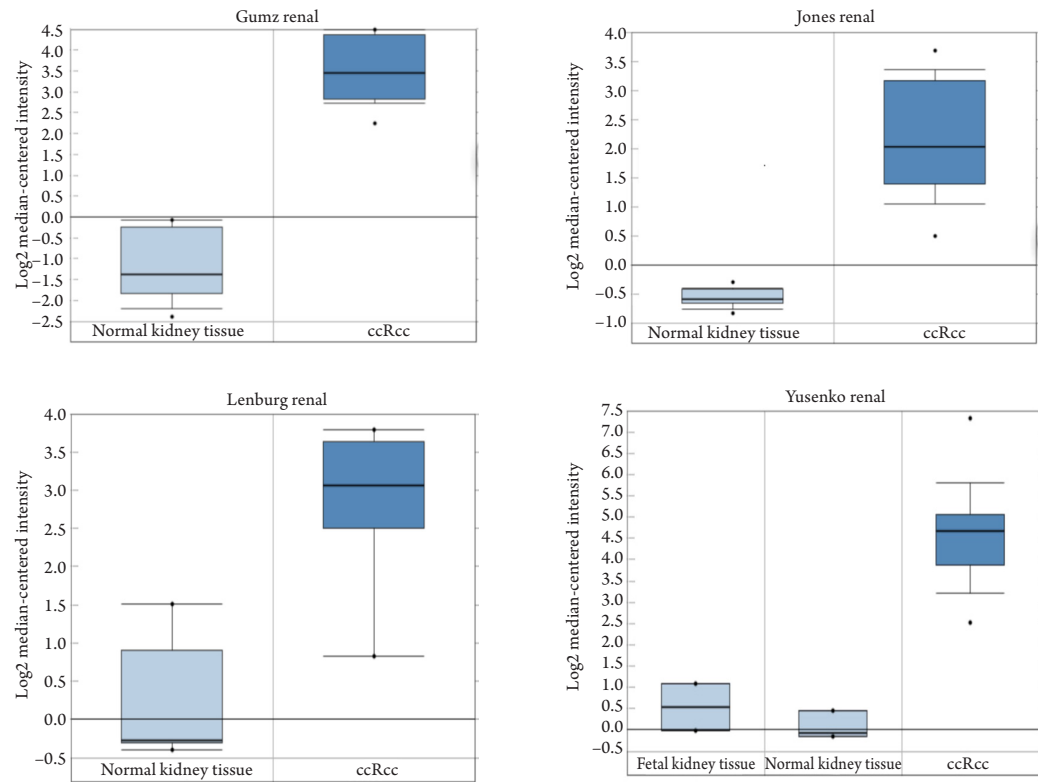


图5 Oncomine数据库中不同数据集ENO2基因在正常肾组织和ccRCC中的表达情况
Figure 5 Analysis of the expression of different data sets ENO2 in Oncomine database in normal kidney tissue and clear cell renal cell carcinoma

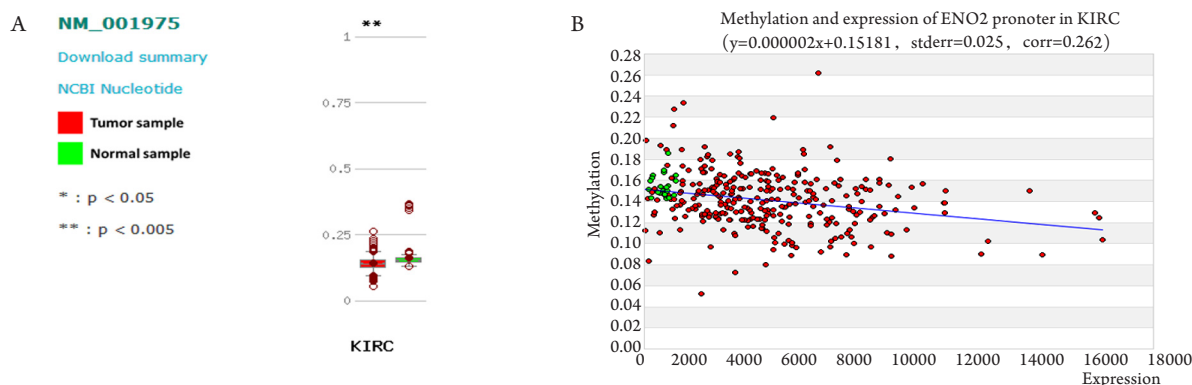


图6 *ENO2*基因NM-001975转录模板在ccRCC和正常组织中甲基化情况

Figure 6 *ENO2* gene methylation level of NM-001975 transcripts was different in clear cell renal cell carcinoma and normal tissues

(A)正常肾组织和ccRCC甲基化水平比较; (B)ccRCC中*ENO2*启动子区域甲基化。

(A) Comparison of normal kidney tissue and ccRcc methylation levels; (B) ccRcc*ENO2* promoter region methylation.

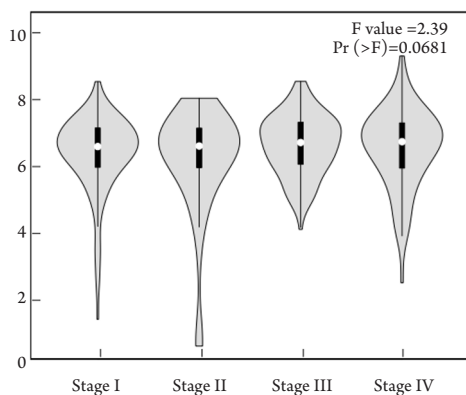


图7 *ENO2*基因表达水平与ccRCC病理分期的关系

Figure 7 Relationship between *ENO2* gene expression level and staging of ccRCC

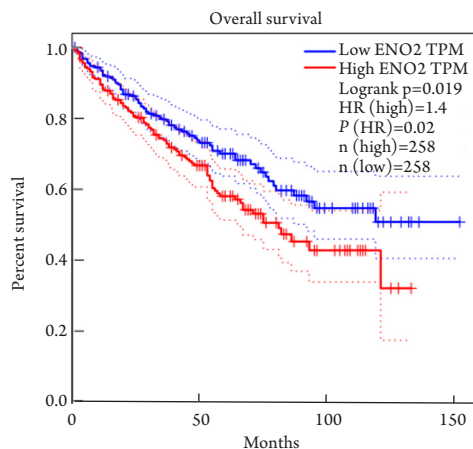


图8 *ENO2*基因表达水平与ccRCC生存期的相关性

Figure 8 Correlation between the expression level of *ENO2* gene and the survival of clear cell renal cell carcinoma

3 讨论

Rcc占人体所有癌症的2%~3%^[10], 在过去的20年中, ccRcc的发病率和病死率显著增加; 据估计^[11], 每年有超过30万人被诊断为ccRcc, 预计到2020年将增加22%; 每年与ccRcc相关的死亡人数超过10万人, 随着外科手术方式的改进和特定靶向药物的应用, 早期ccRcc患者的生存率得到显著改善^[4]。然而, 由于早期症状隐匿, 约1/3的患者确诊时已远处转移而无法手术, 即使接受肾切除手术的患者仍预后不良, 约30%的患者会局部复发或远处转移^[12]。肾癌对放射治疗、化学药物治疗不敏感, 转移及复发后的ccRcc治疗方法有限且效果不佳。

研究^[13-15]发现: *ENO2*在多种肿瘤如肺小细胞癌、神经胶质瘤细胞、白血病中表达显著上调。其可加快肿瘤细胞的糖酵解, 为肿瘤细胞提供能量; 同时*ENO2*可通过与肌动蛋白丝的相互作用, 调节肌动蛋白细胞骨架组织的调节因子RhoA激酶功能参与肿瘤细胞的迁移^[5]。研究表明*ENO2*是肺小细胞癌的敏感和特异性预后生物标志物^[13]。暴露于缺氧和血清饥饿的胶质母细胞瘤细胞中, *ENO2*显著上调, 敲除*ENO2*基因显著抑制细胞迁移, 胶质母细胞瘤细胞敲低*ENO2*后对辐射和替莫唑胺治疗敏感, *ENO2*高表达的患者存活时间明显缩短^[14]。另有研究^[15]发现*ENO2*的表达与急性淋巴细胞白血病患者临床特征密切相关, *ENO2*显著上调各种糖酵解相关基因并增强了丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)活性, 导致糖原合成酶激酶3β磷酸化, 诱导细胞增殖和加快糖酵解, 沉默*ENO2*基因

抑制白血病细胞存活;提示ENO2可能是监测急性淋巴细胞白血病中化疗疗效和复发的生物学标志物,ENO2也可急性淋巴细胞白血病提供潜在的治疗靶点。上述研究提示有效抑制ENO2的活性可能为肿瘤治疗提供新的机会。ENO2在肿瘤中的主要作用是促进肿瘤细胞的糖酵解,其供给肿瘤细胞的能量代谢需求并促进增殖。先前研究表明糖酵解/糖异生,腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)信号转导和磷脂酰肌醇3-激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶(phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号转导途径,代谢途径在ccRCC进展中起关键作用^[16]。研究^[17]发现ENO2参与了与ccRCC发病机制密切相关的糖酵解/糖异生, HIF-1信号转导和代谢途径。此外,有研究^[18]发现ENO2由缺氧诱导因子2 α (hypoxia inducible factors-2 α , HIF-2 α)诱导,尽管单独抑制其mRNA表达不会显著抑制ccRcc细胞的生长。缺氧和缺氧诱导因子(hypoxia inducible factors-1, HIF-1)途径改变对于ccRcc的起始和转移至关重要,缺氧可能通过诱导HIF靶基因失调导致细胞凋亡,迁移和血管生成等一系列肿瘤相关异常^[19]。

尽管多数研究发现ENO2在多种肿瘤中高表达,但由于独立研究样本量小,可能存在误差,缺乏较高的可信度。本研究利用Oncomine数据库挖掘ENO2基因在多种肿瘤中的表达信息,结果发现:有统计学意义的41项研究中,29项研究表明ENO2在常见肿瘤中高表达,包括食管癌、肺癌、肾癌等,12项研究低表达;进一步分析不同芯片数据集中ccRCC的检测结果,发现ENO2在ccRcc中高表达。GEPIA数据库中同样发现与正常组织相比,ENO2在ccRCC中高表达。使用MethHC数据库分析发现ENO2在ccRCC中的甲基化水平比正常组织低;GEPIA数据库对ENO2在ccRcc中进行生存分析发现,ENO2与ccRCC的总体生存率相关,ENO2高表达患者较低表达患者总体生存率低,但与ccRCC的病理分期之间的关系不具有统计学意义,可能与目前研究总样本量较少有关。结合生存分析推断ENO2可能是评估ccRCC预后的指标。

综上所述,本研究通过对ccRCC中ENO2相关信息的挖掘,发现ENO2在ccRCC中高表达,且与ccRCC的预后相关,ENO2可能作为ccRCC的潜在预后生物标志物。采用数据库进行大样本分析,可以避免单一研究样本量过小产生的误差,可以对临床诊断、治疗及预后提供重要的理论依据。目前采用数据库挖掘分析数据可为临

床上ccRCC的生物治疗及判断预后提供参考,为ENO2的临床及基础研究提供线索和理论基础,ENO2在ccRCC中的具体作用机制,需要进一步的基础实验证明。

参考文献

1. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, et al. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity[J]. *Eur Urol*, 2015, 67(1): 85-97.
2. di Martino S, De Luca G, Grassi L, et al. Renal cancer: new models and approach for personalizing therapy[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 217-229.
3. Leibovich BC, Han KR, Bui MH, et al. Scoring algorithm to predict survival after nephrectomy and immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials[J]. *Cancer*, 2003, 98(12): 2566-2575.
4. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, et al. Glycolysis inhibition for anticancer treatment[J]. *Oncogene*, 2006, 25(34): 4633-4646.
5. Vizin T, Kos J. Gamma-enolase: A well-known tumour marker, with a less-known role in cancer[J]. *Radiol Oncol*, 2015, 49(3): 217-226.
6. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis?[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(11): 891-899.
7. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6): 472-482.
8. Haake SM, Weyandt JD, Rathmell WK. Insights into the genetic basis of the renal cell carcinomas from the cancer genome atlas (TCGA)[J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(7): 589-598.
9. Huang WY, Hsu SD, Huang HY, et al. MethHC: A database of DNA methylation and gene expression in human cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(1): 856-861.
10. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(6): 1374-1403.
11. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): 359-386.
12. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma[J]. *Nature Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17009.
13. Isgrò MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 867: 125-143.
14. Yan T, Skaftnesmo KO, Leiss L, et al. Neuronal markers are expressed in human gliomas and NSE knockdown sensitizes glioblastoma cells to radiotherapy and temozolomide[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(1):

- 524-536.
15. Liu CC, Wang H, Wang WD, et al. ENO2 promotes cell proliferation, glycolysis, and glucocorticoid-resistance in acute lymphoblastic leukemia[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1525-1535.
 16. Ciccarese C, Brunelli M, Montironi R, et al. The prospect of precision therapy for renal cell carcinoma[J]. Cancer Treat Rev, 2016, 49: 37-44.
 17. Luo T, Luo T, Chen X, et al. Bioinformatic identification of key genes and analysis of prognostic values in clear cell renal cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2018, 16(2): 1747-1757.
 18. Zhang T, Niu X, Liao L, et al. The contributions of HIF-target genes to tumor growth in RCC[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80544.
 19. Schödel J, Grampp S, Maher ER, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer[J]. Eur Urol, 2016, 69(4): 646-657.

本文引用：方春天, 席春生. ENO2在肾透明细胞癌中的表达及临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(9): 1910-1916. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.09.009

Cite this article as: FANG Chuntian, XI Chunsheng. Expression of ENO2 in clear cell renal cell carcinoma and its clinical influence[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(9): 1910-1916. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.09.009