

基于TCGA数据库卵巢癌患者的miR-301b表达量与生存状况生物信息学分析

侯娟, 蒋树立, 滕长财 (滨州医学院附属医院, 山东滨州 256603)

摘要: **目的** 研究肿瘤基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据库中 microRNA-301b (miR-301b) 在 478 例卵巢癌患者中的表达量与卵巢癌患者生存状况的关系。**方法** 对 TCGA 数据库中 478 例卵巢癌患者的 miR-301b 表达量与生存状况进行分析, 预测其靶基因及生物学活性。**结果** miR-301b 高表达患者具有更长的生存时间, 是卵巢癌患者预后的保护因素 (OS: $P < 0.001$, DFS: $P < 0.05$), 综合 3 个靶基因数据库的预测结果得到 12 个靶基因, 编码的蛋白多数与肿瘤的发生发展有关, 其中靶基因 TEA 结构域家族成员 1 (TEA domain family member 1, TEAD1) 与胞质多糖基化元件结合蛋白 4 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4, CPEB4) 的表达量与卵巢癌患者的预后相关 (TEAD1: $P < 0.05$, CPEB4: $P < 0.05$)。**结论** miR-301b 表达对卵巢癌患者的预后具有重要的意义, 表现出抑癌因子的作用, 对卵巢癌的预后评估和治疗具有重要的指导意义。

关键词: 卵巢癌; miR-301b; 抑癌因子; 肿瘤基因组图谱数据库

中图分类号: R737.31; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 04-037-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.04.009

Bioinformatics Analysis of Mir-301b Expression and Survival Status of Patients with Ovarian Cancer Based on TCGA Database

HOU Juan, JIANG Shu-li, TENG Chang-cai

(the Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Shandong Binzhou 256603, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between the expression of microRNA-301b (miR-301b) in the cancer genome atlas (TCGA) database and the survival status of 478 patients with ovarian cancer. **Methods** Analyzed the association between the miR-301b expression quantity and the survival of ovarian cancer patients in TCGA database. The target genes and biological functions were predicted. **Results** The patients with high expression of miR-301b had longer survival time, which was a protective factor for the prognosis of patients with ovarian cancer (OS: $P < 0.001$, DFS: $P < 0.05$), according to the prediction results of three target gene databases, 12 target genes were obtained. Most of the encoded proteins were related to the occurrence and development of tumor, including the expression of target gene tea domain family member 1 (TEAD1) and cytoplasmic polysaccharide element binding protein 4 (CPEB4) was related to the prognosis of patients with ovarian cancer (TEAD1: $P < 0.05$, CPEB4: $P < 0.05$). **Conclusion** The expression of miR-301b plays an important role in the prognosis of patients with ovarian cancer. It also shows the role of tumor suppressor, which has an important guiding significance for the prognosis evaluation and treatment of ovarian cancer.

Keywords: ovarian cancer; miR-301b; tumor suppressor; the cancer genome atlas TCGA database

卵巢癌是女性中第五大致死的恶性肿瘤, 截止 2014 年美国统计的新发病例为 21 980 例, 死亡人数为 14 270 例, 这其中 90% 为上皮性卵巢癌, 而外科手术后联合顺铂和紫杉醇化疗的程序仍然是上皮性卵巢癌的标准治疗方法^[1-2]。因此, 发现并研究卵巢癌发病的分子特性对于提出更好更有效的治疗方法是必要的。

MicroRNAs 是一种可以调控基因表达的短的 (~22nt) 内源性的单链 RNA 分子, 成熟的 miRNA 和 Argonaute 蛋白形成了 RNA 诱导的沉默复合体

(RISC), 这种核糖核蛋白体的复合物调控了转录后基因的沉默, 通过碱基配对的方式, miRNA 引导 RISC 与信使 RNA 结合, Ago 蛋白促使 mRNA 降解或抑制其表达^[3-4]。miRNA 的调控功能影响了细胞的信号通路, 大部分这些通路控制着发育、细胞凋亡、增殖、分化和肿瘤的发展迁移等生理过程^[5-6]。因此, 干扰 miRNA 的功能会影响到肿瘤的发生发展和治疗。

miR-301b 作为一种促癌因子已在多种癌症中被发现报道, 如在胰腺癌中 miR-301b 影响了转录因

基金项目: 滨州医学院科技计划项目 (BY2017KJ02)。

作者简介: 侯娟 (1990-), 女, 本科, 初级检验师, 研究方向: 肿瘤分子生物学, E-mail: 1244568188@qq.com。

子的作用^[7],在三阴性乳腺癌和结肠癌中 miR-301b 出现高表达的结果^[8],在从巴雷特食管癌到食管腺癌的发展过程中,miR-301b 的表达量明显升高^[9],而在急性髓系白血病人血浆中 miR-301b 出现高表达,化疗后表达量降低^[10-11]。因此,对 miR-301b 仍然不充分,为了进一步研究 miR-301b 在卵巢癌中的作用,笔者用 TCGA 数据库的基因表达数据进行分析。

1 材料与方法

1.1 数据来源 通过在线数据库获取公开的临床病例数据,并对临床病例中 miR-301b 的相关数据进行统计分析;预测 miR-301b 的靶基因并进一步分析其生物学功能。文章中所涉及的数据库见表 1。478 例卵巢癌患者的临床信息以及 miR-301b 的基因表达信息全部来源于 TCGA 数据库,见表 2。

表 1 文章中应用到的数据库及软件

数据库与软件	网址
The Cancer Genome Atlas(TCGA)	http://cancergenome.nih.gov/
TargetScan	http://www.targetscan.org/
PicTar	http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-in/PicTar_vertibrate.cgi
miRanda	http://www.microrna.org/microrna/home.do

表 2 478 例卵巢癌患者的临床资料特征

类 别	n (%)
年龄 (岁)	
≥ 59	242 (50.6)
<59	236 (49.4)
肿瘤分级	
G1+G2	212 (44.4)
G3+G4	266 (55.6)
AJCC 临床分期	
I + II 期	28 (5.9)
III + IV 期	446 (93.3)
未知	4 (0.8)
肿瘤大小 (cm)	
≥ 1.3	266 (55.6)
<1.3	212 (44.4)
肿瘤位置	
双侧	334(69.9)
单侧	118(24.7)
未知	26(5.4)
复发或转移	
是	305(63.8)
否	99(20.7)
未知	74(15.5)
miR-301b 表达	
高表达组	239(50.0)
低表达组	239(50.0)

1.2 数据收集整理 分析 TCGA 数据库中的 478 例卵巢癌患者的信息,miR-301b 进行单因素和多

因素生存分析,判断其是否与预后相关。478 例卵巢癌患者的总生存期 (OS) 定义为从诊断到死亡的生存时间,随访时间 0~180 个月,中位随访时间是 40 个月,无疾病进展生存 (disease free survival, DFS) 指手术开始至局部复发或远处转移或最后一次随访的时间。将 478 例卵巢癌患者的临床资料依年龄、美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 癌症临床分期、美国国家综合癌症网络 (National Comprehensive CancerNetwork, NCCN) 肿瘤分级、肿瘤病发位置、术后肿瘤残余等进行分类纳入生存分析。

1.3 统计学分析 采用 Graphpad Prism5.0 软件和 SPSS 21.0 软件进行统计分析和绘图。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组间均数比较采用 *t* 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,Log-Rank 分析生存差异。运用 Cox 比例风险回归模型分析卵巢癌患者的生存影响因素,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳入数据的基本特征 在 TCGA 网站获取 478 例卵巢癌患者的基因表达资料及临床资料,见表 2。年龄按照中位数分为高龄组 (≥ 59 岁) 和低龄组 (< 59 岁);临床分期分为早期组 (I 期 + II 期)、晚期组 (III 期 + IV 期) 及未知;肿瘤等级分为低级别组 (G1+G2)、高级别组 (G3+G4);病发位置分为单侧组、双侧组;肿瘤残余分为 <1.3cm 组和 ≥ 1.3cm 组;microRNA 按照表达量的中位数分为高表达组和低表达组。

2.2 单因素生存分析卵巢癌患者预后的影响因素 见表 3。对 478 例卵巢癌患者的临床数据进行单因素总生存分析和无进展单因素生存分析,得出 miR-301b 的高表达是卵巢癌患者总生存和无进展生存的保护因素,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。高龄组是卵巢癌患者总生存的危险因素,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),而 AJCC 分期晚期组是无进展生存的危险因素,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

2.3 多因素回归分析卵巢癌预后的影响因素 见表 4。以年龄 (<59 岁 = 0, ≥ 59 岁 = 1)、肿瘤等级 (G1+G2 = 0, G3+G4 = 1)、病发位置 (单侧 = 0, 双侧 = 1)、临床分期 (I 期 + II 期 = 0, III 期 + IV 期 = 1, 未知 = 2)、肿瘤残余 (<1.3cm = 0, ≥ 1.3cm = 1)、miR-301b (低表达 = 0, 高表达 = 1) 为自变量,以生存结局 (生存 = 1, 死亡 = 0) 为因变量, Cox 回归分析显示, miR-301b 高表达是卵巢癌患者总生存和无病生存的独立影响因素,差异具有统计学意义 (*P* < 0.05)。

表3 单因素分析 478 卵巢癌患者预后因素与总生存和无进展生存的关系

类别	总生存			无进展生存		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
年龄	1.382	1.083 ~ 1.761	0.009	1.051	0.839 ~ 1.316	0.667
肿瘤分级	1.058	0.740 ~ 1.513	0.759	1.250	0.889 ~ 1.758	0.200
AJCC 分期	1.937	0.957 ~ 3.920	0.066	1.942	1.155 ~ 3.265	0.012
肿瘤大小	0.990	0.776 ~ 1.262	0.933	1.207	0.959 ~ 1.518	0.108
肿瘤位置	1.015	0.761 ~ 1.352	0.922	1.272	0.964 ~ 1.678	0.088
miR-301b 表达量	0.668	0.523 ~ 0.853	<0.001	0.763	0.09 ~ 0.956	0.019

表4 多因素 Cox 回归分析 478 卵巢癌患者预后因素与总生存和无进展的关系

类别	总生存			无进展生存		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
年龄	1.501	1.163 ~ 1.938	0.002	1.110	0.872 ~ 1.414	0.396
肿瘤分级	1.055	0.722 ~ 1.543	0.781	1.105	0.763 ~ 1.599	0.597
AJCC 分期	1.839	0.898 ~ 3.764	0.096	2.084	1.168 ~ 3.717	0.013
肿瘤大小	1.015	0.784 ~ 1.314	0.908	1.145	0.899 ~ 1.457	0.272
肿瘤位置	1.037	0.768 ~ 1.398	0.922	1.278	0.954 ~ 1.712	0.100
miR-301b 表达量	0.637	0.493 ~ 0.824	0.001	0.728	0.572 ~ 0.926	0.010

2.4 miR-301b 靶基因及作用位点预测分析 通过在线数据库 TargetScan, PicTar, miRanda 分别对 miR-301b 进行靶基因的预测并得出预测结果, 笔者在 TargetScan 数据库中预测得到 432 个靶基因, 在 miRanda 中预测得到 7 900 个靶基因, 在 PicTar 数据库得到 469 个靶基因, 综合三个数据库的预测结果, 选择在三个数据库预测结果中均出现的靶基因, 作为最终预测 miR-301b 的靶基因。综合

预测结果得到 12 个靶基因。笔者发现 miR-301b 与靶基因的结合位点均位于其 mRNA 的 3'UTR 区, 在 3'UTR 区与靶基因结合后抑制靶基因的翻译, 从而降低了靶基因的表达水平。笔者对这 12 个靶基因进行生存分析发现, TEAD1 和 CPEB4 的表达量与卵巢癌患者的预后相关, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

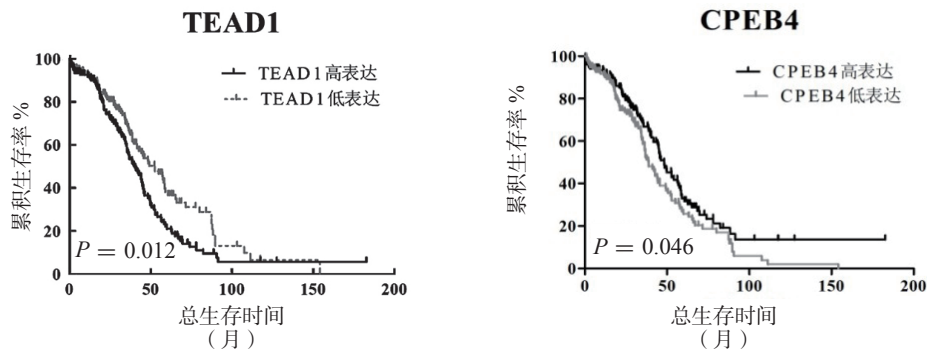


图1 Kaplan-Meier 分析 miR-301b 的表达量与卵巢癌患者预后的关系

3 讨论

肿瘤的发生发展并不是由单一的基因突变引起的, 它是多种突变长期累积的结果。卵巢癌作为一种致死性比较高的恶性肿瘤, 它的发生发展及治疗过程受多种基因的影响, 根据不同的分子表型会采用不同针对性的治疗方式。microRNA 作为一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA, 对细胞生长、组织分化、疾病过程起到重要的调控作用, 尤其是肿瘤的发生发展。

miR-301b 作为一种对肿瘤具有重要作用的 microRNA, 在胰腺癌、肺癌等癌症中 miR-301b 作为一种促癌因子^[14], 促进胰腺癌和肺癌等疾病的进展, 并且预后较差。笔者通过对 TCGA 中卵巢癌的临床病例数据分析发现, miR-301b 高表达卵巢癌患者预后较好。miR-301b 在卵巢癌中表现出了抑癌基因的作用, 与在胰腺癌、肺癌等癌症中原癌基因的作用相反^[14], 笔者认为出现这种情况是由于不同的肿瘤具有不同的分子表型, 即使相同的分子在不同

的肿瘤中具有不同甚至相反的作用。正是由于肿瘤的这种特性,在治疗不同癌症时会采用不同的治疗手段,甚至相同部位的肿瘤会根据其分子分型的差异采取相应的治疗措施。通过本文对 miR-301b 靶基因的分析及靶蛋白相互作用的预测发现,部分靶蛋白及相互作用蛋白是与肿瘤的发生发展及治疗具有重要意义的蛋白质。笔者对预测所得靶基因进行生存分析,发现 TEAD1 与 CPEB4 与卵巢癌的预后相关。先前研究发现在肝细胞癌和肾透明细胞癌中 TEAD1 可以促进其癌细胞的增殖和转移,与笔者的生存分析结果一致,高表达 TEAD1 是卵巢癌预后的危险因素^[15-16]。研究报道在神经胶质母细胞瘤、神经胶质瘤中以及骨肉瘤中均发现 CPEB4 可以促进癌细胞的增殖转移,同时发现 CPEB4 在癌组织中的表达明显高于其对应的癌旁组织。这些研究与笔者数据分析的高表达 CPEB4 卵巢癌患者预后差的结果相一致,CPEB4 属癌基因,其表达可以促进癌细胞的增殖,进而导致癌症患者预后较差^[17-19]。

miR-301b 表达量的变化会直接影响到其多种靶蛋白的表达,在细胞的信号网络中,这些靶蛋白的变化会在细胞产生多种信号,并使细胞的生理过程,如细胞分化、细胞周期、细胞凋亡、细胞间的行为关系等发生变化,这些变化可能会使细胞朝向癌变的方向发展。miR-301b 对于卵巢癌的发生发展具有重要的作用,miR-301b 的研究对卵巢癌的诊断治疗和预后评估具有重要的临床指导意义。

参考文献:

- [1] SIEGEL R, MA Jiemin, ZOU Zhaohui, et al. Cancer statistics,2014[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] LUVERO D, MILANI A, LEDERMANN J A. Treatment options in recurrent ovarian cancer:latest evidence and clinical potential[J]. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2014, 6(5): 229-239.
- [3] WANG Wei, LIU Mingbo, GUAN Yawei, et al. Hypoxia-responsive mir-301a and mir-301b promote radioresistance of prostate cancer cells via downregulating NDRG2[J]. Medical Science Monitor, 2016, 22: 2126-2132.
- [4] CHEN Erbao, XU Xiaojing, LIU Ruiqi, et al. Small but heavy role:MicroRNAs in hepatocellular carcinoma progression[J].Bio Med Research International, 2018, 2018(22): 1-9.
- [5] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2017, 16(3): 203-222.
- [6] LANDGRAF P, RUSU M, SHERIDAN R, et al. A mammalian microRNA expression Atlas based on small RNA library sequencing[J]. Cell, 2007, 129(7): 1401-1414.
- [7] BEREZIKOV E, VAN TETERING G, VERHEUL M, et al. Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis[J]. Genome Research, 2006, 16(10): 1289-1298.
- [8] KIM S H, CHO K H, KIM Y N, et al. Resveratrol attenuates norepinephrine-induced ovarian cancer invasiveness through downregulating hTERT expression[J]. Archives of Pharmacal Research, 2016, 39(2): 240-248.
- [9] CHANG Yaoyin, KUO Wenhung, HUNG Juihui, et al. Deregulated microRNAs in triple-negative breast cancer revealed by deep sequencing[J]. Mol Cancer,2015,14(1):36.
- [10] WU Xifeng, AJANI J A, GU Jian, et al. MicroRNA expression signatures during malignant progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma[J]. Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.), 2013, 6(3): 196-205.
- [11] KOUTOVA L, STERBOVA M, PAZOURKOVA E, et al. The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients [J]. Leuk Res, 2015, 39(12): 1389-1395.
- [12] SYED S N, BRUNE B. MicroRNAs as emerging regulators of signaling in the tumor microenvironment [J]. Cancers, 2020, 12(4): 911.
- [13] CUCCI M A, GRATTAROLA M, DIANZANI C, et al. Ailanthone increases oxidative stress in CDDP-resistant ovarian and bladder cancer cells by inhibiting of Nrf2 and YAP expression through a post-translational mechanism. [J]. Free radical Biology & Medicine, 2020, 150: 125-135.
- [14] MOU Huaping, GUO Ping, LI Xiaoming, et al. Nitidine chloride inhibited the expression of S phase kinase-associated protein 2 in ovarian cancer cells[J]. Cell Cycle, 2017, 16(14):1366-1375.
- [15] CAI Xiaoniao, YU Leilei, CHEN Zhen, et al. Arsenic Trioxide-induced upregulation of miR-1294 suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma by targeting TEAD1 and PIM1[J]. Cancer Biomarkers, 2020,28(1): 1-10.
- [16] YIN Lei, LI Wenjia, XU Aiming, et al. SH3BGR12 inhibits growth and metastasis in clear cell renal cell carcinoma via activating hippo/TEAD1-Twist1 pathway[J]. EBioMedicine, 2020, 51:102596.
- [17] WANG Hongxiang, QIN Rong, MAO Jian, et al. CPEB4 regulates glioblastoma cell proliferation and predicts poor outcome of patients [J]. Clinical Neurology and Neurosurgery, 2018, 169: 92-97.
- [18] YANG Dong, LIU Kaiyuan, FAN Lin, et al. LncRNA RP11-361F15.2 promotes osteosarcoma tumorigenesis by inhibiting M2-Like polarization of tumor-associated macrophages of CPEB4 [J]. Cancer Letters, 2020, 473:33-49.
- [19] GU Naibing, WANG Xinlai, DI Zhengli, et al. Silencing lncRNA FOXD2-AS1 inhibits proliferation, migration, invasion and drug resistance of drug-resistant glioma cells and promotes their apoptosis via microRNA-98-5p/CPEB4 axis [J]. Aging, 2019, 11(22): 10266-10283.

收稿日期: 2020-04-05 修回日期: 2020-05-07