

人非小细胞肺癌组织中转录因子 E2F 家族表达与临床病理特征及预后的相关性分析

张涛元¹, 丁雪梅², 李 俏³, 祝颖英³, 曹三成³, 吴 爽³

(1. 青岛大学附属日照医院 / 日照心脏病医院, 山东日照 276801; 2. 日照市中医医院, 山东日照 276899; 3. 西安交通大学附属儿童医院, 西安 710003)

摘要: 目的 通过生物信息学技术分析转录因子 E2F 家族在人非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中的表达, 探讨其与 NSCLC 临床病理特征的关系, 阐明 E2F 家族对 NSCLC 诊断及预后的影响。方法 使用 Oncomine 数据库、UALCAN 数据库分析 E2F 家族在 NSCLC 组织及正常肺组织中, mRNA 水平表达差异; 利用 UALCAN 及 Kaplan Meier-Plotter 在线分析工具, 阐明 E2F 家族高表达与 NSCLC 患者病理参数及患者总生存率 (overall survival, OS) 之间的关系; 并利用 cBioPorta 网站分析 E2F 家族在 NSCLC 中的基因突变情况。结果 E2F 家族在 NSCLC 中均呈现高表达, 且与 NSCLC 的肿瘤分级、淋巴转移相关; 癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 分析显示 E2F1, E2F2, E2F4, E2F7 和 E2F8 高表达与 NSCLC 患者总生存率密切相关; 突变分析显示, E2F 家族在 NSCLC 中的突变率高达 32%。结论 E2F 家族在 NSCLC 中呈高表达, 且与肿瘤的分级和淋巴转移呈正相关。

关键词: E2F 家族; 非小细胞肺癌; 生物信息学

中图分类号: R734.2; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 04-087-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.017

Correlation Analysis of Transcription Factor E2F Family Expression with Clinicopathological Features and Prognosis in Human Non-small Cell Lung Cancer

ZHANG Tao-yuan¹, DING Xue-mei², LI Qiao³, ZHU Xie-ying³, CAO San-cheng³, WU Shuang³

(1. Affiliated Rizhao Hospital of Qingdao University / Rizhao International Heart Hospital, Shandong Rizhao 276801, China; 2. Rizhao Traditional Chinese Medicine Hospital, Shandong Rizhao 276899, China; 3. the Affiliated Children Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710003, China)

Abstract: Objective To analyze the expression of transcription factor E2F family in human non-small cell lung cancer (NSCLC) by bioinformatics techniques, explore its relationship with clinicopathological features of NSCLC and clarify the influence of E2F family on the diagnosis and prognosis of NSCLC. **Methods** Oncomine database and UALCAN database were used to analyze the mRNA expression differences of E2F family in NSCLC tissues and normal lung tissues. UALCAN and Kaplan Meier-Plotter online analysis tools were used to clarify the relationship between the high expression of E2F family and the pathological parameters and overall survival (OS) rate of NSCLC patients. The E2F family gene mutation in NSCLC was analyzed by cBioPorta website. **Results** E2F family was highly expressed in NSCLC, and was correlated with tumor grade and lymphatic metastasis of NSCLC. TCGA (the cancer genome atlas) analysis showed that the high expression of E2F1, E2F2, E2F4, E2F7 and E2F8 was closely related to the overall survival rate of NSCLC patients. Mutation analysis showed that the mutation rate of E2F family in NSCLC was up to 32%. **Conclusion** E2F family was highly expressed in NSCLC, and was positively correlated with tumor grade and lymphatic metastasis.

Keywords: transcription factors E2F; non-small cell lung cancer; bioinformatics

肺癌是世界范围内严重威胁人类健康的癌症^[1]之一, 根据其组织学类型分为两类: 小细胞肺癌和非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer,

NSCLC)。其中 NSCLC 约占肺癌的 85%, 又分为鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌三类^[2]。随着对 NSCLC 发病机制的深入研究, NSCLC 的诊断和治

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目 (NO.2016SF-036); 西安交通大学基本科研业务费自由探索与创新 - 教师类项目 (NO.xzyo12019129)。

作者简介: 张涛元 (1987-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 器官保护、肺保护, E-mail: 1250424266@qq.com。

通讯作者: 吴爽, 女, 硕士, 主管检验技师, 研究方向: 基因甲基化在儿童哮喘中介导气道炎症及重塑的机制研究。

疗手段提升较大,然而NSCLC的5年总生存率(overall survival, OS)仍小于15%^[3]。因此亟需寻找更多有效的生物标志物,用于预测NSCLC的病理过程并作为潜在药物靶点,改善预后和实施个体化治疗。

迄今为止,转录因子E2F家族共发现了8个因子,并按其发现顺序进行编号(E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7, E2F8)。有研究报道, E2F1, E2F2, E2F3, E2F8与肺癌的发生密切相关^[4-7],然而E2F家族在NSCLC中的表达、与临床病理相关性和可能的作用机制仍未见报道。

近些年,微阵列技术和生物信息技术已被广泛用于鉴定基因组表达水平的改变,帮助我们识别癌症相关的差异表达基因和相关信号通路。本研究利用生物信息学技术,分析E2F家族在NSCLC中的表达情况,探究其与NSCLC分期、淋巴转移、患者预后之间的相关性,并聚焦其在NSCLC中的基因突变情况,寻找致病机理,为NSCLC的诊断提供新型标志物。

1 材料与方法

1.1 数据来源 通过在线数据库获取所需的非小细胞肺癌的临床病例数据,并对所有病例中E2F家族的相关数据进行统计分析。

1.2 方法

1.2.1 E2F家族在转录水平表达差异的验证:利用Oncomine数据库(www.oncomine.org)^[8],比较E2F家族在癌组织与正常组织中转录水平表达差异,同时获取肺癌组织与正常肺组织中E2F家族的研究数据,参数设置如下: t -检验, P -Value为0.01, Fold Change为1.5, Gene Rank为10%, Date Type为mRNA。利用UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu>)数据库^[9],验证NSCLC患者E2F家族mRNA的表达情况。

1.2.2 E2F家族与NSCLC患者临床病理参数的分析:利用UALCAN数据库,分析E2F家族的mRNA表达情况与NSCLC患者的癌症分期和淋巴转移之间的相关性, t -检验进行数据处理,且 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

1.2.3 E2F家族与NSCLC患者总生存率的分析:利用Kaplan Meier-Plotter(<http://kmplot.com/analysis/>)网站,分析E2F家族与NSCLC患者总生存期之间的相关性。将NSCLC患者分为高表达和低表达2组,分组标准为E2F家族mRNA表达值的中位数,计算危险比(hazard ratio,HR)、95%置信区间(95% confidence interval, 95%CI)和 P 值,制作生存曲线。

1.2.4 E2F家族在NSCLC患者基因组图谱中的分析:利用cBioPorta数据库,对E2F家族在NSCLC

患者基因组图谱中的变化进行分析,共纳入标本1380例,分析内容包括突变、预测的GISTIC拷贝数改变(CNA)、mRNA表达的 z 评分(RNA-Seq V2 RSEM)和蛋白表达 z 评分(RPPA)。

1.3 统计学分析 E2F家族在转录水平表达差异的验证及E2F家族与NSCLC患者临床病理参数的分析,采用 t 检验进行数据处理,且 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义;E2F家族与NSCLC患者总生存率的分析,计算危险比(HR)、95%置信区间和 P 值,且 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC患者中E2F家族在mRNA水平高表达 Oncomine数据库显示,E2F家族的mRNA在肺癌患者中均呈现高表达,见图1。UALCAN数据库中,对NSCLC患者E2F家族的转录水平进行验证(其中正常对照组59例,癌症组519例),结果显示,与正常肺组织相比,E2F家族成员在NSCLC组织中mRNA均高表达,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

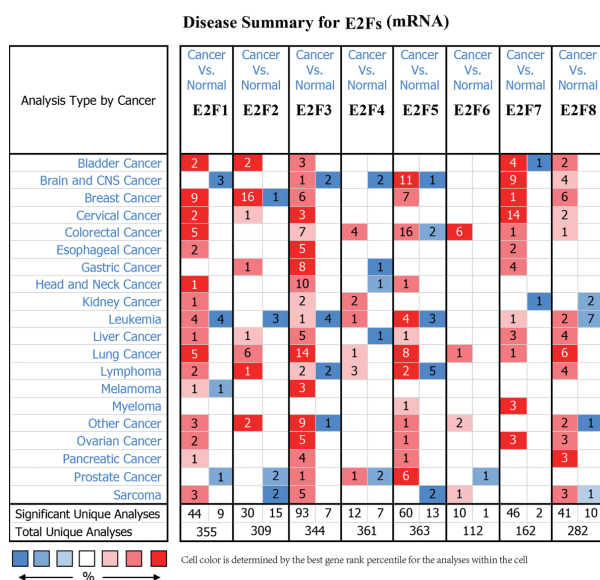


图1 Oncomine数据库中E2F家族在所有肿瘤与正常组织中的mRNA表达差异

2.2 E2F家族转录水平高表达与NSCLC患者的癌症分期、淋巴转移密切相关 见表2。利用UALCAN数据库对E2F家族进行NSCLC患者临床病理参数相关性分析,结果显示在癌症分期(其中正常对照59例,stage1患者277例,stage2患者155例,stage3患者85例,stage4患者28例)中,随着癌症分期的增加,E2F家族的mRNA水平逐渐升高;在淋巴转移中(正常对照59例,N0患者331例,N1患者96例,N2患者74例,N3患者2例),随着淋巴的扩散范围的增大,E2F家族的mRNA水平显著上升。

表1 UALCAN 数据库中 E2F 家族在 NSCLC 组织与正常肺组织中的 mRNA 表达差异

基因名称	表达量 (transcript per million)		P 值
	正常对照组	肿瘤组	
E2F1	5.11	11.67	0.001
E2F2	0.93	1.45	0.330
E2F3	4.21	9.28	0.001
E2F4	41.23	50.96	0.122
E2F5	5.11	9.23	< 0.001
E2F6	6.31	8.96	0.149
E2F7	0.21	0.57	0.009
E2F8	0.19	3.07	< 0.001

2.3 E2F 家族与 NSCLC 患者总生存率密切相关 见图 2。利用 Kaplan Meier-Plotter 进行 E2F 家族与

表2 E2F 家族在 NSCLC 患者的不同癌症分期、淋巴转移级别中的转录水平表达差异

基因名称	肿瘤分级					淋巴转移				P 值
	正常对照	Stage1	Stage2	Stage3	Stage4	N0	N1	N2	N3	
E2F1	5.11	9.32	10.21	10.31	11.23	9.32	10.65	10.90	21.79	0.001
E2F2	0.93	1.40	1.51	2.01	2.99	1.39	1.62	1.51	3.87	0.001
E2F3	4.21	9.78	10.12	9.22	11.21	9.14	9.76	10.53	12.43	<0.001
E2F4	41.23	49.21	50.21	52.33	47.21	48.21	50.75	51.23	46.27	0.027
E2F5	5.11	8.31	8.92	9.14	9.41	8.97	9.44	9.76	12.32	<0.001
E2F6	6.31	9.41	8.92	9.01	8.12	9.01	8.99	9.21	8.12	<0.001
E2F7	0.21	0.48	0.53	0.65	1.21	0.51	0.59	0.76	1.65	0.014
E2F8	0.19	2.79	3.01	3.77	4.98	2.98	3.13	3.98	5.07	<0.001

NSCLC 患者预后的相关分析,并绘制生存曲线图,结果显示, E2F1, E2F2, E2F4, E2F7, E2F8 的高表达组, NSCLC 患者总生存率显著低于低表达组。

2.4 E2F 家族在 NSCLC 患者基因突变分析 见图 3。在 1 380 例 NSCLC 标本中,共有 435 例标本的 E2F 家族基因发生了包括突变、CAN, RNA-Seq V2 RSEM, RPPA 在内的改变,比例高达 31.52%。

3 讨论

E2F 转录因子在包括前列腺癌、乳腺癌、肺癌等在内的多种癌症中高表达^[13-15],在肿瘤的进程中起着重要作用。尽管一些研究已经证实部分 E2F 家族成员在 NSCLC 中发挥关键作用,但是关于 E2F 家族在 NSCLC 中的生物学分析仍未见报道。本研究首次探讨不同 E2F 因子在 NSCLC 中 mRNA 表达和预后价值,为寻找 NSCLC 的诊断提供新的思路。

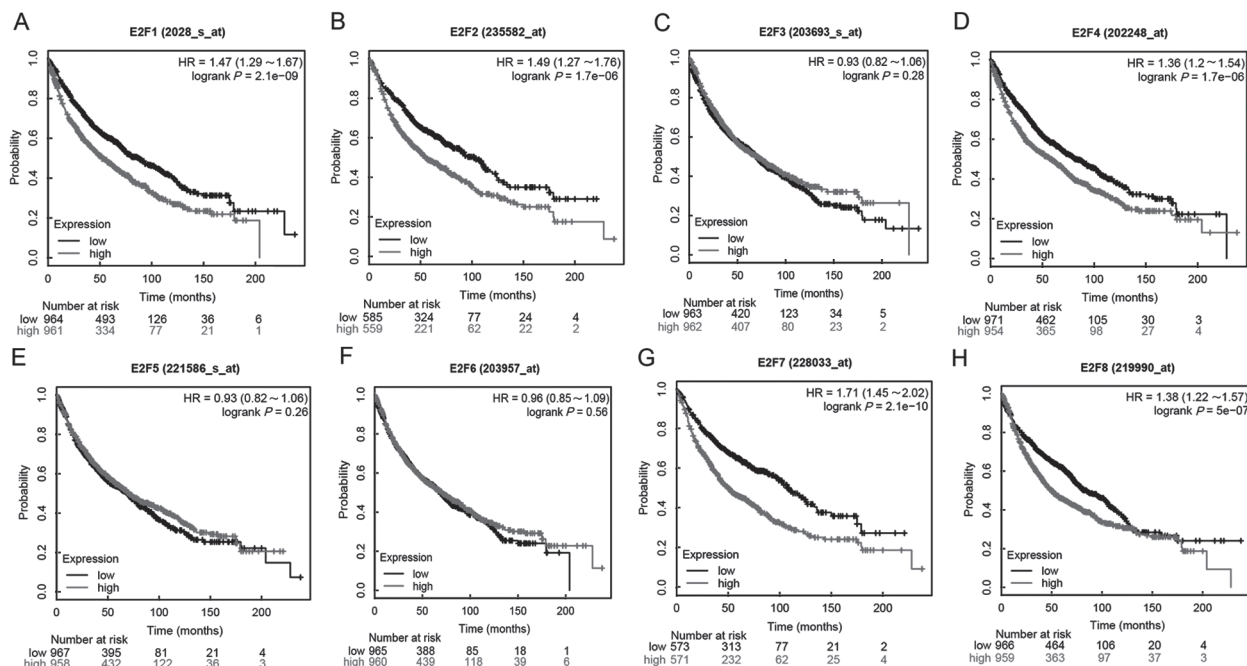


图2 E2F 家族在 NSCLC 患者中总生存率的生存曲线

针对 NSCLC, E2F 家族中研究最多的因子为 E2F1。E2F1 的过表达与 NSCLC 的发生相关,且

干扰 pRb-p53-MDM2 能增强 E2F1 在 NSCLC 中的促癌作用^[16]。另有研究发现,在小细胞肺癌中, E2F1 能够通过 ZEB1 促进肿瘤的侵袭^[16]。本研究通过数据分析发现, E2F1 在 NSCLC 中高表达,且

随着肿瘤的进展及转移, E2F1 的表达量也随之增高,提示 E2F1 可作为监测 NSCLC 病情进展的肿瘤标志物。

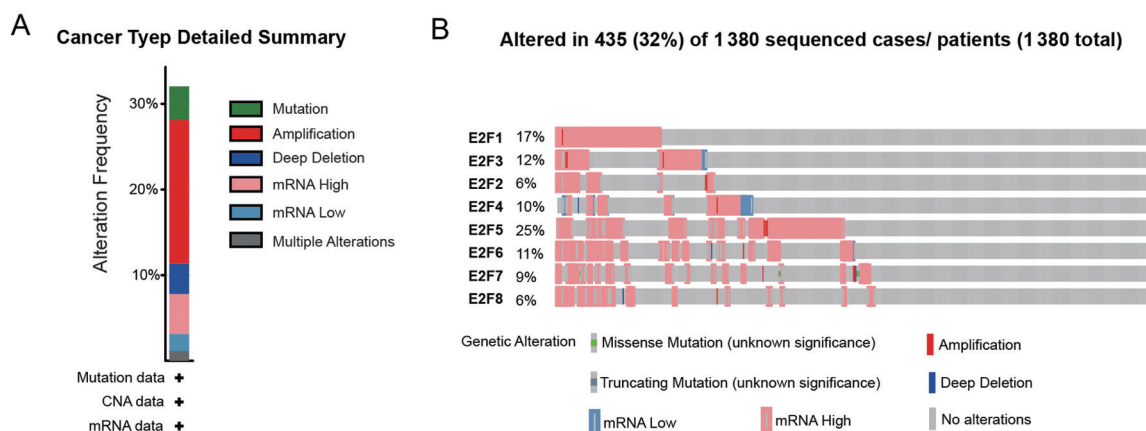


图3 NSCLC 患者中 E2F 家族基因表达及基因突变分析

据报道, E2F2 是 NSCLC 的肿瘤激活因子,是 NSCLC 患者 OS 的独立生存指标^[17]。同时,在血液组织中检测 E2F3 表达情况,发现肺癌患者血液中 E2F3 的 mRNA 水平显著高于正常人血液,即 lncRNA NEAT1 能够上调 E2F3,从而促进肺癌的发生,提示 E2F3 可以作为肺癌诊断的敏感指标^[18]。最新研究发现, E2F3 与 NSCLC 的转移密切相关,预示着 E2F3 在 NSCLC 的预后诊断中具有一定的价值^[19]。

E2F4 作为抑制转录因子,能够抑制增殖,并介导辣椒素的抗增殖活性^[20]。BANKOVIC 等^[21]人通过 DNA 指纹图谱研究了 NSCLC 患者基因组的不稳定性,发现 E2F4 是参与其生长和转移的基因之一。在本研究中, E2F4 高表达与 NSCLC 的肿瘤分级、淋巴转移及患者较差的 OS 相关,这似乎与 E2F4 作为肿瘤抑制因子的作用不一致,需要后续的验证试验加以证明。

E2F5 在前列腺癌和胶质母细胞瘤中高表达^[22-23],但是在 NSCLC 中未见报道。本研究证实 E2F5 在 NSCLC 中 mRNA 高表达,临床病理数据显示 E2F5 与癌症分级相关,但与患者 OS 无明显相关性。

有研究证实, miR-424 负调控 E2F6 的表达,抑制 A549 细胞的增殖和侵袭^[24]。在 NSCLC 患者血液中,检测 E2F6 的表达,显示其 mRNA 较正常人血液样本高表达^[21],而 E2F6 与 NSCLC 的患者生存情况相关性目前未见报道。

E2F7, E2F8 被证明是肿瘤激活因子, E2F8 能阻断其他 E2F 家族成员与 cyclin D1 的结合,并激活 cyclin D1^[25];芯片测序分析表明, E2F8 能够

与 uhrfl 的启动子结合,参与其激活与调控^[26]。通过生物信息学,我们发现随着 NSCLC 的发生发展, E2F7, E2F8 的 mRNA 水平也随之升高,且 E2F7, E2F8 的高表达,与患者较差的 OS 相关,预示着 E2F7, E2F8 有可能作为 NSCLC 的发展及预后的标志物,指导临床治疗。

通过系统分析,我们发现 E2F 家族的表达与 NSCLC 的发生、发展及预后密切相关,同时通过对 E2F 家族突变分析,发现其在 NSCLC 患者中突变率高达 31.52%,提示 E2F 家族的突变可能与 NSCLC 的发生存在密切关系,预示着有可能通过 E2F 家族突变检测提示 NSCLC 的发生风险;同时,鉴于 E2F 家族特别是其中的 E2F1, E2F2, E2F3, E2F5, E2F7 和 E2F8 与 NSCLC 患者肿瘤分级及淋巴转移密切关系,提示他们可作为肿瘤发展、转移等病情监测手段;而 E2F4, E2F7 和 E2F8 与较差的 OS 的相关性,提示他们可作为患者较差预后的检测标志物。

综上所述,本文系统地分析了 E2F 家族在 NSCLC 中的表达和预后价值,并对 E2F 家族及相关蛋白可能参与的 NSCLC 中的生物学功能进行了深入研究。但是,由于本文是基于公共数据库对已公开数据进行统计分析,因此缺乏相关的分子生物学实验验证,因此具有一定局限性,后续研究将根据本实验结果补充验证试验。

参考文献:

- [1] FANG Jing, SUN Chengcao, GONG Cheng. Long noncoding RNA XIST acts as an oncogene in non-small cell lung cancer by epigenetically repressing KLF2 expression[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 478(2): 811-817.

- [2] SUN Chengcao, LI Shujun, LI Dejie. Hsa-miR-134 suppresses non-small cell lung cancer (NSCLC) development through down-regulation of CCND1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 35960-35978.
- [3] SUN Chengcao, HUANG Chuanfeng, LI Shujun, et al. Hsa-miR-326 targets CCND1 and inhibits non-small cell lung cancer development[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7): 8341-8359.
- [4] CHEN Li, YU Jianhua, LU Zhihui, et al. E2F2 induction in related to cell proliferation and poor prognosis in non-small cell lung carcinoma[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(9): 10545-10554.
- [5] PARK S A, PLATT J, LEE J W, et al. E2F8 as a novel therapeutic target for lung cancer[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2015, 107(9): djv151.
- [6] COOPER C S, NICHOLSON A G, FOSTER C A, et al. Nuclear overexpression of the E2F3 transcription factor in human lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2006, 54(2): 155-162.
- [7] LI Zunling, JIAO Fei, MA Ying, et al. Target genes regulated by transcription factor E2F1 in small cell lung cancer[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2016, 68(3): 276-284.
- [8] RHODES D R, YU Jianjun, SHANKER K, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform[J]. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2004, 6(1): 1-6.
- [9] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A, et al. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2017, 19(8): 649-658.
- [10] TANG Zefang, LI Chenwei, KANG Boxi, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W98-W102.
- [11] FRANCESCHINI A, SZKLARCZYK D, FRANKILD S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Database issue): D808-D815.
- [12] SMOOT M E, ONO K, RUSCHEINSKI J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2011, 27(3): 431-432.
- [13] TIMMERS C, SHARMA N, OPAVSKY R, et al. E2F1, E2F2, and E2F3 control E2F target expression and cellular proliferation via a p53-dependent negative feedback loop[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(1): 65-78.
- [14] CHEN Huizi, TSAI S Y, LEONE G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(11): 785-797.
- [15] LIANG Yuxiang, LU Jianming, MO Rujun, et al. E2F1 promotes tumor cell invasion and migration through regulating CD147 in prostate cancer[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 48(4): 1650-1658.
- [16] GORGOLIS V G, ZACHARATOS P, MARIATOS G, et al. Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas[J]. *The Journal of Pathology*, 2002, 198(2): 142-156.
- [17] FELICIANO A, GARCIA-MAYEA Y, JUBIERRE L, et al. MiR-99a reveals two novel oncogenic proteins E2F2 and EMR2 and represses stemness in lung cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(10): e3141.
- [18] TRIKHA P, SHARMA N, PENA C, et al. E2F3 in tumor macrophages promotes lung metastasis[J]. *Oncogene*, 2016, 35(28): 3636-3646.
- [19] WU Lei, WAN Shan, LI Jinan, et al. Expression and prognostic value of E2F3 transcription factor in non-small cell lung cancer[J]. *Oncology Letters*, 2021, 21(5): 411.
- [20] SCHWEMMLE S, PFEIFER G P. Genomic structure and mutation screening of the E2F4 gene in human tumors[J]. *International Journal of Cancer*, 2000, 86(5): 672-677.
- [21] BANKOVIC J, STOJSIC J, JOVANOVIĆ D, et al. Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression [J]. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 2010, 67(2): 151-159.
- [22] FANG D Z, WANG Y P, LIU J, et al. MicroRNA-129-3p suppresses tumor growth by targeting E2F5 in glioblastoma[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(4): 1044-1050.
- [23] LI Shunlai, SUI Ying, SUN Jie, et al. Identification of tumor suppressive role of microRNA-132 and its target gene in tumorigenesis of prostate cancer[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 41(4): 2429-2433.
- [24] LAMMENS T, LI J, LEONE G, et al. Atypical E2Fs: New players in the E2F transcription factor family[J]. *Trends in Cell Biology*, 2009, 19(3): 111-118.
- [25] DENG Qing, WANG Qun, ZONG Weiyang, et al. E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(2): 782-791.
- [26] WEIJTS B G, BAKKER W J, CORNELISSEN P W, et al. E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(19): 3871-3884.

收稿日期: 2021-04-01
修回日期: 2022-03-26

(上接第86页)

- CAO Jia, YANG Huaying, HE Yi, et al. Curcumin regulates cognitive dysfunction in sepsis mice by activating SIRT1 [J]. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 41(3): 301-307.
- [26] 潘日虹. 早期 cTnI, PCT, CRP 对脓毒症患者预后的影响 [J]. *临床急诊杂志*, 2018, 19(5): 338-341.

PAN Rihong. The effect of early stage of cTnI, CRP and PCT on prognosis of sepsis patients [J]. *Journal of Clinical Emergency*, 2018, 19(5): 338-341.

收稿日期: 2021-07-07
修回日期: 2021-08-30