

基于数据挖掘分析低氧诱导因子-3 α 在头颈鳞状细胞癌中的表达及临床意义



扫码阅读电子版

陈小冰 陈晰娟 刘芹 潘雪 张思远 任先越

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院, 广东省口腔医学重点实验室, 广州 510055

通信作者:任先越, Email:renxy7@mail.sysu.edu.cn

【摘要】目的 探讨头颈鳞状细胞癌(HNSCC)患者中低氧诱导因子-3 α (HIF-3 α)的表达与其DNA甲基化水平的关系,研究HIF-3 α 表达异常对HNSCC患者预后的影响。**方法** 以肿瘤基因组(TCGA)数据库为研究基础,分析HIF-3 α 在530例HNSCC及50例正常头颈组织中的mRNA表达及DNA甲基化水平,独立样本 t 检验进行统计分析;Pearson相关性分析HNSCC组织中HIF-3 α DNA甲基化水平与其mRNA表达之间的关系。Kaplan-Meier生存分析法研究HIF-3 α 表达与HNSCC患者的总生存率及无复发生存率之间的关系,Log-rank检验进行统计分析。对HIF-3 α 高表达组与低表达组肿瘤组织进行差异表达基因分析,同时对差异表达基因进行基因富集分析(GSEA),研究其可能参与的生物学功能。**结果** 与正常组织相比,HNSCC组织中HIF-3 α 的mRNA表达水平降低,表达量分别为 (4.809 ± 0.293) 和 (3.100 ± 0.092) ,差异有统计学意义($t = 5.369, P < 0.001$);而DNA甲基化水平升高,表达量分别为 (0.158 ± 0.010) 和 (0.362 ± 0.009) ,差异有统计学意义($t = 6.806, P < 0.001$);HNSCC组织中HIF-3 α 的mRNA表达水平与其DNA甲基化水平呈负相关($r = -0.46, P < 0.001$);HIF-3 α 低表达的HNSCC患者总生存率及无复发生存率均显著低于HIF-3 α 高表达组($HR = 0.701, P = 0.02; HR = 0.517, P = 0.004$);GSEA基因富集分析发现,HIF-3 α 低表达组和高表达组差异基因主要富集在P53信号通路、凋亡通路和免疫反应通路。互作蛋白分析显示,HIF-3 α 可能与血管内皮生长因子A(VEGFA)、CREB结合蛋白(CREBBP)等相互作用。**结论** HIF-3 α 在HNSCC中表达降低与其DNA甲基化水平升高密切相关,是潜在的预后预测分子指标。

【关键词】 癌,鳞状细胞; 头颈部肿瘤; 低氧诱导因子; 低氧微环境

基金项目:国家自然科学基金(81702700、81700979);广州市科技计划(201804010144)

引用著录格式:陈小冰,陈晰娟,刘芹,等.基于数据挖掘分析低氧诱导因子-3 α 在头颈鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J/CD].中华口腔医学研究杂志(电子版),2020,14(1):14-18.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.01.004

The expression and clinical significance of hypoxia-inducible factor-3 α in head and neck squamous cell carcinoma based on data analysis

Chen Xiaobing, Chen Xijuan, Liu Qin, Pan Xue, Zhang Siyuan, Ren Xianyue

Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: Ren Xianyue, Email: renxy7@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the hypoxia inducible factor-3 α (HIF-3 α) mRNA level and the DNA methylation level in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), and to identify the potential novel prognostic biomarker for HNSCC patients. **Methods** Based on TCGA database, 530 cases of HNSCC and 50 cases of normal tissue were analyzed for the mRNA and methylation level of HIF-3 α with Independent sample t -test. Pearson correlation analysis was used to explore the relationship between DNA methylation and mRNA expression of HIF-3 α . Kaplan-Meier survival curves were drawn to investigate the relationship between the expression of HIF-3 α , the overall and recurrence-free survival rate of patients with HNSCC by using the Log-rank test. The

differentially expressed genes were detected in both the high- and low-expression groups of HIF-3 α . Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed to investigate the potential molecular function of HIF-3 α in HNSCC. The online tool cBioportal was used to examine the proteins that interacted with HIF-3 α . **Results** The mRNA expression level of HIF-3 α in the normal tissue (4.809 ± 0.293) was significantly higher than that of HNSCC (3.100 ± 0.092 ; $t = 5.369$, $P < 0.001$), whereas the DNA methylation level of HIF-3 α in the normal tissue (0.158 ± 0.010) was significantly lower than the latter (0.362 ± 0.009 ; $t = 6.806$, $P < 0.001$). Furthermore, the expression of HIF-3 α mRNA was negatively correlated to the level of DNA methylation in HNSCC tissue ($r = -0.46$, $P < 0.001$). GSEA analysis showed that the differentially expressed genes were mainly concentrated in P53 signaling pathway, apoptotic pathway and immune response pathway. Interaction protein analysis showed that HIF-3 α might interact with VEGFA and CREBBP. **Conclusions** The decrease of HIF-3 α expression was strongly related to the increase of DNA methylation in HNSCC. Patients with a low expression level of HIF-3 α showed poor clinical outcomes, demonstrating that HIF-3 α may be used as a prognostic indicator for HNSCC patients.

【Key words】 Carcinoma, squamous cell; Head and neck neoplasms; Hypoxia inducible factor; Hypoxic microenvironment

Fund programs: National Natural Science Foundation of China(81702700,81700979); Science and Technology Planning Project of Guangzhou(201804010144)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.01.004

实体肿瘤快速增长过程中,内部血流灌注不足,导致细胞内氧气供给与消耗不平衡,出现缺氧现象^[1]。细胞感受和应对低氧应激的关键信号通路是低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)信号通路,其与肿瘤的血管生成、增殖、侵袭及产生耐药性等密切相关^[2]。HIF家族主要包括了HIF-1、HIF-2和HIF-3。该家族是由 α 和 β 亚基组成的异源二聚体,其中 α 亚基为低氧调控的主要功能亚基(HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α)^[3]。目前,对HIF-1 α 和HIF-2 α 的表达、转录调控机制已有了较为深入的了解,而对HIF-3 α 的认知尚浅^[4]。

头颈鳞状细胞癌(head neck squamous cell carcinoma, HNSCC)作为全球第六大最常见的实体肿瘤,其发生、发展已被证明是一个伴随着复杂氧化应激反应的过程^[5]。目前,其治疗方案以手术结合放疗及生物治疗等综合治疗为主^[6]。尽管其治疗方式日益丰富,但其临床预后仍不理想^[7]。寻找新的治疗靶点,有助于进一步改善患者预后。低氧是HNSCC发生、发展过程中一个重要特征,围绕低氧相关蛋白探索疾病进展机制,寻求诊治突破仍是这一领域重要课题。本研究拟通过生物信息学方法,挖掘肿瘤基因组(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库数据,对HNSCC中HIF-3 α mRNA表达及甲基化水平进行联合分析,研究HIF-3 α 表达与HNSCC患者预后的关系,同时初步筛选分析HIF-3 α 相关的信号通路。最终,探讨HIF-3 α 在HNSCC中扮演的

可能角色,为HNSCC患者的个体化治疗提供可能的预后预测靶标。

材料与方法

一、资料来源

从公共数据库TCGA(<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/>)中获取HNSCC数据集,包括530例HNSCC及50例正常头颈组织。每例样本均具有2个维度组学数据,即Illumina HiSeq_RNA-Seq Version 2转录组测序表达谱数据及Illumina Human Methylation 450K BeadChip(HM450K)DNA甲基化芯片数据。

二、数据分析

1. 表达分析:采用独立样本 t 检验比较HNSCC与正常组织之间HIF-3 α mRNA及DNA甲基化的表达差异,并进行二者之间Pearson相关性分析。

2. 生存分析:以接受者操作特性(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线的约登指数最小值(总生存分析和无复发生存分析分别为1.421和3.386)作为HIF-3 α mRNA表达水平分割点,将HNSCC患者分为HIF-3 α 高表达组和低表达组;采用Kaplan-Meier法绘制总生存生存曲线和无复发生存曲线;对数秩和检验(Log-rank)分别比较组间的总生存率和无复发生存率。

3. 基因集富集分析:采用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)2.2.3版本进行

分析。根据HNSCC患者根据HIF-3 α mRNA表达水平的高低进行分组,将log值 >3.71 定义为HIF-3 α 高表达组,log值 ≤ 1.896 定义为HIF-3 α 低表达组, $1.896 < \log \text{值} \leq 3.71$ 的定义为HIF-3 α 中表达,采用独立样本 t 检验比较高低表达两组之间的差异,将差异倍数 ≥ 2 、 $P < 0.05$ 定义为差异基因。通过GSEA分析HIF-3 α 表达对各生物信号通路基因集的影响。从GSEA网站MsigDB数据库中获取相应基因集作为参照基因集,按缺省加权富集统计的方法进行富集分析,本研究设置随机组合次数为1000。

4. 互作蛋白分析:通过cBioPortal网站(<http://www.cbioportal.org/>)构建HIF-3 α 蛋白互作调控网络图。

三、统计学处理方法

采用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计分析,并采用Graphad Prism 5.0软件进行作图。mRNA以及DNA甲基化的表达水平采用独立样本 t 检验进行统计分析,相关性分析采用Pearson法;对数秩和检验(Log-rank)分析组间生存率差异。检验水准双侧 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、HIF-3 α 在HNSCC患者中的mRNA表达及DNA甲基化情况

本研究以TCGA数据库为研究基础,从中获取HNSCC及正常头颈组织中的mRNA表达谱以及DNA甲基化芯片数据,分析HIF-3 α 的mRNA表达情况及DNA甲基化水平。与正常组织相比,HIF-3 α 在HNSCC组织中的mRNA表达水平降低,正常与癌组织的表达量分别为(4.809 ± 0.293)和(3.100 ± 0.092),差异具有统计学意义($t = 5.369, P < 0.001$,图1A),而其DNA甲基化水平升高,正常与癌组织的表达量分别为(0.158 ± 0.010)和(0.362 ± 0.009),差异具有

统计学意义($t = 6.806, P < 0.001$,图1B)。进一步分析HIF-3 α mRNA表达与其DNA甲基化水平之间的相关性,发现二者呈负相关关系($r = -0.46, P < 0.001$,图1C)。结果初步表明,HNSCC中HIF-3 α 表达降低,可能与其DNA甲基化水平升高密切相关。

二、HIF-3 α mRNA表达与HNSCC患者预后的相关性

本研究通过绘制ROC曲线,将HNSCC患者分为HIF-3 α 高表达组和低表达组;采用Kaplan-Meier法绘制总生存曲线及无复发生存曲线;对数秩和检验(Log-rank)分别比较HIF-3 α 高表达组和低表达组的总生存率和无复发生存率。结果表明,HIF-3 α 高表达组的总生存率($HR = 0.701, P = 0.02$,图2A)和无复发生存率($HR = 0.517, P = 0.004$,图2B)均显著高于HIF-3 α 低表达组。结果提示,HIF-3 α 低表达预示HNSCC患者不良预后。

三、HIF-3 α 功能基因集富集分析与相互作用蛋白网络构建

为初步探索HIF-3 α 在HNSCC发生、发展过程中的作用机制,指导后续实验研究。本研究通过比较HIF-3 α 低表达组和高表达组之间的差异基因(图3A),并经GSEA分析发现,HIF-3 α 低表达组和高表达组差异基因主要富集在P53信号通路、凋亡通路和免疫反应通路(图3B)。同时,互作蛋白分析结果显示,HIF-3 α 可能与血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、CREB结合蛋白(CREB binding protein, CREBBP)等蛋白相互作用(图3C)。这表明,HIF-3 α 可能参与HNSCC细胞凋亡和免疫反应等重要的生物学过程。

讨 论

HNSCC作为头颈肿瘤中最常见的恶性肿瘤,易

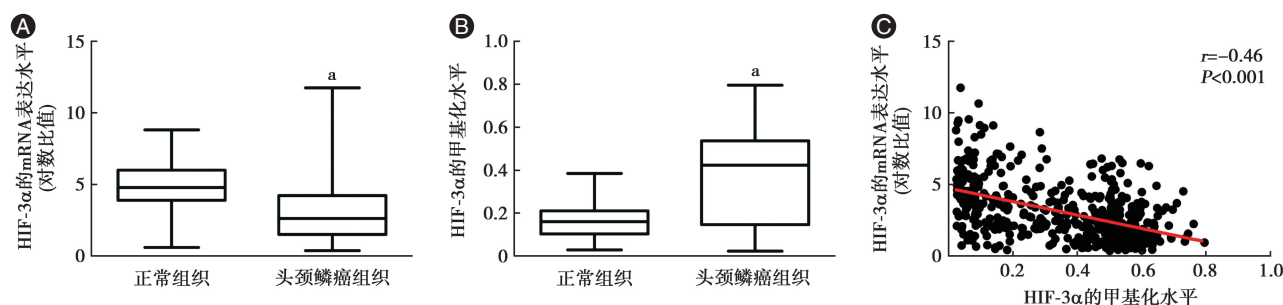


图1 低氧诱导因子-3 α (HIF-3 α)在头颈鳞状细胞癌(HNSCC)患者中的mRNA及DNA甲基化表达情况 A: HIF-3 α 在HNSCC组织中的mRNA表达水平降低;B: HNSCC组织中,HIF-3 α DNA甲基化水平升高;与对照组相比,差异具有统计学意义(* $P < 0.05$);C: HIF-3 α mRNA表达与其DNA甲基化水平呈负相关关系

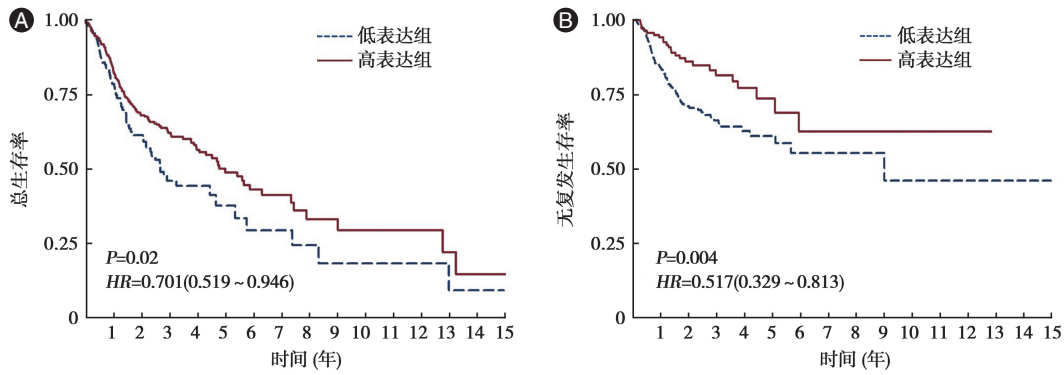


图2 低氧诱导因子-3α(HIF-3α) mRNA表达与头颈鳞状细胞癌(HNSCC)患者预后的相关性 A:总生存率;B:无复发生存率;HIF-3α高表达组的总生存率和无复发生存率均显著高于HIF-3α低表达组

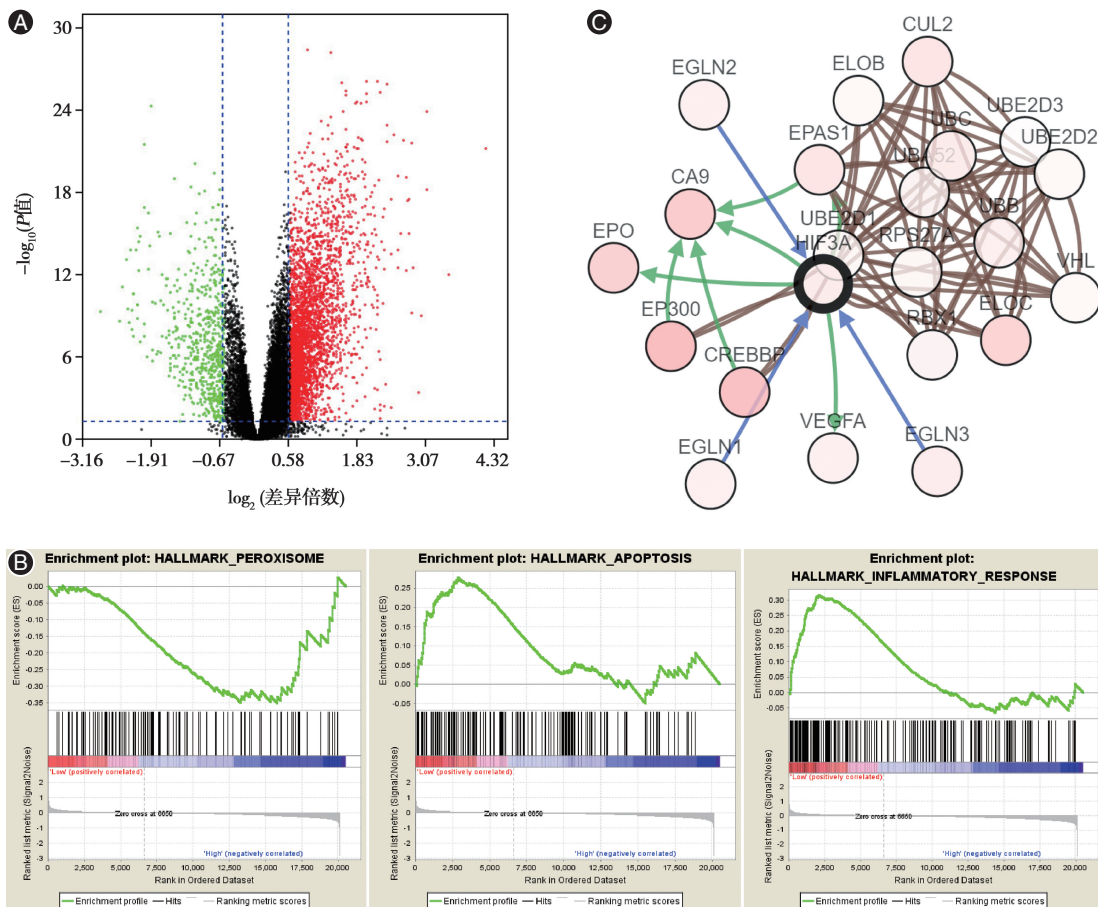


图3 低氧诱导因子-3α(HIF-3α)功能基因集富集分析与相互作用蛋白网络构建 A:HIF-3α低表达组和高表达组之间的差异基因火山图;B:HIF-3α低表达组和高表达组差异基因主要富集在P53信号通路、凋亡通路和免疫反应通路;C:HIF-3α互作蛋白网络图

发生早期局部浸润和淋巴结转移^[8]。长久以来,低氧微环境被认为是肿瘤局部浸润和淋巴结转移的重要促进因素^[9]。普遍认为,低氧微环境的形成是实体肿瘤快速生长的必然结果。以HIF家族为代表的低氧诱导蛋白,大部分可通过调控血管生成、免疫应答和糖酵解等信号,促使肿瘤细胞在低氧微环境中可获得更强的侵袭及转移能力,并对放疗发生

抵抗^[10]。然而亦有研究表明,低氧条件下存在小部分低氧诱导蛋白具有抑制肿瘤生长的作用^[11]。

HIF-3α是继HIF-1α和HIF-2α后又一备受关注的低氧诱导因子。研究报道,HIF-3α存在多种剪切变体,其功能不尽相同^[12]。有研究认为,其可能作为抑制元件对HIF-1α和HIF-2α进行负向调控^[13]。目前,尚未见HIF-3α在HNSCC中的报道。本研究

首先通过TCGA数据库分析发现,HIF-3 α 在HNSCC组织中mRNA表达下调。而研究报道,低氧可诱导HIF-3 α 表达上调^[14]。HNSCC作为一种实体肿瘤,其瘤体内部多处于缺氧状态。因此,为寻求HIF-3 α 在HNSCC组织中表达下调的可能原因,进一步挖掘数据发现HIF-3 α 的DNA甲基化水平升高,且与其表达呈负相关。这表明,HIF-3 α 在HNSCC组织中低表达,可能是与其DNA甲基化水平升高相关。具体分子机制有待后续实验验证与探讨。

目前,有关HIF-3 α 在癌症发生、发展中的作用及机制研究较为匮乏^[15]。近期研究报道,HIF-3 α 可促进胰腺癌的远处转移^[16]。本研究通过TCGA数据库资料首先揭示HIF-3 α 低表达预示HNSCC患者不良预后,并通过比较低表达与高表达HIF-3 α HNSCC患者的差异基因,发现差异基因主要富集在P53信号通路、凋亡通路和免疫反应通路。这些结果均提示HIF-3 α 参与了HNSCC细胞重要的生物学过程。通过预测HIF-3 α 相互作用蛋白发现,HIF-3 α 可能与VEGFA、CREBBP等蛋白相互结合,为后续研究HIF-3 α 在HNSCC中的作用及机制提供了方向。

综上所述,HIF-3 α 在HNSCC的发生、发展中具有重要意义,可能是HNSCC的潜在预后指标及治疗靶点。后续将以此数据分析为指导,展开HIF-3 α 在HNSCC中的作用及机制实验研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, et al. Tumor hypoxia and cancer progression [J]. *Cancer Lett*, 2006, 237(1): 10-21. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.05.028.
- [2] Terry S, Buart S, Chouaib S. Hypoxic Stress-Induced Tumor and Immune Plasticity, Suppression, and Impact on Tumor Heterogeneity [J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1625. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01625.
- [3] Akanji MA, Rotimi D, Adeyemi OS. Hypoxia-Inducible Factors as an Alternative Source of Treatment Strategy for Cancer [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019; 1-10. DOI: 10.1155/2019/8547846.
- [4] Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(9): 705-713. DOI: 10.1038/nrc2468.
- [5] Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 144-159. DOI: 10.1186/1476-4598-9-144.
- [6] Oosting SF, Haddad RI. Best Practice in Systemic Therapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2019, 9:815. DOI: 10.3389/fonc.2019.00815.
- [7] Goel AN, Frangos MI, Raghavan G, et al. The impact of treatment package time on survival in surgically managed head and neck cancer in the United States [J]. *Oral Oncol*, 2019, 88: 39-48. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.11.021.
- [8] Argiris A. EGFR inhibition for recurrent or metastatic HNSCC [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(5):488-489. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70178-6.
- [9] Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(2): 85-95. DOI: 10.1038/nrc2981.
- [10] de la Puente P, Azab F, Muz B, et al. Tris DBA palladium overcomes hypoxia-mediated drug resistance in multiple myeloma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2016, 57(7): 1677-1686. DOI: 10.3109/10428194.2015.1099645.
- [11] Maynard MA, Evans AJ, Shi W, et al. Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(22): 2810-2816. DOI: 10.4161/cc.6.22.4947.
- [12] Yang SL, Wu C, Xiong ZF, et al. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2411-2416. DOI: 10.3892/mmr.2015.3689.
- [13] Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(4):393-402. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.
- [14] Tanaka T, Wiesener M, Bernhardt W, et al. The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction [J]. *Biochem J*, 2009, 424(1):143-151. DOI: 10.1042/BJ20090120.
- [15] Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(4): 260-269. DOI: 10.1152/ajpcell.00315.
- [16] Zhou X, Guo X, Chen M, et al. HIF-3 α Promotes Metastatic Phenotypes in Pancreatic Cancer by Transcriptional Regulation of the RhoC-ROCK1 Signaling Pathway [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(1):124-134. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0256.

(收稿日期:2019-10-09)

(本文编辑:王媛)