

网络出版时间: 2020-12-2 13:55 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201201.1527.023.html>

基于 TCGA 讨论 EPHB2 表达与子宫内膜癌预后的关系

王翠翠, 马晓欣

摘要 目的 讨论子宫内膜癌中 EPHB2 基因的表达与一般临床特征及预后的相关性。方法 利用 TCGA 数据库探讨 EPHB2 在子宫内膜癌中的作用。通过 Wilcoxon 检验和逻辑回归的方法评估 EPHB2 基因表达与一些临床性状的关系。Cox 回归和 Kaplan-Meier 法评估 EPHB2 基因的表达和一些关键的临床病理特征与总体生存率的关系。最后再利用 TCGA 进行基因集富集分析。结果 TCGA 证实与正常内膜相比, EPHB2 在子宫内膜癌组织中表达增高 ($P < 0.05$)。EPHB2 高表达与肿瘤分期 (Ⅲ/Ⅳ vs Ⅰ/Ⅱ, $OR = 2.58$), 肿瘤分级 (高级别 vs 低级别, $OR = 2.41$), 组织学类型 (浆液性腺癌/浆液性与子宫内膜样混合型腺癌 vs 子宫内膜样腺癌, $OR = 13.86$) 及腹水细胞学 (阳性 vs 阴性, $OR = 4.56$) 等相关 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 分析结果显示 EPHB2 基因高表达较低表达预后差, 且单因素及多因素分析进一步证明 EPHB2 表达增高可作为独立的预后因子预测子宫内膜癌的不良结局 ($P < 0.05$)。基因集富集分析结果显示 EPHB2 表达增高可能促进轴突导向过程, 而表达减低可能与 α 亚麻酸代谢相关。结论 EPHB2 表达增高可能与子宫内膜癌的发展相关, 将来有望成为预测子宫内膜癌不良结局的分子标志物。

关键词 EPHB2; 子宫内膜癌; 预后

中图分类号 R 711.74

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)12-1936-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.023

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)是最常见的妇科恶性肿瘤之一,早期 EC 预后较好,5 年生存率能达到 90% 以上,然而,Ⅲ期、Ⅳ期 EC 患者 5 年生存率仅有 60%、20%^[1]。促红细胞生成素的肝癌细胞(erythropoietin-producing hepatocellular, Eph)受体根据序列同源性及相应配体肝配蛋白亲和性不同分为 A(EphA1-10)、B(EphB1-6)两大类。近年来,越来越多的研究^[2-3]表明 EphB2 作为家族成员之一和配体一起可以调节细胞的许多功能,包

括增殖、自噬、凋亡、侵袭及上皮间质转化等,虽然有研究^[4-6]报道 EphB2 在很多恶性肿瘤中,与正常组织相比表达有差异,但其与 EC 的关系尚无研究。该文基于 TCGA 探讨 EPHB2 的表达与 EC 患者预后关系,并利用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)进一步了解那些既涉及 EPHB2 调控网络又参与子宫内膜癌的发生发展的可能的生物学通路。

1 材料与方法

1.1 材料 从 TCGA 官网(<https://cancergenome.nih.gov/>)下载子宫内膜癌(UCEC)校正后的基因转录组数据 575 例和临床样本数据 548 例。EPHB2 在 23 例正常的子宫内膜组织及 552 例 EC 组织间的表达差异通过散点图表现。再比较 EPHB2 在不同临床病理参数间的表达情况。最后利用校正后的基因表达数据和相应的临床样本数据做单因素及多因素分析及 GSEA。

1.2 方法 GSEA 是一种基于 Java 平台利用电脑计算方法分析一种或一组预先定义的基因在两种不同生物状态之间差异是否有统计学意义。该文中 GSEA 以所有基因与 EPHB2 表达的相关性生成的有序的基因列表为基础,并以 EPHB2 在 EC 中的表达水平作为标签,分成高表达组及低表达组,阐明 EPHB2 高表达组与低表达组之间是否存在生存差异。每个分析行 1 000 次基因组排列。以归一化评分对各表型中富集的途径前后排序。

1.3 统计学处理 计量资料进行正态性及方差齐性检验,若数据符合正态分布,对于单变量两组资料之间的比较采用 t 检验,否则采用 Wilcoxon 两样本比较检验。对于多组资料之间的比较,若数据符合正态分布,采用方差分析,否则采用 Kruskal-Wallis 检验。按 EPHB2 表达的中位值将其分为高表达组及低表达组,Logistic 回归分析 EPHB2 的表达与临床病理特征的关系。Kaplan-Meier 法做生存分析曲线。Cox 单因素及多因素分析预测 EPHB2 表达以及其它一些临床特征(如分期、分级、肿瘤状态、组织学类型、淋巴结转移情况、手术方式、是否有残留

2020-07-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81872123); 辽宁省高等学校创新团队支持计划(编号: 辽教函[2018]479号)

作者单位: 中国医科大学附属盛京医院妇产科, 沈阳 110000

作者简介: 王翠翠,女,博士研究生;

马晓欣,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: maxiaoxin666@aliyun.com

病灶及腹水细胞学等)对预后的影响。所有统计分析均用 R 语言执行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者特征 从 TCGA 官网上下载同时具有校正后基因转录组表达数据及临床数据的 EC 样本共 548 例,具体临床资料信息见表 1。

表 1 TCGA EC 患者的临床特征

临床特征	n	%
肿瘤分期		
I	342	62.4
II	52	9.5
III	124	22.6
IV	30	5.5
肿瘤分级		
G1	98	18.5
G2	120	22.6
G3	312	58.9
肿瘤状态		
无瘤状态	426	84.5
带瘤状态	78	15.5
组织学类型		
子宫内膜样腺癌	405	74.9
浆液性及子宫内膜样混合性腺癌	22	4.1
子宫内膜浆液性腺癌	114	21.1
盆腔及腹主动脉旁淋巴结		
阴性	70	13.4
阳性	453	86.6
手术方式		
微创	201	38.7
开腹	318	61.3
腹腔冲洗液中的肿瘤细胞		
阴性	350	86.0
阳性	57	14.0
残留病灶		
R0	371	90.7
R1	22	5.4
R2	16	3.9

2.2 EPHB2 的表达与临床病理参数的关系 575 例来自 TCGA 数据库中与子宫内膜相关的基因表达数据中,正常内膜组织样本 23 例,子宫内膜恶性肿瘤样本 552 例,子宫内膜恶性肿瘤样本中 EPHB2 的表达量高于正常的子宫内膜样本(图 1)。在 552 例内膜癌组织样本中,有 548 例同时具有基因表达数据及患者临床资料。结果显示 EPHB2 表达量与 EC 期别、分化程度、腹水中是否查到瘤细胞及组织类型

等有关,对于高期别、高级别、腹水细胞学阳性及组织病理类型为浆液性腺癌的患者,EPHB2 表达量增高(图 2)。

单因素分析也表明 EPHB2 的表达与一些关键临床特征有关,而这些临床特征往往预示着患者的不良预后(表 2)。EPHB2 高表达组与 EC 晚期,高级别 EC,携瘤状态,腹水找到瘤细胞及较差的组织学类型有关($P < 0.05$),说明相比于 EPHB2 表达减低,EPHB2 表达增高更有可能出现不良预后。

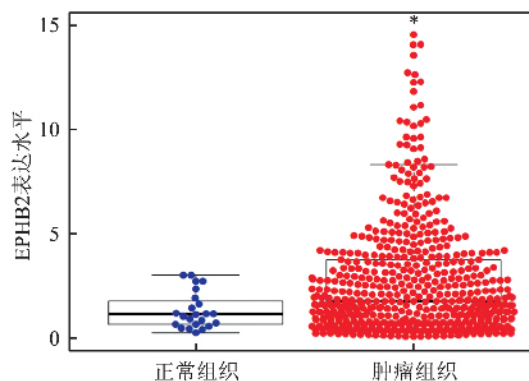


图 1 EPHB2 基因表达情况

与正常组织比较: * $P < 0.05$

表 2 EPHB2 的表达与临床病理特征的关系

临床特征	总数(n)	比值比(EPHB2 高表达)	P 值
分期			
II vs I	389	0.9(0.49 ~ 1.63)	0.72
III vs I	461	2.4(1.56 ~ 3.69)	<0.000 1
IV vs I	367	3.37(1.5 ~ 8.3)	0.004 7
III/IV vs I/II	541	2.58(1.75 ~ 3.84)	<0.000 1
分级			
G2 vs G1	218	1.03(0.59 ~ 1.83)	0.92
G3 vs G1	410	3.35(2.08 ~ 5.46)	<0.000 1
G2/G3 vs G1	530	2.41(1.53 ~ 3.87)	0.000 19
肿瘤状态			
带瘤 vs 无瘤	504	2.42(1.46 ~ 4.09)	0.000 73
组织学类型			
MSE vs EEA	427	4.58(1.84 ~ 13.00)	0.001 9
SEA vs EEA	519	20.04(10.39 ~ 43.68)	<0.000 1
MSE/SEA vs EEA	541	13.86(8.05 ~ 25.51)	<0.000 1
淋巴结转移			
Nx vs N0	523	1.06(0.64 ~ 1.76)	0.81
手术方式			
开腹 vs 腹腔镜	519	0.95(0.66 ~ 1.35)	0.76
腹水中肿瘤细胞			
阳性 vs 阴性	407	4.56(2.40 ~ 9.29)	<0.000 1
肿瘤残留			
R1/R2 vs R0	409	2.06(1.04 ~ 4.27)	0.043

2.3 生存结局和多因素分析 Kaplan-Meier 结果显示 EPHB2 高表达组的总生存时间低于 EPHB2 低表达组 ($P < 0.0001$) (见图 2 F)。Cox 单因素分析结果显示 EPHB2 表达水平与不良生存结局有关。其他可能影响生存预后的因素还包括肿瘤期别、分化程度、是否携带肿瘤、腹水中是否可见肿瘤细胞、淋巴结转移情况以及组织病理类型等。并且多因素分析还提示 EPHB2 可能是一个与总体生存相关的独立预后因子(表 3)。

2.4 GSEA 确定的与 EPHB2 相关的信号通路 为明确 EPHB2 可能参与在影响子宫内膜癌进展的哪些通路,设 EPHB2 的表达水平为表型,分为高表达组及低表达组。以 MSigDB 数据库中 c2. cp. kegg. v5. 2. symbols. gmt 数据集作为功能基因集,按归一化富集分数(NES)排序,在两组中找到 FDR-q 值 < 0.05 且 FWER-P 值 < 0.05 的通路。结果表明 EPHB2 高表达组主要富集在轴突导向通路中,EPHB2 低表达组主要富集在 α 亚麻酸代谢通路中(图 3)。

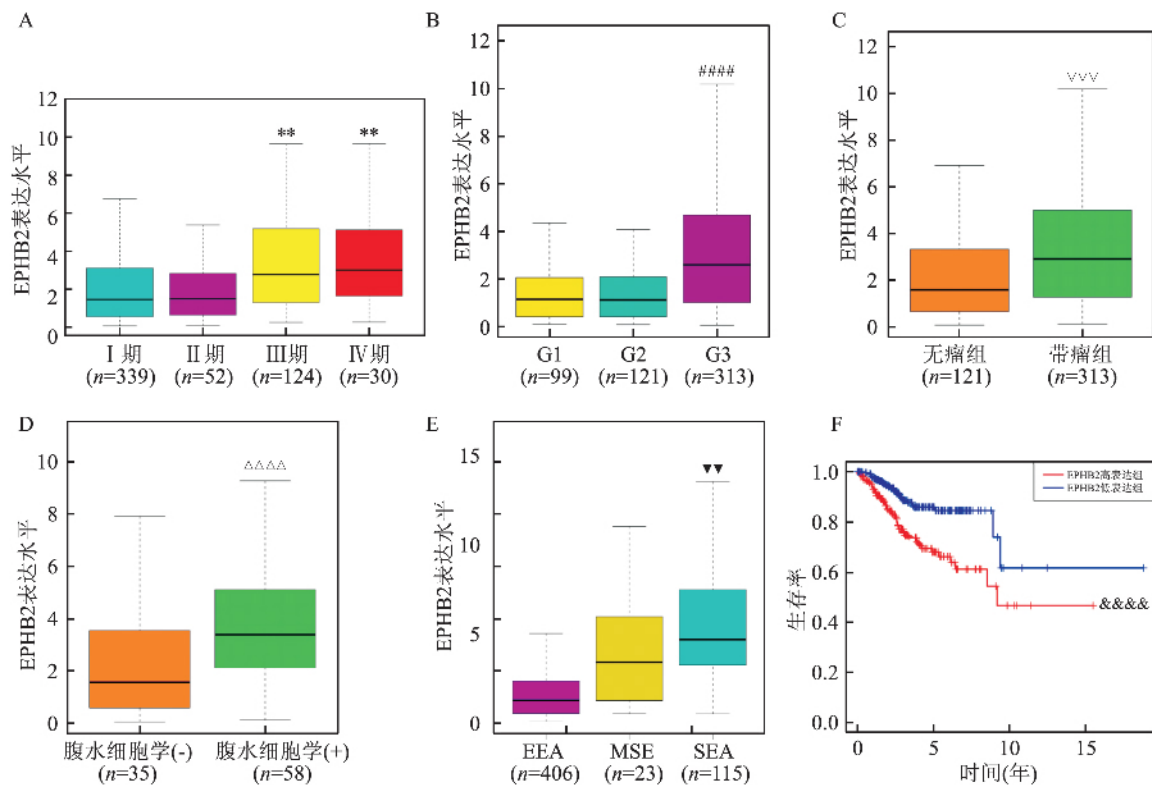


图2 EPHB2 的表达与临床病理特征的关系

A: 分期; B: 分级; C: 携带状态; D: 腹水细胞学; E: 组织学类型; F: EPHB2 的表达对子宫内膜癌患者总生存期的影响; EEA: 子宫内膜样腺瘤; MSE: 浆液性及子宫内膜样混合性腺瘤; SEA: 子宫内膜浆液性腺瘤; 与 I 期比较: ** $P < 0.01$; 与 G1 比较: #### $P < 0.0001$; 与无瘤组比较: $P < 0.001$; 与腹水细胞学(-)比较: $P < 0.0001$; 与 EEA 比较: ▼▼ $P < 0.01$; 与 EPHB2 低表达组比较: &&&& $P < 0.0001$

表3 EPHB2 的表达与 EC 总生存率关系的单因素与多因素分析

参数	单因素分析			多因素分析		
	HR	95% CI	P 值	HR	95% CI	P 值
年龄	1.03	0.99 ~ 1.06	0.12			
分期	2.3	1.71 ~ 3.10	< 0.0001	1.35	0.90 ~ 2.02	0.14
分级	1.94	1.16 ~ 3.24	0.012	1.44	0.81 ~ 2.58	0.22
肿瘤状态	8.75	4.55 ~ 16.84	< 0.0001	7.96	3.35 ~ 18.93	< 0.0001
腹水肿瘤细胞	5.91	3.02 ~ 11.57	< 0.0001	1.28	0.53 ~ 3.10	0.58
残留病灶	2.44	1.59 ~ 3.75	< 0.0001	0.75	0.43 ~ 1.28	0.29
手术方式	0.72	0.36 ~ 1.43	0.34			
淋巴结转移	0.46	0.21 ~ 0.97	0.04	0.42	0.17 ~ 1.03	0.057
组织学类型	1.51	1.07 ~ 2.13	0.02	0.86	0.53 ~ 1.40	0.55
EPHB2	1.08	1.04 ~ 1.13	0.0003	1.09	1.03 ~ 1.16	0.005

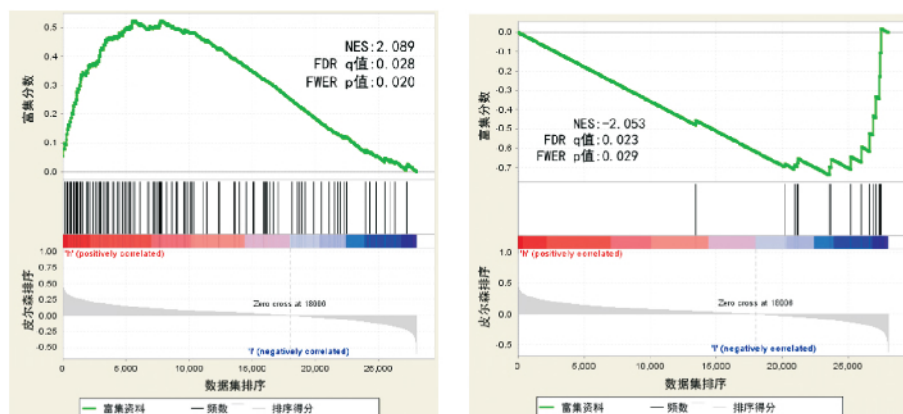


图3 EPHB2 基因高表达样本相关富集基因集

A: 轴突导向通路; B: α 亚麻酸代谢通路

3 讨论

本文基于 TCGA 数据库中的 EC 转录组数据及临床资料进行生物信息学分析,表明 EC 中 EPHB2 的表达与部分临床性状有关(如肿瘤分期、分级、腹水中是否找到瘤细胞以及肿瘤组织类型等)。晚期、高级别、腹水中见瘤细胞及较差的病理类型与 EPHB2 高表达有相关性,提示 EPHB2 表达增高可能与 EC 的不良预后相关;通过 Kaplan-Meier 生存分析及 Cox 单因素及多因素分析证实了这一推测,且 EPHB2 的表达可能成为一个独立预测不良结局的因素。为了进一步讨论 EPHB2 影响 EC 患者预后的机制,又完成了 GSEA 分析,结果显示 EPHB2 表达水平的变化可能通过参与轴突导向通路及 α 亚麻酸代谢通路而影响 EC 的预后。

Eph 受体是酪氨酸激酶受体亚家族成员,最先发现是作为神经系统细胞间相互作用的调节因子,包括轴突导向和神经生长锥的发育。本文利用 GSEA 也推测 EPHB2 表达增高可能促进轴突导向通路。基因敲除鼠模型研究^[7]发现 EPHB2 和肝配蛋白 B2 在动静脉的血管内皮细胞相互结合,启动 EPHB-肝配蛋白 B 信号通路,从而调节血管及淋巴管的发育,而且肝配蛋白的反向信号通路还在肿瘤的血管生成中起重要的作用。除了肿瘤的血管新生,EPHB2-肝配蛋白信号通路还可以介导肿瘤的增殖^[8]、上皮间质转化^[9]、侵袭^[10]和凋亡等。有学者^[11]利用 TCGA 数据库中的头颈部鳞状细胞癌患者的临床数据,通过 Kaplan-Meier 生存分析得出 EPHB2 过表达可降低患者的生存期,其他学者^[11]在肺腺癌中也得到相同的结论。在 EC 中,尚无人指出 EPHB2 的表达对 EC 的影响,本文首次利用 TCGA 数据库

总结出 EPHB2 在 EC 中表达增高,差异有统计学意义,且 EPHB2 高表达与很多临床病理参数相关,EPHB2 表达量越高,EC 患者的预后越差。

α 亚麻酸是人类及其它高等动物自身无法合成的必须脂肪酸,在人体中,这种脂肪酸可以产生花生四烯酸(ARA),二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),这些物质可调节机体稳态,高水平的 α 亚麻酸可帮助预防炎症性疾病、肿瘤、心血管疾病或其它慢性病^[12-13]。 α 亚麻酸抑制肿瘤发生的具体机制还不明确。本文通过 GSEA 得出高表达 EPHB2 可能通过抑制 α 亚麻酸代谢促进 EC 的发生,具体机制还需要细胞学分子水平上的进一步研究。

轴突导向是指轴突延伸到指定靶点的过程,在神经系统中,轴突之所以能沿着精确的路径生长是由于轴突导向作用在神经系统的发育中有着非常重要的作用。在轴突生长的尖端,有一种活力很高的结构,即生长锥,其上含有能识别导向的受体,并激活各种信号分子调节细胞骨架^[14]。起初认为轴突导向分子是用来调节大脑神经元细胞的生长和定位,然而近年来发现它在肿瘤发展中也起到重要的作用。具有代表性的是 Slits 家族,通过与 Robo 跨膜受体结合激活 Slit-Robo 信号通路改变肿瘤的迁移、侵袭和增殖等生物学行为^[15]。本研究显示在 GSEA 中 EC EPHB2 高表达组富集在轴突导向通路中,它可能通过改变轴突导向相关蛋白的表达影响 EC 的发生和发展。

综上,EPHB2 的表达水平可能成为预测 EC 不良预后结局的分子标志物,轴突导向和 α 亚麻酸代谢通路可能是 EPHB2 起作用的关键通路。本文不足在于,结论仅基于 TCGA 数据库中的数据,用转录组表达数据预测蛋白表达量还不够准确,且只用

GSEA 推断 EC 中与 EPHB2 可能相关的通路有一定的局限性,后续还需要实验进一步验证。

参考文献

- [1] Di Tucci C, Capone C, Galati G. Immunotherapy in endometrial cancer: new scenarios on the horizon [J]. *J Gynecol Oncol*, 2019, 30(3) : e46.
- [2] N'Tumba-Byn T, Yamada M, Seandel M. Loss of tyrosine kinase receptor Ephb2 impairs proliferation and stem cell activity of spermatogonia in culture [J]. *Biol Reprod*, 2020, 102(4) : 950 – 62.
- [3] Zhong S, Pei D, Shi L, et al. Ephrin-B2 inhibits A β (25-35) -induced apoptosis by alleviating endoplasmic reticulum stress and promoting autophagy in HT22 cells [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 704: 50 – 6.
- [4] Gao Q, Liu W, Cai J, et al. EphB2 promotes cervical cancer progression by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(2) : 372 – 81.
- [5] Chukkapalli S, Amessou M, Dilly A K, et al. Role of the EphB2 receptor in autophagy, apoptosis and invasion in human breast cancer cells [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 320(2) : 233 – 46.
- [6] Inagaki Y, Tokunaga T, Yanai M, et al. Silencing of EPHB2 promotes the epithelial-mesenchymal transition of skin squamous cell carcinoma-derived A431 cells [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(4) : 3735 – 42.
- [7] Sawamiphak S, Seidel S, Essmann C L, et al. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis [J]. *Nature*, 2010, 465(7297) : 487 – 91.
- [8] Duan S, Wu A, Chen Z, et al. miR-204 regulates cell proliferation and invasion by targeting EphB2 in human cervical cancer [J]. *Oncol Res*, 2018, 26(5) : 713 – 23.
- [9] Bhatia S, Hirsch K, Bukkapatnam S, et al. Combined EphB2 receptor knockdown with radiation decreases cell viability and invasion in medulloblastoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 41.
- [10] Sato S, Vasaikar S, Eskaros A, et al. EPHB2 carried on small extracellular vesicles induces tumor angiogenesis via activation of ephrin reverse signaling [J]. *JCI insight*, 2019, 4(23) : e132447.
- [11] Zhao C, Wang A, Lu F, et al. Overexpression of junctional adhesion molecule-A and EphB2 predicts poor survival in lung adenocarcinoma patients [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39 (2) : 1010428317691000.
- [12] Saini R K, Keum Y S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance – A review [J]. *Life Sci*, 2018, 203: 255 – 67.
- [13] Arshad Z, Rezapour-Firouzi S, Ebrahimifar M, et al. Association of delta-6-desaturase expression with aggressiveness of cancer, diabetes mellitus, and multiple sclerosis: a narrative review [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(4) : 1005 – 18.
- [14] Stoeckli E T. Understanding axon guidance: are we nearly there yet [J]. *Development*, 2018, 145(10) : dev151415.
- [15] Tong M, Jun T, Nie Y, et al. The role of the slit/robo signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2019, 10(12) : 2694 – 705.

Expression of EPHB2 in endometrial carcinoma predicts prognosis: a study based on TCGA analyses

Wang Cuicui, Ma Xiaoxin

(*Dept of Gynaecology and Obstetrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110000*)

Abstract Objective To confirm the expression of EPHB2 associated with clinical value and prognosis in endometrial cancer(EC). **Methods** The role of EPHB2 in ECs was investigated by using publicly available dataset from The Cancer Genome Atlas (TCGA). The correlations between clinical pathologic parameters and EPHB2 were analyzed by the Wilcox test and logistic regression. Then Cox regression and Kaplan-Meier survival analysis were used to analyze the relationships between clinicopathologic characteristics and EPHB2 expression and overall survival in TCGA database. Gene Set Enrichment Analysis(GSEA) was also conducted by TCGA. **Results** The expression of EPHB2 was increased in EC compared to the normal endometrium. Increased EPHB2 expression in EC was significantly correlated with stage ($OR = 2.58$ for III / IV *vs* I / II), grade ($OR = 2.41$ for high grade *vs* low grade), histology type ($OR = 13.86$ for serous/mixed serous endometrioid adenocarcinoma *vs* endometrioid adenocarcinoma) and peritoneal cytology ($OR = 4.56$ for positive *vs* negative), etc ($P < 0.05$). Kaplan-Meier methods revealed that patients of EC with high EPHB2 expression had a poor prognosis than those with low EPHB2 expression. The univariate and multivariate analysis showed that EPHB2 could become an independent predictor for poor outcome of EC ($P < 0.05$). GSEA suggested that axon guidance might be enriched in EPHB2 high expression phenotype and α linolenic acid were enriched in EPHB2 low expression phenotype. **Conclusion** EPHB2 may be associated with development of EC, which could be a potential prognostic molecular marker for poor survival in EC.

Key words EPHB2; endometrial cancer; prognosis