

基于 GEO 数据库的 HPV 阳性口咽癌特征基因生物信息学研究

张轶雯^{1,2}, 钟里科¹, 楼倩雯³, 潘宗富¹, 方罗¹, 黄萍^{1,2*} (1.浙江省肿瘤医院药剂科, 杭州 310022; 2.浙江省头颈肿瘤转化医学研究重点实验室, 杭州 310022; 3.浙江大学城市学院药学院, 杭州 310001)

摘要: 目的 通过分析 HPV 阳性与阴性口咽癌患者基因芯片数据, 寻找差异基因及其关键通路, 区分不同 HPV 感染状态下口咽癌的分子表达特征基因谱。方法 利用 GEO 数据库中高通量基因芯片数据库筛选出口咽癌患者具有 HPV 感染状态信息的芯片。采用 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析, 筛选出可表征不同 HPV 感染状态口咽癌生物特性的特征基因簇和通路, 并进行蛋白质相互作用网络可视化分析。结果 经差异基因分析后, 发现 HPV 感染状态可影响口咽癌的生物学特征, 并显著改变一些重要的肿瘤信号通路, 如 Wnt 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等。结论 本研究利用生物信息学方法, 从多种角度定义了口咽癌不同 HPV 感染状态下的分子表达特征, 为口咽癌的精准治疗提供理论依据。

关键词: HPV 感染; 口咽癌; 差异基因; 生物信息学分析

中图分类号: R963 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)05-0638-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.004

引用本文: 张轶雯, 钟里科, 楼倩雯, 等. 基于 GEO 数据库的 HPV 阳性口咽癌特征基因生物信息学研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 638-741.

Study on the HPV-positive Oropharyngeal Cancer Features Gene Based on GEO Database by Bioinformatics

ZHANG Yiwen^{1,2}, ZHONG Like¹, LOU Qianwen³, PAN Zongfu¹, FANG Luo¹, HUANG Ping^{1,2*} (1.Department of Pharmacy, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou, 310022, China; 2.Key Laboratory of Head & Neck Cancer Translational Research of Zhejiang Province, Hangzhou, 310022, China; 3. School of Pharmacy, Zhejiang University City College, Hangzhou, 310001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To examine the differentially expressed genes and pathways, and detected the different gene expression profiles by analyze the microarray data of both HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer patients. **METHODS** First selected the gene expression profiles of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer patients in GEO database. Then, screened the differentially expressed gene cluster and pathways of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer by GO gene functional annotation and KEGG pathway enrichment analysis, and finally conducted the visualization analysis of protein interaction network. **RESULTS** HPV infection had affected the biological characteristics of oropharyngeal cancer, and significantly altered some important tumor signaling pathways, such as Wnt and PI3k-Akt signaling pathways. **CONCLUSION** This study has employed bioinformatics method from various perspectives to define the gene expression characteristics of different HPV infection in oropharyngeal cancer, and provides theoretical basis for accurate treatment of oropharyngeal cancer.

KEY WORDS: HPV infection; oropharyngeal carcinoma; differential gene; bioinformatics

口咽癌是临床常见的头颈部恶性肿瘤, 且其发病率和死亡率均在逐年增加, 严重威胁着人类健康。据国家癌症中心统计, 2015 年我国新增口咽癌患者约 4.8 万人, 新增死亡患者达 2.2 万人^[1]。

在美国, 人乳头状瘤病毒(HPV)相关的口咽鳞状细胞癌发病率持续上升, 且呈年轻化趋势^[2]。同时, 近年来大量临床研究发现 HPV 阳性和 HPV 阴性的口咽癌的临床预后存在显著差异^[3-4]。其中,

具有代表性的 RTOG052 临床研究入组了 III 期到 IV 期既往接受以铂类为基础化疗的口咽癌患者, 在疾病进展后研究者又进行了中位时间为 4 年的随访观察, 发现 P16 基因阳性口咽癌患者的生存率相比于阴性患者显著提高, 提示肿瘤 HPV 状态是疾病进展后总生存率的独立强预测因子, 可作为复发或转移性口咽癌患者临床试验的分层因素。目前, HPV 感染作为口咽癌的重要致病因素和独

基金项目: 国家自然科学基金(81503165); 浙江省医药卫生科技计划项目(2017RC001)

作者简介: 张轶雯, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0571)88122440 E-mail: zjzyw2003@163.com *通信作者: 黄萍, 女, 博士, 主任药师 Tel: (0571)88122438 E-mail: huangping1841@zjcc.org.cn

立预后因子, 已引起了人们的高度关注^[5-6]。

HPV 病毒为可特异性感染复层鳞状上皮的基底角质细胞, 因此可造成头颈部、肛门、阴茎、阴道和上消化道的肿瘤或疣状赘生物。基础研究表明, 经 HPV 感染后, 可发生体细胞突变、表观遗传变异和蛋白异常表达等大量分子事件, 最终使得其与未感染的口咽癌具有不同的分子病理特征^[7-9]。然而, 对于不同感染状态口咽癌的全基因组差异网络和蛋白功能簇仍尚待挖掘。

基于 HPV 在口咽癌发生发展中的重要意义和感染后所导致的上述差异, 笔者利用高通量基因表达(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中已知 HPV 感染状态的芯片数据进行分析。拟通过筛选 HPV 阳性和阴性口咽癌的差异基因集和差异基因集中的关键通路, 以建立区分不同 HPV 感染状态口咽癌的分子表达特征基因谱, 识别关键的分子事件和路径, 为口咽癌的精准治疗提供理论依据。

1 研究方法

1.1 基因表达谱芯片筛选

利用 NCBI(National Center for Biotechnology Information)平台下的 GEO 数据库进行芯片筛选, 目标芯片需满足如下筛选标准: ①患者口咽癌标本, 排除细胞株和动物; ②入选芯片需具有 HPV 检测信息; ③需为基因表达芯片, 各探针具有归一化的表达值; ④所纳入需复核芯片质量要求, 芯片质量采用 R 语言(<http://bioconductor.org/biocLite.R>) affyPLM 包对数据集进行回归分析判断。

1.2 差异基因筛选

对所筛选出的芯片进行数据下载及差异基因筛选。利用在线工具 GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>)分析各个芯片, 选取 $P<0.05$, 差异 >2 倍的基因为候选差异基因探针, 并将探针转化为标准基因名称。

1.3 基因功能注释与通路富集分析

选取“1.2”中所筛选出的差异基因, 利用 DAVID 生物信息资源数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>, 版本 6.8)中在线分析工具, 以人源基因为背景进行 GO(Gene Ontology)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集, 分析可表征不同 HPV 感染状态口咽癌生物特性的特征基因。

1.4 蛋白相互作用网络分析

应用 Cytoscape 3.5.1(版本 6.8)的蛋白相互作用网络分析插件 MCODE(Version 1.4.2, Bader

Lab, University of Toronto)对构建的生物学网络中的区域进行关联度分析。通过分析网络结构, 根据关联积分值, 可获得整个网络中可能形成的蛋白质簇和关键节点蛋白, 并在 Cytoscape 中进行可视化显示。

2 结果

2.1 患者基本信息

经筛选及芯片质量分析, 共筛选出 6 个符合入选标准的芯片系列, 分别为 GSE30788, GSE41152, GSE55542, GSE55544, GSE55540 和 GSE56142^[10-12]。对其 Matrix 文件所提供相关患者基本信息进行分析, 共纳入 390 名患者, 基本情况见表 1。

表 1 患者基本信息

Tab. 1 The baseline characteristics of patients

患者信息	样本数(n=390)	
	HPV 阳性	HPV 阴性
年龄		
≥60	103	198
<60	20	69
未知	87	104
性别		
男	88	187
女	35	80
部位		
口腔	6	137
咽部	10	22
未知	107	108
临床分期		
I	3	24
II	4	77
III	6	30
IV	3	28
未知	107	108
病理分级		
1	2	23
2	6	71
3	5	33
4	3	29
未知	107	111
淋巴结转移		
是	11	63
否	5	96
未知	107	108

2.2 不同 HPV 感染状态口咽癌差异基因功能富集

通过差异基因的功能注释后, 分析出差异基因主要集中在细胞外基质的生成、分解和其受体的相互作用, 细胞外区域的空间结构及相关分子激活, 非钙依赖性的细胞经膜黏附, 对激素、pH 值和脂肪酸类物质的应答以及跨膜转运等分子行为过程中。

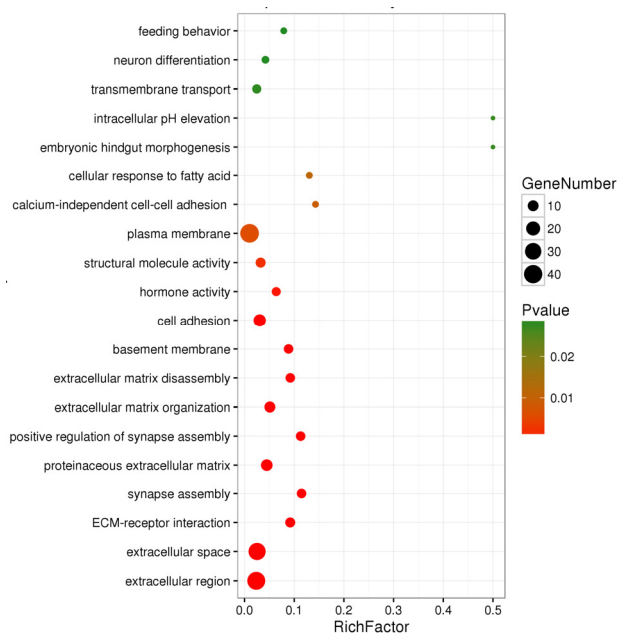


图1 HPV 阳性口咽癌差异基因功能注释结果

Fig. 1 The gene functional annotation of HPV-positive oropharyngeal cancer

2.3 不同 HPV 感染状态口咽癌差异基因通路富集

通过对不同 HPV 感染状态口咽癌差异基因的通路富集, 笔者发现其主要集中在表征肿瘤的相关信号通路, 与细胞附着相关的黏着斑形成通路, 细胞外受体相互作用, Wnt 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等。结果见图 2。

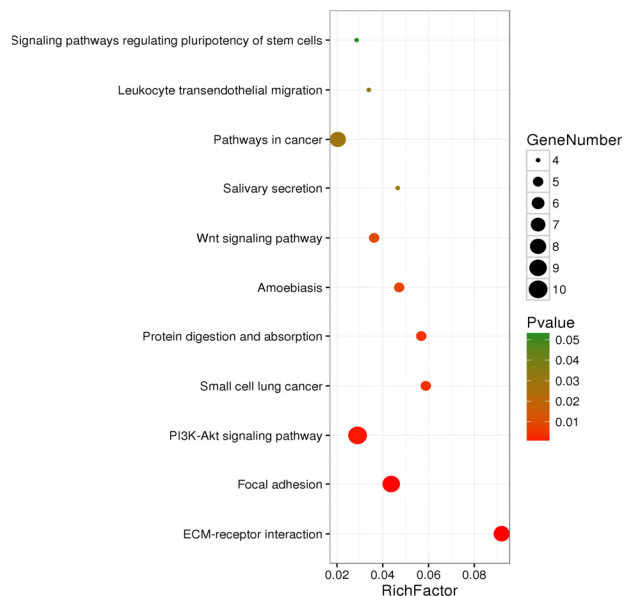
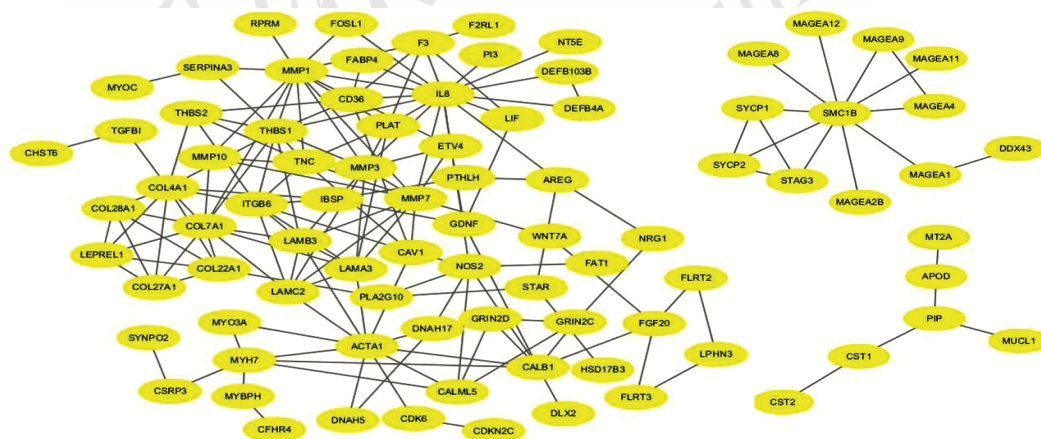


图2 HPV 阳性口咽癌差异基因通路富集结果

Fig. 2 The pathway enrichment analysis of HPV-positive oropharyngeal cancer

2.4 蛋白相互作用网络可视化分析

通过对蛋白-蛋白相互作用进行评分, 做出可视化网络, 基于前述基因富集通路的蛋白相互作用构建网络, 发现其主要聚集于以下 3 个集群, 分别为细胞外基质及胶原形成相关集群, 染色体分离和 DNA 复制集群以及头颈肿瘤所特有的唾液腺高表达相关蛋白。结果见图 3。



要信号通路,并对其蛋白相互作用进行可视化作图。

本研究发现,不同 HPV 感染状态对口咽癌在分子特征和生物学行为,尤其是一些肿瘤恶性演进和侵袭转移相关的基因上具有显著影响。一方面,其差异基因在功能上集中在细胞膜外基质,黏着斑形成以及与基质黏附等和侵袭转移相关的过程。细胞外基质(ECM)由结构物质和功能性大分子复合物组成,在细胞和组织结构的功能维持中起着重要作用^[13-14]。其特异性相互作用主要由跨膜蛋白介导,其中包括 CD36、整合蛋白、糖蛋白或其他细胞表面相关的活性成分。而黏着斑则被认为是肿瘤迁移和耐用的重要标志,其可感受细胞内外的机械变化,通过 FAK-p130Cas(黏着斑激酶-p130Cas)信号通路激活下游金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)将信号进行传导^[15]。推测在 HPV 感染后,病毒释放相关因子与上述受体结合,从而改变细胞的生物学行为。

另一方面,HPV 感染也可调控 Wnt 信号通路和 PI3K-Akt 等经典的肿瘤相关信号通路,这些相互作用直接或间接调控细胞活动,如黏附、迁移、分化、增殖和细胞凋亡^[16-18]。上述行为已被证实,在肿瘤的恶性演进,上皮-间质转化中具有重要意义。同时,通路富集和蛋白相互作用的结果也验证了前述功能的差异。提示,对于不同感染状态的口咽癌,肿瘤相关的关键通路上可能具有不同的抗肿瘤药物作用靶点。

当然,受数据库数据所限,本研究也存在一定局限性。首先 GEO 数据库仅提供 mRNA 水平的数据,其蛋白表达与 mRNA 转录一致性仍待明确。此外,由于芯片系统检测的局限,往往需要 RT-PCR 和 Western Blot 实验在临床样本中进一步验证。因此,HPV 阳性口咽癌特征基因仍需更全面的数据支持。

综上所述,本研究利用多种生物信息学方法从不同的角度定义了不同 HPV 感染状态口咽癌患者分子发病机制的表达特征,证实了 HPV 的感染状态可在分子水平影响口咽癌的发生发展。本研究结果在基因层面为 HPV 作为口咽癌患者分型提供了一定的支持,也为口咽癌的精准治疗提供新思路。

REFERENCES

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] CHATURVEDI A K, ENGELS E A, PFEIFFER R M, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer

- incidence in the United States [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(32): 4294-4301.
- [3] WILSON D D, CRANDLEY E F, SIM A, et al. Prognostic significance of p16 and its relationship with human papillomavirus in pharyngeal squamous cell carcinomas [J]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2014, 140(7): 647-653.
- [4] GEIGER J L, LAZIM A F, WALSH F J, et al. Adjuvant chemoradiation therapy with high-dose versus weekly cisplatin for resected, locally-advanced HPV/p16-positive and negative head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2014, 50(4): 311-318.
- [5] WANG M B, LIU I Y, GORNBEIN J A, et al. HPV-positive oropharyngeal carcinoma: a systematic review of treatment and prognosis [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 153(5): 758-769.
- [6] HUSAIN N, NEYAZ A. Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts [J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2017, 7(3): 198-205.
- [7] SY A U, HERNANDEZ B Y, TAREG A, et al. Acceptability and feasibility of a community based participatory research project comparing cytology and urine HPV DNA testing for cervical cancer screening in Yap, Federated States of Micronesia [J]. *Cancer Epidemiol*, 2017, 50(Pt B): 283-288.
- [8] LIU X, KUMAR M, YANG L, et al. BAP1 is a novel target in HPV negative head and neck cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 24(3): 600-607.
- [9] AYALA-CALVILLO E, MOJICA-VÁZQUEZ L H, GARCÍA-CARRANCA A, et al. Wnt/β-catenin pathway activation and silencing of the APC gene in HPV-positive human cervical cancer-derived cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 17(1): 200-208.
- [10] KOSTARELI E, HOLZINGER D, BOGATYROVA O, et al. HPV-related methylation signature predicts survival in oropharyngeal squamous cell carcinomas [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(6): 2488-2501.
- [11] TOMAR S, GRAVES CA, ALTOMARE D, et al. Human papillomavirus status and gene expression profiles of oropharyngeal and oral cancers from European American and African American patients [J]. *Head Neck*, 2016, 38(Suppl 1): E694-704.
- [12] ZENG X X, YELON D. Cadm4 restricts the production of cardiac outflow tract progenitor cells [J]. *Cell Rep*, 2014, 7(4): 951-960.
- [13] HAN B B, LI S, TONG M, et al. Fenretinide perturbs focal adhesion kinase in premalignant and malignant human oral keratinocytes. Fenretinide's chemopreventive mechanisms include ECM interactions [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8(5): 419-430.
- [14] LI YY, ZHOU C X, GAO Y. Podoplanin promotes the invasion of oral squamous cell carcinoma in coordination with MT1-MMP and Rho GTPases [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(2): 514-529.
- [15] EKE I, CORDES N. Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2015(31): 65-75.
- [16] KRAUSOVA M, KORINEK V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 570-579.
- [17] HOLLAND J D, KLAUS A, GARRATT A N, et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(2): 254-264.
- [18] MARTINS F, DE SOUSA S C, DOS S E, et al. PI3K-AKT-mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis [J]. *J Oral Pathol Med*, 2016, 45(10): 746-752.

收稿日期: 2017-11-14

(本文责编: 李艳芳)