doi:10.11659/jjssx.11E016055

头颈部鳞癌中 TP53 和 NOTCH1 基因的共表达网络及功能分析

郑艳秋,赵斐斐,崔晓波,胡文良,孙学威 (内蒙古医科大学附属医院耳鼻咽喉科,内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘 要] **目的** 探索 TP53 和 NOTCH1 基因在头颈部鳞癌中的表达关系及其作用。**方法** 选取 TCGA 数据库中的 279 例头颈部鳞癌二代测序样本,获得头颈部鳞癌中差异表达基因数据。利用 Pearson 和 Spearman 方法检测 TP53 基因和 NOTCH1 基因的共表达关系。利用 cbioportal 筛选样本中与 TP53 和 NOTCH1 发生共表达的基因。利用 String 数据库,建立 TP53-NOTCH1 共表达网络。利用 KEGG 数据库分析共表达网络基因的富集通路。利用 DAVID 数据库分析共表达网络功能。**结果** 在 TCGA 数据库的头颈部鳞癌样本中,TP53 和 NOTCH1 发生共表达。String 数据库显示 TP53 和 NOTCH1 共有 182 对共表达基因的蛋白质互相作用对(Pearson 分数 =0.45;Spearman 分数 =0.41)。KEGG 分析显示这些共表达基因被富集在T cell receptor signaling pathway,cell cycle 和 cell adhesion molecules 等通路中(Pearson 分数和 Spearman 分数均 >0.3)。功能分析结果显示这些共表达基因的功能主要为免疫应答、转录调控、能量代谢、细胞周期调控和细胞凋亡调控等相关功能($P<0.05$)。**结论** TP53 和 NOTCH1 在头颈部鳞癌中发生共表达;通过建立 TP53-NOTCH1 共表达网络和生物信息学分析,挖掘出二者在头颈部鳞癌中发挥的协同作用及其通路;上述结果能够为头颈部鳞状细胞癌的分子机制研究提供新的参考。

[关键词] 头颈部鳞状细胞癌;TP53;NOTCH1;共表达网络

[中图分类号] R739.65 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-11-12

Co-expression network and function analysis of TP53 and NOTCH1 in head and neck squamous cell carcinoma

ZHENG Yan-qiu, ZHAO Fei-fei, CUI Xiao-bo, HU Wen-liang, SUN Xue-wei (Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Objective To find out the expression relation between TP53 and NOTCH1, and to explore their effects in head and neck squamous cell carcinoma. **Methods** Obtained the differentially expressed genes data of head and neck squamous cell carcinoma from 279 samples in TCGA database. Analyzed the co-expression relation between TP53 and NOTCH1 through Pearson and Spearman method. Cbioportal was used to analyze their co-expressed genes. Establish the co-expression network of TP53 and NOTCH1 with String database. The pathway and function of co-expression network was identified through KEGG and DAVID database respectively. **Results** Among the 279 samples, TP53 and NOTCH1 was co-expressed in head and neck squamous cell carcinoma. (Pearson score =0.45; Spearman score =0.41) There were 182 interaction pairs of TP53 and NOTCH1 related co-expressed gene according to the String database. (Pearson and Spearman score >0.3) These genes were enriched in some pathways such as T cell receptor signaling pathway, cell cycle, cell adhesion molecules and so on. These genes were enriched in some tumor related function including immune response, regulation of transposition, regulation of apoptotic process, cell cycle, regulation of GTPase activity and so on. **Conclusion** TP53 and NOTCH1 was co-expressed. Through establishing co-expressed network of TP53 and NOTCH1 and bioinformatics analysis, their function and signaling pathway were explored. The data generated from this study could provide a new reference in mechanism research of head and neck squamous cell carcinoma.

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma; TP53; NOTCH1; co-expression network

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金(2014MS0856);内蒙古医科大学科技百万工程项目(KJbw2013014)

[通信作者] 赵斐斐,E-mail:immu_zhaofeifei@outlook.com

[17] 黄 勇,徐 峰,蔡贤华,等.改良肌间隙旁正中入路治疗腰椎滑脱症[J].局解手术学杂志,2011(6):667-668.doi:10.3969/j.issn.1672-5042.2011.06.035.

[18] 杨 兵,陈谷才,朱兴建,等.经多裂肌和最长肌间隙入路治疗胸腰段骨折[J].局解手术学杂志,2009,18(6):457.doi:10.3969/j.issn.1672-5042.2009.06.012.

[19] 余贵华,陈 军,向福胜,等.椎旁肌间隙入路与后正中入路行一期减压重建治疗胸腰段脊柱骨折脱位[J].局解手术学杂志,2016,25(3):208-211.doi:10.11659/jjssx.07E015112.

[20] 王静雅,邓雪飞,廖文斌,等.胸腰移行部椎旁肌间隙的解剖及临床应用研究[J].安徽医科大学学报,2015,50(2):164-168.

[21] 桂柯科,俞永林,赵明东,等.中国人 Wiltse 椎旁肌间隙入路的观察与测量[J].中国组织工程研究,2014,18(22):3504-3509.

(编辑:魏 源)

头颈部鳞癌的发病率位于常见恶性肿瘤第六位，严重威胁人类健康[1]。TP53 作为著名的癌基因之一，很早就有研究发现它在头颈部鳞癌的发生发展过程中起重要作用。本课题组在前期实验中发现 TP53 的表达与头颈部鳞癌患者的生存率显著相关，并且通过生物信息学分析发现 TP53 基因主要参与了 DNA 代谢、细胞凋亡和能量代谢等肿瘤相关过程[2]。除 TP53 之外，美国霍普金斯大学和麻省理工的研究小组发现，NOTCH1 在头颈部鳞癌的组织中发生基因突变和异常表达[3-4]。NOTCH1 的异常表达率仅次于 TP53，并且参与了上皮细胞鳞状分化的过程。然而，TP53 和 NOTCH1 作为异常表达率最高的 2 个基因，他们在头颈部鳞癌中是否存在表达关联性还是未知。本次实验中，我们利用 TCGA 数据库和共表达网络等生物信息学方法挖掘 TP53 和 NOTCH1 在头颈部鳞癌中的表达关系及其作用，以期为头颈部鳞癌的机制研究和分子治疗提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 头颈部鳞癌中 TP53 和 NOTCH1 的表达关系

利用癌症基因图集（The cancer genome atlas，TCGA）数据库（http://cancergenome. nih. gov/）中的 279 例头颈部鳞状细胞癌样本，利用 Pearson 和 Spearman 方法检测 TP53 和 NOTCH1 的共表达情况。

1.2 TP53-NOTCH1 的共表达网络的建立

利用 cbioportal 网站（www. cbioportal. org）筛选在 TCGA 数据库 279 例头颈部鳞癌样本中与 TP53 和 NOTCH1 发生共表达的基因，Pearson 和 Spearman 分数均大于 0.3 者为共表达基因。然后，利用 String 数据库（www. string. org）获取这些共表达基因的互作关系对，并利用 Cytoscape 软件（www. cytoscape. org）建立 TP53-NOTCH1 的共表达网络。

1.3 TP53-NOTCH1 共表达网络的通路及功能分析

为了理解 TP53-NOTCH1 共表达基因的功能及其发挥功能的通路，我们利用 KEGG 数据库（http://www. genome. jp/kegg/）和 DAVID（https://david. ncifcrf. gov/）数据库对其进行信号通路和功能分析。输入共表达基因后，选择 Gene_Ontology（GO）中的 GOTERM_BP_FAT 选项进行功能分析。

1.4 统计学分析

KEGG 分析和 GO 功能分析采用错误发现率（false discovery rate，FDR）检验，FDR 小于 0.05 的功能集合被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 头颈部鳞癌中 TP53 和 NOTCH1 的共表达关系

通过 Pearson 和 Spearman 分析，我们发现 279 例头颈部鳞癌样本 TP53 和 NOTCH1 存在共表达关系（Peason 分数 = 0.45；Spearman 分数 = 0.41），见图 1。

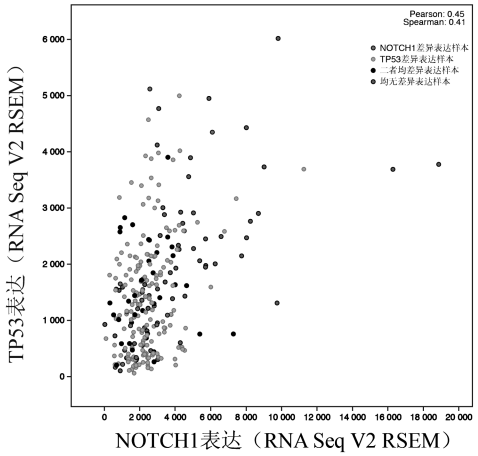


图 1 TP53 和 NOTCH1 在头颈部鳞癌中存在共表达关系

2.2 TP53 和 NOTCH1 共表达网络的建立

我们在 279 例头颈部鳞癌样本中共筛选出与 TP53-NOTCH1 共表达的基因有 771 个。利用 String 数据库，我们发掘它们的共表达基因互作关系 182 组（Pearson 和 Spearman 分数均大于 0.3）。然后，利用 Cytoscape 软件建立 TP53-NOTCH1 的共表达网络（图 2）。

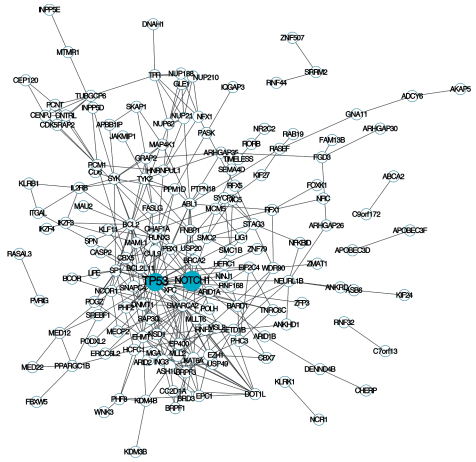


图 2 头颈部鳞癌中 TP53-NOTCH1 的共表达网络

2.3 TP53-NOTCH1 共表达网络的富集信号通路

利用 KEGG 数据库，我们发掘出 TP53-NOTCH1 共表达基因所富集的信号通路。结果显示这些基因主要富集在 T cell receptor signaling pathway，cell cycle 和 cell adhesion molecules 等信号通路中（FDR < 0.05），见表 1。

表 1 TP53-NOTCH1 共表达网络的信号通路

信号通路	FDR 值
hsa05340:Primary immunodeficiency	6.70E-05
hsa04660:T cell receptor signaling pathway	0.001614
hsa00310:Lysine degradation	0.001954
hsa04110:Cell cycle	0.004042
hsa03030:DNA replication	0.006085
hsa03430:Mismatch repair	0.011221
hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	0.018729

2.3 TP53-NOTCH1 共表达网络的功能

利用 DAVID 数据库,我们获得了 TP53-NOTCH1 共表达网络的功能。其主要功能主要为免疫相关功能,包括免疫应答(immune response)、转录调控(transcription)、能量代谢(regulation of glucose transport)、细胞周期调控(cell cycle)和细胞凋亡调控(regulation of apoptotic process)等相关功能(FDR <0.05),见表 2。

表 2 TP53-NOTCH1 共表达网络的功能

基因功能(GO term)	FDR 值
GO:0006351 ~ transcription,DNA-templated	9.09E-20
GO:0042110 ~ T cell activation	9.34E-06
GO:0016925 ~ protein sumoylation	8.01E-05
GO:0002250 ~ adaptive immune response	1.43E-04
GO:0051301 ~ cell division	1.75E-04
GO:0045893 ~ positive regulation of transcription, DNA-templated	1.85E-04
GO:0010529 ~ negative regulation of transposition	6.34E-04
GO:0050776 ~ regulation of immune response	0.003 995
GO:0051056 ~ regulation of small GTPase mediated signal transduction	0.004 031
GO:0097190 ~ apoptotic signaling pathway	0.006 432
GO:0043547 ~ positive regulation of GTPase activity	0.006 499
GO:0010827 ~ regulation of glucose transport	0.006 831
GO:0006955 ~ immune response	0.018 956
GO:2000134 ~ negative regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	0.019 461
GO:0046641 ~ positive regulation of alpha-beta T cell proliferation	0.021 312
GO:0050852 ~ T cell receptor signaling pathway	0.022 892
GO:0043525 ~ positive regulation of neuron apoptotic process	0.023 144
GO:0043065 ~ positive regulation of apoptotic process	0.031 079
GO:0045579 ~ positive regulation of B cell differentiation	0.040 554
GO:0000086 ~ G2/M transition of mitotic cell cycle	0.041 816

3 讨论

头颈部鳞癌是一类严重威胁人类健康的恶性肿瘤。研究表明,头颈部鳞癌的发生发展与多种重要的癌基因发生基因突变及表达异常有密切关系[5]。这些基因包括 TP53、CDKN2A、PIK3CA、HRAS、NOTCH1 和 FBXW7。其中,表达差异率最高的 2 个基因为 TP53 和 NOTCH1[4]。我们在前期的实验分析中发现 TP53 在 279 例头颈部鳞癌样本中的差异表达率为 77%[2]。此外,已有的研究表明 TP53 异常能够影响肿瘤 DNA 修复、细胞增殖和细胞凋亡等重要肿瘤生物学过程[6]。显然,基因的重要性不仅体现在其对于肿瘤的直接调控,更体现在对于整个肿瘤基因网络的影响。研究表明,TP53 基因在发挥作用时,会影响其他上下游基因或直接影响与之结合的基因,从而产生一系列连锁反应。Haricharan 等[7]发现 TLR4 调节乳腺癌细胞增长的过程中必须依赖于 TP53 的参与。Noon 等[8]发现 MDM2 能够通过与 TP53 结合来加快肾癌的恶性进程。然而,在头颈部鳞癌中,TP53 与其他高突变率基因之间也存在类似的联系。例如,TP53 和 CDKN2A 在喉鳞状细胞癌和口腔鳞癌中出现共突变情况[9-10]。然而,作为头颈部鳞癌中表达异常率排在第二位的 NOTCH1 与 TP53 之间是否存在共表达的情况还是未知。本次实验,我们利用 279 例喉癌样本和生物信息学测序分析技术,发现二者存在共表达关系。研究表明,NOTCH1 在肿瘤的发生发展过程中同样发挥着重要作用。Shao 等[11]发现 NOTCH1 能够调节肿瘤的上皮间质化进程从而调节肿瘤的侵袭和转移。Wei 等[12]发现 NOTCH1 能够调控胃癌细胞系 SGC-7901 增殖和侵袭。此外,大量实验证明,NOTCH1 与头颈部鳞癌的关系十分密切。例如,Wang 等[13]发现 NOTCH1 能够调节头颈部鳞癌细胞的血管生成能力从而影响其生长。Dai 等[14]在沉默 NOTCH1 后发现喉鳞状细胞癌细胞系的凋亡率增加,增殖受到抑制。NOCTH1 与 TP53 在头颈部鳞癌中发生共表达,提示 NOTCH1 发挥这些调控肿瘤的作用可能与影响 TP53 基因的表达有关。

为了进一步探究 NOCTH1 和 TP53 在头颈部鳞癌中的协同作用,我们利用生物信息学方法建立了 NOTCH1-TP53 的共表达网络。对该网络进行通路分析后,我们发现它们的共表达基因主要通过免疫通路、细胞周期通路和细胞粘附通路等肿瘤相关通路发挥作用。这与现有的研究结果相符合。例如,Curry 等[15]发现 TP53 和 NOTCH1 参与了头颈部鳞癌肿瘤微环境

中的免疫应答过程,Song 等[16]发现 2 个基因均能影响头颈部鳞癌的细胞周期。NOTCH1-TP53 共表达网络的功能分析结果显示,NOTCH1 和 TP53 参与了免疫应答、转录调控、细胞周期调控和细胞凋亡调控等相关功能。这与前面所举的例证相符合。此外,我们还发现 NOTCH1 和 TP53 共同参与了头颈部鳞癌的能量代谢过程。有研究表明,NOTCH1 能够调节肿瘤的葡萄糖代谢,TP53 也具有类似功能,但是二者是否在这一过程中互相调控还不清楚。我们的结果提示,NOTCH1 和 TP53 很可能通过相互作用的关系影响头颈部鳞癌的能量代谢。

对于 NOTCH1 和 TP53 共表达的可能机制,我们认为这可能与 NF-kB 信号通路有关。Ramdass 等[17]发现 NOTCH1 与 NF-kB 通路发生共表达并激活该通路从而调控肿瘤发展。Heyne 等[18]发现 TP53 能够与 NF-kB 通路发生 crosstalk 从而调节肿瘤生长。而 NF-kB 通路正是在头颈部鳞癌中起到至关重要作用的信号通路之一,因此,这可能是隐藏在 NOTCH1 与 TP53 共表达背后的机制之一,需要进一步的实验来证明。本次研究的结果将 2 个重要的肿瘤相关基因联系在一起,能够为头颈部鳞癌的分子机制研究提供新的参考。

[参考文献]

[1] Strojan P, Corry J, Eisbruch A, et al. Recurrent and second primary squamous cell carcinoma of the head and neck: when and how to reirradiate[J]. Head Neck, 2015, 37(1): 134 - 150. doi: 10.1002/hed.23542.

[2] 徐明义,郑艳秋,孙 娟,等. 头颈部鳞癌中 TP53 基因的调控网络分析[J]. 局解手术学杂志,2016,25(3):863 - 867. doi:10.11659/jjssx.08E016052.

[3] Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1[J]. Science, 2011, 333(6046): 1154 - 1157. doi: 10.1126/science.1206923.

[4] Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Science, 2011, 333(6046): 1157 - 1160. doi: 10.1126/science.1208130.

[5] van Ginkel JH, de Leng WW, de Bree R, et al. Targeted sequencing reveals TP53 as a potential diagnostic biomarker in the post-treatment surveillance of head and neck cancer[J]. Oncotarget, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.11196.

[6] Peltonen JK, Helppi HM, Pääkkö P, et al. p53 in head and neck cancer: functional consequences and environmental implications of TP53 mutations[J]. Head Neck Oncol, 2010, 2: 36. doi: 10.1186/1758 - 3284 - 2 - 36.

[7] Haricharan S, Brown P. TLR4 has a TP53-dependent dual role in regulating breast cancer cell growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(25): E3216 - 3225. doi: 10.1073/pnas.1420811112.

[8] Noon AP, Polański R, El-Fert AY, et al. Combined p53 and MDM2 biomarker analysis shows a unique pattern of expression associated with poor prognosis in patients with renal cell carcinoma undergoing radical nephrectomy[J]. BJU Int, 2012, 109(8): 1250 - 1257. doi: 10.1111/j.1464 - 410X.2011.10433.x.

[9] Todorova TA, Jordanov SH, Stancheva GS, et al. Mutational status of CDKN2A and TP53 genes in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2015, 21(2): 413 - 421. doi: 10.1007/s12253 - 014 - 9836 - 0.

[10] Heaton CM, Durr ML, Tetsu O, et al. TP53 and CDKN2a mutations in never-smoker oral tongue squamous cell carcinoma[J]. Laryngoscope, 2014, 124(7): E267 - 273. doi: 10.1002/lary.24595.

[11] Shao S, Zhao X, Zhang X, et al. Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 28. doi: 10.1186/s12943 - 015 - 0295 - 3.

[12] Wei G, Chang Y, Zheng J, et al. Notch1 silencing inhibits proliferation and invasion in SGC-7901 gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4): 1153 - 1158. doi: 10.3892/mmr.2014.1920.

[13] Wang WM, Zhao ZL, Ma SR, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition reduces angiogenesis via hypoxia-inducible factor-1α and Notch1 in head neck squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0119723. doi: 10.1371/journal.pone.0119723.

[14] Dai MY, Fang F, Zou Y, et al. Downregulation of Notch1 induces apoptosis and inhibits cell proliferation and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2015, 34(6): 3111 - 3119. doi: 10.3892/or.2015.4274.

[15] Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Semin Oncol, 2014, 41(2): 217 - 234. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.03.003.

[16] Song Y, Li L, Ou Y, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer[J]. Nature, 2014, 509(7498): 91 - 95. doi: 10.1038/nature13176.

[17] Ramdass B, Maliekal TT, Lakshmi S, et al. Coexpression of Notch1 and NF-kappaB signaling pathway components in human cervical cancer progression[J]. Gynecol Oncol, 2007, 104(2): 352 - 361.

[18] Heyne K, Winter C, Gerten F, et al. A novel mechanism of crosstalk between the p53 and NF-κB pathways: MDM2 binds and inhibits p65RelA[J]. Cell Cycle, 2013, 12(15): 2479 - 2492. doi: 10.4161/cc.25495.

(编辑:周小林)