doi:10.11659/jjssx.08E016014

头颈部鳞癌中 FOXP3 基因相关的竞争性内源性 RNA 网络分析

孙 娟,王 薇,胡文良,孙学威,李玲香,崔晓波 (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 FOXP3 基因在头颈部鳞癌中的作用机制。**方法** 选取 TCGA 数据库中的 279 例头颈部鳞癌二代测序样本,利用 cbioportal 筛选样本中 FOXP3 的共表达基因;利用 String 数据库,建立 FOXP3 的共表达网络;利用 DAVID 数据库分析共表达网络功能;利用 miRTarBase 和 StarBase 数据库,筛选能够调控 FOXP3 的短链非编码 RNA(microRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)和环状非编码 RNA(circRNA);最后,利用 Cytoscape 软件建立 FOXP3 的竞争性内源性 RNA(ceRNA)网络。**结果** 在 TCGA 数据库的头颈部鳞癌样本中共筛选出 FOXP3 的共表达基因 950 个。(Spearman 分数大于 0.5)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,T 细胞、淋巴细胞和粒细胞激活等免疫相关功能。ceRNA 网络揭示 miR-31-5p 和 miR-210-3p 能够靶向调控 FOXP3 基因。此外,XIST、TUG1、JRK 和 LINC00473 等 42 个 lncRNA 和 ZNF223_hsa_circ_000898 和 ISY1_hsa_circ_001090 等 31 个 circRNA 能够通过 ceRNA 作用调控 FOXP3。**结论** 成功建立 FOXP3 基因相关的 ceRNA 网络,并挖掘出 42 个 lncRNA 和 31 个 circRNA 可能通过 ceRNA 作用调控 FOXP3,可为头颈部鳞状细胞癌的分子机制研究和分子靶向治疗提供新的切入点。

[关键词] 喉鳞状细胞癌;FOXP3;长链非编码 RNA;环状非编码 RNA;竞争性内源性 RNA;短链非编码 RNA;靶向治疗
[中图分类号] R739.65 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-08-10

FOXP3-related ceRNA network analysis in head and neck squamous cell carcinoma

SUN Juan, WANG Wei, HU Wen-liang, SUN Xue-wei, LI Ling-xiang, CUI Xiao-bo (Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Objective To explore the FOXP3-related mechanism underlying head and neck squamous cell carcinoma. **Methods** We used cbioportal to identify the co-expressed genes of FOXP3 in 279 samples from head and neck squamous cell carcinoma in TCGA database. We used String database to establish the co-expression network of FOXP3. The function of co-expression network was identified through DAVID database. We used miRTarBase and StarBase database to screen the microRNA, lncRNA and circRNA that regulate FOXP3. Finally, Cytoscape software was used to establish FOXP3-related ceRNA network. **Results** We found 950 FOXP3 related co-expressed gene. (Spearman score ouer 0.5) These genes were enriched in immune response including T cell, leukocyte and lymphocyte activation. CeRNA network revealed that 2 microRNAs (i.e., miR-31-5p and miR-210-3p), 42 lncRNAs (e.g., XIST, TUG1, JRK and LINC00473) and 31 circRNAs (e.g., ZNF223_hsa_circ_000898 and ISY1_hsa_circ_001090) could regulate FOXP3. **Conclusion** We established FOXP3-related ceRNA network and identified 42 lncRNAs and 31 circRNAs that regulate FOXP3. The data generated from this study could provide a new cut point

[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] 孙 娟,E-mail:immu_sunjuan@163.com

[8] Ramanathan R, Leavell P, Mays C, et al. Impact of sepsis on surgical outcomes[J]. Surg Infect (Larchmt), 2015, 16(4): 405 - 409. doi: 10.1089/sur.2014.063.

[9] Rettig TC, Rigter S, Nijenhuis VJ, et al. The systemic inflammatory response syndrome predicts short-term outcome after transapical transcatheter aortic valve implantation[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2015, 29(2): 283 - 287. doi: 10.1053/j.jvca.2014.10.005.

[10] Whitaker AM, Farooq MA, Edwards S, et al. Post-traumatic stress avoidance is attenuated by corticosterone and associated with brain levels of steroid receptor co-activator-1 in rats[J]. Stress, 2016, 19(1): 69 - 77. doi: 10.3109/10253890.2015.1094689.

[11] Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 73(4): 801 - 808. doi: 10.1097/TA.0b013e318265cf87.

[12] Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment[J]. Lancet, 2014, 384(9952): 1455 - 1465. doi: 10.1016/S0140 - 6736(14)60687 - 5.

[13] 卢海滨,周 健,王耀丽,等. 外周血 CD64 指数对创伤手术后脓毒症的早期诊断价值[J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(5): 339 - 342. doi: 10.11659/jjssx.03E016031.

[14] Guisasola MC, Ortiz A, Chana F, et al. Early inflammatory response in polytraumatized patients: cytokines and heat shock proteins. A pilot study[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2015, 101(5): 607 - 611. doi: 10.1016/j.otsr.2015.03.014.

[15] 李 军,史 忠,粟永萍,等. 烧伤后小鼠血清皮质酮及肝组织糖皮质激素受体水平的变化[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(12): 1427 - 1429. doi: 10.3321/j.issn:1000 - 5404.2002.12.016.

[16] Li J, Li F, Che J, et al. Ameliorative effects of neurolytic celiac plexus block on stress and inflammation in rats with partial hepatectomy[J]. Trop J Pharm Res, 2015, 14(6): 1021. doi: 10.4314/tjpr.v14i6.12.

(编辑:杨 颖)

in research and treatment of head and neck squamous cell carcinoma.

Keywords: laryngeal squamous cell carcinoma; FOXP3; lncRNA; circRNA; ceRNA; microRNA; targeted therapy

头颈部鳞癌一直是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,并且随着人们生活习惯和环境的改变,发病率逐渐升高。以手术为主放化疗为辅的综合治疗方式并不能有效延长患者的生存时间[1]。肿瘤的免疫逃避机制是造成其难以被治愈和控制的主要原因之一。有研究表明调节性 T 细胞(Tregs) 在抑制免疫反应中起重要作用,而 FOXP3 是 Tregs 表面的特征性标志物,是 Tregs 细胞发育和功能维持的关键因素,在维持机体免疫耐受和免疫应答稳态方面具有非常重要的作用,具有下调免疫应答的功能[2-3]。Weller 等[4]研究发现,FOXP3 可以作为头颈部鳞癌的肿瘤标志物并且与患者预后呈正相关。因此,清楚 FOXP3 在头颈部鳞癌中的作用机制,对于治疗该疾病具有重要作用。随着 Salmena 等[5]提出竞争性内源性 RNA 假说(即具有 microRNA 互补结合位点的非编码 RNA 或假基因可以竞争性结合 microRNA 以减弱其对靶基因的抑制作用)以来,长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和环状非编码 RNA(circular RNA, circRNA)作为竞争性内源性 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)在肿瘤发生发展中的重要作用逐渐被发现并成为研究热点。本研究利用生物信息学方法结合现有数据库挖掘 FOXP3 在头颈部鳞癌中的作用及其相关 ceRNA 调控机制,以期为头颈部鳞癌的机制研究和治疗提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 头颈部鳞癌中 FOXP3 共表达基因筛选和共表达网络的建立

利用癌症基因图集(the cancer genome atlas, TCGA)数据库(http://cancergenome.nih.gov/)中的 279 例头颈部鳞癌样本,并通过 cbioportal 网站(www.cbioportal.org)筛选在这些样本中与 FOXP3 存在共表达关系的基因。获得这些共表达基因后,利用 String 数据库(www.string.org)获得共表达基因的互作关系,并利用 Cytoscape 软件(www.cytoscape.org)建立 FOXP3 共表达网络。

1.2 FOXP3 共表达网络的功能分析

为了理解 FOXP3 共表达基因的功能,我们利用 DAVID(https://david.ncifcrf.gov/)数据库对其进行功能分析。输入共表达基因后,选择 Gene_Ontology 中的 GOTERM_BP_FAT 选项进行功能分析。选择统计学意义最大的 15 个 GO term 作为主要功能并绘制表格。

1.3 FOXP3 相关 lncRNA 和 circRNA 的 ceRNA 网络分析

利用 miRTarBase(http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/),我们筛选出经实验证实能够靶向调控 FOXP3 的 microRNA。然后,根据 ceRNA 理论并利用 StarBase V2.0 (http://starbase.sysu.edu.cn)数据库,我们筛选出能够在与上述筛选出的 microRNA 互补结合的 lncRNA 和 circRNA。利用 Cytoscape 软件建立 FOXP3 相关的 ceRNA 网络。

1.4 统计学分析

共表达基因采用 spearman 检验,spearman 分数大于 0.5 的基因被认为有共表达关系。功能分析采用错误发现率(false discovery rate, FDR)检验,FDR < 0.5 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 FOXP3 基因的共表达网络

我们在 279 例头颈部鳞癌样本中共筛选出与 FOXP3 存在共表达关系的基因 950 个。(Spearman 分数大于 0.5)通过 String 数据库分析后,我们发掘出这 950 个共表达基因中存在 4 498 对基因互作关系。利用 Cytoscape 软件建立 FOXP3 的共表达网络,见图 1。

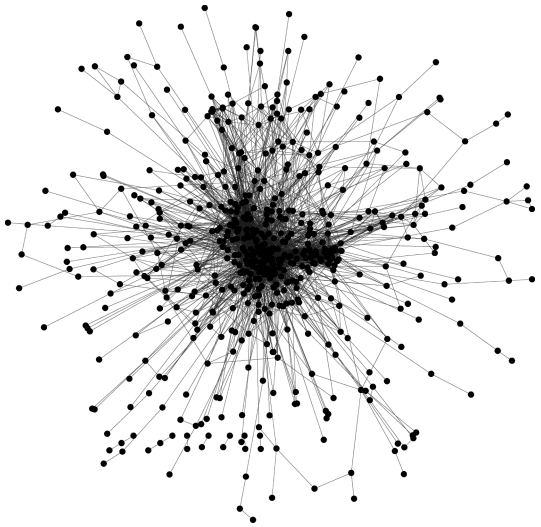


图 1 FOXP3 的共表达网络

2.2 FOXP3 共表达网络的功能

利用 DAVID 数据库,我们获得了 FOXP3 共表达网络的功能。其主要功能为免疫相关功能,包括免疫应答及淋巴细胞、T 细胞和粒细胞的激活,见表 1。该结果符合 FOXP3 的功能特点,并且提示 FOXP3 可能通过影响其他与之共表达的基因来调控头颈部鳞癌的肿瘤免疫功能。

表 1 FOXP3 共表达网络功能

GO term	功能	FDR
GO:0006955	immune response	9.22E-97
GO:0001775	cell activation	2.39E-42
GO:0045321	leukocyte activation lymphocyte activation	4.26E-42
GO:0046649	lymphocyte activation	5.76E-41
GO:0002684	positive regulation of immune system process	1.10E-38
GO:0006952	defense response	3.09E-38
GO:0050865	regulation of cell activation	8.93E-38
GO:0051249	regulation of lymphocyte activation	2.94E-35
GO:0002694	regulation of leukocyte activation	4.30E-35
GO:0042110	T cell activation	3.65E-29
GO:0050863	positive regulation of cell activation	5.35E-27
GO:0050867	inflammatory response	3.25E-24
GO:0006954	positive regulation of leukocyte activation	1.60E-23
GO:0002696	positive regulation of lymphocyte activation	5.61E-22
GO:0051251	positive regulation of T cell activation	9.53E-21
GO:0050870	positive regulation of immune response	3.48E-20
GO:0050778	response to wounding	7.66E-20
GO:0009611	lymphocyte differentiation	1.00E-18
GO:0030098	leukocyte differentiation	1.99E-17
GO:0002521	positive regulation of response to stimulus	6.07E-17

2.3 FOXP3 相关 lncRNA 和 circRNA 的 ceRNA 网络

利用 miRTarBase 数据库,我们筛选出调控 FOXP3 的 2 个 microRNA,即 miR-31-5p 和 miR-210-3p。根据 ceRNA 理论和 StarBase V2.0 数据库,筛选出能够通过 ceRNA 作用来调控 FOXP3 的 42 个 lncRNA,包括 XIST、TUG1、JRK 和 LINC00473 等,如图 2。此外,我们还筛选出能够通过 ceRNA 作用来调控 FOXP3 的 31 个 circRNA,包括 ZNF223_hsa_circ_000898 和 ISY1_hsa_circ_001090 等,如图 3 所示。

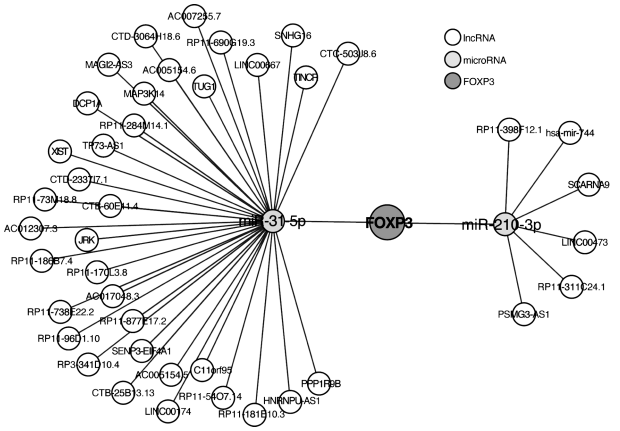


图 2 FOXP3 的 lncRNA 相关 ceRNA 网络

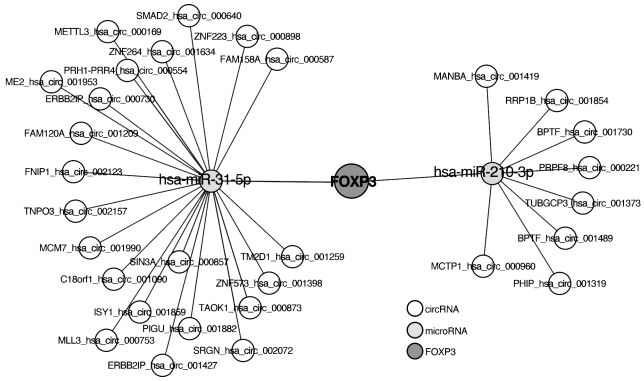


图 3 FOXP3 的 circRNA 相关 ceRNA 网络

3 讨论

近年来肿瘤与免疫的关系备受关注,认为免疫逃避是肿瘤发生的重要机制之一。肿瘤的发生发展依赖于其所处的微环境,T 细胞在肿瘤微环境中的浸润和功能决定了机体对肿瘤免疫监视的结果。Tregs 细胞是近年来确定的一类具有免疫调节功能的 T 细胞亚群之一,也是近年来各学科研究的热点之一,具有免疫无能及免疫抑制两大功能[6-7]。Tregs 细胞又名抑制性 T 细胞,在肿瘤细胞免疫逃逸中起着重要作用,分为固有 Tregs 细胞和诱导性 Tregs 细胞,前者通过细胞直接接触的方式发挥抑制作用,后者通过分泌抑制性因子如 IL-10 和 TGF-β1 发挥作用[8]。Foxp3 + Tregs 是一类具有免疫调节作用的 T 细胞亚群,由 Sakaguchi 等[9]首次报道。有研究表明,肺癌、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌等患者的外周血中 Foxp3 + Tregs 比例增加,提示其参与了疾病的进展[10-12]。Weller 等[4]研究发现 FOXP3 可以作为头颈部鳞癌的生物标志物并且与患者预后呈正相关。这一结果提示FOXP3在头颈部鳞癌的免疫调控中可能起到重要作用。但是,FOXP3 的具体作用还不确切。因此,本次实验中,我们利用共表达分析和功能分析鉴定出 FOXP3 共表达网络的功能。发现 FOXP3 的共表达基因也主要参与免疫应答、免疫细胞激活等免疫功能,这提示 FOXP3 可能通过影响其功能表达基因来调节头颈部鳞癌的免疫调控。

随着 ceRNA 理论的提出,lncRNA 和 circRNA 作为 ceRNA 在肿瘤调控中的重要作用逐渐被发掘。为了解 FOXP3 在头颈部鳞癌中的作用机制,我们利用生物信息学方法和数据库建立了 FOXP3 相关的 ceRNA 网络。利用 miRTarBase 数据库鉴定出已被实验证实能够靶向调节 FOXP3 的 2 个 microRNA。miR-31-5p 和 miR-210-3p 均被发现能够靶向调控 FOXP3,不仅如此,其与肿瘤的关系也十分密切。研究表明,miR-31-5p 能够调节肺癌的细胞周期,miR-210-3p 能够调节软组织肉瘤在缺氧条件下的增殖[13-14]。在此基础上,我们利用 StarBase 数据库,预测出能够与这两个 microRNA 互补结合的 lncRNA 和 circRNA。研究表明,这些 lncRNA 多数与肿瘤的发展关系密切。lncRNA XIST 被发现能够上调 AKT 磷酸化并促进乳腺癌细胞的活力和增殖[15]。TUG1 被发现能够通过调节上皮间质化来促进结肠癌细胞发生肝转移[16]。Pangon 等[17]发现 JRK 可以作为 β-catenin 转录活性的激活物来促进结

肠癌、乳腺癌和卵巢癌的发展。但是,这些 lncRNA 在头颈部肿瘤的影响还不清楚。上述结果提示这些 lncRNA 具有调节头颈部肿瘤的潜力,并且这很可能是通过其 ceRNA 作用实现的。

此外,circRNA 是继 lncRNA 之后被发现的新型非编码 RNA,其在肿瘤发生发展中的作用也越来越受到重视,如 Xuan 等[18]发现 circRNA_100855 能够促进喉鳞状细胞癌的恶性进展,Xie 等[19]发现 circRNA_001569 能够促进结肠癌的增殖和侵袭。由于 circRNA 刚被发现不久,相关的研究还比较少,我们筛选的 circRNA 还没有与头颈部肿瘤的相关报道。但是,我们发现这些 circRNA 与 miR-31-5p 和 miR-210-3p 均具有互补结合的碱基位点,而且这 2 个 microRNA 能够靶向调节 FOXP3。因此,我们有理由相信这些 circRNA 具有调控头颈部肿瘤的潜力。

目前,头颈部鳞癌的治疗方式仍以手术为主,放化疗为辅的综合治疗方式,而肿瘤的早期诊断和早期手术治疗是决定头颈部鳞癌患者预后的重要因素。研究表明 FOXP3 可以作为多项恶性肿瘤的早期诊断标记物,如宫颈癌、尿路上皮癌、结肠癌等[20-22]。这些结果提示 FOXP3 具有成为早期头颈部鳞癌肿瘤标志物的潜力,但这仍需更多的临床和基础实验来证明。本研究结果能够为头颈部鳞癌的免疫逃避机制研究和分子靶向治疗提供新的靶点。我们采用的生物信息学与多种数据库相结合的研究策略也能够为肿瘤的机制研究提供新的方法学参考。

[参考文献]

[1] Seiferlein E, Haderlein T, Schuster M, et al. Correlation between coping strategies and subjective assessment of the voice-related quality of life of patients after resection of T1 and T2 laryngeal tumors[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2012, 269(9): 2091 – 2096. doi: 10.1007/s00405 – 012 – 2020 – 9.

[2] Hossain DM, Panda AK, Manna A, et al. FoxP3 acts as a cotranscription factor with STAT3 in tumor-induced regulatory T cells[J]. Immunity, 2013, 39(6): 1057 – 1069. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.005.

[3] Emamgholipour S, Hossein-nezhad A, Eshaghi SM, et al. Adipocyokine profile, cytokine levels and Foxp3 expression in multiple sclerosis: a possible link to susceptibility and clinical course of disease[J]. Plos One, 2013, 8(10): e76555. doi: 10.1371/journal.pone.0076555.

[4] Weller P, Bankfalvi A, Gu X, et al. The role of tumour FoxP3 as prognostic marker in different subtypes of head and neck cancer[J]. Eur J Cancer, 2014, 50(7): 1291 – 1300. doi: 10.1016/j.ejca.2014.02.016.

[5] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. Cell, 2011, 146(3): 353 – 358. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.014.

[6] Karczwski M, Karczwski J, Kostrzew A, et al. The role of FOXP3 + regulatory T cells in kidney transplantation[J]. Transplant Proc, 2009, 41(5): 1527 – 1529. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.03.065.

[7] Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmuned disease[J]. Immunol Rev, 2005, 204(1): 195 – 207.

[8] Chapman NM, Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation[J]. Immunotherapy, 2014, 6(12): 1295 – 1311. doi: 10.2217/imt.14.84.

[9] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologicself-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. Immunol, 1995, 155(3): 1151 – 1164.

[10] Song JJ, Zhao SJ, Fang J, et al. Foxp3 overexpression in tumor cells predicts poor survival in oral squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 530. doi: 10.1186/s12885 – 016 – 2419 – 6.

[11] Li Y, Li D, Yang W, et al. Overexpression of the transcription factor FOXP3 in lung adenocarcinoma sustains malignant character by promoting G1/S transition gene CCND1[J]. Tumour Biol, 2016, 37(6): 7395 – 7404. doi: 10.1007/s13277 – 015 – 4616 – 3.

[12] Zhang C, Xu Y, Hao Q, et al. FOXP3 suppresses breast cancer metastasis through downregulation of CD44[J]. Int J Cancer, 2015, 137(6): 1279 – 1290. doi: 10.1002/ijc.29482.

[13] Zhong Z, Dong Z, Yang L, et al. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells[J]. Tumour Biol, 2013, 34(3): 1959 – 1965. doi: 10.1007/s13277 – 013 – 0741 – z.

[14] Gits CM, van Kuijk PF, de Rijck JC, et al. MicroRNA response to hypoxic stress in soft tissue sarcoma cells: microRNA mediated regulation of HIF3α[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 429. doi: 10.1186/1471 – 2407 – 14 – 429.

[15] Huang YS, Chang CC, Lee SS, et al. Xist reduction in breast cancer upregulates AKT phosphorylation via HDAC3-mediated repression of PHLPP1 expression[J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 43256 – 43266. doi: 10.18632/oncotarget.9673.

[16] Wang L, Zhao Z, Feng W, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes colorectal cancer metastasis via EMT pathway[J]. Oncotarget, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.10563.

[17] Pangon L, Ng I, Giry-Laterriere M, et al. JRK is a positive regulator of β-catenin transcriptional activity commonly overexpressed in colon, breast and ovarian cancer[J]. Oncogene, 2016, 35(22): 2834 – 2841. doi: 10.1038/onc.2015.347.

[18] Xuan L, Qu L, Zhou H, et al. Circular RNA: a novel biomarker for progressive laryngeal cancer[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2): 932 – 939.

[19] Xie H, Ren X, Xin S, et al. Emerging roles of circRNA_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 26680 – 26691. doi: 10.18632/oncotarget.8589.

[20] Xu S, Huangfu M, Jia X, et al. FOXP3 autoantibody as a potential early prognostic serum biomarker in patients with cervical cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2015, 20(5): 982 – 988. doi: 10.1007/s10147 – 015 – 0797 – 4.

[21] Phé V, Rouprêt M, Cussenot O, et al. Forkhead box protein P3 (Foxp3) expression serves as an early chronic inflammation marker of squamous cell differentiation and aggressive pathology of urothelial carcinomas in neurological patients[J]. BJU Int, 2015, 115(Suppl 6): 28 – 32. doi: 10.1111/bju.13044.

[22] Salama P, Stewart C, Forrest C, et al. FOXP3 + cell density in lymphoid follicles from histologically normal mucosa is a strong prognostic factor in early stage colon cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(8): 1183 – 1190. doi: 10.1007/s00262 – 011 – 1191 – 3.

(编辑:杨 颖)