

论 著

(临床研究)

IL-17A 在卵巢癌中的表达水平及潜在机制的生物信息学分析

陈娟, 刘传丽, 陈艳思, 王振国, 孔祥玲

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-17A(IL-17A)在卵巢癌组织中表达水平的变化及潜在机制。**方法** 选取武警特色医学中心 2018 年 1 月至 11 月间收治的原发性卵巢浆液性囊腺癌患者 20 例,采用 ELISA 法检测肿瘤组织及癌旁正常组织 IL-17A 表达水平。下载肿瘤基因组图谱(TCGA)数据库中 549 例卵巢浆液性囊腺癌数据,按照 IL-17A 表达水平由高到低排序,将排在前 50% 的患者设为高表达组,剩余患者设为低表达组,绘制 2 组患者生存曲线;利用在线分析工具(<http://www.linkedomics.org>)将数据库中每一种基因的表达水平逐一与 IL-17A 表达水平进行 Pearson 相关性检测,根据相关系数选取 100 个相关基因,使用 DAVID 工具完成基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书通路(KEGG 通路)富集分析。**结果** 癌组织 IL-17A 表达水平显著高于癌旁正常组织[(7.23±2.11)ng/L vs (4.19±1.33)ng/L, $P<0.05$];IL-17A 高表达组中位生存时间高于 IL-17A 低表达组(1451 d vs 1348 d, 风险比=0.74, 95%CI 为 0.60 ~ 0.92, $P<0.05$);在检测的 5309 个基因中,有 2103 个基因与 IL-17A 存在相关性($P<0.05$),其中钙电压门控通道亚单位 $\alpha 1$ (CACNA1S)与 IL-17A 表达水平相关系数最高($r=0.6928$, $P<0.05$);GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析可见,相关基因主要涉及的生物学过程包括生物调节、刺激反应和多细胞生物过程,主要涉及的细胞组分为细胞膜、细胞核和囊泡,主要涉及的分子功能为蛋白质结合、离子结合和转运活性,主要涉及的信号通路为泛醌 10 和其他萘类醌的生物合成、ATP 绑定蛋白转运和类固醇生物合成。**结论** IL-17A 可作为评价卵巢浆液性囊腺癌预后的指标之一,这可能与调控细胞膜表面电压门控通道及萘类醌的生物合成有关。

【关键词】 白细胞介素-17A;卵巢癌;卵巢浆液性囊腺癌;生物信息学

【中图分类号】 R711.75 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2020)01-0025-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2020.01.006

The expression level of IL-17A in ovarian cancer and the bioinformatics analysis of potential mechanism

CHEN Juan¹, LIU Chuan-li¹, CHEN Yan-si¹, WANG Zhen-guo², KONG Xiang-ling¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, 2. Medical and Research Department, Characteristic Medical Center of PAP, Tianjin 300162, China)

【Abstract】 Objective To investigate the changes and potential mechanisms of interleukin-17A (IL-17A) expression in ovarian cancer tissues. **Methods** Twenty patients with ovarian serous cystadenocarcinoma admitted to our hospital from January 2018 to November 2018 were enrolled. The expression of IL-17A in tumor tissues and adjacent normal tissues was detected by ELISA. 549 cases of ovarian serous cystadenocarcinoma in the cancer genome atlas (TCGA) database were downloaded. According to the order of IL-17A expression level from high to low, the patients in the top 50% were classified as high expression group, and the remaining patients were subdivided into low expression group. The survival curves of the two groups were drawn. Using an online analysis tool (<http://www.linkedomics.org>) to detect the Pearson correlation between the expression level of each gene in the database and the expression level of IL-17A one by one. According to the correlation

coefficient, 100 genes were selected, and the gene ontology (GO) enrichment analysis and the Kyoto Gene and Genome Encyclopedia pathway (KEGG pathway) enrichment analysis were completed by the DAVID tool. **Results** The expression level of IL-17A in cancer tissues was significantly higher than that in

基金项目:天津市科技计划项目(16ZXHLSY00120)

作者单位:300162 天津,武警特色医学中心妇产科(陈娟、刘传丽、陈艳思、孔祥玲),医研部(王振国)

通信作者:孔祥玲, E-mail: 861197731@qq.com

adjacent normal tissues. The difference was statistically significant $[(7.23 \pm 2.11) \text{ ng/L vs } (4.19 \pm 1.33) \text{ ng/L}, P < 0.05]$. The median survival time in high expression group was longer than that of low expression group (1451 d vs 1348 d, $\text{HR} = 0.74$, $95\% \text{ CI} = 0.60-0.92$, $P < 0.05$). Among the 5309 genes detected, 2103 genes existed correlation with IL-17A ($P < 0.05$), in which the correlation coefficient of calcium voltage-gated channel subunit $\alpha 1$ (CACNA1S) and IL-17A expression level was the highest ($r = 0.6928$, $P < 0.05$). The GO enrichment analysis and the KEGG pathway enrichment analysis showed that the mainly involved biological processes are biological regulation, stimulated response and multicellular biological processes; the mainly involved components are cell membrane, nucleus and vesicles; the mainly involved molecules functions are protein binding, ionic binding and transport activity; the main signaling pathways are biosynthesis of ubiquinone 10 and other quinones, adenosine triphosphate (ATP)-binding protein transport and steroid biosynthesis. **Conclusion** IL-17A can be used as one of the prognostic indicators for evaluating ovarian serous cystadenocarcinoma, which may be related to regulation of cell surface voltage gated channels and biosynthesis of terpenoid quinones.

[Key words] interleukin-17A; ovarian cancer; ovarian serous cystadenocarcinoma; bioinformatics

0 引言

卵巢恶性肿瘤是女性常见的肿瘤之一,其中以上皮癌最多见,卵巢上皮癌死亡率居于各妇科肿瘤之首^[1]。由于卵巢体积小,且发病时缺乏典型症状,难以早期发现,这使得挖掘可以提示肿瘤发生及预后的标志物,并探索其分子调控机制成为卵巢癌防治的关键^[2-3]。越来越多的研究证明^[4-5],炎性微环境对于恶性肿瘤的发生及进展具有重要作用,白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)家族是衔接肿瘤与炎症的关键炎症因子之一,其中 IL-17A 是该家族中最具代表性的成员^[6]。既往研究多着重于比较外周血中 IL-17A 表达水平高低与临床指标的相关性,欠缺长期随访数据以及相关分子机制的深入探讨^[7-8]。为此本研究首先从临床样本出发,验证卵巢癌患者肿瘤组织与癌旁组织 IL-17A 表达变化差异,随后借助公开临床数据库-肿瘤基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)及生物信息学手段分析 IL-17A 与患者生存率的相关性,以及 IL-17A 调控肿瘤的潜在分子机制,为卵巢癌的防控提供新的线索。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取我中心妇科 2018 年 1 月至 11 月间收治的原发性卵巢浆液性囊腺癌患者 20 例,年龄 39 ~ 72 岁,临床分期为 I 期 4 例、II 期 8 例、III 期 8 例。纳入标准:①病理证实为卵巢浆液性囊腺癌;②均为首次进行手术,手术范围包括子宫全切+双附件切除+大网膜及盆腔淋巴结清扫;③无远处转移;④术前均未接受化疗或放疗。排除标准:①存在心、肝、肾等重要脏器疾患;②有自身免疫性疾病,或近期存在感染。本研究经医院伦理委员会批准(批准号:WJ201712024),患者均签署知情同意书。

1.2 标本采集及检测 根据术中快速冰冻病理结

果,分别提取肿瘤组织及癌旁正常组织, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。待所有样本收集完毕后,采用 ELISA 法检测 IL-17A 水平。人 IL-17A 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司,酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司,检测过程严格按照说明书进行。

1.3 生物信息学分析

1.3.1 数据来源及生存曲线分析 从 Omisc 软件(<http://www.linkedomics.org>)下载卵巢浆液性囊腺癌患者 mRNA 数据集,筛选出同时包含 IL-17A 表达水平测定和完整临床数据的病例共 549 例,按照 IL-17A 表达水平由高到低排序,将排在前 50% 的患者设为高表达组($n = 275$),剩余患者设为低表达组($n = 274$),应用 GraphPad Prism 绘制 2 组患者生存曲线。

1.3.2 IL-17A 相关基因筛选 选取包含 IL-17A 表达水平测定的 RNA 基因芯片数据共 549 例,共检测基因 5309 个,利用在线分析工具(<http://www.linkedomics.org/admin.php>)将各基因表达水平逐一与 IL-17A 表达水平进行 Pearson 相关性检测,选取与 IL-17A 表达呈正相关且相关系数最高 50 个基因,以及与 IL-17A 表达呈负相关且相关系数最高 50 个基因,分别绘制基因热图^[9]。

1.3.3 富集分析 选取 $P < 0.05$ 且相关系数绝对值排在前 100 的基因,使用 DAVID 在线生物信息学分析工具(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行生物学注释和分类,即完成基因本体(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书通路(the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway, KEGG 通路)富集分析。GO 富集分析又分为生物学过程、细胞组分和分子功能三个类型。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本 t 检验,生存时间的比较使用 Gehan-Bres-

low-Wilcoxon 分析,相关基因筛选采用 Pearson 相关性分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 卵巢癌组织与癌旁组织 IL-17A 水平比较 癌组织 IL-17A 表达水平 $[(7.23 \pm 2.11) \text{ ng/L}]$ 显著高于癌旁正常组织 $[(4.19 \pm 1.33) \text{ ng/L}]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 IL-17A 表达水平差异对生存曲线影响 IL-17A 高表达组中位生存时间高于 IL-17A 低表达组, 差异有统计学意义 $[1451 \text{ d vs } 1348 \text{ d}, \text{ 风险比}(\text{HR}) = 0.74, 95\% \text{ CI 为 } 0.60 \sim 0.92, P < 0.05]$, 见图 1。

2.3 IL-17A 相关基因筛选结果 在检测的 5309 个基因中, 有 2103 个基因与 IL-17A 存在相关性 ($P < 0.05$), 见图 2a。与 IL-17A 表达呈正相关且相关系数最高 50 个基因见图 2b, 与 IL-17A 表达呈负相关且相关系数最高 50 个基因见图 2c。其中钙电压门控通道亚单位 $\alpha 1$ (calcium voltage-gated channel subunit $\alpha 1$ S, CACNA1S) 与 IL-17A 表达水平相关系数最高 ($r = 0.6928, P < 0.05$), 见图 2d。

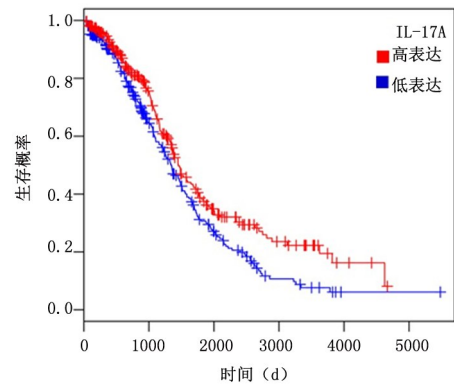
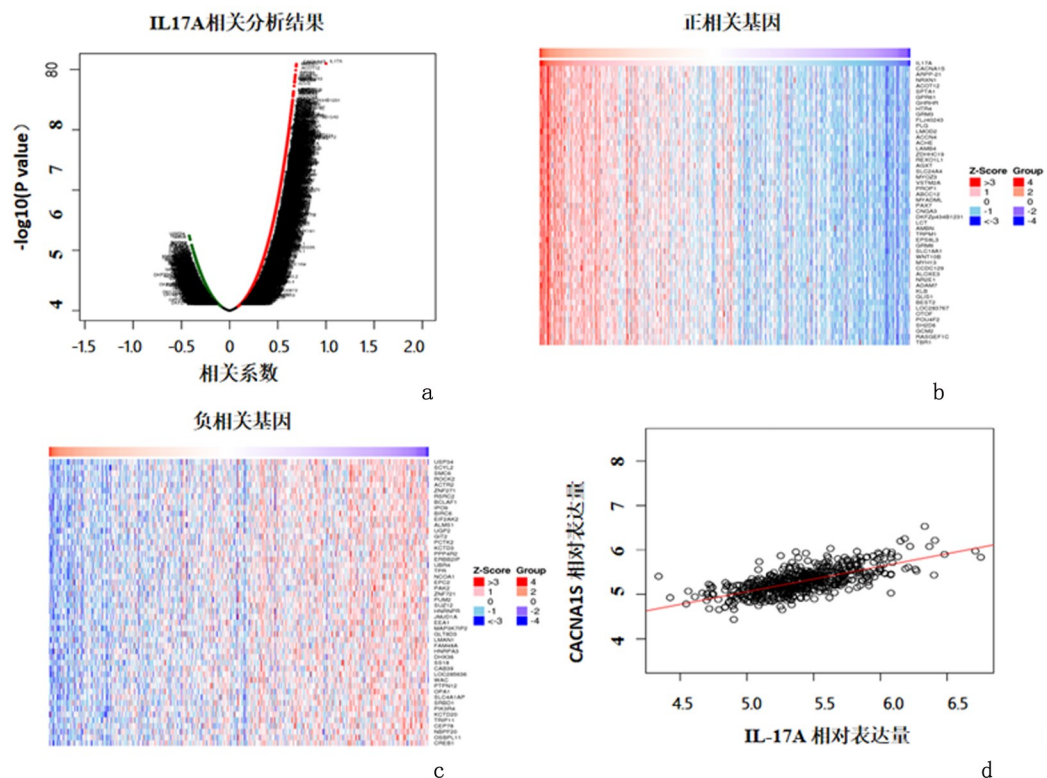


图1 IL-17A 高表达组与低表达组远期生存率比较

2.4 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析 GO 富集分析结果显示, 主要涉及的生物学过程包括生物调节、刺激反应和多细胞生物过程, 主要涉及的细胞组分为细胞膜、细胞核和囊泡, 主要涉及的分子功能为蛋白质结合、离子结合和转运活性, 见图 3。KEGG 通路富集分析显示, 主要涉及的信号通路为泛醌 10 和其他萘类醌的生物合成、三磷酸腺苷 (ATP) 绑定蛋白转运、类固醇生物合成、补体和凝血级联反应、神经活性配体-受体相互作用和神经突触激活, 见图 4。



a: IL-17A 与各基因的相关性分析结果; b: 与 IL-17A 表达呈正相关且相关系数最高 50 个基因按相关性大小由上向下排列; c: 与 IL-17A 表达呈负相关且相关系数最高 50 个基因按相关性大小由上向下排列; d: CACNA1S 与 IL-17A 相关性分析

图2 与 IL-17A 相关性较高的基因筛选结果

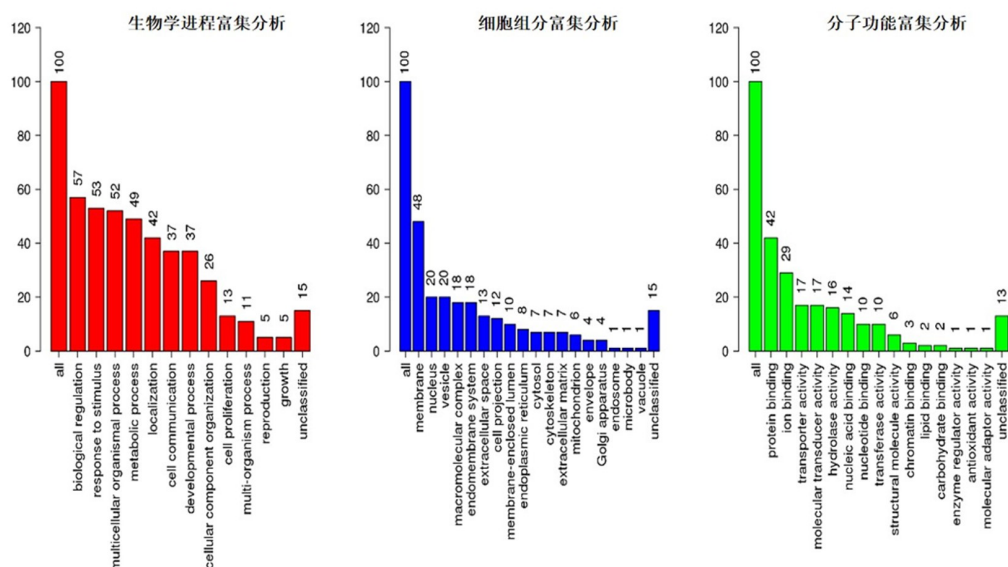


图3 与IL-17A呈正、负相关的前50个基因的GO富集分析

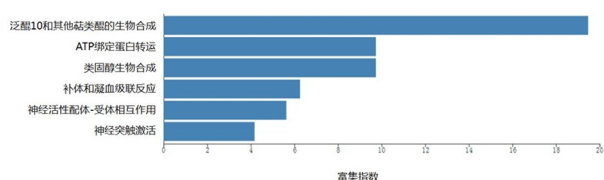


图4 与IL-17A呈正、负相关的前50个基因的KEGG通路富集分析

3 讨 论

恶性肿瘤的发生发展与其所处微环境密切相关,炎性细胞及相关炎症因子是肿瘤微环境的重要组成部分。慢性炎症可促进肿瘤恶变,同时恶变的肿瘤细胞还可主动募集炎性细胞,形成适宜生长的炎性环境^[10-11]。IL-17是T辅助细胞17(T helper cell 17, Th17)分泌的炎症因子,其中IL-17A作为IL-17家族的主要成员,在自身免疫性疾病和过敏性疾病中扮演重要角色^[12]。近期研究发现,其在卵巢癌的发生与发展中同样发挥重要作用。陈献等^[13]发现卵巢癌患者癌组织中IL-17A阳性率显著高于卵巢交界性肿瘤和良性卵巢肿瘤患者的肿瘤组织,熊雯等^[14]亦发现卵巢癌患者血清中IL-17表达显著上调。本研究通过卵巢浆液性囊腺癌患者肿瘤组织的检测发现,IL-17A在癌组织中的表达显著高于癌旁组织,这与多数研究结果一致,这可能是由于慢性炎症的存在可削弱机体的免疫功能,促进肿瘤血管生成及肿瘤细胞的增殖、转移^[15-17]。

但是亦有研究发现,IL-17在促进肿瘤内部的血管生成和肿瘤细胞迁移侵袭的同时,又可通过增强

细胞毒性T细胞活性从而抑制肥大细胞瘤及浆细胞瘤的生长,即IL-17在肿瘤的形成中具有双重作用^[18],这提示需要更多的临床随访数据去观察IL-17A与恶性肿瘤患者预后的关系,以便于进一步探讨IL-17A的作用机制并制定防治策略。TCGA数据库在过去的十余年里收录了加拿大和美国地区11 000多例肿瘤组织以及相匹配的正常组织,和约2.5 PB的高通量基因组测序结果,TCGA创建的基因组数据分析流程,可有效收集、选择和分析组织基因组改变,并结合收录患者的诊断和治疗信息,为改进癌症预防、早期检测和治疗提供了强大的研究基础^[19]。本研究通过对TCGA数据库中549例卵巢浆液性囊腺癌患者的随访数据进行分析后发现,IL-17A表达水平升高提示预后良好,这与Lan等^[20]的研究结果类似,其通过对104例卵巢癌患者的随访发现,IL-17高表达与晚期卵巢癌中无进展生存期的改善相关。这可能由于肿瘤细胞在募集炎症因子的同时,炎症因子本身也可作为一种第二信使,刺激肿瘤细胞微环境中免疫细胞的聚集,特别是T细胞,从而增强肿瘤细胞的清除,IL-17A介导的细胞杀伤作用强于慢性炎症带来的肿瘤血管生成作用,故呈现为IL-17A高表达促进了患者远期生存率的提高。

但是IL-17A具体作用的靶点尚不明确,为此本研究基于TCGA数据库中的基因检测结果,筛选出与IL-17A表达密切相关的基因,并进行富集分析,以求挖掘出潜在机制。结果可见,CACNA1S与IL-17A表达水平相关性最为明显。CACNA1S基因位于染色体1q31-32上,编码L-型钙通道的主要功能

单位 $\alpha 1$ 亚基。 $\alpha 1$ 亚基包含 4 个同源的结构域,它们排列对称,围成中间的亲水通道,随膜电位发生变化而形成构象变化,调节通道的开闭^[21-22]。研究结果提示卵巢浆液性囊腺癌的发展与电压门控通道的改变存在相关性,这可能是由于前列腺素、趋化因子、炎性细胞因子等可间接或直接作用于细胞表面受体,影响胞内外的电化学梯度,使胞内 Ca^{2+} 浓度发生改变,影响肿瘤细胞的增殖与肿瘤血管形成。

GO 富集分析结果提示,多数相关基因与蛋白质结合和生物调节相关,编码蛋白主要定位于细胞膜,这也与筛选出的 CACNA1S 基因功能高度一致。KEGG 通路富集分析显示,相关基因主要集中于泛醌 10 和其他萘类醌的生物合成通路。泛醌 10 又称辅酶 Q10,与多数类固醇、类萘等生物分子类似,主要由乙酰辅酶 A 经甲羟戊酸途径合成^[23],作为线粒体氧化呼吸链中的内源性抗氧化剂和电子载体,其在肿瘤细胞中可参与铁死亡过程。铁是人体生理活动中不可缺少的元素之一,近年来研究表明铁元素可参与线粒体氧化磷酸化,并可促使细胞产生过量活性氧,进而损害核酸、蛋白质和脂质等大分子物质,导致细胞死亡,这种新的细胞死亡形式被称为铁死亡^[24]。在卵巢恶性肿瘤组织,以及卵巢癌起始细胞模型中膜铁转运蛋白含量可显著减少^[25],也提示铁代谢异常可促进卵巢癌细胞的增殖。

综上所述,本研究通过临床标本验证了 IL-17A 在卵巢癌中的表达差异,及其与预后的相关性,并进一步基于 IL-17A 从数据库挖掘卵巢癌的潜在作用机制,发现 IL-17A 相关基因的功能特征主要富集在细胞膜表面的电压门控通道的调控及细胞凋亡过程,为 IL-17A 的临床价值提供了生物信息学证据支持。

[参考文献]

- [1] 伍筱孜,雷月,段晓义.程序性死亡受体-1/配体-1 在卵巢癌中的研究进展[J].医学研究生学报,2017,30(1):108-112.
- [2] 杨帆,谢树红,黄惠娟.卵巢癌在代谢组学中的研究进展[J].东南国防医药,2018,20(2):160-163.
- [3] 洪丽君,曾清芳,卢昆林,等.高尔基体磷蛋白 3 在卵巢癌中的表达及临床意义[J].东南国防医药,2017,19(4):357-360.
- [4] Santibanez JF, Bjelica S. Novel Patents Targeting Interleukin-17A; Implications in Cancer and Inflammation[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2018,13(2):133-144.
- [5] Liu Q, Li H, Yang J, et al. Valproic acid attenuates inflammation of optic nerve and apoptosis of retinal ganglion cells in a rat model of optic neuritis[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 1363-1370.
- [6] Li TJ, Jiang YM, Hu YF, et al. Interleukin-17-Producing Neutrophils Link Inflammatory Stimuli to Disease Progression by Promoting Angiogenesis in Gastric Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2017,23(6):1575-1585.
- [7] 熊雯,周新娥,黄娟,等.血清 CA125、HE4 及 IL-17 检测对上皮性卵巢癌的早期诊断价值分析[J].中国计划生育和妇产科,2016,8(3):69-73.
- [8] 张蓉,梅红,聂亚红,等.Th17 细胞及 IL-17 在卵巢癌患者外周血中的表达及临床意义[J].中国实验诊断学,2016,20(7):1103-1105.
- [9] Vasaikar SV, Straub P, Wang J, et al. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types[J]. Nucleic Acids Res, 2018,46(D1):D956-956D963.
- [10] Huang YS, Guillemineault C, Hwang FM, et al. Inflammatory cytokines in pediatric obstructive sleep apnea[J]. Medicine (Baltimore), 2016,95(41):e4944.
- [11] 田泾,高申.基于疾病微环境靶向的精准纳米靶向技术研究[J].医学研究生学报,2019,32(5):479-483.
- [12] 张海佳,沙素梅,徐斌,等.IL-17 在黏附侵袭性大肠杆菌感染小鼠结肠过程中的作用机制研究[J].现代生物医学进展,2017,17(17):3211-3215,3205.
- [13] 陈献,张晓洁,尚文雯,等.IL-17A 在卵巢癌组织中的表达及临床意义[J].免疫学杂志,2018,34(6):529-533.
- [14] 熊雯,周新娥,黄娟,等.血清 CA125、HE4 及 IL-17 检测对上皮性卵巢癌的早期诊断价值分析[J].中国计划生育和妇产科,2016,8(3):69-73.
- [15] Wu X, Yang T, Liu X, et al. IL-17 promotes tumor angiogenesis through Stat3 pathway mediated upregulation of VEGF in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2016,37(4):5493-5501.
- [16] Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth[J]. Blood, 2003,101(7):2620-2627.
- [17] 王艳军,王瑞玲,张小丽.人附睾分泌蛋白 4、糖类抗原 125 及卵巢恶性肿瘤风险预测模型在卵巢癌诊断中的价值[J].武警后勤学院学报(医学版),2017,26(5):436-438.
- [18] 魏泰,吴立玲,俞光岩.白介素-17 在恶性肿瘤发生发展过程中作用及其机制的研究进展[J].生理科学进展,2016,47(5):335-339.
- [19] Hutter C, Zenklusen JC. The Cancer Genome Atlas: Creating Lasting Value beyond Its Data[J]. Cell, 2018,173(2):283-285.
- [20] Lan C, Huang X, Lin S, et al. High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer[J]. Cell Tissue Res, 2013,352(2):351-359.
- [21] 何妍妍.低钾型周期性麻痹的临床特点及散发病例中 CACNA1S 和 SCN4A 基因筛查[D].湖南:南华大学,2017:12-16.
- [22] 范凌峰,毛熙光.中电导钙激活钾离子通道在肿瘤中的作用[J].西南军医,2012,14(2):328-329.
- [23] 李刚.辅酶 Q10 防治心脑血管疾病[J].中老年保健,2010,13(8):52-52.
- [24] 李瑶琪,杨敏,李晓天.铁死亡的生化过程及对肿瘤的影响[J].中国生物化学与分子生物学报,2018,34(8):838-843.
- [25] Basuli D, Tesfay L, Deng Z, et al. Iron addiction: a novel therapeutic target in ovarian cancer[J]. Oncogene, 2017,36(29):4089-4099.

(收稿日期:2019-05-20; 修回日期:2019-06-25)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕锋)