DOI:10.12113/202006010

基于 TCGA 数据库分析甲状腺癌基因表达谱

赵国连[1],王冀邯[2],崔晓利[1]
(1. 西安市胸科医院 检验科,西安 710100 ;2. 西北工业大学 医学研究院, 西安 710072)

摘 要:为分析甲状腺癌基因表达谱,筛选疾病相关的基因标志物。基于肿瘤基因组图谱(TCGA)数据库中的甲状腺癌基因表达数据,运用 R/Bioconductor 统计平台进行数据处理与统计学分析。分别应用 edgeR 算法和 limma 算法选取肿瘤组织与对照组间倍数改变 > 2,$P < 0.05$ 的基因作为差异基因;进一步运用 Medcalc 统计软件进行受试者工作特征曲线(ROC)分析,鉴定出有诊断标志物潜在应用价值的基因标志物。通过两种运算方法筛选出甲状腺癌组织中存在着1 945个差异基因(上调基因1 033个,下调基因 912 个);根据差异倍数进一步鉴定出 11 个基因在肿瘤组织中表达上调,且对鉴别肿瘤组与对照组有较好的应用价值。本研究分析了 TCGA 中的甲状腺癌表达谱数据,鉴定出了与疾病诊断显著相关的差异表达基因,能够为探索疾病发生发展机制及寻找新型分子标志物提供依据。

关键词:甲状腺癌;肿瘤基因组图谱;差异表达基因;受试者工作特征曲线
中图分类号:Q344+.13 **文献标志码**:A **文章编号**:1672-5565(2021)04-249-05

Analysis of thyroid cancer gene expression profile based on TCGA database

ZHAO Guolian[1], WANG Jihan[2], CUI Xiaoli[1]
(1. *Department of Clinical Laboratory*, *Xi'an Chest Hospital*, *Xi'an* 710100, *China*;
2. *Institute of Medical Research*, *Northwestern Polytechnical University*, *Xi'an* 710072, *China*)

Abstract: To explore the gene expression profile and screen disease-related biomarkers of thyroid cancer (THCA), the R/Bioconductor statistical platform was used for data processing and statistical analysis based on the THCA gene expression data in the TCGA database. Genes with fold change (FC) >2, P <0.05 between tumor and control tissues were selected as differentially expressed genes (DEGs) based on both edgeR package and limma package in R/Bioconductor. Then, the Medcalc statistical software was used for receiver operating characteristic (ROC) curve analysis to identify genetic biomarkers with potential application value as diagnostic markers. By combining the results from the two algorithms, a total of 1 945 DEGs were obtained in the THCA tumors (1 033 up-regulated genes and 912 down-regulated genes). Further, 11 DEGs were identified up-regulated in the tumor tissues, which showed good application values for distinguishing the tumor group from the control group. This study analyzed the THCA expression profile data in TCGA and identified DEGs that are significantly related to disease diagnosis, which can provide basis for exploring the mechanism and novel molecular markers of THCA.

Keywords: Thyroid cancer; TCGA; DEGs; ROC

甲状腺癌(Thyroid cancer, THCA)是内分泌系中最常见的恶性肿瘤,易受饮食、遗传、环境等多种因素的影响[1]。近年来,中国的甲状腺癌的发病率呈上升趋势且女性高于男性[2]。基于甲状腺癌术前诊断率低且晚期患者预后差的特点,探索其发病机制并寻找新型分子标志物,对于早发现、早诊断、早治疗具有重要意义[3]。近年来,随着高通量测序技术及基因芯片技术的进步,其在生命科学领域的应用愈加广泛。利用生物信息学方法在庞大的基因数据库中筛选癌症诊断的生物标志物方法的有效性已经被大量的临床数据证实[4]。

目前已有学者[3]应用基因表达综合数据库

收稿日期:2020-06-28;**修回日期**:2020-08-26.
作者简介:赵国连,女,主管检验师,研究方向:分子生物学. E-mail:774567495@qq.com
*通信作者:崔晓利,女,副主任检验师,研究方向:微生物与分子生物学诊断 E-mail: 291824412@qq.com

(The gene expression omnibus, GEO)对甲状腺癌潜在的 miRNAs 生物学标志物及靶基因功能和信号通路进行分析。Choi 等通过肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)建立了一个 12 个基因预测模型(包括 *BCC*8, *CHI3L*1, *CLCNKA*, *FAM*155*B*, *GABRG*1, *LUM*, *MRO*, *MT*1*G*, *MT*1*H*, *SELV*, *SLC*4*A*4 和 *TMEM*92),用于预测甲状腺乳头状瘤(Papillary thyroid carcinoma, PTC)中的淋巴结转移[5]。此外,Lin 等人使用肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)中与免疫相关的 7 个基因建立预后预测模型(包括 *AGTR*1, *CTGF*, *FAM3B*, *IL*11, *IL*17*C*, *PTH2R* 和 *SPAG*11*A*)用于预测 PTC 预后情况[6]。因此,进一步探索公共数据库,将为寻找 THCA 发生发展的分子机制及挖掘疾病新型生物标志物提供依据。本研究整合了 TCGA 中的 THCA 基因表达数据,应用 edgeR 和 limma 两种算法对诊断甲状腺癌具有潜在应用价值的基因标志物做出预测,后续通过双聚类分析及 ROC 分析进一步验证预测基因的可靠性。通过生物信息学分析鉴定出了 11 个 THCA 的差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)及与疾病诊断相关的基因,以期为探索 THCA 发生发展的分子机制及挖掘疾病新型生物标志物提供依据[2,7]。

1 资料与方法

1.1 数据来源及数据处理

通过 UCSC xean 网站下载 TCGA 数据库中的甲状腺癌基因表达数据(https://gdc.xenahubs.net/download/TCGA-THCA.htseq_counts.tsv.gz),该数据为 Log2 标准化后的数据。该数据集包含了 510 例肿瘤样本和 58 例正常对照样本。

在 UCSC xean 网站下载 THCA 对应的 ID/Gene Mapping (https://gdc.xenahubs.net/download/gencode.v22.annotation.gene.probeMap),将基因 ID 与基因名称进行匹配,当有多个 ID 对应同一个基因名称时,求多个 ID 的平均表达值。

1.2 统计学分析

分别运用 R/Bioconductor 中的 edgeR 包[8]和 limma 包[9]对预处理过后的 THCA 数据提取差异表达基因。选取肿瘤与正常对照组间表达差异倍数(Fold change,FC)大于 2, $P < 0.05$ 的基因作为差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs),将两种算下的 DEGs 取交集。运用 R 中的 pheatmap 包对 DEGs 进行双聚类。运用 Medcalc19.0.4 统计软件分析,检验所筛选的 DEGs 在鉴别肿瘤样本和正常对照样本的应用效果,获取敏感性、特异性、曲线下面积等指标。

2 结果分析

2.1 THCA 中差异表达基因的筛选

首先选取肿瘤与正常对照组间倍数改变大于 2, $P < 0.05$ 的基因。其中,利用 edgeR 包得到差异基因共 2 768 个(上调 1 765 个,下调 1 003 个);利用 limma 包得到差异基因共 2 699 个(上调1 080个,下调 1 619 个)(见图 1)。将上述两种算法的结果求交集并去除表达趋势不一致的基因,最终得到差异基因共 1 945 个(上调 1 033 个,下调 912 个)。进一步分析显示,随着组间差异倍数增大,差异基因主要表现为在肿瘤组织中上调(见图 2)。

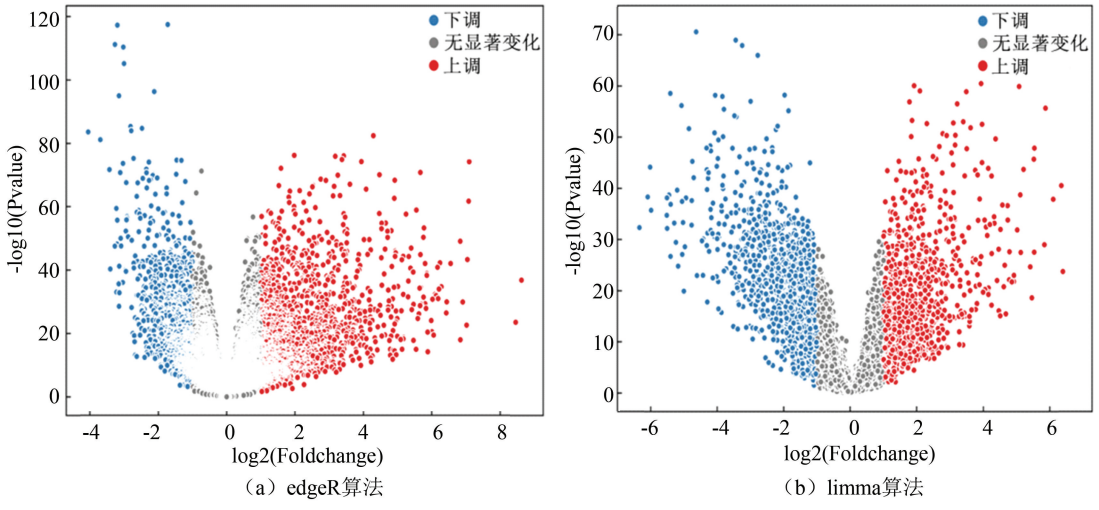


图 1 肿瘤组与正常对照组间 DEGs 火山图

Fig.1 Volcanic diagram of DEGs between tumor group and normal control group

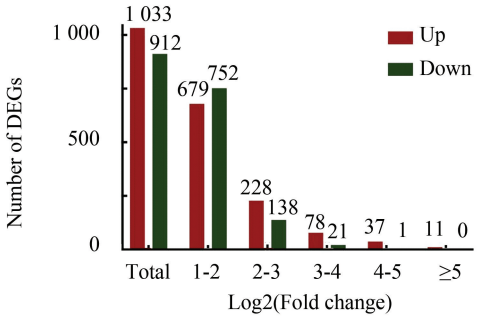


图 2　不同倍数改变的 DEGs 统计

Fig.2　DEGs statistics with different multiples

2.2　候选基因对 THCA 的诊断效能分析

分析显示,随着组间差异倍数的增大,肿瘤组织中 DEGs 绝大部分表现为上调的模式,我们进一步筛选出组间差异倍数在 32 倍(log2(FC)= 5)以上的 DEGs 进行后续分析。该 11 个差异基因在两种算法中的计算结果(见表 1)。对 11 个 DEGs 和样本进行双聚类分析,可以看出,基于组间的 DEGs 表达能够较好的将肿瘤样本和正常对照样本进行区分(见图 3)。

进一步对筛选出的 11 个候选差异基因进行显示,基于基因表达值鉴别肿瘤组与对照组的敏感性和特异性均在 70%以上,曲线下面积均大于 0.8(见图 4 及表 2)。提示上述基因可以较好地鉴别 THCA 肿瘤组和正常组。

表 1　筛选出的 DEGs 汇总

Table 1　Summary of screened DEGs

Gene	Log (FC)-edgeR 法	Log (FC)-limma 法	Up/down
GABRB2	7.095 748 74	6.619 178 34	up
HMGA2	5.549 372 00	5.536 493 55	up
LIPH	5.666 253 67	5.871 114 37	up
MUC21	6.127 748 76	5.530 603 96	up
PRR15	5.772 272 08	5.520 410 79	up
RXRG	5.250 164 41	5.210 834 49	up
SLC22A31	7.079 016 60	6.346 773 34	up
SLIT1	5.804 631 72	5.112 655 77	up
SYT12	6.552 239 88	5.837 992 68	up
SYTL5	5.755 124 36	5.020 747 86	up
ZCCHC12	6.832 698 40	6.103 885 91	up

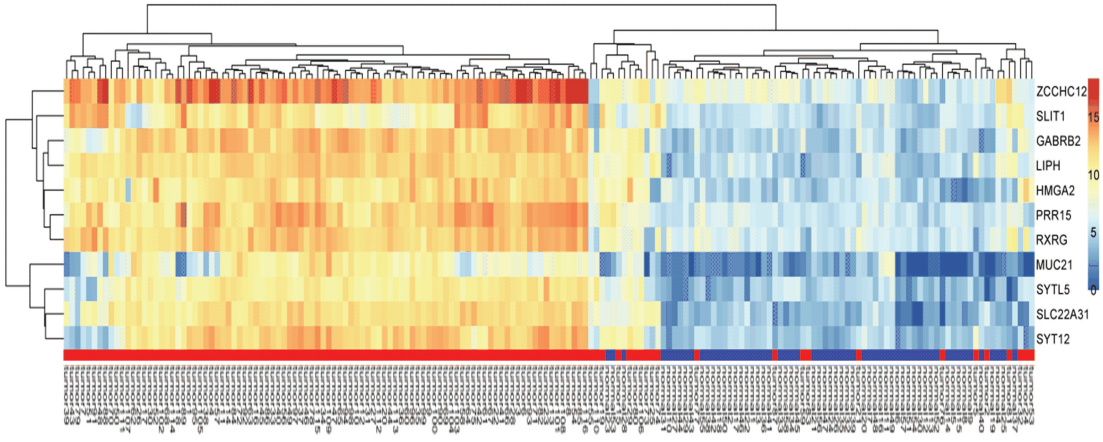
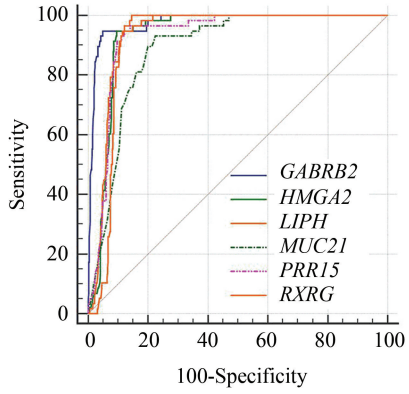


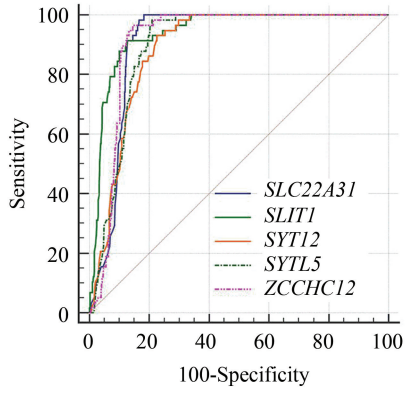
图 3　DEGs 和样本的双聚类分析

Fig.3　Biclustering analysis of DEGs and samples

注:横坐标为样本(红色代表癌症组,蓝色代表正常组),纵坐标为差异表达基因.



(a) *GABRB2*、*HMGA2*、*LIPH*、*MUC21*、*PRR15*和*RXRG*基因ROC曲线



(b) *SLC22A31*、*SLIT1*、*SYT12*、*SYTL5*和*ZCCHC12*基因ROC曲线

图 4　基于候选基因鉴别肿瘤样本与正常对照组的 ROC 曲线

Fig.4　ROC curves of tumor samples and normal control group based on candidate genes

表 2 基于候选基因鉴别肿瘤样本与正常对照组的应用效果

Table 2 Application effects of differentiating tumor samples from normal control group based on candidate genes

候选基因	敏感性/%	特异性/%	曲线下面积
GABRB2	94.83	95.10	0.976
HMGA2	94.83	90.39	0.933
LIPH	100.0	85.00	0.939
MUC21	93.10	77.65	0.887
PRR15	94.83	87.84	0.930
RXRG	94.83	88.43	0.917
SLC22A31	100.0	81.76	0.908
SLIT1	91.38	87.45	0.939
SYT12	93.10	77.45	0.889
SYTL5	98.28	79.02	0.898
ZCCHC12	96.55	85.49	0.915

注:表中 $P<0.001$.

3 讨 论

THCA 是内分泌系统常见的恶性肿瘤之一,寻找潜在的分子标志物对于临床与科研工作至关重要。TCGA 作为全球最大的癌症基因数据库,其大量且规范的样本及基因表达数据为研究探索 THCA 的发病机制及基因标志物提供了平台[10]。本文基于 TCGA 数据库中的 THCA 基因表达数据,对 edgeR 算法和 limma 算法的处理结果取交集并选择 fold change>2、$P<0.05$ 且差异表达变化趋势一致的基因为 DEGs,最终得到了 1 945 个 DEGs。且随着差异倍数的不断增大,肿瘤组织中 DEGs 主要表现为表达上调的改变模式。ROC 结果显示,11 个差异显著的 DEGs 在鉴别肿瘤与正常组具有较好的结果。预期由这 11 个表达差异的 DEGs 组合将为 TCGA 的诊断、预后及复发风险评估有一定的应用价值。

Jin Y 等人发现 *GABRB2* 基因在甲状腺肿瘤组织中过度表达,通过与正常组织为对照组的队列研究中显示 *GABRB2* 在 PCT 中过表达与淋巴结转移相关,体外实验表明 *GABRB2* 下调会显著抑制三种 PCT 细胞系的集落形成,迁徙和侵袭[11]。说明其有作为分子诊断标志物的潜力。HMGA2 是一种非组蛋白的转录因子,可影响包括细胞周期过程、DNA 损伤修复、细胞凋亡、衰老等生物学过程。Chiappetta G 等人通过免疫组织化学和定量 RT-PCR 分析,认为 *HMGA2* 表达与人类甲状腺肿瘤中的恶性表型相关[12]。Ivan Šamija 通过对细针穿刺甲状腺结节中 HMGA2 分析认为其可以作为区分恶性和良性甲状腺结节的辅助生物标志物[13]。MUC21 是一种从 TA3-Ha 细胞中鉴定出一种新型粘蛋白。它在甲状腺癌中通过 mRNA 水平和抗体结合被发现,但在相邻的正常上皮中却没有,这就进一步说明这种粘蛋白有用作甲状腺癌的组织或血清标志物[14]。SYT12 有相关研究证明,SYT12 在甲状腺癌中具有一定的预后意义,SYT12 可用于 PCT 患者的病情进展预测的过表达与癌症的转移有关。但 SYT12 子癌症中的分子生物学作用仍不清楚[15]。一些研究表明 *ZCCHC12* 基因与某些疾病有关,但 *ZCCHC12* 在甲状腺癌中的功能尚未确定。Wang O 的结论证明:*ZCCHC12* 的表达在甲状腺癌中显著上调,该基因过表达与淋巴结转移相关,说明该基因具有重要的生物学功能,并有作为甲状腺癌症中与转移相关的癌基因的潜在价值[16]。

Li YDENG 等研究发现,LIPH 在甲状腺癌组织中的高表达与淋巴结转移密切相关,其细胞功能实验表明,LIPH 与甲状腺癌细胞系的恶性行为呈正相关,这可以作为甲状腺癌诊断标志物的有力证据[17]。Jarzab B 在应用基因芯片方法对 23 例甲状腺癌患者基因表达谱分析中也明确 RXRG 的表达有显著升高,但是该基因在甲状腺癌发生发展中发挥具体作用的机制还未明确[18]。

除了以上 7 种预测基因在甲状腺癌中的相关报道,目前尚未有对于 *PRR15*、*SLC22A31*、*SLIT1* 和 *SYTL5 4* 种基因在甲状腺癌作用机制的报道,但是 *SYTL5* 和 *PRR15* 基因表达上调在其他癌症中的有多次报道。Wright PK 等人通过免疫组化显示 *SYTL5* 在正常乳腺导管上皮细胞、原位导管癌和浸润性乳腺癌细胞中表达[19]。Meunier D 等人研究表明 PRR15 在小鼠和人类胃肠道肿瘤中高表达,可能 APC 蛋白的缺失有关[20]。预测的 11 个基因中发现了 4 个以往没有报道与甲状腺癌相关的基因值得进一步研究,但是这些基因用于甲状腺癌诊断的可靠性还有待更加深入的机制研究。

综上,本研究通过分析 TCGA 甲状腺癌表达数据,鉴定出了与 THCA 发生发展相关的 11 种生物标志物,鉴于此,在今后的临床研究中可以以这些显著表达差异的基因作为药物治疗的靶向治疗点。本研究不足在于缺乏更深入的机制研究,首先转录组学的分析并不能完全代表机体总体变化,其次,由于缺乏体内或体外试验,该分子预测结果还需要进一步的临床样本验证。

4 结论

分析了 TCGA 中的甲状腺癌表达谱数据,鉴定出了与疾病诊断显著相关的 11 个差异表达基因,并通过双聚类分析及 ROC 分析进一步验证显示预测基因的可靠性,这将为探索甲状腺肿瘤发生发展机制及寻找新型分子标志物提供依据。

参考文献(References)

[1]董芬, 张彪, 单广良. 中国甲状腺癌的流行现状和影响因素[J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(1):47-52. DOI:10.3969/j.issn.1007-3969.2016.01.008.
DONG Fen, ZHANG Biao, SHAN Guangliang. Distribution and risk factors of thyroid cancer in China[J]. China Oncology,2016,26(1):47-52. DOI:10.3969/j.issn.1007-3969.2016.01.008.

[2]赵建英, 王玄, 李云慧, 等. 生物信息学方法筛选甲状腺癌潜在的 miRNAs 生物学标志物及靶基因功能和信号通路分析[J]. 解放军医药杂志, 2017,29(12):5-9 DOI:10.3969/j.issn.2095-140X.2017.12.002.
ZHAO Jianying, WANG Xuan, LI Yunhui, et al. Bioinformatics method in screening of potential miRNAs biological marker, target gene function and signal pathways in thyroid cancer[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People´s Liberation Army, 2017,29(12):5-9. DOI:10.3969/j.issn.2095-140X.2017.12.002.

[3]袁小艳, 梁韡, 张舒,等. 基于 GEO 甲状腺癌芯片数据的生物信息学分析[J]. 重庆医学, 2018,47(36):4619-4622+4627. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.36.014.
YUAN Xiaoyan, LIANG Wei, ZHANG Shu, et al. Bioinformatics analysis of thyroid cancer genome microarray based on GEO database[J]. Chongqing Medicine, 2018, 47(36):4619-4622+4627. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.36.014.

[4]邹小龙,董雪松,孙学溥.结肠癌中核内 miRNA 的激活调控作用研究[J].生物信息学, 2019,17(02),111-115. DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201903009.
ZOU Xiaolong, DONG Xuesong, SUN Xuepu. Activation regulation of nuclear miRNA regulation in colon cancer[J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2019,17(02),111-115 DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201903009.

[5]CHOI K Y, KIM J H, PARK I S, et al. Predictive gene signatures of nodal metastasis in papillary thyroid carcinoma [J]. Cancer Biomark,2018,22(1):35-42. DOI: 10.3233/CBM-170784.

[6]LIN P, GUO Y N, SHI L, et al. Development of a prognostic index based on an immunogenomic landscape analysis of papillary thyroid cancer[J]. Aging,2019,11(2):480-500. DOI: 10.18632/aging.101754.

[7]汤喜, 张成瑶, 周晓红,等. 甲状腺癌非编码 RNA 与 mRNA 差异表达谱及竞争性内源 RNA 调控网络分析[J]. 中国普通外科杂志, 2018,27(11):1409-1416 DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.11.007.
TANG Xi, ZHANG Chengyao, ZHOU Xiaohong, et al. Analysis of differential expression profiles of non-coding RNAs and mRNAs and competing endogenous RNA regulatory network in thyroid cancer[J]. Chinese Journal of General Surgery,2018,27(11):1409-1416. DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.11.007.

[8]ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1):139-140. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp616 .

[9]RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(7):e47. DOI:10.1093/nar/gkv007.

[10]CHATTERJEE A, STOCKWELL P A, RODGER E J, et al. scan_tcga tools for integrated epigenomic and transcriptomic analysis of tumor subgroups [J]. Epigenomics. 2016,8(10):1315-1330. DOI:10.2217/epi-2016-0063.

[11]JIN Y,JIN W, ZHENG Z, et al. GABRB2 plays an important role in the lymph node metastasis of papillary thyroid cancer[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2017,492(3):323-330. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.08.114.

[12]CHIAPPETTA G,FERRARO A, VUTTARIELLO E, et al. HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias [J]. European Journal of Cancer, 2008, 44(7):1015-1021. DOI:10.1016/j.ejca.2008.02.039.

[13]ŠAMIJA I, MATEŠA N, KOŽAJ S, et al. HMGA2 gene expression in fine-needle aspiration samples of thyroid nodules as a marker for preoperative diagnosis of thyroid cancer [J].Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2019, 27(6):471-476. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000637.

[14]KYOKO O, MIKA K S, YUICHI I, et al. Abstract #4188: Epiglycanin/MUC21 as a potential marker for thyroid carcinomas[J].Cancer Research,2009,69(9):18-22.

[15]JONKLAAS J,MURTHY S, LIU D, et al. Novel biomarker SYT12 may contribute to predicting papillary thyroid cancer outcomes[J]. Future Science OA, 2017, 4(1):FSO249. DOI:10.4155/fsoa-2017-0087 .

[16]WANG O, ZHENG Z, WANG Q, et al. ZCCHC12, a novel oncogene in papillary thyroid cancer[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology,2017,143(9):1679-1686. DOI:10.1007/s00432-017-2414-6.

[17]LI Y,ZHOU X, ZHANG Q, et al. Lipase member H is a downstream molecular target of hypoxia inducible factor-1α and promotes papillary thyroid carcinoma cell migration in BCPAP and KTC-1 cell lines[J]. Cancer Management and Research,2019,11:931-941. DOI:10.2147/CMAR.S183355.

[18]JARZAB B, WIENCH M, FUJAREWICZ K, et al. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications [J]. Cancer Research, 2005,65(4):1587-1597. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-3078.

[19]WRIGHT P K, MAY F E, DARBY S, et al. Estrogen regulates vesicle trafficking gene expression in EFF-3, EFM-19 and MCF-7 breast cancer cells[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2009,2(5):463-475. https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC2655148/.

[20]MEUNIER D, PATRA K, SMITS R, et al. Expression analysis of proline rich 15 (Prr15) in mouse and human gastrointestinal tumors[J]. Molecular Carcinogenesis, 2011, 50(1):8-15. DOI:10.1002/mc.20692.