

# 上皮细胞 - 间质细胞转化相关基因 FN1 在甲状腺癌的表达及对预后的预测意义

杨春伟<sup>1</sup>, 王晓涛<sup>2</sup>, 赵永魁<sup>2</sup>, 杨光华<sup>2</sup>, 刘春辉<sup>2</sup>, 曹文斌<sup>2</sup>, 魏韬<sup>3</sup>, 张国志<sup>2</sup>

1. 华北理工大学附属开滦总医院内分泌二科, 河北 唐山 063000;

2. 华北理工大学附属医院普通外科, 河北 唐山 063000; 3. 华北理工大学附属医院经管办, 河北 唐山 063000

**摘要:** **目的** 探究上皮细胞 - 间质细胞转化(EMT)对甲状腺癌发生的潜在机制,了解 EMT 相关基因在甲状腺癌组织表达情况并探讨其预后指导价值。**方法** 从 TCGA 数据库下载 568 份甲状腺癌转录组表达谱数据及 508 例患者临床资料,寻找转录组表达谱差异基因,并对差异基因进行功能富集分析。Western blot 分别检测华北理工大学附属医院 5 例患者手术切除的甲状腺癌组织和相应癌旁组织纤维连接蛋白 1(FN1)表达情况,以验证 FN1 差异表达;并检测上皮标志物 E-cadherin 表达水平,以了解甲状腺癌组织 EMT 水平。分析 EMT 相关基因 FN1、MMP11 和 GLT8D2 与差异基因相关性,并利用 EMT 相关基因构建 Cox 回归模型,预测 I ~ IV C 期甲状腺癌患者的预后。**结果** 差异基因分析结果显示共 1 136 个基因在肿瘤和正常组织中差异表达,这些基因 11.6% 富集于 EMT 通路;Western blot 检测 FN1 和 E-cadherin 结果显示,在甲状腺癌组织中 FN1 高表达,E-cadherin 低表达;相关性分析结果显示, FN1、MMP11 和 GLT8D2 与 1 136 个差异基因有较高相关性,尤其是 FN1 与 484 个基因皮尔森相关系数绝对值 > 0.5,最强正相关系数为 0.853,最强负相关系数为 -0.819;Cox 回归分析结果显示, FN1、MMP11 和 GLT8D2 联合对 I ~ IV C 期患者预后较高预测价值(AUC = 0.893)。**结论** 甲状腺癌组织存在 EMT, FN1 基因可能是甲状腺癌机制研究的重要分子。

**关键词:** 上皮细胞 - 间质细胞转化; 甲状腺癌; 纤维连接蛋白 1 基因; 癌症基因组图谱数据库; 预后

**中图分类号:** R 736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 8182(2020)05 - 0580 - 05

## Expression of EMT-related gene FN1 in thyroid carcinoma and its predictive significance for prognosis

YANG Chun-wei\*, WANG Xiao-tao, ZHAO Yong-kui, YANG Guang-hua, LIU Chun-hui,

CAO Wen-bin, WEI Tao, ZHANG Guo-zhi

\* Department of Endocrinology, Kailuan General Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China

Corresponding author: ZHANG Guo-zhi, E-mail: 13102606749@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the potential mechanism of epithelial-mesenchymal transition (EMT) on the occurrence of thyroid cancer, to understand the expression of EMT-related genes in thyroid cancer tissues, and to explore its prognostic value. **Methods** A total of 568 transcriptome expression profile data of thyroid cancer and 508 patients' clinical data were download from the TCGA database to find differential genes in the transcriptome group expression profile, and to analyze the functional enrichment of differential genes. Western blot was used to detect FN1 in thyroid cancer tissues and corresponding adjacent tissues from 5 patients to verify the differential expression of FN1. The expression level of epithelial marker E-cadherin was detected to understand the level of EMT in thyroid cancer tissues. The correlation between EMT-related genes FN1, MMP11, GLT8D2 and differential genes were analyzed, and a Cox model was constructed using EMT-related genes to predict the prognosis of patients with stage I to IV C thyroid cancer. **Results** Differential gene analysis showed that a total of 1 136 genes were differentially expressed in tumors and normal tissues. These genes were 11.6% enriched in the EMT pathway; Western blot showed that FN1 was highly expressed and E-cadherin was lowly expressed in thyroid cancer tissues. Correlation analysis showed that FN1, MMP11, GLT8D2 were highly correlated with 1 136 differential

genes, in particular, the absolute value of the Pearson correlation coefficient of FN1 and 484 genes was greater than 0.5, the strongest positive correlation coefficient was 0.853, and the strongest negative correlation coefficient was -0.819. The results of Cox regression analysis showed that the combination of FN1, MMP11 and GLT8D2 had a higher prognostic value for patients with stage I ~ IVc (AUC = 0.893). **Conclusions** EMT exists in thyroid cancer tissues, and FN1 gene may be an important molecule in the study of mechanism of thyroid cancer.

**Key words:** Epithelial-mesenchymal transformation; Thyroid cancer; Fibronectin 1 gene; The Cancer Genome Atlas database; Prognosis

**Fund program:** Promotional Topics of the National Health and Family Planning Commission of Hebei Province (20150523)

甲状腺癌在全世界的发病率正在迅速增加,甲状腺癌占内分泌恶性肿瘤的 90%,约占人类恶性肿瘤的 1%,虽然大多数甲状腺癌可以通过手术、放射性碘和/或化疗治愈<sup>[1]</sup>,但仍存在很高的复发风险,增加致死率<sup>[2-3]</sup>。滤泡性和未分化甲状腺癌预后普遍较差,尤其未分化甲状腺癌更具侵袭性<sup>[4]</sup>,故寻找甲状腺癌患者潜在预后标志物来优化长期健康结果至关重要<sup>[5]</sup>。

目前已知甲状腺癌预后影响因素包括年龄、肿瘤大小、多灶性疾病、甲状腺外浸润和远处转移<sup>[5]</sup>,然后甲状腺癌与上皮细胞-间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的关系是近年来甲状腺肿瘤进展和转移研究热点。EMT 是指细胞失去其典型的上皮特性,而获得间质细胞特性的一系列形态变化过程<sup>[6]</sup>。研究表明,EMT 与肿瘤发生、浸润及转移有密切的关系<sup>[7-8]</sup>。本研究基于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库,致力于探讨 EMT 在甲状腺癌发生发展所扮演角色,旨在为提高甲状腺癌患者 5 年生存率和无病生存时间提供新的方向。同时,虽然对甲状腺癌发生分子机制已有较深入的了解,但甲状腺癌患者预后仍然难以预测,故除已知分子外,还需要积极寻找新的肿瘤生物标志物<sup>[5]</sup>。鉴于 EMT 与甲状腺癌之间存在千丝万缕联系,为构建 EMT 相关基因纤维连接蛋白 1(FN1)、基质金属蛋白酶(MMP)11 和糖基转移酶(GLT8D2)等基因的 Cox 模型预测甲状腺癌患者预后提供可能性。

## 1 资料与方法

**1.1 数据库及软件** 本研究转录组表达谱数据和患者临床信息来源于 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>),使用 R 3.6.0 软件经“TCGAbiolinks”包下载 TCGA 甲状腺癌转录组表达谱 HTSeq-counts 数据,共 568 份芯片数据和 508 例甲状腺癌患者临床资料。设立芯片数据纳入标准:样本来源需为新鲜组织、液氮或 -80 °C 冷冻保存的组织。Ensembl ID 注解信息来源与 Ensembl 数据库(Ensem-

bl genome browser 98, 完成 <http://asia.ensembl.org/index.html>), 功能富集分析通过 FunRich 3.1.3 软件。

**1.2 样本收集** 本研究样本来源于华北理工大学附属医院 2018 年 12 月 1 日至 2019 年 6 月 1 日就诊的乳头状甲状腺癌患者,共 5 例。收集手术切除的甲状腺癌组织及相应距癌灶边缘 5 cm 的癌旁正常组织,两种组织均无明显坏死。组织收集 30 min 内完成,并置于液氮罐内冷冻保存。5 位患者中男性 2 例,女性 3 例,年龄(46.36 ± 5.26)岁,术前均未接受放射治疗或化学治疗。

**1.3 Western blot 检测** 提取液氮保存组织蛋白,并使用 BCA 法定量蛋白含量,配制上样缓冲液,行电泳分离 FN1 蛋白及上皮标记物 E-cadherin。随后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,用 10% 脱脂牛奶封闭 1 h,加 FN1(北京傲锐东源生物科技,浓度:1.16 mg/ml)、E-cadherin(上海钰博生物科技,浓度:1 mg/ml)抗体,4 °C 冰箱过夜。隔夜取出滴加二抗,37 °C 恒温孵育 30 min。TBST 洗涤后用显影液显影,曝光保存图片。实验使用的内参为 β-actin,应用 Quantity One 分析软件对蛋白条带进行灰度扫描。

**1.4 统计学方法** 本研究使用 R 3.6.0 下载芯片数据及差异基因分析,并使用 R 3.6.0 cor 函数计算 EMT 相关基因 FN1、MMP11 和 GLT8D2 与 1 136 个差异基因相关性,并分别输出 Pearson 相关系数;通过 rms 包构建 Cox 模型,并使用 ROC 包绘制 ROC 曲线,并计算曲线下面积(AUC)值。

## 2 结果

**2.1 差异基因** 转录组表达谱数据均来源于 TCGA 数据库,共 568 个样本,排除 2 个福尔马林浸泡-石蜡包埋正常甲状腺组织及 5 个甲状腺癌组织。共纳入 561 样本,其中正常甲状腺组织 56 例,甲状腺癌组织 505 例。HTSeq-counts 数据经过 EdgR 包预处理,差异倍数(FC)采取 log<sub>2</sub> 处理,差异基因标准为 log<sub>2</sub>FC 值 > 2 或 < -2,且 P 值 < 0.01,共找到 1 136 个差异

基因。FN1 是一种蛋白编码基因,编码一种纤维连接蛋白,并参与细胞粘附和迁移过程,包括胚胎发生、伤口愈合、血液凝固、宿主防御和转移等生物过程。差异基因分析结果显示, FN1 在甲状腺癌组织中高表达,  $\log_2FC = 4.44$  (图 1a)。Western blot 结果显示, 手术所取患者样本中, 5 份甲状腺癌组织 FN1 相对表达量为  $0.073 \pm 0.012$ , 对应癌旁正常组织 FN1 相对表达量为  $0.473 \pm 0.023$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 1b)。

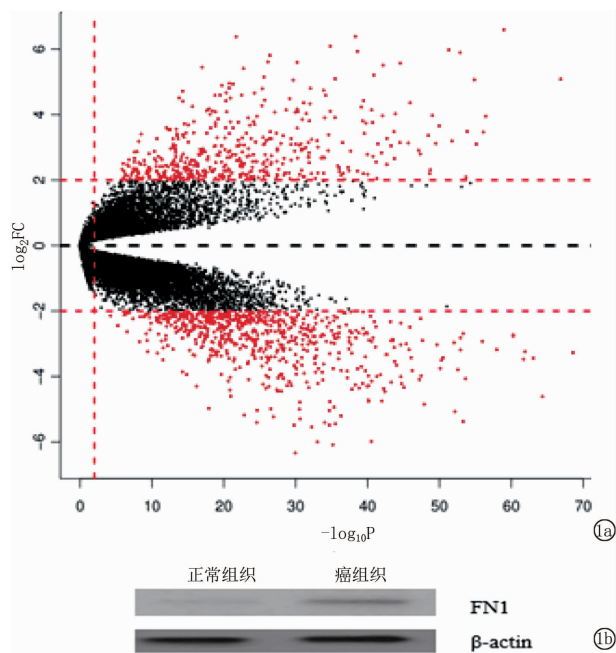
**2.2 功能富集分析及相关基因检测** 功能富集结果显示, 11.6% 的差异基因富集到 EMT 通路 ( $P < 0.01$ )。见图 2a。与正常组织相比, EMT 相关基因 FN1 基因在甲状腺癌组织中高表达, 而 MMP11 和 GLT8D2 则表现出与 FN1 相反的表达模式, 在癌组织低表达。见图 2b。

**2.3 相关性分析** 为确定 EMT 相关基因 FN1、MMP11 和 GLT8D2 对甲状腺癌发生的作用, 分别计算 FN1、MMP11 和 GLT8D2 与 1 136 个差异基因相关性, 并绘制聚类相关系数图。结果显示, FN1 与 484 个差异基因相关性绝对值大于 0.5, 其中 STAC、ST6GALNAC5 和 SLC25A47P1 显著正相关, 相关系数为  $0.853 (P < 0.01)$ 、 $0.851 (P < 0.01)$  和  $0.851 (P < 0.01)$ ; FN1 与 TDH 显著负相关, 皮尔森相关系数为  $-0.819 (P < 0.01)$ 。MMP11 与 164 个差异基因的皮尔森相关系数绝对值大于 0.5, GLT8D2 与差异基因相关性较弱, 最大皮尔森相关系数为 0.513。见图 3。

**2.4 EMT 标志物检测** 以 E-cadherin 表达水平反映

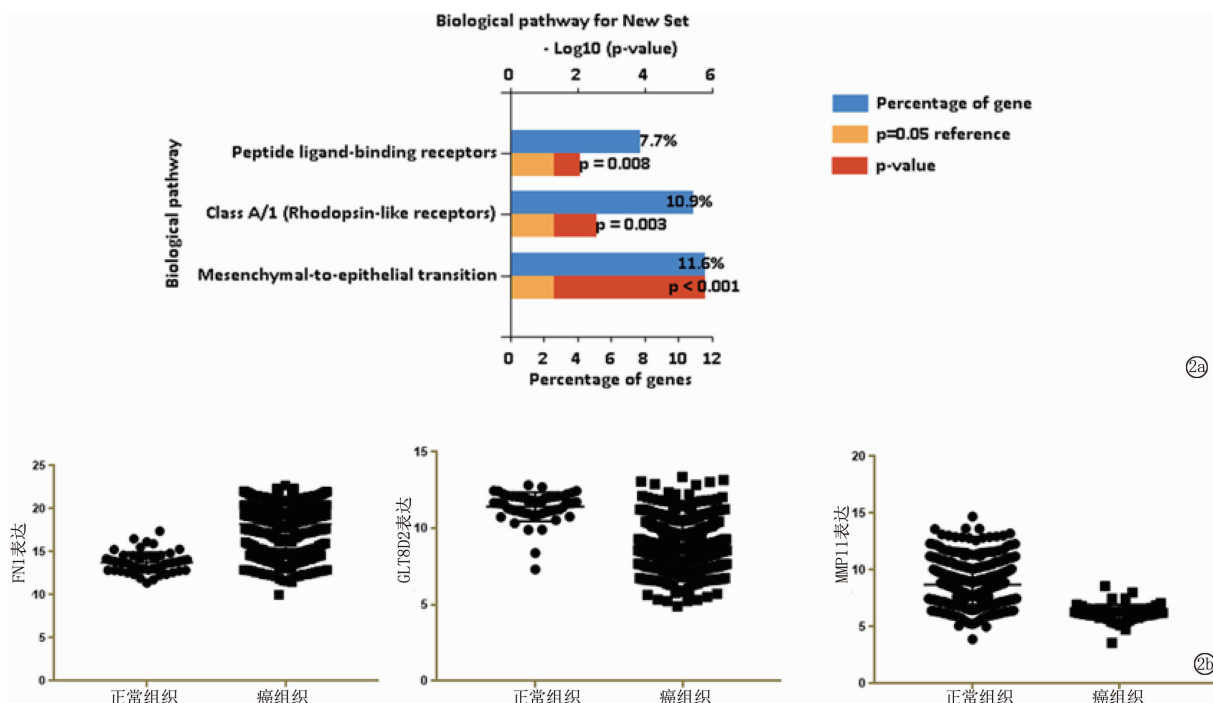
EMT 水平, 对手术所取患者样本行 Western blot 示, E-cadherin 在甲状腺癌组织 ( $0.523 \pm 0.037$ ) 中表达低于正常组织 ( $0.847 \pm 0.034, P = 0.001$ )。见图 4。

**2.5 生存分析** 从 TCGA 数据库下载的 508 例甲状腺癌患者临床资料。鉴于 EMT 在甲状腺癌中扮演重要角色, EMT 相关基因 FN1 差异基因网络异常活跃, 居中心地位, 故用 FN1 表达值建立 Cox 模型预测甲状腺癌患者预后。单独纳入 FN1 基因表达值建立



注: 1a: 差异基因火山图; 1b: Western blot 检测手术所取患者标本正常组织和肿瘤组织 FN1 表达。

图 1 差异基因火山图及 FN1 表达电泳图



注: 2a: 差异基因通路富集分析; 2b: FN1、MMP11 和 GTL8D2 表达。

图 2 差异基因通路富集分析结果及 FN1、MMP11 和 GTL8D2 表达

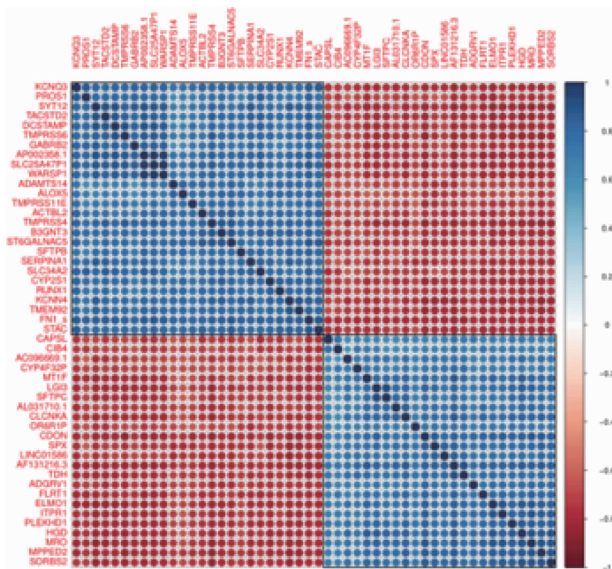


图 3 FN1 与差异基因聚类相关系数图

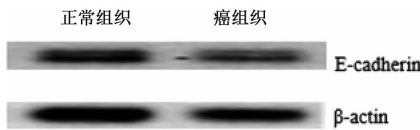


图 4 手术所取患者标本 EMT 标志物表达电泳图

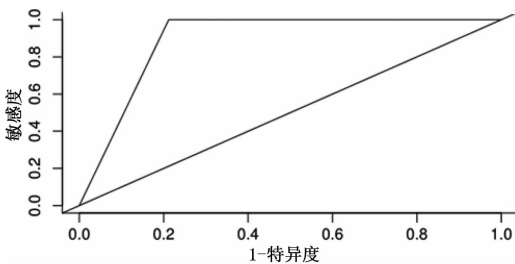


图 5 FN1、MMP11 和 GLT8D2 联合预测 I ~ IVc 期甲状腺癌预后的 ROC 曲线

Cox 回归模型,通过 ROC 曲线下面积评价模型效能,结果显示  $AUC = 0.811$ 。同时纳入 FN1、MMP11 和 GLT8D2 再次建立 Cox 回归模型,  $AUC = 0.893$ , ROC 曲线如图 5 所示。提示 FN1、MMP11 和 GLT8D2 联合能有效预测 I ~ IVc 期甲状腺癌患者预后,为临床提供准确度较高的预后信息。

### 3 讨论

EMT 是上皮细胞向间充质细胞转化的过程。发生 EMT 的细胞具有典型的形态学改变,包括细胞间连接减少、细胞极性丧失、细胞骨架重组和细胞活力增强<sup>[9-10]</sup>。共 3 种 EMT 类型,即 1 型、2 型和 3 型 EMT,不同类型 EMT 将导致不同效应。1 型 EMT 发生在胚胎形成阶段,与胚胎生长发育有关<sup>[11]</sup>; 2 型 EMT 与伤口愈合、组织再生和器官纤维化有关; 3 型 EMT 与肿瘤侵袭和转移有关,发生于上皮肿瘤细胞,常提示肿瘤预后较差<sup>[12]</sup>。之所以 EMT 与肿瘤差预

后相关,是因为 EMT 允许癌细胞获得移动性、侵袭性和干细胞样特性。相反,EMT 是促进癌细胞再分化和转移定植的重要因素<sup>[13]</sup>。

Mak 等<sup>[14]</sup>通过四种已知 EMT 标记物,即 CDH1 (上皮细胞标记物)、CDH2 (间质细胞标记物)、VIM (间质细胞标志物)和 FN1 (间质细胞标志物),在 TCGA 泛癌 RNAseq 数据中找到 77 个泛癌 EMT 基因集合。该 EMT 集合为 EMT 研究者提供了一种新颖的、基于患者且组织学相关工具,也为本研究提供了新甲状腺癌机制思路。笔者通过差异基因分析得到 1 136 个差异基因,并将它们与 Mak 等<sup>[14]</sup>研究进行匹配,最终挑选出表达差异最显著的 3 个 EMT 相关基因,即 FN1、MMP11 和 GLT8D2。假设 EMT 及 EMT 相关基因是甲状腺癌发生的潜在分子机制。为证明该假设将 1 136 个基因进行功能富集分析,发现 11.6% 基因富集于 EMT 通路,初步证明该假设的合理性。

本研究进一步通过 Western blot 检测甲状腺癌组织 EMT 标志物 E-cadherin,以 E-cadherin 表达水平反映 EMT 水平。E-cadherin 功能丧失是 EMT 的主要特征<sup>[15]</sup>。结果显示,E-cadherin 在取自手术患者的甲状腺癌组织中低表达。E-cadherin 表达特征与上述结果一致,提示甲状腺癌组织存在明显 EMT 现象,故明确 EMT 对甲状腺癌的潜在机制,或可为甲状腺癌的治疗,延长患者 5 年生存率和无病生存时间提供新思路。

此外,尹璐等<sup>[16]</sup>探讨了 FN1 在甲状腺癌中表达水平,并分析 FN1 表达值与甲状腺癌患者临床病理特征的相关性,结果显示 FN1 与甲状腺癌组织类型和淋巴结转移等特征显著相关,但该研究并未深入分析 FN1 基因本身对甲状腺癌机制的影响。本研究从 EMT 出发,探讨 FN1 作为 EMT 相关基因在差异表达基因中的地位,并联合 FN1、MMP11 和 GLT8D2 预测甲状腺癌患者预后。本研究与 TCGA 数据库芯片数据分析结果一致, FN1 在肿瘤组织中高表达状态,提示甲状腺癌可能存在活跃的 EMT。

本研究发现 FN1 基因处于 1 136 个差异表达基因网络的中心位置, FN1 与 484 个差异基因皮尔森相关系数绝对值均大于 0.5。FN1 是一种蛋白质编码基因,编码纤维连接蛋白 1,与多种疾病相关,如纤维连接蛋白沉积物 2 肾小球病<sup>[17-18]</sup>。以往分析结果显示, FN1 主要具有蛋白结合<sup>[19]</sup>、整合素结合<sup>[20]</sup>功能,参与细胞外基质结构组成<sup>[21]</sup>,这些特征与 FN1 具备的细胞黏附和迁移生物学属性一致。综上所述,甲状腺癌组织存在 FN1, FN1 基因可能是甲状腺癌机制研究的重要分子。

## 参考文献

- [1] Wang SS, Wu JK, Ren JW, et al. MicroRNA-125b interacts with Foxp3 to induce autophagy in thyroid cancer[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(9):2295-2303.
- [2] Lang Brian HH, Lo CY, Chan WF, et al. Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinoma; their implications for cancer staging[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(2):730-738.
- [3] Lang BH, Lo CY, Wong KP, et al. Should an involved but functioning recurrent laryngeal nerve be shaved or resected in a locally advanced papillary thyroid carcinoma? [J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(9):2951-2957.
- [4] Huk DJ, Ashtekar A, Magner A, et al. Deletion of Rap1b, but not Rap1a or Epac1, reduces protein kinase A-mediated thyroid cancer [J]. *Thyroid*, 2018, 28(9):1153-1161.
- [5] Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer; the american thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2016, 26(1):1-133.
- [6] Pasquier J, Abu-Kaoud N, Al Thani H, et al. Epithelial to mesenchymal transition in a clinical perspective [J]. *J Oncol*, 2015, 2015:792182.
- [7] 李真. TGF- $\beta$  与 EMT 介导的肿瘤转移的关系[J]. *医药论坛杂志*, 2013, 34(7):145-146.
- [8] 刘畅. 肌醇六磷酸对结直肠癌大鼠肿瘤转移过程中 EMT 和 MMPs 的影响[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [9] Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation[J]. *Acta Anat (Basel)*, 1995, 154(1):8-20.
- [10] Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells[J]. *Science*, 2013, 342(6159):1234850.
- [11] Vićovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation[J]. *Acta Anat (Basel)*, 1996, 156(3):202-216.
- [12] Chen SC, Liao TT, Yang MH. Emerging roles of epithelial-mesenchymal transition in hematological malignancies [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1):37.
- [13] Bonnomet A, Syne L, Brysse A, et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer [J]. *Oncogene*, 2012, 31(33):3741-3753.
- [14] Mak MP, Tong P, Diao LX, et al. A patient-derived, Pan-cancer EMT signature identifies global molecular alterations and immune target enrichment following epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3):609-620.
- [15] Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, et al. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2 [J]. *Oncogene*, 2007, 26(5):711-724.
- [16] 尹璐, 杜宁彬, 肖迎聪, 等. 基于 TCGA 数据库探讨 fibronectin 1 在甲状腺癌中的表达及临床意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(13):2281-2287.
- [17] Ohtsubo H, Okada T, Nozu K, et al. Identification of mutations in FN1 leading to glomerulopathy with fibronectin deposits [J]. *Pediatr Nephrol*, 2016, 31(9):1459-1467.
- [18] Dos Reis Monteiro MLG, Custódio FB, de Menezes Neves PDM, et al. A novel single amino acid deletion impairs fibronectin function and causes familial glomerulopathy with fibronectin deposits; case report of a family [J]. *BMC Nephrol*, 2019, 20(1):322.
- [19] Balbona K, Tran H, Godyna S, et al. Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(28):20120-20125.
- [20] Twal WO, Czirok A, Hegedus B, et al. Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 24):4587-4598.
- [21] Didangelos A, Yin XK, Mandal K, et al. Proteomics characterization of extracellular space components in the human aorta [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(9):2048-2062.

收稿日期:2019-11-15 修回日期:2019-12-11 编辑:王娜娜