

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2024.01.004

基于 TCGA 数据分析 TRIM45 基因在乳腺癌中的表达特征及生物学功能

武永霞¹ 姜良乾² 朱峰³

(¹ 临沂市人民医院产科, 临沂 276000; ² 临沂市人民医院检验科, 临沂 276000; ³ 济宁医学院生物科学学院, 日照 276826)

摘要 目的 基于 GDC TCGA Breast Cancer (BRCA) 的数据, 评估 TRIM45 (Tripartite Motif Family 45) 在乳腺癌中的表达、预后价值及其与临床病理的相关性, 揭示 TRIM45 在乳腺癌中的生物学功能及可能的作用机制。**方法** 采用 R 软件对 GDC TCGA Breast Cancer (BRCA) 数据进行生信分析, 研究 TRIM45 在乳腺癌中的表达及其与临床病理的关系。采用 Kaplan-Meier 法评估 TRIM45 对乳腺癌预后的影响。应用 KEGG 基因集进行 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 基因富集分析, 采用 Spearman 相关性分析筛选 TRIM45 相关作用基因。**结果** TRIM45 在乳腺癌临床样本中的表达高于癌旁组织 ($P < 0.001$); Kaplan-Meier 生存分析显示 TRIM45 高表达患者的总生存期高于 TRIM45 低表达者 ($P < 0.05$); TRIM45 在乳腺癌中的表达与 T 分期、TNM 分期、分子分型及病理类型相关联 ($P < 0.05$); GSEA 富集分析结果显示 TRIM45 在 KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER 信号通路中发挥重要的生物学作用, Spearman 相关性分析筛选出 TRIM45 与 STK36、IKBKB、GLI3 具有正相关关系 ($P < 0.001$), 与 HIF1A 具有负相关关系 ($P < 0.001$)。 **结论** TRIM45 在乳腺癌中的表达与 T 分期、TNM 分期、分子分型及病理类型相关联; TRIM45 可能通过调控 STK36、IKBKB、GLI3 和 HIF1A 在乳腺癌发生发展中发挥重要作用。

关键词 TRIM45; 乳腺癌; 癌症基因组图谱; 生物信息学分析

中图分类号: R730 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2024)02-015-05

Analysis of the expression characteristics and biological function of TRIM45 gene in breast cancer based on TCGA

WU Yongxia¹, JIANG Liangqian², ZHU Feng³

(¹ Obstetrics, Linyi People's Hospital, Linyi 276000, China;

² Clinical Laboratory, Linyi People's Hospital, Linyi 276000, China;

³ School of Biology, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective Based on the data of GDC TCGA Breast Cancer (BRCA), to evaluate the expression, prognostic value and clinical pathology correlation of TRIM45 in breast cancer, revealing the biological function of TRIM45 in breast cancer and its possible mechanism. **Method** Bioinformatics analysis of GDC TCGA Breast Cancer (BRCA) data was performed using R software to study the expression of TRIM45 in breast cancer and its correlation with clinical pathology; the Kaplan-Meier method was used to evaluate the effect of TRIM45 on the prognosis of breast cancer; the KEGG gene set was used for GSEA gene enrichment analysis; Spearman correlation analysis was used to screen TRIM45-related genes. **Results** The expression of TRIM45 in breast cancer was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.001$); Kaplan-Meier survival analysis showed that the overall survival of patients with high TRIM45 expression were higher than those of patients with low TRIM45 expression ($P < 0.05$); the expression of TRIM45 in breast cancer is related to T stage, TNM stage, molecular type and pathological type ($P < 0.05$); GSEA enrichment analysis showed that TRIM45 plays

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(2019WS123); 山东省自然科学基金(ZR2020QH189); 济宁医学院科研扶持基金(JYFC2019KJ006)

[通信作者] 姜良乾, E-mail: jiang8014@163.com; 朱峰, E-mail: sedolphin@163.com

an important biological role in the KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER signaling pathway; Spearman correlation analysis screened out that TRIM45 was positively correlated with STK36, IKBKB and GLI3 ($P < 0.001$), and negatively correlated with HIF1A ($P < 0.001$). **Conclusion** The expression of TRIM45 in breast cancer is related to T stage, TNM stage, molecular typing and pathological type. TRIM45 may play an important role in the occurrence and development of breast cancer by regulating STK36, IKBKB, GLI3 and HIF1A.

Keywords: TRIM45; Breast cancer; The Cancer Genome Atlas; Bioinformatics analysis

乳腺癌是严重威胁女性生命健康的一种疾病, 2021 年美国女性癌症发病首位为乳腺癌, 年发病人数约为 28.15 万, 占女性癌症新发病例的 30%; 女性癌症死因乳腺癌排第二位, 年死亡人数约为 4.36 万, 占女性癌症死亡病例的 15%^[1]。因此, 寻找能够诊断乳腺癌的肿瘤标志物迫在眉睫。目前, 三模体家族 45 (Tripartite Motif Family 45, TRIM45) 在乳腺癌中研究较少, 通过 GDC TCGA Breast Cancer (BRCA) 数据库筛选发现 TRIM45 表达显著上调。TRIM45, 一种具有 RING-finger 结构域的 E3 泛素连接酶, 是 TRIM 家族的一员, 在细胞增殖、分化、凋亡和肿瘤发生发展等多种细胞功能中发挥重要作用^[2-6]。TRIM45 可通过抑制 AP-1 和 ELK-1 转录活性从而负调控 MAPK 信号传导途径^[2]; 同时, TRIM45 是一种新型的 RACK1 相互作用蛋白, 能够抑制 RACK1/PKC 复合物的形成而下调 MAPK 信号转导^[3]; 此外, TRIM45 可以负调节 NF- κ B 通路并抑制癌细胞增殖^[4]; 并且 TRIM45 与 p53 相互作用, 通过促进 p53 的 K63 连接的多聚泛素化, 能够稳定 p53, 从而抑制了 p53 的泛素化降解^[5]。研究表明 TRIM45 是一种重要的抗肿瘤分子。因此, 本研究主要以单基因 TRIM45 为研究对象, 通过 GDC TCGA Breast Cancer (BRCA) 数据挖掘, 利用生物信息学方法分析 TRIM45 在乳腺癌中的表达、临床病理相关性及生存预后分析, 使用 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 基因富集分析 TRIM45 参与乳腺癌调控的信号通路, 揭示其调控乳腺癌发生发展的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 乳腺癌基因芯片表达数据及临床数据的收集和整理

乳腺癌患者的临床资料和 RNA-Seq 数据来自 GDC TCGA Breast Cancer (BRCA) (<https://xenabrowser.net>)。其中, 下载 1104 例乳腺癌组织样本和 113 例癌旁样本及配对样本 (乳腺癌临床样

本 113 例、癌旁样本 113 例) 的临床信息和 RNA-Seq 数据, 所有样本的 RNA-Seq 数据均已在 R 软件 (V. 3.6.0) 中使用 BioConductor 包进行处理和归一化。

1.2 TRIM45 在乳腺癌中的表达差异及其与临床病理特征的关系

采用 R 软件 (V. 3.6.0) 对 GDC TCGA Breast Cancer (BRCA) 数据进行处理, 使用 edgeR 包对 RNA-Seq 数据作差异分析, 计算 TRIM45 在乳腺癌组织 (1104 例) 和癌旁组织 (113 例)、乳腺癌组织和与其相匹配的癌旁组织 (113 例) 的差异表达。使用 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>)^[7] 分析 TRIM45 在乳腺癌中的表达及其与临床病理类型的关系。

1.3 乳腺癌组织 TRIM45 表达水平与乳腺癌预后的关系

按 TRIM45 在乳腺癌临床样本中的表达均值 (FPKM 平均值为 2.0341) 进行分组, 低于均值为低表达组, 高于均值为高表达组。分析 TRIM45 表达水平与 Overall Survival 的关系。

1.4 基因集富集分析

使用 KEGG 基因集 [c2.cp.kegg.v7.5.1.symbols.gmt] 进行 GSEA 富集分析, 评估 TRIM45 可能参与乳腺癌调控的信号通路。按 TRIM45 在乳腺癌临床样本中的表达中位数 (FPKM 中位数为 1.9665), 将乳腺癌临床样本分为高、低两组。在分析过程中, TRIM45 的表达被认为是高、低两组表型, 根据 NES (标准化富集分数)、NOM p-val (标准化显著性水平) 和 FDR q-val (矫正多重假设检验) 对每种表型的富集途径进行分类, NES 绝对值 > 1.0, NOM p-val < 0.01, FDR q-val < 0.05 确认为有意义的基因集合。

1.5 统计学方法

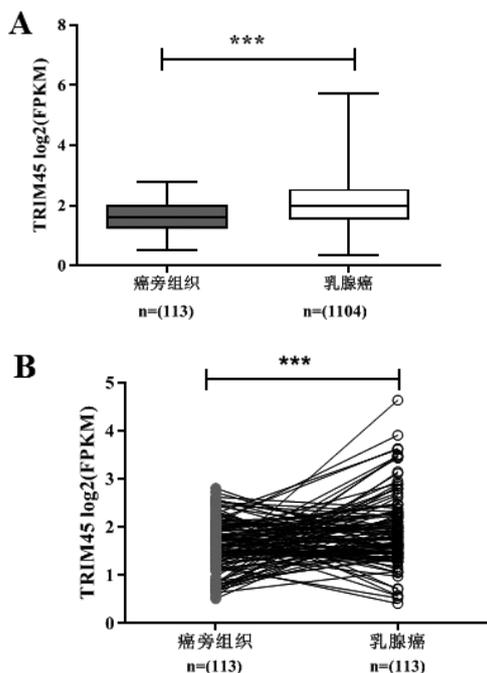
所有统计分析均使用 R (V. 3.6.0) 软件。两组独立样本数据的比较使用 Student's *t*-test 检验, 多组数据间的比较使用秩和检验。采用卡方检验

分析 TRIM45 表达与临床病理特征的关系,使用 Kaplan-Meier 法作生存分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。两基因间相关性分析使用 Spearman 相关性分析, $P < 0.05$ 并且 r 绝对值 > 0.3 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌和正常乳腺组织 TRIM45 差异表达

基于 TCGA 数据分析,在非配对乳腺癌样本与癌旁样本中的差异表达分析显示,TRIM45 在乳腺癌中的表达高于癌旁组织 ($P < 0.001$) (图 1A)。在配对乳腺癌样本与癌旁样本中的差异表达分析显示,TRIM45 在乳腺癌中的表达高于癌旁组织 ($P < 0.001$) (图 1B)。



注:A. TRIM45 在乳腺癌组织与癌旁组织中的表达分析;B. TRIM45 在乳腺癌组织及其匹配的癌旁组织中的表达分析。*** $P < 0.001$ 。

图 1 TRIM45 在乳腺癌中的表达分析

2.2 TRIM45 与乳腺癌患者总生存期的关联性

TRIM45 高表达的患者总生存期优于 TRIM45 低表达的患者 ($P = 0.0021$)。见图 2。

2.3 乳腺癌组织 TRIM45 表达及其临床病理关联性

通过对 1104 例乳腺癌临床数据进行筛选,保留 TCGA 数据集中包含临床参数和生存资料的病例,最后得到含有完整临床病理参数和生存资料的病例 825 例,其中 TRIM45 低表达 422 例,TRIM45 高表达 403 例。

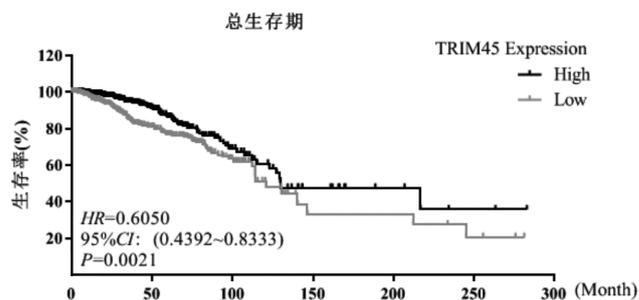


图 2 TRIM45 在乳腺癌中的总生存期分析

TRIM45 mRNA 表达水平与乳腺癌患者分子分型、T 分期、TNM 分期以及病理类型存在显著关联 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 TRIM45 表达与乳腺癌临床病理关联性分析

参数	例数	TRIM45 表达水平		χ^2	P
		低表达	高表达		
年龄/岁					
<60	366	177	189	2.051	0.152
≥ 60	459	245	214		
分子分型					
Luminal A	409	151	258	98.66	<0.001
Luminal B	171	83	88		
HER2-enriched	65	53	12		
Basal-like	150	113	37		
Normal-like	30	22	8		
T 分期					
T1	213	92	121	13.32	0.004
T2	491	263	228		
T3	90	44	46		
T4	31	23	8		
N 分期					
N0	416	205	211	2.294	0.514
N1	269	139	130		
N2	97	56	41		
N3	43	22	21		
M 分期					
M0	809	413	396	0.1897	0.680
M1	16	9	7		
TNM 分期					
I	146	57	89	11.11	0.011
II	489	258	231		
III	176	99	77		
IV	14	8	6		
病理类型					
浸润性小叶癌	119	37	82	22.93	<0.001
浸润性导管癌	627	345	282		
其他	79	40	39		

注:根据 TCGA 临床信息,乳腺癌分子分析包括 Luminal A、Luminal B、HER2-enriched (HER2 富集)、Basal-like (基底样) 和 Normal-like (正常乳腺样)。

2.4 TRIM45 功能基因富集分析

GSEA 富集分析发现 TRIM45 在 KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER 信号通路中发挥重要作用(NES = -1.81, NOM p-val = 0.002, FDR q-val = 0.023),同时 KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER 信号通路在乳腺癌中发挥重要作用。见图 3。

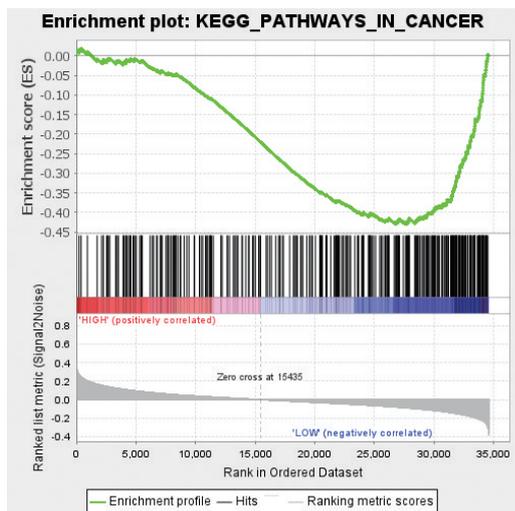
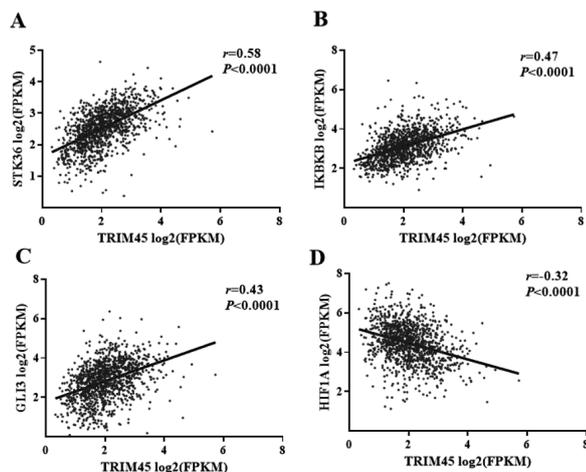


图 3 GSEA 信号通路富集分析

2.5 TRIM45 在 KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER 信号通路中共表达基因筛选

通过相关性分析可以发现 TRIM45 与 KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER 信号通路中多种基因存在相关关系,其中 STK36、IKBKB、GLI3 与 TRIM45 具有正相关关系(图 4A~4C),HIF1A 与 TRIM45 具有负相关关系(图 4D)。



注:A. TRIM45 与 STK36 的相关性分析;B. TRIM45 与 IKBKB 的相关性分析;C. TRIM45 与 GLI3 的相关性分析;D. TRIM45 与 HIF1A 的相关性分析

图 4 TRIM45 表达与 KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER 信号通路共表达基因筛选

3 讨论

TRIM45 是一种具有 RING-finger 结构域的 E3 泛素连接酶,在细胞增殖、分化、凋亡和肿瘤发生发展等中发挥重要作用^[2-6]。本研究通过挖掘 TCGA 数据明确 TRIM45 在乳腺癌中表达上调。通过乳腺癌临床病理相关性分析,发现 TRIM45 在乳腺癌中的表达与 T 分期、TNM 分期、分子分型及病理类型相关。通过生存分析显示,TRIM45 高表达乳腺癌患者的总生存期高于 TRIM45 低表达者,以上生物信息学数据分析结果显示 TRIM45 有望成为乳腺癌抑癌基因,且 TRIM45 高表达能显著提高乳腺癌患者的生存率。

为进一步研究 TRIM45 在乳腺癌中的功能及调控机制,基于 TCGA 数据利用 GSEA 软件进行 KEGG 基因集富集分析。GSEA 富集分析发现 TRIM45 在 KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER 信号通路中发挥重要作用。通过相关性分析可以发现 TRIM45 与 KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER 信号通路中 STK36、IKBKB、GLI3 具有正相关关系,与 HIF1A 具有负相关关系。

STK36 是丝氨酸/苏氨酸激酶家族的成员,是 GLI 锌指转录因子的正调节因子,在 Hedgehog 信号通路中起关键作用^[8-9]。GLI3 编码的蛋白质属于 GLI 家族成员,是一种 DNA 结合转录因子,并且是 Sonic Hedgehog (Shh) 信号传导的介质^[8]。Hedgehog 信号通路在调控细胞的增殖、分化、干细胞调控、肿瘤的发生中起着关键性的作用^[10]。IKBKB 编码的蛋白能够磷酸化 NF-κB 复合物中的抑制剂,导致抑制剂解离并激活 NF-κB,进一步活化 NF-κB 信号通路^[11-12]。HIF1A 编码缺氧诱导因子-1(HIF-1)的 α 亚基,而 HIF-1 是由 α 和 β 亚基组成的异二聚体^[13-14]。HIF-1 作为细胞和系统对缺氧的稳态反应的主要调节因子,参与调控能量代谢、血管生成、细胞凋亡等基因转录^[13-15]。

综上所述,通过挖掘 TCGA 数据库,应用生物信息学技术推测 TRIM45 可能作为潜在的诊断乳腺癌和预测其预后的肿瘤标记物,其内在的调控机制可能是通过调控 STK36、IKBKB、GLI3 和 HIF1A 影响乳腺癌细胞的增殖、侵袭和转移,尚需要进行一系列的实验来验证本文的预测结果,为乳腺癌的早期诊断和疗效评估提供新的靶点。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10. 3322/caac. 21654.
- [2] Wang Y, Li Y, Qi X, et al. TRIM45, a novel human RBCC/TRIM protein, inhibits transcriptional activities of EIK-1 and AP-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(1): 9-16. DOI: 10. 1016/j. bbr. 2004. 08. 048.
- [3] Sato T, Takahashi H, Hatakeyama S, et al. The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway [J]. *Oncogene*, 2015, 34(10): 1280-1291. DOI: 10. 1038/onc. 2014. 68.
- [4] Shibata M, Sato T, Nukiwa R, et al. TRIM45 negatively regulates NF- κ B-mediated transcription and suppresses cell proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(1): 104-109. DOI: 10. 1016/j. bbr. 2012. 05. 090.
- [5] Zhang J, Zhang C, Cui J, et al. TRIM45 functions as a tumor suppressor in the brain via its E3 ligase activity by stabilizing p53 through K63-linked ubiquitination [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2831. DOI: 10. 1038/cddis. 2017. 149.
- [6] Peng X, Wen Y, Zha L, et al. TRIM45 suppresses the development of non-small cell lung cancer [J]. *Curr Mol Med*, 2020, 20(4): 299-306. DOI: 10. 2174/1566524019666191017143833.
- [7] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya S, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-658. DOI: 10. 1016/j. neo. 2017. 05. 002.
- [8] Murone M, Luoh SM, Stone D, et al. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(5): 310-312. DOI: 10. 1038/35010610.
- [9] Maloveryan A, Finta C, Osterlund T, et al. A possible role of mouse Fused (STK36) in Hedgehog signaling and Gli transcription factor regulation [J]. *J Cell Commun Signal*, 2007, 1(3-4): 165-173. DOI: 10. 1007/s12079-007-0014-y.
- [10] Patel TN, Dhanyamraju PK. Role of aberrant Sonic hedgehog signaling pathway in cancers and developmental anomalies [J]. *J Biomed Res*, 2021, 36(1): 1-9. DOI: 10. 7555/JBR. 35. 20210139.
- [11] Schmid JA, Birbach A. I κ B kinase beta (IKK β /IKK2/IKBKB) -- a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19(2): 157-165. DOI: 10. 1016/j. cytofr. 2008. 01. 006.
- [12] Sughra K, Birbach A, de Martin R, et al. Interaction of the TNF-receptor associated factor TRAF1 with I-kappa B kinase-2 and TRAF2 indicates a regulatory function for NF-kappa B signaling [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12683. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0012683.
- [13] Masson N, Willam C, Maxwell PH, et al. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation [J]. *EMBO J*, 2001, 20(18): 5197-5206. DOI: 10. 1093/emboj/20. 18. 5197.
- [14] Kim EJ, Yoo YG, Yang WK, et al. Transcriptional activation of HIF-1 by ROR α and its role in hypoxia signaling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(10): 1796-1802. DOI: 10. 1161/ATVBAHA. 108. 171546.
- [15] Xu C, Liu X, Zha H, et al. A pathogen-derived effector modulates host glucose metabolism by arginine GlcNAcylation of HIF-1 α protein [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(8): e1007259. DOI: 10. 1371/journal. ppat. 1007259.

(收稿日期 2023-02-17)

(本文编辑:甘慧敏)