

文章编号 1006-8147(2023)04-0366-06

论 著

基于生物信息学分析探讨子宫内膜异位症恶变的机制

吴桃¹, 呼学敏², 杨玉芳², 杜雪²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市人民医院/南开大学人民医院妇科, 天津 300121)

摘要 目的:通过生物信息学分析探讨子宫内膜异位症(EMs)恶变为卵巢透明细胞癌(OCCC)的致病机制。方法:通过 GEO 数据库微阵列表达谱数据集 GSE57545, 分别将卵巢型 EMs(OVE)、EMs 相关 OCCC 与正常女性个体的免疫基因进行差异分析, 并对差异表达基因进行 GO 富集和 KEGG 信号通路分析、构建差异表达基因的 PPI 网络并筛选 Hub 基因。结果:OVE 与对照组间共筛选出 43 个差异表达基因, OCCC 与对照组间共筛选出 96 个差异表达基因。相对于正常女性而言, KEGG 信号通路富集显示:癌症通路是 OVE 与 OCCC 共有的信号通路。GO 富集分析结果示:免疫系统过程、免疫反应、调节免疫系统进程等是 OVE 与 OCCC 共有的生物学过程; 囊泡、质膜部分、细胞表面是 OVE 与 OCCC 的差异表达基因富集的共有细胞组分。CAPS3 是 OVE 与 OCCC 的交集 Hub 基因。结论:免疫系统在 EMs 恶变的过程中起重要作用; CAPS3 可能是 EMs 恶变为 OCCC 的关键靶点之一。

关键词 子宫内膜异位症; 恶变; 卵巢透明细胞癌; 细胞焦亡; caspase-3

中图分类号 R71

文献标志码 A

Exploring the mechanism of malignant transformation of endometriosis based on bioinformatics analysis

WU Tao¹, HU Xue-min², YANG Yu-fang², DU Xue²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Gynecology, Tianjin Union Medical Center, Nankai University, Tianjin 300121, China)

Abstract Objective: To investigate the pathogenesis of malignant transformation of endometriosis (EMs) into ovarian clear cell carcinoma (OCCC) by bioinformatics analysis. **Methods:** Through GEO database microarray expression profile dataset GSE57545, the immune genes of OVE, EMs related OCCC and normal female individuals were analyzed differentially. GO enrichment and KEGG signaling pathway analysis were performed for differentially expressed genes, PPI networks of differentially expressed genes were constructed and Hub genes were screened. **Results:** A total of 43 differentially expressed genes were screened between OVE and control group, and 96 differentially expressed genes were screened between OCCC and control group. Compared with normal female individuals, the enrichment of KEGG signaling pathway indicated that the cancer pathway was a common signaling pathway of OVE and OCCC. GO enrichment analysis results showed that the immune system process, immune response, regulation of immune system process were common biological processes of OVE and OCCC. The vesicles, plasma membrane and cell surface were the common components of OVE and OCCC enriched in DEGs. CAPS3 was the intersection Hub gene of OVE and OCCC. **Conclusion:** The immune system plays an important role in the malignant transformation of endometriosis; CAPS3 may be one of the key targets for the malignant transformation of EMs into OCCC.

Key words endometriosis; evil change; ovarian clear cell carcinoma; pyrolysis; caspase-3

子宫内膜异位症(EMs)是一种以盆腔内外子宫内膜样组织生长为特征的慢性、炎症性疾病^[1], 是临床最常见、最复杂的妇科疑难病症之一, 育龄期女性发病率约为 10%~15%^[2-3], 最常见类型为卵巢型 EMs(OVE)。虽然 EMs 是良性疾病, 但临床上通常表现为恶性肿瘤的特征, 即具有复发性、转移性、浸润种植性^[4], 少数 EMs 可发生恶变且恶变率逐年上升, 但 EMs 恶变机制尚不明确。其中, OVE 恶变与卵巢透明细胞癌(OCCC)存在密切联系, 甚至被认为是后者的癌前病变^[5], 而 OCCC 晚期患者的预后较其他组织学亚型的卵巢癌更差, 对化疗药物治疗的有效率低、反应率差、易耐药, 且尚无获批的 OC-

CC 特异性靶向药^[6]。因此, 探索 EMs 恶变为 OCCC 的致病机制, 识别新的潜在生物标志物和药物靶基因, 对临床筛选 EMs 恶变高危人群、预测疾病进展及后续进行个体化治疗具有重要意义。

最近, 有学者提出免疫效应器的敏感性和特异性可以感知癌变细胞的早期分子变化, 癌样免疫特征可能在良性病变中更早出现^[7], 分析组织中的免疫反应可能为探究 EMs 恶变机制提供新方向。因此, 本文拟基于生物信息学分析中 OVE 与 OCCC 差异表达基因, 进一步了解 EMs 恶变为 OCCC 的机制。

1 对象与方法

1.1 数据获取 本研究通过 GEO(Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库查找并下载 11 例 OVE 患者、12 例 OCCC 患者和 29

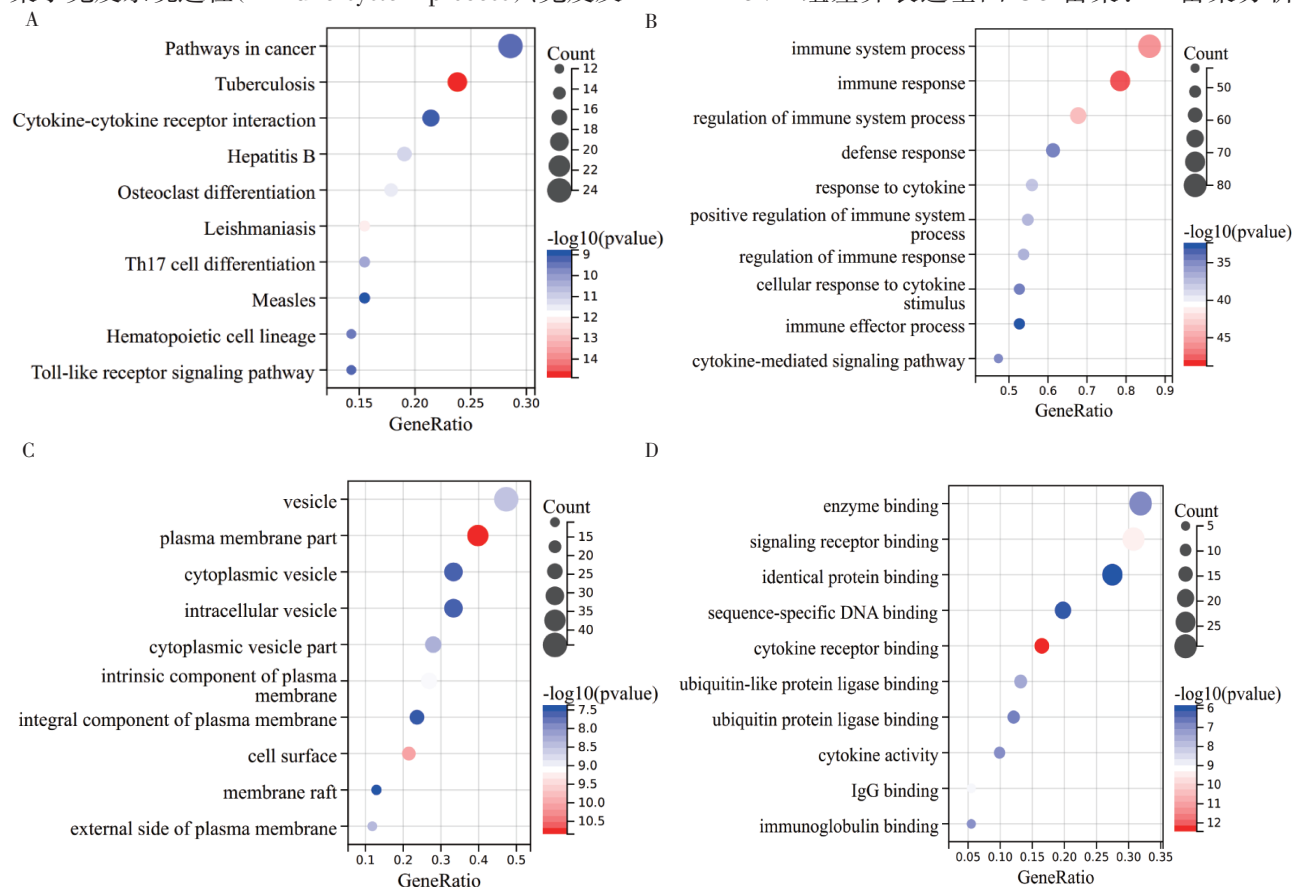
作者简介 吴桃(1984-), 女, 硕士在读, 研究方向: 妇科内分泌; 通信作者: 杜雪; E-mail: lanlandetomao@163.com。

2.2 差异表达基因的 KEGG 信号通路分析、GO 富集分析 利用 Sangerbox 在线分析工具将筛选出的差异表达基因富集分析。OCCC 组 KEGG 富集通路分析发现(图 2A),差异表达基因参与了癌症通路(pathways in cancer)、肺结核(tuberculosis)、细胞因子-细胞因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction)、乙型肝炎(hepatitis B)、破骨细胞分化(osteoclast differentiation)、利什曼病(leishmaniasis)、Th17 细胞分化(Th17 cell differentiation)等多条信号通路。OVE 组 KEGG 富集通路分析发现(图 3A),差异表达基因参与了癌症通路(pathways in cancer)、EB 病毒感染(Epstein-Barr virus infection)、小细胞肺癌(small cell lung cancer)、麻疹(measles)、NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、B 细胞受体信号通路(B cell receptor signaling pathway)等多条信号通路。

OCCC 组差异表达基因 GO 富集,生物学过程(BP)富集分析发现(图 2C),差异表达基因主要富集于免疫系统过程(immune system process)、免疫反

应(immune response)、调节免疫系统进程(regulation of immune system process)、防御反应(defense response)、对细胞因子的反应(response to cytokine)、免疫系统过程的正向调节(positive regulation of immune system process)、免疫反应的调节(regulation of immune response)、细胞对细胞因子刺激的反应(cellular response to cytokine stimulus)、免疫效应过程(immune effector process)、细胞因子介导的信号通路(cytokine-mediated signaling pathway)等生物学过程。细胞组分(CC)富集分析发现(图 2D),差异表达基因主要富集于囊泡(vesicle)、质膜部分(plasma membrane part)、胞质囊泡(cytoplasmic vesicle)、细胞内囊泡(intracellular vesicle)、细胞质囊泡部分(cytoplasmic vesicle part)、质膜的固有成分(intrinsic component of plasma membrane)、细胞表面(cell surface)等细胞部位。分子功能(MF)富集分析发现(图 2E),差异表达基因参与了酶结合(enzyme binding)、信号受体结合(signaling receptor binding)、相同的蛋白质结合(identical protein binding)等多种分子功能途径。

OVE 组差异表达基因 GO 富集:BP 富集分析



注:A:KEGG 富集通路;B:BP 富集分析;C:CC 富集分析;D:MF 富集分析;BP:生物学过程;CC:细胞组分;MF:分子功能;OCCC:卵巢透明细胞癌;OVF:卵巢型子宫内膜异位症(横坐标代表基因富集分数,点的大小代表富集的基因数,点的颜色代表 P 值);FDR<0.5 且 P<0.05 数据具有统计学意义

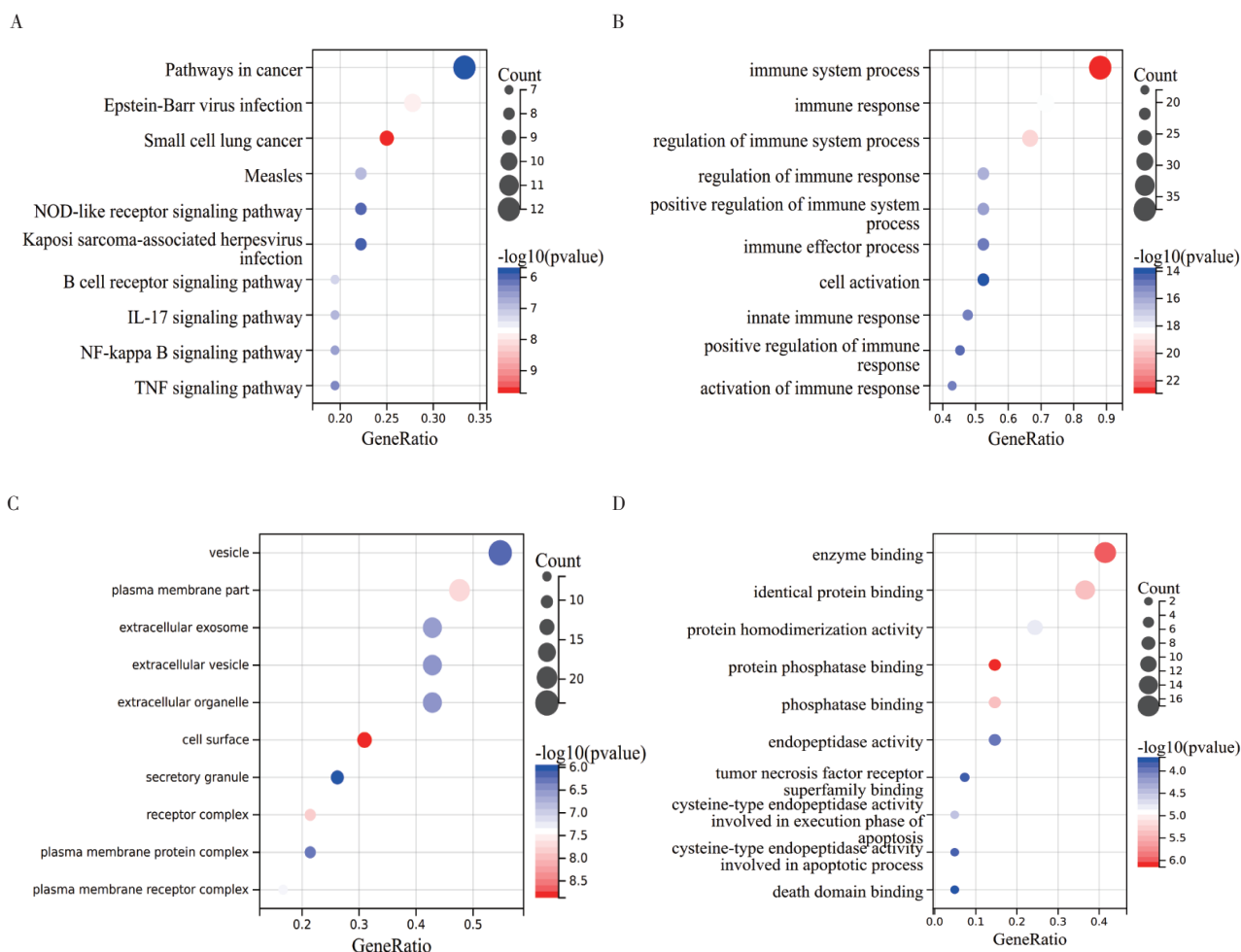
图2 OCCC 组差异基因功能富集分析

Fig 2 Functional enrichment analysis of differential genes in OCCC group

发现(图 3B),差异表达基因主要富集于免疫系统过程(immune system process)、免疫反应(immune response)、调节免疫系统进程(regulation of immune system process)、免疫反应的调节(regulation of immune response)、免疫系统过程的正向调节(positive regulation of immune system process)、免疫效应过程(immune effector process)、细胞的激活(cell activation)、先天免疫反应(innate immune response)、免疫反应的正向调节(positive regulation of immune response)、激活免疫反应(activation of immune response)等生物学过程。CC 富集分析发现(图 3C),差异表达基因主要富集于囊泡(vesicle)、质膜部分(plasma membrane part)、细胞外的外来体(extracellular exosome)、细胞外囊泡(extracellular vesicle)、细胞外的细胞器(extracellular organelle)、细胞表面(cell surface)等细胞部位。MF 富集分析显示(图 3D),

差异表达基因参与了酶结合(enzyme binding)、相同的蛋白质结合(identical protein binding)、蛋白质同二聚体活性(protein homodimerization activity)、蛋白磷酸酶结合(protein phosphatase binding)、磷酸酶绑定(phosphatase binding)、肽链内切酶活性(endopeptidase activity)、肿瘤坏死因子受体超家族结合(tumor necrosis factor receptor superfamily binding)等多种分子功能途径。

2.3 构建 PPI 网络并进行显著性差异基因的筛选 进一步对 OCCC 组、OVE 组差异表达基因构建 PPI 网络,并从各组中筛选出排名前 10 位的 Hub 基因, OCCC 组分别为:IL6、GAPDH、STAT1、SRC、CASP3、JAK2、CTNNB1、PDGFRB、CD34、STAT5B;OVE 组分别为:CASP3、CD44、CD24、NOTCH1、ITGA6、NFKB1、TRAF2、CHUK、IKBKG、TRAF3,利用 Venn 图对两组 Hub 基因取交集,确定研究节点为 CASP3。



注: A: KEGG 富集通路; B: BP 富集分析; C: CC 富集分析; D: MF 富集分析; BP: 生物学过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能; OCCC: 卵巢透明细胞癌; OVF: 卵巢型子宫内膜异位症(横坐标代表基因富集分数,点的大小代表富集的基因数,点的颜色代表 P 值); $FDR < 0.5$ 且 $P < 0.05$ 数据具有统计学意义

图 3 OVE 组差异基因功能富集分析

Fig 3 Functional enrichment analysis of differential genes in OVE group

3 讨论

EMs 的恶变率逐年上升,其病因及发病机制不明,严重威胁女性健康。炎症刺激是子 EMs 恶变的危险因素^[10]。相关研究推测,细胞焦亡诱导的炎症级联反应可能促使子 EMs 恶变^[11]。

本研究中,OVE 与 OCCC 具有共有的肿瘤信号通路、免疫生物学过程以及囊泡等细胞组分。囊泡在 EMs 的细胞迁移、植入和免疫调节中发挥作用^[12],并帮助肿瘤细胞完成免疫逃逸^[13]。这表明免疫系统在 EMs 恶变的过程中起重要作用。但需要进一步研究来阐明 EMs 恶变的具体免疫过程。

同时,本研究显示,CAPS3 是 OVE 与 OCCC 的交集 Hub 基因。Caspase-3 (CAPS3) 是半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶家族成员之一,在调节细胞凋亡中发挥关键作用,并对肿瘤的发生、发展和治疗起非常重要的作用^[14]。然而,随着抗肿瘤药物的广泛应用,肿瘤细胞的抗凋亡能力逐渐增强、逐渐产生耐药性,仍极具侵袭性^[15]。因此,学者们开始深入研究细胞凋亡以外的细胞死亡方式,并发现 caspase-3 可以特异性切割 GSDME,产生可穿透胞膜的 GSDME-N 片段,从而诱导细胞焦亡^[16]。

细胞焦亡是一种新型的细胞程序性死亡方式,不同于凋亡、坏死等其他细胞死亡形式,其最具特征的表现依赖于 caspase 家族触发炎症^[17],其形态学特点是细胞膜结构被破坏,细胞内外渗透压发生变化,细胞肿胀、破裂,炎症因子、溶酶体等细胞内容物释放到细胞外,诱导炎症级联反应^[18-19]。细胞焦亡在应对外源感染调节免疫细胞的功能及响应内源性风险信号中发挥重要作用。然而,一旦持续过度激活,细胞焦亡会导致免疫失调和过度的炎症,组织细胞长期暴露于炎症环境会增加罹患癌症的风险^[20],这类反应可引起多种妇科疾病,如 EMs、多囊卵巢综合征等^[3,21]。

近年来发现,caspase-3/GSDME 为细胞焦亡依赖的信号通路,caspase-3/GSDME 信号通路作为“开关”可以调节细胞焦亡和细胞凋亡之间的平衡。GSDME 属于 gasdermin 超家族,是一种重要的介导细胞焦亡的蛋白质,在检测细胞焦亡中起关键作用^[2]。当 GSDME 高表达时,活性 caspase-3 可切割 GSDME 并释放 N 端结构域,在细胞膜上打孔,导致细胞肿胀、破裂和死亡。GSDME 低表达时,会激活肿瘤细胞死亡的经典机制,即细胞凋亡。此外,研究人员发现 GSDME 也可以位于 caspase-3 的上游,连接外在和内在的凋亡途径,促进 caspase-3 的激活,形成一个自放大的前馈回路。虽然细胞焦亡增强了药物敏

感性,降低了肿瘤的抗凋亡特性,增强了抗肿瘤免疫,但细胞焦亡触发的慢性炎症也可促进组织细胞的癌变。因此,对 caspase-3 和 GSDME 的进一步研究还存在很多问题^[15]。

研究表明,在 EMs 相关炎症中,细胞内的铁过载激活了 caspase-3,活化的 caspase-3 切割 GSDME 后,产生 N 端,随之结合膜上的 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇,造成质膜穿孔,炎性物质释放,引发细胞焦亡^[11]。另一项研究在 EMs 患者的子宫内膜、腹腔液和外周血中发现,炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-16 的表达水平升高,而这些因子又能激活巨噬细胞等炎症细胞释放炎性小体,激活 caspase-1,活化的 caspase-1 促使了 GSDMD 介导的细胞焦亡通路,参与 EMs 的发病机制^[23]。上述研究结果表明,细胞焦亡可促进对 EMs 中的炎症。

最近一项生物信息学分析从卵巢癌患者中筛选出 caspase-3、AIM2 以及 GSDMA 等 7 个细胞焦亡相关基因,其中 caspase-3、IL-18 等基因高表达,这也与本研究结果一致。该团队建立卵巢癌预后风险预测模型,结果显示,在卵巢癌进展过程中细胞焦亡相关基因发挥重要作用,能够用来预测卵巢癌患者的预后^[7]。同样,在子宫内膜癌中,细胞焦亡相关基因 NLRP3、GSDMD、caspase-1、IL1 β 表达量也显著高于良性子宫内膜组织^[24]。有研究提出,细胞焦亡通过形成适合肿瘤细胞生长的微环境来促进肿瘤生长^[25]。还可能对肿瘤免疫微环境产生特定的影响并促进免疫监视。因此,细胞焦亡是肿瘤治疗的潜在新靶点。

在肿瘤发展和治疗机制中细胞焦亡发挥着双重作用。一方面,受到细胞焦亡释放的大量炎症因子的刺激,正常细胞可转化为肿瘤细胞。另一方面,肿瘤细胞焦亡后释放的损伤相关分子模式将肿瘤免疫微环境重编程为免疫刺激状态,从而抑制肿瘤细胞的生长和转移^[7,26]。多项研究发现,诱导细胞焦亡可以抑制卵巢癌的发展: α -Neta 通过激活 GSDMD 的 caspase-4 切割直接诱导细胞焦亡,从而抑制上皮性卵巢癌细胞的增殖^[27];吉西他滨可以诱导 GSDME 高表达,激活 caspase-3,从而进一步促进肿瘤细胞的细胞焦亡^[28];蛇床子素可以诱导 c-GSDME 表达,导致卵巢癌细胞中 GSDME 依赖性细胞焦亡^[22]。因此,随着细胞焦亡相关机制的进一步阐明,其可被视为卵巢癌诊断和治疗的有效靶点。

EMs 与 OCCC 的发病机制都与细胞焦亡相关,EMs 的慢性炎症可能潜在地推动了 EMs 相关性卵巢癌的炎症诱导癌变,但确切的免疫途径和细胞过

程仍不清楚^[11]。而在炎症性肠病中,GSDME介导的细胞焦亡可触发持续性慢性炎症,使细胞内释放重组人高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)增加,促进结直肠癌的发展^[29]。

综上所述,笔者认为 EMs 和卵巢癌患者处于全身炎症状态。监测细胞焦亡指标可能有助于 EMs 恶变的早期识别、准确靶向治疗及疾病随访,为探寻 EMs 恶变机制提供了新思路。

参考文献:

- [1] FRANCA PRC, LONTRA ACP, FERNANDES P D. Endometriosis: a disease with few direct treatment options[J]. *Molecules*, 2022, 27(13):4034.
- [2] SZUKIEWICZ D, STANGRET A, RUIZ-RUIZ C, et al. Estrogen- and progesterone (p4)-mediated epigenetic modifications of endometrial stromal cells (enscs) and/or mesenchymal stem/stromal cells (mscs) in the etiopathogenesis of endometriosis [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(4): 1174-1193.
- [3] YU S Y, LI X L. Pyroptosis and inflammasomes in obstetrical and gynecological diseases [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2021, 37(5):385-391.
- [4] SONG L, XING A, LI Q, et al. High-grade serous carcinoma resulting from rectal endometriosis and complicated with ovarian cancer [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1252.
- [5] BULUN S E, WAN Y, MATEI D. Epithelial mutations in endometriosis: link to ovarian cancer[J]. *Endocrinology*, 2019, 160(3):626-638.
- [6] 张国楠, 向阳, 王登凤, 等. 卵巢透明细胞癌临床诊治中国专家共识 (2022 年版)[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2022, 38(5): 515-523.
- [7] YE Y, DAI Q, QI H. A novel defined pyroptosis-related gene signature for predicting the prognosis of ovarian cancer[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1):71.
- [8] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue):D447-D452.
- [9] Cline M S, Smoot M, Cerami E, et al. Integration of biological networks and gene expression data using cytoscape[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(10):2366-2382.
- [10] LEENEN S, HERMENS M, DE VOS VAN STEENWIJK P J, et al. Immunologic factors involved in the malignant transformation of endometriosis to endometriosis-associated ovarian carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*. 2021, 70(7):1821-1829.
- [11] 黄怡, 李瑞云, 杨媛. 细胞焦亡在妇科疾病中的研究进展[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2022, 23(4): 436-438.
- [12] SCHECK S, PATERSON E S J, HENRY C E. A promising future for endometriosis diagnosis and therapy: extracellular vesicles—a systematic review[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1):174
- [13] LUCIDI A, BUCALON D, RONSINI C, et al. Role of extracellular vesicles in epithelial ovarian cancer: a systematic review [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22):8762.
- [14] ESKANDARI E, EAVES C J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis [J]. *J Cell Biol*, 2022, 221(6):e202201159.
- [15] JIANG M, QI L, LI L, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer[J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6:112.
- [16] WANG Y, GAO W, SHI X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. *Nature*, 2017, 547(7661):99-103.
- [17] KIST M, VUCIC D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications [J]. *EMBO J*, 2021, 40(5):e106700.
- [18] FRANK D, VINCE J E. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1):99-114.
- [19] QI X, CHE X, LI Q, et al. Potential application of pyroptosis in kidney renal clear cell carcinoma immunotherapy and targeted therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:918647.
- [20] KARKI R, KANNEGANTI T D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(4):197-214.
- [21] 廖文欣, 李洋, 申复进. 细胞焦亡在妇科恶性肿瘤中的研究进展[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2022, 14(6):41-45.
- [22] LIANG J, ZHOU J, XU Y, et al. Oshole inhibits ovarian carcinoma cells through LC3-mediated autophagy and GSDME-dependent pyroptosis except for apoptosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 874:172990.
- [23] HANG Y, TAN L, CHEN Q, et al. E3 ubiquitin ligase TRIM24 deficiency promotes NLRP3/caspase-1/IL-1 β -mediated pyroptosis in endometriosis [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(7):1561-1570.
- [24] YANG Y, LIU P Y, BAO W, et al. Hydrogen inhibits endometrial cancer growth via a ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptotic pathway[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):28.
- [25] DU T, GAO J, LI P, et al. Pyroptosis, metabolism, and tumor immune microenvironment[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(8):e492.
- [26] HUANG Y, LI R, YANG Y. Role of pyroptosis in gynecological oncology and its therapeutic regulation[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7):924.
- [27] QIAO L, WU X, ZHANG J, et al. α -NETA induces pyroptosis of epithelial ovarian cancer cells through the GSDMD/caspase-4 pathway[J]. *FASEB J*, 2019, 33(11):12760-12767.
- [28] ZOU J, ZHENG Y, HUANG Y, et al. The versatile gasdermin family: their function and roles in diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:751533.
- [29] RUAN J, WANG S, WANG J. Mechanism and regulation of pyroptosis-mediated in cancer cell death[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 323:109052.

(2023-02-28 收稿)