

文章编号 1006-8147(2022)01-0015-05

论 著

基于 TCGA 数据库分析 JMJD6 在肝癌组织中的表达及临床意义

赵冉,武燕洁,刘振凤,冯圣望,兰蓓

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系,天津 300070)

摘要 目的:分析 JMJD6 在肝癌中的表达及与预后的关系。方法:从 TCGA 数据库中下载肝癌患者的 mRNA 表达数据及患者临床信息。利用 Wilcoxon 检验比较肝癌组织和正常组织中 JMJD6 的表达差异,单因素 Logistic 回归分析 JMJD6 表达量与临床特征的关系。通过 Kaplan-Meier 法和 Cox 回归分析 JMJD6 表达量与患者生存率的关系。将肝癌组织分成 JMJD6 高表达组和低表达组并进行基因集富集分析(GSEA)。结果:与正常组织相比,JMJD6 在肝癌组织中高表达($W=2\,506$, $P<0.001$),且表达量与临床分期和病理分级相关(均 $P<0.05$)。JMJD6 高表达导致患者生存率下降($\chi^2=5.541$, $P<0.05$),并且是肝癌患者预后的独立危险因素($HR=1.109$,95% CI : 1.039~1.184, $P<0.01$)。此外,GSEA 结果显示 JMJD6 高表达组在 DNA 复制、RNA 剪接等通路富集,低表达组在脂肪酸和氨基酸代谢通路富集。结论:JMJD6 高表达与肝癌的发生、发展及患者不良预后相关。

关键词 TCGA;肝癌;JMJD6;预后分析

中图分类号 R735.7

文献标志码 A

The expression and clinical significance of JMJD6 in hepatocellular carcinoma based on TCGA database

ZHAO Ran, WU Yan-jie, LIU Zhen-feng, FENG Sheng-yun, LAN Bei

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To analyze the expression of JMJD6 in hepatocellular carcinoma(HCC) and its relationship with prognosis. **Methods:** The mRNA expression data and clinical information of patients with HCC were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The expression of JMJD6 in HCC tissues and normal tissues was compared by Wilcoxon Test, and univariate Logistic regression analysis was used to analyze the relationship between JMJD6 expression and clinical features. The relationship between JMJD6 expression and patient survival was analyzed by Kaplan-Meier method and Cox regression analysis. Gene set enrichment analysis(GSEA) was performed in the high and low expression groups of JMJD6. **Results:** Compared with normal tissues, the expression of JMJD6 was up-regulated in HCC tissues (Wilcoxon test, $W=2\,506$, $P<0.001$) and the expression level was correlated with clinical stage and pathological grade (all $P<0.05$). The high expression of JMJD6 was related to adverse prognosis of HCC($\chi^2=5.541$, $P<0.05$), and the expression of JMJD6 could be an independent factor affecting the survival of patients ($HR=1.109$, 95% CI : 1.039~1.184, $P<0.01$). In addition, GSEA results showed that JMJD6 high expression group was enriched in DNA replication and RNA splicing pathways, while JMJD6 low expression group was enriched in fatty acid and amino acid metabolism pathways. **Conclusion:** The high expression of JMJD6 is associated with the occurrence and development of HCC and the adverse prognosis of patients.

Key words TCGA; hepatocellular carcinoma; JMJD6; prognosis analysis

肝癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,因此对肝癌中异常表达基因的研究将有助于寻找新的治疗靶点。JMJD6 蛋白属于 Jumonji C domain-containing (JMJD) 蛋白家族,主要定位在细胞核内,具有催化组蛋白或非组蛋白赖氨酸甲基化和精氨酸去甲基化活性。最新研究发现, JMJD6 还具有酪氨酸激酶活性^[1]。JMJD6 在多种生物学过程中发挥重要作用,能够将组蛋白 H4R3me2 去甲基化^[2],并通过与 Br

d4 结合调控转录^[3]。JMJD6 能够与剪接因子 U2AF65 结合并羟甲基化其第 15 位和第 276 位赖氨酸,进而影响 RNA 剪接^[4]。此外, JMJD6 能够磷酸化组蛋白 H2A.X 第 39 位酪氨酸,促进细胞自噬^[5]。同时,越来越多的研究表明, JMJD6 在乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤等多种癌症中发挥作用^[5-9],但是其在肝癌中的作用仍有待进一步研究。为了探讨 JMJD6 在肝癌中的作用,笔者对 TCGA 数据库进行数据挖掘,分析 JMJD6 在肝癌组织中的表达水平及其与预后的关系,并进一步分析 JMJD6 表达对细胞信号通路的影响,为其作为肝癌诊断和治疗的靶

基金项目 天津市教科科研项目(2018KJ068)

作者简介 赵冉(1996-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤表观遗传学;

通信作者:兰蓓, E-mail: lanpei@tmu.edu.cn。

点奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 数据资料收集及患者分组 从GDC (<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载TCGA肝癌患者项目为TCGA-LIHC的RNA FPKM数据和患者临床资料。剔除缺少RNA数据或临床信息的患者,且相同患者保留原位癌数据,最后371例肝癌患者列入本次分析(其中50例患者包括癌组织和正常组织,其余321例仅包括癌组织)。以肝癌组织中JMJD6 mRNA表达量中位值为界(MEDIA=3.380),将患者分为高表达组(185例)和低表达组(186例)。JMJD6在正常组织和肝癌组织中的免疫组化数据来自The Human Protein Atlas (HPA: <https://www.proteinatlas.org/>)。

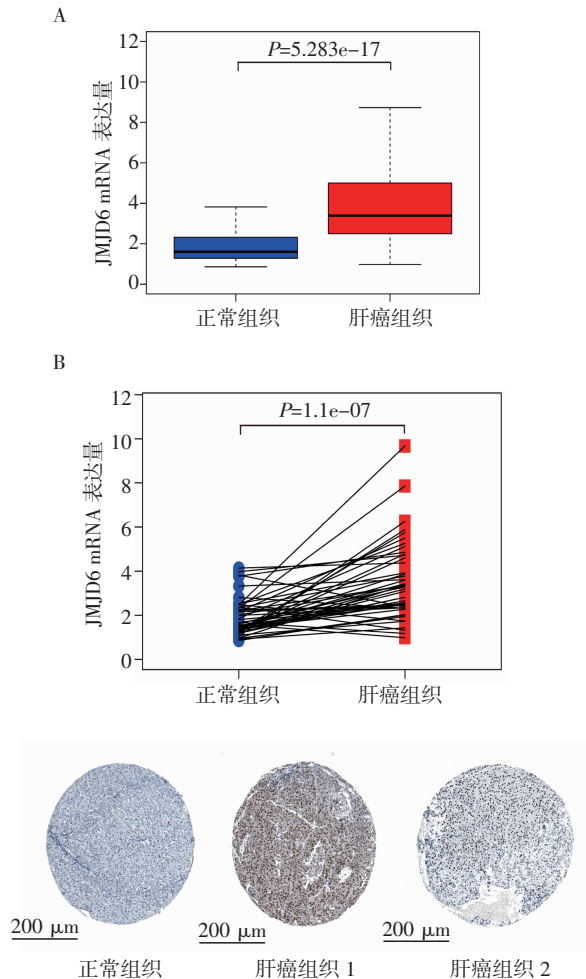
1.2 JMJD6表达的差异分析及与患者临床特征的关系 比较肝癌患者正常组织和肿瘤组织中的JMJD6表达量差异,以及不同临床分期或病理分级患者之间的表达差异,寻找JMJD6表达与临床特征的相关性。进行Kaplan-Meier生存分析及Cox回归分析,探讨JMJD6表达与肝癌患者预后的关系。其中Kaplan-Meier生存分析删除了1例无生存数据病例,Cox回归分析中删除27例临床信息不全的病例。

1.3 基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA) 利用GSEA 4.0.1对肿瘤样本JMJD6高表达组和低表达组的差异表达基因进行比较分析,探讨JMJD6表达水平对细胞信号通路的影响。基因集数据库选择kegg.v7.4,置换次数设定为1 000次,以 $q < 0.05$ 为显著富集基因集。

1.4 统计学处理 数据用R语言R-4.0.3进行整理和统计学分析。非正态分布的计量数据采用中位数(P_{25}, P_{75})描述,进行Wilcoxon检验比较JMJD6表达差异,进行单因素Logistic回归分析JMJD6表达量与临床特征的相关性。绘制Kaplan-Meier生存分析曲线,进行单因素和多因素Cox回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JMJD6在肝癌组织中的表达 肿瘤组织中JMJD6 mRNA表达显著升高[肿瘤组织:3.380(2.489, 4.969),正常组织:1.606(1.283, 2.322), $W=2\ 506$, $P < 0.001$,图1A]。此外,将50个正常组织及其对应的肿瘤组织进行配对分析,结果同样显示,肿瘤组织中JMJD6表达高于正常组织(配对样本Wilcoxon检验, $W=87$, $P < 0.001$,图1B)。在HPA数据库中,JMJD6免疫组化染色结果也证明了其在肝癌组织中高表达(图1C)。

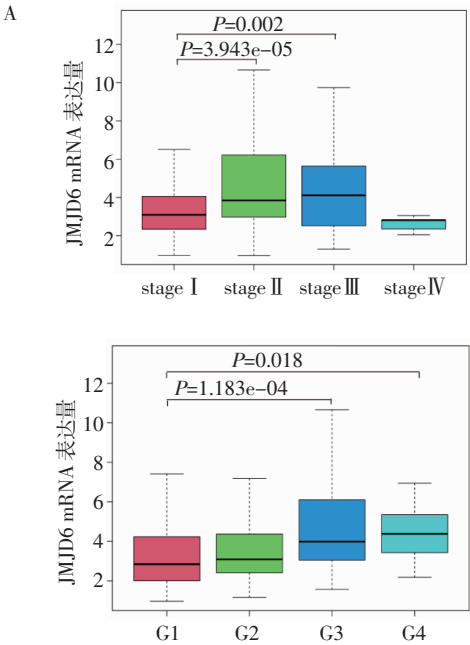


注:A:JMJD6在正常组织和肝癌组织中的总体表达情况;B:JMJD6在肝癌患者正常组织和肝癌组织中的配对表达情况;C:HPA数据库中JMJD6在正常组织和肝癌组织中的免疫组化染色

图1 JMJD6在正常组织和肝癌组织中的表达情况

Fig 1 The expression of JMJD6 in normal tissues and HCC tissues

2.2 JMJD6表达与临床特征之间的关系 应用患者的临床数据分析JMJD6与临床分期及病理分级的关系。结果显示,与stage I期患者相比,stage II、III期患者JMJD6表达水平升高,且差异具有统计学意义[stage I:3.093(2.341, 4.060),stage II:3.845(2.979, 6.220),stage III:4.112(2.526, 5.640),stage II vs. stage I: $W=5\ 041$, $P < 0.001$,stage III vs. stage I, $W=5\ 543$, $P < 0.01$,图2A]。同样,与G1级相比,G3、G4级患者JMJD6表达水平也升高[G1:2.844(2.012, 4.237),G2:3.089(2.415, 4.373),G3:3.987(3.050, 6.105),G4:4.386(3.433, 5.355),G3 vs. G1: $W=2\ 140$, $P < 0.001$,G4 vs. G1: $W=185$, $P < 0.05$,图2B]。采用单因素Logistic回归分析JMJD6表达与不同临床病理特征之间的关系,JMJD6高表达与病理分级和临床分期呈正相关,与年龄呈负相关,而与性别无关(表1)。



注:A:JMJD6 mRNA 表达量与临床分期的关系;B:JMJD6 mRNA 表达量与病理分级的关系

图 2 JMJD6 mRNA 表达量与临床分期、病理分级的关系

Fig 2 The relationship between the expression of JMJD6 mRNA and clinical stage/pathological grade

2.3 JMJD6 表达与肝癌预后的关系 为了研究 JMJD6 表达与肿瘤患者生存率之间的关系,进行 *Kaplan-Meier* 生存分析。结果显示,JMJD6 高表达患者中

位生存期为 4.082 年,少于低表达患者的 5.838 年 ($\chi^2=5.541, P<0.05$,图 3A)。*Kaplan-Meier* Plotter 在线数据库显示,JMJD6 高表达患者和低表达患者的中位生存期分别为 41 个月和 81.9 个月($P<0.001$,图 3B)。

采用单因素 *Cox* 回归分析年龄、性别、病理分级、临床分期、饮酒、Hepatitis B 或 Hepatitis C 感染与否、吸烟及 JMJD6 表达量对肝癌患者预后的影响。结果显示,临床分期、Hepatitis C 感染和 JMJD6 表达量与肝癌患者预后相关。进一步将单因素分析有统计学意义的变量纳入多因素回归分析中,与临床分期 stage I 患者相比,stage III 和 IV 患者死亡风险升高($HR=2.292, 95\% CI: 1.469\sim 3.575, P<0.001$; $HR=8.202, 95\% CI: 2.484\sim 27.079, P<0.001$);丙型肝炎病毒感染及 JMJD6 高表达患者死亡风险也升高($HR=2.115, 95\% CI: 1.426\sim 3.139, P<0.001$; $HR=1.109, 95\% CI: 1.039\sim 1.184, P<0.01$),见表 2。

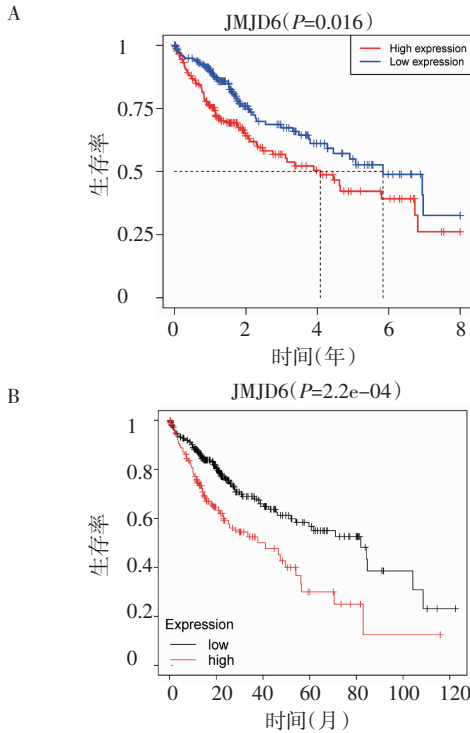
2.4 JMJD6 表达水平对细胞信号通路的影响 通过 GSEA 分析,探讨 JMJD6 表达所影响的信号通路。JMJD6 高表达组中,前 5 个富集的基因集包括:核糖体、剪接、DNA 复制、细胞周期。JMJD6 低表达组中,前 10 个富集的基因集包括:脂肪酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、色氨酸代谢等(图 4)。

表 1 JMJD6 基因表达水平与肝癌患者临床特征的关系

Tab 1 Relationship between JMJD6 gene expression level and clinical indicators in patients with HCC

临床指标	例数(n=371)	JMJD6 低表达组(n=186)	JMJD6 高表达组(n=185)	OR(95%CI)	P
年龄					
≤65	232	105(45.3%)	127(54.7%)	Reference	
>65	138	81(58.7%)	57(41.3%)	0.582(0.379~0.889)	0.013
NA	1				
性别					
女	121	66(54.5%)	55(45.5%)	Reference	
男	250	120(48.0%)	130(52.0%)	1.300(0.842~2.013)	0.237
病理分级					
G1	55	32(58.2%)	23(41.8%)	Reference	
G2	177	103(58.2%)	74(41.8%)	1.000(0.543~1.860)	0.999
G3	122	44(36.1%)	78(63.9%)	2.466(1.293~4.773)	0.007
G4	12	3(25.0%)	9(75.0%)	4.174(1.108~20.395)	0.047
NA	5				
临床分期					
stage I	171	101(59.1%)	70(40.9%)	Reference	
stage II	86	31(36.0%)	55(64.0%)	2.560(1.507~4.409)	5.799e-04
Stage III	85	36(42.4%)	49(57.6%)	1.964(1.163~3.345)	0.012
stage IV	5	5(100.0%)	0(0%)	2.506e-07(NA~5.543e+22)	0.981
NA	24				

注: NA 表示信息缺失;Reference 表示参照组



注: A:Kaplan-Meier 生存曲线分析 JMJD6 高表达组和低表达组肝癌患者的生存率;B:Kaplan-Meier Plotter 在线数据库分析 JMJD6 高表达组和低表达组肝癌患者的生存率

图 3 JMJD6 mRNA 表达量对肝癌患者生存率的影响

Fig 3 The effect of JMJD6 mRNA expression on survival rate of patients of HCC

表 2 肝癌患者总生存率的单因素和多因素 Cox 回归分析

Tab 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis of overall survival rate in patients with HCC

临床指标		单因素 Cox 分析		多因素 Cox 分析	
		HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
年龄	连续变量	1.010(0.995~1.025)	0.181		
性别	男 vs. 女	0.824(0.560~1.214)	0.328		
病理分级	G2 vs. G1	1.134(0.629~2.045)	0.677		
	G3 vs. G1	1.210(0.655~2.234)	0.543		
	G4 vs. G1	1.691(0.605~4.726)	0.317		
临床分期	stage II vs. stage I	1.454(0.875~2.417)	0.149	1.193(0.710~2.004)	0.506
	stage III vs. stage I	2.721(1.768~4.187)	5.297e-06***	2.292(1.469~3.575)	2.577e-04
	stage IV vs. stage I	5.509(1.696~17.894)	0.005**	8.202(2.484~27.079)	5.544e-04
饮酒	Yes vs. No	0.931(0.617~1.406)	0.734		
乙型肝炎病毒感染	Yes vs. No	0.831(0.562~1.228)	0.353		
丙型肝炎病毒感染	Yes vs. No	2.112(1.444~3.108)	1.220e-04***	2.115(1.426~3.139)	1.986e-04
吸烟	Yes vs. No	0.883(0.409~1.910)	0.753		
JMJD6 表达量	连续变量	1.119(1.051~1.192)	4.608e-04***	1.109(1.039~1.184)	0.002

3 讨论

肝癌是常见的癌症类型之一,其发生与多种因素有关,其中以慢性乙型肝炎病毒感染和肝硬化最为常见。肝癌的治疗方法包括肝移植、肝切除、消融、化疗栓塞,靶向治疗肝癌的一线药物包括索拉

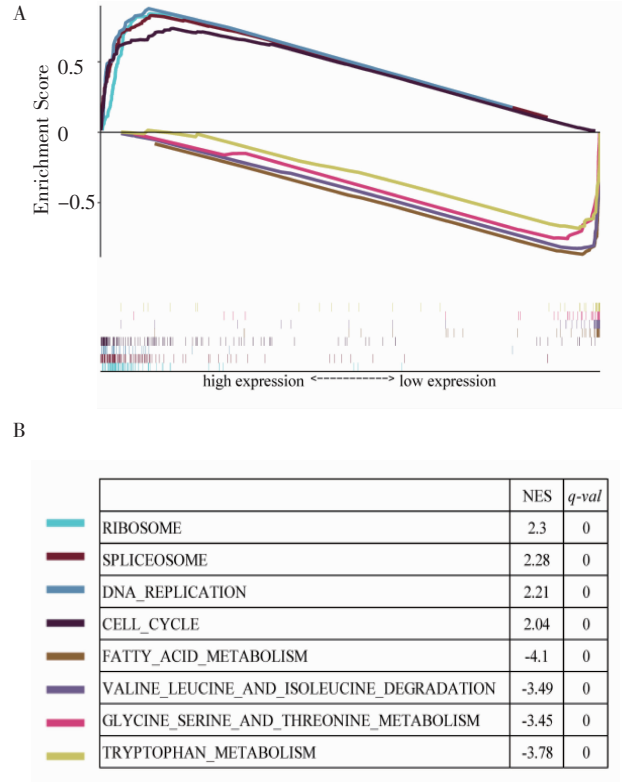


图 4 GSEA 分析 JMJD6 表达对细胞信号通路的影响

Fig 4 GSEA analysis of the effect of JMJD6 expression on cell signaling pathway

非尼等,但是肝癌的治疗效果仍然不令人满意^[10]。因此,发现肝癌组织中异常表达的蛋白并确定其作用机制,将为肝癌的诊疗提供新的作用靶点。

JMJD6 能够催化赖氨酸羟基化和精氨酸去甲基化,其底物包括组蛋白和多种非组蛋白。越来越多

的研究发现,JMJD6在多种癌症中异常表达,促进肿瘤的生长、转移。其机制包括:在结肠癌中,JMJD6结合并羟基化p53的K382,抑制了p53的转录活性^[1];在乳腺癌中,JMJD6能够抑制转化生长因子- β 通路^[2],且JMJD6在雌激素受体 α 结合的增强子的募集是RNA聚合酶II招募和增强子RNA产生所必需的,因此雌二醇引起的乳腺癌细胞增殖依赖于JMJD6^[12]。

在本研究中,笔者利用TCGA数据库,发现在肝癌患者的癌症组织中JMJD6 mRNA表达量高于正常组织,且随着癌症患者分期增加或者病理分级增加,JMJD6表达也升高。其中,stage IV患者与stage I患者相比,JMJD6表达无明显差别($P > 0.05$),原因可能在于stage IV仅为5例,样本量过小,不具有代表性。单因素Logistic回归分析显示JMJD6高表达与年龄、临床分期和病理分级相关。以上结果说明JMJD6 mRNA高表达与肝癌的发生、发展相关。其次,Kaplan-Meier生存曲线结果表明,JMJD6 mRNA高表达导致肝癌患者生存率下降,Cox回归分析显示JMJD6表达量、临床分期及丙型肝炎病毒感染是患者预后的独立危险因素,即JMJD6高表达导致了肝癌患者的不良预后。

GSEA分析结果显示,JMJD6高表达组在RNA剪接、DNA复制、细胞周期等通路富集。RNA剪接是JMJD6已知重要功能之一,在黑色素瘤中,JMJD6通过影响p21-Activated kinase 1(PAK1)的可变剪接,激活丝裂原活化蛋白激酶通路,促进肿瘤细胞生长、侵袭^[8];细胞周期的失调是肿瘤细胞异常增殖的基础^[3],JMJD6高表达伴随细胞周期通路基因的富集,如Cyclin B1(CCNB1)、Cyclin B1(CCNB2)、细胞周期蛋白依赖激酶2(CDK2)的高表达,与肿瘤的发生紧密相关^[14]。此外,JMJD6高表达组在DNA复制通路富集,包括在DNA复制过程中起关键作用的MCM蛋白。而根据之前的报道,MCM家族蛋白能够促进肝癌的增殖^[15]。JMJD6低表达组在脂肪酸和氨基酸代谢通路富集,而JMJD6在肿瘤代谢中的研究还未见报道,该结果提示JMJD6在代谢过程可能也发挥作用。

笔者还分析了JMJD6在肝癌患者中的突变和拷贝数改变的情况(结果未展示)。在已知信息的364例患者中,仅有1例患者JMJD6基因发生突变,说明JMJD6在肝癌患者中的突变频率很低。JMJD6不属于拷贝数显著扩增或缺失基因,因此JMJD6突变及拷贝数变化不是导致其在肿瘤中表达升高的原因。

总之,本研究结果说明JMJD6在肝癌组织中高表达,与肝癌的发生、发展及患者不良预后相关,为后续研究鉴定了基础。

参考文献:

- [1] LIU Y, LONG Y H, WANG S Q, et al. JMJD6 regulates histone H2A. X phosphorylation and promotes autophagy in triple-negative breast cancer cells via a novel tyrosine kinase activity[J]. *Oncogene*, 2019, 38(7): 980-997.
- [2] CHANG B, CHEN Y, ZHAO Y, et al. JMJD6 is a histone arginine demethylase[J]. *Science*, 2007, 318(5849): 444-447.
- [3] LIU W, MA Q, WONG K, et al. Brd4 and JMJD6-associated anti-pause enhancers in regulation of transcriptional pause release[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1581-1595.
- [4] WEBBY C J, WOLF A, GROMAK N, et al. Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing[J]. *Science*, 2009, 325(5936): 90-93.
- [5] LEE Y F, MILLER L D, CHAN X B, et al. JMJD6 is a driver of cellular proliferation and motility and a marker of poor prognosis in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(3): R85.
- [6] ZHANG J, NI S S, ZHAO W L, et al. High expression of JMJD6 predicts unfavorable survival in lung adenocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(4): 2397-2401.
- [7] ZHENG H, TIE Y, FANG Z, et al. Jumonji domain-containing 6 (JMJD6) identified as a potential therapeutic target in ovarian cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 24.
- [8] LIU X, SI W, LIU X, et al. JMJD6 promotes melanoma carcinogenesis through regulation of the alternative splicing of PAK1, a key MAPK signaling component[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 175.
- [9] MILLER T E, LIAU B B, WALLACE L C, et al. Transcription elongation factors represent *in vivo* cancer dependencies in glioblastoma[J]. *Nature*, 2017, 547(7663): 355-359.
- [10] DAOUDAKI M, FOUZAS I. Hepatocellular carcinoma[J]. *Wien Med Wochenschr*, 2014, 164(21/22): 450-455.
- [11] WANG F, HE L, HUANGYANG P, et al. JMJD6 promotes colon carcinogenesis through negative regulation of p53 by hydroxylation[J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(3): e1001819.
- [12] GAO W W, XIAO R Q, ZHANG W J, et al. JMJD6 licenses ER α -dependent enhancer and coding gene activation by modulating the recruitment of the CARM1/MED12 co-activator complex[J]. *Mol Cell*, 2018, 70(2): 340-357.
- [13] WILLIAMS G H, STOEGER K. The cell cycle and cancer[J]. *J Pathol*, 2012, 226(2): 352-364.
- [14] VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE D R, BERNEMAN Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer[J]. *Cell Prolif*, 2003, 36(3): 131-149.
- [15] LEI Y, WANG S, LIU J, et al. Identification of MCM family as potential therapeutic and prognostic targets for hepatocellular carcinoma based on bioinformatics and experiments[J]. *Life Sci*, 2021, 272: 119227.

(2021-05-24 收稿)