

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.12.010

· 临床研究 ·

hnRNPA1 基因在消化系统肿瘤组织中的表达及其临床意义

乔璐¹, 白玉茹¹, 谢宁¹, 刘娜¹, 王进海¹ (1. 西安交通大学第二附属医院消化内科, 陕西 西安 710004)

[摘要] **目的:** 研究核内不均一性核糖核蛋白 A1 基因(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1, *hnRNPA1*) mRNA 水平在消化系统肿瘤组织中的表达及其临床意义。**方法:** 利用 TCGA 数据库全基因组 mRNA 测序资料分析 *hnRNPA1* 在消化道肿瘤与正常组织间表达的差异, 分析其表达水平与临床病理资料相关性, 并进行生存分析判断其预后价值。**结果:** (1) *hnRNPA1* 在不同消化系统肿瘤组织中表达较正常组织均明显增高 ($P < 0.01$), 其中结直肠、肝癌、胆管癌、胰腺癌更为明显。(2) *hnRNPA1* 在肝癌组织中的表达与肿瘤分化程度 ($P < 0.05$)、TNM 分期 ($P < 0.05$) 和浸润深度 ($P < 0.05$) 相关, 与年龄、性别、肝癌危险因素无关联。*hnRNPA1* 在胆管癌、胰腺癌组织中的表达与年龄、性别、TNM 分期、浸润深度等不相关。(3) *hnRNPA1* 在胰腺癌组织中的表达高低与总生存期有相关性 ($P < 0.05$), 且为独立于 TNM 分期、分化程度而影响患者预后的危险因子; *hnRNPA1* 在结肠、直肠、肝、胆管肿瘤组织中的表达高低与总生存期无相关性。**结论:** *hnRNPA1* mRNA 在不同消化系统肿瘤中表达都增高; 其高表达是胰腺癌独立预后不良因素, 可以作为判断预后的有效生物标志物。

[关键词] 核内不均一性核糖核蛋白基因; 消化系统肿瘤; 胰腺癌; 生物标志物

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)012-1399-06

Expression and clinical significance of *hnRNPA1* in neoplasms of digestive system

QIAO Lu¹, BAI Yuru¹, XIE Ning¹, LIU Na¹, WANG Jinhai¹ (1. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression patterns of *hnRNPA1* mRNA in the digestive system tumors and its clinical significance. **Methods:** Whole genome mRNA sequencing data of TCGA databases were used to analyze the different expression of *hnRNPA1* in tumor and normal tissues and to study its correlation to clinical pathological data; and survival analysis was performed to determine its prognostic value. **Results:** 1. The expressions of *hnRNPA1* were significantly higher in digestive system tumor tissues than that in normal tissues ($P < 0.001$), especially in colorectal cancer, hepatocellular carcinoma, pancreatic cancer and cholangiocarcinoma. 2. In hepatocellular carcinoma, *hnRNPA1* expression was correlated with tumor differentiation, TNM stage and the depth of invasion (all $P < 0.05$), but not associated with age, sex, risk factors of liver cancer. In pancreatic cancer and cholangiocarcinoma, the expression of *hnRNPA1* was not significantly associated with age, sex, TNM stage and infiltration depth etc. 3. The expression of *hnRNPA1* was correlated with overall survival in pancreatic cancer patients ($P < 0.05$), which is a risk factor for the prognosis that independent of TNM stage, degree of differentiation; the expression of *hnRNPA1* was not significantly associated with overall survival in colorectal cancer, hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. **Conclusion:** The expression of *hnRNPA1* mRNA was increased in tumor tissues of different digestive system cancers; its over-expression is an independent risk factor for the prognosis of pancreatic cancer, which might be served as a potential biomarker for predicting prognosis.

[Key words] heterogeneous nuclear ribonucleoproteins(*hnRNPA1*); neoplasms of digestive system; pancreatic cancer; biomarker

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(12): 1399-1404. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.010]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81370484)。Project supported by the National Natural Science Foundation (No.81370484)

[作者简介] 乔璐(1992-), 女, 博士生, 主要从事消化道肿瘤机制研究, E-mail: cynthia2010@stu.xjtu.edu.cn

[通信作者] 王进海(WANG Jinhai, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事胃肠道动力性疾病机制及治疗研究、消化道肿瘤发病机制研究, E-mail: jinhaiwang@hotmail.com

[优先出版]

消化系统肿瘤是我国常见的严重威胁患者生命健康的疾病,包括食道癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌和胆管癌等^[1]。尽管消化内镜等医疗技术迅速发展,消化系统肿瘤的早期诊断及预后仍然有待提高。研究消化系统肿瘤发生发展的分子机制,对早期诊断和寻找生物治疗标记物具有重要意义。

核内不均一性核糖核蛋白 A1 基因(*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1, hnRNP A1*)属于 *hnRNP* 家族,参与核酸代谢的多个过程,包括 RNA 转录、外显子剪接、*pre-RNA* 的成熟和降解等^[2-3]。*hnRNP A1* 在多种肿瘤中异常表达,参与肿瘤的发生发展,包括乳腺癌^[4]、肺癌^[5]、胶质细胞瘤^[6]等。目前 *hnRNP A1* 在消化系统肿瘤中的作用研究较少,本研究利用癌症基因组图谱(*the cancer genome atlas, TCGA*),系统性评价 *hnRNP A1* mRNA 水平在消化系统肿瘤中的表达及临床意义,为进一步探索 *hnRNP A1* 在肿瘤发生发展中的作用机制提供思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

肿瘤及正常组织的全基因组测序数据来自于 TCGA (<https://cancergenome.nih.gov/>) 和 GTEx (<https://gtex-portal.org/home/>),肿瘤患者临床资料来自于 TCGA。比对 mRNA 数据库,筛选 TCGA 及 GTEx 中具有可比性的消化系统肿瘤,食管(癌 182 例,正常 286 例),胃(癌 408 例,正常 211 例),结肠(癌 275 例,正常 349 例),直肠(癌 92 例,

正常 318 例),肝(癌 369 例,正常 160 例),胆管(癌 36 例,正常 9 例),胰腺(癌 179 例,正常 171 例)。患者的临床资料包括患者的一般信息、随访时间、结局事件等。肿瘤患者均为手术后患者,随访从手术后开始。

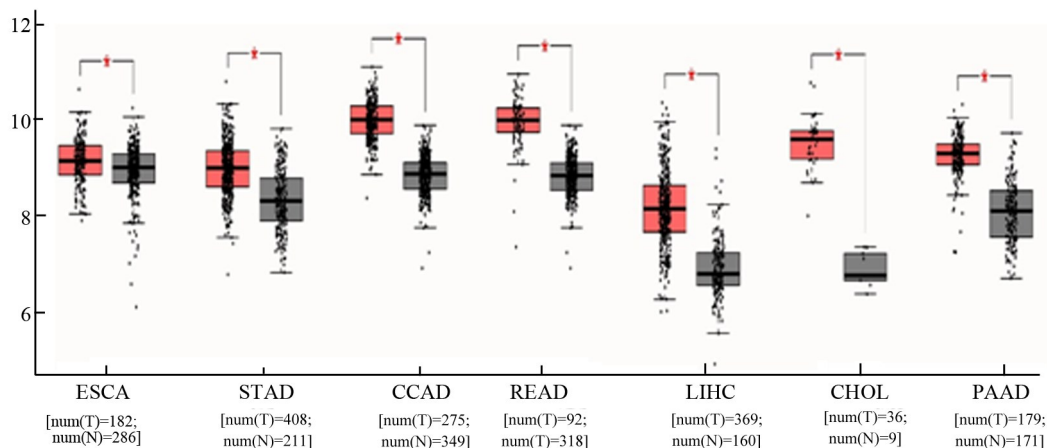
1.2 统计学方法

应用 R 3.3.3 软件进行数据分析,癌与正常组织基因表达差异采用 ANOVA 检验;以目的基因表达量的中位数为界,将肿瘤患者分为高低表达两组,利用卡方检验分析目的基因表达水平与临床病理资料之间的关系;利用 R 3.3.3 *survival* 软件包绘制生存曲线,生存分析采用 Log-Rank 检验;组间生存时间的比较采用 Coxph 模型,检验采用 Wald 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *hnRNP A1* 在消化系统肿瘤组织中的表达

TCGA 数据库中包含了 33 种肿瘤,共 9 736 例肿瘤组织和 726 例正常组织。肿瘤和正常组织样本量之间的不平衡可能会导致差异分析可信度下降。GTEx 项目中有 8 000 例正常组织的测序结果。本文综合分析 TCGA 和 GTEx 的数据,发现在消化系统肿瘤组织中,*hnRNP A1* 的 mRNA 表达水平较正常组织均增高($P < 0.05$,图 1)。与正常组织相比,*hnRNP A1* 在肝癌(LogFC=1.305)、胆管癌(LogFC=1.160)、胰腺癌(LogFC=1.149)中的增高倍数最为显著(表 1)。



ESCA: Esophageal carcinoma ESCA; STAD: Stomach adenocarcinoma STAD; CCAD: Colon adenocarcinoma COAD; READ: Rectum adenocarcinoma READ; LIHC: Liver hepatocellular carcinoma LIHC; PAAD: Pancreatic adenocarcinoma PAAD; CHO: Cholangiocarcinoma CHOL

图 1 *hnRNP A1* mRNA 在不同肿瘤组织中的表达

Fig.1 Expression patterns of *hnRNP A1* mRNA in different digestive system tumors

2.2 *hnRNP A1* 在肿瘤组织中的表达与临床病理资料之间的关系

hnRNP A1 在肝癌、胆管癌及胰腺癌中增高倍数

最为显著,进一步分析 *hnRNP A1* 表达与这 3 种肿瘤临床病理资料的相关性,结果显示(表 2),在肝癌组织中 *hnRNP A1* 的表达与患者年龄、性别、肝癌危险因素

无关,与 TNM 分期 ($P=0.012$)、分化程度 ($P=0.000065$)、肿瘤浸润深度 ($P=0.007$) 相关。在胰腺癌和胆管癌中, *hnRNPA1* 的表达与年龄、性别、TNM 分期、分化程度、肿瘤浸润深度无关(表 3,4)。

表 1 *hnRNPA1* mRNA 在消化系统肿瘤组织中的表达
Tab.1 Expression patterns of *hnRNPA1* mRNA in different digestive system tumors

Project	Median (tumor)	Median (normal)	LogFC	P
ESCA	706.18	646.41	0.13	$P<0.05$
STAD	640.25	404.61	0.66	$P<0.05$
COAD	1252.59	589.07	1.09	$P<0.05$
READ	1242.95	576.91	1.11	$P<0.05$
LIHC	363.70	146.57	1.31	$P<0.05$
CHOL	951.08	143.83	1.16	$P<0.05$
PAAD	781.39	351.72	1.15	$P<0.05$

ESCA: Esophageal carcinoma ESCA; STAD: Stomach adenocarcinoma STAD; CCAD: Colon adenocarcinoma COAD; READ: Rectum adenocarcinoma READ; LIHC: Liver hepatocellular carcinoma LIHC; PAAD: Pancreatic adenocarcinoma PAAD; CHO: Cholangiocarcinoma CHOL

表 2 *hnRNPA1* 在肝癌中的表达与临床病理资料之间的关系(n)
Tab.2 Relationship between *hnRNPA1* expression and clinicopathological characteristics of hepatocarcinoma patients (n)

Item	<i>hnRNPA1</i>		P
	Low	High	
Age(t/a)			0.16
<60	79	63	
≥60	107	94	
Gender			0.238
Female	55	66	
Male	131	121	
TNM stage			0.012
I	98	75	
II	40	47	
III	31	54	
IV	4	2	
Grade			0.000065
G1	32	23	
G2	105	73	
G3	45	78	
G4	2	10	
Risk factor			0.9
None	43	48	
Alcoholconsumption	58	59	
Hepatitis B	42	40	
Hepatitis C	20	14	
Nonalcoholic fatty liver disease	6	6	
Other	17	20	

表 3 *hnRNPA1* 在胰腺癌中的表达与临床病理资料之间的关系(n)

Tab.3 Relationship between *hnRNPA1* expression and clinicopathological characteristics of pancreatic cancer patients(n)

Item	<i>hnRNPA1</i>		P
	Low	High	
Age(t/a)			0.37
<65	44	37	
≥65	45	52	
Gender			0.05
Female	47	33	
Male	42	56	
TNM stage			0.91
I	9	12	
II	74	72	
III	2	2	
IV	3	2	
Grade			0.14
G1	11	20	
G2	51	44	
G3	25	23	
G4	0	2	
Tumor invasion			0.61
T1	5	2	
T2	13	11	
T3	9	73	
T4	1	2	
Lymph node metastasis			0.40
Negative	22	28	
Positive	64	59	
Chronic pancreatitis			0.16
No	61	67	
Yes	9	4	

2.3 *hnRNPA1* 在消化系统肿瘤组织中的预后意义

2.3.1 *hnRNPA1* 的表达与肿瘤患者预后的相关性 在胰腺癌中, *hnRNPA1* 水平与预后显著相关 [$P<0.02517$, $HR=1.592169$, $CI(1.06, 2.40)$, 图 2]; *hnRNPA1* 高表达水平的患者生存期更短, 提示其是胰腺癌的不良预后因素, 而 *hnRNPA1* 表达与结肠癌、肠癌、肝癌、胆管癌等消化系统肿瘤患者的预后无明显相关 ($P>0.05$, 图 3)。

2.3.2 *hnRNPA1* 是胰腺癌独立预后不良因素 单因素 Cox 分析提示患者性别、年龄、慢性胰腺炎病史与术后总生存率无明显相关 ($P>0.05$), 而 *hnRNPA1* 的表

表4 *hnRNPA1*在胆管癌中的表达与临床病理资料之间的关系
Tab.4 Relationship between *hnRNPA1* expressions and clinicopathological characteristics of cholangiocarcinoma patients

Item	<i>hnRNPA1</i>		P
	Low	High	
Age(t/a)			1.00
<65	9	8	
≥65	9	10	
Gender			0.09
Female	13	7	
Male	5	11	
TNM stage			0.45
I	8	11	
II	5	4	
III	0	1	
IV	5	2	
Tumor invasion			0.65
T1	8	11	
T2	7	5	
T3	3	2	
Metastasis			1.00
No	15	13	
Yes	3	2	
Lymph node metastasis			1.00
Negative	13	13	
Positive	3	2	

达量、TNM分期、浸润深度、淋巴结转移、分化程度与总生存时间显著相关($P<0.05$,表5)。进一步将*hnRNPA1*的表达量、TNM分期、肿瘤分化程度进行多因素Cox回归分析,结果显示*hnRNPA1*表达量与术后总生存时间相关,*hnRNPA1*高表达水平的胰腺癌患者,术后总生存时间更短,且独立于TNM分期及分化程度($P<0.01$,表5)。

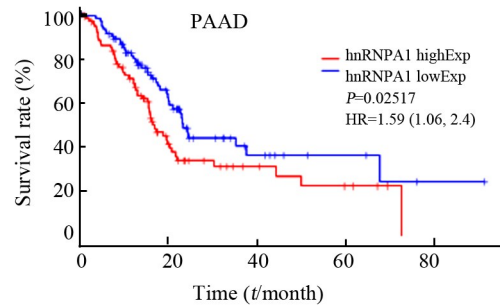


图2 *hnRNPA1*表达对胰腺癌患者总生存率的影响
Fig.2 Influence of *hnRNPA1* expression on overall survival of pancreatic cancer patients

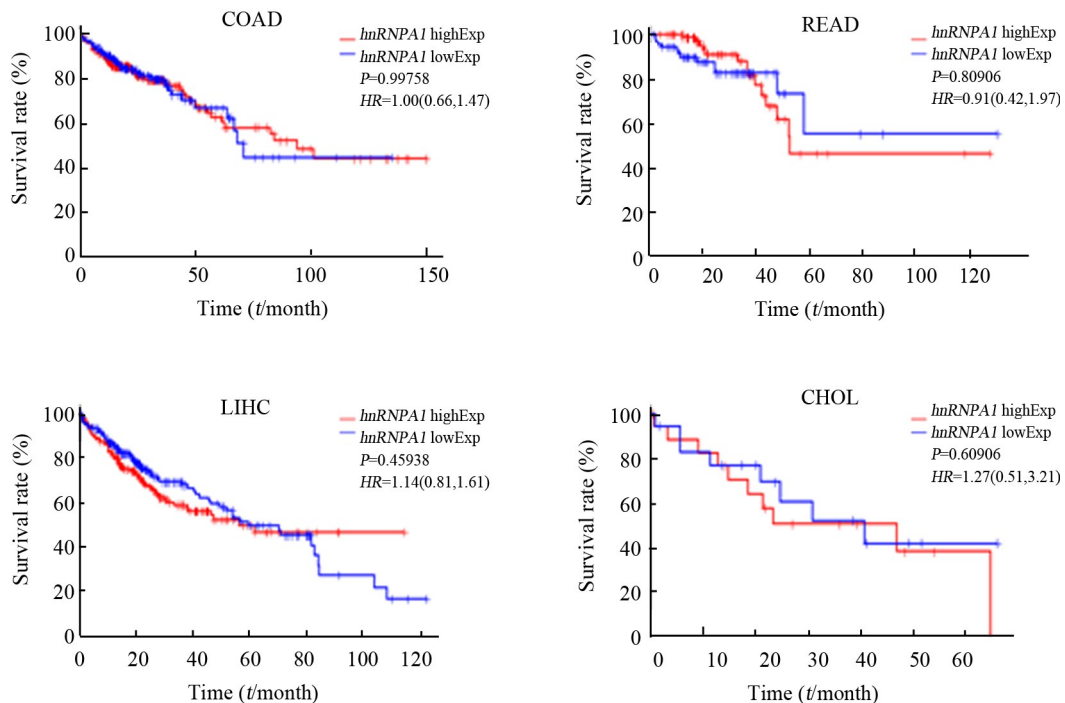


图3 *hnRNPA1*表达对结肠癌、直肠癌、肝癌、胆管癌患者总生存率的影响
Fig.3 Influence of *hnRNPA1* expression on overall survival of patients with COAD,READ and CHOL cancers

3 讨论

*hnRNPA1*是核内不均一性核糖核蛋白家族之一,是RNA结合蛋白中的一员,最初由Beyer等^[7]在

表5 *hnRNPA1* 的表达与胰腺癌患者生存期的相关性
Tab.5 Association between clinicopathological characteristics, *hnRNPA1* expression and overall survival of pancreatic cancer patients

Item	<i>n</i>	HR	95%CI	<i>P</i>
Univariate cox model				
Gender				
Female	80			
Mmale	98	0.809	0.537-1.219	0.31
Age(<i>t/a</i>)				
<65	81			
≥65	97	1.396	0.918-2.121	0.12
TNM stage				
I	21			
II	146	2.333	1.069-5.090	0.03
III	4	1.046	0.128-8.576	0.97
IV	5	1.564	0.321-7.629	0.58
T				
T1/2	31			
T3/4	145	2.022	1.072-3.815	0.03
Grade				
G1	31			
G2	95	1.956	1.006-3.803	0.05
G3	48	2.622	1.303-5.279	0.0069
G4	2	1.650	0.211-12.885	0.63
N				
N0	50			
N1	123	2.154	1.282-3.618	0.0038
Chronic pancreatitis				
No	128			
Yes	13	1.177	0.562-2.464	0.67
hnRNPA1 expression				
Low	89			
High	89	1.597	1.056-2.414	0.03
Multivariate cox model				
TNM stage				
I	21			
II	146	2.548	1.088-5.967	0.03
III	4	1.057	0.125-8.915	0.96
IV	5	1.670	0.328-8.494	0.54
Grade				
G1	31			
G2	95	1.644	0.843-3.208	0.15
G3	48	2.128	1.047-4.326	0.04
G4	2	0.909	0.116-7.141	0.93
hnRNPA1 expression				
Low	89			
High	89	1.847	1.209-2.823	0.0046

hnRNP 颗粒中发现。*hnRNPA1* 蛋白结构N末端包含两个RNA识别域(RNA-recognition motif, RPM);C端富含甘氨酸,含有一个RNA识别域和一个核定位序列,C末端作用多样,包括RNA结合、细胞定位及与蛋白之间的相互作用。

hnRNPA1 基因主要参与哺乳动物转录调控过程和翻译后调控,*hnRNPA1* 在多种肿瘤中高表达,其作用机制可能与影响转录、mRNA剪切、microRNA的生物合成相关。*hnRNPA1* 在肺癌中表达较正常组织明显增高,敲低肺癌细胞A549中*hnRNPA1* 的表达能抑制细胞活力与集落形成,调控细胞周期停滞于G0/G1期^[5]。研究^[8]发现*hnRNPA1* 介导TLR3活化喉癌细胞糖酵解过程,提高细胞内活性氧(ROS)水平,从而促进喉癌细胞增殖与迁移。通过RNA色谱和质谱的方法发现*hnRNPA1* 是调节乳腺癌细胞HER分泌的关键分子,可能是通过调节内含子8的表达,从而提高HER水平^[9]。*hnRNPA1* 在结肠癌中表达明显增高,*hnRNPA1* 通过调控转录和翻译过程,维持端粒酶重复序列的长度,促进细胞增殖^[10]。

本研究利用TCGA数据库分析发现,*hnRNPA1* mRNA水平在不同消化系统肿瘤(食管、胃、结肠、直肠、肝、胆管、胰腺)中表达均增高。有研究^[11]利用临床标本检查*hnRNPA1* 蛋白在胃癌和结肠癌中的表达,发现*hnRNPA1* 可以作为胃癌和结肠癌的标志物,但mRNA水平在肿瘤和正常组织之间无统计学意义。本研究利用TCGA数据分析发现*hnRNPA1* mRNA水平在胃癌和结肠癌中均增高,但与预后无关。*hnRNPA1* 表达在肝癌、胆管癌、胰腺癌中改变倍数最为显著,进一步分析*hnRNPA1* 在这三种肿瘤中的表达与临床病理资料的关系发现,*hnRNPA1* 在肝癌中的表达与TNM分期、浸润深度、肿瘤分化程度等相关,提示*hnRNPA1* 可能参与了肝癌的发生发展。胆管癌由于发病率低,TCGA数据库中肿瘤样本只有36例,而胰腺癌通常难以早期发现,I期样本相对较少,可能导致其阴性结果。

先前的研究多集中于研究*hnRNPA1* 在肿瘤细胞中的作用机制,评价其临床意义的报道较少。本研究利用TCGA完整的临床资料和基因表达数据,分析*hnRNPA1* 在不同消化系统肿瘤中的预后意义,结果发现*hnRNPA1* 与胰腺癌的预后相关,*hnRNPA1* 高表达水平的胰腺癌患者总生存时间更短。进一步多因素回归分析发现,*hnRNPA1* 表达独立于TNM分期及分化程度,提示*hnRNPA1* 是胰腺癌独立不良预后因素。有研究^[12-13]发现*hnRNPA1* 可调节KRAS-E2F1-ILK回路,促进胰腺癌细胞癌基因KRAS的表达,*hnRNPA1* 的表达与胰腺癌细胞侵袭性表型相关。研

究^[4]发现 *hnRNPA1* 可以作为一种转录抑制剂增加 *ZEB1* 蛋白表达量, 而不影响 *ZEB1* mRNA 表达, 促进胰腺癌细胞上皮间质转化。这些都提示 *hnRNPA1* 参与胰腺癌的多个生物学过程, 为胰腺癌的发病机制和靶向治疗拓展了方向。

本研究利用 TCGA 数据库的优势在于样本量大、临床资料完整。本研究系统性评价了 *hnRNPA1* 在消化系统肿瘤中的作用, 寻找消化系统肿瘤独立预后因素, 为进一步发现临床早期诊断标志物提供了新的思路。本研究的不足之处在于仅仅利用数据库进行探索, 需要进一步更深入地探讨 *hnRNPA1* 在胰腺癌中的具体作用机制。

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al., Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016. 66(2): p. 115-32.
- [2] GEUENS T, BOUHY D, TIMMERMAN V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease[J]. Hum Genet, 2016. 135(8): p. 851-67.
- [3] CHEN M, ZHANG J AND MANLEY J L. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA[J]. Cancer Res, 2010. 70(22): p. 8977-80.
- [4] LI S, XU H, DING H, et al., Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX[J]. J Pathol, 2009. 218(3): p. 327-36.
- [5] ZHANG P, FENG S, LIU G, et al. CD82 suppresses CD44 alternative splicing-dependent melanoma metastasis by mediating U2AF2 ubiquitination and degradation[J]. Oncogene, 2016. 35(38): p. 5056-69.
- [6] XU X, JOH H D, PIN S, et al. Expression of multiple larger-sized transcripts for several genes in oligodendrogliomas: potential markers for glioma subtype[J]. Cancer Lett, 2001. 171(1): p. 67-77.
- [7] BEYER A L, CHRISTENSEN M E, WALKER B W, et al. Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles[J]. Cell, 1977. 11(1): p. 127-38.
- [8] MATIJEVIC GLAVAN T, CIPAK GASPAROVIC A, VERILLAUD B, et al. Toll-like receptor 3 stimulation triggers metabolic reprogramming in pharyngeal cancer cell line through Myc, MAPK, and HIF[J]. Mol Carcinog, 2017. 56(4): p. 1214-1226.
- [9] SILIPO M, GAUTREY H, SATAM S, et al. How is Herstatin, a tumor suppressor splice variant of the oncogene HER2, regulated[J]? RNA Biol, 2016: p. 1-8.
- [10] USHIGOME M, UBAGAI T, FUKUDA H, et al. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers[J]. Int J Oncol, 2005. 26(3): p. 635-40.
- [11] PARK W C, KIM H R, KANG D B, et al. Comparative expression patterns and diagnostic efficacies of SR splicing factors and HNRNPA1 in gastric and colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2016. 16: p. 358.
- [12] CHU P C, KULP S K, BEKAIL-SAAB T, et al. Targeting integrin-linked kinase to suppress oncogenic KRAS signaling in pancreatic cancer[J]. Small GTPases, 2016: p. 1-5.
- [13] CHU P C, YANG M C, KULP S K, et al. Regulation of oncogenic KRAS signaling via a novel KRAS-integrin-linked kinase-hnRNPA1 regulatory loop in human pancreatic cancer cells[J]. Oncogene, 2016. 35(30): p. 3897-908.
- [14] KUMAR K, CHOW C R, EBINE K, et al. Differential regulation of ZEB1 and EMT by MAPK-interacting protein kinases (MNK) and eIF4E in pancreatic cancer[J]. Mol Cancer Res, 2016. 14(2): p. 216-27.

[收稿日期] 2017-10-11

[修回日期] 2017-11-20

[本文编辑] 韩丹