

• 临床基础 •

基于数据库分析 *RRM2* 在肝细胞癌中的表达及其预后意义

王海明, 王建华

天津市北辰区中医医院 外科, 天津 300400

摘要:目的 探讨核糖核苷酸还原酶亚单位 M2 (*RRM2*) 在肝细胞癌组织中的表达情况及其临床特征、预后相关性。方法 检索肿瘤基因组图谱 (TCGA) 数据库获取肝细胞癌转录组数据和临床相关资料数据, 提取 *RRM2* 在肝细胞癌和癌旁组织中的表达数据, 采用 COX 单因素、多因素分析 *RRM2* 与肝细胞癌患者临床和预后相关性。利用 The Human Protein Atlas (HAP) 数据库检索 *RRM2* 蛋白在肝细胞癌中的表达情况。**结果** 肝细胞癌组织中 *RRM2* 蛋白和 mRNA 表达均显著高于癌旁组织, 且 I、II 期肝细胞癌组织中 *RRM2* 表达显著高于 III、IV 期癌组织 ($P < 0.01$)。*RRM2* 表达情况与肝细胞癌患者预后呈负相关 ($P < 0.01$)。COX 单因素、多因素分析显示, 肝细胞癌组织中 *RRM2* 表达水平、TNM 分期是影响肝细胞癌预后的独立因素。**结论** *RRM2* 在肝细胞癌发生发展过程中可能发挥促进作用, 是影响肝细胞癌患者预后的独立危险因素, 其可能成为早期诊断肝细胞癌的分子标志物和判断预后的潜在指标, 为 *RRM2* 抑制剂的研发提供理论基础。

关键词: 核糖核苷酸还原酶亚单位 M2; 肝细胞癌; 肿瘤基因组图谱; 预后

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)12-2326-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.12.007

Analysis of *RRM2* expression in hepatocellular carcinoma and its prognostic significance based on data excavation

WANG Hai-ming, WANG Jian-hua

Department of Surgery, Tianjin Beichen Chinese Medicine Hospital, Tianjin 300400, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of ribonucleotide reductase subunit M2 (*RRM2*) gene and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The HCC transcriptome data and clinical data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, the expression data of *RRM2* in HCC and adjacent tissues was extracted, and COX single factor and multivariate were used to analyze the clinical and prognostic correlation between *RRM2* and HCC patients. The Human Protein Atlas (HAP) database was used to analyze the expression of *RRM2* protein in HCC. **Results** *RRM2* protein and mRNA were highly expressed in adjacent tissues, and the expression level of *RRM2* in stage I and stage II HCC tissue was significantly higher than that in stage III and stage IV cancer tissue ($P < 0.01$). Statistical analysis showed that the expression of *RRM2* was negatively correlated with the prognosis of HCC patients ($P < 0.01$). COX univariate and multivariate analysis showed that the expression level of *RRM2* and TNM stage in HCC tissues were independent factors affecting the prognosis of HCC. **Conclusion** *RRM2* may play a promoting role in the occurrence and development of HCC and is an independent risk factor affecting the prognosis of HCC patients. It may become a molecular marker for early diagnosis of HCC and a potential indicator for prognosis, providing a theoretical basis for the development of *RRM2* inhibitors.

Key words: ribonucleotide reductase subunit M2; hepatocellular carcinoma; TCGA; prognostic

肝细胞癌是全球范围内最常见实体恶性肿瘤之一, 其发病率位居恶性肿瘤第 7 位, 是全球第 3 大癌症相关致死原因^[1]。2019 年国家癌症中心最新

统计数据显示, 肝细胞癌占原发性肝癌 90% 以上, 发病率位居恶性肿瘤第 3 位, 死亡率位居第 2 位^[2]。肝细胞癌具有起病隐匿、肿瘤异质性强、预后很差

收稿日期: 2020-10-11

作者简介: 王海明 (1988—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为肿瘤免疫调控。E-mail: whmishere@126.com

等特征, 总体5年生存率仅为12.5%^[3-4]。因此, 从分子生物学角度研究肝细胞癌的发生发展机制, 发现更有效的分子诊断标志物、预后指标和治疗靶点是改进目前肝细胞癌临床治疗现状的重要课题之一。*RRM2* 是核糖核苷酸还原酶 (ribonucleotide reductase, RR) 亚单位之一, 而 RR 是脱氧核糖核苷酸合成过程中的重要酶类, 同时也是 DNA 合成、修复过程中的关键酶。研究发现, RR 在细胞增殖和分化过程中发挥着重要调控作用, 而持续增殖是恶性肿瘤的十大特征之一^[5]。*RRM2* 在多种恶性肿瘤组织中呈高表达状态, 发挥着促癌作用^[6]。因此, *RRM2* 在肝细胞癌发生、发展分子机制中的潜在作用和临床意义值得探讨。本研究通过检索肿瘤基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 分析 *RRM2* 在肝细胞癌中的表达, 探究其与临床、预后的相关性, 为进一步研究 *RRM2* 提供思路。

1 资料与方法

1.1 TCGA 数据的获取和筛选

TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 是世界上目前最大的癌症相关基因信息的数据库, 其主要采用基因组测序分析技术, 从转录组学、表观遗传组学、蛋白质组学等多个层面分析癌症发生发展的分子机制。从 TCGA 官网分别下载 LIHC 中格式为 FPKM 的转录组数据和临床资料数据, 数据下载截止时间节点为 2020 年 10 月 3 日, 使用 Perl 5.32.0.1 软件对原始数据进行整理, 并获得基因表达矩阵。转录组数据共 424 例, 其中包括 50 例癌旁组织和 374 例肝细胞癌组织数据。临床资料数据共 377 例, 通过剔除生存资料缺失、TNM 分期不详和病理分级不完整的样本, 最后共得到 345 例临床资料完整的病例。

1.2 肝细胞癌和癌旁组织中 *RRM2* mRNA 和蛋白表达量筛选和分析

RRM2 在 mRNA 水平的表达采用 R 语言 “limma” 包对上述基因表达矩阵进行分析, 得到肝细胞癌和癌旁组织各样本中 *RRM2* 表达数据, 并进行统计分析。*RRM2* 在蛋白水平的表达情况通过采用人类蛋白质表达图谱 (The Human Protein Atlas, HAP) 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>)^[7] 中收集的 *RRM2* 在肝细胞癌和正常组织中免疫组织表达结果进行分析。

1.3 *RRM2* 表达情况与 TNM 分期、预后相关性分析

数据库中 TNM 分期根据美国癌症联合委员会

(AJCC) 7 版分期方法进行分期。根据上述已获得的 *RRM2* 表达水平矩阵和临床数据资料, 结合 III、IV 期临床病例情况, 将 TNM 分期分为 I + II 期组、III + IV 期组, 分析 *RRM2* 表达对肝细胞癌各组中的表达情况。整理 TCGA 获取的临床资料中生存相关数据, 并结合 *RRM2* 表达水平矩阵, 使用 R 语言中的 “survival” 包, 分析 *RRM2* 表达与肝细胞癌生存情况之间的关系, 以 *RRM2* 表达水平的中位值为分组标准。采用 Kaplan-Meier Plotter 数据库 (<http://www.kmplot.com/analysis/>)^[8] mRNA RNA-seq 中肝细胞癌相关数据对上述结果进行验证。

1.4 肝细胞癌预后独立影响因素的分析

整理 TCGA 中已获得的 *RRM2* 表达数据和临床信息, 包括性别、年龄、组织学分化程度、TNM 分期, 对影响因素进行 COX 单因素分析, 分析影响肝细胞癌预后的影响因素。进一步采用 COX 多因素分析探究影响肝细胞癌预后的独立影响因素。

1.5 统计学分析方法

采用 R4.0.2 软件进行统计学分析。两组之间 *RRM2* 表达量采用 Wilcoxon 秩和检验。*RRM2* 表达量与肝细胞癌患者预后关系采用 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-rank 检验。利用 COX 单因素和多因素分析影响肝细胞癌患者预后的独立因素。

2 结果

2.1 *RRM2* mRNA 和蛋白水平在肝细胞癌组织和正常组织中表达情况

检索 TCGA 数据库得到 50 例癌旁组织和 374 例肝细胞癌组织数据, 将筛选得到数据分为癌旁组织组、肝细胞癌组, 分析结果显示肝细胞癌组织、癌旁组织中 *RRM2* mRNA 平均表达值分别为 6.38、0.47, 两组之间比较具有统计学差异 ($P = 3.179 \times 10^{-26}$), 见图 1。

采用 HAP 在线网站分析 *RRM2* 蛋白表达水平, 结果表明 *RRM2* 蛋白在肝正常组织中呈低表达或无法检测出, 在肝癌组织中呈相对高表达状态, 见图 2。

2.2 *RRM2* 表达与肝细胞癌患者 TNM 分期相关性分析

TCGA 数据库中肝细胞癌患者相关病理分期或 *RRM2* 表达值缺失病例共 32 例, 将其剔除; 鉴于 III、IV 期两组病例数较少, 故将 I + II 期和 III + IV 期分别整合在一起分为两组。其中 I + II 期共 257 例, III + IV 期共 90 例。两组进行统计学分析, 结果显

示 I + II 期组中 *RRM2* 表达值显著低于 III + IV 期组, 差异有统计学差异 ($P=0.034$), 见图 3。

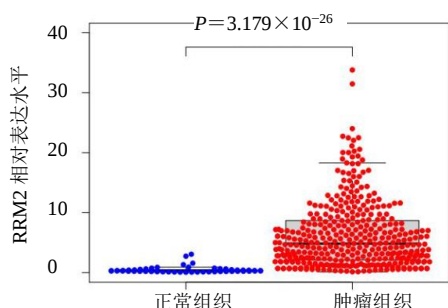


图1 *RRM2* 在肝细胞癌肿瘤组织和正常组织中的表达
Fig. 1 *RRM2* expression in HCC tumor and normal tissue

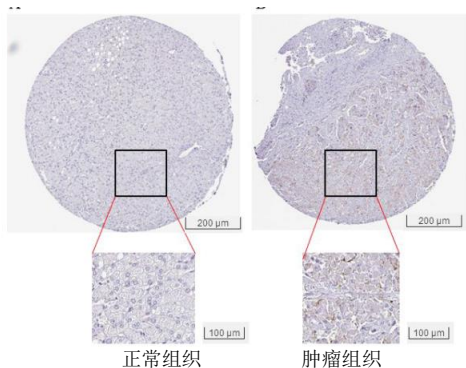


图2 肝细胞癌正常组织和肿瘤组织中 *RRM2* 蛋白表达情况
Fig. 2 Expression of *RRM2* protein in HCC normal tissues and tumor tissues

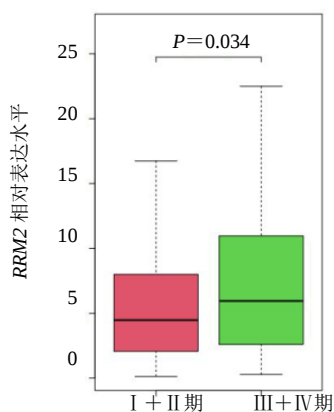


图3 肝细胞癌肿瘤组织 *RRM2* 表达与 TNM 分期相关性
Fig. 3 Correlation analysis of *RRM2* expression in tumor tissues of HCC patients and TNM

同时将肝细胞癌患者 II、III、IV 期中 *RRM2* 表达值分别与 I 期比较, 发现随着 TNM 分期的增加, *RRM2* 表达值亦呈增加趋势, 且 II、III 期与 I 期比较差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 结果见表 1。

表1 肝细胞癌肿瘤组织中 *RRM2* 表达与 TNM 分期相关性
Table 1 Correlation analysis of *RRM2* expression in HCC tumor tissues and TNM staging in TCGA database

TNM 分期	O R 值	95%可信区间 (CI)	P 值
I 期	—	—	—
II 期	2.685	1.581~4.619	0.000 3**
III 期	2.507	1.477~4.306	0.000 7**
IV 期	0.398	0.020~2.760	0.414 1

与 I 期比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

2.3 *RRM2* 表达与肝细胞癌患者预后相关性分析

经过筛选 TCGA 数据库所得临床相关数据, 共得到具有完整随访信息患者 370 例, 其中存活患者 240 例, 死亡患者 130 例。采用 R 语言中“survival”包, 以 *RRM2* 表达值中位数为分组依据分为高、低表达组, 分析两组之间生存情况。结果显示 *RRM2* 高表达组患者 3、5 年生存率分别为 53.2%、40.9%; 同期低表达组患者生存率分别为 69.5%、52.6%, 具有统计学差异 ($P<0.01$), 见图 4。

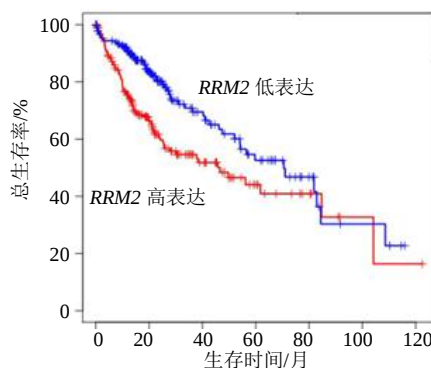


图4 肝细胞癌患者癌组织样本中 *RRM2* 表达与预后的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis of *RRM2* expression and prognosis in cancer tissue samples of HCC patients

采用 Kaplan-Meier Plotter 数据库对上述结果进行验证, 所得结果相一致。结果显示 *RRM2* 低表达组患者的总体生存时间、无进展生存时间均优于高表达组, 具有统计学差异 ($P<0.01$), 见图 5。

2.4 肝细胞癌患者预后影响因素分析

整合 TCGA 数据库中包含 *RRM2* 表达值、存活状态、年龄、性别、TNM 分期、组织学分级等因素的信息, 共得到符合要求的肝细胞癌患者 345 例。

采用 COX 单因素分析方法对上述因素进行分析,结果显示 *RRM2* 表达水平、TNM 分期均与肝细胞癌预后关系密切 ($P=4.94\times 10^{-7}$ 、 2.31×10^{-6}), 见

表 2。多因素分析结果表明,*RRM2* 表达水平和 TNM 分期均为影响肝细胞癌患者预后的独立因素, 具有统计学差异 ($P<0.01$)。

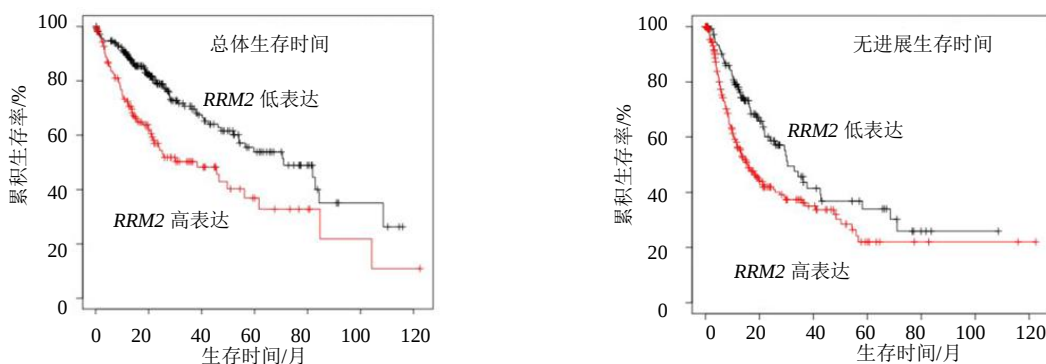


图 5 KM Plotter 数据库肝细胞癌患者 *RRM2* 与预后的相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis of *RRM2* and prognosis of HCC patients by KM Plotter database

表 2 肝细胞癌患者各种因素与预后的 COX 单因素分析

Table 2 COX univariate analysis of various factors and prognosis of HCC patients

参数	OR 值	95%可信区间 (CI)	P 值
年龄	1.013	0.998~1.029	0.095 1
性别	0.911	0.617~1.345	0.638 4
组织学分级	0.955	0.640~1.425	0.822 3
TNM 分期	2.231	1.524~3.268	0.000 037 1
<i>RRM2</i> 表达	1.424	1.188~1.707	0.000 1

3 讨论

我国是全球肝细胞癌的高发地区之一, 世界范围内每年肝细胞癌发病和死亡人数的 50% 以上均来源于我国^[9]。同时我国肝细胞癌发病中位年龄明显低于欧洲、北美等地区, 平均发病年龄为 52 岁, 为我国社会带来了严重的负担^[10]。近年来随着肝细胞癌领域分子生物学和免疫靶向治疗学科的发展, 防治、总死亡率方面有了显著改善, 但是肝癌驱动基因仍未确定, 导致总体治疗效果仍不理想。因此, 从基因、分子层面研究肝细胞癌致病、进展机制, 挖掘更多有效的用于早期诊断和预后因素评估方面的生物标志物是目前迫切需要解决的问题。

RRM2 又名核糖核苷酸还原酶亚单位 M2, 是核糖核苷酸还原酶重要组成单位之一, 参与 DNA 合成和修复等生物过程, 影响肿瘤细胞增殖、分化和侵袭迁移。目前研究报道, *RRM2* 在乳腺癌^[11]、人胶质母细胞瘤^[12]、宫颈癌^[13]、非小细胞肺癌^[14]中呈相对高表达状态, 且在多种肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移等过程中发挥着重要作用。*RRM2* 在肝

细胞癌中的作用也有少量报道, 但是多数均是通过体外试验验证。本研究通过收录分析 TCGA 数据库中肝细胞癌相关转录组和临床资料信息, 分析 *RRM2* 在肝细胞癌中的表达情况及其对预后的影响, 同时探究其作为免疫抑制剂潜在作用靶点的可能性。

RRM2 在多种恶性肿瘤中主要通过调控肿瘤细胞的增殖、侵袭等生物学行为起着促癌基因的作用, 但具体分子机制尚不清楚。Xue 等^[15]研究报道, 裸鼠皮下卵巢癌细胞 SKOV3 细胞中 *RRM2* 表达被干扰, 可以有效抑制卵巢癌细胞生长。本研究通过对 TCGA 数据库中肝细胞癌相关转录组数据进行分析, 结果提示 *RRM2* 在肝细胞癌组织中呈显著高表达状态; 同时从蛋白层面进行验证, 发现 *RRM2* 蛋白在肝正常组织几乎检测不到, 在肝细胞癌组织显著呈高表达状态。结果与目前研究报道的结论符合。*RRM2* 与多种恶性肿瘤病理分期和预后相关。Chang 等^[16]研究报道, 结直肠癌中 *RRM2* 呈过表达状态, 与其病理分期和不良预后关系密切。实验通

过将 TCGA 中肝细胞癌相关转录组数据和临床信息综合整理, 进行进一步统计分析发现, 随着肝细胞癌 TNM 分期的增加, *RRM2* 亦呈显著增加趋势, 且具有统计学差异。结合文献报道, 推测 *RRM2* 是影响肝细胞癌患者 TNM 分期的潜在危险因素。生存分析结果显示, *RRM2* 高表达组患者 3、5 年总体生存率显著低于低表达组患者。同时使用 Kaplan-Meier Plotter 数据库对 *RRM2* 作为预后标志物的可能性进行验证, 结果显示其在预测总体生存时间、无进展生存时间具有良好的区分能力。间接提示 *RRM2* 在肝细胞癌患者预后方面具有可靠性和可操作性。最后采用 COX 单因素和多因素对 TCGA 所得肝细胞癌相关信息进行综合分析, 结果提示 *RRM2* 表达水平、TNM 分期是影响肝细胞癌患者预后的独立因素, 进一步侧面证实 *RRM2* 作为肝细胞癌患者预后分子标志物的可靠性。结合既往研究报道的干扰或沉默肿瘤细胞中 *RRM2* 可以抑制肿瘤细胞增殖、转移的结论, 推测 *RRM2* 将来亦可以成为肝细胞癌免疫治疗的潜在靶点, 为肝细胞癌的治疗提供更多的思路。

综上所述, 本研究通过整合分析 TCGA 数据库中肝细胞癌相关信息, 发现 *RRM2* 在肝细胞癌中呈过表达状态, 且具有预测预后的能力。同时结合目前 *RRM2* 在肿瘤中的生物学功能, 推测 *RRM2* 亦可能成为肝细胞癌免疫治疗的潜在药物靶点。认为 *RRM2* 可能在肝细胞癌的发生、发展过程中发挥促癌作用, 其可以作为评估肝细胞癌危险度分级、预后和免疫治疗靶点的生物学标志物。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19-28.
- [3] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the global burden of disease study [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(4): 524-548.
- [4] 应倩, 汪媛. 肝癌流行现况和趋势分析 [J]. *中国肿瘤*, 2020, 29(3): 185-191.
- [5] Moses C, Garcia-Bloj B, Harvey A R, et al. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation [J]. *Eur J Cancer*, 2018, 93: 10-18.
- [6] Mazzu Y Z, Armenia J, Chakraborty G, et al. A novel mechanism driving poor-prognosis prostate cancer: Overexpression of the DNA repair gene, ribonucleotide reductase small subunit M2 (*RRM2*) [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(14): 4480-4492.
- [7] Tebani A, Gummesson A, Zhong W, et al. Integration of molecular profiles in a longitudinal wellness profiling cohort [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4487.
- [8] Györfy B, Lanczky A, Eklund A C, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22, 277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1, 809 patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123(3): 725-731.
- [9] Zeng H M, Chen W Q, Zheng R S, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: A pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): e555-e567.
- [10] Park J W, Chen M S, Colombo M, et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: The BRIDGE Study [J]. *Liver Int*, 2015, 35(9): 2155-2166.
- [11] Chen W X, Yang L G, Xu L Y, et al. Bioinformatics analysis revealing prognostic significance of *RRM2* gene in breast cancer [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(4): BSR20182062.
- [12] Li C, Zheng J F, Chen S, et al. *RRM2* promotes the progression of human glioblastoma [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10): 6759-6767.
- [13] Ma J J, Zhang F, Sun P. miR-140-3p impedes the proliferation of human cervical cancer cells by targeting *RRM2* to induce cell-cycle arrest and early apoptosis [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(3): 115283.
- [14] Huang N, Guo W, Ren K, et al. LncRNA AFAP1-AS1 suppresses miR-139-5p and promotes cell proliferation and chemotherapy resistance of non-small cell lung cancer by competitively upregulating *RRM2* [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1103.

[15] Xue T, Wang L, Li Y, *et al.* SiRNA-mediated RRM2 gene silencing combined with cisplatin in the treatment of epithelial ovarian cancer *in vivo*: An experimental study of nude mice [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(11): 1510-1516.

[16] Chang C C, Lin C C, Wang C H, *et al.* miR-211 regulates the expression of RRM2 in tumoral metastasis and recurrence in colorectal cancer patients with a *k-ras* gene mutation [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 8107-8117.