

• 论 著 •

RNA 结合蛋白 LARP6 影响胃癌浸润及预后



胡仁旺, 龚建平

华中科技大学同济医学院附属同济医院胃肠外科(武汉 430000)

【摘要】 目的 研究 La 相关蛋白 6 (LARP6) 基因表达对胃癌患者预后的影响, 并探讨其与免疫细胞浸润量的关系。方法 通过癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库, 下载胃癌患者的临床生存信息及基因表达谱信息, 分析 LARP6 基因表达和患者临床特征的关系, 并采用 Cox 比例风险回归模型探索影响患者预后的危险因素, 再利用 Kaplan Meier plotter 数据库验证。然后结合 TIMER 免疫数据库探索 LARP6 基因表达与免疫细胞浸润量的相关性, 及其对胃癌患者预后的影响。结果 胃癌患者中, LARP6 基因的表达与病理分期、T 分期和 N 分期有关 ($P < 0.05$), 但与 M 分期和性别无关 ($P > 0.05$)。多因素 Cox 比例风险回归分析结果表明, 年龄和 LARP6 基因表达均是预后的影响因素 ($P < 0.05$)。进一步采用 Kaplan Meier plotter 数据库进行验证, 结果也表明, LARP6 基因高表达胃癌患者的总体生存 (OS) 和无进展生存 (PFS) 情况均差于 LARP6 基因低表达的患者 ($P < 0.001$)。根据 TIMER 数据库探索 LARP6 基因在胃癌患者中的表达水平与免疫细胞浸润量的相关性, 结果表明, LARP6 基因在胃癌患者中的表达水平与 $CD4^+$ T 细胞和巨噬细胞浸润量呈正相关关系 ($P < 0.001$), 且高浸润量的巨噬细胞和高 LARP6 基因表达均是影响患者术后生存的危险因素 ($P < 0.05$)。结论 巨噬细胞浸润量和 LARP6 基因表达是胃癌患者预后的影响因素, 可以用来判断临床预后, LARP6 基因可能是胃癌治疗的新靶点。

【关键词】 胃癌; La 相关蛋白 6; RNA 结合蛋白; 预后

RNA binding protein LARP6 affects invasion and prognosis of gastric cancer

HU Renwang, GONG Jianping

Department of Gastrointestinal Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College in Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, P. R. China

Corresponding author: GONG Jianping, Email: jpgong@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of La-related protein 6 (LARP6) gene on the survival of postoperative patients with gastric cancer, and to explore its relationship with immune cell infiltration. **Methods** The clinical survival information and gene expression information of gastric cancer patients were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The relationship between LARP6 gene expression and clinical characteristics of patients were analyzed. Cox proportion hazard regression model was used to find out the prognostic risk factors of gastric cancer patients, and then Kaplan-Meier plotter database was used to verify. Then the correlation between LARP6 gene expression and immunity was proved by Tumor IMMune Estimation Resource (TIMER) immune database. **Results** In gastric cancer patients, the expression of LARP6 gene was related to pathological stage, T stage, and N stage ($P < 0.05$), but not related to M stage and sex ($P > 0.05$). Multivariate Cox proportion hazard regression analysis showed that age [$HR=2.022$, 95% CI was (1.287, 3.176), $P=0.002$] and LARP6 gene expression [$HR=1.176$, 95% CI was (1.070, 1.293), $P < 0.001$] were prognostic factors. Further verified by Kaplan Meier plotter database, the results also showed that the overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) of gastric cancer patients with high expression of LARP6 gene were worse than those with low expression of LARP6 gene ($P < 0.001$). TIMER database was used to explore the correlation between the expression level of LARP6 gene and immune cell infiltration in patients with gastric cancer, and the results showed that the expression level of LARP6 gene in gastric cancer patients was positively correlated with the infiltration number of $CD4^+$ T cells and macrophage cell ($P < 0.001$). Log-rank results showed that infiltration number of macrophage cell and LARP6 gene expression were risk factors for clinical prognosis of gastric cancer patients ($P < 0.05$). **Conclusions** Macrophage cell and cell and LARP6

DOI: 10.7507/1007-9424.202003058

通信作者: 龚建平, Email: jpgong@tjh.tjmu.edu.cn



gene expression are risk factors for gastric cancer patients. LARP6 may be a new target for the treatment of gastric cancer.

【Keywords】 gastric cancer; La-related protein 6; RNA binding protein; prognosis

La 相关蛋白 (LARP) 是一种 RNA 的结合磷蛋白, 位于细胞核内, 在真核生物中普遍表达, 含有 RNA 识别模体, 可以参与 RNA 的翻译与转录过程, 保护 RNA、避免其被核酸酶降解, 促进 RNA 的合成, 影响基因的表达及蛋白磷酸化^[1-3]。LARP 可以被称为 RNA 的分子伴侣, 早期的研究认为它可以促进乙肝病毒 RNA 的复制^[4], 并根据其通路的相关研究, 发现了治疗乙肝患者的靶向药物。La 蛋白抑制剂 (HBSC11) 能较好地抑制乙肝病毒的活性^[5-6]。近年来的研究发现, LARP 与肿瘤的发生和发展也有密切的关系^[7], 其作为一种 RNA 结合蛋白, 可以影响肿瘤的进展^[8], 但目前关于 LARP 的具体调控机制尚不清楚。本研究主要探索 LARP6 基因表达对胃癌术后患者生存的影响, 验证其是否为胃癌术后患者预后的独立危险因素。

1 资料与方法

1.1 LARP6 基因的表达与胃癌患者临床特征和预后的相关性分析

通过癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库官网 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 提取胃癌的基因表达谱和临床信息数据, 提取表达谱中 LARP6 基因的表达数据, 并将其与临床特征和生存信息合并, 以进一步探讨它们之间的关系。

1.1.1 LARP6 基因表达的影响因素分析 将纳入患者的 LARP6 基因表达水平以中位值为界分为高低表达 2 组 (中位数纳入低表达组, 后同), 进行 logistic 回归分析。采用非条件 logistic 回归分析探索 LARP6 基因表达的影响因素。

1.1.2 LARP6 基因表达对胃癌患者预后的影响 利用 Cox 风险比例回归分析进行预后影响因素的单因素分析和多因素分析, 探索影响生存的危险因素。

1.2 以 Kaplan Meier plotter 数据库验证 LARP6 基因表达对胃癌患者预后的影响

以 Kaplan Meier plotter 数据库 (<http://kmpplot.com/analysis/>) 验证 LARP6 基因表达是否为胃癌患者预后的危险因素。Kaplan Meier plotter 数据库中的临床信息及基因表达信息同时包含 GEO、EGA 和 TCGA 数据库, 数据量更大, 因而更具有说服力。

1.3 LARP6 基因表达与免疫细胞浸润数量的相关性及其对预后的影响

TIMER (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) 是

一个可以在线分析各种肿瘤类型患者临床预后与基因表达和免疫细胞浸润相关性的数据库^[9-11], 其临床数据来源于 TCGA 数据库。根据该数据库, 采用 Spearman 秩相关性分析方法探索胃癌患者 LARP6 基因表达和免疫细胞浸润数量的相关性, 并采用 log-rank 方法分析 LARP6 基因表达对胃癌患者预后的影响。

1.4 统计学方法

本研究所有分析在 R 软件 (3.6.0 版本) 中进行, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 LARP6 基因的表达与胃癌患者临床特征和预后的相关性分析结果

2.1.1 临床信息与测序信息合并结果 通过数据整理, 考虑到并非每例患者均有全基因组测序信息, 因此将患者的临床信息与基因测序信息合并。为避免患者基因测序信息过多丢失, 影响结果的可靠性, 初步纳入了 375 例同时具有临床信息和基因测序信息的胃癌患者。375 例患者的年龄为 58 ~ 73 岁, 中位年龄为 67 岁; 男 241 例, 女 134 例; 病理分期: I 期 53 例, II 期 111 例, III 期 150 例, IV 期 38 例, 未知分期 23 例; T 分期: T1 期 19 例, T2 期 80 例, T3 期 168 例, T4 期 100 例, Tx 期 8 例; N 分期: N0 期 111 例, N1 期 97 例, N2 期 75 例, N3 期 74 例, Nx 期 16 例, 未知分期 2 例; M 分期: M0 期 330 例, M1 期 25 例, Mx 期 20 例。

2.1.2 LARP6 基因表达影响因素的 logistic 回归分析 单独对各个病理分期进行分析时, 剔除临床信息的缺失值或不明值 (如 Tx、Nx 和 Mx 分期)。因为临床数据中 T 分期、N 分期、M 分期等数据在不同的患者中会有不同程度的缺失, 为了避免患者信息删除过多, 影响结果的可靠性, 因此在分析 T 分期时不考虑病理分期、N 分期、M 分期等临床特征的缺失情况, 其他指标都采用此种方法。结果显示: 与病理 I 期比较, II ~ IV 期, 单独 II、III 和 IV 期胃癌患者的 LARP6 基因的表达水平较高 ($OR>1, P<0.05$); 与 T1 期比较, T2 ~ 4 期, 单独 T2、T3 和 T4 期胃癌患者 LARP6 基因的表达水平较高 ($OR>1, P<0.05$); 与 N0 期比较, N1 ~ 3 期和单独 N1 期胃癌患者 LARP6 基因的表达水平较高 ($OR>1, P<0.05$)。具体见表 1。这提示随肿瘤进



表1 LARP6 基因表达的影响因素分析结果

临床特征	n	OR (95%CI)	P 值
病理分期-1 (II ~ IV 比 I)	352	2.405 (1.312, 4.565)	0.006
病理分期-2			
II 比 I	164	2.679 (1.363, 5.426)	0.005
III 比 I	203	2.679 (1.138, 4.285)	0.021
IV 比 I	91	2.679 (1.116, 6.292)	0.029
T 分期-1 (T2 ~ 4 比 T1)	367	5.714 (1.863, 24.882)	0.006
T 分期-2			
T2 比 T1	99	5.607 (1.705, 25.460)	0.010
T3 比 T1	187	5.607 (2.008, 27.823)	0.004
T4 比 T1	119	5.607 (1.523, 22.11)	0.016
M 分期 (M1 比 M0)	355	1.304 (0.577, 3.020)	0.525
N 分期-1 (N1 ~ 3 比 N0)	357	1.636 (1.042, 2.584)	0.033
N 分期-2			
N1 比 N0	208	1.930 (1.115, 3.369)	0.020
N2 比 N0	186	1.930 (0.763, 2.487)	0.289
N3 比 N0	185	1.930 (0.872, 2.858)	0.133
性别 (男比女)	375	0.863 (0.565, 1.316)	0.493

展, LARP6 基因表达水平升高。但 M 分期与性别对 LARP6 基因表达无影响 ($P>0.05$)。以上结果显示, 随着肿瘤的进展, LARP6 基因的表达水平有逐渐升高趋势, 提示 LARP6 基因表达水平可能是一个预测肿瘤分期及预后的指标。

2.1.3 LARP6 基因表达与患者预后的关系 删除临床随访时间缺失及短于 30 d 的患者信息, 进行生存分析。纳入患者 334 例, 随访时间范围为 30 d ~ 3720 d, 中位随访时间为 411 d。生存分析结果 (图 1a) 显示, LARP6 基因高表达组的 1、3 和 5 年生存率分别为 73.3%、37.1% 和 25.5%, LARP6 基因低表达组的 1、3 和 5 年生存率分别为 80.9%、55.9% 和 42.2%, LARP6 基因高表达组的生存情况差于低表达组, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=5.6, P=0.018$)。

2.1.4 Cox 比例风险回归模型分析影响临床预后的危险因素 利用 R 软件进行 Cox 比例风险回归模型的单因素和多因素回归分析, 并绘制森林图 (图 1b 和图 1c)。从图 1b 可以看出, 年龄、病理分期、T 分期、M 分期、N 分期和 LARP6 基因表达的 P 值均小于 0.05, 说明均是预后的影响因素。然后再进行多因素 Cox 比例风险回归分析 (图 1c), 结果发现, 年龄 [$HR=2.022, 95\% CI (1.287, 3.176), P=0.002$] 和 LARP6 基因表达 [$HR=1.176, 95\% CI (1.070, 1.293), P<0.001$] 是预后的影响因素, 高龄和 LARP6 基因高表达是影响其术后生存的独立危险因素, 可

以用来预测患者的预后情况。

2.2 相关数据库验证

本研究进一步采用 Kaplan Meier plotter 数据库验证 LARP6 基因表达是否为预后的危险因素。以 LARP6 基因表达水平的中位值为界, 将胃癌患者分为高 LARP6 基因表达组和低表达组。结果显示: LARP6 基因高表达胃癌患者的总体生存 (OS) 和无进展生存 (PFS) 情况均差于 LARP6 基因低表达的患者 ($P<0.001$)。具体见图 1d 和图 1e。

2.3 LARP6 基因表达与免疫细胞浸润量的相关性

相关分析结果 (图 1f-1k 和表 2) 表明: LARP6 基因在胃癌患者中的表达水平与 $CD4^+$ T 细胞 ($r_s=0.312, P<0.001$) 和巨噬细胞 ($r_s=0.353, P<0.001$) 浸润量明显相关, 均具有统计学意义。进一步研究免疫细胞浸润量和 LARP6 基因表达与患者生存的关系, 其结果 (图 1l-1r) 显示: 高浸润量的巨噬细胞和高 LARP6 基因表达均是影响患者术后生存的危险因素 ($P<0.01$)。

3 讨论

随着生物学的发展及基因测序的不断普及, 近年来大多数学者认为, microRNA、非编码 RNA (ncRNA) 及 RNA 结合蛋白 (RBPs) 明显影响着基因的表达^[12-13]。目前已经有相关文献证实, LARP 是序列高度保守的影响 RNA 翻译和转录的 RNA 结合蛋白 (RBP)^[12]。近年来相关文献报道, LARP 蛋白参与不同肿瘤发展的调控, 与宫颈癌^[14]、卵巢癌^[15]、前列腺癌^[16]、非小细胞肺癌^[17]、神经胶质瘤^[18]、乳腺癌^[19]、口腔鳞状细胞癌^[20]、结直肠癌和肝癌的预后密切相关, 其中高表达 LARP1 蛋白的消化系统肿瘤 (如肝癌^[21]和结直肠癌^[22]) 患者的生存时间明显短于低表达者。

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤, 近年来, 其发病率有逐年升高的趋势, 严重威胁着人们的生命健康。随着手术技术的进步及化疗药物的不断发展, 胃癌术后患者的总体生存率有了一定程度的提高, 但目前仍缺乏有效的治疗胃癌的靶向药物。胃癌的发病机制尚不清楚, 本研究发现, 编码 LARP6 蛋白的基因可能是影响胃癌患者术后生存的独立危险因素。通过对 LARP6 基因表达量的分析, 发现其与病理分期、T 分期和 N 分期有关, 随着肿瘤的进展, 其表达量有逐渐增高的趋势, 而 M 分期与其表达无关, 可能是由于 M1 期患者数量太少所致。通过 Cox 比例风险回归分析, 进一步验证了 LARP6 基因表达为其独立的预后危险因素, 因此我们可以

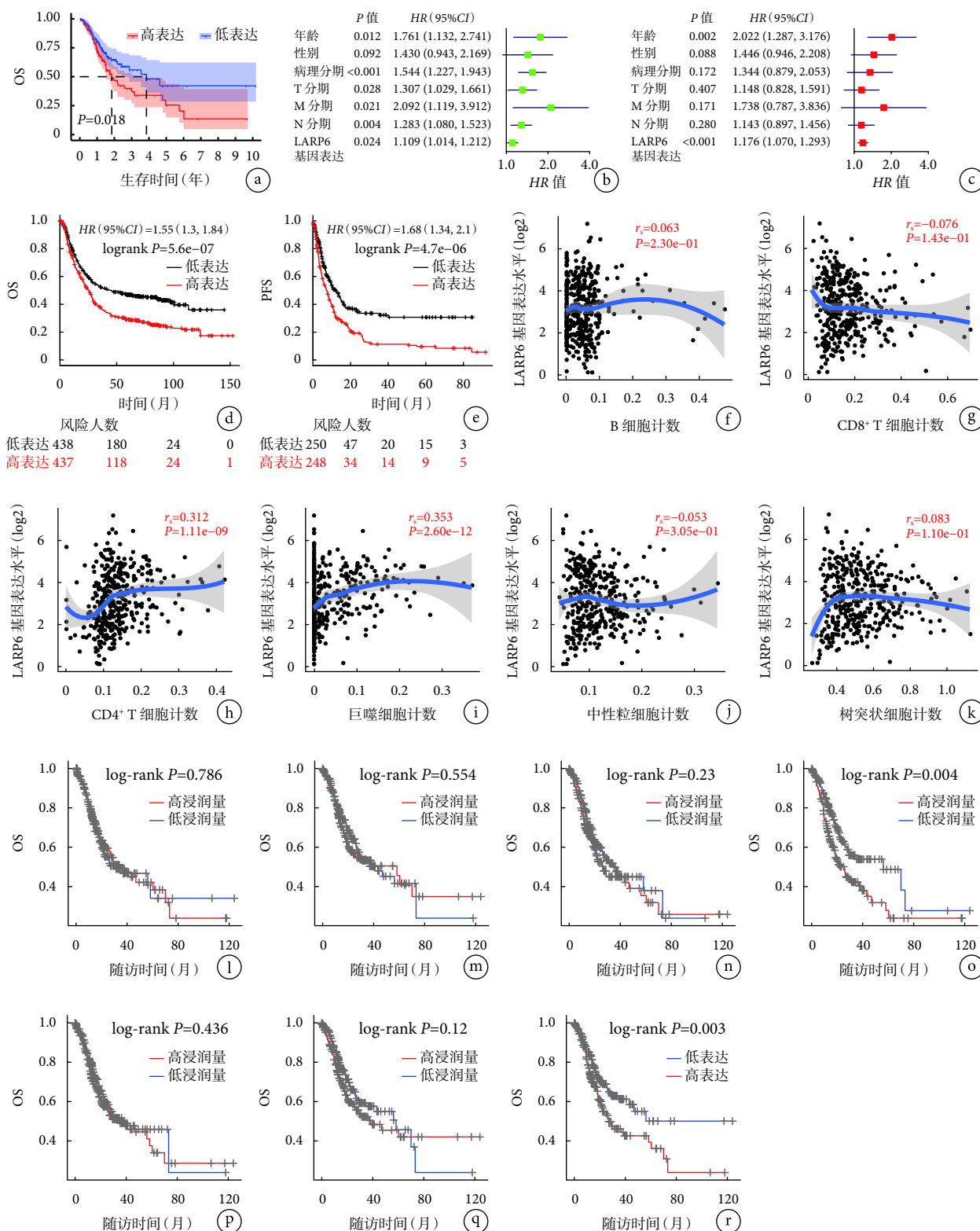


图 1 示根据不同数据库资料绘制的 LARP6 基因不同表达组的 OS 曲线、PFS 曲线及单因素和多因素 Cox 比例风险回归分析结果，LARP6 基因表达水平与免疫细胞浸润量相关性的散点图，以及免疫细胞不同浸润量和 LARP6 基因不同表达组的 OS 曲线

a-c: 示 TCGA 数据库资料的 LARP6 基因高表达组和 LARP6 基因低表达组的 OS 曲线，颜色区域表示置信区间 (a)、单因素 (b) 和多因素 (c) Cox 比例风险回归分析结果；d 和 e: 采用 Kaplan Meier plotter 数据库绘制的 LARP6 基因高表达组和 LARP6 基因低表达组的 OS (d) 和 PFS (e) 曲线；f-k: 示 TIMER 数据库资料的 LARP6 基因表达水平与 B 细胞 (f)、CD8⁺ T 细胞 (g)、CD4⁺ T 细胞 (h)、巨噬细胞 (i)、中性粒细胞 (j) 和树突状细胞 (k) 浸润量相关性的散点图；l-r: 示 TIMER 数据库资料的不同 B 细胞 (l)、CD8⁺ T 细胞 (m)、CD4⁺ T 细胞 (n)、巨噬细胞 (o)、中性粒细胞 (p) 和树突状细胞 (q) 浸润量以及不同 LARP6 基因表达水平 (r) 患者的 OS 曲线，以中位值为界将免疫细胞浸润量分高低 2 组

表 2 LARP6 基因表达水平与免疫细胞浸润量的相关性

细胞类型	相关系数 (r_s)	P 值
B 细胞	0.063	0.230
CD8 ⁺ T 细胞	-0.076	0.143
CD4 ⁺ T 细胞	0.312	<0.001
巨噬细胞	0.353	<0.001
中性粒细胞	-0.053	0.305
树突状细胞	0.083	0.110

通过测量 LARP6 基因的表达量来预测患者的预后情况。同时,本研究也发现,年龄为影响胃癌术后生存的独立风险因素。为了避免单一数据库说明问题的局限性,本研究又在 Kaplan Meier plotter 数据库验证 LARP6 基因表达是否为影响患者术后生存的危险因素,其中 Kaplan Meier plotter 数据库中的临床信息及基因表达信息同时包含 GEO、EGA 和 TCGA 数据库,数据量更大,更具有说服力,结果与 TCGA 数据库相同。通过 TIMER 免疫数据库的进一步探索,本研究发现,巨噬细胞浸润量和 LARP6 基因表达为胃癌患者临床预后的风险因素,且巨噬细胞浸润量还与 LARP6 基因在胃癌组织中的表达量相关,因此我们也许可以重点关注巨噬细胞与胃癌发病机制的联系。

本研究主要利用 TCGA 的胃癌基因表达谱数据和临床相关信息进行分析,并利用其他数据库进行验证,使结果更为可靠。近年来,LARP 蛋白家族与肿瘤的相关性,以及其促进肿瘤的发生发展有较多文献的报道,我们也应该关注 LARP6 基因与胃癌患者预后的关系,重点加大对 LARP6 基因富集分析通路的研究。胃癌的免疫治疗,近年来引起越来越多学者的注意^[23]。其中巨噬细胞与肿瘤的进展转移^[24]、免疫治疗调节^[25]、肿瘤微环境^[26]等方面的关系也有较多报道,因此我们需要重视肿瘤患者中巨噬细胞的浸润水平。同时也需加大巨噬细胞与 LARP6 基因表达相关性的研究,寻找胃癌治疗的新靶点^[27]。总之,本研究提示,巨噬细胞浸润量和 LARP6 基因表达是胃癌患者术后的独立影响因素,可以用来判断临床预后,LARP6 基因可能是胃癌治疗的新靶点。

重要声明

利益冲突声明:本文全体作者阅读并理解了《中国普外基础与临床杂志》的政策声明,我们没有相互竞争的利益。

作者贡献声明:文章由胡仁旺独立撰写成稿,龚建平进行文章审核。

参考文献

- Maraia RJ, Mattijssen S, Cruz-Gallardo I, et al. The La and related RNA-binding proteins (LARPs): structures, functions, and evolving perspectives. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017, 8(6): 10.1002/wrna.1430.
- Wolin SL, Cedervall T. The La protein. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 375-403.
- Sommer G, Dittmann J, Kuehnert J, et al. The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene*, 2011, 30(4): 434-444.
- Tang J, Zhang ZH, Liu GL. A systematic analysis of the predicted human La protein targets identified a hepatitis B virus infection signature. *J Viral Hepat*, 2013, 20(1): 12-23.
- Tang J, Huang ZM, Chen YY, et al. A novel inhibitor of human La protein with anti-HBV activity discovered by structure-based virtual screening and *in vitro* evaluation. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36363.
- Tong S, Pan J, Tang J. Study on the structure optimization and anti-hepatitis B virus activity of novel human La protein inhibitor HBSC11. *J Med Virol*, 2019, 91(10): 1818-1829.
- Stavraka C, Blagden S. The La-related proteins, a family with connections to cancer. *Biomolecules*, 2015, 5(4): 2701-2722.
- Mura M, Hopkins TG, Michael T, et al. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression. *Oncogene*, 2015, 34(39): 5025-5036.
- Li T, Fu J, Zeng Z, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(W1): W509-W514.
- Li T, Fan J, Wang B, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Res*, 2017, 77(21): e108-e110.
- Li B, Severson E, Pignon JC, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 174.
- Kechavarzi B, Janga SC. Dissecting the expression landscape of RNA-binding proteins in human cancers. *Genome Biol*, 2014, 15(1): R14.
- Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*, 2012, 149(6): 1393-1406.
- 陈昆仑, 吴怡, 李牧, 等. RNA 结合蛋白 La 在宫颈癌组织中的表达及临床意义. *南方医科大学学报杂志*, 2013, 33(7): 999-1003.
- Egiz M, Usui T, Ishibashi M, et al. La-related protein 4 as a suppressor for motility of ovarian cancer cells. *Tohoku J Exp Med*, 2019, 247(1): 59-67.
- Kato M, Goto Y, Matsushita R, et al. MicroRNA-26a/b directly regulate La-related protein 1 and inhibit cancer cell invasion in prostate cancer. *Int J Oncol*, 2015, 47(2): 710-718.
- Xu Z, Xu J, Lu H, et al. LARP1 is regulated by the XIST/miR-374a axis and functions as an oncogene in non-small cell lung carcinoma. *Oncol Rep*, 2017, 38(6): 3659-3667.
- Koso H, Yi H, Sheridan P, et al. Identification of RNA-binding protein LARP4B as a tumor suppressor in glioma. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2254-2264.
- Ji X, Lu H, Zhou Q, et al. LARP7 suppresses P-TEFb activity to inhibit breast cancer progression and metastasis. *Elife*, 2014, 3: e02907.
- Sommer G, Rossa C, Chi AC, et al. Implication of RNA-binding protein La in proliferation, migration and invasion of lymph node-metastasized hypopharyngeal SCC cells. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25402.
- Xie C, Huang L, Xie S, et al. LARP1 predict the prognosis for early-stage and AFP-normal hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*, 2013, 11: 272.
- Ye L, Lin ST, Mi YS, et al. Overexpression of LARP1 predicts poor prognosis of colorectal cancer and is expected to be a potential therapeutic target. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 14585-14594.
- 黄理宾, 陈海宁, 杨廷翰, 等. 胃癌的免疫治疗. *中国普外基础与临床杂志*, 2019, 26(7): 779-784.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010, 141(1): 39-51.
- De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell*, 2013, 23(3): 277-286.
- Cianciaruso C, Beltraminelli T, Duval F, et al. Molecular profiling and functional analysis of macrophage-derived tumor extracellular vesicles. *Cell Rep*, 2019, 27(10): 3062-3080.
- Al-Ejeh F, Darby JM, Brown MP. The La autoantigen is a malignancy-associated cell death target that is induced by DNA-damaging drugs. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 2): 5509s-5518s.

收稿日期: 2020-03-12 修回日期: 2020-06-24

本文编辑: 罗云海