

LBR 基因低表达与甲状腺癌的相关性研究

周婷婷, 翁一如, 叶恭杰

【摘要】目的 探讨 LBR 基因低表达与甲状腺癌的相关性。**方法** 本研究利用 TCGA 大数据分析, 探究 LBR 在甲状腺癌中的表达, 并且寻找在不同亚型中的表达差异; 通过甲基化、免疫浸润分析、免疫荧光和免疫组化等方法探讨 LBR 基因低表达在甲状腺癌发生及发展中的作用。**结果** 本研究发现 LBR 在甲状腺癌中低表达, 且在不同亚型中存在表达差异 ($P < 0.05$); ROC 曲线分析显示 LBR 在甲状腺癌中有良好的诊断效能; 通过甲基化分析发现 LBR 表达与启动子区两个甲基化位点均呈负相关 (均 $P < 0.05$), 免疫浸润分析发现 LBR 表达与嗜酸性粒细胞、辅助型 T 细胞及中央记忆型 T 细胞浸润均呈正相关 (均 $P < 0.05$); 此外, 研究发现 LBR 与 TP53 存在共表达和共定位, 提示 LBR 的抑癌作用或与 TP53 有关。**结论** LBR 基因的低表达可能会促进甲状腺癌的发生及发展。

【关键词】 甲状腺癌; LBR 基因; 低表达

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.03.004

【中图分类号】 R736.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)03-0294-04

The correlation between Low expression of LBR and Thyroid Cancer

ZHOU Tingting, WENG Yiru, YE Gongjie (Ningbo Medical Center Lihuili Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the correlation between low expression of LBR gene and thyroid cancer. **Methods** In this study, TCGA data analysis was used to explore the expression of LBR in thyroid cancer, and to find the different expression in different subtypes. The role of LBR gene in the genesis and development of thyroid cancer was investigated by methylation, immunoinfiltration analysis, immunofluorescence and immunohistochemistry. **Results** LBR was down-regulated in thyroid cancer, and there were differences of expression among all subtypes ($P < 0.05$). The ROC curve showed that LBR had a good diagnostic effect of thyroid cancer. The methylation analysis revealed that LBR expression was negatively correlated with two methylation sites in the promoter region (all $P < 0.05$). Immunoinfiltration analysis revealed a positive correlation between LBR expression and infiltration of eosinophils, helper T cells, and central memory T cells (all $P < 0.05$). Besides, the co-expression and localization of LBR with TP 53 were found, suggesting that the tumor suppressor effect of LBR may be regulated by TP 53 expression. **Conclusions** Low expression of LBR promotes the occurrence and development of thyroid cancer.

【Key words】 Thyroid cancer; LBR gene; Low expression

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(3):294-297]

甲状腺癌(thyroid carcinoma, TC)是最常见的内分泌恶性肿瘤, 占每年新诊断癌症的 3.4%^[1]。而高分化甲状腺癌 (highly differentiated thyroid cancer, WDTC) 又占 TC 病例的大部分^[2]。手术切除是大多数 TC 患者的标准治疗方法。低风险 WDTC 患者可单纯通过手术治疗, 而高风险 WDTC 患者可能需要

结合抑制促甲状腺素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 和放射碘治疗 (radioiodine therapy, RAI)^[3]。目前晚期 TC 患者生存期较差, 表明缺乏有效的治疗策略。因此, 寻找优质的生物标志物对 TC 的诊疗具有重要意义。

层粘连蛋白 B 受体 (lamin B receptor, LBR) 基因编码的蛋白属于甾醇还原酶基因 4/甾醇还原酶基因 24 (sterol reductase 4/sterol reductase 24, ERG4/ERG24) 家族, 定位于核膜内, 它可能介导与染色质和层蛋白 B 之间的相互作用, 影响骨骼发育^[4]。研究表明

基金项目: 宁波市医学科技计划项目 (2021Y01); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2023KY1043)

作者单位: 315040 宁波, 宁波市医疗中心李惠利医院

通信作者: 叶恭杰, Email: yegongjie5431@126.com

LBR 在细胞分裂、分化和增殖中具有重要意义,且参与 DNA 复制、细胞周期进程和基因沉默过程^[5]。尽管 LBR 在基因转录调控方面具有强大功能,但其在肿瘤中的作用机制尚不明确。本研究拟通过癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库对比 LBR 在 TC 与癌旁的表达,分析 LBR 表达与亚型之间的关系,并明确甲基化调控 LBR 表达以及与免疫浸润的关系,探究 LBR 与 TP53 之间的表达关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择来源于 TCGA 数据库的 RNA-seq 数据,利用 DNA 甲基化交互式可视化数据库(DNA methylation interactive visualization database, DNMIIVD)网站进行甲基化分析;在时代 2.0 (Timer2.0)网站进行免疫浸润分析。

细胞与试剂:人甲状腺癌乳状细胞(BcPAP)细胞系购自普诺赛生物科技公司,抗体 Anti-Lamin B Receptor/LBR antibody [E398L](货号:ab32535, Abcam)、p53(1C12) Mouse mAb(货号:2524, CST)、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠(货号:SA00001-1, PTG)、HRP 标记羊抗兔(货号:SA00001-2, PTG)、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI)溶液(货号:28718-90-3, 索莱宝)、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(20x)(货号:DA1010, 索莱宝)、荧光素 5-异硫氰酸酯(FITC)标记羊抗鼠(货号:SA00003-1, PTG)、花青素 3 (CY3) 标记羊抗鼠(货号:SA00009-2, PTG)。免疫组化:选取一对高分化 II 型 TC 与癌旁组织进行免疫组化实验。本研究经宁波市医疗中心李惠利医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 数据获取 应用 R 包“TCGA-biolinks”下载和读取 TCGA RNA-seq 数据,提取“每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本数(TPM)”测序数据,临床信息包括亚型、治疗及生存等,形成表达矩阵; R 版本:R version 4.2.2。

1.2.2 差异分析和相关性分析 读取上述获得基因表达矩阵,并进行癌与癌旁分组,加载“DESeq2”包,构建 DESeq2 所需的 DESeqDataSet 对象,过滤掉低表达的基因;使用 DESeq 进行差异表达分析,并使用 ggplot 提取、分析 LBR 基因表达差异并作图。

1.2.3 受试者操作特征曲线(ROC)分析 使用 pROC 和 ggplot2 包在 R 语言中绘制 ROC 曲线。

1.2.4 甲基化分析 利用 DNMIIVD(<http://119.3.41.228/dnmivd/index/>)网站,以关键词:LBR; thyroid carcinoma 进行分析,通过皮尔逊(Pearson)相关性分析并做图。

1.2.5 免疫浸润分析 免疫浸润分析在 Timer2.0 网站(<http://timer.cistrome.org/>)进行,进入免疫评估模块,以输入基因:LBR; 免疫亚群,进行 LBR 基因表达与免疫各亚群的相关性分析,筛选相关性系数 $r > 0.4$ 的免疫亚群进行展示。

1.2.6 免疫荧光 将 BcPAP 细胞铺入细胞爬片中培养 2 d 后,使用多聚甲醛固定,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗,使用 Triton X-100 破膜、牛血清白蛋白(BSA)封闭,一抗过夜, FITC 或 CY3 标记的二抗孵育, DAPI 染色,显微镜获取图片。

1.2.7 免疫组化 将高分化 II 型 TC 与癌旁组织放入 4%的甲醛中固定 1 周,取出放入正丁醇中脱水处理,并经石蜡包埋处理,制作石蜡切片。在 55 °C 的恒温箱中烤片 30 min,把切片放入脱蜡液中,依次用脱蜡液、无水乙醇处理,并用流水冲洗,完成脱蜡和水化;把切片放入 3%双氧水中,孵育 5 ~ 10 min,并用流水清洗,致使内源性过氧化物酶灭活;使用微波炉加热,进行抗原修复,高火 2 min,两次;使用 5%的山羊血清室温封闭 30 min; 4 °C 孵育一抗 LBR 抗体、TP53 抗体过夜;用 PBS 洗 3 次;二抗孵育室温 1 h;用 PBS 洗 3 次后, DAB 溶液显色 30 s,洗去 DAB 工作液,使用苏木素进行复染,用流水清洗,将切片置于无水乙醇中浸泡 10 s,高温干燥;加入中性树脂封片。

1.3 统计方法 采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,使用配对 t 检验分析 TC 与癌旁组织的 LBR 表达差异, LBR 与 TP53 共表达的相关性采用线性分析, LBR 表达的检验效能分析采用 ROC 曲线分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LBR 基因在甲状腺癌中的表达 RNA-seq 数据来源于 TCGA 数据库,其中 TC 患者 571 例,癌旁组织 59 例,结果显示 LBR 在 TC 中低表达 ($P < 0.05$), 见封三图 1; LBR 在 TC 中低于癌旁 ($P <$

0.05), 见封三图 2; LBR 在经典型 PTC 中高于滤泡型, 癌旁高于 PTC 任何亚型(均 $P < 0.05$), 见封三图 3。ROC 曲线分析结果显示 LBR 在 TC 诊断中有较好的诊断效果($AUC=0.80$, $95\%CI: 0.74 \sim 0.86$)。

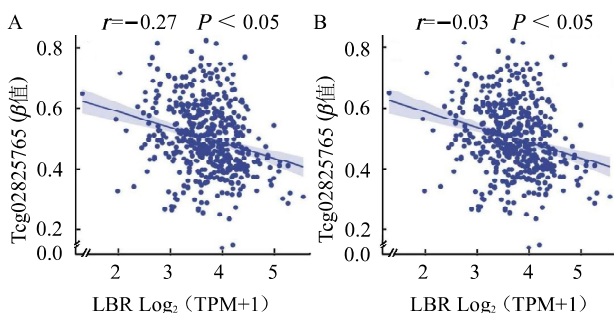
2.2 LBR 低表达与高甲基化的相关性 LBR 启动子区的甲基化检测发现位点 cg02825765、cg24834199 甲基化水平与 LBR 表达均呈负相关($r=-0.27$ 、 -0.03 , 均 $P < 0.05$), 见图 1。LBR 表达与嗜酸性粒细胞、辅助型 T 细胞及中央记忆型 T 细胞浸润均呈正相关($r=0.45$ 、 0.53 、 0.41 , 均 $P < 0.05$), 见图 2。

2.3 LBR 低表达与 TP53 相关并存在共定位情况 免疫荧光检测发现 LBR 与 TP53 在细胞核中共定位, 见图 3; 免疫组化检测显示 TP53、LBR 在肿瘤中均低表达, 见图 4; 此外, 相关性分析发现 LBR 与 TP53 呈正相关($r=0.47$, $P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论

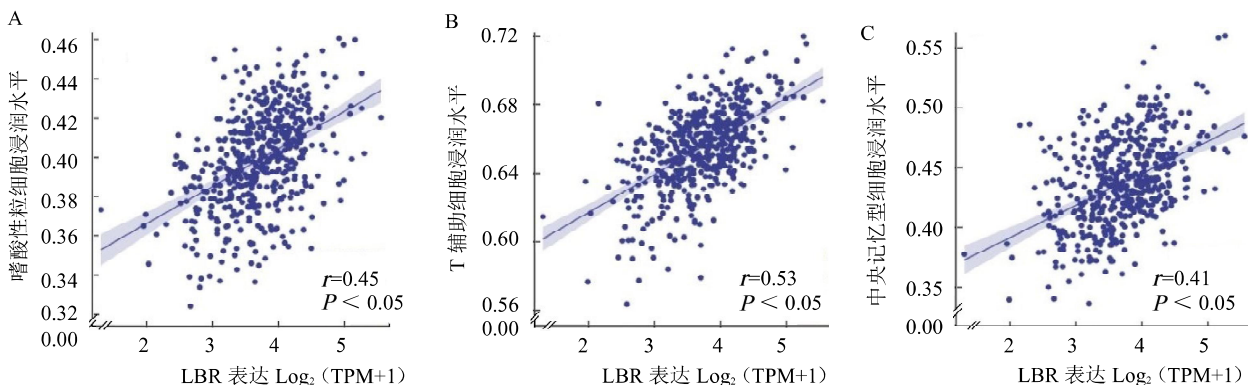
TP53 是一种抑癌因子, 在细胞周期、DNA 修复和凋亡中具有多方面的调节功能^[6]。失活的 TP53 突变已在约 50% 的人类癌症中被鉴定^[7]。这些突变不仅在肿瘤进展中很重要, 而且对一些肿瘤的化疗和放疗反应也很重要^[8]。TP53 突变见于 14% 的恶性甲状腺肿瘤, 在低分化和间变性肿瘤中更常见。此外, 辐射相关 TC 的 TP53 突变率(15.4%)与自发性肿瘤相似, 尽管在两组肿瘤中突变的残基存在非常显著的异质性^[9]。在辐射相关 TC 中突变的残基均未涉及 CpG 脱氨。根据 TP53 超变异性的证据, TC 似乎表现出显著的基因组不稳定性。本研究发现 TP53 表达、定位与 LBR 相关; 然而, 两者的调控关系需要后序实验证明。

以往研究表明, LBR 表达与组织分化和发育有关, Solovei 等^[10]发现在小鼠模型中, LBR 的表达下调导致核外周异染色质的缺失。部分研究报道 LBR 选择性与异染色质或 Lamin B TUDOR 结构域相互作用, 诱导染色质压缩和抑制转录。染色质致密化可通过与特定组蛋白修饰标记的染色质区域结合, 如二甲基化的 Lys 20 组蛋白 H4 (H4K20me2) 而介导。虽然压缩本身会导致转录抑制, 但 LBR 也会招募转录抑制因子, 如 HP1 等。另一方面, 异染色质的形态和定位是调控肿瘤发生、发展的关键因素, Zhu 等^[11]研究发现 BRCA1 蛋白具有促进泛素化修饰的组蛋白 H2A 在臂间异染色质区域富集的作用,



注: A 为位点 cg02825765 甲基化水平与 LBR 表达的相关性, B 为位点 cg24834199 甲基化水平与 LBR 表达的相关性

图 1 LBR 与甲基化的相关性



注: A 为 LBR 表达与嗜酸性粒细胞浸润的相关性, B 为 LBR 表达与辅助型 T 细胞浸润的相关性, C 为 LBR 表达与中央记忆型 T 细胞浸润的相关性

图 2 LBR 与免疫浸润的相关性

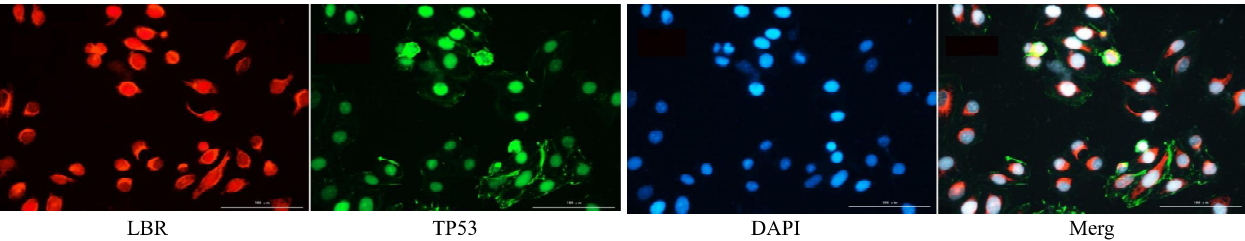


图 3 免疫荧光图 (标尺=100 μm)

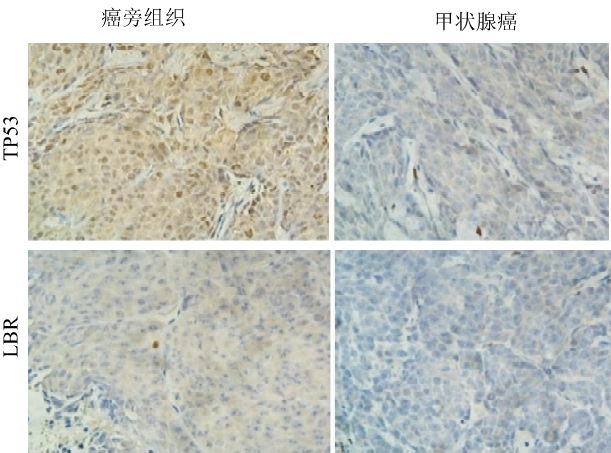


图 4 甲状腺癌免疫组化图 (DAPI 染色, ×400)

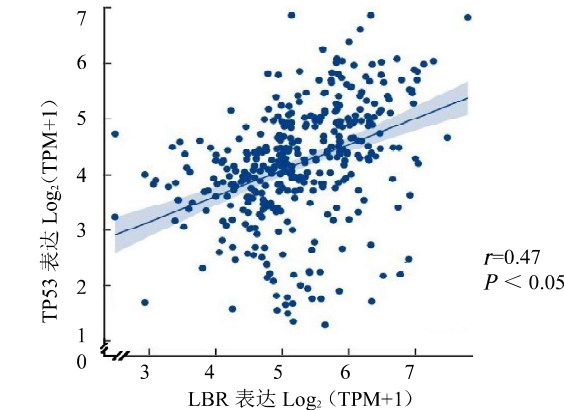


图 5 LBR 表达与 TP53 的相关性

BRCA1 缺失导致异染色质的异位, 并导致卫星 DNA 转录激活, DNA 断裂等基因组失稳表型, 而 LBR 低表达是否与甲状腺基因组稳定以及发生有关有待研究。此外, Tiago 等^[12]发现在小热休克蛋白 HSPB3 可以通过结合 LBR 并抑制其在核膜的定位, 增加肌生成。而肌生成相关基因表达如 SYNPO2、MYH2 与肿瘤抑制有关^[13], 这提示 LBR 低表达可能与低分化 TC 的发生及发展有关。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 周婷婷: 实验操作、论文撰写; 翁一如: 数据整理、统计学分析; 叶恭杰: 研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] LEIMBACH R D, HOANG T D, SHAKIR M K M. Diagnostic challenges of medullary thyroid carcinoma[J]. *Oncology*, 2021, 99(7):422-432.
- [2] XU B, GHOSSEIN R. Poorly differentiated thyroid carcinoma[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2020, 37(5):243-247.
- [3] MA D X, DING X P, ZHANG C, et al. Combined targeted therapy and immunotherapy in anaplastic thyroid carcinoma with distant metastasis: A case report[J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(12): 3849-3855.
- [4] ARAI R, EN A, TAKAUJI Y, et al. Lamin B receptor (LBR) is involved in the induction of cellular senescence in human cells[J]. *Mech Ageing Dev*, 2019, 178:25-32.
- [5] SMITH S, BLOBEL G. Colocalization of vertebrate lamin B and lamin B receptor (LBR) in nuclear envelopes and in LBR-induced membrane stacks of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(21):10124-10128.
- [6] DENEKA A Y, BACA Y, SEREBRIISKII I G, et al. Association of TP53 and CDKN2A mutation profile with tumor mutation burden in head and neck cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(9):1925-1937.
- [7] RAUSCH T, JONES D T, ZAPATKA M, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations[J]. *Cell*, 2012, 148(1-2):59-71.
- [8] COLOMBO C, POGGIAGHI G, TOSI D, et al. Thyroid cancer harboring *PTEN* and TP53 mutations: A peculiar molecular and clinical case report[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 949098.
- [9] KHAN M S, PANDITH A A, MASOODI S R, et al. Significant association of TP53 Arg72Pro polymorphism in susceptibility to differentiated thyroid cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15(4):459-465.
- [10] SOLOVEI I, WANG A S, THANISCH K, et al. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation[J]. *Cell*, 2013, 152(3):584-598.
- [11] ZHU Q, PAO G M, HUYNH A M, et al. BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing[J]. *Nature*, 2011, 477(7363):179-184.
- [12] TIAGO T, HUMMEL B, MORELLI F F, et al. Small heat-shock protein HSPB3 promotes myogenesis by regulating the lamin B receptor[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5):452.
- [13] ZHENG Z, SONG Y. Synaptodin-2: A potential tumor suppressor[J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1):158.

收稿日期:2023-09-10

(本文编辑:陈志翔)