

DOI:10.13232/j.cnki.jnju.2022.04.010

HMGB3 在乳腺癌中的预后和功能:基于生物信息学分析

王文艺¹, 徐佳玮², 顾 军^{1*}

(1. 南京大学医学院附属金陵医院普通外科研究所, 南京, 210002; 2. 南京医科大学金陵临床医学院, 南京, 211103)

摘 要: 为了探究高迁移率组盒 3 (HMGB3) 在乳腺癌中的表达、预后作用和功能, 利用 TIMER 数据库分析 HMGB3 在不同肿瘤中的表达情况和肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌患者累积生存的影响, 使用 GEPIA 和 UALCAN 分析 HMGB3 在乳腺癌和正常乳腺组织中的表达差异, 用 PrognScan 和 Kaplan-Meier Plotter 评估 HMGB3 在乳腺癌中的预后作用, 通过 Coexpedia 和 STRING 分析 HMGB3 在乳腺癌中的功能。发现 HMGB3 mRNA 和蛋白在乳腺癌中高表达, 预后分析显示 HMGB3 高表达预示乳腺癌患者不良预后, 且 HMGB3 高表达在 ER 阳性、淋巴结阳性和 TP53 突变患者中的预后更差。高水平的肿瘤免疫浸润提示乳腺癌患者可以达到更好的十年累积生存。在更低的 B 细胞、CD8+T 细胞、CD4+T 细胞、自然杀伤细胞、Th1 细胞浸润水平下, HMGB3 高表达与乳腺癌更差的预后有关; 在更高水平 Treg 细胞浸润下, 高 HMGB3 表达与乳腺癌更差的预后有关。功能分析显示 HMGB3 与其共表达基因在乳腺癌中主要参与调控 P53 通路、细胞周期信号通路和药物代谢。HMGB3 在乳腺癌中高表达且提示乳腺癌不良预后, 可作为乳腺癌的预后指标和潜在治疗靶点。

关键词: 乳腺癌, HMGB3, 生存分析, 生物信息学, 肿瘤浸润淋巴细胞

中图分类号: R730.7

文献标志码: A

The prognosis and function of HMGB3 in breast cancer: Based on bioinformatics analysis

Wang Wenyi¹, Xu Jiawei², Gu Jun^{1*}

(1. Research Institute of General Surgery, Affiliated Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, 210002, China; 2. School of Jinling Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing, 211103, China)

Abstract: The purpose of our research is to explore the expression, prognostic effect and function of high mobility group box 3 (HMGB3) in breast cancer. The TIMER database is used to analyze the expression of HMGB3 in different tumors and the effect of tumor infiltrating lymphocytes on the cumulative survival of breast cancer patients. GEPIA and UALCAN are applied to analyze the expression difference of HMGB3 between breast cancer tissues and normal breast tissues. PrognScan and Kaplan-Meier Plotter are utilized to evaluate the prognostic value of HMGB3 in breast cancer. Coexpedia and STRING are used to analyze the function of HMGB3 in breast cancer. The mRNA and protein expression levels of HMGB3 are highly expressed in breast cancer samples. Prognostic analysis shows that high HMGB3 expression predicts poor prognosis in breast cancer patients, and has a worse prognosis in ER-positive, lymph node-positive, and TP53 mutations breast cancer patients. In breast cancer, the high level of tumor infiltrating lymphocytes suggest better 10-year cumulative survival. High expression of HMGB3 is associated with poorer prognosis in breast cancer patients with lower B cells, CD8+T cells, CD4+T cells, natural killer cells, and Th1 cells infiltration levels. High expression of HMGB3 is correlated with worse prognosis in breast cancer patients with higher Treg cell infiltration level. HMGB3 and its co-expressed genes are mainly involved in p53

基金项目:江苏省科技项目(BE2017726)

收稿日期:2021-10-25

* 通讯联系人, E-mail: gujunjiangsu@outlook.com

signaling pathway, cell cycle signaling pathway and drug metabolism. HMGB3 is highly expressed in breast cancer and which indicates poor prognosis in breast cancer patients, and HMGB3 may be used as a prognostic indicator and potential therapeutic target for breast cancer.

Key words: breast cancer, high mobility group box 3 (HMGB3), survival analysis, bioinformatics, tumor infiltrating lymphocytes (TIL)

乳腺癌(Breast Cancer, BC)是全球发病率最高的肿瘤类型,也是女性肿瘤死亡的首要原因。2015年中国大约有303600例新发乳腺癌病例以及70400例乳腺癌死亡,预计到2030年中国乳腺癌的发病率和死亡率将继续增加^[1]。目前乳腺癌的治疗策略主要包括内分泌治疗、靶向治疗和化疗,雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子激素受体(HER-2)和Ki-67等是BC患者预测疗效的重要临床分子生物标志物。然而肿瘤的异质性和耐药性的出现使疗效显著降低,相同分子类型的BC预后也有差异,所以迫切需要确定新的治疗靶点和特定的生物标志物以提高BC患者的治疗疗效和预测预后的准确性。

高迁移率族框(High Mobility Group Box, HMGB)家族主要包括HMGB1, HMGB2和HMGB3,它们可以调节DNA复制、转录、重组和修复。HMGB家族基因在多种肿瘤中异常表达并发挥重要作用,有望成为肿瘤治疗的新靶点。其中, HMGB1和HMGB2在膀胱癌^[2]、皮肤鳞状细胞癌^[3]中过表达并与肿瘤进展相关, HMGB3在食管癌^[4]、膀胱癌^[5]和肝癌^[6]中过表达并提示不良预后。实验研究表明HMGB1过表达能增强乳腺癌血管生成^[7], HMGB1激活的成纤维细胞通过增加有氧糖酵解促进乳腺癌细胞转移^[8]。HMGB2在乳腺癌中表达高于正常乳腺组织, HMGB2表达是乳腺癌根治性切除术后的独立预后因素^[9]。但是目前HMGB3在乳腺癌中的表达情况、预后价值仍不明确,功能研究较少。此外,已经证实肿瘤浸润淋巴细胞(Tumor Infiltrating Lymphocytes, TIL)与多种肿瘤的预后相关,在免疫治疗中增强TIL水平在杀死肿瘤细胞方面具有非常显著的作用^[10],而不同种类TIL与乳腺癌预后的关系仍不明确。

癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,

TCGA)等大型数据库中存储了大量的癌症患者的临床信息及基因组、转录组、蛋白组等各个组学数据,利用各种在线分析工具可以对这些数据进行交互探索与分析。因此,本研究利用多种生物信息学方法进行数据库挖掘,探究HMGB3基因在乳腺癌中的表达、预后和功能。此外,还分析了不同TIL水平对乳腺癌预后的影响,并探究HMGB3与TIL影响乳腺癌预后的可能机制,旨在为临床提供有助于改进治疗设计和预测BC患者预后的潜在生物标志物。

1 资料与方法

1.1 TIMER数据库泛癌表达及免疫预后分析

TIMER (Tumor Immune Estimation Resource)数据库是一个基于TCGA的数据分析平台(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)^[11],通过TIMER的Diff Exp模块分析HMGB3在不同癌症中的表达情况,通过Survival模块计算不同免疫细胞浸润水平对肿瘤患者的预后影响。设置条件:

(1) Cancer Type: BRCA (Breast Invasive Carcinoma)。

(2) Immune Infiltrates: B cell, CD8+T cell, CD4+T cell, Macrophage, Neutrophil, Dendritic Cell。

(3) Kaplan - Meier Curve Parameters: Split Percentage of Patients 50%, Survival Time Between (Month) 120。

1.2 GEPIA和UALCAN表达分析

基因表达谱数据动态分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA, <http://gepia.cancer-pku.cn/>)^[12]数据库是一个基于TCGA和GTEx数据的网页分析工具,可提供差异表达分析、轮廓图绘制、患者生存分析、相关基因分析等功能。使用GEPIA分析乳腺癌和正常组织之间的表达差异。

筛选条件:

(1)Gene:HMGB3.

(2)Datasets Selection:BRCA,其他筛选框保持默认值.

UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/>)^[13]使用来自临床蛋白质组学肿瘤分析协会(Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium,CPTAC)证实或发现的数据集数据分析不同肿瘤蛋白质表达,可以通过UALCAN的“CPTAC analysis”功能探究HMGB3在乳腺癌和正常乳腺组织中的蛋白表达差异,利用UALCAN分析基于TCGA数据的乳腺癌的HMGB3启动子甲基化水平.

1.3 PrognScan 和 Kaplan-Meier Plotter 预后分析 PrognScan 数据库(<http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/PrognScan/index.html>)^[14]基于大量公共可得的癌症微阵列数据集分析其中特定基因表达与癌症患者预后之间的关系,例如总体生存期(Overall Survival,OS)、无病生存期(Disease Free Survival,DFS)、无远处转移生存期(Distant Metastasis Free Survival,DMFS)、无复发生存期(Relapse Free Survival,RFS)和疾病特异性生存期(Disease Specific Survival,DSS)等.本研究通过PrognScan数据库检索HMGB3不同表达对乳腺癌患者预后的影响.

Kaplan-Meier Plotter(<http://kmplot.com/analysis/>)^[15]是一种基于生物标志物评估的在线荟萃分析工具,能基于大型样本数据集来评估不同生物标志物的表达对不同癌症患者生存的影响.通过Kaplan-Meier Plotter数据库分析HMGB3表达在不同临床因素,包括ER、PR、HER2、分子分型、淋巴结转移、肿瘤分级和TP53突变状态下与乳腺癌患者的无复发生存期RFS和无远处转移生存期DMFS预后的关系.设置条件:

(1)Cancer:Breast Cancer.

(2)Gene:HMGB3.

(3)Split patients by:median.

(4)Survival:RFS或DMFS.

(5)Follow up threshold:all.

(6)Probe set options: only JetSet best probe set.

通过Kaplan-Meier Plotter数据库中的泛癌数据集进一步筛选不同免疫细胞浸润水平下的HMGB3表达对乳腺癌患者总生存的影响.筛选条件:

(1)Gene symbol:HMGB3.

(2)Split patients by:median.

(3)Survival:OS.

(4)Follow up threshold:all.

(5)Cancer:Breast cancer ($n=1090$).

1.4 Coexpedia 和 STRING 数据库功能分析

Coexpedia(<https://www.coexpedia.org/>)通过功能关联评估目的基因的共表达^[16],分析HMGB3在乳腺癌中的分子调控网络.筛选条件:

(1)Human gene:HMGB3.

(2)MeSH incl. Neoplasms: Breast Neoplasms.

STRING 数据库(<https://string-db.org/>)通过整合大量生物信息数据构建蛋白质-蛋白质互作网络并预测目标蛋白的生物学功能^[17].通过基因本体论(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)来进行目标基因的功能注释分析,显示细胞组成(Cellular Component,CC)、分子功能(Molecular Function,MF)、生物学过程(Biological Process,BP)和KEGG通路(KEGG Pathway)结果.筛选条件:

(1)List of name:输入HMGB3和通过Coexpedia获得的18个基因蛋白名称.

(2)Organism:Homo Sapiens.

(3)FDR<0.05.

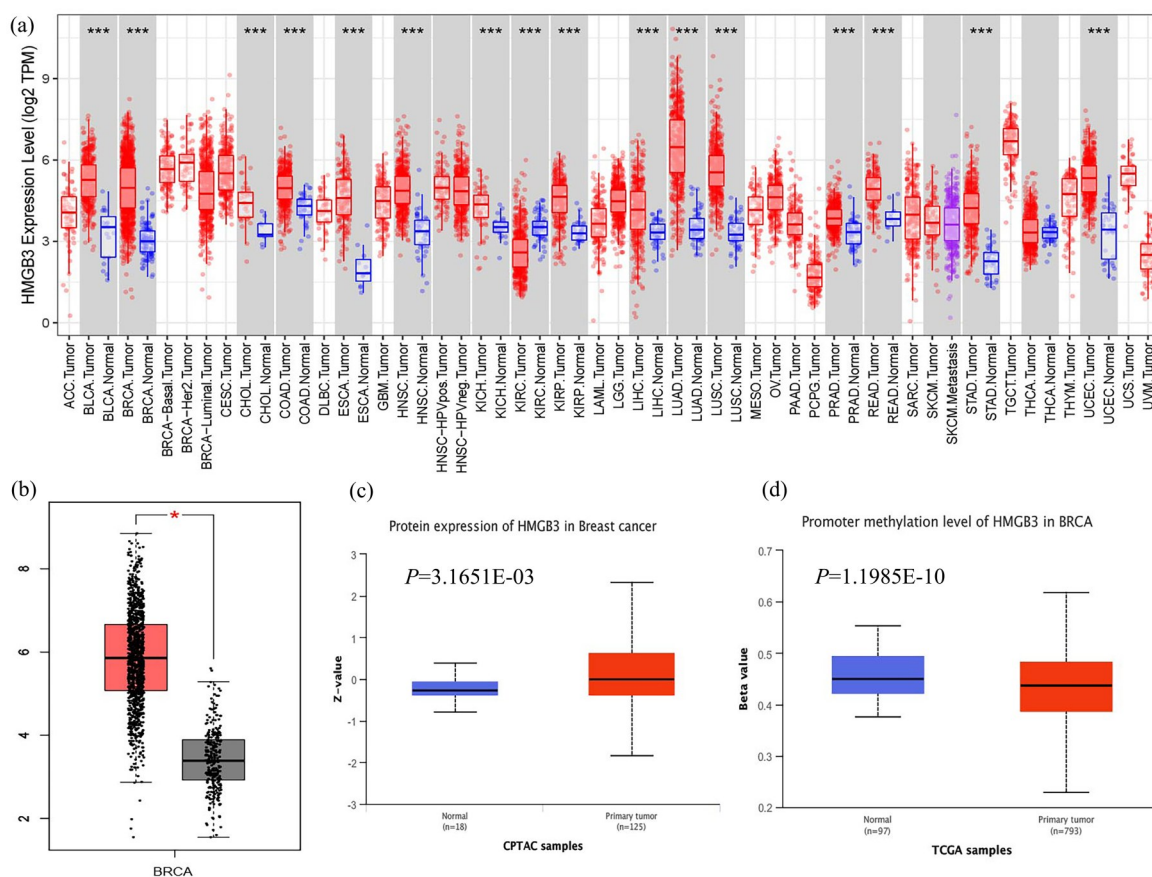
1.5 统计学方法 采用数据库默认的统计学分析方法.在GEPIA和UALCAN中,对正常组织与乳腺癌组织的差异分析采用独立样本 t 检验.在PrognScan中,使用单变量Cox回归模型来计算HR和P,应用R软件(版本4.0.4)将预后结果可视化.在对Kaplan-Meier Plotter的分析中,用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,用log-rank检验来分析HMGB3表达与乳腺癌患者生存之间的相关性.所有数据以 $P<0.05$ 视为有统计学意义.

2 结果

2.1 HMGB3在不同肿瘤中的表达情况 有研究报道HMGB3在多种癌症中过表达,本研究通过TIMER数据库分析得到了相似的结果。如图1a所示,HMGB3转录水平在多种肿瘤中高于正常组织,包括膀胱尿路上皮癌、乳腺癌、胆管癌、结肠腺癌、食道癌、头颈部鳞状细胞癌、嫌色肾细胞癌、肾乳头状细胞癌、肝细胞癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、前列腺腺癌、直肠腺癌、胃腺癌和子宫内膜癌。但在肾透明细胞癌中,正常组织中HMGB3

转录水平高于肿瘤组织。通过GEPIA进一步验证了HMGB3在乳腺癌中表达高于正常乳腺组织(图1b)。此外,通过UALCAN分析还可以发现,在蛋白表达水平上,乳腺癌中的HMGB3表达同样高于正常组织,如图1c所示。以上结果表明:乳腺癌中HMGB3转录水平和蛋白水平均高于正常组织,可能在乳腺癌的发生发展中发挥作用。

2.2 HMGB3的甲基化分析 已经观察到乳腺癌中HMGB3表达的显著增加,进一步探究HMGB3升高的原因。DNA甲基化是基因组表观遗传修饰中的重要事件,与疾病发生发展密切相



CPTAC: Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, 临床蛋白质组学肿瘤分析联盟;

TCGA: The Cancer Genome Atlas, 癌症基因组图谱; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图1 HMGB3表达水平及甲基化水平:(a) HMGB3基于TCGA数据分析的在不同类型肿瘤中的表达水平(TIMER);(b) HMGB3基于TCGA和GTEx数据分析的在乳腺癌和正常乳腺组织中的表达(GEPIA);(c) HMGB3蛋白在乳腺癌和正常乳腺组织中的表达(UALCAN);(d) HMGB3启动子甲基化水平在乳腺癌和正常乳腺组织中的表达(UALCAN)

Fig. 1 The expression level and methylation level of HMGB3:(a) HMGB3 expression in different types of tumors based on TCGA data analysis (TIMER), (b) HMGB3 expression in breast and normal breast tissues (GEPIA) based on TCGA and GTEx data analysis, (c) HMGB3 protein expression in breast and normal breast tissues (UALCAN), (d) expression level of HMGB3 promoter methylation in breast and normal breast tissues (UALCAN)

关^[18-19]. 基因甲基化与复制延迟、染色质浓缩和转录起始抑制有关,而低甲基化可导致基因组的不稳定性,并且可以激活相关基因^[20]. 因此,使用UALCAN数据库来分析乳腺癌中HMGB3启动子的甲基化水平. 发现与正常组织相比,乳腺癌中HMGB3启动子的甲基化水平降低,差异有统计学意义(图1d),提示乳腺癌可能通过下调HMGB3基因的甲基化修饰程度激活HMGB3基因,从而增加HMGB3表达.

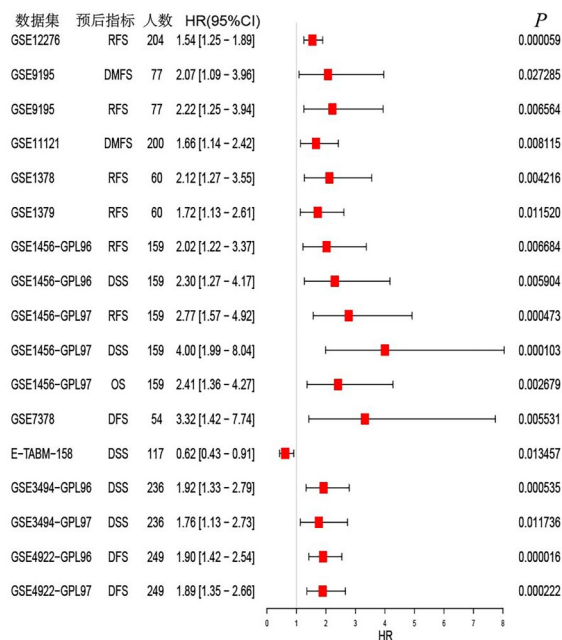
2.3 HMGB3基因在不同乳腺癌数据集中的预后

为了研究HMGB3表达的升高是否影响乳腺癌患者的预后,通过PrognScan数据库进一步探索HMGB3不同表达对乳腺癌患者预后的影响. 图2给出了21个GSE数据集中的13个数据集,其HMGB3的表达水平与乳腺癌患者预后相关($P < 0.05$),其余数据集,其表达结果无显著统计学差异,在此略去. 由图可见,GSE12276,GSE1378,

GSE1379数据集的HMGB3高表达与患者较差的RFS相关;GSE9195数据集的HMGB3高表达与患者不良DMFS和RFS相关;GSE11121数据集HMGB3高表达与患者较差的RFS相关;GSE1456 - GPL96, GSE1456 - GPL97 中的HMGB3高表达与患者不良DFS和RFS相关, GSE1456-GPL97中的HMGB3高表达还与患者不良OS相关;GSE7378, GSE4922 - GPL96, GSE4922-GPL97数据集的HMGB3高表达提示患者较差的DFS;GSE3494-GPL96, GSE3494-GPL97数据集的HMGB3高表达提示患者DSS较差,但在E-TABM-158数据集中, HMGB3高表达提示患者有较好的DSS. 以上结果都具有统计学显著差异($P < 0.05$).

2.4 HMGB3表达在不同临床病理因素下对乳腺癌预后的亚组分析

由于Kaplan-Meier Plotter数据库的样本量更大,可以通过Kaplan-Meier Plotter进一步验证HMGB3表达在乳腺癌患者中的预后作用. 表1给出了不同临床病理因素下乳腺癌中HMGB3表达与临床预后的相关性,表中黑体字为 $P < 0.05$ 具有显著统计学差异的结果. 由表可见, HMGB3与乳腺癌患者更差的无复发生存期RFS和无远处转移生存期DMFS有关($P = 2e - 8, P = 3.1e - 5$). 还针对不同临床病理因素下HMGB3表达与乳腺癌患者预后关系进行亚组分析,以探究不同临床病理因素对HMGB3与乳腺癌预后的影响. 由表可见:ER阳性组HMGB3高表达的乳腺癌患者RFS和DMFS比低表达组更差($HR = 1.49, P = 0.006; HR = 2.27, P = 0.037$),而ER阴性组不同HMGB3表达的RFS与DMFS差异无统计学意义($HR = 0.91, P = 0.55; HR = 1.21, P = 0.37$). 不论HER2状态为阳性或阴性, HMGB3高表达均提示较差的RFS和DMFS(所有 $P < 0.05$),但HMGB3表达对患者RFS与DMFS的影响与PR状态无关(所有 $P > 0.05$). 在不同的分子分型中luminal A型和HER2阳性型患者中HMGB3高表达组的RFS较低表达组更差($HR = 1.37, P = 0.011; HR = 1.7, P = 0.017$),但对DMFS却无影响. 淋巴结状态亚组分析提示,淋巴结阳性患者中HMGB3高表达患者与更差的RFS和DMFS



RFS:Relapse Free Survival,无复发生存期

DMFS:Distant Metastasis Free Survival,无远处转移生存期

DSS:Disease Specific Survival,疾病特异性生存期

DFS:Disease Free Survival,无病生存期

图2 PrognScan数据库中不同数据集的HMGB3表达对乳腺癌患者预后影响

Fig. 2 The prognostic effect of HMGB3 expression in breast cancer patients based on different datasets of PrognScan database

表1 不同临床病理因素下乳腺癌中HMGB3表达与临床预后的相关性(Kaplan-Meier Plotter)

Table 1 Correlation of HMGB3 expression and clinical prognosis in breast cancer with different clinicopathological factors by Kaplan-Meier Plotter

		RFS ($n = 4939$)			DMFS ($n = 2767$)		
		<i>N</i>	Hazard ratio	<i>P</i>	<i>N</i>	Hazard ratio	<i>P</i>
Total analysis		2032	1.54 (1.32~1.29)	2e~8	958	1.77 (1.35~2.32)	3.1e-05
ER	ER positive	902	1.49 (1.12~1.97)	0.006	248	2.27 (1.03~5.02)	0.037
	ER negative	470	0.91 (0.67~1.24)	0.55	270	1.21 (0.79~1.86)	0.37
PR	PR positive	511	1.41 (0.97~2.04)	0.072	144	2.18 (0.74~6.38)	0.15
	PR negative	436	1.29 (0.92~1.81)	0.14	266	1.38 (0.89~2.16)	0.15
HER2 positive		461	1.44 (1.06~1.95)	0.019	260	1.55 (0.98~2.45)	0.062
HER2 negative		1571	1.48 (1.24~1.76)	1.20E-05	698	1.41 (1.02~1.96)	0.04
Intrinsic subtype	basal	417	1.16 (0.86~1.58)	0.34	275	1.24 (0.78~1.99)	0.36
	luminal A	952	1.37 (1.07~1.75)	0.011	361	1.56 (0.93~2.6)	0.089
	luminal B	465	1.22 (0.9~1.64)	0.2	203	1.24 (0.7~2.22)	0.46
	HER2+	198	1.7 (1.09~2.66)	0.017	119	1.79 (0.97~3.3)	0.059
Lymph node positive		814	1.77 (1.39~2.27)	3.90E-06	261	2.4 (1.45~3.97)	0.00047
Lymph node negative		574	1.06 (0.73~1.54)	0.76	240	0.88 (0.44~1.76)	0.72
grade	1	113	0.97 (0.34~2.76)	0.95	44	NA	
	2	243	1.23 (0.75~2.01)	0.42	91	1.93 (0.75~5)	0.17
	3	481	0.91 (0.68~1.22)	0.52	234	1.27 (0.76~2.12)	0.37
TP53	mutated	132	2.04 (1.11~3.75)	0.02	56	3.15 (0.98~10.14)	0.043
	wild type	82	0.42 (0.17~1)	0.044	6	NA	

有关 ($HR = 1.77, P = 3.90E - 06$; $HR = 2.4, P = 0.00047$). 在 TP53 突变患者中, 高 HMGB3 表达组提示较差的 RFS 和 DMFS 且有最高的 HR ($HR = 2.04, P = 0.02$; $HR = 3.15, P = 0.043$), 而 TP53 野生型患者中 HMGB3 高表达与患者更好的 RFS 相关 ($HR = 0.42, P = 0.044$), 但未获得相关 DMFS 生存资料.

2.5 肿瘤浸润淋巴细胞水平与乳腺癌患者的累积生存相关 TIL 独立预测癌症患者的总生存期和前哨淋巴结状态, 已经有研究证实 TIL 与乳腺

癌预后相关. 在 ER+/HER2-乳腺癌中, 单因素分析表明 TIL 与患者无远处转移生存无关, 但在接受化疗的患者中高水平的 TIL 与更好的无远处转移生存相关^[21]. 而在三阴性乳腺癌中, 高水平 TIL 可以提高患者的总生存期^[22]. 然而这些研究都停留在总的 TIL 水平上, 没有研究探讨不同种类 TIL 与乳腺癌预后的关系, 这促使我们通过 TIMER 数据库研究在乳腺癌中不同 TIL 与乳腺癌预后的关系. 如图 3 所示, 高水平的 B 细胞、CD8+T 细胞、CD4+T 细胞、中性粒细胞和树突

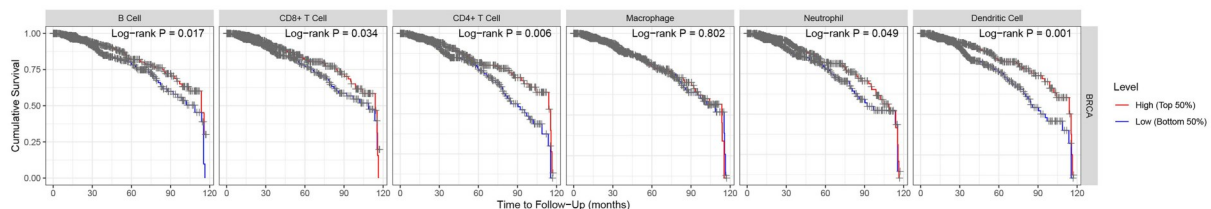


图3 肿瘤浸润淋巴细胞水平对乳腺癌患者的10年累积生存的预后分析

Fig. 3 The prognostic analysis of tumor infiltrating lymphocytes levels on the 10-year cumulative survival of breast cancer patients

状细胞浸润的乳腺癌患者 10 年累积生存率更高, 差异有统计学意义(所有 $P < 0.05$), 但巨噬细胞浸润水平与患者 10 年累积生存无关 ($P = 0.802$). 这些结果进一步证实 TIL 与乳腺癌患者预后有关, 而且不同种类 TIL 对乳腺癌预后的影响不同, B 细胞、CD8+T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞与乳腺癌关系密切, 而巨噬细胞浸

润与乳腺癌预后无关.

2.6 HMGB3 表达在不同肿瘤浸润淋巴细胞水平下对乳腺癌患者的预后分析 已知 HMGB3 表达影响乳腺癌预后, TIL 水平也与乳腺癌预后相关, 通过 Kaplan-Meier Plotter 进一步探究 TIL 水平是否对 HMGB3 跟乳腺癌总生存率 (Overall Survival, OS) 的关系有影响. 如图 4 所示, 在低的

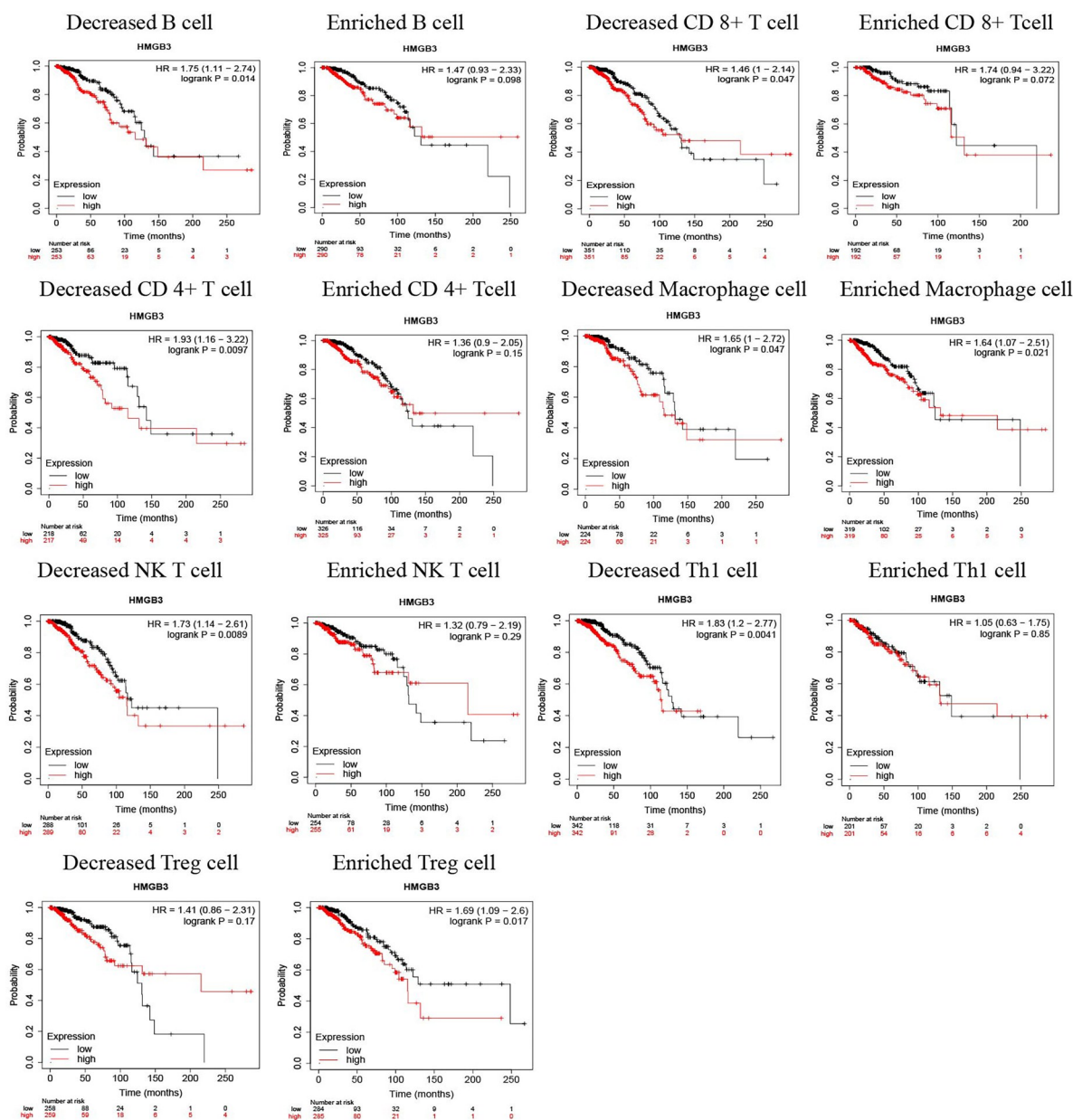


图 4 不同肿瘤浸润淋巴细胞水平下乳腺癌 HMGB3 表达与总生存的相关性

Fig. 4 Correlation of HMGB3 expression and overall survival in breast cancer with different tumor infiltrating lymphocytes levels

B 细胞 ($HR = 1.75(1.1 \sim 2.74)$, $P = 0.014$)、CD8+T 细胞 ($HR = 1.46(1 \sim 2.14)$, $P = 0.046$)、CD4+T 细胞 ($HR = 1.93(1.16 \sim 3.22)$, $P = 0.0097$)、自然杀伤细胞 ($HR = 1.73(1.14 \sim 2.61)$, $P = 0.0089$)、Th1 细胞 ($HR = 1.83(1.2 \sim 2.77)$, $P = 0.0041$) 浸润水平下, HMGB3 高表达与乳腺癌更差的 OS 相关。不论巨噬细胞浸润水平如何 HMGB3 高表达均提示较差的 OS, 但是更高水平 Treg 细胞浸润下, 高 HMGB3 表达与乳腺癌更差的 OS ($HR = 1.69(1.09 \sim 2.6)$, $P = 0.017$) 有关, 低水平 Treg 细胞浸润时 HMGB3 表达与乳腺癌患者 OS 无关 ($HR = 1.41(0.86 \sim 2.31)$, $P = 0.17$)。

2.7 HMGB3 的共表达网络与功能注释分析

通过 Coexpedia 获得与 HMGB3 共表达的分子调控网络, 筛选出与乳腺癌相关的共表达分子共 18 个, 包括 HMGB2, DKC1, POLA1, PPP1R14B, EIF1AX, SEMA3C, CCNB1, RFC5, SLC7A5, DUT, KIAA0101, HCCS, RRM2, ORC1, MRPL16, HMBS, DPP3, UBE2C, 如图 5 所示。

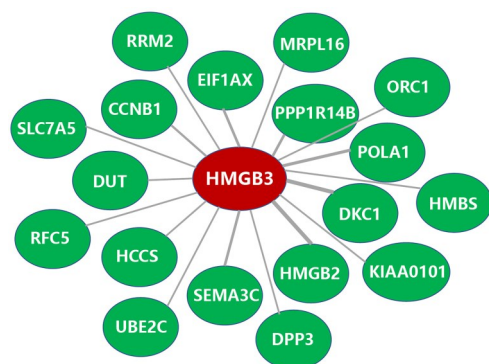


图5 HMGB3在乳腺癌中的共表达分子网络

Fig. 5 Network of HMGB3 co-expressed molecules in breast cancer

使用 STRING 数据库进行 HMGB3 和其 18 个共表达基因蛋白的功能注释分析。生物过程方面, 九个基因蛋白在 DNA 代谢过程起重要作用, 六个基因蛋白参与 DNA 复制。细胞成分方面, 多个基因蛋白主要分布在染色体和核质中。分子功能方面主要与 DNA 结合弯曲和 DNA 聚合酶活性等相关。信号通路方面, 主要参与调控 P53 信号通路、细胞周期信号通路和药物代谢等。如表 2 所示。

3 讨论

HMGB3 是 HMGB 家族的重要成员之一, 其编码的蛋白是一种非组蛋白染色质相关蛋白, 在染色质的结构与功能及基因表达调控过程中均发挥着重要作用。非编码 RNA 可以调节 HMGB3 表达以促进包括胃癌^[23]、肺癌^[24-26]、鼻咽癌^[27]、前列腺癌^[28]、肝癌^[29]、胶质母细胞瘤^[30]等肿瘤细胞的增殖, 侵袭和迁移并抑制癌细胞的凋亡。本研究通过 TIMER 数据库证实了 HMGB3 在包括乳腺癌在内的多种肿瘤中过表达。GEPIA 和 UALCAN 数据库分析发现, 乳腺癌中 HMGB3 转录水平和蛋白质表达较正常乳腺组织升高, 而启动子甲基化水平较正常乳腺组织降低。由于其在乳腺癌中低甲基化, HMGB3 可以被激活和上调, 这提示 HMGB3 基因的甲基化修饰程度下调可能是乳腺癌中 HMGB3 表达增加的潜在机制。此外, 通过 Prognoscan 数据库分析及 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析表明 HMGB3 高表达预示乳腺癌不良预后。这些结果提示 HMGB3 可能在乳腺癌的发病过程中作为癌基因发挥作用, 并且可以作为预后指标预测乳腺癌患者生存。

以往的研究表明 HMGB3 可以通过调节缺氧诱导因子 1 的表达来抑制肿瘤的增殖和乳腺癌的生长^[31-32], HMGB3 基因敲除实验^[33]表明下调 HMGB3 表达可以抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭。本研究的亚组生存分析表明, HMGB3 在 ER 阳性或 luminal A 型乳腺癌中预示患者更差的 RFS 和 DMFS, 因此, 在 ER 阳性或 luminal A 型乳腺癌内分泌治疗耐药患者中靶向 HMGB3 可能是改善患者预后的潜在策略。而在淋巴结阳性状态下 HMGB3 高表达有更差的预后, 可能提示 HMGB3 高表达与乳腺癌远处转移相关, 监测乳腺癌 HMGB3 表达有助于预测乳腺癌远处转移, 靶向 HMGB3 可能降低乳腺癌远处转移的发生。在 TP53 突变状态下 HMGB3 高表达患者有更差的预后, 而 TP53 未突变状态下 HMGB3 高表达乳腺癌患者预后更好。沉默 HMGB3 可以调节 P53 和 P21 通路从而抑制细胞增殖和诱导胃癌细胞的 G0/G1 期停滞^[34], 功能分析表明 HMGB3 参与调节 P53 信号通路, 提示 HMGB3 可能与 TP53

表 2 HMGB3 及其共表达基因的功能注释分析

Table 2 Functional annotation analysis of HMGB3 and its co-expressed genes

subtype	functional annotation	FDR	genes
Biological process	DNA metabolic process	1.50e-05	HMGB2, KIAA0101, RRM2, DKC1, HMGB3, ORC1, POLA1, DUT, RFC5
	DNA replication	1.56e-05	KIAA0101, RRM2, ORC1, POLA1, DUT, RFC5
	DNA biosynthetic process	0.00071	KIAA0101, DKC1, POLA1, RFC5
	regulation of transcription involved in G1/S transition of mitotic cell cycle	0.00089	RRM2, ORC1, POLA1
	mitotic cell cycle phase transition	0.00089	CCNB1, UBE2C, RRM2, ORC1, POLA1
	cell cycle process	0.0017	CCNB1, KIAA0101, UBE2C, RRM2, ORC1, POLA1, RFC5
Cellular component	chromosome	0.023	CCNB1, HMGB2, HMGB3, ORC1, POLA1, RFC5
	nucleoplasm	0.031	CCNB1, HMGB2, KIAA0101, UBE2C, DPP3, DKC1, ORC1, POLA1, DUT, RFC5
	nuclear chromosome	0.0471	CCNB1, HMGB2, ORC1, POLA1
	replication fork	0.0471	POLA1, RFC5
Molecular function	four-way junction DNA binding	0.009	HMGB2, HMGB3
	DNA binding, bending	0.0129	HMGB2, HMGB3
	DNA polymerase activity	0.0178	DUT, DKC1, EIF1AX, HMGB2, HMGB3
KEGG pathways	Pyrimidine metabolism	0.0027	RRM2, POLA1, DUT
	Porphyrin and chlorophyll metabolism	0.0064	HMBS, HCCS
	DNA replication	0.0064	POLA1, RFC5
	Drug metabolism: other enzymes	0.0109	RRM2, DUT
	p53 signaling pathway	0.0109	CCNB1, RRM2
	Cell cycle	0.0225	CCNB1, ORC1
	Purine metabolism	0.0369	RRM2, POLA1

FDR (False Discovery Rate), 错误发现率, 数值越小, 相关基因与富集的功能关系越密切.

基因突变有关并参与调节 P53 信号通路促进乳腺癌发生发展并影响乳腺癌预后, 但需要进一步实验加以验证. 通过构建 HMGB3 基因的共表达分子网络, 进行基因蛋白的功能注释分析显示, HMGB3 与其共表达基因除了参与 P53 信号通路, 还参与调控细胞周期信号通路和药物代谢. 细胞周期信号通路参与调控细胞的生长、增殖及分化, 通路中的许多因子起着原癌基因或抑癌基因的作用, 这些因子的激活或畸变促进了癌症的发生发展^[35]. 调节药物代谢酶是肿瘤细胞产生化学耐药性的机制之一^[36-37], 而 HMGB3 表达的上调可导致胃癌及卵巢癌发生化疗耐药^[34, 38]. 因此, HMGB3 及其共表达基因可能通过调节这些通路在乳腺癌细胞增殖、侵袭、转移和耐药过程中发挥作用. 以上结果表明 HMGB3 可作为乳腺癌的潜

在治疗靶点, 为进一步深入研究提供方向.

既往研究分析了 TIL 水平与乳腺癌亚型的关系, 高 TIL 与非管腔亚型乳腺癌包括三阴性乳腺癌和 HER2+ 乳腺癌更好地预后相关^[39-40]. 分析不同种类 TIL 与乳腺癌预后的关系, 结果表明, 高水平的 B 细胞、CD8+T 细胞、CD4+T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞浸润提示乳腺癌患者更好的 10 年累积生存, 但巨噬细胞浸润水平与患者预后无关(图 4). 最新研究表明, 组蛋白脱乙酰基酶 3 可通过下调 miR-130a-3p 来增加 HMGB3 表达, 从而调节肿瘤免疫性 T 细胞水平以促进乳腺癌细胞的免疫逃逸^[41]. 本研究中, 高 HMGB3 表达在低浸润水平的 B 细胞、CD8+T 细胞、CD4+T 细胞、自然杀伤细胞和 Th1 细胞亚组中具有较差的预后(图 5), 提示 HMGB3 可能通

过下调肿瘤中B细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、自然杀伤细胞和Th1细胞浸润水平以促进乳腺癌细胞免疫逃逸从而影响乳腺癌患者预后。FOXP3是调节性T细胞的主要标志物,它会诱导免疫耐受从而干扰抗肿瘤免疫力,而乳腺癌患者中较高的FOXP3⁺TILs水平导致较差的总体生存率^[42]。发现富集的Treg细胞水平下HMGB3高表达乳腺癌患者预后更差,这提示HMGB3可能通过上调FOXP3⁺Treg细胞水平诱导肿瘤免疫耐受从而影响乳腺癌患者预后。还需进行进一步研究,以确认HMGB3表达在乳腺癌免疫微环境中的关键作用,并评估其表达与免疫细胞疗法的响应之间的关联。

本研究发现HMGB3在乳腺癌中高表达且与乳腺癌患者不良预后有关,可作为乳腺癌的预后指标和潜在治疗靶点。此外,HMGB3与乳腺癌免疫微环境的关系和功能分析结果为乳腺癌的靶向及免疫治疗研究提供了一个方向。但是由于数据库的限制,没有继续分析HMGB3与肿瘤免疫浸润的深层关系。

参考文献

- [1] Lei S Y, Zheng R S, Zhang S W, et al. Breast cancer incidence and mortality in women in China: Temporal trends and projections to 2030. *Cancer Biology & Medicine*, 2021, 18(3): 900—909.
- [2] Wang W, Jiang H W, Zhu H C, et al. Overexpression of high mobility group box 1 and 2 is associated with the progression and angiogenesis of human bladder carcinoma. *Oncology Letters*, 2013, 5(3): 884—888.
- [3] Sharma A, Ray R, Rajeswari M R. Overexpression of high mobility group (HMG) B1 and B2 proteins directly correlates with the progression of squamous cell carcinoma in skin. *Cancer Investigation*, 2008, 26(8): 843—851.
- [4] Gao J, Zou Z Z, Gao J, et al. Increased expression of HMGB3: A novel independent prognostic marker of worse outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(1): 345—352.
- [5] Li M H, Cai Y, Zhao H M, et al. Overexpression of HMGB3 protein promotes cell proliferation, migration and is associated with poor prognosis in urinary bladder cancer patients. *Tumor Biology*, 2015, 36(6): 4785—4792.
- [6] Zheng W J, Yang J L, Dong Z Z, et al. High mobility group box 3 as an emerging biomarker in diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Management and Research*, 2018(10): 5979—5989.
- [7] He H E, Wang X M, Chen J J, et al. High-mobility group box 1 (HMGB1) promotes angiogenesis and tumor migration by regulating hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α) expression via the phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Medical Science Monitor*, 2019(25): 2352—2360.
- [8] Chen Y P, Cai L, Guo X Q, et al. HMGB1-activated fibroblasts promote breast cancer cells metastasis via RAGE/aerobic glycolysis. *Neoplasia*, 2021, 68(1): 71—78.
- [9] Fu D Y, Li J, Wei J L, et al. HMGB2 is associated with malignancy and regulates Warburg effect by targeting LDHB and FBP1 in breast cancer. *Cell Communication and Signaling*, 2018, 16(1): 8.
- [10] Kartono A, Subiyanto. Mathematical modeling of the effect of boosting tumor infiltrating lymphocyte in immunotherapy. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2013, 16(20): 1095—1103.
- [11] Li T W, Fan J Y, Wang B B, et al. TIMER: A web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Research*, 2017, 77(21): e108—e110.
- [12] Tang Z F, Li C W, Kang B X, et al. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W98—W102.
- [13] Chandrashekar D S, Bashel B, Balasubramanya S A H, et al. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649—658.
- [14] Mizuno H, Kitada K, Nakai K, et al. PrognScan: A new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC Medical Genomics*, 2009, 2(1): 18.
- [15] Lanczky A, Gyorffy B. Web-based survival analysis tool tailored for medical research (KMplot): Development and implementation. *Journal of Medical Internet Research*, 2021, 23(7): e27633.
- [16] Yang S M, Kim C Y, Hwang S, et al. COEXPEDIA: Exploring biomedical hypotheses via co-expressions

- associated with medical subject headings (MeSH). *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1):D389—D396.
- [17] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1):D362—D368.
- [18] Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: Applications and challenges. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(10):679—692.
- [19] Robertson K D. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(8):597—610.
- [20] Costello J F, Frühwald M C, Smiraglia D J, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genetics*, 2000, 24(2):132—138.
- [21] Criscitiello C, Vingiani A, Maisonneuve P, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2-breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2020, 183(2):347—354.
- [22] Lotfinejad P, Jafarabadi M A, Shadbad M A, et al. Prognostic role and clinical significance of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple-negative breast cancer (TNBC): A systematic review and meta-analysis study. *Diagnostics*, 2020, 10(9):704.
- [23] Chen X D, Zhao G Q, Wang F Q, et al. Upregulation of miR-513b inhibits cell proliferation, migration, and promotes apoptosis by targeting high mobility group-box 3 protein in gastric cancer. *Tumor Biology*, 2014, 35(11):11081—11089.
- [24] Ren P, Xing L, Hong X D, et al. LncRNA PITPNA-AS1 boosts the proliferation and migration of lung squamous cell carcinoma cells by recruiting TAF15 to stabilize HMGB3 mRNA. *Cancer Medicine*, 2020, 9(20):7706—7716.
- [25] Wang J Y, Sheng Z Y, Cai Y. Effects of microRNA-513b on cell proliferation, apoptosis, invasion, and migration by targeting HMGB3 through regulation of mTOR signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(7):10934—10941.
- [26] Zhou G H, Lu Y Y, Xie J L, et al. Overexpression of miR-758 inhibited proliferation, migration, invasion, and promoted apoptosis of non-small cell lung cancer cells by negatively regulating HMGB. *Bioscience Reports*, 2019, 39(1):BSR20180855.
- [27] Liu D T, Wang Y P, Zhao Y G, et al. LncRNA SNHG5 promotes nasopharyngeal carcinoma progression by regulating miR-1179/HMGB3 axis. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):178.
- [28] Song X F, Wang H, Wu J W, et al. Long noncoding RNA SOX2-OT knockdown inhibits proliferation and metastasis of prostate cancer cells through modulating the miR-452-5p/HMGB3 axis and inactivating Wnt/ β -catenin pathway. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2020, 35(9):682—695.
- [29] Wang L K, Xie X N, Song X H, et al. Upregulation of miR-200b inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by targeting HMGB3 protein. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2018(17):1533033818806475.
- [30] Liu J X, Wang L L, Li X S. HMGB3 promotes the proliferation and metastasis of glioblastoma and is negatively regulated by miR-200b-3p and miR-200c-3p. *Cell Biochemistry and Function*, 2018, 36(7):357—365.
- [31] Gu J, Xu T, Zhang C M, et al. HMGB3 small interfere RNA suppresses mammosphere formation of MDA-MB-231 cells by down-regulating expression of HIF1 α . *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019, 23(21):9506—9516.
- [32] Gu J, Xu T, Huang Q H, et al. HMGB3 silence inhibits breast cancer cell proliferation and tumor growth by interacting with hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Management and Research*, 2019(11):5075—5089.
- [33] Elgamal O A, Park J K, Gusev Y, et al. Tumor suppressive function of mir-205 in breast cancer is linked to HMGB3 regulation. *PLoS One*, 2013, 8(10):e76402.
- [34] Guo S N, Wang Y Y, Gao Y, et al. Knockdown of high mobility group-box 3 (HMGB3) expression inhibits proliferation, reduces migration, and affects chemosensitivity in gastric cancer cells. *Medical Science Monitor*, 2016(22):3951—3960.
- [35] Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective: Defects in cell cycle control and cancer. *The Journal of Pathology*, 1999, 187(1):95—99.
- [36] Kaur G, Gupta S K, Singh P, et al. Drug-metabolizing enzymes: Role in drug resistance in cancer. *Clinical*

- and Translational Oncology, 2020, 22(10): 1667—1680.
- [37] Verma H, Singh Bahia M, Choudhary S, et al. Drug metabolizing enzymes-associated chemo resistance and strategies to overcome it. Drug Metabolism Reviews, 2019, 51(2):196—223.
- [38] Mukherjee A, Huynh V, Gaines K, et al. Targeting the high-mobility group box 3 protein sensitizes chemo-resistant ovarian cancer cells to Cisplatin. Cancer Research, 2019, 79(13):3185—3191.
- [39] Hida A I, Watanabe T, Sagara Y, et al. Diffuse distribution of tumor-infiltrating lymphocytes is a marker for better prognosis and chemotherapeutic effect in triple-negative breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, 2019, 178(2):283—294.
- [40] Gao Z H, Li C X, Liu M, et al. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: A meta-analysis. BMC Cancer, 2020, 20(1):1150.
- [41] Chen Z L, Pei L, Zhang D H, et al. HDAC3 increases HMGB3 expression to facilitate the immune escape of breast cancer cells via down-regulating microRNA-130a-3p. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2021(135):105967.
- [42] Shou J F, Zhang Z G, Lai Y C, et al. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+Tregs: A systematic review and meta-analysis. BMC Cancer, 2016(16):687.

(责任编辑 杨可盛)