

本文引文格式:王俊杰,詹雪冰,罗倩,等.基于Notch通路相关基因结肠癌预后模型的构建及验证[J].右江民族医学院学报,2022,44(3):373-381.

【论著与临床报道】

## 基于Notch通路相关基因结肠癌预后模型的构建及验证

王俊杰,詹雪冰,罗倩,况云舒,陶香香,朱晓群,梁箫,赵同洋,陈冰

(皖南医学院病理学教研室,安徽 芜湖 241002)

**摘要:**目的 构建一个基于Notch通路相关基因的结肠腺癌预后模型并通过列线图绘制进行验证。方法 下载TCGA结肠腺癌患者的mRNA表达量和临床病理资料。GSEA(gene set enrichment analysis)分析Notch信号通路相关基因集,筛选癌与癌旁组织中差异表达的基因。单因素与多因素Cox比例回归模型进行预后相关mRNAs的筛选,并构建基于mRNAs表达谱的预后模型和列线图,通过生存分析C-index、ROC曲线和校准曲线评估其预测价值。从GEO数据库中下载验证队列GSE29621,对预后模型预测患者预后的有效性进行验证。使用在线网站人类蛋白图谱(HPA)对预后模型内基因进行蛋白表达情况验证。**结果** 从TCGA中下载444例结肠腺癌患者mRNA表达数据和临床病理资料,排除临床资料不全的患者信息,最终纳入385例患者的信息作为研究对象。从GSEA中3个Notch信号通路基因集中获取Notch相关基因,并与TCGA表达数据结合,得到Notch相关基因的表达量,最后进行Notch相关基因的差异基因的筛选。使用GSEA在结肠腺癌mRNAs表达谱中筛选出391个Notch信号通路相关差异表达基因( $P < 0.05$ )。利用单变量Cox回归分析筛选出14个结肠腺癌预后相关Notch通路基因,进一步多变量Cox回归分析构建出5种mRNAs(CDHR2, KRT8P12, NEURL1B, SELE, FSTL3)组成的预后模型。ROC曲线和生存分析显示,高Notch通路相关基因风险评分与较差的生存结果显著相关( $AUC = 0.748, P < 0.05$ )。Notch通路相关的基因评分被证明是一个独立的预后因素。构建了具有临床病理特征和Notch通路相关基因评分的列线图,进一步预测结肠腺癌患者的预后,在C-index、ROC曲线和校准曲线上也表现良好( $C-index = 0.794, AUC = 0.969$ )。**结论** 构建的包含5个Notch信号通路相关基因的结肠腺癌预后模型具有良好的预后预测效果,有望作为评估结肠腺癌患者预后的指标。

**关键词:**临床预后模型;结肠腺癌;Notch信号通路;列线图

中图分类号:R735.35 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2022)03-0373-09

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.03.012

### Construction and validation of colon cancer prognosis model based on Notch pathway related genes

Wang Junjie, Zhan Xuebing, Luo Qian, Kuang Yunshu, Tao Xiangxiang,  
Zhu Xiaoqun, Liang Xiao, Zhao Tongyang, Chen Bing

(Department of Pathology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To construct a prognostic model of colonic adenocarcinoma based on Notch pathway-related genes and verify it by nomogram. **Methods** The mRNA expression and clinicopathological data of patients with TCGA colonic adenocarcinoma were downloaded. GSEA (gene set enrichment analysis) was used to analyze the gene set related to Notch signaling pathway and screen differentially expressed genes in cancer and adjacent tissues. Univariate and multivariate Cox proportional regression models were used to screen prognosis related mRNAs, and the prognostic model and nomogram was constructed based on mRNAs expres-

**基金项目:**安徽省卫生健康委科研项目(AHWJ2021b059);国家级大学生创新创业训练项目(202110368030,202110368068);活性生物大分子研究安徽省重点实验室自主研究课题(LAB202005)

**第一作者简介:**王俊杰(2001-),男,在读本科生,E-mail:1606945059@qq.com

**通讯作者简介:**陈冰(1974-),男,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤病理学,E-mail:chenbing@wnmc.edu.cn

sion profile. The survival analysis was applied to evaluate predictive value of C-index, ROC curve and calibration curve. The validation queue GSE29621 was downloaded from GEO database to verify the effectiveness of prognostic model in predicting patient prognosis. The protein expression of genes in the prognostic model was verified using the online Human Protein Atlas (HPA). **Results** The mRNA expression data and clinicopathological data of 444 patients with colonic adenocarcinoma were downloaded from TCGA. Patients with incomplete clinical data were excluded, and 385 patients were finally included as the study subjects. Multiple Notch-related genes were extracted from three Notch signaling pathway genes in GSEA and combined with TCGA expression data to obtain the expression level of Notch-related genes. Finally, differential genes of Notch related genes were screened. GSEA was used to screen out 391 differentially expressed genes related to Notch signaling pathway in mRNAs expression profile of colonic adenocarcinoma ( $P < 0.05$ ). Univariate Cox regression analysis was used to screen 14 prognostic Notch pathway genes in colonic adenocarcinoma. Multivariate Cox regression analysis was further used to construct prognostic models of 5 mRNAs (CDHR2, KRT8P12, NEURL1B, SELE, FSTL3). ROC curve and survival analysis showed that high Notch pathway related gene risk score was significantly associated with poor survival outcome ( $AUC = 0.748$ ,  $P < 0.05$ ). Notch pathway-related gene score was shown to be an independent prognostic factor. A nomogram with clinicopathological features and Notch pathway-related gene scores was constructed to further predict the prognosis of patients with colonic adenocarcinoma, with good performance in C-index, ROC curve and calibration curve ( $C\text{-index} = 0.794$ ,  $AUC = 0.969$ ). **Conclusion** The constructed prognostic model of colonic adenocarcinoma containing 5 Genes related to Notch signaling pathway has a good prognostic effect and is expected to be used as a prognostic indicator for patients with colonic adenocarcinoma.

**Key words:** clinical prediction model; colonic adenocarcinoma; Notch signaling pathway; nomogram

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是包括在结肠和直肠中发生的恶性肿瘤,也是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一。据统计,2020年新发CRC病例超过190万例,死亡人数超过93万例,约占全部癌症病例和死亡人数的10%,总的来说,CRC在癌症发病率上排名第三,在死亡率上排名第二<sup>[1]</sup>。在中国,CRC是发病率和死亡率最高的五大肿瘤之一。近年来,随着社会经济水平的提高及生活和饮食结构的改变,我国结直肠癌总体发病率与死亡率呈现明显上升趋势,且存在结肠癌构成比逐年增加<sup>[2]</sup>。而超过60%的CRC发生在结肠,结肠癌中最常见的病理类型为结肠腺癌<sup>[3]</sup>。结肠腺癌被认为是一种异质性疾病,遗传变异、细胞和外界环境的影响与肿瘤的发生、发展和转移有关<sup>[4]</sup>,结肠腺癌的发生率和病死率都很高,治疗以手术切除和化疗为主<sup>[5]</sup>。因此探究结肠腺癌发生相关机制及找到合适的生物标志物能有效提高对结肠腺癌诊断、治疗、预后和预防的能力。

Notch信号通路是一种进化上保守的细胞间信号级联,调节邻近细胞之间的通讯、细胞发育、增殖和凋亡以及基因组的稳定性。它是介导细胞间直接接触的主要信号通路之一<sup>[6]</sup>。近年来研究发现,Notch信号通路的改变与代谢性疾病、内分泌疾病、遗传性疾病和肿瘤(包括结肠腺癌)的发生发展密切相关<sup>[7-8]</sup>。肿瘤血管生成可以满足肿瘤生长的代谢需要,为远处转移

提供血管通路。因此Notch信号通路被认为与肿瘤的进展、侵袭和转移有关,是潜在的肿瘤预后指标<sup>[9-11]</sup>。

尽管结肠镜检查仍然是诊断结肠腺癌的金标准,但它具有侵入性,费用昂贵,患者依从性较差。先进的肿瘤生物标志物对肿瘤的诊断具有较高的敏感性和特异性,有助于肿瘤的早期检测<sup>[5]</sup>。以往对结肠腺癌生物标志物的研究尚未取得理想的结果。在本研究中,利用来自癌症基因组图谱(TCGA)的转录组数据,筛选了结肠腺癌患者中差异表达的Notch通路相关基因,开发了一个与Notch通路相关的与结肠腺癌患者预后密切相关的基因特征,并通过预后列线图验证其预测价值。在本研究中,新的潜在预后标志物也为理解结肠腺癌进展的复杂机制提供了初步的生物信息学证据。

## 1 材料与方法

1.1 数据下载与整理 结肠腺癌患者的mRNA表达数据和相应的临床数据从癌症基因组图谱(TCGA)官方网站(<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>)下载,设置搜索条件为:Colon、TCGA-COAD、RNA-Seq,得到444例患者资料,剔除临床信息和生存资料不全病例后,最终将385份临床资料纳入研究。使用Perl语言(Perl strawberry 5.32.1.1)整理数据并提取TCGA数据库中385例结肠腺癌患者mRNA转录

组数据用于基因富集分析。

1.2 Notch 信号通路相关基因集的筛选 分子签名数据库 (MsigDB, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>) 是一组用于 GSEA 软件的注释基因集数据库。以 “Notch” 作为关键词下载 8 个注释基因集 (“BIOCARTA NOTCH PATHWAY”, “GO NEGATIVE REGULATION OF NOTCH SIGNALING PATHWAY”, “BIOCARTA PS1 PATHWAY”, “GO \_NOTCH\_SIGNALING\_INVOLVED\_IN\_HEART\_DEVELOPMENT”, “NOTCH DN. V1 DN”, “NOTCH DN. V1 UP”, “NOTCH SIGNALING PATHWAY”, “REACTOME SIGNALING BY NOTCH”)。使用 Perl 语言, 整理出 GSEA 输入文件 (表达数据集文件和表型数据文件), 包括了 TCGA 结肠腺癌转录组数据中基因表达数目、基因表达量和分型 (肿瘤样本或癌旁样本)。使用 GSEA 4.2.0 软件上传输入文件和注释基因集后, 设置排列数为 “1000”, 设置表型标签为 “T versus N” 进行 1000 次排列数的基因富集分析, 富集上述 8 个 Notch 信号通路基因集。以  $FDR < 0.05$  和  $|\log_2(FC)| > 1$  作为截止标准, 纳入了 NOM p-val、FDR p-val、FWER p-val 均  $< 0.05$  的基因集, 筛选出肿瘤样本和癌旁样本之间存在显著差异的基因集。

1.3 差异表达基因的筛选 使用 Perl 语言提取筛选所得基因集内 Notch 信号通路相关差异表达基因 391 个, 通过 R 语言 (limma 包) 将差异表达基因与 TCGA 结肠腺癌临床数据中生存时间和生存状态合并用于构建结肠腺癌患者的预后模型。

1.4 Notch 通路相关基因预后风险模型的构建 利用 R 语言 (survival 包), 使用比例风险回归模型 (proportional hazards model, 简称 Cox 模型) 进行单因素与多因素 Cox 回归分析并绘制森林图。将最终筛选出的 5 个 Notch 通路相关基因, 建立最优的 Notch 通路相关基因预后模型。

1.5 绘制 Notch 通路相关基因预后风险模型生存曲线与 ROC 曲线 根据所得 Notch 通路相关基因预后模型计算结肠腺癌患者的风险评分后, 将 385 例患者分为高风险组和低风险组, 通过 R 语言 (survival 包, survminer 包) 绘制 Kaplan-Meier 曲线, 评估高危组和低危组生存结果的显著性差异。采用 R 语言 (survival ROC 包) 绘制受试者工作特征曲线 (ROC) 检测所构建预后模型的临床价值。

1.6 结肠腺癌预后列线图的构建 在本研究中分析了临床因素 (年龄、性别、分期、T、N、M) 和选择与结肠腺癌预后密切相关的风险评分作为临床独立因素。通过 R 软件, 将所有测试的临床独立因素用于构建

Notch 信号通路相关基因结肠腺癌患者预后列线图 (<https://cran.r-project.org/web/packages/rms/>), 评估结肠腺癌患者 3 年和 5 年总生存期的概率, 并将筛选的 Notch 通路相关基因评分包括在另一个列线图中, 以预测结肠腺癌患者 1 年、3 年和 5 年总生存期的概率。此外, 为了探究预后列线图的预测准确性, 时间依赖的生存 ROC 分析由 R 软件中的 “survival ROC” 包进行, “survival” 包验证 C-index, “RMS” 包验证校准曲线, 所有统计检验均采用 R 软件 (version 3.6.1) 进行。  $P < 0.05$  被认为有统计学意义, 所有检验均为双向检验。

1.7 GEO 验证队列验证结肠腺癌患者预后模型及列线图 在 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载结肠腺癌微阵列表达数据集 GSE29621, 其实验平台为 GPL570, 临床病理资料信息见表 1。整理数据后, 使用 EXCEL 2020 提取预后模型中 5 个 Notch 信号通路相关基因表达量, 并利用风险评分公式计算出样本中患者的风险评分, 分为高风险组和低风险组。使用 R 软件中的 “survival ROC” 包绘制 ROC 曲线, “survival” 包计算 C-index, “RMS” 包验证校准曲线。

1.8 人类蛋白图谱分析 人类蛋白图谱 (HPA) (<https://www.proteinatlas.org/>) 是一个免费访问的网站, 有助于研究人类组织和细胞中的蛋白表达<sup>[12]</sup>。通过免疫组化图像分析了结肠腺癌和正常组织中 Notch 结肠腺癌通路相关基因的表达情况。

1.9 统计学方法 采用 R 软件 (4.0.2) 分析数据, 其中对于肿瘤分期等级资料进行秩和检验 (Mann-whitney  $U$  检验), Kaplan-Meier 法计算总体生存率 (OS), Log-rank 检验评价各变量不同亚组生存差异的显著性, 连续变量用中位数和平均数表示, 分类变量用例数 (百分率) 表示。使用 Cox 单因素分析筛选有意义的变量, 将单因素分析中  $P < 0.05$  的变量纳入多因素 Cox 比例风险模型, 以防止具有独立预测意义的变量遗漏。基于影响结肠腺癌预后的独立危险因素, 使用 R 软件 (4.0.3) 中的 rms、survival 等程序包构建绘制列线图。在验证集中进行外部验证, 模型的区分度用 C-index、ROC 曲线及曲线下面积 (AUC) 进行评价, 同时通过绘制校准曲线检测模型的校准度, 以确保模型准确可靠。

## 2 结果

2.1 TCGA 与 GEO 数据库结肠腺癌患者临床病理资料 提取出有完整临床资料的结肠腺癌病例共 450 例, 男性 245 例, 女性 205 例, 年龄 31~90 岁, 平均年龄 (67.01±13.21) 岁。见表 1。

表 1 385 例 TCGA 与 65 例 GEO 数据库  
结肠腺癌患者临床资料

临床特征	TCGA (n=385)	GEO (n=65)
性别		
男	205(53.25)	40(61.54)
女	180(46.75)	25(38.46)
阶段		
I	66(17.14)	7(10.77)
II	151(39.22)	22(33.85)
III	103(26.75)	18(27.69)
IV	54(14.03)	18(27.61)
Unknown	11(2.86)	0(0.00)
T		
T <sub>1</sub>	9(2.34)	0(0.00)
T <sub>2</sub>	68(17.66)	8(12.31)
T <sub>3</sub>	263(68.31)	52(80.00)
T <sub>4</sub>	44(11.43)	5(7.69)
Tis	1(0.26)	0(0.00)
M		
M <sub>0</sub>	286(74.29)	46(70.77)
M <sub>1</sub>	54(14.03)	18(27.69)
Unknown	45(11.69)	1(1.54)
N		
N <sub>0</sub>	231(60.00)	33(50.77)
N <sub>1</sub>	88(22.86)	25(38.46)
N <sub>2</sub>	66(17.14)	7(10.77)

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

2.2 结肠腺癌中差异表达的 Notch 通路相关基因的鉴定 最终选取了 3 个在肿瘤组织和癌旁组织中显著差异的基因集(“NOTCH\_DN.V1\_DN”,“REACTOME\_SIGNALING\_BY\_NOTCH”,“NOTCH\_DN.V1\_UP”)用于提取差异表达基因,见图 1。3 个 Notch 信号通路相关基因集中共鉴定出 391 个差异表达基因,其中上调基因 186 个,下调基因 205 个。

2.3 生存相关 Notch 通路相关基因的鉴定 通过单因素 Cox 回归分析,共发现 14 个差异表达的 Notch 通路相关基因与结肠腺癌患者的 OS 显著相关。随后,使用多变量 Cox 回归分析将差异表达基因筛选至 5 个,并建立 Notch 信号通路相关基因的预后模型。该预后模型包含 5 个 Notch 通路相关基因,包括 CDHR2(钙粘蛋白相关家族成员 2)、KRT8P12(角蛋白 8 假基因 12)、NEURL1B(神经元化 E3 泛素蛋白连接酶 1B)、SELE(选择素 E)、FSTL3(卵泡抑素样 3),见表 2。

2.4 Notch 通路相关基因预后模型的构建 385 例结肠腺癌患者的风险评分 = (-0.03628 × CDHR2 表达值) + (0.39496 × KRT8P12 表达值) + (-0.04810 × NEURL1B 表达值) + (0.27620 × SELE 表达值) + (0.03329 × FSTL3 的表达值),并根据临界值分为低危组和高危组。生存分析显示,高风险评分与不良生

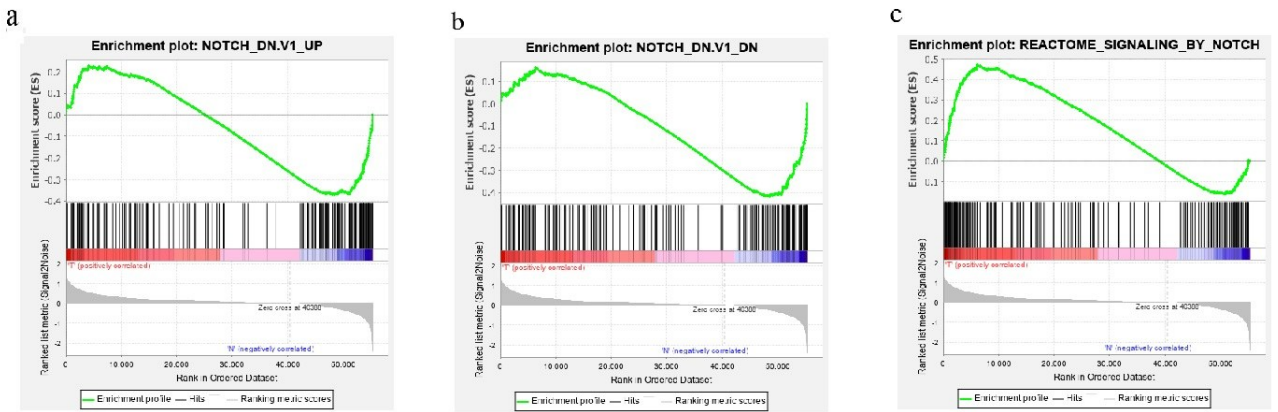
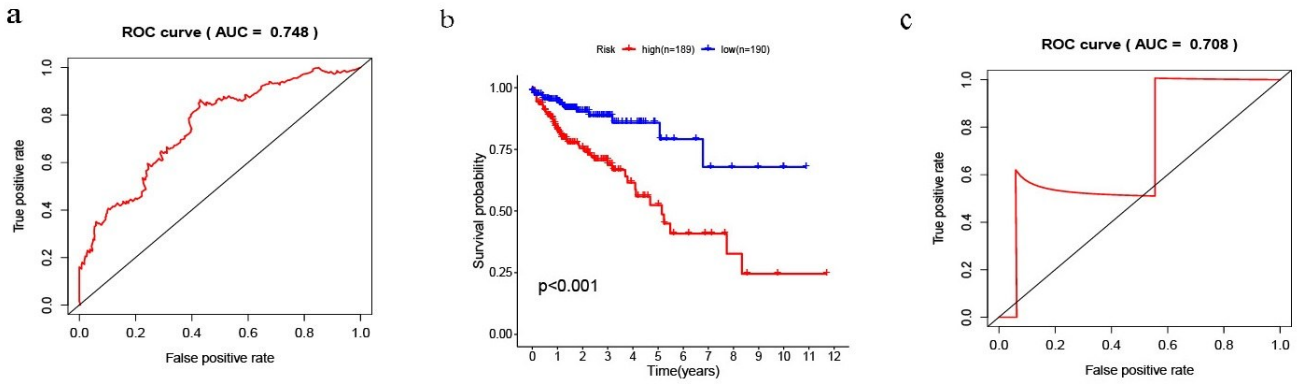


图 1 基于 CSEA 分析得到 3 个有效的 Notch 通路基因集

表 2 多因素 Cox 获得结肠腺癌患者 Notch 信号  
通路相关基因预后模型

基因	b	HR	95% CI	P
CDHR2	-0.036	0.954	0.918~0.991	0.015
KRT8P12	0.395	1.446	1.242~1.684	<0.001
NEURL1B	-0.048	0.935	0.879~0.994	0.033
SELE	0.276	1.273	1.071~1.514	0.006
FSTL3	0.033	1.028	1.007~1.048	0.007

存预后显著相关(P < 0.01)。使用 ROC 曲线进一步评估 Notch 通路相关基因特征风险评分的预后价值,曲线下面积(AUC)为 0.748,提取 GSE29621 中结直肠癌患者预后模型内基因表达量绘制 ROC 曲线,所得 AUC=0.708,提示生存结果具有较高的预测准确性,见图 2。



a: Notch 信号通路预测模型 ROC 曲线; b: 基于 Notch 信号通路风险评分的结肠腺癌患者 KM 生存曲线; c: GEO 临床数据验证 Notch 信号通路预测模型 ROC 曲线。  
图 2 Notch 信号通路预测模型 ROC 曲线及 KM 生存曲线

2.5 Notch 通路相关基因预后模型的验证 通过绘制 5 个已识别的差异表达基因的表达模式、风险评分分布和生存状态谱,比较了原始和验证队列中的低风险和高危组的生存状况,见图 3。风险图显示风险评

分表现良好,热图显示 3 个高危基因(KRT8P12、SELE、FSTL3)在高危组中过表达,2 个 Notch 通路相关基因在低危组中过表达,这与本研究构建预测模型结果相一致。

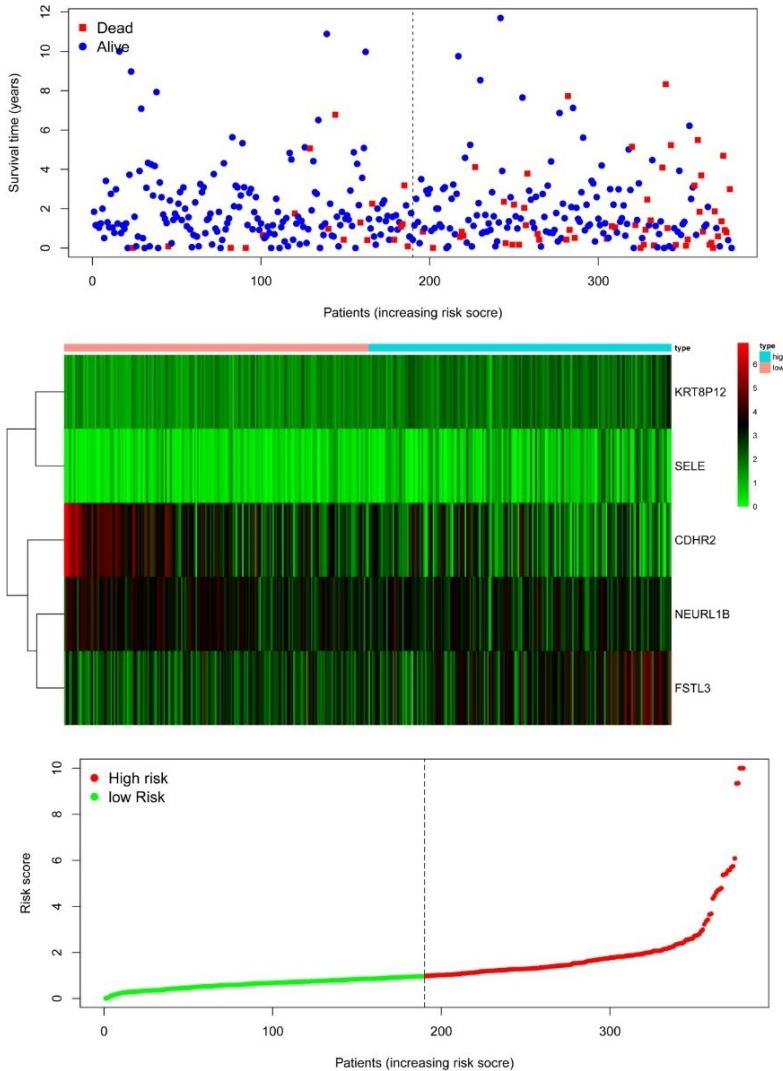


图 3 构建 Notch 信号通路预后模型风险热图

2.6 Notch 通路相关基因特征是结肠腺癌的独立预后因素 单因素 Cox 回归分析显示,分期和特征风险评分与结肠腺癌患者的总生存期相关。多变量 Cox 回归分析显示,风险评分与结肠腺癌患者的总生存期独

立相关( $P < 0.01$ ),见图 4。这些结果表明,Notch 通路相关基因特征风险评分是结肠腺癌的独立预后因素。

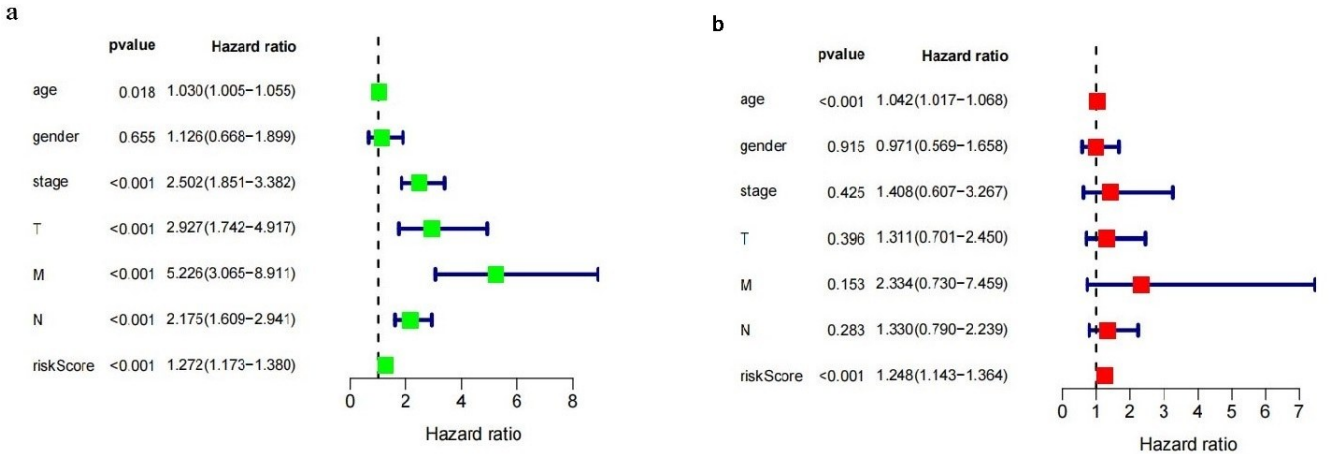


图 4 基于 TCGA 患者临床数据单因素 Cox 回归分析及多因素 Cox 回归分析构建森林图

2.7 结肠腺癌预后列线图的构建和验证 为了建立一种临床适用的结肠腺癌患者预后监测方法,本研究结合临床病理特征(年龄、性别、分期、T、N、M)和 Notch 通路相关基因特征风险评分,构建了预后列线图。结果表明,该预后列线图可以更好地预测结肠腺

癌患者的 1 年、2 年和 3 年总生存期,见图 5。使用 GEO 队列评价列线图的价值,校准曲线显示,两个队列的列线图与预测和实际总生存期有较好的一致性。ROC-AUC 为 0.969。列线图 C-index 在研究队列中为 0.759,在验证队列中为 0.760,见图 6。

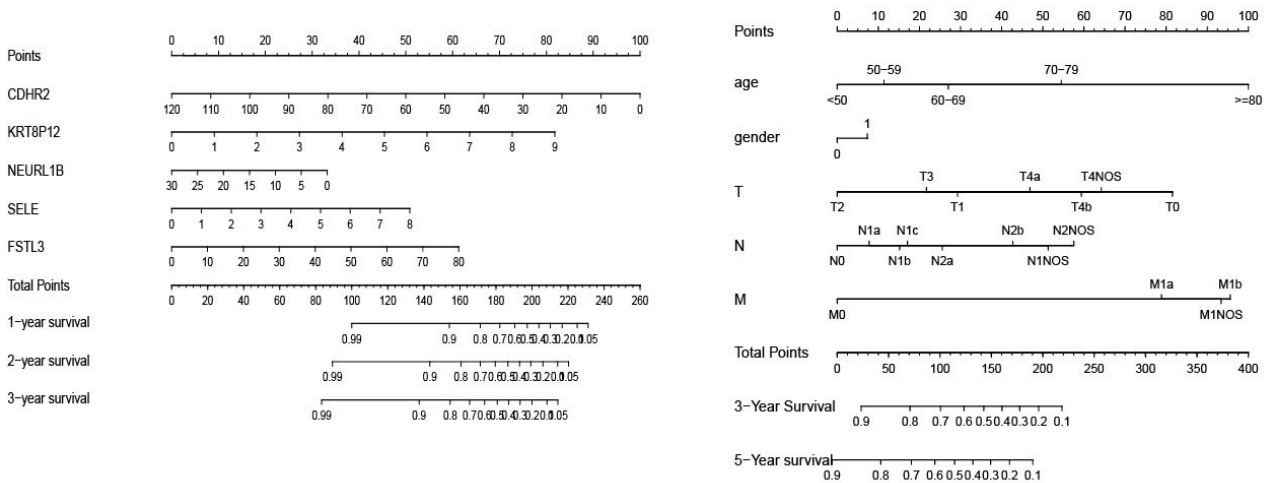
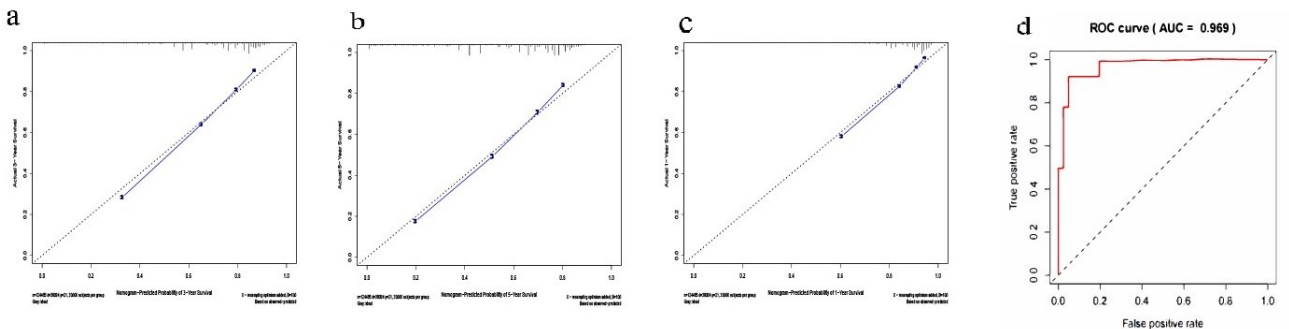


图 5 基于 Notch 预后模型及风险评分构建结肠腺癌患者预后列线图



a、b、c:结肠腺癌患者 1 年、3 年、5 年 OS 的校准曲线;d:结肠腺癌患者列线图 ROC 曲线。

图 6 验证结肠腺癌临床病理特征列线图

2.8 Notch 通路相关基因预测模型与结肠腺癌的分  
级和 TNM 分期密切相关 结肠腺癌患者的治疗策略  
显著取决于肿瘤的分期,通过比较 TCGA 队列中结肠

腺癌之间的 Notch 通路相关基因特征风险评分与肿瘤  
TNM 分期的关系,显示高低风险组内不同分期之间对  
于患者生存期有显著差异( $P < 0.05$ ),见图 7。

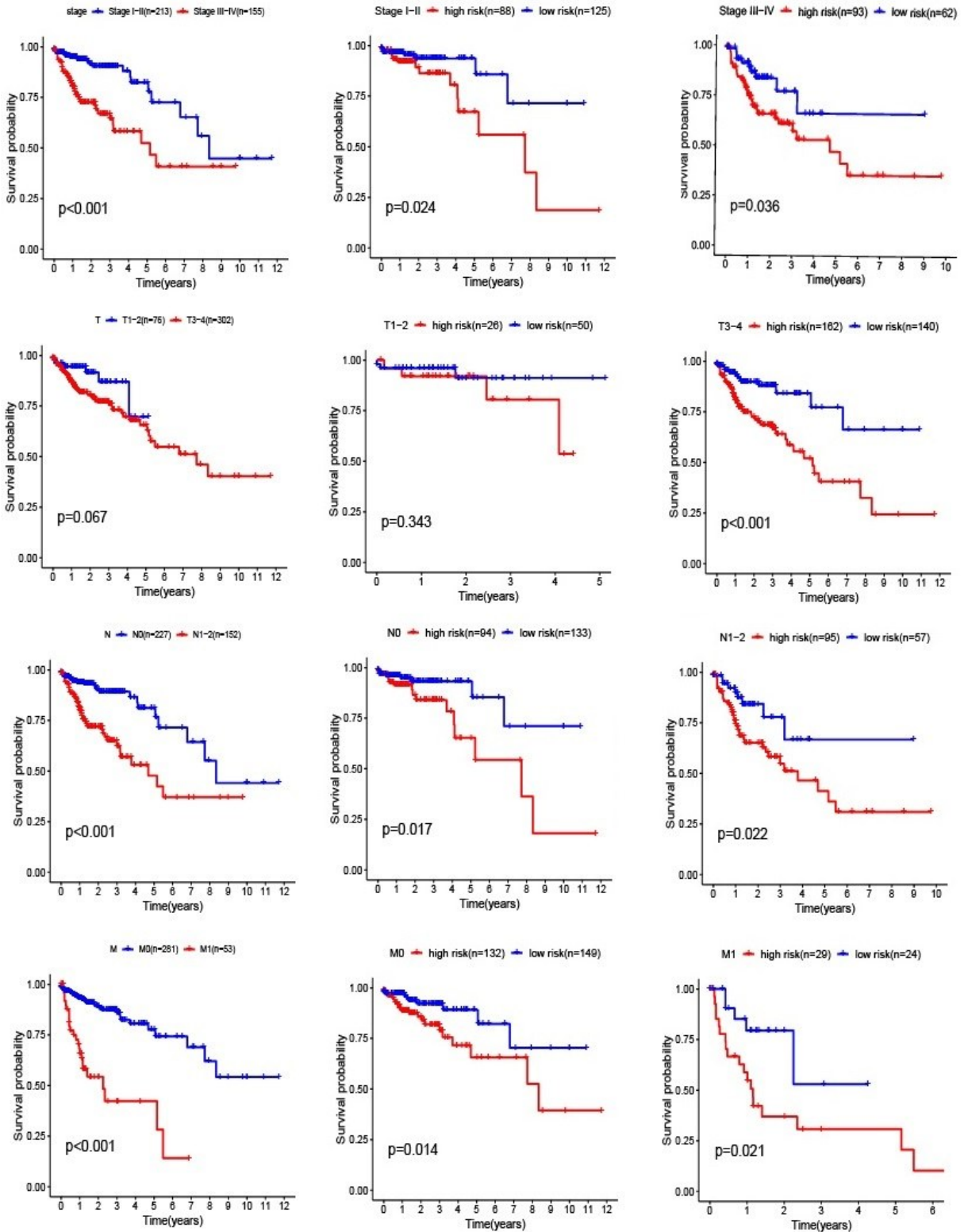


图 7 Notch 信号通路相关基因结肠腺癌预测模型与结肠腺癌分级 TNM 分期相关

2.9 通过人类蛋白图谱分析进行验证 为了进一步  
探究结肠腺癌中 Notch 通路相关基因蛋白的表达,本

研究分析了来自 HPA 的免疫组化染色图像结果显  
示,除在结肠腺癌患者的蛋白表达中未检测到 SELE

外, KRT8P12 在 HPA 中未检测到外, 其余 3 个基因在肿瘤组织中表达较高, 而在正常组织中均未检测到, 进一步验证构建临床预测模型优良作用, 见图 8。

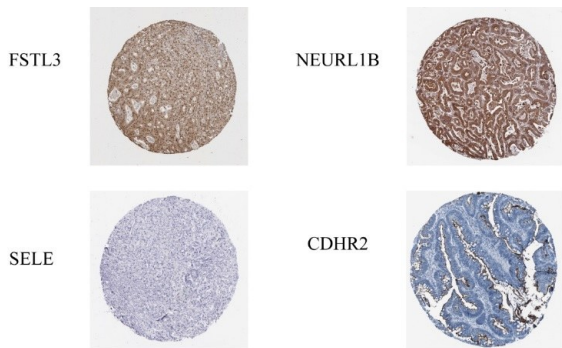


图 8 Notch 信号通路相关基因在 HPA 中的免疫组化情况

### 3 讨论

既往研究表明<sup>[11]</sup>, Notch 信号通路的异常可导致身体功能调节的紊乱和肿瘤的发生。在本研究中 GSEA 基因集内鉴定了 Notch 通路相关基因的差异表达, 其中三个基因已被证实与结肠腺癌的总生存期显著相关。最终选择 5 个 Notch 通路相关基因 (CDHR2、KRT8P12、NEURL1B、SELE、FSTL3) 作为结肠腺癌预后特征模型, 生存分析显示, 高风险评分与不良生存预后显著相关。使用单变量和多变量 Cox 回归分析来说明与 Notch 通路相关的基因特征是结肠腺癌的独立的预后因素, 通过构建预后列线图临床病理特征, 可以更好地预测结肠腺癌患者的总生存期。此外, 使用 C 指数、曲线下面积和校准曲线来评估列线图的价值, 这在所有测试中都表现良好。最后使用人类蛋白质图谱数据库, 深入验证 Notch 通路相关基因与结肠腺癌之间的相互作用。

结肠腺癌 Notch 信号通路相关基因预后模型内基因均在恶性肿瘤的生物学研究中被报道。Notch 通路相关基因 CDHR2 作为 Pcdh 超家族成员, 在肿瘤的发生发展中起着重要作用。CDHR2 最早在人肝癌、肾癌和结直肠癌中表达, 因此被命名为原钙黏蛋白 Ikc117<sup>[13]</sup>。CDHR2 的 C 端可与 hmas205 蛋白的 PDZ 区结合, 起到接触抑制作用。其他研究表明, galectin-1 和 galectin-3 能与 CDHR2 的胞内片段结合, 使 E-Catenin 留在胞浆内, 从而抑制细胞凋亡  $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[14-15]</sup>。它由一系列蛋白质区域组成。其结构的复杂性决定了其功能的即时性和特异性。SELE (Icam2, ELAM-1), 在内皮细胞上表达, 并参与携带配体唾液酸化路易斯寡糖-A 和唾液酸化路易斯寡糖-X 的白细胞的粘附和渗透<sup>[16]</sup>。相关研究表明 SELE 在乳腺癌、骨肉瘤中是合适的生物学标志

物<sup>[17-18]</sup>。FSTL3 是由 HAYETTE S 等<sup>[19]</sup>于 1998 年首次报道, 属于调节性糖蛋白 TGF- $\beta$  超家族。FSTL3 能与 TGF- $\beta$  家族的某些成员配体结合, 如激活素和肌生长抑制素, 通过类似的异聚体受体抑制其功能<sup>[20]</sup>。虽然其通常是一种分泌性糖蛋白, 但核 FSTL3 的表达被发现在某些细胞类型, 其异位过表达会促进结直肠癌的增殖、侵袭行为<sup>[21]</sup>。KRT8P12 属于 KRT 家族, 能维持细胞的完整性, 与细胞的有丝分裂、应激反应、凋亡和坏死等活性密切相关。KRT8P12 是一种 II 型 KRT, 其编码基因为 12(12q) 上皮细胞 KRT。在细胞凋亡过程中, KRT8 被磷酸化, 细胞膜被破坏后会脱落<sup>[22]</sup>。目前已证实 KRT 是恶性肿瘤的血清标志物<sup>[23]</sup>。KRT8 的过度表达可能与某些肿瘤有关, 这已被广泛证实。研究表明, KRT8P12 不仅在肝病、特发性肺纤维化等疾病患者中表达增加, 在肿瘤患者中也有表达<sup>[24-25]</sup>。NEURL1B 在整个成人脑中表达, 编码 E3 泛素连接酶, 在 Notch 信号通路中起关键作用<sup>[26]</sup>。NEURL1B 蛋白定位于细胞膜的细胞质侧, 和其他 Notch 配体的 E3 泛素连接酶 2 相互作用, 用于调节多种发育和稳态过程, 如细胞分化、增殖、凋亡<sup>[27]</sup>。而在结肠癌中, NEURL1B 的高甲基化与结肠癌的低生存率密切相关。因此, 有研究提示 NEURL1B 作为一个抑癌基因参与了结肠癌的病理过程<sup>[28]</sup>。本研究通过前期生信技术结合这 5 个 Notch 信号通路相关基因, 共同构建结肠腺癌预测算法和预后模型, 能够较好提高结肠腺癌患者的诊断和预后预测, 提高患者的生存率。

综上所述, 本研究基于 TCGA 数据库鉴定了 5 个 Notch 通路相关基因作为反映结肠腺癌预后的潜在标志物。通过 GEO 数据库和 HPA 等在线网站, 确保了预后模型及列线图在预测结肠腺癌患者的总生存期和肿瘤进展阶段方面的价值。今后需要进一步的临床试验来验证本研究的结果, 以及 Notch 通路相关基因模型在结肠腺癌中的预后价值的机制也值得进一步的实验探究。

### 参考文献:

- [1] WHO. Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019[Z/OL]. [2021-02-20].
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] 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.

- [4] BRENNER H, KLOOR M, POX C P. Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2014, 383(9927): 1490-1502.
- [5] 张丽娜, 孔祥兴, 李昕琳, 等. 结直肠癌 pT4 期诊断的难点及辅助诊断方案的研究进展 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2021, 36(1): 6-10.
- [6] NOWELL C S, RADTKE F. Notch as a tumour suppressor [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17(3): 145-159.
- [7] Peng G L, Tian Y, Lu C, et al. Effects of Notch-1 down-regulation on malignant behaviors of breast cancer stem cells [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2014, 34(2): 195-200.
- [8] DONNEM T, ANDERSEN S, AL-SHIBLI K, et al. Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch-1 and vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival [J]. *Cancer*, 2010, 116(24): 5676-5685.
- [9] MOHAMED S Y, KAF R M, AHMED M M, et al. The Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers (Notch1, ALDH1, and CD44) in Primary Colorectal Carcinoma [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2019, 50(4): 824-837.
- [10] SIEBEL C, LENDAHL U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease [J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(4): 1235-1294.
- [11] TEOH S L, DAS S. Notch Signalling Pathways and Their Importance in the Treatment of Cancers [J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19(2): 128-143.
- [12] 况云舒, 詹雪冰, 罗倩, 等. 基于生信分析 ANKRD26 在肝细胞癌中的表达、预后及与化学物质的相互作用 [J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(5): 605-610, 616.
- [13] LIN N Y, DISTLER A, BEYER C, et al. Inhibition of Notch1 promotes hedgehog signalling in a HES1-dependent manner in chondrocytes and exacerbates experimental osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(11): 2037-2044.
- [14] LOGEAT F, BESSIA C, BROU C, et al. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(14): 8108-8112.
- [15] XIA Z Y, HUANG M J, ZHU Q Q, et al. Cadherin Related Family Member 2 Acts As A Tumor Suppressor By Inactivating AKT In Human Hepatocellular Carcinoma [J]. *Cancer*, 2019, 10(4): 864-873.
- [16] KOWALSKA I, STRACZKOWSKI M, SZELACHOWSKA M, et al. Circulating E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in men with coronary artery disease assessed by angiography and disturbances of carbohydrate metabolism [J]. *Metabolism*, 2002, 51(6): 733-736.
- [17] PRZYBYLAB D, SHAFIRSTEIN G, VISHAL S J, et al. Molecular changes in bone marrow, tumor and serum after conductive ablation of murine 4T1 breast carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(2): 600-608.
- [18] SORENSON L, FU Y, HOOD T, et al. Targeted transcriptional profiling of the tumor microenvironment reveals lymphocyte exclusion and vascular dysfunction in metastatic osteosarcoma [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(9): e1629779.
- [19] HAYETTE S, GADOUX M, MARTEL S, et al. FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders [J]. *Oncogene*, 1998, 16(22): 2949-2954.
- [20] SIDIS Y, TORTORIELLO D V, HOLMES W E, et al. Follistatin-related protein and follistatin differentially neutralize endogenous vs. exogenous activin [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(5): 1613-1624.
- [21] FANG C Y, HSIAO M. FSTL3 Promotes Tumor Cell Proliferation, Invasion, Survival and Associates with Poor Prognosis in Colorectal Cancer Patients [J]. *The FASEB Journal*, 2020, 34(S1): 1.
- [22] HESSE M, MAGIN T M, WEBER K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18 [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 14): 2569-2575.
- [23] SCHUTTE B, HENFLING M, KÖLGEN W, et al. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 297(1): 11-26.
- [24] ZHONG Q, AN X, YANG Y X, et al. Keratin 8 is involved in hepatitis B virus replication [J]. *J Med Virol*, 2014, 86(4): 687-694.
- [25] HUSAIN H, WASEEM M, AHMAD R. Proteomic and molecular evidences of Il1r12, Ric8a, Krt18 and Hsp90b1 modulation during experimental hepatic fibrosis and pomegranate supplementation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 185: 696-707.
- [26] SONG R, KOO B K, YOON K J, et al. Neuralized-2 regulates a Notch ligand in cooperation with Mind bomb-1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36391-36400.
- [27] TAAL K, TUVIKENE J, RULLINKOV G, et al. Neuralized family member NEURL1 is a ubiquitin ligase for the cGMP-specific phosphodiesterase 9A [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7104.
- [28] LIU J X, LIU Z, ZHANG X Z, et al. Aberrant methylation and microRNA-target regulation are associated with downregulated NEURL1B: a diagnostic and prognostic target in colon cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 342.

收稿日期: 2021-12-13; 修回日期: 2021-12-29