

· 论 著 ·

转录因子 CREB3L1 在甲状腺癌组织中的表达及生物学意义^{*}

蒋洪棉, 朱良琴, 冯振博[△]

(广西医科大学第一附属医院病理科, 广西 南宁 530021)

[摘 要] **目的** 探讨转录因子环腺苷酸响应元件结合蛋白 3-样 1(CREB3L1)在甲状腺癌(THCA)组织中的表达及其临床意义。**方法** 从 GEO、ArrayExpress、SRA、TCGA 等数据库检索下载 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的表达谱,应用 Wilcoxon 非参数检验检测 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织和正常甲状腺组织中表达水平的差异;计算 CREB3L1 表达值的标准化均数差(SMD)及汇总受试者工作特征(SROC)曲线下面积等指标,综合评估 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的表达水平及其对 THCA 的区分能力。用上述数据集批量获取 CREB3L1 在 THCA 组织中的相关过表达基因,应用 CistromeDB 预测 CREB3L1 转录靶基因,用 clusterProfiler 对 CREB3L1 在 THCA 组织中的相关过表达基因、CREB3L1 转录靶标交集基因进行基因本体和京都基因与基因组百科全书功能注释。在 THPA 数据库中查看 CREB3L1 蛋白在 THCA 组织中的表达水平。**结果** 与正常甲状腺组织比较,THCA 组织中 CREB3L1 蛋白表达水平呈上调趋势。基于基因芯片、高通量测序数据集共纳入 1 175 例 THCA 组织和 791 例正常甲状腺组织样本。CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中呈高表达[SMD=0.11,95%可信区间(95%CI):0.01~0.20],集成 SROC 曲线下面积为 0.62(95%CI:0.57~0.66)。CREB3L1 蛋白在 THCA 组织中高表达患者 5 年生存率比低表达者低。交叉基因主要富集在细胞周期信号通路上,主要生物学功能为细胞器裂解。细胞分裂周期 6 蛋白(CDC6)与 CREB3L1 呈正相关。**结论** CREB3L1 在 THCA 组织中高表达不利于患者的预后,有可能通过靶向基因 CDC6 参与了 THCA 的发生、发展。

[关键词] 转录因子; 甲状腺肿瘤; 基因表达; 生物学; cAMP 响应元件结合蛋白 3-样 1

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.08.002

中图法分类号:R736.1

文章编号:1009-5519(2023)08-1267-08

文献标识码:A

Expression and biological significance of transcription factor

CREB3L1 in thyroid carcinoma^{*}

JIANG Hongmian, ZHU Liangqin, FENG Zhenbo[△]

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of transcription factor cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein 3-like 1 (CREB3L1) in thyroid carcinoma (THCA) tissues and its clinical significance. **Methods** The CREB3L1 mRNA expression profiles in THCA tissues were retrieved and downloaded from GEO, ArrayExpress, SRA and TCGA databases. The difference of CREB3L1 mRNA expression between THCA and normal thyroid tissues was detected by Wilcoxon nonparametric test. The standardized mean difference(SMD) of CREB3L1 expression values and the area under the curve(AUC) of summary receiver operating characteristic(SROC) curve were calculated to comprehensively assess the expression level of CREB3L1 mRNA in THCA tissues and its ability to discriminate between THCA. The above dataset was used to obtain the relevant overexpressed genes of CREB3L1 in THCA tissues in bulk. CistromeDB was used to predict CREB3L1 transcription target genes. The gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes were annotated by clusterProfiler for CREB3L1 related overexpressed genes and CREB3L1 transcrip-

^{*} 基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20190139)。

作者简介:蒋洪棉(1980—),本科,教授,主要从事病理诊断工作。 [△] 通信作者, E-mail: fengzhenbo_gxmu@163.com。

tional target intersection genes in THCA tissues. The expression level of CREB3L1 protein in THCA tissues was examined in the THPA database. **Results** Compared with normal thyroid tissues, the expression level of CREB3L1 protein in THCA tissues was up-regulated. A total of 1 175 THCA and 791 normal thyroid tissue samples were included based on gene chip and high-throughput sequencing data sets. It was confirmed that CREB3L1 mRNA was highly expressed in THCA tissues($SMD=0.11, 95\%CI:0.01-0.20$), $SROC AUC=0.62 (95\%CI:0.57-0.66)$. The five-year survival rate of patients with high expression of CREB3L1 protein in THCA tissues was lower than that of patients with low expression. Cross genes were mainly concentrated in cell cycle pathway and their main biological function was organelle lysis. Cell division cycle 6 protein (CDC6) was positively correlated with CREB3L1. **Conclusion** The high expression of CREB3L1 in THCA tissues is not conducive to the prognosis of patients, and it is possible that the targeted gene CDC6 is involved in the occurrence and development of THCA.

[Key words] Transcription factors; Thyroid carcinoma; Gene expression; Biology; Cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein 3-like 1

甲状腺癌 (THCA) 是内分泌系统中常见的恶性肿瘤, 约占内分泌系统恶性肿瘤的 95%^[1]。由于 THCA 患者缺乏明显的临床特征, 常导致漏诊或误诊, 使患者未得到及时治疗^[2]。近年来, 随着高通量测序技术的发展, 可作为癌症诊疗及预后相关生物标志物的基因越来越多, 有效提高了癌症早期发现率并降低了死亡率。目前, 临床用于 THCA 诊疗的生物标志物在特异度和灵敏度方面均很低, 对临床诊疗的价值不大^[3]。因此, 迫切需要提高对 THCA 发生、发展机制的认识及发现新的分子靶标并开发新的治疗方法。

环腺苷酸响应元件结合蛋白 3-样 1 (CREB3L1) 是一种转录因子, 在多种组织类型中均有表达, CREB3L1 参与了内质网应激, 被激活后进入细胞核^[4-5]。有研究发现, 与正常组织比较, CREB3L1 mRNA 在乳腺及膀胱肿瘤中的表达水平下调。因此, CREB3L1 mRNA 表达水平的降低是患者预后不良的一项指标^[6-10]。但另一项研究表明, CREB3L1 mRNA 在转移性乳腺癌中的表达水平高于原发性癌, 故 CREB3L1 可作为评估转移性乳腺癌风险的指标^[11]。CREB3L1 表达水平可能对多种癌症均具有预测患者预后的价值。然而, 目前 CREB3L1 在 THCA 中的表达鲜见相关文献报道。有研究表明, CREB3L1 与甲状腺未分化癌 (ATC) 进展相关^[12], 但其参与的分子通路及作用靶点尚未清楚。本研究基于大数据分析探究了 CREB3L1 在 THCA 组织中的表达情况、临床预后特征及其参与的分子通路和转录靶点等, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 将基于 GEO、ArrayExpress、

SRA、TCGA 等数据库筛选出的全球 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的表达谱作为研究对象。

1.1.2 纳入标准 (1) 人类 THCA 及对照组织样本量均大于或等于 3 例; (2) 数据可公开获取。

1.1.3 剔除标准 (1) 物种非人类 (如小鼠模型); (2) 非 mRNA 表达谱 (如微小 RNA、长非编码 RNA、环状 RNA 等)。

1.2 方法

1.2.1 资料收集及研究设计 基于 GEO、ArrayExpress、SRA、TCGA 等数据库对全球 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的表达谱进行筛选, 检索式为 “THCA OR thyroid cancer”, 检索过程由 2 名研究人员双盲完成, 经讨论获得最终纳入数据集。若有重复仅保留最新数据集。纳入数据集经平台合并、批次效应移除, 用于后续计算分析。研究设计图见图 1。

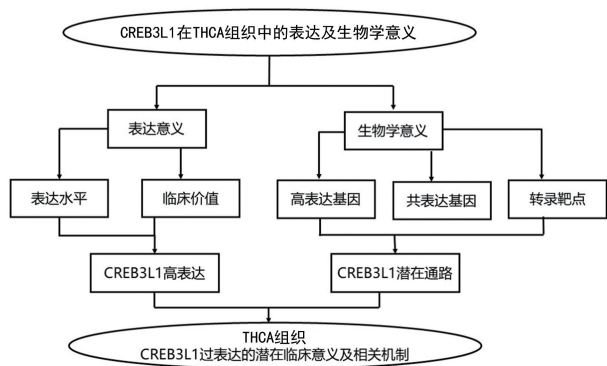


图 1 研究设计图

1.2.2 CREB3L1 mRNA 表达水平 应用 Wilcoxon 非参数检验检测 CREB3L1 mRNA 在 THCA 和正常甲状腺组织中的表达水平差异; 整合各数据集中 CREB3L1 mRNA 相对表达值并计算标准化均数差 (SMD), 评估其综合表达水平。

1.2.3 CREB3L1 蛋白表达水平 为验证 CREB3L1 蛋白在 THCA 组织中的表达水平,应用 The Human Protein Atlas (THPA) 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>) 查询 CREB3L1 蛋白在 THCA 和正常甲状腺组织中的免疫组织化学染色情况,以判断 CREB3L1 蛋白在 THCA 和正常甲状腺组织中的表达水平,并记录患者相关预后信息。

1.2.4 鉴定 THCA 组织差异表达基因 利用整合后的 THCA 平台矩阵计算 CREB3L1 基因表达值的 SMD,评估其在 THCA 组织中的表达模式。为探究 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的高表达潜在的临床意义,首先通过计算灵敏度与特异度分析各数据集中 CREB3L1 高表达对 THCA 组织的区分能力。通过绘制汇总受试者工作特征(SROC)曲线图评估过表达 CREB3L1 鉴别 THCA 组织的综合能力。

1.2.5 CREB3L1 表达与 THCA 患者临床预后的相关性分析 应用 THPA 数据库中 501 例 THCA 患者 CREB3L1 蛋白表达水平进行生存分析,包括高表达患者 111 例,低表达患者 390 例,并通过 THPA 数据库分析 CREB3L1 mRNA 与 THCA 患者预后的关系,对 CREB3L1 mRNA 高表达组(111 例)和低表达组(390 例)进行生存分析,以分析 CREB3L1 表达与 THCA 患者临床预后的相关性。

1.2.6 CREB3L1 转录靶点及功能预测 应用 CistromeDB 预测 CREB3L1 转录靶基因,设置 score≥0.9。用 clusterProfiler 对 CREB3L1 在 THCA 组织中的相关过表达基因、CREB3L1 转录靶标交集基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书

(KEGG)功能注释。GO 包括交叉基因生物学过程、细胞组分和分子功能。

1.3 统计学处理 应用 Wilcoxon 检验比较 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织和正常甲状腺组织中的表达水平差异。由于纳入数据集存在统计学异质性($I^2>50\%$, $P<0.10$),故采用随机效应模型对 CREB3L1 的 SMD 进行评估,并运用 Egger's 检验评估 SMD 结果的发表偏倚水平。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 纳入高通量数据情况 共收集来自 11 个数据平台的 1 966 例样本(包括 1 175 例 THCA 组织和 791 例正常甲状腺组织)的高通量数据集。见表 1。

2.2 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的表达呈上调趋势 只有 2 个芯片中的 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的表达水平低于正常甲状腺组织,其余数据集均提示 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的表达上调。见图 2。CREB3L1 mRNA 表达水平具有鉴别 THCA 组织和正常甲状腺组织的能力。见图 3。

2.3 基于数据库的 CREB3L1 mRNA 表达验证 CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中的表达水平明显高于正常甲状腺组织[SMD=0.11,95%可信区间(95%CI):0.01~0.20, $I^2=41.2\%$],见图 4A。纳入数据集无明显发表偏倚,见图 4B。集成 SROC 曲线下面积(AUC)为 0.62(95%CI:0.57~0.66),见图 4C。合并灵敏度为 0.49,合并特异度为 0.67,见图 5。CREB3L1 mRNA 在 THCA 组织中过表达可能是一种具有前景的生物标志物。

表 1 纳入高通量数据集详细信息

数据集名称	THCA 组织样本($n=1\ 175$)			正常甲状腺组织样本($n=791$)		
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
GPL24676	75	1.498 661	0.899 829	42	1.409 057	0.667 250
GPL570	302	4.888 503	0.556 054	242	4.771 767	0.564 157
GPL6244	25	6.883 275	0.633 754	20	6.333 439	0.520 295
GPL96	129	3.464 093	0.772 318	76	3.542 532	0.795 145
GSE104006_GPL14951	29	6.234 042	0.772 318	5	5.843 728	0.599 571
GSE126698_GPL15456	22	32.824 870	41.860 020	6	0.939 380	0.852 047
GSE151181_GPL23159	39	6.295 333	0.273 249	13	6.202 323	0.216 495
GSE201365	6	1.518 546	1.423 441	6	1.904 073	1.687 526
GSE29315_GPL8300	31	7.780 158	0.221 568	40	7.764 635	0.248 643
GSE9115_GPL5917	15	0.031 858	0.805 474	4	-0.365 740	0.159 334
TCGA-GTEX	502	2.583 909	0.937 757	337	2.573 662	0.837 832

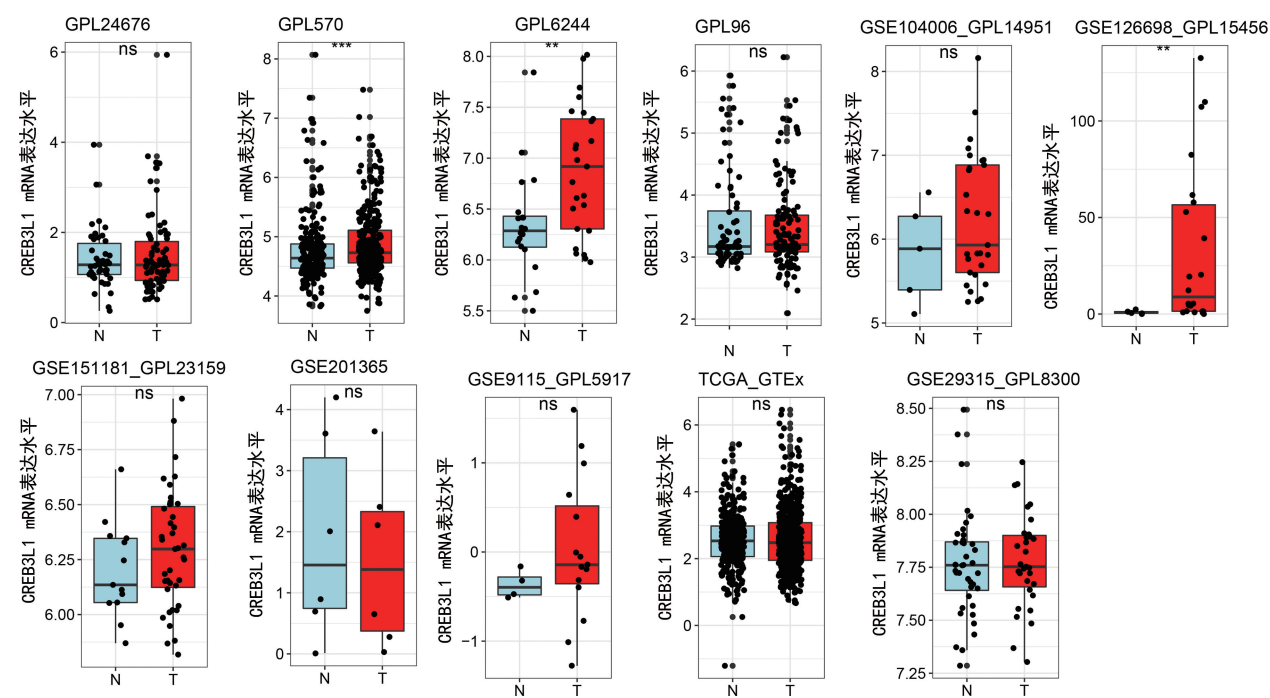


图 2 CREB3L1 mRNA 表达水平

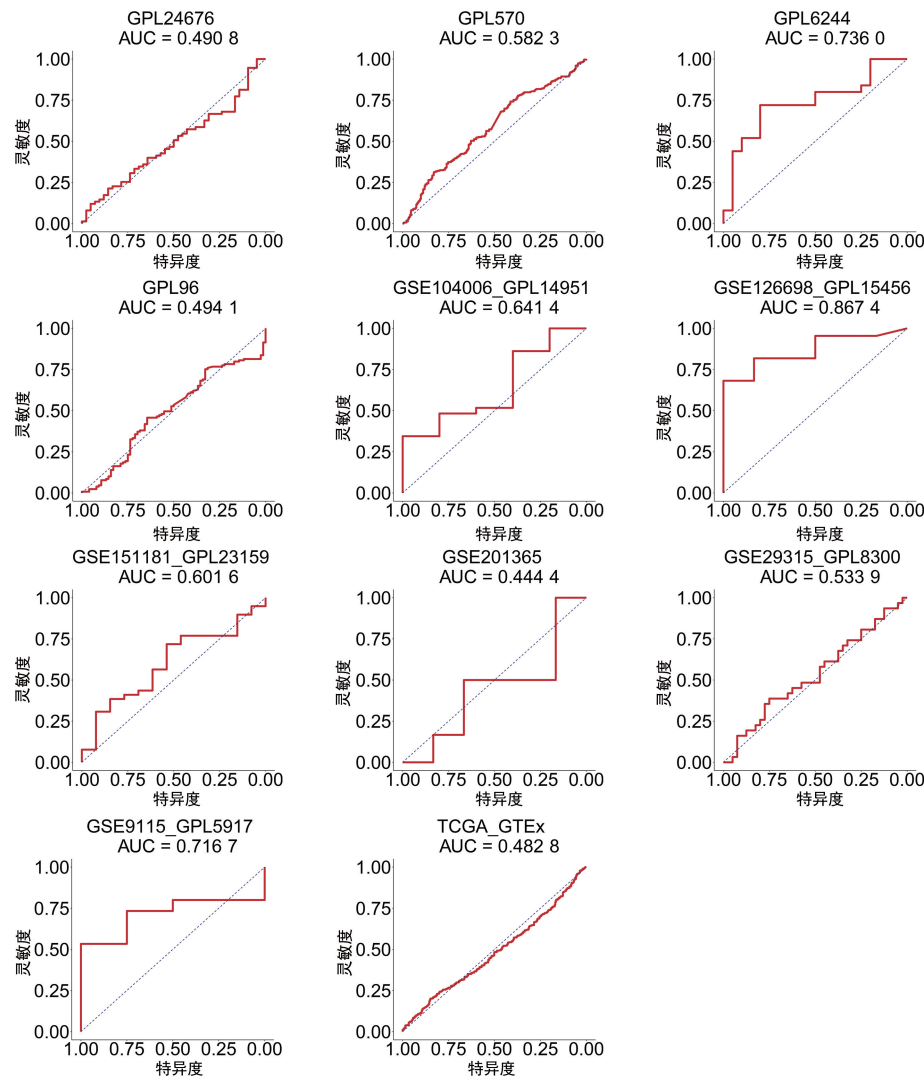
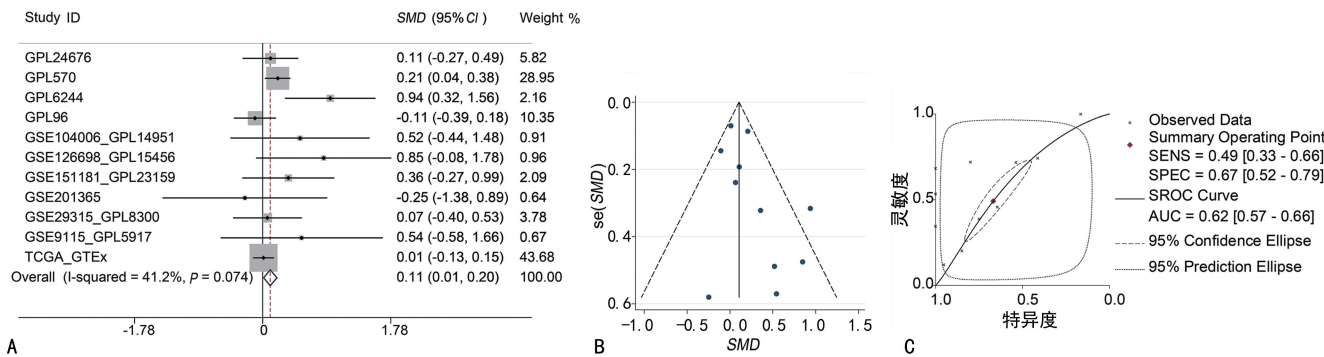
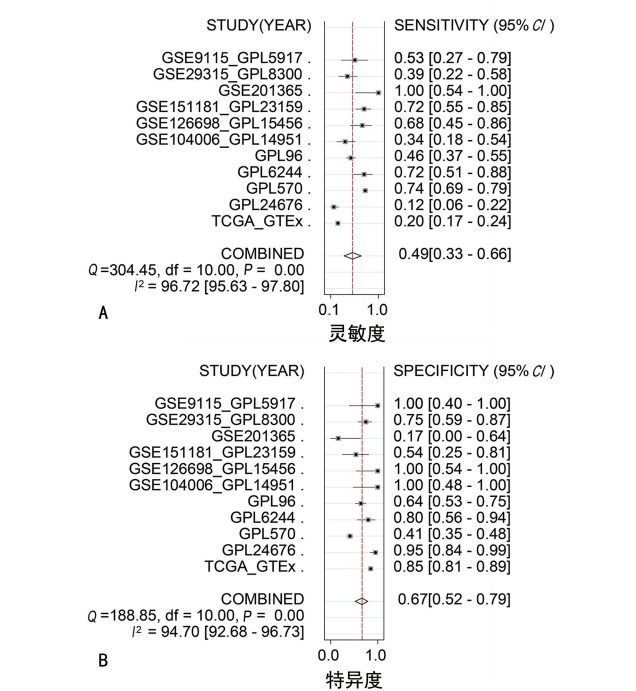


图 3 CREB3L1 mRNA 表达水平的 ROC 曲线



注: A. SMD 森林图; B. 漏斗图(Begg's 检验: 校正 $P=0.533$, Egger's 检验: $P=0.121$); C. SROC 曲线。

图 4 CREB3L1 mRNA 综合表达水平



注: A. 灵敏度森林图; B. 特异度森林图。

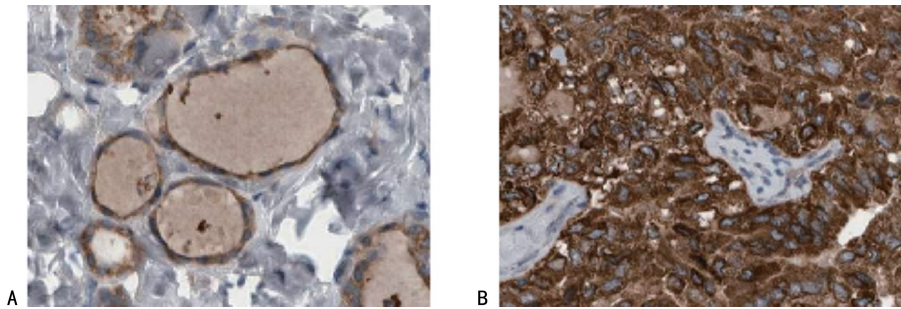
图 5 CREB3L1 mRNA 过表达对 THCA 的区分性能

2.4 CREB3L1 蛋白在 THCA 组织中的表达呈上调趋势 CREB3L1 蛋白在正常甲状腺组织滤泡上皮细胞的细胞质和细胞膜中均呈中等强度表达水平,而同一抗体(CAB026151)在 THCA 组织中呈中高等强度

表达。见图 6。表明 CREB3L1 蛋白在 THCA 组织中的表达呈上调趋势(因该工具包含的病例数有限,故未进行统计分析)。

2.5 CREB3L1 表达与 THCA 患者临床预后的相关性 CREB3L1 蛋白在 THCA 组织中高表达患者生存率比低表达者低。CREB3L1 mRNA 高表达患者 5 年生存率明显低于低表达者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 7。CREB3L1 表达可作为 THCA 风险因素,其高表达提示预后不良风险增加。

2.6 CREB3L1 在 THCA 中的潜在功能和通路 交叉基因主要生物学过程为细胞器分裂、有丝分裂核分裂、核分裂等;细胞组分包括纺锤丝、染色体区域、有丝分裂纺锤体;分子功能主要为微管结合、微管蛋白结合、外肽酶活性,见图 8A。交叉基因主要集中在细胞周期信号通路、p53 信号传导通路、范可尼贫血信号通路等,见图 8B。细胞分裂周期 6 蛋白(CDC6)、CHEK1、YWHAG、ESPL1、CDC7、CDC25C 在启动子区域有明显转录因子结合信号峰,见图 9。且 CDC6、CHEK1、YWHAG、ESPL1、CDC7、CDC25C 在 THCA 中均高表达($SMD=0.44、0.44、0.36、0.25、0.22、0.28$)。CDC6 与 CREB3L1 呈正相关,见图 10。可能为其靶基因。



注: A. CREB3L1 蛋白在正常甲状腺组织中呈中度表达(抗体 CAB026151); B. CREB3L1 蛋白在 THCA 组织中呈高度表达(抗体 CAB026151)。

图 6 CREB3L1 蛋白表达(免疫组织化学染色,200 $\times$)

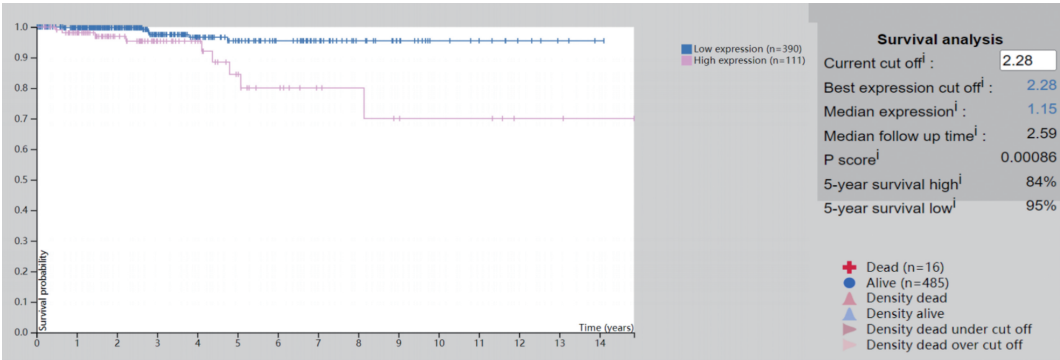
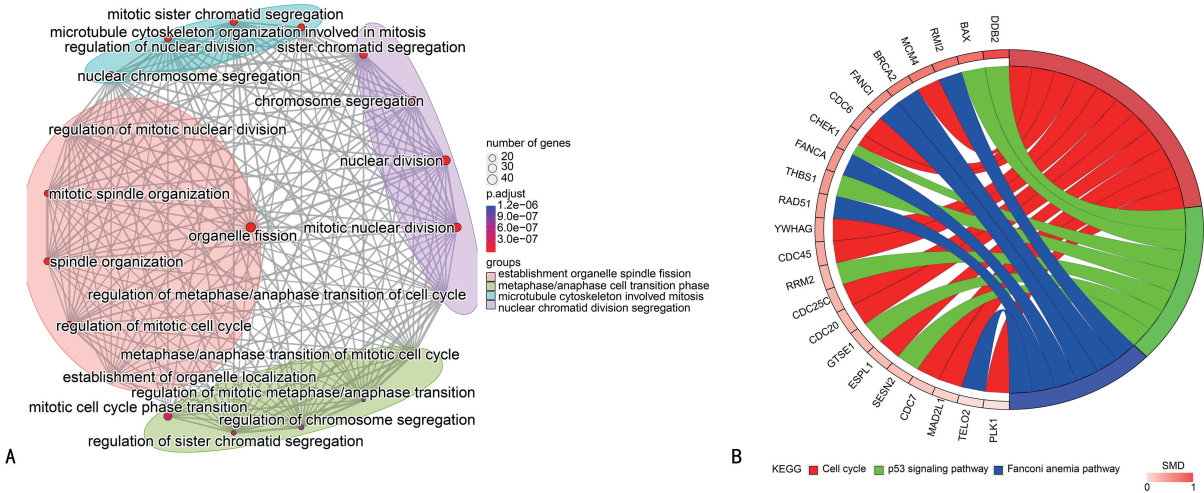
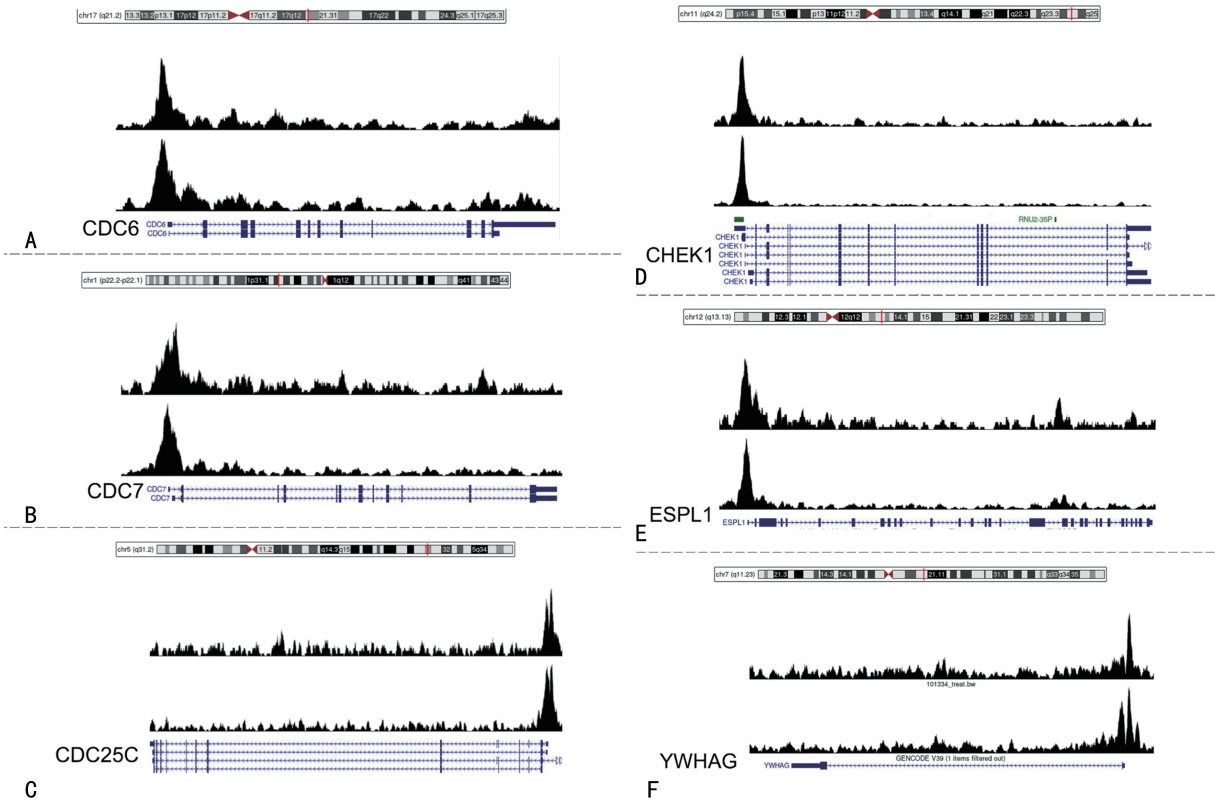


图 7 CREB3L1 mRNA 表达与 THCA 患者预后的相关性



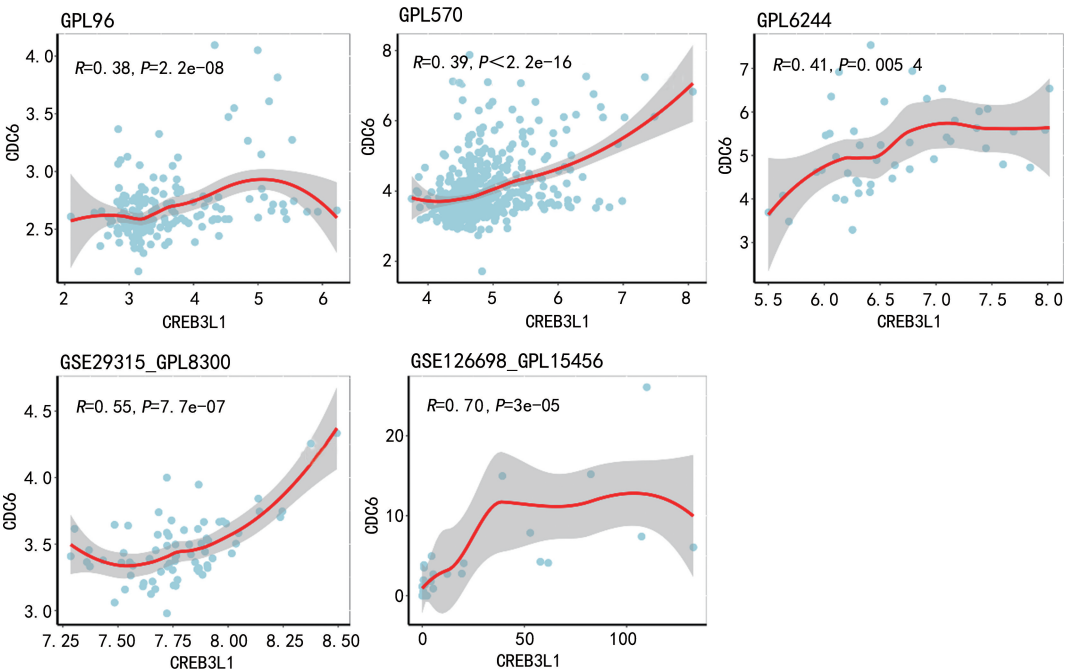
注:A. GO 富集emap图;B. KEGG 弦图。

图 8 THCA CREB3L1 相关靶基因功能注释



注:A~F 分别为 CDC6、CDC7、CDC25C、CHEK1、ESPL1、YWHAG 与 CREB3L1 的 ChIP-seq 峰图。

图 9 CREB3L1 转录靶基因鉴定



注:R 为相对系数。

图 10 CREB3L1 转录靶基因相关性散点图

3 讨 论

CREB3L1 为转录因子家族成员,是一种膜结合转录因子,位于内质网^[13]。CREB3L1 在内质网腔的序列有 Site-1 蛋白酶和 Site-2 蛋白酶水解位点,使其在跨膜区域能被调节的膜内蛋白水解。在内质网应激反应中 CREB3L1 位于内质网腔的序列被 Site-1 蛋白酶切断,位于跨膜区域的序列被 Site-2 蛋白酶切断。水解后的 N 端作为转录因子转移至细胞核,驱动细胞核中靶基因的转录^[14]。有研究表明,CREB3L1 是 ATC 模块 2 中特异度靶向基因的主调控因子;该模块中 70% 以上的基因由胶原家族成员组成,说明 CREB3L1 在 ATC 中通过调控胶原促使 ATC 进展^[15]。但 CREB3L1 在 THCA 发展中的转录机制还不明确。

本研究通过对芯片和测序数据中收集到的 THCA 和非癌样本综合分析,CREB3L1 在 THCA 组织中高表达不利于患者预后。推测 CREB3L1 可能是 THCA 的风险因子,参与了 THCA 的进展和预后,具有一定的临床意义。但目前 CREB3L1 蛋白表达水平纳入病例数较少,尚有待于今后进一步扩大样本进行验证。本研究通过对 CREB3L1 的相对过表达基因和预测靶基因取交集基因进行 GO 和 KEGG 分析发现,这些基因主要富集在细胞周期通路,生物学过程主要为细胞器分裂、核分裂。细胞周期的改变在几乎所有的癌症类型中均很常见。CREB3L1 是未折叠蛋白反应通路下游的一个关键效应器,在细胞内质网应激过程中发挥了重要作用,CREB3L1 被激活后以活化形式进入细胞核,改变对细胞增殖重要的基因转录^[16]。

与本研究结果一致,CREB3L1 通过调节与细胞周期相关的基因控制转录。

CDC6 是真核生物 DNA 复制的必要蛋白,位于染色体 17q21.3,在 DNA 复制早期其与起始识别复合物、小染色体维持蛋白、Cdt1 共同与起始识别复合物结合,促进细胞周期从 G₁ 期向 S 期过渡^[17]。CDC6 高表达可促进 DNA 合成,抑制有丝分裂细胞中细胞周期蛋白依赖性激酶 1 的活性,影响细胞分裂和增殖,并参与了恶性细胞转化。因此,CDC6 异常表达可影响 DNA 的复制过程和细胞周期的调控,导致细胞发生不可控性增殖^[18-19]。FENG 等^[20]发现,CREB3L1 作为转录因子,上调 CSPS 基因,使乳腺癌发生转移。本研究结果显示,CDC6 基因的启动子区域有明显的转录因子结合峰,且 CDC6 在 THCA 组织中高表达,CDC6 表达与 CREB3L1 呈正相关。所以推测 CREB3L1 结合 THCA 中 CDC6 的启动子区域,调节 CDC6 基因的表达,CDC6 通过影响细胞周期通路或 p53 通路最终使肿瘤细胞增殖。

综上所述,CREB3L1 在 THCA 组织中高表达,是 THCA 患者预后不良的重要因素。但目前的研究仍具有一定局限性。本研究强调了 CREB3L1 高表达在 THCA 中的生物学意义,但仍需进行连续的体内、外实验以进一步验证 CREB3L1 在 THCA 中的生物学作用及其上游可能的调节机制。

参考文献

[1] 吴华杰,张楠,李磊,等. 甲状腺癌发病的危险因素及预防策略研究进展[J]. 昆明医科大学学报,

- 2022,43(5):162-167.
- [2] MIRANDA-FILHO A, LORTET-TIEULENT J, BRAY F, et al. Thyroid cancer incidence trends by histology in 25 countries: A population-based study[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(4): 225-234.
- [3] JO Y J, CHOI H R, PARK S H, et al. Extent of thyroid surgery for clinically node-negative papillary thyroid carcinoma with confirmed nodal metastases after prophylactic central neck dissection: A 15-year experience in a single center [J]. *Ann Surg Treat Res*, 2020, 99(4): 197-204.
- [4] LIANG M, YU S, TANG S, et al. A panel of plasma exosomal miRNAs as potential biomarkers for differential diagnosis of thyroid nodules[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 449.
- [5] MELLOR P, KENDALL S, SMITH S, et al. Reduced CREB3L1 expression in triple negative and luminal a breast cancer cells contributes to enhanced cell migration, anchorage-independent growth and metastasis [J]. *PLoS One*, 2022, 17(7): e0271090.
- [6] DUAN Y, ZHANG Y, PENG W, et al. MiR-7-5p and miR-451 as diagnostic biomarkers for papillary thyroid carcinoma in formalin-fixed paraffin-embedded tissues[J]. *Pharmazie*, 2020, 75(6): 266-270.
- [7] YANG X, XU J, SUN J, et al. Clinical value of color Doppler ultrasound combined with serum tumor markers for the diagnosis of medullary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(1): 561.
- [8] MELLOR P, DEIBERT L, CALVERT B, et al. CREB3L1 is a metastasis suppressor that represses expression of genes regulating metastasis, invasion, and angiogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(24): 4985-4995.
- [9] WARD A K, MELLOR P, SMITH S E, et al. Epigenetic silencing of CREB3L1 by DNA methylation is associated with high-grade metastatic breast cancers with poor prognosis and is prevalent in triple negative breast cancers[J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 12.
- [10] ROSE M, SCHUBERT C, DIERICH S L, et al. OASIS/CREB3L1 is epigenetically silenced in human bladder cancer facilitating tumor cell spreading and migration in vitro[J]. *Epigenetics*, 2014, 9(12): 1626-1640.
- [11] DENARD B, LEE C, YE J. Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1[J]. *Elife*, 2012, 1: e00090.
- [12] PAN Z, LI L, QIAN Y, et al. The differences of regulatory networks between papillary and anaplastic thyroid carcinoma: An integrative transcriptomics study[J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(9): 853-862.
- [13] MURAKAMI T, KONDO S, OGATA M, et al. Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress [J]. *J Neurochem*, 2006, 96 (4): 1090-1100.
- [14] DENARD B, SEEMANN J, CHEN Q, et al. The membrane-bound transcription factor CREB3L1 is activated in response to virus infection to inhibit proliferation of virus-infected cells[J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(1): 65-74.
- [15] PAN Z, LI L, FANG Q, et al. Integrated bioinformatics analysis of master regulators in anaplastic thyroid carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 9734576.
- [16] KONDO S, SAITO A, ASADA R, et al. Physiological unfolded protein response regulated by OASIS family members, transmembrane bZIP transcription factors[J]. *IUBMB Life*, 2011, 63 (4): 233-239.
- [17] YANG C, XIE N, LUO Z, et al. The effect of high CDC6 levels on predicting poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Chemotherapy*, 2022, 67 (1): 47-56.
- [18] LIM N, TOWNSEND P A. Cdc6 as a novel target in cancer: Oncogenic potential, senescence and subcellular localisation[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(6): 1528-1534.
- [19] YIM H, ERIKSON R L. Regulation of the final stage of mitosis by components of the pre-replicative complex and a polo kinase[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(9): 1374-1377.
- [20] FENG Y X, JIN D X, SOKOL E S, et al. Cancer-specific PERK signaling drives invasion and metastasis through CREB3L1 [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1079.