

# CCDC69 在乳腺癌中的表达及其临床意义

刘显胜<sup>1</sup>, 王振国<sup>2</sup>, 高温杰<sup>1</sup>, 于晓双<sup>1</sup>, 任贵兵<sup>3</sup>

**【摘要】 目的** 探讨卷曲螺旋结构域蛋白69(coiled-coil domain-containing protein 69, CCDC69)在乳腺癌组织中的表达情况及其与乳腺癌患者临床特征和预后之间的相关性,预测其影响乳腺癌进展的分子机制。**方法** 从癌症基因组图集(the cancer genome atlas, TCGA)数据库下载乳腺癌数据集,获得 CCDC69 基因表达谱和临床信息。分析 CCDC69 在乳腺癌组织和正常乳腺组织中的表达情况;分析 CCDC69 的表达量与乳腺癌患者临床特征及预后之间的相关性。采用基因富集分析(GSEA)预测 CCDC69 可能参与的相关信号通路。**结果** CCDC69 在乳腺癌组织中表达量较正常乳腺组织低( $P < 0.001$ ); CCDC69 表达量与乳腺癌患者年龄( $P = 0.020$ )和肿瘤体积( $P = 0.027$ )相关。CCDC69 低表达的患者总体生存期短于 CCDC69 高表达的患者( $P = 0.004$ ),其低表达是影响乳腺癌患者预后的独立因素( $P = 0.010$ )。CCDC69 与 MYC 信号通路、E2F 信号通路、未折叠蛋白反应、糖酵解基因集负相关。**结论** CCDC69 可能是乳腺癌发生发展过程中的抑癌基因,有望成为乳腺癌潜在的治疗靶点和预后指标。

**【关键词】** 乳腺癌;卷曲螺旋结构域蛋白69;癌症基因组图集数据库;基因富集;预后

**【中国图书分类号】** R737.9

## Expression of CCDC69 in breast cancer and its clinical significance

LIU Xiansheng<sup>1</sup>, WANG Zhenguo<sup>2</sup>, GAO Wenjie<sup>1</sup>, YU Xiaoshuang<sup>1</sup>, and REN Guibing<sup>3</sup>. 1. Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China; 2. Department of Medical Research, 3. Department of Oncology, Characteristic Medical Center of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of CCDC69 in breast cancer and its association with clinical features and prognosis of breast cancer patients, and to predict the role of CCDC69 in the development of breast cancer. **Methods** Breast cancer datasets were downloaded from the cancer genome atlas (TCGA) to obtain the CCDC69 gene expression profiles and clinical information. The expression levels of CCDC69 in breast cancer tissues and normal breast tissues were compared, and the correlations of CCDC69 expression levels with clinicopathological parameters and their impact on prognosis were analyzed. Gene enrichment analysis (GSEA) was used to predict the possible pathways regulated by CCDC69 in breast cancer. **Results** CCDC69 in breast cancer tissues was under-expressed compared with normal breast tissues ( $P < 0.001$ ), and low expression of CCDC69 was an independent risk factor affecting the prognosis of patients with breast cancer. CCDC69 expressions were associated with age ( $P = 0.020$ ) and tumor size ( $P = 0.027$ ). The overall survival of patients with low expressions of CCDC69 was shorter than that of patients with high expressions of CCDC69 ( $P = 0.004$ ). CCDC69 was negatively correlated with MYC signaling pathway, E2F signaling pathway, unfolded protein response and glycolysis gene sets. **Conclusions** CCDC69 may play a role as a tumor suppressor gene involved in the occurrence and development of breast cancer, and it can be potentially used as a therapeutic target and prognostic indicator.

**【Key words】** breast cancer; CCDC69; cancer genome atlas database; gene set enrichment; prognosis

乳腺癌是全球范围内女性发病率和死亡率均排首位的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。据统计,仅2018年新发病例为208.9万例,死亡62.7万例<sup>[2]</sup>。近年来,随着新一代测序技术和突变基因检测技术在乳腺癌中的应用与发展<sup>[3]</sup>,不断有新的癌基因和抑癌基因被发现<sup>[4,5]</sup>,为乳腺癌精准治疗提供了新的方向。然而

部分患者因确诊时间晚、病理分型差、对治疗不敏感等原因,预后仍不甚理想<sup>[6]</sup>,因此亟待进一步深入研究乳腺癌的发病机制及特异性标记物。卷曲螺旋结构域蛋白(coiled-coil domain-containing protein, CCDC)是一种由两个或两个以上的卷曲螺旋结构域组成的同寡聚体或寡聚体序列蛋白,可通过基因转录、调控细胞周期、介导细胞凋亡、影响细胞侵袭能力等多种途径参与癌症的发生发展过程<sup>[7]</sup>。近年来研究发现,CCDC蛋白在肺癌、甲状腺癌、胃癌、结肠癌等多种恶性肿瘤中发挥抑癌作用<sup>[8-11]</sup>。卷曲螺旋结构域蛋白69(coiled-coil domain-containing

基金项目:天津市科技计划项目(15ZXLCSY00040)

作者简介:刘显胜,硕士研究生,医师。

作者单位:1. 300309 天津,武警后勤学院; 300162 天津,武警特色医学中心; 2. 医研部; 3. 肿瘤科

通讯作者:任贵兵, E-mail: renguibing1972@163.com

protein 69, CCDC69)是近年来新发现的 CCDC 家族成员,定位于5号染色体长臂5q33.1,由296个氨基酸构成。研究发现,CCDC69能够通过维持纺锤体的正常形态和功能,进而影响细胞分裂的准确性<sup>[12]</sup>。CCDC69可通过促进细胞周期依赖性激酶抑制蛋白(alternative reading frame, p14ARF)的表达和抑制p53蛋白的降解,增强卵巢癌细胞对化疗的敏感性,并诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。目前,关于CCDC69与乳腺癌的相关性研究尚不深入。本研究利用癌症基因组图集(the cancer genome atlas, TCGA)数据库,探讨CCDC69在乳腺癌组织中的表达情况及潜在作用,为寻找乳腺癌的新的分子诊断途径和靶向治疗方案提供证据。

## 1 资料与方法

1.1 资料数据来源及预处理 从TCGA数据库(<https://www.cancer.gov/>)下载了1108例女性乳腺癌组织样本和112例癌旁组织样本的mRNA表达谱及相关临床数据。利用R语言分析包edgeR(<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>)对原始mRNA表达数据进行基于加权截尾均值化M值(trimmed mean of M-values, TMM)标准化<sup>[14, 15]</sup>,并进行 $\log_2$ 转换用于后续分析。

1.2 数据筛选及分组 筛选出同一患者的癌组织及癌旁组织基因表达信息的病例111例,用于癌组织及癌旁组织的差异表达分析。筛选出具有完整临床信息(年龄、TNM分期、肿瘤体积、淋巴结转移、远处转移、雌激素受体、孕激素受体、人类表皮生长因子受体2、生存信息)的病例818例,用于临床相关分析。根据CCDC69的表达量进行排序,选取中位值将818例患者分为高表达组和低表达组,用于预后相关分析。

1.3 基因集富集分析 使用基因富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)软件,选择“h. all. v6.2. symbols. gmt”为参照基因集,根据1108例乳腺癌组织CCDC69的表达量建立连续表型,按默认加权富集统计(default weighted enrichment statistic)的方法,设置置换次数为1000次,计算CCDC69与参照基因集的皮肤森相关系数,并按照相关系数大

小进行基因排序,计算富集系数,设置标准化 $P < 0.05$ ,错误发现率(false discovery rates, FDR)  $< 0.25$ 为显著性富集标准。

1.4 统计学处理 使用SPSS 25.0进行统计分析。癌组织与癌旁组织的差异分析用配对 $t$ 检验。临床病理参数相关性分析采用独立样本 $t$ 检验。生存分析采用Kaplan-Meier法和Log-rank检验。单因素和多因素分析采用Cox比例风险回归模型分析,并计算风险比(HR)及其95%可信区间(CI), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCDC69在癌组织与癌旁组织中的差异表达

CCDC69在同一患者的癌组织中的表达水平( $9.922 \pm 1.126$ )低于癌旁组织( $12.571 \pm 1.388$ ),差异具有统计学意义( $P < 0.001$ )。提示在乳腺癌的发生发展过程中,CCDC69的表达可能受到抑制(图1)。

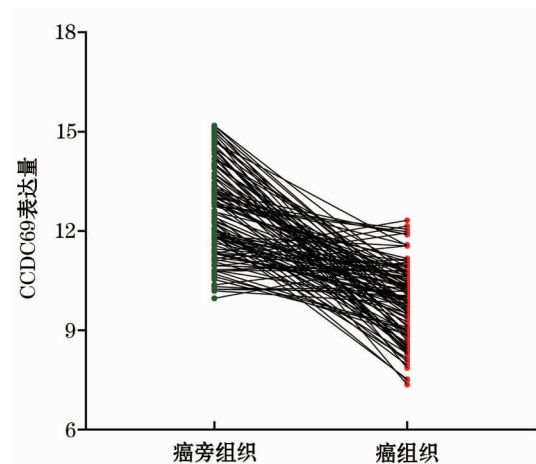


图1 CCDC69在乳腺癌组织和癌旁组织的表达量比较

2.2 CCDC69表达水平与乳腺癌患者临床病理指标的相关性 CCDC69的表达水平与患者的年龄( $P = 0.020$ )、肿瘤体积( $P = 0.027$ )密切相关,而与TNM分期、淋巴结转移情况、远端转移情况、雌激素受体(ER)表达情况、孕激素受体(PR)表达情况和人类表皮生长因子受体2(Her-2)表达情况等指标无明显相关性( $P > 0.05$ ,表1)。

表1 CCDC69 表达量与乳腺癌患者临床病理指标间的相关性 ( $\bar{x} \pm s$ )

临床指标	例数	CCDC69 表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄(岁)				
≤65	610	9.940 ± 1.121	2.324	0.020
>65	208	9.730 ± 1.136		
TNM 分期				
I ~ II	626	9.867 ± 1.123	-0.894	0.372
III ~ IV	192	9.950 ± 1.147		
肿瘤体积(cm)				
≤2	217	10.029 ± 1.091	2.221	0.027
>2	601	9.835 ± 1.138		
淋巴结转移情况				
无	402	9.884 ± 0.058	-0.062	0.950
有	416	9.889 ± 1.091		
远端转移情况				
无	803	9.896 ± 1.123	1.748	0.081
有	15	9.383 ± 1.301		
ER				
阴性	201	9.834 ± 1.278	-0.627	0.531
阳性	617	9.902 ± 1.076		
PR				
阴性	275	9.821 ± 1.258	-1.119	0.264
阳性	543	9.920 ± 1.057		
Her-2				
阴性	695	9.908 ± 1.146	1.129	0.259
阳性	159	9.796 ± 1.051		

## 2.3 CCDC69 表达水平与乳腺癌患者预后的相关性

CCDC69 的表达水平与乳腺癌患者总体生存期相关( $P=0.004$ ),高表达组患者总体生存期明显长于低表达组患者,提示 CCDC69 低表达可能是一种不良预后因素(图2)。在单因素分析中,CCDC69 的表达量、患者年龄、TNM 分期、肿瘤体积、淋巴结转移、远端转移能影响患者预后( $P<0.05$ )。多因素分析提示 CCDC69 的表达量、患者年龄、TNM 分期、远端转移是影响患者预后的独立危险因素( $P<0.05$ ,表2)。

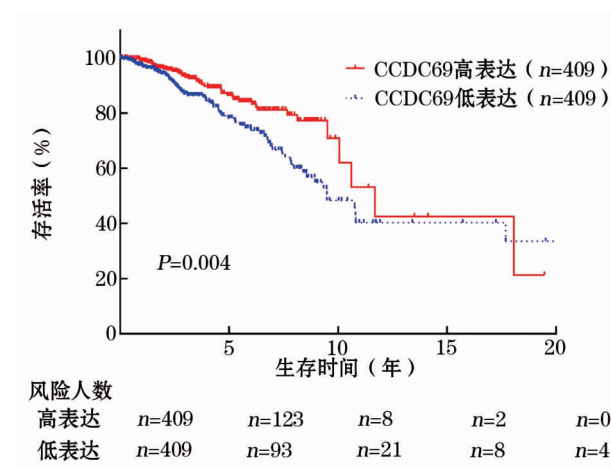


图2 CCDC69 表达水平与乳腺癌患者预后的相关性

表2 影响乳腺癌患者预后的单因素和多因素分析

临床指标	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	<i>P</i>	HR(95% CI)	<i>P</i>
CCDC69 表达量(高 vs 低)	0.581(0.397,0.848)	0.005	0.672(0.383,1.174)	0.010
年龄(>65岁 vs ≤65岁)	2.617(1.794,3.816)	0.000	3.026(2.050,4.469)	0.000
TNM 分期(III ~ IV vs I ~ II)	2.915(2.020,4.207)	0.000	2.328(1.412,3.838)	0.001
肿瘤体积(>2 cm vs ≤2 cm)	1.623(1.034,2.546)	0.035	1.130(0.685,1.863)	0.632
淋巴结转移(有 vs 无)	1.996(1.357,2.934)	0.000	1.251(0.749,2.088)	0.392
远端转移(有 vs 无)	5.716(3.195,10.226)	0.000	3.038(1.605,5.751)	0.001
ER(阳性 vs 阴性)	0.716(0.480,1.069)	0.102	0.720(0.397,1.305)	0.278
PR(阳性 vs 阴性)	0.726(0.499,1.055)	0.093	0.672(0.385,1.175)	0.163
Her-2(阳性 vs 阴性)	1.200(0.753,1.912)	0.443	1.041(0.644,1.681)	0.870

2.4 CCDC69 功能富集分析 GSEA 提示,在乳腺癌样本中,CCDC69 富集到 MYC 信号通路、E2F 信号通路、未折叠蛋白反应、糖酵解基因集,且与上述基因集呈负相关,说明 CCDC69 可能通过调节以上 4 条通路发挥抑制乳腺癌作用(表3)。

表3 CCDC69 负相关的乳腺癌样本富集的基因集

名称	富集分数	校正后富集分数	<i>P</i>	FDR
MYC 信号通路 V1	-0.65	-1.81	0.013	0.077
E2F 信号通路	-0.65	-1.76	0.037	0.064
未折叠蛋白反应	-0.49	-1.73	0.013	0.058
糖酵解	-0.41	-1.64	0.016	0.071

### 3 讨 论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,需要根据TNM分期和ER、PR、Her-2的表达情况及其他基因检测结果,选择个体化的治疗策略,并为患者复发风险和生存质量评估提供指导。随着对CCDC蛋白家族研究的深入,越来越多的证据表明CCDC蛋白在一些恶性肿瘤中发挥着重要作用,其中CCDC170与雌激素受体1基因融合可增加乳腺癌的侵袭性和复发率<sup>[16]</sup>,CCDC8在乳腺癌组织中的表达量低于良性组织,可能起到抑制乳腺癌发生发展的作用<sup>[17]</sup>。

本研究基于TCGA数据库,首次探讨了CCDC69与乳腺癌的相关性。通过111例癌组织与癌旁组织配对样本基因表达数据发现CCDC69在乳腺癌组织中的表达量较正常乳腺组织下降。基于818例具有完整临床资料的患者样本基因表达数据,发现CCDC69的表达量与患者年龄和肿瘤体积相关,且CCDC69高表达的患者总体生存期明显长于低表达患者,Cox回归分析进一步证实CCDC69 mRNA低表达是影响总生存期的独立危险因素,说明CCDC69在乳腺癌的发生发展过程中可能起到抑制作用。

此外,本研究通过对1108例乳腺癌样本中全基因组测序数据进行基因富集分析,进一步探讨了CCDC69抑制乳腺癌的可能机制。研究表明,MYC基因是乳腺癌中重要的原癌基因,与肿瘤细胞迁移和免疫逃逸密切相关<sup>[18]</sup>。E2F转录因子家族是调控细胞周期的重要蛋白,可通过调节靶基因的转录来控制乳腺癌细胞增殖及凋亡<sup>[19]</sup>。另外,肿瘤细胞生长过程中需消耗大量的营养和氧气,普遍存在着微环境缺氧、营养匮乏、pH改变等情况,而未折叠反应和糖酵解途径有利于肿瘤在此环境中生存<sup>[20-22]</sup>。因此,结合GSEA结果,CCDC69可能通过抑制MYC信号通路,E2F信号通路、未折叠蛋白反应和糖酵解途径发挥抑制乳腺癌作用。

综上所述,本研究利用生物信息学方法揭示了CCDC69作为乳腺癌预后标志物的潜在可能性,并对CCDC69在乳腺癌中的作用机制提出假设,为临床诊治乳腺癌提供新的思路。

#### 【参考文献】

[1] 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.

[2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.

[3] Yip C H, Evans D G, Agarwal G, *et al.* Global disparities in breast cancer genetics testing, counselling and management[J]. *World J Surg*, 2019,43(5):1264-1270.

[4] Abdel F T, Agarwal D, Liu D X, *et al.* SPAG5 as a prognostic biomarker and chemotherapy sensitivity predictor in breast cancer: a retrospective, integrated genomic, transcriptomic, and protein analysis[J]. *Lancet Oncol*, 2016,17(7):1004-1018.

[5] 刘静,周炳娟,马秋双,等. FOXM1、PLK1、HIF-1 $\alpha$ 及EZH2在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *武警医学*,2018,29(4):35-39.

[6] Eriksson L, Bergh J, Humphreys K, *et al.* Time from breast cancer diagnosis to therapeutic surgery and breast cancer prognosis: A population-based cohort study[J]. *Int J Cancer*, 2018,143(5):1093-1104.

[7] 许建辉,殷德涛. CCDC与恶性肿瘤的研究进展[J]. *国际外科学杂志*,2014,41(9): 635-638.

[8] Yin D T, Xu J, Lei M, *et al.* Characterization of the novel tumor-suppressor gene CCDC67 in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncotarget*,2016,7(5): 5830-5841.

[9] Jiang G Y, Zhang X P, Zhang Y, *et al.* Coiled-coil domain-containing protein 8 inhibits the invasiveness and migration of non-small cell lung cancer cells[J]. *Hum Pathol*,2016,56: 64-73.

[10] Wei S, Shang H, Cao Y, *et al.* The coiled-coil domain containing protein Ccdc136b antagonizes maternal Wnt/ $\beta$ -catenin activity during zebrafish dorsoventral axial patterning[J]. *J Genet Genomics*,2016,43(7):431-438.

[11] 贾晓鹏,齐春侠,路玲玲,等. 卷曲螺旋结构蛋白8(CCDC8)功能研究进展[J]. *生命的化学*,2016, 36(5): 710-714.

[12] Pal D, Wu D, Haruta A, *et al.* Role of a novel coiled-coil domain-containing protein CCDC69 in regulating central spindle assembly[J]. *Cell Cycle*, 2010,9(20): 4117-4129.

[13] Cui L, Zhou F, Chen C, *et al.* Overexpression of CCDC69 activates p14ARF/MDM2/p53 pathway and confers cisplatin sensitivity[J]. *J Ovarian Res*, 2019,12(1): 4-11.

[14] Dillies M A, Rau A, Aubert J, *et al.* A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis [J]. *Brief Bioinform*,2013,14(6): 671-683.