

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.010

CDCA8 和 INCENP mRNA 在肝细胞癌组织中的表达及其临床意义

张路遥, 黄辉星, 曹立环, 余龙(复旦大学生命科学学院 遗传工程国家重点实验室, 上海 200438)

[摘要] **目的:** 探讨 CDCA8 和 INCENP mRNA 在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中的表达及其临床意义。**方法:** 使用 Illumina Nextbio 芯片数据库分析原发性 HCC 组织和相应癌旁组织中 CDCA8 和 INCENP mRNA 表达情况,在癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)肝癌数据库中使用 RNA-Seq mRNA 表达数据进行验证,并结合 TCGA 临床数据分析 CDCA8 和 INCENP mRNA 表达水平与 HCC 患者临床病理特征及预后的关系,使用基因集富集软件分析目的基因高表达的相关通路。**结果:** CDCA8 和 INCENP mRNA 在 HCC 组织中表达水平显著上调($P < 0.01$)。CDCA8 mRNA 表达水平与 HCC 的组织学分级、瘤体大小、肿瘤复发、美国东部肿瘤协作组织(ECOG)评级、血清 AFP 水平、肿瘤基因拷贝数变异显著相关($P < 0.05$);INCENP mRNA 表达水平与 HCC 的组织学分级、肿瘤复发、ECOG 评级、血清 AFP 水平、肿瘤基因突变总数和肿瘤基因拷贝数变异显著相关($P < 0.05$)。CDCA8 高表达组患者的 OS 及 TFS 显著低于 CDCA8 低表达组患者($P < 0.01$);INCENP 高表达组患者的 OS 显著低于 INCENP 低表达组患者($P < 0.05$),而 TFS 无显著差异($P > 0.05$)。多因素分析显示,CDCA8 mRNA 水平是预测 HCC 患者不良预后的独立因素($P < 0.01$)。基因集富集分析表明,CDCA8 和 INCENP 可能在细胞周期之外的其他生物学信号通路中发挥一定作用。**结论:** CDCA8 和 INCENP mRNA 在 HCC 组织中呈现显著高表达。CDCA8 可能成为 HCC 预后的独立风险因素和新的治疗靶点。

[关键词] 肝细胞癌;肿瘤基因组图谱;细胞分裂周期相关蛋白 8;内着丝粒结合蛋白;预后

[中图分类号] R735.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)02-0158-10

Expressions of CDCA8 and INCENP mRNAs in hepatocellular carcinoma and their clinical significance

ZHANG Luyao, HUANG Huixing, CAO Lihuan, YU Long (National Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To explore expressions of CDCA8 and INCENP mRNAs in hepatocellular carcinoma (HCC) and their clinical significance. **Methods:** Illumina Nextbio microarray database was used to analyze expressions of CDCA8 and INCENP mRNAs in primary HCC and paired adjacent liver tissues. The results were verified by the RNA-Seq mRNA expression data in liver cancer database of The Cancer Genome Atlas (TCGA). Then correlations of the CDCA8 and INCENP mRNAs expressions with clinicopathological features and prognosis of the patients with HCC were analyzed combining with clinical data of TCGA. Gene sets enrichment analysis (GSEA) software was used to analyze the related pathways for high expressions of the target genes. **Results:** The expression levels of CDCA8 and INCENP mRNAs were significantly upregulated in HCC tissues ($P < 0.01$). The expression level of CDCA8 mRNA was significantly correlated with histological grade, clinical stage, tumor diameter, recurrence, Eastern Cooperative Oncology Group of the United States (ECOG) grade, serum alpha fetal protein (AFP) concentration and copy number alteration (CNA) of the patients with HCC ($P < 0.05$). The expression level of INCENP mRNA was evidently correlated with histological grade, recurrence, ECOG grade, serum AFP concentration, mutation counts and CNA of the patients with HCC ($P < 0.05$). Overall survival (OS) and tumor free survival (TFS) of the patients with higher expression level of CDCA8 mRNA were significantly shorter than

[基金项目] 国家科技重大专项资助项目(No. 2013ZX10002010)。Project supported by the National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China(No. 2013ZX10002010)

[作者简介] 张路遥(1991-),男,硕士生,主要从事肝癌遗传学研究,E-mail: luyaozhang13@fudan.edu.cn

[通信作者] 余龙(YU Long, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肝癌的分子遗传学机制和抗肝癌药物的研究,E-mail: longyu@fudan.edu.cn

those of the patients with lower expression level of *CDCA8* mRNA ($P < 0.01$). OS of the patients with higher expression level of *INCENP* mRNA was significantly shorter than that of the patients with lower expression level of *INCENP* mRNA ($P < 0.05$). However, there was no significant difference of TFS between the patients with higher expression level and lower expression level of *INCENP* mRNA. Multivariate analysis showed that the expression level of *CDCA8* mRNA was an independent factor for poor prognosis of the patients with HCC ($P < 0.01$). Analization of GSEA indicated that *CDCA8* and *INCENP* may play certain roles in other biological pathways except cell cycle-related pathways. **Conclusion:** Expressions of *CDCA8* and *INCENP* mRNAs appeared significant high levels in HCC tissues. *CDCA8* could be as an independent risk factor for prognosis of HCC and a potential novel target for therapy of the patients with HCC.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; the cancer genome atlas (TCGA); cell division cycle associated protein 8 (*CDCA8*); inner centromere protein (*INCENP*); prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(2): 158-167. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.010]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一^[1],其发病率在恶性肿瘤中居第5位,而病死率居第3位^[2]。由于缺少有效的诊断和治疗方法,HCC较难在早期被发现并进行有效治疗,其总体5年生存率仅为7%^[3]。因此,探索新的分子肿瘤标志物对寻找潜在的诊疗分子靶点、预测临床风险、延长HCC患者生存期具有重要意义。染色体移动复合物(chromosomal passenger complex, CPC)是细胞有丝分裂过程中的关键调控因子,在有丝分裂过程中通过4个核心蛋白的相互调节以及在时间空间上的精确定位,通过校正动粒-微管连接、激活纺锤体组装,启动细胞质分裂,确保有丝分裂的正常进行。CPC组分蛋白的过表达可导致CPC功能紊乱,无法正常发挥有丝分裂中的修复及调节作用,引起细胞分裂异常、非整倍体形成,从而加速癌症的发生与发展^[4-5]。据报道^[6-7],CPC的组成成分Aurora激酶B(Aurora B)和Survivin(baculoviral IAP repeat containing 5, BIRC5)在多种癌症中高表达,针对Aurora B、Survivin开发的抑制剂展现出良好的抗肿瘤活性,其中部分已进入临床试验阶段。而CPC的另外两个核心蛋白:细胞分裂周期相关蛋白8(cell division cycle associated 8, *CDCA8*)以及内着丝粒结合蛋白(inner centromere protein, *INCENP*)在肿瘤中的表达情况研究相对较少,有关其在HCC中的表达及临床意义的研究更是未见报道。本研究通过癌症公共数据库数据分析*CDCA8*和*INCENP* mRNA在HCC中的表达,探讨其与临床病理特征和患者预后的关系,并通过生物信息学方法初步分析这两种基因在HCC中的潜在作用。

1 资料与方法

1.1 癌症公共基因数据库的来源及数据获取

Illumina Nextbio 数据库(<https://www.nextbio.com/>)

是 Illumina 公司的一个生物医学研究数据库,其芯片数据库包含了 Gene Expression Omnibus(GEO)和 Stanford Microarray Database 中的基因芯片数据,所有芯片数据已经过标准化处理,能够在不同平台之间进行相互比较。

肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)肝癌基因表达数据和患者临床数据下载自美国 Broad 研究所基因数据分析中心 Firehose 网站(<http://gdac.broadinstitute.org/>)和 Memorial Sloan Kettering 癌症研究中心 cBioPortal 肿瘤基因组网站(<http://www.cbioportal.org/>)。TCGA 计划由美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)及国家人类基因组研究所(National Human Genome Research Institute, NHGRI)于2006年发起、2015年初步完成。使用高通量测序技术对20余种癌症共10 000多个样本进行检测,意在建立一个较完整的人类癌症基因图谱。TCGA 肝癌数据库样本来自1995年至2013年期间确诊且被纳入TCGA计划的HCC患者,由TCGA核心样本资源库负责收集,按照标准化方法处理后进行测序及分析(<http://cancergenome.nih.gov/cancer-genomics/tissuesamples>),具有临床数据的样本共377例,部分临床数据条目缺失。TCGA 肝癌数据库中的 mRNA 表达数据为RSEM(RNA-Seq by Expectation-Maximization)算法^[8]标准化后的RNA-Seq数据,共423例,包括373例癌症样本数据及50例配对癌旁样本数据,通过Illumina HiSeq 2000 测序平台获得。

1.2 使用 Illumina Nextbio 数据库分析目的基因数据

登录 Illumina Nextbio 网站(<https://www.nextbio.com/>),筛选出人类 mRNA 表达数据。剔除转移性肝癌或肝癌细胞系数据,选择 *CDCA8* 和 *INCENP* 基因表达存在显著变化的9个研究人类原发性肝癌与配对正常肝组织或癌旁组织之间 mRNA

表达差异的数据集 (GSE50579, GSE59259, GSE54236, GSE55758, GSE55048, GSE41804, GSE33294, GSE25599, GSE36411), 对癌组织和正常组织中目的基因 mRNA 相对表达情况分析, 并将 CPC 中的另外 2 个组分 *AURKB*、*BIRC5* 作为参考基因, 绘制基因相对表达差异热图。

1.3 使用 TCGA 肝癌数据库分析目的基因数据

首先, 用 TCGA 肝癌数据库中的 50 例配对肝癌/癌旁组织样本的 mRNA 表达数据验证 Illumina Next-bio 数据库的 mRNA 表达分析结果。cBioPortal 肿瘤基因组网站提供的癌症基因组数据可视为分析工具^[9], 用于分析目的基因 mRNA 表达的相关性及 mRNA 表达水平与基因拷贝数变异之间的关系。用 364 例具有 mRNA 表达数据及 GISTIC 拷贝数变异数据的 TCGA 肝癌组织样本分析 mRNA 表达水平与基因拷贝数变异之间的关系。用 361 例含 mRNA 表达数据和患者临床数据的 TCGA 原发性 HCC 样本进行基因 mRNA 表达水平与肿瘤临床病理数据、个体遗传数据(肿瘤拷贝数变异、肿瘤突变总数) 的关联性分析; 以 mRNA 表达量的中位数为分割值划分高表达组及低表达组患者, 用 314 例包含 OS 随访数据的样本(中位随访时间为 25.7 个月, 剔除随访数据缺失及随访时间小于 1 年的截尾数据) 作 OS 分析, 用 272 例包含无瘤生存 (TFS) 随访数据的样本(中位随访时间为 23.7 个月, 剔除随访数据缺失及随访时间小于 1 年的截尾数据) 作 TFS 分析。在 361 例包含 mRNA 表达数据及患者临床数据的 TCGA 样本中, 选择数据完整性大于 80% 的 11 个临床参数及 *CDCA8* 与 *INCENP* mRNA 表达数据, 分别进行影响 OS 和 TFS 的 COX 单因素分析; 单因素分析结果 *P* 值小于 0.01 的因素被纳入影响 OS 及 TFS 的 COX 多因素比例风险模型进行分析, 共计 319 例 (OS) / 229 例 (TFS) 各因素资料均完全的样本参与多因素分析。

1.4 基因集富集分析

基因集富集分析(gene sets enrichment analysis, GSEA) V2.2.2 下载自 Borad 研究所网站(<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), 使用的标准参考基因集为 GSEA Molecular Signatures 数据库(MSigDB) 中的 KEGG 和 Biocarta 通路基因集, 分析样本为 361 例 TCGA 队列具有完整 mRNA 表达数据的原发性肝细胞癌样本, 表型标签(phenotype label) 为按照 *CDCA8* 或 *INCENP* mRNA 表达值中位数划分的高表达组($n = 181$) 与低表达组($n = 180$)。剔除基因数大于 500、且小于 10 的基因集后, KEGG 和 Biocarta 通路基因集中的 327 个基因集(含 20 501

个基因) 被纳入了分析。参数设置如下: (1) 表达谱数据集(expression dataset): 选择载入的 TCGA 肝癌 mRNA 表达谱数据; (2) 基因集数据库(Gene sets database): 选择 KEGG(Kegg. V5.1. symbols. gmt) 与 Biocarta(Biocarta. V5.1. symbols. gmt) 通路数据库进行分析; (3) 随机排列数(number of permutations): 保留默认值 1 000; (4) 表型标签: 选择编辑好并已经载入的 cls 文件, 选择高表达比低表达; (5) 芯片平台(chip platform): 因为数据为非芯片数据, 无须根据探针集进行转置; (6) 排除较大数集的最大数集(max size: exclude larger sets): 排除参考通路数据库中基因数大于某设定值的基因集, 保留默认值 500; (7) 排除较小数集的最小数集(min size: exclude smaller sets): 排除参考通路数据库中基因数小于某设定值的基因集, 将默认值 15 修改为 10, 使得含有基因大于或等于 10 的基因集也进入分析, 其余参数保持默认。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 统计软件及 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) 统计作图软件进行统计分析及作图。配对数据组间检验使用 *t* 检验, 非配对数据组间检验使用 *t* 检验或 Wilcoxon 符号秩和检验, 相关性分析采用卡方检验或 Fisher 精确检验。使用 Kaplan-Meier 法进行生存分析, Log-rank 检验用于比较组间生存差异。GSEA 分析中使用 FWER 校正 *P* 值。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *CDCA8* 与 *INCENP* 在 HCC 与癌旁组织中表达上调

根据 Illumina Nextbio 数据库 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 表达变化倍数绘制的热图分析结果(图 1) 显示, 9 个芯片数据集中, *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 表达均为上调, 其中 *CDCA8* mRNA 表达上调 8 倍以上的数据集 3 个, 上调 5 ~ 8 倍的数据集 2 个, 上调 2 ~ 5 倍的数据集 4 个; *INCENP* mRNA 表达上调 2 ~ 5 倍的数据集 6 个, 上调 1.5 ~ 2 倍的芯片数据集 3 个。提示 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 在 HCC 组织中呈现上调表达, 且 *CDCA8* 的上调水平较 *INCENP* 更高。之后对 TCGA 肝癌数据库 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 表达水平分析, 验证以上结果。对 TCGA 肝癌数据库中的 HCC 组织与对应癌旁组织中的分析结果显示, 以 mRNA 表达上调 2 倍作为阈值, 在 50

对配对 HCC 组织与癌旁组织中, 48 对样本 (96.0%) *CDCA8* mRNA 表达上调, 28 对样本 (56.0%) *INCENP* mRNA 表达上调(图 2), 且癌组织中 *CDCA8* 与 *INCENP* mRNA 表达水平显著高于配对癌旁组织 ($P < 0.01$; 图 3)。此外, 通过 cBioPortal 癌症基因组网站的数据可视化工具分析 TCGA 数据库中肝癌表达数据, *CDCA8* 和 *INCENP* 基因拷贝数增加的样本 mRNA 表达水平显著高于拷贝数不变或减少的样本 ($P < 0.05, P < 0.01$; 图 4)。

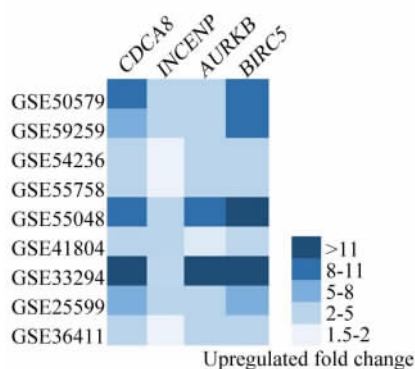


图 1 HCC 组织和正常肝组织中 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 的相对表达情况 (Illumina Nextbio 数据库和基因芯片数据, 以 Aurora B 和 Survivin 表达情况作为参照)

Fig. 1 Relative expressions of *CDCA8* and *INCENP* mRNA in HCC and normal liver tissues (Illumina Nextbio database, and microarray data, using the expression of Aurora B and Survivin as control)

2.2 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 表达水平与临床病理特征显著相关

TCGA 原发性 HCC 样本 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 表达水平结合临床数据统计分析结果显示 (表 1)。*CDCA8* mRNA 表达水平与肿瘤分化程度、肿瘤分期、瘤体大小、肿瘤复发、美国东部肿瘤协作组织 (ECOG) 评分、AFP 水平、肿瘤拷贝数变异显著相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); *INCENP* mRNA 表达水平与肿瘤分化程度、肿瘤复发、ECOG 评分、血清 AFP 浓度、肿瘤突变总数和肿瘤拷贝数变异显著相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上结果提示, *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 水平的上调与 HCC 的发生发展以及个体遗传特征具有一定关联性。

2.3 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 表达水平与患者临床预后有关联

HCC 患者预后分析结果显示, *CDCA8* mRNA 高表达组患者的 OS 和 TFS 均显著低于低表达组 (OS: HR = 2.17, 95% CI: 1.53 ~ 3.07, $P < 0.01$; TFS:

HR = 1.81, 95% CI: 1.33 ~ 2.47, $P < 0.01$),

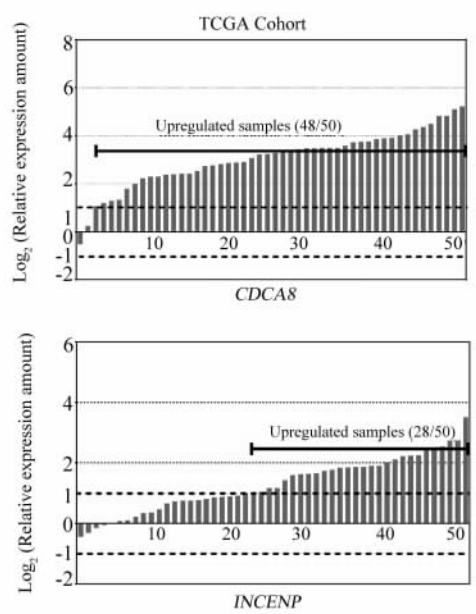


图 2 HCC 及其癌旁组织中 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 的相对表达情况 (TCGA 队列, RNA-Seq 数据; $n = 50$)

Fig. 2 Relative expressions of *CDCA8* and *INCENP* mRNA in HCC and paired adjacent liver tissues (TCGA cohort, RNA-Seq data; $n = 50$)

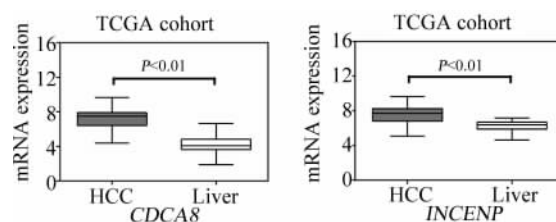
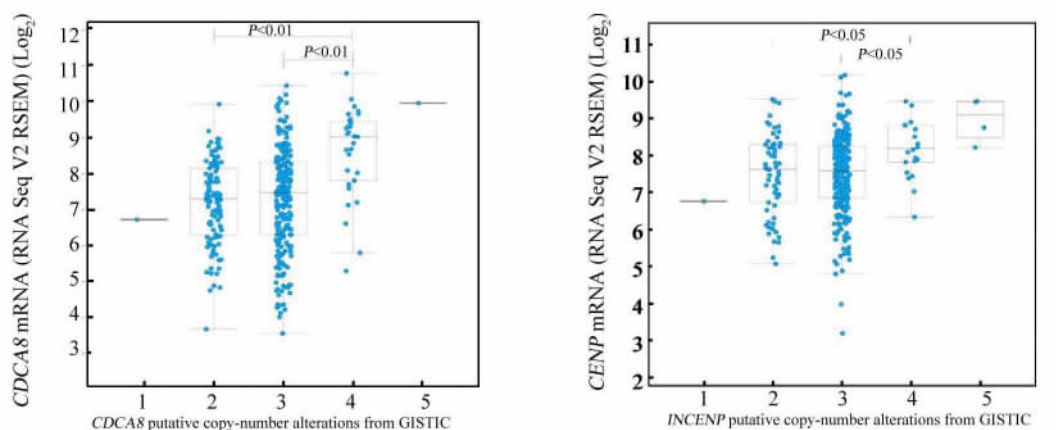


图 3 HCC 及其癌旁组织中 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 总体表达情况 (TCGA 队列, 对数转置的 RNA-Seq RSEM 数据; $n = 50$)

Fig. 3 Overall expressions of *CDCA8* and *INCENP* mRNA in HCC and paired adjacent liver tissues (TCGA cohort, log-transformed RNA-Seq RSEM data; $n = 50$)

CDCA8 mRNA 高表达组的中位 OS 为 29.6 个月, 而低表达组为 80.8 个月, *CDCA8* mRNA 高表达组的中位 TFS 为 12.7 个月, 而低表达组为 33.9 个月 (图 5)。*INCENP* mRNA 高表达组患者的 OS 显著低于低表达组 (HR = 1.57, 95% CI: 1.09 ~ 2.19, $P < 0.05$), *INCENP* mRNA 高表达组的中位 OS 为 46.0 个月, 而低表达组为 69.6 个月, 而 *INCENP* mRNA 高表达组与低表达组的 TFS 无显著差异 ($P > 0.05$)



1: Deep delation; 2: Shallow deletion; 3: Diploid; 4: Gain; 5: Amplification

图4 HCC 组织中拷贝数变异与 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 表达水平的关系(TCGA 队列, $n = 364$)

Fig. 4 The relationship between alterations of the copy-number and the expressions of *CDCA8* and *INCENP* mRNA in the HCC tissues (TCGA cohort, $n = 364$)

(图6)。COX 单因素和多因素分析结果(表2)显示:(1)和 OS 的关系:*CDCA8* mRNA 表达水平(高/低:HR = 2.01, 95% CI: 1.36-2.98, $P < 0.01$)、肿瘤临床分期(Ⅲ, IV/I, II: HR = 1.70, 95% CI: 1.15 ~ 2.51; $P < 0.01$)、乙型肝炎病史(有/无: HR = 0.40, 95% CI: 0.24 ~ 0.66, $P < 0.01$)对 OS 具有独立预后价值;(2)和 TFS 的关系:*CDCA8* mRNA 表达水平(高/低: HR = 1.74, 95% CI: 1.19 ~ 2.54; $P < 0.01$)、肿瘤临床分期(Ⅲ, IV/I, II: HR = 1.94, 95% CI: 1.27 ~ 2.97; $P < 0.01$)、血管侵犯(有/无: HR = 1.58, 95% CI: 1.06 ~ 2.35, $P < 0.05$)对 TFS 具有独立预后价值。

2.4 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 差异表达与多个生物学通路有关

在了解 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 表达水平与 HCC 的临床数据间的关系后,通过 GSEA 软件分析了 TCGA 肝癌队列 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 高表达组 ($n = 181$)与低表达组 ($n = 180$)之间具有显著差异的生物学通路。GSEA 分析结果显示,在 *CDCA8* mRNA 高表达组中,有 129 个基因集呈现上调表达,其中显著上调基因集有 15 个($P < 0.05$,表3);在 *INCENP* mRNA 高表达组中,有 245 个基因集呈现上调表达,其中显著上调基因集有 12 个($P < 0.05$,表4)。可以看出,除了细胞周期相关通路之外,剪接体通路、FAS 通路、P53 信号通路、ATR/BRCA 通路等也与 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 高表达显著相关,提示这 2 个基因可能直接或间接参与或影响这些通

路的作用。

3 讨论

在有丝分裂过程中,*CDCA8* 能够辅助 CPC 着丝粒定位,校正动粒结合位点并稳定双极纺锤体;而 *INCENP* 作为结构平台,起到完成 CPC 核心结构的装配作用,同时参与 Aurora B 激酶的激活过程^[10]。作为有丝分裂过程中的一个重要调控基因,*CDCA8* 转录活性的增强在胚胎、胚胎干细胞以及癌症细胞中被发现,同时敲减 *CDCA8* 可有效抑制肺癌、结肠癌细胞以及人类胚胎干细胞的增殖,同时促进细胞分化或诱导分化^[11-13]。在胃癌、肺癌以及结肠癌中 *CDCA8* 的高表达提示肿瘤预后风险不佳^[11-12,14];在具有化疗抗性卵巢上皮癌中, *CDCA8* 也呈现高表达^[15];提示其在细胞增殖、肿瘤形成及肿瘤向高恶性程度演变过程中有重要作用。

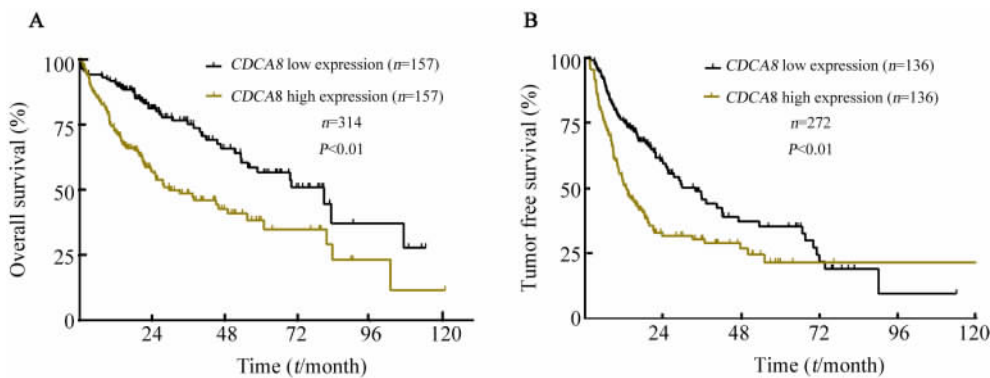
本研究发现 *CDCA8* mRNA 在 HCC 组织中出现高表达,并且发现 *CDCA8* mRNA 表达水平与 HCC 的分化程度、肿瘤分期、瘤体大小、肿瘤复发、ECOG 评分、血清 AFP 浓度、肿瘤拷贝数变异相关,提示增高的 *CDCA8* mRNA 水平与 HCC 的发生发展具有密切关系。目前,对 *CDCA8* 在癌症中的表达调控机制了解尚不完全。Hayama 等^[11]报道 *CDCA8* 与 CPC 的另外两个组分 Aurora-B 以及 Survivin 存在共同表达及磷酸化调控关系;Dai 等^[13]发现,在胚胎干细胞中 *CDCA8* 的转录受到转录因子 NF- γ 的调控。本研究发现, *CDCA8* mRNA 表达水平与基因拷贝数变异显著相关, *CDCA8* 基因拷贝数增加的患者

表 1 HCC 组织中 CDCA8 和 INCENP mRNA 表达水平与 HCC 患者临床病理特征之间的关系 (TCGA 队列)

Tab.1 Correlation between the expression levels of CDCA8 and INCENP mRNAs and the clinicopathological characters of the patients with HCC(TCGA cohort)

Variable	CDCA8 mRNA		P	INCENP mRNA		P
	High	Low		High	Low	
Age (t/a)						
≤50	44	31	0.092	43	32	0.153
>50	136	149		137	148	
Gender						
Female	63	54	0.294	67	50	0.0514
Male	117	127		113	131	
Histological grade						
I , II	92	132	0.001	98	126	0.002
III , IV	86	46		80	52	
Clinical stage						
I , II	113	136	0.006	117	132	0.079
III , IV	56	34		52	38	
Tumor diameter (d/cm)						
≤5	122	144	0.008	128	138	0.227
>5	57	35		51	41	
Metastasis						
M0	130	129	0.317	130	129	0.317
M1	1	3		1	3	
Vascular invasion						
No	95	105	0.260	98	102	0.687
Yes	57	48		54	51	
Recurrence						
No	60	80	0.023	67	73	0.049
Yes	95	75		88	82	
Child-pugh score						
A	106	106	1.000	105	107	0.654
B, C	11	11		12	10	
ECOG score						
0	74	86	0.006	79	81	0.022
1	37	44	34	47		
2-4	30	11		28	13	
AFP [$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$]						
≤20	48	94	0.001	53	89	0.000
>20	87	42		82	47	
Ishak fibrosis score						
0	32	40	0.217	35	37	0.911
1-4	35	24	29	30		
5-6	38	41		41	38	
Mutation counts						
Low	48	47	0.885	19	76	0.001
High	47	48		76	19	
CNA						
Low	68	109	0.001	73	104	0.001
High	108	68		103	73	

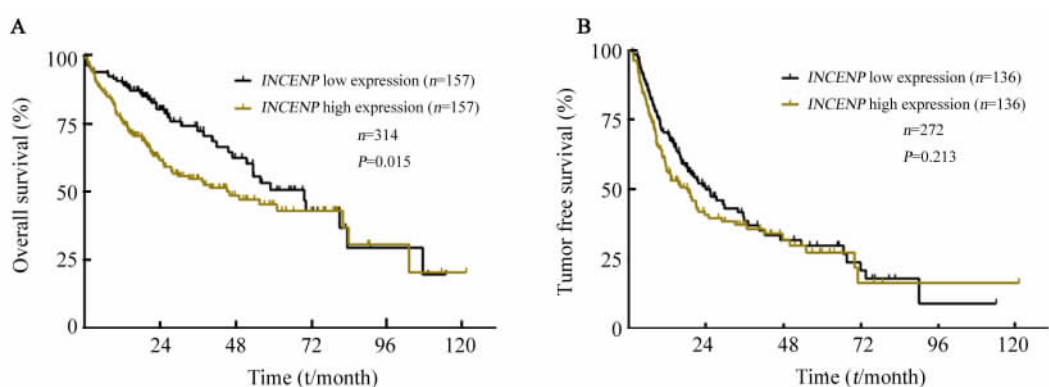
ECOG: Eastern cooperative oncology group; AFP: α -Fetoprotein; CNA: Copy number alteration



A:Overall survival curves;B:Tumor free survival curves

图5 CDCA8 mRNA 高表达组与低表达组 HCC 患者的总体生存曲线与肿瘤无复发曲线(TCGA 队列)

Fig. 5 Overall survival curves and tumor free survival curves of the patients with HCC high and low expressions CDCA8 mRNA groups (TCGA cohort)



A:Overall survival curves;B:Tumor free survival curves

图6 INCENP mRNA 高表达组与低表达组 HCC 患者的总体生存曲线与肿瘤无复发曲线(TCGA 队列)

Fig. 6 Overall survival curves and tumor free survival curves of the patients with HCC in high and low expressions of INCENP mRNA groups (TCGA cohort)

其CDCA8 mRNA 水平显著高于拷贝数正常或减少的患者。由于在多种癌症中 CDCA8 所在的染色体 1p34 区存在拷贝数变异,提示拷贝数变异可能是 CDCA8 上调的原因之一。本研究通过 COX 多因素回归模型发现,CDCA8 mRNA 的表达水平是肝癌患者 OS 与 TFS 的独立风险因子,提示 CDCA8 在 HCC 发生发展过程中很可能具有较关键作用,并且考虑到 CDCA8 与 Aurora-B 和 Survivin 紧密的相互作用关系,有理由推断 CDCA8 可作为潜在的肿瘤标志物和 HCC 治疗的靶向分子。本研究在 GSEA 分析结果中发现标准富集评分剪接体通路仅次于细胞周期和 DNA 复制通路,提示 CDCA8 与剪接体通路的关系极为密切,具体机制值得进一步研究。

INCENP 是第一个被确定的 CPC 组分,然而,其在癌症中的作用仍不明确,仅在少数癌症研究中

提到其作用问题。在 CPC 大分子中,INCENP 起到桥接作用,其 N-末端与 Survivin 及 CDCA8 结合,C-末端与 Aurora-B 连接。其中,与 Aurora-B 的连接对 Aurora-B 的完全激活是必需的^[16]。同时,INCENP 也受到 Cdk1 等蛋白的磷酸化调节^[17]。近来,INCENP 在癌症中的作用逐渐被发现,Deng 等^[18]发现癌细胞中 INCENP R887 位点的去甲基化可有效抑制癌细胞增殖,并引起 Aurora-B 活性的降低。本研究发现 INCENP mRNA 的表达水平与 HCC 的分化程度、肿瘤复发、ECOG 评分、血清 AFP 水平、肿瘤突变总数和肿瘤拷贝数变异显著相关,提示 INCENP mRNA 的上调与 HCC 的发生发展紧密相关。但是,INCENP mRNA 表达水平与患者不良预后的关联性不如 CDCA8 mRNA 表达水平明显。因此,笔者认为 INCENP 还可能通过其他机制在癌症中发

表 2 影响 HCC 患者总体生存时间及无复发生存时间因素的单因素和多因素分析

Tab. 2 Univariate and multivariate analysis of factors effecting on the OS and TFS of the patients with HCC

Variable	Overall survival			Tumor free survival		
	HR	95% CI for HR	P	HR	95% CI for HR	P
Univariate analysis						
CDCA8 (high vs low)	2.37	1.66 - 3.40	0.000	1.90	1.40 - 2.58	0.000
INCENP (high vs low)	1.52	1.07 - 2.14	0.019	1.25	0.92 - 1.69	0.150
Age($t/a > 50$ vs ≤ 50)	1.05	0.69 - 1.61	0.815	0.99	0.68 - 1.44	0.952
Gender (male vs female)	0.82	0.58 - 1.17	0.284	0.88	0.64 - 1.21	0.428
Histological grade (III, IV vs I, II)	1.08	0.75 - 1.54	0.690	1.13	0.83 - 1.54	0.439
Clinical stage (III, IV vs I, II)	2.42	1.67 - 3.49	0.000	2.42	1.74 - 3.36	0.000
Vascular invasion (yes vs no)	1.38	0.91 - 2.09	0.128	1.88	1.32 - 2.68	0.000
Surgical Resection (R1, R2 vs R0)	1.68	0.85 - 3.31	0.136	1.70	0.90 - 3.22	0.104
Asian (yes vs no)	0.75	0.52 - 1.08	0.123	0.80	0.59 - 1.09	0.167
Family history (yes vs no)	1.17	0.81 - 1.69	0.407	0.88	0.62 - 1.23	0.441
Alcohol consuming (yes vs no)	1.02	0.70 - 1.48	0.928	1.04	0.75 - 1.43	0.824
Hepatitis B (yes vs no)	0.35	0.22 - 0.57	0.000	0.52	0.37 - 0.75	0.000
Hepatitis C (yes vs no)	1.12	0.69 - 1.83	0.649	1.30	0.87 - 1.95	0.202
Multivariate analysis						
CDCA8 (high vs low)	2.01	1.36 - 2.98	0.000	1.74	1.19 - 2.54	0.004
Clinical stage (III, IV vs I, II)	1.70	1.15 - 2.51	0.008	1.94	1.27 - 2.97	0.002
Hepatitis B (yes vs no)	0.40	0.24 - 0.66	0.000	0.57	0.38 - 0.87	0.026
Vascular invasion (yes vs no)	NR	NR	NR	1.58	1.06 - 2.35	0.026

HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval; NR: Excluded in the resultant model

表 3 CDCA8 mRNA 高表达组 GSEA 显著上调富集通路(TCGA 队列, FWER, $P < 0.05$)Tab. 3 Enrichment pathway in the high expression of CDCA8 mRNA group significantly upregulated by GSEA analysis (TCGA Cohort, FWER, $P < 0.05$)

Biological process/pathway	Source	NES	FDR q-val	FWER p-val
DNA replication	KEGG	2.699 228	0	0
Cell cycle	KEGG	2.671 77	0	0
Spliceosome	KEGG	2.359 995	0	0
Cellcycle pathway	Biocarta	2.250 764	0	0
Homologous recombination	KEGG	2.224 333	0	0
Mismatch repair	KEGG	2.208 657	0	0
Atr/brca pathway	Biocarta	2.199 086	0	0
Nucleotide excision repair	KEGG	2.078 841	0	0
Oocyte meiosis	KEGG	2.062 154	0	0
G1 pathway	Biocarta	2.017 489	2.78E - 04	0.001
G2 pathway	Biocarta	2.081 404	3.71E - 04	0.001
Base excision repair	KEGG	1.981 171	1.50E - 04	0.002
Progesterone mediated oocyte maturation	KEGG	2.015 678	1.68E - 04	0.002
Fas pathway	Biocarta	1.951 895	0.001 976	0.009
P53 signaling pathway	KEGG	1.853 752	0.001 613	0.023

NES: Normalized enrichment score; FDR: False discovery rate; FWER: Familywise error rate

表4 *INCENP* mRNA 高表达组 GSEA 显著上调富集通路(TCGA 队列,FWER $P < 0.05$)

Tab.4 Enrichment pathways in the high expression of *INCENP* mRNA group significantly upregulated by GSEA analysis (TCGA Cohort,FWER $P < 0.05$)

Biological process/pathway	Source	NES	FDR q-val	FWER p-val
Cell cycle	KEGG	2.266 039	0	0
DNA replication	KEGG	2.083 161	0	0
ATR/BRCA pathway	Biocarta	2.061 22	0.001 282	0.001
Fas pathway	Biocarta	2.013 859	0.001 906	0.003
G2 pathway	Biocarta	1.968 193	0.002 048	0.005
Progesterone mediated oocyte maturation	KEGG	1.907 756	0.001 382	0.006
Caspase pathway	Biocarta	1.926 091	0.002 496	0.008
Oocyte meiosis	KEGG	1.863 314	0.002 576	0.015
Homologous recombination	KEGG	1.859 94	0.002195	0.016
Mismatch repair	KEGG	1.838 909	0.002 405	0.021
TNFR1 pathway	Biocarta	1.871 871	0.006 872	0.028
ERBB signaling pathway	KEGG	1.813 997	0.003326	0.034

NES: Normalized enrichment score; FDR: False discovery rate; FWER: Familywise error rate

挥作用。本研究发现,*INCENP* mRNA 的表达与肿瘤突变总数具有显著关联,提示突变很有可能对 *INCENP* 的表达造成影响。Kabisch 等^[19] 分析了 88 911 名欧洲女性 CPC 组分的 SNP 位点,报道 *INCENP* 的多个 SNP 位点与乳腺癌的总体风险显著相关。因此有理由认为,*INCENP* 的遗传多态性与突变在其表达及功能的改变中发挥重要作用,从而影响癌症的发生与发展。GSEA 分析结果提示,*INCENP* mRNA 高表达与多个细胞分裂之外的通路存在显著关联,如 ATR/BRCA 通路、FAS 通路、Caspase 通路等,提示 *INCENP* 与这些通路存在一定联系,须进行后续验证,以进一步明确 *INCENP* 在 HCC 发生发展中的角色。

综上,本研究首次应用美国 NCI 肿瘤基因组图谱数据库和 Illumina Nextbio 数据库人肝癌基因表达数据和肝癌患者临床病理、个体遗传数据,分析肝癌发生发展的风险因素,报道了 *CDCA8* 和 *INCENP* mRNA 在 HCC 中的表达情况及其相关临床意义,提示 *CDCA8* 很可能作为一个新的 HCC 预后判断因子和潜在的诊疗靶点。

[参 考 文 献]

[1] EL-SERAG H B. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12):1118-1127. DOI: 10. 1056/NEJMra1001683.
 [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015

[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29. DOI: 10. 3322/caac. 21254.
 [3] BOSCH F X, RIBES J, DIAZ M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends[J/OL]. Gastroenterology, 2004, 127(5 Suppl 1):S5-S16[2016-03-15]. http://dx. doi. org/10. 1053/j. gastro. 2004. 09. 011. PMID: 15508102.
 [4] CARMENA M, WHEELOCK M, FUNABIKI H, et al. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(12):789-803. DOI: 10. 1038 /nrm3474.
 [5] VAN DER HORST A, LENS S M. Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space[J]. Chromosoma, 2014, 123(1/2): 25-42. DOI: 10. 1007/s00412-013-0437-6.
 [6] AIHARA A, TANAKA S, YASEN M, et al. The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 as a novel treatment for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2010, 52(1): 63-71. DOI: 10. 1016/j. jhep. 2009. 10. 013.
 [7] KANEKO N, MITSUOKA K, AMINO N, et al. Combination of YM155, a survivin suppressant, with bendamustine and rituximab: a new combination therapy to treat relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(7): 1814-1822. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-13-2707.
 [8] LI B, DEWEY CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J/OL]. BMC Bioinformatics, 2011, 12:323[2016-03-15]. https://www. ncbi. nlm. gov/pmc/articles/PMC3163565/. DOI: 0. 1186/1471-2105-12-323.
 [9] CERAMI E, GAO J, DOGRUSOZ U, et al. The cBio cancer ge-

- nomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(5):401-404. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
- [10] JEYAPRAKASH A A, KLEIN U R, LINDNER D, et al. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together[J]. *Cell*, 2007, 131(2):271-285. DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.045.
- [11] HAYAMA S, DAIGO Y, YAMABUKI T, et al. Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 8 by aurora kinase B plays a significant role in human lung carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9):4113-4122. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4705.
- [12] WANG Y, ZHAO Z, BAO X, et al. Borealin/Dasra B is overexpressed in colorectal cancers and contributes to proliferation of cancer cells[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(11):248. DOI: 10.1007/s12032-014-0248-5.
- [13] DAI C, MIAO CX, XU XM, et al. Transcriptional activation of human *CDCA8* gene regulated by transcription factor NF-Y in embryonic stem cells and cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(37):22423-22434. DOI: 10.1074/jbc.M115.642710.
- [14] CHANG J L, CHEN T H, WANG C F, et al. Borealin/Dasra B is a cell cycle-regulated chromosomal passenger protein and its nuclear accumulation is linked to poor prognosis for human gastric cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(7):962-973. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.12.015.
- [15] JU W, YOO B C, KIM I J, et al. Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high-density oligonucleotide microarrays[J]. *Oncol Res*, 2009, 18(2-3):47-56. DOI: http://dx.doi.org/10.3727/096504009789954672.
- [16] YANG J, ZAPPACOSTA F, ANNAN R S, et al. The catalytic role of INCENP in Aurora B activation and the kinetic mechanism of Aurora B/INCENP[J]. *Biochem J*, 2009, 417(1):355-360. DOI: 10.1042/BJ20081365.
- [17] GOTO H, KIYONO T, TOMONO Y, et al. Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(2):180-187. DOI: 10.1038/ncb1350.
- [18] DENG X, VON KEUDELL G, SUZUKI T, et al. PRMT1 promotes mitosis of cancer cells through arginine methylation of INCENP[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34):35173-35182. DOI: 10.18632/oncotarget.6050.
- [19] KABISCH M, LORENZO B J, DUNNEBIER T, et al. Inherited variants in the inner centromere protein (INCENP) gene of the chromosomal passenger complex contribute to the susceptibility of ER-negative breast cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(2):256-271. DOI: 10.1093/carcin/bgu326.
- [收稿日期] 2016-12-02 [修回日期] 2017-01-10
[本文编辑] 宋关鸿

· 读者 · 作者 · 编者 ·

参考文献题名后须标注文献类型和文献载体标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都须标上[文献类型标志]或[文献类型标志/文献载体标志]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。

现把常用的文献类型标志代码和电子文献载体标志代码介绍如下:

表1 文献类型和文献载体标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联机网络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		