

# 基于生物信息学分析 TP63 在乳腺癌中的表达 及预后意义

阳纯茜<sup>1,2,3</sup> 蔡文启<sup>1,2,4</sup> 郑林惠<sup>1,2,3</sup> 张润泽<sup>1,2</sup> 刘东<sup>1,2,3</sup> 於海军<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>湖北省肿瘤临床研究中心 湖北 武汉 430071;

<sup>2</sup>武汉大学中南医院肿瘤放化疗科 湖北 武汉 430071;

<sup>3</sup>肿瘤生物学行为湖北省重点实验室 湖北 武汉 430071;

<sup>4</sup>武汉大学中南医院新洲院区/新洲区中医医院 湖北 武汉 430499

**摘要** 目的:探索肿瘤蛋白 63(TP63)在乳腺癌(BRCA)中的表达,分析其预后价值并为 BRCA 患者的治疗决策作出贡献。方法:利用 TCGA、GSE93601 和 HPA 数据库分析 BRCA 组织中 TP63 mRNA 和蛋白质表达水平,并分析其与临床病理特征的关系。通过 Kaplan-Meier 生存分析及单因素和多因素 Cox 回归分析探究 TP63 表达对 BRCA 患者预后的影响。使用 Limma 包分析 TP63 高表达组和低表达组的差异表达基因并采用富集分析预测 BRCA 中 TP63 相关的功能和通路。使用 SMART、cBioPortal 和 MethSurv 工具研究 BRCA 中 TP63 DNA 甲基化状态。采用 CIBERSORT 算法研究 BRCA 中免疫细胞浸润水平与 TP63 表达的相关性。采用 Spearman 相关性分析评估 TP63 表达与 DNA 甲基化相关基因及免疫相关生物标志物表达的相关性。结果:TP63 表达在 BRCA 中显著降低,并且与不良病理特征和不良预后相关。富集分析显示 TP63 参与细胞因子-细胞因子受体相互作用、紧密连接、激素信号通路、白细胞经内皮层迁移和细胞黏附分子等过程。TP63 低表达可能与胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CpG)甲基化增强相关。分析 TCGA 转录组数据发现,TP63 高表达组的免疫细胞浸润和免疫相关生物标志物表达增加,这可能表明高表达组对免疫疗法的反应更为有利。结论:TP63 在 BRCA 组织中低表达,有望作为独立预测 BRCA 预后的生物标志物,协助 BRCA 患者的诊断和治疗决策。

**关键词** 乳腺癌;TP63;预后标志物;生物信息学;甲基化;免疫浸润分析

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

## Expression and prognostic significance of TP63 in breast cancer based on bioinformatics analysis

YANG Chunqian<sup>1,2,3</sup>, CAI Wenqi<sup>1,2,4</sup>, ZHENG Linhui<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Runze<sup>1,2</sup>, LIU Dong<sup>1,2,3</sup>, YU Haijun<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Hubei Cancer Clinical Study Center, Wuhan 430071, Hubei, China;

<sup>2</sup>Department of Radiation and Medical Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China;

<sup>3</sup>Hubei Key Laboratory of Tumor Biological Behaviors, Wuhan 430071, Hubei, China;

<sup>4</sup>Xinzhou District Hospital of Traditional Chinese Medicine & Xinzhou Branch of Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430499, Hubei, China

**课题来源:**湖北省自然科学基金创新发展联合基金(编号:2024AFD426);武汉大学中南医院科技创新培育基金(编号:CXPY2023049);湖北省卫健委科研项目(编号:ZYCC2023005)。

**作者简介:**阳纯茜,女,1999—,医学硕士,主要从事乳腺恶性肿瘤相关基础与临床研究,E-mail: yangcq7017@163.com;蔡文启,男,1994—,医学硕士,主要从事乳腺恶性肿瘤相关临床研究,E-mail: cwq7537@163.com。阳纯茜、蔡文启为本文共同第一作者。

**通信作者:**於海军,E-mail: haijunyu@whu.edu.cn。

### Abstract

**Objective:** To explore the expression of tumor protein 63 (TP63) in breast cancer (BRCA), and to study its prognostic value and contribution to the treatment decisions of BRCA patients. **Methods:** The expression levels of TP63 mRNA and protein in BRCA tissues were analyzed by using data from TCGA, GSE93601, and HPA databases, and their relationship with clinicopathological characteristics was examined. The effect of TP63 expression on the prognosis of BRCA patients was investigated using Kaplan-Meier survival analysis and univariate and multivariate Cox regression analysis. Differentially expressed genes between the TP63 high-expression group and the low-expression group were analyzed using the Limma package, and enrichment analysis was used to predict TP63-related functions and pathways in BRCA. SMART, cBioPortal and MethSurv tools were used to study the DNA methylation status of TP63 in BRCA. The CIBERSORT algorithm was used to study the correlation between the level of immune cell infiltration and TP63 expression in BRCA. Spearman correlation analysis was used to evaluate the correlation between TP63 expression and the expression of DNA methylation-related genes and immune-related biomarkers. **Results:** TP63 expression was significantly reduced in BRCA and was associated with adverse pathological features and poor prognosis. Enrichment analysis showed that TP63 was involved in cytokine-cytokine receptor interaction, tight junction, hormone signaling, leukocyte transendothelial migration, and cell adhesion molecules. Low TP63 expression may be associated with enhanced cytosine-phosphate-guanine (CpG) methylation. Analysis of the transcriptome data from TCGA revealed that the immune cell infiltration and immune related biomarker expression in the TP63 high expression group increased, which may indicate that the high expression group has a more favorable response to immunotherapy. **Conclusion:** TP63 is lowly expressed in BRCA tissues and is expected to serve as an independent biomarker for predicting BRCA prognosis, assisting in the diagnosis and treatment decisions of BRCA patients.

**Key Words** Breast Cancer; TP63; Prognostic Marker; Bioinformatics; Methylation; Immune Infiltration Analysis

根据2022年全球癌症统计数据<sup>[1]</sup>显示,乳腺癌(breast cancer, BRCA)是女性最常见的癌症类型,也是癌症相关死亡的主要原因。根据《CSCO乳腺癌诊疗指南2024》<sup>[2]</sup>将乳腺癌分为人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)阳性、三阴性、激素受体(hormone receptor, HR)阳性和HER2低表达四类。不同分类的乳腺癌都有较为成熟的治疗方案<sup>[3]</sup>,分子理解的进步也促成了新的免疫疗法和靶向治疗的应用,显著改善了乳腺癌患者的预后<sup>[4-6]</sup>,已发现越来越多乳腺癌预后和治疗的分子靶点<sup>[7-8]</sup>。然而,乳腺癌是具有高度异质性的疾病,每个患者都有不同的个体特征,因此患有相同亚型乳腺癌的患者对治疗的反应具有个体差异。乳腺癌耐药性是乳腺癌治疗面临的重大挑战。因此,新的生物标志物不仅对于改进诊断是必要的,而且对于改善患者对治疗的反应和预后也是必要的<sup>[9]</sup>。

肿瘤蛋白63(tumor protein 63, TP63)是p53转录因子家族的一员,由位于染色体3q28的TP63基因编码。TP63与发育和分化、增殖、干细胞维持、衰老和细胞凋亡等多种生物学功能有关。TP63通常表达于乳腺系统的肌上皮细胞层<sup>[10]</sup>。TP63基因编码多种亚型的蛋白质,主要包括TAp63和 $\Delta$ Np63两类。由于这两类蛋白质的作用相反,TP63基因在乳腺癌中发挥的作用难以阐明。目前的研究<sup>[11-13]</sup>普遍认为TAp63作为肿瘤和转移抑制因子在乳腺癌中发挥抗肿瘤作用,而 $\Delta$ Np63作为致癌因子参与乳腺癌的转移和干性维持<sup>[14-17]</sup>。此外,研究<sup>[18]</sup>发现 $\Delta$ Np63 $\alpha$ 参与白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导的乳腺癌细胞顺铂耐药。有研究<sup>[19]</sup>表明,TP63表达下调与BRCA患者的无复发生存期和无转移生存期较差有关。因此,本研究旨在探索TP63表达,分析其预后价值,并为BRCA患者的治疗决策作出贡献。

## 1 材料与方法

**1.1 数据收集** BRCA 组织及癌旁组织的转录组数据以及对应的临床病理参数和随访数据来自癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)。用于验证的 BRCA 数据集从基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)获取<sup>[20]</sup>,访问编号为 GSE93601。人类蛋白质图谱(the Human Protein Atlas, HPA)数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)提供了 BRCA 组织(32 例)和癌旁组织(9 例)的免疫组织化学染色图像和蛋白质组学数据<sup>[21]</sup>。

**1.2 RNA 和蛋白表达分析** 首先,本研究使用 TIMER(tumor immune estimation resource)<sup>[22]</sup>评估多种恶性肿瘤的肿瘤和正常组织中 TP63 的差异表达。随后,对 TCGA-BRCA 数据集和 GSE93601 数据集进行单基因的差异分析,以确认 BRCA 中 TP63 的 mRNA 表达水平。使用 Wilcoxon 秩和检验确定显著性水平, $P < 0.05$  表示有统计学意义。受试者工作特征(ROC)曲线及其曲线下面积(AUC)评估了 TP63 表达在区分乳腺癌组织和正常组织方面的准确性。此外,利用 HPA 数据库的正常和肿瘤组织样本的免疫组织化学染色图像和数据,证实 TP63 的蛋白质表达水平。R 软件(4.4.2 版)进行统计分析,ggplot2 包(3.5.1 版)将结果可视化。

**1.3 临床病理特征和预后分析** 首先,整理 TCGA-BRCA 数据集的临床信息,删除含有未知信息的样本及随访期少于 30 d 的样本,最后获得 789 例具有完整临床信息的乳腺癌患者样本。随后,使用卡方检验和 Fisher 确切概率法分析了 TP63 mRNA 表达与 BRCA 各种临床病理特征之间的关系。通过 Kaplan-Meier 方法进行了总生存期(overall survival, OS)分析。使用 survminer 包(0.5.0 版)中的 surv\_cutpoint 函数寻找最佳截断值进行分组,ggsurvplot 函数绘制生存曲线。最后,应用单因素和多因素 Cox 回归模型分析影响 BRCA 患者 OS 的可能危险因素。使用 R 软件(4.4.2 版)完成统计分析, $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

**1.4 功能和通路富集分析** 根据生存分析的最佳截断值将 BRCA 患者分为 TP63 低和高表达组。利用 Limma 包(3.62.1 版)评估这两组之间基因表达的差异。将差异表达基因(differentially expressed

genes, DEGs)的阈值设置为伪发现率(false discovery rate, FDR)  $< 0.05$  和倍数变化(fold change, FC)  $> 2$ , 即  $|\log_2 FC| > 1$ 。生成一个火山图来可视化显著过表达和低表达的基因。此外,还运用 pheatmap 包(1.0.12 版)绘制了一个热图来显示前 50 个上调和下调的基因。随后,使用 ClusterProfiler 包(4.14.4 版)进行京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析和基因本体论(gene ontology, GO)富集分析。如果  $P < 0.05$ ,则认为该通路被富集。

**1.5 免疫细胞浸润分析** 使用 CIBERSORT(Cell - type Identification by Estimating Relative Subsets of RNA Transcripts)算法评估了 BRCA 组织中 22 种免疫细胞的浸润状态。采用 Spearman 相关性分析以确定 TP63 表达水平与免疫细胞浸润状态间的关联。此外,绘制提琴图展示 TP63 低和高表达组的 BRCA 微环境中各种免疫细胞的比例。

**1.6 免疫相关生物标志物分析** 采用 Spearman 相关性分析以确定 TP63 表达水平与免疫相关生物标志物间的关系。其中,程序性细胞死亡蛋白 1(programmed cell death 1, PDCD1/PD-1)、程序性细胞死亡配体 1(programmed cell death ligand 1, CD274/PD-L1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA4)和淋巴细胞激活基因 3(lymphocyte activating 3, LAG3)是与肿瘤免疫逃逸相关的重要免疫检查点标志物<sup>[23]</sup>; T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, TIGIT)、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3, TIM3/HAVCR2)、LAYN(layilin)和 CXC 基序趋化因子 3(C-X-C motif chemokine ligand 3, CXCL3)是 T 细胞耗竭标志物;干扰素  $\gamma$ (interferon gamma, IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 2(interleukin 2, IL-2)、颗粒酶 B(granzyme B, GZMB)和穿孔素 1(perforin 1, PRF1)是 T 细胞效应功能标志物。此外,本研究还分析了这些基因在 TP63 低和高表达组中的差异表达。

**1.7 表观遗传修饰分析** 首先,通过 SMART<sup>[24]</sup>分析了多种恶性肿瘤的肿瘤和正常组织中 TP63 的 CpG 聚集甲基化值。随后, Spearman 相关分析了 TP63 基因与 DNA 甲基化相关基因之间的关系,包括 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases,

DNMTs)家族成员 DNMT1/3A/3B、tRNA 天冬氨酸甲基转移酶(tRNA aspartic acid methyltransferase 1, TRDMT1)、TET 蛋白(Ten-eleven translocation, TET)家族成员 TET1-3、甲基 CpG 结合结构域(methyl-CpG-binding domain, MBD)家族成员 MBD1-4 和甲基化 CpG 结合蛋白-2(methyl-CpG-binding protein 2, MECP2)<sup>[25]</sup>。此外,本研究还分析了这些基因在 TP63 低和高表达组中的差异表达,然后使用 cBioPortal(cBio Cancer Genomics Portal)数据库<sup>[26]</sup>分析了 BRCA 中 TP63 表达与 TP63 甲基化的相关性。散点图显示 BRCA 中每个样本的 TP63 表达和甲基化水平。最后,基于 MethSurv 观察了 TCGA-BRCA 队列的 TP63 DNA 中多个探针的甲基化状态<sup>[27]</sup>。

**1.8 列线图的构建和评估** 在多因素 Cox 回归分析的基础上建立基于独立预后因素的列线图。然后,使用 Calibration 校准曲线来评估列线图的性能。此外,使用一致性指数(Concordance Index, C-index)来衡量预测和观察到的生存概率之间的差异。

## 2 结果

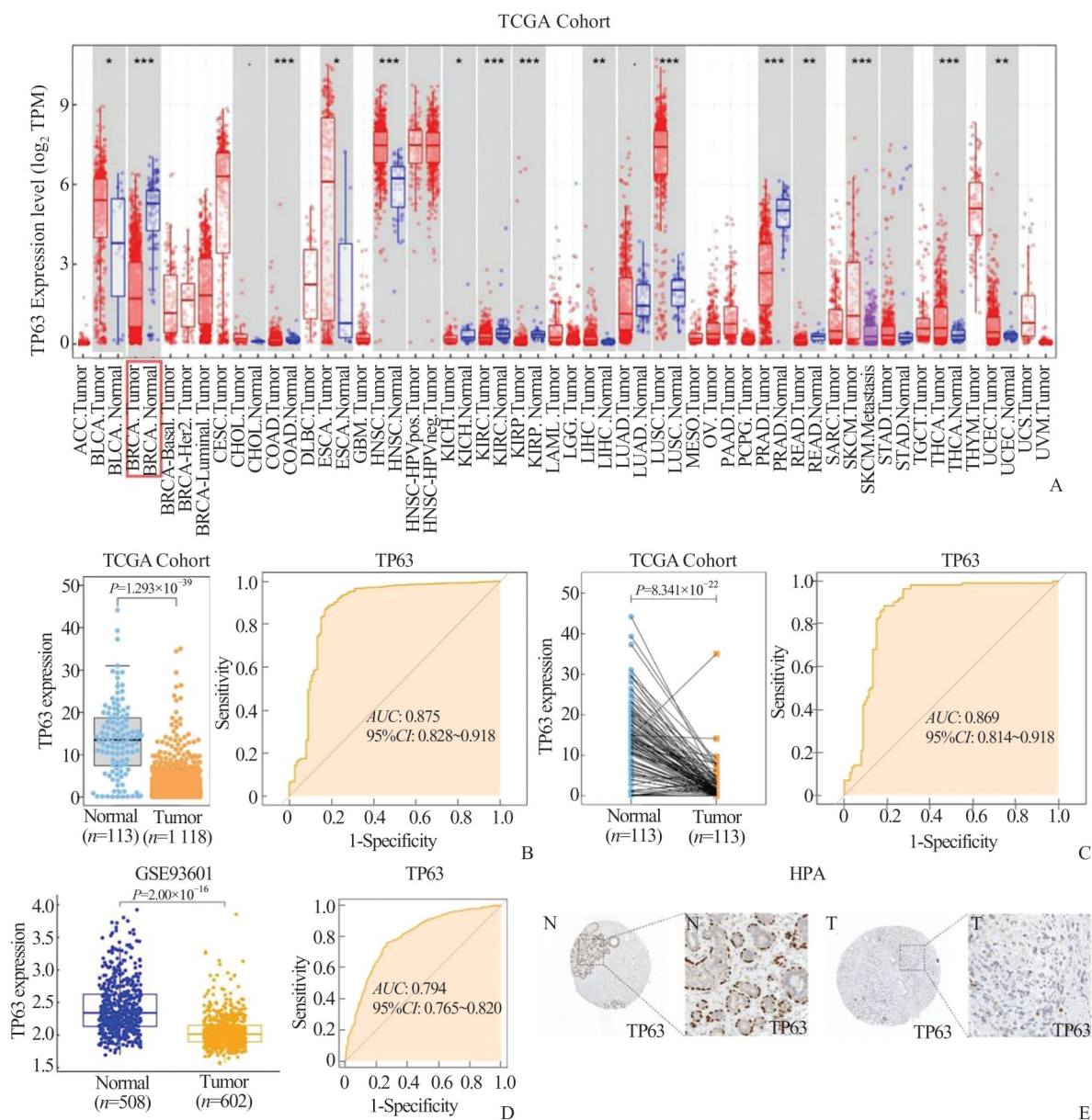
**2.1 TP63 表达水平在 BRCA 中显著降低** TIMER 评估了 TP63 在多种恶性肿瘤和相应正常组织中的差异表达。结果发现,与相应的正常组织相比,BRCA 组织中的 TP63 表达显著降低( $P < 0.001$ ,图 1A)。此外,使用 TCGA-BRCA 数据集,在 RNA 水平上分析了肿瘤和正常组织 TP63 的差异(图 1B)及配对差异分析(图 1C),进一步验证了上述结果。GSE93601 ( $n=1\ 110$ ) 数据集证实 BRCA 组织中的 TP63 表达下调( $P < 0.000\ 1$ ,图 1D)。受试者工作特征(ROC)曲线分析表明,BRCA 患者的 TP63 基因表达在预测疾病存在方面表现出高水平的准确性(图 1B~1D)。然后,分析 HPA 数据库中的 BRCA 组织和正常乳腺组织中的免疫组织化学染色图像后发现,在 9 例正常乳腺组织中,肌上皮细胞或腺细胞高表达 TP63 蛋白,数量为  $>75\%$ ;而在 32 例乳腺癌组织中,15 例未检测到 TP63 蛋白,14 例低表达和 3 例中等强度的表达(图 1E)。总之,乳腺癌组织中的 TP63 蛋白表达低于正常乳腺组织,这与 RNA 水平的结果一致。

**2.2 TP63 低表达与 BRCA 的多种临床病理特征和不良预后相关** 进一步分析 BRCA 中 TP63

mRNA 表达和临床病理特征的关系,结果显示,年龄、种族、病理分期和 T 分期是 TP63 表达的影响因素(表 1)。Kaplan-Meier 法用于评估 TP63 表达水平与 BRCA 预后之间的关联。结果显示,与 TP63 高表达组相比,TP63 低表达组的 BRCA 患者 OS 较差( $P=0.000\ 14$ ,图 2)。为了更全面地了解 BRCA 患者的预后指标,我们采用了单因素和多因素 Cox 回归分析(表 2)。单因素 Cox 回归分析的结果显示,年龄、T 分期、N 分期、M 分期和 TP63 表达与乳腺癌患者的 OS 相关。多因素 Cox 回归分析进一步证实,TP63 表达、N1 分期、N2 分期、N3 分期、M1 分期和年龄是 BRCA 患者 OS 的独立预后因素。

**2.3 TP63 相关差异表达基因的功能富集分析** 为了研究 TP63 低和高表达组之间的转录组差异,我们使用 TCGA-BRCA 数据集分析了两组中的差异表达基因。结果显示,与 TP63 低表达组相比,TP63 高表达组有 346 个基因上调,61 个基因下调(图 3A)(见图 S1,手机扫描本文 OSID 可查看)。对所有 DEGs 进行 KEGG 和 GO 富集分析。KEGG 分析结果显示,差异基因主要富集在神经活性配体-受体相互作用、细胞因子-细胞因子受体相互作用、紧密连接、激素信号通路、白细胞经内皮层迁移和细胞黏附分子等相关通路中(图 3B)。GO 富集分析的结果包括生物学过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三个方面。在 BP 相关的分析中,差异基因主要富集在体液免疫反应、表皮发育、抗菌体液反应、细胞外基质组织和细胞外结构组织等。在 CC 相关的分析中,差异基因主要富集在含胶原的细胞外基质、免疫球蛋白复合物、血液微粒、顶端连接复合体和角化套膜等。在 MF 相关的富集分析中,差异基因主要富集在糖胺聚糖结合、G 蛋白偶联受体结合、细胞因子活性和细胞外基质结构成分等(图 3C)。

**2.4 TP63 表达水平与 BRCA 中多种免疫细胞的浸润相关** 结果显示,TP63 表达水平与初始 B 细胞( $R=0.40$ ,  $P < 0.000\ 1$ )、浆细胞( $R=0.26$ ,  $P < 0.000\ 1$ )、CD8<sup>+</sup> T 细胞( $R=0.14$ ,  $P=0.005\ 3$ )、静息 CD4<sup>+</sup> 记忆 T 细胞( $R=0.22$ ,  $P < 0.000\ 1$ )、单核细胞( $R=0.21$ ,  $P < 0.000\ 1$ )、静息树突状细胞( $R=0.25$ ,  $P < 0.000\ 1$ )和静息肥大细胞( $R=0.20$ ,  $P < 0.000\ 1$ )呈正相关,而与 M0 巨噬细胞( $R=-0.36$ ,  $P < 0.000\ 1$ )和 M2 巨噬细胞( $R=-0.18$ ,



A. 通过TCGA数据库的泛癌数据分析不同肿瘤组织和相应正常组织中TP63的mRNA表达水平,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ; B. TCGA-BRCA数据集分析肿瘤和正常组织的TP63差异表达,AUC值为0.875;C. TCGA-BRCA数据集分析肿瘤和正常组织的TP63配对差异表达,AUC值为0.869;D. 通过GEO数据库的数据集(GSE93601)分析乳腺癌组织和癌旁组织中的TP63 mRNA表达水平,AUC值为0.794;E. HPA数据库中TP63在正常乳腺组织(N)和乳腺癌组织(T)中的代表性免疫组织化学染色图像。

图1 BRCA中TP63 mRNA和蛋白表达水平显著低于正常乳腺组织

$P=0.0003$ )呈负相关(图4A)。此外,TP63低和高表达组中初始B细胞、浆细胞、 $CD8^+$  T细胞、静息 $CD4^+$ 记忆T细胞、M0巨噬细胞、M2巨噬细胞、静息树突状细胞和静息肥大细胞的肿瘤浸润水平与Spearman分析结果一致(图4B)。我们发现,与TP63低表达组相比,TP63高表达组的BRCA中浸润的 $CD8^+$  T细胞和M1型巨噬细胞增多,而M2型巨噬细胞减少,这可能是TP63高表达组患者预后较好的原因之一。

**2.5 TP63表达与BRCA中的免疫相关标志物相关** 在BRCA中,TP63表达与LAYN( $R=0.42$ ,  $P<0.0001$ )表达呈正相关,而与其他免疫相关标志物的相关性不强(图S2,手机扫描本文OSID可见)。我们进一步分析了TP63低和高表达组中免疫相关标志物的差异表达。结果显示,除LAG3和HAVCR2,其他免疫相关标志物在TP63高表达组中均上调(见图S3,可扫描本文OSID二维码查看)。TP63高表达组的患者可能对PD-1/PD-L1和

表 1 BRCA 患者中 TP63 表达与临床病理特征的关联 [例(%)]

| 病理特征              | 总计        | TP63 高表达  | TP63 低表达  | $\chi^2$ | P     |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------|-------|
| 年龄                |           |           |           | 8.521    | 0.004 |
| ≤65 岁             | 601(76.2) | 435(79.1) | 166(69.5) |          |       |
| >65 岁             | 188(23.8) | 115(20.9) | 73(30.5)  |          |       |
| 性别 <sup>#</sup>   |           |           |           | —        | 0.075 |
| 女                 | 779(98.7) | 546(99.3) | 233(97.5) |          |       |
| 男                 | 10(1.3)   | 4(0.7)    | 6(2.5)    |          |       |
| 病理分期 <sup>#</sup> |           |           |           | —        | 0.018 |
| I                 | 154(19.5) | 112(20.4) | 42(17.6)  |          |       |
| II                | 454(57.5) | 303(55.1) | 151(63.2) |          |       |
| III               | 168(21.3) | 129(23.5) | 39(16.3)  |          |       |
| IV                | 13(1.6)   | 6(1.1)    | 7(2.9)    |          |       |
| T 分期              |           |           |           | 15.184   | 0.002 |
| T1                | 222(28.1) | 169(30.7) | 53(22.2)  |          |       |
| T2                | 453(57.4) | 297(54.0) | 156(65.3) |          |       |
| T3                | 91(11.5)  | 72(13.1)  | 19(7.9)   |          |       |
| T4                | 23(2.9)   | 12(2.2)   | 11(4.6)   |          |       |
| N 分期              |           |           |           | 6.127    | 0.106 |
| N0                | 392(49.7) | 258(46.9) | 134(56.1) |          |       |
| N1                | 268(34.0) | 195(35.5) | 73(30.5)  |          |       |
| N2                | 86(10.9)  | 66(12.0)  | 20(8.4)   |          |       |
| N3                | 43(5.4)   | 31(5.6)   | 12(5.0)   |          |       |
| M 分期 <sup>#</sup> |           |           |           | —        | 0.073 |
| M0                | 776(98.4) | 544(98.9) | 232(97.1) |          |       |
| M1                | 13(1.6)   | 6(1.1)    | 7(2.9)    |          |       |
| 种族                |           |           |           | 7.748    | 0.021 |
| 亚洲人               | 54(6.8)   | 36(6.5)   | 18(7.5)   |          |       |
| 黑人或非裔美国人          | 118(15.0) | 70(12.7)  | 48(20.1)  |          |       |
| 白种人               | 617(78.2) | 444(80.7) | 173(72.4) |          |       |

注：<sup>#</sup>采用 Fisher 确切概率法分析。

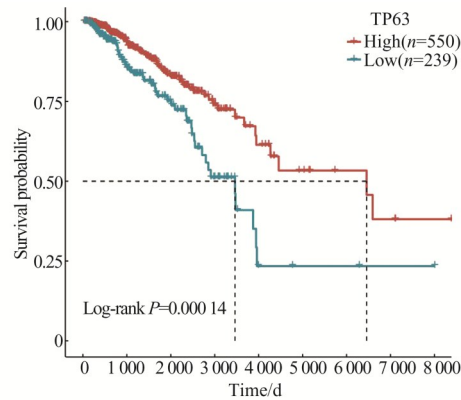


图 2 TP63 低表达与 BRCA 的不良预后相关

CTLA4 阻断疗法具有更良好的反应性。

**2.6 BRCA 中 TP63 表达下调与 DNA 甲基化修饰有关** BRCA 组织中 TP63 的 CpG 聚集甲基化水平显著高于正常组织 ( $P<0.0001$ , 图 5A)。随后,我

们分析了 BRCA 中与 DNA 甲基化相关酶的表达与 TP63 基因表达之间的相关性,结果显示这些基因表达与 TP63 表达的相关性很弱(见图 S4A,可扫描本文 OSID 二维码查看)。本研究进一步分析了 DNA 甲基化相关基因在 TP63 低和高表达组中的差异表达,结果显示 TP63 高表达组的 DNMT3B 下调而 MECP2 上调(见图 S4B,可扫描本文 OSID 二维码查看)。然而,这并不能直接反映 TP63 表达与 TP63 甲基化的相关性。因此,本研究使用 cBioPortal 工具分析了两个乳腺癌数据集中 TP63 表达与 TP63 甲基化的关系,发现二者呈负相关(图 5B)。然后,采用 MethSurv 工具分析 BRCA 中 TP63 DNA 甲基化水平。结果显示,TP63 DNA 序列中大多数甲基化位点在 BRCA 中是高甲基化的(图 S5,手机扫描本文 OSID 可见)。

**2.7 构建并评估基于独立预后因素的列线图** 为预测 BRCA 患者的预后,本研究构建了整合 TP63 表达和独立临床危险因素(年龄、N 分期和 M 分期)的列线图。较高的总分与较差的预后相关(图 6A)。此外,采用 C-index (0.742, 95%CI: 0.689~0.795) 和 Calibration 校准曲线评估列线图预测性能(图 6B~6D)。结果表明 TP63 作为影响 BRCA 患者预后的独立因素起着至关重要的作用。

3 讨论

BRCA 是女性最常见的癌症类型和癌症相关死亡的主要原因。尽管 BRCA 的治疗已经有比较成熟的方案,但是肿瘤的异质性和患者的个体差异严重影响治疗效果。因此,仍然需要进一步寻找新的生物标志物,从而为 BRCA 的治疗提供新思路。TP63 是一种转录因子,属于 TP53 家族成员,主要编码 TAp63 和  $\Delta$ Np63 两种亚型的蛋白质。既往研究<sup>[12-13]</sup>表明 TAp63 是一种肿瘤和转移抑制因子,TAp63 缺失使小鼠和人的乳腺上皮细胞转化为肿瘤起始细胞并且导致小鼠 BRCA 发生远处转移。此外,靶向 IL13R $\alpha$ 2 激活了 IL13-STAT6-TP63 信号轴,从而抑制 BRCA 细胞的迁移和肺转移<sup>[19]</sup>。而  $\Delta$ Np63 作为致癌因子在 BRCA 中发挥促肿瘤作用。从原发肿瘤到肿瘤播散再到远处转移的过程中存在  $\Delta$ Np63 的振荡表达。有研究<sup>[28]</sup>在基因工程 BRCA 原位小鼠模型中调节了 BRCA 转移过程中  $\Delta$ Np63 的表达(即最初表达  $\Delta$ Np63,然后沉默  $\Delta$ Np63,然后重新表达  $\Delta$ Np63),发现  $\Delta$ Np63 的振荡

表 2 乳腺癌患者总生存率的单因素和多因素 Cox 回归分析的结果

| 因素       | 单因素回归分析             |        | 多因素回归分析            |        |
|----------|---------------------|--------|--------------------|--------|
|          | HR(95%CI)           | P      | HR(95%CI)          | P      |
| T 分期     |                     |        |                    |        |
| T1       | Ref                 |        | Ref                |        |
| T2       | 1.305(0.828~2.056)  | 0.252  | 1.164(0.723~1.876) | 0.532  |
| T3       | 1.512(0.832~2.749)  | 0.175  | 1.088(0.568~2.084) | 0.799  |
| T4       | 4.371(2.180~8.764)  | <0.001 | 1.674(0.751~3.734) | 0.208  |
| N 分期     |                     |        |                    |        |
| N0       | Ref                 |        | Ref                |        |
| N1       | 1.773(1.168~2.693)  | 0.007  | 1.752(1.127~2.723) | 0.013  |
| N2       | 2.387(1.334~4.272)  | 0.003  | 2.637(1.426~4.878) | 0.002  |
| N3       | 5.203(2.715~9.968)  | <0.001 | 2.530(1.047~6.114) | 0.039  |
| M 分期     |                     |        |                    |        |
| M0       | Ref                 |        | Ref                |        |
| M1       | 7.748(4.143~14.490) | <0.001 | 2.829(1.166~6.865) | 0.022  |
| 年龄       |                     |        |                    |        |
| ≤65 岁    | Ref                 |        | Ref                |        |
| >65 岁    | 2.502(1.721~3.638)  | <0.001 | 2.434(1.639~3.615) | <0.001 |
| TP63     |                     |        |                    |        |
| 高表达      | Ref                 |        | Ref                |        |
| 低表达      | 2.012(1.393~2.906)  | <0.001 | 1.662(1.115~2.477) | 0.013* |
| 性别       |                     |        |                    |        |
| 女        | Ref                 |        |                    |        |
| 男        | 0.961(0.134~6.899)  | 0.968  |                    |        |
| 种族       |                     |        |                    |        |
| 亚洲人      | Ref                 |        |                    |        |
| 黑人或非裔美国人 | 1.524(0.456~5.089)  | 0.494  |                    |        |
| 白种人      | 1.108(0.349~3.518)  | 0.862  |                    |        |

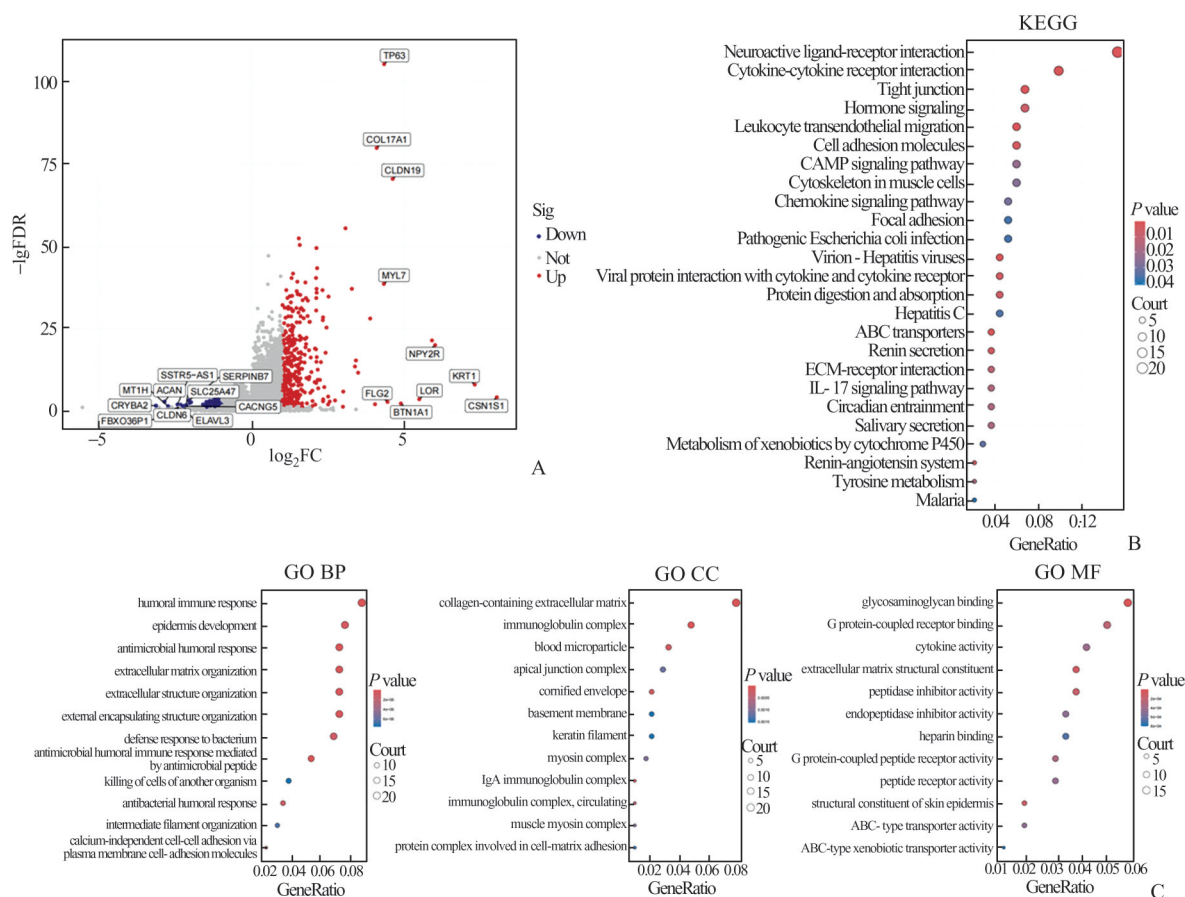
注:危险比(hazard ratio, HR);置信区间(confidence interval, CI);参照(Reference, Ref)。

表达是 BRCA 有效转移并定植于肺部所必需的。此外,ΔNp63 在 BRCA 的转移播散、干性维持和顺铂耐药方面发挥重要作用<sup>[15-18]</sup>。TAp63 和 ΔNp63 具有相反的功能,因此,TP63 基因在 BRCA 中的作用值得进行全面的研究和进一步的探索。本研究希望通过联合多个肿瘤数据库进一步挖掘 TP63 在 BRCA 中的表达,分析其预后价值并为 BRCA 患者的治疗决策作出贡献。

本研究发现 BRCA 中 TP63 表达异常下调,且高表达患者预后显著改善。单因素和多因素 Cox 回归分析证实 TP63 是 BRCA 患者 OS 的独立预后因素。转录组分析揭示 407 个 TP63 相关 DEGs,富集分析提示其通过调控多个生物学过程及通路影响肿瘤进程。肿瘤微环境中的免疫细胞浸润与肿瘤发生发展密切相关,是预测 BRCA 患者预后的重要因素<sup>[29]</sup>。免疫浸润分析的结果表明高水平的 TP63 可能通过调节 BRCA 中浸润的免疫细胞数量来影

响 BRCA 的预后。此外,发现 TP63 高表达组中部分免疫相关标志物表达上调。这些发现支持 TP63 在 BRCA 中的潜在抑制作用。基因失调可以由多种机制引起,但 DNA 甲基化修饰是与致癌作用密切相关的关键机制<sup>[25]</sup>。本研究结果发现 DNA 甲基化可能是调节 TP63 表达的重要机制,但这只是一个假设,需要研究和验证。

综上所述,本研究揭示了 BRCA 中的 TP63 表达谱以及 TP63 下调与 BRCA 患者较差的预后存在显著关联。我们研究了 BRCA 中 TP63 低表达的潜在机制,发现 TP63 的下调可能与 TP63 DNA 高甲基化有关。此外,本研究观察到 TP63 低表达对免疫细胞浸润的负面影响。以高免疫浸润和免疫检查点表达为特征的 TP63 高表达组可能决定对 PD-1/PD-L1 和 CTLA4 阻断疗法的反应更有利。总之,本研究结果表明 TP63 表达可用于预测 BRCA 的预后。尽管如此,本研究仍有不足之处。



A. TP63 低和高表达组之间的差异基因;B. KEGG 通路富集分析;C. GO 功能富集分析。

图 3 TP63 低表达组和 TP63 高表达组具有不同的富集功能和通路

首先,研究只涉及两个数据集,这限制了患者群体的多样性并导致选择偏倚。其次,使用的数据缺少 BRCA 患者的分子分型和治疗方案的信息,这可能会影响其预后和 TP63 表达,需要在后续研究中补充大样本量的临床数据进一步分析。最后,TP63 影响 BRCA 发生发展的确切机制仍不清楚,需要进一步研究以揭示 TP63 发挥作用的潜在机制。



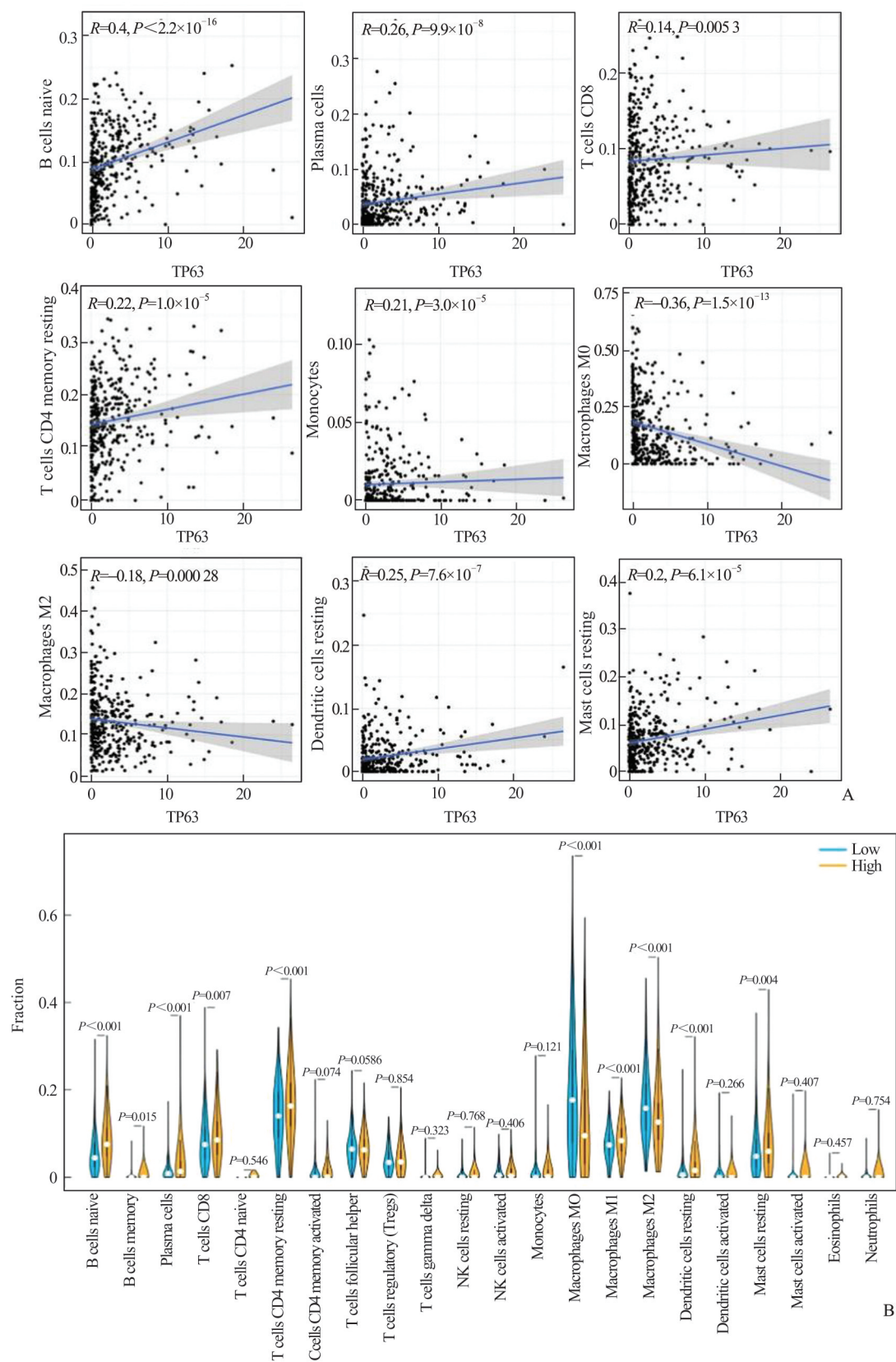
开放科学(资源服务)标识码(OSID):

#### 参考文献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] LI J, JIANG Z. Chinese society of clinical oncology breast cancer (CSCO BC) guidelines in 2024: International contributions from China[J]. Cancer Biol Med, 2024, 21(10): 838-843.
- [3] GRADISHAR W J, MORAN M S, ABRAHAM J,

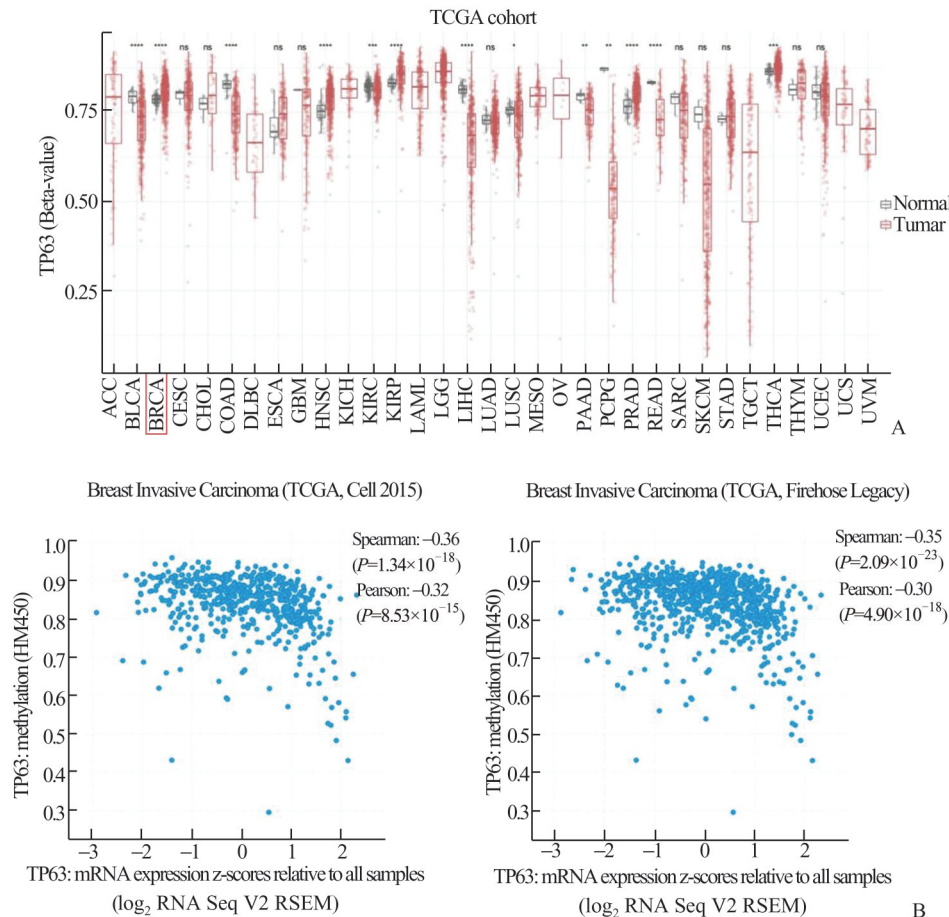
et al. Breast cancer, version 3.2024, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2024, 22(5): 331-357.

- [4] DVIR K, GIORDANO S, LEONE J P. Immunotherapy in breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(14): 7517.
- [5] JACOBS A T, MARTINEZ CASTANEDA-CRUZ D, ROSE M M, et al. Targeted therapy for breast cancer: An overview of drug classes and outcomes[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 204: 115209.
- [6] YE F, DEWANJEE S, LI Y H, et al. Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 105.
- [7] KAWIAK A. Molecular research and treatment of breast cancer 2.0[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(7): 3932.
- [8] SHAN R, DAI L J, SHAO Z M, et al. Evolving molecular subtyping of breast cancer advances precision treatment[J]. Cancer Biol Med, 2024, 21(9): 731-739.
- [9] KHAN M M, YALAMARTY S S K, RAJMALANI B A, et al. Recent strategies to overcome breast cancer resistance[J]. Crit Rev Oncol, 2024, 197: 104351.
- [10] FISHER M L, BALINTH S, MILLS A A. p63-related signaling at a glance[J]. J Cell Sci, 2020, 133(17): 104351.



A. Spearman 分析结果显示 BRCA 组织中与 TP63 表达具有显著相关性的 9 种免疫细胞;B. TP63 低和高表达组中 22 种免疫细胞的浸润水平。

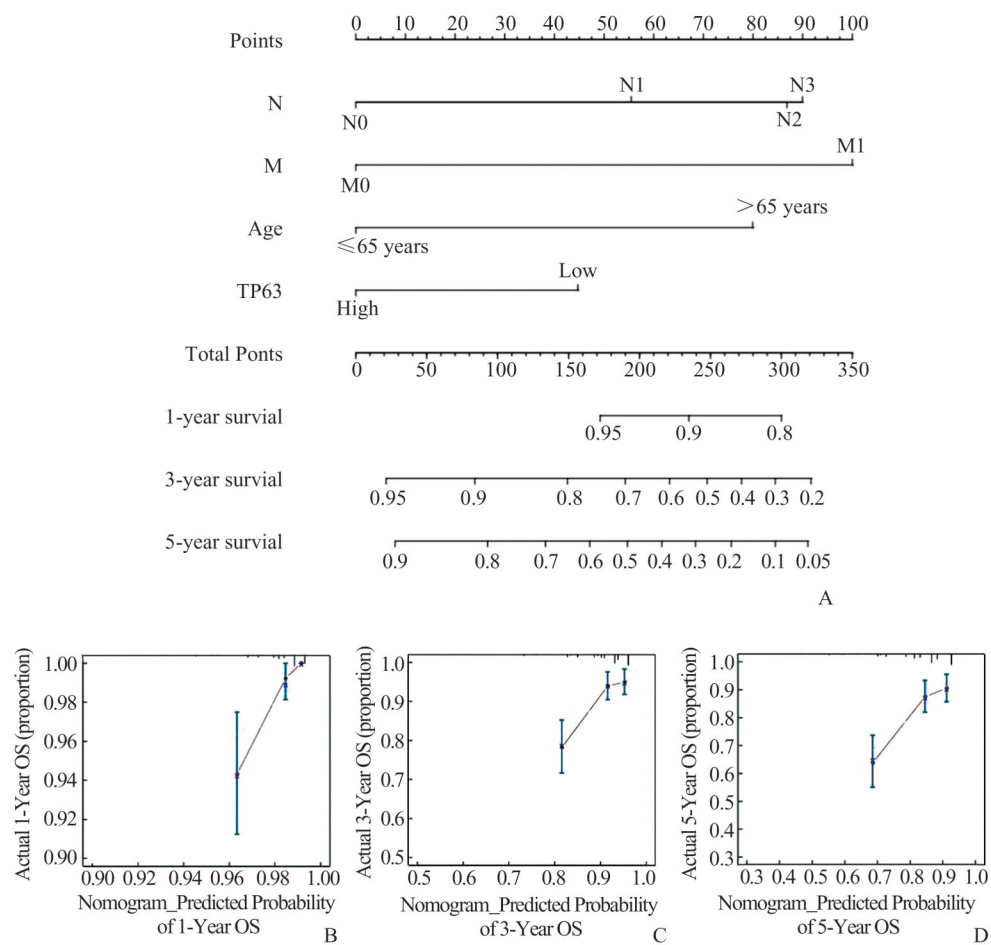
图 4 BRCA 中免疫细胞浸润与 TP63 表达之间的相关性



A. TCGA 泛癌数据中肿瘤和正常组织中 TP63 的 CpG 聚集甲基化值, ns.  $P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ;  
B. BRCA 中 TP63 表达与 TP63 DNA 甲基化的相关性分析。

图 5 BRCA 中 TP63 表达与 DNA 甲基化修饰的关系

- jcs228015.
- [11] NAPOLI M, LI X, ACKERMAN H D, et al. Pan-cancer analysis reveals TAp63-regulated oncogenic lncRNAs that promote cancer progression through AKT activation[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5156.
  - [12] SU X, CHAKRAVARTI D, CHO M S, et al. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs[J]. Nature, 2010, 467 (7318): 986-990.
  - [13] SU X, NAPOLI M, ABBAS H A, et al. TAp63 suppresses mammary tumorigenesis through regulation of the Hippo pathway[J]. Oncogene, 2017, 36(17): 2377-2393.
  - [14] GATTI V, BONGIORNO-BORBONE L, FIERRO C, et al. p63 at the crossroads between stemness and metastasis in breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (11): E2683.
  - [15] SUNDQVIST A, VASILAKI E, VOYTYUK O, et al. TGF $\beta$  and EGF signaling orchestrates the AP-1- and p63 transcriptional regulation of breast cancer invasiveness[J]. Oncogene, 2020, 39(22): 4436-4449.
  - [16] VASILAKI E, BAI Y, ALI M M, et al.  $\Delta$ Np63 bookmarks and creates an accessible epigenetic environment for TGF $\beta$ -induced cancer cell stemness and invasiveness [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 411.
  - [17] YING L, FEI X, JIALUN L, et al. SETDB2 promoted breast cancer stem cell maintenance by interaction with and stabilization of  $\Delta$ Np63 $\alpha$  protein[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(12): 2180-2191.
  - [18] MENDOZA-RODRÍGUEZ M G, AYALA-SUMUANO J T, GARCÍA-MORALES L, et al. IL-1 $\beta$  inflammatory cytokine-induced TP63 isoform  $\Delta$ NP63 $\alpha$  signaling cascade contributes to cisplatin resistance in human breast cancer cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2): E270.
  - [19] PAPAGEORGIS P, OZTURK S, LAMBERT A W, et al. Targeting IL13R $\alpha$ 2 activates STAT6-TP63 pathway to suppress breast cancer lung metastasis[J]. Breast Cancer Res, 2015, 17: 98.
  - [20] CLOUGH E, BARRETT T, WILHITE S E, et al. NCBI GEO archive for gene expression and epigenomics data sets: 23-year update[J]. Nucleic Acids Res,



A. 预测BRCA患者OS的列线图;B~D. 列线图的Calibration校准曲线,用于预测1年、3年和5年的OS。

图6 用于预测BRCA患者OS的列线图和校准曲线

- 2024, 52(d1): D138-D144.
- [21] UHLÉN M, FAGERBERG L, HALLSTRÖM B M, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome[J]. Science, 2015, 347(6220): 1260419.
- [22] LI T, FAN J, WANG B, et al. TIMER: A web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. Cancer Res, 2017, 77(21): e108-e110.
- [23] GALASSI C, CHAN T A, VITALE I, et al. The hallmarks of cancer immune evasion[J]. Cancer Cell, 2024, 42(11): 1825-1863.
- [24] LI Y, GE D, LU C. The SMART App: An interactive web application for comprehensive DNA methylation analysis and visualization[J]. Epigenetics Chromatin, 2019, 12(1): 71.
- [25] LEE A V, NESTLER K A, CHIAPPINELLI K B. Therapeutic targeting of DNA methylation alterations in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2024, 258: 108640.
- [26] CERAMI E, GAO J, DOGRUSOZ U, et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data[J]. Cancer Discov, 2012, 2(5): 401-404.
- [27] MODHUKUR V, ILJASENKO T, METSALU T, et al. MethSurv: A web tool to perform multivariable survival analysis using DNA methylation data[J]. Epigenomics, 2018, 10(3): 277-288.
- [28] BUI N H B, NAPOLI M, DAVIS A J, et al. Spatio-temporal regulation of  $\Delta$ Np63 by TGF $\beta$ -regulated miRNAs is essential for cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2020, 80(13): 2833-2847.
- [29] BAXEVANIS C N, FORTIS S P, PEREZ S A. The balance between breast cancer and the immune system: Challenges for prognosis and clinical benefit from immunotherapies[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 72: 76-89.

(2025-02-04 收稿)  
编辑 沈建国