

生物信息分析

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002779

多数据库分析 ARHGAP44 在结直肠癌中的表达及临床意义

姜小叶, 姜钟翔, 向丽苑, 吴 焦, 陈雪诺, 姜 政

(重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨多个数据集中结直肠组织的 Rho GTP 酶活化蛋白 44(Rho GTPase activating protein 44, ARHGAP44)表达情况及其与结直肠癌临床病理特征和预后的关系。**方法:**利用基因表达汇编(the gene expression omnibus, GEO)及癌症和肿瘤基因表达图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据集汇总结直肠癌相关数据, 分析 ARHGAP44 表达及其与结直肠癌临床病理学的关系, 用 Kaplan-Meier 分析和 Cox 回归模型评价其预后价值。采用 RT-qPCR 方法检测临床样本中 ARHGAP44 基因表达情况, 之后使用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)预测通路, 并使用单样本基因集富集分析(single-sample gene-set enrichment analysis, ssGSEA)算法, 计算 ARHGAP44 与免疫细胞浸润之间的关联。**结果:**在 TCGA、GEO 数据集及临床样本中, ARHGAP44 表达在肿瘤中降低($P<0.001$), 且与 T 分期及 TNM 分期有关($P<0.05$)。ARHGAP44 的低表达是结直肠癌患者总体生存(overall survival, OS)的独立危险因素($HR=0.44, P=0.02$)。GSEA 结果显示, ARHGAP44 高表达样本中富集了结直肠癌通路、Notch 通路、T 细胞受体、B 细胞受体等基因集。ARHGAP44 的表达与 macrophages、T helper cells、肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)和 type I IFN response 等免疫信号成负相关($cor=-0.35, -0.37, -0.33, -0.35, -0.23, -0.32, P=0.008, 0.006, 0.027, 0.021, 0.041, 0.021$)。**结论:**ARHGAP44 的表达在结直肠癌中被下调, 可作为独立的预后生物标记物, 且在肿瘤免疫中具有潜在作用。

【关键词】结直肠癌; ARHGAP44; 预后; 免疫**【中图分类号】**R735.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-07-31

Multi-database analysis of the expression and clinical significance of ARHGAP44 in colorectal cancer

Jiang Xiaoye, Jiang Zhongxiang, Xiang Lichun, Wu Jiao, Chen Xuenuo, Jiang Zheng

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of Rho GTPase activating protein 44 (ARHGAP44) in colorectal tissue and its relationship with the clinicopathological characteristics and prognosis of colorectal cancer in multiple data sets. **Methods:** With the use of the gene expression omnibus (GEO) and the cancer genome atlas (TCGA) cohorts, we summarized the expression of ARHGAP44 and its relationship with clinicopathological characteristics of colorectal cancer, evaluated the prognostic value by the Cox regression model and Kaplan-Meier curve. The mRNA expression of ARHGAP44 was validated in clinical samples by RT-qPCR. And gene set enrichment analysis (GSEA) was used to predict the pathway. Using the ssGSEA (single-sample gene-set enrichment analysis) algorithm, the association between ARHGAP44 and immune cell infiltration was calculated. **Results:** In TCGA, GEO datasets and clinical samples, the ARHGAP44 expressions were reduced in tumor tissues ($P<0.001$), and related to T stage and TNM stage ($P<0.05$). The low expression of ARHGAP44 showed an independent risk factor for OS (overall survival) of colorectal cancer patients ($HR=0.44, P=0.02$). GSEA results showed that the high expression samples of ARHGAP44 were rich in colorectal cancer pathway, Notch pathway, T cell receptor pathway, B cell receptor pathway and other gene sets. The expression of ARHGAP44 was negatively correlated with the infiltration levels of macrophages, T helper cells, TIL (tumor-infiltrating lymphocytes) and type I IFN response ($cor=-0.35, -0.37, -0.33, -0.35, -0.23$ and $-0.32, P=0.008, 0.006, 0.027, 0.021, 0.041$ and 0.021). **Conclusion:** The expression of ARHGAP44 is down-regulated

作者介绍: 姜小叶, Email: 277905989@qq.com,

研究方向: 消化道肿瘤的基因检测及治疗。

通信作者: 姜 政, Email: jiangz1753@163.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210412.1728.012.html>

(2021-04-13)

in colorectal cancer, which can be used as an independent prognostic biomarker for survival, and has a potential role in tumor immunology.

【Key words】colorectal cancer; ARHGAP44; prognosis; immunity

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球最常见的恶性肿瘤类型之一^[1]。根据最新数据,2018 年全球估计有 1 810 万新病例和 960 万癌症相关死亡率。然而,2018 年全球 CRC 发病率(6.1%)和死亡率(9.2%)分别排在第 3 位和第 2 位,在所有癌症类型中分别最高^[2]。从正常上皮到 CRC 的转变是一个涉及多个基因的过程^[3]。因此,鉴定新的肿瘤标志物和潜在的分子机制可能有助于 CRC 的诊断、治疗和预后。

Rho GTP 酶活化蛋白 44(Rho GTPase activating protein 44, ARHGAP44)位于染色体 17p12 区域,分子大小为 202 132 bp,编码蛋白分子量为 89 247 D。ARHGAP44 可刺激 Rho 型 GTP 酶的活性,控制 Rho 型 GTP 酶在其活性 GTP 结合状态和非活性 GDP 结合状态之间循环^[4]。Rho GTP 酶(Rho GTPase)蛋白家族属于 Ras 超家族中的一员,是一类在真核生物中普遍存在的小分子 G 蛋白(small G protein),具有 GTP 酶活性^[5]。Rho 蛋白家族包括 Cdc42、RAC1、RAC2、RAC3、RHOA 等基因,通过影响细胞迁移、细胞周期、细胞凋亡和各种细胞功能而发挥作用^[6],且 Rho 蛋白家族在免疫系统中也起重要作用^[7]。已经观察到 RHO 基因的异常表达与几种肿瘤类型的侵袭相关,包括乳腺癌、胃癌、睾丸生殖细胞肿瘤、结肠癌及黑素瘤^[8-10]。但是 ARHGAP44 在 CRC 中的生物学功能还尚未有研究。

因此,明确 ARHGAP44 在 CRC 中的表达情况及预后作用,对阐明 ARHGAP44 参与肿瘤发生发展的作用机制具有重要意义。本研究通过收集基因表达汇编(the gene expression omnibus, GEO)及癌症和肿瘤基因表达图谱(the cancer genome atlas, TCGA)这 2 个公共数据集中结肠癌数据并分别对其进行分析,明确 ARHGAP44 在 CRC 中的表达情况,分析其对结直肠癌预后生存的影响,并进一步探讨 ARHGAP44 与肿瘤免疫关系,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床标本的收集

收集来自重庆医科大学附属第一医院接受结直肠癌手术切除的 30 例结直肠癌患者的癌组织和配对癌旁组织。所有患者均为初次诊治,术前未经任何放化疗治疗。本研究已获得重庆医科大学生物医学伦理委员会审批。

1.2 数据库分析

从美国国立生物技术信息中心(National Center for

Biotechnology Information, NCBI)的 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载经预处理的结直肠癌的 series matrix 数据,包括 GSE39084(CRC 组织 50 例)、GSE39582(正常组织 19 例, CRC 组织 566 例)、GSE41258(正常组织 54 例, 息肉组织 48 例, CRC 组织 186 例)、GSE17537 (CRC 组织 55 例)、GSE30378(CRC 组织 95 例)及 GSE38832(CRC 组织 122 例),并使用 R 包“sva”“limma”给 GSE39582 与 GSE39084 做批次校正^[11];从 TCGA 数据库(<http://tcga-data.nci.nih.gov/Tcga/>)下载 33 种癌症的 RNA-Seq 数据^[12];从 TCGA 数据库下载 CRC 突变数据(workflow type: VarScan2 Variant Aggregation and Masking),并提取 TP53 突变数据。筛选临床资料及生存信息完整的数据,最终 GSE39084、GSE39582 数据集共筛选出 598 例,TCGA 数据集共筛选出 411 例。在人蛋白质图谱(<http://www.proteinatlas.org>)在线数据库中探讨 ARHGAP44 的蛋白质表达。

1.3 qRT-PCR 检测

使用 Trizol(Takara 生物技术有限公司,大连)-氯仿-异丙醇方法提取结直肠癌组织和邻近正常组织的总 RNA,并使用逆转录试剂盒(Takara 生物技术有限公司)制备 cDNA,在 Applied Biosystems StepOnePlus 实时 PCR 上使用 TB Green™ Premix Ex Taq(Takara 生物技术有限公司)进行 PCR 扩增,以 β -actin 为对照,应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法比较 30 对结直肠癌和癌旁配对组织中 ARHGAP44 mRNA 的相对表达情况。引物序列均由 Takara 生物技术有限公司设计并合成,序列见表 1。反应条件:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 10 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环。实验重复 3 次。

表 1 临床标本 qRT-PCR 引物

基因名	引物序列	大小/bp
ARHGAP44	F: 5'-CGTGAACCATATGCCAACTACA	173
	R: 5'-CCACCCAGTTTGTGTCCATGA	
β -actin	F: 5'-CCAGAACTACCTTCAACTCC-3'	132
	R: 5'-GTGATCTCCTTGTGCATCCTGT-3'	

1.4 基因集富集分析

然后使用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)(4.0 版, <http://software.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp>)研究 ARHGAP44 基因表达水平对各生物通路基因集的影响。利用 GSEA 网站 MSigDB 数据库中的“c5.all.v7.1.symbols.gmt”数据集及“c2.cp.kegg.v7.1.symbols.gmt”数据集作为功能基因集,按缺省加权富集统计方法,设置随机组合次数为 1 000 次。 $P < 0.05$ 、 $FDR < 0.25$ 、 $ES > 1$ 被定义为截止标准^[13]。

1.5 单样本基因集富集分析

通过单样本基因集富集分析(single-sample gene-set enrichment analysis, ssGSEA)评分,在 GSE17537、GSE30378 及 GSE38832 数据集上测量每个样本中 29 种免疫信号的富集水平^[14]。通过 Pearson 相关性计算 ARHGAP44 表达量与免疫细胞 ssGSEA 评分之间的相关性。

1.6 统计学处理

使用 SPSS 软件 (25.0, SPSS Inc., 美国芝加哥, 伊利诺伊州) 分析数据, 使用 R 软件 3.6.0 分析数据并画图。使用 Kruskal-Wallis 方法分析 ARHGAP44 在不同组中的差异分析。使用 Kaplan-Meier 曲线分析结直肠癌患者的总体生存 (overall survival, OS) (使用 R 包“survminer”寻找最佳生存节点)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。所有实验至少进行 3 次。

2 结果

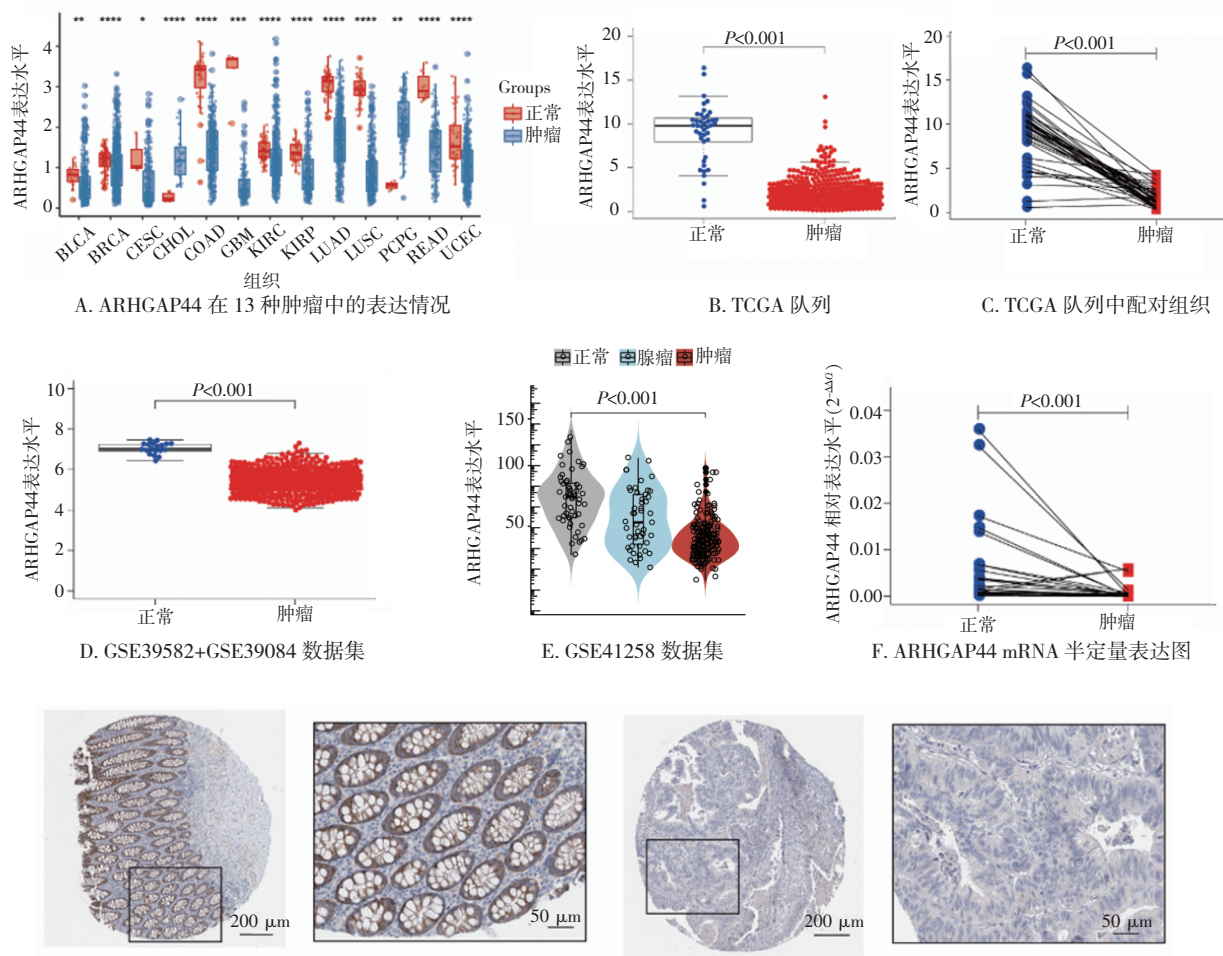
2.1 ARHGAP44 基因在结直肠癌中低表达

在 TCGA 的 33 种癌症中, 发现 ARHGAP44 在 13 种癌症中有差异, 其中在 11 种肿瘤组织中表达量降低 (图 1A)。通过对多组结直肠数据的研究, TCGA 结直肠癌 RNA-Seq 数据中含有 42 个正常组织和 488 个结直肠癌组织, 含 42 个成对的结直肠癌组织和匹配的正常相邻组织 (图 1B、C)。GEO 中 GSE39582、GSE39084 数据集中含有 616 个结直肠癌组织和 19 个不匹配的正常相邻组织 (图 1D)。GSE41258 数据集中含有正常组织 54 例, 息肉组织 48 例, 结直肠癌组织 186 例

(图 1E)。RT-qPCR 实验探索了 30 对结直肠癌组织及其配对正常组织 (图 1F), 发现 ARHGAP44 在结直肠癌组织中的表达始终较低 ($P<0.001$)。进一步研究 ARHGAP44 在人类蛋白质图谱中的蛋白表达 (<https://www.proteinatlas.org/>), 结果显示 ARHGAP44 蛋白相较于正常组织在结肠癌中表达更低 (图 1G)。

2.2 ARHGAP44 基因表达与 CRC 临床病理特征的相关性研究

TCGA 数据库 411 例 CRC RNA 测序数据中, ARHGAP44 基因表达水平与肿瘤分级、T 分期、M 分期、N 分期显著负相关 ($P=0.019, 0.045, 0.002, 0.035$) (图 2A); 使用 GSE39084+GSE39582 数据集做同样的分析, ARHGAP44 基因表达水平与肿瘤分级、T 分期、N 分期显著负相关 ($P=0.001, <0.001, 0.010$), 与 M 分期不相关 ($P=0.058$) (图 2B)。进一步使用 qRT-PCR 结果结合 30 例临床标本基线数据做相关性研究, 发现 ARHGAP44 基因相对表达水平与肿瘤分级、T 分期、M 分期显著负相关 ($P=0.003, 0.010, 0.015$), 与 N 分期相关性不相关 ($P=0.200$) (图 2C)。综上推测, ARHGAP44 表达水平与肿瘤 TNM 分期、T 分期有关。



G. 正常结直肠组织中 ARHGAP44 的表达 (左), 结直肠癌组织中 ARHGAP44 的表达 (右)

图 1 ARHGAP44 在结直肠癌中的表达情况

2.3 ARHGAP44 基因是 CRC 患者的预后独立因子

在 TCGA 结直肠癌数据集中用 Kaplan-Meier 检验判断 ARHGAP44 低表达是否预示 CRC 患者预后不良。如图 3A 所示, 较低的 ARHGAP44 表达水平与较差的预后显著相关。该结果在 GSE39582+GSE39084 数据集得到验证(图 3B)。使用单因素和多因素 Cox 回归分析评价 ARHGAP44 表达对 CC 患者预后是否有独立预后价值。在 TCGA 队列中, 单因素 Cox 分析显示, ARHGAP44 表达与 OS 显著相关($HR=0.48$, $95\%CI=0.25\sim0.93$, $P=0.031$)。同时多因素回归 Cox 分析表明, ARHGAP44 的表达与 CC 患者明显较好的 OS 独立相关($HR=0.44$, $95\%CI=0.22\sim0.88$, $P=0.020$)(图 3C)。在 GSE39582+GSE39084 数据集中得到同样的结果(图 3C)。提示 ARHGAP44 mRNA 低表达或与结直肠癌预后不良相关。

2.4 ARHGAP44 基因在 CRC 中的降低可能与 TP53 突变有关

有研究发现, ARHGAP44 是突变 TP53 的新靶标^[15], 而在结直肠癌的发生发展中存在 TP53 突变^[16], 因此推测结直肠癌中 ARHGAP44 异常可能与此相关。在 TCGA CRC 数据集、

GSE39582+GSE39084 数据集和 GSE41258 中使用 TP53 突变与 TP53 野生型样本做 ARHGAP44 表达的差异分析, 结果提示相较于 TP53 野生型样本, ARHGAP44 在 TP53 突变型样本中表达更低(P 值分别为 <0.001 、 <0.001 和 0.045)(图 4)。

2.5 ARHGAP44 基因的功能基因富集

使用 GSEA 分析 ARHGAP44 基因对结直肠癌相关机制的影响, 结果提示基因本体论(gene ontology, GO)分析中, ARHGAP44 在分子机制与生物学过程主要富集在转移、细胞免疫、自噬、GAP 连接等功能上(图 5A~C), 京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析中, ARHGAP44 主要富集在结肠癌通路、Notch 信号通路、MAPK 信号通路、自噬、ERBB 信号通路、T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路和 MTOR 信号通路等通路上(图 5D)。

2.6 ARHGAP44 表达与结直肠癌的免疫浸润水平相关

由于 TP53 突变及 Rho GTPases 在肿瘤微环境中的重要作用^[17-18], 且 KEGG 分析表明其参与 T 细胞受体途径等免疫

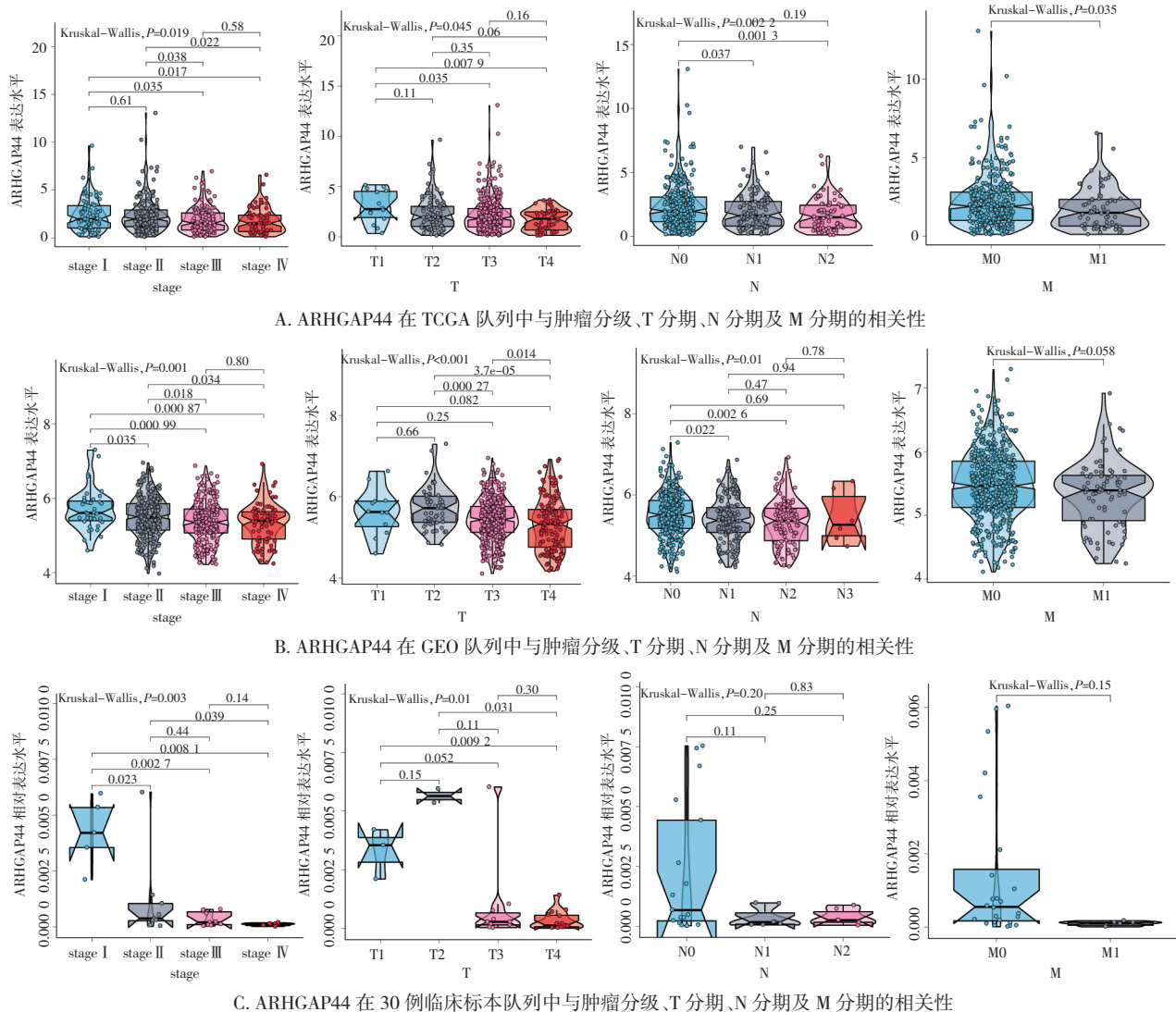


图 2 ARHGAP44 基因表达与 CRC 临床病理特征的相关性

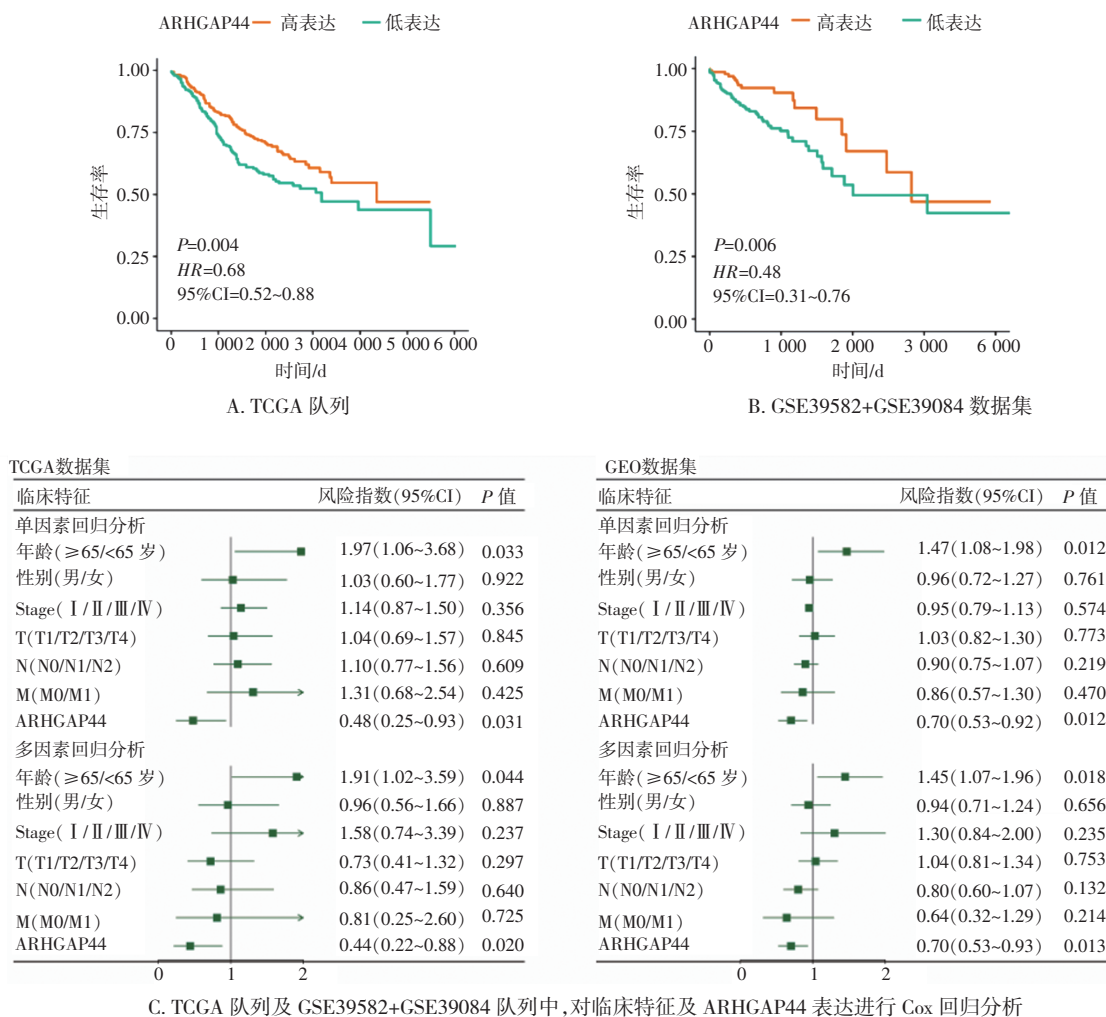


图 3 ARHGAP44 基因是 CRC 患者的预后独立因子

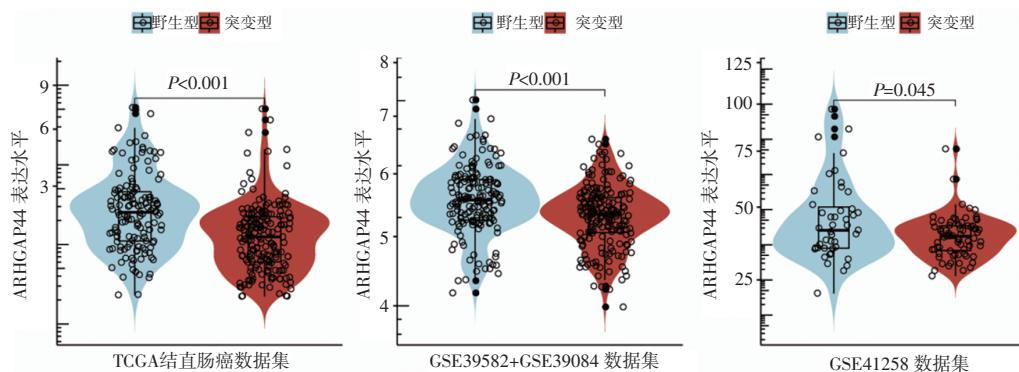


图 4 ARHGAP44 在 TP53 野生型样本与 TP53 突变型样本中的表达情况

相关途径,这些传导途径和生物学功能对肿瘤微环境有很大的影响^[9]。因此,本研究通过 ssGSEA 算法探讨了 ARHGAP44 表达是否与癌症的免疫浸润水平相关。在 GSE17537 数据集中,皮尔逊相关性分析发现 ARHGAP44 表达与 Macrophages 细胞、Parainflammation 细胞、T cell co-inhibition、T helper cells、TIL 和 Type I IFN Response 呈负相关($cor=-0.35$ 、 -0.37 、 -0.33 、 -0.35 、 -0.23 、 -0.32 , $P=0.008$ 、 0.006 、 0.027 、 0.021 、 0.041 、 0.021) (图 6A),且 macrophages 细胞、parainflammation 细胞、T cell

co-inhibition、T helper cells、TIL 和 type I IFN response 在高 ARHGAP44 表达组中相较于低 ARHGAP44 表达组密度较低 (图 6D)。这些结果在 GSE30378 及 GSE38832 中得到验证 (图 6B、C、E、F)。这些结果表明 ARHGAP44 在肿瘤组织尤其是在 macrophages 细胞、parainflammation 细胞、T cell co-inhibition、T helper cells、肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) 和 type I IFN response 免疫浸润中可能起特定作用。

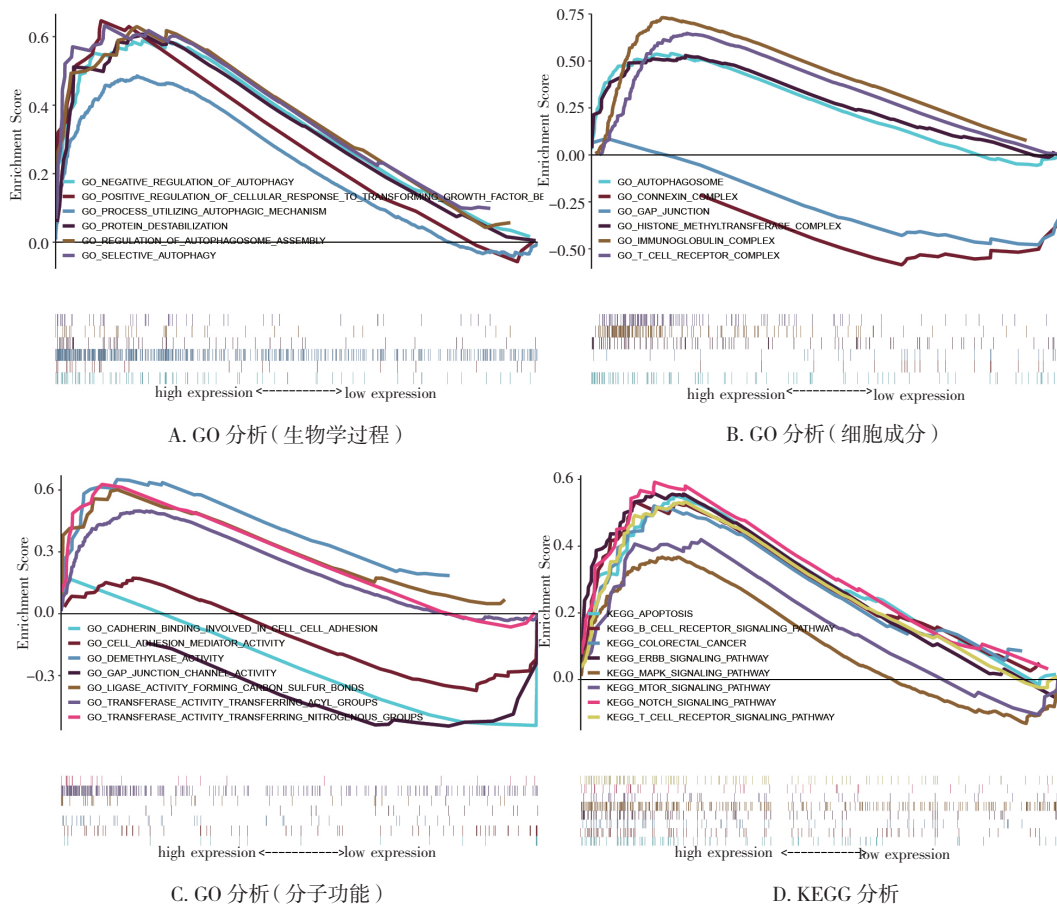


图 5 ARHGAP44 在结直肠癌数据中 GSEA 的分析结果

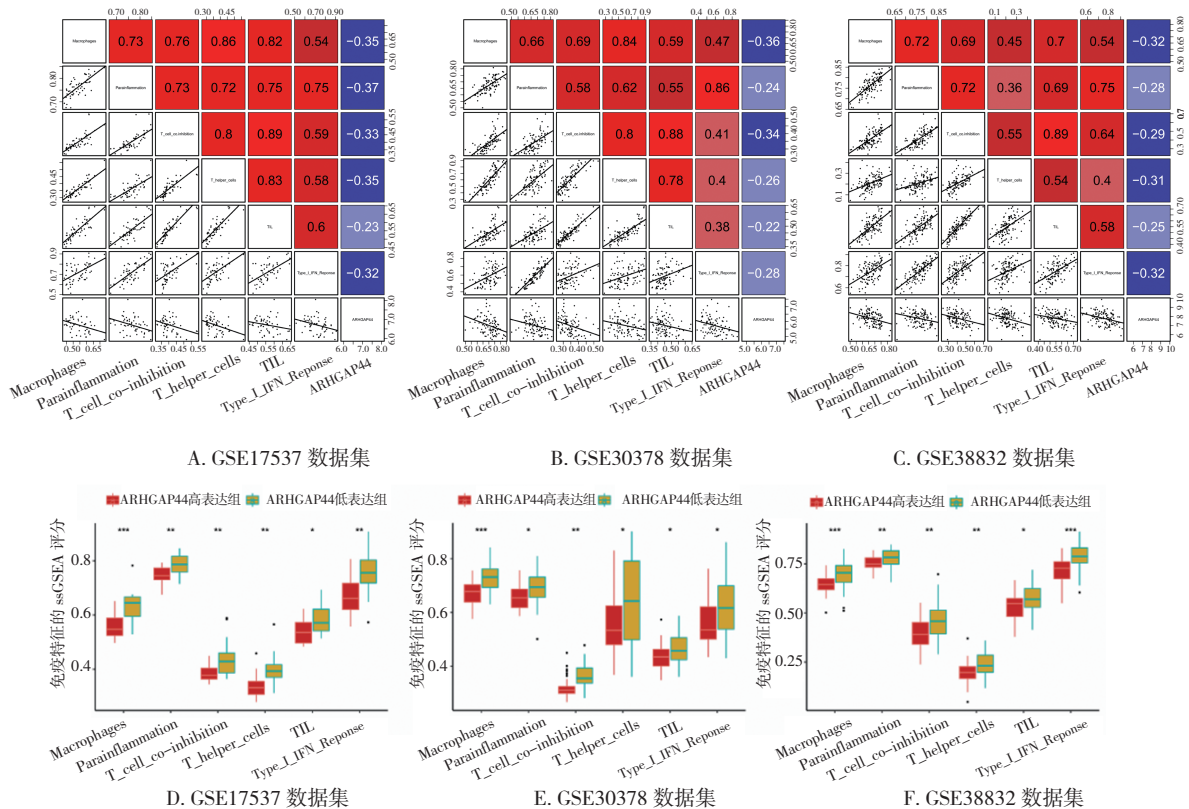


图 6 ARHGAP44 表达与结直肠癌的免疫浸润水平相关

3 讨论

ARHGAP44(也称 Rich2 或 Nadrin2)是一种对小 Rho GTPases Rac1 和 Cdc42 有选择性的 GTP 酶激活蛋白(GAP)^[4]。研究发现 ARHGAP44 敲减可以促进肺癌扩散与转移,但 ARHGAP44 对结直肠癌的影响还尚未有研究^[15]。本研究发现 ARHGAP44 在结直肠癌中低表达,并且表达水平与结直肠癌的预后呈负相关,即 ARHGAP44 表达水平越低,患者预后越差。除此之外还发现 ARHGAP44 表达水平与结直肠癌患者的肿瘤 T、TNM 分级呈负相关,结合前期文献推测 ARHGAP44 基因表达降低也可以促进结直肠癌的扩散与转移。总的来说,ARHGAP44 在结肠癌的发生发展中起抑癌作用,但具体作用机制尚需进一步研究。

进一步研究 ARHGAP44 是否可以作为 CRC 的诊断和预后生物标志物。Kaplan-Meier 检验显示 ARHGAP44 mRNA 低表达与 CRC 患者 OS 相关。单因素和多因素 Cox 回归分析显示,ARHGAP44 的低表达是 CRC 患者 OS 的独立危险因素。本研究结果表明,ARHGAP44 基因在许多结直肠癌病例中表达降低,有作为预后标志物的潜力,需要进一步临床验证。

研究发现 TP53 突变可以激活 Rho GTPases 及其相关信号通路^[20],而 RhoGAP 可以催化 GTP 水解使 Rho GTPases 酶返回到非活性状态^[21],且 ARHGAP44 是突变 TP53 的新靶标^[15],在结直肠癌的发生发展中也存在 TP53 的突变^[16,22-23]。本研究在 TCGA CRC 数据集、GSE39582+GSE39084 数据集、GSE41258 数据集中均发现 ARHGAP44 mRNA 水平在突变型 TP53 中表达更低,考虑 ARHGAP44 在结直肠中的低表达可能与 TP53 突变有关。

为了进一步阐明 ARHGAP44 的生物学作用,进行了功能富集分析。结果发现在各种与癌症相关的通路上富集,如 mTOR、ERBB、Notch 信号通路及结直肠癌等通路,而这与 ARHGAP44 表达与肿瘤 TNM 分级、T 分期负相关相对应。此外,还富集了许多参与各种免疫相关过程的生物学过程及通路,包括 T 细胞受体通路、B 细胞受体通路等,而这些通路在肿瘤免疫中发挥关键作用。其中 Cdc42、RAC1、

RHOA 等 Rho GTPases 家族基因在结直肠通路、MARK 通路、B 细胞受体通路、T 细胞受体通路上起重要作用^[24-25]。这些结果表明 ARHGAP44 在肿瘤及肿瘤免疫中可能通过调节 RhoGTPases 的活性起作用。既往研究表明,肿瘤部位的免疫浸润水平会影响化疗和免疫治疗的疗效和预后,CD8⁺细胞毒性 T 细胞及活化的 M1 巨噬细胞等被认为是抗肿瘤免疫效应细胞^[26-28],而 M2 巨噬细胞分泌 IL-4、IL-10、IL-13 和 TGF β ,具有抗炎作用,能够促进肿瘤进展^[29]。在癌症中,浸润肿瘤的 T 细胞表达多种共抑制受体,这些受体会破坏肿瘤特异性 T 细胞反应^[30]。TP53 丧失后,Parainflammation 丧失了肿瘤抑制性质,在肿瘤进展过程中起相反作用^[31]。本研究采用 ssGSEA 探索肿瘤微环境,并基于从 GSE17537、GSE30378 及 GSE38832 获得的结直肠癌样本对免疫反应的 29 种免疫细胞进行量化。结果显示 ARHGAP44 的表达与大肠癌中 macrophages 细胞、parainflammation 细胞、T cell co-inhibition、T helper cells、TIL 和 type I IFN response 的浸润程度呈显著负相关。这些免疫标志的浸润可能能够促进肿瘤进展^[29-31]。这些结果表明 ARHGAP44 在免疫浸润中可能起特定作用,而这些可能与肿瘤抑制有关。

综上所述,ARHGAP44 的表达在结直肠癌中被下调,其相对较低的表达与恶性特征相关。例如 T 分期、TNM 分期及不良预后,其在肿瘤中的低表达可能与 TP53 突变有关,并且在肿瘤免疫学中具有潜在作用。因此,本研究为理解 ARHGAP44 在其作为癌症生物标志物的应用及肿瘤免疫学中的潜在作用提供了见解。

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] 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.
- [3] de Rosa M, Pace U, Rega D, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review) [J]. Oncol Rep, 2015, 34(3): 1087-1096.
- [4] Richnau N, Aspenstrom P. Rich, a rho GTPase-activating protein domain-containing protein involved in signaling by Cdc42 and Rac1 [J].

- J Biol Chem, 2001, 276(37): 35060–35070.
- [5] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage[J]. Cell, 2004, 116(2): 167–179.
- [6] Rathinam R, Berrier A, Alahari SK. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression[J]. Front Biosci(Landmark Ed), 2011, 16: 2561–2571.
- [7] Narumiya S, Thumkeo D. Rho signaling research: history, current status and future directions[J]. FEBS Lett, 2018, 592(11): 1763–1776.
- [8] Takagi K, Miki Y, Onodera Y, et al. ARHGAP15 in human breast carcinoma: a potent tumor suppressor regulated by androgens[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 804.
- [9] Sun Z, Zhang B, Wang C, et al. Forkhead box P3 regulates ARHGAP15 expression and affects migration of glioma cells through the Rac1 signaling pathway[J]. Cancer Sci, 2017, 108(1): 61–72.
- [10] Xu XF, Gao F, Wang JJ, et al. BMX-ARHGAP fusion protein maintains the tumorigenicity of gastric cancer stem cells by activating the JAK/STAT3 signaling pathway[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 133.
- [11] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(7): e47.
- [12] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma[J]. Cell, 2017, 169(7): 1327–1341.e23.
- [13] Hanzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14: 7.
- [14] Tian XL, Zhu XQ, Yan TT, et al. Differentially expressed lncRNAs in gastric cancer patients: a potential biomarker for gastric cancer prognosis[J]. J Cancer, 2017, 8(13): 2575–2586.
- [15] Xu JJ, Jiao J, Xu W, et al. Mutant p53 promotes cell spreading and migration via ARHGAP44[J]. Sci China Life Sci, 2017, 60(9): 1019–1029.
- [16] Öner MG, Rokavec M, Kaller M, et al. Combined inactivation of TP53 and MIR34A promotes colorectal cancer development and progression in mice via increasing levels of IL6R and PAI1[J]. Gastroenterology, 2018, 155(6): 1868–1882.
- [17] Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, et al. The immune landscape of cancer[J]. Immunity, 2018, 48(4): 812–830.e14.
- [18] Chaker M, Minden A, Chen S, et al. Rho GTPase effectors and NAD metabolism in cancer immune suppression[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(1): 9–17.
- [19] Ping Y, Liu CJ, Zhang Y. T-cell receptor-engineered T cells for cancer treatment: current status and future directions[J]. Protein Cell, 2018, 9(3): 254–266.
- [20] Muller PAJ, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion[J]. J Cell Biol, 2011, 192(2): 209–218.
- [21] Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion[J]. J Cell Biol, 2018, 217(2): 447–457.
- [22] Xue YZ, San Luis B, Lane DP. Intratumour heterogeneity of p53 expression: causes and consequences[J]. J Pathol, 2019, 249(3): 274–285.
- [23] Li XL, Zhou JB, Chen ZR, et al. P53 mutations in colorectal cancer—molecular pathogenesis and pharmacological reactivation[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(1): 84–93.
- [24] Qadir MI, Parveen A, Ali M. Cdc42: role in cancer management[J]. Chem Biol Drug Des, 2015, 86(4): 432–439.
- [25] Myant KB, Cammareri P, McGhee EJ, et al. ROS production and NF- κ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(6): 761–773.
- [26] Raeber ME, Zurbuchen Y, Impellizzeri D, et al. The role of cytokines in T-cell memory in health and disease[J]. Immunol Rev, 2018, 283(1): 176–193.
- [27] Karin N. Chemokines and cancer: new immune checkpoints for cancer therapy[J]. Curr Opin Immunol, 2018, 51: 140–145.
- [28] Pinto MP, Balmaceda C, Bravo ML, et al. Patient inflammatory status and CD4⁺/CD8⁺ intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2018, 151(1): 10–17.
- [29] Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 298–306.
- [30] Baitsch L, Baumgaertner P, Devèvre E, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients[J]. J Clin Invest, 2011, 121(6): 2350–2360.
- [31] Lasry A, Aran D, Butte AJ, et al. Cancer cell-autonomous parainflammation mimics immune cell infiltration[J]. Cancer Res, 2017, 77(14): 3740–3744.

(责任编辑:唐秋姗)