

# *BAP1*、*FOXO3* 和 *ITPR2* 基因表达变化与葡萄膜黑色素瘤转移和预后关联分析

李洋 冯宇 刘月明 魏文斌

首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 眼内肿瘤诊治研究北京市重点实验室 北京市眼科学与视觉科学重点实验室 100730

通信作者:魏文斌,Email:weiwenbintr@163.com

**【摘要】 目的** 鉴定分子遗传学水平上与葡萄膜黑色素瘤(UM)转移和预后相关的潜在标志物。

**方法** 收集肿瘤基因组图谱数据库中 2007—2019 年 80 例 UM 样本的信息,根据是否发生转移分为转移组 18 例和非转移组 62 例。采用 R 软件中的 maftools 函数包分析 UM 样本中的基因突变种类、变异类型、单核苷酸变异(SNV)类型和基因突变比例,计算肿瘤突变负荷;采用 R 软件中的 edgeR 软件包分析转移组和非转移组间的差异表达基因(DEGs);采用 KOBAS 工具对 DEGs 的京都基因与基因组百科全书通路进行富集,筛选出预后相关基因。采用 survival 函数包建立 Cox 回归模型验证基因突变情况和 DEGs 的预后评价。 **结果** UM 基因突变中以错义突变为主,主要变异类型为 SNV,UM 基因突变负荷低。与非转移组相比,转移组中存在 562 个 DEGs,在基因集富集分析中,3 条与眼部疾病和癌症相关的通路显著富集,分别为玻璃体视网膜变性、癌症相关蛋白多糖和 PI3K-Akt 信号通路。转移组 *BAP1*、*FOXO3* 和 *ITPR2* 基因表达量分别为 2 982.50(1 251.50,5 637.00)、1 223.00(914.75,2 706.25)和 2 201.50(570.75,4 814.00),与非转移组的 5 225.00(2 281.25,8 784.00)、2 293.50(1 254.25,3 693.75)和 474.00(153.00,1 437.75)比较,转移组 *BAP1* 和 *FOXO3* 表达量显著下调,*ITPR2* 表达量显著上调,差异均有统计学意义( $Z=-1.786,-1.982,-3.065$ ,均  $P<0.10$ )。采用 Cox 模型单因素分析显示,*BAP1* 基因突变、*FOXO3* 基因表达下调和 *ITPR2* 基因表达上调与不良预后显著相关(均  $P<0.10$ )。 **结论** *BAP1* 基因突变、*FOXO3* 基因下调和 *ITPR2* 基因上调可作为 UM 转移和预后的潜在生物标志物。

**【关键词】** 葡萄膜黑色素瘤;转移;预后;生物标志物

**基金项目:**北京市自然科学基金项目(7204245);北京市教育委员会科技发展计划一般项目(KM202010025018);北京市医院管理中心“青苗”计划专项经费项目(QML20190202);北京市东城区优秀人才培养计划项目(2018)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200714-00495

## Relationship between *BAP1*, *FOXO3* and *ITPR2* gene expression and metastasis and prognosis of uveal melanoma

Li Yang, Feng Yu, Liu Yueming, Wei Wenbin

Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Key Laboratory of Intraocular Tumor Diagnosis and Treatment, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China

Corresponding author: Wei Wenbin, Email: weiwenbintr@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the potential biomarkers for the metastasis and prognosis of uveal melanoma (UM) from molecular genetics. **Methods** The data of 80 UM samples including 18 metastatic cases and 62 non-metastatic cases between 2007 and 2019 were downloaded from The Cancer Genome Atlas database. The tumor mutation burden and gene mutation information, including mutant genes, variant type, the proportion of single nucleotide variation (SNV) and mutation proportion, were analyzed using maftools package in R software, and the differentially expressed genes (DEGs) between the two groups were screened using edgeR package. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis based on the DEGs was performed to screen prognosis-associated genes using KOBAS. Cox regression model was established using survival package in R software to verify the association between gene mutation and DEGs and the prognosis of UM patients. **Results** The mutation analysis showed that missense mutation accounted for a large proportion in the mutation of UM samples, and the main variant type was SNV, and the mutation burden of UM was low. Compared with the non-metastatic UM samples, 562 DEGs were identified in the metastatic UM

samples. Three pathways, including vitreoretinal degeneration, proteoglycans in cancer, and PI3K-Akt pathway, were significantly enriched. The expression levels of *BAP1*, *FOXO3* and *ITPR2* were 2 982.50 (1 251.50, 5 637.00), 1 223.00 (914.75, 2 706.25) and 2 201.50 (570.75, 4 814.00) in the metastatic group, and 5 225.00 (2 281.25, 8 784.00), 2 293.50 (1 254.25, 3 693.75) and 474.00 (153.00, 1 437.75) in the non-metastatic group, respectively. The expression of *BAP1* and *FOXO3* among the DEGs were significantly down-regulated and *ITPR2* expression was significantly up-regulated in the metastatic group in comparison with the non-metastatic group ( $Z = -1.786, -1.982, -3.065$ ; all at  $P < 0.10$ ). The survival analysis revealed *BAP1* mutation, decreased *FOXO3* expression and increased *ITPR2* expression were associated with inferior survival of UM patients (all at  $P < 0.10$ ).

**Conclusions** *BAP1* mutation, up-regulation of *FOXO3* and down-regulation of *ITPR2* might be potential biomarkers for the metastasis and prognosis of UM.

[Key words] Uveal melanoma; Metastasis; Prognosis; Biomarkers

**Fund program:** Beijing Natural Science Foundation (7204245); Scientific Research Common Program of Beijing Municipal Commission of Education (KM202010025018); Beijing Municipal Administration of Hospitals Youth Programme (QML20190202); Beijing Dongcheng District Outstanding Talents Cultivating Plan (2018)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200714-00495

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是成年人眼内常见的原发性恶性肿瘤,其起源于葡萄膜中的黑色素细胞,约占全身黑色素瘤的 5%<sup>[1-2]</sup>。UM 多发于浅肤色白人,除种族因素外,UM 的危险因素还包括脉络膜痣、眼(皮肤)黑色素细胞增多症<sup>[3-6]</sup>。尽管紫外线辐射是皮肤黑色素瘤的重要危险因素,但其是否促使 UM 的发生仍存在争议<sup>[7]</sup>。UM 的常见远处转移部位为肝脏,近一半的 UM 患者最终发展为肝转移<sup>[8-9]</sup>。当前,对于转移性 UM 尚缺少明确有效的治疗策略,发生转移后患者中位生存时间不足 1 年<sup>[10]</sup>。既往研究发现,肿瘤大小、睫状体侵犯、眼外扩散等影像学表现和组织学上皮细胞型、有丝分裂核像、血管祥为预后不良的标志<sup>[11-12]</sup>;染色体拷贝数变异水平上 3 号染色体短臂丢失以及 8 号染色体长臂扩增者的预后较差<sup>[13]</sup>。近年来,分子遗传学研究表明 *GNAQ* 和 *GNAI1* 基因突变是促进细胞增生的早期事件<sup>[10]</sup>; *SF3B1* 基因突变具有中等转移风险,与晚期转移有关<sup>[14]</sup>; *EIF1AX* 基因突变患者预后较好,具有较长的无转移生存期<sup>[10]</sup>。此外,Onken 等<sup>[13]</sup>通过对转移/非转移 UM 基因表达谱的差异分析筛选出 12 个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs),并根据上述基因表达谱将肿瘤分为恶性程度低、不易转移的 1 型和恶性程度高、易转移的 2 型,相较基于肿瘤临床特征的预后评估更加准确、可靠。UM 的发生和发展与基因突变和基因表达异常密切相关,而目前 UM 的临床分期仍以肿瘤大小和肿瘤所在区域为主要依据,且 UM 转移的诊断也主要依靠肝功能和影像学检测结果。因此,亟需鉴定出 UM 转移性相关的分子标志物,在 UM 微转移灶的潜伏期进行有效干预。此外,尽管既往研究已鉴定出 UM 影像学、组织学、染色体拷贝数变异水平上的预后指标,但目前仍缺乏分子遗传学水平的深入研究。本

研究基于 TCGA 数据库对 80 个转移/非转移 UM 样本的基因突变、DEGs 进行生物信息学分析,筛选并寻找新的 UM 预后指标,以期探讨其发生和转移机制、提高患者远期预后提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 UM 样本基因突变数据来源

本研究基于美国国家癌症研究所 (NCI) 和人类基因组研究所 (NHGRI) 共同建立的肿瘤基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA, <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>), 对该共享基因组图谱中 2007—2019 年全部 80 例 UM 样本的基因突变信息 Maf 文件和基因表达矩阵数据进行生物信息学分析。患者中男 45 例,占 56.2%,女 35 例,占 43.8%;年龄的中位数为 60 岁;白人 55 例,占 68.8%,未知人种者 25 例,占 31.2%;转移患者 18 例,非转移患者 62 例;病理分期 I、II、III、IV 期及未知分期者分别有 0、39、36、4、1 例,分别占 0.0%、48.8%、45.0%、5.0% 和 1.2%;有远处转移者 26 例,占 32.5%,无远处转移者 54 例,占 67.5%;进行、未进行、未知是否进行放射治疗者分别有 3、76 和 1 例,分别占 3.8%、95.0% 和 1.2%;进行化学治疗者 4 例,占 5.0%,未进行化学治疗者 76 例,占 95.0%;死亡病例 23 例,占 28.8%,存活病例 57 例,占 71.2%。

### 1.2 方法

**1.2.1 UM 样本基因突变分析** 采用 R 软件中的 maftools 函数包分析 UM 样本中的基因突变种类、变异类型、单核苷酸变异 (single nucleotide variants, SNV) 类型和基因突变比例并作图。每兆碱基的平均突变数,即样本总突变位点个数/外显子区域长度 (40 Mb),定义为每个患者的肿瘤突变负荷 (tumor mutation burden,

TMB) 数值。

**1.2.2 转移性和非转移性 UM 间 DEGs 分析** 采用 R 软件中的 edgeR 软件包分析源自转录组的 DEGs。首先去除表达矩阵平均测序个数小于 10 的基因(测序个数小于 10,其峰度较低,研究价值较低)。以肿瘤是否发生转移的临床信息为依据,将样本分为转移组和非转移组,并以错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 和  $|\log_2 FC| > 1$  作为阈值筛选 DEGs。

**1.2.3 DEG 功能富集分析** 采用在线数据库 KOBAS 工具对筛选出的 DEGs 进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。以经过“BH”法校正过的 P 值 < 0.05 为标准筛选显著富集的 KEGG 通路。

**1.2.4 UM 预后与相关因素分析** 采用 R 软件中的 survival 包及 survminer 包进行生存分析。采用 survival 包进行 Cox 回归模型的建立,探讨性别、TMB、GNAQ、GNA11、BAP1、SF3B1、EIF1AX 基因突变及 FOXO3、ITPR2 和 BAP1 的差异表达量对生存时间的影响,并绘制森林图。以 P < 0.10 为阈值筛选预后相关因素,并采用 survminer 软件包绘制生存曲线。

**1.3 统计学方法**

采用 R 软件(v3.6.3)对数据进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实不符合正态分布,以  $M(Q_1, Q_3)$  表示。采用 Kaplan-Meier 方法估计 2 个组的整体生存率,采用 Log-rank 检验比较 2 个组间生存率差异的显著性;采用 Wilcoxon 秩和检验比较 2 个组基因表达差异。P < 0.10 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 转移性和非转移性 UM 样本中基因突变率**

转移组和非转移组 UM 均以错义突变为主,突变类型为 SNV, 基因突变形式以 C > T 居多(图 1)。UM 基因突变负荷低,仅

个别样本中存在相对较高的基因突变负荷。进一步对突变率前 10 位的基因分析发现,2 个组样本的突变基因不完全相同:在非转移组 UM 样本中,GNAQ、GNA11、BAP1、SF3B1 和 EIF1AX 基因具有较高的突变率;在转移组 UM 样本中,GNA11、PLCB4、SF3B1、BAP1 和 ARHGDLA 基因具有较高突变率,GNA11 和 PLCB4 基因的突变率分别高达 67% 和 33%。

**2.2 转移性和非转移性 UM 样本间基因表达差异**

在转移性和非转移性 UM 样本间进行 DEGs 分析,以 FDR < 0.05 和  $|\log_2 FC| > 1$  作为阈值筛选出 562 个 DEGs。与非转移性 UM 样本相比,转移性 UM 样本

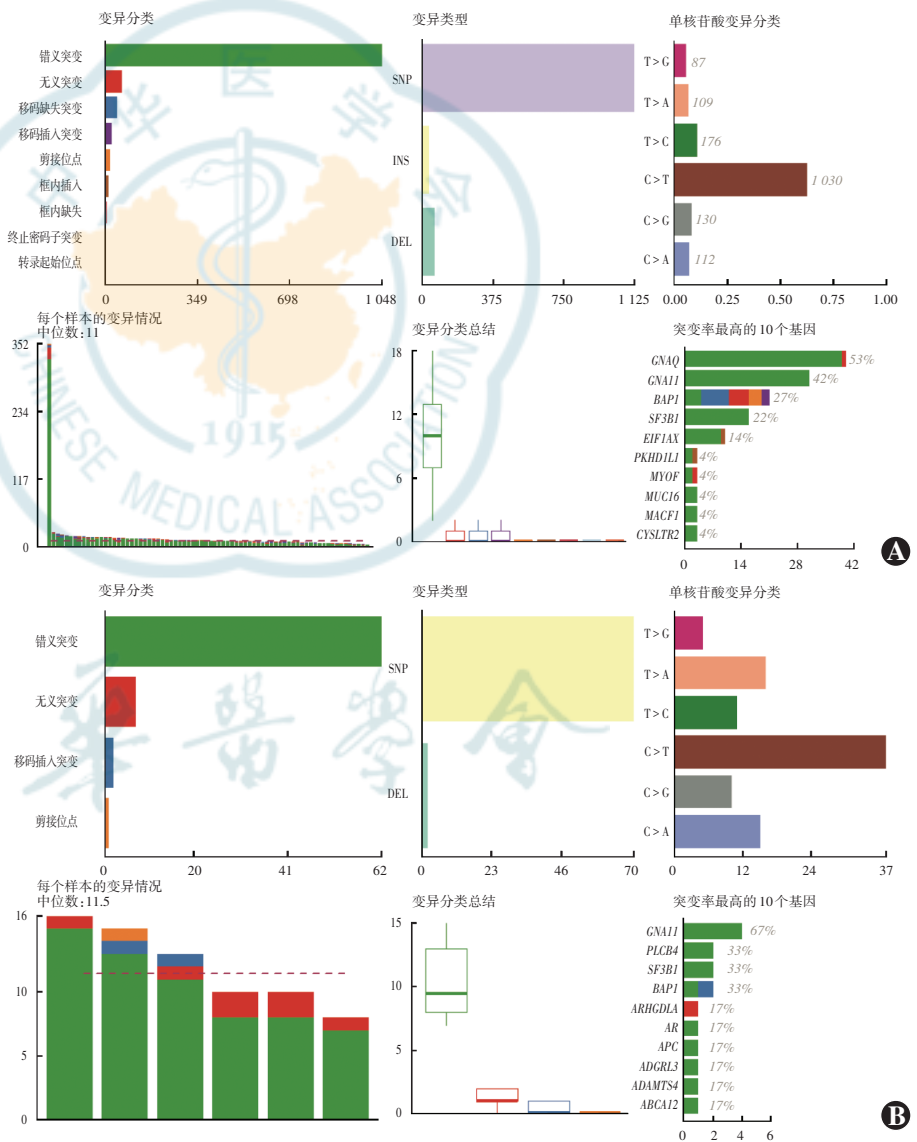
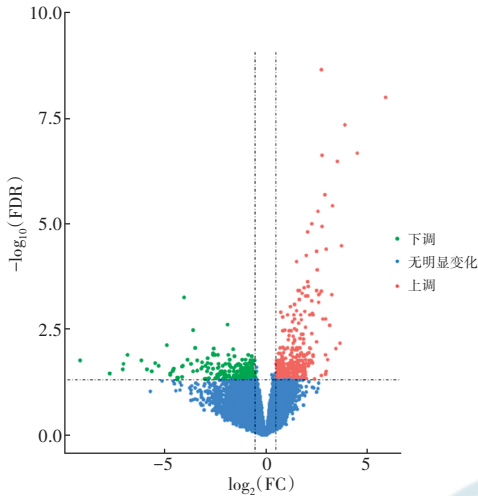


图 1 2 个组 UM 样本的基因突变特点分析 A:非转移组 B:转移组 绿色:错义突变;红色:无义突变;蓝色:移码缺失突变;紫色:移码插入突变;黄色:剪接位点;褐色:框内缺失 SNP:单核苷酸多态性;INS:插入突变;DEL:缺失突变

Figure 1 Mutation characteristics of mutated genes in UM samples from the two groups A: non-metastatic group B: metastatic group Color green: missense mutation; Color red: nonsense mutation; Color blue: frameshift deletion; Color purple: frameshift insertion; Color yellow: splice site; Color brown: in-frame deletion SNP: single nucleotide polymorphism; INS: insertion mutation; DEL: deletion mutation

中 218 个基因显著下调, 344 个基因显著上调(图 2)。



**图 2** 2 个组 UM 样本中 DEGs 火山图 绿色: 表达下调基因; 红色: 表达上调基因; 蓝色: 非差异表达基因 FDR: 错误发现率; FC: 倍数变化  
**Figure 2** Volcano plot of DEGs between the two groups of UM samples Color green: down-regulated genes; Color red: up-regulated genes; Color blue: non-differentially expressed genes FDR: false discovery rate; FC: fold change

**2.3 DEG 功能通路富集分析**

KEGG 通路功能富集分析结果显示, 其中 3 条与眼部疾病和癌症相关的通路显著富集, 分别为玻璃体视网膜变性、癌症相关蛋白多糖和 PI3K-Akt 信号通路。进一步筛选出此 3 条通路对应的基因, 分别为 ENSG00000139219 (*COL2A1*)、ENSG00000123104 (*ITPR2*) 和 ENSG00000118689 (*FOXO3*) (表 1)。

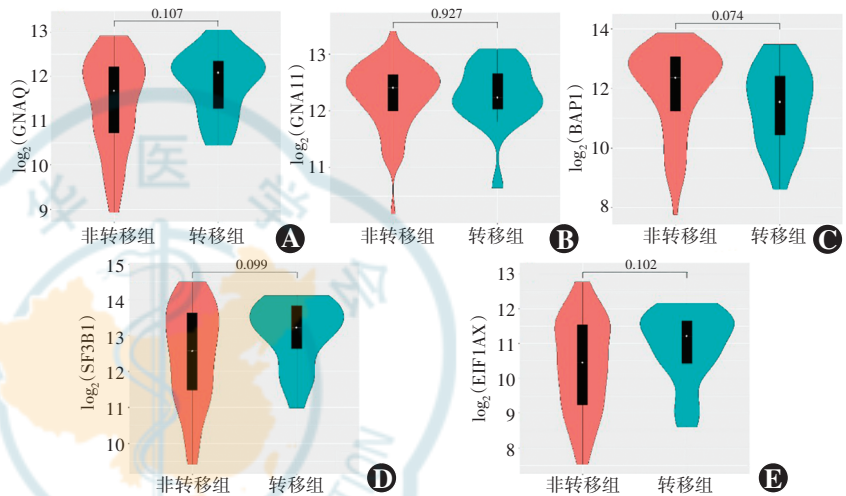
**2.4 转移性和非转移性 UM 样本中 FOXO3、ITPR2 和 BAP1 基因表达差异**

2 个组突变率较高的基因 (*GNAQ*、*GNA11*、*BAP1*、*SF3B1*、*EIF1AX*)、与癌症和眼部疾病相关的基因 (*FOXO3*、*ITPR2*、*COL2A1*) 表达差异如图 3, 4 所示。2 个组 *GNAQ*、*GNA11*、*SF3B1*、*EIF1AX* 和 *COL2A1* 基因表达量比较, 差异均无统计学意义 ( $Z = -1.613, -0.092, -1.648, -1.636, -0.259$ , 均  $P > 0.10$ ); 与非转移组比较, 转移组 *BAP1* 和 *FOXO3* 表达量显著下调, *ITPR2* 表达量显著上调, 差异均有统计学意义 ( $Z = -1.786, -1.982, -3.065$ , 均  $P < 0.10$ ) (表 2)。

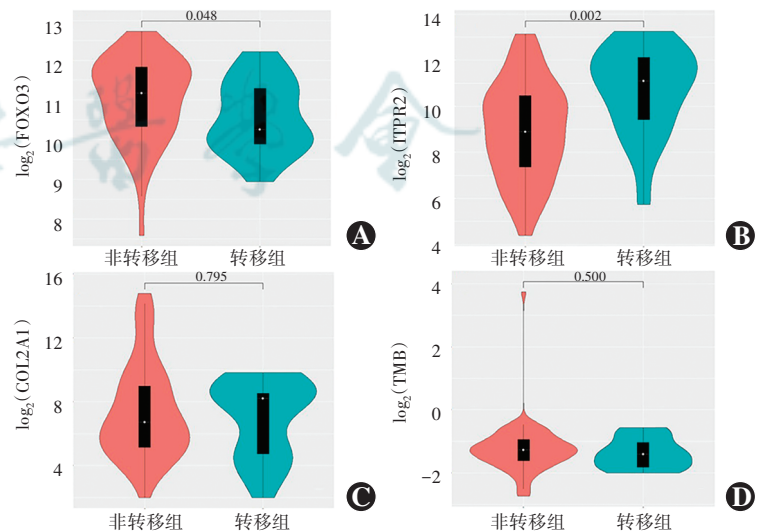
**表 1 阈值筛选后的功能富集分析以及对应的基因**  
**Table 1 Screening of candidate genes related to cancer and eye disease by functional enrichment analysis**

KEGG 通路	数据库	编号	基因名称
玻璃体视网膜变性	KEGG DISEASE	H00805	ENSG00000139219 ( <i>COL2A1</i> )
癌症相关蛋白多糖	KEGG PATHWAY	hsa05205	ENSG00000123104 ( <i>ITPR2</i> )
PI3K-Akt 信号通路	KEGG PATHWAY	hsa04151	ENSG00000118689 ( <i>FOXO3</i> )

注: KEGG: 京都基因与基因组百科全书  
 Note: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes



**图 3** 2 个组 UM 样本中基因突变率前 5 位的基因表达水平比较 *BAP1* 在转移性 UM 显著下调 A: *GNAQ* B: *GNA11* C: *BAP1* D: *SF3B1* E: *EIF1AX*  
**Figure 3** Comparison of the expression of the top 5 mutated genes between the two groups of UM samples *BAP1* was significantly down-regulated in the metastatic group A: *GNAQ* B: *GNA11* C: *BAP1* D: *SF3B1* E: *EIF1AX*



**图 4** 2 个组 UM 样本中癌症和眼部疾病相关基因的表达及 TMB 比较 在转移性 UM 中, *FOXO3* 表达量显著下调, *ITPR2* 表达量显著上调 A: *FOXO3* B: *ITPR2* C: *COL2A1* D: TMB TMB: 肿瘤突变负荷  
**Figure 4** Comparison of cancer and eye disease-related genes expression and TMB between the two groups of UM samples The expression level of *FOXO3* was significantly decreased, and the expression level of *ITPR2* was significantly increased in the metastatic group A: *FOXO3* B: *ITPR2* C: *COL2A1* D: TMB TMB: tumor mutation burden

表 2 2 个组 UM 样本中的基因表达量比较 [M(Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>)]  
Table 2 Comparison of gene expression levels between the two groups of UM samples [M(Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>)]

组别	样本量	BAP1 基因	SF3B1 基因	EIF1AX 基因	GNAQ 基因
转移组	18	2 982.50(1 251.50, 5 637.00)	9 587.00(5 306.00, 15 143.75)	2 383.50(1 361.00, 3 280.00)	4 332.50(2 306.50, 5 313.75)
非转移组	62	5 225.00(2 281.25, 8 784.00)	6 107.50(2 820.25, 13 118.50)	1 400.50( 589.00, 3 041.75)	3 275.50(1 656.50, 4 766.75)
Z 值		-1.786	-1.648	-1.636	-1.613
P 值		0.074	0.099	0.102	0.107

组别	样本量	GNAI1 基因	COL2A1 基因	FOXO3 基因	ITPR2 基因
转移组	18	4 815.00(4 014.75, 6 665.50)	295.50(23.50, 403.50)	1 223.00( 914.75, 2 706.25)	2 201.50(570.75, 4 814.00)
非转移组	62	5 431.00(4 049.50, 6 429.00)	105.00(33.75, 535.50)	2 293.50(1 254.25, 3 693.75)	474.00(153.00, 1 437.75)
Z 值		-0.092	-0.259	-1.982	-3.065
P 值		0.927	0.795	0.048	0.002

注: (Wilcoxon 秩和检验) 数据来源于 TCGA 数据库 UM: 葡萄膜黑色素瘤  
Note: (Wilcoxon rank sum test) The data came from TCGA database UM: uveal melanoma

### 2.5 BAP1、FOXO3 和 ITPR2 基因与 UM 患者生存率的关联分析

Cox 模型单因素分析显示, BAP1 基因突变、FOXO3 基因表达下调和 ITPR2 基因表达上调与不良预后显著相关(均 P<0.10)(表 3)。此外,对 BAP1 基因是否突变、FOXO3、ITPR2 基因不同表达水平和不同 TMB 的 UM 患者组分别进行生存分析,得出 BAP1 基因未发生突变组和 FOXO3 基因高表达组的生存率较高(P=0.076、0.004), ITPR2 基因高表达组的生存率较低(P=0.006)(图 5)。

表 3 UM 患者性别、基因突变和表达与预后的关系  
Table 3 Association between sex, gene mutations or gene expression levels and prognosis of UM patients

影响因素	回归系数 1	回归系数 2	95% 下限	95% 上限	P 值
性别	1.743	0.574	0.643	4.719	0.27
GNAQ_var	1.666	0.600	0.359	7.733	0.51
GNAI1_var	1.160	0.862	0.217	6.210	0.86
BAP1_var	2.645	0.378	0.880	7.954	0.08
SF3B1_var	5.650	0.177	0.616	51.815	0.13
EIF1AX_var	2.590	0.386	0.247	27.136	0.43
TMB	2.933	0.341	0.986	8.721	0.05
COO2A1_exp	0.785	1.274	0.277	2.226	0.65
FOXO3_exp	0.171	5.844	0.045	0.644	0.01
ITPR2_exp	6.207	0.161	1.633	23.598	0.01

注: UM: 葡萄膜黑色素瘤; \_var: 基因突变有/无; \_exp: 表达量高/低; TMB: 肿瘤突变负荷

Note: UM: uveal melanoma; \_var: with or without gene mutation; \_exp: with high or low expression level; TMB: tumor mutation burden

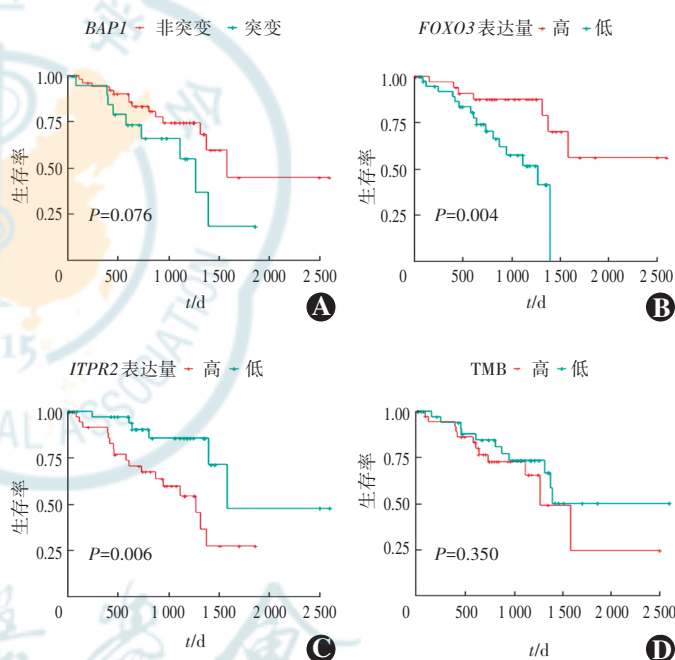


图 5 不同 BAP1 基因突变状态、FOXO3、ITPR2 差异表达和 TMB 高低的 UM 患者生存曲线分析 A: 不同 BAP1 基因突变状态 B: 不同 FOXO3 表达量 C: 不同 ITPR2 表达量 D: 不同 TMB 高低状态 TMB: 肿瘤突变负荷

Figure 5 The survival curves of UM patients with BAP1 mutation, differentially expressed FOXO3 and ITPR2 and different TMB values A: Mutated or non-mutated BAP1 gene B: Different values of differentially expressed FOXO3 gene C: Different values of differentially expressed ITPR2 gene D: Different TMB values TMB: tumor mutation burden

### 3 讨论

本研究对 TCGA 数据库中 80 例 UM 患者的基因突变和基因表达情况进行了分析,结果显示 UM 基因突变以错义突变为主,主要变异类型为 SNV,其中以 C>T 为主要形式。通过 DEGs 及 KEGG 通路富集分析,在转移性 UM 样本相对于非转移性 UM 样本的 218 个下调基因和 344 个上调基因中,鉴定出 3 个与眼部

疾病和癌症相关的基因,即 *BAP1*、*FOXO3* 和 *ITPR2* 基因。生存分析结果显示,*BAP1* 基因突变、*FOXO3* 基因表达下调和 *ITPR2* 基因表达上调与较差预后相关,表明这 3 个基因能够作为 UM 潜在的生物标志物,对患者的预后情况预测具有临床指导意义。

通过对基因突变信息的统计分析,本研究鉴定出突变频率最高的基因中,*GNAQ* 和 *GNAI1* 基因均已被证明在人 UM 组织中存在突变<sup>[14]</sup>,符合先前的研究结果,二者的高突变率与 UM 的发生紧密相关。但在本研究中,*GNAQ* 和 *GNAI1* 基因在转移组和非转移组之间的表达量比较差异无统计学意义。除了 *GNAQ* 和 *GNAI1* 外,*BAP1* 基因也在 UM 样本中显示出较高的突变率。*BAP1* 是位于 3 号染色体 3p21 的核去泛素化水解酶,通过从蛋白质中去除泛素起到信号调节的作用,参与细胞增生、细胞发育和 DNA 损伤修复等生物过程<sup>[15-18]</sup>。*BAP1* 基因突变首先在乳腺癌和肺癌细胞系中被发现<sup>[19]</sup>,并存在于其他几种癌症中,如脑膜瘤、间皮瘤和肾细胞癌等<sup>[20-22]</sup>。种系 *BAP1* 基因突变个体患 UM 和皮肤黑色素瘤的风险显著上升<sup>[23-24]</sup>,而体细胞 *BAP1* 基因突变未见于 *BAP1* 基因野生型 UM 进展过程中,表明体细胞 *BAP1* 基因突变是 UM 发生的早期事件,而非在转移过程中获得<sup>[25-27]</sup>。本研究结果发现,*BAP1* 基因在转移组中的表达量较非转移组显著下调,生存分析表明 *BAP1* 基因突变是影响 UM 预后不良的因素。亦有研究表明,敲除 *BAP1* 基因可使 UM 细胞系失去典型的黑色素细胞形态,且基因表达谱向预后不良的 2 型转化<sup>[25,28]</sup>。尽管有很多研究探索 *BAP1* 蛋白的功能,但 *BAP1* 基因突变如何促进 UM 的转移尚不清楚。有研究表明,*BAP1* 的缺失抑制同源介导的 DNA 修复,迫使细胞依赖于更容易出错的非同源末端连接<sup>[29]</sup>。此外,一些与 *BAP1* 相互作用的蛋白,如叉头转录因子 *FOXK1*、*FOXK2* 和多梳家族蛋白 *ASXL1*、*ASXL2*,已被证明参与到转录等相关过程的调控<sup>[30-31]</sup>,因此 *BAP1* 的缺失会影响下游的级联过程。正是由于这些潜在的相关蛋白和复杂的相互作用网络,*BAP1* 在 UM 转移中的关键作用并未被阐明,因此对 *BAP1* 及其相互作用蛋白的进一步研究有助于开发针对 UM 中 *BAP1* 缺失的治疗方法。

本研究对转移组和非转移组的 DEGs 进行功能富集分析,筛选出了与眼部疾病和癌症通路相关的基因 *FOXO3* 和 *ITPR2*,其中 *FOXO3* 基因在转移组的表达量明显下调,*ITPR2* 基因在转移组的表达量明显上调。*FOXO3* 是 *FOXO* 家族转录因子的重要成员,是 Akt 激酶活性的主要下游靶点,通过激活或抑制多个靶基因

的表达,参与调节细胞增生、分化、DNA 修复和凋亡等过程<sup>[32]</sup>。Akt 磷酸化 *FOXO3* 使其在细胞质中保留,防止其细胞核中的细胞调节作用,而 Akt 失活导致 *FOXO3a* 去磷酸化,并促使其从细胞质向细胞核的转移。已有研究表明,*FOXO3* 受 IGF-1R/PI3K/Akt 通路调控,并与横纹肌肉瘤、肝细胞癌、乳腺癌等肿瘤的转移密切相关<sup>[33-34]</sup>。此外,*FOXO3* 还可以通过上调 *Bim* 和 *CDKN1B*,抑制 *cyclin D1* 的转录和表达,发挥抑制细胞增生的作用<sup>[35]</sup>。本研究发现,*FOXO3* 表达下调与 UM 远处转移相关,生存分析显示 *FOXO3* 下调为 UM 预后不良的因素,可能的机制如下:IGF-1 受体在 UM 中过度表达并持续激活,*FOXO3* 受 IGF-1R/PI3K/Akt 通路激活后磷酸化,转移出细胞核失去调节能力,从而使 UM 细胞的侵袭和迁移能力增强<sup>[36-37]</sup>;相反,抑制 PI3K/Akt 通路可增强 *FOXO3* 活性<sup>[9]</sup>。*FOXO3* 参与了 IGF-1 诱导的 UM 细胞增生,因此该通路相关蛋白可能成为抑制 UM 远处转移的潜在治疗靶点。

*ITPR2* 蛋白是 IP3 受体的成员,是钙离子跨膜转运活性的关键调节蛋白,在细胞周期和增生中起关键作用<sup>[38-39]</sup>。在肝癌干细胞中,*ITPR2* 作为内质网钙离子通道蛋白,通过调控细胞钙信号,增强肝癌干细胞的自我更新能力<sup>[40]</sup>。此外,有研究报道 *ITPR2* 可作为细胞遗传学正常型急性髓细胞白血病不良预后的新型生物标志物<sup>[39]</sup>。然而,尚未有研究探索 *ITPR2* 蛋白的表达与 UM 之间的联系。本研究发现 *ITPR2* 基因在转移性 UM 中表达显著上调,生存分析显示 *ITPR2* 的表达增加与不良预后相关,这为未来探讨钙信号参与调控 UM 增生、转移的相关机制提供了新的思路。

本研究通过对 TCGA 数据库中 UM 样本的基因突变信息的统计分析发现,*BAP1* 基因在转移组和非转移组突变率均较高,*BAP1* 基因的突变是影响 UM 预后不良的因素,这与之前的研究结果相符合,但 *BAP1* 是如何影响 UM 的转移性还需要进一步研究。此外,本研究通过筛选转移组和非转移组的 DEGs,也阐释了 *FOXO3* 基因表达下调和 *ITPR2* 基因表达上调与转移性 UM 有很强的相关性,其中 *FOXO3* 与 UM 的关系报道较少,据目前报道仅有 1 篇研究显示 *FOXO3a* 的过度表达减弱了 UM 的基底侵袭和迁移<sup>[9]</sup>,这与本研究中发现在转移性 UM 中 *FOXO3* 基因表达显著下调这一结果可以相互验证和补充。对于 *ITPR2*,本研究表明了其与 UM 之间的关联,在转移性 UM 中 *ITPR2* 的表达显著上调。本研究也统计了数据库中这 80 例患者的预后信息,数据分析结果也能够支持这 3 个基因对转移性 UM 的影响。本研究从突变、表达和临床等

多个维度阐述了这 3 个基因对转移性 UM 的重要影响。在后续研究上,会进行相关的生物学验证,建立 UM 关键基因突变或敲除动物模型,在体内验证这些基因对 UM 转移的确切意义。

综上所述,本研究通过对 80 例 UM 基因样本的分析发现, *BAP1* 基因突变、*FOXO3* 基因表达下调和 *ITPR2* 基因表达上调与 UM 远处转移相关,可作为 UM 患者转移预测和预后的潜在重要标志,有助于 UM 转移的早期监测和治疗,对提高患者的远期生存率具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Shields CL, Kaliki S, Furuta M, et al. Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8, 033 cases [J]. *Retina*, 2012, 32 ( 7 ) : 1363 - 1372. DOI: 10. 1097/IAE. 0b013e31824d09a8.
- [2] Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival [J]. *Ophthalmology*, 2011, 118 ( 9 ) : 1881-1885. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2011. 01. 040.
- [3] Singh AD, Kalyani P, Topham A. Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus [J]. *Ophthalmology*, 2005, 112 ( 10 ) : 1784-1789. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2005. 06. 011.
- [4] Shields CL, Kaliki S, Livesey M, et al. Association of ocular and oculodermal melanocytosis with the rate of uveal melanoma metastasis: analysis of 7872 consecutive eyes [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2013, 131 ( 8 ) : 993-1003. DOI: 10. 1001/jamaophthalmol. 2013. 129.
- [5] Nayman T, Bostan C, Logan P, et al. Uveal melanoma risk factors: a systematic review of meta-analyses [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42 ( 8 ) : 1085-1093. DOI: 10. 1080/02713683. 2017. 1297997.
- [6] Weis E, Shah CP, Lajous M, et al. The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis [J]. *Arch Ophthalmol*, 2006, 124 ( 1 ) : 54-60. DOI: 10. 1001/archophth. 124. 1. 54.
- [7] Weis E, Vrouwe SQ, LeBaron DB, et al. Changes in ultraviolet radiation exposure to the ocular region: a population-based study [J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 ( 5 ) : 719 [ 2020-08-19 ]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31137687/>. DOI: 10. 3390/cancers11050719.
- [8] Lorigan JG, Wallace S, Mavligit GM. The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: imaging study in 110 patients [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 1991, 157 ( 6 ) : 1279-1281. DOI: 10. 2214/ajr. 157. 6. 1950883.
- [9] Yan F, Liao R, Farhan M, et al. Elucidating the role of the FoxO3a transcription factor in the IGF-1-induced migration and invasion of uveal melanoma cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84 : 1538-1550. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2016. 11. 027.
- [10] Patrone S, Maric I, Rutigliani M, et al. Prognostic value of chromosomal imbalances, gene mutations, and BAP1 expression in uveal melanoma [J]. *Genes Chromosome Canc*, 2018, 57 ( 8 ) : 387 - 400. DOI: 10. 1002/gcc. 22541.
- [11] AJCC Ophthalmic Oncology Task Force. International validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th Edition Classification of uveal melanoma [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2015, 133 ( 4 ) : 376 - 383. DOI: 10. 1001/jamaophthalmol. 2014. 5395.
- [12] Damato B. Ocular treatment of choroidal melanoma in relation to the prevention of metastatic death—a personal view [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 66 : 187-199. DOI: 10. 1016/j. pretyeres. 2018. 03. 004.
- [13] Onken MD, Worley LA, Tuscan MD, et al. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma [J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12 ( 4 ) : 461 - 468. DOI: 10. 2353/jmoldx. 2010. 090220.
- [14] Field MG, Harbour JW. GNAQ/11 mutations in uveal melanoma: is YAP the key to targeted therapy? [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25 ( 6 ) : 714-715. DOI: 10. 1016/j. cr. 2014. 05. 028.
- [15] Nishikawa H, Wu W, Koike A, et al. BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 ( 1 ) : 111 - 119. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-08-3355.
- [16] Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB [J]. *Nature*, 2010, 465 ( 7295 ) : 243 - 247. DOI: 10. 1038/nature08966.
- [17] Misaghi S, Ottosen S, Izrael-Tomasevic A, et al. Association of C-terminal ubiquitin hydrolase BRCA1-associated protein 1 with cell cycle regulator host cell factor 1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29 ( 8 ) : 2181-2192. DOI: 10. 1128/MCB. 01517-08.
- [18] Yu H, Mashtalir N, Daou S, et al. The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30 ( 21 ) : 5071-5085. DOI: 10. 1128/MCB. 00396-10.
- [19] Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, et al. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression [J]. *Oncogene*, 1998, 16 ( 9 ) : 1097-1112. DOI: 10. 1038/sj. onc. 1201861.
- [20] Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, et al. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers [J]. *J Med Genet*, 2011, 48 ( 12 ) : 856-859. DOI: 10. 1136/jmedgenet-2011-100156.
- [21] Bott M, Brevet M, Taylor BS, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21. 1 losses in malignant pleural mesothelioma [J]. *Nat Genet*, 2011, 43 ( 7 ) : 668-672. DOI: 10. 1038/ng. 855.
- [22] Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2012, 44 ( 7 ) : 751-759. DOI: 10. 1038/ng. 2323.
- [23] Walpole S, Pritchard AL, Cebulla CM, et al. Comprehensive study of the clinical phenotype of germline BAP1 variant-carrying families worldwide [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110 ( 12 ) : 1328-1341. DOI: 10. 1093/jnci/djy171.
- [24] Carbone M, Ferris LK, Baumann F, et al. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MIBAITs [J/OL]. *J Transl Med*, 2012, 10 : 179 [ 2020 - 12 - 23 ]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22935333/>. DOI: 10. 1186/1479-5876-10-179.
- [25] Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas [J]. *Science*, 2010, 330 ( 6009 ) : 1410-1413. DOI: 10. 1126/science. 1194472.
- [26] Field MG, Durante MA, Anbunathan H, et al. Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma [J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9 ( 1 ) : 116 [ 2020 - 12 - 25 ]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29317634/>. DOI: 10. 1038/s41467-017-02428-w.
- [27] Shain AH, Bagger MM, Yu R, et al. The genetic evolution of metastatic uveal melanoma [J]. *Nat Genet*, 2019, 51 ( 7 ) : 1123 - 1130. DOI: 10. 1038/s41588-019-0440-9.
- [28] Koopmans AE, Verdijk RM, Brouwer RW, et al. Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma [J]. *Mod Pathol*, 2014, 27 ( 10 ) : 1321 - 1330. DOI: 10. 1038/modpathol. 2014. 43.
- [29] Yu H, Pak H, Hammond-Martel I, et al. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 ( 1 ) : 285 - 290. DOI: 10. 1073/pnas. 1309085110.
- [30] Ji Z, Mohammed H, Webber A, et al. The forkhead transcription factor FOXK2 acts as a chromatin targeting factor for the BAP1-containing histone deubiquitinase complex [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42 ( 10 ) :



- 6232-6242. DOI:10.1093/nar/gku274.
- [31] Peng H, Prokop J, Karar J, et al. Familial and somatic BAP1 mutations inactivate ASXL1/2-mediated allosteric regulation of BAP1 deubiquitinase by targeting multiple independent domains [J]. *Cancer Res*, 2018, 78 (5) : 1200-1213. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-2876.
- [32] Wang H, Zhou X, Huang J, et al. The role of Akt/FoxO3a in the protective effect of venlafaxine against corticosterone-induced cell death in PC12 cells [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013, 228 (1) : 129-141. DOI:10.1007/s00213-013-3017-9.
- [33] Kong W, He L, Coppola M, et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer [J/OL]. *J Biol Chem*, 2016, 291 (43) : 22855 [2020-12-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27825093/>. DOI:10.1074/jbc.A110.101055.
- [34] Kim CG, Lee H, Gupta N, et al. Role of forkhead box class O proteins in cancer progression and metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 50 : 142-151. DOI:10.1016/j.semcancer.2017.07.007.
- [35] Yan F, Liao R, Lin S, et al. Forkhead box protein O3 suppresses uveal melanoma development by increasing the expression of Bcl-2-like protein 11 and cyclin-dependent kinase inhibitor 1B [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (2) : 3109-3114. DOI:10.3892/mmr.2017.8215.
- [36] Kim CG, Lee H, Gupta N, et al. Role of forkhead box class O proteins in cancer progression and metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 50 : 142-151. DOI:10.3892/mmr.2017.8215.
- [37] Yoshida M, Selvan S, McCue PA, et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in metastatic uveal melanoma and implications for potential autocrine and paracrine tumor cell growth [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2014, 27 (2) : 297-308. DOI:10.1111/pcmr.12206.
- [38] Wu X, Scelo G, Purdue MP, et al. A genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus for renal cell carcinoma on 12p11.23 [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21 (2) : 456-462. DOI:10.1093/hmg/ddr479.
- [39] Shi JL, Fu L, Wang WD. High expression of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, type 2 (ITPR2) as a novel biomarker for worse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (7) : 5299-5309. DOI:10.18632/oncotarget.3024.
- [40] Sun C, Shui B, Zhao W, et al. Central role of IP3R2-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillation in self-renewal of liver cancer stem cells elucidated by high-signal ER sensor [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (6) : 396 [2020-12-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31113961/>. DOI:10.1038/s41419-019-1613-2.

(收稿日期:2021-02-26 修回日期:2021-06-28)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

## 眼科常用英文缩略语名词解释

- AMD:年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration)
- ANOVA:单因素方差分析(one-way analysis of variance)
- BUT:泪膜破裂时间(breakup time of tear film)
- DR:糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy)
- EAU:实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis)
- EGF:表皮生长因子(epidermal growth factor)
- ELISA:酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay)
- ERG:视网膜电图(electroretinogram)
- FFA:荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography)
- FGF:成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor)
- GFP:绿色荧光蛋白(green fluorescent protein)
- IFN- $\gamma$ : $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ )
- IL:白细胞介素(interleukin)
- IOL:人工晶状体(intraocular lens)
- IRBP:光间受体视黄类物质结合蛋白(interphotoreceptor retinoid binding protein)
- LASIK:准分子激光角膜原位磨镶术(laser in situ keratomileusis)
- ICGA:吲哚菁绿血管造影(indocyanine green angiography)
- LECs:晶状体上皮细胞(lens epithelial cells)
- miRNA:微小RNA(microRNA)
- MMP:基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase)
- mTOR:哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin)
- MTT:四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium)
- NF:核转录因子(nuclear factor)
- OCT:光相干断层扫描(optical coherence tomography)
- OR:优势比(odds ratio)
- PACG:原发性闭角型青光眼(primary angle-closure glaucoma)
- PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)
- RGCs:视网膜节细胞(retinal ganglion cells)
- POAG:原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma)
- RB:视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)
- RPE:视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium)
- RNV:视网膜新生血管(retinal neovascularization)
- RP:视网膜色素变性(retinitis pigmentosa)
- S I t:基础泪液分泌试验(Schirmer I test)
- shRNA:小发夹RNA(short hairpin RNA)
- siRNA:小干扰RNA(small interfering RNA)
- $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin)
- TAO:甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy)
- TGF:转化生长因子(transforming growth factor)
- TNF:肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor)
- UBM:超声生物显微镜(ultrasound biomicroscope)
- VEGF:血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)
- VEP:视觉诱发电位(visual evoked potential)

(本刊编辑部)