

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.04.016

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.04.016>

基于 R 语言子宫内膜癌脂代谢基因差异性分析 及免疫组织化学验证

刘桐宇¹, 胡丹², 李杰萍³, 朱伟峰², 许春伟², 谢榕¹, 杨琳¹, 邹建平¹, 嵇海舟¹, 孙阳¹

(1. 福建医科大学附属福建省肿瘤医院妇科, 福州 350014; 2. 福建医科大学附属福建省肿瘤医院病理科, 福州 350014; 3. 武警福建总队医院检验科, 福州 350003)

[摘要] 目的: 探讨R语言在基因表达数据库中筛选子宫内膜癌相关的脂质代谢关键分子的可行性。方法: 从基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中筛选子宫内膜癌测序集GSE56087, 基于R语言进行基因差异性分析及信号通路分析, 从结果中选取可能有意义的高表达基因并进行免疫组织化学验证。结果: 通过基因差异性分析、富集分析并结合信号通路分析, 筛选出子宫内膜癌组织中代谢相关基因CYP3A4与NR1I2高表达。临床标本免疫组织化学显示CYP3A4与NR1I2在癌与癌旁组织的表达差异有统计学意义($P < 0.05$), 但均非高表达。CYP3A4与NR1I2在不同子宫内膜癌分期中的表达情况的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: R语言对已有基因表达数据库进行基因差异性分析和信号通路分析是可行的。对GSE56087测序结果进行差异性基因分析发现, 脂质代谢相关的CPY基因家族、NR基因家族有高表达, 尤其CYP3A4与NR1I2, 值得后续深入研究。

[关键词] R语言; 脂质代谢; 内膜癌; 免疫组织化学

Differential analysis for lipid metabolism genes in endometrial cancer and immunohistochemical verification based on R language

LIU Tongyu¹, HU Dan², LI Jieping³, ZHU Weifeng², XU Chunwei², XIE Rong¹, YANG Lin¹, ZOU Jianping¹,
JI Haizhou¹, SUN Yang¹

(1. Department of Gynecology, Fujian Cancer Hospital, Fujian Medical University Cancer Hospital, Fuzhou 350014; 2. Department of Pathology, Fujian Cancer Hospital, Fujian Medical University Cancer Hospital, Fuzhou 350014; 3. Department of Laboratory, Fujian Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Fuzhou 350003, China)

Abstract **Objective:** To explore the feasibility of screening key molecules of lipid metabolism in endometrial cancer in

收稿日期 (Date of reception): 2020-02-03

通信作者 (Corresponding author): 孙阳, Email: doctorsunyang@sina.com

基金项目 (Foundation item): 福建省卫生和计划生育委员会医学创新课题 (2017-CX-9); 福建省科技计划项目 (2018Y2003)。This work is supported by the Medical Innovation Project of Fujian Provincial Health and Family Planning Commission (2017-CX-9) and the Science and Technology Program of Fujian Province (2018Y2003), China.

gene expression database based on R language. **Methods:** Following screening the endometrial cancer sequence set GSE56087 from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, differential analysis of genes and signal pathway analysis were performed based on R language. Potentially significant genes with high expression were selected from the results for immunohistochemical verification. **Results:** Through genetic difference analysis, enrichment analysis, and signal pathway analysis, high expression of metabolism-related genes CYP3A4 and NR1I2 in endometrial cancer tissues were screened out. Immunohistochemistry of clinical specimens showed that the expression of CYP3A4 and NR1I2 in cancer and adjacent tissues was statistically significant ($P < 0.05$), but they were not highly expressed. There was no significant difference in expression of CYP3A4 and NR1I2 in different endometrial cancer stages ($P > 0.05$). **Conclusion:** It is feasible to analyze the gene difference and signal pathway in the existing gene expression database with R language. Differential gene analysis of GSE56087 sequence results showed that the CPY gene family and NR gene family related to lipid metabolism were highly expressed, especially CYP3A4 and NR1I2, which are worthy of further research.

Keywords R language; lipid metabolism; endometrial cancer; immunohistochemistry

女性生殖道肿瘤对其健康构成巨大威胁, 其中包括三个主要肿瘤: 子宫内膜癌, 上皮性卵巢癌和宫颈癌。2015年中国有63 400名女性被诊断患有子宫内膜癌, 其中21 800人死亡^[1]。

脂类代谢参与调节细胞的生长、增殖、分化等多种生命活动, 脂类代谢异常在肿瘤的发生发展中起重要的作用^[2]。多不饱和脂肪酸(poly unsaturated fatty acids, PUFAs)作为一类独特的生物活性物质, 对人体有重要的生理功能。细胞膜中脂肪酸(尤其是PUFAs)代谢的改变影响细胞的结构、功能、细胞的氧化状态以及信号通路, 从而改变细胞的生长特性^[3]。患有代谢紊乱(包括肥胖和糖尿病)的女性患子宫内膜癌的风险增加。然而, 子宫内膜肿瘤的脂质代谢途径还没有得到充分的研究。

既往研究^[4]发现子宫内膜癌患者外周血中, omega-6含量及omega-6/omega-3比值增高。omega-6及omega-d等PUFAs在生物体内的代谢是一个复杂的过程。其中omega-3 PUFAs和omega-6 PUFAs都是合成类二十烷酸化合物的前体, 在机体内具有稳定细胞膜功能、调控基因表达、维持细胞因子和脂蛋白平衡、抗心血管病、抗炎和抗癌等生理功能, 是目前营养生化研究热点之一^[5-7]。人类的食物中omega-3 PUFAs明显减少, 同时含有过量的omega-6 PUFAs, 高omega-6/omega-3 PUFAs比值的膳食引发一系列的慢性疾病, 如心血管疾病、肥胖、糖尿病、癌症、炎症及自身免疫性疾病等^[8-11]。

为深入探索脂肪酸代谢异常关键分子与子宫内膜癌发生或发展的关系, 并探讨利用R语言进行基因差异性分析的可行性, 本研究通过对美

国国立生物技术信息中心基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中子宫内膜癌二代基因测序数据GSE56087, 进行基于R语言的基因差异性分析, 筛选与子宫内膜癌相关的脂质代谢关键分子, 并在组织标本上进行免疫组织化学验证。

1 资料与方法

1.1 基因差异性分析

1.1.1 相关数据集筛选GEO数据库芯片筛选

本研究检索美国国家生物信息技术中心(The National Center for Biotechnology Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 点击选择GEO datasets, 检索 Endometrial cancer, 选择 Homosapiens, 共检索出2 451个芯片。我们以“endometrial cancer AND adjacent normal tissue”为检索词, 在排除非内膜癌标本、非真实患者组织标本检测、甲基化、针对某个靶标的基因芯片检测, 最终选择GSE56087, 该测序结果应用Illumina 100个核苷酸配对端测序法, 对9对子宫内膜癌及癌旁组织进行mRNA表达谱分析。

1.1.2 R语言包的安装

R语言采用3.5.3版本。安装Biobase、GEOquery、pheatmap、FactoMineR、factoextra、ggpubr、limma函数包。pheatmap绘制热图和ggpubr绘制韦恩图。

1.1.3 差异基因筛选及信号通路分析

按照 $|\log_2FC| > 1$ 和 $P < 0.05$ 作为筛选标准, 使用limma包筛选差异性基因。将最终筛选出的差异性基因, 导入<https://string-db.org/>网站进行京都

的基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)的信号通路(pathway)及基因本体论(Gene Ontology, GO)分析。

基因富集分析时,对于每个给定的基因列表,使用以下进行途径和过程富集分析:KEGG途径,GO生物过程,反应基因集(reactome gene sets),规范途径(canonical pathways)。基因组中的所有基因都被用作富集背景。 $P < 0.01$,最小计数为3,富集因子 > 1.5 (富集因子是观察到的计数与偶然预期的计数之间的比率)的基因被收集并根据其成员相似性分组。基于累积超几何分布^[12]计算P值,并且使用Benjamini-Hochberg过程计算q值以考虑多次测试^[13]。Kappa^[14]得分当在富集项上执行分层聚类时,将其用作相似性度量,并且将具有 > 0.3 的相似性的子树视为聚类。选择群集中最具统计意义的术语来表示群集。

1.2. 血脂水平分析、免疫组织化学验证

收集2007年6月至2018年12月福建省肿瘤医院病理科存档I型子宫内膜样腺癌I~II期病理组织共77例,均具有完整的病历资料,就诊前未接受任何治疗。患者均为女性,年龄29~73岁,中位年龄54岁。取材子宫内膜癌及癌旁组织。搜集患者初诊时血脂水平指标,包括三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDLC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDLC)、载脂蛋白A1(apolipoprotein A1, ApoA1)、载脂蛋白B(apolipoprotein B, ApoB)。

苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色和免疫组织化学染色:组织经4%中性甲醛固定、常规脱水、石蜡包埋、4 μm 厚切片,进行HE染色。采用罗氏全自动免疫组织化学仪(Roche Benchmark XT),对NR1I2、CYP3A4标志物免疫组织化学染色,实验步骤参照说明书进行。所用一抗NR1I2、CYP3A4为Biotech公司产品。用已知阳性组织作为阳性对照,采用PBS代替一抗作为阴性对照。判读标准:所有染色切片经2位经验丰富的病理科医师进行阅片,以最终得到统一的结果为准。阳性染色为确定为强而连续的细胞质染色。CYP3A4、NR1I2阴性染色定义为无染色、局部染色、弱染色。染色强度评分标准如下。1)肿瘤组织中阳性肿瘤细胞百分比:1为0%~25%、2分为6%~50%、3分为51%~75%、4分为76%~100%。2)染色强度:0(无信号)、1(弱)、2(中)、3(强)。最后的分数是根据染色强度和阳性肿瘤细胞的百

分比来计算的。按乘积分数,小于6分为低表达组,大于等于6分为高表达组^[15-17]。

1.3 统计学处理

计量资料采用Shapiro-Wilks检验对其进行正态性检验,符合正态分布的资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式进行描述,不符合正态分布的资料采用中位数(第一四分位数,第三四分位数)进行描述,符合正态分布的资料组间比较采用独立样本t检验进行,不符合正态分布的资料组间比较采用非参数检验进行。所有检验以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因挖掘的主成分分析结果

采用R语言函数包“FactoMineR”“factoextra”对差异基因进行主成分分析,可以看出癌与癌旁组织基因测序结果大致可以区分(图1),有利于提取基因测序结果进行下一步分析。

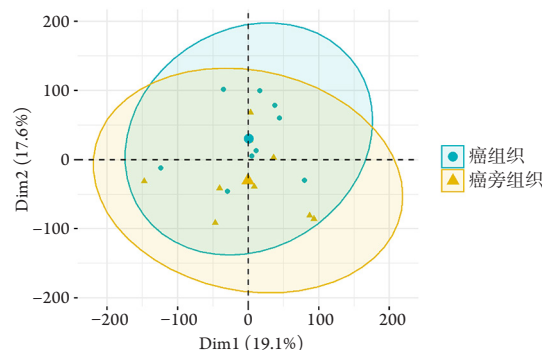


图1 GSE56087数据集癌与癌旁组织基因测序结果主成分分析

Figure 1 Principal component analysis of gene sequencing results of cancer and adjacent tissues in GSE56087 dataset

2.2 热图的制作

采用R语言函数包“pheatmap”制作异基因表达值参差聚类热图(图2)。热图中的红色表示高表达基因,蓝色表示低表达基因。基因测序结果大致可以区分癌与癌旁组织,通过主成分及热图分析,判断可进入差异性基因分析。

差异性基因GO分析结果中,针对脂质代谢通路,发现多个细胞色素酶P450家族(cytochrome P450 family, CYP)CYP2J2、CYP8B1、CYP2D7P1、CYP1B1、CYP3A4及其配体NR1I2、NR1P2、NR1P3,其中NR1I2及CYP3A4富集度较高。

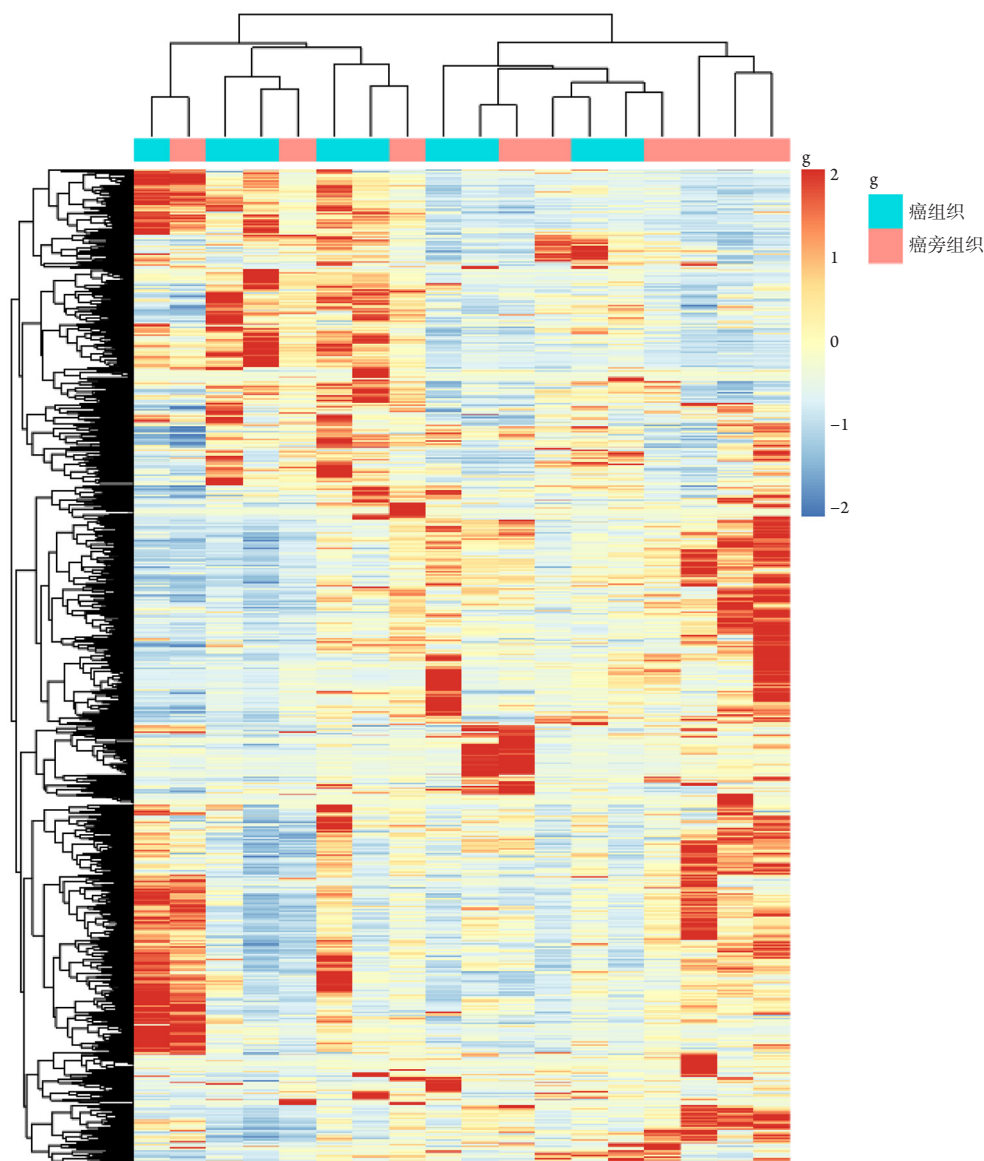


图2 GSE56087数据集差异基因表达值参差聚类热图

Figure 2 Heterogeneous clustering heat map of differential gene expression value in GSE56087 dataset

将富集度较高的基因通路的差异性基因导入蛋白质互作分析网站(STRING, <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=yViCck44ORyc>), 发现NR1I2与CYP家族基因的确有相互作用, 但并非核心互作基因。基于子宫内膜癌患者常合并肥胖、雌激素水平增高的现象以及我们关注的脂质代谢方向, 故选择NR1I2及CPY3A4进行免疫组织化学验证。

2.3 差异基因的筛选结果

按照 $|\log_2FC| > 1.5$ 和 $P < 0.05$ 作为筛选标准, 共筛选出差异性基因808个。将差异性基因复制后导入<https://ga.genecards.org/>和<http://metascape.org/>

网站, 筛选出可进行分析基因795个。通过基因富集分析, 优先筛选出富集度较高的基因通路20个(表1)。

2.4 子宫内膜癌血脂水平表达、免疫组织化学验证

福建省肿瘤医院病理科存档I型子宫内膜样腺癌I~II期病理组织共77例, CYP3A4阳性组与阴性组, 阴性组年龄为 (52.27 ± 11.72) 岁, 阳性组年龄为 (52.95 ± 9.38) 岁, $F=2.11$, $P=0.15$ 。NR1I2阳性组与阴性组, 阴性组年龄为 (50.20 ± 9.81) 岁, 阳性组年龄为 (55.27 ± 10.66) 岁, $F=0.13$, $P=0.72$ 。病历资料血脂水平与子宫内膜癌分期的差异性分析见表2。

表1 GSE56087差异基因信号通路富集结果

Table 1 GSE56087 enrichment results of differential genes in signaling pathways

GO	信号通路	LogP	富集度	Z- 评分
CORUM:430	18S U11/U12 snRNP	-7.59	55.91	16.46
R-HSA-77387	胰岛素受体回收	-5.60	41.29	12.57
CORUM:1181	C 复合体剪接体	-14.12	37.37	19.80
R-HSA-917977	转铁蛋白内吞和回收	-5.28	34.63	11.46
CORUM:2755	17S U2 snRNP	-5.17	32.53	11.08
GO:0000387	剪接 snRNP 装配	-7.40	30.97	13.23
R-HSA-72165	mRNA 剪接 - 次要途径	-7.40	30.97	13.23
GO:0033572	转铁蛋白转运	-5.01	29.82	10.58
GO:0015682	铁运输	-4.92	28.25	10.28
GO:0015991	ATP 水解耦合质子传输	-3.72	26.84	8.66
GO:0039694	病毒 RNA 基因组复制	-3.72	26.84	8.66
GO:0099131	ATP 水解偶联离子跨膜转运	-3.64	25.16	8.36
CORUM:351	剪接体	-14.23	24.75	17.29
hsa04721	突触小泡循环	-4.04	17.04	7.80
R-HSA-72172	mRNA 剪接	-11.17	16.86	13.46
R-HSA-72203	封闭内含子的 pre-mRNA 的加工	-13.75	16.50	14.88
hsa05120	幽门螺杆菌感染上皮细胞信号转导	-3.91	15.79	7.47
hsa04145	吞噬体	-5.75	12.20	8.53
hsa00190	氧化磷酸化	-4.97	12.11	7.86
GO:0015909	长链脂肪酸转运	-2.70	12.02	5.52

差异基因信号通路富集分析, 其中包含脂肪代谢相关通路GO: 0015909。

Gene set enrichment pathway analysis shows that the results include long-chain fatty acid transports pathway GO: 0015909.

表2 子宫内膜癌患者不同分期血脂水平比较

Table 2 Comparison of blood lipid levels in different stages of endometrial cancer patients

血脂指标	I 期 (n=41)	II 期 (n=36)	P
TG/(mmol·L ⁻¹)	1.62 (0.96, 2.20)	1.34 (0.84, 1.86)	0.14
TC/(mmol·L ⁻¹)	5.32 ± 1.05	5.55 (4.70, 6.36)	0.55
HDLc/(mmol·L ⁻¹)	1.28 ± 0.32	1.38 ± 0.42	0.23
LDLc/(mmol·L ⁻¹)	3.51 ± 0.77	3.86 (3.07, 4.32)	0.35
ApoA1/(g·L ⁻¹)	1.34 ± 0.28	1.37 ± 0.38	0.72
ApoB/(g·L ⁻¹)	1.05 ± 0.22	1.02 ± 0.38	0.62

CYP3A4与NR1I2在癌与癌旁组织的表达差异有统计学意义($P < 0.05$), 但均非高表达(表3)。CYP3A4与NR1I2在不同子宫内膜癌分期中的表达情

况的差异无统计学意义($P > 0.05$, 表4)。

CYP3A4与NR1I2免疫组织化学表达图示见图3。

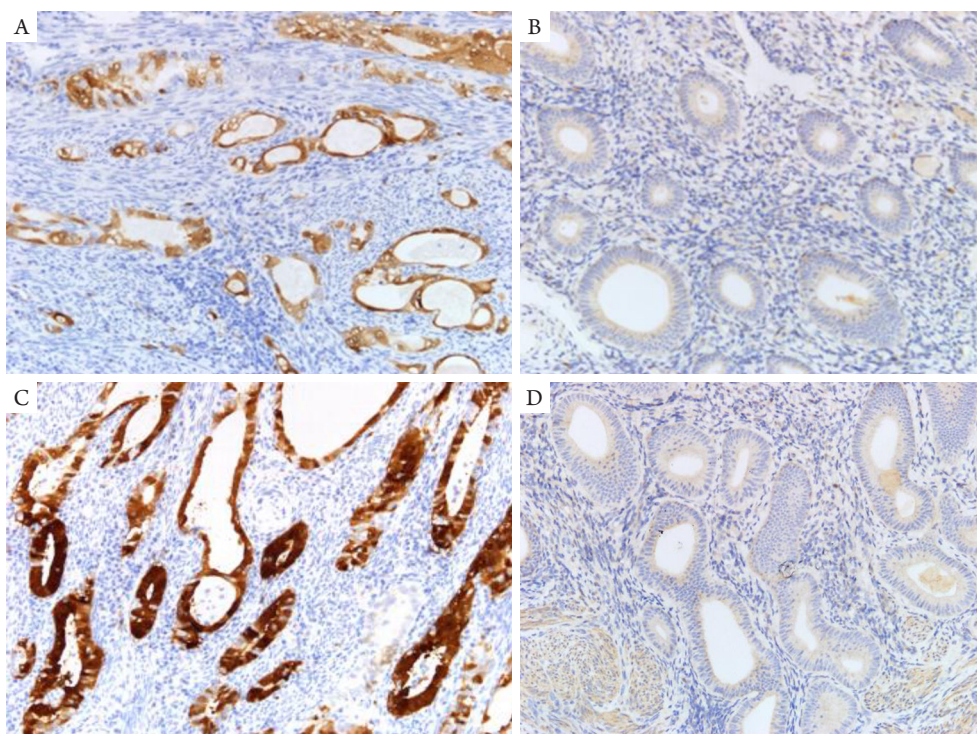
表3 CYP3A4与NR1I2在癌与癌旁组织的表达情况($n=77$)Table 3 Expression of CYP3A4 and NR1I2 in cancer and adjacent tissues ($n=77$)

表达基因	表达情况	癌 / [例 (%)]	癌旁 / [例 (%)]	χ^2	P
CYP3A4	有表达	41 (53.25)	15 (19.48)	18.97	<0.01
	未表达	36 (46.75)	62 (80.52)		
NR1I2	有表达	37 (48.05)	14 (18.18)	15.51	<0.01
	未表达	40 (51.95)	63 (81.82)		

表4 CYP3A4与NR1I2在子宫内膜癌不同分期中的表达情况

Table 4 Expression of CYP3A4 and NR1I2 in different stages of endometrial cancer

表达基因	表达情况	I期 / [例 (%)]	II期 / [例 (%)]	χ^2	P
CYP3A4	高表达	23 (56.09)	18 (50.00)	0.29	0.59
	低表达	18 (43.91)	18 (50.00)		
NR1I2	高表达	21 (51.22)	16 (44.44)	0.35	0.55
	低表达	20 (48.78)	20 (55.56)		

图3 CYP3A4、NR1I2子宫内膜癌及癌旁组织免疫组织化学染色(Ventana, $\times 200$)Figure 3 Immunohistochemical staining of CYP3A4, NR1I2 endometrial cancer and adjacent tissues (Ventana, $\times 200$)

(A) CYP3A4在子宫内膜癌组织中阳性表达; (B) CYP3A4在子宫内膜癌癌旁组织中阴性表达; (C) NR1I2子宫内膜癌组织中阳性表达; (D) NR1I2在子宫内膜癌癌旁组织中阴性表达。

(A) Positive expression of CYP3A4 in endometrial cancer tissues; (B) CYP3A4 is negatively expressed in the tissue adjacent to the endometrial cancer; (C) positive expression of NR1I2 in endometrial cancer tissue; (D) NR1I2 is negatively expressed in adjacent tissues of uterus endometrioid adenocarcinoma.

3 讨论

炎症因子在子宫内膜癌的病因中起着重要的作用^[18-19]。一项荟萃分析^[20]纳入了7项队列研究和14项病例对照研究, 总计524 583参与者纳入分析, 研究发现较高的单不饱和和脂肪酸的摄入量人群有着明显较低的子宫内膜癌的发生风险。Brasky等^[21]发现单独摄入长链omega-3 PUFAs使子宫内膜癌风险线性降低15%~23%。长链omega-3 PUFAs的抗炎特性可以很好解释当前研究中观察到的抗癌益处; 然而, 正常体重妇女受益并不容易解释。因此, 我们试图寻找子宫内膜癌中脂质代谢途径中基因表达差异。

从Liu等^[22]的生物信息学研究, 发现子宫内膜癌中有细胞色素P450(cytochrome P450, CYP 450)代谢通路, 以及MAPK信号通路、血清素能突触通路等参与。脂质代谢在内膜癌中扮演了比较重要的角色。我们的研究发现, I型子宫内膜癌I、II期患者, 血脂水平的差别无统计学意义。脂质代谢在I型子宫内膜癌与癌前病变的差异是否存在, 值得进一步研究。

孕烷X受体(pregnenane X receptor, PXR), 属于核受体的大家族。PXR(由NR1I2编码)和PPAR α (由PPAR A编码)是影响CYP3A4表达的两个重要转录因子^[23-24]。NR1I2负责药物代谢酶和转运蛋白的上游调节, 包括CYP3A家族和多药耐药蛋白1(multi-drug resistance 1, MDR1)^[25]。CYP3A4的上游调节因子除了NR1I2, 还有PPARA、NFKB1^[26]。作为核激素受体超家族的依赖配体的转录因子, PXR具有多种功能, 包括调节异生物和胆固醇代谢, 能量稳态, 肠道黏膜防御和癌症发展^[26]。

GSE56087是对子宫内膜癌及癌旁组织进行基因表达测序。我们的研究从GSE56087测序结果中, 进行差异性基因分析。在差异性分析中, 确实发现脂质代谢相关的CYP基因家族、NR基因家族有高表达。这结果同Ashton等^[27]对191例子宫内膜癌病例和291例健康对照者中对18个基因的28个多态性进行了基因分型, 其发现子宫内膜癌中CYP家族高表达结果类似。针对我们寻找子宫内膜癌中脂质代谢途径中基因表达差异的目的, 对差异性分析结果中的CYP3A4及NR1I2进行免疫组织化学验证。我们研究的结果发现: CYP3A4与NR1I2确实在I型子宫内膜癌I、II期患者中表达, 但并非高表达。Masuyama等^[28]提出: PXR-CYP3A4/7信号传导可能是致癌途径, 有可能导致低表达ER- α 的子宫内膜组织的致癌作用。

在其他激素依赖性肿瘤(例如前列腺癌)中, Chen等^[29]发现, 选择性强效激动剂SR12813可以通过PXR介导的人前列腺癌PC3细胞中CYP3A4和MDR1的上调来增强对紫杉醇和长春碱的耐药性。既往研究发现配体和PXR激活之间的关系, 可促进雌激素积累和激素反应性肿瘤的疾病进展, 如Meyer zu Schwabedissen等^[30]通过PXR介导的OATP1A2上调揭示了激素依赖乳腺癌的发病机制与雌激素积累增加之间的直接关系。Miyoshi等^[31]发现通过乳腺癌肿瘤中CYP3A4的mRNA和免疫组织化学表达水平与多西他赛治疗的乳腺癌患者的临床结局相关。CYP3A4 mRNA水平低的患者($n=14$)对多西他赛治疗的反应率显著高于CYP3A4 mRNA水平高的患者($n=9$, 71% vs 11%, $P<0.01$)因此, CYP3A4及NR1I2值得我们进行后续的相关研究。

本研究充分证实了R语言进行基因差异性分析的可行性, 并证实对公开数据库中基因挖掘的可行性。但脂质代谢在子宫内膜癌中扮演了何种角色, 仍需要进一步设计新的实验去证实。

由于公开数据库中, 同时对子宫内膜癌及癌旁组织进行基因测序的实验很少, 有部分数据库有数据缺失的情况。如能综合多个数据集进行挖掘和验证, 效果会更好。

参考文献

1. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
2. Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1): 924-949.
3. Abel S, Riedel S, Gelderblom WC. Dietary PUFA and cancer[J]. Proc Nutr Soc, 2014, 73(3): 361-367.
4. Gerber M. Background review paper on total fat, fatty acid intake and cancers[J]. Ann Nutr Metab, 2009, 55(1/3): 140-161.
5. 孙翔宇, 高贵田, 段爱莉, 等. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 418-423.
SUN Xiangyu, GAO Guitian, DUAN Aili, et al. Research progress in polyunsaturated fatty acids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 418-423.
6. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1851(4): 469-484.
7. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man[J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(5): 1105-1115.
8. Gómez Candela C, Bermejo López LM, Loria Kohen V. Importance

- of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations[J]. *Nutr Hosp*, 2011, 26(2): 323-329.
9. Strandvik B. The omega-6/omega-3 ratio is of importance![J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2011, 85(6): 405-406.
 10. Sanders TA. Protective effects of dietary PUFA against chronic disease: evidence from epidemiological studies and intervention trials[J]. *Proc Nutr Soc*, 2014, 73(1): 73-79.
 11. Kang JX. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio in chronic diseases: animal models and molecular aspects[J]. *World Rev Nutr Diet*, 2011, 102: 22-29.
 12. Zar JH. *Biostatistical analysis*[M]. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999: 523.
 13. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing[J]. *Stat Med*, 1990, 9(7): 811-818.
 14. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales[J]. *Educational and Psychological Measurement*, 1960, 20: 27-46.
 15. Qixing M, Juqing X, Yajing W, et al. The expression levels of CYP3A4 and CYP3A5 serve as potential prognostic biomarkers in lung adenocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(4): 1010428317698340.
 16. Feng F, Jiang Q, Cao S, et al. Pregnane X receptor mediates sorafenib resistance in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(4): 1017-1030.
 17. Dong Y, Wang Z, Xie GF, et al. Pregnane X receptor is associated with unfavorable survival and induces chemotherapeutic resistance by transcriptional activating multidrug resistance-related protein 3 in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 71.
 18. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, et al. Inflammation and cancer: how hot is the link?[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(11): 1605-1621.
 19. Wallace AE, Gibson DA, Saunders PT, et al. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma[J]. *J Endocrinol*, 2010, 206(2): 141-157.
 20. Zhao J, Lyu C, Gao J, et al. Dietary fat intake and endometrial cancer risk: a dose response Meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(27): e4121.
 21. Brasky TM, Rodabough RJ, Liu J, et al. Long-chain ω -3 fatty acid intake and endometrial cancer risk in the Women's Health Initiative[J]. *Am J Clin Nutr*, 2015, 101(4): 824-834.
 22. Liu L, Chen F, Xiu A, et al. Identification of key candidate genes and pathways in endometrial cancer by integrated bioinformatical analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(4): 969-975.
 23. Klein K, Thomas M, Winter S, et al. PPARA: a novel genetic determinant of CYP3A4 in vitro and in vivo[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 91(6): 1044-1052.
 24. Piedade R, Schaeffeler E, Winter S, et al. PXR variants and artemisinin use in Vietnamese subjects: frequency distribution and impact on the interindividual variability of CYP3A induction by artemisinin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(4): 2153-2157.
 25. Zhang J, Kuehl P, Green ED, et al. The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants[J]. *Pharmacogenetics*, 2001, 11(7): 555-572.
 26. Zhao G, Liu M, Wu X, et al. Effect of polymorphisms in CYP3A4, PPARA, NR112, NFKB1, ABCG2 and SLCO1B1 on the pharmacokinetics of lovastatin in healthy Chinese volunteers[J]. *Pharmacogenomics*, 2017, 18(1): 65-75.
 27. Ashton KA, Proietto A, Otton G, et al. Polymorphisms in genes of the steroid hormone biosynthesis and metabolism pathways and endometrial cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol*, 2010, 34(3): 328-337.
 28. Masuyama H, Hiramatsu Y, Kodama J, et al. Expression and potential roles of pregnane X receptor in endometrial cancer[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(9): 4446-4454.
 29. Chen Y, Tang Y, Wang MT, et al. Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10361-10367.
 30. Meyer zu Schwabedissen HE, Tirona RG, Yip CS, et al. Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22): 9338-9347.
 31. Miyoshi Y, Ando A, Takamura Y, et al. Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(1): 129-132.

本文引用: 刘桐宇, 胡丹, 李杰萍, 朱伟峰, 许春伟, 谢榕, 杨琳, 邹建平, 嵇海舟, 孙阳. 基于 R 语言子宫内膜癌脂代谢基因差异性分析及免疫组织化学验证[J]. *临床与病理杂志*, 2021, 41(4): 832-839. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.04.016

Cite this article as: LIU Tongyu, HU Dan, LI Jieping, ZHU Weifeng, XU Chunwei, XIE Rong, YANG Lin, ZOU Jianping, JI Haizhou, SUN Yang. Differential analysis for lipid metabolism genes in endometrial cancer and immunohistochemical verification based on R language[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(4): 832-839. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.04.016