

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.06.031

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191120.1108.010.html>(2019-11-20)

差异性表达基因在肝癌研究中的意义及进展*

黎经何 综述, 史政荣[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 400016)

[摘要] 原发性肝癌是临床上常见的恶性肿瘤,病死率居全球恶性肿瘤前三位。目前有关肝癌的病因、演变与发展机制尚不完全清楚,主要涉及肝炎病毒感染、酒精性肝损害、摄入黄曲霉毒素 B1、非酒精性脂肪肝、糖尿病、铁积累等。从分子生物学的角度看,无论是何种因素,最后均会导致肝癌基因的不正常表达,失去对细胞周期的控制,从而诱发肝癌的发生,这也符合恶性肿瘤发展的一般规律。因此,研究与肝癌有关的基因表达有望从根本上了解肝癌分子水平的发生发展,开展有针对性的预防和治疗。现主要对肝癌差异性表达的热点基因 Echs1、TOP2A、nme212、CYP2D6 * 10、ecm1、atf5 进行阐述。

[关键词] 肝肿瘤;差异性表达基因;预防;治疗

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)06-0998-04

Significance and progress of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma*

LI Jinghe, SHI Zhengrong[△]

(Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] Primary liver cancer is a common malignant tumor in clinic, and the mortality rate ranks the top three among global malignant tumor mortality. At present, the etiology, evolution and development mechanism of liver cancer are not fully understood, mainly including hepatitis virus infection, alcoholic liver damage, aflatoxin B1 intake, nonalcoholic fatty liver, diabetes, iron accumulation and so on. From the perspective of molecular biology, no matter what kinds of factors, it will lead to the abnormal expression of liver cancer genes, cause the loss of controlling the cell cycle, thereby induce the occurrence of liver cancer, which is also in line with the general rule of malignant tumor development. Therefore, the study of gene expression related to liver cancer is expected to fundamentally understand the occurrence and development of liver cancer molecular levels, targeted prevention and treatment. This article mainly describes the hotspot genes of differentially expressed genes in liver cancer, including Echs1, TOP2A, nme212, CYP2D6 * 10, ecm1, and atf5.

[Key words] hepatocellular neoplasms; differentially expressed genes; prevention; treatment

大量研究表明,肝癌的发生不是单一基因调控,而是不同种类、不同信号传导途径基因的相互作用^[1-2]。细胞周期缓慢、细胞色素 P450 功能障碍和肝脏解毒效应受损是肝癌基因作用中的 3 个典型模块。ZHANG 等^[3]通过高通量数据采集生物学分析发现了 598 个显著上调的差异性表达基因(differentially expressed genes, DEGS)和 632 个显著下调的 DEGS,研究发现不同基因虽然作用途径不一,但在抗原处理和递呈、补体级联和 I 型干扰素信号通路上有协同或

拮抗作用,而这些对肝癌的发生及侵袭能力变化有重要影响。ZHU 等^[4]的研究结果显示,基因作用相似的蛋白可以相互交互,构成蛋白-蛋白相互作用网络(protein-protein interaction network, PPI),并强调 PPI 主要由 1 个或多个重要的基因辐射形成,称为枢纽基因,而枢纽基因的作用就是肝癌发生发展的重要因素,也是潜在的治疗靶点。说明肝癌基因的调控具有中心性及多样性。这与肝癌的临床异质性差异及化疗药物治疗效果差相符^[5]。目前肝癌的一线治疗

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会医学科研计划面上项目(2013-2-009)。 作者简介:黎经何(1994-),住院医师,硕士,主要从事肝胆外科临床研究。 [△] 通信作者, E-mail:1043567160@qq.com。

药物索拉非尼、乐伐替尼,主要机制是抑制血管内皮生长因子(VEGF)/血管内皮生长因子受体(VEGFR)的活性,临床疗效较好,但并非所有患者都能从中受益^[6-7]。因此,需要对更多的肝癌 DEGS 进行研究,为更细致的肝癌病理分型及后期药物开发提供参考。

1 新型乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)结合蛋白

Echs1 基因与肝癌发病密切相关,LIU 等^[8]从 NCBI 基因表达总库中获得肝癌数据集(GSE6222 和 GSE41804),鉴定了 273 个在肝癌中差异表达的基因,发现 Echs1 基因是表达最显著的基因,定位于染色体 10q26.2-q26.3。它是一种新型 HBsAg 结合蛋白,XIAO 等^[9]研究证实了它在肝癌中过表达,并且与 HBsAg 在细胞质中共同定位,研究进一步发现乙型肝炎病毒(HBV)有促进肝癌细胞凋亡作用,Echs1 基因抑制肝癌细胞凋亡,但在 HBsAg 过表达的癌细胞中,由于 HBsAg 可影响 Echs1 基因中的定位,Echs1 基因的表达水平有所下降,二者共存表现出促进肝癌细胞凋亡的作用。因此,推测可通过针对性抑制 Echs1 作用加强 HBsAg 阴性肝癌患者的治疗效果。ZHU 等^[10]的研究表明 Echs1 可通过 AKT/PKB 途径促进肝癌细胞增殖及通过线粒体途径拮抗肝癌细胞凋亡,通过基因敲除 Echs1,可使 bcl-2、bcl-xl、抗凋亡蛋白(MCL-1)下降和 Bax、Bid、bim、BAD、促凋亡蛋白(puma)的表达水平上升。据报道,不仅仅是 bcl-2, bax 和 bcl-2 的比值,对抑制药物诱导的癌细胞凋亡起着重要的作用^[11]。XU 等^[12]发现沉默 Echs1 基因可以抑制细胞增殖和诱导自噬。针对 Echs1 通路的 AKT/PKB 抑制剂哌立福辛以往被用于乳腺肿瘤的治疗,但是 1 项前瞻性研究表明哌立福辛单独或联合使用索拉非尼,可明显抑制肝癌细胞生长,提高患者的生存率^[13]。它与索拉非尼的结合增强了对肝癌细胞增殖的抑制作用,诱导细胞凋亡,降低肿瘤血管生成。所以对于 Echs1 基因及其通路 AKT/PKB 抑制剂的研究有助于提高肝癌的临床治疗效果,也需要更多的前瞻性研究或其他重要证据支持。对于 AKT/PKB 通路是否是 Echs1 基因的唯一通路也需要进一步的基础研究证据支持。

2 功能性核酶

TOP2A 基因(表达二型拓扑异构酶)位于 17 号染色体(17q21-Q22)上,编码 170 kDA 核酶,控制 DNA 拓扑结构、染色体分离和细胞周期进程。TOP2A 表达增加已被证明能提高小细胞肺癌的耐药性^[14]。有研究通过微阵列数据集 gse 64041,在肝癌组与对照组之间鉴定出 DEGS,进行功能富集分析、PPI、整合转录因子(TF)-微 RNA(miRNA)靶网络等分析,发现 TOP2A 同样在肝癌组织中过表达,与肝

癌细胞耐药性相关。LIANG 等^[15]研究表明, TOP2A 的过表达并不是 TOP2A 基因扩增引起的,而是与血清中的 HBsAg 以及 Ki-67 的表达显著相关,并且其扩增或缺失与肿瘤对蒽环类药物的反应性具有显著的相关性,临床上常用的蒽环类药物包括阿霉素、表阿霉素、吡柔比星等。TOP2A 高表达的患者对依托泊苷和蒽环类药物较敏感,而低表达患者对上述两类药物表现出耐药性,这与 COX 等^[16]的前期研究结果相符。WANG 等^[17]的研究进一步证实在 TOP2A 高表达的肝癌细胞系中,低浓度酶结合剂依托泊苷可使阿霉素常规化疗剂量降低 3~5 倍,从而可大幅度减少化疗不良反应。目前尚无对 TOP2A 基因及其通路针对性的用药,临床使用蒽环类药物仅为经验性用药,疗效欠佳,推测可通过基因筛选 TOP2A,针对性联合蒽环类药物提高肝癌的治疗效果,但有待进一步研究及更多证据支持。

3 编码核因子 Nrf2

TIAN 等^[18]的研究显示, nme212 基因在肝癌组织内富集,核因子 Nrf2 的编码基因, nme212 突变激活 Nrf2/Re 通路,伴随着 Nrf2 的过表达和细胞保护蛋白的转录上调,有利于癌细胞的存活,增强癌细胞对化疗药物的抗药性。其机制包括抗凋亡作用、过表达 Nrf2 介导的外排转运体[如多药耐药相关蛋白(MRPs)等],增强化疗药物的外排,加强对活性氧(Ros)的防御系统,促进 II 期解毒酶的解毒作用,规避化疗药物的细胞毒性作用等。CHEN 等^[19]研究发现 PI3K/AKT 信号通路在索拉非尼耐药肝癌细胞中被激活,并介导 Nrf2 的过度表达以促进高增殖表型,而有针对性地对 Nrf2 进行药理抑制或基因敲除,肝癌组织对包括索拉非尼、阿霉素、5-氟尿嘧啶和多西紫杉醇等常用的化疗药物的敏感性增强。羟基喜树碱作为一种新型的 Nrf2 抑制剂,可与其他化疗药物联合应用,提高其治疗 Nrf2 高表达肝癌的疗效^[20]。因此, Nrf2 抑制剂可用来作为常规抗肝癌药物治疗的增敏剂。

4 细胞色素 P450 酶系

CYP2D6 * 10 基因是细胞色素 P450 酶系的一部分,细胞色素 P450 是 1 个定位于内质网或线粒体膜的酶家族,在内源性和外源性分子代谢过程中发挥着多种重要作用,尤其是某些药物。LI 等^[21]研究发现,在肝癌患者中,某些细胞色素 P450 的水平也随着肝癌的进展而变化。尤其是细胞色素 P450 家族成员 cyp2j2 可通过降低 bax/bcl622 比值,在肝癌细胞增殖和对抗癌药物(阿霉素)的耐药性中发挥关键作用。因此推测针对细胞色素代谢途径靶向抑制可成为新药物开发及提高现有药物作用的新靶点。

5 抑癌基因候选基因

肿瘤细胞 DNA 低甲基化可引起染色体不稳定和癌基因激活,被认为是肿瘤高度可靠的临床标志^[22]。更重要的是,许多研究表明肿瘤抑制基因(TSGs)的高度甲基化参与了肝癌的发病^[23]。GAO 等^[24]利用超高效液相色谱/串联质谱和单碱基高通量测序、羟甲基化和甲基化敏感标记测序(hmst-seq),以同步测定人肝癌标本中这两种修饰。鉴定了人肝细胞癌差异甲基化和羟甲基化基因后,筛选出 6 个抑癌候选基因,其中 *ecm1*、*atf5* 经 siRNA 基因沉默实验证实具有潜在的抗肿瘤作用。*ecm1* 通过高亲和力蛋白/蛋白质相互作用抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的活性^[25]。在肝癌组织中,*ecm1* 下调的同时,可以观察到 MMP-9 转录的显著上调。基质金属蛋白酶(MMPs)是肿瘤微环境的关键调节因子,已经证明 MMPs 不仅通过各种非催化结构域调控 ECM 的转换,而且还通过非蛋白水解的方式调控细胞生长、炎症和血管生成的信号通路^[26]。*atf5* 是一种高度丰富的富肝转录因子,属于 *atf/cAMP* 反应元件结合家族。UDOM-PONG 等^[27]及 DEY 等^[28]研究表明,CHOP 和 *atf4* 直接诱导 *atf5* 的转录表达,并与 *atf5* 共同构成整合应激反应(ISR)通路,对减轻急性应激所产生的损伤至关重要。因此,*atf5* 和 CHOP 的促凋亡功能已被揭示。在肝癌中,*atf5* 在其启动子中被过甲基化,并表现出下调的转录表达。因此,*atf5* 在肝癌中可能被阻断,失去对肝细胞的促凋亡作用。

6 结 语

近十年来,微阵列等用于分析肿瘤发生过程中基因改变的高通量平台在医学肿瘤学研究中越来越受到重视,广泛用于监测基因在癌症中的表达的全基因组微阵列技术^[29],已经确定了许多差异表达的基因,并使癌症研究获得一系列新进展。近几年,微阵列技术被用于研究肝癌发生过程中的基因表达谱^[8]。结合生物信息学分析的微阵列技术,由于具有快速处理大量数据集的能力,能够全面识别参与肝癌发生发展的数百个差异表达基因。研究表明,肝癌的发生及发展并非单一基因的作用,而是不同种类、不同信号传导途径基因的相互作用,在这其中,与肝癌发生关系密切的,称之为驱动基因,如 *Echsl*、*myc*、*TOP2A*、*PLK1*、*Cdk1*、*ccnb2* 基因等^[30],可能与肝癌的发生、发展、转移有关,占据 PPI 网络的重要节点,也被称为“枢纽基因”;不仅在肝癌细胞中高表达,在其他肿瘤细胞中也同样存在高表达现象,影响细胞生长发育的基因,称为伴随基因,它们更偏向于由于驱动基因的作用,被动表达于肿瘤细胞内,如 *aca1*、*CENPF*、*atf5* 基因等^[31],可促进肝癌细胞生长、转移、复发等;还有

一类特殊类型基因,存在于低分化、恶性程度高的肝癌细胞中,推测可能与肝癌耐药性有关,如 *nme212*、*CYP2D6 * 10* 系等^[32]。通过 OG 分析及 KEGG 分析表明 DEGS 在吸收、代谢和细胞周期途径上富集。PPI 同样显示,DEGS 主要参与细胞周期调控、氧化应激和肝脏解毒,但具体的通路、详细的生理生化途径尚待深入研究。

参考文献

- [1] JIANG X,HAO Y. Analysis of expression profile data identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*,2018,15(2):2625-2630.
- [2] JIN B,WANG W,DU G,et al. Identifying hub genes and dysregulated pathways in hepatocellular carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2015,19(4):592-601.
- [3] ZHANG C,PENG L,ZHANG Y,et al. The identification of key genes and pathways in hepatocellular carcinoma by bioinformatics analysis of high-throughput data[J]. *Med Oncol*,2017,34(6):101.
- [4] ZHU Q,SUN Y,ZHOU Q,et al. Identification of key genes and pathways by bioinformatics analysis with TCGA RNA sequencing data in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Clin Oncol*,2018,9(6):597-606.
- [5] 陈勇,陈祖舜,袁卫平. 两种方法治疗第一、二肝门旁小肝癌的疗效及影响因素分析[J]. *重庆医学*,2016,45(36):5157-5161.
- [6] SPOSITO C,MAZZAFERRO V. The SIRveNIB and SARAH trials, radio embolization vs. sorafenib in advanced HCC patients: reasons for a failure, and perspectives for the future[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*,2018,7(6):487-489.
- [7] KAIBORI M,ISHIZAKI M,MATSUI K. Experience and future prospect of hepatocellular carcinoma treatment by sorafenib[J]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*,2019,116(1):18-27.
- [8] LIU F,LI H,CHANG H,et al. Identification of hepatocellular carcinoma-associated hub genes and pathways by integrated microarray analysis[J]. *Tumori*,2015,101(2):206-214.
- [9] XIAO C X,YANG X N,HUANG Q W,et al. ECHS1 acts as a novel HBsAg-binding protein

- enhancing apoptosis through the mitochondrial pathway in HepG2 cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(1):67-73.
- [10] ZHU X S, DAI Y C, CHEN Z X, et al. Knock-down of ECHS1 protein expression inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation via suppression of Akt activity[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2013, 23(3):275-282.
- [11] 葛丽丽, 杨小昂, 朴军颜, 等. 基因芯片筛选稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 基因的肝癌细胞中肿瘤转移相关差异表达基因[J]. *重庆医学*, 2016, 45(12):1595-1597.
- [12] XU W J, CHEN L G, CHEN X, et al. Silencing ECHS1 attenuates the proliferation and induces the autophagy of hepatocellular carcinoma via impairing cell metabolism and activating AMPK[J]. *Neoplasma*, 2015, 62(6):872-880.
- [13] KIM M N, RO S W, KIM D Y, et al. Efficacy of perifosine alone and in combination with sorafenib in an HrasG12V plus shp53 transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76(2):257-267.
- [14] GRAY J E, HEIST R S, STARODUB A N, et al. Therapy of small cell lung cancer (sclc) with a topoisomerase- α -inhibiting antibody-drug conjugate (adc) targeting trop-2, sacituzumab govitecan[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(19):5711-5719.
- [15] LIANG Z, YI H, JUNJUN L, et al. Screening and function analysis of hub genes and pathways in hepatocellular carcinoma via bioinformatics approaches [J]. *Cancer Biomarkers*, 2018;1-11.
- [16] COX J, WEINMAN S. Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepat Oncol*, 2016, 3(1):57-59.
- [17] WANG N, ZHU M, TSAO S W, et al. MiR-23a-mediated inhibition of topoisomerase 1 expression potentiates cell response to etoposide in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1):119.
- [18] TIAN B, LU Z N, GUO X L. Regulation and role of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) in multidrug resistance of hepatocellular carcinoma [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 280:70-76.
- [19] CHEN K F, CHEN H L, TAI W T, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 337(1):155-161.
- [20] CHEN F, WANG H, ZHU J, et al. Camptothecin suppresses NRF2-ARE activity and sensitizes hepatocellular carcinoma cells to anticancer drugs[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(10):1495-1506.
- [21] LI N, LI L, CHEN Y. The identification of core gene expression signature in hepatocellular carcinoma[J]. *Oxid Med Cell Long*, 2018, 2018:3478305.
- [22] OLKHOV-MITSEL E, BAPAT B. Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers[J]. *Cancer Med*, 2012, 1(2):237-260.
- [23] JIA P, ZHAO Z. Characterization of tumor-suppressor gene inactivation events in 33 cancer types [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(2):496-506.
- [24] GAO F, XIA Y, WANG J, et al. Integrated analyses of DNA methylation and hydroxymethylation reveal tumor suppressive roles of ECM1, ATF5, and EOMES in human hepatocellular carcinoma[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12):533.
- [25] AL SHAREEF Z, KARDOONI H, MURILLO-GARZON V, et al. Protective effect of stromal Dickkopf-3 in prostate cancer: opposing roles for TGFBI and ECM-1[J]. *Oncogene*, 2018, 37(39):5305-5324.
- [26] SHIMODA M. Extracellular vesicle-associated MMPs: a modulator of the tissue microenvironment[J]. *Adv Clin Chem*, 2019(88):35-66.
- [27] UDOMPONG S, MANKHONG S, JARATJARO O NPHONG J, et al. Involvement of p38 MAPK and ATF-2 signaling pathway in anti-inflammatory effect of a novel compound bis[(5-methyl)2-furyl] (4-nitrophenyl) methane on lipopolysaccharide-stimulated macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50:6-13.
- [28] DEY S, BAIRD T D, ZHOU D, et al. Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(43):33165-33174.

- associated atherosclerosis? Focus on glucose and palmitate uncouple AMPK from autophagy in human aortic endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(3):246-248.
- [26] LIANG X, ZHANG T, SHI L, et al. Ampelopsin protects endothelial cells from hyperglycemia-induced oxidative damage by inducing autophagy via the AMPK signaling pathway[J]. *Biofactors*, 2016, 41(6):463-475.
- [27] ZHANG Q, LENARDO M J, BALTIMORE D. 30 years of NF- κ B; a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2):37-57.
- [28] LI H, JIAO Y, XIE M. Paeoniflorin ameliorates atherosclerosis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B activation [J]. *Inflammation*, 2017, 40(6):2042-2051.
- [29] DAN H C, BALDWIN A S. Differential involvement of IkappaB kinases alpha and beta in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt[J]. *J Immunol*, 2008, 180(11):7582-7589.
- [30] 钟国娥, 王炯亮, 孙小蝶, 等. NF- κ B 信号通路介导自噬对机体作用的研究进展[J]. *广东医学*, 2018, 39(9):1422-1425.
- [31] ZHOU Y D, CAO X Q, LIU Z H, et al. Rapamycin inhibits oxidized low density lipoprotein uptake in human umbilical vein endothelial cells via mTOR/NF-kappa B/LOX-1 pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0146777.
- [32] MATTHEW S, WILKINSON S. ER homeostasis and autophagy[J]. *Essa Biochem*, 2017, 61(6):625-635.
- [33] LI J M, ZHU H Q, SHEN E, et al. Deficiency of Rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2010, 59(8):2033-2042.
- [34] WANG S, XIE X, LEI T, et al. Statins attenuate activation of the NLRP3 inflammasome by oxidized LDL or TNF- α in vascular endothelial cells through a PXR-dependent mechanism[J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 92(3):256-264.
- [35] ONAL G, KUTLU O, DEVRIM G. Lipid droplets in health and disease [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1):128-142.
- [36] KOSACKA J, NOWICKI M, PAESCHKE S, et al. Up-regulated autophagy: as a protective factor in adipose tissue of wokr rats with metabolic syndrome [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2018, 10(1):13-27.
- [37] ELHASSAN S, CANDASAMY M, CHAN E, et al. Autophagy and GLUT4: the missing pieces[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(6):1109-1116.

(收稿日期:2019-05-18 修回日期:2019-11-19)

(上接第 1001 页)

- [29] JIA X, YU H, ZHANG H, et al. Integrated analysis of different microarray studies to identify candidate genes in type 1 diabetes[J]. *J Diabetes*, 2017, 9(2):149-157.
- [30] LIU R, LI Y, TIAN L, et al. Gankyrin drives metabolic reprogramming to promote tumorigenesis, metastasis and drug resistance through activating beta-catenin/c-Myc signaling in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2019, 443:34-46.
- [31] KATO R, MATSUI-YUASA I, AZUMA H, et al. The synergistic effect of 1'-acetoxychavicol acetate and sodium butyrate on the death of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 212:1-10.
- [32] NAULT J C, REBOUSSOU S, ZUCMAN R J. NRF2/KEAP1 and Wnt/beta-catenin in the multistep process of liver carcinogenesis in humans and rats [J]. *Hepatology*, 2015, 62(3):677-679.

(收稿日期:2019-05-18 修回日期:2019-11-21)