

基于肝细胞癌中 *INPP4B* 基因表达的 TCGA 数据库生物信息学 分析及其实验验证

文丽梅^{1,2}, 郭娅丽^{2,3}, 马文梅⁴, 薛涛涛^{2,3}, 耿若愚^{2,3}, 马冲^{2,3}, 张新红^{2,3}, 杨建华^{1,2}

(1. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学第一附属医院
新疆药物临床研究重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017;
4. 新疆医科大学第一附属医院病理科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:** 基于癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库和临床样本的实验验证探讨肝细胞癌 (HCC) 中肌醇多聚磷酸-4-磷酸酶 II 型 (*INPP4B*) 基因的表达及临床意义。**方法:** 基于 TCGA 数据库中的 424 例临床样本数据资料 (包括 HCC 组织 374 例, 癌旁组织 50 例), 采用 Kaplan-Meier 法和 Cox 回归分析, 评估 *INPP4B* 基因与 HCC 患者临床特征及生存预后的关系。分析 *INPP4B* 基因与 24 种免疫细胞数量, 肿瘤组织中的基质、肿瘤组织中的免疫细胞浸润和肿瘤纯度, HCC 高频突变基因肿瘤蛋白 53 (*TP53*) 基因表达水平的相关性。收集 2022 年 12 月—2023 年 12 月进行手术切除治疗的 60 例 HCC 患者临床病理资料及其组织石蜡切片, 根据临床诊断分为低分化组 (HCC-L 组)、中分化组 (HCC-M 组) 和高分化组 (HCC-H 组), 每组 20 例, 选取同时期 20 例取活检并病理诊断为非肿瘤患者的临床病理资料及其肝组织石蜡切片, 作为正常组。HE 染色观察各组研究对象 HCC 组织和正常肝组织病理形态表现, 免疫组织化学法检测各组研究对象 HCC 组织和正常肝组织中 Ki-67 和 *INPP4B* 蛋白表达情况。**结果:** 与正常组织比较, HCC 组织中 *INPP4B* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。与 *INPP4B* 低表达组比较, *INPP4B* 高表达组患者的总生存期 (OS) 均明显延长 ($P < 0.05$)。单因素 Cox 回归分析, 肿瘤分期、病理分期、肿瘤状况和残余肿瘤对 HCC 患者 OS 存在影响 ($P < 0.05$)。单因素回归分析, *INPP4B* 预后风险模型评分危险比 (HR) = 0.781, 95% 置信区间 (CI): 0.552~1.105, $P = 0.168$ 。*INPP4B* 对 HCC 患者 OS 影响的受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积 (AUC) 值为 0.558, 表明 *INPP4B* 基因预后风险模型在 HCC 患者生存预后方面具有一定的预测价值。*INPP4B* mRNA 表达水平与 TNM 分期、Stage 分期、患者性别、年龄、种族和体质量指数 (BMI) 值均无相关关系 ($P > 0.05$)。高表达和低表达 *INPP4B* 的肿瘤组织中, 22 种免疫细胞存在统计学差异 ($P < 0.05$); *INPP4B* mRNA 表达水平与除辅助性 T 细胞 (Th) 17 外的 23 种免疫细胞的数量均呈正相关关系 ($r > 0$), 其中除自然杀伤细胞 (NK) CD56⁺ 细胞外, 均具有统计学意义 ($P < 0.01$); *INPP4B* 与肿瘤组织中的基质 ($r = 0.475$)、肿瘤组织中的免疫细胞浸润 ($r = 0.641$) 和肿瘤纯度 ($r = 0.599$) 均具有显著的相关性 ($P < 0.01$)。*INPP4B* 与 *TP53* 存在相关性 ($r = 0.287$, $P < 0.01$)。HE 染色, 正常组研究对象肝组织中可见肝小叶结构清晰、完整, 细胞排列整齐, 轻微炎性细胞浸润; HCC-L 组、HCC-M 组和 HCC-H 组患者 HCC 组织中可见肝小叶被完全破坏, 肝细胞脂肪变性明显, 炎性细胞大量浸润, 部分

[收稿日期] 2024-12-26 [录用日期] 2025-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82360795); 中国健康促进基金会公立医院高质量发展科研公益项目基金 (GL-A005); 新疆维吾尔自治区人力资源和社会保障厅 2024 年度“天山英才”医药卫生高层次人才培养计划项目 (TSYC202401B014)

[作者简介] 文丽梅 (1989—), 女, 新疆维吾尔自治区昌吉市人, 副主任药师, 医学博士, 主要从事新疆特色药用资源的开发和利用方面的研究。

[通信作者] 杨建华, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: yjh-yfy@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

细胞出现气球样变、小细胞性增生的病变, 且 HCC 分化程度越低, 组织破坏程度越严重; 免疫组织化学法, 与正常组比较, HCC-L 组、HCC-M 组和 HCC-H 组患者 HCC 组织中 Ki-67 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$), 且 HCC 组患者的分化程度越低, Ki-67 阳性率越高。在正常组研究对象肝组织中可观察到细胞中棕褐色颗粒平均分布, *INPP4B* 蛋白呈高表达; 与正常组比较, HCC-L 组、HCC-M 组和 HCC-H 组患者 HCC 组织中 *INPP4B* 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$), 且 HCC 组织分化程度越低, *INPP4B* 阳性率越低。**结论:** *INPP4B* 是 HCC 患者预后的保护因素, *INPP4B* 作为一种新的抑癌基因, 可能成为治疗 HCC 新药筛选的潜在靶标。

[关键词] 肝细胞癌; 肌醇多聚磷酸-4-磷酸酶 II 型基因; 癌症基因组图谱数据库; 磷脂酰肌醇信号系统; 免疫细胞

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

Bioinformatic analysis of TCGA database based on *INPP4B* gene expression in hepatocellular carcinoma and its experimental validation

WEN Limei^{1,2}, GUO Yali^{2,3}, MA Wenmei⁴, XUE Taotao^{2,3}, GENG Ruoyu^{2,3}, MA Chong^{2,3}, ZHANG Xinhong^{2,3}, YANG Jianhua^{1,2}

(1. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Clinical Drug Research, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 3. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 4. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the expression and clinical significance of inositol polyphosphate-4-phosphatase type II (*INPP4B*) gene in hepatocellular carcinoma (HCC) based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) database and experimental verification with clinical samples. **Methods:** Based on data from 424 clinical samples in the TCGA database (including 374 HCC tissues and 50 paracarcinoma tissues), Kaplan-Meier method and Cox regression analysis were used to evaluate the relationship between *INPP4B* gene and the clinical characteristics and survival prognosis of the HCC patients. The correlations between *INPP4B* gene and the number of 24 types of immune cells, matrix, immune cell infiltration and tumor purity in tumor tissue, and the expression level of the high-frequency mutant gene tumor protein 53 (*TP53*) in HCC were analyzed. The clinicopathological data and paraffin-embedded tissue sections of 60 HCC patients treated with surgical resection from December 2022 to December 2023 were collected. According to clinical diagnosis, they were divided into poorly differentiated group (HCC-L group), moderately differentiated group (HCC-M group) and well-differentiated group (HCC-H group), with 20 cases in each group; 20 patients during the same period who underwent biopsy and were pathologically diagnosed as non-tumor were selected as normal group, and their clinicopathologic data and liver tissue paraffin sections were collected. HE staining was used to observe the pathomorphology of HCC tissue and normal liver tissue of the subjects in various groups; immunohistochemistry method was used to detect the expressions of Ki-67 and *INPP4B* proteins in the HCC tissue and normal liver tissue of the subjects in various groups. **Results:** The TCGA database analysis results showed that compared with normal tissue, the expression level of *INPP4B* mRNA in HCC tissue was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with *INPP4B* low expression group, the overall survival (OS) of the patients in *INPP4B* high expression group was significantly prolonged ($P < 0.05$). The univariate Cox regression analysis results showed that tumor

stage, pathological stage, tumor status and residual tumor had impacts on OS of the HCC patients ($P < 0.05$). The univariate regression analysis results showed that the *INPP4B* prognostic risk model score ratio was $HR=0.781$, 95% confidence interval (CI): $0.552-1.105$, $P=0.168$. The AUC value for the impact of *INPP4B* on OS of the HCC patients was 0.558 , indicating that the *INPP4B* gene prognostic risk model had certain predictive value in survival prognosis. The *INPP4B* mRNA expression level was not correlated with TNM stage, stage, patient gender, age, race or body mass index (BMI) ($P > 0.05$). In tumor tissue with high and low *INPP4B* expression, 22 types of immune cells showed statistically significant differences ($P < 0.05$); the *INPP4B* mRNA expression level was positively correlated with the number of 23 types of immune cells except T helper (Th) 17 cells ($r > 0$), among which all Th cells except natural killer (NK) $CD56^+$ cells were statistically significant ($P < 0.01$); *INPP4B* was significantly correlated with matrix ($r=0.475$), immune cell infiltration ($r=0.641$) and tumor purity ($r=0.599$) in tumor tissue ($P < 0.01$). *INPP4B* was correlated with *TP53* ($r=0.287$, $P < 0.01$). The HE staining results showed that clear and complete lobular structure, neatly arranged cells and slight inflammatory cell infiltration were observed in liver tissue of the subjects in normal group; completely destroyed lobular structure, significant hepatocellular steatosis, massive inflammatory cell infiltration, and lesions such as ballooning degeneration and small cell hyperplasia in some cells were observed in HCC tissue of the patients in HCC-L, HCC-M and HCC-H groups, and the lower the HCC differentiation degree, the more severe the tissue destruction; The immunohistochemistry results showed that compared with normal group, the expression levels of Ki-67 protein in HCC tissue of the patients in HCC-L, HCC-M and HCC-H groups were significantly increased ($P < 0.01$), and the lower the differentiation degree of the HCC patients, the higher the Ki-67 positive rate. Brownish-yellow granules evenly distributed in the cells and *INPP4B* protein was highly expressed in liver tissue of the subjects in normal group; compared with normal group, the expression levels of *INPP4B* protein in HCC tissue of the patients in HCC-L, HCC-M and HCC-H groups were significantly decreased ($P < 0.01$), and the lower the differentiation degree of the HCC tissue, the lower the *INPP4B* positive rate. **Conclusion:** *INPP4B* is a protective factor for the prognosis of HCC patients; as a new tumor suppressor gene, *INPP4B* may become a potential target for new drug screening in HCC treatment.

KEYWORDS Hepatocellular carcinoma; Inositol polyphosphate-4-phosphatase type II gene; The Cancer Genome Atlas database; Phosphatidylinositol signaling system; Immune cells

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 占肝癌病例的 90% 以上, 是全球癌症死亡的第三大原因^[1]。因其早期诊断率较低、恶性程度高和转移速度快, 大部分患者确诊时已为中晚期, 从而错失手术切除治疗的最佳机会^[2-3]。对于晚期 HCC 患者, 化疗未能显示出很好的生存优势^[4]。因此, 寻找新型有效的分子靶标, 对 HCC 早期诊断及改善预后具有重要意义。

肌醇多聚磷酸-4-磷酸酶 II 型 (inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, *INPP4B*) 作为一种新抑癌基因, 属于磷酸酶家族, 可阻滞磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路的激活, 诱导肿瘤细胞的凋亡, 从而抑制肿瘤细胞的浸润和转移^[5-6]。*INPP4B* 基因与急性髓系

白血病、黑色素瘤和结直肠癌等多种恶性肿瘤的发生发展有密切关联^[7]。研究^[8]显示: HCC 患者肿瘤组织中 *INPP4B* 基因的表达较癌旁组织明显下调, *INPP4B* 基因过表达可抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 并提高化疗敏感性。由此可见, *INPP4B* 作为一种新的广谱抑癌基因在多种恶性肿瘤中异常表达, 且在癌细胞迁移和侵袭的抑制方面表现出巨大潜力, 提示 *INPP4B* 作为 PI3K/AKT 信号通路的上游抑癌基因是 HCC 防治的潜在靶点。

本研究利用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中 HCC 患者的临床数据资料, 对 *INPP4B* 基因的差异表达水平和预后价值进行评价, 并对总生存期 (overall survival, OS) 的影响进行分析。此外, 对 *INPP4B* 基因与免疫浸润及肝癌高频突变基因肿瘤蛋白 53 (tumor protein 53,

TP53) 基因相关性进行评价和分析, 并利用临床样本对分析结果进行验证, 阐明 HCC 的发病机制, 为治疗 HCC 的新药靶点筛选提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 数据来源和预处理 自 TCGA 数据库 (网址: <https://portal.gdc.cancer.gov/>) 收集 HCC 项目中 level 3 HTSeq-FPKM 格式的 RNAseq 数据 424 例, 包含 374 例 HCC 组织样本和 50 例癌旁组织样本的 mRNA 表达谱及其临床数据。利用软件 Strawberry Perl 5.30.1 将基因表达数据整理成基因表达矩阵用于后续分析, 删除临床特征不明确和生存时间缺失的患者数据^[8-9]。

1.2 *INPP4B* 基因表达情况分析 使用 R 4.0.2 软件对 RNA Seq V2 数据进行分析, 对 HCC 组织样本和癌旁组织样本中的 *INPP4B* 基因 mRNA 表达量数据进行分析。

1.3 *INPP4B* 基因对 HCC 患者生存预后的影响

利用 R 4.0.2 软件的 survminer R 包对 mRNA 原始数据进行处理, 并经 \log_2 转换后用于后续分析。根据 X-tile 3.6.1 软件确立最佳分组截断值, 以靶标基因的中位表达水平为界限, 分为 *INPP4B* 低表达组和高表达组^[10]。通过 Kaplan-Meier 法分析 2 组患者间 OS 的差异。采用单因素和多因素 Cox 回归分析 HCC 预后风险模型与临床病理因素, 包括 T 分期、N 分期、M 分期、病理分期、肿瘤状况、性别、种族、年龄、体质量、身高和体质量指数 (body mass index, BMI) 值等及 *INPP4B* 基因表达的关系, 计算危险比 (hazard ratio, HR), 评价 *INPP4B* 基因对 HCC 患者生存预后的影响。

1.4 *INPP4B* 基因表达与患者临床病理特征的关系

分析 通过 Med Calc 19.4.0 软件制作患者分类特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC), 确定最佳临界点, 即最接近 ROC 曲线左上角一点, 使筛检试验的灵敏度和特异度相对最优。ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 值反映与诊断价值的关系, 面积越接近 1.0, 诊断真实度越高; 面积越接近 0.5, 真实度越低; 面积等于 0.5, 无诊断价值^[11], 基于此判断该基因是否具有诊断能力。

利用 Linkedomics 在线分析系统, 选取患者年龄、种族、瘤体大小、淋巴结转移、远处转移和肿瘤分级等作为 HCC 的临床病理特征指标, 根据中位值将 *INPP4B* 基因表达分为 *INPP4B* 低表达组和高表达组, 通过卡方检验, 比较 *INPP4B* 基因表达

水平与临床病理特征之间的关系。

1.5 *INPP4B* 基因与免疫细胞浸润的相关性分析

分析 *INPP4B* 基因与数据集中的所有种类免疫细胞 (共 24 种, 由 18 种 T 淋巴细胞亚型和 6 种其他免疫细胞组成) 的相关性^[12]。通过 HCC 基因表达谱定量免疫细胞, 过滤掉 $P < 0.05$ 的样本后, 对 HCC 组和正常组中 24 种免疫细胞进行差异分析。并对靶标基因与肿瘤组织中的基质、免疫细胞浸润和肿瘤纯度进行非参数检验相关性分析。

1.6 *INPP4B* 基因与 *TP53* 基因相关性分析

TP53 作为 HCC 常见的高频突变基因, 在肿瘤的发生发展中起重要作用^[13]。利用 Spearson 对 *INPP4B* 与 *TP53* 基因的相关性进行检验, 分析 *INPP4B* 可能的调控作用。

1.7 临床样本来源

收集 2022 年 12 月—2023 年 12 月于新疆医科大学第一附属医院进行手术切除治疗的 60 例 HCC 患者临床病理资料及其组织石蜡切片, 根据临床诊断分为低分化组 (HCC-L 组)、中分化组 (HCC-M 组) 和高分化组 (HCC-H 组), 每组 20 例, 选取同时期 20 例取活检并病理诊断为非肿瘤患者的临床药理资料及其肝组织石蜡切片, 作为正常组, 患者年龄 35~73 岁, 中位年龄 56 岁。

HCC 患者纳入标准: 将肿瘤切除部位为肝脏, 术后组织学标本病理科病理结果证实为 HCC 的患者; **排除标准:** ①其他肿瘤切除部位包括肝外胆管、胆囊等; ②并发晚期肝病 (肝功能衰竭、肝腹水等) 和并发其他重要脏器损伤; ③凝血功能障碍; ④弥散性肝癌。

1.8 主要试剂和仪器

INPP4B 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司), HRP-山羊抗兔 IgG 聚合物二抗和 DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 过氧化氢 (德州欣瑞达消毒制品有限公司), 中性树胶 (北京索莱宝科技有限公司)。JA5003 型电子天平 (上海良平仪器仪表有限公司), Sorvall ST16R 型通用台式离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), ELGA PURELAB® Chorus 1 型纯水仪 [威立雅水处理技术 (上海) 有限公司], GScan-40 全自动数字玻片扫描仪 (广州光影细胞科技有限公司)。

1.9 HE 染色观察各组研究对象 HCC 组织和正常

肝组织病理形态表现 随机选取各组研究对象 HCC 组织与正常肝组织, 固定于 4% 多聚甲醛中, 石蜡包埋, 切为厚度 5 μm 的薄片后, 采用 HE 染

色,于光学显微镜下观察各组研究对象HCC组织和正常肝组织病理形态表现。

1.10 免疫组织化学法染色检测各组研究对象HCC组织和正常肝组织中Ki-67和INPP4B蛋白表达情况 各样本按照文献[14]方法进行染色及评价。常规石蜡切片、热抗原修复、灭活内源酶活性、封闭,一抗(1:200)37℃孵育2h,二抗(1:100)37℃孵育1h,DAB显色、苏木素复染、盐酸乙醇分化、脱水、封片观察。染色结果判断:Ki-67蛋白表达于肿瘤细胞核,阳性细胞呈浅黄色至棕褐色颗粒,染色的切片由本院病理医师采用双盲法读片,选取10个视野,按照染色强度和阳性细胞所占比例作为综合判断标准。染色强度:无着色0分,浅黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分。阳性细胞百分率:阴性0分,阳性细胞百分率<25%计1分,25%≤阳性细胞百分率<50%计2分,50%≤阳性细胞百分率<70%计3分,阳性细胞百分率≥70%计4分;2项指标积分相乘,乘积>3分为阳性。INPP4B蛋白表达于细胞膜和细胞质,阳性细胞率计分方法与Ki-67相同。

1.11 统计学分析 采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验;计数资料以百分率表示,两组间样本均数比较采用 χ^2 检验和Wilcoxon秩和检验。采用Kaplan-Meier法比较INPP4B低表达组和高表达组患者的OS,并将HCC患者的年龄、性别和TNM分期等临床指标进行量化赋值,利用单因素和多因素Cox回归模型分析其对HCC预后的判定价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

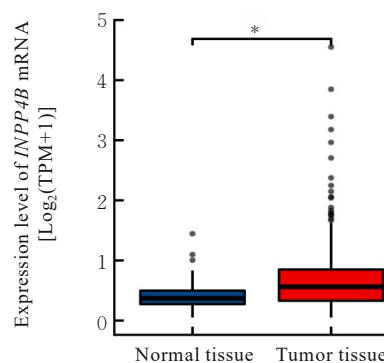
2 结果

2.1 HCC组织中INPP4B mRNA表达水平 与正常组织比较,HCC组织中INPP4B mRNA表达水平明显升高($P<0.01$)。见图1。

2.2 靶标基因对HCC患者生存预后的影响 与INPP4B低表达组比较,INPP4B高表达组患者的

OS均明显延长($P<0.05$),提示INPP4B mRNA表达水平可显著影响HCC患者的预后。见图2。

2.3 INPP4B与HCC患者预后的关系 采用单因素Cox回归分析入组HCC患者的临床病理特征,结果显示:肿瘤分期、病理分期、肿瘤状况和残余肿瘤对HCC患者OS存在影响($P<0.05$)。单因素回归分析结果显示:INPP4B预后风险模型评分比为[HR=0.781,95%置信区间(confidence interval,CI):0.552~1.105, $P=0.168$]。见表1。



* $P<0.01$ compared with normal tissue.

图1 HCC组织中INPP4B mRNA表达水平

Fig. 1 Expression level of INPP4B mRNA in HCC tissues

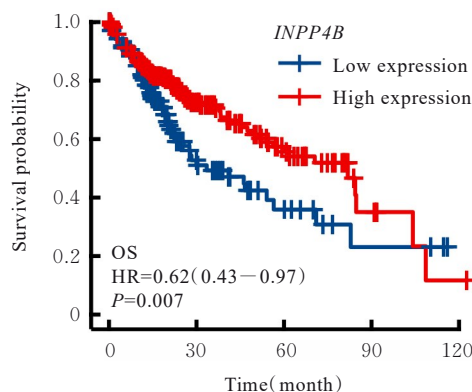


图2 INPP4B mRNA表达水平对HCC患者预后的影响
Fig. 2 Effect of expression level of INPP4B mRNA on prognosis of HCC patients

表1 单因素和多因素Cox回归分析

Tab. 1 Univariate and multivariate Cox regression analysis

Characteristics	Total case	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
T stage	370				
T1-T2	277	Reference			
T4-T3	93	2.598 (1.826-3.697)	<0.001	1.606 (0.212-12.182)	0.647

续表

Characteristics	Total case	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		HR (95%CI)	<i>P</i>	HR (95%CI)	<i>P</i>
N stage	258				
N0	254	Reference			
N1	4	2.029 (0.497–8.281)	0.324	—	—
M stage	272				
M0	268	Reference			
M1	4	4.077 (1.281–12.973)	0.017	1.447 (0.339–6.166)	0.618
Pathologic stage	349				
I - II	259	Reference			
III -IV	90	2.504 (1.727–3.631)	<0.001	1.291 (0.171–9.743)	0.804
Tumor status	354				
Tumor free	202	Reference			
With tumor	152	2.317 (1.590–3.376)	<0.001	2.706 (1.616–4.531)	<0.001
Gender	373				
Female	121	Reference			
Male	252	0.793 (0.557–1.130)	0.200	—	—
Race	361				
Asian	159	Reference			
Black or African American	17	1.585 (0.675–3.725)	0.290	—	—
White	185	1.323 (0.909–1.928)	0.144	—	—
Age (year)	373				
≤60	177	Reference			
>60	196	1.205 (0.850–1.708)	0.295	—	—
Weight (kg)	345				
≤70	184	Reference			
>70	161	0.941 (0.657–1.346)	0.738	—	—
Height (cm)	340				
<170	201	Reference			
≥170	139	1.232 (0.849–1.788)	0.272	—	—
BMI (kg·m ⁻²)	336				
≤25	177	Reference			
>25	159	0.798 (0.550–1.158)	0.235	—	—
Residual tumor	344				
R0	326	Reference			
R1	17	1.448 (0.705–2.972)	0.313	1.218 (0.439–3.378)	0.704
R2	1	11.749 (1.595–86.516)	0.016	—	—
Histologic grade	368				
G1-G2	233	Reference			
G3-G4	135	1.091 (0.761–1.564)	0.636	—	—
AFP(μg·L ⁻¹)	279				
≤400	215	Reference			
>400	64	1.075 (0.658–1.759)	0.772	—	—
Prothrombin time (s)	296				
≤4	207	Reference			
>4	89	1.335 (0.881–2.023)	0.174	—	—

续表

Characteristics	Total case	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
Adjacent hepatic tissue inflammation	236				
None	118	Reference			
Mild	101	1.204 (0.723—2.007)	0.476	—	—
Severe	17	1.144 (0.447—2.930)	0.779	—	—
Albumin ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$)	299				
<35	69	Reference			
≥ 35	230	0.897 (0.549—1.464)	0.662	—	—
Child-Pugh grade	240				
A	218	Reference			
B	21	1.595 (0.757—3.361)	0.219	—	—
C	1	2.138 (0.294—15.544)	0.453	—	—
Fibrosis ishak score	214				
0—1/2	106	Reference			
3/4—5/6	108	0.740 (0.445—1.232)	0.247	—	—
INPP4B	373				
Low expression	187	Reference			
High expression	186	0.781 (0.552—1.105)	0.163	—	—

“—”: No data.

2.4 INPP4B与HCC患者临床病理特征的关系

INPP4B对HCC患者OS影响的AUC值为0.558,表明INPP4B基因预后风险模型在生存预测方面具有一定的预测价值。见图3。INPP4B mRNA表达水平与TNM分期和Stage分期均无相关关系($P>0.05$)。INPP4B mRNA表达水平与患者性别、年龄、种族和BMI值均无相关关系($P>0.05$)。见图4。

2.5 INPP4B与免疫微环境的关系 高表达和低表达INPP4B的肿瘤组织中,22种免疫细胞数量比较差异存在统计学意义($P<0.05$),自然杀伤细

胞(natural killer cell, NK) $\text{CD}56^+$ 细胞和辅助性T细胞(T helper cell, Th17)细胞数量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。INPP4B mRNA表达水平与除Th17细胞外的23种免疫细胞数量均呈正相关关系($r>0$),其中除NK $\text{CD}56^+$ 细胞外,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。INPP4B mRNA表达与肿瘤组织中的基质($r=0.475$)、肿瘤组织中的免疫细胞浸润($r=0.641$)和肿瘤纯度($r=0.599$)均具有显著的相关性($P<0.01$)。见图5。

2.6 基因相关性分析 INPP4B与TP53的相关性分析结果显示:INPP4B与TP53存在相关性($r=0.287$),差异有统计学意义($P<0.01$)。见图6。

2.7 各组研究对象HCC组织和正常肝组织病理形态表现 正常组研究对象肝组织中可见肝小叶结构清晰、完整,细胞排列整齐,细胞核位于中央,轻微炎性细胞浸润。HCC-L组、HCC-M组和HCC-H组患者HCC组织中可见肝小叶被完全破坏,细胞体积增大,肝细胞脂肪变性明显,有大量的空泡状细胞,炎性细胞大量浸润,部分细胞出现气球样变、小细胞性增生的病变,且HCC分化程度越低,组织破坏程度越严重。见图7。

2.8 各组研究对象HCC组织和正常肝组织中Ki-67和INPP4B蛋白表达情况 与正常组比较,HCC-L组、HCC-M组和HCC-H组患者HCC组织

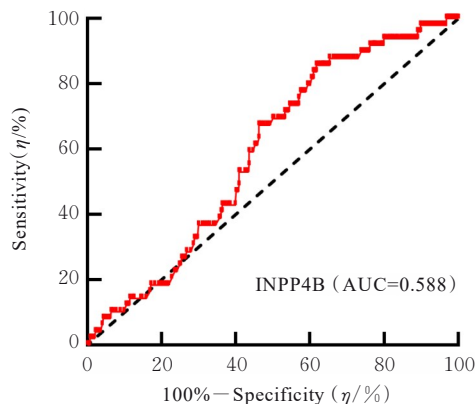
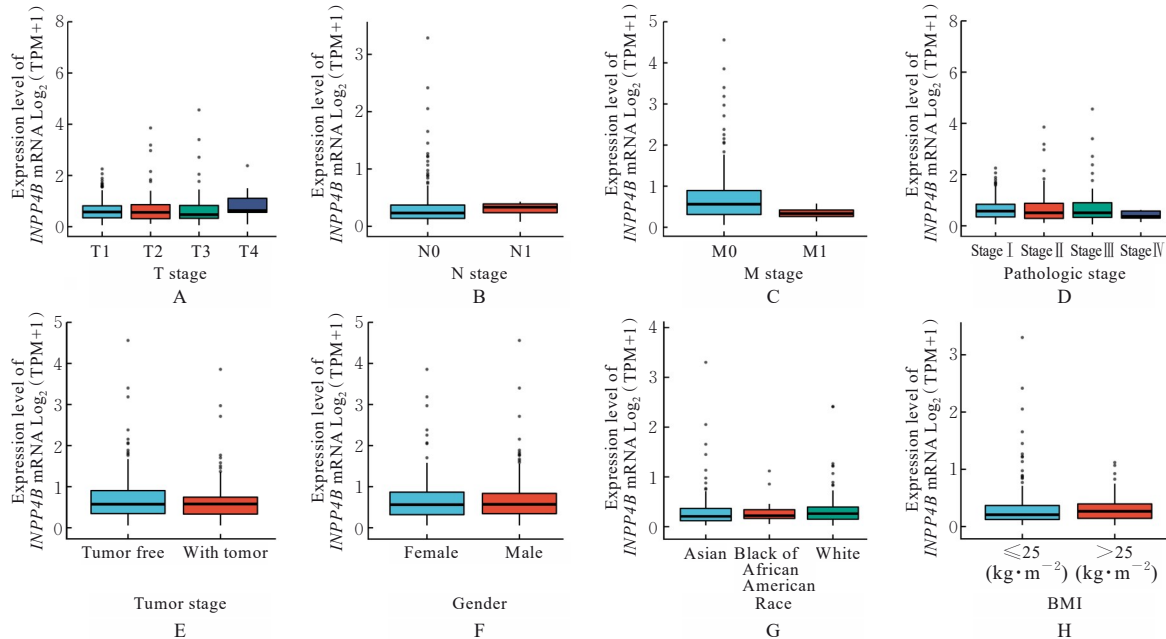


图3 INPP4B诊断HCC患者的ROC曲线

Fig. 3 ROC curve of HCC patients diagnosed by INPP4B



A: Relationship between *INPP4B* mRNA expression and T stage in HCC patients; B: Relationship between *INPP4B* mRNA expression and N stage in HCC patients; C: Relationship between *INPP4B* mRNA expression and M stage in HCC patients; D: Relationship between *INPP4B* mRNA expression and pathologic stage in HCC patients; E: Relationship between *INPP4B* mRNA expression and tumor status in HCC patients; F: Relationship between *INPP4B* mRNA expression and gender in HCC patients; G: Relationship between *INPP4B* mRNA expression and race in HCC patients; H: Relationship between *INPP4B* mRNA expression and BMI in HCC patients.

图4 *INPP4B* mRNA 表达与 HCC 患者临床病理参数分析

Fig. 4 Analysis on *INPP4B* mRNA expression and clinicopathologic parameters of HCC patients

中 Ki-67 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$), 且 HCC 组的分化程度越低, Ki-67 阳性率越高。

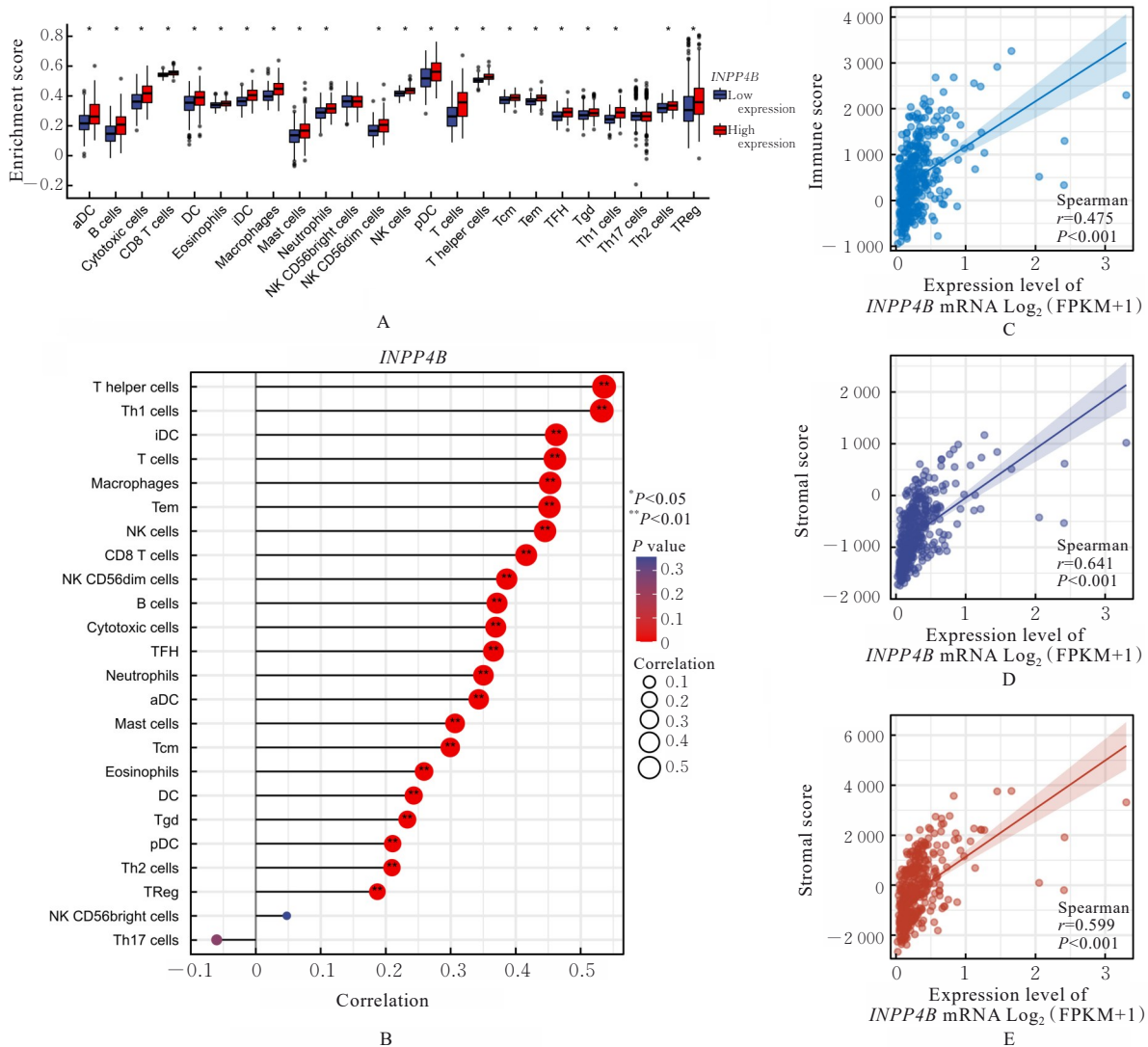
正常组、HCC-L 组、HCC-M 组和 HCC-H 组研究对象肝组织中均可见 *INPP4B* 蛋白不同程度的表达。正常组研究对象肝组织中可观察到细胞中棕褐色颗粒平均分布, *INPP4B* 蛋白呈高表达。与正常组比较, HCC-L 组、HCC-M 组和 HCC-H 组患者 HCC 组织中 *INPP4B* 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$), 且 HCC 组织分化程度越低, *INPP4B* 蛋白表达阳性率越低。见图 8 和 9。

3 讨论

目前, HCC 的发病机制尚未完全明确, 公认的发病机制主要有细胞信号传导通路的失调、原癌基因的激活和抑癌基因的失活、DNA 修复调节基因的缺失、DNA 甲基化、HCC 的微环境等^[15]。近年来, 众多研究者认为信号传导通路失调在 HCC 的发生发展中起着重要作用, 主要包括 PI3K/AKT 通路、Wnt/ β 连环蛋白 (β -catenin) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路、Janus 激酶/信号转导与转录激活因子 (Janus kinase/signal transducer

and activator of trans-ions, JAK/STAT) 通路和大鼠肉瘤 (rat sarcoma, RAS) 通路等。其中, PI3K 及其下游分子 AKT 所组成的 PI3K/AKT 信号通路因其与肿瘤发生发展密切相关, 近年来备受瞩目^[16-17]。在众多肿瘤抑癌基因中, 起到抑制 PI3K/AKT 信号通路的关键基因主要有 *INPP4B*、*p53*、第 10 号染色体上缺失的与张力蛋白同源的磷酸酯酶 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*) 等。其中, *INPP4B* 作为一种新出现的双重作用的癌症调控基因, 在 HCC 防治研究中报道较少。

INPP4B 基因低表达与前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌和卵巢癌等多种恶性肿瘤的发生发展有密切关联^[18]。研究者^[19]对检索文献时间为 2000 年 1 月—2023 年 8 月在 PubMed 数据库和中国国家知识基础设施 (China National Knowledge Infrastructure, CNKI) 全文数据库检索系统中以 “*INPP4B*” 和 “tumor” 作为关键词进行检索, 根据研究目的纳入 61 篇论文进行分析, 结果显示: *INPP4B* 在胃癌、结肠癌、胰腺癌和肝癌中的表达较低, 但在食管癌、结肠癌、胰腺癌和胆囊癌中表达较高。由此可



A: Relationship between expression of *INPP4B* mRNA and number of immune cells in tumor tissue; B: Relationship between the expression of *INPP4B* mRNA and the immune cells ($*P<0.05$); C: Relationship between expression of *INPP4B* mRNA and stroma in tumor tissue; D: Relationship between expression of *INPP4B* mRNA and immune cell infiltration in tumor tissue; E: Relationship between expression of *INPP4B* mRNA and tumor purity in tumor tissue. $*P<0.001$ compared with *INPP4B* low expression group.

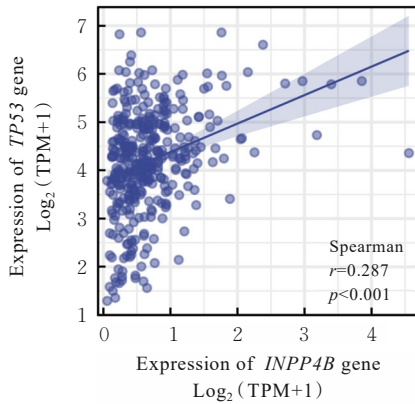
图5 *INPP4B* mRNA 表达与免疫微环境的关系

Fig. 5 Relationship between *INPP4B* mRNA expression and immune microenvironment

见, *INPP4B* 作为一个新型抑癌基因, 在各种肿瘤中的表达趋势不尽相同。本研究利用 TCGA 数据库分析 HCC 患者肿瘤组织中 *INPP4B* mRNA 表达水平及 *INPP4B* mRNA 表达水平对患者 OS 的影响, 结果显示: 与正常肝组织比较, HCC 组织中 *INPP4B* mRNA 表达水平明显升高, 但 *INPP4B* 高表达患者的生存时间却长于低表达的患者。TCGA 所提供的转录组测序数据被描述为一种批量的测序意味着其对整个组织或细胞群中的所有细胞进行分析, 而非单个细胞^[20]。因此, 当在肿瘤组织中通过转录组测序测得的高表达基因时, 这些基因可能是免疫

细胞内高表达的分子, 而不仅是肿瘤细胞内。这种情况下, 高表达的基因可能与肿瘤患者的预后无关, 甚至可能与免疫反应有关。因此, *INPP4B* 在 HCC 患者中的表达需进一步实验对其进行验证。

HCC 作为典型的炎症相关肿瘤, 免疫逃避是其发生和发展过程的重要特征, 因此肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中免疫抑制程度与 HCC 患者不良预后密切相关^[21]。TME 由癌细胞、复杂的细胞因子环境、细胞外基质、免疫细胞亚群等组成的动态系统, 涉及多个免疫细胞, 为肝癌的治疗带来挑战^[22]。研究^[23] 报道: $CD4^+$ T 细胞、

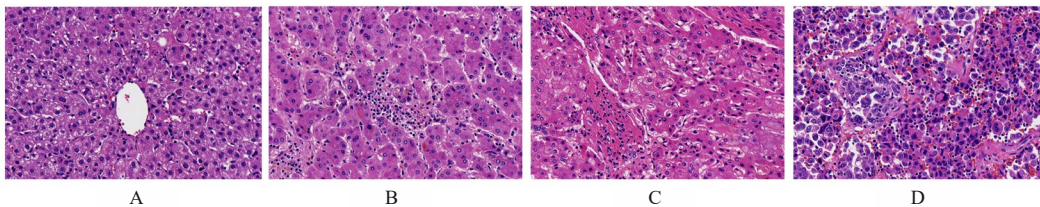
图6 *INPP4B*与 *TP53*基因的相关性分析Fig.6 Correlation analysis on *INPP4B* gene and *TP53* gene

CD8⁺T细胞、NK细胞、M1型巨噬细胞、树突状细胞具有杀伤肿瘤细胞作用，而Th2细胞、M2型巨噬细胞等可以协助肿瘤细胞免疫逃逸。且 *INPP4B* 已被证实在人HCC中，其可抑制细胞的增殖、侵袭和化疗耐药^[23]。本研究结果显示：HCC组织中 *INPP4B* 的表达与23个免疫细胞的数量均呈正相关关系，*INPP4B* 与肿瘤组织中的基质、肿瘤组织中的免疫细胞浸润和肿瘤纯度均具有相关性，

提示 *INPP4B* 高度参与HCC患者的TME。

肿瘤抑制基因 *TP53* 是人类所有癌症类型中最常见的突变基因之一，其编码的蛋白p53可抑制肿瘤的发展进程，该蛋白激活可调节细胞生长停滞、细胞凋亡和DNA修复等过程^[24]。*TP53* 基因及其相应的蛋白因突变而失活或部分失能，从而增加罹患癌症的风险，其在肝细胞癌中的突变频率较高。研究^[25]发现：HCC中高频突变基因 *TP53* 作为PI3K/AKT下游重要的转录因子之一，其失活是人类HCC的重要危险因素，在过表达 *INPP4B* 的HCC细胞系中，*TP53* 的表达增加。本研究通过对 *INPP4B* 基因与 *TP53* 相关性进行分析，结果显示二者之间具有相关性。

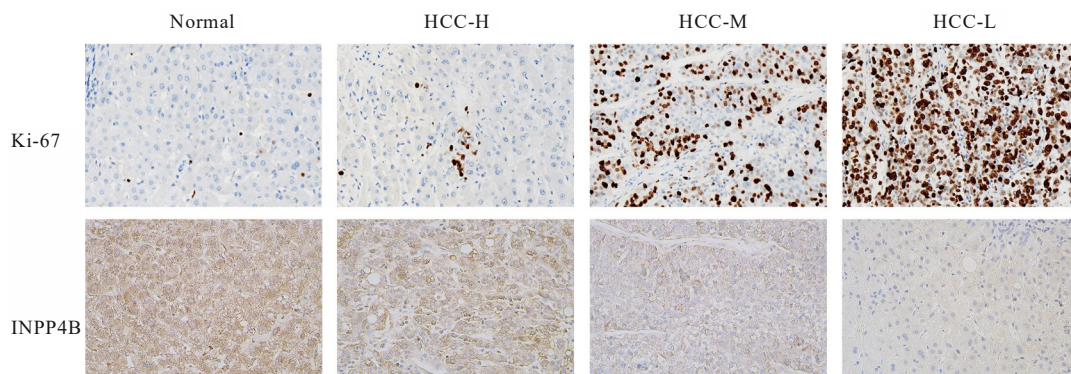
本研究结果显示：HCC患者肿瘤组织中Ki-67蛋白表达较正常肝组织明显升高。正常情况下，Ki-67蛋白表达阳性率越高，其肿瘤分期越晚，恶性程度越高，患者肿瘤组织分化、转移、被膜浸润等方面会往肿瘤恶性趋势发展^[26]。由此可见，本研究中纳入的HCC组织样本符合其分化程度诊断。本研究结果显示：HCC患者中 *INPP4B* 蛋白表达随着分化程度增加而明显升高，正常组的表达最高。



A: Normal group; B: HCC-H group; C: HCC-M group; D: HCC-L group.

图7 HE染色观察各组研究对象肝组织病理形态表现(×200)

Fig.7 Pathomorphology of liver tissue of subjects in various groups observed by HE staining (×200)

图8 免疫组织化学法检测各组研究对象肝组织中Ki-67和 *INPP4B* 蛋白表达情况(×200)Fig.8 Expressions of Ki-67 and *INPP4B* proteins in liver tissue of subjects in various groups detected by immunohistochemistry assay (×200)

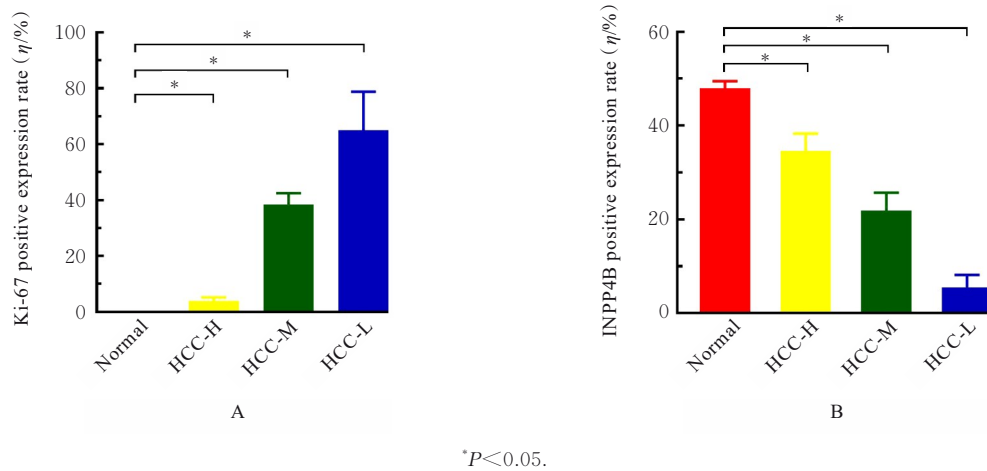


图9 各组研究对象HCC组织和正常肝组织中Ki-67和INPP4B蛋白表达情况

Fig. 9 Expressions of Ki-67 and INPP4B proteins in HCC tissue and normal liver tissue of subjects in various groups

HCC患者的肿瘤样本中INPP4B蛋白表达水平低于癌旁组织和正常肝组织,提示其异常表达在HCC的发生发展中起重要作用^[15, 27]。

综上所述, *INPP4B* 基因表达显著影响HCC患者预后,且其表达水平与免疫细胞浸润和 *TP53* 基因表达水平有关。*INPP4B* 作为一种新的抑癌基因,可能成为治疗HCC新药筛选的潜在靶标。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

文丽梅参与实验操作和文章撰写,郭娅丽参与实验操作,马文梅参与临床样本收集,薛涛涛参与数据统计学分析,耿若愚和马冲参与生物信息学分析,张新红参与病例查询,杨建华参与实验设计和论文审阅。

[参考文献]

- [1] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [2] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma. reply[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(1): e2.
- [3] MIDORIKAWA Y, TAKAYAMA T, HIGAKI T, et al. Early hepatocellular carcinoma as a signaling lesion for subsequent malignancy[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2016, 46(12): 1102-1107.
- [4] KHEMLINA G, IKEDA S, KURZROCK R. The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 149.
- [5] 孙颖, 丁焕, 黎晓晴, 等. 转染INPP4B基因对三阴

性乳腺癌细胞株MDA-MB-231增殖的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2013, 51(12): 41-45.

- [6] 岳杰, 于振涛. 转移性食管癌分子靶向治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2016, 43(4): 170-172.
- [7] Hamila S A, Ooms L M, Rodgers S J, et al. The INPP4B paradox: Like PTEN, but different[J]. *Adv Biol Regul*, 2021, 82: 100817.
- [8] TANG W D, YANG L W, YANG T Y, et al. INPP4B inhibits cell proliferation, invasion and chemoresistance in human hepatocellular carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 3491-3507.
- [9] 张冉, 逢瑗博, 靖或. 基于TCGA探讨急性髓系白血病患者miR-363表达与其临床特征及靶基因的关系[J]. *标记免疫分析与临床*, 2023, 30(8): 1402-1406.
- [10] 杨玺. 基于TCGA数据库构建恶性胸膜间皮瘤miRNA和基因预后模型及其生物信息学分析[D]. 大理: 大理大学, 2023.
- [11] 朱翠雯, 马甜甜, 段怡平, 等. 基于TCGA数据库分析DDX27在肝细胞癌中的预后价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2023, 15(4): 549-553.
- [12] MA J Y, HUANG L J, HU D, et al. The role of the tumor microbe microenvironment in the tumor immune microenvironment: bystander, activator, or inhibitor?[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 327.
- [13] ZHOU G, WANG J P, ZHAO M, et al. Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(6): 960-974.
- [14] YIN G Z, JIA S Y, ZHANG Y J, et al. YAP1-activated ZNF131 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through transcriptional regulation of PAIP1[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 754: 109921.

- [15] 张洋洋. *INPP4B*和*PTEN*蛋白在肝细胞癌中的表达及其意义[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [16] 王 湘, 张 森, 韩科研, 等. 苦参碱衍生物ZS10基于PI3K/AKT信号通路诱导人肝癌细胞BEL-7402凋亡[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(1): 116-124.
- [17] SUN Y, ZHANG H, MENG J P, et al. S-palmitoylation of PCSK9 induces sorafenib resistance in liver cancer by activating the PI3K/AKT pathway[J]. Cell Rep, 2022, 40(7): 111194.
- [18] 吴友亮. *INPP4B*在胃癌和胆囊癌中的临床意义及机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2022.
- [19] HAN L, CHEN S, DU S Y. Role of inositol polyphosphate-4-phosphatase type II in oncogenesis of digestive system tumors [J]. World J Gastrointest Oncol, 2023, 15(10): 1706-1716.
- [20] CAO Y Y, JIAO N L, SUN T T, et al. CXCL11 correlates with antitumor immunity and an improved prognosis in colon cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 646252.
- [21] FU Y J, LIU S S, ZENG S, et al. From bench to bed: the tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 396.
- [22] CHEW V, LAI L Y, PAN L, et al. Delineation of an immunosuppressive gradient in hepatocellular carcinoma using high-dimensional proteomic and transcriptomic analyses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(29): E5900-E5909. DOI:10.1073/pnas.1706559114
- [23] 李秀勤, 施章时, 伍 亮, 等. 胃癌外泌体lncRNA MM2P诱导STAT6磷酸化而促进M2型巨噬细胞极化[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2022, 31(3): 304-309.
- [24] XU J X, WU X Y, CHEN J L, et al. A *TP53*-associated metabolic gene signature for the prediction of overall survival and therapeutic responses in hepatocellular carcinoma [J]. J Radiat Res Appl Sci, 2023, 16(2): 100552.
- [25] GUO W, YAO X H, LAN S Y, et al. Metabolomics and integrated network pharmacology analysis reveal SNKAF decoction suppresses cell proliferation and induced cell apoptosis in hepatocellular carcinoma *via* PI3K/Akt/P53/FoxO signaling axis [J]. Chin Med, 2022, 17(1): 76.
- [26] ZHANG X, WU Z X, PENG Y H, et al. Correlation between Ki67, VEGF, and p53 and hepatocellular carcinoma recurrence in liver transplant patients[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6651397.
- [27] XIE B H, HE X, HUA R X, et al. miR-765 promotes cell proliferation by downregulating *INPP4B* expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2016, 16(3): 405-413.