

DOI:10.3969/j.issn.2096-8248.2024.01.007

肝细胞癌中 HIF-1 α 依赖性的 ATP2C1 过表达指示不良预后*

任德续^a, 马少杰^{a,b}, 丁圆圆^a, 王雅嵩^a, 钱其兰^a, 邱腾^a, 陈泽锋^a,
施雯^a, 王伟玲^{a,b}, 马金鸣^{a,b}, 王秀军^{a,b}, 吉敬^{a,b}

(江苏海洋大学 a. 药学院; b. 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要: 缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)与肝细胞癌的发生发展相关。HIF-1 α 在包括肝细胞癌在内的多种癌症类型的发生发展中发挥着重要作用,但其在肝细胞癌中的靶基因尚未完全确定。为找到 HIF-1 α 在肝癌中新的致癌靶点,通过整合 HIF-1 α 敲除的 RNA-seq 数据, HIF-1 α 的 ChIP-Seq 数据, HIF-1 α 在肝癌中的共表达基因,以及肝癌相关的 GEO(Gene Expression Omnibus)数据集,寻找 HIF-1 α 的潜在靶基因。通过分析 TCGA(The Cancer Genome Atlas)肝癌数据库、GEO 和 HPA(Human Protein Atlas)数据集,研究 HIF-1 α 与 ATP2C1 的相关性, ATP2C1 在肝癌中的表达及预后。通过建立物理和化学(氯化钴)缺氧模型验证 ATP2C1 与低氧及 HIF-1 α 的关系。通过 GO(Gene Ontology), KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)和 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)分析探索 ATP2C1 的生物学功能。通过设计体外实验证实 ATP2C1 对 HCC 的作用。利用 STRING 和 BioGRID 两个蛋白互作在线数据库获得 ATP2C1 的互作蛋白,并研究其在肝癌中的表达及相关性。通过整合及筛选数据,ATP2C1 被鉴定为一个 HIF-1 α 的潜在靶基因。ATP2C1 与 HIF-1 α 高度相关,在肝细胞癌中高表达,且伴随有不良预后。富集分析与体外实验的结果表明 ATP2C1 参与调控 HCC 细胞的增殖迁移。蛋白互作数据表明 ATP2C1 与 TMEM165 存在互作关系,生存分析表明 TMEM165 高表达的肝癌患者预后较差。相关性分析的结果显示 ATP2C1 与肝癌中 TMEM165 和 MMP2 的表达高度相关,表明 ATP2C1 可能与 TMEM165 和 MMP2 存在互作关系,并参与了肝癌的进展过程。结果表明, ATP2C1 是 HIF-1 α 的靶基因和肝细胞癌的生物标志物,其敲低抑制了 HCC 的增殖和迁移。

关键词: 缺氧; HIF-1 α ; ATP2C1; 肝细胞癌; 预后

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 2096-8248(2024)01-0044-14

引用格式: 任德续, 马少杰, 丁圆圆, 等. 肝细胞癌中 HIF-1 α 依赖性的 ATP2C1 过表达指示不良预后[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2024, 33(1): 44-57.

HIF-1 α -dependent ATP2C1 Overexpression in Hepatocellular Carcinoma Predicting a Poor Prognosis

REN Dexu^a, MA Shaojie^{a,b}, DING Yuanyuan^a, WANG Yasong^a, QIAN Qilan^a, QIU Teng^a,
CHEN Zefeng^a, SHI Wen^a, WANG Weiling^{a,b}, MA Jinming^{a,b}, WANG Xiujun^{a,b}, JI Jing^{a,b}

(a. School of Pharmacy; b. Jiangsu Key Laboratory of Marine Drug Active Molecular Screening,

Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Hypoxia-inducible factors (HIF) are associated with the onset and progression of hepa-

* 收稿日期: 2023-04-01; 修订日期: 2023-04-18

作者简介: 任德续(1997—), 男, 甘肃天水人, 硕士研究生, 研究方向为药理学, (E-mail) ren13151728968@163.com。

通信作者: 吉敬(1991—), 女, 江苏连云港人, 副教授, 博士, 研究方向为神经退行性疾病的发病机制、蛋白质的翻译后修饰及其在疾病中的作用, (E-mail) jijing@jou.edu.cn。

tocellular cancer. As an important member of the hypoxia-inducing factors, HIF-1 α plays an important role in the occurrence and development of various cancer types, especially hepatocellular carcinoma. However, its target genes in hepatocellular carcinoma have not been fully determined. Therefore, this study aims to identify a new oncogenic target of HIF-1 α in liver cancer. The publicly available RNA-Seq and ChIP-Seq data of HIF-1 α wild-type (WT) and Knockout (KO) cells, co-expression genes of HIF-1 α in HCC, and hepatocellular carcinoma-related Gene Expression Omnibus (GEO) data sets were integrated to search for potential target genes of HIF-1 α . The correlation between HIF-1 α and ATP2C1, and the expression and prognosis of ATP2C1 in liver cancer were investigated by analyzing The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, GEO, and HPA (Human Protein Atlas) dataset. Physical and chemical (CoCl₂) hypoxia models were established to verify the relationship between ATP2C1 and hypoxia and HIF-1 α . The biological function of ATP2C1 was explored with Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). In vitro experiments were designed to confirm the role of ATP2C1 in HCC. The interaction proteins of ATP2C1 were obtained by using two online protein interaction databases, STRING and BioGRID, and their expression and correlation in HCC were studied. By integrating and screening the public data, ATP2C1 was identified as a potential target gene for HIF-1 α , which was highly expressed in HCC and associated with poor prognosis. The results of enrichment analysis and in vitro experiments indicated that ATP2C1 was involved in the regulation of HCC cell proliferation and migration. Protein interaction data showed that ATP2C1 interacted with TMEM165. Survival analysis showed that HCC patients with high expression of TMEM165 had a poor prognosis. The results of correlation analysis showed that ATP2C1 was highly correlated with TMEM165 and MMP2 expression in HCC, indicating that ATP2C1 might interact with TMEM165 and MMP2 and participate in the progression of HCC. In summary, findings suggest that ATP2C1 is a target gene of HIF-1 α and a biomarker for HCC. Its knockdown inhibits HCC proliferation and migration.

Key words: hypoxia; HIF-1 α ; ATP2C1; liver hepatocellular carcinoma; prognosis

0 引言

具有高发病率和死亡率的肝脏恶性肿瘤一直以来受到广泛关注,该类疾病可分为原发性和继发性两大类^[1]。肝细胞癌(HCC)是最常见的威胁成人生命健康的原发性肝脏恶性肿瘤之一^[2],其发展受包括缺氧诱导因子(HIF)在内的多种信号通路和分子靶点的影响^[3]。缺氧是实体恶性肿瘤的一个重要特征,它通过多种分子途径稳定 HIF 的表达,从而在肿瘤生长中发挥作用^[4]。HIFs 是促进多种缺氧相关基因表达的转录因子,可以促进肿瘤发生、血管生成和无氧代谢^[5]。

HIF-1 α 是 HIF 家族中表达最广泛的一个成员^[6]。在常氧条件下,HIF-1 α 通过泛素-蛋白酶体途径降解^[7],而肿瘤快速生长造成的低氧环境导致

HIF-1 α 过度表达^[8]。HIF-1 α 可上调多个与肿瘤生长相关的下游靶点的表达,比如 VEGF 和 ANGPT1^[9],这些靶点在能量代谢、新生血管形成、肿瘤细胞的增殖和转移中发挥重要作用^[10]。同时 HIF-1 α 还可以促进细胞内活性氧的产生,以及激活糖酵解途径,从而促进肿瘤细胞的代谢^[11-12]。在 HCC 发生进程中,HIF-1 α 作为 HCC 侵袭转移的调控因子发挥着重要作用,其高表达增加了血管侵袭的可能^[13]。然而,HIF-1 α 调控 HCC 的确切机制及相关靶基因尚不完全明确。

为进一步揭示 HIF-1 α 调控 HCC 发生发展的分子机制,本研究系统性地挖掘了多个公共数据库,以确定 HIF-1 α 的下游靶基因,并通过构建缺氧模型加以验证。通过对两个肝细胞癌细胞系的实验分析该潜在靶点对 HCC 进程的影响,以评估其作为 HCC 潜在生物标志物的潜力。

1 材料与方法

1.1 数据集

从癌症基因组图谱(TCGA)数据库中获得肝细胞癌数据集(TCGA-LIHC),包括369例肿瘤样本和50例正常肝组织的mRNA表达数据,以及患者的临床信息。基因型组织表达(Genotype-Tissue Expression,GTEx)数据库提供了160例正常肝脏样本的mRNA表达数据。从基因表达综合(GEO)数据库中获得2个肝癌相关数据集GSE41804(包含20个肿瘤组织和20个正常组织)和GSE45267(包含48个肿瘤组织和39个正常组织)。从KnockTF数据库(<http://www.licpathway.net/KnockTF/>)检索获取HIF-1 α 敲低后的基因表达谱,从GTRD数据库(<http://gtrd.biouml.org/>)获得HIF-1 α 相关ChIP-Seq数据。cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)和Coxpresdb(<https://coxpresdb.jp/>)数据库提供了ATP2C1的共表达基因集。ATP2C1的启动子序列来自EPD在线工具(<https://epd.epfl.ch/index.php>),该工具是唯一经过实验验证的启动子数据库。JASPAR(<https://jaspar.genereg.net/>)是收集转录因子和DNA结合位点信息的最全面的公共数据库。利用JASPAR数据库结合EPD获得的启动子序列预测ATP2C1启动子区域的缺氧反应元件(HREs)。利用BioGRID(<https://thebiogrid.org>)和String(<https://cn.string-db.org/>)两个在线数据库获取ATP2C1的互作蛋白网络。

1.2 差异基因分析

在R-4.1.0中使用“limma”包来筛选差异表达基因(DEGs)。以 $P < 0.05$ 和 $\log_2 FC < -1.2$ 为条件检测HIF-1 α 敲低后基因表达谱中潜在的HIF-1 α 底物。使用 $P < 0.05$ 和倍数变化(FC) > 1.2 作为阈值分析了GSE41804和GSE45267数据集中上调的基因。利用GraphPad Prism 9软件绘制条形图和散点图,分析靶基因在肿瘤样本和正常样本中的差异表达。使用Sangerbox在线工具(<http://vip.sangerbox.com/login.html>)绘制靶基因在泛癌和肝细胞癌及邻近正常组织中的差异表达。

1.3 免疫组织化学分析

人类蛋白图谱数据库(HPA)(<https://www.proteinatlas.org/>)使用特殊配制的抗体和免疫组织化学技术检测每种蛋白在48个人类正常组织、20

个肿瘤组织、47个细胞系和12个血细胞中的分布和表达^[14]。从该数据库中获得了ATP2C1蛋白在正常肝脏和肝细胞癌组织中的差异表达数据。根据细胞染色强度分为4级:0级为无阳性染色(阴性),1级为淡黄色染色(弱阳性),2级为棕黄色染色(阳性),3级为棕色染色(强阳性)。根据阳性细胞数量比例分为4级:小于25%为1级,25%~50%为2级,50%(不含50%)~75%为3级,大于75%为4级。最后的分数通过两个评分相乘得到。

1.4 临床差异表达分析和生存分析

UALCAN网站(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)是一个分析和挖掘癌症数据的在线工具,数据主要源于TCGA数据库^[15]。从UALCAN数据库中检索ATP2C1在HCC不同分期、分级和组织学亚型中的表达数据。KM-plotter网站提供了一个在线进行生存分析的平台,目前涵盖了54675个基因和18674个癌症样本的研究,包括乳腺癌、肺癌、肝癌和其他癌症^[16]。从该平台获得了ATP2C1和TMEM165的总生存期(OS)、无复发生存期(RFS)和无进展生存期(PFS)的生存曲线。此外,使用R-4.1.0分析了TCGA-LIHC数据中ATP2C1的表达与HCC患者OS分期和无病间隔期(DFI)分期之间的关系。

1.5 Gene Ontology (GO)分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)分析

GO数据库将基因功能分为细胞组分(CC)、分子功能(MF)和生物过程(BP)3个组成部分,由此可以确定目标基因在每个组分中的参与情况^[17]。此外,通过KEGG数据库对基因参与的相关通路进行探究。为了研究ATP2C1的生物学功能,使用R包“clusterProfiler”对ATP2C1的共表达基因集进行了GO分析和KEGG分析。

1.6 基因集富集分析(GSEA)

根据ATP2C1的表达情况,将TCGA-LIHC样本分为ATP2C1高表达组和ATP2C1低表达组,然后使用Hallmark基因集(<http://www.gsea-msigdb.org/>)和“fgsea”“Enrichment plot”“gggsea”“clusterProfiler”等R包在R-4.1.0中进行基因集富集分析。

1.7 细胞培养

人肝癌细胞株HepG2和Huh7购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection),分别用DMEM高糖培养基和RPMI-1640培养基(均含10%体积分数的胎牛血清、青霉素-链霉

素 100 U/mL)在 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂ 的细胞培养箱中培养。物理低氧模型: HepG2 和 Huh7 细胞置于氧气体积分数 5% 的低氧培养箱中培养 24 h; 化学缺氧模型: 200 μ mol/L 氯化钴处理 HepG2 和 Huh7 细胞 24 h。

1.8 总 RNA 提取和实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

使用 TRIzol (Invitrogen, USA) 裂解人肝癌细胞, 并使用乙醇进行沉淀, DEPC 水溶解沉淀, 进而获取细胞总 RNA。使用逆转录试剂盒进行反转录合成 cDNA。采用 QLightCycler480 (罗氏) 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 扩增程序: 95 °C 反应 30 s (重复次数 1 次), 然后 95 °C 反应 10 s, 62 °C 反应 30 s, 95 °C 反应 15 s, 共计反应 40 个循环。以 GAPDH 为阴性对照, 分析各基因的扩增曲线, 拷贝出各组的 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算试验组与对照组目的基因的差异表达情况。ATP2C1 的正向引物序列为 5'-TGATGATGCCGTCAGTATCACT-3', 反向引物序列为 5'-CCTTCACGCACACAATGGC-3'。

1.9 蛋白质印迹分析

收集培养的细胞, 使用 PBS 清洗两次。根据细胞量加入蛋白酶抑制剂和 RIPA 裂解液, 充分混匀, 4 °C 裂解 30 min, 12 000 r/min 离心后取上清。对样本进行定量, 加入适量的蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min。使用体积分数为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 然后将电泳后的蛋白胶转印到 PVDF 膜上, 使用质量分数为 5% 的脱脂牛奶封闭 45 min。然后与 ATP2C1 抗体 (1:1 000 体积稀释度, Beyotime)、HIF-1 α 抗体 (1:1 000 体积稀释度, Beyotime) 和 β -actin 抗体 (1:1 000 体积稀释度, Beyotime) 在 4 °C 孵育 24 h。使用 TBST 清洗 PVDF 膜 5 min, 重复 4 次。选择带有 HRP 标记的抗体, 按体积比 1:10 000 使用质量分数为 5% 的脱脂牛奶对其进行稀释, 室温摇床孵育 45 min。再次使用 TBST 对膜进行清洗, 最后滴加 ECL 发光液进行显影。

1.10 细胞增殖测定

采用 CCK-8 法将待测细胞以每孔 10 000 个的密度均匀接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔。细胞贴壁后, 根据说明书使用 CCK8 试剂盒进行检测。每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 孵育 2 h。然后使用酶标记物在 450 nm 波长测量每个孔的吸光度值。

1.11 细胞侵袭实验

用 DMEM 不完全培养基将基质胶稀释至 200 μ g/mL, 取 100 μ L 混合液添加到上层的 Tran-

swell 小室中, 然后在 37 °C 孵育 4 h。接下来在下室中加入 650 μ L 的趋化液, 上室中加入 100 μ L 细胞悬液 (5×10^4 个细胞/孔), 将 Transwell 培养板置于 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h。用棉签去除上室内侧细胞后, 用质量分数为 4% 的多聚甲醛固定上室下侧细胞 20 min, 用结晶紫染色 30 min。用 PBS 冲洗晾干后, 在显微镜下计数染色细胞。

1.12 细胞划痕实验

对照组和敲除组的肝癌细胞以 1.5×10^5 个/孔的密度均匀接种在 12 孔板中常规孵育 24 h, 当细胞密度生长到孔面积的 80%~90% 时, 使用 10 μ L 的移液枪枪头在每孔中划痕, 分别于 0, 24, 48 h 拍照。

1.13 克隆形成实验

将生长良好的细胞以每孔 1 000 个细胞的密度均匀接种于 12 孔板中进行克隆形成实验。将细胞培养板在 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂ 的培养箱中孵育 10~14 d。待细胞形成明显克隆团后, 将其在质量分数为 4% 的多聚甲醛中固定 15 min, 用结晶紫染色 30 min, 拍照并计数。

1.14 数据统计学分析

数据以均数 \pm 标准差 (SD) 表示, 使用 R-4.1.0 和 GraphPad Prism 9.0 进行统计学分析。采用 *t* 检验 (两组间比较) 计算组间差异。使用 R 包 “survminer” 和 log-rank 检验进行 Kaplan-Meier 生存分析。P < 0.05 为有统计学意义的差异。* 表示 P < 0.05, ** 表示 P < 0.01, *** 表示 P < 0.001, **** 表示 P < 0.000 1。

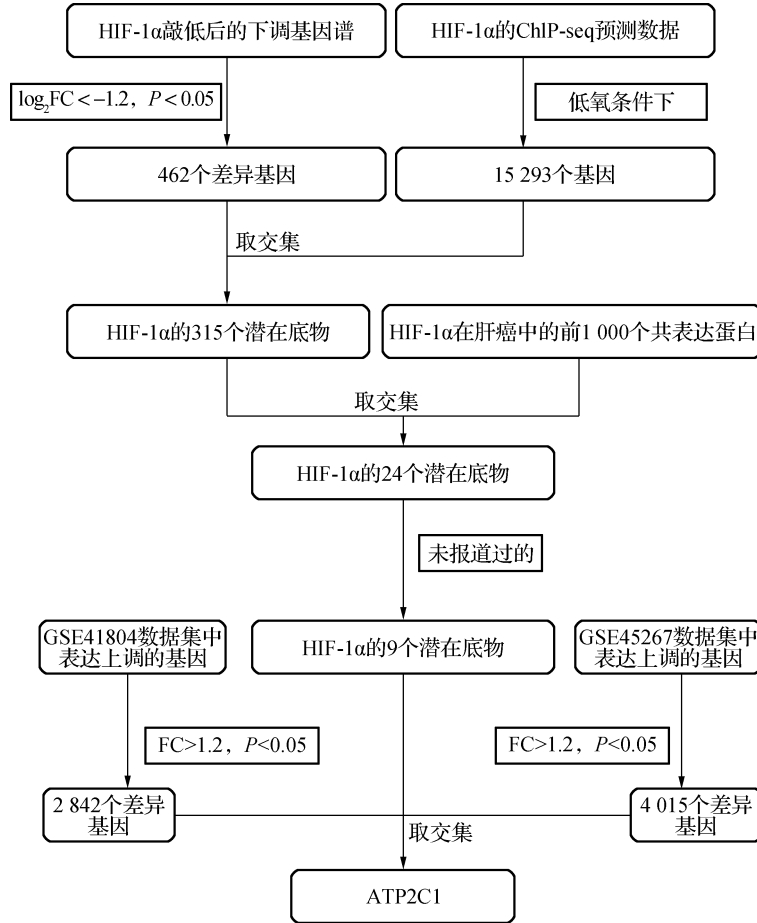
2 结果与分析

2.1 HCC 中潜在的 HIF-1 α 靶基因的筛选

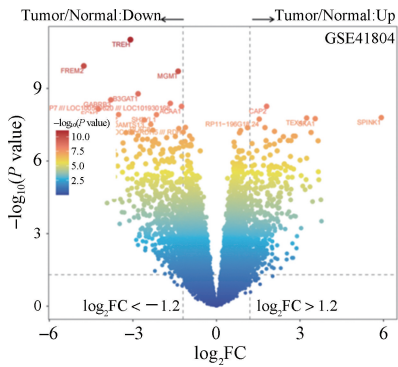
通过分析 HIF-1 α 敲低后的基因表达谱和 HIF-1 α 的 ChIP-Seq 数据初步确定了 HIF-1 α 潜在靶基因的范围 (图 1a)。以 Log₂FC < -1.2 和 P < 0.05 为阈值分析 HIF-1 α 敲低后的基因表达谱, 发现了 462 个下调基因。在 HIF-1 α 的 ChIP-Seq 数据中, 去除重复基因名后, 发现缺氧处理的样本中有 15 293 个基因。取两个基因数据集的交集, 得到了 315 个可能受 HIF-1 α 调控的下游基因。然后将这 315 个基因与 cBioPortal 数据库中 HIF-1 α 在肝细胞癌中的前 1 000 个共表达基因取交集, 发现了 24 个共同基因。剔除已有相关研究报道的基因后, 发现了 9 个潜在的 HIF-1 α 在肝细胞癌中的下游靶基

因。为了进一步筛选 HCC 中潜在的 HIF-1 α 致癌靶基因,从 GEO 数据库中选取了包含正常肝组织和肝癌样本的 GSE41804 和 GSE45267 数据集。以 $FC > 1.2$ 和 $P < 0.05$ 为阈值进行差异分析,发现在肿瘤样本中,GSE41804 和 GSE45267 分别有 2 842

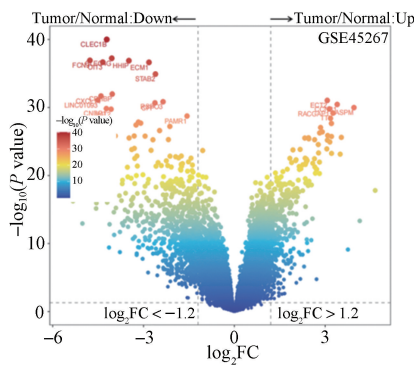
个和 4 015 个基因表达上调,两个数据集中的差异表达基因以火山图展示(图 1b,图 1c)。最后对 3 个基因集取交集发现 ATP2C1 是 9 个潜在靶基因中唯一一个在 HCC 中表达显著上调的基因(图 1d),表明 ATP2C1 可能参与 HCC 的进程。



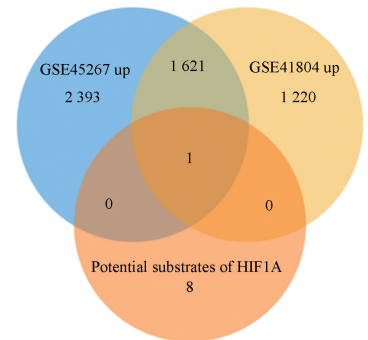
a ATP2C1 筛选流程



b GSE41804 火山图



c GSE45267 火山图



d 3 个基因集交集韦恩图

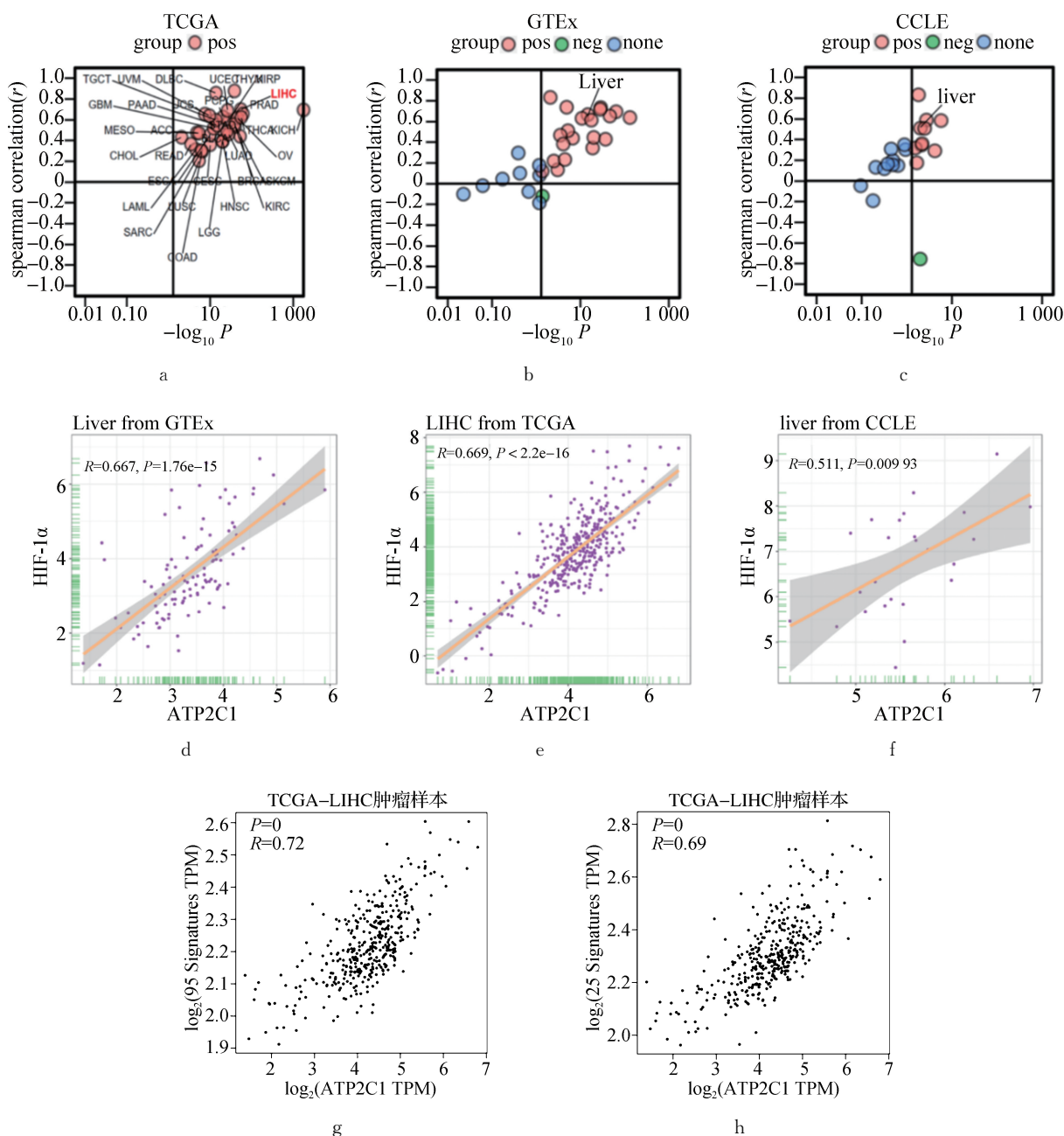
图 1 ATP2C1 筛选过程

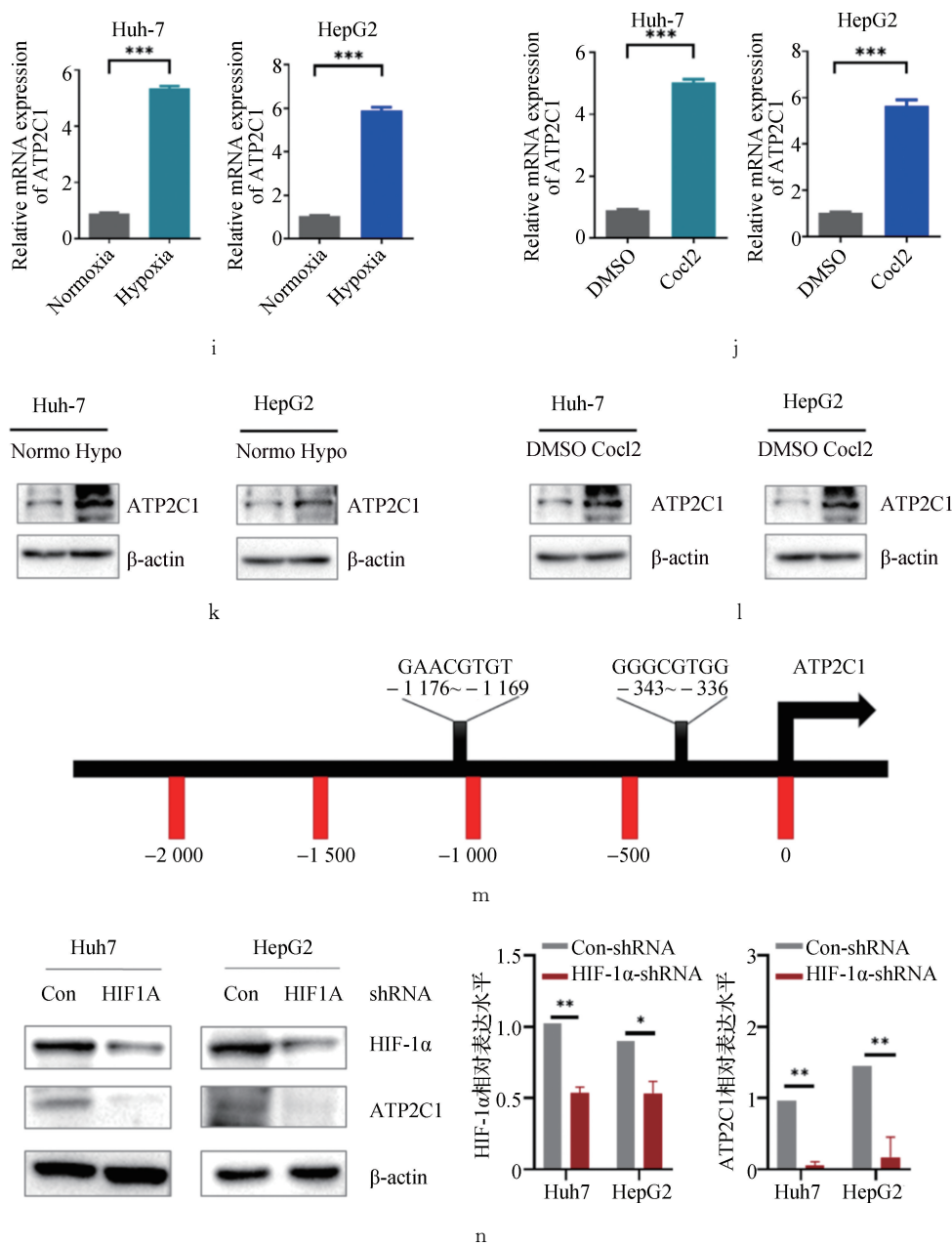
Fig. 1 Screening process of ATP2C1

2.2 肝癌中 ATP2C1 受 HIF-1 α 依赖性调控

通过对 TCGA, GTE_x 和 CCLE 数据库数据的整合分析,进一步揭示了 ATP2C1 和 HIF-1 α 之间的关系。HCC 中 ATP2C1 与 HIF-1 α 及低氧的关系分析如图 2 所示。结果显示 ATP2C1 和 HIF-1 α 的 mRNA 表达在 TCGA 所有肿瘤、GTE_x 大部分正常组织和 CCLE 部分癌细胞中都有很强的相关性(图 2a、图 2b 和图 2c)。ATP2C1 和 HIF-1 α 在正常肝组织、肝癌样本和肝癌细胞株中的相关性尤为显著(图 2d、图 2e 和图 2f)。另外还发现,ATP2C1 与最常见的缺氧特征基因集(相关表格略)在 HCC

中也显著相关(图 2g 和图 2h)。随后分别用物理和化学缺氧方法处理 Huh7 和 HepG2 细胞株,发现两种缺氧模型均显著诱导了 ATP2C1 的 mRNA 和蛋白水平的表达(图 2i、图 2j、图 2k 和图 2l)。HIF-1 α 调控下游靶基因的表达需要识别其启动子区中的低氧反应元件(HREs)^[18]。在 ATP2C1 的启动子区域发现了两个可能的 HREs,表明 HIF-1 α 可能通过识别这两个 HREs 来调节 ATP2C1 的表达(图 2m 和图 2n)。上述结果表明,在 HCC 中 ATP2C1 和 HIF-1 α 之间存在实质性的联系。





注:a~h为ATP2C1与HIF-1 α 及低氧特征基因的相关性,i~l为低氧下ATP2C1的表达,m~n为HIF-1 α 调控ATP2C1。

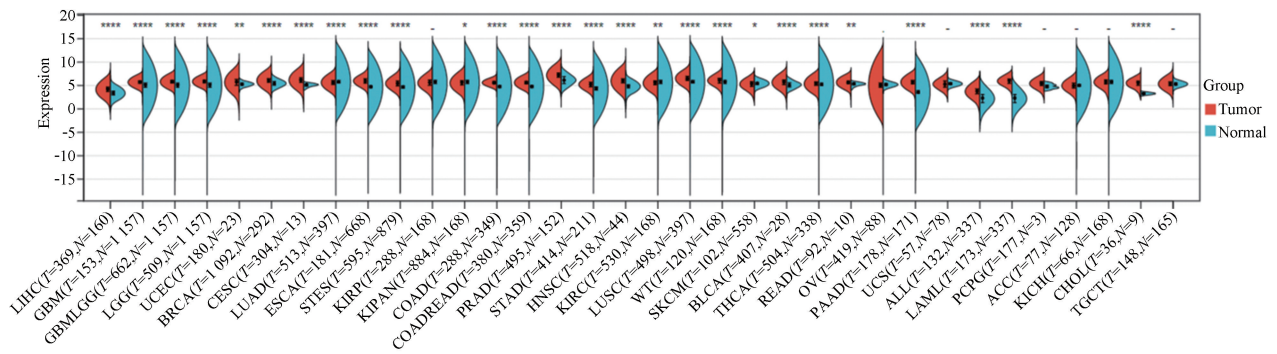
图2 HCC中ATP2C1与HIF-1 α 及低氧的关系分析

Fig. 2 Analysis of the relationship between ATP2C1, HIF-1 α and hypoxia in HCC

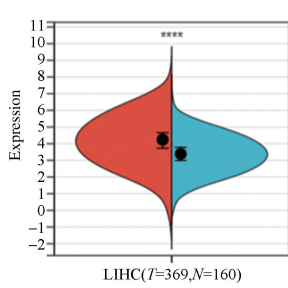
2.3 ATP2C1在肝细胞癌中过表达

通过Sanger box在线工具分析了TCGA数据库34种肿瘤类型中ATP2C1的表达,结果发现,在超过80%的肿瘤类型中(28/34),ATP2C1在肿瘤组织中的mRNA水平显著高于癌旁组织(图3a)。此外,无论是否整合GTEX的数据,ATP2C1在HCC组织中的表达均显著高于邻近正常组织(图3b和图3c)。与此一致的是,GSE41804和GSE45267数据集也显示在HCC中ATP2C1的mRNA水平高于

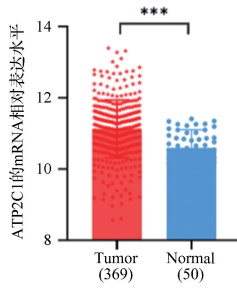
正常样本(图3d和图3e)。UALCAN数据平台的分析显示,ATP2C1在中晚期或高恶性HCC组织中的表达明显高于早期或低恶性HCC组织(图3f和图3g)。此外,ATP2C1在其他两种肝癌亚型中的表达也高于正常肝组织(图3h),说明ATP2C1可能参与了其他类型肝癌的进展。在人类蛋白质图谱数据库中,免疫组织化学染色也显示了与之相同的结果(图3i)。上述结果表明ATP2C1在HCC中过表达。



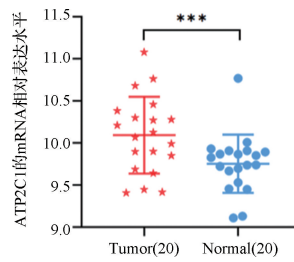
a ATP2C1 在泛癌中的 mRNA 表达



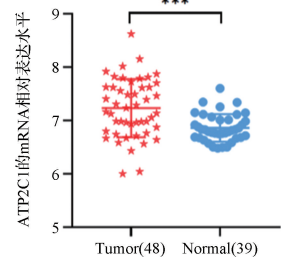
b ATP2C1 的 mRNA 表达 (TCGA>EX)



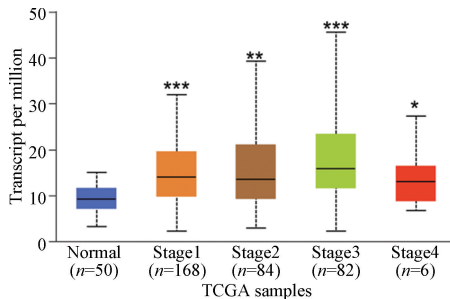
c ATP2C1 的 mRNA 表达 (TCGA)



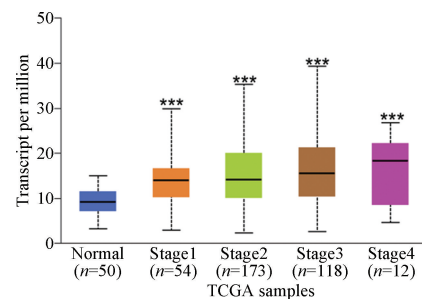
d ATP2C1 的 mRNA 表达 (GSE41804)



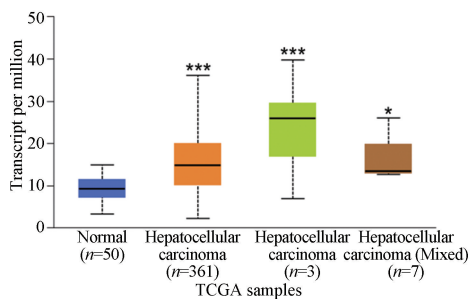
e ATP2C1 的 mRNA 表达 (GSE45267)



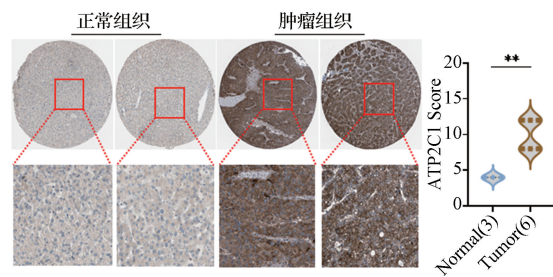
f LIHC 不同肿瘤分期中 ATP2C1 的表达



g LIHC 不同肿瘤分级中 ATP2C1 的表达



h LIHC 不同组织学亚型中 ATP2C1 的表达



i ATP2C1 在肝癌样本和正常肝脏样本中的蛋白表达

图 3 ATP2C1 在 HCC 及正常肝组织中的差异表达

Fig. 3 Differential expression of ATP2C1 in HCC and normal liver tissues

2.4 ATP2C1 在 HCC 中的过表达与不良预后相关

根据总生存期的最佳截断值,将 TCGA 中有完整生存数据的 HCC 样本分为 ATP2C1 低表达组(样

本量 $n=237$)和 ATP2C1 高表达组(样本量 $n=102$),探讨 ATP2C1 的表达在 HCC 中的预后价值。表 1 显示,两组患者在年龄、性别、家族癌症史、肿瘤组织学

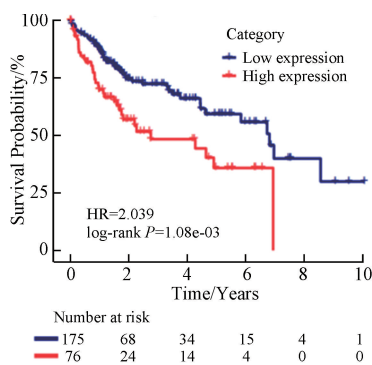
分级、Ishak 评分、血管浸润方面差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。ATP2C1 过表达与 Child-Pugh 分级、血清甲胎蛋白(AFP)阳性、肿瘤残留、TNM 分期和存活状态显著相关 ($P < 0.05$)。ATP2C1 在大多数 TNM 晚期患者中呈高表达,存活状态显示 ATP2C1 高表达组的生存率明显低于低表达组。根据 TNM 分期进

行亚组分析发现,无论 TNM 分期如何,ATP2C1 过表达均与较差的 OS(图 4a、图 4b 和图 4c)和 DFI(图 4d、图 4e 和图 4f)相关 ($P < 0.05$)。KM-plotter 在线数据库也显示,ATP2C1 过表达与 HCC 患者的 OS, RFS 和 PFS 的不良相关(图 4g、图 4h 和图 4i)。

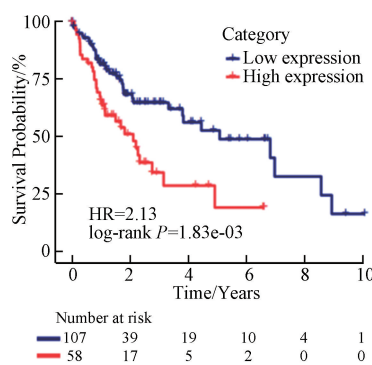
表 1 TCGA 数据库中 ATP2C1 表达与肝细胞癌患者临床参数的关系

Table 1 Association between ATP2C1 expression and clinical parameters of patients with hepatocellular carcinoma in TCGA database

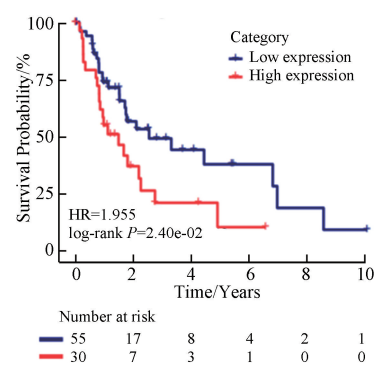
临床参数	指标	ATP2C1 表达水平			P 值
		总样本($n=339$) (比例)	高表达($n=102$) (比例)	低表达($n=237$) (比例)	
年龄	<65	208(61.4%)	61(59.8%)	147(62.0%)	0.792
	≥ 65	194(37.2%)	77(31.8%)	117(41.8%)	
性别	男	231(68.1%)	67(65.7%)	164(69.2%)	0.610
	女	108(31.9%)	35(34.3%)	73(30.8%)	
家族癌症史	无	196(57.8%)	53(52.0%)	143(60.3%)	0.307
	有	98(28.9%)	35(34.3%)	63(26.6%)	
	未知	45(13.3%)	14(13.7%)	31(13.1%)	
TNM 分期	I	170(50.1%)	39(38.2%)	131(55.3%)	0.007
	II	84(24.8%)	29(28.4%)	55(23.2%)	
	III	81(23.9%)	34(33.3%)	47(19.8%)	
	IV	4(1.2%)	0(0)	4(1.7%)	
肿瘤组织学分级	G1~G2	212(62.5%)	66(64.7%)	146(61.6%)	0.689
	G3~G4	125(36.9%)	35(34.3%)	90(38.0%)	
	未知	2(0.6%)	1(1.0%)	1(0.4%)	
Ishak 评分	0~4	124(36.6%)	31(30.4%)	93(39.2%)	0.297
	5~6	74(21.8%)	24(23.5%)	50(21.1%)	
	未知	141(41.6%)	47(46.1%)	94(39.7%)	
Child-Pugh 分级	A	207(61.1%)	47(46.1%)	160(67.5%)	<0.001
	B~C	21(6.2%)	11(10.8%)	10(4.2%)	
	未知	111(32.7%)	44(43.1%)	67(28.3%)	
血清甲胎蛋白	阴性	143(42.2%)	47(46.1%)	96(40.5%)	0.031
	阳性	120(35.4%)	26(25.5%)	94(39.7%)	
	未知	76(22.4%)	29(28.4%)	47(19.8%)	
肿瘤残余	R0	301(88.8%)	85(83.3%)	216(91.1%)	<0.001
	R1~R2	12(3.5%)	1(1.0%)	11(4.6%)	
	未知	26(7.7%)	16(15.7%)	10(4.2%)	
存活状态	存活	224(66.1%)	56(54.9%)	168(70.9%)	0.006
	死亡	115(33.9%)	46(45.1%)	69(29.1%)	



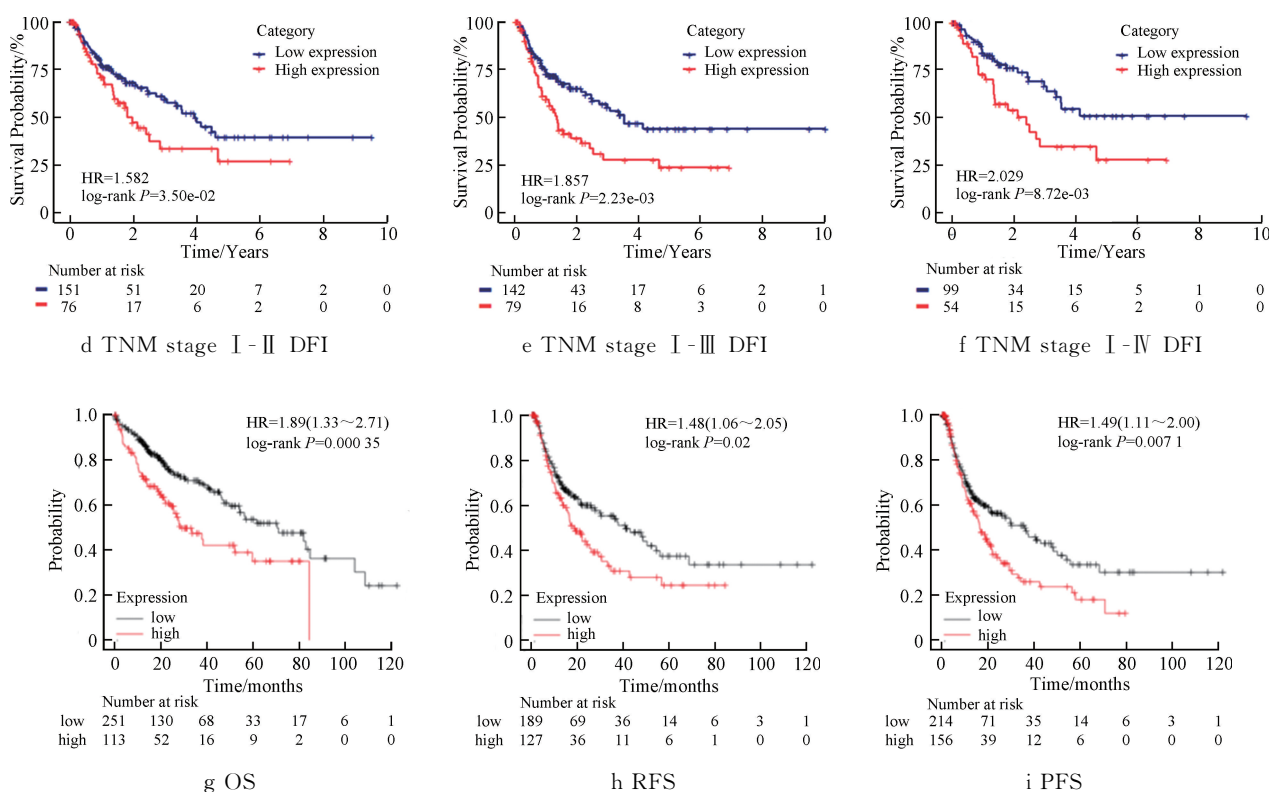
a TNM stage I-III OS



b TNM stage II-III OS



c TNM stage III-IV OS



注:a~f为 ATP2C1 的表达与不同 TNM 分期的 HCC 患者生存期的关系;g~i 为 KM-plotters 数据库中 ATP2C1 表达与 HCC 患者三种生存期的关系。

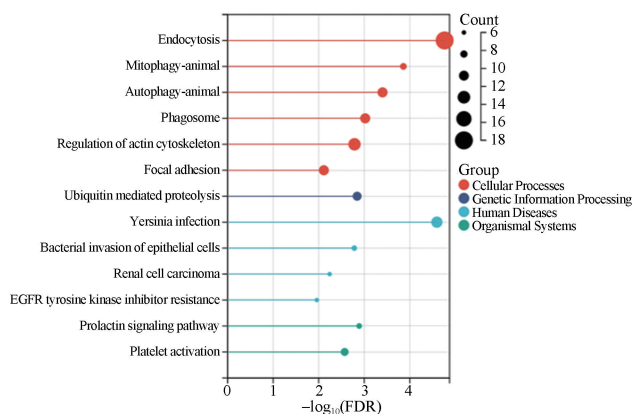
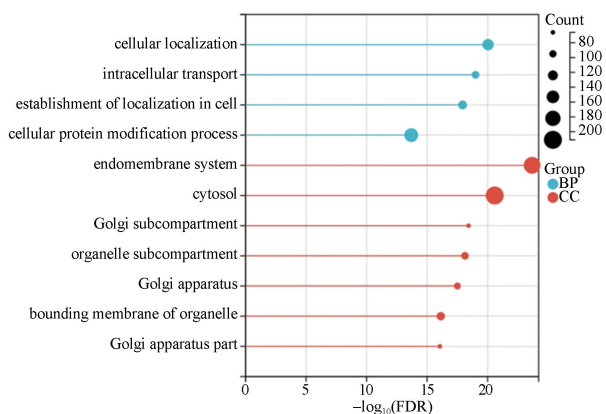
图 4 ATP2C1 表达在 HCC 中的预后分析

Fig. 4 Prognostic analysis of ATP2C1 expression in HCC

2.5 ATP2C1 参与肝癌细胞增殖调控

在 cBioPortal 和 Cxpresdb 两个在线数据库中分别获取了与 ATP2C1 相关性最强的前 2 000 个共表达基因并取交集,检索到 476 个共同基因。对共同基因集的 GO 分析表明,ATP2C1 主要与内分泌系统相关(图 5a),KEGG 分析显示 ATP2C1 主要参与胞吞作用(图 5b),这些结果与 ATP2C1 作为 Ca²⁺

转运 ATP 酶的特征一致。然后根据 TCGA-LIHC 样本中 ATP2C1 的表达情况,将 TCGA-LIHC 样本分为 ATP2C1 高表达组和 ATP2C1 低表达组,进行 GSEA 分析。结果显示,ATP2C1 高表达组显著富集于上皮-间充质转化、有丝分裂纺锤体、PI3K-AKT、蛋白分泌等与细胞增殖相关的通路(图 5c),表明 ATP2C1 可能参与调控这些信号通路。



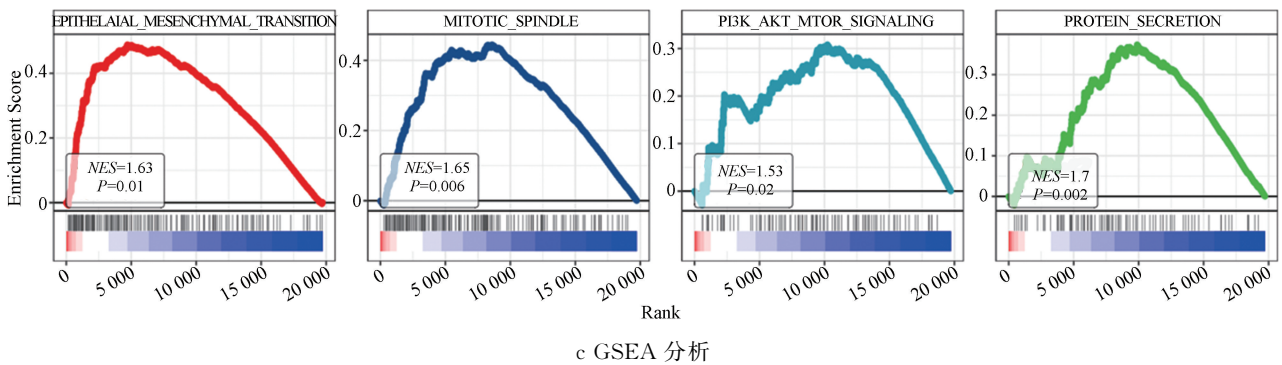


图5 ATP2C1在HCC中功能富集分析

Fig. 5 Functional enrichment analysis of ATP2C1 in HCC

2.6 敲低ATP2C1抑制肝癌细胞的增殖和迁移

在两种肝癌细胞株(Huh7和HepG2)中转染了Con-shRNA和ATP2C1-shRNA慢病毒质粒,构建了ATP2C1敲低的稳定细胞株(图6a),以探究ATP2C1的表达对HCC进程的影响。CCK8检测显示,ATP2C1敲低后,Huh7和HepG2细胞的生

长明显受到抑制(图6b)。细胞侵袭和划痕实验表明,ATP2C1的敲低减弱了两种肝癌细胞的迁移能力(图6c和图6d),并影响了肝癌细胞的克隆形成能力(图6e)。这些结果表明ATP2C1的表达可以调控肝癌细胞增殖。

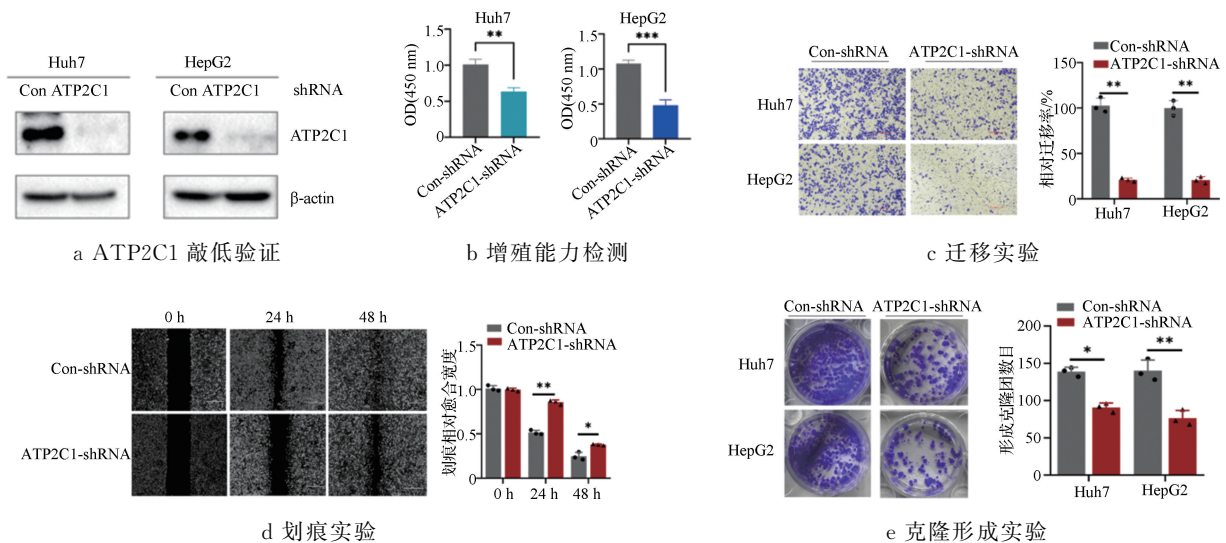


图6 ATP2C1敲低对HCC细胞的影响

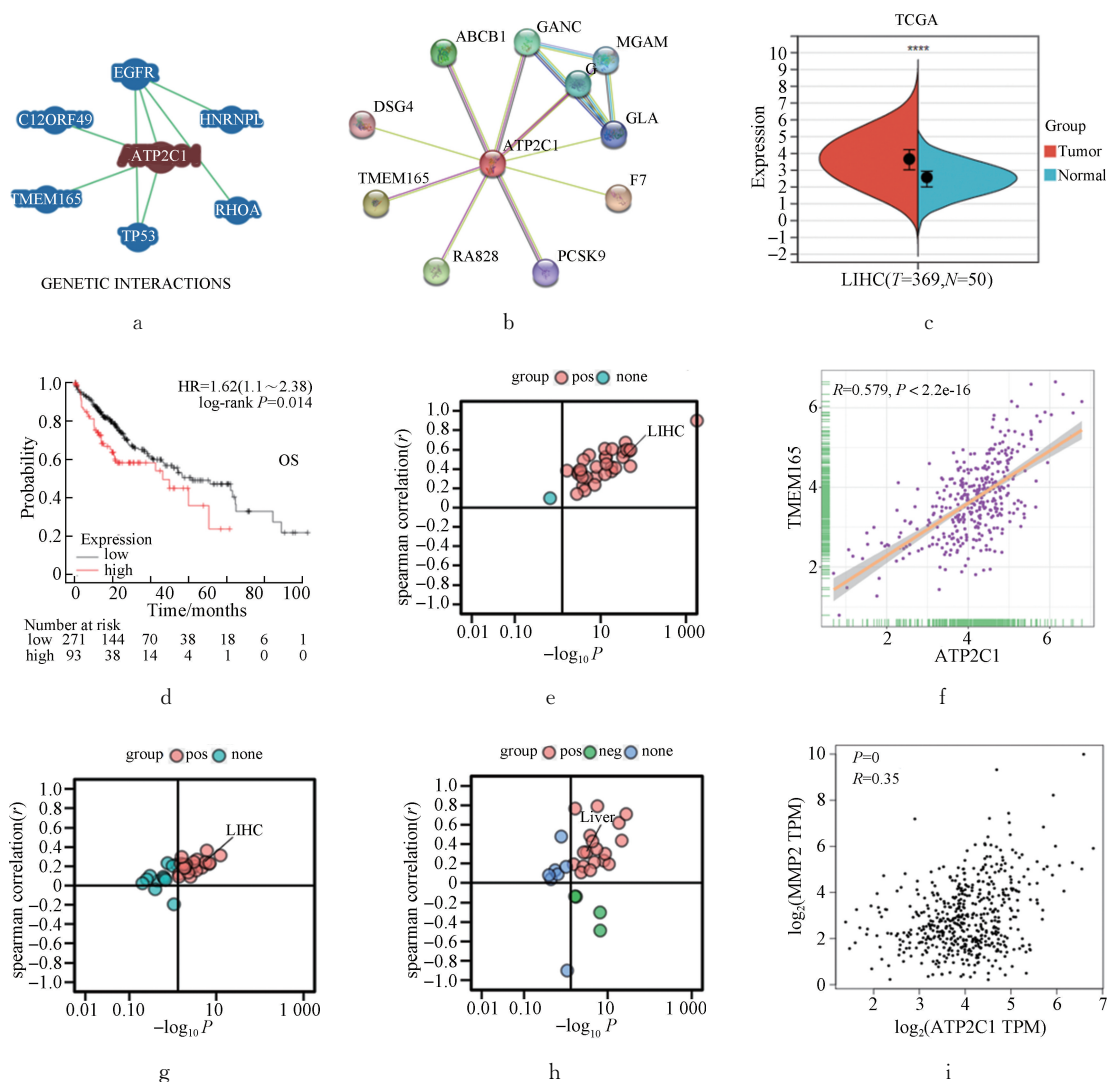
Fig. 6 Effects of ATP2C1 knockdown on HCC cells

2.7 ATP2C1与TMEM165和MMP2的相关性

根据BioGRID和STRING两个数据库提供的数据,对ATP2C1的相互作用蛋白进行了分析,结果发现跨膜蛋白165(TMEMP165)在两个数据库中均为ATP2C1的互作蛋白(图7a和图7b)。另外还观察到TMEMP165在HCC中高表达(图7c),且与不良预后相关(图7d)。对ATP2C1和TMEMP165的相关性分析表明,在TCGA数据库的大多数癌症

类型中它们两者是显著正相关的(图7e),这其中便包括肝细胞癌(图7f)。已有研究表明TMEMP165可上调基质金属蛋白酶2(MMP2),从而促进HCC的进程^[19],因而这里进一步分析了ATP2C1与MMP2之间的相关性。通过整合GTEX-Liver数据和TCGA-LIHC数据,发现ATP2C1和MMP2在包括HCC在内的多种肿瘤中都显著相关(图7g),而在肝脏等正常组织中也有很强的相关性(图7h和

图 7i)。这些结果表明 ATP2C1 与 TMEM165 和 MMP2 两个肝癌促癌因子的表达高度相关,可能协



注:a和b为ATP2C1互作蛋白网络;c和d分别为TMEM165在HCC中的表达和预后;e和f为ATP2C1与TMEM165的相关性分析;g,h和i为ATP2C1与MMP2的相关性分析。

图 7 ATP2C1 与 TMEM165 和 MMP2 的相关性分析

Fig. 7 Correlation analysis of ATP2C1 with TMEM165 and MMP2

3 讨论

肝细胞癌是一种高度流行的恶性肿瘤,除索拉非尼外,晚期 HCC 的治疗策略选择非常有限^[20]。而 HIF-1 α 是参与癌细胞缺氧反应的关键转录因子,可激活肝细胞癌中负责血管生成、糖代谢、癌细胞增殖、侵袭和转移相关的基因转录^[21],鉴定 HIF-1 α 的下游靶基因并研究其作用机制将有助于提供更多的 HCC 治疗策略。在本研究中,通过对多个

公共数据库的数据分析,发现 ATP2C1 是 HIF-1 α 在 HCC 中高表达的靶基因。

ATP2C1 作为一种 Ca²⁺ 转运 ATP 酶,其编码 SPCA1 蛋白在皮肤和肝脏中广泛表达^[22],现有研究表明,Ca²⁺ 转运 ATP 酶的异常表达与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关^[23]。因此,进一步探究其在肿瘤中的作用对肿瘤治疗至关重要。经分析发现,ATP2C1 与 HIF-1 α 有着高度的相关性,并且它在 HCC 中的异常高表达与患者不良预后相关。虽然在表 1 中可以明确地观察到 ATP2C1 高表达组

的样本生存率显著低于 ATP2C1 低表达组。但因为不确定这两组样本间是否具有重要因素上的差异,即样本间的异质性,于是本文针对所有样本不同的 TNM 分期进一步分析了 ATP2C1 的表达与总生存率和无病间隔期的关系。结果发现不管在哪个分期区间里,ATP2C1 的高表达都与 HCC 患者 OS 和 DFI 预后差显著相关。

基因集富集分析的结果表明 ATP2C1 可能参与调控肝细胞癌的增殖。其中 PI3K-AKT 通路的出现为研究提供了新的视角。ATP2C1 高表达组显著富集于这一与肿瘤增殖密切相关的信号通路,ATP2C1 或可能参与这一信号通路从而影响肿瘤的发生和发展。体外实验验证了 ATP2C1 的表达与缺氧和 HIF-1 α 之间的关系,并进一步揭示了 ATP2C1 的敲低可抑制 HCC 的增殖和迁移,为 HCC 的治疗提供了新的思路。此外,互作蛋白网络分析揭示了 ATP2C1 可能是通过与 TMEM165 和 MMP2 的相互作用影响了 HCC 的进展。TMEM165 是一种高尔基跨膜蛋白,在肝癌中高表达,可以通过诱导 MMP2 过表达促进肝癌细胞的侵袭活性^[24-25]。而 MMPs 作为降解细胞外基质和基底膜的蛋白水解酶,其过表达与肿瘤侵袭、转移和不良预后相关^[26],许多研究显示 MMP2 参与了癌症的发生和发展,并与 HIF-1 α 存在联系^[27-29]。ATP2C1 与 TMEM165 和 MMP2 在 HCC 中显著的相关性表明,ATP2C1 与这两个蛋白间很可能存在促进 HCC 进展的协同作用。

综上所述,本研究突出了 ATP2C1 作为 HIF-1 α 新的靶基因和 HCC 生物标志物的潜力,为后续研究 ATP2C1 在 HCC 中的作用机制提供了理论基础,此外也进一步论证了生物信息学在识别潜在的癌症生物标志物和治疗靶点方面的便利性和可靠性,这可能是传统方法难以鉴定的。

参考文献:

- [1] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 2020, 1873(1): 188314.
- [2] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2021, 7(1): 6.
- [3] SHIANI A, NARAYANAN S, PENA L, et al. The role of diagnosis and treatment of underlying liver disease for the prognosis of primary liver cancer[J]. *Cancer Control*, 2017, 24(3): 1073274817729240.
- [4] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma [J]. *New England Journal of Medicine*, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [5] BAO M H, WONG C C. Hypoxia, metabolic reprogramming, and drug resistance in liver cancer [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1715.
- [6] COWMAN S J, KOH M Y. Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment [J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(1): 28-42.
- [7] ALBADARI N, DENG S, LI W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2019, 14(7): 667-682.
- [8] YUEN V W, WONG C C. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2020, 130(10): 5052-5062.
- [9] BARBEN M, SAMARDZIJA M, GRIMM C. The role of hypoxia, hypoxia-inducible factor (HIF), and VEGF in retinal angiomas proliferation [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1074: 177-183.
- [10] HARRIS A L. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(1): 38-47.
- [11] HWANG A B, RYU E A, ARTAN M, et al. Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2014, 111(42): E4458-E4467.
- [12] PAN Tingting, SUN Shaoqiong, CHEN Yang, et al. Immune effects of PI3K/Akt/HIF-1 α -regulated glycolysis in polymorphonuclear neutrophils during sepsis[J]. *Critical Care*, 2022, 26(1): 29.
- [13] LIU Zhikui, WANG Yufeng, DOU Changwei, et al. Hypoxia-induced up-regulation of VASP promotes invasiveness and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2018, 8(17): 4649-4663.
- [14] SONG Xiudao, DU Rao, GUI Huan, et al. Identification of potential hub genes related to the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma through integrated bioinformatics analysis[J]. *Oncology Reports*, 2020, 43(1): 133-146.
- [15] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A H, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-658.
- [16] XIANG Shixin, LI Jing, SHEN Jing, et al. Identifi-

- cation of prognostic genes in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 653836.
- [17] CARRACEDO-REBOREDO P, LIÑARES-BLANCO J, RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ N, et al. A review on machine learning approaches and trends in drug discovery [J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 4538-4558.
- [18] JIAO Hongli, WENG Binshu, YAN Shanshan, et al. Upregulation of OSBPL3 by HIF-1 α promotes colorectal cancer progression through activation of RAS signaling pathway [J]. *Cell Death and Disease*, 2020, 11(7): 571.
- [19] LEE J S, KIM M Y, PARK E R, et al. TMEM165, a Golgi transmembrane protein, is a novel marker for hepatocellular carcinoma and its depletion impairs invasion activity [J]. *Oncology Reports*, 2018, 40(3): 1297-1306.
- [20] PIÑERO F, DIRCHWOLF M, PESSÔA M G. Biomarkers in hepatocellular carcinoma: diagnosis, prognosis and treatment response assessment [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1370.
- [21] CHU Qingfei, GU Xinyu, ZHENG Qiuxian, et al. Regulatory mechanism of HIF-1 α and its role in liver diseases: a narrative review [J]. *Annals of Translational Medicine*, 2022, 10(2): 109.
- [22] LI Xiaoli, ZHANG Dingwei, DING Jiahui, et al. Identification of ATP2C1 mutations in the patients of Hailey-Hailey disease [J]. *BMC Medical Genetics*, 2020, 21(1): 120.
- [23] LEE K C, CHANG H T, CHOU K J, et al. Mechanism underlying histamine-induced intracellular Ca²⁺ movement in PC3 human prostate cancer cells [J]. *Pharmacological Research*, 2001, 44(6): 547-552.
- [24] DULARY E, POTELLE S, LEGRAND D, et al. TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG-II): clues and evidences for roles of the protein in Golgi functions and ion homeostasis [J]. *Tissue Cell*, 2017, 49(2 Pt A): 150-156.
- [25] LEE J S, KIM M Y, PARK E R, et al. TMEM165, a Golgi transmembrane protein, is a novel marker for hepatocellular carcinoma and its depletion impairs invasion activity [J]. *Oncology Reports*, 2018, 40(3): 1297-1306.
- [26] CABRAL-PACHECO G A, GARZA-VELOZ I, CASTRUITA-DE LA ROSA C, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9739.
- [27] WANG Xiaoqian, YANG Bing, SHE Yuanping, et al. The lncRNA TP73-AS1 promotes ovarian cancer cell proliferation and metastasis via modulation of MMP2 and MMP9 [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(9): 7790-7799.
- [28] BUTTACAVOLI M, DI CARA G, ROZ E, et al. Integrated multi-omics investigations of metalloproteinases in colon cancer: focus on MMP2 and MMP9 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22): 12389.
- [29] WANG Bin, DING Youming, FAN Ping, et al. Expression and significance of MMP2 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncology Letters*, 2014, 8(2): 539-546.

(责任编辑:秦海明 实习编辑:易圣杰)