

引用本文: 吕学宁, 叶必成, 王昌成. 肝细胞癌中 ATP1B3 基因表达及功能的生物信息学分析[J]. 安徽医药, 2022, 26(2): 315-321. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.02.026.

◇临床医学◇



肝细胞癌中 ATP1B3 基因表达及功能的生物信息学分析

吕学宁, 叶必成, 王昌成

作者单位: 徐州医科大学附属淮安医院消化科, 江苏 淮安 223002

通信作者: 王昌成, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为消化道肿瘤, Email: lovefallingsnow@126.com

摘要: **目的** 探讨 ATP1B3 基因在肝细胞癌中的表达以及临床价值, 预测 ATP1B3 基因在肝细胞癌发生发展中的作用。**方法** 通过 Oncomine 及 TIMER 数据库分析 ATP1B3 mRNA 在不同肿瘤中的表达水平的差异性。利用 HCCDB、Oncomine 以及 TCGA 等数据库, 分析 ATP1B3 mRNA 在肝细胞癌和正常肝组织中的表达情况, 并分析 ATP1B3 的表达与临床病理特征及预后的关系。使用 GSEA 法对 ATP1B3 的正负相关基因进行富集分析。通过 TIMER 及 GFPIA 数据库分析肝细胞癌中 ATP1B3 的表达与免疫浸润程度的相关性。利用 WebGestalt 数据库对 ATP1B3 为核心的基因网络分析预测 ATP1B3 的靶向药物。**结果** ATP1B3 mRNA 在肝细胞癌中的表达高于正常肝组织 ($P < 0.05$)。ATP1B3 在不同肿瘤分级、分期中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在不同性别、年龄、有无家族史、BMI、有无血管浸润及癌组织有无周围炎症等中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。ATP1B3 高表达组的总生存期及疾病特异性生存期均低于低表达组 ($P < 0.05$), 且 ATP1B3 高表达是影响肝细胞癌病人总体生存预后的独立危险因素 ($P < 0.05$)。对 ATP1B3 正负相关基因进行富集分析得出: ATP1B3 基因高表达的样本存在于核糖体、剪接体并影响 RNA 转运、MAPK 信号通路等生物过程 ($P < 0.01$, $FDR < 0.05$)。在肝细胞癌中 ATP1B3 基因的表达与免疫浸润相关 ($cor > 0$, $P < 0.05$)。ATP1B3 基因互作网络预测强心苷类药物可能是 ATP1B3 的靶向药物。**结论** ATP1B3 可能是肝细胞癌潜在的致癌基因, 其表达上调在肝细胞癌的发生发展过程发挥重要作用, 并可能成为判断肝细胞癌病人预后的重要的生物学指标。**关键词:** 癌, 肝细胞; ATP1B3; 生物信息学

Biological analysis of ATP1B3 expression and function in hepatocellular carcinoma

LYU Xuening, YE Bicheng, WANG Changcheng

Author Affiliation: Department of Gastroenterology, Huai'an Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Huai'an, Jiangsu 223002, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical value of ATP1B3 genes in hepatocellular carcinoma, and predict the role of ATP1B3 genes in the occurrence and development of HCC. **Methods** The expression levels of ATP1B3 mRNA in different tumors were analyzed using by Oncomine and TIMER database. HCCDB, Oncomine and TCGA databases were used to analyze the expression of ATP1B3 mRNA in hepatocellular carcinoma and normal liver tissues. Moreover, the correlation between ATP1B3 expression and clinicopathological characteristics and prognosis was analyzed. GSEA method was used to analyze the positive and negative genes of ATP1B3. TIMER and GFPIA database were used to analyze the correlation between the expression of ATP1B3 and the degree of immune invasion in hepatocellular carcinoma. A gene network based on ATP1B3 was constructed using GeneMANIA database and analyzed using WebGestalt database to predict ATP1B3 targeted drugs. **Results** ATP1B3 mRNA expression in hepatocellular carcinoma was higher than that in normal liver tissue ($P < 0.05$). The expression of ATP1B3 in different tumor grades and stages was statistically different ($P < 0.05$), there were no statistically significant differences in expression among different genders, ages, family history, BMI, vascular invasion, and surrounding inflammation in cancer tissues ($P > 0.05$). The overall and disease free survival of the ATP1B3 high expression group was lower than that of the low expression group ($P < 0.05$), and the high expression of ATP1B3 was an independent risk factor affecting the overall survival prognosis of HCC patients ($P < 0.05$). Enrichment analysis of positive and negative genes related to ATP1B3 lead to a natural conclusion that samples with high expression of ATP1B3 gene existed in ribosome and spliceosome and affected RNA transportation, MAPK signaling pathway and other biological processes ($P < 0.01$, $FDR < 0.05$). ATP1B3 gene expression was associated with immune infiltration in hepatocellular carcinoma ($cor > 0$, $P < 0.05$). ATP1B3 gene interaction network predicted that cardiac glycosides may be targeted drugs of ATP1B3. **Conclusion** ATP1B3 may be a potential oncogene in hepatocellular carcinoma, and its up-regulated expression played an important role in the development and progression of hepatocellular carcinoma, and may be an important biological indicator for the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma.

Key words: Carcinoma, hepatocellular; ATP1B3; Bioinformatics

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是目前全球癌症死亡的第2大主要原因^[1], 具有较高的病死率^[2], 大多数肝癌病人诊断时间较晚, 总体治疗效果相对较差^[3-4], 其5年生存率约为18%^[5]。肝细胞癌遗传异质性较强, 疾病的发生发展中涉及众多基因的改变及相互作用, 因此极易复发及转移。虽然针对癌基因突变的不同靶点, 进行靶向干预治疗, 为肝细胞癌治疗开辟了新的思路, 但目前对肝细胞癌的确切分子机制仍尚不清楚^[6], 有必要继续积极探索 HCC 分子机制以及起关键作用的致癌基因为肝细胞癌的诊治提供参考。

ATP1B3 (ATPase Na⁺/K⁺ Transporting Subunit Beta 3) 是 Na⁺/K⁺-ATP 酶编码的 $\beta 3$ 亚基, 是 ATP 酶的一个分子调节亚基, 定位于 Chr 3 号染色体 q22-23 区域^[7], Na⁺/K⁺-ATP 酶广泛分布在原核和真核细胞中, 参与多种细胞活动: 维持跨膜细胞离子平衡、在细胞质中建立高 K⁺ 低 Na⁺ 调节跨膜电位、维持细胞环境稳定等。Na⁺/K⁺-ATP 酶不仅参与正常的细胞活动, 而且在肿瘤发生中发挥重要作用, 是肿瘤治疗的潜在靶点^[8]。相关研究表明, ATP1B3 可上调淋巴瘤细胞活性, 促进 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 的产生^[9-10], 以及作用于细胞周期抑制癌细胞的凋亡^[11]等来促进肿瘤的发展, 本研究自 2020 年 5—8 月通过不同数据库探讨 ATP1B3 基因在肝细胞癌发生发展过程中的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 ATP1B3 在不同人类肿瘤中的表达水平 通过 Oncomine (<https://www.oncomine.org/>) 及 TIMER (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) 数据库进行 ATP1B3 mRNA 表达水平的分析, 探索 ATP1B3 在不同肿瘤中的表达差异性 (以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义)。

1.2 ATP1B3 在肝细胞癌的表达情况 利用 Oncomine 数据库及 HCCDB 数据库 (<http://lifeome.net/database/hccdb/home.html>), 通过多个肝癌数据集检测 ATP1B3 mRNA 在肝细胞癌组织中的表达水平。采用 R 软件进行数据分析, 组间 ATP1B3 的表达数据, 采用成组 t 检验, 临界值设定条件 ($P < 0.05$)。

1.3 临床病理特征分析 在 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 数据库下载 LIHC 的 FPKM 数据, 使用 R 软件进行统计分析及数据可视化, 分析 ATP1B3 mRNA 表达量与各个临床病理特征之间的关系, 包括: 肿瘤分级、分期、性别、年龄、BMI、家族史、血管浸润及癌组织周围炎症等。各个基因表达量为 $\log_2(\text{FPKM}+1)$, 并排除了临床信息不完整的样本。组间比较分别采用成组 t 检验, 多组间 (≥ 3) 采

用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.4 生存分析 通过 Kaplan-Meier plotter (KM-PLOT) (<http://kmplot.com/analysis/>) 在线工具对 ATP1B3 在肝细胞癌中的预后进行生存分析评估, 包括: 总生存期 (overall survival, OS)、无复发生存期 (recurrence free survival, RFS)、无进展生存期 (progression free survival, PFS) 和疾病特异性生存期 (disease free survival, DSS)。并对肝细胞癌病人进行了亚组生存分析, 包括: 性别、分期、分级、人种、有无饮酒史及有无肝炎病毒感染。此外, 排除临床信息不完整的样本, 利用 R 软件构建多因素 Cox 回归模型评估影响肝细胞癌病人总体生存期的危险因素。生存分析采用 Kaplan-Meier 法及 log-rank 检验, 计算 95% 置信区间 (95%CI) 和风险比 (HR), $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

1.5 GSEA 富集分析 使用基因富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 探讨 ATP1B3 可能通过哪些生物过程参与肿瘤的发生发展。利用 R 软件通过 Spearman 检验将肝细胞癌的 FPKM 数据分成 ATP1B3 的正相关组 ($\text{cor} > 0$) 和负相关组 ($\text{cor} < 0$), 按照相关系数大小进行基因排序, 并通过使用 R 软件的 clusterProfiler 包对两组进行富集分析, 其中错误发现率 (FDR) < 0.05 视为差异有统计学意义。

1.6 免疫浸润相关性分析 通过 TIMER 数据库, 评估 ATP1B3 表达与免疫浸润水平的相关性, 包括肿瘤纯度、B 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及树突状细胞浸润水平 ($\text{cor} < 0$ 为负相关, $\text{cor} > 0$ 为正相关, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义)。此外, 通过 GEPIA 数据库分析了正常肝组织及肝细胞癌中的不同免疫细胞的免疫标记集与 ATP1B3 的相关性 ($\text{cor} < 0$ 为负相关, $\text{cor} > 0$ 为正相关, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义)。

1.7 ATP1B3 靶向药物富集分析 利用 GeneMANIA (<https://genemania.org/>) 建立以 ATP1B3 为核心的基因网络, 并且通过使用 WebGestalt (<http://www.webgestalt.org/>) 对以 ATP1B3 为核心的基因网络进行了靶向药物的富集分析, 预测通过该基因网络中相关通路作用于 ATP1B3 的靶向药物。

1.8 统计学方法 采用 R 软件对进行数据分析。差异分析中对于两组 ATP1B3 mRNA 的表达数据, 采用成组 t 检验, 对于两组以上的数据, 采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。生存分析采用 Kaplan-Meier 法及 log-rank 检验, 包括多因素 Cox 回归模型评估影响肝细胞癌病人总体生存期的危险因素, 计算 95% 置信区间 (95%CI) 和风险比 (HR), 其中 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。富集分析, 以

错误发现率(FDR)<0.05视为差异有统计学意义。免疫浸润相关性分析,以 $\text{cor}<0$ 为负相关, $\text{cor}>0$ 为正相关, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATP1B3在不同人类肿瘤中的表达差异性 为了确定ATP1B3在不同肿瘤和正常组织中的表达差异,我们使用Oncomine数据库分析了不同肿瘤组织和正常组织中ATP1B3 mRNA的表达水平。该分析显示,与正常组织相比,ATP1B3在大脑中神经系统肿瘤(brain and CNS cancer)、食管癌(esophageal cancer)、胃癌(gastric cancer)、头颈部鳞状细胞癌(head and neck cancer)、肾癌(kidney cancer)、白血病(leukemia)、肝癌(liver cancer)、淋巴瘤(lymphoma)及肉瘤(sarcoma)等肿瘤中的表达升高;此外,还有部分数据显示ATP1B3在结直肠癌(colorectal cancer)、肺癌(lung cancer)和前列腺癌(prostate cancer)中表达降低。

为了进一步评估ATP1B3在不同肿瘤中的表达情况,我们利用TIMER数据库中多个恶性肿瘤的数据检测ATP1B3的表达。分析显示:在乳腺癌(breast cancer, BRCA)、胆管癌(cholangiocarcinoma, CHOL)、食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)、头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)、肝细胞癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)、肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)、胃癌(stomach adenocarcinoma, STAD)、甲状腺癌(thyroid carcinoma, THCA)和子宫内膜癌(uterine corpus endometrial carcinoma, UCEC)中,ATP1B3 mRNA表达量显著高于正常组织;在结肠癌(colon adenocarcinoma, COAD)、肾嫌色细胞癌(kidney chromophobe, KICH)、肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)、肾乳头状细胞癌(kidney renal papillary cell carcinoma, KIRP)、肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)、前列腺癌(prostate adenocarcinoma, PRAD)及直肠腺癌(rectum adenocarcinoma, READ)中ATP1B3 mRNA表达量显著低于正常组织。这些结果表明ATP1B3在许多肿瘤中均具有显著差异性表达,可能是部分肿瘤的潜在癌基因,在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的价值。

2.2 ATP1B3 mRNA在肝细胞癌中的表达 在HCCDB数据库中分析了9个肝细胞癌的基因集:BCCDB4($P<0.001$)、BCCDB6($P<0.001$)、HCCDB12($P<0.001$)、HCCDB13($P<0.001$)、HCCDB15($P<0.001$)、HCCDB16($P<0.001$)、HCCDB17($P<0.001$)、HCCDB18($P<0.001$),研究发现与邻近的正常组织相比,HCC中ATP1B3 mRNA表达升高。Oncomine

数据库中的三个基因集的ATP1B3 mRNA表达也得出相似的结果:Mas Liver($P<0.001$)、Chen Liver($P<0.001$)、Rossler Liver($P<0.001$)。此外,肝硬化中ATP1B3 mRNA水平显著高于正常组织($P<0.001$)。因此,这些结果表明ATP1B3可能是肝细胞癌中潜在的生物学标志物,甚至可能是肝硬化发展为肝细胞癌的始动因素。

2.3 ATP1B3的表达在不同临床病理特征中的差异分析 在TCGA数据库下载肝细胞癌的FPKM数据,分析ATP1B3的表达与各个临床病理特征之间的关系,研究发现肝细胞癌的分化程度越低,ATP1B3的表达越高,组间两两比较差异有统计学意义($F=6.513$, $P<0.001$);且肝细胞癌分期越高,ATP1B3的表达越高,组间两两比较差异有统计学意义($F=4.341$, $P=0.015$),这一结果提示ATP1B3可能通过某种途径来影响肝细胞癌的进展。此外,ATP1B3在不同性别($t=-1.406$, $P=0.162$)、不同年龄($F=1.315$, $P=0.272$)、有无家族史($t=-0.076$, $P=0.939$)、BMI($F=0.985$, $P=0.376$)、有无血管浸润($t=1.429$, $P=0.155$)、及癌组织周围有无炎症($t=0.996$, $P=0.321$)中的表达差异无统计学意义。综上,这些结果证明ATP1B3可能是肝细胞癌诊断的标志物。

2.4 ATP1B3高表达对肝细胞癌病人预后的影响 为了进一步评估ATP1B3基因在肝细胞癌中的预后价值,我们使用了KMPLLOT这一在线工具对TCGA数据的370例肝细胞癌病人进行生存分析。这些结果表明,在ATP1B3高表达组中,肝细胞癌病人的OS(总生存期)[HR=1.89(1.15~3.11), $P=0.011$]和DSS(疾病特异性生存期)[HR=1.97(1.11~3.48), $P=0.018$]相对于ATP1B3低表达组显著减少;PFS(无进展生存期)[HR=1.49(0.91~2.43), $P=0.110$]和RFS(无复发生存期)[HR=1.54(0.92~2.58), $P=0.100$]差异无统计学意义。此外,我们对371例肝细胞癌病人进行了亚组生存分析,分析发现(表1):所有女性病人中的ATP1B3高表达组具有较差的OS和PFS;所有男性病人中的ATP1B3高表达组具有较差的OS;1期肝细胞癌病人中ATP1B3高表达组具有较差的OS和PFS,1+2期、3期、3+4期病人中ATP1B3高表达组具有较差的OS;2级肝细胞癌病人中ATP1B3高表达组具有较差的OS和PFS,3级肝细胞癌病人中ATP1B3高表达组具有较差的OS;白种人群的肝细胞癌病人中ATP1B3高表达组具有较差的PFS,亚洲人群的肝细胞癌病人中ATP1B3高表达组具有较差的OS和PFS;无饮酒史的肝细胞癌病人中ATP1B3高表达组具有较差的OS;感染及未感染肝炎病毒的肝细胞癌病人中ATP1B3高表达组均具

表1 在不同临床特征的肝细胞癌中 ATP1B3 高表达的预后分析

临床病理特征	总生存期(<i>n</i> =364)			无进展生存期(<i>n</i> =370)		
	例数	风险比	<i>P</i> 值	例数	风险比	<i>P</i> 值
性别						
女性	118	2.49(1.17~5.32)	0.015	120	1.75(1.05~2.94)	0.031
男性	246	3.33(1.98~5.58)	0.000	246	1.35(0.93~1.96)	0.110
分期						
1期	170	2.58(1.4~4.77)	0.002	170	1.84(1.08~3.14)	0.020
2期	83	2.40(0.9~6.38)	0.071	84	0.65(0.36~1.17)	0.150
1+2期	253	2.32(1.44~3.75)	0.000	254	1.40(0.91~2.13)	0.120
3期	83	2.44(1.27~4.67)	0.006	83	1.45(0.82~2.54)	0.200
4期	4			5		
3+4期	87	2.54(1.34~4.83)	0.003	88	1.39(0.8~2.4)	0.240
分级						
1级	55	0.67(0.25~1.77)	0.420	55	1.65(0.73~3.73)	0.220
2级	174	2.72(1.57~4.72)	0.000	175	1.83(1.18~2.85)	0.006
3级	118	2.90(1.58~5.34)	0.000	119	1.42(0.86~2.34)	0.170
4级	12			12		
人种						
白种人	181	1.62(0.99~2.64)	0.052	183	1.41(0.94~2.72)	0.009
亚洲人	155	4.38(2.1~9.12)	0.000	155	1.81(1.13~2.91)	0.013
饮酒史						
有	115	1.78(0.9~3.51)	0.094	115	1.46(0.87~2.47)	0.150
无	202	2.40(1.52~3.78)	0.000	204	1.54(0.98~2.44)	0.061
感染肝炎病毒						
是	150	2.68(1.32~5.42)	0.005	152	1.35(0.81~2.26)	0.250
否	167	1.89(1.15~3.11)	0.011	167	1.49(0.91~2.43)	0.110

有较差的OS。因此ATP1B3高表达的肝细胞癌病人具有相对较差的预后。而多因素COX回归分析提示ATP1B3高表达是影响肝细胞癌病人总体生存预后的独立危险因素($P=0.005$)。这些结果都显著表明ATP1B3是肝细胞癌病人的潜在预后指标。

2.5 ATP1B3表达的生物学功能分析 为了进一步探索ATP1B3在肝细胞癌的潜在生物学功能,我们对ATP1B3基因正负相关的两组进行富集分析。正相关组主要富集核糖体、剪接体、趋化因子信号通路、RNA转运、Rap1信号通路、MAPK信号通路及Ras信号通路等,这一结果表明ATP1B3的高表达可能激活这些通路,从而促进肿瘤的发生发展。此外,负相关组富集于酮体的合成与降解等的代谢,这一结果表明ATP1B3的高表达可能抑制这一通路。

2.6 肝细胞癌中ATP1B3的表达与免疫浸润水平相关性分析 通过TIMER数据库,我们评估了ATP1B3表达与免疫浸润水平的相关性,研究发现:ATP1B3表达与肝细胞癌的肿瘤纯度呈负相关($\text{cor}=-0.29, P<0.001$);与B细胞($\text{cor}=0.34, P<0.001$)、CD8+T细胞($\text{cor}=0.30, P<0.001$)、CD4+T细胞($\text{cor}=0.32, P<0.001$)、巨噬细胞($\text{cor}=0.49, P<0.001$)、中性

粒细胞($\text{cor}=0.44, P<0.001$)及树突状细胞($\text{cor}=0.44, P<0.001$)浸润水平呈正相关。

为了进一步研究不同免疫浸润细胞与ATP1B3的关系,本文还研究了GEPIA数据库中正常肝组织和肝细胞癌中的不同免疫细胞的免疫标记集与ATP1B3的关系,结果显示,与正常肝组织相比,在肝细胞癌中,ATP1B3表达水平与部分免疫细胞的免疫标记集显著相关($\text{cor}>0, P<0.05$),这些结果提示ATP1B3表达可能与肿瘤的部分免疫细胞浸润有关,通过免疫浸润进一步促进肿瘤的进展。

2.7 ATP1B3的基因网络分析 通过GeneMAINA在线数据库以ATP1B3为核心的基因网络,通过WebGestalt数据库分析这一基因网络,我们发现强心苷类药物可能通过该网络的潜在通路作用于ATP1B3,是抗肝细胞癌ATP1B3的基因靶向药物。

3 讨论

肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一,随诊医疗技术水平的不断发展,肿瘤分子生物学研究的不断深入,肝细胞癌的靶向治疗正在快速发展,已发现的常见突变基因包括TERT、MLL4、CCNE1^[12]、TP53和CTNNB1等^[13-14]。尽管有许多潜在的治疗靶点,但肝细胞癌病人发病率和病死率仍在升

高^[15], 总体生存率仍然不理想, 因此继续探究肝细胞癌的潜在分子机制及癌变基因为肝细胞癌的诊治提供新思路至关重要。本研究通过生物信息学公开数据分析, 首次探讨了 ATP1B3 在肝细胞癌中的作用, 进一步了解了 ATP1B3 在肝细胞癌中的潜在价值。

Na⁺/K⁺-ATP 酶是一种跨膜转运蛋白, 主要调节细胞内外 Na⁺、K⁺ 的平衡, 维持细胞内环境的稳定, 对细胞的生长、分化和存活起到至关重要的作用^[16], Na⁺/K⁺-ATP 酶不仅参与正常的细胞活动, 而且在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 目前已有研究将其作为治疗乳腺癌的靶点^[17]。而 Na⁺/K⁺-ATP 酶由 3 个亚基组成: α 、 β 和 FXYD 家族的成员^[18], α 亚基是催化亚基, 而 β 亚基和 FXYD 是调节亚基, 每个亚基的已知亚型包括: $\alpha 1$ - $\alpha 4$, $\beta 1$ - $\beta 3$, 以及 FXYD1-FXYD7^[19], 其中 β 亚基的三个亚型 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$, 参与全酶的结构和功能成熟^[20-22]。相关研究指出 Na⁺/K⁺-ATP 酶亚基在胃癌^[23]、膀胱癌^[24]和乳腺癌^[25]中表达均升高。Mijatovic 研究指出 Na⁺/K⁺-ATP 酶 $\alpha 1$ 亚基的下调降低了非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞的迁移和增殖^[26]。Li 等^[11]相关研究结果指出, ATP1B3 在胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭中发挥重要作用, ATP1B3 高表达在胃组织中具有致癌作用。但是刘战培研究表明增加 ATP1B3 在肿瘤细胞中的表达能够显著抑制肿瘤细胞的生长, 甚至使其变性死亡^[27]。此外, ATP1B3 还在免疫应答中具有调节作用^[10], 研究表明 Na⁺/K⁺-ATP 酶的 α 或 β 亚基参与 HIV-1^[28]、肠病毒 71^[29]、冠状病毒^[30]、IAV/IBV^[31] 和 HCMV 感染^[32]。Baisong Zheng 等^[33]研究指出过表达 ATP1B3 降低了乙型肝炎病毒中 HBsAg 和 HBeAg 的数量, 因此 ATP1B3 在抗病毒免疫应答中也起到重要作用。

本研究利用不同数据库分析了 ATP1B3 在肝细胞癌中的表达, 研究得出 ATP1B3 在肝细胞癌中具有显著的表达差异性, 且可能参与肿瘤的浸润发展, 而与性别、年龄、家族史、BMI、血管浸润及癌组织周围炎症均无明显关系, 因此表明 ATP1B3 可以作为肝细胞癌诊断的潜在标志物。并且 ATP1B3 的过表达导致肝细胞癌病人预后较差, 是预测肝细胞癌病人总生存期的独立危险因素, 这一结果表明 ATP1B3 是肝细胞癌病人的潜在预后指标。

此外, 本研究通过富集分析富集出 ATP1B3 基因高表达的样本存在于核糖体、剪接体、趋化因子信号通路、RNA 转运、Rap1 信号通路、MAPK 信号通路、Ras 信号通路及 PI3K/AKT 通路等生物过程从而促进肿瘤的进展。大量研究表明 Rap1 在多种癌症

中激活, 包括白血病和实体瘤, 如: 前列腺癌、黑色素瘤、结肠癌、胰腺癌及人类口腔癌等等^[34]。Ras 蛋白在许多肿瘤的发生和维持中发挥关键作用, Ras 是肺癌、结肠癌、胰腺癌等癌症疾病常见的致癌基因^[34], 在肝细胞癌中 ATP1B3 可能通过某些机制作用于 Rap1、Ras 信号通路, 促进肿瘤的发生发展。异常的 MAPK 信号在人类癌症的发展和进展中起着关键的作用, 也决定了对癌症治疗的反应, 应激活的 MAPKs (包括 JNK 和 p38) 与多种恶性肿瘤有关, 包括滤泡性淋巴瘤、肺、甲状腺和乳腺癌、胶质瘤和头颈部鳞状细胞癌等等^[35]。并且 MAPK 信号通路还与肿瘤浸润和转移相关, 刘红兵^[36]相关文献指出 MAPK 通路在胃癌的浸润和转移过程中具有重要的作用, 本文得出 ATP1B3 可能通过 AMPK 信号通路作用于肝细胞癌, 并且浸润相关分析得出 ATP1B3 参与肝细胞癌的免疫浸润, 通常免疫细胞的浸润丰度越高, 提示免疫基因的异常表达越高, 肿瘤免疫微环境越紊乱, 进而参与肿瘤的发生发展及侵袭转移的进程。此外相关文献还指出 ATP1B3 可上调淋巴细胞活性, 促进 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 的产生^[9-10], 因此, ATP1B3 可能通过 AMPK 信号通路、上调淋巴细胞活性及免疫浸润等过程共同促进肝细胞癌的浸润转移。

本研究还通过 GeneMaina 在线数据库以 ATP1B3 为核心的基因网络, 通过 WebGestalt 数据库分析这一基因网络, 我们发现强心苷类药物可能通过该网络的潜在通路作用于 ATP1B3, 是抗肝细胞癌 ATP1B3 基因的靶向药物。既往研究表明强心苷类药物, 包括地高辛、蛙巴因、阿诺布费金和蟾毒灵等, 是 Na⁺/K⁺-ATP 酶抑制剂, 通过特异性地结合 Na⁺/K⁺-ATP 酶的 α 亚基, 调节细胞内不同信号通路, 如激活 NF- κ B, 激活 Ras/Raf/MEK/ERK 蛋白级联反映, 增加 P53 及减少 Cyclin D 表达等, 最终对肿瘤细胞产生抑制作用^[37-38]。还有研究表明强心苷在非小细胞肺癌^[39]、肝癌^[40]、胰腺癌^[41]、乳腺癌^[42]、白血病^[43]、食管癌^[44]等肿瘤中均被证实可以抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。本研究结果表明强心苷类药物可能通过抑制 ATP1B3 的表达来抑制肝细胞癌的发生发展, 但其分子机制尚不清楚, 有待基础及临床试验进一步验证。

综上所述, 本研究运用相关生物信息学方法揭示了 ATP1B3 可能是肝细胞癌潜在的致癌基因, 其表达上调在肝细胞癌的发生发展过程发挥重要作用, 并可能成为判断肝细胞癌病人预后的重要的生物学指标, 为肝细胞癌的诊断及治疗提供参考。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA, 2018, 68(1):7-30.
- [2] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. International Journal of Cancer, 2019, 144(8):1941-1953.
- [3] MEHTA N, GUY J, FRENETTE CT, et al. Excellent outcomes of liver transplantation following down-staging of hepatocellular carcinoma to within milan criteria: a multicenter study [J]. Clinical gastroenterology and Hepatology, 2018, 16(6):955-964.
- [4] CHAN KM, CHENG CH, WU TH, et al. Salvage living donor liver transplantation for posthepatectomy recurrence: a higher incidence of recurrence but promising strategy for long-term survival [J]. Cancer Management and Research, 2019, 11:7295-7305.
- [5] JEMAL A, WARD EM, JOHNSON CJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2014, featuring survival [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2017, 109(9):dix030. DOI: 10.1093/jnci/dix030.
- [6] ZUCMAN-ROSSI J, VILLANUEVA A, NAULT JC, et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2015, 149(5):1226-1239.
- [7] BESIRLI CG, GONG TW, LOMAX MI. The Atp1b3 gene for Na, K-ATPase beta 3 subunit maps to mouse chromosome 9, and a related gene, Atp1b3-rs, maps to mouse chromosome 3 [J]. Mammalian Genome, 1998, 9(2):171-172.
- [8] YANG P, MENTER DG, CARTWRIGHT C, et al. Oleandrin-mediated inhibition of human tumor cell proliferation: importance of Na, K-ATPase alpha subunits as drug targets [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2009, 8(8):2319-2328.
- [9] CHIAMPANICHAYAKUL S, SZEKERES A, KHUNKAEWLA P, et al. Engagement of Na, K-ATPase beta3 subunit by a specific mAb suppresses T and B lymphocyte activation [J]. International Immunology, 2002, 14(12):1407-1414.
- [10] CHRUEWKAMLOW N, PATA S, MAHASONGKRAM K, et al. $\beta 3$ subunit of Na, K ATPase regulates T cell activation with no involvement of Na, K ATPase activity [J]. Immunobiology, 2015, 220(5):634-640.
- [11] LI L, FENG R, XU Q, et al. Expression of the $\beta 3$ subunit of Na (+)/K (+)-ATPase is increased in gastric cancer and regulates gastric cancer cell progression and prognosis via the PI3/AKT pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(48):84285-84299.
- [12] SUNG WK, ZHENG H, LI S, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma [J]. Nature Genetics, 2012, 44(7):765-769.
- [13] SCHULZE K, IMBEAUD S, LETOUZÉ E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets [J]. Nature Genetics, 2015, 47(5):505-511.
- [14] TOTOKI Y, TATSUNO K, COVINGTON KR, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes [J]. Nature Genetics, 2014, 46(12):1267-1273.
- [15] ZHENG R, QU C, ZHANG S, et al. Liver cancer incidence and mortality in China: Temporal trends and projections to 2030 [J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2018, 30(6):571-579.
- [16] YU SP. Na(+), K(+)-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death [J]. Biochemical Pharmacology, 2003, 66(8):1601-1609.
- [17] CHEN JQ, CONTRERAS RG, WANG R, et al. Sodium/potassium ATPase (Na⁺, K⁺-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: a new paradigm for development of anti-breast cancer drugs [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2006, 96(1):1-15.
- [18] SWEADNER KJ. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 988(2):185-220.
- [19] SWEADNER KJ, RAEL E. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression [J]. Genomics, 2000, 68(1):41-56.
- [20] ACKERMANN U, GEERING K. Mutual dependence of Na, K-ATPase alpha- and beta-subunits for correct posttranslational processing and intracellular transport [J]. FEBS Letters, 1990, 269(1):105-108.
- [21] GEERING K. Subunit assembly and functional maturation of Na, K-ATPase [J]. The Journal of Membrane Biology, 1990, 115(2):109-121.
- [22] GEERING K, THEULAZ I, VERREY F, et al. A role for the beta-subunit in the expression of functional Na⁺-K⁺-ATPase in *Xenopus* oocytes [J]. The American Journal of Physiology, 1989, 257(5 Pt 1):C851-858.
- [23] LEE S, BAEK M, YANG H, et al. Identification of genes differentially expressed between gastric cancers and normal gastric mucosa with cDNA microarrays [J]. Cancer Letters, 2002, 184(2):197-206.
- [24] ESPINEDA C, SELIGSON DB, JAMES BALL W JR, et al. Analysis of the Na, K-ATPase alpha- and beta-subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays [J]. Cancer, 2003, 97(8):1859-1868.
- [25] KOMETIANI P, LIU L, ASKARI A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells [J]. Molecular pharmacology, 2005, 67(3):929-936.
- [26] MIJATOVIĆ T, ROLAND I, QUAQUEBEKE EVAN, et al. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers [J]. The Journal of Pathology, 2007, 212(2):170-179.
- [27] 刘战培, 熊竹娟, 张洁, 等. Na⁺, K⁺-ATP1b1 对肝癌细胞生长侵袭能力影响的研究 [J]. 华西医学, 2008, 23(1):94-96.
- [28] NISHITSUJI H, SUGIYAMA R, ABE M, et al. ATP1B3 protein modulates the restriction of HIV-1 production and nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) activation by BST-2 [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(9):4754-4762.
- [29] LU Y, HOU H, WANG F, et al. ATP1B3: a virus-induced host factor against EV71 replication by up-regulating the production of type-I interferons [J]. Virology, 2016, 496:28-34.
- [30] BURKARD C, VERHEIJ E, HAAGMANS BL, et al. ATP1A1-mediated Src signaling inhibits coronavirus entry into host cells [J]. Journal of virology, 2015, 89(8):4434-4448.
- [31] MIS, LI Y, YAN J, et al. Na(+)/K(+)-ATPase $\beta 1$ subunit interacts with M2 proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication [J]. Science China Life sciences, 2010, 53(9):1098-1105.
- [32] CUI X, SUN ZR, REN GW, et al. Interaction between human cytomegalovirus UL136 protein and ATP1B1 protein [J]. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas, 2011, 44(12):1251-1255.
- [33] ZHENG B, ZHANG J, ZHENG T, et al. ATP1B3 cooperates with BST-2 to promote hepatitis B virus restriction [J]. Journal of medical virology, 2020, 92(2):201-209.

- [34] SHAH S, BROCK EJ, JI K, et al. Ras and Rap1: a tale of two GTPases[J]. Seminars in cancer biology, 2019, 54:29-39.
- [35] LOW HB, ZHANG Y. Regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer[J]. Immune Network, 2016, 16(2):85-98.
- [36] 刘红兵, 张皓渝, 林兆博, 等. MAPK 信号通路系统与胃癌研究进展[J]. 中国现代普通外科进展, 2020, 23(3):244-247.
- [37] AIZMAN O, UHLÉN P, LAL M, et al. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(23):13420-13424.
- [38] MCCONKEY DJ, LIN Y, NUTT LK, et al. Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells [J]. Cancer Research, 2000, 60(14):3807-3812.
- [39] WANG Y, QIU Q, SHEN JJ, et al. Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44(11):1813-1824.
- [40] ZHANG DM, LIU JS, TANG MK, et al. Bufotalin from *Venenum Bufonis* inhibits growth of multidrug resistant HepG2 cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis [J]. European Journal of Pharmacology, 2012, 692(1/3):19-28.
- [41] LI M, YU X, GUO H, et al. Bufalin exerts antitumor effects by inducing cell cycle arrest and triggering apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. Tumour Biology, 2014, 35(3):2461-2471.
- [42] BIELAWSKI K, WINNICKA K, BIELAWSKA A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(7):1493-1497.
- [43] 李新萍, 欧阳建, 周敏. 哇巴因对 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞株的作用及机制的初步探讨 [J]. 医学研究生学报, 2014, 27(7):698-701.
- [44] 程中华, 熊文坚, 冯珍, 等. 哇巴因对人食管癌细胞的增殖调控作用及其机制研究 [J]. 胃肠病学, 2015, 15(9):523-527.

(收稿日期:2020-10-15,修回日期:2020-11-27)

引用本文:陈艳红,谢云霞,刘涛.血清脂肪酸合酶、上皮钙黏素、再生蛋白 4 水平在早期胃癌中的诊断价值及与淋巴结转移的关系[J].安徽医药,2022,26(2):321-325.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.02.027.

◇临床医学◇



血清脂肪酸合酶、上皮钙黏素、再生蛋白 4 水平在早期胃癌中的诊断价值及与淋巴结转移的关系

陈艳红^a, 谢云霞^a, 刘涛^b

作者单位:郑州大学第一附属医院,^a手术部,^b胃肠外科,河南 郑州 450052

摘要: 目的 探讨血清脂肪酸合酶(FAS)、上皮钙黏素(E-cadherin)、再生蛋白 4(REG4)水平在早期胃癌中的诊断价值及与淋巴结转移的关系。方法 选取郑州大学第一附属医院 2014 年 1 月至 2016 年 8 月收治的胃癌病人 88 例作为观察组,其中淋巴结转移病人 35 例,无淋巴结转移病人 53 例,另选取同期胃良性疾病病人 80 例作为对照组。检测对比两组、有无淋巴结转移病人血清 FAS、E-cadherin、REG4 水平,分析各血清诊断价值及胃癌淋巴结转移的影响因素。随访 3 年,比较不同血清 FAS、E-cadherin、REG4 表达水平病人生存状况。结果 观察组血清 FAS[(62.38±20.79)ng/mL 比 (41.90±13.92)ng/mL]、REG4 水平[(5.93±1.97)ng/mL 比 (3.06±1.00)ng/mL]高于对照组,E-cadherin 水平低于对照组[(3.57±1.01)μg/mL 比 (8.36±2.78)μg/mL]($P<0.001$)。对于早期胃癌的诊断价值而言,E-cadherin AUC(0.793)>REG4(0.747)>FAS(0.735),三指标联合应用的价值更高,其灵敏度和特异度分别为 93.18%(82/88)、93.75%(75/80)。有淋巴结转移病人血清 FAS、REG4 水平高于无淋巴结转移病人,E-cadherin 水平低于无淋巴结转移病人($P<0.001$)。低分化、肿瘤最大径 ≥ 5 cm、黏膜下癌、血清 FAS ≥ 62.38 ng/mL、E-cadherin ≤ 3.57 μg/mL、REG4 ≥ 5.93 ng/mL 是胃癌淋巴结转移的重要影响因素($P<0.05$)。随访 3 年,FAS、E-cadherin、REG4 高表达组、低表达组生存曲线对比,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清 FAS、E-cadherin、REG4 水平可考虑作为诊断胃癌的潜在有效肿瘤标志物,其水平异常表达是胃癌淋巴结转移的独立危险因素。

关键词: 胃肿瘤; 早期诊断; 脂肪酸合酶; 上皮钙黏素; 再生蛋白 4; 淋巴结转移

Diagnostic value of serum fatty acid synthase, E-cadherin and REG4 levels in patients with early gastric cancer and their relationship with lymph node metastasis

CHEN Yanhong^a, XIE Yunxia^a, LIU Tao^b

Author Affiliation:^aDepartment of Operation,^bDepartment of Gastrointestinal Surgery,the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University,Zhengzhou,Henan 450052,China