

基于 TCGA 数据库分析 AHSA1 表达与肝细胞癌预后的相关性

王琦琦¹, 叶必成², 王昌成¹

(1. 徐州医科大学附属淮安医院 消化内科, 江苏 淮安, 223000;

2. 扬州市职业大学 医学院, 江苏 扬州, 225000)

摘要: **目的** 探讨热休克 90 kDa 蛋白 ATPase 同源物 1 的激活因子(AHSA1)在肝细胞癌(HCC)中的表达,分析 AHSA1 表达水平与预后的关系。**方法** 利用 HCCDB、GEPIA 和 Oncomine 数据库分析 AHSA1 mRNA 在 HCC 组织及正常肝组织中的表达情况。从癌症基因组图谱(TCGA)下载 HCC RNA-seq 表达和临床信息,使用单变量、多变量 Cox 比例风险回归模型以及 Kaplan-Meier 图来评估 AHSA1 预测肝癌预后的价值。利用 R 软件构建基于 AHSA1 表达水平的列线图,绘制校准曲线评估实际生存和预测生存的一致性。通过基因本体论(GO)、京都基因和基因组百科全书(KEGG)基因集富集分析揭示与 AHSA1 相关的肿瘤相关生物学过程。通过 TIMER2.0 及 GFPIA 数据库分析 HCC 中 AHSA1 的表达与肿瘤免疫浸润的相关性。通过 CMAP 筛选出作用于 AHSA1 的小分子靶向药物。**结果** HCC 组织中 AHSA1 的表达水平高于正常组织,差异有统计学意义($P < 0.01$)。AHSA1 高表达与 HCC 预后较差有相关性($P < 0.05$), AHSA1 高表达是影响 HCC 患者总体生存期(OS)的独立因素($HR = 1.970, P < 0.001$)。列线图显示 AHSA1 基因表达与 HCC 风险存在相关性,其预测 1、3、5 年 OS 的曲线下面积(AUC)分别为 0.721、0.711、0.725。校准图显示预测生存率曲线与实际生存率曲线具有较好的一致性。GO 和 KEGG 富集分析显示, AHSA1 可以通过介导中性粒细胞活化参与糖酵解、糖异生等生物学过程来促进肿瘤的进展。AHSA1 mRNA 表达水平与 B 细胞、CD4⁺ T 细胞、调节性 T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞的免疫浸润程度有相关性($P < 0.05$)。依他尼酸和布雷他汀可能是逆转 AHSA1 基因表达的小分子靶向药物。**结论** AHSA1 mRNA 可能是 HCC 潜在的致癌基因, AHSA1 mRNA 高水平表达可能促进 HCC 组织中免疫浸润,并且与 HCC 患者预后不良相关。

关键词: 肝细胞癌; 热休克 90 kDa 蛋白 ATPase 同源物 1 的激活因子; 生物信息学; 免疫浸润; 预后

中图分类号: R 735.7; R 318.04 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2022)01-008-10 **DOI:** 10.7619/jcmp.20213231

Correlation between AHSA1 expression and prognosis of hepatocellular carcinoma based on TCGA database analysis

WANG Qiqi¹, YE Bicheng², WANG Changcheng¹

(1. Department of Gastroenterology, Huai'an Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Huai'an, Jiangsu, 223000; 2. College of Medicine, Yangzhou Vocational University, Yangzhou, Jiangsu, 225000)

Abstract: Objective To investigate the expression of activator of heat shock 90 kDa protein ATPase homolog 1 (AHSA1) in hepatocellular carcinoma (HCC) and analyze the relationship between AHSA1 expression level and prognosis. **Methods** HCCDB, GEPIA and Oncomine databases were used to analyze the expression of AHSA1 mRNA in HCC and normal liver tissues. HCC RNA-seq expression and clinical information were downloaded from the Cancer Genome Atlas (TCGA), and univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models and Kaplan-Meier plots were used to evaluate the value of AHSA1 in predicting the prognosis of liver cancer. R software was used to construct the nomogram based on the expression level of AHSA1, and the calibration curve was plotted to evaluate the consistency between the actual survival and the predicted survival. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) gene set enrichment analyses

收稿日期: 2021-08-10

基金项目: 江苏省淮安市科学技术局重点研发计划(社会发展)项目(HAS2015017)

通信作者: 王昌成, E-mail: lovefallingsnow@126.com

were perform to reveal tumor-associated biological processes related to AHSA1. The TIMER2.0 and GPPIA database were used to evaluate the correlation between AHSA1 and tumor immune infiltration in HCC. Small molecule targeted drugs acting on AHSA1 were screened by CMAP. **Results** The expression level of AHSA1 in HCC tissues was significantly higher than that in normal tissues ($P < 0.01$). High expression of AHSA1 was associated with the poor prognosis of HCC ($P < 0.05$), and was an independent factor affecting overall survival (OS) ($HR = 1.970, P < 0.001$). The nomogram showed that AHSA1 gene expression was correlated with the risk of HCC, and the area under the curve (AUC) of predicting OS at 1 year, 3 and 5 years were 0.721, 0.711 and 0.725, respectively. The calibration chart showed that the predicted survival rate curve was in good agreement with the actual survival rate curve. GO and KEGG enrichment analysis showed that AHSA1 was able to promote tumor progression by mediating neutrophil activation and participating in biological processes such as glycolysis and gluconeogenesis. The expression level of AHSA1 mRNA was associated with the degrees of immune infiltration by B cells, $CD4^+$ T cells, regulatory T cells, macrophages, neutrophils and dendritic cells ($P < 0.05$). Etacrynic acid and blebbistatin might be the small molecule targeted drugs that can reverse the expression of AHSA1. **Conclusion** AHSA1 mRNA may be a potential oncogene in HCC, the high expression of AHSA1 mRNA may promote the immune infiltration of HCC tissues, and is associated with poor prognosis of HCC patients.

Key words: hepatocellular carcinoma; activator of heat shock 90 kDa protein ATPase homolog 1; bioinformatics; immune infiltration; prognosis

肝细胞癌(HCC)具有较高的病死率,大部分HCC患者首次诊断时已为中晚期,且总体治疗效果相对较差,5年生存率约为18%^[1]。热休克90 kDa蛋白ATPase同源物1的激活因子(AHSA1)是热休克蛋白90(HSP90)功能的一般上调剂,是真核细胞中必不可少的分子伴侣^[2-3]。共伴侣因子AHSA1的N端结构域与HSP90的中间结构域发生相互作用,诱导HSP90中间结构域催化环区形成稳定构象,随后AHSA1的C端结构域识别并结合发生二聚化的HSP90N端结构域,最终上调HSP90的三磷酸腺苷(ATP)水解功能^[4-5]。AHSA1伴侣分子具有独特的能力,能够显著增强人HSP90固有的低ATPase活性,其创建并维持称为“客户蛋白质”的蛋白质子集的功能构象,这是介导癌细胞增殖、存活和转移的多个信号网络的关键组成部分^[6]。相关研究发现AHSA1与乳腺癌^[7]、骨肉瘤^[8]、子宫内膜癌^[9]、多发性骨髓瘤^[10]等恶性肿瘤的发生发展均有显著相关性,但有关肝癌中AHSA1表达及功能的系统研究则较少。本研究基于多项队列综合地探索了AHSA1在HCC中的表达,并评估了AHSA1在HCC预后中的价值以及潜在的生物学机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 AHSA1在HCC中的差异性表达

通过HCCDB数据库(<http://lifeome.net/Database/hccdb/home.html>)对多个肝癌数据集检测AHSA1 mRNA在HCC组织中的表达水平。利用GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)及Oncomine数据库(<https://www.oncomine.org/>)检索AHSA1 mRNA在肝癌组织及癌旁组织中的表达。

1.2 AHSA1表达与肝癌患者生存预后的关系

通过Kaplan-Meier Plotter数据库(<http://kmplot.com/analysis/>)对AHSA1在HCC中的预后进行生存分析评估,包括总生存期(OS)、无复发生存期(RFS)、无进展生存期(PFS)和疾病特异性生存期(DSS)。从癌症基因组图谱(TCGA)下载HCC RNA-seq表达和临床数据,排除临床信息不完整的样本,利用R软件对TCGA数据库中提取的患者信息及AHSA1 mRNA的表达构建单因素和多因素Cox回归模型,评估影响HCC患者OS的危险因素。使用TCGA数据集中具有详细临床病理信息的患者资料(包括诊断时的年龄、肿瘤分级、肿瘤分期和AHSA1表达水平)来建立列线图,以预测肝癌患者的1、3、5年生存率。使用R软件构建受试者工作特征(ROC)曲线和校准图,评估

列线图的效率。

1.3 差异表达基因的筛选和功能分析

使用 R 软件的“wilcox.test”函数筛选 TCGA 数据库中肝癌患者肿瘤组织的不同 AHS1 表达组之间的差异表达基因 (DEGs)。DEGs 的截断标准为 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$, 错误发现率 (FDR) < 0.05 。通过使用 R 软件的“clusterProfiler”包进行功能富集分析, 以基因本体论 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 进行注释。GO 分为 3 个部分: 分子功能 (MF)、细胞组分 (CC) 和生物学过程 (BP), 其中 FDR < 0.05 被认为是显著富集。

1.4 免疫浸润相关性分析

使用 TIMER2.0 (<http://timer.cistrome.org/>) 数据库计算得出 AHS1 表达量与免疫细胞浸润情况的相关性。通过 GEPIA 数据库分析正常肝组织及 HCC 中的不同免疫细胞的免疫标记集与 AHS1 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)。

1.5 潜在小分子靶向药物的筛选

Connectivity map (<http://www.broad.mit.edu/cMap>) 是一个基因表达谱数据库。该网站搜集了利用小分子化合物处理后人类细胞基因表现的差异, 建立小分子化合物、基因表型与疾病相关联的生物应用数据库。将差异表达基因分为上调组与下调组, 分别输入 CMAP 数据库检索, 筛选出 $P < 0.01$ 的潜在小分子药物。

1.6 统计学分析

生存分析采用 Kaplan-Meier 法及 Log-rank 检验, 包括 Cox 回归模型评估影响 HCC 患者 OS 的危险因素, 计算 95% 可信区间 (95% CI) 和风险比 (HR), 其中 $P < 0.05$ 视为差异具有统计学意义。将单因素分析结果有统计学意义的变量纳入多因素 Cox 比例风险回归中, 用于确定肝癌患者的预后因素。建立列线图模型预测肝癌患者的 OS, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 R 4.0.2 软件进行统计学分析和绘图。富集分析以 FDR < 0.05 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 AHS1 在肝癌组织与正常组织中的表达差异

在 HCCDB 数据库中分析了 9 个 HCC 的基因集: HCCDB1 ($P = 0.000\ 005\ 880$)、HCCDB3 ($P =$

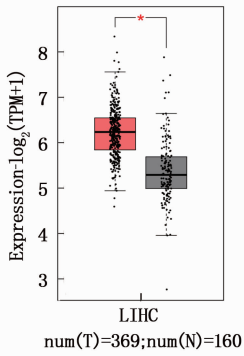
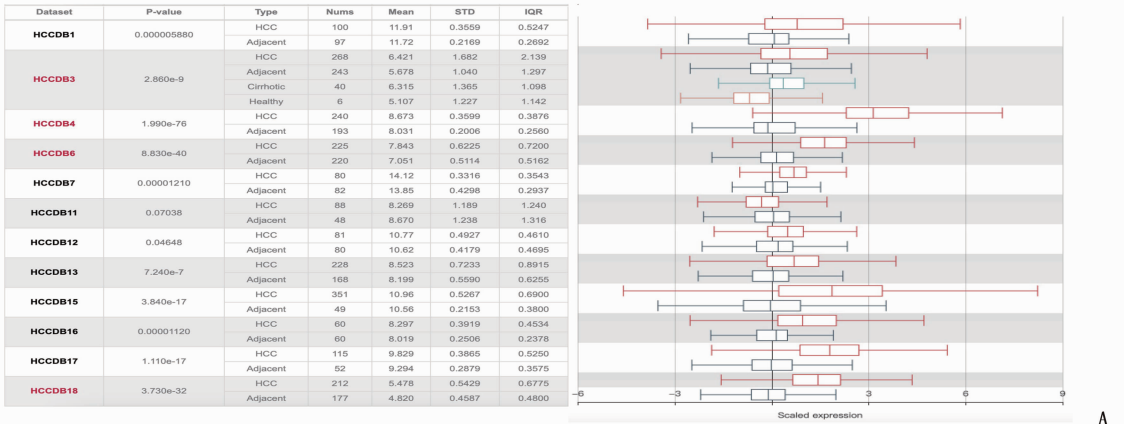
$2.860e - 9$)、HCCDB4 ($P = 1.990e - 76$)、HCCDB6 ($P = 8.830e - 40$)、HCCDB7 ($P = 0.000\ 012\ 10$)、HCCDB11 ($P = 0.070\ 38$)、HCCDB12 ($P = 0.046\ 48$)、HCCDB13 ($P = 7.240e - 7$)、HCCDB15 ($P = 3.840e - 17$)、HCCDB16 ($P = 0.000\ 011\ 20$)、HCCDB17 ($P = 1.110e - 17$)、HCCDB16 ($P = 3.730e - 32$), 发现与邻近的正常组织相比, AHS1 mRNA 在 HCC 组织中高表达 (图 1A)。

通过 GEPIA 分析 TCGA 数据库及 GTEx 数据库中合计 369 个肝癌样本及 160 个正常肝组织样本中 AHS1 的表达水平, 结果显示肝癌组织中的 AHS1 表达水平较正常肝组织升高, 差异有统计学意义 ($\log_2 \text{FC Cut-off} = 0.8$, $P < 0.001$) (图 1B)。进一步通过 Oncomine 数据库验证, 数据库中有 4 项研究符合筛选条件, 共包含 299 个肝癌组织样本及 261 个正常肝组织样本, 对其进行荟萃分析的结果显示, AHS1 在肝癌组织中的表达水平高于正常肝组织 ($P = 0.005$) (图 1C)。

2.2 AHS1 高表达的 HCC 患者具有相对较差的预后

为了进一步评估 AHS1 对 HCC 的预后价值, 作者使用了 Kaplan-Meier Plotter 在线工具对 TCGA 数据库的 HCC 患者进行生存分析, 结果显示, 与低表达组患者相比, AHS1 高表达组患者的预后生存更差, 表现为 OS [$HR = 1.51 (1.07 \sim 2.31)$, $P = 0.019$] 和 DSS [$HR = 1.67 (1.07 \sim 2.68)$, $P = 0.032$] 的差异有统计学意义, 而 PFS [$HR = 1.15 (0.83 \sim 1.61)$, $P = 0.40$] 和 RFS [$HR = 1.18 (0.83 \sim 1.69)$, $P = 0.36$] 的差异无统计学意义。见图 2。单因素 Cox 回归分析表明, 高 AHS1 表达与不良总生存率显著相关 [$HR = 2.115 (1.498 \sim 2.988)$, $P < 0.001$]; 多变量 Cox 分析表明, AHS1 基因表达是肝癌患者总体生存的独立危险因素 [$HR = 1.970 (1.395 \sim 2.782)$, $P < 0.001$]。见图 3。

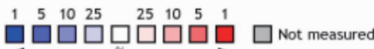
为了临床医生能够预测个体 HCC 患者死亡的风险、指导患者治疗、评估治疗决策, 本研究通过整合临床因素和 TCGA 数据集的基因表达来构建预后列线图 (图 4A), 同时绘制 ROC 曲线和校正曲线, 评估列线图的预测能力。校正曲线显示, 由列线图预测的风险与观察到的 1、3、5 年生存率具有高度一致性 (图 4B、C、D)。在 ROC 曲线中, 列线图预测 1、3、5 年生存率的曲线下面积 (AUC) 依次为 0.721、0.711、0.725 (图 4E、F、G)。



Median Rank	p-Value	Gene
1218.5	0.005	AHS1

Legend

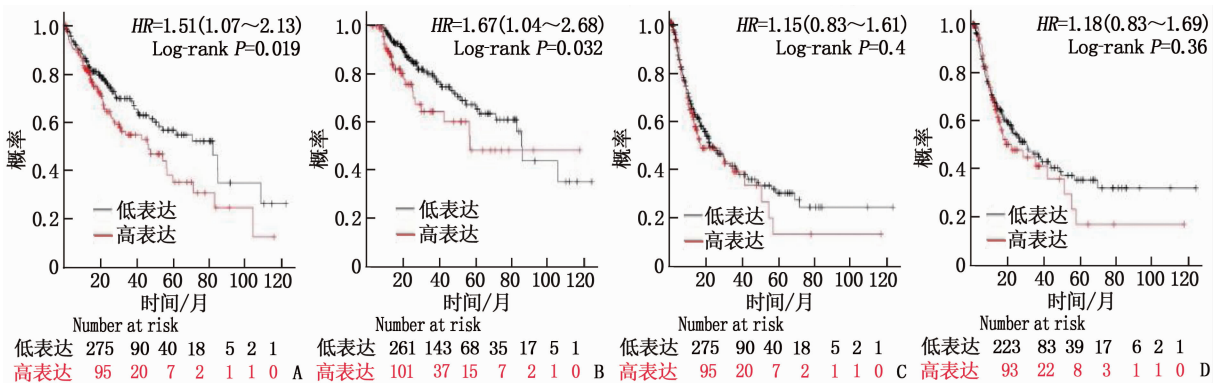
- Hepatocellular Carcinoma vs. Normal Roessler Liver, *Cancer Res, 2010*
- Hepatocellular Carcinoma vs. Normal Roessler Liver 2, *Cancer Res, 2010*
- Hepatocellular Carcinoma vs. Normal Wurmbach Liver, *Hepatology, 2007*
- Liver Cell Dysplasia vs. Normal Wurmbach Liver, *Hepatology, 2007*



The rank for a gene is the median rank for that gene across each of the analyses.
The p-Value for a gene is its p-Value for the median-ranked analysis.

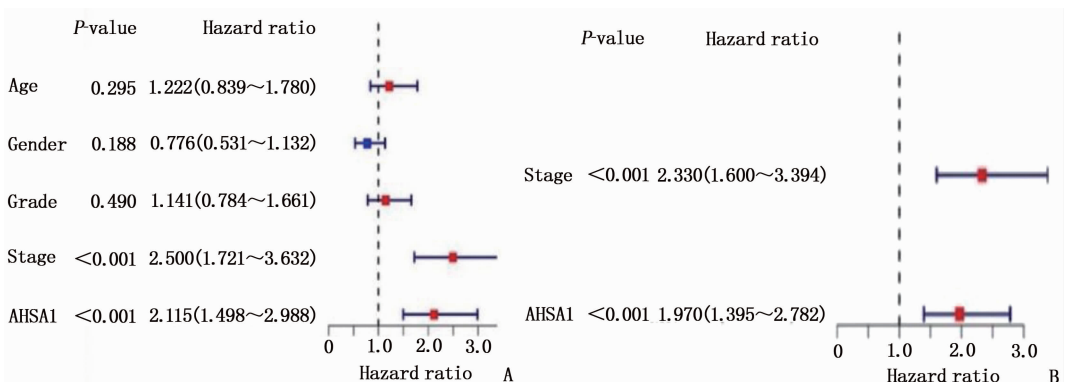
A: 不同 HCC 的基因集中 AHS1 mRNA 与临近正常组织的差异性表达; B: GEPIA 分析 TCGA 数据库及 GTEx 数据库中合计 369 个肝癌样本及 160 个正常肝组织样本中 AHS1 的表达水平; C: Oncomine 数据库对 4 项研究进行荟萃分析。

图 1 AHS1 mRNA 在 HCC 中高表达



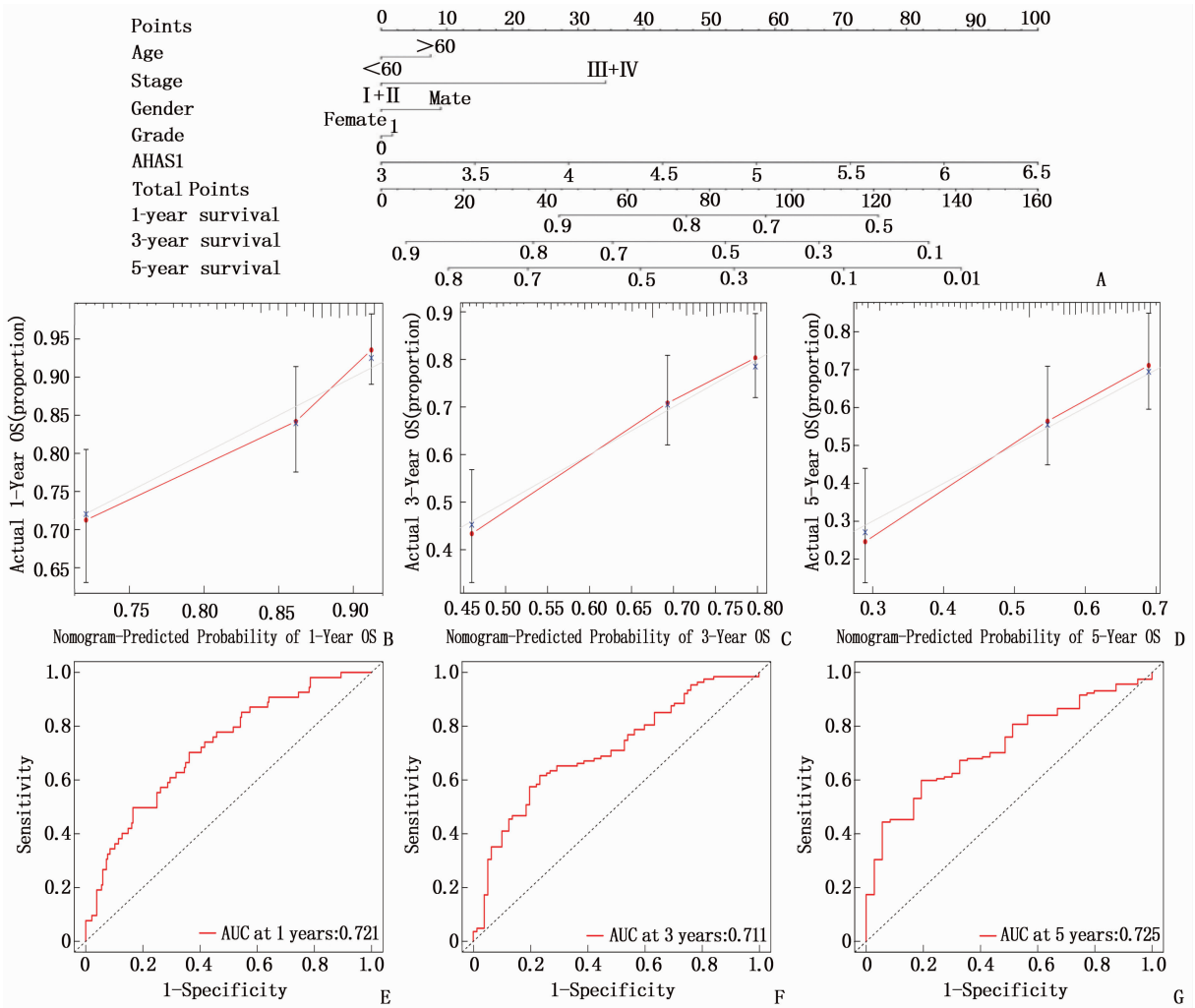
A: OS; B: DSS; C: PFS; D: RFS。

图 2 AHS1 高表达与低表达的 HCC 患者的预后分析



A: 单因素 Cox 回归分析; B: 多因素 Cox 回归分析。

图 3 AHS1 表达与 OS 的相关性分析



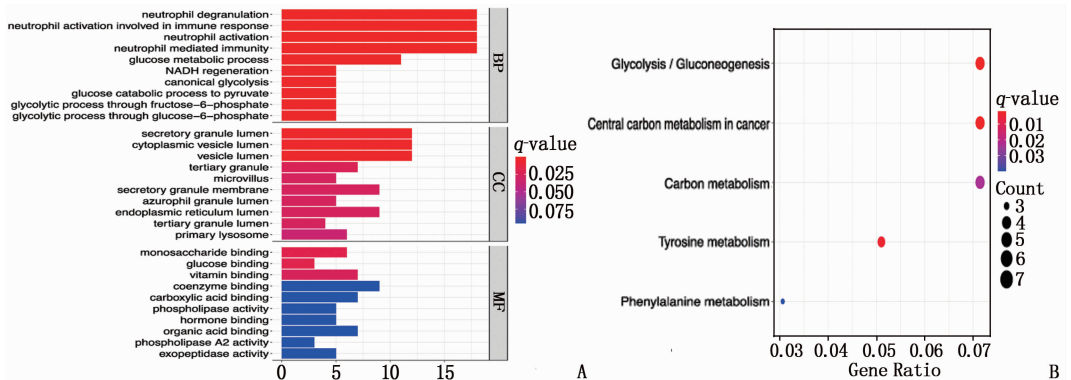
A: TCGA 肝癌队列中 AHSA1 与临床参数的列线图; B、C、D: 预测 TCGA 队列中 1、3、5 年生存率的列线图校准曲线; E、F、G: 基于 TCGA 队列的时间依赖性 ROC 曲线和 1、3、5 年 OS 的 AUC。

图 4 预后列线图的构建及预测能力

2.3 AHSA1 表达的生物学功能分析

GO 功能富集分析结果显示, AHSA1 差异表达基因在 BP 方面主要与介导中性粒细胞活化而参与免疫反应等有关; 在 CC 方面主要与分泌颗粒腔、胞质囊腔、分泌颗粒膜、内质网腔等有关; 在 MF 方面主要与辅酶绑定、维生素结合、羧酸结

合、有机酸结合等有关(图 5A)。KEGG 信号通路分析结果显示, AHSA1 差异表达基因主要富集于糖酵解/糖异生、癌症的中心碳代谢、酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢通路(图 5B)。KEGG 信号通路分析表明, AHSA1 的表达涉及肿瘤细胞能量代谢相关的信号转导过程。



A: HCC 中 AHSA1 表达的 GO 富集分析; B: HCC 中 AHSA1 表达的 KEGG 通路分析。

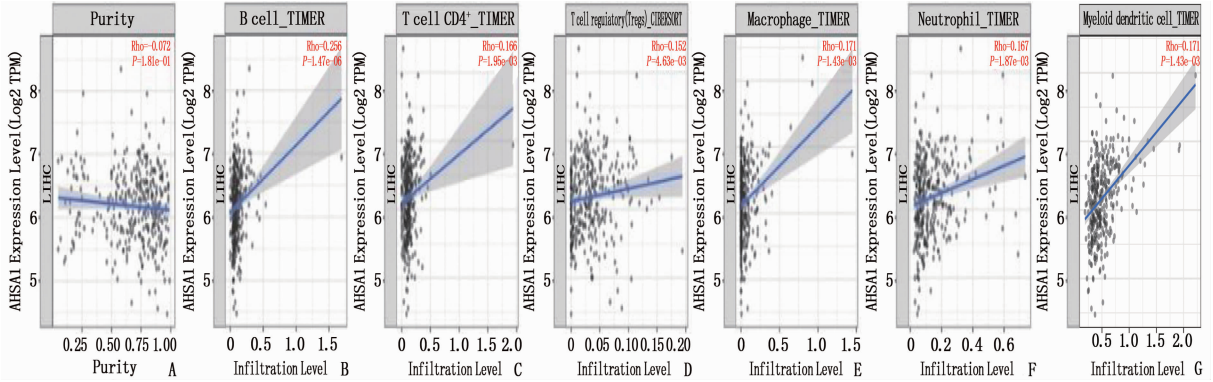
图 5 AHSA1 表达的生物学功能分析

2.4 HCC 中 AHSA1 表达与免疫浸润水平的相关性

采用 TIMER2.0 分析 AHSA1 表达与 HCC 免疫浸润之间的相关性,结果显示,AHSA1 表达与 B 细胞($r=0.256, P=1.47e-06$)、CD4⁺ T 细胞($r=0.166, P=1.95e-03$)、调节性 T 细胞($r=0.152, P=4.83e-03$)、巨噬细胞($r=0.171, P=1.43e-03$)、中性粒细胞($r=0.167, P=1.87e-03$)、树突状细胞($r=0.405, P=4.37e-15$)的免疫浸润程度有相关性,提示 AHSA1 可能参与肝癌

细胞的免疫浸润过程。见图 6。

为了进一步研究不同免疫浸润细胞与 AHSA1 的关系,作者研究了 GEPIA 数据库中正常肝组织和肝癌组织中的不同免疫细胞的免疫标记集与 AHSA1 的关系,结果显示,与正常肝组织相比,肝癌组织中 AHSA1 表达水平与部分免疫细胞的免疫标记集显著相关($cor > 0, P < 0.05$),这些结果进一步提示 AHSA1 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。见表 1-1、1-2。



A: B 细胞; B: CD4⁺ T 细胞; C: 调节性 T 细胞; D: 巨噬细胞; E: 中性粒细胞; F: 树突状细胞。

图 6 AHSA1 的表达与免疫细胞的关系

表 1-1 正常肝组织和 HCC 中的不同免疫细胞的免疫标记集与 AHSA1 的关系

免疫细胞	基因标志物	正常组织		肝癌组织	
		cor	P	cor	P
CD8 ⁺ T 细胞	CD8A	0.34	0.015	0.25	9.9e-07
	CD8B	0.37	0.007 7	0.30	4.0e-09
T 细胞	CD3D	0.26	0.063	0.25	9.6e-07
	CD3E	0.25	0.075	0.21	4.7e-05
B 细胞	CD2	0.17	0.24	0.22	1.3e-05
	CD19	0.32	0.025	0.1	0.085
单核细胞	CD79A	0.36	0.01	0.061	0.24
	CD86	0.3	0.036	0.39	1.2e-14
肿瘤相关巨噬细胞	CD115 (CSF1R)	0.36	0.009 4	0.34	1.6e-11
	CCL2	0.23	0.11	0.021	0.69
M1 巨噬细胞	CD68	0.42	0.002 5	0.29	8.3e-09
	IL10	0.13	0.38	0.41	2.2e-16
M2 巨噬细胞	INOS (NOS2)	0.19	0.19	-0.03	0.57
	IRF5	0.23	0.11	0.22	2.1e-05
中性粒细胞	COX2 (PTGS2)	0.18	0.2	0.039	0.45
	CD163	0.3	0.037	0.38	3.1e-14
自然杀伤细胞	VSIG4	0.32	0.022	0.36	9.6e-13
	MS4A4A	0.32	0.024	0.36	7.5e-13
自然杀伤细胞	CD66b (CEACAM8)	0.25	0.08	0.000 46	0.99
	CD11b (ITGAM)	0.43	0.001 7	0.2	8.9e-05
自然杀伤细胞	CCR7	0.35	0.014	0.068	0.19
	KIR2DL1	0.32	0.026	0.092	0.079
自然杀伤细胞	KIR2DL3	0.21	0.14	0.12	0.019
	KIR2DL4	0.25	0.082	0.16	0.001 6
自然杀伤细胞	KIR3DL1	0.27	0.061	0.12	0.019
	KIR3DL2	0.068	0.64	0.14	0.008 9
自然杀伤细胞	KIR3DL3	0.15	0.29	0.1	0.046
	KIR2DS4	0.008 9	0.86	0.14	0.33

表 1-2 正常肝组织和 HCC 中的不同免疫细胞的免疫标记集与 AHS1 的关系

免疫细胞	基因标志物	正常组织 cor		肝癌组织	
		cor	P	cor	P
树突状细胞	HLA-DPB1	0.3	0.033	0.24	2.4e-06
	HLA-DQB1	0.4	0.004 4	0.22	1.4e-05
	HLA-DRA	0.25	0.08	0.25	9.5e-07
	HLA-DPA1	0.23	0.11	0.18	0.000 57
	BDCA-1 (CD1C)	0.28	0.05	0.084	0.11
	BDCA-4 (NRP1)	0.46	0.000 89	0.36	2e-12
	CD11c (ITGAX)	0.16	0.28	0.19	0.000 17
Th1	T-bet (TBX21)	0.4	0.003 6	0.16	0.002 1
	STAT4	0.2	0.17	0.014	0.79
	STAT1	0.58	1e-05	0.14	0.007 4
	IFN-γ (IFNG)	0.27	0.058	0.21	5.9e-05
	TNF-α (TNF)	0.21	0.14	0.005 5	0.92
Th2	GATA3	0.13	0.36	0.39	9.3e-15
	STAT6	0.69	2.9e-08	0.097	0.063
	STAT5A	0.53	6.9e-05	0.19	3e-04
Tfh	IL13	-0.023	0.88	-0.028	0.59
	BCL6	0.012	0.94	0.078	0.14
Th17	IL21	0.19	0.18	0.023	0.66
	STAT3	0.18	0.2	0.099	0.058
调节性 T 细胞	IL17A	0.25	0.079	0.029	0.58
	FOXP3	0.31	0.027	-0.023	0.66
	CCR8	0.2	0.16	0.16	0.002 8
	STAT5B	0.44	0.001 3	0.1	0.05
T 细胞耗竭	TGFβ (TGFB1)	0.38	0.005 8	0.31	6.2e-10
	PD-1 (PDCD1)	0.4	0.004	0.14	0.007
	CTLA4	0.23	0.11	0.22	2e-05
	LAG3	0.21	0.15	0.26	3.6e-07
	TIM-3 (HAVCR2)	0.25	0.079	0.19	0.000 18
	GZMB	0.36	0.011	5.5e-05	0.21

2.5 治疗肝癌的小分子药物的筛选

为了筛选有价值的肝癌候选治疗药物,作者将选定的与 AHS1 表达有关的 DEGs(分为上调和下调)上传到 CMAP 数据库,然后将其与小分

子匹配,筛选出排名前 13 的小分子靶向药物 ($P < 0.01$),见表 2。在筛选出的药物中,依他尼酸和布雷他汀表现出显著的负评分,说明这两种小分子药物可以有效逆转肝癌细胞的 AHS1 表达。

表 2 CMAP 筛选出的可以逆转肝癌细胞 AHS1 表达的 13 种最重要的潜在小分子药物

排序	CMAP 名称	mean	n	富集分数	P
1	Ly-294002	-0.409	61	-0.445	0.000 01
2	斑鸠霉素 (ikarugamycin)	0.606	3	0.930	0.000 62
3	格隆溴铵 (glycopyrronium bromide)	-0.657	5	-0.799	0.000 70
4	依他尼酸 (etaerynic acid)	-0.691	3	-0.907	0.001 52
5	硫丙咪胺马来酸 (thiopramide)	0.590	5	0.724	0.003 72
6	羟甲唑啉 (oxymetazoline)	-0.589	4	-0.780	0.004 83
7	布雷他汀 (blebbistatin)	-0.749	2	-0.952	0.004 89
8	莫米松 (mometasone)	-0.469	4	-0.773	0.005 39
9	环己米特 (cicloheximide)	-0.451	4	-0.772	0.005 47
10	吐根碱 (emetine)	-0.481	4	-0.765	0.006 21
11	辛可宁 (cinchonine)	-0.242	4	-0.760	0.006 76
12	伏立诺他 (vorinostat)	-0.324	12	-0.455	0.008 26
13	哌西他嗪 (piperacetazine)	-0.443	4	-0.741	0.008 81

3 讨论

由于复杂的分子机制, HCC 仍是世界上最具威胁的恶性肿瘤之一, 尽管手术切除、肿瘤血管栓塞和射频消融可以提高生存率, 但 HCC 患者的预后依然很差, 免疫逃逸、侵袭和转移进一步降低了 HCC 患者的长期生存率。随着基因测序技术的发展, 已经发现了一些对肝癌患者具有预测价值的潜在基因标志物, 但这种生物标志物的数量仍然有限, 为了改善肝癌患者的预后, 需要发现更多具有较高预测准确性的生物标志物。

相关研究^[11]表明, 抑癌基因 p53 表达降低会导致 AHSA1 的表达升高; AHSA1 通过上调 HSP90 来激活其下游蛋白 MMP-2, MMP-2 在癌症细胞迁移、侵袭和血管生成中起重要作用^[12]; 通过调节 AHSA1 来调节 HSP90 活性会影响原发性血管内皮细胞中一氧化氮合成酶 (eNOS) 活性和血管内皮生长因子 (VEGF) 介导的作用, 内皮细胞中释放 NO 是 VEGF 刺激内皮细胞通透性和新生血管生成的重要介质。由此可见, AHSA1 的上调可以促进肿瘤组织血管的生成, 从而增强肿瘤细胞的增殖和转移。AHSA1 在骨肉瘤细胞中高表达, 而敲除 AHSA1 可以抑制细胞生长、迁移和侵袭, miRNA-338-3p 通过靶向 AHSA1 抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮细胞-间充质转化 (EMT)^[8, 13], 说明 AHSA1 在肿瘤细胞生长、迁移和侵袭中发挥重要作用。本研究发现, 肝癌组织中 AHSA1 mRNA 表达增加, 且与 HCC 患者的预后显著相关, 是预测 HCC 患者 OS 的独立危险因素, 表明 AHSA1 是 HCC 患者的潜在预后指标。另外, 本研究多因素 Cox 风险比例模型及列线图也进一步证明了 AHSA1 在 HCC 中的预后价值。

免疫细胞浸润和肿瘤微环境已被证实发生在癌症的发生发展中发挥着关键作用^[14], 免疫疗法可能是一种很有前景的抗肝癌策略。研究发现免疫疗法对多种类型的人类癌症有效, 如黑色素瘤^[15]和肺癌^[16], 但在肝癌中获益较小。大多数肝癌由乙型或丙型肝炎发展而来, 是一种炎症驱动的疾病, 研究^[17-18]表明免疫细胞浸润会加速慢性肝炎向肝癌的进展, 同时与肝癌患者的不良预后相关, 包括肿瘤相关巨噬细胞 (TAM)^[19]、CD4⁺ 调节性 T 细胞^[20]和骨髓来源的抑制性细胞 (MDSCs)^[21]等。在这种情况下, 调节肿瘤微环境中的免疫细胞浸润可能是治疗肝癌的一种新的有效策略。然

而, 肝癌细胞如何逃避免疫监视尚未完全阐明。本研究分析多个数据库表明 AHSA1 mRNA 表达水平与 B 细胞、CD4⁺ 调节性 T 细胞、调节性 T 细胞 (Tregs)、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞浸润增加有关, 且 GO 功能富集分析结果提示 AHSA1 生物学过程方面主要与介导中性粒细胞活化从而参与免疫反应等有关, 都表明 AHSA1 可能通过调节免疫微环境对肝癌预后产生负面影响。

Tregs 可以通过释放转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-10 (IL-10) 和白细胞介素-35 (IL-35) 来限制有效的抗肿瘤免疫反应, 从而促进肝癌进展^[22-23]; 肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 浸润可以通过表达细胞因子和趋化因子吸引 Tregs 至癌症部位, 从而抑制抗肿瘤免疫并促进肝癌进展^[24], 同时促进肝癌的远处转移^[25]。CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 是用于靶向癌症的首选免疫细胞^[26], 效应 CTL 会浸润到肿瘤的核心或浸润部位, 在杀死癌细胞方面发挥重要作用, 但是肿瘤细胞可以通过变换表型躲避 CTL 细胞识别和杀伤, 促进肿瘤细胞侵袭和抑制肿瘤免疫治疗, 并且这种作用受到如癌症相关成纤维细胞 (CAF)、Tregs 和 M2 型巨噬细胞的干扰^[27]。研究^[24]表明 AHSA1 是肿瘤免疫逃逸的核心基因之一。本研究结果提示, AHSA1 的表达与 Tregs 和巨噬细胞浸润相关, 也间接表明 AHSA1 的表达可能通过 Tregs 和 M2 型巨噬细胞浸润而触发 CTL 免疫逃逸, 导致肿瘤进一步恶化。该研究为进一步探索基于免疫的肝癌新疗法提供了参考。

目前临床上已涌现了许多相关药物研究, 使用抑制剂破坏 HSP90 α /AHSA1 复合物, 引起 HSP90 α 和 AHSA1 在细胞质的重新分布, 并减少细胞迁移^[28-29]。类黄酮 TL-2-8 可以通过减少 HSP90-AHSA1 复合物的形成来诱导乳腺癌细胞的死亡, 起到抗癌作用^[7]。本研究主要从 CMAP 数据库中筛选出两种可能逆转肝癌基因表达的小分子靶向药物: 依他尼酸和布雷他汀。依他尼酸是谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的抑制剂, 而 GST 在肝细胞的表达与癌前病变及肿瘤发生有关, 并导致耐药表型出现, 因此依他尼酸可以通过抑制 GST 来发挥抗癌作用^[30]。索拉非尼是用于治疗肝癌的常用靶向分子药物, 与依他尼酸协同可以发挥更好的抗癌效果^[31]。依他尼酸和环吡酮胺 (CPX) 联合对肝癌细胞具有强大的协同抗肿瘤作用^[32]。布雷他汀是一种肌球蛋白抑制剂, 肌球蛋

白 II ATP 酶的过度活性与肿瘤转移和侵袭有关^[33], 使用布雷他汀特异性抑制非肌肉肌球蛋白 II 证实了该分子在胰腺腺癌细胞、乳腺癌细胞侵袭和细胞外基质相互作用中的关键作用^[34-35], 但尚无布雷他汀在肝癌中的研究。后续需要更多的实验证据和长期临床试验来验证依他尼酸和布雷他汀在肝癌治疗中的作用。

综上所述, 本研究提供了关于 AHSA1 在肿瘤发生和发展中的重要性及其作为 HCC 新型指标的潜力的多层次线索。尽管大数据分析可以全面、快速地挖掘潜在数据和功能性生物分子, 但各种假阳性结果是不可避免的。本研究主要是为功能基因的筛选提供一种快速、简便的方法, 提示 AHSA1 可能成为判定 HCC 患者预后的分子标志物和新的治疗靶点, 证实了 AHSA1 在 HCC 中的重要作用, 但后续仍需进一步进行实验分析和临床验证。

参考文献

- [1] JEMAL A, WARD E M, JOHNSON C J, *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975 - 2014, Featuring Survival [J]. J Natl Cancer Inst, 2017, 109(9): dx030.
- [2] OROZ J, BLAIR L J, ZWECKSTETTER M. Dynamic Ahal co-chaperone binding to human Hsp90 [J]. Protein Sci, 2019, 28(9): 1545 - 1551.
- [3] WORTMANN P, GÖTZ M, HUGEL T. Cooperative Nucleotide Binding in Hsp90 and Its Regulation by Ahal [J]. Biophys J, 2017, 113(8): 1711 - 1718.
- [4] HOLMES J L, SHARP S Y, HOBBS S, *et al.* Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allyl-amino-17-demethoxygeldanamycin [J]. Cancer Res, 2008, 68(4): 1188 - 1197.
- [5] WOLMARANS A, LEE B, SPYRACOPOULOS L, *et al.* The Mechanism of Hsp90 ATPase Stimulation by Ahal [J]. Sci Rep, 2016, 6: 33179.
- [6] WANDINGER S K, RICHTER K, BUCHNER J. The Hsp90 chaperone machinery [J]. J Biol Chem, 2008, 283(27): 18473 - 18477.
- [7] LIU H J, JIANG X X, GUO Y Z, *et al.* The flavonoid TL-2-8 induces cell death and immature mitophagy in breast cancer cells via abrogating the function of the AHA1/Hsp90 complex [J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(10): 1381 - 1393.
- [8] ZHENG D, LIU W, XIE W, *et al.* AHA1 upregulates IDH1 and metabolic activity to promote growth and metastasis and predicts prognosis in osteosarcoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 25.
- [9] ZHANG Y, ZHANG Y, LIN Q H. Progesterone-modulated proteins in human endometrial cancer cell line Ishikawa [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2006, 26(8): 1110 - 1113.
- [10] HEIDER M, EICHNER R, STROH J, *et al.* The IMiD target CRBN determines HSP90 activity toward transmembrane proteins essential in multiple myeloma [J]. Mol Cell, 2021, 81(6): 1170 - 1186, e10.
- [11] KOCHHAR A, KOPELOVICH L, SUE E, *et al.* p53 modulates Hsp90 ATPase activity and regulates aryl hydrocarbon receptor signaling [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2014, 7(6): 596 - 606.
- [12] BAKER-WILLIAMS A J, HASHMI F, BUDZYNSKI M A, *et al.* Co-chaperones TIMP2 and AHA1 Competitively Regulate Extracellular HSP90: Client MMP2 Activity and Matrix Proteolysis [J]. Cell Rep, 2019, 28(7): 1894 - 1906, e6.
- [13] CAO R, SHAO J, HU Y, *et al.* microRNA-338-3p inhibits proliferation, migration, invasion, and EMT in osteosarcoma cells by targeting activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 [J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 49.
- [14] KLAUSCHEN F, MÜLLER K R, BINDER A, *et al.* Scoring of tumor-infiltrating lymphocytes: From visual estimation to machine learning [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 52(Pt 2): 151 - 157.
- [15] LIPSON E J, DRAKE C G. Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(22): 6958 - 6962.
- [16] HELLMANN M D, NATHANSON T, RIZVI H, *et al.* Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. Cancer Cell, 2018, 33(5): 843 - 852, e4.
- [17] ZHANG H H, MEI M H, FEI R, *et al.* Regulatory T cells in chronic hepatitis B patients affect the immunopathogenesis of hepatocellular carcinoma by suppressing the anti-tumour immune responses [J]. J Viral Hepat, 2010, 17(Suppl 1): 34 - 43.
- [18] HONG G Q, CAI D, GONG J P, *et al.* Innate immune cells and their interaction with T cells in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2021, 21(1): 57.
- [19] LIU J, FAN L, YU H, *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Causes Liver Cancer Cells to Release Exosomal miR-23a-3p and Up-regulate Programmed Death Ligand 1 Expression in Macrophages [J]. Hepatology, 2019, 70(1): 241 - 258.
- [20] FU J, XU D, LIU Z, *et al.* Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2328 - 2339.
- [21] ARIHARA F, MIZUKOSHI E, KITAHARA M, *et al.* Increase in CD14⁺ HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis [J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(8): 1421 - 1430.
- [22] LANGHANS B, NISCHALKE H D, KRÄMER B, *et al.* Role of regulatory T cells and checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2019, 68(12): 2055 - 2066.
- [23] HINDLEY J P, FERREIRA C, JONES E, *et al.* Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating convention-

- al and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3): 736-746.
- [24] LU C, RONG D, ZHANG B, *et al.* Current perspectives on the immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: challenges and opportunities[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 130.
- [25] KITAMURA T, QIAN B Z, POLLARD J W. Immune cell promotion of metastasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(2): 73-86.
- [26] BORST J, AHRENDTS T, BABALA N, *et al.* CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(10): 635-647.
- [27] FARHOOD B, NAJAFI M, MORTEZAEI K. CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8509-8521.
- [28] GHOSH S, SHINOGL E, GARG G, *et al.* Hsp90 C-terminal inhibitors exhibit antimigratory activity by disrupting the Hsp90 α /Aha1 complex in PC3-MM2 cells[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(2): 577-590.
- [29] STIEGLER S C, RÜBBELKE M, KOROTKOV V S, *et al.* A chemical compound inhibiting the Aha1-Hsp90 chaperone complex[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(41): 17073-17083.
- [30] PARODY J P, ALVAREZ MDE L, QUIROGA A, *et al.* Hepatocytes isolated from preneoplastic rat livers are resistant to ethacrynic acid cytotoxicity[J]. *Arch Toxicol*, 2007, 81(8): 565-573.
- [31] MISHRA M, JAYAL P, KARANDE A A, *et al.* Identification of a co-target for enhancing efficacy of sorafenib in HCC through a quantitative modeling approach[J]. *Febs j*, 2018, 285(21): 3977-3992.
- [32] AL-DALI A M, WEIHER H, SCHMIDT-WOLF I G H. Utilizing ethacrynic acid and ciclopirox olamine in liver cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6854-6860.
- [33] ROMAN B I, VERHASSELT S, STEVENS C V. Medicinal Chemistry and Use of Myosin II Inhibitor (S)-Blebbistatin and Its Derivatives[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(21): 9410-9428.
- [34] DUXBURY M S, ASHLEY S W, WHANG E E. Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness by blebbistatin: a novel myosin II inhibitor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4): 992-997.
- [35] DERYCKE L, STOVE C, VERCOUTTER-EDOUART A S, *et al.* The role of non-muscle myosin II A in aggregation and invasion of human MCF-7 breast cancer cells[J]. *Int J Dev Biol*, 2011, 55(7-9): 835-840.

(本文编辑: 梁琥)

(上接第 7 面)

- [37] JU P C, HO Y C, CHEN P N, *et al.* Kaempferol inhibits the cell migration of human hepatocellular carcinoma cells by suppressing MMP-9 and Akt signaling[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(10): 1981-1989.
- [38] HONG Z S, ZHUANG H B, QIU C Z, *et al.* Tenacissoside H induces apoptosis and inhibits migration of colon cancer cells by downregulating expression of GOLPH₃ gene[J]. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2020, 2020: 2824984.
- [39] JIA Y S, HU X Q, GABRIELLA H, *et al.* Antitumor activity of tenacissoside H on esophageal cancer through arresting cell cycle and regulating PI3K/Akt-NF- κ B transduction cascade[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 464937.
- [40] SAKTHIVEL K M, VISHNUPRIYA S, PRIYA DHARSHINI L C, *et al.* Modulation of multiple cellular signalling pathways as targets for anti-inflammatory and anti-tumorigenesis action of Scopoletin[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021. [Epub Ahead of Print]
- [41] MIRZAEI S, GHOLAMI M H, ZABOLIAN A, *et al.* Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: New hope in the fight against cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105759.
- [42] WU Y J, LIN S H, DIN Z H, *et al.* Sinulariolide Inhibits Gastric Cancer Cell Migration and Invasion through Downregulation of the EMT Process and Suppression of FAK/PI3K/AKT/mTOR and MAPKs Signaling Pathways [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12): 668.
- [43] HÜSER L, SACHINDRA S, GRANADOS K, *et al.* SOX2-mediated upregulation of CD24 promotes adaptive resistance toward targeted therapy in melanoma [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(12): 3131-3142.
- [44] LEE J J, VAN DE VEN R A H, ZAGANJOR E, *et al.* Inhibition of epithelial cell migration and Src/FAK signaling by SIRT3[J]. *PNAS*, 2018, 115(27): 7057-7062.
- [45] CANAUD G, HAMMILL A M, ADAMS D, *et al.* A review of mechanisms of disease across PIK3CA-related disorders with vascular manifestations[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2021, 16(1): 306.
- [46] FUCHS C S, TOMASEK J, YONG C J, *et al.* Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2014, 383(9911): 31-39.
- [47] LI J, QIN S, XU J, *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of apatinib in patients with chemotherapy-refractory advanced or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(13): 1448-1454.
- [48] 胡永进, 杜学明, 吴春娃, 等. 胃癌靶向治疗研究进展[J]. *现代诊断与治疗*, 2021, 32(6): 870-871, 964.
- [49] 世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南[J]. *世界中医药*, 2021, 16(4): 527-532.
- [50] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读[J]. *中草药*, 2021, 13(14): 4119-4129.

(本文编辑: 周冬梅)