

基于TCGA数据库和实验验证分析肝细胞癌中PLC β 4基因的表达及临床意义

文丽梅^{1,2}, 郭娅丽^{2,3}, 侯强³, 郑董璇³, 代武³, 高翔³, 杨建华¹, 胡君萍^{2,3}

Expression and Clinical Significance of PLC β 4 Gene in Hepatocellular Carcinoma Analyzed Based on TCGA Database and Experimental Validation

WEN Limei^{1,2}, GUO Yali^{2,3}, HOU Qiang³, ZHENG Dongxuan³, DAI Wu³, GAO Xiang³, YANG Jianhua¹, HU Junping^{2,3}

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. State Key Laboratory of Neurology and Oncology Drug Development, Nanjing 210042, China; 3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China

Corresponding Authors: HU Junping, E-mail: hjp_yxy@163.com; YANG Jianhua, E-mail: yjh-yfy@163.com

Abstract: Objective To analyze the PLC β 4 gene mRNA expression and its clinical significance in hepatocellular carcinoma (HCC) based on TCGA database. **Methods** Based on the data on 424 clinical samples (including 374 cases of HCC tissues and 50 cases of nontumor liver tissues) in the TCGA database, Kaplan–Meier method, Cox regression analysis, and immune infiltration analysis were performed to evaluate the relationship between PLC β 4 gene and the clinical characteristics and survival prognosis of HCC patients. Correlation analysis between PLC β 4 gene and 24 types of immune cells was applied to investigate the relationship between PLC β 4 gene and immune cell infiltration and mRNA expression level of TP53 gene, a high-frequency mutation gene in HCC. In addition, paraffin sections of highly, moderately, and poorly differentiated tumor tissues and normal liver tissues from HCC patients were collected. The histopathological observation was carried out via HE staining method, and the expression levels of PLC β 4 and Ki-67 proteins in each clinical sample were verified through the immunohistochemical method. **Results** The expression level of PLC β 4 gene in HCC was significantly higher than that in normal tissues ($P < 0.01$), and all patients in the PLC β 4 high-expression group had a significantly longer overall survival than those in the low-expression group ($P < 0.05$), which suggested that PLC β 4 substantially affected the prognosis of HCC patients. Correlation analysis showed that the expression level of PLC β 4 gene was highly correlated with immune cell infiltration and the expression level of TP53 gene. As verified by clinical sample experiments, HE staining experiments and immunohistochemical results revealed that PLC β 4 gene expression in HCC tissue samples was significantly higher than that in normal tissues ($P < 0.001$), and it was negatively correlated with the degree of differentiation. **Conclusion** PLC β 4 may serve as an independent prognostic factor in HCC and is expected to be a novel molecular target for HCC treatment.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Phospholipase-C β 4 gene; TCGA database; Phosphatidylinositol signaling genes

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 82360795); The State Key Laboratory of

收稿日期: 2024-10-25; 修回日期: 2025-03-19

基金项目: 国家自然科学基金 (82360795); 神经与肿瘤药物研发全国重点实验室开放研究课题 (SKLSIM-F-2024206); 新疆维吾尔自治区2024年度“天山英才”医药卫生高层次人才培养计划-中青年骨干医疗人才 (TSYC202401 B014); 公立医院高质量发展科研公益项目 (GL-A005)

作者单位: 1. 830011 乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院药学部; 2. 210042 南京, 神经与肿瘤药物研发全国重点实验室; 3. 830017 乌鲁木齐, 新疆医科大学药学院

通信作者: 胡君萍, 女, 博士, 教授, 主要从事天然药物研究与开发, E-mail: hjp_yxy@163.com, ORCID: 0009-0007-6095-7735; 杨建华, 男, 博士, 教授, 主要从事天然药用资源的开发与利用研究, E-mail: yjh-yfy@163.com, ORCID: 0009-0005-8527-3415

作者简介: 文丽梅, 女, 博士, 副主任药师, 主要从事中药药理学研究, ORCID: 0000-0003-3714-4107

Neurology and Oncology Drug Development Fund (No. SKLSIM-F-2024206); Xinjiang Uygur Autonomous Region 2024 "Tianshan Talents" Medical and Health High-level Talent Training Program-Young and Middle-aged Backbone Medical Talents (No. TSYC202401B 014); Public Hospital High Quality Development Scientific Research Public Welfare Project Fund (No. GL-A005)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 基于癌症基因组图谱

(TCGA)数据库分析肝细胞癌中PLC-β4基因mRNA的表达及其临床意义。**方法** 基于TCGA数据库中的424例临床样本资料(包括肝细胞癌组织374例,非肿瘤肝组织50例),采用Kaplan-Meier法、Cox回归分析、免疫浸润分析,评估PLCβ4基因与HCC患者临床特征及生存预后的关系。应用PLCβ4基因与24种免疫细胞的相关性分析,观察PLCβ4基因与免疫细胞浸润的关系及与肝癌高频突变基因TP53 mRNA表达水平的相关性。另外收集新疆医科大学第一附属医院病理科HCC患者的高、中、低分化肿瘤组织以及正常肝组织石蜡切片各20例,HE染色法进行组织病理学观察,免疫组织化学法对各临床样本中PLCβ4、Ki-67蛋白表达水平进行验证。**结果** PLCβ4基因在HCC中的表达水平显著高于正常组织($P<0.01$),且PLCβ4高表达患者的总生存期均明显长于低表达者($P<0.05$),提示PLCβ4显著影响HCC患者预后。相关性分析结果显示PLCβ4基因的表达水平与免疫细胞浸润高度相关;且PLCβ4与TP53基因的表达水平高度相关。HCC组织样本中的PLCβ4基因表达显著高于正常组织($P<0.001$),且与分化程度呈负相关关系。**结论** PLCβ4可作为肝细胞癌的一个独立预后因素,有望成为HCC治疗的新型分子靶点。

关键词: 肝细胞癌; PLCβ4基因; TCGA数据库; 磷脂酰肌醇信号系统

中图分类号: R735.7

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

肝癌已成为全球第三大癌症相关死亡原因,其中肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)的发病率约占原发性肝脏恶性肿瘤的85%以上^[1]。随着经济的发展和生活方式的改变,HCC的发病趋于年轻化且生存率无明显改善^[2],主要原因是其发病隐匿性强、肿瘤转移速度快及预后较差^[3-4]。因此,寻找早期筛查和诊断的新型分子靶标,是改善HCC预后的关键。

磷酸肌醇特异性磷脂酶-Cβ4基因(Phospholipase-Cβ4 gene, PLCβ4)编码磷脂酶同工酶β4蛋白,属于调节肌醇脂质代谢的超家族,参与肿瘤的迁移、侵袭和耐药^[5-6]。PLCβ4可将膜结合的磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP2)水解为肌醇1,4,5-三磷酸(IP3)和二酰基甘油(DAG),二者作为细胞内磷脂酰肌醇信号转导途径中重要的第二信使,在细胞内信号转导中起重要作用。DAG介导蛋白激酶C的活化,而IP3触发钙从细胞内储库释放^[7-8]。研究表明,PLCβ4表达增加与间皮瘤、黑色素瘤和胃肠道肿瘤等实体瘤患者的低生存率密切相关^[5,9-10]。文献报道,PLCβ4在人乳腺癌细胞MCF-7中差异表达,并与肿瘤多药耐药相关^[11],但该基因在HCC中的表达鲜有报道。基于上述研究背景,PLCβ4作为

脂质代谢的关键基因在多种恶性实体瘤中异常表达,且在抑制肿瘤细胞增殖和转移方面的机理亟待挖掘,提示PLCβ4可作为磷脂酰肌醇信号通路的潜在关键靶标。因此,有必要深入研究PLCβ4基因参与HCC发生发展的机制。

本研究通过分析TCGA数据库和临床肝癌及癌旁组织标本中PLCβ4基因的差异表达,分析PLCβ4表达与患者临床病理参数及预后的相关性,并对PLCβ4与免疫浸润及肝癌高频突变基因TP53的相关性进行评价。此外,本研究还利用临床样本对分析结果进行验证,旨在为HCC的诊断、治疗和预后评估提供诊疗标志物和治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 生物信息学分析

1.1.1 数据来源和预处理 自TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)收集HCC项目中level 3 HTSeq-FPKM格式的RNAseq数据,包含374例HCC组织样本和50例癌旁组织样本的mRNA表达谱及临床数据。利用软件StrawBerry Perl5.30.1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^[12]。

1.1.2 PLCβ4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肿瘤组织样本和癌旁组织样本中PLCβ4基因的mRNA表达量数据进行分析,比较PLCβ4基因在HCC样本和正常样本中的表达差异。

1.1.3 PLCβ4基因生存预后分析 利用R4.0.2软件的survminer R包对mRNA原始数据进行处理,并经log2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PLCβ4基因的中位表达水平为界限,分为低表达组和高表达组^[13]。通过Kaplan-Meier法分析两组之间总体生存期(Overall survival, OS)的差异,基于Cox回归模型计算危险比(Hazard ratio, HR),评价该基因对HCC患者生存预后的影响,并使用单因素和多因素Cox回归分析PLCβ4在HCC中的预后价值。

1.1.4 PLCβ4与临床病理特征的相关性分析

1.1.4.1 ROC曲线方法筛选具有诊断能力的基因 通过Med Calc软件制作患者分类特征曲线(ROC曲线),ROC曲线下面积(AUC)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^[14]。

1.1.4.2 PLCβ4与临床病理特征的相关性分析 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PLCβ4基因表达分为两组,通过卡方检验,分析PLCβ4基因高/低表达与临床病理特征之间的关系。

1.1.5 PLCβ4与免疫细胞浸润的相关性分析 考察PLCβ4与24种免疫细胞^[15]的相关性,通过HCC基因表达谱定量免疫细胞,过滤掉 $P<0.05$ 的样本后,采用 t 检验对肿瘤组和正常组中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。

1.1.6 PLCβ4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着重要作用^[16]。利用Spearson对PLCβ4与TP53及基因相互之间的相关性进行检验。

1.2 临床样本验证实验

1.2.1 临床样本来源 收集2023年1月—2024年5月在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,其中,高、中、低分化HCC组织各20例,以及同时期20例取活检并经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,用于PLCβ4蛋白的免疫组织化学染色验证实验。本研究获得本院伦理委员会的批准(K202403-66)。

纳入标准: 肿瘤切除部位为肝脏且术后经病理组织学证实为HCC患者; **排除标准:** (1) 肿瘤切除部位为肝外胆管、胆囊等其他部位者; (2) 合并晚期肝病(肝功能衰竭、肝腹水等)者; (3) 合并其他重要脏器损伤者; (4) 有凝血功能障碍者; (5) 为弥散性肝癌者。

1.2.2 试剂 PLCβ4抗体(货号: PA5-64922; 北京博奥森生物技术有限公司); HRP-山羊抗兔IgG聚合物二抗(货号: 2323D0619; 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); DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2.3 组织病理学及蛋白表达检测 采用随机数字表法,分别取高、中、低分化程度的HCC组织与正常肝脏组织蜡块,5 μm厚切片,HE染色,在光学显微镜下观察。

免疫组织化学染色步骤按照试剂盒说明书并结合近期文献报道^[17]进行染色及评价。经常规石蜡切片、热抗原修复、灭活内源酶活性、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB显色、苏木精对比染色、盐酸

酒精分化、脱水、封片观察。PLCβ4表达于细胞质, Ki-67表达于肿瘤细胞核, 阳性细胞呈浅黄色至棕黄色颗粒。染色结果判断: 由两位资深病理医师采用双盲法读片, 以阳性细胞率和染色强度(即阳性强度)作为判断标准。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析, 计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 t 检验; 计数资料用百分率表示, 两组间比较采用 χ^2 检验、Wilcoxon秩和检验。对HCC患者的年龄、性别、TNM分期等临床指标进行量化赋值, 利用Cox比例回归模型进行单因素和多因素分析, 生存分析采用Kaplan-Meier法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLCβ4在HCC组织中的表达

根据TCGA数据库中HCC患者的基因表达数据, 发现PLCβ4基因在HCC中的表达水平显著高于正常组织($P<0.001$), 见图1。

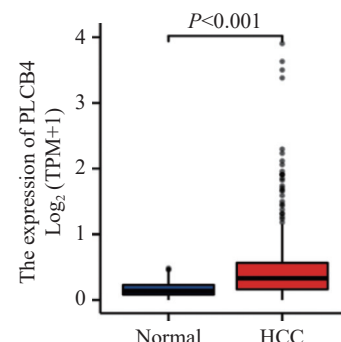


图1 基于TCGA数据库分析PLCβ4基因在HCC组织中的表达

Figure 1 Analysis of PLCβ4 gene expression in HCC tissues based on TCGA database

2.2 PLCβ4基因对HCC患者生存预后的影响

2.2.1 总体生存期(OS)曲线 OS曲线结果显示PLCβ4高表达组患者的总生存期均明显长于低表达组($P<0.05$), 见图2。结合2.1项下PLCβ4基因在HCC样本和正常样本中的差异表达情况, 提示PLCβ4基因的表达情况显著影响HCC患者的预后。

2.2.2 PLCβ4与HCC患者预后的关系 单因素Cox回归分析结果显示, 肿瘤T分期、M分期、病理分期、有无肿瘤、残余肿瘤和PLCβ4的表达水平与患者的OS存在相关性($P<0.05$); 将单因素Cox回归分析中具有统计学意义的因素纳入多因素Cox回归分析, 发现肿瘤状况和PLCβ4的表达水平与患者OS存在相关性($P<0.05$), 见表1。

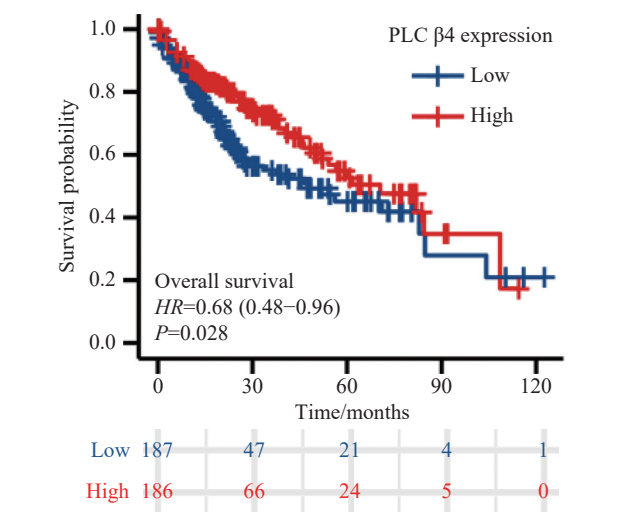


图 2 基于TCGA数据库分析PLCβ4基因的表达对HCC患者预后的影响

Figure 2 Effect of PLCβ4 gene expression on the prognosis of HCC patients analyzed based on TCGA database

2.3 PLCβ4与临床病理特征的相关性

PLCβ4对HCC患者的总生存期影响的AUC为0.780，表明PLCβ4预后风险模型在生存预测方面具有预测价值，见图3。

PLCβ4的表达水平与TNM分期、凝血酶原时间、甲胎蛋白（AFP）、有无肿瘤、组织学分级和病理分期均无显著相关性（均 $P>0.05$ ）；60岁以下患者的PLCβ4表达量显著高于60岁以上患者（ $P<0.01$ ），见图4。

2.4 PLCβ4与免疫微环境的关系

结果显示，PLCβ4在肿瘤组织T细胞、浆细胞样树突状细胞、自然杀伤细胞、CD56⁺自然杀伤细胞、CD8⁺T细胞、B细胞、T辅助细胞、效应记忆性T细胞、辅助性滤泡T细胞和辅助型T细胞等16种免疫细胞中的表达差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。PLCβ4基因表达水平与这16种免疫细胞的数量均呈

表 1 HCC患者临床特征与PLCβ4基因表达的单因素和多因素Cox回归分析

Table 1 Univariate and multivariate Cox regression analyses of clinical characteristics and PLCβ4 gene expression in HCC patients

Clinical characteristics	n	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
T stage					
T1-T2	277	Reference			
T4-T3	93	2.598 (1.826-3.697)	<0.001	1.606 (0.212-12.182)	0.647
N stage					
N0	254	Reference			
N1	4	2.029 (0.497-8.281)	0.324		
M stage					
M0	268	Reference			
M1	4	4.077 (1.281-12.973)	0.017	1.447 (0.339-6.166)	0.618
Pathologic stage					
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					
Tumor free	202	Reference			
With tumor	152	2.317 (1.590-3.376)	<0.001	2.706 (1.616-4.531)	<0.001
Gender					
Female	121	Reference			
Male	252	0.793 (0.557-1.130)	0.200		
Race					
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 (years)					
≤60	177	Reference			
>60	196	1.205 (0.850-1.708)	0.295		
Weight(kg)					
≤70	184	Reference			
>70	161	0.941 (0.657-1.346)	0.738		
Height(cm)					
<170	201	Reference			
≥170	139	1.232 (0.849-1.788)	0.272		

续表 1 HCC患者临床特征与PLCβ4基因表达的单因素和多因素Cox回归分析

Table 1 (Continued) Univariate and multivariate Cox regression analyses of clinical characteristics and PLCβ4 gene expression in HCC patients

Clinical characteristics	n	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
BMI(kg/m ²)					
≤25	177	Reference			
>25	159	0.798 (0.550-1.158)	0.235		
Residual tumor					
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					
G1-G2	233	Reference			
G3-G4	135	1.091 (0.761-1.564)	0.636		
AFP (ng/ml)					
≤400	215	Reference			
>400	64	1.075 (0.658-1.759)	0.772		
Prothrombin time(sec)					
≤4	207	Reference			
>4	89	1.335 (0.881-2.023)	0.174		
Adjacent hepatic tissue inflammation					
None	118	Reference			
Mild	101	1.204 (0.723-2.007)	0.476		
Severe	17	1.144 (0.447-2.930)	0.779		
Albumin(g/dl)					
<35	69	Reference			
≥35	230	0.897 (0.549-1.464)	0.662		
Child-Pugh grade					
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					
0-2	106	Reference			
3-6	108	0.740 (0.445-1.232)	0.247		
Expression of PLCβ4					
Low	187	Reference			
High	186	0.677 (0.478-0.959)	0.028	0.551 (0.328-0.925)	0.024

Note: Data related to patients with unclear clinical characteristics and missing survival times have been excluded from the table above.

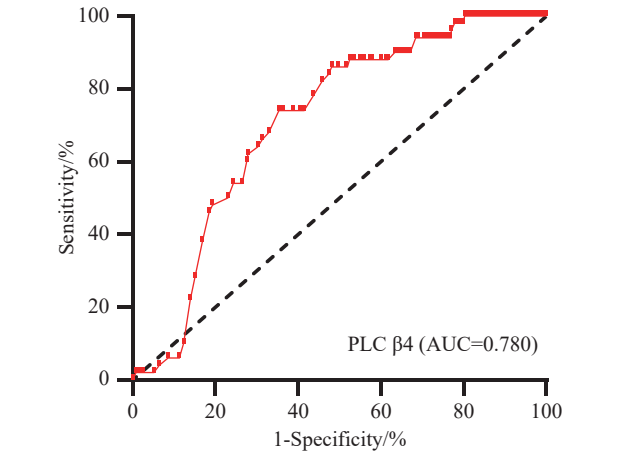


图 3 基于TCGA数据库分析PLCβ4基因对HCC诊断能力的ROC曲线

Figure 3 ROC curve of diagnostic ability of PLCβ4 gene for HCC analyzed based on TCGA database

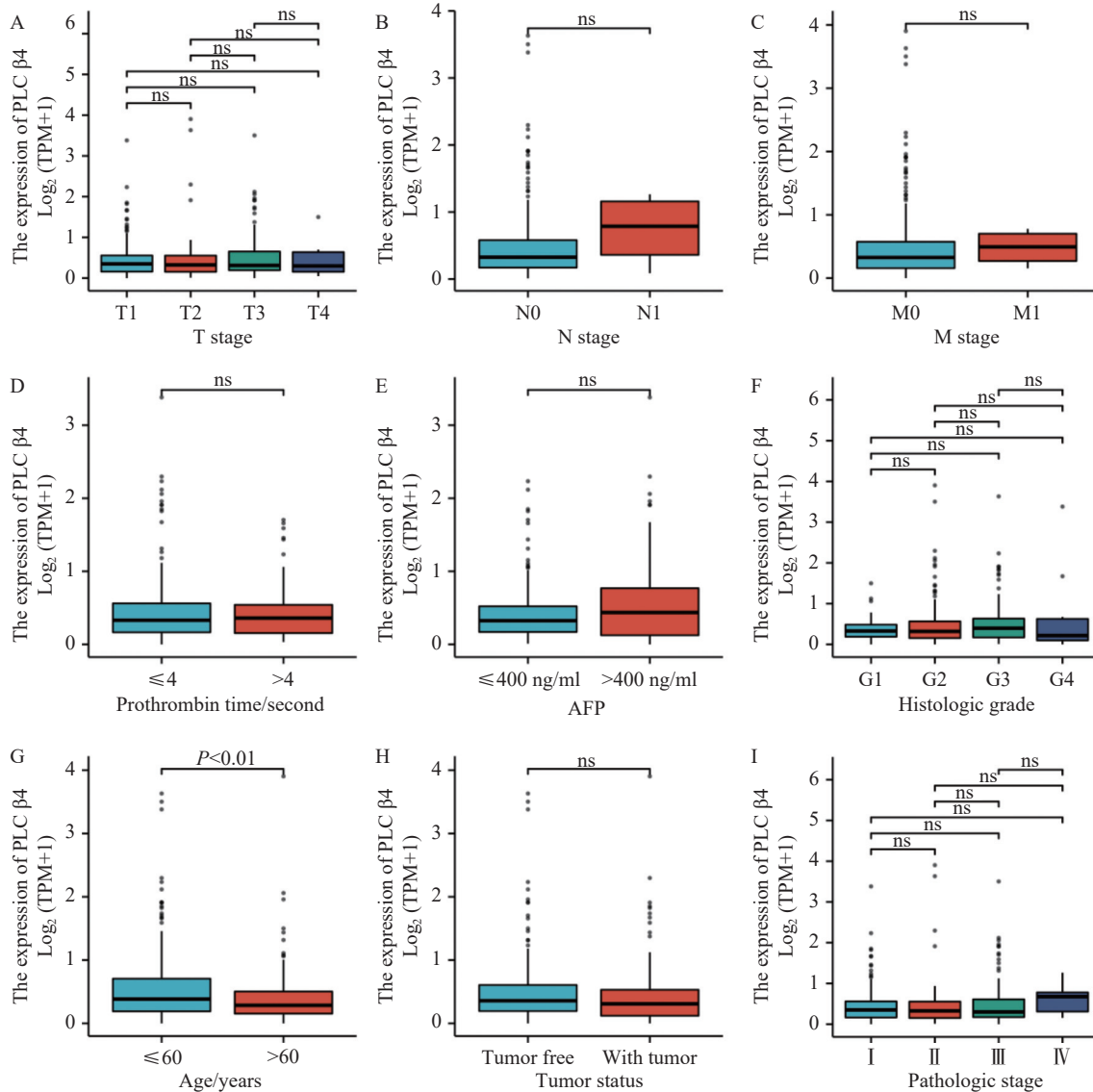
正相关性。PLCβ4的表达与肿瘤组织中的基质、免疫细胞浸润和肿瘤纯度均具有显著相关性 ($P<0.01$), 见图5。

2.5 基因相关性分析

采用Spearman法对PLCβ4与TP53之间的相关性进行分析, 结果显示PLCβ4与TP53存在相关性 ($P<0.001$), 见图6。

2.6 临床样本验证实验结果

HE染色结果显示, HCC组织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组织分化程度越低, 组织破坏程度越严重。60例HCC患者手术标本及其20例非肿瘤组织PLCβ4免疫组织化



ns: $P > 0.05$.

图4 基于TCGA数据库分析PLCβ4的表达与HCC患者临床病理参数的相关性分析

Figure 4 Correlation of PLCβ4 expression with clinicopathologic parameters of HCC patients based on TCGA database analysis

学染色结果显示, PLCβ4表达于细胞质, Ki-67表达于肿瘤细胞核, 在HCC组织和肝脏非肿瘤组织中均可见PLCβ4蛋白不同程度的表达。与非肿瘤组织比较, HCC高、中和低分化组织中Ki-67蛋白表达均升高, 且HCC组织分化程度越低, 细胞阳性面积越大, 见图7。PLCβ4在HCC组织中表达显著高于非肿瘤组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) 且与分化程度呈负相关关系。

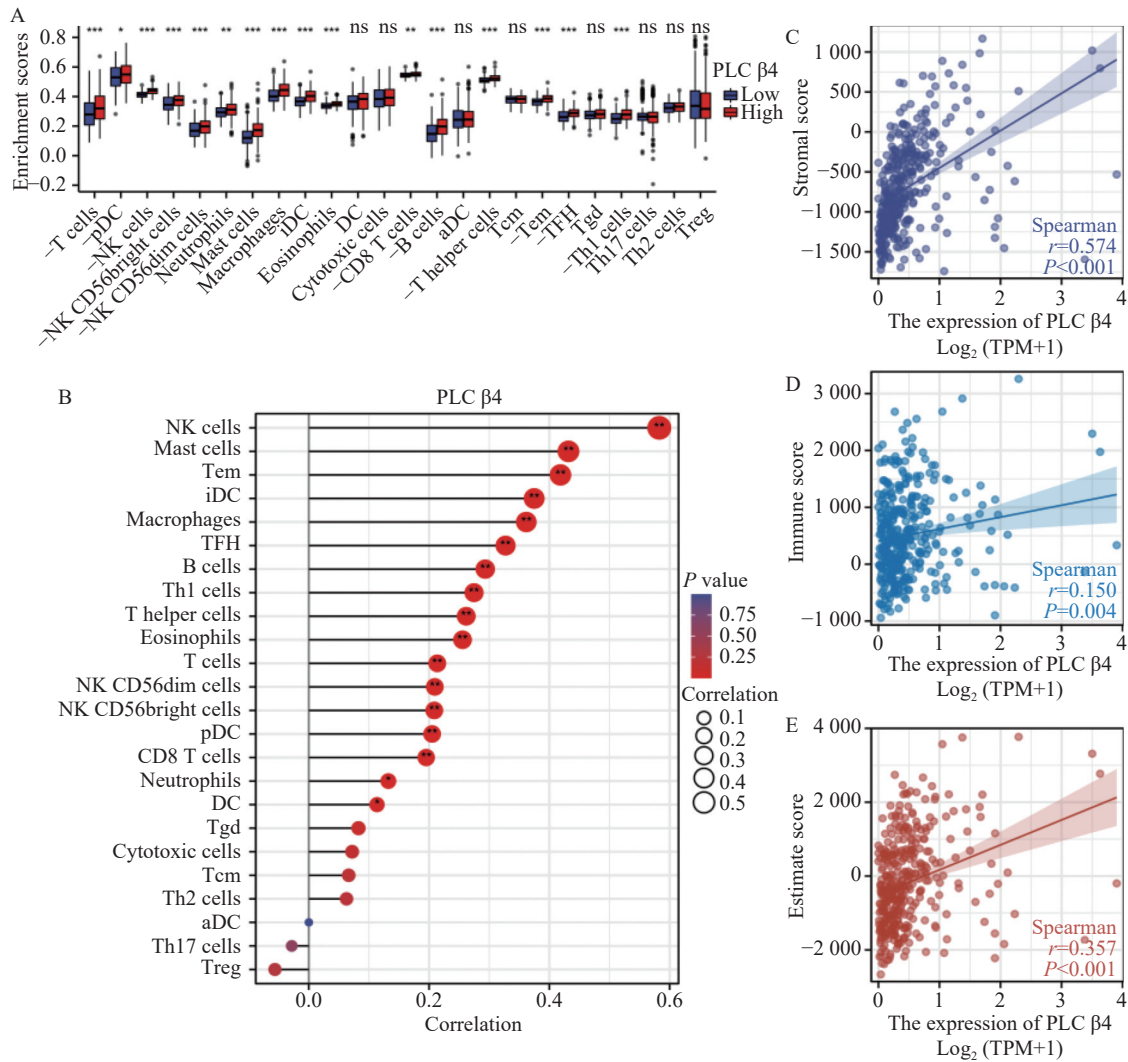
3 讨论

肝癌作为世界范围内的恶性肿瘤之一, 是第三大致命肿瘤。针对晚期肝癌患者, 临床治疗的主要方式为化疗, 但因化疗药物往往为单靶点, 在治疗中具有很大的局限性, 如: 用药后肝癌细胞可以通

过替代途径、改变细胞膜通透性及增加药物外排等产生获得性耐药和多药耐药^[18]。因此迫切需要从肝癌发生发展的分子机制入手, 探寻潜在的药物靶标^[19]。

TP53是人类癌症类型中最常见的突变基因之一, TP53突变使肿瘤细胞更具转移性和侵袭性, 导致患者预后不良^[20], 在突变型HCC中, TP53突变最为常见^[21]。本研究相关性分析结果显示, PLCβ4与TP53存在显著相关性 ($P < 0.001$)。

PLCβ4作为肿瘤细胞脂质代谢关键基因, 在多种恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用, 然而, 以PLCβ4为靶点防治HCC作用机制的研究鲜有报道。因此, 本研究基于TCGA数据库, 对HCC组织样本和正常组织样本的mRNA表达谱进行数据分析。结果表明, PLCβ4基因在HCC中的表达水平显著高于



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, ns: $P>0.05$. A: relationship between the expression of PLCβ4 and the number of immune cells in tumor tissues; B: correlation and regulation between PLCβ4 expression and immune cells; C: relationship between the expression of PLCβ4 and the matrix in tumor tissue; D: relationship between the expression of PLCβ4 and the infiltration of immune cells in tumor tissues; E: relationship between the expression of PLCβ4 and tumor purity in tumor tissues.

图5 基于TCGA数据库分析PLCβ4与免疫微环境的关系

Figure 5 Analysis of relationship between PLCβ4 and immune microenvironment based on TCGA database

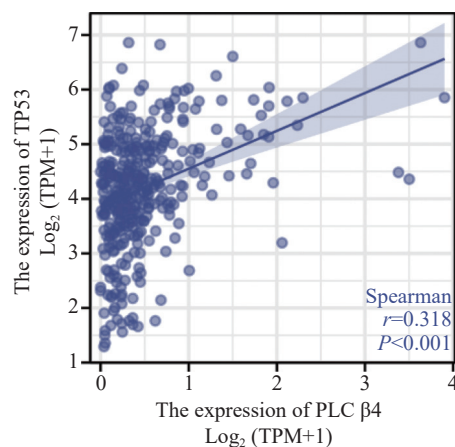
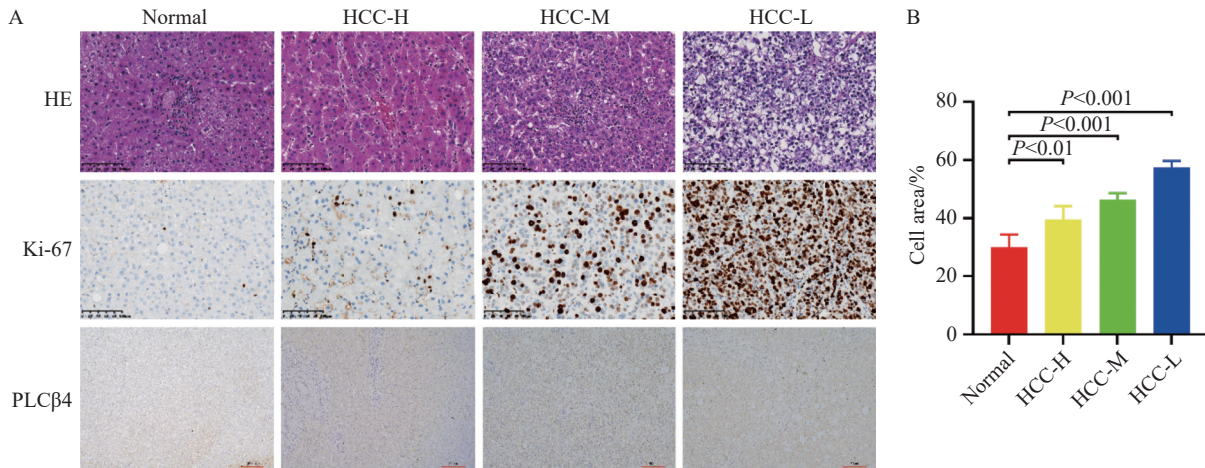


图6 基于TCGA数据库分析PLCβ4与TP53之间的相关性分析
Figure 6 Correlation analysis between PLCβ4 and TP53 based on TCGA database

正常组织 ($P<0.01$), 且其在高表达组患者的总生存期明显长于低表达组。单因素回归分析结果显示 PLCβ4 的表达水平对 OS 存在影响 ($P<0.05$)。研究表明, Ki-67 在多种恶性肿瘤如胃癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌等肿瘤中呈现过表达现象, 并与其发生发展及预后有关^[22]。为验证本研究生信分析结果, 收集新疆医科大学第一附属医院 HCC 患者肿瘤组织与肝脏非肿瘤组织进行实验验证, 对其组织进行病理学观察, 并对 Ki-67 和 PLCβ4 蛋白表达进行免疫组织化学检测, 结果显示, HCC 患者肿瘤组织中 Ki-67 蛋白表达较正常肝脏组织显著升高, 且表达强度与 HCC 组织分化程度呈负相关, 与文献报道趋势相符合。Li 等^[5]研究证实 PLCβ4 是原发性伊马替尼初治胃肠道间质瘤中的致癌脂质分解代谢酶, 其



A: histopathological and protein expression (Ki-67 and PLCβ4) assays of liver tissue; B: quantitative analysis of immunohistochemical staining results.

图7 临床样本组织实验验证结果(免疫组织化学法, ×200)

Figure 7 Experimental validation of clinical tissue samples (IHC, ×200)

可由扩增或多体性衍生的拷贝获得驱动或由增加的蛋白YAP1上调,进一步证明了PLCβ4有助于胃肠道间质瘤细胞系中的细胞增殖。Johansson等研究^[6,23]发现,PLCβ4在4%的葡萄膜黑色素瘤(Uveal melanoma, UM)中携带激活突变,即PLCB轴是UM发生的关键驱动因素。进而证明,PLCβ4在黑色素细胞谱系中易导致肿瘤的发生发展,并使用钙作为辅助因子催化PI2P形成IP3和DAG^[6]。Tatsuo等^[9]发现,PLCβ4敲低可减弱YAP转导的永生间皮瘤细胞和YAP活性间皮瘤细胞系的生长,而不影响YAP非活性间皮瘤细胞系的生长,即PLCβ4可能是治疗间皮瘤的药物靶点。本研究中,经临床样本实验验证,PLCβ4免疫组织化学结果表明,该基因在HCC组织中呈高表达,在正常肝脏组织中呈低表达,两者差异具有显著统计学意义,且HCC组织分化程度越低,PLCβ4表达越高。本研究结果揭示,PLCβ4基因与HCC的发生发展密切相关,并对HCC的诊断及预后具有潜在价值,该基因可能是治疗HCC的潜在靶标。

肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)是肿瘤发生和发展的内环境^[24]。TME在肿瘤的发展进程、治疗抵抗以及免疫逃逸中发挥重要功能^[25]。除了通过激活糖酵解过程以外,脂质代谢重编程也是肝癌细胞应对代谢应激的重要方式。研究表明^[26],脂质代谢相关基因磷脂酰肌醇转运蛋白胞质1(PITPNC1),在HCC组织中表现出促癌作用,与HCC患者的预后密切相关。本研究表明,肿瘤组织中PLCβ4的表达与16个免疫细胞的数量均呈正相关性,其中PLCβ4与肿瘤组织中的基质、免疫细胞

浸润和肿瘤纯度也均具有显著的相关性,提示PLCβ4高度参与HCC患者的肿瘤免疫微环境。

综上所述,本研究结果显示,PLCβ4基因在HCC组织中高表达,其表达水平显著影响HCC患者预后,且与免疫细胞浸润和TP53基因的表达水平高度相关。提示PLCβ4可能是HCC发生、发展等恶性生物学行为的促进因子,可作为HCC患者评判疾病发展进程及预后的重要指标,这为HCC深入精准治疗以及靶向药物的研发奠定了理论基础。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, *et al.* Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [2] Coccia PF. Overview of Adolescent and Young Adult Oncology[J]. *J Oncol Pract*, 2019, 15(5): 235-237.
- [3] Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, *et al.* Breast Cancer Statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(6): 524-541.
- [4] 谷敏,冯菲菲,甘雪晴,等.Ⅲ型磷脂酰肌醇3-磷酸5-激酶在小鼠血管平滑肌细胞增殖和迁移中的作用机制研究[J].*中国病理生理杂志*, 2021, 37(3): 433-442. [Gu M, Feng FF, Gan XQ, *et al.* Role of type III phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase in the proliferation and migration of mouse vascular smooth muscle cells[J]. *Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi*, 2021, 37(3): 433-442.]
- [5] Li CF, Liu TT, Chuang IC, *et al.* PLCβ4 copy gain and PLCβ4 overexpression in primary gastrointestinal stromal tumors: Integrative characterization of a lipid-catabolizing enzyme associated with worse disease-free survival[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19997-20010.
- [6] Johansson P, Aoude LG, Wadt K, *et al.* Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4[J].

- [Oncotarget](#), 2016, 7(4): 4624-4631.
- [7] Bunney TD, Katan M. Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(5): 342-352.
- [8] Raimondi C, Chikh A, Wheeler AP, *et al.* A novel regulatory mechanism links PLC γ 1 to PDK1[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(13): 3153-3163.
- [9] Kakiuchi T, Takahara T, Kasugai Y, *et al.* Modeling mesothelioma utilizing human mesothelial cells reveals involvement of phospholipase-C beta 4 in YAP-active mesothelioma cell proliferation[J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37(11): 1098-1109.
- [10] van de Nes J, Koelsche C, Gessi M, *et al.* Activating CYSLTR2 and PLC β 4 Mutations in Primary Leptomenigeal Melanocytic Tumors[J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(9): 2033-2035.
- [11] Yang M, Li H, Li Y, *et al.* Identification of genes and pathways associated with MDR in MCF-7/MDR breast cancer cells by RNA-seq analysis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6211-6226.
- [12] 段怡平, 陈梁玥, 柳家翠, 等. 基于TCGA数据库分析PFKFB4在肝细胞癌的临床意义及分子机制[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1): 25-29. [Duan YP, Chen LY, Liu JC, *et al.* Analysis of the clinical significance and molecular mechanism of PFKFB4 in hepatocellular carcinoma based on TCGA database[J]. *Fen Zi Zhen Duan Yu Zhi Liao Za Zhi*, 2021, 13(1): 25-29.]
- [13] 丛丹. 基于TCGA数据库的甲状腺癌相关miRNA和基因表达谱的分析及临床相关性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016. [Cong D. Analysis and clinical relevance of thyroid cancer-related miRNA and gene expression profiles based on TCGA database [D]. Changchun: Jilin University, 2016.]
- [14] Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, *et al.* Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. *Immunity*, 2013, 39(4): 782-795.
- [15] Long J, Wang A, Bai Y, *et al.* Development and validation of a TP53-associated immune prognostic model for hepatocellular carcinoma[J]. *EBioMedicine*, 2019, 42: 363-374.
- [16] Yin G, Jia S, Zhang Y, *et al.* YAP1-activated ZNF131 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through transcriptional regulation of PAIP1[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 754: 109921.
- [17] 向晓辉, 毛骏, 李海. 基于TCGA数据库分析CCDC34基因在肝细胞癌中的表达及意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(5): 1050-1054. [Xiang XH, Mao J, Li H. Expression and clinical significance of CCDC34 in hepatocellular carcinoma: An analysis based on The Cancer Genome Atlas database[J]. *Lin Chuang Gan Dan Bing Za Zhi*, 2020, 36(5): 1050-1054.]
- [18] 郑宣, 陈波, 李晔雄. 肝细胞肝癌放疗联合免疫治疗研究进展[J]. *肝癌电子杂志*, 2019, 6(4): 5-8. [Zheng X, Chen B, Li YX. Research progress of radiotherapy combined with immunotherapy for hepatocellular liver cancer[J]. *Gan Ai Dian Zi Za Zhi*, 2019, 6(4): 5-8.]
- [19] Klajer E, Garnier L, Goujon M, *et al.* Targeted and immune therapies among patients with metastatic renal carcinoma undergoing hemodialysis: A systemic review[J]. *Semin Oncol*, 2020, 47(2-3): 103-116.
- [20] Link T, Iwakuma T. Roles of p53 in extrinsic factor-induced liver carcinogenesis[J]. *Hepatoma Res*, 2017, 3: 95-104.
- [21] Rao CV, Asch AS, Yamada HY. Frequently mutated genes/pathways and genomic instability as prevention targets in liver cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(1): 2-11.
- [22] Habiba YH, Omran GA, Helmy MW, *et al.* Antitumor effects of rhamnazin on sorafenib-treated human hepatocellular carcinoma cell lines via modulation of VEGF signaling and PI3K/NF-kappaB p38/caspase-3 axes cross talk[J]. *Life Sci*, 2022, 297: 120443.
- [23] Phan HTN, Kim NH, Wei W, *et al.* Uveal melanoma-associated mutations in PLC β 4 are constitutively activating and promote melanocyte proliferation and tumorigenesis[J]. *Sci Signal*, 2021, 14(713): eabj4243.
- [24] Alannan M, Fayyad-Kazan H, Trézéguet V, *et al.* Targeting Lipid Metabolism in Liver Cancer[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(41): 3951-3964.
- [25] Tan S, Israeli E, Ericksen RE, *et al.* The altered lipidome of hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 3): 445-456.
- [26] 张赛, 胡宽, 朱占伟, 等. 磷脂酰肌醇转运蛋白胞质1在肝细胞癌中表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(7): 1061-1070. [Zhang S, Hu K, Zhu ZW, *et al.* Expression of phosphatidylinositol transfer protein cytoplasmic 1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Zhongguo Pu Tong Wai Ke Za Zhi*, 2023, 32(7): 1061-1070.]

[编辑校对: 刘红武]

作者贡献:

文丽梅: 实验实施、数据分析、论文撰写

郭娅丽: 实验实施、数据分析

侯强、郑董璇、代武、高翔: 数据收集及整理

杨建华、胡君萍: 指导研究方案、论文修改