

本文引用: 徐子悟, 朱政清, 梁文萱, 李霞, 李云耀, 周颖倩, 刘碧源, 孟蕾. 基于氧化应激基因构建肝细胞癌预后模型及潜在中药预测分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2231–2237.

基于氧化应激基因构建肝细胞癌预后模型及潜在中药预测分析

徐子悟^{1,2}, 朱政清¹, 梁文萱¹, 李霞³, 李云耀⁴, 周颖倩¹, 刘碧源¹, 孟蕾^{1*}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南大学, 湖南长沙 410012;

3. 湖南省人民医院, 湖南长沙 410005; 4. 湖南交通工程学院, 湖南衡阳 421001

[摘要] **目的** 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种具有高侵袭性、诊断延迟和不良预后的肿瘤。本研究旨在构建一个基于氧化应激基因的 HCC 预后模型,并探索与该模型相关的中药成分。**方法** 研究使用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)和基因表达集(gene expression omnibus, GEO)中的数据集,鉴定与氧化应激相关的差异表达基因。通过单变量和多变量 Cox 回归以及 Lasso 回归分析,构建一个用于预测 HCC 患者预后的模型。利用 Coremine Medicine 数据库预测模型基因潜在的相关中药成分,并进行归经和性味聚类以及分子对接分析。验证试验:采用 MTT 法检测预测中药马钱子和龙葵水提液对 Hep3B 细胞增殖的影响;使用 Western blot 检测马钱子和龙葵水提液对细胞中 SLC7A11 蛋白水平的调控。**结果** 在氧化应激相关基因中,EZH2 和 SLC7A11 基因可用于构建预后模型。预测模型模型基因相关的中药主要归肝经、味苦和性寒。分子对接分析表明,龙葵中的 5'-甲氧基松脂素和马钱子中的马钱子碱 N-氧化物分别与 SLC7A11 的 247 号丙氨酸(Affinity=-11.0)和 198 号赖氨酸(Affinity=-10.2)具有较强的结合能力。实验证实,马钱子和龙葵水提取物对 Hep3B 细胞增殖呈浓度和时间依赖性抑制作用,并减少了 Hep3B 细胞中 SLC7A11 蛋白的表达。**结论** 本研究成功构建了一个基于氧化应激基因的个体化 HCC 预后模型,并预测了与模型基因相关的潜在中药成分。

[关键词] 氧化应激;肝细胞癌;风险评估模型;数据挖掘;生物标志物;中药

[中图分类号] R273;R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.013

Prognostic model of hepatocellular carcinoma based on oxidative stress genes and the potential herbal constituents analysis

XU Ziwu^{1,2}, ZHU Zhengqing¹, LIANG Wenxuan¹, LI Xia³, LI Yunyao⁴, ZHOU Yingqian¹,

LIU Biyuan¹, MENG Lei^{1*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan University, Changsha, Hunan 410012,

China; 3. People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410005, China; 4. Hunan Institute of Transportation

Engineering, Hengyang, Hunan 421001, China

[Abstract] **Objective** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a tumor with high aggressiveness, delayed diagnosis, and poor prognosis. This study aimed to construct a prognostic model of HCC based on oxidative stress genes and explore the herbal constituents associated with this model. **Methods** Datasets from the cancer genome atlas (TCGA) and gene expression omnibus (GEO) were used to identify differentially expressed genes associated with oxidative stress. Models were constructed to predict the

[收稿日期] 2023-03-16

[基金项目] 湖南省中医药管理局科研课题(2021065);长沙市自然科学基金项目(kq2014085);湖南中医药大学校级科研基金项目(2021XJJ017);湖南中医药大学生物工程学科。

[第一作者] 徐子悟,男,博士研究生,研究方向:肿瘤相关基因表达调控研究。

[通信作者] *孟蕾,女,讲师,博士,E-mail:menglei0901@126.com。

prognosis of HCC patients by univariate and multivariate Cox regression and Lasso regression analysis. The potential herbal constituents of the modeled genes were predicted using the Coremine medical database. The constituents were clustered for their properties, flavors, and meridians tropisms. Moreover, molecular docking was performed with the modeled genes and the herbal constituents. Experimental validation: The effect of the aqueous extracts of the predicted Maqianzi (Strychni Semen) and Longkui (Solanum Nigrum) on cell proliferation and SLC7A11 protein expression was determined by MTT and Western blot. **Results** Among the oxidative stress-related genes, *EZH2* and *SLC7A11* could be used to construct prognostic models. The Chinese medicines related to the predictive model genes mainly entered the liver meridian, and had bitter flavor and cold nature. Molecular docking analysis showed that among the predictive model gene-related Chinese medicines, 5'-methoxypinesterin in Longkui (Solanum Nigrum) and brucine *N*-oxide in Maqianzi (Strychni Semen) bind strongly to alanine acid residue in position 247 (Affinity=-11.0) and lysine residue in position 198 (Affinity=-10.2) of SLC7A11, respectively. It was confirmed that the aqueous extracts of Maqianzi (Strychni Semen) and Longkui (Solanum Nigrum) showed concentration and time dependent inhibitory effects on the proliferation of Hep3B cells and reduced the expression of SLC7A11 protein in Hep3B cells. **Conclusion** In this study, we successfully constructed an individualized HCC prognostic model based on oxidative stress genes and predicted the potential herbal constituents associated with the model genes.

[**Keywords**] oxidative stress; hepatocellular carcinoma; risk assessment model; data mining; biomarkers; Chinese medicines

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肝癌, 约占所有原发性肝脏恶性肿瘤的80%, 其发病率和死亡率在全球范围内均在增加^[1]。尽管目前在 HCC 筛查和治疗方面取得新进展, 但大多数 HCC 患者在诊断时仍处于晚期^[2]。因此, 寻找一种新的灵敏且可靠的预后模型, 准确预测患者生存率并合理指导治疗方案至关重要。

氧化应激是 HCC 发生和发展的关键因素, 参与 HCC 的迁移、侵袭和转移^[3]。目前, 已有试验将氧化应激生物标志物用于临床治疗 HCC 和预测术后 HCC 复发^[4]。研究表明, 许多传统中药都含有抗氧化活性的成分, 参与调节氧化应激^[5]。在现代临床治疗中, 传统中药因其低毒性和良好的临床疗效, 已被纳入许多疾病的治疗方案^[6]。

本文拟构建可以精确预测 HCC 患者的氧化应激相关基因预后模型, 并预测作用模型中枢基因的中药单体成分, 以期治疗 HCC 的靶向中药研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 数据收集和预处理

从 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)下载 LIHC 队列的转录组测序数据、体细胞突变数据和临床数据。此外, 在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)补充以 GSE14520、GSE62232、GSE74656 HCC 患者转录组测序数据集。氧化应激相关基因通过 Genecards 数据库检索“氧化应激”, 以相关评分 ≥ 7 分作为筛选条件获得。

1.2 转录组差异分析

利用 R 语言“DESeq2”包对 TCGA-LIHC 原始 Counts 数据进行差异分析。GEO 数据库的 GSE14520、GSE62232、GSE74656 使用“limma”包分析差异表达基因。

1.3 氧化应激相关基因预后模型构建

TCGA-LIHC 与 GSE62165、GSE62452、GSE28735 的共同差异基因(differential genes, DEGs)与获得的 1 399 个氧化应激相关基因取交集, 获得差异表达的氧化应激相关基因。通过单/多变量 Cox 回归、Lasso 回归分析预后特征基因。通过生存分析和 ROC 分析, 以验证模型可靠性。

1.4 免疫组织化学图像分析

从人类蛋白质图谱(<https://www.proteinatlas.org/>)获得人类健康组织和 HCC 患者组织的免疫组织化学图像, 用于在蛋白质水平上验证。

1.5 功能相关中药预测

通过 Coremine Medical 数据库(<https://coremine.com/medical/>), 以 $P < 0.05$ 作为筛选标准, 预测对模型关键基因有潜在调控作用的中药。药物的性味、归经通过 2020 版《中华人民共和国药典》进行搜集。使用 TCMSP、HERB、ETCM、TCMID 数据库检索中药成分, 使用 SwissADME(www.swissadme.ch)以 $MW < 500$ 、 $Hdon < 5$ 、 $Hacc < 10$ 、 $LogP < 5$ 为筛选条件筛选中药成分。最终基于 Autodock vina^[7]软件对筛选后的中药成分进行分子对接。

1.6 中药水提物制备

中药材于 80 °C 水中熬煮 6 h, 水提 3 次。提取

液过滤,去除残渣后,将提取液放入旋转蒸发器浓缩成浸膏,喷雾干燥获得药物干粉,用于后续实验。

1.7 细胞培养及处理

用含10%胎牛血清的DMEM培养基在37℃、5% CO₂条件下常规培养Hep3B细胞,培养基每2~3 d更换1次。当细胞汇合度约为90%时,用0.25%胰蛋白酶溶液进行传代培养。

1.8 细胞活力评估

Hep3B细胞以 5×10^3 个/孔接种于96孔板,分别使用不同浓度马钱子水提物和龙葵水提物(0、0.390 625、0.781 25、1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 mg·mL⁻¹)干预HepG2细胞48 h和72 h后,每孔加入100 μL 10% MTT溶液,4 h后用酶标仪测定490 nm处吸光度(A),计算细胞存活率。细胞存活率=(A加药-A空白)/A空白×100%。

1.9 Western blot 检测

使用IP裂解缓冲液制备来自Hep3B细胞系的全蛋白裂解物,然后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹。所用抗体及其稀释浓度如下:SLC7A11(1:2 000)、β-Actin(1:2 500)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为AA128、AF7992)。

2 结果

2.1 HCC患者基本信息

本研究数据转录组来源TCGA数据库,TCGA临床数据见表1。

表1 TCGA队列基线资料表

指标	分组	人数(百分比)/[例(%)]
年龄	>60	180(47.49)
	≤60	199(52.51)
性别	男	258(67.89)
	女	122(32.11)
Stage分期	Stage I	177(49.72)
	Stage II	88(24.72)
	Stage III	86(24.16)
	Stage IV	5(1.40)
T分期	T1	187(49.60)
	T2	96(25.46)
	T3	81(21.49)
	T4	13(3.45)
N分期	N0	259(98.47)
	N1	4(1.53)
M分期	M0	274(98.56)
	M1	4(1.44)

2.2 筛选差异氧化应激相关基因

对TCGA数据库和GSE14520、GSE62232、GSE74656数据集进行差异分析,分别有4 531、1 222、1 442和972个基因被鉴定为DEGs(图1A—D)。4个数据集共有356个交集DEGs(图1E),其中47个基因被识别为氧化应激相关DEGs(图1F)。

2.3 预测模型的构建与评价

单变量Cox回归鉴定31个预后相关基因(图2A),Lasso回归筛选进一步筛选出7个基因(图2B—

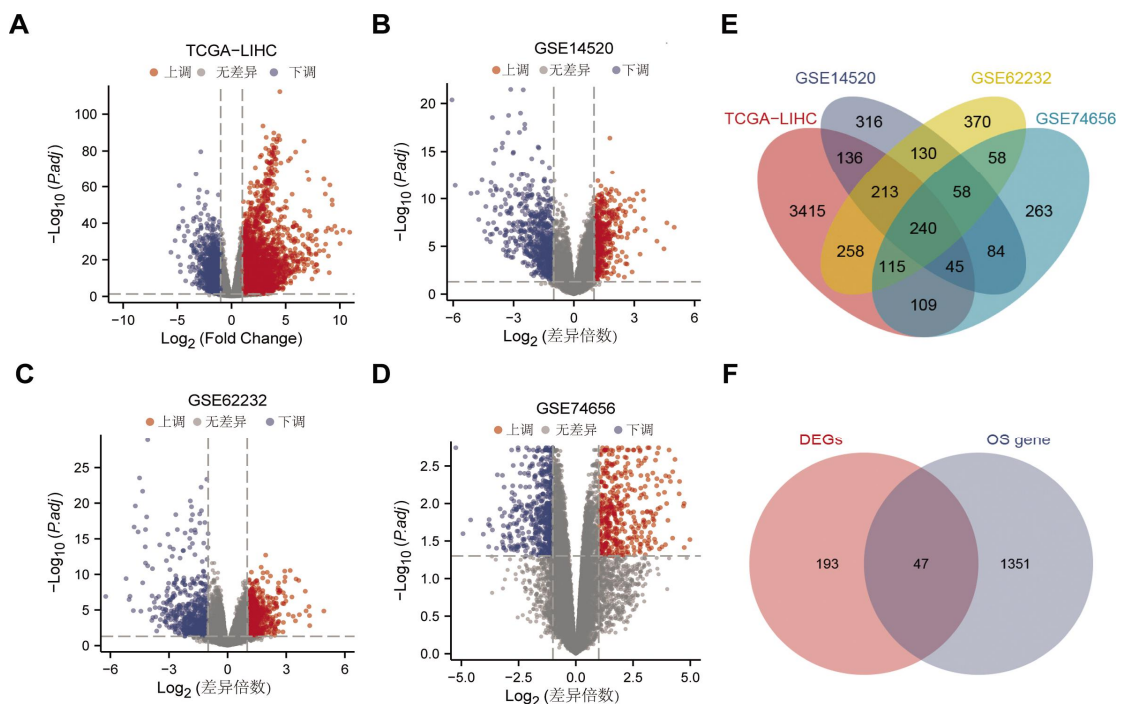


图1 HCC氧化应激相关基因鉴定

注:A—D.HCC患者的DEGs;E.HCC患者的交集DEGs;F.DEGs和OS genes的交集基因。

C)。多变量 Cox 回归以 *SLC7A11*($P=0.047$)和*EZH2*($P=0.016$)构建预后相关基因模型(图 2D)。ROC 曲线显示模型可以灵敏地预测患者的生存状况(图 2E)。高风险组相较于低风险组平均生存年数更低(图 2F),生存率显著低于低风险组($P<0.001$)(图 2G)。

2.4 关键基因的生存分析与表达验证

TCGA 和 GEO 数据库配对样本数据集表明, *EZH2* 和 *SLC7A11* 的表达在 HCC 患者中均有显著增加($P<0.001$)(图 3A—B),并且与与预后相关($P<$

0.001)(图 3C—D)。为了进一步验证,本研究团队使用从 Human Protein Atlas 公共数据库获得到肝癌患者组织和健康肝组织中 IHC 图像,可见肝癌组织中的 *EZH2* 主要定位于细胞核内,且蛋白表达增加(图 3E)。

2.5 相关中药网络和分子对接

通过 Coremine Medical 医学数据检索到作用模型基因 *EZH2* 中药 24 味, *SLC7A11* 潜在中药 9 味(表2)。灰色底色为 Affinity>-7.0,蓝色底色为 Affini-

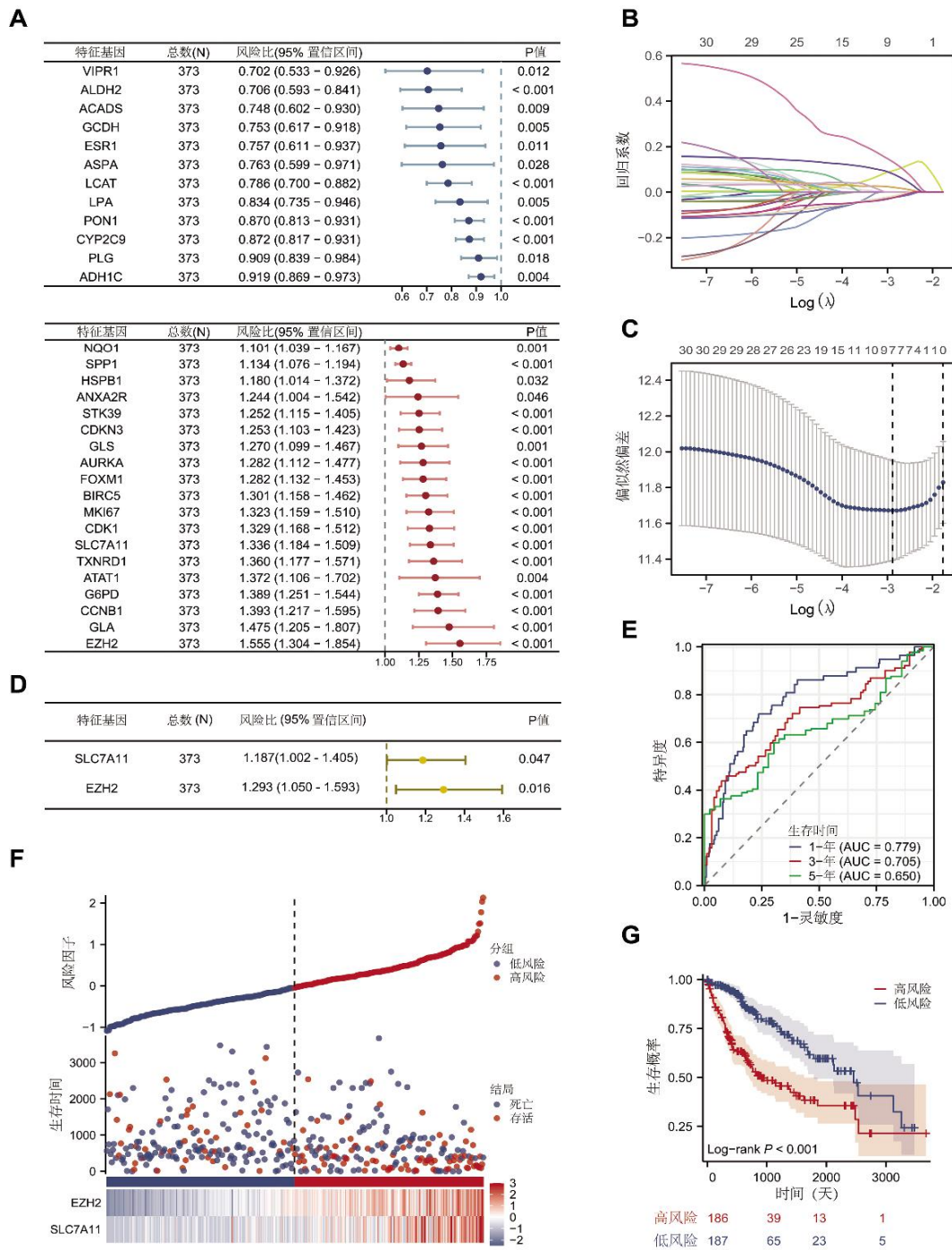


图 2 HCC 氧化应激相关关键基因患者预后模型及其预后效能

注:A.单变量 Cox 回归分析;B.LASSO 系数谱;C.LASSO 系数分布图;D.多变量 Cox 回归分析;E.时间依赖 ROC 曲线;F.风险因子图;G.生存分析。

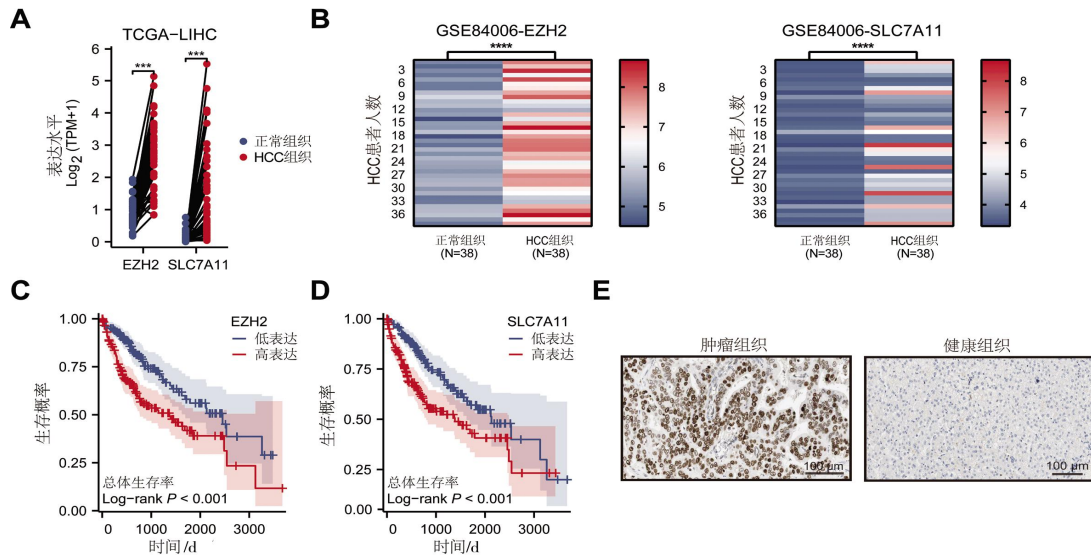


图3 关键HCC氧化应激相关基因表达水平

注:A—B. 表达分析;C—D. 生存分析;E. EZH2的IHC的图像;*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

表2 关键基因的中药预测

基因	中药(P值)
<i>SLC7A11</i>	苦丁茶(0.000 50), 仙鹤草(0.005 48), 博落回(0.006 45), 藤黄(0.006 96), 地骨皮(0.008 33), 钩藤(0.009 06), 冬凌草(0.009 57), 白芷(0.011 25), 马钱子(0.012 29), 墨家黄(0.013 20), 桑叶(0.013 70), 白屈菜(0.014 96), 猕猴桃根(0.015 62), 石菖蒲(0.018 54), 茯神(0.019 47), 生地黄(0.026 90), 柚花(0.028 92), 柚皮橘红(0.029 06), 地黄(0.029 11), 龙葵(0.029 48), 茯苓(0.031 99), 丹参(0.035 81), 积雪草(0.040 92), 枸杞子(0.048 45)
<i>EZH2</i>	蜀葵花(0.001 68), 枸骨叶(0.004 44), 桂郁金(0.005 83), 雷公藤(0.020 59), 墨旱莲(0.024 18), 温莪术(0.026 02), 藤黄(0.026 52), 片姜黄(0.026 52), 郁金(0.026 52)

$ty < -7.0$, 深蓝色底色为中药成分, 红色底色为关键基因的蛋白靶点(图4A)。对中药进行性味、归经分析, 大部分中药具有性寒、味苦特点, 肝经为主要富集的经络(图4B—D)。在对中药成分与相应模型蛋白的对接结果中, 丹参、白芷、马钱子等中药成分与模型蛋白有较好亲和力(图4E)。其中, 龙葵的5'-甲氧基松脂素和马钱子的马钱子N-氧化物(brucine N-oxide, BNO) Affinity < -10.0 , 分别作用SLC7A11的247号丙氨酸和198号赖氨酸(图4F)。

2.6 关键药物抑制Hep3B细胞的增殖和SLC7A11蛋白表达

以梯度浓度龙葵和马钱子水提液分别干预Hep3B细胞, 结果显示药物对Hep3B细胞的抑制能力呈时间和剂量依赖性(图5A)。以48 h条件下药物的 $1/2 \times IC_{50}$ 药物浓度干预细胞后检测SLC7A11靶点表达情况显示, 龙葵和马钱子水提液能够抑制SLC7A11蛋白的表达(图5B)。

3 讨论

HCC是全球第三大致死癌症类型, 需要有效的治疗和诊断策略来预防其发生发展和转移氧化应

激显著影响各种功能和过程, 如细胞增殖、分化、血管生成和代谢, 并与各种疾病的病理生理学有关^[4]。肝脏是ROS攻击的主要器官, 伴随着过量的ROS, 氧化应激和细胞代谢受损参与肝损伤的发生和发展^[8]。有研究证明, 氧化应激会促进非酒精脂肪肝发生各类病理性变化, 并将进一步促进肝癌发生^[9]。

本文基于氧化应激相关基因成功地筛选出*EZH2*、*SLC7A11*, 并以此构建了HCC中的氧化应激相关基因的预后模型, 其有效性在Kaplan-Meier曲线和时间依赖ROC曲线得以证明, 尤其是在第5年时AUC为0.650, 说明该模型具有良好的预测能力。通过分析模型基因的表达情况, 发现高表达*EZH2*或*SLC7A11*的HCC患者, 其预后情况较差, 这与目前研究一致^[10]。中药已经发展了数千年, 虽然中药配方中的化学成分复杂, 但中药的这一特点与肿瘤的全系统、多靶点治疗相适应^[11]。本研究预测了预后模型中关键基因的潜在治疗中药。BNO是马钱子在炮制过程中由毒性成分马钱子碱转化而来的一种特殊生物碱^[12], 具有引发线粒体凋亡途径诱导HCC凋亡的功能^[13]。而目前在癌症治疗方面尚无有关5'-甲氧

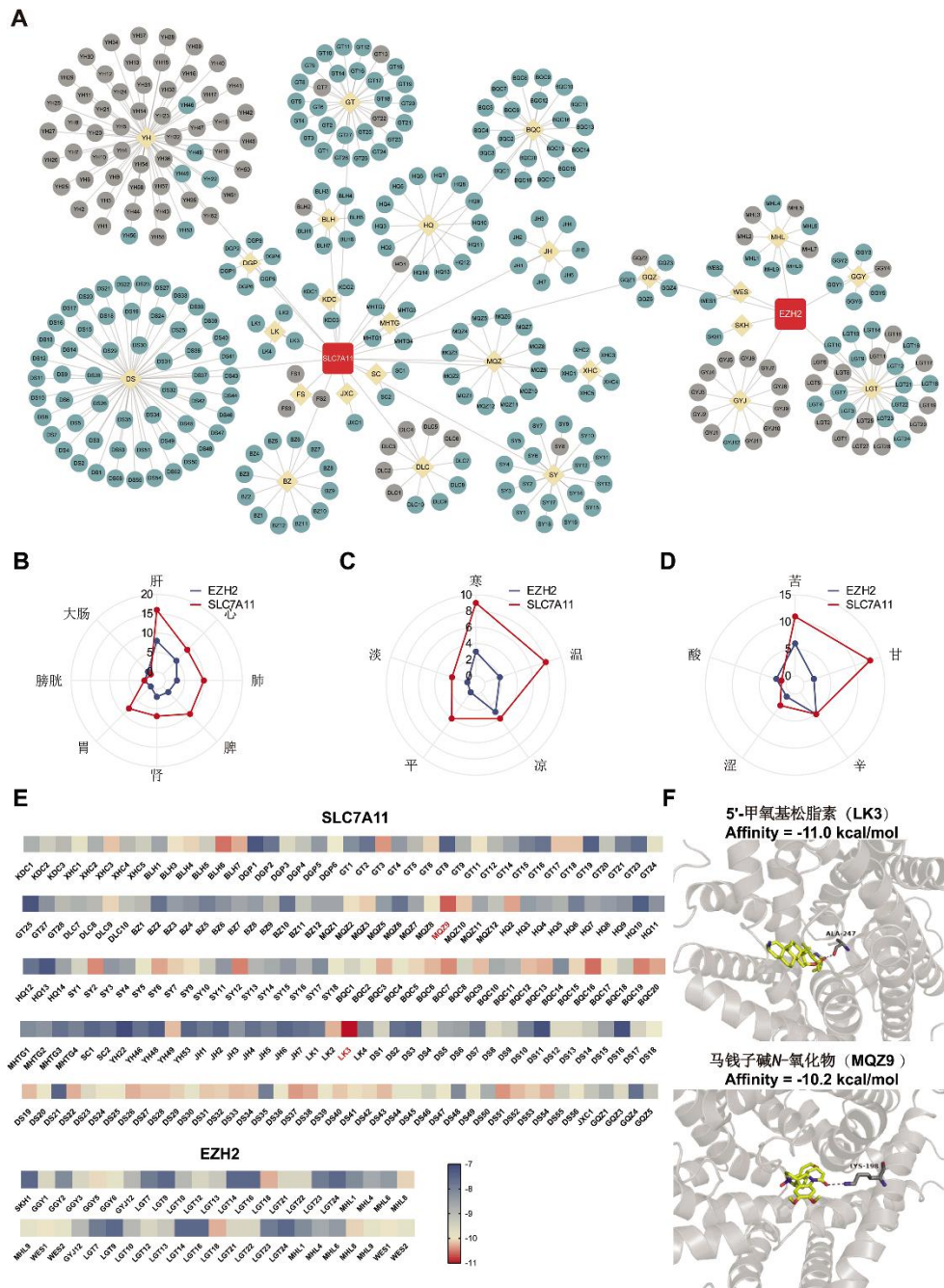


图 4 HCC 氧化应激相关中药成分网络以及对接结果

注:A.中药成分-模型基因网络图;B.中药的归经;C.中药的性;D.中药的味;E.热图展示中药成分与模型基因蛋白对接结果;F.可视化对接结果。

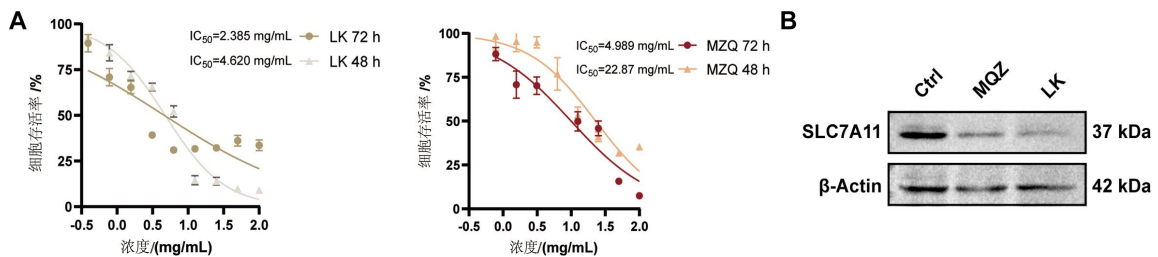


图 5 龙葵(LK)和马钱子(MQZ)水提液对 Hep3B 细胞增殖和 SLC7A11 蛋白表达的影响

注:A.龙葵和马钱子水提液对 Hep3B 细胞增殖的影响;B.龙葵和马钱子水提液对 SLC7A11 蛋白表达的影响。

基松脂素的研究。本文研究中预测到马钱子中的 BNO 与 SLC7A11 的赖氨酸具有很强的亲和力。此外,

作用模型关键基因的中药主要富集于肝经,性寒味苦也是归肝经中药的特点^[14],表明在HCC 中 EZH2

和 SLC7A11 积极的治疗潜力。

研究进一步通过 MTT 法检测马钱子以及龙葵水提取物对 Hep3B 肝癌细胞系增殖的影响,结果展示出细胞存活率随着药物浓度和处理时间的增加而下降,说明两味中药具有抑制 Hep3B 细胞增殖的能力。此外,通过检测细胞中 SLC7A11 蛋白表达,发现在马钱子以及龙葵水提取物处理细胞后,Hep3B 细胞的 SLC7A11 蛋白表达水平下降,说明两位中药能够下调 SLC7A11 水平。

EZH2 是一种组蛋白甲基转移酶,能三甲基化组蛋白 H3 的 27 位赖氨酸(H3K27me3)。EZH2 的活化有助于表观遗传转录沉默,而非突变表观遗传重编程已经被认为是癌症新的重要特征之一^[15]。EZH2 可通过 T 细胞功能障碍和 T 细胞排斥促进肿瘤免疫逃逸^[16]。SLC7A11 是溶质载体(Solute Carrier, SLC),属于胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白,主要负责质膜上氨基酸的转运^[17]。SLC7A11 在铁死亡中扮演着关键调控者的角色。铁死亡作为一种非凋亡性细胞死亡过程,已成为肿瘤治疗的新靶向策略^[18]。SLC7A11 还是作为控制 Treg 细胞增殖潜能的关键决定因素^[19]。

综上所述,本研究成功构建了一个基于氧化应激相关基因 *EZH2* 和 *SLC7A11* 的 HCC 预后模型,该模型能够敏感地预测患者的生存状况。此外,通过对模型相关基因的分析,本研究丰富了传统中药对于模型中关键基因治疗的理解。同时,模型中的关键基因在肿瘤治疗方面也具有重要的研究价值,有望成为潜在的治疗靶点。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] ZHANG C H, LI M, LIN Y P, et al. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: Advances and hopes[J]. Current Gene Therapy, 2020, 20(2): 84-99.
- [3] MEYSKENS F L Jr, BUCKMEIER J A, MCNULTY S E, et al. Activation of nuclear factor- κ B in human metastatic melanomacells and the effect of oxidative stress[J]. Clinical Cancer Research, 1999, 5(5): 1197-1202.
- [4] FU Y, CHUNG F L. Oxidative stress and hepatocarcinogenesis[J]. Hepatoma Research, 2018, 4: 39.
- [5] LIANG B, ZHU Y C, LU J, et al. Effects of traditional Chinese medication-based bioactive compounds on cellular and molecular mechanisms of oxidative stress[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 3617498.
- [6] DENG Q, LI X X, FANG Y T, et al. Therapeutic potential of quercetin as an antiatherosclerotic agent in atherosclerotic cardiovascular disease: A review[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 2020: 5926381.
- [7] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455-461.
- [8] SEEN S. Chronic liver disease and oxidative stress: a narrative review[J]. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2021, 15(9): 1021-1035.
- [9] GENTRIC G, MAILLET V, PARADIS V, et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(3): 981-992.
- [10] CHEUNG E C, VOUSDEN K H. The role of ROS in tumour development and progression[J]. Nature Reviews Cancer, 2022, 22(5): 280-297.
- [11] HUANG H, FANG J S, FAN X D, et al. Advances in molecular mechanisms for traditional Chinese medicine actions in regulating tumor immune responses[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 1009.
- [12] CAI B C, HATTORI M, NAMBA T. Processing of nux vomica. II. Changes in alkaloid composition of the seeds of *Strychnos nux-vomica* on traditional drug-processing[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38(5): 1295-1298.
- [13] DENG X K, YIN F Z, LU X Y, et al. The apoptotic effect of brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* on human hepatoma cells is mediated via bcl-2 and Ca²⁺ involved mitochondrial pathway[J]. Toxicological Sciences, 2006, 91(1): 59-69.
- [14] 韩学超, 孙坤坤, 徐琬梨. 苦味中药的归经及临床应用[J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(4): 463-466.
- [15] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: New dimensions[J]. Cancer Discovery, 2022, 12(1): 31-46.
- [16] LUO L H, WANG Z H, HU T C, et al. Multiomics characteristics and immunotherapeutic potential of EZH2 in pan-cancer[J]. Bioscience Reports, 2023, 43(1): BSR20222230.
- [17] LEE J, ROH J L. SLC7A11 as a gateway of metabolic perturbation and ferroptosis vulnerability in cancer[J]. Antioxidants, 2022, 11(12): 2444.
- [18] YIN J M, MENG X Q, PENG L X, et al. Ferroptosis and cancer immunotherapy[J]. Current Molecular Medicine, 2023, 23(5): 401-409.
- [19] PROCACCINI C, GARAVELLI S, CARBONE F, et al. Signals of pseudo-starvation unveil the amino acid transporter SLC7A11 as key determinant in the control of Treg cell proliferative potential[J]. Immunity, 2021, 54(7): 1543-1560.

(本文编辑 苏 维)