DOI:10.16016/j.2097-0927.202306086

基于生物信息学分析抑制素在消化系统恶性肿瘤中的表达及预后价值

李晓凤[1],刘禧禧[1],宋子晴[1],唐明政[1],蔡 辉[2],张凌云[3] 730000 兰州,甘肃中医药大学第一临床医学院[1];730000 兰州,甘肃省人民医院普外科[2];730050 兰州,甘肃省中医院外科临床中心[3]

[摘要] **目的** 探索肿瘤组织中抑制素(prohibitin,*PHB*)的表达情况,分析其对消化系统恶性肿瘤(digestive system malignant tumor,DT)患者预后的影响以及作用机制。**方法** ①使用癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas,TCGA)和基因型-组织表达(Genotype-Tissue Expression,GTEx)数据库比较肿瘤组织和正常组织中 *PHB* 的表达差异。②收集 2023 年 10 月甘肃省人民医院诊治的 5 对胃癌及癌旁组织和 5 对结肠癌及癌旁组织,RT-qPCR 检测 *PHB* mRNA 表达水平。③采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测正常胃黏膜细胞(GES-1)和胃癌细胞(AGS、MKN45 和 HGC27)、正常结肠细胞 NCM-460 和人结肠癌细胞株 SW480 中 *PHB* 的表达差异。④利用 R 语言分析 *PHB* 对 DT 患者预后、肿瘤微环境、肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性的影响。⑤采用 CIBERSORT 算法分析肿瘤组织中 *PHB* 表达与肿瘤免疫细胞浸润之间的相关性。基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis,GSEA)探讨 *PHB* 的生物学功能。⑥利用 R 语言分析 *PHB* 与药物敏感性的关系。**结果** ①*PHB* 在结肠癌、胆管癌、食管癌、肝癌、直肠癌和胃癌组织中均显著高表达($P<0.01$)。②RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示 *PHB* 在胃癌和结肠癌组织和细胞中高表达($P<0.01$)。③*PHB* 的差异表达与肝癌($P=0.002$)预后不良相关。在胆管癌、胃癌、胰腺癌、肝癌和食管癌中,*PHB* 与肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性呈正相关($P<0.05$)。④*PHB* 的表达在结肠癌中与 M2 型巨噬细胞呈正相关($P=0.03$);在胆管癌中与活化 $CD4^+$ 记忆 T 细胞呈正相关($P<0.05$);在食管癌中与活化肥大细胞呈正相关($P=0.03$);在肝癌中与 M0、M2 型巨噬细胞和单核细胞呈正相关($P<0.05$);在直肠癌中与静息树突状细胞、嗜酸性粒细胞和活化 $CD4^+$ 记忆 T 细胞呈正相关($P<0.05$);在胃癌中与 M0 型巨噬细胞、活化肥大细胞、中性粒细胞、静息自然杀伤细胞、活化 $CD4^+$ 记忆 T 细胞和滤泡辅助性 T 细胞呈正相关($P<0.05$)。⑤*PHB* 在Ⅰ类受体、PPAR 和钙离子信号通路中主要富集($P<0.05$)。⑥*PHB* 的表达与氨萘非特、普拉西诺特和阿比特龙等 13 种药物敏感性呈正相关($P<0.05$)。**结论** *PHB* 表达与 DT 中多种免疫细胞浸润及不良预后有关,其可能成为新型 DT 生物标志物及潜在的免疫调节靶点。

[关键词] 抑制素;消化系统恶性肿瘤;肿瘤微环境;免疫;预后
[中图法分类号] R341;R730.23;R735 [文献标志码] A

Expression and prognostic value of prohibitin in gastrointestinal cancers based on bioinformatics

LI Xiaofeng[1], LIU Xixi[1], SONG Ziqing[1], TANG Mingzheng[1], CAI Hui[2], ZHANG Lingyun[3] [1]First Clinical Medical College of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2]Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [3]Surgical Clinical Center of Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu Province, 730050, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the expression of prohibitin (PHB) in tumor tissues and analyze its effect on the prognosis of patients with digestive system malignant tumor (DT) and its mechanism.

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(20JR5RA159);甘肃中医药大学 2023 年度研究生创新创业基金(32 号)
[通信作者] 张凌云,E-mail:Zhangly8848@126.com

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Methods ①The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) database were used to compare the expression of PHB in tumor tissues and normal tissues. ②Five pairs of gastric cancer and adjacent tissues and 5 pairs of colon cancer and adjacent tissues were collected, and RT-qPCR was used to verify the mRNA expression levels. ③RT-qPCR and Western blotting were used to verify the differential expression of PHB in normal gastric mucosa cells (GES-1), gastric cancer cells (AGS, MKN45 and HGC27), normal colon cells NCM-460 and human colon cancer cell line SW480. ④R language was used to analyze the effect of PHB on the prognosis, tumor microenvironment, tumor mutation burden and microsatellite instability of DT patients. ⑤CIBERSORT algorithm was used to study the correlation between PHB expression in tumor tissues and tumor immune cell infiltration. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was used to explore the biological function of PHB. ⑥R language was used to analyze the relationship between PHB and drug sensitivity. **Results** ①PHB was highly expressed in colon cancer, cholangiocarcinoma, esophageal cancer, liver cancer, rectal cancer and gastric cancer ($P<0.01$). ②RT-qPCR and Western blotting showed that PHB was highly expressed in the tissues and cell lines of gastric cancer ($P<0.01$) and colon cancer ($P<0.01$). ③The differential expression of PHB was associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma ($P=0.002$). In cholangiocarcinoma, gastric cancer, pancreatic cancer, liver cancer and esophageal cancer, PHB was positively correlated with tumor mutation burden and microsatellite instability ($P<0.05$). ④PHB was positively correlated with M2 macrophages in colon cancer ($P=0.03$). In cholangiocarcinoma, it was positively correlated with activated $CD4^+$ memory T cells ($P<0.05$). In esophageal carcinoma, it was positively correlated with activated hypertrophy ($P=0.03$). It was positively correlated with M0 and M2 macrophages and monocytes in hepatocellular carcinoma ($P<0.05$). It was positively correlated with resting dendritic cells, eosinophils and activated $CD4^+$ memory T cells in rectal cancer ($P<0.05$). It was positively correlated with M0 macrophages, activated mast cells, neutrophils, resting natural killer cells, activated $CD4^+$ memory T cells and follicular helper T cells in gastric cancer ($P<0.05$). ⑤PHB was mainly enriched in class I receptors, PPAR and calcium signaling pathways ($P<0.05$). ⑥ The expression of PHB was positively correlated with the sensitivity of 13 drugs, including ammonafide, prasinolide and abiraterone ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of PHB is significantly related to the infiltration of various immune cells in DT and poor prognosis in DT patients, which may become a new biomarker and potential immunomodulatory target of DT.

[**Key words**] prohibitin; digestive system malignant tumor; tumor microenvironment; immunity; prognosis

Supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (20JR5RA159) and the Project of Postgraduate Innovation and Entre preneurship Fund of Gansu University of Chinese Medicine in 2023 (No. 32). Corresponding author: ZHANG Lingyun, E-mail: Zhangly8848@126.com

消化系统恶性肿瘤(digestive system malignant tumor,DT)包括食管癌、胃癌、胆囊癌、肝癌、结直肠癌和胰腺癌。研究数据表明,DT 在男性和女性癌症相关死亡中所占比例不可忽视,其中结直肠癌在癌症相关死亡中排名第二,其次是肝癌(第三)、胃癌(第四)、食管癌(第六)。这些癌症是世界范围内发病率排名前 10 位的恶性肿瘤[1],且病死率不断上升[2]。尽管手术、放疗和化疗等治疗方法有所改善,但晚期患者的平均生存时间仍较短[3]。抑制素(prohibitin,*PHB*)是相对分子量大小为 33×10^3 的基因,属于高度保守且广泛表达的蛋白质家族,在真菌和哺乳动物中广泛存在[4]。*PHB* 还属于 Band-7 或禁止素结构域家族[5],存在于多个细胞区室中(包括细胞核、线粒体和质膜),且最初发现时被认为是抗增殖基因。近年来,*PHB* 的多种细胞功能得到了阐明,包括调节转录和细胞周期、线粒体功能、质膜中的信号转导,以及抗氧化和抗炎作用[6]。*PHB* 作为线粒体伴侣和进化上保守的蛋白质,在原核生物和真核生物中普遍存在,并且具有转录调节剂的功能[7]。

目前研究更多地集中在 *PHB* 与线粒体之间的密切关系,缺乏探究 *PHB* 与 DT 之间的调控作用和生物学功能研究。本研究基于癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas,TCGA)和基因型-组织表达(Genotype-Tissue Expression,GTEx)数据库,探讨 *PHB* 在 DT 中的

表达情况及其与预后、免疫细胞浸润、肿瘤突变负荷(tumor mutational burden,TMB)和微卫星不稳定性(microsatellite instability,MSI)的关系,旨在揭示 *PHB* 在 DT 中的作用,并为其在调节化疗抗性方面的潜在作用提供新的见解,为未来 DT 治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 样本数据收集

使用 TIMER2.0(http://timer.cistrome.org/)数据库并选择“Gene_DE”面板,分析 33 种不同癌症与正常组中 *PHB* 表达的差异。7 种 DT 的临床数据是通过癌症基因组图谱(https://portal.gdc.cancer.gov/)和 UCSC Xena(https://xena.ucsc.edu/)从 TCGA 数据库下载。使用 BioGRID 数据库(https://thebiogrid.org/)分析 *PHB* 在泛癌中的突变频率。

1.2 结肠癌和胃癌组织标本收集

收取 2023 年 10 月甘肃省人民医院收治的 5 对胃癌及癌旁组织和 5 对结肠癌及癌旁组织,患者术前未经放疗和化疗且未并发其他肿瘤。经甘肃省人民医院胃肠外科手术切除肿瘤。术后取肿瘤标本与癌旁组织(距离肿瘤边缘至少 5 cm 的正常胃和结肠组织,经由病理科医师确认),放入-80 ℃冻存备用。本研究经甘肃省人民医院伦理委员会批准通过(2023-575),并经患者和捐赠者同意。

1.3 细胞培养

人正常胃上皮细胞 GES-1,人胃癌细胞株 AGS、MKN45 和 HGC27,人正常结肠细胞 NCM-460,人结肠癌细胞 SW480 由中国科学院细胞资源中心提供;保存于甘肃省人民医院中心实验室,在含有 10%胎牛血清(FBS)和 1%双抗(链-青霉素)的 RPMI1640 培养基中培养,并放置在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中进行培养。

1.4 RNA 分离和 RT-qPCR 检测

使用 M5 Universal RNA Mini Kit 提取 RNA,按照其说明书的要求进行操作。然后测量 RNA 的浓度和纯度。根据反转录试剂盒的说明,将 RNA 反转录为 cDNA。使用 2× M5 Hiper SYBR premix EsTaq(含 Tli RnaseH)作为 RT-qPCR 检测的荧光染料。*PHB* 和内参 GAPDH 的引物由生物工程(上海)有限公司设计与合成。*PHB* 的引物序列为正向:5′-TGTCATTTTGACCGATTCCG-3′,反向:3′-CTGGACATTACGTGGTCGAG-5′;GAPDH 的引物序列为正向:5′-GGAAGCTTGTCATCAATGGAAATC-3′,反向:5′-TGATGACCC-3′。*PHB* 的 mRNA 表达水平,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式进行计算和分析。

1.5 Western blot 检测

用 PBS 缓冲液清洗培养密度约 80%的细胞系 2 次,使用添加了苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride,PMSF)的高性能裂解液(RIPA 裂解液,Boster,武汉)完全裂解细胞,并以 4 ℃、13 000×*g* 离心 15 min,收集上清液。使用 BCA 蛋白检测试剂盒(Solarbio,北京)测量蛋白质浓度。每个蛋白质样品取 20 μg,经过 SDS-PAGE 分离,转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上(Millipore,美国)。无蛋白快速封闭液(Boster,武汉)封闭膜,并使用 TBST 冲洗液洗涤膜 3 次,每次 5 min。随后,将膜与 *PHB*(Proteintech Group,武汉)和 β-Tubulin(Boster 武汉)的一抗在 4 ℃摇床上孵育过夜,之后与二抗孵育 1 h。TBST 冲洗液洗涤膜 3 次,每次 10 min。使用增强化发光试剂盒(Boster,武汉)将印迹可视化。

1.6 *PHB* 的表达与消化道肿瘤患者预后及临床病理特征的相关性分析

采用总生存期(overall survival,OS)研究 *PHB* 表达与患者生存之间的关系。根据 *PHB* 表达水平的中位数,将患者划分为高表达组和低表达组。使用 R 软件包“Survival”和“SurvMiner”展示了患者的生存情况。同时,利用 R 软件包“limma”和“Nagpur”进行临床相关研究。使用 R 软件包“pROC”和“ggplot2”对 TCGA 和 GTEx RNAseq 数据进行分析和可视化,并计算诊断和预后的 ROC 曲线下的面积(area under the ROC curve,AUC)。

1.7 肿瘤微环境、肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性分析

利用 R 软件包“ggplot2”“ggpubr”和“ggExtra”分析 *PHB* 表达与肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)之间的相关性,Spearman 方法计算肿瘤突变负荷(tumor mutational burden,TMB)、微卫星不稳定性(microsatellite instability,MSI)与 *PHB* 表达的相关性。图像可视化使用 R 软件包“fmsb”。

1.8 免疫细胞浸润分析

使用 CIBERSORT 评估 33 种癌症的免疫细胞浸润情况,并通过 R 软件包“ggplot2”“ggpubr”和“ggExtra”分析 *PHB* 表达与细胞免疫浸润之间的相关性。采用 Immuneeconv R 软件包获得免疫评分[8]。

1.9 GSEA 富集分析

GSEA(https://www.gsea-msigdb.org/gsea/downloads.jsp)提供基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)的基因集[9]。使用 R 软件包“limma”“org.Hs.eg.db”“clusterprofiler”和“enrichplot”对 GO 和 KEGG 进行功能注释和路径富集分析。

1.10　药物敏感性分析

为了分析 *PHB* 在 DT 中的药物敏感性,从 CallMiner™ 下载 NCI-60 化合物活性数据和 RNA-seq 表达谱(https://discover.nci.nih.gov/cellminer/home.do)。选择 FDA 批准的药物或临床试验中的药物进行分析。使用 R 软件包“impute”“limma”“ggplot2”和“ggpubr”将其可视化。

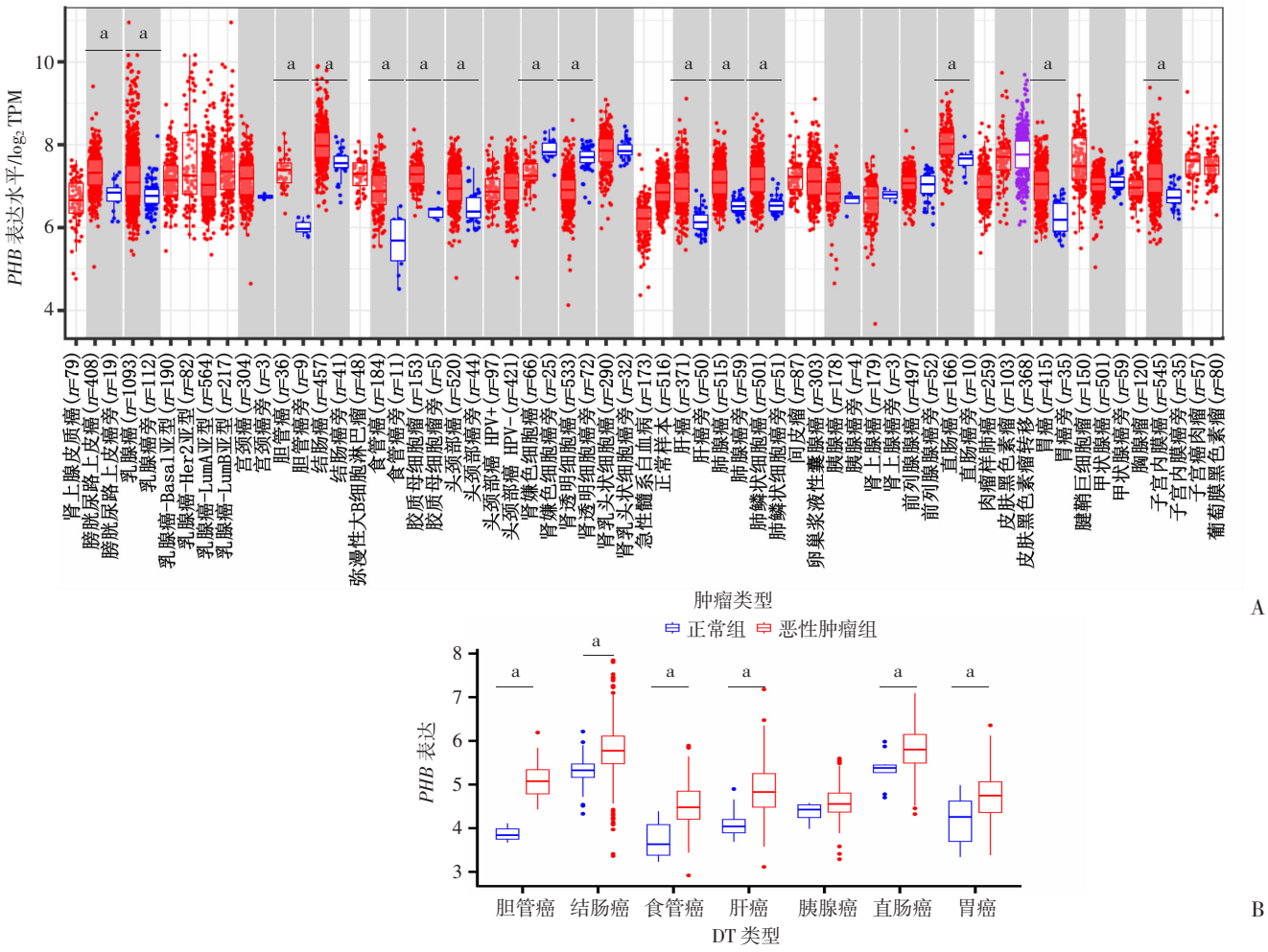
1.11　统计学分析

本研究中的所有基因数据经过对数转换以实现归一化处理。*PHB* 的差异表达采用 Wilcoxon 检验。选用 Spearman 等级相关系数评估 *PHB* 基因表达与免疫细胞浸润丰度以及基因共表达分析之间的关联性。*PHB* 表达水平与癌症中 MMR 和 DNA 甲基转移酶突变之间的相关性采用 Pearson 相关分析。采用 Kaplan-Meier 曲线分析 *PHB* 对 DT 患者预后的影响。2 组数据间比较采用 *t* 检验。多组数据间比较采用单因素方差分析。数据分析使用 R 软件(4.2.1 版,www.R-project.org),并运行 R 软件包完成结果的多重可视化。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　*PHB* 在 DT 中高表达

通过 TCGA、TIMER 数据库探索 *PHB* 在不同组织中的表达水平,结果显示:*PHB* 在食管癌、胆管癌和肝癌等 17 种肿瘤中呈高表达($P<0.01$,图 1A),其中 *PHB* 在所有的 DT 中呈高表达($P<0.01$,图 1B)。BioGRID 数据库的分析发现,*PHB* 在各类肿瘤中表现为突变、结构变异、扩增、深度缺失和多重变异。其中扩增最为突出,主要表现在乳腺癌(6.37%)、间皮瘤(4.60%)和子宫肉瘤(3.51%,图 1C)。

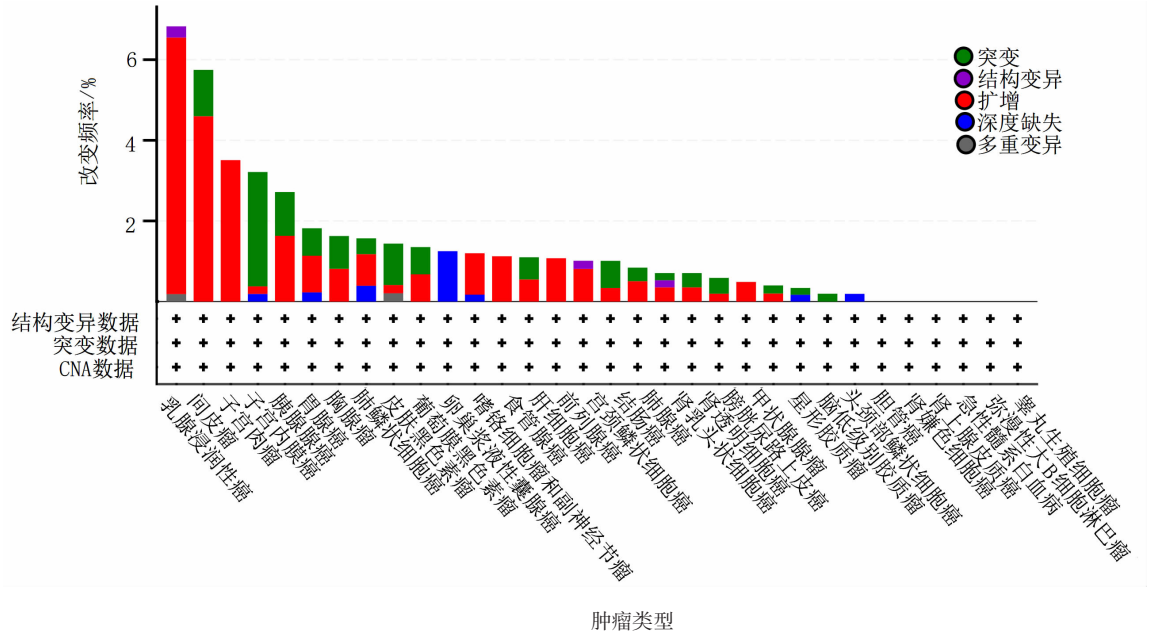


a:$P<0.01$

A:*PHB* 在 33 类肿瘤中的表达;B:*PHB* 在 DT 中的表达

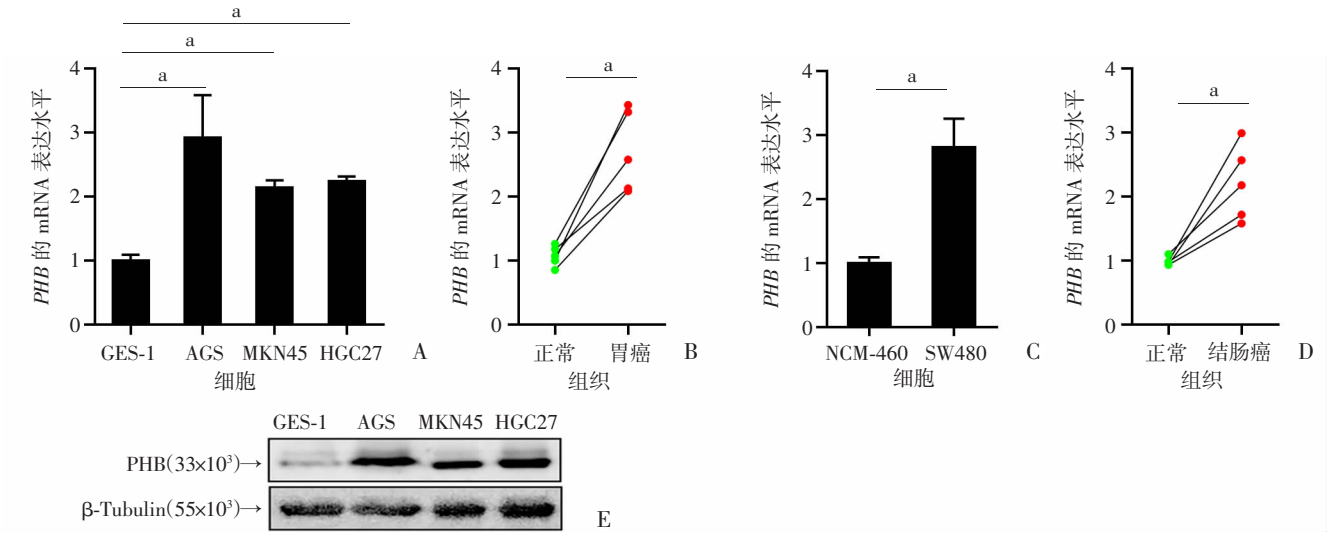
图 1　*PHB* 在 DT 中的表达情况及体细胞突变情况

(图 1C 续下页)



C:*PHB* 在肿瘤中的突变情况

续图 1 *PHB* 在 DT 中的表达情况及体细胞突变情况



a:$P<0.01$

A:RT-qPCR 验证人胃癌细胞系中 *PHB* 的 mRNA 表达;B:RT-qPCR 验证人胃癌组织中 *PHB* 的 mRNA 表达水平;C:RT-qPCR 验证人结肠癌细胞系中 *PHB* 的 mRNA 表达水平;D:RT-qPCR 验证人结肠癌组织中 *PHB* 的 mRNA 表达水平;E:Western blot 验证人胃癌细胞系中 *PHB* 的蛋白表达水平

图 2 RT-qPCR 和 Western blot 验证 *PHB* 在人胃癌、结肠癌细胞系和组织中的表达

2.2 *PHB* 表达的验证

RT-qPCR 实验证实:与正常胃黏膜细胞(GES-1)比较,*PHB* 在胃癌细胞(AGS、MKN45 和 HGC27)中高表达($P<0.01$,图 2A)。与正常胃组织比较,*PHB* 在胃癌组织中表达升高($P<0.01$,图 2B)。*PHB* 在人结肠癌细胞株 SW480 和结肠癌组织中同样呈高表达($P<0.01$,图 2C、D)。Western blot 实验证实:与正常胃细胞(GES-1)比较,胃癌细胞(AGS、MKN45 和 HGC27)的 *PHB* 蛋白表达水平更高($P<0.05$,图 2E)。

2.3　诊断、预后和临床病理分析

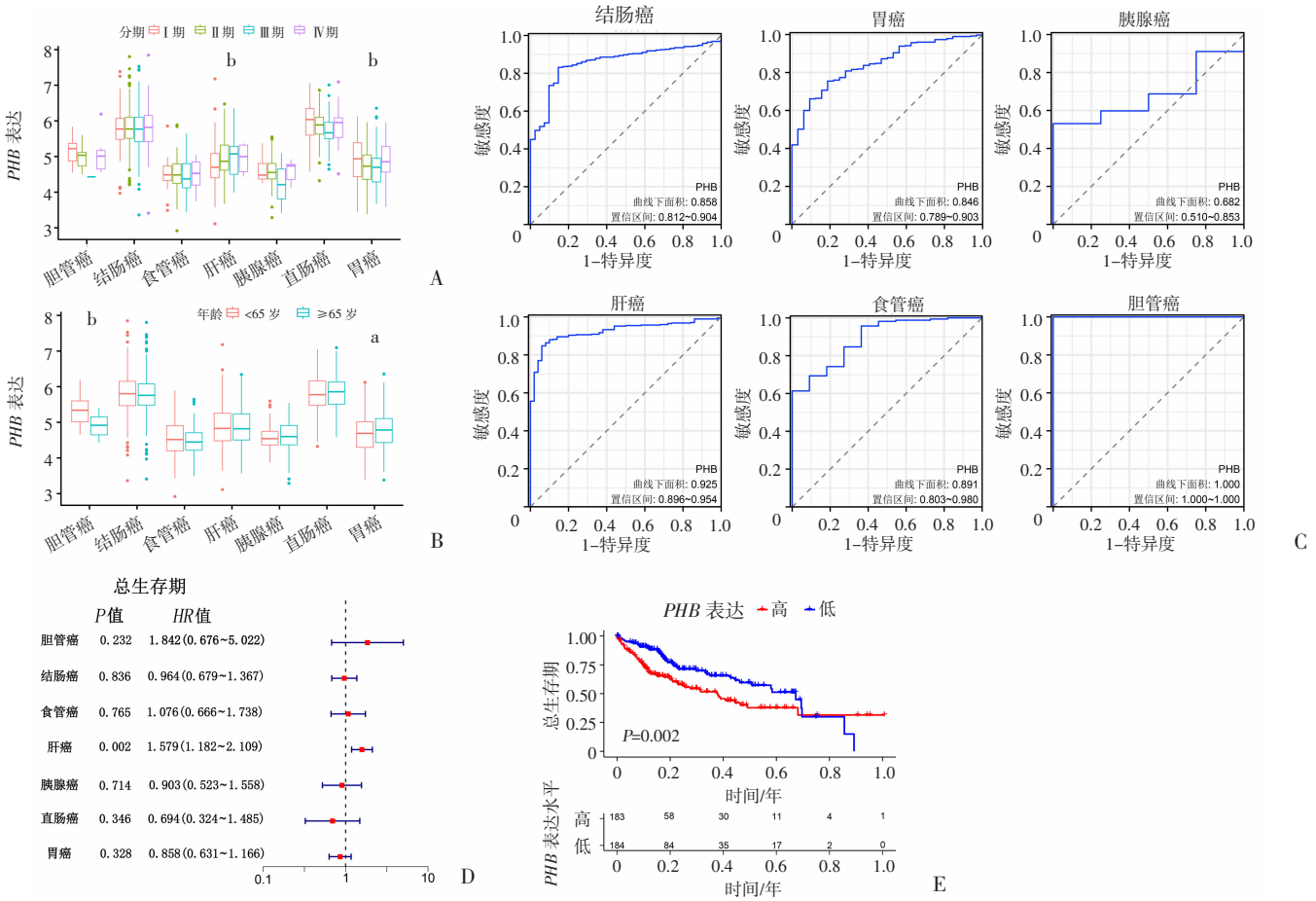
PHB 的表达与肝癌和胃癌的肿瘤分期相关($P<0.01$,图 3A),与胆管癌和胃癌的年龄相关($P<0.05$,图 3B)。此外,ROC 曲线验证了 *PHB* 在不同癌症中的诊断价值。结果显示:*PHB* 对 6 种 DT 具有中等以上的诊断准确性(AUC>0.68,图 3C)。*PHB* 对 DT 患者的生存影响结果显示:肝癌患者中,*PHB* 高表达的患者生存期更短($P=0.002$,图 3D、E)。

2.4　肿瘤微环境(TME)、肿瘤突变负荷(TMB)和微卫星不稳定性(MSI)分析

TME 刺激肿瘤细胞间的异质性,导致肿瘤细胞具有多耐药性,并促进肿瘤细胞的增殖和转移。通过 TME 研究 *PHB* 在 DT 中的表达关系。结果显示:在所有 DT 中,*PHB* 的表达与基质细胞和免疫细胞呈负相关($P<0.05$,表 1)。TMB 表示每百万个碱基中的碱基突变数。MSI 指的是由于基因插入或缺失,肿瘤的微卫星位点上出现新的微卫星等位基因。结果表明,在胃癌、肝癌和结肠癌中,*PHB* 与 TMB 和 MSI 呈明显正相关($P<0.05$,图 4)。

2.5　*PHB* 与免疫细胞浸润

PHB 在不同癌症类型中与免疫细胞的相互作用密切相关。采用 CIBEROR 分析 33 种恶性肿瘤中免疫浸润细胞与 *PHB* 的相关性,结果显示:*PHB* 在不同癌症类型中与免疫细胞的表达呈现多样的关系($P<0.05$,表 2)。其中 *PHB* 在结肠癌中的表达与 M2 型巨噬细胞呈正相关($P=0.03$);在胆管癌中与静息树突状细胞、活化 $CD4^+$ 记忆 T 细胞和调节性 T 细胞呈正相关($P<0.05$);在食管癌中与肥大细胞的激活呈正相关($P=0.030$);在肝癌中与 M0、M2 型巨噬细胞和单核细胞呈正相关($P<0.05$);在胰腺癌中与单核细胞呈负相关($P=0.025$);在直肠癌中与静息树突状细胞、嗜酸性粒细胞和活化 $CD4^+$ 记忆 T 细胞呈正相关($P<0.05$);在胃癌中与 M0 型巨噬细胞、活化肥大细胞和中性粒细胞等 6 种免疫细胞呈正相关。这些发现揭示了 *PHB* 在肿瘤中的表达与免疫细胞浸润之间的复杂联系。



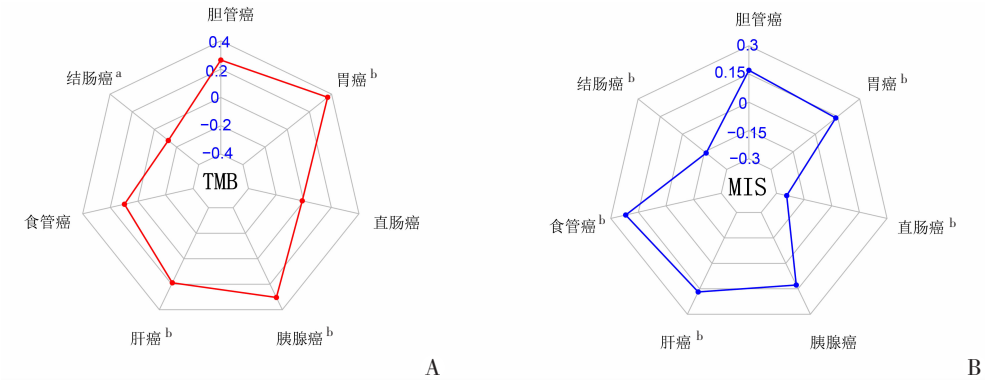
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:*PHB* 在不同肿瘤分期组织中的表达;B:*PHB* 在不同年龄组肿瘤组织中的表达;C:ROC 诊断曲线;D:总生存期(OS)森林图;E:不同 *PHB* 表达肝癌患者的生存曲线

图 3　*PHB* 的表达与 DT 患者肿瘤分期、年龄、诊断和预后的关系

表 1　肿瘤中 *PHB* 的表达与基质细胞、免疫细胞评分的相关分析

肿瘤类型	基质细胞评分		免疫细胞评分	
	相关性	*P* 值	相关性	*P* 值
胃癌	−0.33	4.30E-11	−0.20	1.00E-04
结肠癌	−0.27	9.60E-09	−0.22	2.90E-06
肝癌	−0.27	1.10E-07	−0.12	0.016
胰腺癌	−0.35	1.90E-06	−0.26	<0.001
食管癌	−0.34	9.60E-06	−0.24	0.002



A　　B

a：*P*<0.05；b：*P*<0.01

A：肿瘤突变负荷　红色曲线表示相关系数；B：微卫星不稳定性　蓝色曲线表示相关系数

图 4　*PHB* 的表达与肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性的关系

表 2　肿瘤中 *PHB* 的表达与免疫细胞浸润的相关分析

细胞		胃癌	结肠癌	肝癌	胰腺癌	食管癌	胆管癌	直肠癌
M2 型巨噬细胞	*r* 值	/	0.38	0.15	/	/	/	/
	P 值	/	0.030	0.016	/	/	/	/
静息树突状细胞	*r* 值	/	/	/	/	/	0.10	0.17
	P 值	/	/	/	/	/	0.046	0.036
活化 $CD4^+$ 记忆 T 细胞	*r* 值	0.20	/	/	/	/	0.22	0.31
	P 值	1.60E-04	/	/	/	/	7.20E-06	9.90E-05
调节性 T 细胞	*r* 值	/	/	/	/	/	0.12	/
	P 值	/	/	/	/	/	0.016	/
活化肥大细胞	*r* 值	0.12	/	/	/	0.18	/	/
	P 值	0.019	/	/	/	0.030	/	/
M0 型巨噬细胞	*r* 值	0.24	/	0.25	/	/	/	/
	P 值	5.50E-06	/	4.30E-05	/	/	/	/
单核细胞	*r* 值	/	/	0.25	−0.17	/	/	/
	P 值	/	/	0.008	0.025			
嗜酸性粒细胞	*r* 值	/	/	/	/	/	/	0.22
	P 值	/	/	/	/	/	/	0.006
中性粒细胞	*r* 值	0.17	/	/	/	/	/	/
	P 值	0.001	/	/	/	/	/	/
静息自然杀伤细胞	*r* 值	0.17	/	/	/	/	/	/
	P 值	0.001	/	/	/	/	/	/
滤泡辅助性 T 细胞	*r* 值	0.24	/	/	/	/	/	/
	P 值	4.20E-06	/	/	/	/	/	/

2.6　GSEA 富集分析

为了验证 *PHB* 在 DT 中的生物学功能,使用 R 语言进行了 GSEA 富集分析。GO 结果显示 *PHB* 与皮质醇代谢过程、线粒体翻译、SNRNA 加工与代谢、mRNA 稳定性和嗅觉感受器相关(图 5A)。*PHB* 在细胞质 DNA 感应通路、RIG1 样受体信号通路、PPAR 信号通路、钙离子信号通路和氮代谢中得到主要富集(图 5B)。

2.7　*PHB* 的药敏分析

利用 CellMiner™ 数据库对药物敏感性与 *PHB* 表达之间的潜在关系。结果显示,*PHB* 的表达与氨萘非特、普拉西诺特和阿比特龙等 13 种药物敏感性呈正相关($P<0.05$),但与 AEG-40730、吉达塞利和卡哈拉利德-F 呈负相关($P<0.05$,图 6)。

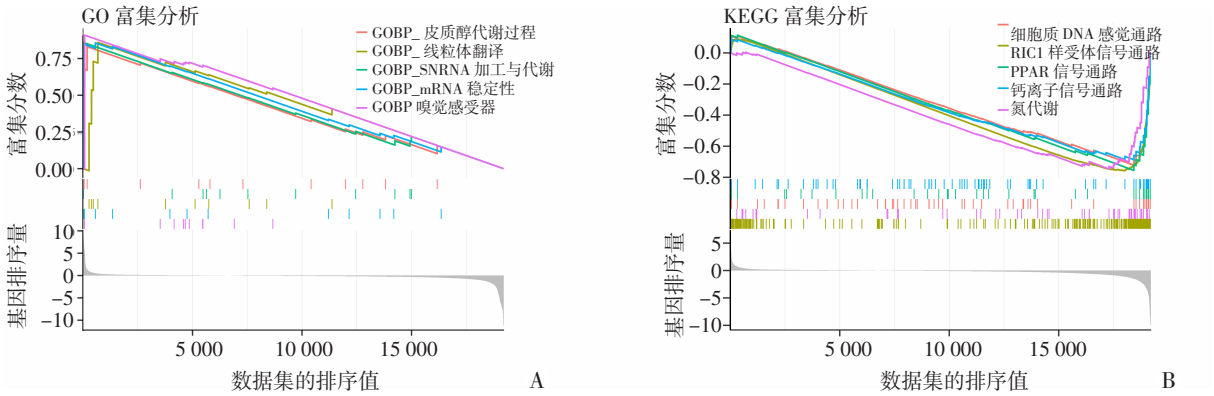


图 5　GSEA 的 GO(A)与 KEGG(B)富集分析

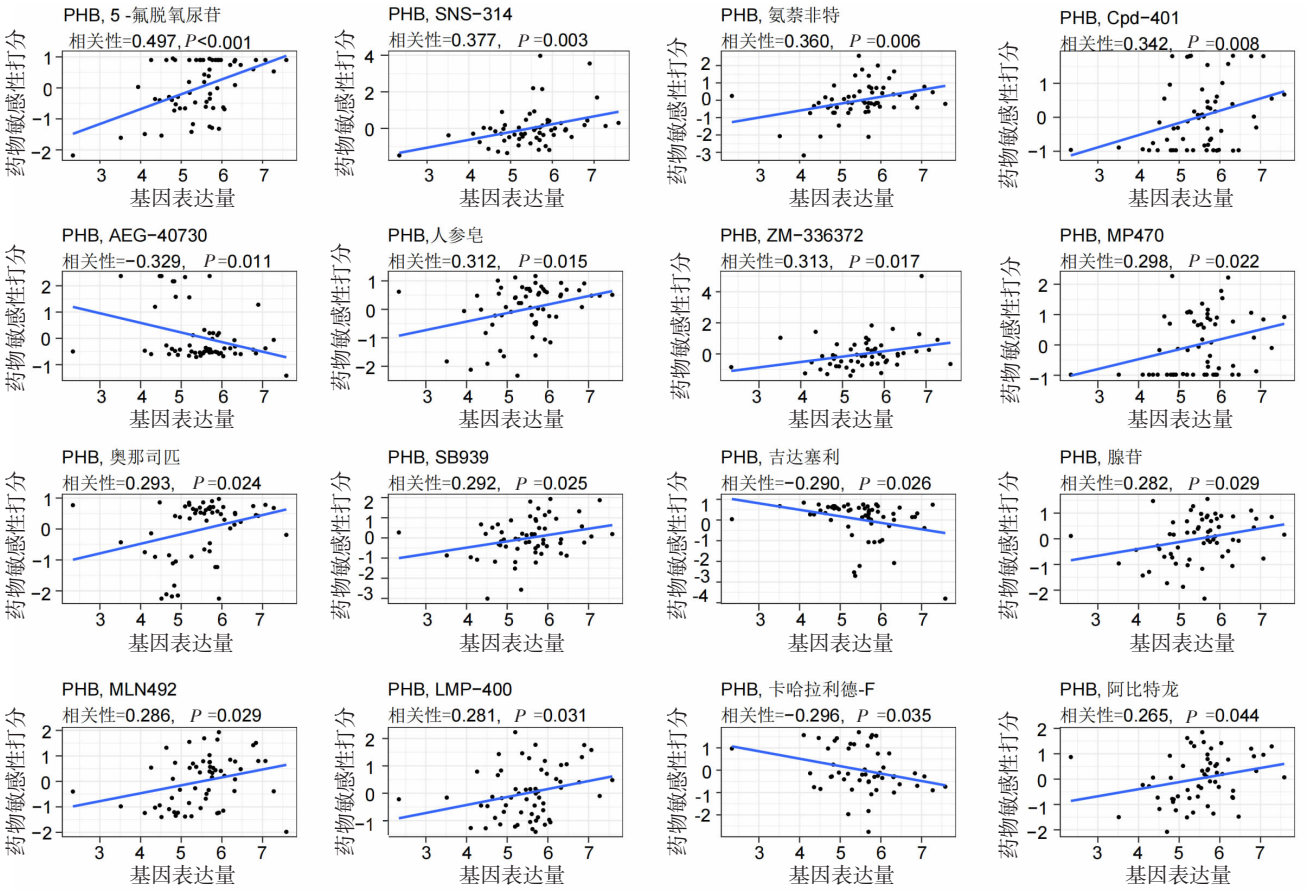


图 6　*PHB* 的表达与药物敏感性的相关分析

3 讨论

根据 WHO 第五版 DT 分类,DT 覆盖范围很广,最常见的人类 DT 包括食管癌[10]、胃癌[11]、结直肠癌[12]、肝癌[13]和胰腺癌[14]。对于大多数 DT 患者来说,若恶性肿瘤可以在早期得到准确的诊断,那么相应的手术和辅助放化疗将显著改善预后。遗憾的是,由于诊断策略的局限性和未揭示的肿瘤特征,大多数患者在进入晚期阶段或发生远处转移时才能得到明确诊断[3]。因此,对各种肿瘤相关分子生物标志物的更多研究和对潜在调控网络的详细披露有助于改善 DT 患者的预后。

3.1 *PHB* 具有作为癌症诊断和预后分子标志物的潜力

本研究基于生物信息学理论和方法,综合探讨了 *PHB* 在 DT 中的作用。研究结果显示:*PHB* 在 DT 中广泛高表达。为了验证生物信息学研究结果的准确性,进一步通过 RT-qPCR 和 Western blot 实验发现 *PHB* 在胃癌和结肠癌细胞与组织中为高表达,实验结果与生物信息学结果相一致。先前的研究已证明 *PHB* 在多种癌症中高表达。如在不同类型的癌症和糖尿病中,*PHB* 的酪氨酸磷酸化缺陷与疾病的发展密切相关[15]。在胃癌中,过表达的 *PHB* 被认为是组织检测和分化的生物标志物[16]。在膀胱癌中,也发现 *PHB* 表达上调,并与不良预后相关[17]。在宫颈癌组织中,*PHB* 水平降低与 *p*21 表达减少密切相关[18]。此外,*PHB* 在结直肠癌、甲状腺癌和非移行性膀胱癌中的表达水平增高,而在肿瘤去分化和胃癌发生时下降[19]。同时,过表达的 *PHB* 是弥漫大 B 细胞淋巴瘤发生侵袭时的标志物[20]。该研究表明 *PHB* 与 DT 患者临床病理关系紧密。结果显示,*PHB* 与患者的年龄和肿瘤分期有关。ROC 曲线证实 *PHB* 对 DT 患者具有良好的诊断价值,并且其在不同癌症类型中均具有一定的诊断潜力。此外,在肝癌患者中,高表达的 *PHB* 导致生存时间缩短。此前的研究还指出,*PHB* 是小细胞肺癌[21]、胰腺癌[22]、胃癌[23]、脑胶质瘤[34]、鼻咽癌[25]、结直肠癌[26]和肝癌[27]等患者预后不良的因素之一。除此之外,STOML2 通过激活 MAPK 信号通路与 *PHB* 相互作用,促进结直肠癌增殖[28]。因此,抑制 *PHB* 基因表达可能有助于延长患者的生存时间。

TME 对恶性肿瘤的发展具有重要影响[29]。本研究结果显示:在所有 DT 中,*PHB* 基因的表达与基质细胞评分和免疫细胞评分呈负相关。肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性可作为肿瘤发展的重要影响因素和抗 PD 单药治疗的生物标志物[30],通过进一步的研究发现 *PHB* 与胃癌、肝癌和结肠癌的 TMB 和 MSI 之间存在显著正相关关系。研究表明,*PHB* 与肿瘤免疫过程有关[31]。本研究利用 CIBERSORT 算法研究了 *PHB* 表达与 22 种免疫细胞浸润水平之间的关系。结果显示,*PHB* 的表达与 22 种免疫细胞相关。研究表明 *PHB* 是巨噬细胞功能可塑性的关键调节因子[32]。

3.2 *PHB* 与耐药性有关,可能影响化疗药物的治疗效果

进一步探究 *PHB* 与药物敏感性之间的关系,结果显示 *PHB* 的表达与氨萘非特、普拉西诺特和阿比特龙等 13 种药物敏感性呈正相关,但与 AEG-40730、吉达塞利 PKI-587 和卡哈拉利德-F 呈负相关。研究表明 *PHB* 抑制线粒体 ROS 可驱动胶质母细胞瘤进展和治疗耐药性[33],c-Kit/磷酸化 *PHB* 轴通过 Notch3-PBX1 和 β-catenin-ABCG2 信号转导增强卵巢癌干性和化疗耐药性[34],靶向 *PHB* 从而抑制黑色素瘤生长并克服对靶向治疗的耐药性[35]。总体而言,*PHB* 可能与某些化疗药物的耐药性有关,这表明 *PHB* 在一定程度上会影响化疗药物对癌症患者的治疗效果。

综上所述,本研究综合探讨了 *PHB* 在 DT 中的各方面特征,涵盖了基因表达、生存预后、肿瘤免疫微环境、MSI、TMB、信号通路和药物敏感性等,并为 *PHB* 在调节肿瘤化疗抗性方面的潜在作用提供了新的见解。尽管本研究通过 RT-qPCR 和 Western blot 证明胃癌和结肠癌中 *PHB* 高表达,并提示 *PHB* 能够用于预测肝癌患者的预后,但还存在一些局限性。首先,分析的所有 DT 病例的临床数据均来自公共数据库。其次,由于条件的限制,只验证了 *PHB* 在胃癌和结肠癌中的表达。因此,需要进一步进行更多的临床病例研究、细胞实验和动物实验证实本研究的结果。基于本研究的分析结果和既往研究,有理由相信针对 *PHB* 在 DT 的免疫微环境中的潜在调控机制研究是有前景的,并值得在未来的研究中进一步探索。

参考文献:

[1] TANG J, CHEN J W, WANG Y Q, *et al*. The role of MiRNA-433 in malignant tumors of digestive tract as tumor suppressor[J]. Cancer Rep (Hoboken), 2022, 5(9): e1694. DOI: 10.1002/cnr2.1694.

[2] REITANO E, DE'ANGELIS N, GAVRIILIDIS P, *et al*. Oral bacterial microbiota in digestive cancer patients: a systematic review[J]. Microorganisms, 2021, 9(12): 2585. DOI: 10.3390/microorganisms9122585.

[3] WANG J T, MA X, SI H, *et al*. Role of long non-coding RNA H19 in therapy resistance of digestive system cancers [J]. Mol Med, 2021, 27(1): 1. DOI: 10.1186/s10020-020-00255-2.

[4] WHITE J J, LEDBETTER D H, EDDY R L Jr, *et al*.

Assignment of the human prohibition gene (PHB) to chromosome 17 and identification of a DNA polymorphism [J]. Genomics, 1991, 11(1): 228-230. DOI: 10.1016/0888-7543(91)90126-y.

[5] MISHRA S, MURPHY L C, NYOMBA B L, *et al*. Prohibitin: a potential target for new therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(4): 192-197. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.02.004.

[6] MISHRA S, ANDE S R, NYOMBA B L G. The role of prohibitin in cell signaling[J]. FEBS J, 2010, 277(19): 3937-3946. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07809.x.

[7] SIMONS K, TOOMRE D. Lipid rafts and signal transduction [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000, 1(1): 31-39. DOI: 10.1038/35036052.

[8] IJSSELSTEIJN R, JANSEN J G, DE WIND N. DNA mismatch repair-dependent DNA damage responses and cancer [J]. DNA Repair (Amst), 2020, 93: 102923. DOI: 10.1016/j.dnarep.2020.102923.

[9] KANEHISA M, FURUMICHI M, SATO Y, *et al*. KEGG: integrating viruses and cellular organisms[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D545-D551. DOI: 10.1093/nar/gkaa970.

[10] 王润媛, 陈星材, 吴蔚, 等. 基于增强CT图像和Swin Transformer网络的食管癌T分期智能诊断模型的构建与评估[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(16): 1770-1778. DOI:10.16016/j.2097-0927.202302021.
WANG R Y, CHEN X C, WU W,*et al*. Construction and evaluation of an intelligent diagnosis model for T staging of esophageal cancer based on contrast-enhanced CT images and Swin Transformer network [J]. J Army Med Univ, 2023, 45(16): 1770-1778. DOI:10.16016/j.2097-0927.202302021.

[11] 郭丹, 李雅睿, 张旭, 等. FKBP10促进胃癌细胞增殖与转移的机制研究[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(11): 1181-1188. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202206078.
GUO D, LI Y R, ZHANG X,*et al*. Mechanism of FKBP10 promoting the proliferation and metastasis of gastric cancer cells [J]. J Army Med Univ, 2023, 45(11): 1181-1188. DOI: 10.16016/ J.2097-0927.202206078.

[12] 孙燕, 王灵巧, 张国伟, 等. ACSS2介导的上皮间质转化在乙醇促结直肠癌细胞迁移中的作用及机制[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(17): 1806-1818. DOI:10.16016/j.2097-0927.202303141.
SUN Y, WANG L Q, ZHANG G W, *et al*. The role and mechanism of ACSS2-mediated epithelial-mesenchymal transition in ethanol-induced migration of colorectal cancer cells [J]. J Army Med Univ, 2023, 45(17): 1806-1818. DOI:10.16016/j.2097-0927.202303141.

[13] 王松, 张炳兰, 张秉强. 靶向EPCAM的CAR-T细胞抗肝癌细胞的体外杀伤性研究[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(18): 1947-1954. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202205133.
WANG S, ZHANG B L, ZHANG B Q. Effects of CAR-T cells targeting EPCAM on liver cancer cells *in vitro* [J]. J Army Med Univ, 2023, 45(18): 1947-1954. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202205133.

[14] 张旭东, 刘浩昂, 王志浩, 等. Smad3通过p38/MAPK信号通路调控细胞自噬及凋亡促进胰腺癌进程[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(19): 1968-1978. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202205059.
ZHANG X D, LIU H A, WANG Z H, *et al*. Smad3 promotes the progression of pancreatic cancer by regulating autophagy and apoptosis through p38/MAPK signaling pathway [J]. J Army Med Univ, 2022, 44(19): 1968-1978. DOI:10.16016/j.2097-0927.202205059.

[15] ANDE S R, NGUYEN K H, PADILLA-MEIER G P, *et al*. Expression of a mutant prohibitin from the aP2 gene promoter leads to obesity-linked tumor development in insulin resistance-dependent manner [J]. Oncogene, 2016, 35(34): 4459-4470. DOI: 10.1038/onc.2015.501.

[16] ROSTAMI-NEJAD M, REZAEI-TAVIRANI M, MANSOURI V, *et al*. Impact of proteomics investigations on gastric cancer treatment and diagnosis[J]. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2019, 12(Suppl1): S1-S7.

[17] JIANG L, DONG P, ZHANG Z, *et al*. Akt phosphorylates prohibitin 1 to mediate its mitochondrial localization and promote proliferation of bladder cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(2): e1660. DOI: 10.1038/cddis.2015.40.

[18] HAN Y Y, WU P, WANG Z, *et al*. Ubiquinol-cytochrome C reductase core protein Ⅱ promotes tumorigenesis by facilitating p53 degradation[J]. EBioMedicine, 2019, 40: 92-105. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.01.002.

[19] CHEN D B, CHEN F L, LU X R, *et al*. Identification of prohibitin as a potential biomarker for colorectal carcinoma based on proteomics technology[J]. Int J Oncol, 2010, 37(2): 355-365. DOI: 10.3892/ijo_00000684.

[20] BENTAYEB H, AITAMER M, PETIT B, *et al*. Prohibitin (*PHB*) expression is associated with aggressiveness in DLBCL and flavagline-mediated inhibition of cytoplasmic *PHB* functions induces anti-tumor effects[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 450. DOI: 10.1186/s13046-019-1440-4.

[21] XU Z H, MIAO Z W, JIANG Q Z, *et al*. Brain microvascular endothelial cell exosome-mediated S100A16 up-regulation confers small-cell lung cancer cell survival in brain[J]. FASEB J, 2019, 33(2): 1742-1757. DOI: 10.1096/fj.201800428R.

[22] WANG W B, XU L, YANG Y, *et al*. A novel prognostic marker and immunogenic membrane antigen: prohibitin

(PHB) in pancreatic cancer[J]. Clin Transl Gastroenterol, 2018, 9(9): 178. DOI: 10.1038/s41424-018-0044-1.

[23] MA W H, XU Z L, WANG Y T, *et al*. A positive feedback loop of SLP2 activates MAPK signaling pathway to promote gastric cancer progression[J]. Theranostics, 2018, 8(20): 5744-5757. DOI: 10.7150/thno.28898.

[24] KOSGODAGE U S, UYSAL-ONGANER P, MACLATCHY A, *et al*. Cannabidiol affects extracellular vesicle release, miR21 and miR126, and reduces prohibitin protein in glioblastoma multiforme cells[J]. Transl Oncol, 2019, 12(3): 513-522. DOI: 10.1016/j.tranon.2018.12.004.

[25] WANG H R, ZHOU Y J, OYANG L, *et al*. LPLUNC1 stabilises PHB_1 by counteracting TRIM21-mediated ubiquitination to inhibit NF-κB activity in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncogene, 2019, 38(25): 5062-5075. DOI: 10.1038/s41388-019-0778-6.

[26] MA W H, CHEN Y H, XIONG W J, *et al*. STOML2 interacts with *PHB* through activating MAPK signaling pathway to promote colorectal Cancer proliferation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 359. DOI: 10.1186/s13046-021-02116-0.

[27] WANG Y Q, CHEN H D, LIU Y X, *et al*. Treatment optimization for recurrent hepatoblastoma: retrospective study from a hepatoblastoma cohort in Southern China[J]. Pediatr Surg Int, 2022, 38(7): 1031-1039. DOI: 10.1007/s00383-022-05126-x.

[28] MA W, CHEN Y, XIONG W, *et al*. STOML2 interacts with PHB through activating MAPK signaling pathway to promote colorectal cancer proliferation [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 359. DOI:10.1186/s13046-021-02116-0.

[29] VEENSTRA R G, FLYNN R, KREYMBORG K, *et al*. B7-H3 expression in donor T cells and host cells negatively regulates acute graft-versus-host disease lethality [J]. Blood, 2015, 125(21): 3335-3346. DOI: 10.1182/blood-2014-09-603357.

[30] MACGREGOR H L, SAYAD A, ELIA A, *et al*. High expression of B7-H3 on stromal cells defines tumor and stromal compartments in epithelial ovarian cancer and is associated with limited immune activation[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 357. DOI: 10.1186/s40425-019-0816-5.

[31] BOLTON-MAGGS P H B, GEORGE J N. Immune thrombocytopenia treatment[J]. N Engl J Med, 2021, 385(10): 948-950. DOI: 10.1056/NEJMe2110953.

[32] XU Y X Z, ANDE S R, IKEOGU N M, *et al*. Prohibitin plays a role in the functional plasticity of macrophages [J]. Mol Immunol, 2022, 144: 152-165. DOI: 10.1016/j.molimm.2022.02.014.

[33] HUANG H, ZHANG S, LI Y, *et al*. Suppression of mitochondrial ROS by prohibitin drives glioblastoma progression and therapeutic resistance [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3720. DOI:10.1038/s41467-021-24108-6.

[34] FANG C H, LIN Y T, LIANG C M, *et al*. A novel c-Kit/phospho-prohibitin axis enhances ovarian cancer stemness and chemoresistance *via* Notch3-PBX1 and β-catenin-ABCG2 signaling [J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 42. DOI:10.1186/s12929-020-00638-x.

[35] NAJEM A, KRAYEM M, SABBAH S, *et al*. Targeting prohibitins to inhibit melanoma growth and overcome resistance to targeted therapies [J]. Cells, 2023, 12(14). DOI:10.3390/cells12141855.

(收稿:2023-06-24;修回:2023-11-13)

(编辑 栾 嘉)