DOI:10.16016/j.2097-0927.202404140

APEX 家族在肝细胞癌中的作用及其作为生物标志物的分析研究

唐希贤,赵 楠,曹德东 430061 武汉,武汉大学人民医院肿瘤中心

[摘要] **目的** 分析 APEX 家族基因与蛋白在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)中的作用。**方法** 本研究利用公开数据库(TCGA 和 TNM plot)收集 HCC 和正常肝组织的表达数据,通过差异表达分析、蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interactions networks,PPI)建构和基因集富集分析(gene set enrichment analysis,GSEA)探讨 APEX 家族(APEX1 和 APEX2)在 HCC 中的表达模式、功能网络和潜在的生物学通路。采用 ROC 曲线分析评估 APEX 家族成员作为 HCC 诊断标志物的潜力,并通过生存分析探讨其与 HCC 患者预后的相关性。通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测肝细胞与 HCC 细胞中 APEX1、APEX2 mRNA 和蛋白的表达水平,通过转染分别沉默 HCC 细胞中 APEX1、APEX2,通过 CCK-8、EdU、划痕愈合实验和 Transwell 实验检测 APEX1、APEX2 对 HCC 细胞的影响。**结果** APEX1 和 APEX2 在 HCC 样本中的表达水平显著高于正常肝组织($P<0.01$)。根据公共数据库 ROC 曲线分析结果显示,APEX1 和 APEX2 预测 HCC 的 AUC 值分别为 0.922 和 0.917。PPI 网络分析揭示 APEX 家族成员通过多种信号通路调控细胞周期。生存分析表明,与低表达相比,高表达 APEX1、APEX2 的 HCC 患者的整体生存期显著缩短($P<0.05$),APEX1 与 APEX2 与 Ki-67 和 TP53 传统肿瘤生存预后因子具有高相关性($P<0.001$)。肝癌细胞中 APEX1、APEX2 mRNA 和蛋白的水平显著高于正常肝细胞($P<0.05$)。沉默 APEX1、APEX2 后,HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著降低($P<0.05$)。**结论** APEX1 和 APEX2 可作为 HCC 诊断和预后评估的潜在生物标志物,APEX1 和 APEX2 参与 HCC 增殖和转移的调控为 HCC 的早期诊断和个性化治疗提供了新的策略和靶点。

[关键词] 肝细胞癌;APEX 家族;诊断标志物;治疗靶点;生物信息学分析
[中图法分类号] R318.04; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Role of the APEX family in hepatocellular carcinoma and its potential as a biomarker

TANG Xixian, ZHAO Nan, CAO Dedong Cancer Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei Province, 430061, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the role of APEX family in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** After expression data of HCC and normal liver tissues from public databases (TCGA and TNM plot) were collected, the expression patterns, functional networks, and potential biological pathways of the APEX family in HCC were investigated through differential expression analysis, construction of protein-protein interaction networks(PPI), and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to assess the potential of APEX family members as diagnostic markers for HCC, and their correlation with HCC prognosis was anlyzed through survival analysis. RT-qPCR and Western blotting we performed to detect the expression of APEX1 and APEX2 at mRNA and protein levels in liver cells and HCC cells. The effect of silencing APEX1 and APEX2 in HCC cells were determined through CCK-8 assay, EdU assay, scratch healing test, and Transwell assay. **Results** The expression levels of the 2 members of the APEX family, APEX1 and APEX2, were significantly higher in the HCC samples than the normal liver tissues ($P<0.01$). The results of ROC curve analysis on public databases showed that the AUC value of APEX1 and APEX2 in predicting HCC was 0.922 and 0.917, respectively. PPI network analysis

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81700208)
[通信作者] 曹德东,E-mail:caodedong123@whu.edu.cn

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/)

revealed that APEX family members regulated cell cycle through various signaling pathways. Survival analysis indicated that HCC patients with high expression levels of APEX1 and APEX2 had significantly shorter overall survival than those with low levels ($P<0.05$), and APEX1 and APEX2 were highly correlated with traditional tumor survival prognostic factors Ki-67 and TP53 ($P<0.001$). The mRNA and protein levels of APEX1 and APEX2 were significantly higher in the liver cancer cells than the normal liver cells ($P<0.05$). In addition, silencing APEX1 and APEX2 resulted in notably reduced proliferation, migration, and invasion abilities of HCC cells ($P<0.05$). **Conclusion** APEX1 and APEX2 can serve as potential biomarkers for HCC diagnosis and prognosis assessment, and their involvement in the regulation of HCC proliferation and metastasis provides new strategies and targets for the early diagnosis and individualized treatment of HCC.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; APEX family; diagnostic biomarkers; therapeutic targets; bioinformatics analysis

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81700208). Corresponding author: CAO Dedong, E-mail: caodedong123@whu.edu.cn

肝癌根据病理类型可以分为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, IHCC)和混合型肝癌(combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, cHCC)。其中,HCC是最常见的类型,占肝癌的70%~85%,也是全球排名第6的常见肿瘤,发病率和死亡率均居于恶性肿瘤前列[1]。其流行病学背景涉及多种因素,包括地域、生活方式、病毒感染等。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是我国肝癌主要的致病因素之一[2]。长期慢性HBV感染可导致肝硬化,并增加罹患肝癌的风险。亚硝胺、黄曲霉毒素、长期酗酒和肥胖等同样是肝癌的重要危险因素[3-6]。APEX家族已知包含2个成员(APEX1和APEX2)。APEX1与APEX2具有DNA损伤修复以及氧化还原的功能。其中APEX1已被证实在多种肿瘤的发生发展中具有显著改变,而APEX2在肿瘤中的研究相对较少。APEX家族中APEX1在碱基切除修复途径中扮演关键角色,负责修复活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)造成的DNA损伤,同时也通过其氧化还原功能维持多种转录因子的活性,并调控它们的DNA结合能力,影响肿瘤的发生发展。这些转录因子包括AP-1、NF-κB[7]、HIF-1、p53和STAT3等[8-10]。APEX家族蛋白在多种肿瘤中的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关。本研究通过系统生物信息学方法探讨APEX家族成员在HCC的诊断、预后和治疗中的作用,旨在为HCC患者提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

本实验所有实验试剂与细胞来自美国ATCC公司。泛癌分析在泛癌筛查(图1)中,APEX家族与HCC存在较高的相关性,结合我国肝癌高发态势,遂选取肝癌中APEX1与APEX2作为研究对象。

1.1 数据获取与处理

RNA-seq数据分析:从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)的肝细胞癌项目(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)中提取424个HCC样本的RNA序列数据(以TPM格式表示),并于该数据库中选取50个癌旁正常肝组织样本作为对照。

微阵列数据源:通过TNM plot在线数据库(https://tnmplot.com/analysis/)获取了379个正常肝组织、806个原发性HCC组织和24个转移性HCC组织的微阵列转录组数据,以进一步验证RNA-seq数据分析结果。

1.2 APEX家族表达差异分析

利用TIMER2.0在线数据库(http://timer.cistrome.org/)和TNM plot数据库对APEX1与APEX2在不同器官正常与肿瘤组织中的表达差异进行可视化分析,以评估其在泛癌中的表达模式差异性。

1.3 HCC中APEX家族差异表达

使用TCGA-LIHC中的样本数据,对APEX1与APEX2在HCC与癌旁正常组织中的差异表达进行统计分析。应用ROC曲线和曲线下面积(area under the curve, AUC)分析,确定APEX1与APEX2区分HCC组织与正常组织的诊断潜力。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interactions networks, PPI)

通过GeneMANIA公共平台数据库(https://genemania.org/)构建PPI图,探索APEX1与APEX2与其他蛋白质之间的功能关系和相互作用,揭示APEX1与APEX2在HCC发病机制中的潜在作用。

1.5 基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)

下载MSigDB数据库(https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb)中的c2 Reactome路径和c5基因集

的“gmt”文件,利用 R 软件包 clusterProfiler 进行基因集富集分析,识别与 APEX 家族成员表达显著相关的生物学途径和功能。显著性阈值:$P<0.05$ 和 $q<0.25$。

1.6 免疫渗透和微环境分析

采用单样本基因集富集分析(ssGSEA)算法,评估 24 种免疫细胞群体和 14 种免疫状态在 HCC 中的渗透情况。利用 TISIDB 数据库(http://cis.hku.hk/TISIDB/)分析 APEX1 与 APEX2 表达与免疫亚型之间的相关性,进一步探讨其在调节 HCC 免疫微环境中的作用。

1.7 细胞培养和转染

选取正常肝细胞系 HL-7702 和 HCC 细胞系 Huh-7、SMMC-7721、Bel-7402 并在 21%O_2、5%CO_2、37 ℃和 95%湿度。Huh-7 通过转染来沉默 APEX1 和 APEX2,将 Huh-7 细胞在 6 孔板中培养,当细胞密度达到 60%后,添加 Opti(100 μL)和 Lipofectamine™ 2000(5 μL)并孵育 5 min 作为试剂 A,或添加 Opti(100 μL)以及 si-APEX1、si-APEX2 和 si-NC 质粒(20 ng/μL)并孵育 5 min 作为试剂 B。将试剂 A 和 B 混合在一起并孵育 20 min。16 h 后获得相应的细胞,用于后续实验。

1.8 RT-qPCR 实验

裂解细胞提取 RNA,反转录合成 cDNA,使用 qPCR 分析 APEX1 与 APEX2 基因表达。引物序列如下。APEX1:(上游引物)5′-TTCTTTGCGGCCGTCTTA-CT-3′,(下游引物)5′-GCAGTCTGAACGGCAACG-3′;APEX2:(上游引物)5′-AGACGATATCCGCATCCAGC-3′,(下游引物)5′-GGAGGTGTTCCAGCCCTTTA-3′;GAPDH:(上游引物)5′-AGTTAAAAGCAGCCCTGGTGA-3,(下游引物)5′-TTGCGTCGCCAGCCG-3′。

1.9 Western blot

收集 HL-7702、Huh-7、SMMC-7721 和 Bel-7402 细胞,使用裂解缓冲液得到等量的蛋白样品,并与电泳样品缓冲液混合加热变性加载到 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离。转移蛋白质到硝酸纤维膜上,室温下封闭 1 h,使用 CPTC-APEX1-2 孵育膜孵育,并在 4 ℃培养 12 h;使用 PBST 液冲洗 4~5 次,使用 HRP 标记二抗并孵育,再次使用 PBST 液体洗涤 4~5 次,使用化学发光底物进行检测不同细胞之间蛋白含量差异情况,拍照记录条带内容,并进行相应的数据分析。

1.10 细胞活力检测

使用 CCK-8 试剂用于检测细胞活力。将 100 μL 的细胞悬浮液分配到 96 孔板的每个孔中,并在 24、48、72 和 96 h 监测细胞生长。随后,向每个孔中加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续孵育 2 h 以完成细胞活性反应。使用酶标仪在 450 nm 波长下测量每个孔的光密度值[$D(450)$],以评估细胞生长情况。

1.11 细胞增殖检测

将 Huh-7 细胞消化后接种于 96 孔板,每孔 1×10^4 个细胞,培养过夜。加入 10 μmol/L 的 EdU 工作液,37 ℃孵育 2 h 以标记增殖细胞。用 PBS 洗涤并用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min。固定后,用 0.5%TritonX-100 的 PBS 通透化细胞 15 min,以便染色剂进入。加入反应液在室温下避光孵育 30 min 以检测 EdU 标记的细胞。用荧光显微镜观察并拍照,通过 EdU 阳性细胞的比例评估细胞增殖情况。

1.12 细胞迁移检测

通过划痕愈合实验评估细胞迁移能力。在 6 孔板中培养细胞直至形成单层细胞。利用 200 μL 的塑料移液器吸头在细胞单层上制造划痕,并记录初始划痕的宽度(0 h)。细胞在无血清培养基中继续培养 24 h。培养结束后,对划痕区域进行拍照,以评估细胞的愈合情况。通过光学显微镜精确测量划痕前缘的迁移距离,并计算其相对于初始划痕宽度的百分比,从而量化细胞的迁移和增殖能力。

1.13 细胞侵袭检测

使用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力。将基质胶按照 1∶8 的体积比例进行稀释,并将其加入 Transwell 装置的上室,在 37 ℃下孵育 30 min,以使其充分附着和固化。在 24 孔板-Transwell 装置的下室中加入 600 μL 完全培养基,为细胞提供必要的营养支持。将细胞在无血清培养基中于 37 ℃培养 24 h 以进行饥饿处理,使细胞处于更敏感的迁移状态。消化细胞后,取 100 μL 细胞溶液(含 5×10^5 个细胞/mL)加入已水合的 Transwell 上室。经过 24 h 的迁移,移除未侵入的细胞,并对渗入下室的细胞进行固定和染色,使用 95%乙醇固定细胞,用 0.1%结晶紫在室温下染色 20 min,以便清晰地显现细胞形态。使用显微镜在×400 倍视野下,随机选取 5 个视野进行细胞计数。

1.2 统计学分析

采用 R 软件进行统计分析,单因素 Cox 生存分析 APEX1 与 APEX2 表达与肝细胞性肝癌临床预后的关系。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用 Student's t 检验或单因素方差分析进行。$P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

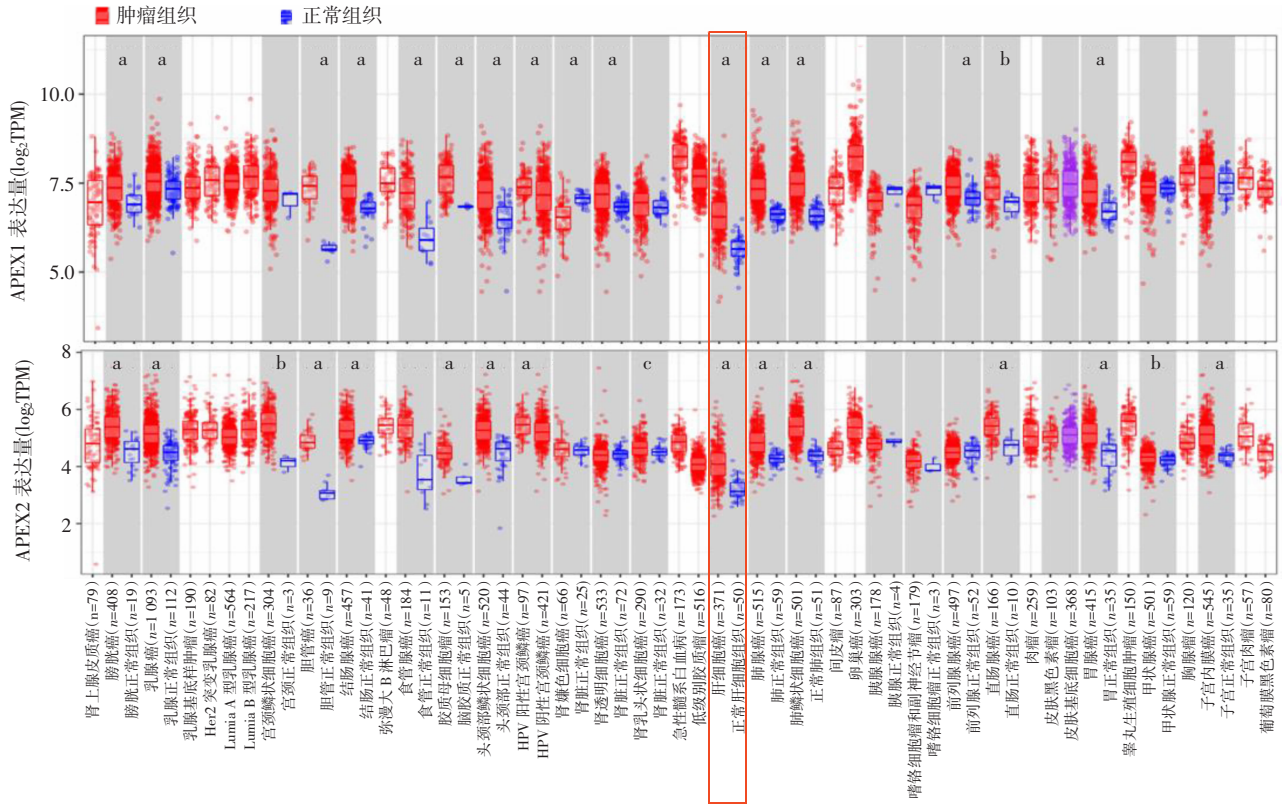
2 结果

2.1 APEX 家族成员在 HCC 中表达上调

在对生殖和消化系统肿瘤的广泛研究中,观察到 APEX1 与 APEX2 基因及其表达产物在多种肿瘤中普遍上调尤其是在 HCC 中,这种上调现象尤为显著(图 1)。通过综合分析 TCGA 数据库,HCC 样本中 APEX1 与 APEX2 的表达水平与正常肝组织相比有显著差异

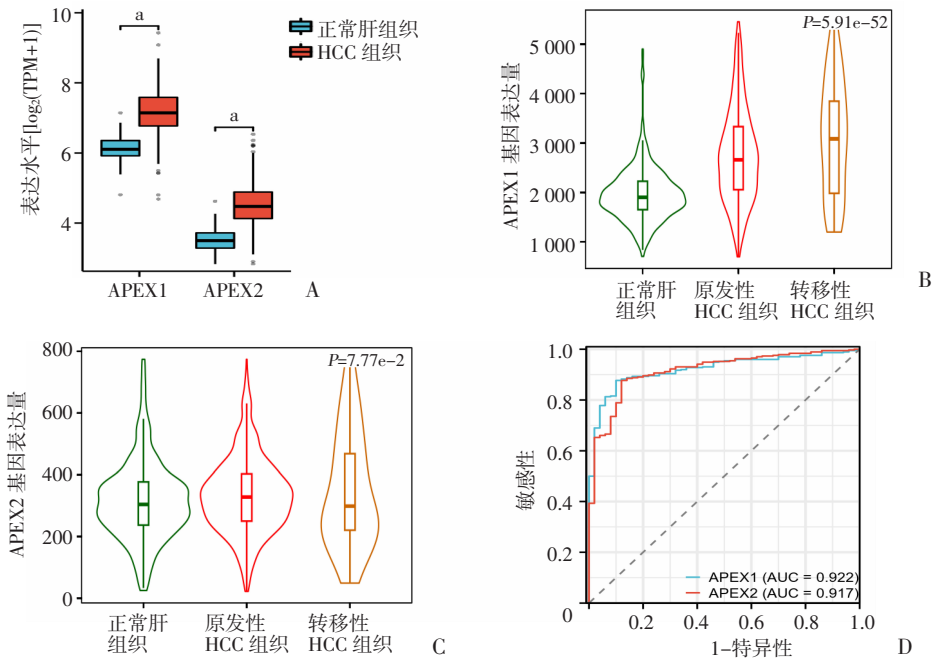
(P<0.01,图 2)。

ROC 曲线分析揭示了 APEX1 和 APEX2 在区分 HCC 样本与正常肝样本方面的高诊断准确性,其 AUC 值分别为 0.922 和 0.917(图 2D)。这表明了 APEX1 与 APEX2 作为生物标志物的高诊断价值,也反映了它们在早期肝癌诊断中的潜在应用可能性。



a:P<0.01, b:P<0.05,与正常组织比较

图 1 多种肿瘤中 APEX1 与 APEX2 表达图



A:HCC 组织和正常肝组织之间 APEX1 和 APEX2 表达产物的差异表达 a:P<0.01;B、C:APEX1 和 APEX2 在正常肝组织、原发性 HCC 组织和转移性 HCC 组织中的表达;D:APEX1 和 APEX2 的诊断 ROC 曲线

图 2 肝细胞癌(HCC)中 APEX 家族的表达和诊断价值

2.2 APEX1 与 APEX2 与肝癌的进展和转移的相关性

APEX1 与 APEX2 与肝癌进展和转移标志物(如 Ki-67 和 TP53)的相关性分析显示,Ki-67 和 TP53A 与 APEX1 和 APEX2 之间存在相关性($P<0.001$);APEX1 与 AFP 的关联强于 APEX2,但整体相关性较弱(图 3)。

2.3 APEX1 与 APEX2 在 HCC 患者中的预后价值

研究表明,与低表达组相比,APEX1 与 APEX2 高表达的 HCC 患者显示出显著较短的总生存期($P=0.022$,$P<0.001$,图 4A、C)。APEX1 高表达与较差的疾病特异性生存趋势相关,但差异无统计学意义(图 4B),APEX2 的高表达则与更短的疾病特异性生存显著相关($P=0.017$,图 4D),表明 APEX 家族的高表达与肝癌预后不良相关。

2.4 APEX1 与 APEX2 在 DNA 修复和信号调控中的关键作用及其 PPI

通过 GeneMANIA 构建的 PPI 网络揭示了 APEX1 与 MUTYH、TDG、OGG1 和 SMUG1 等蛋白质的密切相关性(图 5),在碱基切除修复途径、DNA 的脱甲基化修复起到主要作用,其作用位点集中于 8-羟基鸟嘌呤(8-OHdG)和 2-羟基腺嘌呤(2-OHA)以及 DNA 中的胸腺嘧啶(T)和甲基化的胞嘧啶(mC)。APEX2 则与 PDE12、PCNA、NEDD4L 存在密切联系,在调控 cGMP/cAMP 信号通路、DNA 的复制和损伤修复、DNA 基因重组、转录激活、染色质组装和细胞周期调控等方面起到重要作用。

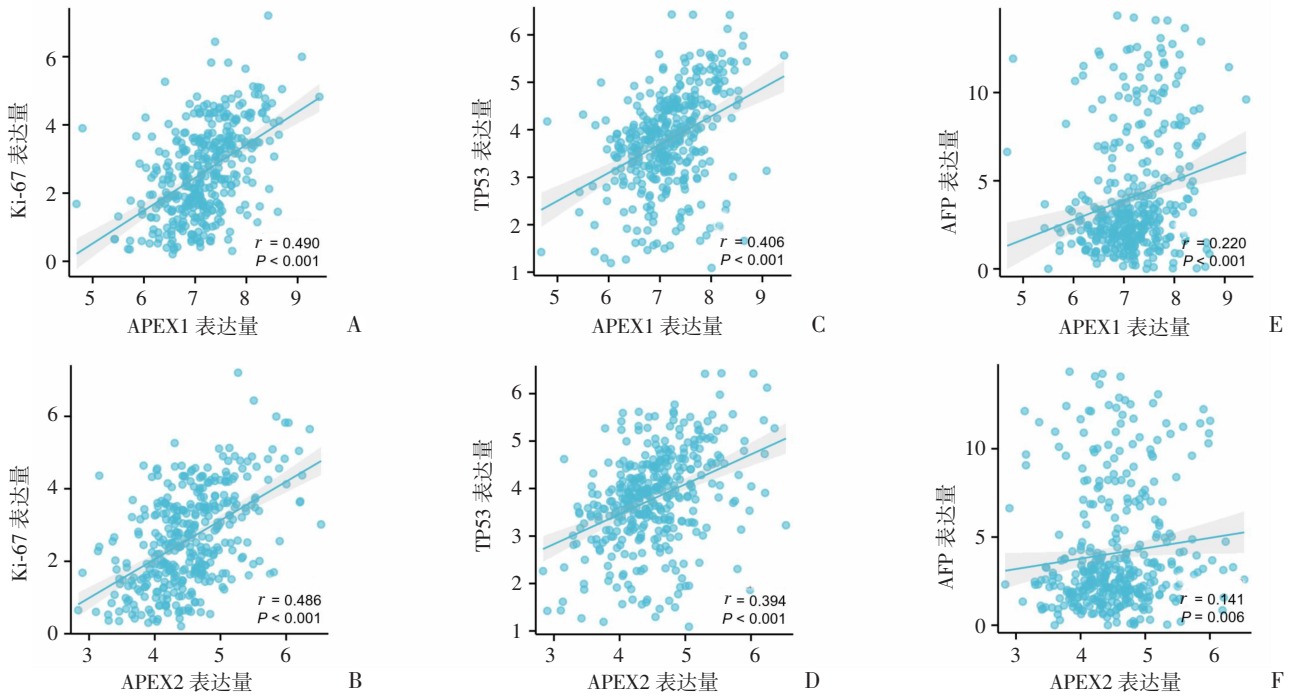
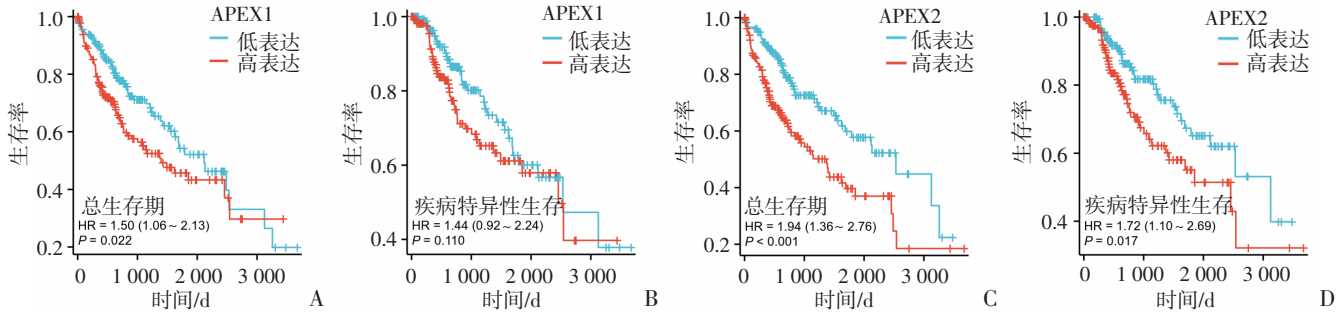


图 3 APEX1 与 APEX2 表达与 Ki-67(A、B)、TP53(C、D)、AFP(E、F)的相关性



A、C:APEX1 与 APEX2 的表达与总生存期之间的关联;B、D:APEX1 与 APEX2 的表达与疾病特异性生存之间的关联

图 4 APEX 家族成员在 HCC 中的预后价值

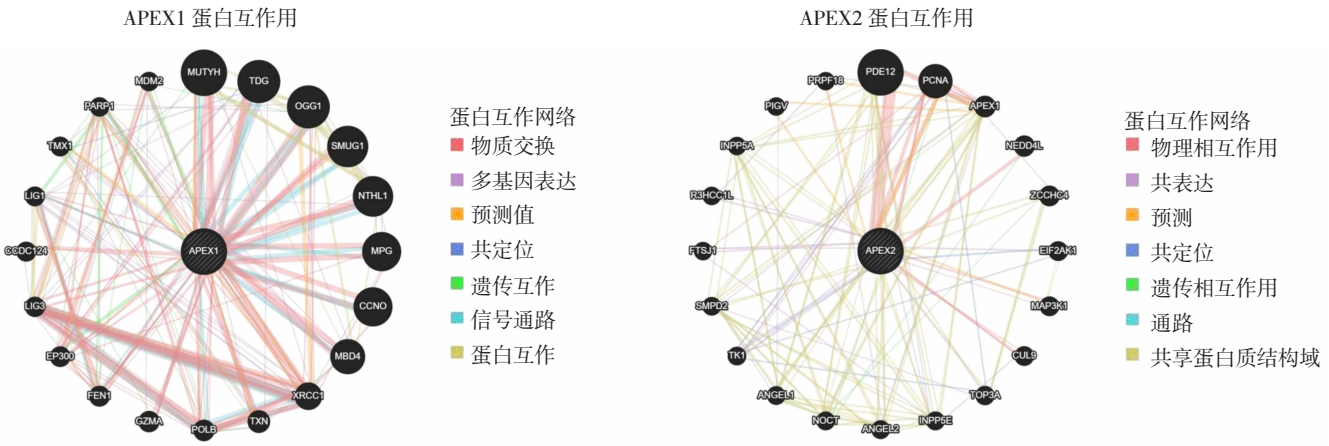


图 5 APEX1 与 APEX2 的 PPI 网络图

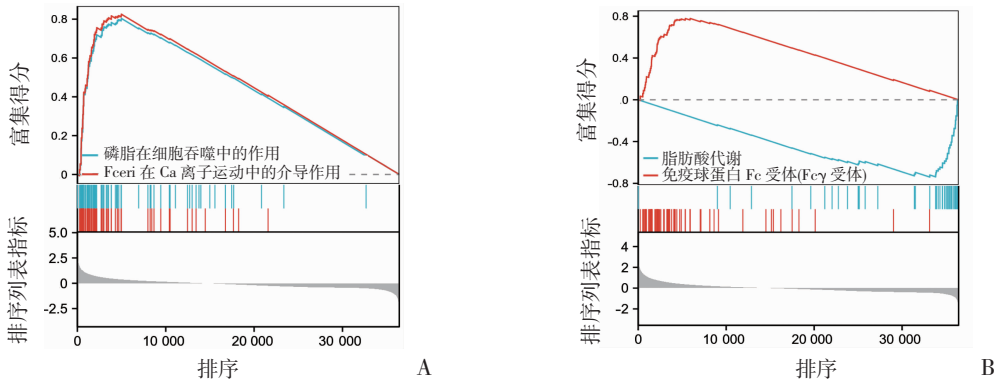


图 6 APEX1(A)与 APEX2(B)的 GSEA 分析

2.5 免疫应答与代谢通路分析

基于 Reactome 途径的 GSEA 揭示了 APEX1 与 APEX2 与免疫应答相关途径。APEX1 与 Fceri 介导的 Ca 离子运动、磷脂在细胞吞噬中的作用均呈正相关(图 6A)。APEX2 与免疫球蛋白 Fc 受体活化呈正相关,则在脂肪酸代谢途径中呈现负相关性(图 6B)。

2.6 APEX 家族成员与免疫细胞浸润的关系

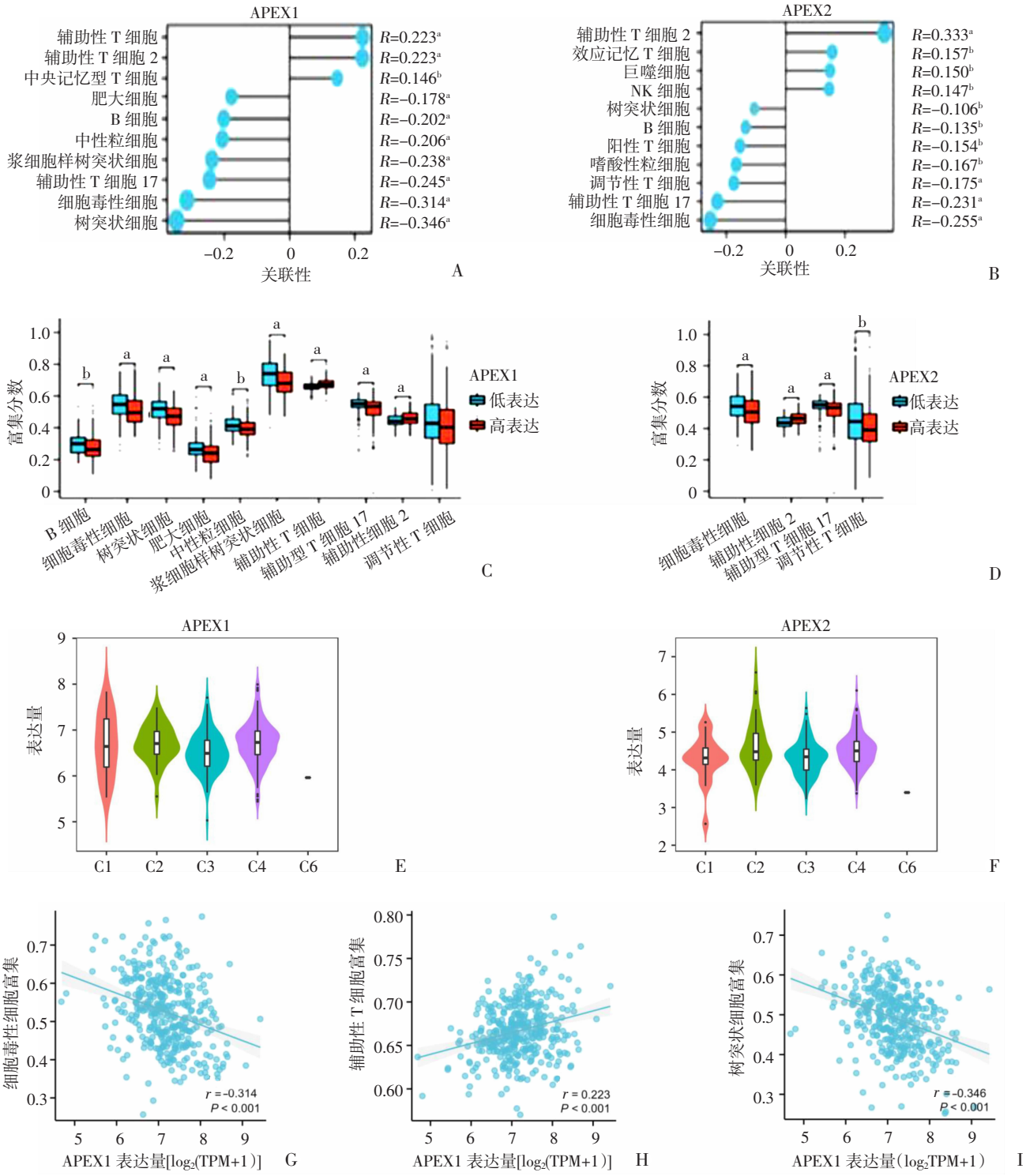
通过 ssGSEA 算法进行的富集分析揭示了 APEX 家族成员与免疫细胞浸润及 HCC 肿瘤微环境中免疫状态之间的密切关系。结果表明,APEX1 表达与辅助性 T 细胞、辅助性 T 细胞 2、中心记忆型 T 细胞呈正相关,而与树突状细胞、细胞毒性细胞和辅助性 T 细胞 17 呈负相关(图 7A)。APEX2 表达则与效应记忆 T 细胞和巨噬细胞呈正相关,与细胞毒性细胞、调节性 T 细胞、嗜酸性粒细胞和辅助性 T 细胞 17 呈负相关(图 7B)。在 APEX1 与 APEX2 高表达组群中,多数免疫细胞呈减少趋势,提示高表达的 APEX1 与 APEX2 可能存在免疫抑制(图 7C、D)。APEX1 与细胞毒性细胞显著负相关性(P<0.01),与辅助性 T 细胞呈显著正相关(P<0.01),与树突状细胞显著负相关(P<0.01,图 7G~I),这一结果凸显了 APEX 家族在调节肝癌免疫微环境中的潜在作用。免疫亚型包括 C1 到 C6,在这些亚型中,APEX1 在 C1、C2、C4 中高表达,在 C3 亚型中表达水平较低;而 APEX2 则在 C1 中表达水平较低,在 C2、C3、C4 中表达较高(图 7E、F)。

2.7 APEX 家族成员的遗传变异与肝癌预后的关联

通过对 APEX1 与 APEX2 的遗传变异进行详细研究,结果发现 APEX1 和 APEX2 的突变率均为 3%,突变类型主要为错义突变(图 8A)。进一步分析 APEX 家族成员的基因突变与肝癌患者预后之间的关系,虽然存在 APEX 家族突变的 HCC 患者相比于无突变者显示更差的总生存期趋势(P = 0.369,图 8B),提示 APEX 家族成员的遗传变异与肝癌预后之间的复杂关系,需要进一步的研究来阐明。

2.8 APEX1、APEX2 在 HCC 细胞系中的表达特征

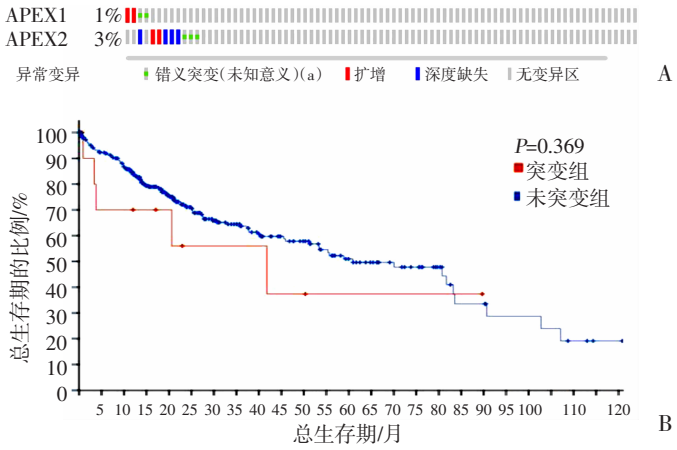
HCC 细胞系 Huh-7、SMMC-7721、Bel-7402 中 APEX1、APEX2 mRNA 和蛋白的水平均显著高于正常肝细胞系 HL-7721(P<0.01,图 9)。



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

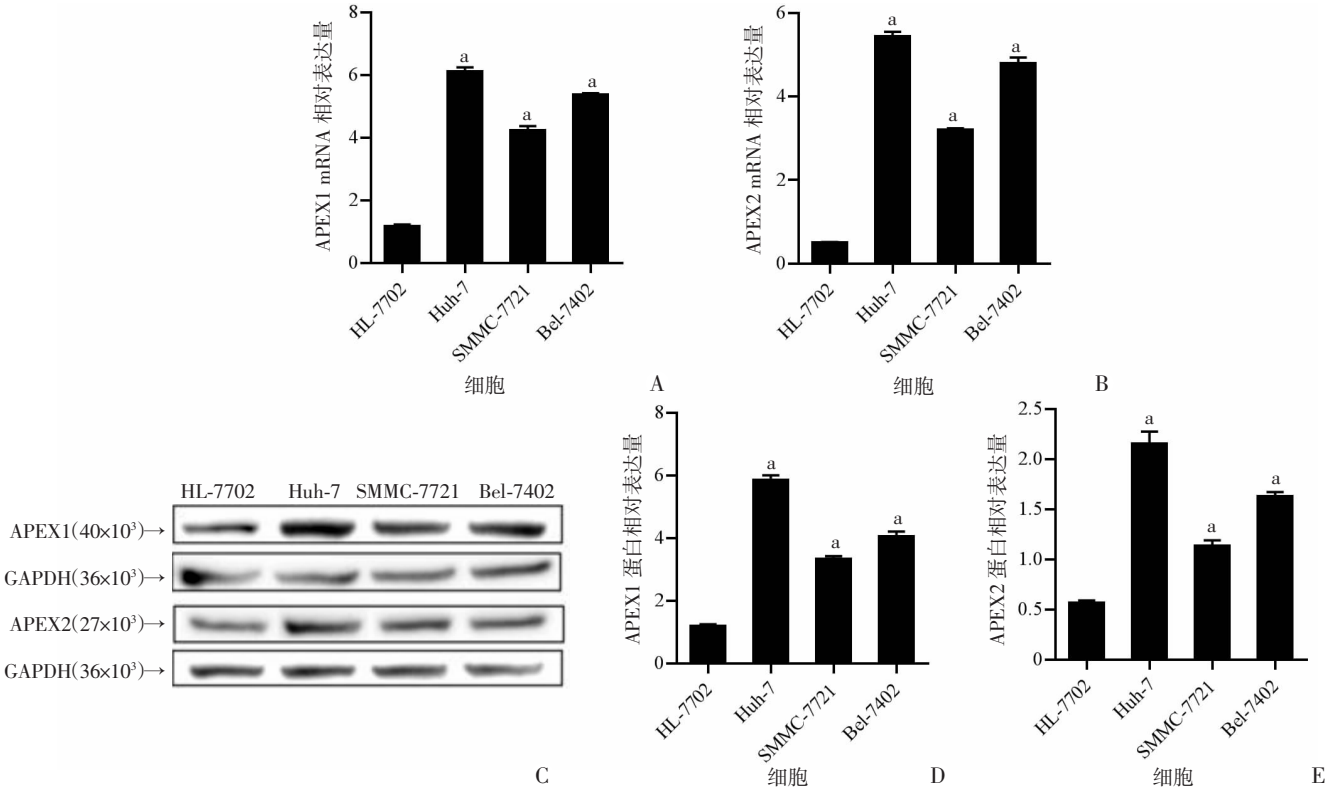
A、B:APEX1 与 APEX2 表达与富集后免疫细胞浸润之间的关系;C、D:APEX1 与 APEX2 表达与免疫细胞之间的关系;E、F:APEX1 与 APEX2 与 TISIDB 检测的 HCC 免疫亚型之间的相关性 C1:伤口愈合($n=22$);C2:IFNγ 显性($n=45$);C3:炎症($n=135$);C4:淋巴细胞耗竭($n=159$);C6:TGF-β 占优势($n=1$);G~I:APEX1 与细胞毒性细胞、辅助性 T 细胞、树突状细胞的相关性

图 7 APEX 家族成员与免疫细胞浸润的关系



A:APEX1 和 APXE2 基因突变图;B:基因突变与总生存期的相关性

图 8 肝癌中 APEX 家族成员的遗传改变



a:$P<0.01$,与 HL-7702 细胞比较

A、B:RT-qPCR 检测 APEX1、APEX2 mRNA 在 HCC 中的表达水平;C~E:Western blot 检测 APEX1、APEX2 蛋白在 HCC 中的表达水平

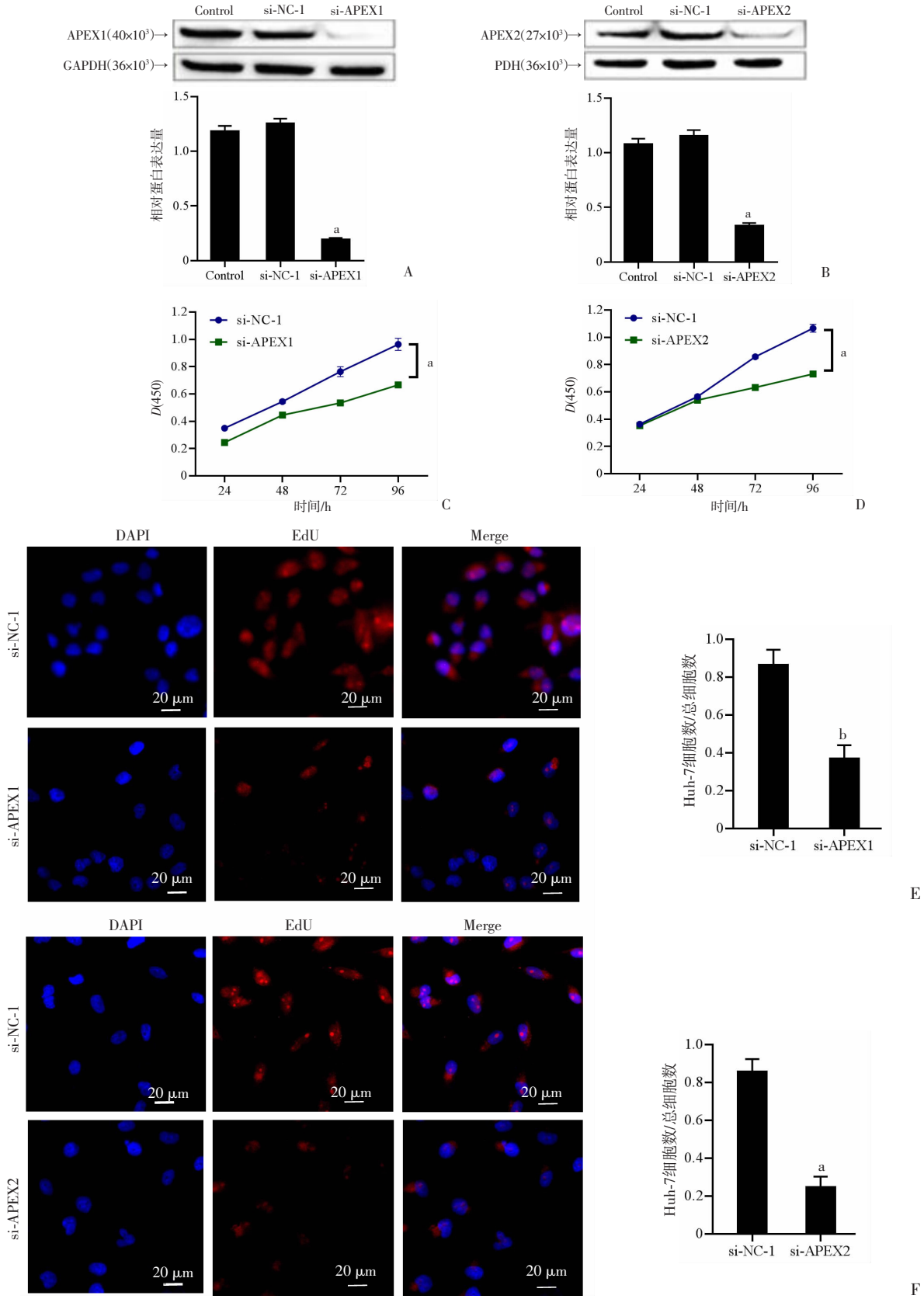
图 9 APEX1、APEX2 mRNA 和蛋白的表达情况

2.9 沉默 APEX1 和 APEX2 对 HCC 细胞增殖的影响

Western blot 实验结果显示,与 si-NC-1 组相比,si-APEX1 组与 si-APEX2 组中 APEX1 与 APEX2 蛋白表达降低($P<0.01$,图 10A、B),提示转染成功沉默 Huh-7 细胞中 APEX1 和 APEX2。与 Control 组、si-NC-1 组相比,si-APEX1 组与 si-APEX2 光密度值明显降低,且荧光显微镜下细胞数量明显减少,提示细胞增殖速度明显降低($P<0.01$,图 10C~F)。

2.10 沉默 APEX1 和 APEX2 对 HCC 细胞迁移和侵袭的影响

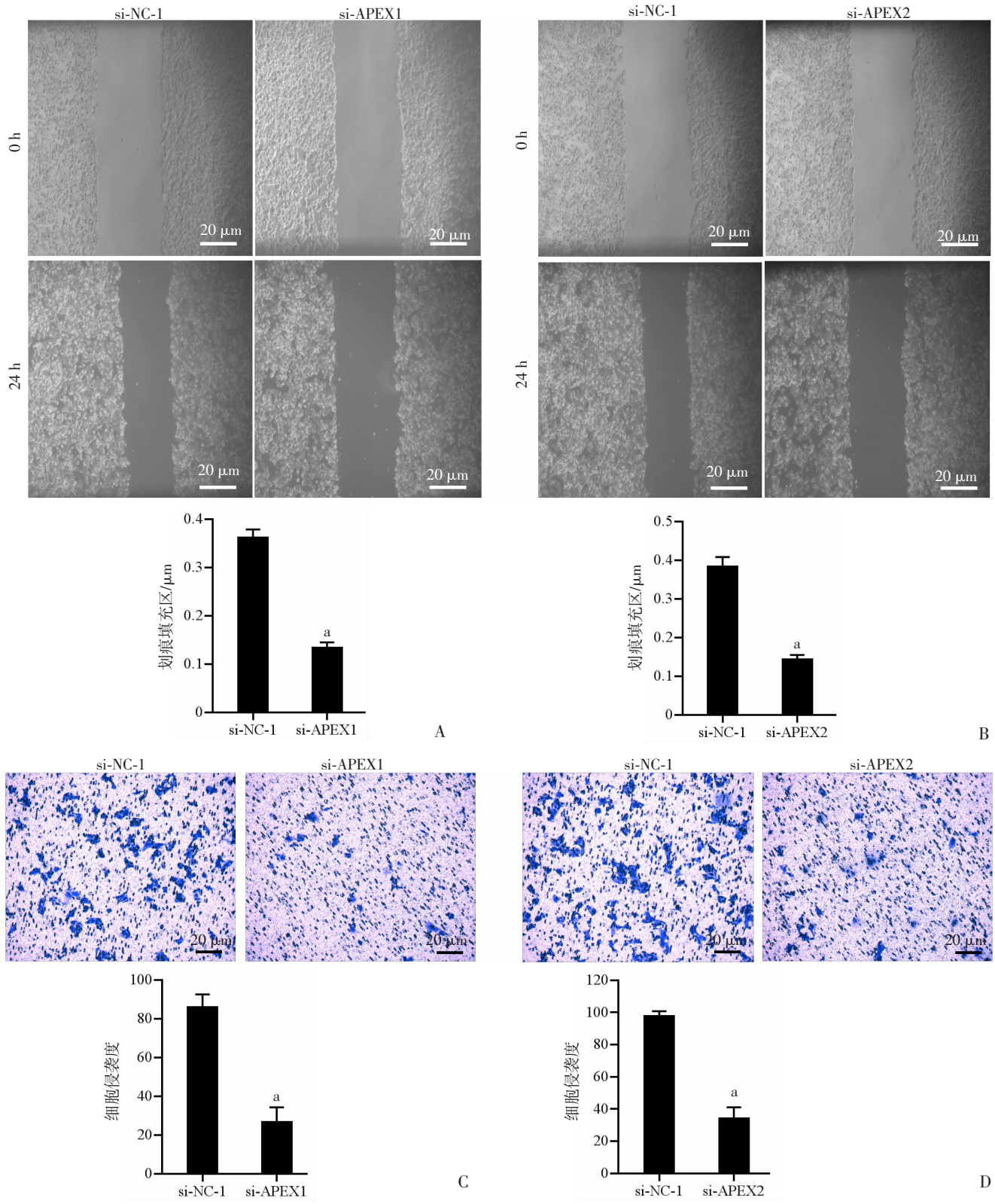
划痕愈合实验结果表明,与 si-NC-1 组比较,APEX1 与 APEX2 分别沉默后,划痕区域细胞数目明显减少($P<0.01$,图 11A、B),提示迁移能力明显减弱。Trasnwell 实验结果表明,APEX1 与 APEX2 沉默后,si-APEX1 组与 si-APEX2 组侵袭基质胶深度相较于 si-NC-1 明显减少($P<0.01$,图 11C、D),提示侵袭能力明显减弱。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 si-NC-1 组比较

A、B:Western blot 检测转染后各组细胞中 APEX1、APEX2 蛋白的水平;C、D:CCK-8 检测沉默 APEX1、APEX2 对 Huh-7 细胞活力的影响;D、F:EdU 检测沉默 APEX1、APEX2 对 Huh-7 细胞增殖能力的影响

图 10 沉默 APEX1 和 APEX2 对 HCC 细胞增殖的影响



a:$P<0.01$,与 si-NC-1 组比较

A、B:划痕愈合实验检测沉默 APEX1 和 APEX2 对 Huh-7 细胞迁移能力的影响;C、D:Trasnwell 实验检测沉默 APEX1 和 APEX2 对 Huh-7 细胞侵袭能力的影响

图 11 沉默 APEX1、APEX2 对 HCC 细胞迁移和侵袭的影响

3 讨论

本研究表明肝细胞性肝癌中,APEX1 与 APEX2 均有不同程度的表达异常,通过实验,证明当 APEX1 与 APEX2 表达受到抑制后能够对肿瘤细胞起到抑制作用。公共数据的样本分析表明 APEX1 与 APEX2 在多种肿瘤中均有升高趋势,SUN 等[11]发现肝细胞肿瘤生存期较差的患者中 APEX1 与 MAP2K6 表达正相关;FAN 等[12]在高级别浆液性卵巢腺癌预后较差的人群中发现 APEX1 与与 NPM1 蛋白正相关;JO 等[13]的研究发现结肠癌、肝癌、肺癌、肾癌或前列腺癌预后较差的人群中术后 APEX1 水平升高。选取肝细胞肝癌作为研究对象,利用公共数据库样本资料,分析出 APEX1 与 APEX2 相较于正常组织在肿瘤组织与转移组织中均有明显升高。经细胞实验验证在肝细胞性肝癌细胞中 APEX1 与 APEX2 明显升高。

在该研究中当 APEX1 与 APEX2 活性受抑表达降低时,肝癌细胞生长减缓,迁移能力减弱。这提示在未来抗肿瘤治疗中,APEX1 与 APEX2 拮抗剂有望成为抗肿瘤药物。在 BEHROUZI 等[14-17]的研究中,铂类相关周围神经反应(卡铂除外)相较于 APEX1 表达量偏高组反应更轻,口腔鳞状细胞癌术后顺铂化疗后无病生存期和总生存期均较长[17]。这些研究内容均提示 APEX1 与 APEX2 与肿瘤的发生发展以及治疗存在相关性。

通过相关性分析研究,APEX1 与 APEX2 与传统肿瘤标记物(AFP、TP-53、Ki-67)存在一定的相关性。在该研究中,APEX1 和 APEX2 与 TP-53、Ki-67 存在相关性($P<0.001$),在一定程度上能够作为预后评估的相关标记物。同时,有文献表明 APEX1 表达增加伴随有 TGF-β1 水平升高,放射性肺炎的发生率增加,不利于抗肿瘤治疗[18]。另有研究表明,抑制 APEX1 其氧化还原能力亦能够抑制病毒复制的能力[19]。随着 APEX1 抑制剂的运用[20],肺癌细胞侵袭性下降,对于药物的敏感性升高。WU 等[21]的研究中显示 APEX1 与胆管癌预后有关[22],而 CHEN 等[23]的研究也显示 APEX2 表达升高促进了乳腺癌细胞的增殖和转移能力。而 APEX1 和 APEX2 与 AFP 尽管存在相关性,但作为早期预测指标缺乏相关研究,尚不足以作为诊断标记物。为此 APEX1 与 APEX2 是否存在于免疫相关通路进行了相关探讨,发现多种免疫相关细胞在高表达的样本中呈正相关,提示 APEX1 与 APEX2 在一定程度上与免疫系统相关联,是否能够影响免疫治疗,尚无相关研究报道。

本实验从公共数据获取大样本数据,分析了肝细胞癌中 APEX1 与 APEX2 相关特性,与传统肿瘤标记物进行相关性分析,认为能够作为预后相关因子,预测疾病预后发展,并对其相关蛋白通路以及变异可能进行相应模拟阐述,通过细胞实验验证 APEX1 与 APEX2 表达上调与肝细胞癌发生发展具有相关性,能够为后续临床治疗提供新的治疗途径。本研究尚停留于细胞学实验阶段,未对相关蛋白通路进行更深层次研究,未进行动物实验,以及临床样本验证。后期将进行动物实验验证 APEX1 与 APEX2 与肝细胞癌的相关性,以及 APEX1 与 APEX2 相关抑制剂的抑瘤效果。更进一步的从临床获取样本进行临床样本验证。

综上所述,本研究不仅揭示了 APEX1 和 APEX2 在 HCC 发病机制中的重要角色,也为开发新的诊断和治疗策略提供了一定的基础。随着对这些分子在 HCC 中作用的进一步理解,以及新治疗方法的开发和优化,有望为 HCC 患者提供更有效的诊断工具和治疗选项。

参考文献:

[1] FRICK C, RUMGAY H, VIGNAT J, *et al*. Quantitative estimates of preventable and treatable deaths from 36 cancers worldwide: a population-based study [J]. Lancet Glob Health, 2023, 11(11): e1700-e1712. DOI: 10.1016/S2214-109X(23)00406-0.

[2] LIU Y, ZHENG J X, HAO J L, *et al*. Global burden of primary liver cancer by five etiologies and global prediction by 2035 based on global burden of disease study 2019 [J]. Cancer Med, 2022, 11(5): 1310-1323. DOI: 10.1002/cam4.4551.

[3] RUMGAY H, FERLAY J, MARTEL C D, *et al*. Global, regionaland national burden of primary liver cancer by subtype [J]. Eur J Cancer, 2022, 161: 108-118. DOI: 10.1016/j.ejca.2021.11.023.

[4] CHO Y, KIM B H, PARK J W. Overview of Asian clinical practice guidelines for the management of hepatocellular carcinoma: an Asian perspective comparison [J]. Clin Mol Hepatol, 2023, 29(2): 252-262. DOI: 10.3350/cmh.2023.0099.

[5] ZHANG C H, CHENG Y F, ZHANG S, *et al*. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in Asia [J]. Liver Int, 2022, 42(9): 2029-2041. DOI: 10.1111/liv.15251.

[6] SINGAL A G, LAMPERTICO P, NAHON P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends [J]. J Hepatol, 2020, 72(2): 250-261. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.08.025.

[7] CHOI S, JOO H K, JEON B H. Dynamic regulation of APE1/ref-1 as a therapeutic target protein [J]. Chonnam Med

J, 2016, 52(2): 75-80. DOI: 10.4068/cmj.2016.52.2.75.

[8] BETLEJ G, BATOR E, PYRKOSZ A, *et al*. A dual face of APE1 in the maintenance of genetic stability in monocytes: an overview of the current status and future perspectives[J]. Genes, 2020, 11(6): 643. DOI: 10.3390/genes11060643.

[9] NATH S, ROYCHOUDHURY S, KLING M J, *et al*. The extracellular role of DNA damage repair protein APE1 in regulation of IL-6 expression[J]. Cell Signal, 2017, 39: 18-31. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.07.019.

[10] NASSOUR H, WANG Z Q, SAAD A, *et al*. Peroxiredoxin 1 interacts with and blocks the redox factor APE1 from activating interleukin-8 expression[J]. Sci Rep, 2016, 6: 29389. DOI: 10.1038/srep29389.

[11] SUN Z P, CHEN G Y, WANG L, *et al*. *APEX*1 promotes the oncogenicity of hepatocellular carcinoma via regulation of *MAP2K6*[J]. Aging, 2022, 14(19): 7959-7971. DOI: 10.18632/aging.204325.

[12] FAN X M, WEN L X, LI Y H, *et al*. The expression profile and prognostic value of APE/Ref-1 and NPM1 in high-grade serous ovarian adenocarcinoma[J]. APMIS, 2017, 125(10): 857-862. DOI: 10.1111/apm.12733.

[13] JO Y, KIM Y, PARK E, *et al*. Changes in the plasma apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1(APE1/ref-1) level during cancer surgery: an observational study[J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(11): 1280. DOI: 10.3390/medicina57111280.

[14] BEHROUZI A, XIA H Y, THOMPSON E L, *et al*. Oxidative DNA damage and cisplatin neurotoxicity is exacerbated by inhibition of OGG1 glycosylase activity and APE1 endonuclease activity in sensory neurons[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1909. DOI: 10.3390/ijms23031909.

[15] KELLEY M R, JIANG Y L, GUO C L, *et al*. Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106485. DOI: 10.1371/journal.pone.0106485.

[16] KELLEY M R, WIKEL J H, GUO C L, *et al*. Identification and characterization of new chemical entities targeting apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2016, 359(2): 300-309. DOI: 10.1124/jpet.116.235283.

[17] XIE J L, LI Y, KONG J J, *et al*. Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 could serve as a potential serological biomarker for the diagnosis and prognosis of oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2019, 77(4): 859-866. DOI: 10.1016/j.joms.2018.11.034.

[18] ZHANG Y, YOU H J, DUAN J, *et al*. Clinical value of serum Ape1/Ref-1 combined with TGF-β1 monitoring in predicting the occurrence of radiation pneumonitis (RP) in non-small cell lung cancer patients[J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(3): 3328-3335. DOI: 10.21037/apm-21-423.

[19] HU J Y, WANG Y, YUAN Y. Inhibitors of APE1 redox function effectively inhibit γ-herpesvirus replication *in vitro* and *in vivo*[J]. Antiviral Res, 2021, 185: 104985. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104985.

[20] MANGUINHAS R, FERNANDES A S, COSTA J G, *et al*. Impact of the APE1 redox function inhibitor E3330 in non-small cell lung cancer cells exposed to cisplatin: increased cytotoxicity and impairment of cell migration and invasion[J]. Antioxidants, 2020, 9(6): 550. DOI: 10.3390/antiox9060550.

[21] WU Z C, LIU Z R, SUN Y, *et al*. APEX1 predicts poor prognosis of gallbladder cancer and affects biological properties of $CD133^+$ GBC-SD cells via upregulating Jagged1[J]. J Cancer, 2023, 14(8): 1443-1457. DOI: 10.7150/jca.83356.

[22] HE H M, SONG F Y, GAO Q, *et al*. The APEX1/miRNA-27a-5p axis plays key roles in progression, metastasis and targeted chemotherapy of gastric cancer[J]. Int J Pharm, 2021, 599: 120446. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120446.

[23] CHEN D M, WIRTH K M, KIZY S, *et al*. Desmoglein 2 functions as a receptor for fatty acid binding protein 4 in breast cancer epithelial cells[J]. Mol Cancer Res, 2023, 21(8): 836-848. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-22-0763.

(**收稿**:2024-04-30;**修回**:2024-07-03)

(编辑 邓强庭)