

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2024)06-0508-12

肝细胞癌组织核孔蛋白 85 (NUP85) 高表达与免疫细胞浸润及预后相关性分析

刘新宇^{1Δ}, 丁泽邦^{1Δ}, 吴煥², 马俊杰³, 陆进^{4*} (蚌埠医科大学: ¹临床医学院 2021 级, ²精神卫生学院 2021 级, ³临床医学院 2020 级, ⁴基础医学院人体解剖学教研室, 安徽 蚌埠 233030)

[摘要] 目的 探究核孔蛋白 85 (NUP85) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达意义及免疫相关性分析。方法 综合利用多种在线数据库分析 NUP85 在 HCC 中的 mRNA 表达、蛋白表达以及突变情况, 并进行预后诊断价值分析; 采用单细胞测序数据及肿瘤免疫评估资源 (TIMER) 和基因表达谱交互作用分析 2021 (GEPIA2021) 数据库分析 NUP85 的免疫相关性; 利用基因组癌症分析 (GSCA) 和临床生信之家分析 NUP85 的药物敏感性; 通过肝细胞癌综合分子数据库 (HCCDB) 筛选 NUP85 在 HCC 中的共表达基因, 并利用 R 语言“limma 包”分析 NUP85 及其相关基因的相关性; 再利用 R 语言“clusterProfiler 包”分析 NUP85 及其相关基因的基因本体论 (GO) 功能注释、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 以及基因集富集分析 (GSEA); 利用临床生信之家对 NUP85 及其相关基因进行列线图 and 预后风险评估模型的构建。结果 NUP85 的 mRNA 和蛋白质在 HCC 中表达上调, 在不同分期和分级均高表达, 不利于患者预后; 而其在 HCC 样本中突变率是 19%, 显著影响患者的总生存期 (OS)、疾病特异性生存 (DSS) 以及无进展生存 (PFS), 且其在巨噬细胞、B 细胞、T 细胞等多种免疫细胞中高表达并与多种免疫细胞浸润水平呈正相关; 此外, NUP85 的表达与米尔达美替尼 (PD0325901)、维莫非尼的结构类似物 (PLX4720) 和瑞法替尼 (PD0325901) 等多用药物具有显著相关性。NUP85 及其共表达基因的 GO 功能主要富集在细胞器裂变、核分裂和染色体分离等, KEGG 通路主要富集在细胞周期和运动蛋白等, 并显著不利于 HCC 患者 OS, 且对 HCC 患者 1 年、3 年和 5 年 OS 预后诊断的 ROC 曲线下面积 AUC 均大于 0.7。结论 NUP85 高表达 HCC 患者预后差, 并与多种免疫细胞和药物相关, 可作为 HCC 诊断、治疗和预后的生物标志物。

[关键词] 核孔蛋白 85 (NUP85); 肝细胞癌; 单细胞分析; 免疫浸润; 生物信息学

[中图分类号] Q279, R392.12, R735.7, Q811.4 **[文献标志码]** A

DOI:10.13423/j.cnki.cjmi.009797

Analysis of correlation between high expression of nucleoporin 85 (NUP85) and immune cell infiltration in hepatocellular carcinoma

LIU Xinyu^{1Δ}, DING Zebang^{1Δ}, WU Huan², Ma Junjie³, LU Jin^{4*}

¹Class 2021, Clinical Medical College, ²Class 2021, Mental Health College, ³Class 2020, Clinical Medical College, ⁴Department of Anatomy, College of Basic Medicine, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China

* Corresponding author, E-mail: 0100197@bbmc.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the significance of nucleoporin 85 (NUP85) expression in hepatocellular carcinoma (HCC) and analyze its relevance to immune response. **Methods** A comprehensive analysis was conducted using various online databases to assess the mRNA and protein expression of NUP85 in HCC, as well as its mutation status and prognostic diagnostic value. The immune relevance of NUP85 was evaluated using single-cell sequencing data and resources from the Tumor Immune Estimation Resource (TIMER) and the Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2021 (GEPIA2021) databases. The drug sensitivity of NUP85 was analyzed through the Genomic Landscape of Cancer (GSCA) and the Clinical Bioinformatics Home. Co-expressed genes of NUP85 in HCC were filtered using the Hepatocellular Carcinoma Comprehensive Molecular Database (HCCDB), and the correlation between NUP85 and its related genes was analyzed using the R language “limma” package. The gene ontology (GO) functions, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

收稿日期: 2023-12-20; 接受日期: 2024-05-06

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (2023AH051929); 2021 年教育部产学研合作协同育人项目 (202101160001)

作者简介: 刘新宇 (2003-), 男, 安徽阜阳人, 本科生

Tel: 13063378880; E-mail: 2024442736@qq.com

Δ 同为第一作者

* 通讯作者, 陆进, E-mail: 0100197@bbmc.edu.cn

网络首发: <https://link.cnki.net/urlid/61.1304.R.20240510.1559.004>

DOI: 10.13423/j.cnki.cjmi.009797

(KEGG), and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of NUP85 and its related genes were performed using the R language “clusterProfiler” package. The Clinical Bioinformatics Home was utilized to construct heatmaps and prognostic risk scoring models for NUP85 and its related genes. **Results** NUP85 mRNA and protein expression were upregulated in HCC, showing high levels across different stages and grades, which indicates a poor prognosis for patients. The mutation rate of NUP85 in HCC samples was 19%, significantly affecting the overall survival (OS), disease-specific survival (DSS), and progression-free survival (PFS) of patients. NUP85 was highly expressed in various immune cells, including macrophages, B cells, and T cells, and was positively correlated with the infiltration levels of multiple immune cells. The expression of NUP85 was significantly correlated with multiple drugs, such as Milademetan (PD0325901), a structural analog of Vemurafenib (PLX4720), and Regorafenib (PD0325901). The GO functions of NUP85 and its co-expressed genes were mainly enriched in organelle fission, nuclear division, and chromosome segregation, while the KEGG pathways were primarily enriched in the cell cycle and kinesin proteins. These factors significantly and unfavorably affected the OS of HCC patients, and the areas under the ROC curve (AUC) for the 1-year, 3-year, and 5-year OS prognostic diagnosis of HCC patients were all greater than 0.7. **Conclusion** The high expression of NUP85 in HCC is correlated with a poor prognosis and is related to various immune cells and drugs, making it a potential biomarker for diagnosis, treatment, and prognosis in HCC.

[Key words] nuclear porin 85 (NUP85); hepatocellular carcinoma; single cell analysis; immune infiltration; bioinformatics

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的肝癌类型, 占原发性肝癌的 75% ~ 90%, 是仅次于胰腺癌的第三大致命肿瘤^[1]。目前 HCC 的最佳治疗方案是手术切除, 但复发率极高。而不可切除的 HCC 可通过微波消融 (microwave ablation, MWA) 或射频消融 (radiofrequency ablation, RFA)、经动脉化疗栓塞术 (transarterial chemoembolization, TACE) 等局部区域疗法进行治疗, 但 HCC 患者预后仍不佳, 5 年生存率仅为 18%^[2]。2017 年, 索拉非尼 (sorafenib) 问世, 开启了靶向药物研究的先河。此后诸如瑞戈非尼 (regorafenib) 以及卡博替尼 (cabozantinib) 等新兴药物的陆续出现将靶向治疗推向研究热点。然而这些药物的实际疗效局限, 患者总生存期 (overall survival, OS) 延长不够显著^[3-4]。由于 HCC 高度异质的特性, 即患者具有相似疾病表型但可能有不同的分子病因学, 提示了基于分子水平靶向研究将有助于开发出更为有效的治疗方案^[5], 因此寻找更为稳定的分子标志物具有主要临床意义。

近年来, 有证据显示 HCC 肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TIME) 中的生物标志物与患者的预后情况关系密切, 从与 TIME 相关的关键基因切入研究或许可以为 HCC 治疗方案提供新思路^[6]。核孔蛋白 85 (nucleoporin 85, NUP85) 作为核孔复合体 (nuclear pore complex, NPC) 组装和维护的必需成分, 在介导核质间运输中发挥重要作用, 并具有修复 DNA 和调控基因表达的功能。NUP85 能调节肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 的趋化因子信号传导从而影响肿瘤发展, 对肿瘤细胞快速增殖和转移有重要作用^[7]。此外, 高表达的 NUP85 还可能通过抑制 TAM 从而使 HCC 细胞逃避免疫监测和杀伤^[8]。已有研究表明, 抑制 NUP85 基

因的表达可以有效提升患者的预后, 在前列腺癌^[9]等恶性肿瘤中都有很好体现。然而, 目前 NUP85 在 HCC 中的作用尚未见报道。本研究基于以往研究广泛报道的核孔蛋白 (nucleoporins, NUP) 家族^[10], 利用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 和基因表达数据集 (gene expression omnibus, GEO) 数据库中的多个样本, 实现了 NUP85 在各种免疫细胞中的浸润分析, 评估了 NUP85 基因与其共表达基因对 HCC 患者预后的相关程度, 为从信号通路和 TIME 角度理解 HCC 发生发展过程提供参考, 表明 NUP85 有望成为 HCC 免疫治疗和预后的新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究基于公开数据库及相关软件进行分析, 具体数据库如下: 生物信息学在线分析平台 SangerBox (<http://vip.sangerbox.com/home.html>)、肿瘤免疫评估资源 (tumor immune estimation resource, TIMER) 数据库、基因表达谱交互作用分析 (gene expression profiling interactive analysis, GEPIA) (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) 数据库、Kaplan-Meier plotter 数据库 (<http://kmplot.com/analysis/>), 阿拉巴马大学伯明翰分校癌症数据分析门户网站 (The University of Alabama at Birmingham cancer data analysis, UALCAN) (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>)、人类蛋白质图谱 (The Human Protein Atlas, HPA) 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>)、肿瘤免疫评估资源 (tumor immune estimation resource, TIMER) 数据库 (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)、临床生信之家 (<https://www.aclbi.com/static/index.html#/>)、肝

细胞癌综合分子数据库 (hepatocellular carcinoma comprehensive molecular database, HCCDB) (<http://lifeome.net/database/HCCdb/home.html>)、细胞标志物 (CellMarker) (<http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/CellMarker/>)、癌症基因组学门户 (cBio Cancer Genomics Portal, cBioPortal) (<https://www.cbioportal.org/>)、基因表达数据集 (gene expression omnibus, GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。具体分析流程图如图 1 所示。

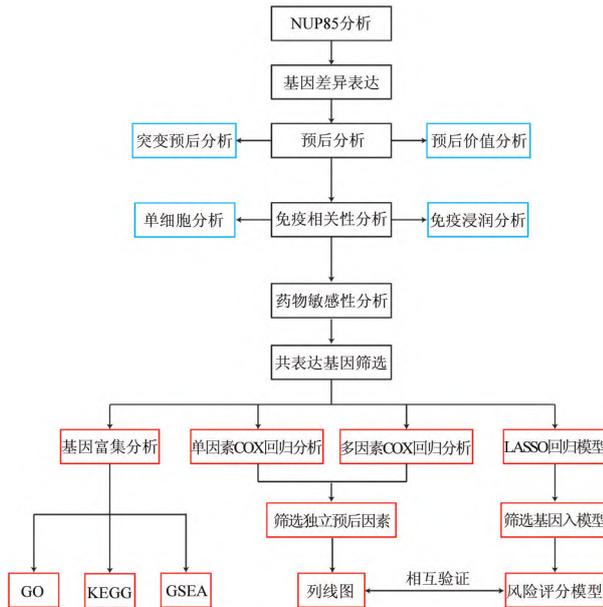


图 1 生物信息学分析流程图

1.2 方法

1.2.1 NUP85 的差异表达与预后分析 通过 UALCAN 数据库对 NUP85 进行差异表达分析。利用 Kaplan-Meier 方法创建生存曲线分析 NUP85 基因的疾病特异性生存 (disease-specific survival, DSS)、无进展生存 (progression-free survival, PFS)、OS 以及无病生存 (disease-free survival, DFS)。利用 HPA 数据库获取 NUP85 在 HCC 组织与正常肝组织中的免疫组织化学染色结果。

1.2.2 NUP85 的突变与预后分析 利用 cBioPortal 数据库对来源于癌症基因组图谱 (cancer genome atlas, TCGA) 数据集的 372 个 HCC 样本进行 NUP85 突变分析, 将样本分为突变组与未突变组, 并对两组的 DFS、OS、PFS 以及 DSS 进行分析。

1.2.3 NUP85 的预后诊断价值 通过临床生信之家在线分析 HCC 组织中 NUP85 的表达及生存预后评估, 并通过生存风险比以及曲线下积分 (area under the curve, AUC) 判断预后诊断价值。

1.2.4 NUP85 单细胞分析 相关数据来自 GEO 数

据集 GSE166635 的 2 个样本 GSM5076749、GSM5076750, 根据以下标准过滤样本细胞和基因: ①保留表达基因数量在 500~10 000 个的细胞; ②去除在少于 3 个细胞中表达基因; ③保留基因表达量在 1000~100 000 的细胞; ④保留线粒体基因百分比小于 20% 的细胞。

利用 R 语言“Seurat 包”对相关数据进行分析, 先通过“归一化数据 (normalize data) 函数”标准化相关单细胞数据, 并利用 Harmony 函数对患者样本进行整合, 再通过运行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 函数对数据主成分进行计算, 后利用 K 最近邻算法 (K-nearest neighbors, KNN) 对所选取数据的前 20 个主要成分进行群集分析, 并通过细胞标志物 (CellMarker) 信息库并根据特征基因对细胞种类进行注释。

1.2.5 NUP85 免疫浸润分析 NUP85 在 HCC 组织的基因表达与免疫细胞浸润水平 (infiltration level)、肿瘤细胞纯度 (purity) 之间的相关性通过 TIMER 进行分析; 利用 GEPIA2021 的肿瘤周边免疫细胞群体评估 (estimation of peripheral immune cell populations in tumours, EPIC) 算法分析 NUP85 基因表达相关的浸润免疫细胞与 HCC 患者 OS 的关系。

1.2.6 NUP85 药物敏感性分析 利用癌症基因组分析 (gene set cancer analysis, GSCA) 数据库对与 NUP85 基因表达相关的药物进行筛选。将筛选出的药物导入临床生信之家进行 50% 抑制浓度 (50% maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 分析, 从 TCGA 数据集获得 371 个 HCC 患者的临床信息和 RNA 测序 (RNA sequencing, RNAseq) 数据, 根据癌症药物敏感性基因组学数据库, 预测每个样本的化疗反应。使用 R 包“pRRophetic”通过岭回归估计每个样本的药物 IC_{50} , 使用 combat 调整批次效应和考虑所有组织类型, 并将重复的基因表达值取平均, 所有参数均按默认值设置。

1.2.7 NUP85 共表达基因筛选 通过 HCCDB 数据库对 NUP85 在 HCC 中的共表达基因进行筛选, 并利用 R 语言“limma 包”对共表达基因的相关系数进行分析。

1.2.8 NUP85 的预后诊断价值 将 NUP85 及其共表达基因导入 R 语言, 通过“基因集富集分析比较器 (clusterProfiler) 包”探究 NUP85 及相关基因的基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集, 再利用 KEGG 通路并基于 R 语言“limma 包”和“clusterProfiler 包”, 根据 NUP85 基因的中位表达值将样本分为高表达组和低表达组, 然后对这两组进行

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

1.2.9 NUP85 及其共表达基因列线图 利用临床生信之家,对 NUP85 及其共表达基因进行单因素 COX 回归分析和多因素 COX 回归分析,筛选出独立预后因素,将其纳入模型构建列线图,并通过校准曲线进行验证。

1.2.10 NUP85 共表达基因风险评估模型 通过临床生信之家进行 LASSO 回归分析,从 NUP85 及相关基因中筛选出基因并进行风险评估,以风险评估的中位值为阈值,分为高风险组和低风险组,并进行下游分析。

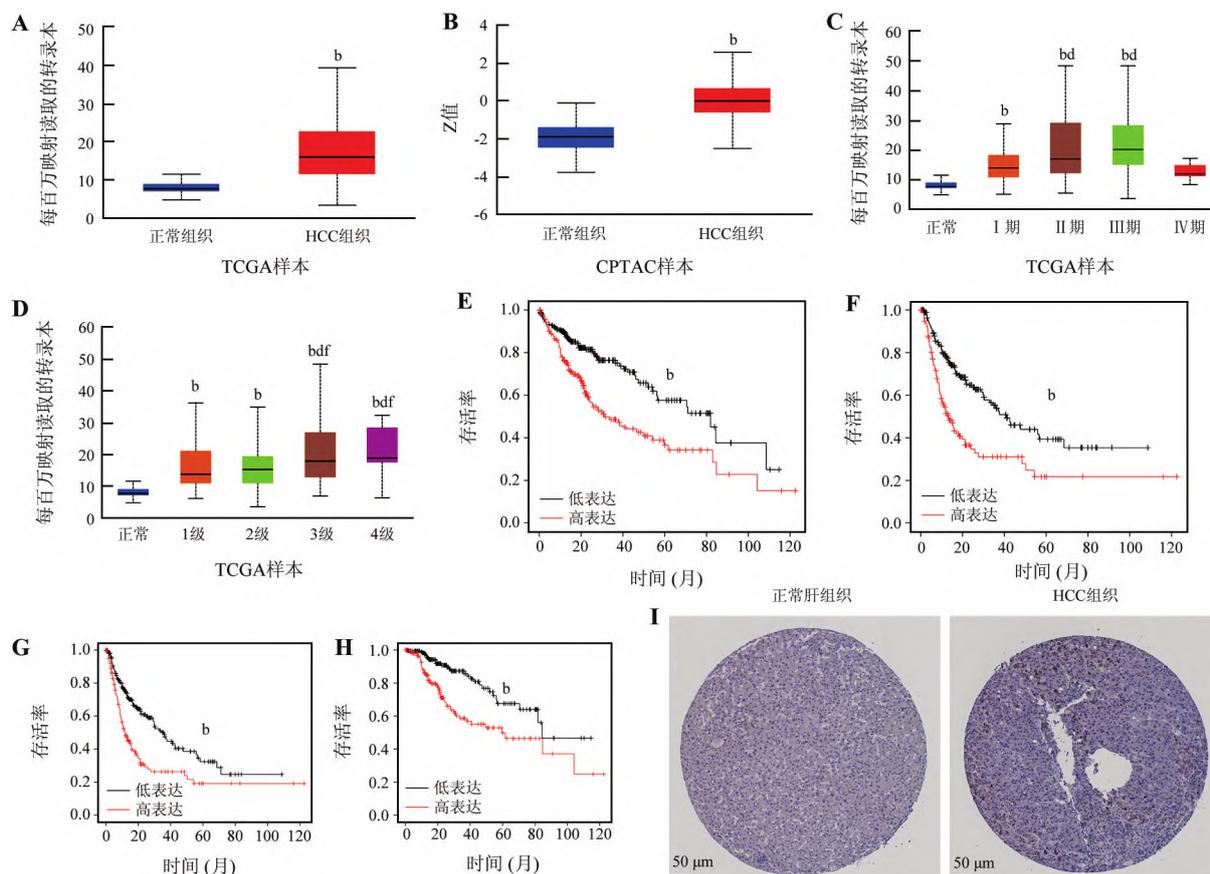
1.2.11 统计学分析 本研究采用多种统计方法以确保数据分析的准确性和可靠性。生存分析使用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验来评估 NUP85 基因表达与生存期的相关性。NUP85 在不同组织和肿瘤分期中的表达差异通过 ANOVA 和 *F* 检验进行分析。基因表达与免疫细胞浸润的相关性采用 Spearman 相

关性分析。在共表达基因筛选和风险评估模型构建中,应用 LASSO 回归分析识别与预后相关的基因,并进行风险评估。通过 COX 回归分析筛选独立预后因素,并构建列线图。模型预测准确性通过校准曲线验证, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NUP85 在 HCC 组织高表达且与预后差相关

利用 UALCAN 分析样本数据,发现在 HCC 组织中 NUP85 高表达(图 2A、B),且 NUP85 在不同的肿瘤分期和肿瘤分级均高表达(图 2C、D)。生存曲线显示,NUP85 基因高表达不利于 HCC 患者的 DFS、OS、PFS 以及 DSS(图 2E ~ H)。切片结果显示,NUP85 蛋白在 HCC 组织细胞质中表达上调,呈棕色颗粒(图 2I)。



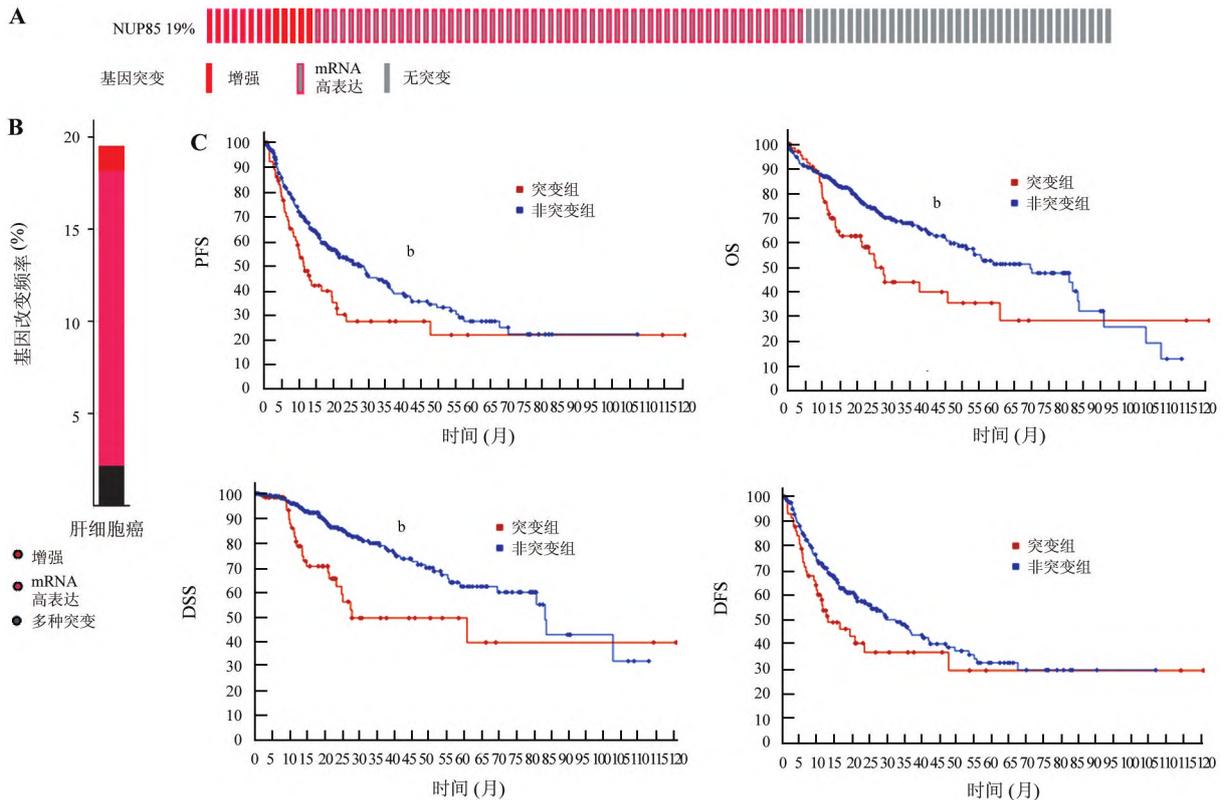
A: NUP85 在 HCC 与正常组织中的表达差异; B: NUP85 在 HCC 中的蛋白表达; C: NUP85 表达与患者临床分期的关系。^b $P < 0.01$ vs 正常; ^d $P < 0.01$ vs 1 期。D: NUP85 表达与患者临床分级的关系。^b $P < 0.01$ vs 正常; ^d $P < 0.01$ vs 1 级; ^e $P < 0.01$ vs 2 级。E: 患者 OS; F: 患者 DFS; G: 患者 PFS; H: 患者 DSS。^b $P < 0.01$ vs 高表达。I: HCC 组织 NUP85 蛋白的表达(免疫组织化学染色,标尺=50 μm)。

图 2 HCC 组织中 NUP85 的表达及其 HCC 患者生存预后的关系

2.2 NUP85 突变与预后差相关

通过 cBioPortal 在线工具对 NUP85 突变的分析结果发现,NUP85 的突变率是 19%,共有 3 种突变

方式,分别增强、mRNA 高表达、同时存在增强与 mRNA 高表达(图 3A、B),且影响患者的 OS、DSS 以及 PFS($P < 0.05$,图 3C)。



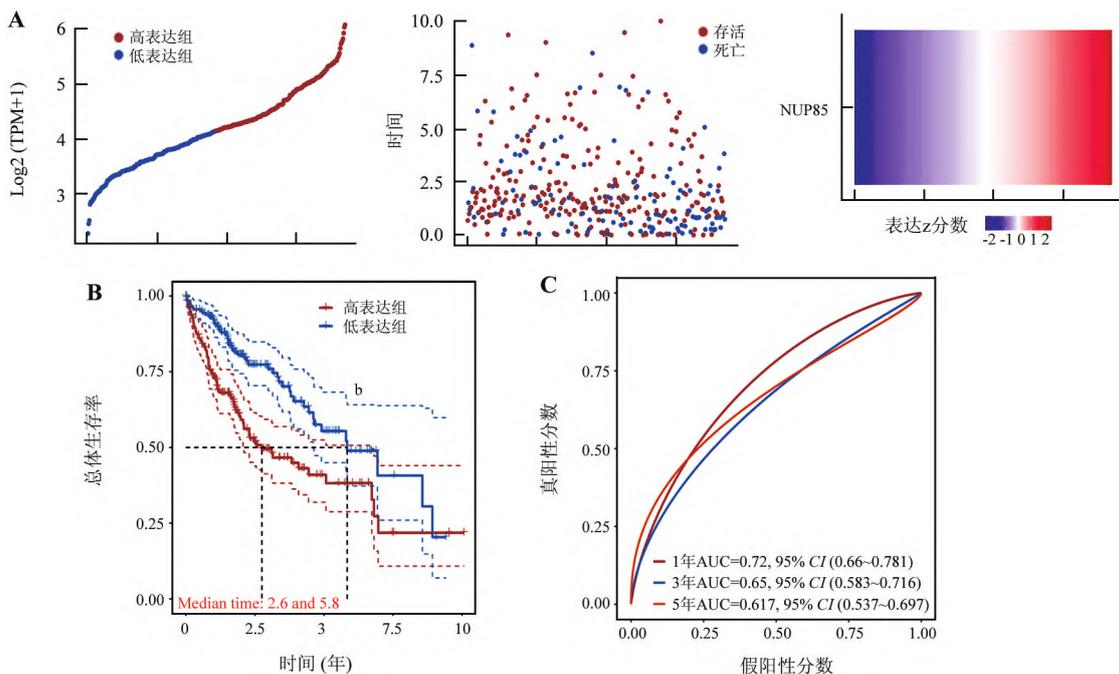
A: NUP85 突变在样本中占比; B: NUP85 在 HCC 中突变频率; C: NUP85 突变与 HCC 患者生存预后关系。 ^b*P* < 0.01 vs 突变组。

图3 NUP85 突变及其与 HCC 患者预后相关性

2.3 NUP85 对 HCC 有预后诊断价值

分析结果显示, 随 NUP85 表达的增高, 患者预后风险增加(图 4A), NUP85 的不利于 HCC 患者的生存时间(图 4B); 对于 HCC 患者的 1 年、3 年和

5 年总体生存预后的诊断, NUP85 的 AUC 分别为 0.72(95% CI = 0.66 ~ 0.781)、0.65(95% CI = 0.583 ~ 0.716) 和 0.617(95% CI = 0.537 ~ 0.697)(图 4C)。



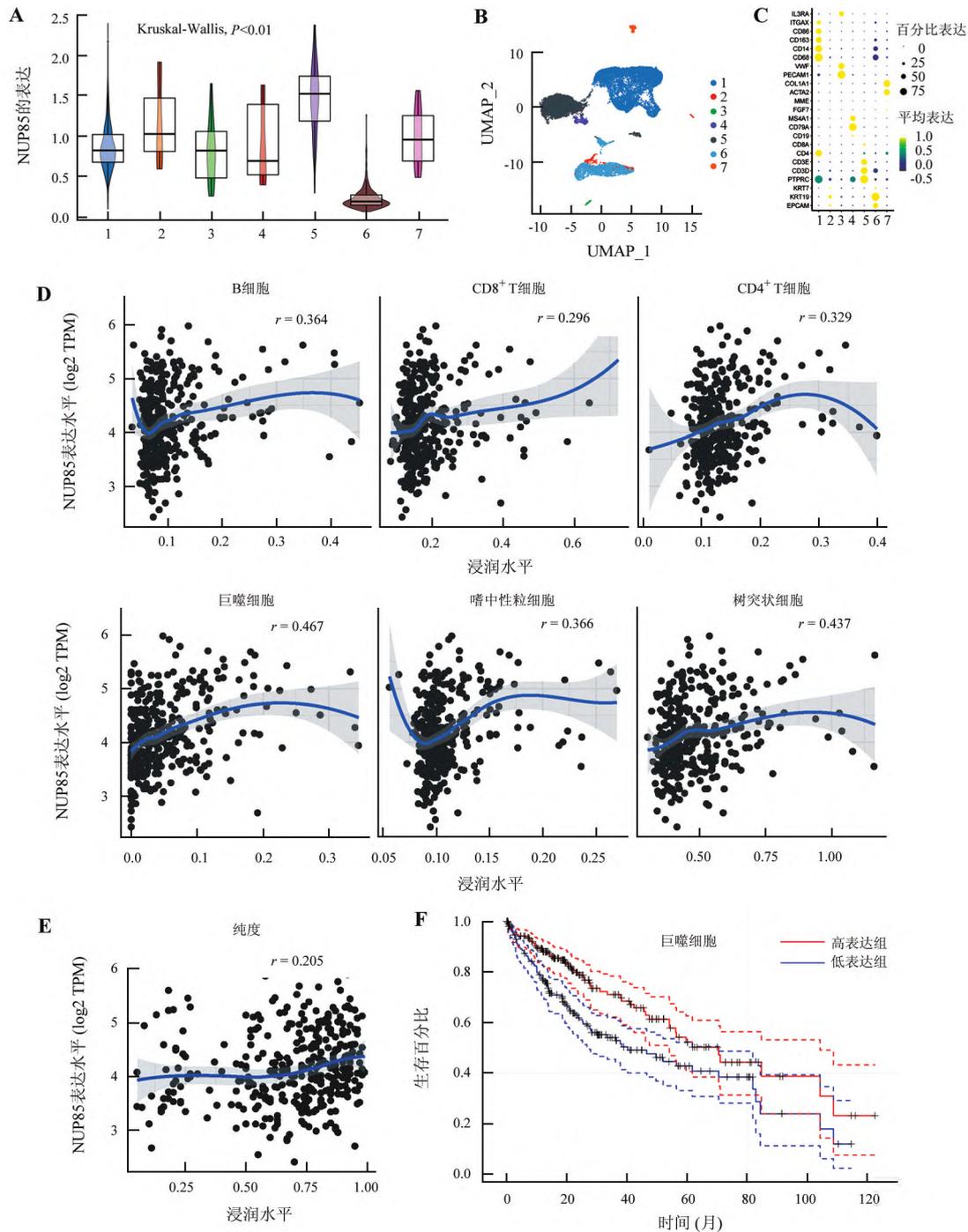
A: 风险得分, 生存时间以及 NUP85 表达; B: NUP85 KM 生存曲线。 ^b*P* < 0.01 vs 高表达组。 C: ROC 曲线 AUC。

图4 NUP85 对 HCC 患者预后诊断价值

2.4 NUP85 主要在 HCC 的免疫细胞表达且巨噬细胞高浸润与 HCC 患者良好预后相关

利用 R 语言“Seurat 包”分析 NUP85 基因表达,发现其主要在免疫细胞中表达(图 5A)。群集分析结果显示, NUP85 基因在巨噬细胞、肥大细胞、内皮细胞、B 细胞、T 细胞、肿瘤相关成纤维细胞等多种细胞类型均有表达(图 5B、C)。免疫浸润分析结果发

现, NUP85 在 HCC 组织与各类免疫细胞显著正相关($P < 0.05$), 其中与巨噬细胞相关性最强(图 5D), 且与肿瘤细胞纯度(purity)显著正相关($r = 0.205$, $P = 1.19e-04$, 图 5E)。此外, 通过 GEPIA2021 的 EPIC 算法, 分析 NUP85 基因表达相关的浸润免疫细胞与 HCC 患者 OS 的关系, 发现巨噬细胞的高浸润与 HCC 患者良好预后相关(图 5F)。



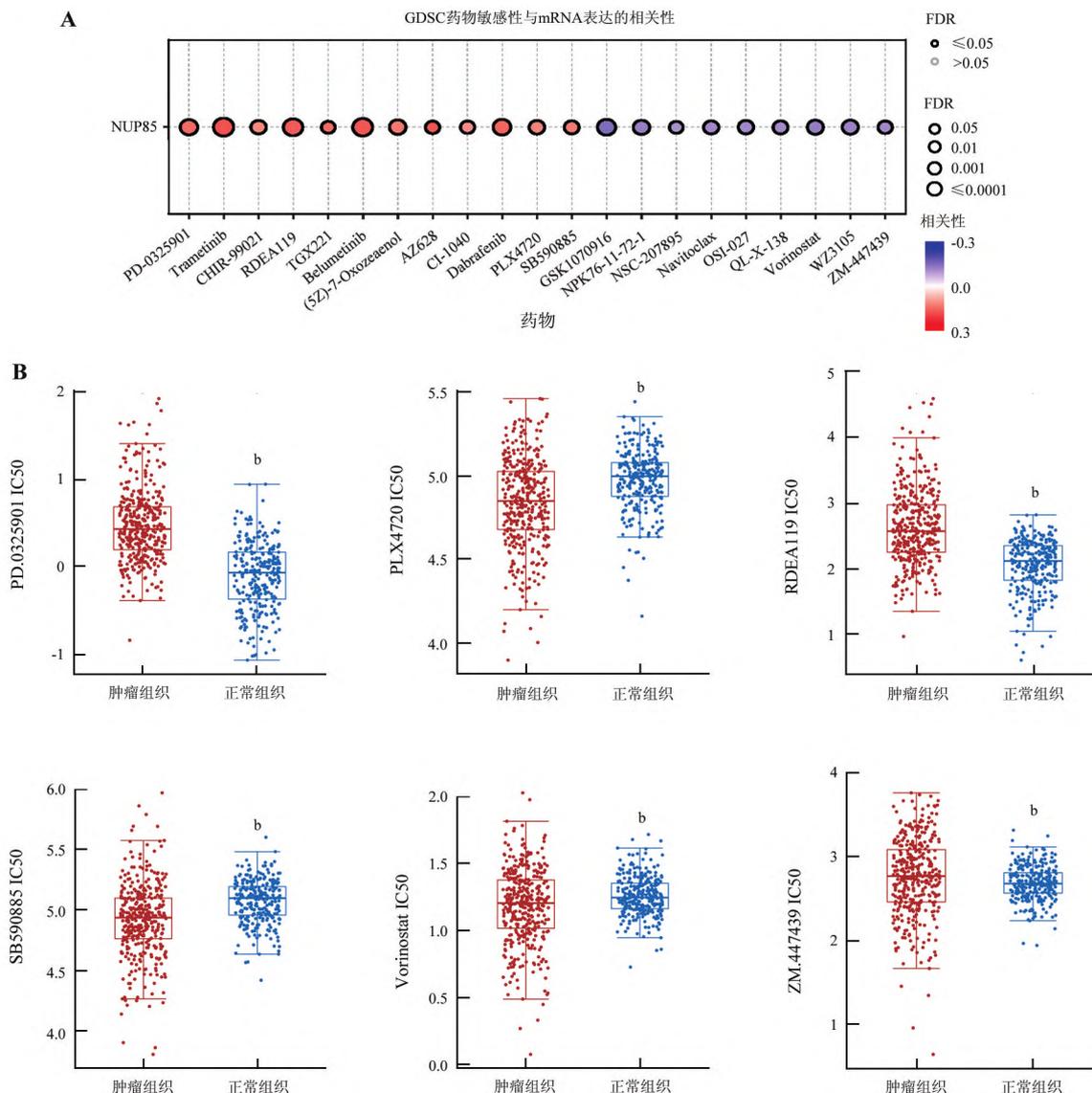
A: NUP85 在各免疫细胞的表达; B: 免疫细胞聚集的散点图; C: 各免疫细胞簇标记基因的表达比例及表达水平。1: 巨噬细胞; 2: 肥大细胞; 3: 内皮细胞; 4: B 细胞; 5: T 细胞; 6: 恶性肿瘤细胞; 7: 肿瘤相关成纤维细胞。D: 各种免疫细胞浸润水平; E: 肿瘤细胞纯度; F: 巨噬细胞浸润水平与患者预后的关系。

图 5 NUP85 在不同免疫细胞内的表达及免疫细胞浸润和患者预后之间的关系

2.5 NUP85 药物敏感性分析

分析结果显示, 数据库中共 21 种药物与 NUP85 基因表达具有显著相关性(图 6A)。将筛选出的药物导入临床生信之家进行 IC₅₀ 分析, 结果显示, 药物 PD0325901 即米尔达美替尼 (mirdametinib)、

PLX4720 即维莫非尼 (vemurafenib) 的结构类似物、RDEA119 即瑞法替尼 (refametinib)、SB590885 即一种 B-Raf 抑制剂、伏立诺他 (Vorinostat) 和一种选择性的极光激酶抑制剂 ZM. 447439 (分子式为 C₂₉H₃₁N₅O₄) 的 IC₅₀ 分析结果有显著意义 ($P < 0.05$, 图 6B)。



A: GDSC 药物敏感性与 NUP85 表达的相关性; B: GDSC 相关药物的 IC₅₀ 分析. ^b $P < 0.01$ vs 肿瘤组织。

图 6 NUP85 的表达与药物敏感性的相关性及相关药物 IC₅₀ 分析

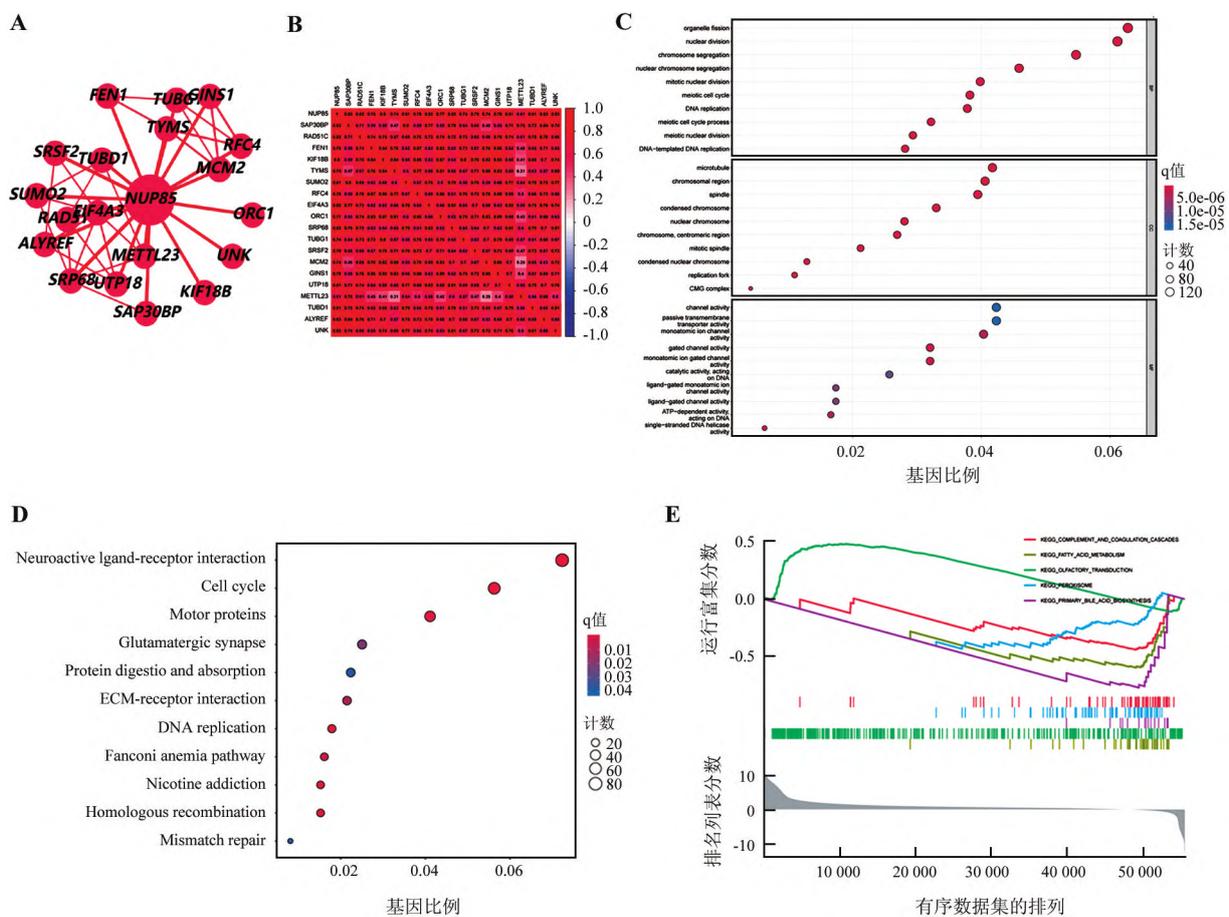
2.6 NUP85 共表达基因的筛选及其共表达基因富集分析

分析结果显示, 与 NUP85 共表达的 19 个基因分别是翻转末端核酸酶 1 (flap endonuclease 1, FEN1)、微管蛋白 γ 1 (tubulin gamma 1, TUBG1)、5-1-2-3 (Go-Ichi-Ni-San, GINS) 复合体亚基 1 (GINS complex subunit 1, GINS1)、胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TYMS)、复制因子 C 亚基 4 (replication factor C

subunit 4, RFC4)、小核核糖核蛋白丝氨酸/精氨酸剪接因子 2 (serine/arginine-rich splicing factor 2, SRSF2)、微管蛋白 δ 链 1 (tubulin delta 1, TUBD1)、微小染色体维持复合体成分 2 DNA 复制许可因子 (minichromosome maintenance complex component 2, MCM2)、小泛素样修饰蛋白 2 (small ubiquitin-like modifier 2, SUMO2)、原点识别复合体亚基 1 (origin recognition complex subunit 1, ORC1)、RAD51 同源物 C

(RAD51 homolog C, RAD51C)、真核翻译起始因子4A3(eukaryotic translation initiation factor 4A3, EIF4A3)、Aly/REF输出因子(Aly/REF export factor, ALYREF)、甲基转移酶样蛋白23(methyltransferase like 23, METTL23)、蓬乱(unkempt, UNK)锌指蛋白、68kDa信号识别颗粒蛋白(signal recognition particle 68kDa, SRP68)、UTP利用酶18(UTP-utilizing enzyme 18, UTP18)、驱动蛋白家族成员18B(kinesin family member 18B, KIF18B)以及SAP30结合蛋白(SAP30 binding protein, SAP30BP)(图7A),且通过R语言“limma包”分析所得结果显示共表达基因与NUP85相关系数均 >0.6 (图7B)。通过R语

言“clusterProfiler包”对NUP85及其共表达基因进行GO分析和KEGG通路富集分析,结果显示,在生物过程方面其主要涉及到细胞器裂变、核分裂以及染色体分离等;在细胞组分方面其主要涉及微管、染色体区域和纺锤体等;在分子功能方面其主要涉及通道活性、被动跨膜转运体活性和单原子离子通道活性等(图7C);而对于KEGG通路则主要富集在神经活性配体-受体的相互作用、细胞周期和运动蛋白等(图7D);此外,GSEA分析结果显示,在NUP85基因高表达组中嗅觉转导通路是活跃的,而补充和凝聚级联、脂肪酸代谢、过氧化物酶体、初级胆汁酸生物合成等通路主要富集在NUP85基因低表达组(图7E)。



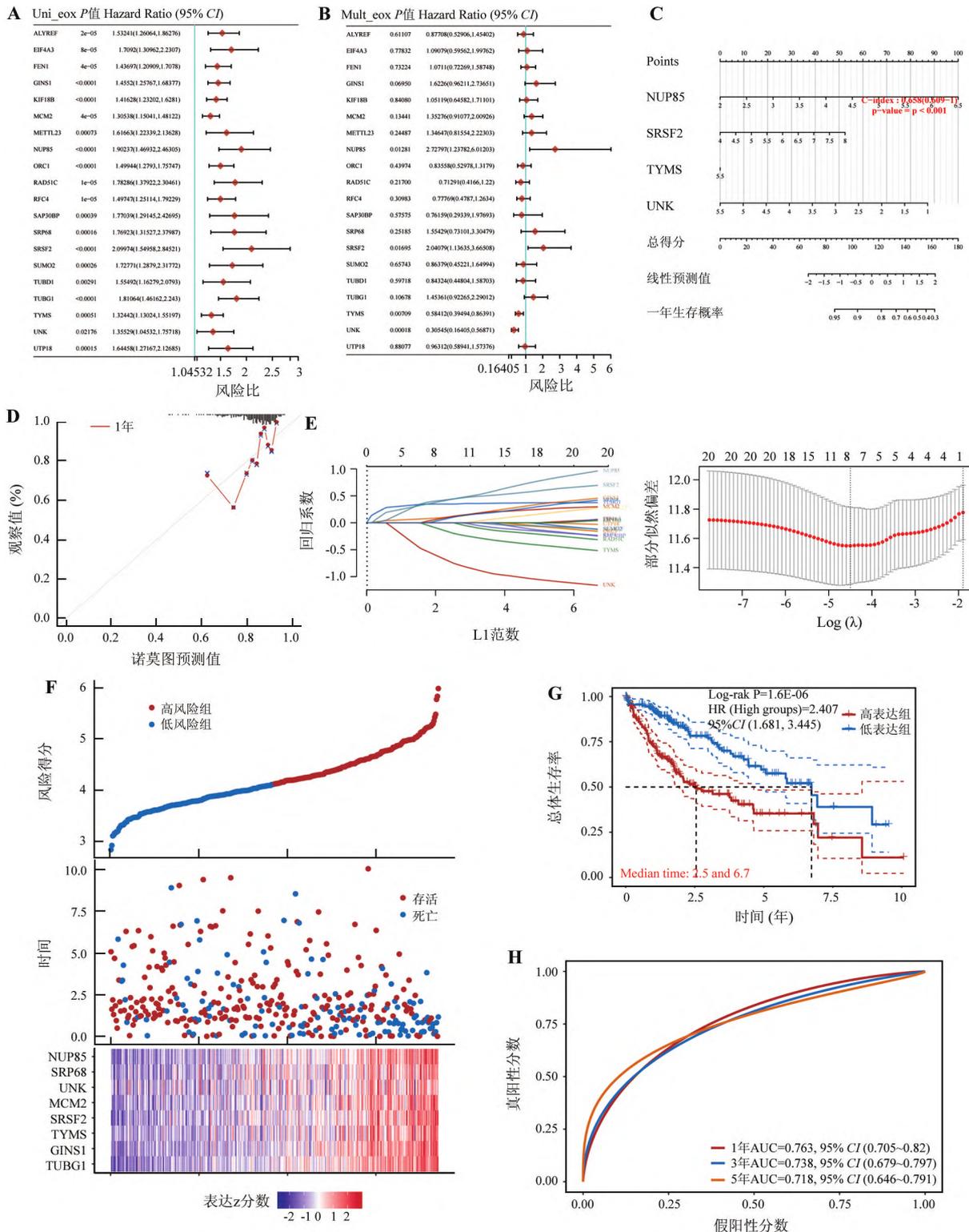
A: NUP85 共表达基因网络图; B: 共表达基因相关性图; C: GO 功能注释(BP, CC, MF); D: KEGG 通路分析; E: GSEA 分析。
图7 NUP85 在 HCC 中共表达基因及其 GO 功能、KEGG 通路富集分析和 GSEA 分析

2.7 NUP85 共表达基因列线图及其风险评估模型

单因素生存分析森林图显示, NUP85 及其共表达基因均为患者 OS 的危险因素(图 8A), 多因素生存分析森林图显示, 仅 NUP85、SRSF2、TYMS 以及 UNK 是影响 HCC 患者 OS 的独立预后因素(图 8B)。利用所得上述独立因素构建风险列线图, 评估结果表明, 模型的

C-index 为 0.658(0.609 ~ 1.000), 其高表达增加 HCC 患者预后风险(图 8C), 校准曲线与实际情况高度吻合(图 8D)。利用 LASSO 回归模型, 从 NUP85 及其共表达基因中筛选出 8 个基因构建模型, 并进行风险评估(图 8E)。结果显示, 患者的死亡率随着评分的增高而增高(图 8F), 且 NUP85 高表达组患者预后差(图 8G),

HCC 患者 1 年、3 年和 5 年 OS 的 ROC 曲线下面积 AUC (0.679 ~ 0.797) 和 0.718, 95% CI (0.646 ~ 0.791), 具有较好的预测能力 (图 8H)。



A: 单因素生存分析森林图; B: 多因素生存分析森林图; C: 列线图; D: 校准曲线; E: LASSO 回归模型; F: 风险评分模型; G: K-M 曲线; H: 1 年、3 年和 5 年 OS 的 ROC 曲线。

图 8 NUP85 及其共表达基因对 HCC 患者预后风险评价及风险评分模型的建立与验证

3 讨论

HCC 作为全球最常见的癌症之一,生物学过程复杂,起病隐匿,目前难以进行根治性治疗。有研究表明,系统抗肿瘤治疗是中晚期 HCC 患者的希望^[11],针对特定靶点生物分子的免疫疗法逐渐成为首选的癌症治疗方案之一^[12]。大量证据显示,NUP85 与多种恶性肿瘤所处的 TIME 有关^[13],且可以通过改变多种免疫细胞的浸润水平来影响患者预后情况。

分析结果显示,NUP85 在正常肝脏组织中有较少表达,但在 HCC 组织及其不同分期和分级中表达较高,且高表达组较低表达组对 HCC 患者的 DFS、OS、PFS 以及 DSS 生存预后情况产生不利影响,显著缩短了 HCC 患者的生存时间,该结果与 Singh 等^[14]在关于 NUP 家族的研究中所得结论一致。因此,可推测 NUP85 的表达产物在 HCC 的发生与发展进程中起到重要作用。此外,Lin 等^[15]使用分子细胞学和生化技术对 729 例原发性 HCC 病例进行研究,结果显示 NUP93 在 HCC 组织中高表达,促进 HCC 肿瘤细胞转移,并且与 HCC 患者的较差预后有关。由于 NUP85 与 NUP93 均为 NUP 家族的核心成分^[16],因此可推测 NUP85 可能对 HCC 有相同作用。同时许多证据表明 NUP85 在多种肿瘤中均存在高表达的现象。彭雨^[17]以 NUP93 为切入点也发现 NUP 家族在去势前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) 组织中的表达明显高于其癌旁组织;同时 Oliver-Krasinski 等^[18]证实了高水平表达的 NUP85 与膀胱浸润性乳头状尿路上皮癌 (papillary urothelial carcinoma, PUC) 的无复发生存期和无特异性侵袭生存期呈负相关,而与临床病理恶性程度呈正相关。因此,可推测 NUP85 可能与 HCC 患者的生存预后情况有紧密联系。综上所述,种种证据显示 NUP85 与 HCC 关系密切,与本文研究中 NUP85 在 HCC 中高表达的结果一致。

此外,本研究分析发现 NUP85 在 HCC 中有较大概率产生突变,影响患者的生存预后情况。国外学者 Morgan 等的研究结果显示,NUP85 的突变可激活主流蛋白 53 (tumor protein 53, TP53) 及其依赖性转录程序,且 NUP85 突变后大量表达与 TP53 突变有直接关系,该过程会导致肝细胞特异性增生发展为 HCC^[19-20],与本文研究中高突变 NUP85 与 HCC 有密切关系的观点相同。因此,可推测 NUP85 可能通过影响 TP53 等基因的突变情况进而影响 HCC 患者的生存预后。综上所述,NUP85 极为可能是一种癌基因,在 HCC 的发生发展过程中发挥重要作用,并可能与

TP53 的突变有关。

本研究发现 NUP85 在 HCC 中的共表达基因共有多个,其中有显著相关关系是 SRSF2、TYMS 以及 UNK。有研究表明,NUP85 与这几个基因可通过将 NUP 家族募集到患者脑组织的细胞质聚集体中来影响核孔复合体 (nuclear pore complex, NPC) 的分布和功能^[21]。此外,本研究中 GO 分析显示,NUP85 及其共表达基因在生物过程方面其主要涉及到核分裂以及染色体分离以及微管、染色体区域和纺锤体等,而 KEGG 通路则主要富集在细胞周期和运动蛋白等通路上,GSEA 分析结果显示 NUP85 基因高表达组中嗅觉转导通路活跃,这些结果表明 NUP85 基因可能与有丝分裂密切相关,NUP85 高表达可能促进肿瘤发生发展。Borah 等^[22]研究证实负责调控核膜内外物质运输的 NPC 由多个 NUP 家族亚基组成,这些 NUP 的正确组装对 NPC 至关重要,一旦 NUP 家族的功能和结构发生改变,通常会对肿瘤发生和癌症进展产生较大影响,印证了本研究中 NUP85 可能通过细胞周期调控 HCC 进展的结果。因此,可推测细胞周期的改变可能与 HCC 肿瘤细胞的增殖和转移有关,而与细胞周期调节相关的基因 NUP85 可能是肿瘤发生发展和转移的重要因素。NUP85 及其共表达基因在细胞周期调节中可能发挥重要作用,导致 HCC 肿瘤细胞增殖异常,进而导致肿瘤患者的生存预后不良。另外,本研究结果显示,mirdametinib 等药物与 NUP85 相关性较强,这也与蔡广臻^[23]的研究结果一致。因此,可推测 NUP85 可能是 HCC 药物研发的新靶点。

TIME 由各种免疫细胞和其他细胞类型组成,这些细胞类型有助于肿瘤生长,使其成为癌症生存预后治疗的有效靶点^[24]。本研究显示 NUP85 在多种免疫细胞中均有表达,特别是 TAM 和 T 淋巴细胞。Liu 等^[25]证明这两类细胞在治疗肿瘤和增强免疫防御方面有重要作用,与本研究结果一致。同时本研究中免疫浸润分析结果发现,NUP85 在 HCC 组织与各类免疫细胞显著正相关,其中与巨噬细胞相关性最强,且巨噬细胞的高浸润可促进 HCC 患者良好预后。Gui 等^[26]认为 HCC 中存在着独特的 TIME,而 TAM 是浸润 TIME 最丰富的免疫细胞之一,并存在于 HCC 进展的所有阶段。其通过研究还发现,TAM 与术后肿瘤进展和治疗密切相关,在肿瘤进展中起着不可或缺的作用,靶向 TAM 免疫治疗对患者生存预后具有极大改善,这与本文研究结果具有高度一致性。因此,可推测 NUP85 可通过 TIME 对 HCC 产生影响,可能是 HCC 的潜在生物标志物。另有研究认

为, NUP85 对 HCC 的影响机制是通过表达产物, 一种细胞内蛋白趋化因子信号调节器前部蛋白 (FROUNT) 通过与巨噬细胞上的 CC 趋化因子受体 2 (C-C motif chemokine receptor 2, CCR2) 和 CCR5 结合, 从而促进伪足的形成, 从机制层面解释了 NUP85 如何通过 TIME 对 HCC 进行调控^[27-29], 与本研究结果一致。

总之, 通过对 HCC 大数据综合分析发现, NUP85 高表达不利于 HCC 患者的生存预后, 且 NUP85 与多种免疫细胞浸润正相关, 为早期判断 HCC 患者的生存状况提供重要依据, 也为其中晚期治疗提供重要的生物学信息。所以, NUP85 可作为 HCC 患者生存预后的生物标志物。

参考文献:

- [1] Tümen D, Heumann P, Gitlow K, et al. Pathogenesis and current treatment strategies of hepatocellular carcinoma[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12): 3202.
- [2] 熊焰, 简蕾, 吴昊. 肝细胞癌的临床免疫治疗联合靶向治疗研究进展[J]. *中国医药科学*, 2024, 14(2): 62-65.
Xiong Y, Jian L, Wu H. Advances in clinical immunotherapy combined with targeted therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Zhongguo Yi Yao Ke Xue*, 2024, 14(2): 62-65.
- [3] 邓燕, 段勇. 原发性肝癌发病机制和药物治疗的研究进展[J]. *河北医学*, 2024, 30(2): 345-348.
Deng Y, Duan Y. Progress in the pathogenesis of primary hepatocellular carcinoma and drug treatment [J]. *Hebei Yi Xue*, 2024, 30(2): 345-348.
- [4] 张天奇, 曹钰哲, 左孟轩, 等. 肝癌靶向联合免疫治疗耐药后的二线治疗方案研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(2): 386-390.
Zhang T, Cao Y, Zuo M, et al. Research progress on second-line treatment for hepatocellular carcinoma after drug resistance to targeted combined immunotherapy[J]. *Lin Chuang Gan Dan Bing Za Zhi*, 2024, 40(2): 386-390.
- [5] 苏莉莉, 梁晚晴, 吕振宇, 等. PLXNA1 在肝癌中高表达并影响患者的生存预后及其免疫微环境[J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(11): 1909-1918.
Su L, Liang W, Lyu Z, et al. PLXNA1 is highly expressed in hepatocellular carcinoma and affects the survival prognosis and immune microenvironment of patients[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2023, 43(11): 1909-1918.
- [6] 王威, 程倩倩, 周雪丽, 等. 肝细胞癌免疫相关基因和 lncRNA 联合预后模型的构建及验证[J]. *安徽医药*, 2024, 28(4): 789-793.
Wang W, Cheng Q, Zhou X, et al. Construction and validation of a combined prognostic model of immune-related genes and lncRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Anhui Yi Yao*, 2024, 28(4): 789-793.
- [7] 姚燕, 王淑贤, 吴银翠, 等. 鼠源 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 真核表达质粒的构建及其部分功能研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(5): 794-799.
Yao Y, Wang S, Wu Y, et al. Construction and functional study of murine pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 eukaryotic expression plasmid [J]. *Anhui Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2023, 58(5): 794-799.
- [8] Zhang M, Tian S Y, Ma S Y, et al. Deficient chaperone-mediated autophagy in macrophage aggravates inflammation of nonalcoholic steatohepatitis by targeting NUP85[J]. *Liver Int*, 2023, 43(5): 1021-1034.
- [9] Wang Y, Fan J, Chen T, et al. A novel ferroptosis-related gene prognostic index for prognosis and response to immunotherapy in patients with prostate cancer[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 975623.
- [10] Patel M K, Chakrabarti B, Panwar A S. Emergence of selectivity and specificity in a coarse-grained model of the nuclear pore complex with sequence-agnostic FG-Nups [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2023, 25(48): 32824-32836.
- [11] Wang Y, Deng B. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanism, targeted therapy, and biomarkers [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2023, 42(3): 629-652.
- [12] Xie M, Lin Z, Ji X, et al. FGF19/FGFR4-mediated elevation of ETV4 facilitates hepatocellular carcinoma metastasis by upregulating PD-L1 and CCL2[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(1): 109-125.
- [13] Liu Y, Xun Z, Ma K, et al. Identification of a tumour immune barrier in the HCC microenvironment that determines the efficacy of immunotherapy[J]. *J Hepatol*, 2023, 78(4): 770-782.
- [14] Singh U, Bindra D, Samaiya A, et al. Overexpressed NUP88 stabilized through interaction with NUP62 promotes NF-κB dependent pathways in cancer[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1095046.
- [15] Lin C S, Liang Y, Su S G, et al. Nucleoporin 93 mediates β-catenin nuclear import to promote hepatocellular carcinoma progression and metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2022, 526: 236-247.
- [16] Mori K, Murakoshi Y, Tamura M, et al. Mutations in nuclear pore complex promote osmotolerance in Arabidopsis by suppressing the nuclear translocation of ACQOS and its osmotically induced immunity [J]. *Front Plant Sci*, 2024, 15: 1304366.
- [17] 彭雨. NUP93 促进去势抵抗性前列腺癌进展的作用及机制研究[D]. 山东大学, 2023.
Peng Y. To investigate the role and mechanism of NUP93 in promoting the progression of castration-resistant prostate cancer [D]. Shandong University, 2023.
- [18] Oliver-Krasinski J M, Bidot S, Ingram J W, et al. Noninvasive papillary urothelial carcinoma of the bladder: an institutional experience focusing on tumors with borderline features [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2024, 148(2): 223-229.
- [19] Ravindran E, Lesca G, Januel L, et al. Case report: Compound

- heterozygous NUP85 variants cause autosomal recessive primary microcephaly[J]. *Front Neurol*, 2023, 14: 1124886.
- [20] Morgan K J, Doggett K, Geng F, et al. Ahctf1 and Kras mutations combine to amplify oncogenic stress and restrict liver overgrowth in a zebrafish model of hepatocellular carcinoma[J]. *Elife*, 2023, 12: e73407.
- [21] 李易玲, 陈平, 付智丹, 等. 光信号和光合产物调控豆科植物根瘤形成发育的研究进展[J]. *中国生态农业学报(中英文)*, 2023, 31(1): 21-30.
- Li Y, Chen P, Fu Z, et al. Light signals and photosynthates regulate nodule formation and development in leguminous plants [J]. *Zhongguo Sheng Tai Nong Ye Xue Bao (Zhong Ying Wen)*, 2023, 31(1): 21-30.
- [22] Borah S, Dhanasekaran K, Kumar S. The LEM-ESCRT toolkit: repair and maintenance of the nucleus[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 989217.
- [23] 蔡广臻. 肝细胞癌缺氧微环境相关的分子特征与生物学功能研究[D]. 华中科技大学, 2022.
- Cai G. To study the molecular characteristics and biological functions of hepatocellular carcinoma hypoxic microenvironment [D]. *Huazhong University of Science and Technology*, 2022.
- [24] Zhang L, Xu J, Zhou S, et al. Endothelial DGKG promotes tumor angiogenesis and immune evasion in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2024, 80(1): 82-98.
- [25] Liu L, Zhang R, Deng J, et al. Construction of TME and Identification of crosstalk between malignant cells and macrophages by SPP1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(1): 121-136.
- [26] Gui M, Huang S, Li S, et al. Integrative single-cell transcriptomic analyses reveal the cellular ontological and functional heterogeneities of primary and metastatic liver tumors[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 206.
- [27] Cheng K, Cai N, Zhu J, et al. Tumor-associated macrophages in liver cancer: From mechanisms to therapy[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(11): 1112-1140.
- [28] Toda E, Sawada A, Takeuchi K, et al. Inhibition of the chemokine signal regulator FROUNT by disulfiram ameliorates crescentic glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 2022, 102(6): 1276-1290.
- [29] Chen A, Lee K, He J C. Treating crescentic glomerulonephritis by targeting macrophages [J]. *Kidney Int*, 2022, 102(6): 1212-1214.

《细胞与分子免疫学杂志》2025年征订启事

《细胞与分子免疫学杂志》为北大图书馆《中文核心期刊要目总览》医药卫生类核心期刊、百种中国杰出学术期刊、中国高校百佳科技期刊、中国科技信息研究所“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”、中国科学院文献情报中心“中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊”,清华大学“中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)”统计源期刊、武汉大学“中国学术期刊评价研究报告中国核心期刊”,各种国内数据库收录期刊。同时也是MEDLINE/PubMed、Scopus、JST China、WPRIM等国外著名数据库收录期刊。本刊为月刊,国内外公开发行。精装双面铜版纸彩色印刷,每月18日出版。本刊自办发行,欢迎各单位直接联系本刊编辑部购买,量大从优,国际邮发代号BM4882。

地址:陕西省西安市长乐西路169号空军军医大学《细胞与分子免疫学杂志》编辑部; 邮编:710032 网站: <http://cmi.guifeng.cc/>
电话:029-84774550(兼传真); E-mail:immuedit@fmmu.edu.cn

联系人:韩老师

《细胞与分子免疫学杂志》编辑部
2024-06-10