

## 广西原发性肝细胞癌合并肝吸虫病患者的转录组测序分析

黄新磊, 黄在达, 彭凯, 蓝晨露, 覃海飞, 韦勇光, 廖锡文, 杨成昆, 韩创业, 朱广志

(广西医科大学第一附属医院肝胆外科, 南宁 530021)

**摘要** **目的:** 利用转录组学数据探索肝细胞癌(HCC)合并肝吸虫病的分子机制与免疫环境特征。**方法:** 收集2022年1月至2023年12月在广西医科大学第一附属医院接受手术切除的6例HCC患者(其中3例合并肝吸虫病, 3例未合并肝吸虫病)的癌组织及其癌旁组织样本, 进行转录组测序。比较合并与未合并肝吸虫病的HCC患者的基因表达谱, 使用“Limma”包鉴定差异表达基因, 并对这些基因进行功能富集(GO)分析以确定所涉及的生物学通路。使用Cibersort算法对HCC患者肿瘤微环境中的免疫细胞浸润模式进行精确量化, 并构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络, 揭示这些差异表达基因之间的潜在相互作用和信号传导机制。**结果:** 从合并肝吸虫病患者中鉴定出131个差异表达基因以及31个枢纽基因, 它们均与代谢和炎症信号通路相关。免疫分析显示, HCC合并肝吸虫病患者肿瘤组织中静息的记忆CD4<sup>+</sup>T细胞浸润上调。**结论:** 代谢途径的重编程、炎症信号通路的异常激活以及免疫微环境的改变可能共同构成了肝吸虫感染背景下HCC患者预后较差的潜在生物学基础。

**关键词** 肝细胞癌; 肝吸虫病; 转录组测序; 代谢途径; 炎症反应; 免疫浸润

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)05-0646-07

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.05.002

### Transcriptome sequencing analysis of primary hepatocellular carcinoma patients with hepatic trematodiasis in Guangxi

HUANG Xinlei, HUANG Zaida, PENG Kai, LAN Chenlu, QIN Haifei, WEI Yongguang, LIAO Xiwen, YANG Chengkun, HAN Chuangye, ZHU Guangzhi. (Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract** **Objective:** To explore the molecular mechanism and immune environmental characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) with hepatic trematodiasis using transcriptomic data. **Methods:** The cancerous tissue and adjacent tissue samples from 6 HCC patients (3 patients with hepatic trematodiasis and 3 patients without hepatic trematodiasis) who underwent surgical resection in the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University from January 2022 to December 2023 were collected for transcriptome sequencing. The gene expression profiles of HCC patients with and without hepatic trematodiasis were compared, "Limma" package was used to identify differentially expressed genes (DEGs), and functional enrichment (GO) analysis of these genes was performed to determine the biological pathways involved. Cibersort algorithm was used to precisely quantify immune cell infiltration patterns in the tumor microenvironment of HCC patients and construct protein-protein interaction (PPI) networks to reveal the potential interactions and signaling mechanisms between these DEGs. **Results:** A total of 131 DEGs and 31 Hub genes were identified in HCC patients with hepatic trematodiasis, all of which were related to metabolic and inflammatory signaling pathways. Immunological analysis revealed an up-regulation of T cells CD4<sup>+</sup> memory resting infiltration in the tumor tissues of HCC patients with hepatic trematodiasis. **Conclusion:** Reprogramming of metabolic pathways, aberrant activation of inflammatory signaling path-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 82360465)

[共同第一作者] 黄新磊, 黄在达

[通信作者] 朱广志, E-mail: zhuguangzhi0792@hotmail.com

[收稿日期] 2024-04-15

ways, and alterations in the immune microenvironment may collectively contribute the potential biological basis for the poor prognosis of HCC patients with hepatic trematodiasis.

**Keywords** hepatocellular carcinoma; hepatic trematodiasis; transcriptome sequencing; metabolic pathway; inflammatory reaction; immune infiltration

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,其发展机制复杂,主要涉及遗传和环境因素<sup>[2]</sup>。在非洲南部和亚洲东南部,HCC的发病率及病死率尤其高,我国也是HCC的高发地区<sup>[3]</sup>。不同地理分布和人群背景使得HCC表现出独特的生物学特性<sup>[4]</sup>。肝吸虫感染可能是这些背景之一,受饮食习惯的影响,其在我国两广地区流行<sup>[5]</sup>。虽然肝吸虫感染已被确认是胆管癌的致癌因素,但是其致癌机制包括机械阻塞、胆道损害、炎症反应等也与HCC相关<sup>[6-7]</sup>。一项荟萃分析揭示肝吸虫感染与HCC有显著关联,且感染程度与发病率呈正相关<sup>[8]</sup>。此外,有研究显示,与非肝吸虫感染的HCC患者对比,合并肝吸虫感染的HCC患者的临床预后更差<sup>[9-10]</sup>。然而,目前对于HCC合并肝吸虫感染的患者预后不良的具体机制尚不完全清楚。随着高通量测序技术的进步,使转录组学成为揭示疾病基因表达模式和分子网络的关键工具<sup>[11]</sup>。因此,本研究利用转录组数据探索HCC合并肝吸虫病患者疾病进展的分子机制以及免疫环境特征,以阐明导致这类患者预后不良的潜在机制。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集2022年1月至2023年12月在广西医科大学第一附属医院接受手术切除的6例HCC患者的癌组织及癌旁组织样本,其中3例患者术前肝吸虫酶标呈阳性,且粪便检查发现肝吸虫卵;另3例患者肝吸虫酶标检测呈阴性,且粪便检查无肝吸虫卵。所有患者术前未接受抗癌治疗,且携带乙型肝炎病毒。本研究已取得本院伦理委员会审核批准(批准号:2024-E262-01),所有患者均已签署知情同意书。

**1.2 数据来源** 将收集到的12个组织样本分为A组(HCC合并肝吸虫感染的癌组织)、B组(A组的癌旁组织)、C组(HCC未合并肝吸虫感染的癌组织)和D组(C组的癌旁组织),送至北京诺禾致源公司

进行转录组分析。完成mRNA处理及文库构建,获取Illumina平台兼容文库,并下载转录组数据(每个外显子碱基每百万次映射的读段数格式)。

**1.3 差异表达基因的识别** 使用“Limma”包(3.52.2版本),识别HCC合并肝吸虫病的差异表达基因<sup>[12]</sup>。具有 $|\text{Log}_2\text{Fold Change}| > 1$ 且 $P < 0.05$ 的基因被认为是差异表达基因。

**1.4 显著差异表达基因的功能富集分析** 利用“clusterProfiler”包(4.4.4版本)对差异表达基因和枢纽基因进行基因本体(gene ontology, GO)分析,包括生物过程、细胞成分、分子功能,以及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,以找出潜在的生物学功能<sup>[13]</sup>。

**1.5 免疫浸润分析** 利用“CIBERSORT”包(1.03版本)来计算HCC合并肝吸虫病患者和未感染肝吸虫的HCC患者的免疫细胞浸润程度<sup>[14]</sup>。

**1.6 蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络和模块分析** 使用STRING工具(<https://cn.string-db.org/>)构建PPI网络(阈值 $> 0.15$ )<sup>[15]</sup>,并用Cytoscape进行可视化<sup>[16]</sup>。利用molecular complex detection(MCODE)插件筛选出重要模块。采用CytoHubba插件的最大邻域分量(maximum neighborhood component, MNC)、最大团簇中心性(maximum cluster centrality, MCC)和边缘渗透分量(edge permeability component, EPC)算法筛选枢纽基因,并用韦恩图展示交集情况。

**1.7 统计学方法** 采用R语言4.2.1软件进行统计分析和图表绘制。组间两两比较使用独立样本 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 差异表达基因的鉴定** 本研究流程图如图1所示。A组与C组相比,661个基因(507个上调基因,154个下调基因)在HCC合并肝吸虫病患者中是

显著的差异表达基因,见图2A。A+C组与B+D组相比,3 310个基因(1 609个上调基因,1 701个下调基因)被鉴定为HCC患者的显著差异表达基因,见图2B。韦恩图的交集产生了131个共同差异表达基因,见图2C。聚类热图描绘了HCC合并肝吸虫病患者及HCC患者中显著差异表达基因分布,见图2D、图2E。

**2.2 差异表达基因的功能特点** 从生物过程来看,这些差异表达基因在细胞黏附、氧化应激反应、环氧酶通路以及白细胞迁移的正向调控等过程中呈现富集(图3A)。就细胞组分而言,差异表达基因主要定位于细胞表面、细胞膜等区域(图3B)。分子功能分析显示,差异表达基因在血红素结合、生长因子活性和细胞粘附分子结合等方面具有富集性(图3C)。此外,KEGG富集分析指出,矿物质吸收和花生四烯酸代谢途径是差异表达基因显著富集的(图3D)。

**2.3 免疫细胞浸润分析** CIBERSORT算法表明,

与未感染肝吸虫的HCC患者相比,合并肝吸虫感染的HCC患者中静息的记忆CD4<sup>+</sup>T细胞的浸润显著增加( $P < 0.05$ ),并且没有观察到明显的CD8<sup>+</sup>T细胞浸润( $P > 0.05$ ),见图4A、图4B。

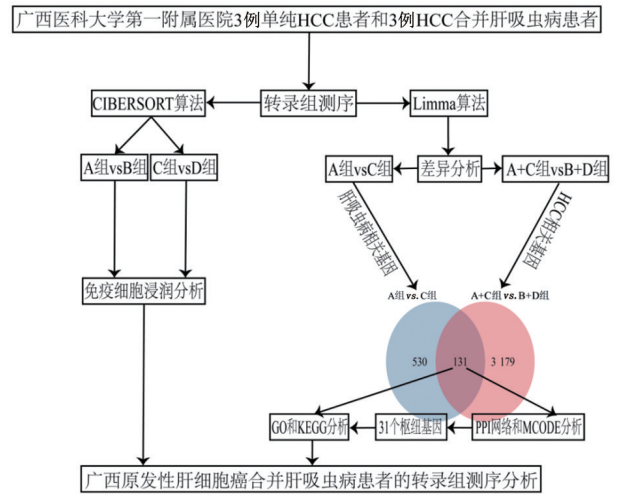
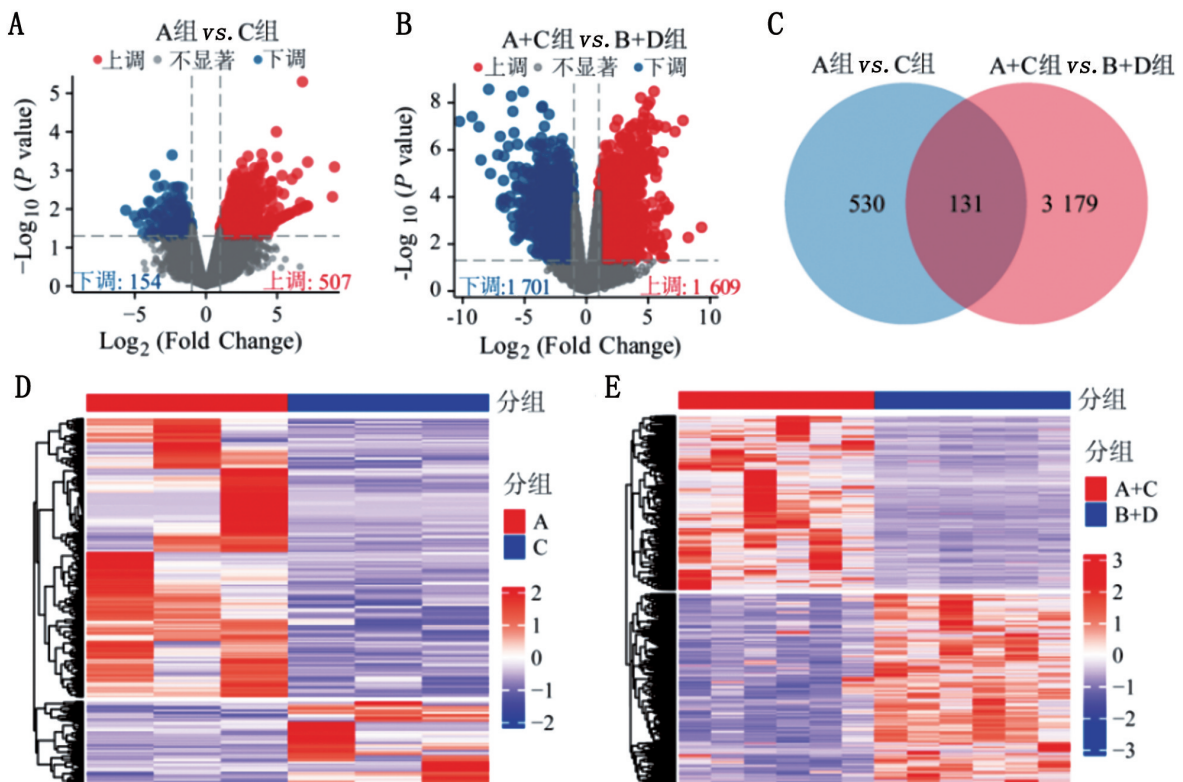


图1 研究设计流程图



A、B:火山图显示差异表达基因;C:韦恩图显示113个差异表达基因重叠;D、E:聚类热图显示了两组上调或下调最显著的差异表达基因。

图2 不同组织中基因表达谱的鉴定

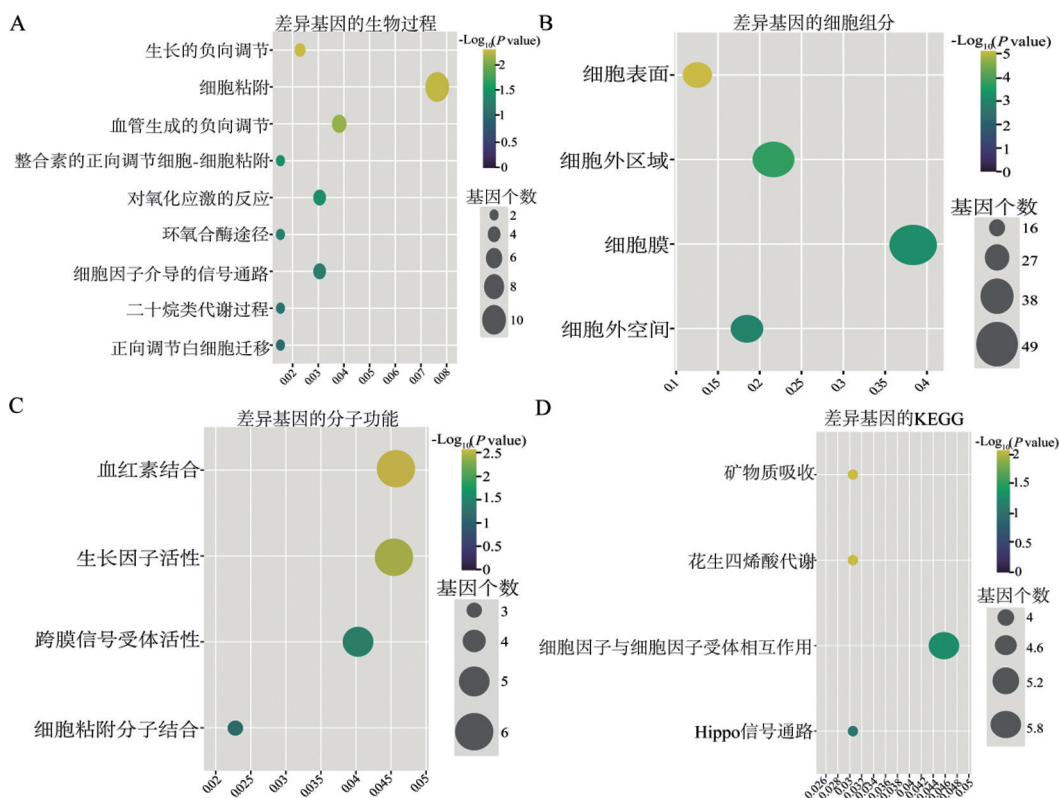
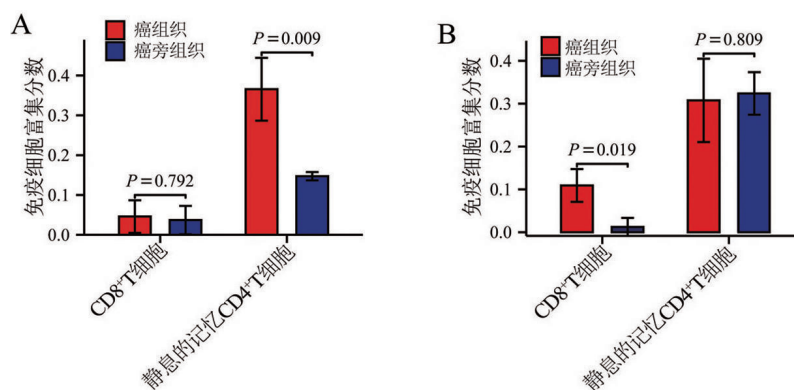


图3 公共差异表达基因的功能注释

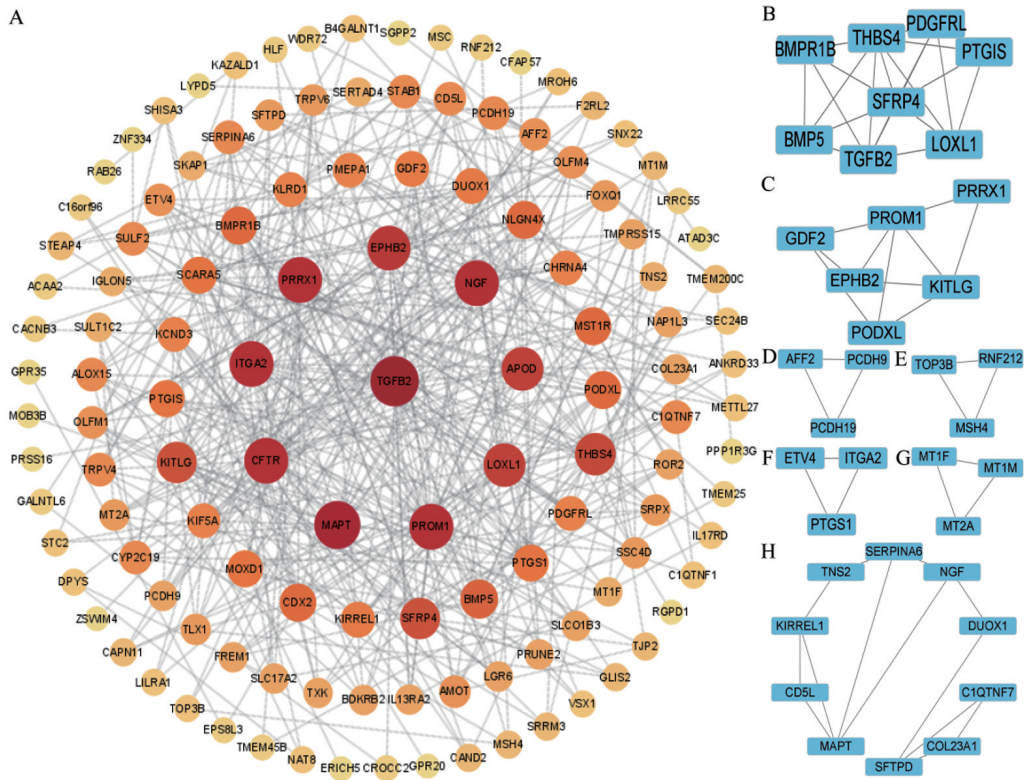


A:合并肝吸虫病的HCC患者的免疫细胞浸润情况;B:未感染肝吸虫的HCC患者的免疫细胞浸润情况。

图4 两类患者的免疫细胞浸润情况

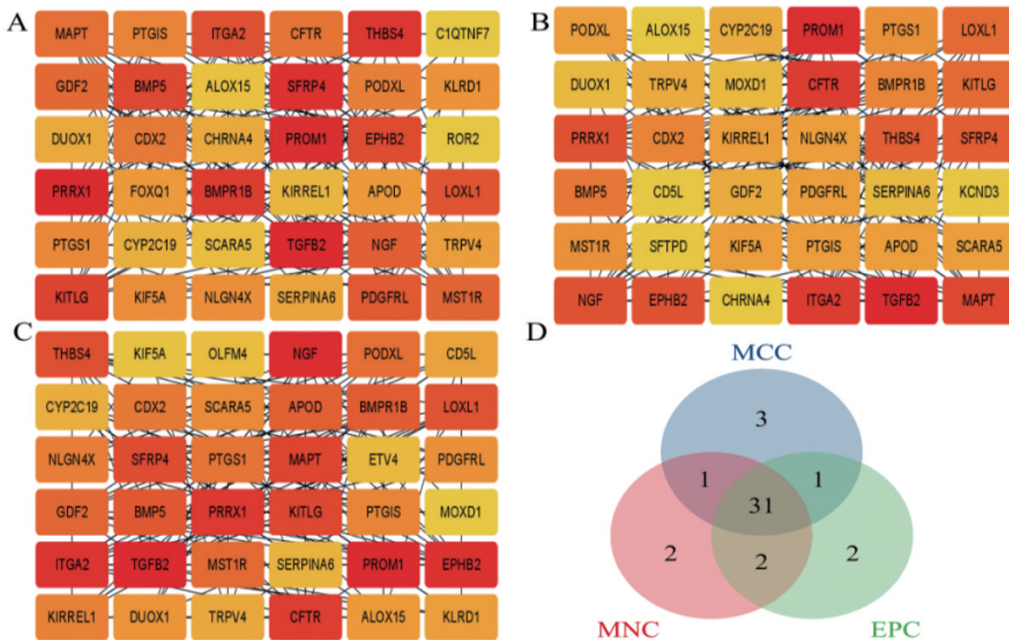
**2.4 差异表达基因的PPI网络分析** 使用STRING数据库对131个公共差异表达基因进行富集分析并在Cytoscape绘制了包括125个节点438条关联的PPI网络图(图5A),使用MCODE插件识别了7个包含36个差异表达基因的潜在模块(图5B~图5H)。  
**2.5 枢纽基因的鉴定与富集功能分析** 利用MCC、EPC和MNC算法筛选得分最高的前36个差异表达基因,通过韦恩重叠分析,确定了31个枢纽基因(图6),

并对它们进行了GO和KEGG富集功能分析。GO和KEGG分析结果显示,枢纽基因与炎症反应、代谢过程等生物学活动相关,涉及白细胞迁移、粒细胞趋化作用、脂肪酸代谢、类固醇代谢、肝细胞分化、顶端质膜、基底膜、生长因子活性、花生四烯酸代谢、细胞因子-细胞因子受体相互作用、转化生长因子 $\beta$ 信号通路等多个信号通路(图7)。



A: PPI网络图, 颜色深浅和圆圈大小代表得分高低; B~H: 显著基因聚类模块。

图5 PPI网络与显著基因模块



A~C: MCC、EPC和MNC算法筛选的前36个差异表达基因; D: 韦恩图显示了3种算法之间的重叠的31个差异表达基因。

图6 枢纽基因的筛选

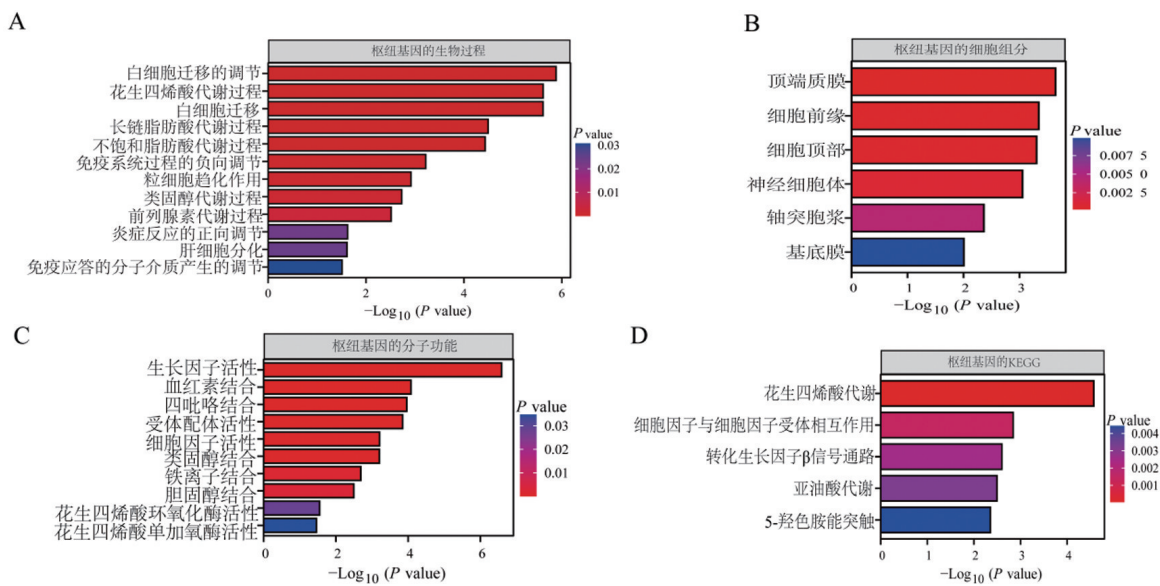


图7 枢纽基因的功能注释

### 3 讨论

广西作为HCC和肝吸虫感染的高发地区<sup>[17-18]</sup>,使用转录组测序技术,对来自该地区的HCC患者肿瘤组织以及邻近的非肿瘤组织进行深入分析,探索HCC合并肝吸虫患者的分子机制和免疫环境特征,有助于我们更好地理解这一特殊亚型HCC患者群体的病理机制,从而改进治疗策略,并有望提高这些患者的生存率。

本研究对差异表达基因和枢纽基因进行了功能富集分析,揭示了在HCC合并肝吸虫感染情况下,多种代谢途径和炎症通路显著富集。这些结果表明,癌细胞的代谢适应性和炎症响应的紊乱在HCC伴随肝吸虫感染的背景下对于肿瘤微环境的构建和疾病的进展有着显著影响。本研究发现,差异表达基因和枢纽基因在花生四烯酸代谢途径显著富集,这提示肝吸虫感染可能导致这一代谢途径的活性增强,从而为HCC发展提供额外的支持<sup>[19]</sup>。此外,本研究还发现枢纽基因参与转化生长因子 $\beta$ 信号通路,该通路的异常已被证实构建HCC的炎症微环境、促进纤维形成以及免疫调节中扮演着核心角色<sup>[20]</sup>。肝吸虫感染可能会加剧转化生长因子 $\beta$ 通路的失调,从而为HCC的发展创造慢性炎症环境,并促进HCC的免疫逃逸。这些发现与Qi等<sup>[21]</sup>的研究结果相一致,均强调了代谢和炎症途径在HCC合并肝吸虫感染的预后不良的潜在作用。

本研究还探索了HCC患者的肿瘤免疫微环境

浸润情况。与未感染肝吸虫的HCC患者相比,在HCC合并肝吸虫感染的患者中,免疫微环境特征包括静息的记忆 $CD4^+$ T细胞的浸润上调、 $CD8^+$ T细胞浸润不明显。这些变化可能由持续的抗原刺激和感染环境影响所致,对理解肿瘤微环境提供了新视角。通常,记忆T细胞在病原体清除后长期存活,再次遇到相同抗原时迅速响应<sup>[22]</sup>,记忆 $CD4^+$ T细胞积累反映了对感染和肿瘤的对抗。而 $CD8^+$ T细胞主要负责识别和杀死感染细胞和肿瘤细胞<sup>[23]</sup>,其浸润不明显意味着在HCC合并肝吸虫病患者中,抗肿瘤免疫反应可能受到了限制,这或许是这类患者预后不良的关键原因。

本研究的创新点包括:(1)首次通过对HCC合并肝吸虫病患者样本进行转录组测序分析,揭示了这一特殊亚组HCC患者的转录组学特征;(2)首次基于转录组学对HCC合并肝吸虫病患者的肿瘤免疫微环境进行探索,为针对这一患者群体的免疫治疗策略提供了重要理论依据。此外,本研究也存在一些局限性:(1)样本例数较少且仅采用了转录组技术,未结合其他分子生物学技术,如蛋白质组学或代谢组学分析,这限制了对转录下游调控机制的全面揭示;(2)结果缺乏实验验证,包括动物模型和细胞模型,未来需要更多的实验验证这些机制在肝吸虫感染相关HCC发展中的具体作用。

综上,本研究揭示了HCC合并肝吸虫病患者中代谢途径的重编程、炎症信号通路的异常激活以及免疫微环境的改变,这些因素共同构成了这类患者预后较差的潜在生物学基础。

## 参考文献:

- [1] NAGARAJU G P, DARIYA B, KASA P, et al. Epigenetics in hepatocellular carcinoma[J]. *Seminars in cancer biology*, 2022, 86(Pt 3): 622-632.
- [2] GOMEZ-QUIROZ L E, ROMAN S. Influence of genetic and environmental risk factors in the development of hepatocellular carcinoma in Mexico[J]. *Annals of hepatology*, 2022, 27(Suppl 1): 100649.
- [3] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma[J]. *The New England journal of medicine*, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [4] CRAIG A J, VON FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma[J]. *Nature reviews gastroenterology & hepatology*, 2020, 17(3): 139-152.
- [5] JIANG Z H, WAN X L, LV G L, et al. High prevalence of clonorchis sinensis infection in Guangxi, southern China [J]. *Tropical medicine and health*, 2021, 49(1): 6.
- [6] BOUVARD V, BAAN R, STRAIF K, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents[J]. *The lancet oncology*, 2009, 10(4): 321-322.
- [7] SHI Y, JIANG Z, YANG Y, et al. Clonorchis sinensis infection and co-infection with the hepatitis B virus are important factors associated with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma[J]. *Parasitology research*, 2017, 116(10): 2645-2649.
- [8] XIA J, JIANG S C, PENG H J. Association between liver fluke infection and hepatobiliary pathological changes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Plos one*, 2015, 10(7): e0132673.
- [9] LIN Q, TANG Z, QIN Y, et al. Clonorchis sinensis infection amplifies hepatocellular carcinoma stemness, predicting unfavorable prognosis[J]. *Plos neglected tropical diseases*, 2024, 18(1): e0011906.
- [10] LIU J Q, WANG J, HUANG X L, et al. A radiomics model based on magnetic resonance imaging to predict cyto-keratin 7/19 expression and liver fluke infection of hepatocellular carcinoma[J]. *Scientific reports*, 2023, 13(1): 17553.
- [11] FAGERBERG L, HALLSTRÖM B M, OKSVOLD P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics[J]. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2014, 13(2): 397-406.
- [12] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic acids research*, 2015, 43(7): e47.
- [13] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *Omics: a journal of integrative biology*, 2012, 16(5): 284-287.
- [14] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. *Nature methods*, 2015, 12(5): 453-457.
- [15] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. *Nucleic acids research*, 2015, 43: 447-452.
- [16] DONCHEVA N T, MORRIS J H, GORODKIN J, et al. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data[J]. *Journal of proteome research*, 2019, 18(2): 623-632.
- [17] YOUNOSSI Z M, WONG G, ANSTEE Q M, et al. The global burden of liver disease[J]. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 2023, 21(8): 1978-1991.
- [18] SUN J, XIN H, JIANG Z, et al. High endemicity of clonorchis sinensis infection in Binyang County, southern China[J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2020, 14(8): e0008540.
- [19] WANG K, SHI J H, GAO J, et al. Arachidonic acid metabolism CYP450 pathway is deregulated in hepatocellular carcinoma and associated with microvascular invasion[J]. *Cell biology international*, 2024, 48(1): 31-45.
- [20] CHEN J, GINGOLD J A, SU X. Immunomodulatory TGF- $\beta$  signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Trends in molecular medicine*, 2019, 25(11): 1010-1023.
- [21] QI Y, HU J, LIANG J, et al. Clonorchis sinensis infection contributes to hepatocellular carcinoma progression in rat [J]. *Parasitology research*, 2022, 121(12): 3403-3415.
- [22] LAL G, SHAILA M S, NAYAK R. Booster immunization of antigen primed mice with anti-idiotypic T cells generates antigen-specific memory T cell response[J]. *Vaccine*, 2006, 24(8): 1149-1158.
- [23] REINA-CAMPOS M, SCHARPING N E, GOLDRATH A W. CD8(+) T cell metabolism in infection and cancer[J]. *Nature reviews immunology*, 2021, 21(11): 718-738.

## 本文引用格式:

黄新磊, 黄在达, 彭凯, 等. 广西原发性肝细胞癌合并肝吸虫病患者的转录组测序分析[J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(5): 646-652. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.05.002

HUANG X L, HUANG Z D, PENG K, et al. Transcriptome sequencing analysis of primary hepatocellular carcinoma patients with hepatic trematodiasis in Guangxi[J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2024, 41(5): 646-652. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.05.002