

基于数据挖掘分析 SLC22A1 基因在肝细胞癌组织中的表达及其预后意义

王海明, 张虹, 王建华*

天津中医药大学附属北辰中医医院 天津市北辰区中医医院, 天津 300400

摘要: 目的 探讨阳离子转运蛋白 1 (SLC22A1) 基因在肝细胞癌中的表达情况和预后意义。方法 用 The Human Protein Atlas (HAP) 数据库分析 SLC22A1 蛋白在肝细胞癌中的表达情况。利用 Oncomine 和 GEPIA 数据库分析 SLC22A1 基因在肝细胞癌和肝正常组织中的表达水平。利用 GEPIA 和 Linked Omics 数据库分析 SLC22A1 基因与肝细胞癌患者临床相关性: 总生存期 (OS)、无瘤生存期 (DFS)、病理分期和种族。采用 Metascape 在线工具对 SLC22A1 相关基因进行功能和通路富集分析。结果 SLC22A1 蛋白和 mRNA 在肝细胞癌组织中显著低于正常组织, 且与肝细胞癌预后呈正相关 ($P < 0.001$)。肝细胞癌中 SLC22A1 基因表达水平与预后、病理分期存在显著差异性 ($P < 0.05$), 与种族无相关性。功能富集分析显示, SLC22A1 基因通过影响小分子分解代谢过程、对异源生物刺激的反应和有机酸生物合成过程等发挥作用。通路富集分析显示, SLC22A1 基因通过作用于过氧化物酶体、脂肪酸降解和精氨酸和脯氨酸代谢等通路起作用。结论 肝细胞癌组织中 SLC22A1 蛋白和 mRNA 表达水平均显著低于肝正常组织, 其表达情况与肝细胞癌预后存在显著关联, 提示 SLC22A1 可能成为评估肝细胞癌预后的指标和研发肝细胞癌相关靶向药物的候选靶点, 为肝细胞癌研究提供新研究思路。

关键词: 肝细胞癌; 离子转运蛋白 1 基因; 蛋白; 表达; 预后

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)07-1316-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.07.006

Analysis of SLC22A1 gene expression in hepatocellular carcinoma and its prognostic significance based on data excavation

WANG Hai-ming, ZHANG Hong, WANG Jian-hua

Beichen Chinese Medicine Hospital Affiliated to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300400, China

Abstract: Objective To investigate the expression of cation transporter 1 (SLC22A1) gene and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The Human Protein Atlas (HAP) database was used to analyze the expression of SLC22A1 protein in hepatocellular carcinoma. The online tools Oncomine and GEPIA were used to evaluate the expression of SLC22A1 gene in hepatocellular carcinoma. GEPIA and Linked Omics databases were also used to analyze the correlation between SLC22A1 and clinical indicators overall survival (OS), tumor-free survival (DFS), pathological stage, and race. Metascape online tools were used to perform functional and pathway enrichment analysis of SLC22A1-related genes. **Results** SLC22A1 protein and mRNA were highly expressed in normal tissues and was positively correlated with prognosis ($P < 0.001$). The expression levels of SLC22A1 gene in HCC were significantly different from prognosis and pathological stage ($P < 0.05$), and it was not related to race. Functional enrichment analysis showed that the SLC22A1 gene played a role by affecting small molecule catabolic processes, responses to heterologous biological stimuli, and organic acid biosynthesis processes. Pathway enrichment analysis showed that the SLC22A1 gene works through pathways such as peroxisomes, fatty acid degradation, and arginine and proline metabolism. **Conclusion** SLC22A1 gene and protein is highly expressed in normal tissues, and its expression level is significantly correlated with prognosis, which might be an important therapeutic target and biomarker of HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; cation transporter 1 gene; protein; expression; prognostic

收稿日期: 2020-02-19

作者简介: 王海明 (1988—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为肿瘤免疫调控。E-mail: whmishere@126.com

*通信作者 王建华 (1962—), 男, 主任医师, 主要研究方向为肝胆胰腺恶性肿瘤免疫机制。E-mail: 893697003@qq.com

原发性肝癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一，其中肝细胞癌占原发性肝癌的80%以上，居全球癌症相关死亡原因第3位^[1]。我国肝细胞癌每年新发病例数、死亡数分别占全球54.6%、53.9%^[2]。肝细胞癌具有发病隐匿、预后很差、恶性程度高等生物学特征，5年生存率仅为12.1%^[3]。因此进一步加深对肝细胞癌发病机制的研究十分重要。肝细胞癌具有早期诊断率低、预后不理想、恶性程度高等生物学特征。深入探讨肝细胞癌的发生、发展机制，寻找新的治疗靶点和预测预后的生物标志物对肝细胞癌的研究有着重要意义。阳离子转运蛋白1 (SLC22A1) 是含有12个跨膜结构域的血浆整合膜蛋白，参与人体内众多内源性小有机阳离子、多种药物代谢和内环境毒素等调控^[4]。SLC22A1蛋白编码基因是位于6号染色体上3种相似的阳离子转运蛋白基因之一^[5]。近年来研究表明，SLC22A1在多种肿瘤中呈低表达状态，可能发挥着抑制肿瘤进展的作用^[6-8]，笔者预测SLC22A1在肝细胞癌组织中亦呈低表达状态，并且发挥着抑制肿瘤发生、发展的作用。因此本研究通过对Oncomine和TCGA数据库中资源进行挖掘，分析SLC22A1在肝细胞癌中的表达情况及其对预后影响，为寻找肝细胞癌的治疗靶点、早期生物标记物提供思路。

1 资料和方法

1.1 SLC22A1 蛋白差异表达分析方法

HAP (The Human Protein Atlas) 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>) 是利用免疫组化技术检测人类蛋白质在组织和细胞中分布情况的在线网站。包括48种人类正常组织、20种肿瘤组织、47个细胞系和12种血液细胞。本研究利用此网站分析SLC22A1蛋白在肝细胞癌组织、肝正常组织中的表达情况。

1.2 Oncomine 数据库挖掘分析方法

Oncomine 数据库 (<https://www.oncomine.org/>) 是目前世界上最大的肿瘤相关基因芯片数据库，整合了癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 和基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 资源，可用于寻找潜在治疗靶点和生物标志物。通过该数据库分析SLC22A1基因在肝细胞癌组织、正常肝组织的表达差异。设置检索条件：(1) Gene: SLC22A1。(2) Analysis Type: Cancer vs. Normal Analysis。(3) Cancer Type: Hepatocellular Carcinoma。(4) Data Type: mRNA。

(5) 阈值设定: $P < 1E-4$, Fold Change: > 2 , Gene Top: 10%。其余条件为数据库默认。检索完成，筛选出SLC22A1基因在肝细胞癌中的数据集进行整理分析，并以柱状图显示结果。

1.3 TCGA 数据库挖掘分析方法

利用TCGA可视化在线数据库GEPiA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 对TCGA数据库中SLC22A1基因与肝癌的信息进行交互分析^[9]。主要包括肿瘤组织、正常组织差异表达分析和患者生存分析。根据模块分别设置检索条件：(1) Expression DIY 模块: Box Plot 下选择SLC22A1和Match TCGA Normal data。(2) Survival 模块: Survival Plots 下选择SLC22A1、Overall Survival(OS)或Disease Free Survival (DFS)。利用Linked Omics 在线网站 (<http://www.linkedomics.org/>) 分析SLC22A1基因与肝癌病理分期及组织学分型之间的相关性。

1.4 肝细胞癌组织中与 SLC22A1 基因相关性最高的 100 个基因及富集分析

利用Linked Omics 在线网站分析肝细胞癌组织中与SLC22A1基因相关系数最高的100个基因，包括上调和下调基因各50个。利用Metascape 在线分析软件 (<http://metascape.org/>) 对上述100个基因进行功能和通路富集分析。

1.5 统计学分析

SLC22A1 基因表达与肝癌患者预后关系采用Kaplan-Meier生存分析与log-rank检验；与肝癌病理分期、组织学分型及种族之间分析采用Kruskal-Wallis分析。肝癌组织中SLC22A1基因相关性分析采用Spearman相关分析。

2 结果

2.1 SLC22A1 蛋白在肝细胞癌组织和正常组织中表达情况

采用HAP在线网站分析SLC22A1在肝癌和肝正常组织蛋白层面的表达情况。结果表明SLC22A1蛋白在肝正常组织中呈高表达，且定位在细胞质和胞膜上；在肝癌组织中呈低表达状态，见图1。

2.2 SLC22A1 基因在肝细胞癌组织和正常组织中表达情况

通过Oncomine数据库检索SLC22A1 mRNA在肝癌组织和肝正常组织中的表达情况。共发现4项有关SLC22A1 mRNA在“肝细胞癌组织 vs 肝正常组织”中表达的研究。Meta分析结果得到: SLC22A1 mRNA在肝细胞癌组织中较肝正常组织呈显著低

表达 ($P < 0.001$), 见图 2。与肝细胞癌组织相比, SLC22A1 mRNA 在肝正常组织中的表达水平均显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 见图 3。

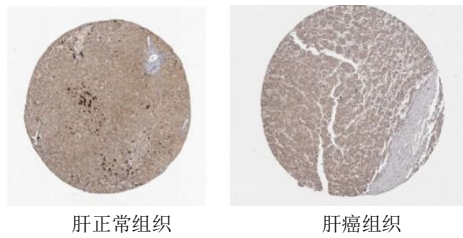


图 1 SLC22A1 蛋白在肝正常组织、肝癌组织中的表达
Fig. 1 Expression of SLC22A1 protein in normal liver tissues and liver cancer tissues

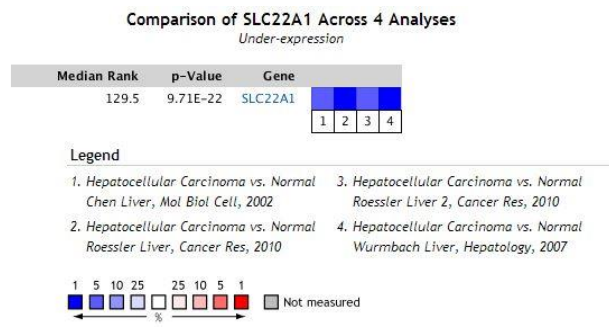


图 2 Oncomine 数据库 Meta 分析结果
Fig. 2 Results of Meta-analysis in Oncomine database

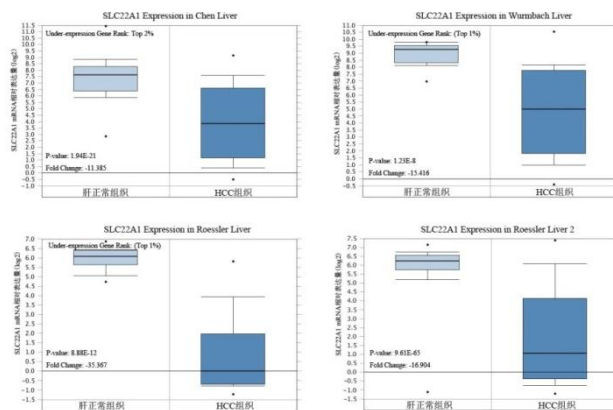


图 3 Oncomine 数据库中 SLC22A1 在不同数据集的表达
Fig. 3 Expression of SLC22A1 in different data sets in Oncomine database

2.3 GEPIA 数据库验证结果

为明确 SLC22A1 基因在肝细胞癌组织中确实呈低表达状态, 使用 GEPIA 工具对来自 TCGA 数据库的 419 个标本进行分析, 其中正常组织 50 例, 肝癌组织 369 例, 见图 4。SLC22A1 基因在肝癌组织中表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$), 与 Oncomine 数据库分析结果一致。

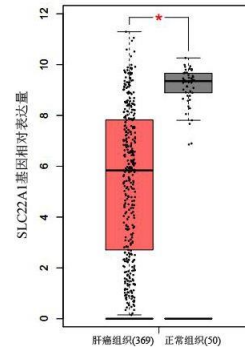


图 4 TCGA 数据库中 SLC22A1 基因在肝正常组织和肿瘤组织中的表达情况
Fig. 4 Expression of SLC22A1 gene in normal liver and tumor tissues in TCGA database

2.4 SLC22A1 基因表达水平与肝细胞癌患者临床相关性分析

采用 GEPIA 在线网站分析 TCGA 数据库中 364 例肝癌患者数据, 根据截断值为 50% 将 SLC22A1 基因表达水平分为高表达和低表达组。分析得出: SLC22A1 基因表达情况与患者总生存期 (OS) 和无瘤生存期 (DFS) 均存在显著影响, SLC22A1 基因表达水平高组较表达水平低组的预后明显好, 具有统计学意义 ($P < 0.01$)。利用 Linked Omics 在线网站分析得出: SLC22A1 基因表达水平与肝癌病理分期亦均存在显著的相关性, 具有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 与种族之间无明显相关性, 见图 5。

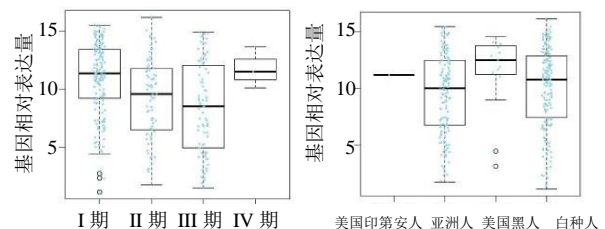
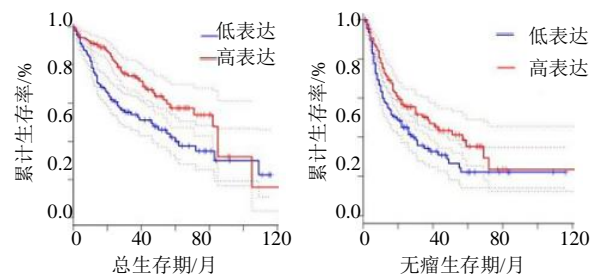


图 5 SLC22A1 基因表达水平与肝癌患者临床相关性分析
Fig. 5 SLC22A1 gene expression level and clinical correlation analysis of HCC patients

2.5 肝细胞癌组织中 SLC22A1 相关基因及其富集分析

使用 Linked Omics 在线工具分析肝细胞癌组织中 SLC22A1 相关基因, 结果采用热图形式表示, 见图 6。利用在线分析工具 Metascape 对相关性最高的 100 个基因进行基因本体 (GO) 功能和通路 (KEGG) 富集分析^[10]。功能富集分析显示, SLC22A1 基因通过影响小分子分解代谢过程、对异源生物刺激的反应和有机酸生物合成过程等发挥作用。通路富集分析显示, SLC22A1 基因通过作用于过氧化物

酶体、脂肪酸降解和精氨酸和脯氨酸代谢等通路起作用, 见表 1。

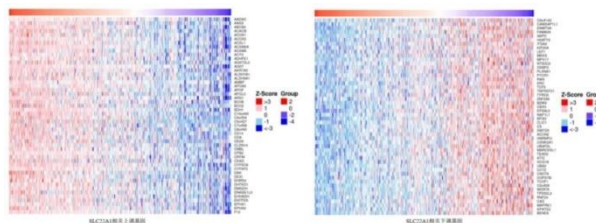


图 6 SLC22A1 相关性最高的 100 个基因

Fig. 6 The 100 genes with the highest correlation in SLC22A1

表 1 SLC22A1 相关性最高的 100 个基因富集分析

Table 1 Enrichment analysis of 100 genes with the highest correlation in SLC22A1

GO	类别	描述	计数	百分数	lg10(P)
GO:0009410	生物过程	对异源生物刺激的反应	15	15	-11.92
GO:0044282	生物过程	小分子分解代谢过程	17	17	-11.36
GO:0016053	生物过程	有机酸生物合成过程	15	15	-9.08
hsa04146	KEGG 通路	过氧化物酶体	8	8	-8.70
GO:0006081	生物过程	细胞醛代谢过程	7	7	-7.62
hsa00071	KEGG 通路	脂肪酸降解	5	5	-5.98
GO:0019693	生物过程	核糖磷酸代谢过程	12	12	-5.31
hsa00650	KEGG 通路	丁酸酯代谢	4	4	-5.28
GO:1901568	生物过程	脂肪酸衍生物代谢过程	7	7	-5.17
GO:0019216	生物过程	脂质代谢过程的调节	10	10	-5.10
GO:0008202	生物过程	类固醇代谢过程	9	9	-5.01
GO:0014075	生物过程	对胺的反应	4	4	-4.40
hsa00330	KEGG 通路	精氨酸和脯氨酸代谢	4	4	-4.26
GO:1901607	生物过程	α-氨基酸的生物合成过程	4	4	-3.76
GO:0031111	生物过程	微管聚合或解聚的负调控	3	3	-3.32
GO:0051259	生物过程	蛋白质复合物寡聚化	9	9	-3.23
GO:0019439	生物过程	芳族化合物分解代谢过程	10	10	-3.11
R-HSA-15869	反应组基因集	核苷酸代谢	4	4	-3.08

3 讨论

肝细胞癌是肝脏最常见的原发恶性肿瘤, 占 85%~90%, 也是全球癌症死亡的第 3 大原因^[1]。肝细胞癌的发生发展是一种复杂的、多步骤、多阶段的分子生物学过程, 具有发病隐匿、预后差、恶性程度高和转移潜力大等生物学特征^[11]。目前临床上关于肝细胞癌的治疗靶点仍较少, 因此亟待深度预测和挖掘更多关于肝细胞癌治疗的新靶点和预测预后的新生物标志物。SLC22A1 是溶质转运体家族重要成员, 主要在肝细胞膜上表达, 在机体内转

运各种药物和内源性代谢产物等化合物^[12]。Nishimura 等^[11]研究发现, SLC22A1 在肝脏组织中表达水平较肿瘤组织高。Martinez-Becerra 等^[13]通过对肝脏原发性恶性肿瘤患者研究发现, SLC22A1 在肿瘤组织中均呈低表达状态, 间接表明 SLC22A1 可能是抑癌基因。

SLC22A1 在多种肿瘤中呈异常表达, 但其机体机制目前尚不清楚。Hoffmann 等^[14]研究发现, SLC22A1 在前列腺癌患者中表达水平显著降低, 并且可能与 rs4646284 插入缺失相关。Liu 等^[15]通过

微阵列分析发现, SLC22A1 在肝腺瘤中表达水平较正常组织低, 并且与 DNA 甲基化水平呈负相关。Hyrsova 等^[16]通过体外实验证实, SLC22A1 在 HepaRG 细胞中通过 HNF4 α 和 USF 转录因子途径调控呈相对高表达状态。de Lima 等^[17]通过对 118 例慢性粒细胞白血病患者研究发现, SLC22A1 在甲磺酸伊马替尼应答者中较非应答者显著升高。此外, SLC22A1 在宫颈癌、黑色素瘤、结直肠癌等肿瘤中呈低表达, 并且与疾病的进展可能相关。因此, SLC22A1 可能是恶性肿瘤将来药物治疗的一个潜在靶点。然而, 有少数报道显示, SLC22A1 在乳腺癌、肾癌等恶性肿瘤中呈高表达状态, 研究结果与多数研究相悖, 这有待进一步研究和挖掘。

目前有研究报道, SLC22A1 低表达与肿瘤预后不良相关, 但其在肝细胞癌中的表达情况和预后的相关性报道较少见。因此进一步探讨 SLC22A1 在肝细胞癌中的表达情况和临床相关性十分必要。Oncomine 数据库和 TCGA 数据库是目前被广泛使用的肿瘤学数据库, 并得到了医学科研工作者的认同。本实验通过对 Oncomine 和 TCGA 数据库数据深入挖掘, 发现 SLC22A1 基因在肝细胞癌组织中的表达水平低于肝正常组织, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 通过 GEPIA 数据库验证结果与其一致。同时实验通过 HAP 工具分析肝细胞癌患者组织中 SLC22A1 蛋白表达情况并得出: 肝正常组织中蛋白水平显著高于肿瘤组织。进一步对 SLC22A1 进行功能和通路富集分析显示: 主要通过影响小分子分解代谢过程和作用于过氧化物酶体信号通路发挥作用。综上实验间接得出, SLC22A1 在肝细胞癌的发生发展过程中可能发挥着负向调控作用, 主要通过影响小分子代谢过程和过氧化物酶体信号通路。然而, 本研究的局限性在于未通过临床和基础实验进一步验证以上结果, 有待于在今后的实验中探究 SLC22A1 在肝细胞癌中的生物学功能和机制。

综上所述, 本研究通过深入挖掘公共数据库获得肝细胞癌相关分子生物学信息, 并进行相关性分析。结果表明, SLC22A1 在肝细胞癌中呈低表达状态, 可能发挥着抑制肝细胞癌发生发展的作用。生存分析发现, SLC22A1 表达水平与患者临床预后相关。本研究将为寻找肝细胞癌治疗的新靶点和新预测预后的靶标提供一定的理论依据和临床指导。

参考文献

[1] Lin Y, Liang R, Qiu Y, *et al.* Expression and gene

regulation network of RBM8A in hepatocellular carcinoma based on data mining [J]. *Aging*, 2019, 11(2): 423-447.

- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Zeng H, Chen W, Zheng R, *et al.* Changing cancer survival in China during 2003–15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): e555-e567.
- [4] Herraiz E, Lozano E, Macias R I, *et al.* Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib [J]. *Hepatology*, 2013, 58(3): 1065-1073.
- [5] Makhtar SM, Husin A, Baba AA, *et al.* Genetic variations in influx transporter gene *SLC22A1* are associated with clinical responses to imatinib mesylate among Malaysian chronic myeloid leukaemia patients [J]. *J Genet*, 2018, 97(4): 835-842.
- [6] Landini I, Lapucci A, Pratesi A, *et al.* Selection and characterization of a human ovarian cancer cell line resistant to auranofin [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 96062-96078.
- [7] Roessler S, Jia H L, Budhu A, *et al.* A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10202-10212.
- [8] Wang X, Liao X, Yang C, *et al.* Identification of prognostic biomarkers for patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1586-1602.
- [9] Tang Z, Li C, Kang B, *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-W102.
- [10] Zhou Y, Zhou B, Pache L, *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [11] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2017, 20(6): 452-477.
- [12] 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]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(2): 397-406.

- [13] Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero M R, *et al.* No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(6): 1693-1704.
- [14] Hoffmann T J, Van Den Eeden S K, Sakoda LC, *et al.* A large multiethnic genome-wide association study of prostate cancer identifies novel risk variants and substantial ethnic differences [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(8): 878-891.
- [15] Liu D, Liu P, Cao L, *et al.* Screening the key genes of hepatocellular adenoma via microarray analysis of DNA expression and methylation profiles [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 3975-3980.
- [16] Hyrsova L, Smutny T, Carazo A, *et al.* The pregnane X receptor down-regulates organic cation transporter 1 (SLC22A1) in human hepatocytes by competing for ("squenching") SRC-1 coactivator [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(10): 1703-1715.
- [17] de Lima L T, Vivona D, Bueno C T, *et al.* Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3): 851.