

本文引文格式:任佳怡,陈赞豪,李杨,等.基于外泌体 exoRBase2.0 数据库构建肝细胞癌相关的 ceRNA 网络并进行相关分析[J].右江民族医学院学报,2024,46(3):328-335.

【论著与临床报道】

## 基于外泌体 exoRBase2.0 数据库构建肝细胞癌 相关的 ceRNA 网络并进行相关分析

任佳怡<sup>1</sup>,陈赞豪<sup>1</sup>,李杨<sup>1</sup>,史芸苓<sup>1</sup>,凌宇婧<sup>1</sup>,周鹭<sup>2</sup>

(1. 南通大学杏林学院,江苏 南通 226001;

2. 南通大学附属医院,江苏 南通 226001)

**摘要:**目的 基于生物大数据构建肝细胞癌(HCC)患者血液外泌体竞争性内源 RNA(ceRNA)调控网络,并对 HCC 发病机制进行探究。方法 从 exoRBase 2.0 数据库中下载 HCC 患者和正常人群血液外泌体基因测序数据,并应用 R 语言进行差异分析。通过 TargetScan、miRanda、starBase 和 miRcode 数据库预测与 mRNA、lncRNA、circRNA 结合的 miRNA 并对其差异表达分析,将结果导入 Cytoscape 软件,构建 ceRNA 网络,进一步对其进行 GO 和 KEGG 富集分析,并使用 CytoHubba 插件筛选核心基因。将核心基因导入 UALCAN 和 Kaplan-Meier Plotter 网站进行基因表达量和生存分析;并通过 TIMER2.0 网站进行免疫浸润分析。结果 GO 分析显示富集在骨髓细胞分化和横纹肌细胞分化等功能,KEGG 分析显示富集在催产素信号通路和 cGMP-PKG 信号通路,生存分析显示 CELF2 高表达组 HCC 患者的生存率显著高于低表达组;免疫浸润分析显示 CELF2 的高表达与 HCC 患者的肿瘤纯度显著呈负相关,与多种免疫细胞显著呈正相关。结论 本研究成功构建了 HCC 患者血液外泌体 ceRNA 调控网络,从分子层面阐述了 HCC 的发生、转移和侵袭机制,为 HCC 的临床诊疗提供理论支持。

**关键词:**肝细胞癌;外泌体;竞争性内源 RNA;生物信息学

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2024)03-0328-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.03.008

### Construction and analysis of hepatocellular carcinoma competing endogenous RNA network based on exosomal exoRBase2.0 database

REN Jiayi<sup>1</sup>, CHEN Zanhao<sup>1</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, SHI Yunqin<sup>1</sup>, LING Yujing<sup>1</sup>, ZHOU Lu<sup>2</sup>

(1. Xinglin College, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China;

2. the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China)

**Abstract:** **Objective** To construct the competitive endogenous RNA (ceRNA) regulatory network of blood exosomes in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) based on biological big data, and to explore the pathogenesis of HCC. **Methods** The gene sequencing data of blood exosomes from HCC patients and normal individuals were downloaded from the exoRBase 2.0 database, and differential analysis was performed using R language. TargetScan, miRanda starBase databases and miRcode were utilized to predict miRNAs binding to mRNA, lncRNA and circRNA, and analyze their differential expression. Subsequently, the results were imported into Cytoscape software to construct the ceRNA network. Furthermore, GO and KEGG enrich-

基金项目:江苏省大学生创新创业训练计划资助项目(202313993062xl)

第一作者:任佳怡,大学生,E-mail:1356096567@qq.com

通讯作者:周鹭,博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:临床医学,E-mail:xueyehoulu2007@sina.com

ment analyses were conducted, and the core genes were screened by CytoHubba plugin. The core genes were then imported into the UALCAN and Kaplan-Meier Plotter websites for gene expression and survival analysis. Additionally, TIMER2.0 website was used to analyze the immune infiltration. **Results** The GO analysis showed enrichment in bone marrow cell differentiation and striated muscle cell differentiation. The KEGG analysis demonstrated enrichment in the oxytocin signaling pathway and the cGMP-PKG signaling pathway. Survival analysis indicated that HCC patients with high CELF2 expression had significantly higher survival rates compared to those with low CELF2 expression. Immune infiltration analysis showed that high CELF2 expression was significantly negatively correlated with tumor purity and positively correlated with various immune cells in HCC patients. **Conclusion** This study successfully constructed the ceRNA regulatory network of blood exosomes from HCC patients, elucidating the molecular mechanisms underlying the occurrence, metastasis and invasion of HCC. These findings provide theoretical support for the clinical diagnosis and treatment of HCC.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; exosome; competitive endogenous RNA; bioinformatics

肝癌是一种常见的原发性肿瘤,其发病率和死亡率在全球恶性肿瘤中分别位居第 6 位和第 4 位<sup>[1]</sup>,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌中最普遍发生的,约占肝癌发病例数的 75%~85%<sup>[2]</sup>。尽管近几年 HCC 的临床诊断和治疗取得了很大进展,但由于 HCC 具有发病隐匿和早期症状不典型等特点,约 39.0%~53.6%的患者确诊时已处于中晚期,预后极差,中位生存期仅为 6 个月<sup>[3]</sup>。因而,研究 HCC 的发展、侵袭和转移机制,寻找可用于临床早期诊断和有效治疗的高特异性和高敏感性的 HCC 基因靶点成为改善 HCC 患者生存预后的重要目标。

外泌体可由多种活性细胞分泌,是一种直径约 40~100 nm 的磷脂双分子层圆盘状囊泡,生物学相对稳定,且广泛分布于唾液、血液、尿液和腹腔液等各种体液中。外泌体中所富含的长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)、微小 RNA(microRNA, miRNA)、环状 RNA(circularRNA, circRNA)以及一些生物活性物质,通过改变肿瘤微环境中受体细胞的生物化学组分、信号传导途径和基因表达机制,进一步影响肿瘤增殖、侵袭、转移、免疫逃逸等进展,从而发挥重要作用。2011 年, SALMENA L 等<sup>[4]</sup>首次提出竞争性内源性 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)假说,指出在 ceRNA 网络中,信使 RNA(messenger RNA, mRNA)、lncRNA、circRNA 和假基因等转录物之间存在调控网络,可以通过竞争 miRNA 反应元件来对基因表达进行调控,从而调节肿瘤细胞的一系列重要生理功能,如增殖、生长、分化和凋亡等。现有研究表明, ceRNA 网络可能参与 HCC 的发展,例如 LI B 等<sup>[5]</sup>的研究证实 lncRNA FAL1 竞争性结合 miR-1236 使 HCC 细胞增殖和迁移进一步发生, HU W 等<sup>[6]</sup>的研究也发现 LINC00511 作为 ceRNA 通过调节 miR-195/EYA1 轴促进细胞恶性行为并与 HCC

患者的预后相关,然而 HCC 患者血液外泌体中 ceRNA 网络的调节机制尚不清楚。因此,本研究通过分析 exoRBase 2.0 数据库中 HCC 患者和正常人群的血液外泌体测序数据,获得相关 RNA 的差异表达谱,构建可视化的 HCC ceRNA 网络,研究 HCC 病理生理的分子发生机制,希望能够对 HCC 的临床诊断和治疗给予理论指导。

## 1 材料和方法

1.1 材料 在 exoRBase 2.0 数据库(<http://www.exorbase.org/>)中下载(截至 2023 年 7 月 28 日)HCC 患者以及正常人群的外周血液外泌体基因表达谱数据(包括 mRNAs、lncRNAs 和 circRNAs),共下载 230 组样本,其中包含 118 组正常样本和 112 组 HCC 患者样本。同时,下载 circRNA 的基因注释文件,并对其进行注释。

## 1.2 方法

1.2.1 差异表达 RNAs 筛选 使用 R 语言中的“limma”和“sva”包,对获取的 mRNAs、lncRNAs 和 circRNAs 进行筛选,整合出相应的表达谱矩阵,根据设定的筛选条件( $|\log_2 FC| > 0$ ,  $P < 0.05$ ),筛选出差异表达的 mRNAs、lncRNAs 和 circRNAs。同时,使用 R 语言中的“heatmap”包,对显著差异表达的 mRNAs、lncRNAs 和 circRNAs 分别绘制热图,直观展示正常组织和 HCC 组织中的差异表达情况。

1.2.2 以 miRNAs 为共同靶向的 ceRNA 网络构建 进入 ENCORI 网站(<https://rnasysu.com/encori/>),联合使用 TargetScan 和 miRanda 数据库预测与上述差异表达 mRNAs 结合的 miRNAs;使用 starBase 数据库预测与上述差异表达 circRNAs 结合的 miRNAs。另外使用 miRcode 数据库(<http://www.mircode.org/>)预测与上述差异表达 lncRNAs 结合的 miRNAs。将最终得到的 mRNA-miRNA、circRNA-

miRNA、lncRNA-miRNA 预测配对结果两两取交集,整合生成以 miRNA 为共同靶向的 ceRNA 网络信息,导入 Cytoscape 软件(版本 3.9.1)构建以 miRNAs 为共同靶向的可视化 ceRNA 网络。

1.2.3 ceRNA 网络中差异表达 mRNAs 的 GO 和 KEGG 富集分析 为探索 ceRNA 网络中差异表达的 mRNAs 具有潜在功能和参与潜在通路,对其进行 GO 和 KEGG 富集分析。使用 R 语言中的“org. Hs. eg. db”包将差异表达的 mRNAs 从 Gene Symbol 转换为 entrez ID,然后使用“clusterProfiler”、“org. Hs. eg. db”、“enrichplot”和“ggplot2”包对差异表达 mRNAs 进行 GO 功能富集分析并对分析结果进行可视化。同时,将差异表达的 mRNAs 导入 KOBAS (<http://bioinfo.org/kobas>)网站进行 KEGG 通路富集分析并对结果进行可视化。

1.2.4 关键 Hub 基因的筛选 将获得的 ceRNA 网络信息导入 Cytoscape 可视化分析软件,使用其中的插件 CytoHubba,选择 MCC(maximum cross correlation)算法计算得出蛋白质节点之间的连接度分值,选择得分排名前 10 的基因为 Hub 基因。

1.2.5 核心基因表达量和生存分析 采用 UALCAN 数据库 (<https://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>)和 Kaplan-Meier Plotter 生存分析网站 (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=background>)对正常样本和 HCC 患者样本基因测序数据进行

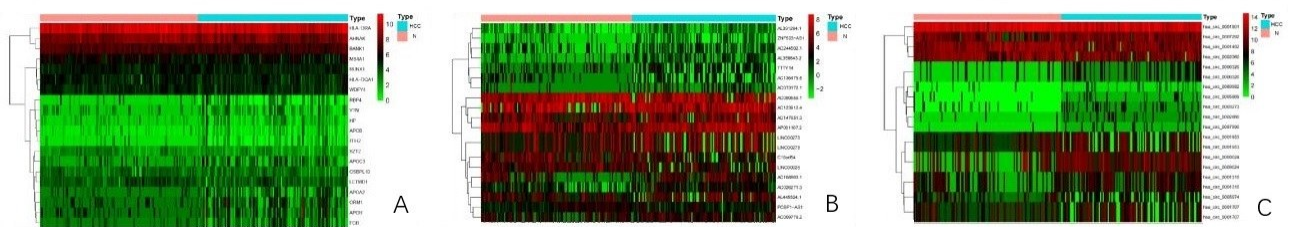
分析,根据其基因水平表达量和生存差异情况进一步筛选出关键基因( $P < 0.05$ )。

1.2.6 免疫细胞浸润分析 使用 TIMER2.0 数据库 (<http://timer.cistrome.org/>)进行免疫细胞浸润分析,验证核心基因与 HCC 发生发展的相关性,探寻对 HCC 治疗的潜在价值。通过使用 Immune 中的 gene 模块,评估差异基因表达与 HCC 肿瘤微环境中 6 种免疫细胞(包括 CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞)浸润程度的相关性。

1.2.7 统计学方法 使用编程语言 Perl(版本 strawberry-perl-5.30)进行数据整理;使用 R 语言(版本 R-4.3.1)进行数据分析和绘图,其中部分 R 包来源于 bioconductor 网站 (<https://bioconductor.org/>)。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计学检验采用 *t* 检验或方差分析。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 数据下载及差异表达 从 exoRBase 2.0 数据库中下载血液外泌体测序数据(其中包括 112 个 HCC 患者样本和 118 个正常样本),使用 R 语言分别对 mRNA、lncRNA 和 circRNA 表达谱矩阵进行差异分析,筛选出差异 mRNA 134 个,差异 lncRNA 19 个,差异 circRNA 15 个,再分别选取显著差异表达的前 10 个基因绘制热图,见图 1A、图 1B 和图 1C。



注:A. mRNA 差异性表达热图;B. lncRNA 差异性表达热图;C. circRNA 差异性表达热图。

图 1 mRNA、lncRNA、circRNA 差异性表达热图

2.2 以 miRNAs 为共同靶向的 ceRNA 网络构建 联合使用 TargetScan 和 miRanda 数据库,输入 134 个差异表达的 mRNA,共预测出 620 对 mRNA-miRNA;使用 starBase 数据库,输入 15 个差异表达的 circRNA,共预测出 178 对 circRNA-miRNA;使用 miRcode 数据库,输入 19 个差异表达的 lncRNA,共预测出 500 对 lncRNA-miRNA。将上述数据两两取交集,整合生成以 miRNA 为共同靶向的 ceRNA 网络信息,导入 Cytoscape 软件生成可视化的 ceRNA 网络,共有 miRNA 节点 83 个、mRNA 节点 49 个、circRNA 节点 8 个和 lncRNA 节点 4 个,见图 2。

2.3 ceRNA 网络中差异表达 mRNAs 的 GO 和 KEGG 富集分析 GO 富集分析结果显示:差异表达的 mRNAs 生物学过程(biological process, BP)主要富集在骨髓细胞分化(myeloid cell differentiation)、横纹肌细胞分化(striated muscle cell differentiation)、器官生长的调节(regulation of organ growth)、器官生长(organ growth)、调节心肌组织生长(regulation of cardiac muscle tissue growth)、调节心脏生长(regulation of heart growth)、心肌组织生长(cardiac muscle tissue growth)、心脏生长(heart growth)、血小板形成(platelet formation)、血小板形态发生(platelet mor-

phogenesis)、心肌肥大的负调节(negative regulation of cardiac muscle hypertrophy)、肌肉肥大的负调节(negative regulation of muscle hypertrophy)、器官生长的负调节(negative regulation of organ growth);差

异表达的 mRNAs 细胞组成(cellular component, CC)主要富集在伪足小体(podosome);差异表达的 mRNAs 分子功能(molecular function, MF)主要富集在胰岛素受体结合(insulin receptor binding),见图 3。

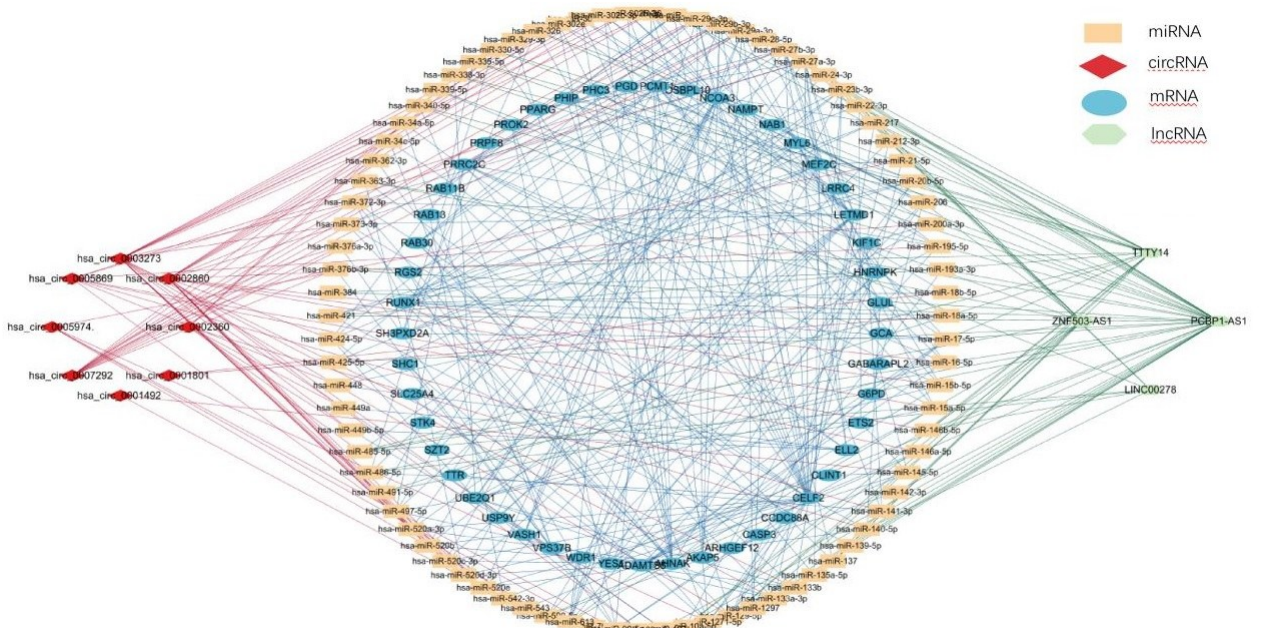


图 2 差异表达基因的 ceRNA 网络



注:着色表示 P 值,红色越低,蓝色越高。

点大小表示基因数目大小。  
图 3 GO 富集分析的气泡图

KEGG 富集分析结果显示:差异表达的 mRNAs 主要富集通路在催产素信号通路(oxytocin signaling pathway)和 cGMP-PKG 信号通路(cGMP-PKG signaling pathway),见图 4。同时进一步分析数据,得到与 HCC 的发展密切相关的关键词有 SHC1 和 CASP3,分别主要富集在慢性骨髓性白血病(chronic myeloid leukemia)和亨廷顿病(huntington disease),见表 1。

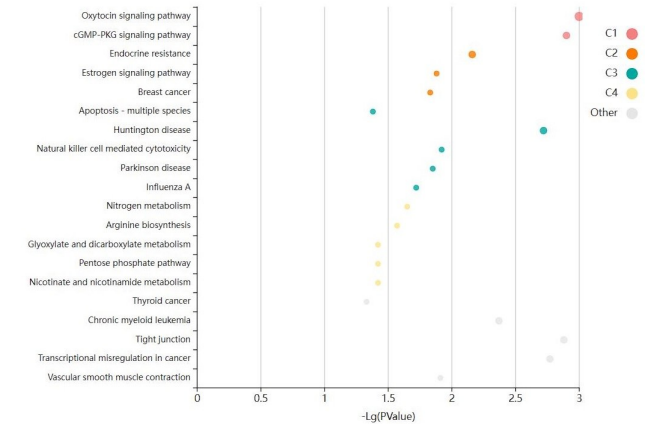
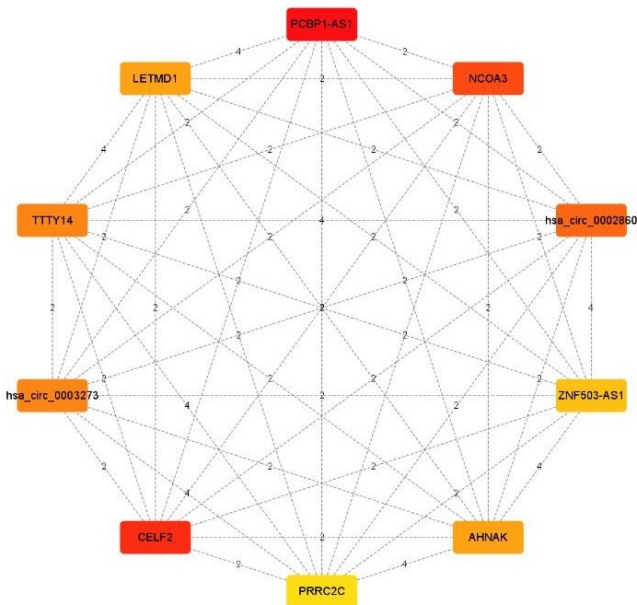


图 4 KEGG 富集分析的气泡图

表 1 KEGG 富集分析的结果

Term	Database	ID	P-Value	Input
Oxytocin signaling pathway	KEGG PATHWAY	hsa04921	0.000989123	MEF2C MYL6 RGS2
cGMP-PKG signaling pathway	KEGG PATHWAY	hsa04022	0.001266515	MEF2C RGS2 SLC25A4
Tight junction	KEGG PATHWAY	hsa04530	0.001331678	MYL6 RAB13 RUNX1
Transcriptional misregulation in cancer	KEGG PATHWAY	hsa05202	0.00171486	MEF2C PPARG RUNX1
Huntington disease	KEGG PATHWAY	hsa05016	0.001901995	PPARG CASP3 SLC25A4
Chronic myeloid leukemia	KEGG PATHWAY	hsa05220	0.004306471	RUNX1 SHC1
Endocrine resistance	KEGG PATHWAY	hsa01522	0.006975943	NCOA3 SHC1
Natural killer cell mediated cytotoxicity	KEGG PATHWAY	hsa04650	0.012052208	SHC1 CASP3
Vascular smooth muscle contraction	KEGG PATHWAY	hsa04270	0.012225166	MYL6 ARHGEF12
Estrogen signaling pathway	KEGG PATHWAY	hsa04915	0.013285727	NCOA3 SHC1
Parkinson disease	KEGG PATHWAY	hsa05012	0.014014288	CASP3 SLC25A4
Breast cancer	KEGG PATHWAY	hsa05224	0.014948882	NCOA3 SHC1
Influenza A	KEGG PATHWAY	hsa05164	0.018945968	CASP3 SLC25A4
Nitrogen metabolism	KEGG PATHWAY	hsa00910	0.022215144	GLUL
Arginine biosynthesis	KEGG PATHWAY	hsa00220	0.027085794	GLUL
Nicotinate and nicotinamide metabolism	KEGG PATHWAY	hsa00760	0.037958022	NAMPT
Pentose phosphate pathway	KEGG PATHWAY	hsa00030	0.037958022	G6PD
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	KEGG PATHWAY	hsa00630	0.037958022	GLUL
Apoptosis - multiple species	KEGG PATHWAY	hsa04215	0.041555581	CASP3
Thyroid cancer	KEGG PATHWAY	hsa05216	0.046331832	PPARG

2.4 Hub 基因筛选 Cytoscape 软件筛选出得分前 10 名的 Hub 基因,包括 3 个 lncRNA:*PCBP1-AS1*、*TTY14*、*ZNF503-AS1*;5 个 mRNA:*CELF2*、*NCOA3*、*LETMD1*、*AHNAK*、*PRRC2C*;2 个 circRNA:*has\_circ\_0002860* 和 *has\_circ\_0003273*,见图 5。



注:颜色代表得分水平,红色越高,黄色越低。两个相连的蛋白质之间的相互作用以节点之间的连线表示。

图 5 Hub 基因网络图

2.5 核心基因表达量和生存分析 将 KEGG 富集分析得到的关键基因和得分排名前 10 的 Hub 基因进行整理,共得到 12 个核心基因:*PCBP1-AS1*、*TTY14*、

*ZNF503-AS1*、*CELF2*、*NCOA3*、*LETMD1*、*AHNAK*、*PRRC2C*、*has\_circ\_0002860*、*has\_circ\_0003273*、*SHC1*、*CASP3*。利用 UALCAN 数据库进行基因表达量分析,发现与正常组织相比,*NCOA3*、*LETMD1*、*AHNAK*、*SHC1*、*CASP3* 在 HCC 组织中表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ),而 *TTY14*、*CELF2* 在 HCC 组织中表达量均显著下调 ( $P < 0.05$ );*PCBP1-AS1*、*ZNF503-AS1*、*PRRC2C*、*has\_circ\_0002860*、*has\_circ\_0003273* 查无数据,见图 6。利用 Kaplan-Meier Plotter 网站进行生存分析,结果显示:*TTY14*、*CELF2* 高表达组 HCC 患者的生存率显著高于低表达组 ( $P < 0.05$ );*SHC1* 低表达组 HCC 患者的生存率显著高于高表达组 ( $P < 0.05$ );*NCOA3*、*LETMD1*、*AHNAK*、*SHC1*、*CASP3* 差异无统计学意义,见图 7。

2.6 TIMER2.0 免疫浸润分析 利用 TIMER2.0 网站,评估 *TTY14*、*CELF2* 和 *SHC1* 的表达与 HCC 患者免疫细胞浸润的关系,结果显示:*CELF2* 的高表达与 HCC 患者的肿瘤纯度 ( $\text{Rho} = -0.465$ ,  $P = 5.39 \times 10^{-20}$ ) 呈显著负相关,而与 HCC 患者的  $\text{CD8}^+$  T 细胞 ( $\text{Rho} = 0.483$ ,  $P = 1.46 \times 10^{-21}$ )、 $\text{CD4}^+$  T 细胞 ( $\text{Rho} = 0.286$ ,  $P = 6.49 \times 10^{-8}$ )、B 细胞 ( $\text{Rho} = 0.372$ ,  $P = 8.71 \times 10^{-13}$ )、巨噬细胞 ( $\text{Rho} = 0.506$ ,  $P = 7.08 \times 10^{-24}$ )、中性粒细胞 ( $\text{Rho} = 0.436$ ,  $P = 2.11 \times 10^{-17}$ )、树突状细胞 ( $\text{Rho} = 0.619$ ,  $P = 8.07 \times 10^{-38}$ ) 关系显著呈正相关;而 *TTY14* ( $P = 9.60 \times 10^{-1}$ ) 和 *SHC1* ( $P = 3.80 \times 10^{-1}$ ) 的高表达与 HCC 患者的肿瘤纯度相关性比较差异无统计学意义,见图 8。

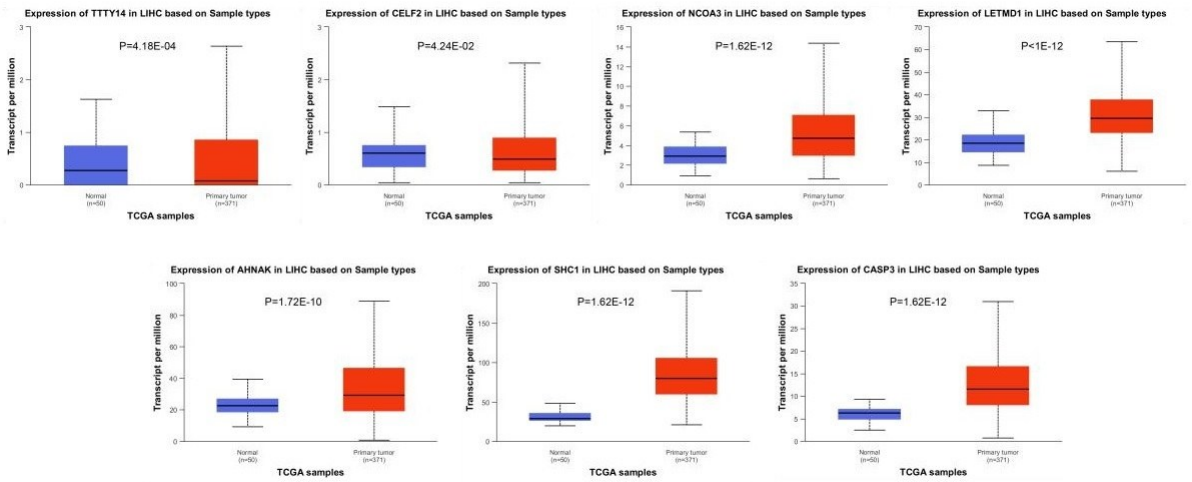


图 6 ceRNA 网络中核心基因的差异表达验证

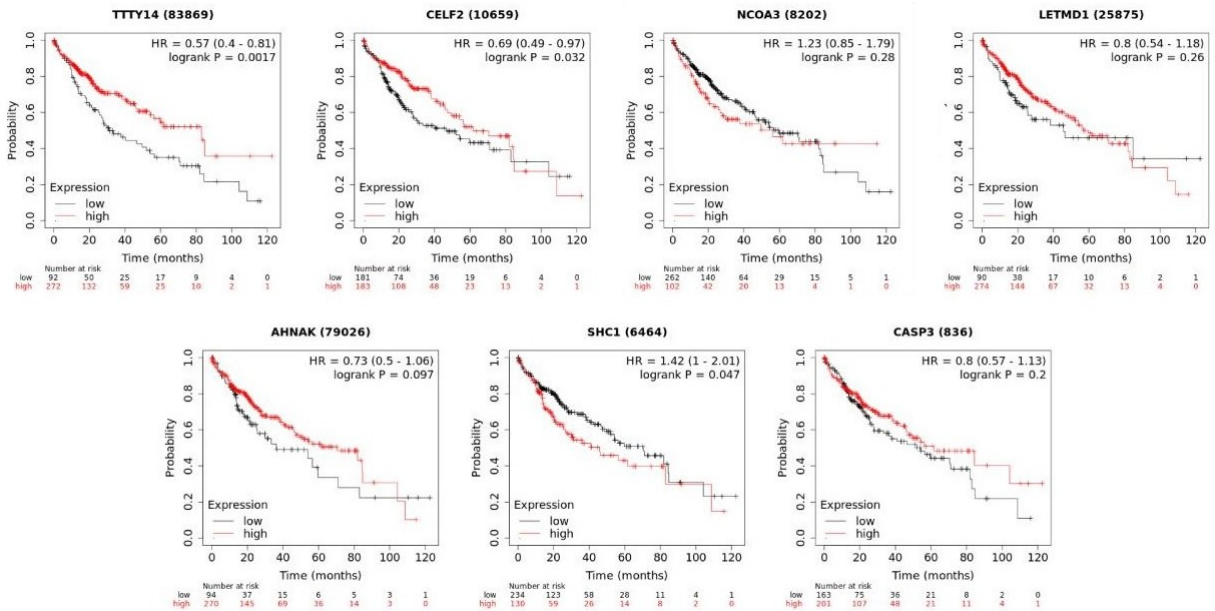


图 7 ceRNA 网络中核心基因的生存分析

### 3 讨论

HCC 是一种发病率最高的肝癌类型。因为其早期症状不典型,所以大部分患者确诊时已经处于中晚期并丧失手术机会。因此,寻找能够用于临床早期诊断和有效治疗的新靶点对 HCC 患者至关重要。外泌体富含多种生物活性分子,如 DNA、RNA 和蛋白质等,并通过转移其生物活性成分来执行细胞间交流的关键功能,因此近年来外泌体已成为医学领域研究的热点。已有研究发现,外泌体可以通过细胞间的信息交流广泛参与肿瘤的发生发展<sup>[7]</sup>。WANG S 等<sup>[8]</sup>的研究发现,HCC 衍生的外泌体通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路并将脂肪细胞转化为促肿瘤细胞来促进肿瘤生长、增强血管生成和在体内募集巨噬细胞的能力。DAI Y P 等<sup>[9]</sup>证明,前列腺癌细胞来源的外泌体 miR-183 通过下调原肌球蛋白-1 促进肿瘤增殖、迁移和侵

袭。YOU X W 等<sup>[10]</sup>的研究证明,富含 miR-663b 的宫颈癌细胞来源的外泌体通过激活 EMT 信号通路促进宫颈癌的转移。近年来,基于 ceRNA 假说,mRNA、lncRNA 和 circRNA 等之间相互竞争结合 miRNA,从而对靶基因的表达进行进一步的调控<sup>[11-12]</sup>,这为研究肿瘤的发生发展机制提供重要的线索,也为本研究探讨 HCC 中的 ceRNA 调控网络的作用机制提供可靠的参考依据。

在这项研究中,利用 exoRBase 2.0 数据库分析正常人群和 HCC 患者的外周血外泌体的基因测序数据,共筛选出 134 个差异表达的 mRNA、19 个差异表达的 lncRNA 和 15 个差异表达的 circRNA。使用 Cytoscape 软件构建可视化 ceRNA 网络,共有 49 个 mRNA 节点、4 个 lncRNA 节点、8 个 circRNA 节点和 83 个 miRNA 节点。根据 GO 功能富集结果显示,差异表达

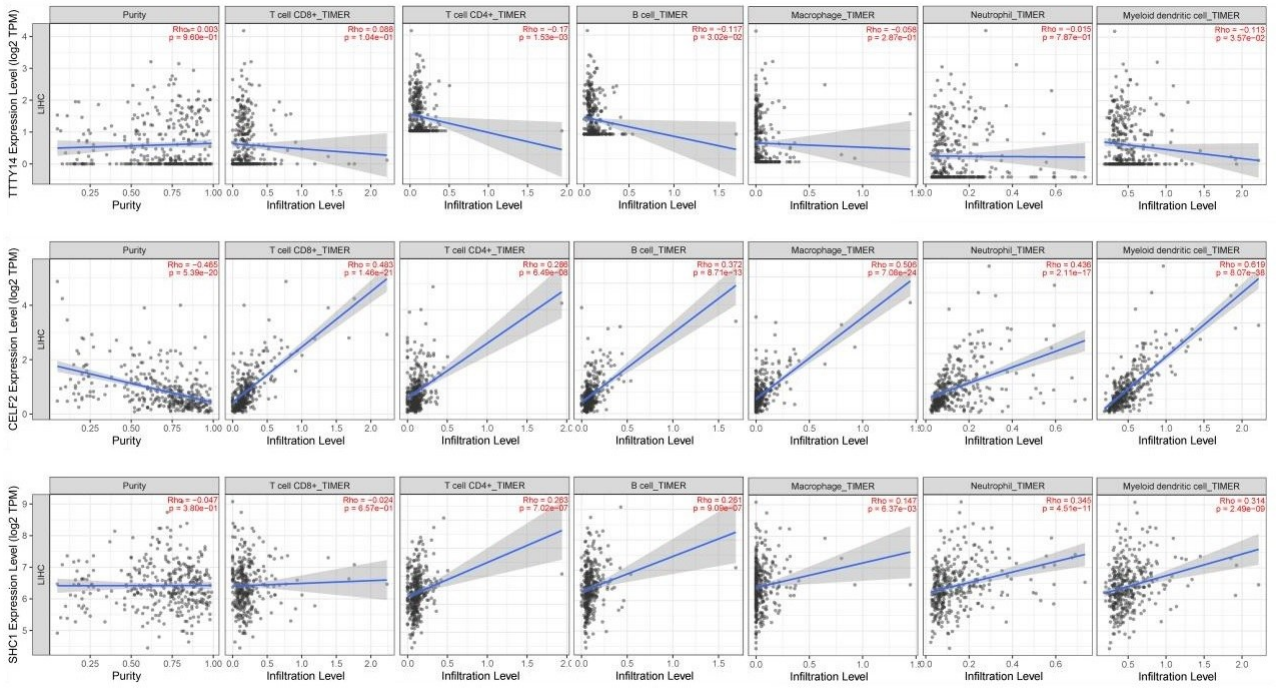


图 8 ceRNA 网络中核心基因的免疫相关性分析

的 mRNAs 生物学过程主要富集在骨髓细胞分化、横纹肌细胞分化和器官生长的调节等,细胞组成主要富集在伪足小体,分子功能主要富集在胰岛素受体结合。根据 KEGG 通路富集显示结果,ceRNA 调控网络中差异表达的 mRNAs 主要富集在催产素信号通路和 cGMP-PKG 信号通路。其中,经分析得到与 HCC 的发展密切相关的关键基因有 *SHC1* 和 *CASP3*,分别主要富集在慢性骨髓性白血病和亨廷顿病。

核心基因经基因表达量、生存分析和免疫细胞浸润验证后,筛选证实得到 *CELF2* 与 HCC 发展密切相关。*CELF2* 是一种 mRNA,属于 CUGBP Elav-like 家族,已被证实许多癌症中下调从而促进癌症的发生发展,如乳腺癌<sup>[13]</sup>、卵巢癌<sup>[14]</sup> 和非小细胞肺癌<sup>[15]</sup> 等。WU J 等<sup>[16]</sup> 的研究表明 *STYXL1* 可通过 PI3K/Akt 通路下调 *CELF2*,加快 HCC 细胞增殖速度并抑制细胞凋亡。XIE S C 等<sup>[17]</sup> 的研究表明 lncRNA *CRNDE* 可以使 *CELF2* 表观遗传受到抑制,从而促进 HCC 的增殖、迁移和化疗耐药性。此外, TUO H 等<sup>[18]</sup> 的研究发现缺氧诱导的 lncRNA *MRV1-AS1* 可以通过募集 RNA 结合蛋白 *CELF2* 稳定 *SKA1* mRNA 来加快 HCC 的发展。

肿瘤浸润免疫细胞是肿瘤微环境的重要组成部分,对肿瘤治疗效果具有一定的预测价值。实验结果表明,*CELF2* 的高表达与 HCC 患者的肿瘤纯度呈显著负相关,而与 HCC 患者的 CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞关系呈显著正相关。提示 *CELF2* 可能参与 HCC 肿瘤微环

境的免疫应答,尤其是对 CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞的免疫应答。现有研究发现 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞分化的调节性 T 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等免疫细胞亚群是 HCC 肿瘤微环境中的关键免疫抑制成分<sup>[19]</sup>。此外,CRISPR-Cas9 介导的 *CELF2* 敲低可以削弱 IL-10<sup>[20]</sup>。IL-10 具有抑制 T 细胞、单核细胞和巨噬细胞的活化和效应功能,还可以调节 B 细胞、NK 细胞、细胞毒性和辅助性 T 细胞、肥大细胞、粒细胞、树突状细胞、角质形成细胞和内皮细胞的生长和(或)分化。因此,*CELF2* 有望成为 HCC 的临床诊断治疗新靶点。

本研究成功构建了 HCC 患者血液外泌体 ceRNA 网络,并对其进行了富集分析。同时,确定了影响 HCC 发生发展的核心基因,并通过基因表达量、生存分析和免疫细胞浸润反应进行验证,为今后研究 HCC 的作用机制提供了更加精准的靶点。

但是本研究还存在以下局限性:所采用的数据库外泌体样本量较小;基因的表达受到环境和遗传因素的调控影响;由于实验条件的限制以及算法的局限性,一些潜在的有价值的生物标志物可能无法被准确检测出来。此外,ceRNA 网络只能说明相关 RNA 与 miRNA 之间存在相关性以及可能存在调控作用,并不能体现调控机制确切的变化关系。因此,未来还需要进行更多大量的实验研究来阐释和验证这些关键基因具体的作用机制。

## 参考文献:

- [1] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1):6.
- [2] MARQUARDT J U, ANDERSEN J B, THORGEIRSSON S S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(11):653-667.
- [3] 国家感染性疾病临床医学研究中心, 北京医学会肝病学会, 中国老年学及老年医学学会转化医学分会. 晚期原发性肝癌精细化诊疗管理专家共识(2023 年版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2023, 31(9):910-920.
- [4] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA hypothesis: the rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3):353-358.
- [5] LI B G, MAO R, LIU C F, et al. LncRNA FAL1 promotes cell proliferation and migration by acting as a CeRNA of miR-1236 in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Life Sci*, 2018, 197:122-129.
- [6] HU W Y, WEI H Y, LI K M, et al. LINC00511 as a ceRNA promotes cell malignant behaviors and correlates with prognosis of hepatocellular carcinoma patients by modulating miR-195/EYA1 axis[J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2020, 121:109642.
- [7] CHEN S M, MDATTA-CHAUDHURI A, DEME P, et al. Lipidomic characterization of extracellular vesicles in human serum[J]. *J Circ Biomark*, 2019, 30(8):18494544-19879848.
- [8] WANG S H, XU M Q, LI X X, et al. Exosomes released by hepatocarcinoma cells endow adipocytes with tumor-promoting properties[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1):82.
- [9] DAI Y P, GAO X Q. Inhibition of cancer cell-derived exosomal microRNA-183 suppresses cell growth and metastasis in prostate cancer by upregulating TPM1[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):145.
- [10] YOU X W, WANG Y, MENG J Y, et al. Exosomal miR-663b exposed to TGF- $\beta$ 1 promotes cervical cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition by targeting MGAT3[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(4):12.
- [11] HUANG J, CHEN YX, ZHANG B. IGF2-AS affects the prognosis and metastasis of gastric adenocarcinoma via acting as a ceRNA of miR-503 to regulate SHOX2[J]. *Gastric Cancer*, 2020, 23(1):23-38.
- [12] Guo Q, Li D, Luo X, et al. The Regulatory Network and Potential Role of LINC00973-miRNA-mRNA ceRNA in the Progression of Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:684807.
- [13] PIQUÉ, MARTINEZ DE PAZ A, PIÑEYRO D, et al. Epigenetic inactivation of the splicing RNA-binding protein CELF2 in human breast cancer[J]. *Oncogene*, 2019, 38(45):7106-7112.
- [14] GUO Q H, WU Y, GUO X Q, et al. The RNA-Binding protein CELF2 inhibits ovarian cancer progression by stabilizing FAM198B[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23:169-184.
- [15] YEUNG Y T, FAN S Y, LU B B, et al. CELF2 suppresses non-small cell lung carcinoma growth by inhibiting the PREX2-PTEN interaction[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(3):377-389.
- [16] WU J Z, JIANG N, LIN J M, et al. STYXL1 promotes malignant progression of hepatocellular carcinoma via downregulating CELF2 through the PI3K/Akt pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacolo Sci*, 2020, 24(6):2977-2985.
- [17] XIE S C, ZHANG J Q, JIANG X L, et al. LncRNA CRNDE facilitates epigenetic suppression of CELF2 and LATS2 to promote proliferation, migration and chemoresistance in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8):676.
- [18] TUO H, LIU R K, WANG Y F, et al. Hypoxia-induced lncRNA MRV11-AS1 accelerates hepatocellular carcinoma progression by recruiting RNA-binding protein CELF2 to stabilize SKA1 mRNA[J]. *World J Surg Oncol*, 2023, 21(1):111.
- [19] WANG D, YANG L, YUE D L, et al. Macrophage-derived CCL22 promotes an immunosuppressive tumor microenvironment via IL-8 in malignant pleural effusion [J]. *Cancer Lett*, 2019, 452:244-253.
- [20] YOON J S J, WU M K, ZHU T H, et al. Interleukin-10 control of pre-miR155 maturation involves CELF2 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(4):e0231639.

收稿日期:2024-01-05;修回日期:2024-02-02