

• 论 著 •

基于生物信息学检测 PRKCD 在肝细胞癌中的表达及意义

李莉娟,宋少华,方晓琳,李海舰,曹东林[△]

广东省第二人民医院检验医学部,广东广州 510317

摘要:目的 通过多个数据库对蛋白激酶 C δ (PRKCD)的表达水平与肝细胞癌(HCC)的相关性进行分析,探讨 PRKCD 作为 HCC 新的诊断和治疗靶点的价值。方法 通过生物信息学工具联合分析 PRKCD 基因在 HCC 中的预后价值及其调控机制。结果 HCC 患者 PRKCD 表达水平明显高于癌旁和正常组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$);疾病不同亚组分析结果表明,PRKCD 表达水平升高与年龄、肥胖、疾病不同阶段等因素均相关($P < 0.05$);生存分析结果表明,PRKCD 表达水平与预后呈明显负相关($P < 0.05$);功能网络分析显示,PRKCD 可能与细胞分裂相关。结论 HCC 患者体内 PRKCD 表达水平升高,且与预后不良密切相关,提示 PRKCD 有望成为 HCC 诊断和治疗的新靶点。

关键词:蛋白激酶 C δ ; 肝细胞癌; 生物信息学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.16.013

中图法分类号:R735.7

文章编号:1673-4130(2021)16-1982-05

文献标志码:A

Expression and significance of PRKCD in hepatocellular carcinoma based on bioinformatics

LI Lijuan, SONG Shaohua, FANG Xiaolin, LI Haijian, CAO Donglin[△]

Department of Laboratory Medicine, the Second People's Hospital of

Guangdong, Guangzhou, Guangdong 510317, China

Abstract: Objective To explore the value of protein kinase C δ (PRKCD) as a new diagnostic and therapeutic target for hepatocellular carcinoma (HCC) by analyzing the correlation between the expression level of PRKCD and through multiple databases. **Methods** Bioinformatics tools was used to jointly analyze the prognostic value of PRKRD in hepatocellular carcinoma and its regulatory mechanism. **Results** The expression of PRKCD was significantly higher in hepatocellular carcinoma than that in precancerous, and normal tissues, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The analysis results of different subgroups of diseases indicated that the increase of expression of PRKCD was related to factors such as age, obesity and different stages of the disease ($P < 0.05$). Survival analysis results showed that its expression level was significantly negatively correlated with prognosis. Functional network analysis showed that PRKCD might be related to cell division. **Conclusion** PRKCD levels in patients with hepatocellular carcinoma are elevated and are closely related to poor prognosis. It is suggested that PRKCD may become a new target for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

Key words: protein kinase C δ ; hepatocellular carcinoma; bioinformatics

肝细胞癌(HCC)作为最常见的原发性肝癌,因早期诊断不易、治疗方案有限且预后差,故在过去的几十年中,HCC 的发病率及其与 HCC 相关的死亡人数一直有所增加^[1],现已成为全球第二的癌症相关死亡原因,其发病率仍持续上升^[2-3]。因此,寻找早期诊断和治疗 HCC 的靶分子有重要意义。蛋白激酶 C δ

(PRKCD)是一种广泛表达的蛋白激酶,参与多种细胞信号途径,是癌症、糖尿病、缺血性心脏病和神经退行性疾病炎性反应的重要调节因子,通过酪氨酸磷酸化、激活机制和多个亚细胞靶点进行调控^[4]。本文通过多个数据库对 PRKCD 的表达水平与 HCC 的相关性进行分析比较,探讨 PRKCD 作为 HCC 新的诊断

作者简介:李莉娟,女,主管技师,主要从事医学检验免疫学方面的研究。 [△] **通信作者:**E-mail:caodl@126.com。

本文引用格式:李莉娟,宋少华,方晓琳,等.基于生物信息学检测 PRKCD 在肝细胞癌中的表达及意义[J].国际检验医学杂志,2021,42(16):1982-1986.

和治疗靶点的潜在价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 GEPIA 数据库 GEPIA 数据库(<http://gepia.pku.cn/>)是基于 TCGA 和 GTEx 的一个癌症数据挖掘网站,通过它可以检测 PRKCD 在 HCC 中的具体表达情况^[5]。

1.1.2 HCCDB 数据库 HCCDB 数据库(<http://lifeome.net/database/HCCDB>)包括 15 个数据集,涵盖大约 4 000 例临床样本,用于探索 HCC 基因表达和共表达情况^[6]。

1.1.3 UALCAN 数据库 UALCAN 数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)的数据主要来源于 TCGA 数据库中的相关癌症数据,可在线对 PRKCD 在 HCC 的表达情况进行亚组分析^[7]。

1.1.4 LinkedOmics 数据库 LinkedOmics 数据库(<http://www.linkedomics>)可分析来自 TCGA 癌症相关的多维数据集^[8]。本研究采用 Pearson 相关系数先对 PRKCD 共表达进行统计学分析,分析结果为火山图和热图。再以 LinkedOmics 功能模块进行基因本体生物过程和 KEGG 通路富集分析。等级标准为 $FDR < 0.05$,模拟 1 000 次。

1.2 Kaplan-Meier 生存曲线分析 Kaplan-Meier 标图仪能够评估 54k 基因(mRNA、miRNA、蛋白)对 21 种癌症类型生存率的影响,包括乳腺癌($n = 7 830$)、卵巢癌($n = 2 190$)、肺癌($n = 3 452$)和胃癌($n = 1 440$)。数据库来源包括 GEO、EGA 和 TCGA,该工具的主要目的是基于生存标志物的发现和验证的 Meta 分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析。采用 Kaplan-Meier 生存曲线比较生存时间差异^[9],按特异性基因中位表达水平区分 HCC 患者的生存期[总体生存期(OS)、无复发生存期(RFS)、无

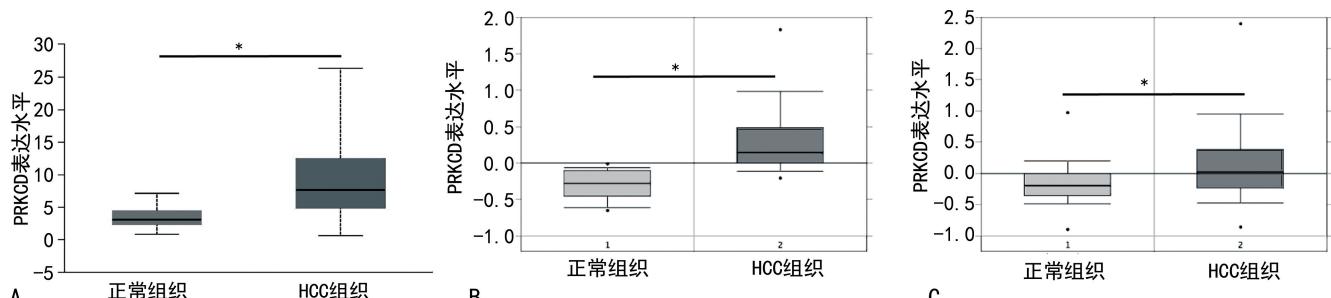
进展生存期(PFS)及特异性生存期(DSS)]。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PRKCD 在 HCC 中表达水平分析 为了检测 HCC 和相邻非肿瘤组织之间 PRKCD 表达的变化,本研究在一些独立的生物信息学数据库中分析了它们的表达谱。利用 TIMER 数据库发现,在大多数肿瘤组织中,PRKCD 的表达水平较正常组织均升高,尤其是 HCC 患者;Oncomine 4.5 数据库中的数据显示,PRKCD 在 HCC 组织中的表达水平明显高于正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$) (图 1A~C)。

2.2 HCCDB 数据库中 PRKCD 的表达谱和共表达网络分析 进一步检测细胞中 PRKCD 的差异表达水平,12 个不同的 HCC 数据集结果显示,在大多数数据集(8/12)中,如 HCCDB1、HCCDB3、HCCDB4、HCCDB6、HCCDB13、HCCDB15、HCCDB17 和 HCCDB18 的基因表达 HCC 组织中的 PRKCD 水平明显高于邻近肝组织。共表达式网络结果显示,共表达式在 HCC 组织、癌旁组织和正常肝组织中的 PRKCD 调控网络完全不同,提示 PRKCD 的表达增多后调控了特异的分子网络,其与 HCC 的发生密切相关(图 2A~C)。

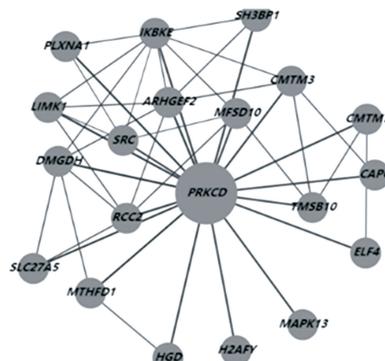
2.3 HCC 患者 PRKCD 的 mRNA 表达水平及其与临床病理参数的关系 如图 3A 所示,男性和女性 HCC 患者的 PRKCD mRNA 表达水平均高于对照组;不同体质的 HCC 患者 PRKCD 的 mRNA 表达水平均明显高于对照组(图 3B);同时 HCC 患者 PRKCD 的 mRNA 明显高表达与种族无关(图 3C);年龄 ≥ 21 岁的 HCC 患者 PRKCD 的 mRNA 表达水平普遍高于对照组(图 3D);在 HCC 患者中,PRKCD 的 mRNA 表达水平与肿瘤分期呈正相关,PRKCD 呈高水平表达可能与较差的临床特征有关(图 3E、3F)。



注:A 为 PRKCD 在 HCC 样品中的表达水平,与正常组织比较, * $P < 0.05$;B 和 C 方框图分别为 PRKCD mRNA 水平在 Roessier 肝脏和 Roessiers 肝脏统计中的表达情况,与正常组织比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 PRKCD 在不同类型 HCC 中表达水平分析

肝癌Meta共表达网络



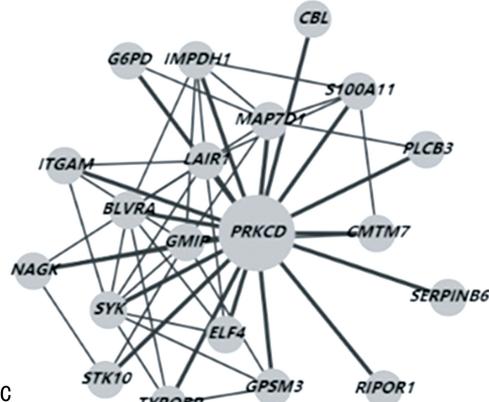
A

相邻元素共表达网络



B

GTEx共表达网络



C

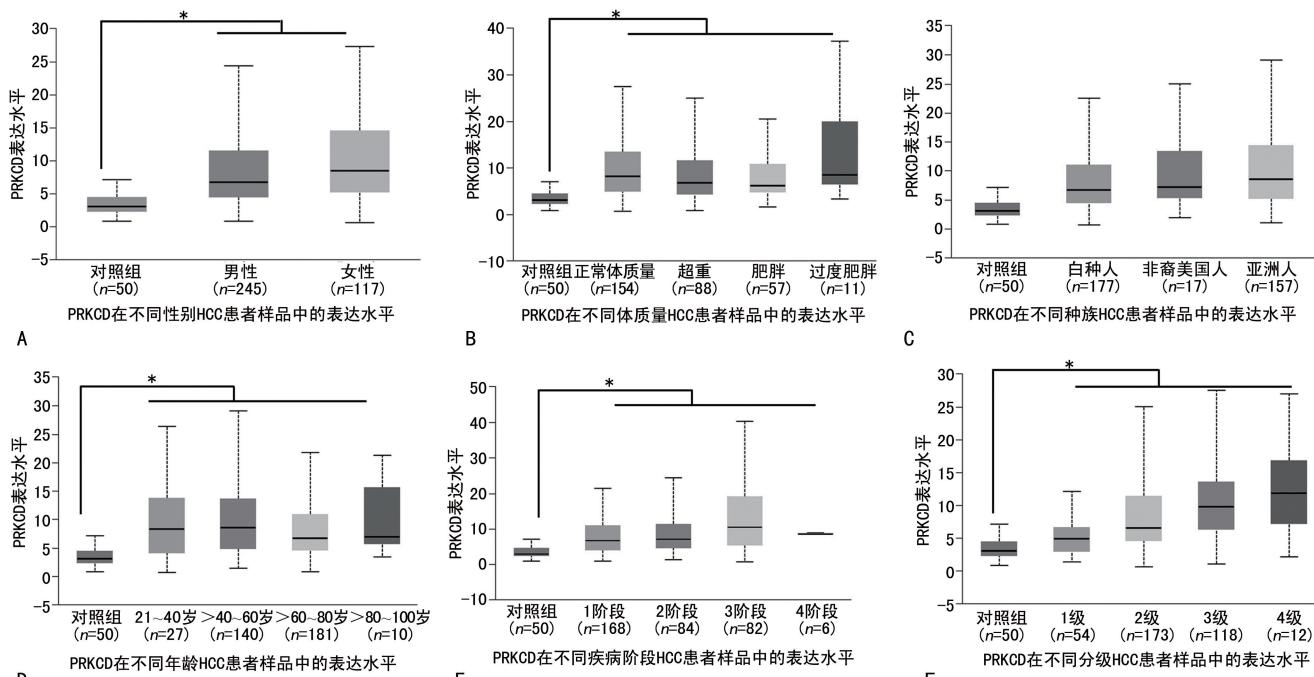
注: A 为来自 GTEx project 的 HCC 组织; B 为邻近肝组织; C 为正常组织中 CELSR2 的共表达网络显示。

图 2 HCCDB 数据库中 PRKCD 共表达网络分析

2.4 PRKCD 表达水平对 HCC 患者的临床预后分析 从绘制的生存曲线图发现,无论是 OS(图 4A)、RFS(图 4B)、PFS(图 4C)、DSS(图 4D),其 PRKCD 高表达的 HCC 患者生存率均比对照组低,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其他数据库获得同样的分子结果(图 4E)。

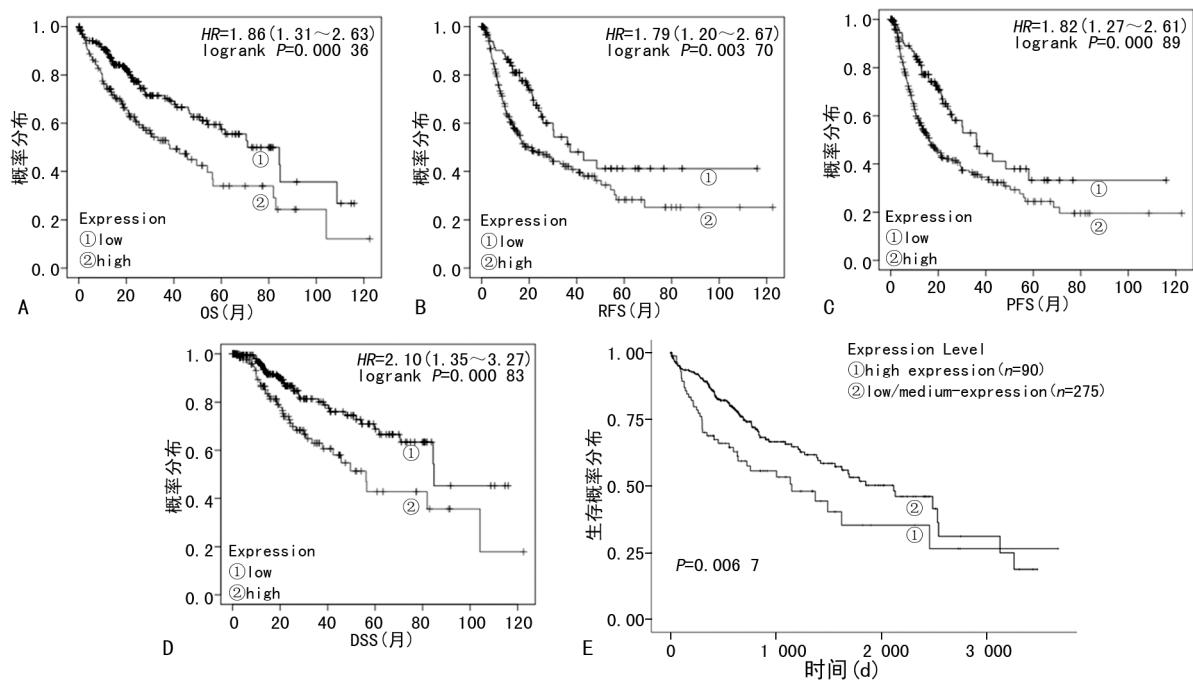
2.5 HCC 患者中与 PRKCD 相关的共表达基因的 GO 和 KEGG 通路分析 LinkedOmics 数据库包含 TCGA 中 371 例 HCC 患者的 mRNA 测序数据,用于分析 PRKCD 在 HCC 中的共表达基因及其相关调控

通路。首先找出与 PRKCD 呈明显正相关和负相关的基因($FDR < 0.01$),使用基因集富集分析(GSEA)进行分析 GO 和 KEGG 分析。GO 分析显示,相关基因主要集中于参与细胞的有丝分裂、端粒控制、细胞周期、染色质组装、细胞器分裂等相关(图 5A)。KEGG 分析显示,相关基因与 DNA 复制、同源重组、T 细胞受体通路、利什曼病、卵母细胞减数分裂、乙型肝炎、志贺菌病相关(图 5B)。结果表明 PRKCD 主要通过影响肝癌细胞增殖、调控细胞周期等方式促进肿瘤的发生和发展。



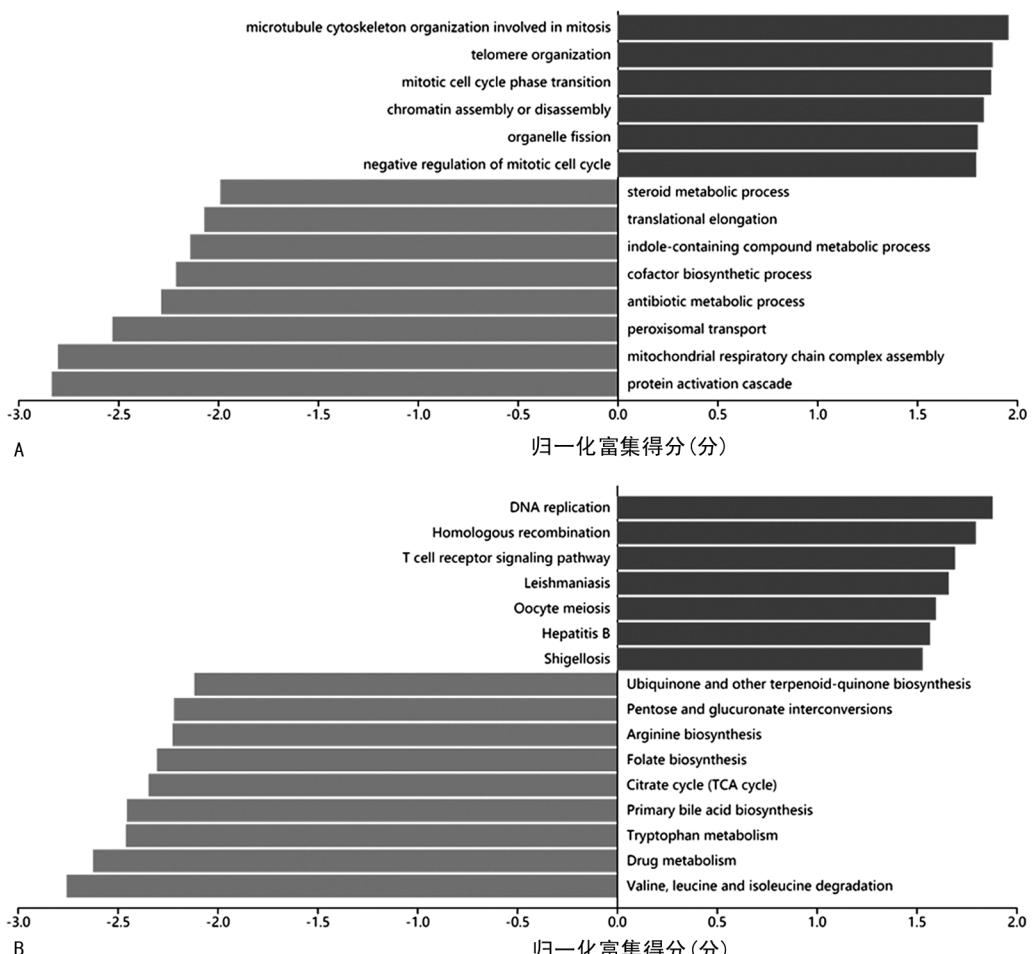
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

UALCAN 数据库中 PRKCD 的 mRNA 表达水平分析



注: A~D 为基于 PRKCD 表达的 HCC 患者 OS、RFS、PFS 和 DSS 的 Kaplan-Meier 分析; E 为使用 UALCAN 数据库确定 PRKCD 表达式与 OS 之间的关联。

图 4 PRKCD 表达水平对 HCC 患者预后的影响



注: A 为利用 GSEA 分析 HCC 中 PRKCD 共表达基因明显富集的 GO 相关的生物过程; B 为利用 GSEA 分析 HCC 中 PRKCD 共表达基因明显富集 KEGG 通路分析。

图 5 HCC 患者中与 PRKCD 相关的基因差异表达

3 讨 论

为探究 PRKCD 与 HCC 的调控关系,本研究通过分析一系列数据库发现,HCC 患者体内 PRKCD 表达水平明显升高,且与生存预后不良明显相关。HCC 病因广泛,大多数发生于慢性肝病患者,由病毒性肝炎、非酒精性脂肪肝和酒精相关性脂肪肝引起^[10]。许多患者没能在早期被诊断,在肿瘤被发现时已处于中晚期,5 年生存率只有 6.9%^[11]。虽然现在 HCC 的诊断和治疗等均取得了一定进展,但肝移植仍被认为是 HCC 最有效的治疗方式之一,而供体不足、费用昂贵且患者终身需服用免疫抑制药物等诸多因素,使其临床应用被限制^[12]。

本研究发现,PRKCD 表达水平在 HCC 患者中明显上调,并且与患者的临床特征相关,高水平的 PRKCD 与 HCC 患者较低的 OS 和 DFS 相关,提示该基因可作为一种促肿瘤因子。据有关数据显示,我国 HCC 的年病死率在恶性肿瘤死亡中占第 2 位^[13]。PRKCD 是第 1 个通过哺乳动物 cDNA 文库筛选得到的新的蛋白激酶 C 亚型,在细胞和组织中广泛表达,可介导膜肌醇磷脂水解产生二酰甘油,并通过将这些化合物结合到其调节域的 C1 区域而促进肿瘤生长^[14]。PRKCD 是一种具有多种下游靶蛋白的信号激酶,在多种信号传导途径中发挥作用^[15]。PRKCD 的活化和细胞内分布可能对细胞凋亡有重要影响,它可以作用于 Caspases 的上游和下游,PRKCD 的全长和催化片段在细胞凋亡刺激下,转移到不同的细胞间隔,包括线粒体和细胞核,这又与肿瘤的耐药性密切相关^[16]。因此,后续需要通过详细的体外、体内生物学实验来证实 PRKCD 对肿瘤细胞活性的影响及其调控机制。

公共在线数据库的靶向基因分析揭示了 PRKCD 在 HCC 发展中的重要性,并支持其作为 HCC 的生物标志物。但研究中 1 个明显的局限性使转录组测序只能检测静态突变,不能直接提供与蛋白质活性或表达水平相关的信息。PRKCD 很有可能是 HCC 早期诊断和治疗的新靶点,后期可能会通过更加严谨的实验来进一步证实这一结果。

参考文献

[1] CRAIG A J, VON FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(3): 139-152.

[2] RHEE H, CHO E S, NAHM J H, et al. Gadoxetic acid-enhanced MRI of macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma and its prognostic implications[J]. J Hepatol, 2021, 74(1): 109-121.

[3] SINGAL A G, LAMPERTICO P, NAHON P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: new trends[J]. J Hepatol, 2020, 72(2): 250-261.

[4] ZHANG D, XU X, DONG Z. PRKCD/PKC δ contributes to nephrotoxicity during cisplatin chemotherapy by suppressing autophagy[J]. Autophagy, 2017, 13 (3): 631-632.

[5] 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(1): 98-102.

[6] LIAN Q, WANG S, ZHANG G, et al. HCCDB: a database of hepatocellular carcinoma expression atlas[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2018, 16(4): 269-275.

[7] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A H, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses [J]. Neoplasia, 2017, 19(8): 649-658.

[8] VASAIKAR S V, STRAUB P, WANG J, et al. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(1): 956-963.

[9] LACNY S, WILSON T, CLEMENT F, et al. Kaplan-meier survival analysis overestimates cumulative incidence of health-related events in competing risk settings: a meta-analysis[J]. J Clin Epidemiol, 2018, 93: 25-35.

[10] ANSTEE Q M, REEVES H L, KOTSILITI E, et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(7): 411-428.

[11] GROHMANN M, WIEDE F, DODD G T, et al. Obesity drives STAT-1-dependent NASH and STAT-3-dependent HCC[J]. Cell, 2018, 175(5): 1289-1306.

[12] LEE D D, SAPISOCHIN G, MEHTA N, et al. Surveillance for HCC after liver transplantation: increased monitoring may yield aggressive treatment options and improved postrecurrence survival [J]. Transplantation, 2020, 104(10): 2105-2112.

[13] ZHOU J, SUN H C, WANG Z, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in China (2017 edition)[J]. Liver Cancer, 2018, 7(3): 235-260.

[14] KE G, LIANG L, YANG J, et al. MiR-181a confers resistance of cervical cancer to radiation therapy through targeting the pro-apoptotic PRKCD gene[J]. Oncogene, 2013, 32(25): 3019-3027.

[15] GUO C J, PAN Q, CHENG T, et al. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways[J]. FEBS J, 2009, 276 (18): 5163-5176.

[16] SWEENEY M D, AYYADURAI S, ZLOKOVIC B V. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways[J]. Nature Neurosci, 2016, 19(6): 771-783.