

网络出版时间: 2024-07-19 15:01:52 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240717.1520.003>

肝细胞癌 PD-1 免疫治疗敏感性的靶基因分析

史宇泽^{1,2}, 丁可^{2,3}, 孙倍成^{1,2,3}

摘要 目的 探究肝细胞癌(HCC)患者程序性死亡受体1(PD-1)免疫治疗敏感性的特征基因。方法 通过加权基因共表达网络分析(WGCNA)及差异性分析筛选与PD-1免疫治疗敏感性相关数据集GSE202069及ERP117672中共同差异基因,将上述共同差异基因通过Lasso回归筛选PD-1免疫治疗敏感性的特征基因;通过GEPIA及Ualcan数据库预测特征基因在HCC的表达水平,通过实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)、蛋白质印迹(WB)及免疫组织化学染色(IHC)实验验证其表达。构建过表达3-羟基丁酸脱氢酶1(BDHI)细胞系,通过肿瘤功能学实验细胞计数试剂盒8(CCK-8)、平板克隆、EdU染色、细胞划痕、Transwell实验探究其对肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。结果 通过WGCNA及差异性分析筛选出两项数据集共有118个共同差异基因,Lasso回归筛选出共同差异基因中与PD-1免疫治疗敏感性特征基因(含黄素二甲苯胺单加氧酶3(FMO3)、过氧化物酶反式-2-烯酰辅酶A还原酶(PECR)、BDHI、溶质载体家族7成员1(SLC7A1)、细胞色素b5A型(CYB5A)和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶1(PCK1));生存分析表明BDHI与HCC最为相关(总体生存率: $P < 0.001$;复发: $P = 0.007$)。GEPIA及Ualcan数据库分析显示BDHI在HCC组织中低表达,通过RT-qPCR、WB及IHC对本中心收集的HCC样本进一步证实BDHI在HCC中低表达。CCK-8、平板克隆、EdU染色、细胞划痕、Transwell实验结果显示,与Hep3B pCDH组相比,过表达BDHI使得HCC细胞吸光度降低($t = 4.766, P < 0.01$),克隆形成数目减少($t = 16.02, P < 0.0001$),增殖细胞比例下降($t = 23.13, P < 0.0001$),细胞迁移率减慢($t = 25.28, P < 0.0001$),穿过小室数目减少($t = 10.78, P = 0.004$)。结论 BDHI是观察HCC患者PD-1免疫治疗敏感性的特征基因;BDHI具有抑制HCC细胞增殖、迁移和侵袭的能力。

关键词 肝细胞癌; PD-1 免疫治疗; BDHI; 肿瘤功能学实验中图分类号 R 657.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1323-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.006

肝癌是全球第三大癌症死亡的主要原因,病毒性肝炎及非酒精性脂肪性肝病是其常见诱因^[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌中最常见的类型,约占75%~80%^[1-2]。HCC通常在诊断时已处于晚期,治疗选择方式有限并且通常预后较差,高达70%的患者在5年内复发,尤其是在手术或消融治疗后仍被认为处于高风险状态的患者。

大量研究报道分子靶向药物如索拉菲尼、乐伐替尼等极大改善了HCC患者的预后,但随之出现的肿瘤细胞对索拉菲尼等药物的耐药导致部分患者治疗失败^[3]。程序性死亡受体1(programmed death-1, PD-1)、细胞程序性死亡受体配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)免疫治疗于2017年被FDA批准可用于治疗对索拉菲尼治疗无效的HCC患者^[4]。基于PD-1/PD-L1在肿瘤中的杀伤机制,增强杀伤肿瘤细胞的能力,近年来已开发多种PD-1/PD-L1抑制剂用于HCC的免疫治疗,但是免疫治疗敏感性依旧是困扰广大工作者的一大难题。因此,筛选并探究HCC中PD-1/PD-L1免疫治疗敏感性的关键基因,并剖析其在肿瘤进展中的功能显得至关重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肝癌细胞系Hep3B购自中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 培养细胞所使用的胎牛血清、DMEM培养基、PBS、青链霉素双抗及胰酶购自南京维森特生物技术公司;蛋白提取所需的Western及IP裂解液、磷酸酶及蛋白酶抑制剂、蛋白浓度测定用BCA试剂盒购自南通碧云天生物技术公司;实时荧光定量反转录聚合酶链反应(real-time

2024-05-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81930086、82120108012);安徽省高校科研项目(编号:2022AH010070);安徽省临床医学研究转化专项(编号:202204295107020008)

作者单位:¹南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科,南京 210008

²安徽医科大学第一附属医院肝胆胰及移植外科,合肥 230022

³南京医科大学鼓楼临床医学院肝胆外科,南京 210008

作者简介:史宇泽,男,博士研究生;

孙倍成,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: sunbc@ahmu.edu.cn

quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 所需的快速 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、高灵敏性染料法定量 PCR 检测试剂盒购自南京诺唯赞公司; 3-羟基丁酸脱氢酶 1 (3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1, BDH1)、 β -actin 及相对应的二抗购自武汉三鹰公司; 细胞培养板、Transwell 小室购自美国康宁公司; 其他实验所需的细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)、结晶紫染液、苏木素染液、EdU 检测试剂盒购自南通碧云天生物技术公司; 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物科技有限公司; 中性甲醛固定液来自武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病例资料 本研究使用的临床样本来自南京大学医学院附属鼓楼医院(40例)行 HCC 手术治疗的患者。组织离体后对肿瘤组织及距肿瘤边缘 > 2 cm 的癌旁组织进行取样,一部分置于液氮以备提取蛋白及 RNA; 一部分置于中性甲醛固定液以备制作石蜡切片。所有样本的使用均获得患者的知情同意,同时获得鼓楼医院伦理委员会审核批准。

1.2.2 RT-qPCR 取上述收集的液氮保存的临床样本,按照说明书使用诺唯赞公司提供的 RNA 快速提取试剂盒提取各组临床样本组织 RNA; 测定 RNA 浓度后,实行逆转录,使用 ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix 进行 qPCR。所使用的引物序列如下: BDH1 5'-GACAGCCTAAACAGTGACCGA-3', 3'-GACCGACAATCTCCACCA-5'; β -actin 5'-CATGTACG-TTGCTATCCAGGC-3', 3'-CTCCTTAATGTCACGCAC-GAT-5'。

1.2.3 组织(细胞)蛋白提取及蛋白质印迹实验(Western blot, WB) 取上述收集的液氮保存的临床样本或肿瘤细胞系,向其加入已添加磷酸酶抑制、蛋白酶抑制剂的 Western 及 IP 裂解液,冰上裂解 30 min 后以 12 000 r/min 离心 15 min 收集上清液。使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,加 5 × loading buffer, 95 °C 金属浴 5 min 后将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离后转至 PVDF 膜,5% BSA 封闭 2 h 后孵育目的一抗 4 °C 摇床过夜。洗去一抗后常温孵育相应二抗 2 h, TBST 洗脱后显影。

1.2.4 免疫组织化学染色 将组织切片置于 60 °C 烘箱 1 h 进行脱蜡后进一步水化: 二甲苯 15 min × 2, 100% 无水乙醇 5 min × 2, 95% 乙醇 5 min, 90% 乙醇 5 min, 85% 乙醇 5 min, 75% 乙醇 5 min, 50% 乙醇 5 min; PBS 清洗 5 min 后使用枸橼酸钠(pH 6.0)进

行微波抗原修复(微波炉高火 2 min, 低火 15 min)。按照说明书使用福州迈新生物科技有限公司提供的免疫组化染色试剂盒进行后续染色。染色完成后行 DAB 显色,苏木精染核后逆向进行梯度乙醇及二甲苯脱水,中性树脂封片。

1.2.5 细胞转染 将 BDH1 的基因序列插入 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 载体中构建 BDH1 过表达质粒,该质粒模版购自森灵生物。使用 Lipofectamine 3000 对 293T 细胞进行转染,48 h 后收集上清液转染 6 孔板内的 Hep3B,使用嘌呤霉素(1 μ g/ml)筛选转染成功的细胞。将 Hep3B pCDH 细胞定义为对照组,过表达 BDH1 的细胞 Hep3B BDH1 + 定义为实验组。

1.2.6 CCK-8 实验及 EdU 染色实验 对于 CCK-8 实验 2×10^3 细胞接种于 96 孔板中,每个孔加入 10 μ l CCK-8 溶液置于培养箱 1 h 后测量。在相对应的时间点使用酶标仪在 450 nm 测定吸光度。对于 EdU 实验 1×10^5 细胞接种于 24 孔板中,次日细胞贴壁后按照说明书使用南通碧云天生物技术公司提供的 EdU 检测试剂盒进行 EdU 染色及 DAPI 染色,染色完成后于荧光显微镜下观察拍照。

1.2.7 平板克隆实验 取对数期生长的细胞 1×10^3 细胞接种于 6 孔板中,培养箱培养 10 ~ 14 d(每隔 4 d 对其进行换液),中性多聚甲醛固定细胞 20 min 后,结晶紫染色后显微镜下拍照、计数。

1.2.8 细胞划痕实验 1×10^6 细胞接种于 6 孔板中,次日细胞贴壁伸展后,使用 200 μ l 枪头对细胞进行划线拍照,24 h 后再次进行拍照,计算划痕宽度变化。

1.2.9 细胞侵袭实验 取对数期生长的细胞 2×10^5 细胞使用 200 μ l 无血清培养基重悬加入 Transwell 上室培养,下层加入 600 μ l 完全培养基。培养 48 h 后,用棉签将上室中的细胞轻轻擦去,结晶紫染色后显微镜下拍照、计数。

1.2.10 加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 及 Lasso 回归分析 WGCNA 分析根据基因的表达相似性将其划分为不同的模块,并与表型进行关联分析,最后识别感兴趣的基因集。基于 R 语言“WGCNA”软件包构建基于差异基因表达情况的加权共表达网络。分别定义基因显著性(gene significance, GS)及基因与模块的相关性(module membership, MM)。GS 和 MM 的绝对值越大,代表基因与其所属模块以及临床表型的相关性越大。基于 R 语言软件中“glmnet”

软件包对差异基因进行 Lasso 回归分析,筛选 PD-1 免疫治疗敏感性的特征基因。lambda 增加,自由度和残差减少,因此选取最小 lambda 值。然后通过 glmnet 函数进行交叉检验,选择均方误差最小时的 lambda 值并输出图形。将 lambda 带入模型,筛选最终输出的变量作为 PD-1 免疫治疗敏感性的特征基因。

1.3 统计学处理 所有实验均独立重复 3 次,使用 Prism 9 软件统计分析,统计结果使用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 Student's *t* 检验和单因素方差分析(ANOVA)对两组或多组数据进行分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 对 GSE202069 及 ERP117672 数据集进行 WGCNA 及差异性分析 选取于南京大学医学院附属鼓楼医院接受 PD-1 治疗的 17 例 HCC 患者数据集(GSE202069),其中包括 8 例应答者及 9 例无应答者。此外,从数据库中选取了一项来自韩国的

数据集(ERP117672),包括 6 例应答者和 34 例无应答者。随后对两个数据集进行 WGCNA 分析以确定共表达模块,并构建他们与 PD-1 免疫治疗应答率的联系。对于 GSE202069 软阈值功率设定为 6,筛选出 12 个共表达模块;ERP117672 软阈值功率设定为 6,筛选出 16 个共表达模块。模块-特征相关性分析热图显示每个模块与 PD-1 免疫治疗应答率之间的关系。其中棕色模块中基因与 PD-1 免疫治疗的相关性最高(GSE202069: $r = 0.72$; ERP117672: $r = 0.52$) ,且棕色模块中基因与 PD-1 免疫治疗敏感性呈正相关(GSE202069: $r = 0.80$, $P = 7e - 180$,图 1A、B 和 ERP117672: $r = 0.57$, $P = 1.7e - 81$,图 1D、E)。通过差异性分析,数据集(GSE202069)中筛选出 4 224 个差异基因,其中 2 714 个上调,1 510 个下调(图 1C);而数据集(ERP117672)中筛选出 1 550 个差异基因,其中 667 个上调,883 个下调(图 1F)。将上述 4 个基因簇进行交叉分析,获得 118 个与 PD-1 免疫治疗敏感性相关的共表达基因(图 1G)。

2.2 Lasso 回归、基因集变异分析及生存分析 将

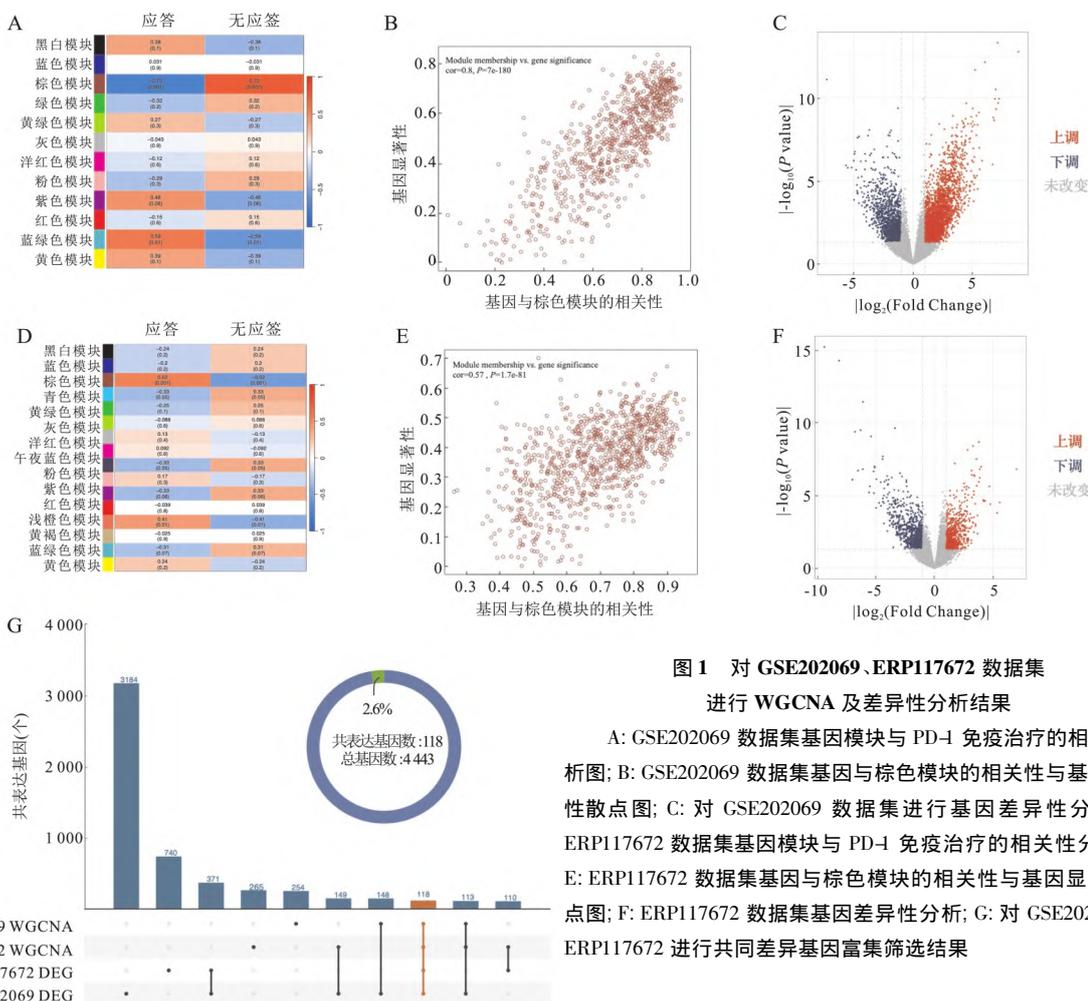


图 1 对 GSE202069、ERP117672 数据集进行 WGCNA 及差异性分析结果

A: GSE202069 数据集基因模块与 PD-1 免疫治疗的相关性分析图; B: GSE202069 数据集基因与棕色模块的相关性与基因显著性散点图; C: 对 GSE202069 数据集进行基因差异性分析; D: ERP117672 数据集基因模块与 PD-1 免疫治疗的相关性分析图; E: ERP117672 数据集基因与棕色模块的相关性与基因显著性散点图; F: ERP117672 数据集基因差异性分析; G: 对 GSE202069 和 ERP117672 进行共同差异基因富集筛选结果

上述 118 个共表达基因作为预测变量 ,并进一步通过 Lasso 回归进行筛选(图 2A、B)。通过连续拟合模型寻找最佳预测值 ,在 Lasso 回归中 ,入围了 6 个 PD-1 免疫治疗应答率预测基因 ,包括 *FMO3*、*PECR*、*BDHI*、*SLC7A1*、*CYB5A* 和 *PCK1*。ROC 曲线用于预测 Lasso 回归模型的性能 ,使用 AUC 值来评估预测模型 ,6 基因模型被认为是一个完美的预测模型

(AUC = 1 ,图 2C)。此外 ,高表达水平和低表达水平组的 PD-1 免疫治疗应答率存在显著差异(图 2D)。以上结果证实筛选的 6 个基因表达水平与 HCC 中 PD-1 免疫治疗应答存在相关性。随后通过数据库(GSE14520) 进行生存分析 ,发现其中 *BDHI* 与 HCC 的预后存在最具差异的相关性(图 2F ~ J) (*BDHI*: $P_{\text{总体生存率}} < 0.001$, $P_{\text{复发}} = 0.007$)。

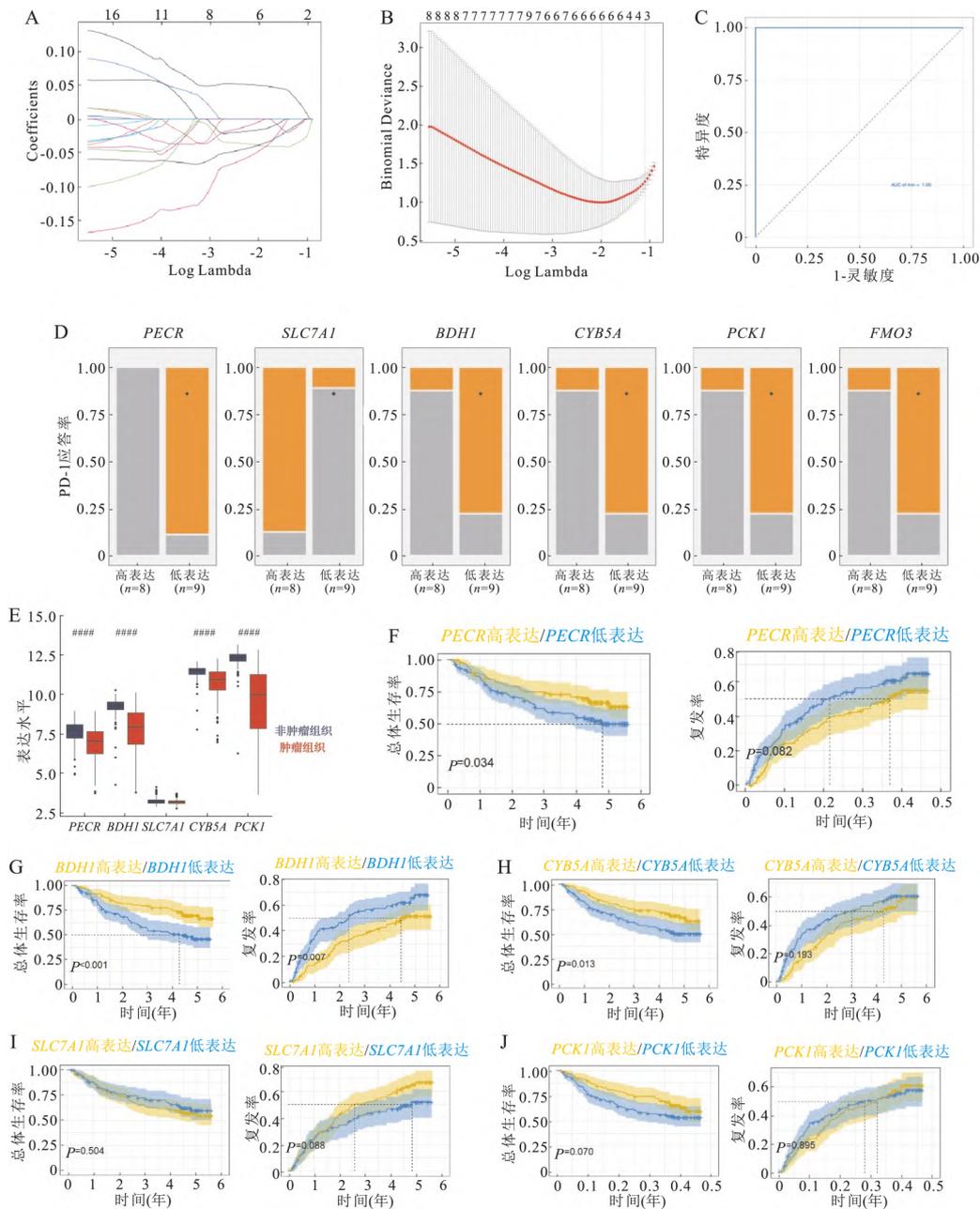


图 2 Lasso 回归、基因集变异分析及生存分析

A: Lasso 回归的交叉验证图; B: Lasso 最佳调谐参数选择图; C: Lasso 回归的 ROC 曲线预测; D: 高表达组与低表达组 PD-1 免疫治疗应答率的比较; 灰色: 应答; 黄色: 无应答; 与高表达组比较: * $P < 0.05$; E: GSE14520 数据集中非肿瘤组织与肿瘤组织中 *PECR* 等基因表达水平比较; 与非肿瘤组织比较: #### $P < 0.0001$; F ~ J: GSE14520 数据集中根据 *PECR*、*BDHI*、*SLC7A1*、*CYB5A* 和 *PCK1* 表达水平进行生存分析

2.3 *BDHI* 在 HCC 中的表达水平 运用 GEPIA 及 Ualcan 数据库分析癌组织与癌旁组织或正常肝组织中 *BDHI* 的表达情况 结果显示 ,与癌旁组织或正常肝组织相比 ,癌组织 *BDHI* 表达水平降低 ($P < 0.0001$; 图 3A、B)。Ualcan 数据库分析正常肝组织与不同分化程度 HCC 样本中 *BDHI* 的表达情况 结果显示 ,与正常肝组织相比 ,其余各组 *BDHI* 表达水平降低 ($P < 0.0001$; 图 3C)。检测本中心 40 例 HCC 和对应的癌旁组织中 *BDHI* 的蛋白及 mRNA

表达水平 ,结果显示 ,与癌旁组织相比 ,癌组织 *BDHI* 蛋白及 mRNA 水平下降 ($t_{mRNA} = 4.791, P < 0.0001$; $t_{蛋白} = 9.096, P < 0.0001$; 图 3D、F)。免疫组织化学染色的结果亦显示 *BDHI* 的表达水平在 HCC 组织中下降(图 3E)。

2.4 过表达 *BDHI* 对 HCC 细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响 构建稳定过表达 *BDHI* 的人肝癌 Hep3B 细胞系 并通过 WB 对其进行验证(图 4A)。CCK-8 实验结果显示 ,实验组吸光度值低于对照组

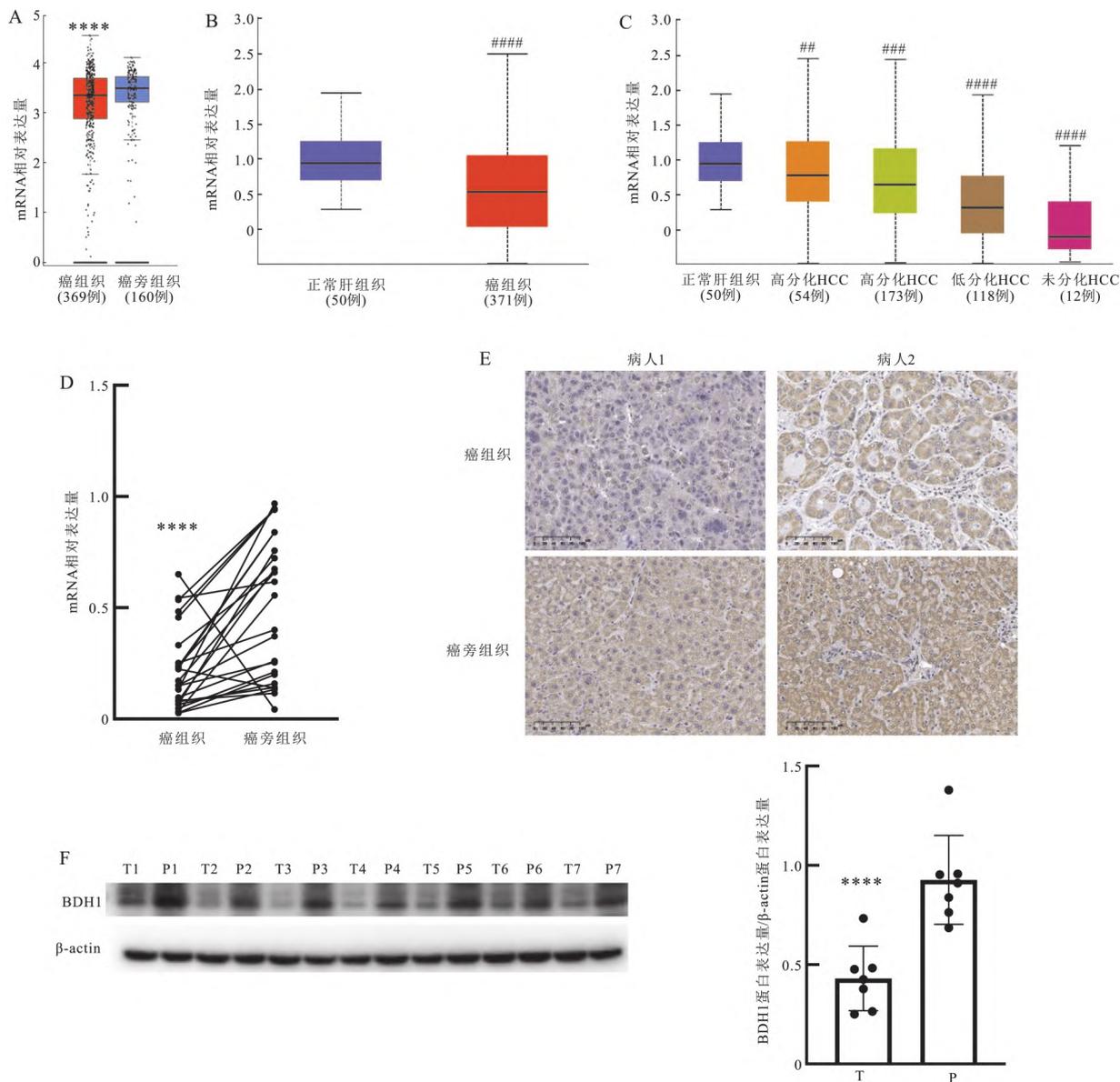


图3 *BDHI* 在 HCC 中表达情况

A: GEPIA 数据库中 *BDHI* 在癌组织和癌旁组织的表达水平; B: Ualcan 数据库中 *BDHI* 在正常肝组织和癌组织的表达水平; C: Ualcan 数据库中 *BDHI* 在不同分化程度 HCC 组织中的表达水平; D: RT-qPCR 检测配对癌组织和癌旁组织中 *BDHI* mRNA 表达水平(40 例); E: IHC 实验检测配对癌组织和癌旁组织临床样本石蜡切片中 *BDHI* 的表达水平 $\times 20$; F: WB 检测临床样本中 *BDHI* 的蛋白表达灰带图及统计图; T: 癌组织; P: 癌旁组织; 1~7: 标本序号; 与癌旁组织比较: $**** P < 0.0001$; 与正常肝组织比较: $## P < 0.01, ### P < 0.001, **** P < 0.0001$

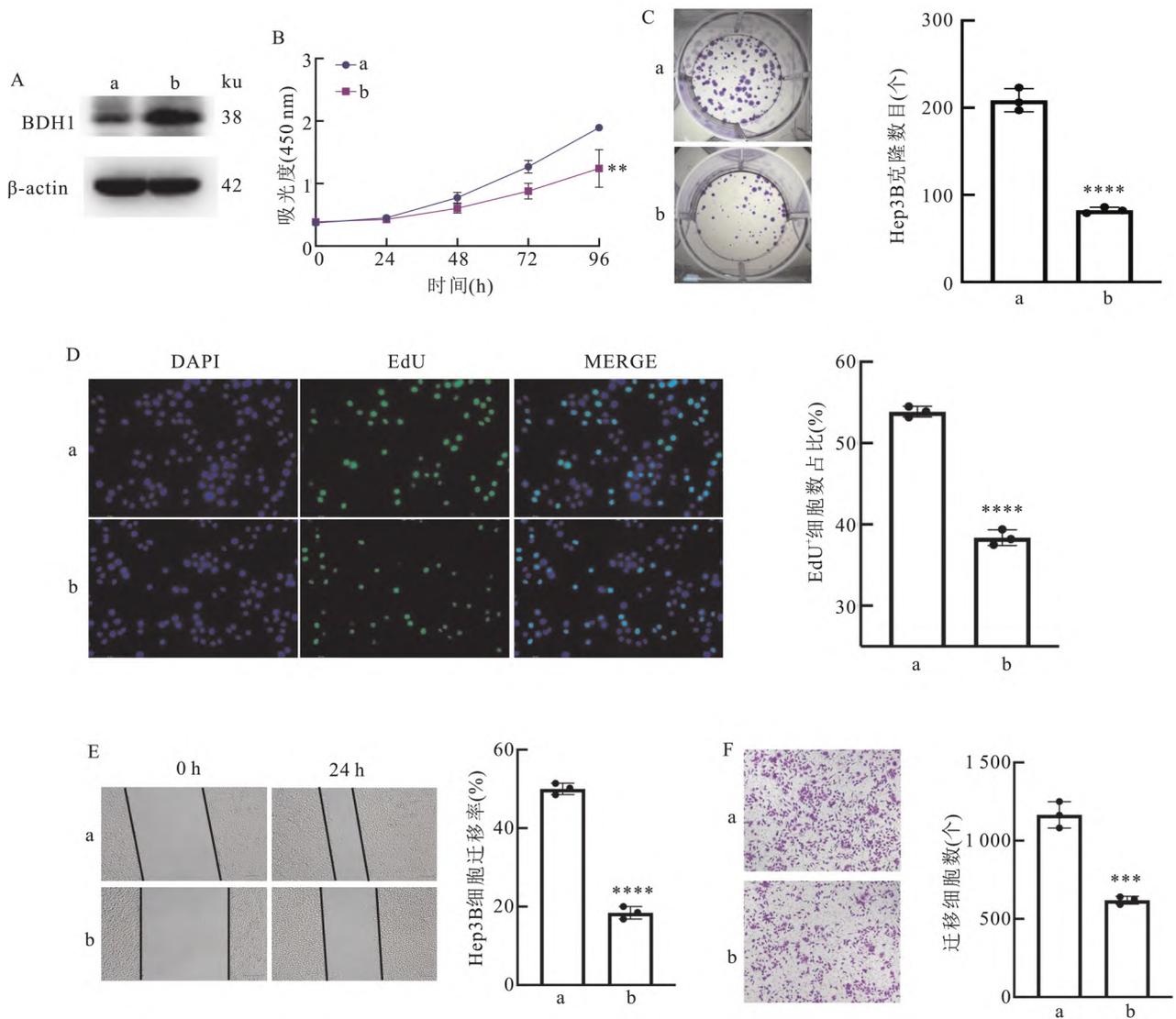


图4 过表达BDHI对HCC细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响

A: WB实验验证Hep3B细胞过表达BDHI; B: CCK-8检验两组细胞增殖能力; C: 平板克隆实验检验两组细胞增殖能力 结晶紫染色; D: EdU实验检验两组细胞增殖能力 ×20; E: 细胞划痕实验检验两组细胞迁移能力 ×10; F: Transwell实验检验两组细胞侵袭能力 结晶紫染色 ×10; a: Hep3B pCDH组; b: Hep3B BDHI组; 与Hep3B pCDH组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

($t = 4.766, P < 0.01$; 图4B)。平板克隆实验结果显示,实验组细胞克隆数低于对照组($t = 16.02, P < 0.0001$; 图4C)。EdU实验结果显示,实验组增殖细胞比例低于对照组($t = 23.13, P < 0.0001$; 图4D)。划痕实验结果显示,实验组划痕愈合速度较对照组降低(图4E)($t = 25.28, P < 0.0001$; 图4E)。Transwell实验结果显示实验组穿过小室的细胞数目较对照组减少($t = 10.78, P = 0.004$; 图4F)。

3 讨论

肝癌的发生发展是多诱因、复杂的免疫微环境

导致的结果,伴有高度异质性。靶向治疗和系统化疗是晚期不可切除HCC的主要疗法,但疗效有限,因此探索新的治疗方式、筛选新的分子靶点以优化肝癌的临床诊疗仍显得至关重要^[5-6]。

免疫疗法的不断深入探究使其展现出广阔的临床应用前景,但免疫治疗敏感性的问题依然困扰着广大医务工作者及科研研究人员^[4,7]。目前认为与免疫治疗敏感性相关的生物标志物包括PD-L1表达水平、高度微卫星不稳定性和错配修复缺陷和肿瘤突变负荷等^[8]。本研究通过WCGNA、差异性分析以及Lasso回归筛选与PD-1免疫治疗敏感性的

特征基因,包括 *FMO3*、*PECR*、*BDHI*、*SLC7A1*、*CYB5A* 和 *PCK1*,但由于 *FMO3* 和多数免疫细胞浸润无显著相关性,在后续的生存分析中将其剔除。

生存分析及体外实验确定了以 *BDHI* 为核心的 PD-1 免疫治疗敏感性的研究方向。*BDHI* 是重要的酮体代谢调节分子,参与酮类物质的合成降解及丁酸的代谢过程^[9]。文献报道 *BDHI* 在肝癌中的表达下降,发挥抑癌基因的功能,与肝癌的不良预后相关^[10]。*BDHI* 的表达与肝癌细胞癌组织分化级别、肿瘤直径、肿瘤数目、微血管侵犯及 TNM 分期均显著相关^[11]。*BDHI* 还具有氧化还原酶活性和 3-羟基丁酸脱氢酶活性,可以作为心衰早期的检测标志物。心功能衰竭时,心肌特异性 *BDHI* 过表达可以增加酮体代谢,改善心肌细胞的氧化应激反应^[12]。*BDHI* 在不同肿瘤发生发展中的作用尚不清晰,肿瘤功能学实验发现 *BDHI* 具有抑制肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭的能力,但其具体机制尚不清晰,此外肿瘤细胞 *BDHI* 通过何种方式影响免疫细胞如 T 细胞、NK 细胞尚亦是未知的,值得学者进一步探索。

综上所述,该研究确定了 HCC 患者对 PD-1 治疗敏感性的特征基因 *BDHI*,围绕 *BDHI* 为核心进一步研究有助于筛选优势获益人群,实现精确、个体化的治疗。

参考文献

[1] Toh M R, Wong E Y T, Wong S H, et al. Global epidemiology and genetics of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(5): 766–82.

[2] Llovet J M, Kelley R K, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6.

[3] Tang W, Chen Z, Zhang W, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Theoretical basis and therapeutic aspects [J]. *Signal Transduct Target Ther* 2020, 5(1): 87.

[4] Llovet J M, Castet F, Heikenwalder M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3): 151–72.

[5] Ladd A D, Duarte S, Sahin I, et al. Mechanisms of drug resistance in hcc [J]. *Hepatology*, 2024, 79(4): 926–40.

[6] Lee Y T, Fujiwara N, Yang J D, et al. Risk stratification and early detection biomarkers for precision hcc screening [J]. *Hepatology*, 2023, 78(1): 319–62.

[7] Donne R, Lujambio A. The liver cancer immune microenvironment: Therapeutic implications for hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2023, 77(5): 1773–96.

[8] Zhu Y, Chen M, Xu D, et al. The combination of pd-1 blockade with interferon- α has a synergistic effect on hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(6): 726–37.

[9] Stagg D B, Gillingham J R, Nelson A B, et al. Diminished ketone interconversion, hepatic tea cycle flux, and glucose production in d- β -hydroxybutyrate dehydrogenase hepatocyte-deficient mice [J]. *Mol Metab*, 2021, 53: 101269.

[10] Liu Z, Li Y, Liu Y, et al. Expression and clinical significance of *bdh1* in liver cancer [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(48): e28013.

[11] 唐津天, 薛峰, 佟庆, 等. 新标志物 *BDHI* 用于肝细胞癌术后生存的预测价值分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, (17): 3361–5.

[12] Uchihashi M, Hoshino A, Okawa Y, et al. Cardiac-specific *bdh1* overexpression ameliorates oxidative stress and cardiac remodeling in pressure overload-induced heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2017, 10(12): e004417.

Target gene analysis of PD-1 immunotherapy sensitivity in hepatocellular carcinoma

Shi Yuze^{1,2}, Ding Ke^{2,3}, Sun Beicheng^{1,2,3}

(¹Dept of Hepatobiliary Surgery, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008; ²Dept of Hepatobiliary Pancreatic and Transplantation Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ³Dept of Hepatobiliary Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210008)

Abstract Objective To investigate the characteristic genes of Programmed cell death protein 1 (PD-1) immunotherapy sensitivity in Hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The common differential genes in GSE202069 and ERP117672 data sets were investigated by Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) and Difference analysis, and the characteristic genes of PD-1 immunotherapy sensitivity were screened through Lasso

(下转第 1338 页)

mesenchymal transition (EMT) were investigated using colony formation assays, cell counting kit-8 (CCK-8) assays, wound healing assays, Transwell assays, and flow cytometry. A mouse model of cholangiocarcinoma was constructed to assess GPX2 expression in mouse cholangiocarcinoma tissues. **Results** Based on the analysis results from the Omicshare website, *GPX2* was generally upregulated in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) ($P < 0.001$). Western blot ($P < 0.0001$), RT-qPCR ($P < 0.001$), and immunohistochemistry experiments showed that, compared to adjacent non-cancerous tissues, the expression of GPX2 was significantly elevated in ICC. When GPX2 was knocked down, the colony formation rate of cells decreased significantly ($P < 0.01$), and the proliferation capacity was reduced ($P < 0.001$). Conversely, overexpression of GPX2 led to a significant increase in colony formation rate ($P < 0.01$) and enhanced proliferation capacity ($P < 0.01$). Results from wound healing and Transwell assays demonstrated that GPX2 knockdown slowed down cell wound healing ($P < 0.01$) and reduced migration ability ($P < 0.01$). Additionally, GPX2 knockdown resulted in an increase in E-cadherin ($P < 0.01$) and a decrease in N-cadherin ($P < 0.01$) and Vimentin ($P < 0.05$). On the other hand, overexpression of GPX2 accelerated wound healing ($P < 0.05$) and enhanced migration ability ($P < 0.05$), while E-cadherin expression decreased ($P < 0.05$) and N-cadherin ($P < 0.01$) and Vimentin ($P < 0.001$) expression increased. Flow cytometry for apoptosis and Western blot experiments indicated that GPX2 knockdown increased the apoptosis rate ($P < 0.001$), decreased the expression of Bcl-2 ($P < 0.001$), and increased the expression of BAX ($P < 0.01$). But overexpression of GPX2 reduced the apoptosis rate ($P < 0.01$), increased Bcl-2 expression ($P < 0.0001$), and decreased BAX expression ($P < 0.001$). Finally, elevated levels of GPX2 were observed in a mouse model of cholangiocarcinoma. **Conclusion** GPX2 is highly expressed in human and mouse cholangiocarcinoma tissues, and it may enhance cholangiocarcinoma cell proliferation and migration, promote tumor cell EMT, and inhibit tumor cell apoptosis.

Key words intrahepatic cholangiocarcinoma; GPX2; proliferation; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition

(上接第 1329 页)

regression. The expression levels of characteristic genes in HCC were predicted by GEPIA and Ualcan databases, and their expression was verified by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), Western blot (WB) and Immunohistochemistry (IHC). 3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1 (*BDHI*) overexpressed cell line was constructed, followed by cell counting kit-8 (CCK-8), EdU, cell scratches and Transwell experiment to investigate the effects of *BDHI* on the proliferation, migration and invasion of HCC cells. **Results** Total of 118 common differentially expressed genes were identified in two datasets by WGCNA and differential analysis. The characteristic genes associated with PD-1 immunotherapy sensitivity screened through Lasso regression including Flavin containing dimethylaniline monooxygenase 3 (*FMO3*), Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase (*PECR*), *BDHI*, Solute carrier family 7 member 1 (*SLC7A1*), Cytochrome b5 type A (*CYB5A*) and Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*PCK1*). Survival analysis showed that *BDHI* was most associated with HCC (Overall survival: $P < 0.001$, Recurrence: $P = 0.007$). GEPIA and Ualcan databases showed low expression of *BDHI* in HCC tissues, while RT-qPCR, WB, and IHC further confirmed this. CCK-8, plate cloning assay, EdU staining, cell scratch, and Transwell experiments showed that compared with the Hep3B pCDH group, overexpression of *BDHI* resulted in a decrease in the absorbance of HCC cells ($t = 4.766$, $P < 0.01$), a decrease in the number of clone formation ($t = 16.02$, $P < 0.0001$), a decrease in the proportion of proliferating cells ($t = 23.13$, $P < 0.0001$), a decrease in cell migration rate ($t = 25.28$, $P < 0.0001$), and a decrease in the number of small compartments ($t = 10.78$, $P = 0.004$). **Conclusion** *BDHI* is a characteristic gene for observing the sensitivity of PD-1 immunotherapy in HCC patients. *BDHI* could inhibit the proliferation, migration, and invasion ability of HCC cells *in vitro*.

Key words hepatocellular carcinoma; PD-1 immunotherapy; *BDHI*; tumor function experiment