



MUTYH-APEX1轴调控细胞周期蛋白促进肝细胞癌进展及治疗耐药的研究*

周艳杰^{ID}, 张 禾, 朱亚兰, 蒋鹏骏, 丰天宇, 吴 臻, 陈 捷^{ID}[△]

四川大学华西医院 实验医学科 临床检验医学研究中心, 四川省医学检验临床医学研究中心(成都 610041)

【摘要】目的 探讨mutY同源物(mutY homolog, *MUTYH*)基因在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达情况、预后价值及潜在作用机制, 分析其作为HCC新型生物标志物和治疗靶点的临床转化潜力。**方法** 通过TCGA、GEO数据库对比*MUTYH*在HCC与正常组织中的表达差异, 并分析其与临床病理参数、*TP53*突变、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)诊断效能及索拉非尼耐药性的关系; 通过Kaplan-Meier法和log-rank检验进行生存分析评估预后影响, 采用单变量和多变量Cox比例风险回归模型分析其独立预后价值; 通过GO、KEGG、GSEA富集分析和PPI网络解析其分子机制; 利用CIBERSORT算法和BEST数据库分析*MUTYH*与免疫细胞浸润、免疫检查点抑制剂疗效的关系; 采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)验证*MUTYH*和其核心关联分子在HCC组织与正常组织中的表达差异。**结果** *MUTYH*在HCC组织中异常高表达($P<0.05$), 临床样本检测证实其可作为诊断HCC的生物标志物[曲线下面积(area under the curve, AUC)=0.824, 95%置信区间(confidence interval, CI): 0.762 ~ 0.886, $P<0.001$], 其在低AFP表达的HCC亚组中仍表现出较高的诊断价值(GSE25097: AUC=0.716, $P<0.001$; GSE63898: AUC=0.624, $P<0.001$)。 *MUTYH*高表达与索拉非尼耐药相关($P<0.05$), 且是影响患者总生存期的独立危险因素[风险比(hazard ratio, HR): 1.92, $P<0.05$]。功能富集分析表明*MUTYH*参与细胞周期调控等信号通路, 并与脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1 (apurinic/aprimidinic endonuclease 1, *APEX1*)表达呈正相关(GSE157142: $r=0.83$, $P<0.05$), 可能通过调控G₁/S期关键分子(细胞周期蛋白依赖性激酶 4, 细胞周期蛋白依赖性激酶 7, 细胞周期蛋白 E2)促进细胞周期进程。免疫浸润分析显示*MUTYH*与肿瘤微环境中多种免疫细胞水平相关, 并能有效预测抗PD-1/PD-L1治疗响应(IMvigor210队列和Cho2020队列AUC分别为0.637和0.782), 但与抗CTLA-4治疗无统计学关联。**结论** HCC中*MUTYH*表达显著升高, 分析发现*MUTYH*可通过调控*APEX1*及细胞周期关键分子促进HCC发展; 其诊断与预后评估效能优于传统标志物AFP, 并与患者抗PD-1/PD-L1治疗响应、索拉非尼耐药性相关。综上, *MUTYH*有潜力成为HCC新型生物标志物及治疗靶点。

【关键词】 *MUTYH* *APEX1* 细胞周期调控 肝细胞癌 生物标志物

MUTYH-APEX1 Axis Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression and Therapeutic Resistance by Regulating Cell Cycle Proteins

ZHOU Yanjie^{ID}, ZHANG He, ZHU Yalan, JIANG Pengjun, FENG Tianyu, WU Zhen, CHEN Jie^{ID}[△].
Department of Laboratory Medicine, Clinical Laboratory Medicine Research Center, West China Hospital, Sichuan University & Sichuan Clinical Research Center for Laboratory Medicine, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: chenjiewch@wchscu.cn

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82372319, No. 81401666, and No. 81873979) and the West China Hospital of Sichuan University AI 1-3-5 Project (No. ZYAI24002).

[Abstract] Objective To investigate the expression pattern, prognostic significance, and underlying molecular mechanisms of mutY homolog (*MUTYH*) in hepatocellular carcinoma (HCC), and to evaluate its clinical potential as a novel biomarker and therapeutic target. **Methods** The differential expression of *MUTYH* between HCC and normal tissues was compared using the TCGA and GEO databases. Associations with clinicopathological parameters, *TP53* mutation status, diagnostic efficacy of alpha-fetoprotein (AFP), and sorafenib resistance were analyzed. Prognostic impact was evaluated using the Kaplan-Meier method with the log-rank test, and univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models were used to verify its independent prognostic value. Molecular mechanisms were explored through GO, KEGG, and GSEA enrichment analyses as well as protein-protein interaction (PPI) network construction.

* 国家自然科学基金项目(No. 82372319、No. 81401666和No. 81873979)和四川大学华西医院人工智能1-3-5工程项目(No. ZYAI24002)资助

[△] 通信作者, E-mail: chenjiewch@wchscu.cn

The correlations of *MUTYH* with immune cell infiltration and the immunotherapeutic efficacy of immune checkpoint inhibitors were assessed using the CIBERSORT algorithm and the BEST database. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed to validate the expression differences of *MUTYH* and its core interacting molecules between HCC and normal tissues. **Results** *MUTYH* was significantly upregulated in HCC ($P < 0.05$), clinical sample tests have confirmed that it can serve as a biomarker for diagnosing HCC (area under the curve [AUC] = 0.824, 95% CI: 0.762-0.886, $P < 0.001$), its diagnostic value remains high even in the HCC subgroup with low AFP expression (GSE25097, AUC = 0.716, $P < 0.001$; GSE63898, AUC = 0.624, $P < 0.001$). High *MUTYH* expression correlated with sorafenib resistance ($P < 0.05$) and was an independent risk factor for poor overall survival (hazard ratio [HR] = 1.92, $P < 0.05$). Mechanistically, *MUTYH* was positively associated with apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APEX1) ($r = 0.83$, $P < 0.05$), potentially facilitating G₁/S transition by modulating cyclin-dependent kinase 4, cyclin-dependent kinase 7, and cyclin E2. Immune analysis identified *MUTYH* as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 response (IMvigor210 AUC = 0.637; Cho2020 AUC = 0.782), though no association was found with anti-CTLA-4 therapy. **Conclusion** *MUTYH* is significantly overexpressed in HCC and may promote HCC progression by regulating *APEX1* and key cell cycle molecules. Compared with the conventional marker AFP, *MUTYH* demonstrates superior diagnostic and prognostic evaluation efficacy and is associated with anti-PD-1/PD-L1 therapeutic response and sorafenib resistance. Overall, *MUTYH* has potential as a novel biomarker and therapeutic target for HCC.

[Key words] *MUTYH* *APEX1* Cell cycle regulation Hepatocellular carcinoma Biomarker

肝细胞癌(liver hepatocellular carcinoma, HCC)是一种高死亡率的原发性肝癌^[1]。我国HCC患者的5年生存率仅为14%,术后5年复发率高达70%^[2]。近年来,基因测序和大数据分析技术的发展为探究肝细胞癌的分子发病机制和寻找新型预后分子标志物开辟了新途径。

氧化应激是HCC发生发展的重要机制^[3],可导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多,引起DNA损伤,影响细胞增殖相关通路的调控,从而促进肿瘤发生发展^[4]。8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-oxo-dG)是活性氧自由基攻击DNA分子中的鸟嘌呤碱基第8位碳原子而产生的一种氧化性加合物^[5],会诱导基因突变,促进肿瘤形成^[6]。人MutY同源物(*MUTYH*)基因编码与8-羟基鸟嘌呤糖基化酶(8-oxoguanine glycosylase 1, OGG1)互相协作,共同完成8-oxo-dG的修复,通过切除与8-oxo-dG配对的腺嘌呤,从而有效抑制8-oxoG诱导的突变^[7]。已有研究表明,*MUTYH*基因^[8-9]突变与结直肠癌、卵巢癌及乳腺癌的发生发展相关;但其在HCC这一氧化应激相关肿瘤中的表达与作用尚不明确。本研究旨在通过一系列生物信息学技术和qPCR试验验证,探究*MUTYH*表达与HCC发生发展之间的关系,为HCC的预后研究与分子医学研究提供新的理论支持。

1 资料与方法

1.1 数据库分析

通过多个数据库检索,确定*MUTYH*在不同组织器官和肿瘤内的表达水平。检索数据库包括:Consensus数据库、HPA数据库、GTEX数据库、FANTOM5数据库。从

TCGA数据库检索*MUTYH*基因在HCC患者和健康人中的表达情况及其临床信息,并导出数据。基于该数据集,将HCC患者和健康人按性别,年龄,种族,临床分期、分级,组织学分型,是否发生淋巴结转移和*TP53*突变进行分组,绘制柱形图和生存曲线,进行单因素和多因素Cox回归分析。HCC临床分期以美国肿瘤联合委员会(AJCC)发布的肝癌肿瘤分期标准第八版为标准,分级采用Edmondson-Steiner四级法。进一步利用GEO数据集(GSE25097、GSE63898)分析*MUTYH*及甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)在HCC与对照样本中的mRNA表达差异,并通过GSE109211、GSE14377数据集评估索拉非尼耐药性与*MUTYH*表达的相关性。本研究还纳入了GSE157142数据集,该数据集包含和野生型小鼠(*Mutyh*^{+/+}, $n = 3$)和*Mutyh*基因敲除小鼠(*Mutyh*^{-/-}, $n = 3$)的肝癌组织转录组测序数据,用于分析*Mutyh*缺失对基因表达及相关通路的影响。

1.2 蛋白质相互作用网络

利用STRING数据库(<https://string-db.org/>)在线检索*MUTYH*上下游蛋白的相互作用,分析对比每种蛋白的详细信息,并用Cytoscape软件绘制蛋白互作网络图。

1.3 GO分析、KEGG分析和GSEA分析

利用DAVID、KOBAS等在线工具对*MUTYH*基因进行基因本体富集(GO)分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)分析。使用“clusterProfiler”包进行基因集富集分析(GSEA)以识别富集通路,通路富集标准为:归一化富集评分(NES)的绝对值 > 1 , $P < 0.01$, 错误发现率(FDR) < 0.25 。

1.4 免疫浸润分析

从TCGA数据库收集了LIHC含有免疫表型评分的数据,通过CIBERSORT算法评估MUTYH高表达组和低表达组免疫细胞占比并绘制堆叠图和箱式图,分析HCC患者MUTYH基因表达和免疫细胞浸润的相关性。利用BEST数据库(https://rookieutopia.hipplot.com.cn/app_direct/BEST/)分析MUTYH表达与免疫检查点抑制剂(抗PD-L1、抗PD-1/PD-L1、抗CTLA-4)疗效的关联。

1.5 临床研究样本

收集2022年1月–2023年12月于四川大学华西医院确诊的18例HCC患者的肿瘤组织及癌旁正常组织(距肿瘤边缘>2 cm),所有样本均经病理证实,患者术前未接受放化疗。本研究经四川大学华西医院伦理委员会批准(批件号:20220301147)。本研究所有试验过程均严格遵照《国家卫生健康委员会关于涉及人的生物医学研究伦理审查办法》相关条例进行,所有受试对象或其法定监护人已签署书面知情同意书,同意其临床样本及相关信息用于本项科学研究。

1.6 实时荧光定量PCR (qPCR)

取冻存的肝癌组织及癌旁正常组织用TRIzol试剂提取总RNA,使用K2800核酸分析仪检测RNA浓度及吸光度比值(A_{260}/A_{280})。使用5× All-In-One MasterMix试剂盒对500 ng RNA进行反转录再进行qPCR检测。以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。提取组织或细胞总RNA,逆转录为cDNA,采用SYBR Green法进行qPCR。检测基因的引物购自上海生工生物公司,引物序列如下: MUTYH(Forward: 5'-GCCTGCTAAGCTGGTACGAC-3', Reverse: 5'-CTGCATCCATCCGGTATAGTAGT-3'); APEX1(上游: 5'-CAATACTGGTCAGCTCCTTCG-3', 下游: 5'-TGCCGTAAGAACTTTGAGTGG-3'); CDK4(Forward: 5'-ATGGCTACCTCTCGATATGAGC-3', Reverse: 5'-CATTGGGGACTCTCACACTCT-3'); CDK7(Forward: 5'-ATGGCTCTGGACGTGAAGTCT-3', Reverse: 5'-GCGACAATTTGGTTGGTGTTTC-3'); CCNE2(Forward: 5'-TCAAGACGAAGTAGCCGTTTAC-3', Reverse: 5'-TGACATCCTGGGTAGTTTTCTC-3'); β -actin(Forward: 5'-AATCTGGCACCACACCTTCTACAA-3', Reverse: 5'-GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3')。

1.7 统计学方法

采用R4.2.0软件进行数据分析。两组间表达差异比较采用独立样本 t 检验或配对 t 检验。多组间(如不同临床分期、病理分级)的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),并使用SNK检验进行事后两两比较。生存分

析采用Kaplan-Meier法和log-rank检验,进一步进行单变量和多变量Cox比例风险回归分析,纳入分析的患者特征包括性别、年龄、临床分期、病理分级及MUTYH mRNA表达水平(高/低表达,以中位数为临界值),使用“survival”和“rms”包进行生存相关分析,“ggplot2”用于图表绘制。通过Pearson相关分析探究基因间的表达相关性,采用Bonferroni法进行多重比较校正以控制I类错误。诊断效能通过受试者工作特征(ROC)曲线及曲线下面积(AUC)评估,采用Youden指数确定最佳临界值。

2 结果

2.1 MUTYH在HCC患者组织中表达升高

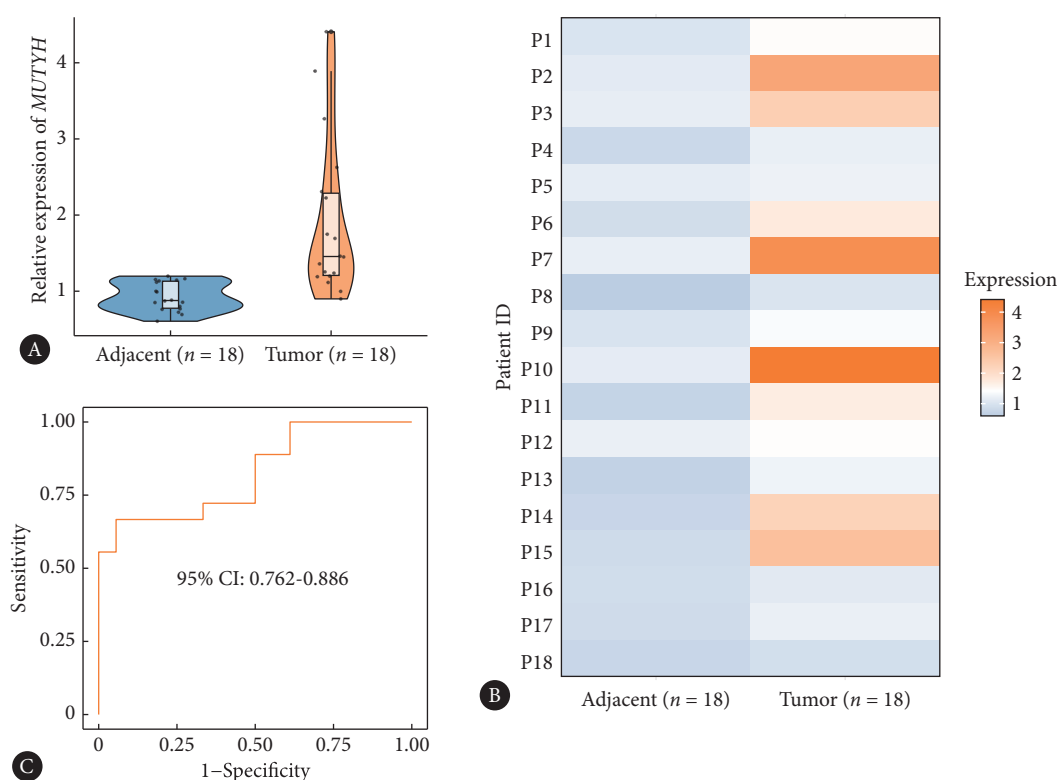
多数据库检索显示,MUTYH在多种正常组织中广泛表达,表达并无组织特异性,其在结直肠癌、卵巢癌、肺癌、肾癌组织中有较低表达,在肝癌组织中表达最高。TCGA分析结果显示,健康人MUTYH表达水平显著低于HCC患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MUTYH在HCC患者中的表达水平随肿瘤分级和年龄的升高而增高;HCC的临床分期在1~3期时,MUTYH表达水平随肿瘤临床分期升高而增高,在4期的患者中MUTYH表达水平有所下降,这有可能是标本数量过少($n=6$)引起的偏差;MUTYH表达水平与HCC患者的性别、种族、淋巴结转移差异无统计学意义;在TP53突变型的HCC和纤维板层状癌(fibrolamellar carcinoma, FLC)中,MUTYH也呈高表达。详见网络资源附件附图1。

2.2 MUTYH可作为HCC的诊断生物标志物

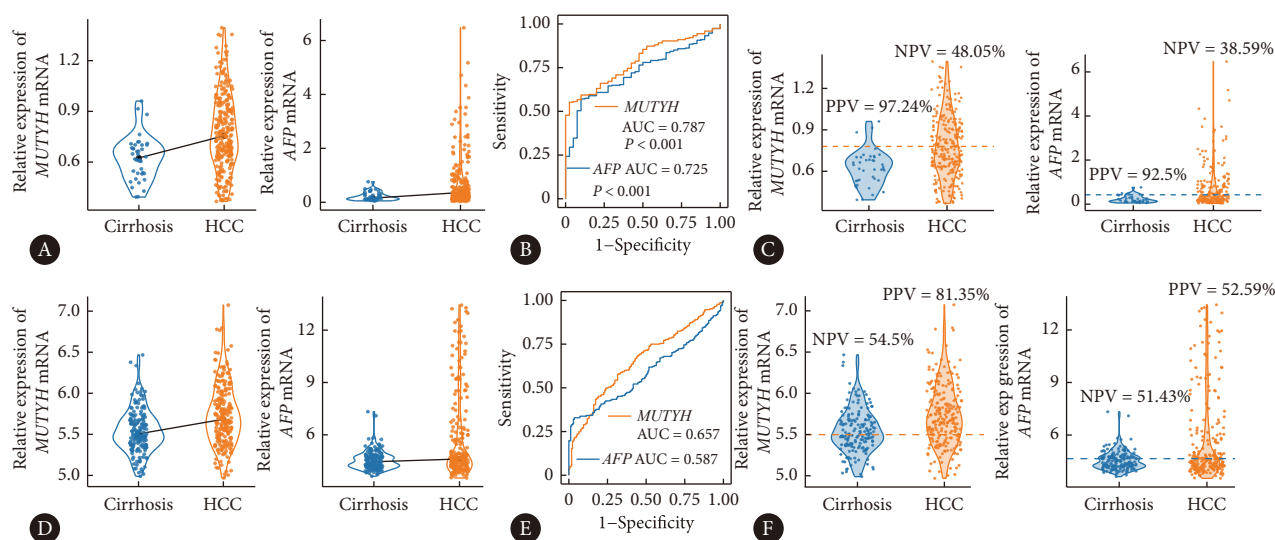
图1A显示,肿瘤组织中MUTYH mRNA表达水平高于癌旁正常组织($P < 0.001$)。热图分析结果进一步验证了该差异,绝大多数HCC样本中MUTYH的表达量高于对应正常组织(图1B)。假设MUTYH可作为HCC的诊断生物标志物,进一步通过ROC曲线(图1C)分析评估其诊断效能,发现MUTYH的AUC值为0.824[95%置信区间(confidence interval, CI): 0.762 ~ 0.886, $P < 0.001$],提示其对HCC具有诊断价值。

2.3 MUTYH在HCC诊断中的阳性预测值优于AFP

在GSE25097数据集中,与肝硬化组织相比,HCC组织中MUTYH和AFP的表达均明显上升(图2A)。ROC曲线分析(图2B)显示,MUTYH的AUC值为0.787(95%CI: 0.731 ~ 0.843, $P < 0.001$),优于AFP的AUC值0.725(95%CI: 0.668 ~ 0.782, $P < 0.001$)。通过ROC曲线的特异性和敏感性确定最佳临界值后发现,MUTYH与AFP的阴性预测值(NPV)分别为97.24%和92.5%,差异无统计学意义,但MUTYH的阳性预测值(PPV)为48.05%,显著高于AFP的

图1 *MUTYH*在HCC组织及癌旁组织中的表达及其诊断效能Fig 1 Expression and diagnostic performance of *MUTYH* in HCC and adjacent non-tumor tissues

A, The relative expression level of *MUTYH* mRNA in HCC tumor tissues was higher than in adjacent normal tissues ($P < 0.001$); B, heatmap diagram showing the difference in *MUTYH* mRNA expression between cancerous tissues and adjacent normal liver tissues; C, ROC curve of *MUTYH* for the diagnostic efficacy of hepatocellular carcinoma.

图2 *MUTYH*和AFP在HCC诊断中的阳性预测值Fig 2 The positive predictive value of *MUTYH* and AFP in HCC diagnosis

A, *MUTYH* and AFP expression in cirrhosis ($n = 40$) and HCC ($n = 268$) from GSE25097. B, ROC analysis of *MUTYH* and AFP for HCC vs. cirrhosis discrimination in GSE25097. C, Optimal cut-offs, PPV, and NPV for *MUTYH* and AFP based on Youden and G-mean indices (GSE25097). D, *MUTYH* and AFP expression in cirrhosis ($n = 168$) and HCC ($n = 228$) from GSE63898. E, ROC evaluation of *MUTYH* and AFP in distinguishing HCC from cirrhosis (GSE63898). F, Optimal thresholds, PPV, and NPV for *MUTYH* and AFP derived from Youden and G-mean indices (GSE63898).

38.59% (图2C), 提示*MUTYH*在诊断HCC方面较AFP更具敏感性。本研究进一步在GSE63898数据集中再次验证。

HCC组织的*MUTYH* mRNA水平仍显著高于肝硬化样本 (图2D)。ROC分析 (图2E) 显示, AFP的AUC值为

0.587(95%CI: 0.532 ~ 0.642, $P=0.003$), 低于 *MUTYH* 的 0.657(95%CI: 0.604 ~ 0.710, $P<0.001$)。此外, 两者的NPV相近, 但 *MUTYH* 的PPV(81.35%), 明显高于AFP(52.59%)(图2F)。上述结果均表明, 在区分HCC与肝硬化患者方面, *MUTYH* 是一个比AFP更敏感的诊断标志物。

2.4 *MUTYH* 在低AFP表达的HCC患者中具有更优的诊断效能

进一步在GSE25097和GSE63898数据集中评估了 *MUTYH* 在低AFP表达HCC患者中的诊断效能。结果(图3)显示, 低AFP表达HCC患者的 *MUTYH* 水平显著高于肝硬化患者, 两组AFP水平差异具有统计学意义, 但AFP的AUC值均未显示出统计学意义。与之相反, ROC曲线分析显示, 在低AFP亚组中 *MUTYH* 仍保持诊断效能(GSE25097: AUC=0.716, 95%CI: 0.664 ~ 0.768, $P<0.001$; GSE63898: AUC=0.624, 95%CI: 0.572 ~ 0.676, $P<0.001$)。这些数据表明, *MUTYH* 可有效诊断低AFP表达HCC患者, 是一种更好的诊断生物标志物。

2.5 *MUTYH* 高表达预示HCC患者预后不良

对TCGA数据库中371名HCC患者, 根据 *MUTYH* 的中位表达值分为高表达组和低表达组患者进行生存分析, 结果显示, *MUTYH* 高表达组的累积总生存率(OS)(图4A)

和无病生存率(DFS)(图4B)在5年内均低于低表达组, 差异均有统计学意义(log-rank检验 $P<0.05$)。即 *MUTYH* 表达水平越高的HCC患者预后越差。单因素Cox回归分析确定了病理分级G3[风险比(hazard ratio, HR): 2.49, 95%CI: 1.13 ~ 5.48, $P<0.05$]、临床分期Ⅲ~Ⅳ期(Ⅲ期HR: 2.37, 95%CI: 1.61 ~ 3.13; Ⅳ期HR: 4.87, 95%CI: 1.95 ~ 7.75, 均 $P<0.05$)及 *MUTYH* 高表达(HR: 1.52, 95%CI: 1.36 ~ 1.76, $P<0.001$)均为预后危险因素(图4C)。多因素Cox回归分析进一步(图4D)确认, 临床分期Ⅲ~Ⅳ期(Ⅲ期HR: 2.63, 95%CI: 1.68 ~ 4.11; Ⅳ期HR: 4.96, 95%CI: 1.48 ~ 11.40, 均 $P<0.001$)及 *MUTYH* 高表达(HR: 1.92, 95%CI: 1.10 ~ 4.94, $P<0.05$), 这进一步证实了 *MUTYH* 作为肝细胞癌潜在独立预后标志物的价值。

2.6 *MUTYH* 的蛋白质相互作用网络、功能通路解析及核心关联蛋白APEX1

STRING数据库构建的蛋白质相互作用网络(PPI)显示, *MUTYH* 与多种蛋白质存在直接或间接相互作用, 其中APEX1为核心相互作用蛋白, 其他还包括OGG1等重要蛋白。进一步的表达分析证实, *APEX1* 在HCC组织中显著高表达, 且与 *MUTYH* 的表达呈强正相关, 提示二者在HCC中可能存在功能协同。KEGG通路富集分析表明,

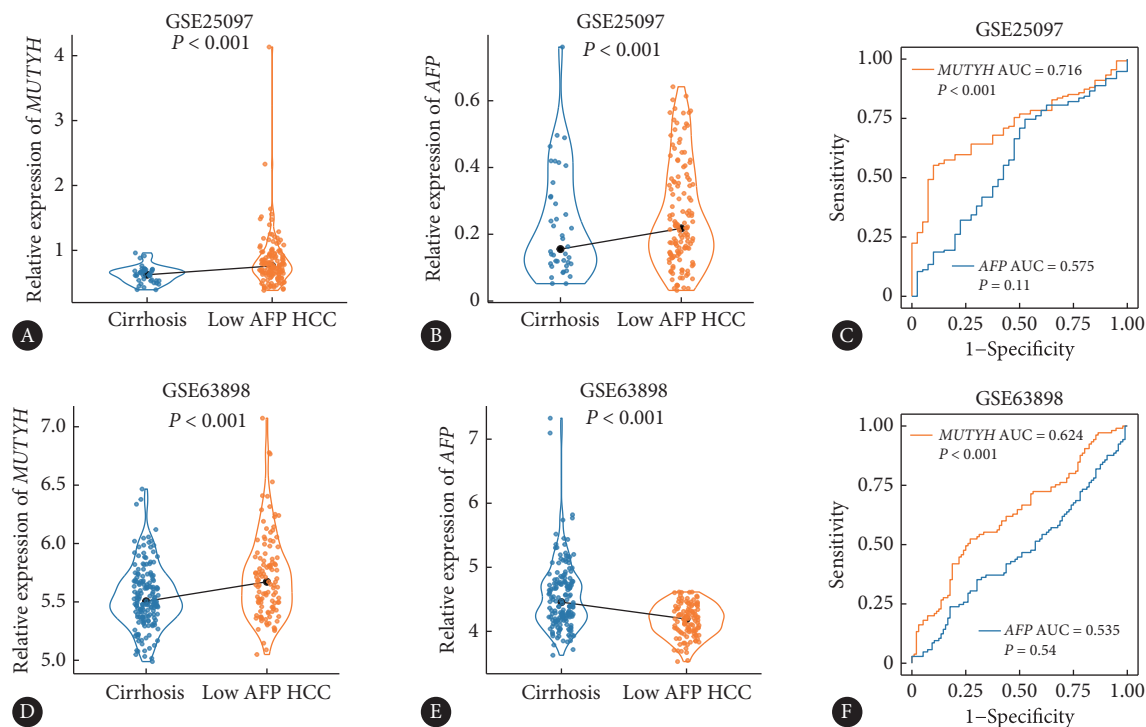
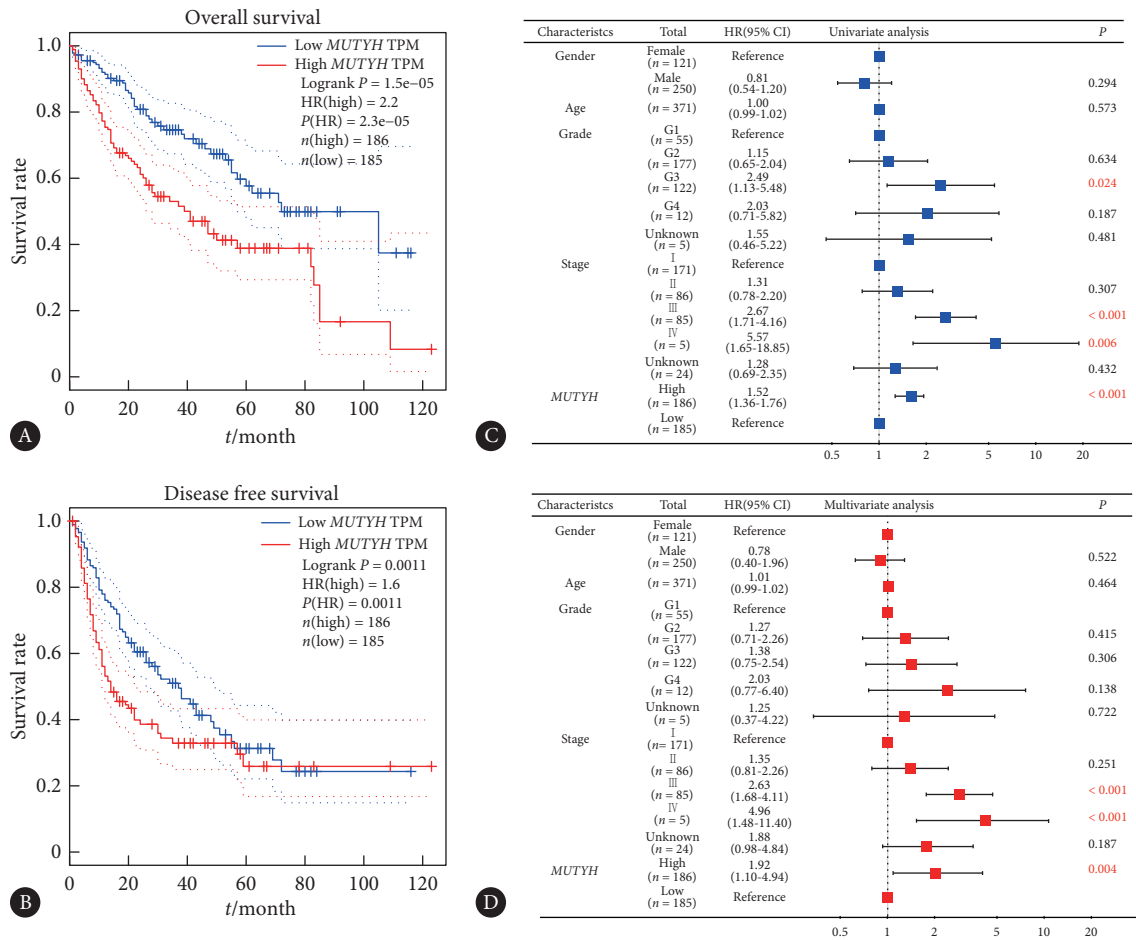


图3 *MUTYH* 在低AFP表达的HCC患者中的诊断效能

Fig 3 Diagnostic efficacy of *MUTYH* in hepatocellular carcinoma patients with low AFP expression

A and B, *MUTYH* and AFP expression in cirrhosis ($n=40$) and low-AFP HCC ($n=134$) from GSE25097; C, ROC analysis of *MUTYH* and AFP for discriminating cirrhosis and low-AFP HCC (GSE25097); D and E, *MUTYH* and AFP expression in cirrhosis ($n=168$) and low-AFP HCC ($n=114$) from GSE63898; F, ROC evaluation of *MUTYH* and AFP for distinguishing cirrhosis and low-AFP HCC (GSE63898).

图4 *MUTYH*表达与HCC患者预后的关系Fig 4 Relationship between *MUTYH* expression and prognosis of HCC patients

TPM: transcripts per million; HR: hazard ratio. A and B, Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) curves based on Kaplan-Meier analysis; C and D, forest plots of univariate and multivariate Cox regression analyses for clinicopathological characteristics in HCC patients.

*MUTYH*主要定位于细胞核,参与细胞周期调控、DNA复制及RNA转运等关键生物学过程。详见网络资源附件附图2。

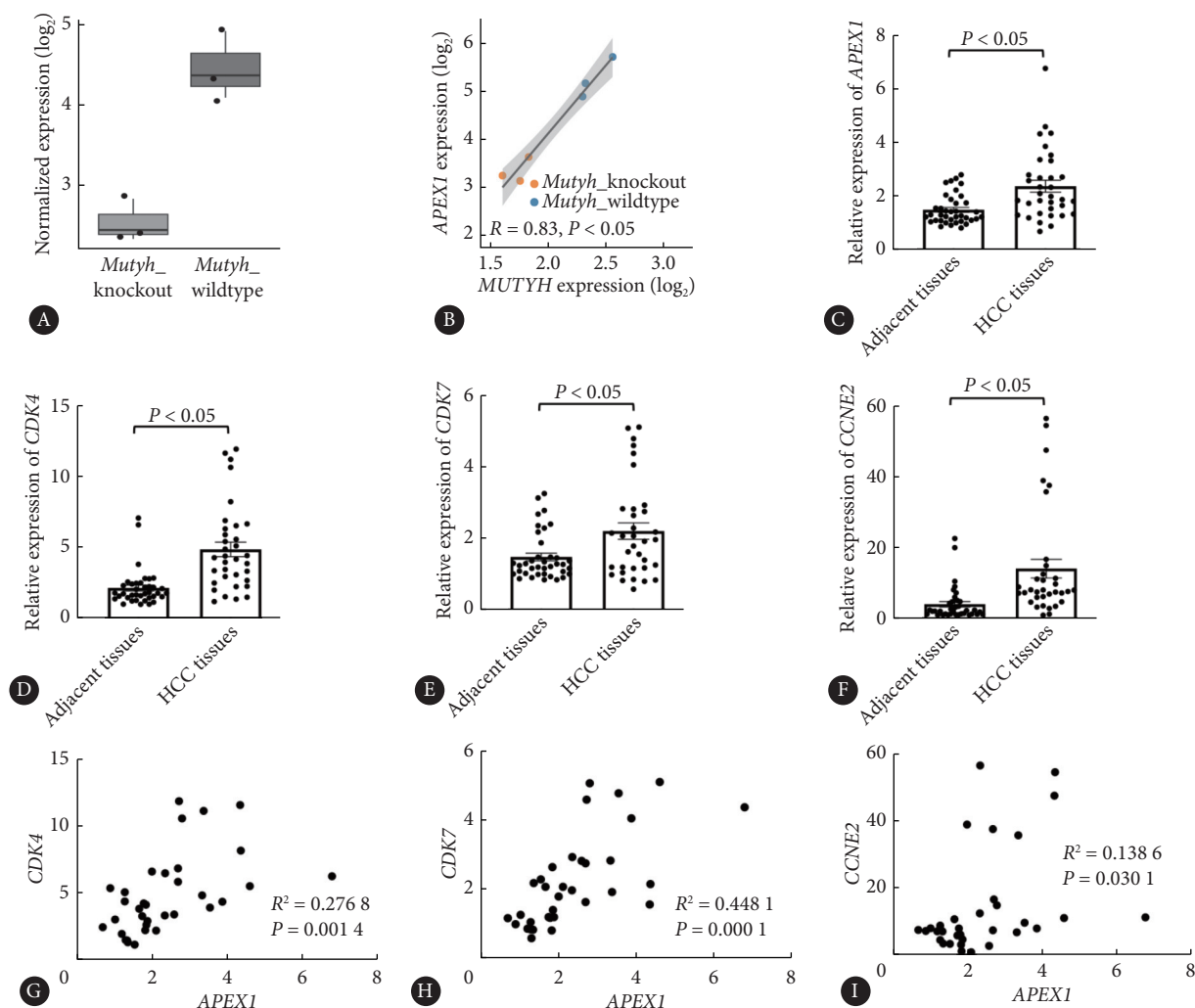
2.7 *MUTYH*通过调控*APEX1*影响细胞周期进程促进HCC进展

为了明确“*MUTYH-APEX1*”调控轴,本研究利用GSE157142数据集分析*MUTYH*基因敲除(*Mutyh*^{-/-})小鼠HCC模型发现,与野生型小鼠相比,*Mutyh*^{-/-}组中*APEX1*表达呈下调趋势(log₂FC = -1.8, $P < 0.05$, 图5A),且与*MUTYH*表达呈强相关($r = 0.83$, $P < 0.05$, 图5B),证实*MUTYH*缺失可直接下调*APEX1*表达。进一步GSEA分析显示,细胞周期通路在*Mutyh*^{-/-}组中显著富集且下调(NES = -1.75, FDR = 0.01, 见网络资源附件附图3A)。该通路核心基因表达同步降低(见网络资源附件附图3B),且该通路大多基因与*APEX1*表达呈正相关(见网络资源附件附图3C),提示*MUTYH*缺失可通过下调*APEX1*抑制细胞周期通路。

鉴于G₁/S期转换是HCC细胞突破增殖限制的关键环节,本研究进一步聚焦该阶段的核心调控分子。GSEA分析和相关性分析提示G₁期激酶CDK4、S期激酶CDK7及G₁/S期特异性周期蛋白CCNE2是细胞周期通路的关键基因。通过qPCR检测36对HCC及癌旁组织,结果证实HCC肿瘤组织中*APEX1*、CDK4、CDK7和CCNE2的表达均显著高于癌旁组织(图5C~5F),且三者表达与*APEX1*均呈显著正相关(图5G~5I)。表明*MUTYH*可能通过上调*APEX1*,进而激活细胞周期关键激酶与周期蛋白,促使细胞周期异常推进,最终促进HCC。

2.8 HCC中*MUTYH*表达的免疫浸润特征

为了进一步HCC免疫微环境与*MUTYH*表达水平之间的关系,本研究采用CIBERSORT免疫评分分析了TCGA-LIHC数据集*MUTYH*高、低表达组的免疫细胞浸润分布(整体分布见网络资源附件附图4A)。组间差异分析显示,*MUTYH*表达在活化的记忆CD4 T细胞、滤泡辅助T细胞、调节性T细胞、活化的NK细胞、单核细胞、

图 5 *MUTYH*-*APEX1*轴对G₁/S期调控因子的影响Fig 5 The *MUTYH*-*APEX1* axis modulates G₁/S-phase regulatory factors

A, *APEX1* expression in *Mutyh* knockout ($n = 3$) and wildtype mouse ($n = 3$) hepatic tumor tissues; C-F, qPCR analysis of *APEX1*, *CDK4*, *CDK7*, and *CCNE2* in HCC ($n = 18$) and adjacent tissues ($n = 18$); G-I, correlation analysis between *APEX1* and *CDK4*, *CDK7*, and *CCNE2*.

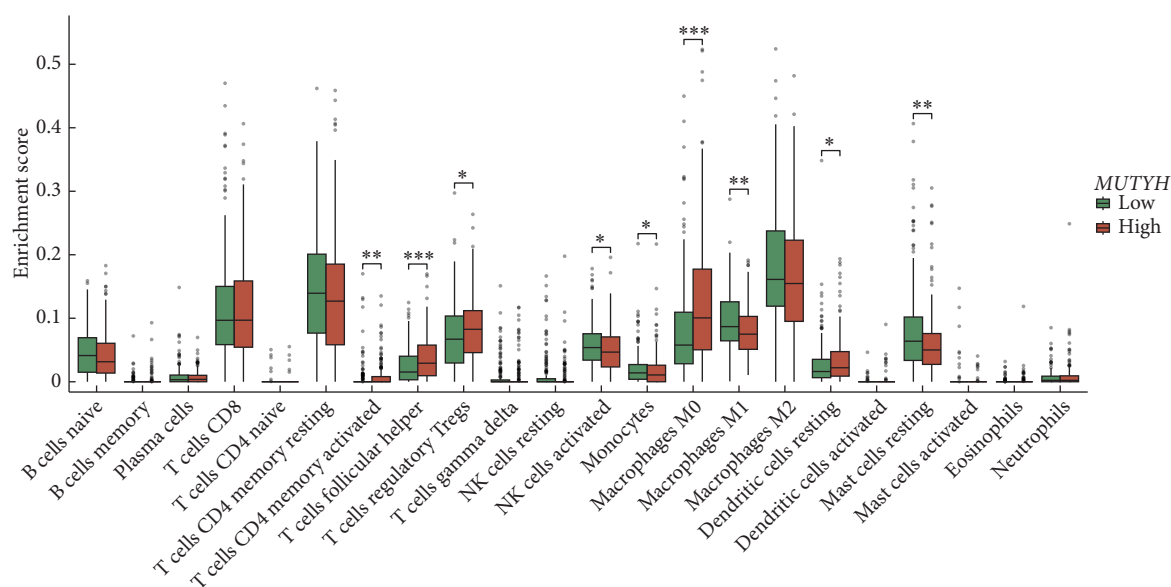
M0/M1巨噬细胞、树突状细胞及肥大细胞中存在统计学差异($P < 0.05$, 图6), 进一步分析发现, *MUTYH*表达水平与M0巨噬细胞、活化的记忆CD4 T细胞、滤泡辅助T细胞、调节性T细胞及树突状细胞浸润呈显著正相关, 而与幼稚B细胞、活化的NK细胞、肥大细胞及M1巨噬细胞浸润呈负相关($P < 0.05$, 见网络资源附件附图4B), 提示*MUTYH*可能通过重塑免疫细胞亚群比例, 推动肿瘤免疫抑制微环境形成。

2.9 高表达*MUTYH*与HCC免疫治疗响应、索拉非尼耐药相关

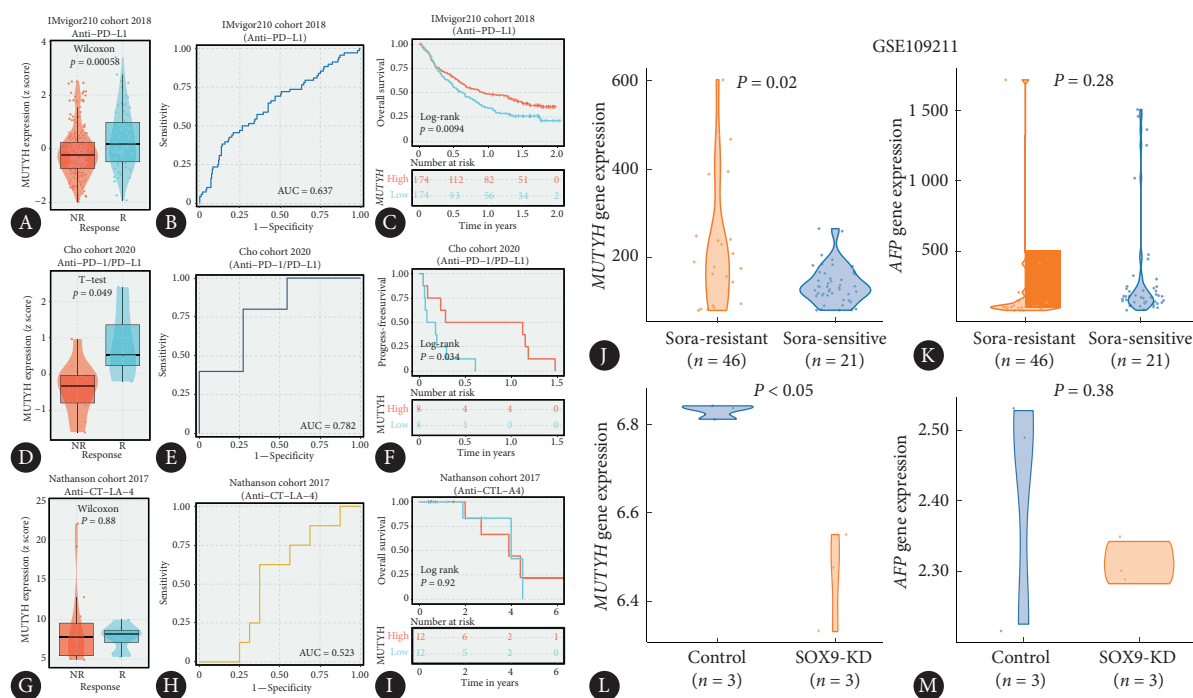
在抗PD-L1和抗PD-1/PD-L1治疗的两个队列中, 治疗反应组与无反应组的*MUTYH*表达差异有统计学意义($P < 0.05$, 图7A、7E、7H)。基于*MUTYH*构建的预测模型在评估抗PD-L1和抗PD-1/PD-L1治疗响应时表现良好, AUC值分别为0.637(95%CI: 0.543 ~ 0.731)和0.782

(95%CI: 0.698 ~ 0.866)(图7B、7F、7I), 且生存分析证实*MUTYH*可有效预测此类免疫治疗患者的预后($P < 0.05$, 图7C、7G、7J)。但在抗CTLA-4治疗队列中未观察到显著关联。

本研究基于GSE109211数据集, 分析了*MUTYH*在索拉非尼耐药与敏感患者中的表达差异。结果显示, 索拉非尼耐药组HCC患者的*MUTYH*表达高于敏感组($P < 0.05$, 图7K), 而两组间AFP表达水平无明显差异(图7L)。为进一步验证*MUTYH*与索拉非尼耐药的关联, 本研究分析GSE143477数据集——通过敲除HepG2细胞的SOX9基因构建索拉非尼抗性降低模型。结果显示, 敲除SOX9索拉非尼抗性减弱组的*MUTYH* mRNA表达低于对照组($P < 0.05$, 图7L), 而AFP表达无明显差异($P = 0.38$, 图7M)。以上结果表明, *MUTYH*高表达可能与HCC患者对索拉非尼的耐药性相关。

图6 *MUTYH*表达与HCC免疫细胞浸润水平的差异分析Fig 6 Differential analysis of immune cell infiltration levels associated with *MUTYH* expression in HCC

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparison of immune cell infiltration between *MUTYH*-high and *MUTYH*-low expression groups in HCC patients.

图7 *MUTYH*表达与HCC免疫治疗响应及索拉非尼耐药的关系Fig 7 Relationship between *MUTYH* expression and immunotherapy response or sorafenib resistance in HCC

A, D, and G, Expression levels of *MUTYH* between different immune response groups; B, E, and H, predictive efficacy of *MUTYH* on immunotherapy response; C, F, and I, predictive efficacy of *MUTYH* on immunotherapy prognosis assessment; J, *MUTYH* mRNA expression in sorafenib-resistant and sensitive ($n = 21$) HCC patients from the GSE109211 dataset; K, *AFP* mRNA expression in sorafenib-resistant and sensitive groups (GSE109211); L, *MUTYH* mRNA expression in *SOX9*-knockdown (*SOX9*-KD) and empty virus control (Control) HepG2 cells (GSE143477); M, *AFP* mRNA expression in *SOX9*-KD and control HepG2 cells (GSE143477).

3 讨论

HCC患者肿瘤细胞常伴染色体不稳定性,易发生 *TP53*突变等遗传学改变,导致致癌通路异常激活;同时,

肿瘤微环境内氧化应激水平升高,氧化修饰事件增多^[10]。*MUTYH*作为DNA氧化损伤修复系统中的关键蛋白,主要通过OGG1协同作用切除8-oxo-dG配对的腺嘌呤,维持基因组稳定性^[17]。从理论层面推测,HCC患者体内

*MUTYH*表达水平应高于健康人群,本研究通过TCGA数据库分析和qPCR进一步证实这一结论。

在诊断标志物方面,本研究证实*MUTYH*可以作为HCC生物标志物,区分HCC与肝硬化时效能高于*AFP*。尤其在低*AFP*表达HCC中,*AFP*诊断效能显著下降,而*MUTYH*仍稳定,提示其可有效弥补传统标志物的不足,提升HCC早期检出率。预后分析进一步揭示*MUTYH*的临床价值,生存分析显示,*MUTYH*高表达患者的5年OS和DFS均较差($P<0.05$),单/多因素Cox回归分析进一步证实*MUTYH*高表达是HCC的独立预后危险因素。此外,*MUTYH*高表达与索拉非尼耐药相关,耐药组*MUTYH*表达更高,而*AFP*无组间差异。因此,*MUTYH*表达水平可能作为预测索拉非尼治疗反应的潜在生物标志物。

目前尚缺乏直接证据表明*MUTYH*高表达促进HCC发生发展。已知*MUTYH*的正常表达对维持DNA复制保真性和基因组稳定性至关重要^[11],但在肿瘤微环境中,其功能可能因氧化应激水平而异:一方面,*MUTYH*高表达可能通过增强DNA损伤修复能力保护肿瘤细胞,减轻ROS引起的致死损伤,类似于MTH1通过清除氧化核苷酸保护肿瘤细胞的机制^[12];另一方面,许多化疗药物通过诱导ROS引起DNA损伤(如碱基错配、断裂)以杀伤肿瘤细胞^[13],而*MUTYH*高表达可能增强肿瘤细胞对这类药物所致DNA损伤的修复,从而导致化疗耐药^[14]。此外,*MUTYH*的过度表达还可能通过过度碱基切除破坏正常细胞基因组稳定性,增加恶变风险并间接促进肿瘤进展,以上假设尚需进一步实验验证。

通过蛋白质互作网络分析,本研究识别出*MUTYH*的核心关联蛋白为*APEX1*。*APEX1*是一种双功能酶,既参与AP位点的DNA损伤修复,也通过调控EGR1、NF- κ B、p53等转录因子的还原状态以影响其活性^[15]。*APEX1*在包括HCC在内的多种恶性肿瘤中高表达,与临床分期和预后密切相关^[16-17]。本研究显示,*APEX1*在HCC组织中高表达且与*MUTYH*呈强正相关($P<0.001$),提示二者可能协同参与HCC发生。KEGG通路分析进一步表明,*MUTYH*主要定位于细胞核,参与细胞周期调控、DNA复制等关键生物学过程,这些通路的异常激活,已被大量研究证实是HCC恶性进展的重要分子基础,这也为后续探索*MUTYH*与*APEX1*的协同作用机制提供了方向。

鉴于细胞周期异常是肿瘤细胞恶性增殖的核心特征,而G₁/S期转换更是HCC细胞突破增殖限制、启动无限增殖的关键节点,本研究进一步聚焦*MUTYH*-*APEX1*轴与细胞周期调控的关联。本研究发现在*MUTYH*或*APEX1*高表达的HCC患者中,G₁/S期关键调控分子(*CDK4*、

CDK7、*CCNE2*)表达显著上升,且与*MUTYH*/*APEX1*表达正相关($P<0.05$)。其中,*CDK4*是G₁/S转换的核心激酶;*CCNE2*为G₁/S期特异性周期蛋白,可与*CDK2*结合推动周期进程;*CDK7*通过磷酸化激活*CDK4*等激酶以放大增殖信号^[18-19]。qPCR结果进一步证实HCC组织中*APEX1*及上述细胞周期蛋白表达均高于癌旁组织,且*CDK4*、*CCNE2*与*APEX1*表达正相关。据此推测,*MUTYH*可能通过上调*APEX1*激活G₁/S期关键分子,推动细胞周期异常进展,从而促进HCC增殖。然而,*MUTYH*与*APEX1*间的具体作用机制及它们在细胞周期调控网络中的定位,仍需通过细胞与动物实验深入探索。

此外,本研究还探讨了*MUTYH*在肿瘤免疫微环境中的作用。CIBERSORT分析显示*MUTYH*高表达与M0巨噬细胞、调节性T细胞浸润正相关,而与活化NK细胞、M1巨噬细胞负相关,形成免疫抑制表型。进一步结合BEST数据库分析发现:在抗PD-1/PD-L1治疗队列中,无应答组*MUTYH*表达显著高于应答组;但在抗CTLA-4队列中未观察到此差异,提示*MUTYH*的预测价值具有治疗特异性,可能与其调控的免疫细胞亚群差异有关。这一发现为HCC免疫治疗方案的个体化选择提供了潜在参考,但*MUTYH*调控免疫微环境的具体分子机制仍需深入研究。

综上所述,本研究证实*MUTYH*在HCC中高表达,具有诊断与预后评估价值,可能通过*MUTYH*-*APEX1*轴调控细胞周期促进HCC进展,并且*MUTYH*高表达与索拉非尼耐药、抗PD-1/PD-L1治疗响应相关。但本研究主要分析数据来自公共数据库,缺乏进一步验证。我们后续将通过细胞及动物模型等体内外实验进一步明确其生物学功能继续深入研究,未来需要通过多中心、大样本队列来增强研究结论的普适性。明确*MUTYH*-*APEX1*轴在细胞周期调控中的具体机制,为*MUTYH*的临床转化应用提供更有力的证据支持。

* * *

作者贡献声明 周艳杰负责论文构思、数据审编、正式分析、研究方法、可视化、初稿写作和审读与编辑写作,张禾负责数据审编、正式分析、可视化和审读与编辑写作,丰天宇负责正式分析和调查研究,朱亚兰负责数据审编和调查研究,蒋鹏骏负责调查研究,吴臻负责审读与编辑写作,陈捷负责论文构思、经费获取、验证和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contributions ZHOU Yanjie is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. ZHANG He is responsible for data curation, formal analysis, visualization, and writing--review and editing. FENG Tianyu is responsible for formal analysis and investigation. ZHU

Yalan is responsible for data curation and investigation. JIANG Pengjun is responsible for investigation. WU Zhen is responsible for writing--review and editing. CHEN Jie is responsible for conceptualization, funding acquisition, validation, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314. doi: [10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2).
- [2] CHEN S, CAO Q, WEN W, *et al*. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Challenges and opportunities. *Cancer Lett*, 2019, 460: 1-9. doi: [10.1016/j.canlet.2019.114428](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.114428).
- [3] LLOVET J M, PINYOL R, KELLEY R K, *et al*. Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Cancer*, 2022, 3(4): 386-401. doi: [10.1038/s43018-022-00357-2](https://doi.org/10.1038/s43018-022-00357-2).
- [4] GLORIEUX C, LIU S, TRACHOOTHAM D, *et al*. Targeting ROS in cancer: rationale and strategies. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(8): 583-606. doi: [10.1038/s41573-024-00979-4](https://doi.org/10.1038/s41573-024-00979-4).
- [5] BA X, BOLDOGH L. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biol*, 2017, 14: 669-678. doi: [10.1016/j.redox.2017.11.008](https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.008).
- [6] WANG J, LI C, HAN J, *et al*. Reassessing the roles of oxidative DNA base lesion 8-oxoGua and repair enzyme OGG1 in tumorigenesis. *J Biomed Sci*, 2025, 32(1): 1. doi: [10.1186/s12929-024-01093-8](https://doi.org/10.1186/s12929-024-01093-8).
- [7] TERUYA N, KOHTARO O, SHOGO H, *et al*. Structure of the mammalian adenine DNA glycosylase MUTYH: insights into the base excision repair pathway and cancer. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(12): 7154-7163. doi: [10.1093/nar/gkab492](https://doi.org/10.1093/nar/gkab492).
- [8] YURGELUN M B, KULKE M H, FUCHS C S, *et al*. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*, 2017, 35(10): 1086-1095. doi: [10.1200/JCO.2016.71.0012](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0012).
- [9] SAMADDER N J, GIRIDHAR K V, BAFFY N, *et al*. Hereditary Cancer Syndromes-A Primer on Diagnosis and Management: Part 1: Breast-Ovarian Cancer Syndromes. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(6): 1084-1098. doi: [10.1016/j.mayocp.2019.02.017](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.02.017).
- [10] TORRECILLA S, SIA D, HARRINGTON A N, *et al*. Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2017, 67(6): 1222-1231. doi: [10.1016/j.jhep.2017.08.013](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.013).
- [11] KARAHALIL B, BOHR V A, WILSON D M 3rd. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum Exp Toxicol*, 2012, 31(10): 981-1005. doi: [10.1177/0960327112444476](https://doi.org/10.1177/0960327112444476).
- [12] NAKABEPPU Y, OHTA E, ABOLHASSANI N. MTH1 as a nucleotide pool sanitizing enzyme: Friend or foe? *Free Radic Biol Med*, 2017, 107: 151-158. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.002](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.002).
- [13] CARTER R J, PARSONS J L. Base excision repair, a pathway regulated by posttranslational modifications. *Mol Cell Biol*, 2016, 36(10): 1426-1437. doi: [10.1128/MCB.00030-16](https://doi.org/10.1128/MCB.00030-16).
- [14] TLEMSANI C, TAKAHASHI N, PONGOR L, *et al*. Whole-exome sequencing reveals germline-mutated small cell lung cancer subtype with favorable response to DNA repair-targeted therapies. *Sci Transl Med*, 2021, 13(578): eabc7488. doi: [10.1126/scitranslmed.abc7488](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7488).
- [15] LAEV S S, SALAKHUTDINOV N F, LAVRIK O I. Inhibitors of nuclease and redox activity of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox effector factor 1 (APE1/Ref-1). *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(9): 2531-2544. doi: [10.1016/j.bmc.2017.01.028](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.028).
- [16] ANTONIALI G, SERRA F, LIRUSSI L, *et al*. Mammalian APE1 controls miRNA processing and its interactome is linked to cancer RNA metabolism. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 797. doi: [10.1038/s41467-017-00842-8](https://doi.org/10.1038/s41467-017-00842-8).
- [17] CAO L, CHENG H, JIANG Q, *et al*. APEX1 is a novel diagnostic and prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(5): 4573-4591. doi: [10.18632/aging.102913](https://doi.org/10.18632/aging.102913).
- [18] ABUHAMMAD S, CULLINANE C, MARTIN C, *et al*. Regulation of PRMT5-MDM4 axis is critical in the response to CDK4/6 inhibitors in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(36): 17990-18000. doi: [10.1073/pnas.1901323116](https://doi.org/10.1073/pnas.1901323116).
- [19] TSANG F H, LAW C T, TANG T C, *et al*. Aberrant super-enhancer landscape in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2502-2517. doi: [10.1002/hep.30544](https://doi.org/10.1002/hep.30544).

(2025-08-26收稿, 2026-02-27修回)

编辑 汤洁



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2026《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*