中国现代普通外科进展
Chin J Curr Adv Gen Surg
2025年9月　第28卷　第9期　Sep. 2025 Vol. 28 No. 9

基于生物信息学方法分析NXPH4在肝细胞癌中的表达和临床意义及功能

杨尚儒[1]　姜文凯[1]　刘心如[1]　张树泽[2]　周文策[1,2]

[1]兰州大学第二临床医学院　（甘肃　兰州　730000）
[2]兰州大学第二医院　普外科　（甘肃　兰州　730000）

【摘要】**目的：**探讨神经外营养蛋白4（NXPH4）在肝细胞癌（HCC）中的表达及其临床意义和功能。**方法：**下载癌症基因图谱（TCGA）数据库中HCC的mRNA表达量和临床信息数据，比较NXPH4在HCC和癌旁组织之间的表达差异，分析NXPH4表达量与HCC病理及预后之间的关系。利用基因本体富集分析（GOEA）和基因集富集分析探究NXPH4在HCC中可能参与的生物学功能。**结果：**NXPH4在23种肿瘤中显著高表达，且与HCC患者TNM分期、组织学分级及血管侵犯等密切相关（*P*均<0.05）。预后分析显示NXPH4高表达患者总生存期较短（*HR*=1.64，95% *CI*：1.15～2.33，*P*=0.006）、疾病特异性生存率较低（*HR*=1.88，5% *CI*：1.19～2.96，*P*=0.007）；免疫浸润结果显示NXPH4表达与辅助型T细胞（Th）2、Th17显著相关（*P*均<0.05），与T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域（*r*=0.265，*P*<0.001）、程序性细胞死亡蛋白-1（*r*=0.297，*P*<0.001）、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白-4（*r*=0.302，*P*<0.001）、淋巴细胞激活基因-3（*r*=0.179，*P*<0.001）的表达相关；基因富集分析显示NXPH4主要功能富集于模式指定过程（*P*<0.001）、受体配体活性（*P*<0.001）、胶原蛋白形成（*P*=0.009）、基质金属蛋白酶激活（*P*<0.001）、神经活性配体-受体相互作用（*P*<0.001）、ALK2通路（*P*=0.039）。**结论：**NXPH4与HCC患者临床病理分期和不良预后相关；NXPH4与促癌通路和免疫浸润相关，在预测患者预后和免疫治疗方面具有较高价值。

【关键词】肝细胞癌•神经外营养蛋白•免疫浸润•临床预后•生物信息学
【中图分类号】R735.7
【文献标识码】A　DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2025.09.003
【文章编号】1009-9905(2025)09-0686-06

Analysis of NXPH4 expression, clinical significance, and function in hepatocellular carcinoma based on bioinformatics methods

YANG Shang-ru[1], JIANG Wen-kai[1], LIU Xin-ru[1], ZHANG Shu-ze[2], ZHOU Wen-ce[1,2]

[1]The Second Clinical Medical School of Lanzhou University(Lanzhou 730000, China)
[2]Department of General Surgery, the Second Hospital of Lanzhou University(Lanzhou 730000, China)

【ABSTRACT】***Objective:*** To investigate the expression of Neurexophilin 4 (NXPH4) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its clinical significance and function. ***Methods:*** Retrieved LIHC project data (mRNA expression profiles and clinical records) from TCGA, analyzed differential NXPH4 expression in HCC versus adjacent non-tumor tissues, and investigated correlations between NXPH4 expression and clinicopathological characteristics/prognostic outcomes in HCC. Using GOEA and GSEA to investigate potential biological functions of NXPH4 in hepatocellular carcinoma. ***Results:*** NXPH4

[基金项目]联合科研基金一般项目（23JRRA1508）
[通信作者]周文策，E-mail: zhouwc129@163.com

exhibited significant upregulation in 23 cancer types (P<0.05), with significant associations to advanced HCC progression markers including TNM stage (P<0.05), histologic grade (P<0.05), and vascular invasion (P<0.05). Clinically, elevated NXPH4 expression correlated with reduced OS(*HR*=1.64, 95% *CI*: 1.15–2.33, P=0.006) and DSS(*HR*=1.88, 95% *CI*: 1.19–2.96, P=0.007). The immune infiltration results showed that NXPH4 expression was significantly correlated with Th2 cells and Th17 cells (all P values<0.05).Furthermore, NXPH4 expression was positively correlated with the levels of several immune checkpoint markers: TIGIT(r=0.265), PD–1 (r=0.297), CTLA–4 (r=0.302), and LAG–3 (r=0.179, all P< 0.001). Gene enrichment analysis revealed NXPH4 was significantly enriched in: pattern specification process (P<0.001); receptor ligand activity (P<0.001); collagen formation (P=0.009); activation of matrix metalloproteinases (P<0.001); neuro–active ligand receptor interactions (P<0.001); and ALK2 signaling (P=0.039). **Conclusion:** NXPH4 is associated with clinical pathological staging and poor prognosis in HCC patients; NXPH4 is associated with oncogenic pathways and im–mune infiltration, and has high value in predicting patient prognosis and immunotherapy.

【KEY WORDS】Hepatocellular carcinoma•Neurexophilin 4•Immune infiltration•Prognosis•Bioinformatics

神经外营养蛋白4（neurexophilin4, NXPH4）是神经突触分泌蛋白，属于神经外营养蛋白（neurexophilin, NXPH）家族，其家族最初被认为是一种神经糖蛋白[1-2]。目前关于NXPH家族的机制研究还不完善，有研究发现，NXPH家族中的NXPH1和NXPH2在胰腺导管腺癌肿瘤组织中高表达[3]；Yang等[4]发现，NXPH4在非小细胞肺癌中高表达。但是目前对于NXPH4在肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）中的表达、临床意义及生物学功能还待进一步挖掘。因此，本研究应用生物信息学方法分析NXPH4在HCC中的表达水平、与其临床相关性及生存预后相关性，并探究NXPH4在HCC中可能参与的功能及其与免疫浸润的关系，从而为治疗HCC提供新的治疗靶点，改善预后。

1 资料与方法

1.1 数据来源 从癌症基因图谱（TCGA，www.cancergenome.nih.gov/）下载HCC及癌旁组织的mRNA表达谱，包括424例HCC组织样本和50例癌旁组织样本，同时下载各样本对应的临床信息和预后信息。从基因表达数据库（GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）下载GEO数据集系列GSE64041芯片的数据，包括60例HCC组织样本和对应的60例癌旁组织样本。

1.2 基因集富集分析 基因集富集分析（gene set enrichment analysis, GSEA）可从一组基因集合的整体行为中揭示生物学过程的整体模式。利用“clusterProfiler”包进行GSEA。从分子标志数据库（molecular signatures database, MSigDB）获取相应通路的基因集进行比对。探索NXPH4可能在HCC发生发展中参与的生物学功能通路。显著富集的调节为：调整后P<0.05且错误发现率<0.2。

1.3 基因本体论富集分析 基因本体论富集分析（gene ontology enrichment analysis, GO）是一个标准化的功能注释系统，将基因的功能分为三大类：分子功能（molecular function, MF）、细胞组分（cellular component, CC）、生物过程（bological process, BP）。将TCGA中的HCC样本分为NXPH4高表达和NXPH4低表达组，对两组进行差异分析，根据$|\log_2FC|>2$和调整P<0.05筛选差异基因，对差异基因进行GO富集分析，通过鉴定差异基因进行GO功能注释分析。

1.4 单样本基因集富集分析 单样本基因集富集分析（single–sample gene set enrichment analysis, ssGSEA）是GSEA的扩展，可针对每个样本独立计算富集分数，适用于个性化分析。应用“GSVA”中的ssGSEA算法对TCGA中的HCC样本中的不同免疫细胞进行免疫浸润评分，例如：辅助型T细胞（T helper cells, Th）2、Th17，并与NXPH4 mRNA表达量进行相关性分析。

1.5 统计学处理 应用R4.4.1软件。两组间比较采用Wilcoxon检验。利用χ^2检验评估NXPH4表达与患者临床病理特征之间的关系。生存分析采用Log–Rank检验，分析总生存期（overall survival, OS）和疾病特异性生存期（disease specific survival, DSS），计算*HR*及95% *CI*。ROC曲线评估NXPH4表达对HCC患者1、3和5年的生存期的预测能力。Spearman校正法分析NXPH4与24种免疫细胞富集评分的相关性，以及与部分免疫检查点[如T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域（T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain, TIGIT）、程序性细胞死亡蛋白1（programmed cell death protein –1, PDCD1）、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4（cytotoxic T lymphocyte–associated antigen–4, CTLA4）和淋巴细胞激活基因–3（lymphocyte activation gene–3, LAG–3）]的相关性。P<0.05表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　NXPH4 在 HCC 和其他肿瘤中的表达　TCGA 数据库结果显示，NXPH4 mRNA 水平在不同肿瘤中高表达。33 种肿瘤类型中，NXPH4 在 23 种肿瘤中显著高表达（*P* 均<0.05，图 1A）；在 HCC 中 NXPH4 的表达明显高于癌周组织（*P*<0.001，图 1B），配对样本分析显示 NXPH4 在 HCC 组织中的表达也明显高于正常组织（*P*<0.001，图 1C）。利用 GSE64041 中的 HCC 数据进行验证，结果同样显示 NXPH4 的 mRNA 表达在 HCC 组织中高于正常组织（*P*<0.05，图 1D）。

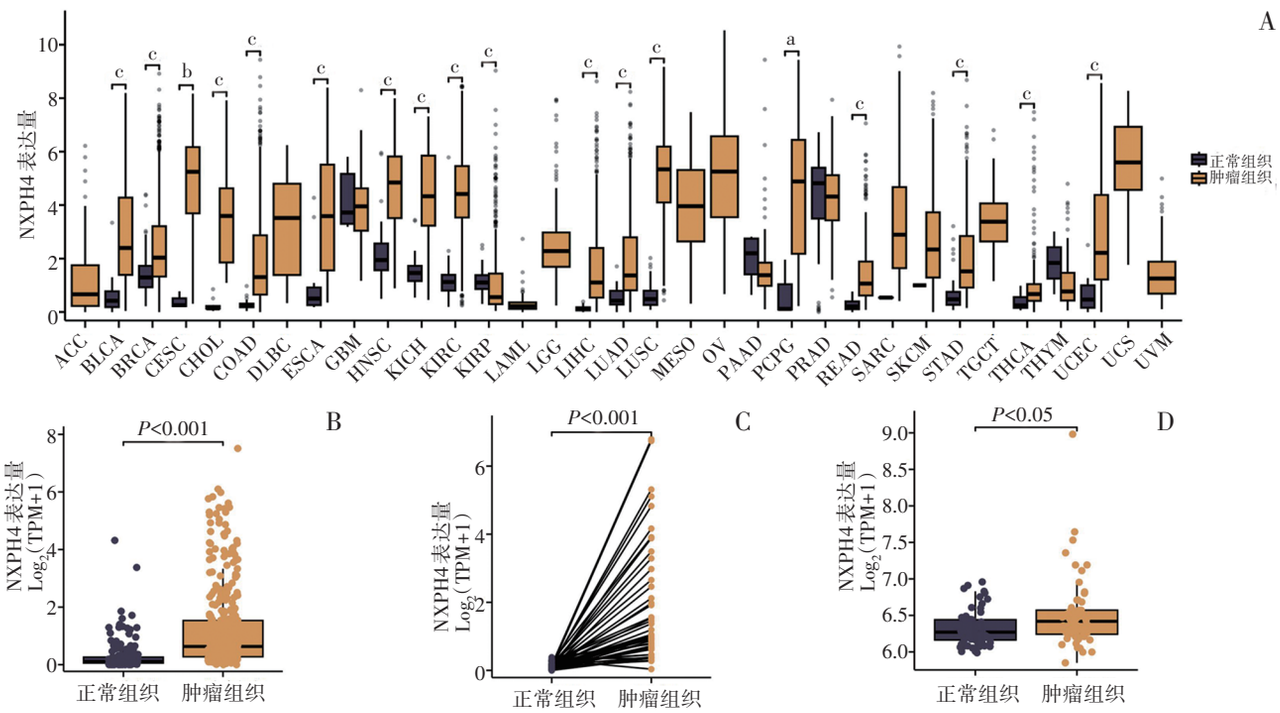


图 1　NXPH4 在多种肿瘤中表达情况及其在正常组织与 HCC 组织中的表达差异

A：NXPH4 在各种肿瘤中的表达情况；B：NXPH4 在 HCC 组织和癌旁组织中的表达差异；C：NXPH4 在 HCC 组织和配对样本中的表达差异；D：GEO 数据库中 NXPH4 在 HCC 组织和正常组织中的表达差异；a：*P*<0.05；b：*P*<0.01；c：*P*<0.001。

2.2　NXPH4 mRNA 表达水平在不同临床病理特征中的分布和预后分析　分析 TCGA 数据库中 NXPH4 mRNA 表达水平在不同临床病理特征中的分布，其中，男性（*P*<0.01），AFP>400 ng/mL（*P*<0.01），血管侵犯（*P*<0.05），病理分期Ⅲ、Ⅳ期（*P*<0.001），T_3、T_4期（*P*<0.001），组织学分级 G_1、G_2期（*P*<0.001）的患者 NXPH4 表达显著升高（图 2A~F）。

生存分析结果表明，NXPH4 mRNA 表达与 HCC 患者 OS 显著相关（*HR*=1.64，*P*=0.006，图 2G），NXPH4 高表达组的生存率明显低于低表达组。高表达组的 DSS 显著低于低表达组（*HR*=1.86，*P*=0.007，图 2H），说明 NXPH4 是与 HCC 预后相关的生物标志物。ROC 曲线结果显示，NXPH4 对 HCC 患者 1、3 和 5 年的生存期预测具有一定价值（图 2I）。上述结果表明，NXPH4 表达与 HCC 患者多种病理特征相关且提示患者预后不良。

2.3　NXPH4 高表达组的基因富集分析结果　根据 NXPH4 的 mRNA 表达量中位数将 TCGA 中的 HCC 样本分为 NXPH4 高表达组和 NXPH4 低表达组并进行差异分析，对差异基因 GO 富集分析（图 3A），结果显示 BP 富集包括模式指定过程、信号释放、激素分泌调控（*P* 均<0.001）；CC 富集包括神经元胞体、突触前膜、阳离子通道复合物（*P* 均<0.001）；MF 富集包括受体配体活性、配体门控通道活性、内肽酶活性（*P* 均<0.001）。GSEA 结果显示：NXPH4 主要富集于胶原蛋白形成（*P*=0.009）、基质金属蛋白酶激活（*P*<0.001）、神经活性配体-受体相互作用（*P*<0.001）、ALK2 通路（*P*=0.039，图 3B~E）。上述结果表明 NXPH4 可能通过多种功能途径参与 HCC 发生发展。

2.4　NXPH4 表达量与肿瘤免疫蛋白相关性分析　利用 ssGSEA 法评估免疫细胞浸润丰度并与 NXPH4 表达量进行相关性分析，结果显示，NXPH4 表达量与 Th2 表达呈显著正相关（*r*=0.342，*P*<0.001），与 Th17 表达呈显著负相关（*r*=-0.416，*P*<0.001，图 4A）。进一步探究 NXPH4 表达量与部分免疫检查点的关系（图 4B~E），散点图结果显示 NXPH4 表达量与 TIGIT（*r*=0.265，*P*<0.001）、PDCD1（*r*=0.297，*P*<0.001）、CTLA4（*r*=0.302，*P*<0.001）和 LAG-3（*r*=0.179，*P*<0.001）的表达均呈正相关。

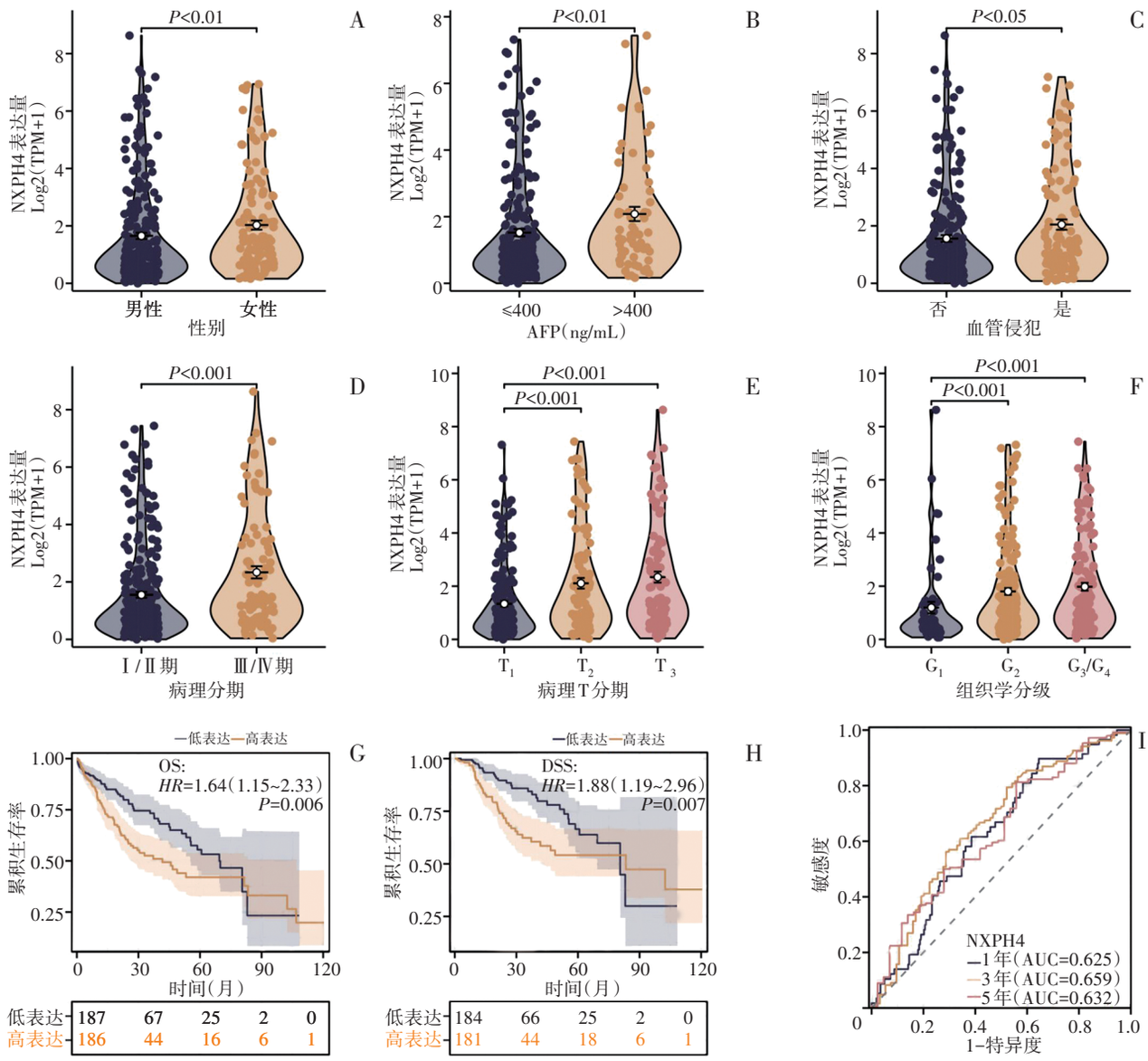


图2　NXPH4 mRNA表达水平在不同临床病理特征分布及预后分析

A～F：NXPH4在性别、AFP、是否血管侵犯、不同病理分期、不同组织学分级的表达量差异；G～I：NXPH4高低表达组OS、DSS的生存时间差异；NXPH4对HCC患者的生存预测价值；a：*P*<0.05；b：*P*<0.01；c：*P*<0.001。

3　讨论

最新的HCC治疗指南中强调，综合运用化疗、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂等疗法，共同为HCC患者提供更为全面和有效的治疗选择[5]，其中免疫治疗更是研究的热点内容。

NXPH4属于NXPH家族，是神经突触分泌蛋白，广泛表达于人体器官。目前NXPH4在肿瘤中的相关研究较少，有研究显示，作为神经素的配体，其具有调节小脑高尔基颗粒细胞抑制性神经传递的能力[6]。通过TCGA数据库分析发现，NXPH家族在HCC中普遍高表达，其中NXPH4在多种肿瘤中显著高表达，且与多种临床病理特征相关，有潜力成为癌症的诊断标志物。进一步分析发现，NXPH4是影响生存期的独立预后因素。因此，本研究认为NXPH4是HCC的危险因子。

肿瘤微环境（tumour microenvironment, TME）是影响肿瘤发生发展的重要因素，由基质细胞和免疫细胞构成[7]。本研究中GSEA分析表明，基因显著富集于胶原蛋白形成、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）激活、ALK2通路。胶原蛋白是细胞外基质（extracellular matrix, ECM）的主要成分，Ⅰ型胶原蛋白和XV型胶原蛋白的异常表达，可能与HCC的侵袭性与转移潜能相关[8-9]；MMPs作为降解ECM的主要蛋白酶，通过分解基质成分（如胶原蛋白和弹性蛋白），促进肿瘤细胞远处转移，ECM降解使肿瘤细胞能够突破基质屏障，从而促进肿瘤扩散[10-12]。有研究发现，抑制ALK2激酶活性可阻断下游SMAD磷酸化，延缓肿瘤进展[13]。此外，本研究发

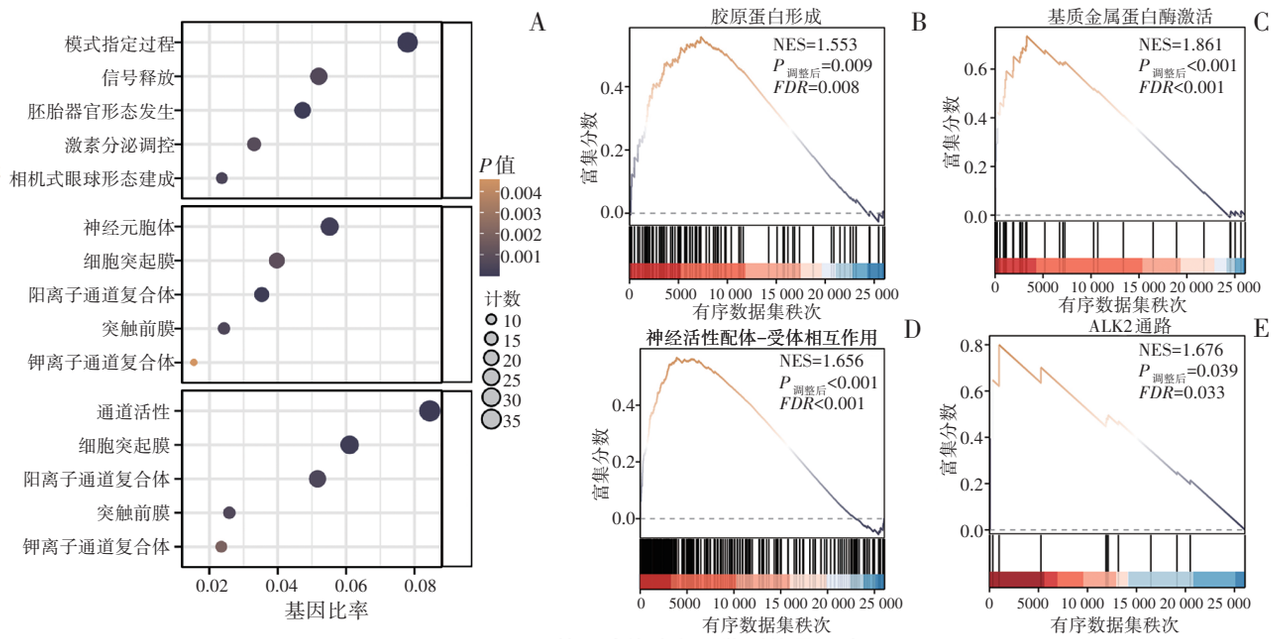


图 3　NXPH4 基因功能注释及鉴别信号通路

A：生物过程（BP）、细胞成分（CC）和分子功能（MF）的 GO 功能注释分析；B：胶原蛋白形成；C：基质金属蛋白酶激活；D：神经活性配体-受体相互作用；E：激活素受体样激酶 2 通路

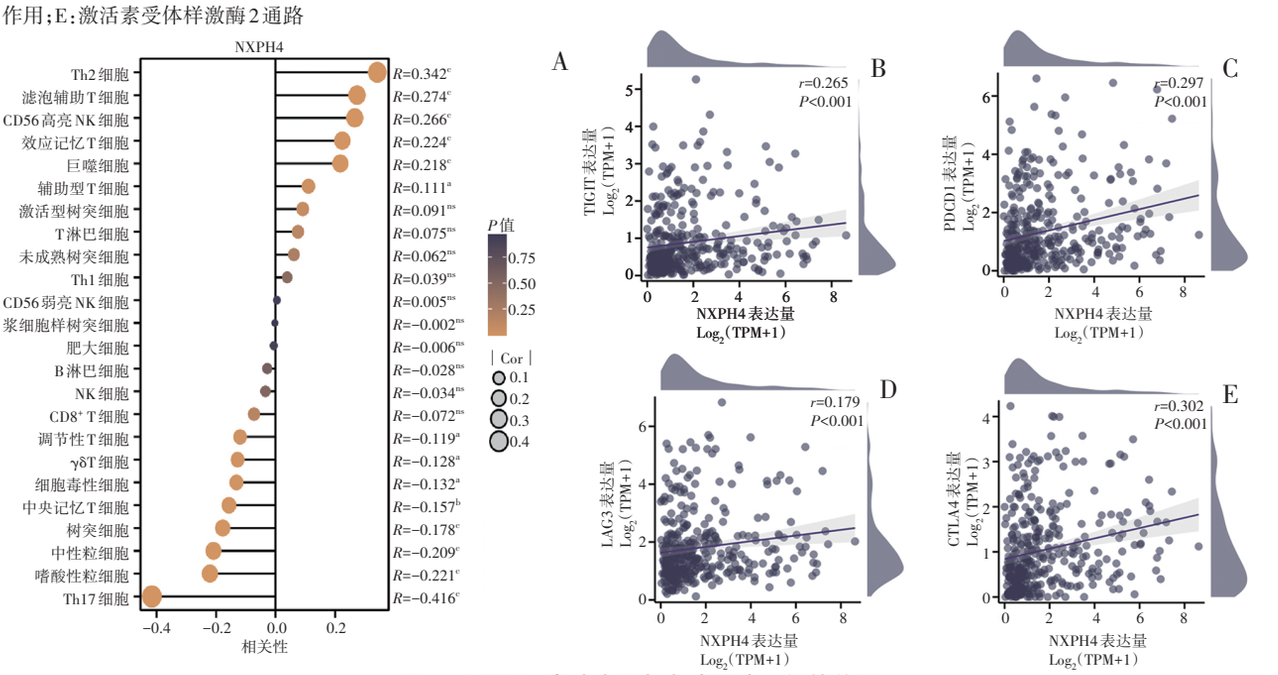


图 4　NXPH4 表达水平与免疫细胞之间的关系

A：HCC 中 NXPH4 表达水平与免疫细胞浸润的关系；B～E：NXPH4 表达量与免疫检查点 TIGIT、PDCD1、LAG3、CTLA4 的表达的相关性；a：$P<0.05$；b：$P<0.001$；c：$P<0.001$；ns：$P>0.05$。

现 NXPH4 与多种免疫细胞活性相关。T 淋巴细胞在细胞介导免疫中发挥关键作用，可以识别肿瘤特异性抗原并攻击肿瘤，抑制性的免疫检查点可以抑制 T 细胞活化，促进 T 细胞衰竭[14]。在 HCC 相关 TME 中，细胞毒性免疫应答受到抑制，具体表现为促肿瘤的免疫抑制性细胞的显著富集[15-16]。研究表明 NXPH4 在 HCC 中与多种免疫细胞浸润相关，比如 NXPH4 表达量与 Th2 细胞表达呈显著正相关，这可能会抑制抗肿瘤免疫应答[17]。本研究表明，NXPH4 mRNA 表达量还与 TIGIT、PDCD1、CTLA4、LAG-3 的表达呈正相关，这些因子可以通过抑制相关 T 细胞功能，促进免疫逃逸、诱导免疫耐受，影响治疗效果及预后[18-20]。NXPH4 与特定通路和免疫因子的显著共表达可能增强 HCC 细胞的侵袭性，同时，NXPH4 表达升高与多种免疫细胞正相关提示其可通过调控免疫耐受与负向免疫检查点通路促进肿瘤免疫逃逸。

HCC 的免疫治疗本质上是增强细胞免疫力，调

节免疫活化程度，改善T细胞功能，从而抑制肿瘤细胞的发生和生长。免疫检查点是免疫细胞表达的一系列调控分子，在维持自身免疫功能和自身疾病中发挥重要作用，包括PD-1及其配体、CTLA-4等。一项研究表明，外周血CTLA-4、PD-1、表达与中晚期HCC患者不良预后有关[21]；另外有研究显示，使用CTLA-4单抗后，患者的客观应答率达到了17.6%[22]。另外有研究表明，TIGIT和PD-1共抑制可导致T细胞功能完全耗竭，阻断两者可显著增强抗肿瘤免疫[23]。鉴于NXPH4与免疫微环境形成、免疫检查点相关，因此靶向NXPH4可能增强肿瘤免疫，为HCC的治疗带来了新的转机。

综上所述，NXPH4可能是HCC潜在的新型生物标志物，未来应着重研究NXPH4影响HCC的生物学机制及免疫治疗效果。

参 考 文 献

[1] Kinzfogl J, Hangoc G, Broxmeyer HE. Neurexophilin 1 suppresses the proliferation of hematopoietic progenitor cells[J]. Blood, 2011, 118(3): 565-575. DOI: 10.1182/blood-2010-12-325381.

[2] Reissner C, Stahn J, Breuer D, et al. Dystroglycan binding to α-neurexin competes with neurexophilin-1 and neuroligin in the brain [J]. J Biol Chem, 2014, 289(40): 27585-27603. DOI: 10.1074/jbc.M114.595413.

[3] de Wit J, Ghosh A. Specification of synaptic connectivity by cell surface interactions[J]. Nat Rev Neurosci , 2016, 17(1): 22-35. DOI: 10.1038/nrn.2015.3.

[4] Yang Z, Wei B, Qiao A, et al. A novel EZH2/NXPH4/CDKN2A axis is involved in regulating the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2022, 86(3): 340-350. DOI:10.1093/bbb/zbab217.

[5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.原发性肝癌诊疗指南(2024年版)[J].临床肝胆病杂志，2024，40(5)：893-918. DOI: 10.12449/JCH240508.

[6] Meng X, McGraw CM, Wang W, et al. Neurexophilin4 is a selectively expressed α-neurexin ligand that modulates specific cerebellar synapses and motor functions[J]. Elife, 2019, 8: e46773. DOI: 10.7554/eLife.46773.

[7] Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression[J]. Cancer Res, 2019, 79(18): 4557. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.

[8] Ma HP, Chang HL, Bamodu OA, et al. Collagen 1A1 (COL1A1) is a reliable biomarker and putative therapeutic target for hepatocellular carcinogenesis and metastasis[J]. Cancers, 2019, 11(6): 786. DOI: 10.3390/cancers11060786.

[9] Yao T, Hu W, Chen J, et al. Collagen XV mediated the epithelial-mesenchymal transition to inhibit hepatocellular carcinoma metastasis [J]. J Gastrointest Oncol, 2022, 13(5):2472-2484. DOI: 10.21037/jgo-22-299.

[10] Scheau C, Badarau IA, Costache R, et al. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma[J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2019, 2019: 9423907. DOI: 10.1155/2019/9423907.

[11] Wei L, Lun Y, Zhou X, et al. Novel urokinase-plasminogen activator inhibitor SPINK13 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma in vivo[J]. Pharmacol Res, 2019, 143: 73-85. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.03.009.

[12] Chaulagain RP, Padder AM, Shrestha H, et al. Deciphering the matrisome: extracellular matrix remodeling in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Cureus, 2025, 17(4): e82171. DOI: 10.7759/cureus.82171.

[13] Koo J, Seong CS, Parker RE, et al. Live-Cell invasive phenotyping uncovers ALK2 as a therapeutic target in LKB1-mutant lung cancer [J]. Cancer Res, 2024, 84(22): 3761-3771. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-23-2631.

[14] Lei X, Lei Y, Li JK, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy[J]. Cancer Lett, 2020, 470: 126-133. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.11.009.

[15] Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma[J]. Cell, 2019, 179(4): 829-845.e20. DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.003.

[16] Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of infiltrating T Cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing[J]. Cell, 2017, 169(7): 1342-1356.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.035.

[17] DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, et al. $CD4^+$ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages[J]. Cancer Cell, 2009, 16(2): 91-102. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.06.018.

[18] Js J, Wc T. The detection of tumor location and lymph node metastasis by aberrant NXPH1 and NXPH2 expressions in pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. Chin J Physiol, 2016, 59(6): 348-354. DOI: 10.4077/CJP.2016.BAF430.

[19] Wu Y, Hao X, Wei H, et al. Blockade of T-cell receptor with Ig and ITIM domains elicits potent antitumor immunity in naturally occurring HBV-related HCC in mice[J]. Hepatology, 2023, 77(3): 965-981. DOI: 10.1002/hep.32715.

[20] Bozward AG, Davies SP, Fiancette R, et al. The dual role of TIGIT in regulatory and effector T cells in chronic liver disease[J]. JHEP Rep, 2025, 7(6): 101405. DOI: 10.1016/j.jhepr.2025.101405.

[21] 陆小华，袁洪新.外周血CTLA-4、PD-1、BTLA表达与中晚期肝癌病理特征及预后的关系[J].中国现代普通外科进展，2025，28(3)：191-195.

[22] Sangro B, Gomez-Martin C, de la Mata M, et al. A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C[J]. J Hepatol, 2013, 59(1): 81-88. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.02.022.

[23] Coblockade of TIGIT and PD-1 optimizes antitumor $CD8^+$ T-cell response[J]. Cancer Discov, 2022, 12(5): 1182. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-RW2022-050.

（收稿日期：2025-05-01）