

HNF4A 在胃癌中的表达及多数据库分析和实验研究

卢豪^{1*}, 范纪昌^{1*}, 周立强², 吴忱¹, 辛林¹

摘要 目的 探讨肝细胞核因子 4A (HNF4A) 在胃癌中的表达、预后及生物学作用,并研究其对胃癌细胞增殖的影响。方法 肿瘤免疫分析 2.0 (TIMER2.0) 和基因表达谱交互式分析 (GEPIA2) 数据库分析 HNF4A 在胃癌和正常组织中的表达差异, KM plotter 分析 HNF4A 表达水平与胃癌患者生存率的相关性, TISIDB 数据库和 R 语言 4.1.2 分析 HNF4A 是否参与胃癌免疫调节的过程, cBioPortal 数据库分析 HNF4A 在胃癌中的突变情况, GSEA 4.2 对 HNF4A 进行功能富集分析, LinkedOmics 数据库预测 HNF4A 可能调控的基因。实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)、蛋白质印迹法 (Western blot) 和免疫组织化学 (IHC) 染色检测 HNF4A 在胃癌和癌旁组织中的相对表达量, 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU)、平板克隆和流式细胞周期检测胃癌细胞的增殖和细胞周期。结果 HNF4A 在胃癌组织中表达升高 ($P < 0.05$), HNF4A 高表达胃癌患者总生存率更差 ($P < 0.001$)。HNF4A 在胃癌中主要以错义突变为主。免疫细胞浸润发现 HNF4A 和 B 淋巴细胞、CD8⁺T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞都相关 ($P < 0.001$), HNF4A 还和肿瘤突变负荷 ($r = 0.28$, $P < 0.0001$)、微卫星不稳定性 ($r = 0.13$, $P < 0.01$) 相关。敲低 HNF4A 后, 胃癌细胞的增殖能力明显减弱, 诱导其细胞周期阻滞在 G0/G1 期。结论 HNF4A 在胃癌组织中表达明显升高, 并且与预后不良相关, 还可能参与免疫调节过程, 敲低 HNF4A 可以抑制胃癌细胞增殖。

关键词 HNF4A; 胃癌; 细胞增殖; 生物信息学

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0434-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.015

胃癌是位于全球第五位的高发恶性肿瘤, 其死

亡率排在恶性肿瘤的第四位^[1], 因此探索其分子机制显得尤为重要。肝细胞核因子 4A (hepatocyte nuclear factor 4A, HNF4A) 是一种含有锌指结构的配体依赖性转录因子, 属于核受体超家族成员之一, 由 11 个内含子和 12 个外显子组成^[2]。HNF4A 不仅是葡萄糖、脂肪酸和脂质代谢过程中的核心成员和中枢调节剂, 而且具有调节桥粒、粘着连接和紧密连接 3 个主要区室内多种成分表达的能力^[3]。因此, HNF4A 的异常表达和癌症的发生发展密切相关。研究^[4-6]表明 HNF4A 在食管癌、肝癌和结肠癌中作为促癌基因或抑癌基因参与疾病进展, 但是在胃癌中研究较少。

该研究利用多种数据库全面分析了 HNF4A 在胃癌中的表达、预后、基因突变和免疫机制等; 收集胃癌临床标本检测 HNF4A 相对表达量, 并在胃癌细胞中敲低 HNF4A, 以检测其对细胞增殖和周期的影响。

1 材料与方法

1.1 数据库分析

1.1.1 差异性表达和预后分析 通过肿瘤免疫分析 2.0 (tumor immune estimation resource 2.0, TIMER 2.0) 在线数据库 (<http://timer.cistrome.org/>) 分析 HNF4A 在胃癌中的差异性表达, 通过基因表达谱交互式分析 (gene expression profiling interactive analysis 2, GEPIA 2) 数据库 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) 匹配 GTEx 数据进一步分析 HNF4A 在胃癌和正常组织中的差异表达, 并通过 KM-plot 数据库 (<https://kmplot.com/>) 中胃癌独立数据集 gene chip 对生存预后进行预测分析。

1.1.2 免疫相关分析 通过 TISIDB 数据库 (<http://cis.hku.hk/TISIDB/>) 中的免疫调节剂功能模块分析 HNF4A 和免疫刺激剂、免疫抑制剂的关系, 并进一步分析 HNF4A 在胃癌中与免疫亚型及分子亚型的关系。通过 UCSC 数据库 (<https://xenabrowser.net/>) 下载 TCGA-STAD 和 GTEx 数据, 使用 R 语言 IOBR 和 ESTIMATE 软件包分析 HNF4A 与免疫浸润细胞及免疫浸润评分的关系。通过

2023-02-23 接收

基金项目: 江西省重点研发计划项目 (编号: 20203BBG73056); 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划-领军人才项目 (编号: 20213BCJ22014); 国家自然科学基金 (编号: 8216100399)

作者单位: ¹ 南昌大学第二附属医院胃肠外科, 南昌 330000

² 南昌大学第一附属医院胃肠外科, 南昌 330000

作者简介: 卢豪, 男, 博士研究生;

辛林, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xlyxs@126.com

* 对本文具有同等贡献

TCGA-STAD 数据集中的 RNAseq 数据和相应的临床信息分析 HNF4A 与肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMB) 及微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 的关系, 并通过 R 软件包 ggstatsplot 进行可视化。

1.1.3 基因突变和相关机制分析 通过 cBioPortal 数据库 (<https://www.cbioportal.org/>) 分析 HNF4A 在胃癌中的突变情况。利用 R 语言 maftools 软件包下载并可视化 HNF4A 在 TCGA-STAD 数据集中的体细胞突变情况及突变相关基因。使用软件 GSEA 4.2.2 对 TCGA-STAD 数据集进行基因富集分析 根据 HNF4A 表达量的中位数为高低两组, 通路选择 *c5.go.bp*, 当 $NES > 1$, $P < 0.05$, $FDR_{q-val} < 0.25$ 时被认定为具有研究意义。通过 LinkedOmics (<http://www.linkedomics.org/>) 数据库中的 LinkFinder 功能探索 HNF4A 可能调控的相关基因, 通过 String 和 Cytoscape 联合分析了 HNF4A 相关的蛋白网络关系图 (cutoff 设置为 0.4, Max interactors 为 50)。

1.2 实验方法

1.2.1 临床样本分析 收集 2020 年 6 月—2022 年 5 月南昌大学第二附属医院 60 对胃癌标本, 所有样本都经患者同意并且通过南昌大学第二附属医院伦理委员会审核, 审批号【2020】第(058)号。采用 qRT-PCR、Western blot 和 IHC 分析 HNF4A 在胃癌和癌旁组织中的相对表达量。qRT-PCR 引物序列 (5'-3'): β -actin 正义链: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'; β -actin 反义链: 5'-AGGTCTTTCGGATGTCCACGT-3'; HNF4A 正义链: 5'-GGTGCCATACGCATCCTTGAC-3'; HNF4A 反义链: 5'-AGCCGCTTGATCTTCCCTGGAT-3'。抗体: HNF4A (美国 Abcam 公司, 货号: ab181604), GAPDH (武汉三鹰生物科技, 货号: 60004-1-Ig)。

1.2.2 细胞的培养和转染 人胃癌细胞 AGS、BGC823、SNU-1、HGC27、MGC803 和人胃正常黏膜上皮细胞 GES-1 购于上海中国科学院细胞库, 按照细胞培养指南, 在 RPMI1640 或 DMEM 培养基中加入 10% FBS、10 μ g/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下培养, 每日观察细胞生长速度, 并按时进行细胞传代处理。按照 TRIzol (美国 Invitrogen 公司) 和 RIPA (北京索莱宝科技) 试剂操作指南, 提取所收集的临床胃癌标本及各细胞系的 mRNA 及总蛋白, 以验证 HNF4A 在胃癌各细胞系中的相对表达量。待细胞处于对数生长期且细胞汇合度约 60% ~ 70% 时使用 Lipo3000 (美国 Invitrogen

公司) 将 si-HNF4A 或 sh-HNF4A 转染至相关细胞。si-HNF4A 干扰片段序列如下: si-HNF4A #1, 5'-GCAGUGCGUGGUGGACAAATT-3'; si-HNF4A #2, 5'-GAGAUCCAUGGUGUUCAAGTT-3'; si-HNF4A #3, 5'-UGUGCAGGUGUUGACGAUGTT-3'。依据 si-HNF4A#2 序列构建了 sh-HNF4A 质粒, 质粒载体为 PCDNA3.1-U6-MCS-CMV-ZsGreen-T2A-PURO。

1.2.3 CCK-8 测定 将 AGS 和 BGC823 细胞用胰蛋白酶消化并充分重悬后进行细胞计数, 细胞计数后将细胞密度调整为 1×10^5 个/ml, 将每孔 100 μ l 的细胞悬液接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后用 Lipo 3000 将 sh-Ctrl 和 sh-HNF4A 分别进行瞬时转染, 在瞬转 6 h 后进行换液处理, 每孔加入 100 μ l 完全培养基, 并用 100 μ l 每孔的 PBS 环绕一圈以防止挥发。分别在 0、24、48、72 h 加入 10 μ l CCK-8 试剂于培养基中 (上海汉恒生物), 并在 37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测量吸光度值。

1.2.4 EdU 增殖检测 将 1×10^4 个 AGS 和 BGC823 细胞分别接种于 96 孔板中, 使用 Lipo 3000 将 sh-Ctrl 和 sh-HNF4A 进行瞬时转染。按照 EdU 试剂盒说明书 (苏州 UE 生物) 配制 50 μ mol/L 终浓度 EdU 工作液, 每孔加入 100 μ l 50 μ mol/L EdU 工作液并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h。孵育完成后, 用 50 μ l 4% 中性多聚甲醛室温孵育 30 min 对细胞进行固定, 后每孔加入 50 μ l、2 mg/ml 甘氨酸溶液以中和残留固定液, 以每孔 100 μ l 0.5% Triton X-100 室温孵育 20 min 进行促渗。促渗完成后, 加入 100 μ l Click-iT 反应混合物至每孔室温避光孵育 30 min。去除反应混合物后, 每孔加入 100 μ l Hoechst33342 溶液, 室温避光孵育 30 min 进行核染色。使用荧光显微镜进行拍照, Image J 软件进行数据分析。

1.2.5 平板克隆计数 将 AGS 和 BGC823 细胞系 sh-Ctrl 和 sh-HNF4A 组稳转细胞 (2 μ g/ml 嘌呤霉素筛选) 用胰蛋白酶消化, 充分重悬后进行细胞计数, 将每组 500 个细胞铺板于 6 孔板中, 每隔 3 d 进行换液, 培育两周后至肉眼可见克隆成团细胞后终止培育, 用 PBS 清洗细胞后 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色后在白色背景下用相机进行拍照, 并用 Image J 软件进行细胞计数和分析。

1.2.6 流式细胞周期检测 将 AGS 和 BGC823 细胞接种于 6 孔板中, 待汇合度约 70% 时使用 Lipo 3000 将 sh-Ctrl 和 sh-HNF4A 进行瞬时转染。继续培养 48 h, 使用细胞周期检测试剂盒 (苏州 UE 生物) 按照操作指南用胰酶将细胞消化后, 用 1 ml 预

冷的 75% 乙醇固定细胞 5 h。细胞固定后,加入 1 ml 预冷的 PBS 重悬细胞并再次离心沉淀细胞,去除上清液。每管细胞样品中加入 500 μ l 碘化丙啶染色液,室温避光孵育 30 min 进行流式周期检测,数据通过 FlowJo (10.8.1) 软件进行分析。

1.3 统计学处理 应用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析和绘图。实验均重复 3 次,结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HNF4A 在胃癌中的表达及预后 在 TIMER2 和 GEPIA2 数据库中,HNF4A 在胃癌中呈现出高表达 ($P < 0.05$),见图 1A、B。临床胃癌标本 qRT-PCR 分析表明,在胃癌组织中 HNF4A 的 mRNA 表达量明显高于癌旁组织,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1C),Western blot 实验也证明 HNF4A 蛋白水平在胃癌组织中高于癌旁组织(图 1D),HNF4A 的 IHC 染色深度和阳性占比在胃癌组织中明显高于癌旁组织,且 HNF4A 主要定位于细胞核中(图 1E)。

K-M 预后分析结果显示 HNF4A 在高表达组的总生存率相比于低表达组更差 ($P < 0.001$),见图 1F。

2.2 HNF4A 在胃癌中的免疫分析 HNF4A 在胃癌中和免疫刺激剂(图 2A)及免疫抑制剂(图 2B)呈现负相关性。进一步分析了胃癌中 HNF4A 和免疫亚型及分子亚型之间的关系(图 2C、D),显示 HNF4A 和免疫亚型 ($P < 0.0001$) 及分子亚型 ($P < 0.0001$) 都具有相关性。然后,对 TCGA 胃癌数据集进行了 Estimate 免疫浸润评分相关性分析,显示 HNF4A 表达量和 Estimate 评分呈现负相关性 ($r = -0.38, P < 0.0001$) (图 2E)。HNF4A 和免疫细胞浸润评分的分析表明,HNF4A 和 B 淋巴细胞 ($r = -0.15, P < 0.001$)、CD8 + T 细胞 ($r = -0.16, P < 0.001$)、中性粒细胞 ($r = -0.18, P < 0.001$)、巨噬细胞 ($r = -0.22, P < 0.0001$) 和树突状细胞 ($r = -0.18, P < 0.001$) 都具有负相关性,但是和 CD4 + T 细胞不具有相关性 ($r = -0.03, P > 0.05$) (图 2F)。最后,进行 TMB 和 MSI 分析表明,HNF4A 在胃癌中和 TMB ($r = 0.28, P < 0.0001$)、MSI ($r = 0.13, P < 0.01$) 存在相关性(图 2G)。

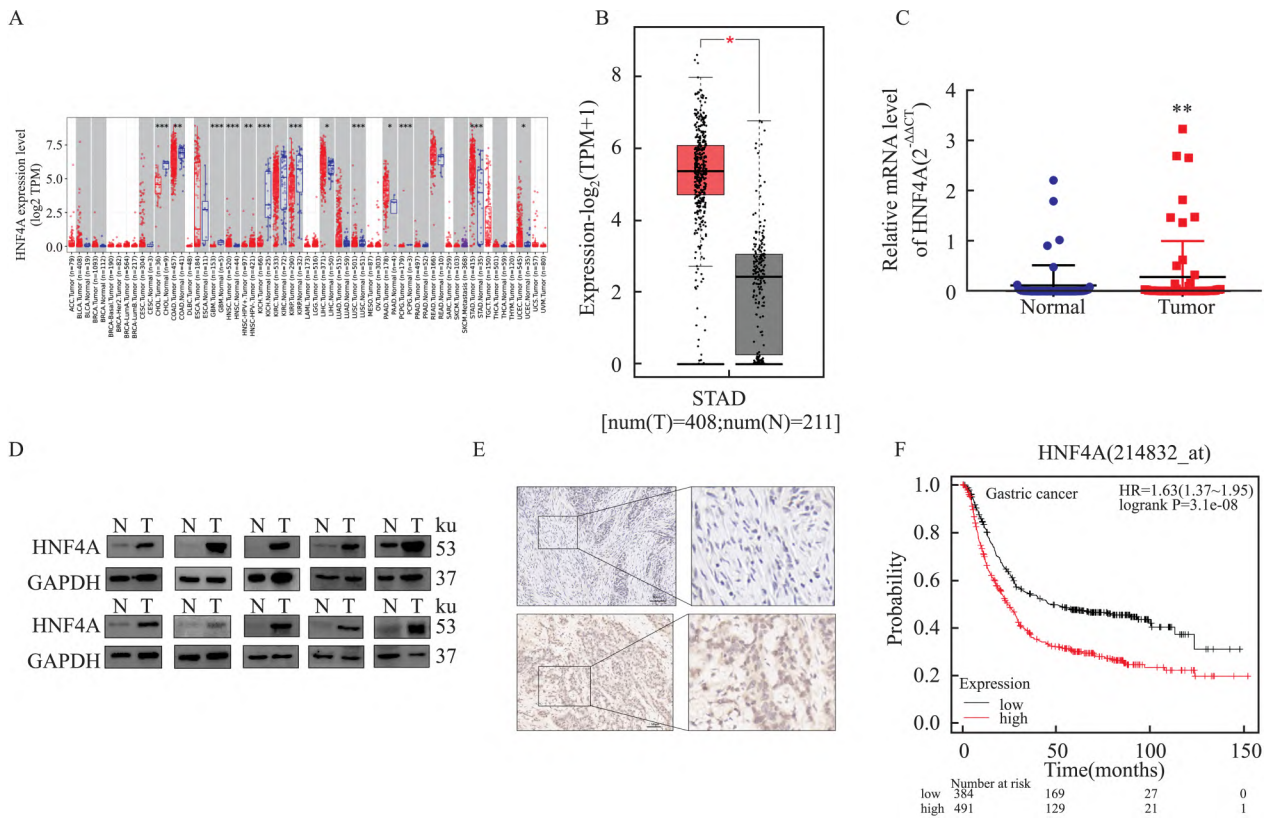


图 1 HNF4A 在胃癌组织中的差异性表达及预后

A: TIMER2 数据库中 HNF4A 差异性表达; B: GEPIA2 数据库中 HNF4A 差异性表达; C: 胃癌组织中 HNF4A mRNA 相对表达量; D: 胃癌组织中 HNF4A 蛋白相对表达量 (N 代表癌旁组织, T 代表胃癌组织); E: HNF4A 在胃癌和癌旁组织中的 IHC $\times 200$; F: KM-Plot 数据库中的高表达 HNF4A 患者总生存率更低; 与正常组织比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

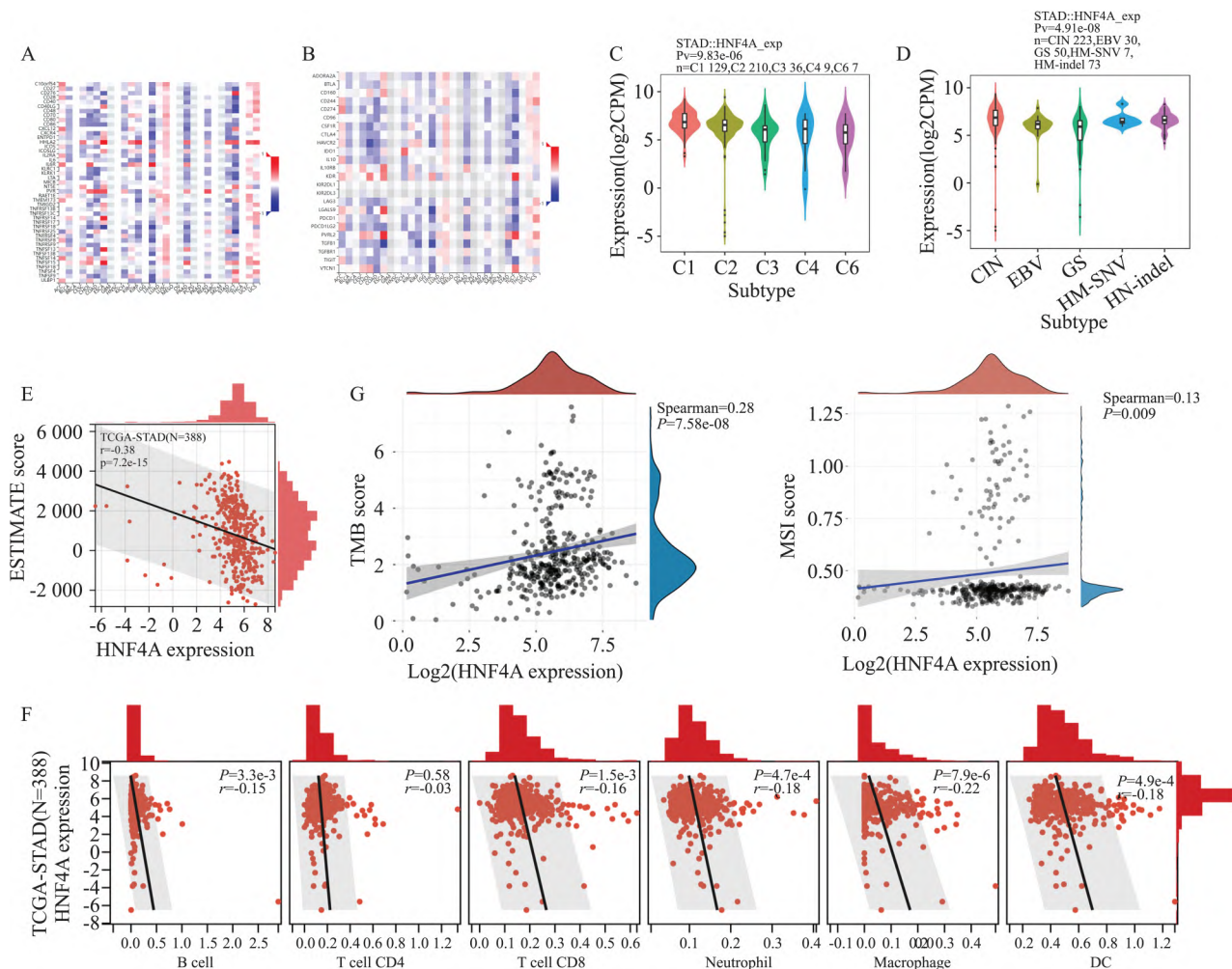


图 2 HNF4A 在胃癌中的免疫分析

A: HNF4A 和免疫刺激剂的关系; B: HNF4A 和免疫抑制剂的关系; C: HNF4A 在胃癌中和免疫亚型的关系; D: HNF4A 在胃癌中和分子亚型的关系; E: HNF4A 和免疫浸润 Estimate 评分关系; F: HNF4A 和免疫细胞浸润的关系(Timer 方法); G: HNF4A 和 TMB、MSI 的关系

2.3 HNF4A 在胃癌中的基因突变和相关性 通过 cBioProtal 数据库胃癌数据集对 HNF4A 进行了突变分析, HNF4A 在胃癌中突变以错配突变为(图 3A)。然后对 TCGA 数据库中的胃癌数据集构建了体细胞突变图, 并筛选出和 HNF4A 相关性最高的 10 个突变基因 (TTN、MUC16、TP53、LRP1B、SYNE1、CSMD3、ARID1A、FAT4、PCLO、FLG) (图 3B)。GSEA 富集分析, 在 HNF4A 高表达组主要富集在 MICROVILLUS_ORGANIZATION、INTESTINAL_ABSORPTION、RNA_EXPORT_FROM_NUCLEUS 等生物过程(图 3C)。通过 linkedOmics 数据库预测了可能和 HNF4A 正调控及负调控相关的 50 个基因(图 3D ~ F), 其中正相关前五基因为 HNF1A ($r = 0.786$)、USH1C ($r = 0.743$)、EPS8L3 ($r = 0.736$)、VIL1 ($r = 0.721$)、GPR35 ($r = 0.72$), 负相关前五的基因为 TERF2IP ($r = -0.451$)、C22orf23

($r = -0.438$)、FBXL5 ($r = -0.43$)、ARL4D ($r = -0.428$)、CLDND1 ($r = -0.425$)。然后利用 Cytoscape 网站联合 String 数据库预测和 HNF4A 相关的前 50 个相互作用蛋白, 并进行可视化(图 3G)。

2.4 HNF4A 对胃癌细胞增殖影响 HNF4A 在胃癌细胞系中的表达量分析, HNF4A 在 AGS 及 BGC823 细胞系中的 mRNA 及蛋白质相对表达量最高(图 4A ~ C)。在 AGS 细胞系中验证干扰片段效果发现, si-HNF4A #2 干扰效果最好(图 4D)。AGS 及 BGC823 细胞系稳转株验证, sh-HNF4A 组 HNF4A 表达量明显降低(图 4E-G)。CCK-8 结果显示, sh-HNF4A 组胃癌细胞的增殖能力明显减弱 ($P < 0.001$), 见图 5A; EdU 结果显示, sh-HNF4A 组的 DNA 的合成率明显低于 sh-Ctrl 组, 两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 见图 5B。平板克隆结果显示, sh-HNF4A 组细胞克隆率明显低于 sh-Ctrl 组 ($P <$

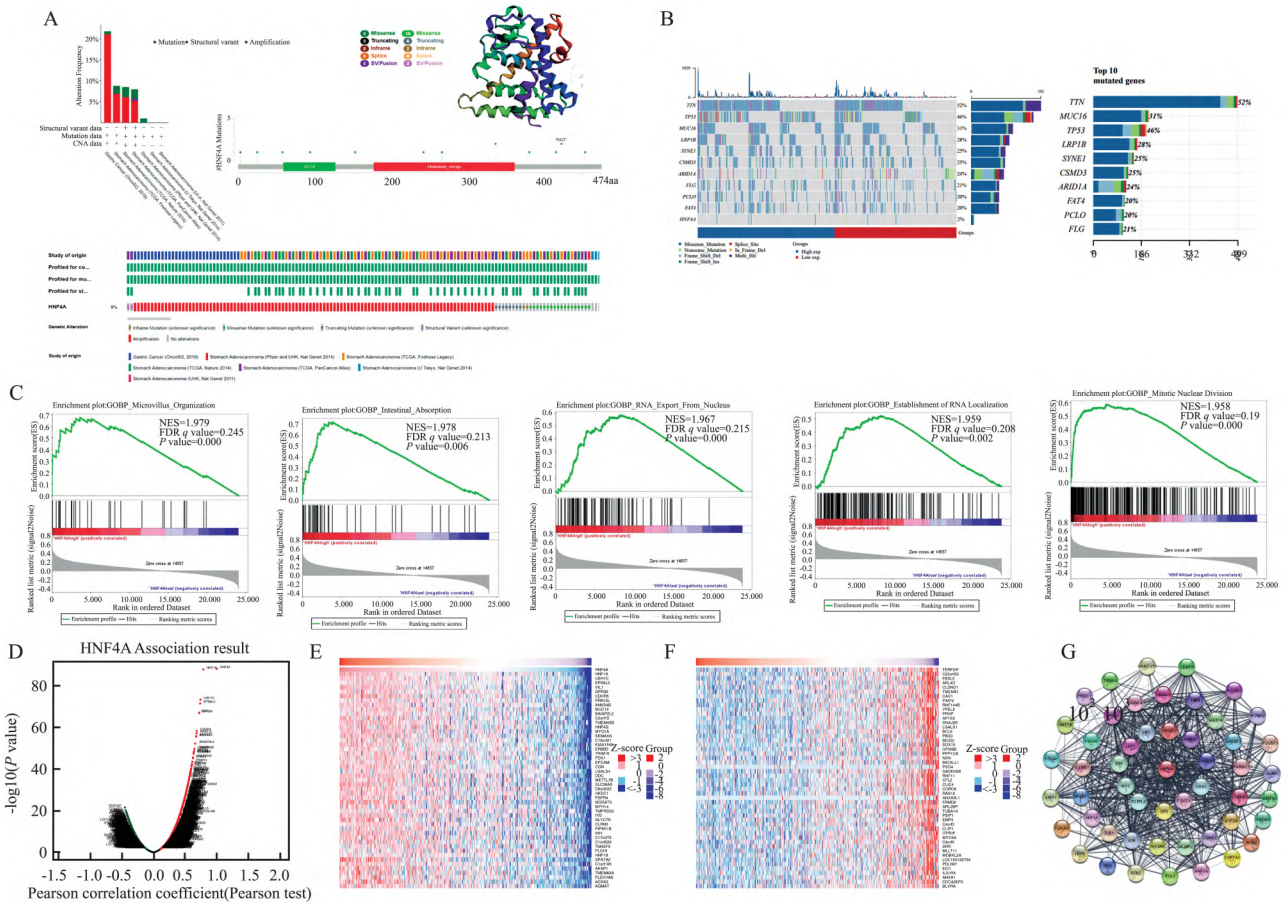


图3 HNF4A 在胃癌中的基因突变和相关性分析

A: HNF4A 在 cBioPortal 数据库中胃癌数据集的突变情况; B: HNF4A 在 TCGA-STATD 数据集的体细胞突变景观图及突变基因; C: GSEA 中 c5. go. bp 富集分析结果; D: HNF4A 相关基因的火山图; E: HNF4A 正相关性前 50 个基因; F: HNF4A 负相关性前 50 个基因; G: HNF4A 蛋白相互作用可视图

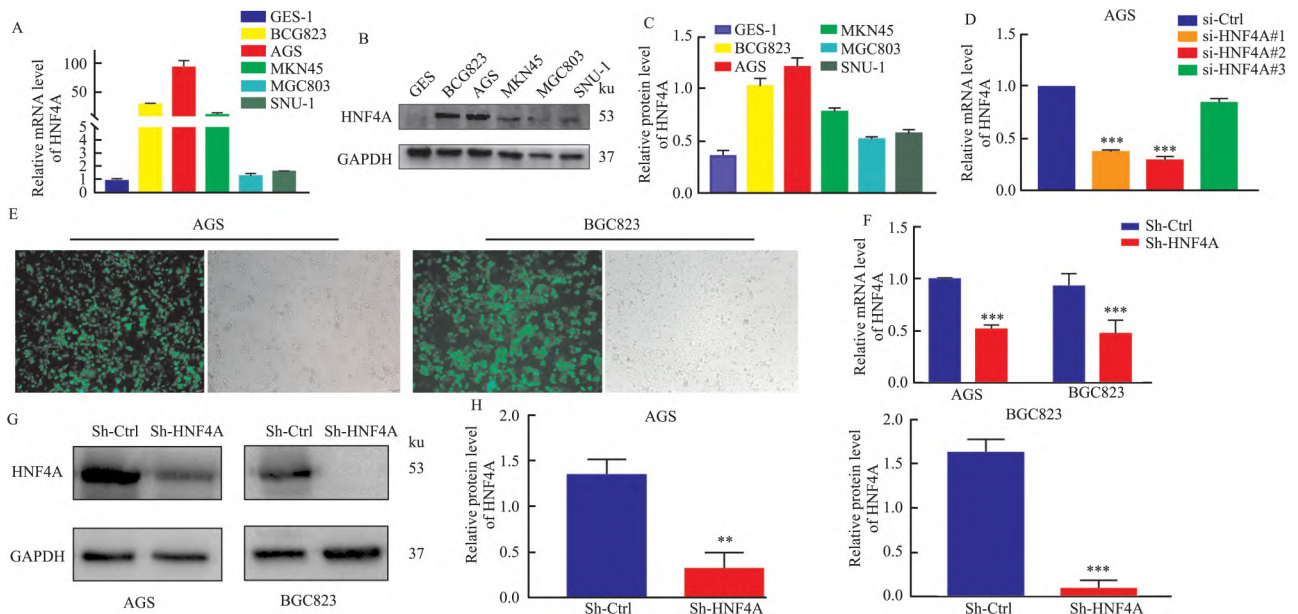


图4 HNF4A 在胃癌细胞系的表达及质粒的构建

A: HNF4A 在胃癌细胞系中 mRNA 水平的相对表达量; B-C: HNF4A 在胃癌细胞系中蛋白水平的相对表达量; D: HNF4A 干扰片段效果的验证; E: sh-HNF4A 稳转株荧光效果; F: sh-HNF4A 稳转株在 mRNA 水平的相对表达量; G-H: sh-HNF4A 稳转株在蛋白水平的相对表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

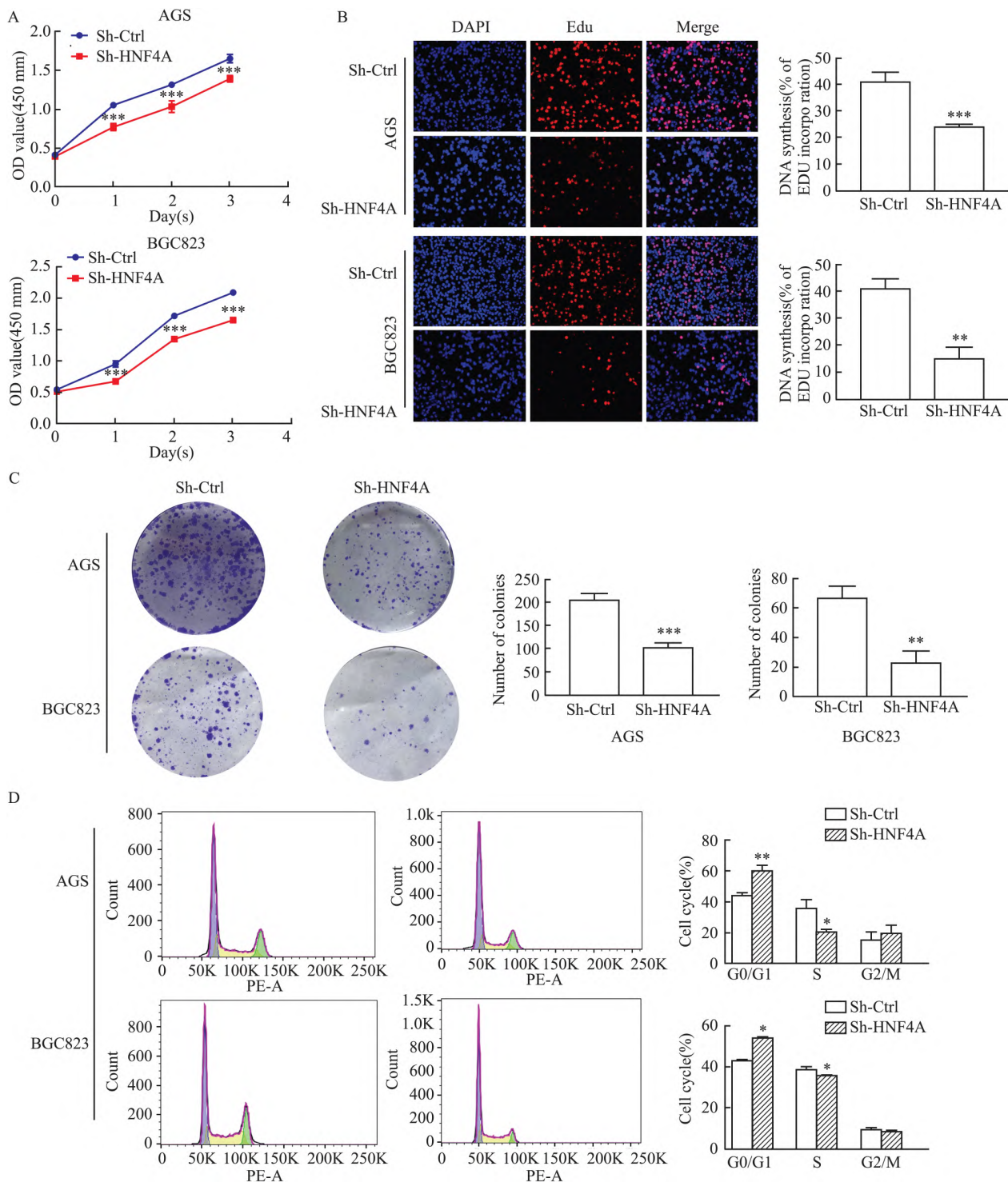


图5 HNF4A对胃癌细胞增殖的影响

A: CCK-8 增殖实验; B: EdU 增殖实验; C: 平板克隆实验; D: 流式细胞周期实验; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

0.01) ,见图 5C; 流式细胞周期结果显示 ,sh-HNF4A 组胃癌细胞周期阻滞在 G0/G1 期 ($P < 0.05$) ,见图 5D。

3 讨论

胃癌是全球高发恶性肿瘤之一 ,由于进展期胃

癌的 5 年生存率不足 30% [7] ,所以对于胃癌发病机制的研究迫在眉睫。HNF4A 不仅在复制、转录、翻译和翻译后的修饰过程中起调控作用 ,而且在癌症多种信号通路中发挥核心作用 ,如: Wnt/ β -catenin、NF- κ B、STAT3 和 TGF- β 信号通路 [8]。然而 HNF4A 在胃癌中作用仍然不明确。

研究^[5,9]表明 HNF4A 在肝细胞肝癌、结肠癌中常作为肿瘤抑制因子,与患者的预后呈负相关,但是在 TIMER2 数据库中 HNF4A 在肝癌和结肠癌呈现高表达,分析其原因可能与 HNF4A 存在亚型相关。研究^[2]表明 HNF4A 存在 P1 和 P2 两个亚型,此外 P1-HNF4A 和 P2-HNF4A 在组织分布也不同,其中 P1-HNF4A 主要在成人肝脏和肾脏中表达,而 P2-HNF4A 主要在胎儿肝脏、胃和胰腺中表达^[10-11]。Saandi et al^[12]研究表明,HNF4A 在结肠癌中通过与尾部相关同源转录因子 2(Caudal-related homeobox transcription factor 2 , CDX2) 相互作用抑制结肠癌进展,而 Lu et al^[13]认为 HNF4A 促进了结肠癌的进展。因此,在结肠癌中 HNF4A 发挥致癌或抑癌机制可能和 HNF4A 的亚型相关,需要进一步深入研究。

胃癌是一类高异质性的肿瘤,本研究显示 HNF4A 在胃癌组织中高表达,细胞功能实验证实 HNF4A 和胃癌细胞增殖密切相关,当敲低 HNF4A 时细胞的增殖周期阻滞在 G0/G1 期,结果与数据库分析结果相一致。因进展期胃癌患者的整体生存率较低,肿瘤免疫治疗可能给晚期胃癌患者带来一定获益^[14]。肿瘤突变负荷是肿瘤基因组中除去胚系突变后的体细胞突变量,当 TMB 越高时说明诱发肿瘤免疫反应的可能性越大,对免疫治疗的效果可能越好。如 Prasad et al^[15]研究证实当 TMB > 10 mut/Mb 时对免疫检测点抑制剂(immune checkpoint inhibitors , ICIs) 具有明显疗效。通过数据库分析显示 HNF4A 与 TMB、MSI 密切相关,在未来 HNF4A 可能是一个新的 ICIs 治疗反应生物标志物,这有待进一步实验研究来证明。对胃癌的免疫细胞浸润分析显示,在胃癌数据集中 HNF4A 与 CD8⁺ T 细胞、B 细胞、中性粒细胞、树突状细胞的免疫浸润水平为负相关,因此推测 HNF4A 可能抑制了免疫细胞浸润而引起胃癌细胞的免疫逃逸,最终促进疾病的进展。

本研究表明 HNF4A 在胃癌中可能作为一个癌基因促进疾病进展,体外细胞实验也证实 HNF4A 对胃癌细胞增殖能力的影响。同时,本研究也存在不足之处:首先,未区分 HNF4A 的两个亚型,在胃癌中两个亚型间的具体作用有待进一步研究;其次,对于 HNF4A 在免疫调控中的作用有待后续研究。

参考文献

[1] Sung H , Ferlay J , Siegel R L , et al. Global cancer statistics

2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin* , 2021 , 71 (3) : 209 - 49.

[2] Lambert É , Babeu J P , Simoneau J , et al. Human hepatocyte nuclear factor 4-α encodes isoforms with distinct transcriptional functions [J]. *Mol Cell proteomics* , 2020 , 19(5) : 808 - 27.

[3] Lu H. Crosstalk of HNF4α with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids [J]. *Acta Pharm Sin B* , 2016 , 6(5) : 393 - 408.

[4] Rogerson C , Britton E , Withey S , et al. Identification of a primitive intestinal transcription factor network shared between esophageal adenocarcinoma and its precancerous precursor state [J]. *Genome Res* , 2019 , 29(5) : 723 - 36.

[5] Teeli A S , Łuczynska K , Haque E , et al. Disruption of tumor suppressors HNF4α/HNF1α causes tumorigenesis in liver [J]. *Cancers(Basel)* , 2021 , 13(21) : 5357.

[6] Babeu J P , Jones C , Geha S , et al. P1 promoter-driven HNF4α isoforms are specifically repressed by β-catenin signaling in colorectal cancer cells [J]. *J Cell Sci* , 2018 , 131(13) : jcs214734.

[7] Gao K , Wu J. National trend of gastric cancer mortality in China (2003 - 2015) : a population-based study [J]. *Cancer Commun (Lond)* , 2019 , 39(1) : 24.

[8] Lv D D , Zhou L Y , Tang H. Hepatocyte nuclear factor 4α and cancer-related cell signaling pathways: a promising insight into cancer treatment [J]. *Exp Mol Med* , 2021 , 53(1) : 8 - 18.

[9] Jin L , Pan Y L , Zhang J , et al. LncRNA HOTAIR recruits SNAIL to inhibit the transcription of HNF4α and promote the viability , migration , invasion and EMT of colorectal cancer [J]. *Transl Oncol* , 2021 , 14(4) : 101036.

[10] Ko H L , Zhuo Z , Ren E C. HNF4α combinatorial isoform heterodimers activate distinct gene targets that differ from their corresponding homodimers [J]. *Cell Rep* , 2019 , 26(10) : 2549 - 57. e3.

[11] Dean S , Tang J I , Seckl J R , et al. Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents [J]. *Gene Expr* , 2010 , 14(6) : 337 - 44.

[12] Saandi T , Baraille F , Derbal-Wolfrom L , et al. Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4α in intestinal cancer [J]. *Oncogene* , 2013 , 32(32) : 3782 - 8.

[13] Lu Y , Yu Y , Liu F , et al. LINC00511-dependent inhibition of IL-24 contributes to the oncogenic role of HNF4α in colorectal cancer [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* , 2021 , 320 (3) : G338 - 50.

[14] Staudt R E , Carlson R D , Snook A E. Targeting gastrointestinal cancers with chimeric antigen receptor (CAR) -T cell therapy [J]. *Cancer Biol Ther* , 2022 , 23(1) : 127 - 33.

[15] Prasad V , Addeo A. The FDA approval of pembrolizumab for patients with TMB > 10 mut/Mb: was it a wise decision? No [J]. *Ann Oncol* , 2020 , 31(9) : 1112 - 4.

Multi – database analysis and experimental study on the expression of HNF4A in gastric cancer

Lu Hao¹, Fan Jichang¹, Zhou Liqiang², Wu You¹, Xin Lin¹

(¹Dept of Gastrointestinal Surgery, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000;

²Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000)

Abstract *Objective* To investigate the expression, prognosis and biological role of hepatocyte nuclear factor 4A (HNF4A) in gastric cancer, and to study its effect on the proliferation of gastric cancer cells. *Methods* Tumor Immune Estimation Resource 2.0 (TIMER2.0) and Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA2) databases were used to analyze the relative expression levels of HNF4A in gastric cancer and normal tissue, KM Plotter was used to analyze the correlation between the expression level of HNF4A and the survival rate of gastric cancer patients, TISIDB database and R language (4.1.2) were used to analyze whether HNF4A was involved in the immune regulation process of gastric cancer. cBioPortal database was used to analyze the mutations of HNF4A in gastric cancer, GSEA 4.2 was used to analyze the functional enrichment of HNF4A, and LinkedOmics database was used to predict the genes that might be regulated by HNF4A. The relative expression of HNF4A in gastric cancer and adjacent tissues was detected by qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry (IHC). The proliferation and cell cycle of gastric cancer cells were analyzed by CCK-8, EdU, colony forming assay and flow cytometry. *Results* The expression of HNF4A increased in gastric cancer tissues ($P < 0.05$), and the overall survival rate of gastric cancer patients with high HNF4A expression was worse ($P < 0.001$). HNF4A was mainly missense mutated in gastric cancer. Immune cell infiltration showed that HNF4A was associated with B lymphocytes, CD8⁺ T cells, neutrophils, macrophages and dendritic cells (all $P < 0.001$). HNF4A was also associated with tumor mutation burden ($r = 0.28$, $P < 0.0001$) and microsatellite instability ($r = 0.13$, $P < 0.01$). After knockdown of HNF4A, cell proliferation ability was significantly inhibited, and cell cycle was arrested at G0/G1 phase. *Conclusion* HNF4A expression significantly increased in gastric cancer tissues, which is associated with poor prognosis, and may also be involved in immune regulation. Knockdown of HNF4A can inhibit the proliferation of gastric cancer cells.

Key words HNF4A; gastric cancer; cell proliferation; bioinformatics

(上接第 433 页)

detected. *Results* Compared with control group, model group mice exhibited the increased number of spontaneous flinches, decreased mechanical nociceptive threshold, decreased movement distance and latency, and up-regulated expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β), astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (GFAP), cyclooxygenase-2 (COX-2), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate and specific proteinase 1 (Caspase-1). Compared with model group, lycorine administration reduced the number of spontaneous flinches, increased mechanical nociceptive threshold, enhanced the movement distance and latency, bound and reduced COX-2 expression, down-regulated the expression levels of IL-1 β , GFAP, NLRP3 and Caspase-1. *Conclusion* Lycorine reduces COX-2 expression, inhibits NLRP3 inflammasome activation, suppresses spinal inflammation, consequently alleviates pain behaviors and improved motor ability of mice.

Key words lycorine; chemotherapy induced pain; neuroinflammation; cyclooxygenase-2