

原肌球蛋白调节蛋白3在肝细胞癌复发转移中的潜在作用分析

罗龙彪,蒋辉,马丹丹,付航玮,孙炜玮
(中部战区总医院普通外科,武汉 430070)

摘要 目的 探讨原肌球蛋白调节蛋白3(TMOD3)与肝细胞癌恶性生物学特征的关系及其对肝癌复发转移的预测潜力。方法 首先利用人类蛋白质图谱数据库获取 TMOD3 结构及其在细胞和组织中的定位。利用 TCGA 以及 GEO 数据集探究 TMOD3 在肝细胞癌组织与正常肝脏组织中的表达差异及其对临床病理特征及预后的影响。接着利用 STRING 数据库探究 TMOD3 的相互作用蛋白并利用 Metascape 数据库进行富集分析,最后利用 Logistic 回归分析肝细胞癌远处转移的独立危险因素,并利用受试者工作特征曲线(ROC)以及瓦尔德检验进行预测变量的重要程度评估。生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线与 Log-rank 检验。**结果** TMOD3 定位于细胞中的肌动蛋白丝,且与癌旁组织相比,肝细胞癌组织中 TMOD3 表达水平更高($P < 0.05$),TMOD3 高表达与肝细胞癌患者的淋巴结转移及肿瘤远处转移密切相关($P < 0.05$)。富集分析结果显示 TMOD3 及其相互作用蛋白主要富集于肿瘤的侵袭转移的信号通路。Logistic 回归分析显示 TMOD3 是肝细胞癌复发转移的独立危险因素($OR:4.359, 95\% CI:1.235 \sim 15.384, P=0.022$)。生存分析显示高表达的 TMOD3 与肝细胞癌患者的不良总生存期(OS)、无病生存期(DFS)、无复发生存期(RFS)相关($P < 0.05$)。ROC 分析和瓦尔德检验均判断 TMOD3 具有良好的预测肝细胞癌发生远处转移的预测效能。**结论** TMOD3 与肝细胞癌的侵袭转移密切相关,是肝细胞癌发生远处转移的独立危险因素。TMOD3 对于预测肝细胞癌发生远处转移具有较好的效能,有潜力成为预测肝细胞癌发生远处转移的生物标志物。

关键词 原肌球蛋白调节蛋白3;肝细胞癌;转移;组织芯片;生物标志物;生物信息学

中图分类号 R 657.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2094-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.005

肝癌是最常见的癌症类型之一。在肝癌中,肝

细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占75%~85%,肝内胆管癌占10%~15%,还有较少见的混合型肝细胞癌-胆管癌。HCC具有高度恶性的生物学特征,其复发和转移是导致高病死率的主要原因之一^[1]。因此,识别新的分子靶点可能会为HCC患者提供新的预后指标和潜在的治疗靶点,以降低

2024-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82300716)

作者简介:罗龙彪,男,主治医师;

孙炜玮,男,副主任医师,通信作者,E-mail:3295364@qq.com

weighted imaging, the T/M at 2 h in the experimental group was $135.20\% \pm 0.06\%$ of 0 h, the T/M at 2 h in the Gd-DTPA group was $115.70\% \pm 0.05\%$ of 0 h and the T/M at 2 h in the saline group was $113.5\% \pm 0.02\%$ of 0 h. Compared with Gd-DTPA control group, the experimental group had significantly enhanced T1-weighted MR contrast, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). In tumor T2-weighted imaging, the T/M quantitative analysis showed that the tumor T2-weighted contrast enhancement of the three groups was relatively small, and the T/M of the experimental group and the control group at 0.5 h was $94.60 \pm 0.03\%$ and $106.30 \pm 0.04\%$ of the 0 h, respectively. In the normal saline group, T/M at 0.5 h was $102.20 \pm 0.002\%$ of that at 0 h, and no significant enhancement of the T2-weighted MR contrast of tumor was observed. **Conclusion** Successfully construct a FAP-responsive molecular probe which can self-assemble to form a Gd-nanoparticle structure in tumor cells under the cleavage of FAP, effectively improving the enrichment of Gd in the target region, and enhancing T1-weighted magnetic resonance imaging of pancreatic cancer, which has potential clinical application value.

Key words contrast agent; click reaction; self-assembly; fibroblast activation protein; pancreatic cancer; T1 weighted magnetic resonance imaging

Fund program Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2023A20105)

Corresponding author Jiang Jinhui, E-mail: jiangjinhui@ahmu.edu.cn

HCC 的复发转移进程进而改善预后。

原肌球蛋白调节蛋白家族是一组肌动蛋白结合蛋白,其中原肌球蛋白调节蛋白 3(tropomodulin 3, TMOD3) 几乎在所有哺乳动物细胞中都普遍表达,提示其在哺乳动物生理功能上的重要性。同时,有研究^[2-3]表明 TMOD3 在乳腺癌、非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤中高表达,促进癌细胞侵袭与迁移。推测其在 HCC 侵袭转移中可能发挥重要作用。目前,国内尚无 TMOD3 在 HCC 中的相关研究,该研究旨在探讨 TMOD3 与 HCC 恶性生物学特征的关系及其对复发转移的预测潜力。

1 材料与方法

1.1 基因结构以及定位分析 人类蛋白质图谱(Human Protein Atlas, HPA)是一个始于 2003 年的瑞典项目,旨在利用多组学技术绘制细胞、组织和器官中所有人类蛋白质的图谱,该数据库中的所有数据都可开放获取^[4]。在该数据库中检索 TMOD3 可获得相应的基因结构以及在细胞和组织中的定位的可视化数据。

1.2 基因表达差异分析 采用基因表达水平的交互式分析平台(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)^[5]数据库的单基因分析模块来分析肿瘤基因组图谱计划(The Cancer Genome Atlas, TCGA)中 TMOD3 在 HCC 组织和癌旁组织中的表达和预后图谱。利用 GEPIA 数据库分析:设定条件为“gene: TMOD3”、“cancer type: HCC”,可获得 TMOD3 在 HCC 组织与癌旁组织中的表达差异情况。同时利用 R(版本号 4.0.3)中“ArrayExpress”包和“GEOquery”包下载 BioStudies 数据集 E-TABM-36 和基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)数据集 GSE144269 和 GSE14520 中基因的表达数据,并进行 TMOD3 在 HCC 组织与癌旁组织中的表达差异分析。

1.3 蛋白质相互作用以及富集分析 采用基因/蛋白质相互作用检索搜索工具数据库(Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins, STRING)^[6],选择“Protein by name”选项,将 TMOD3 直接复制粘贴到输入框中,物种(Organisms)选择人(Homo sapiens),点击 Search 按钮提交任务即可获得与 TMOD3 的相互作用蛋白集合,选择分数排名前 10 的相互作用蛋白进行后续的京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)以及基因本体联合数据库(Gene Ontology, GO)富

集分析,分别在 KEGG 数据库以及 Metascape 数据库^[7]进行分析。

1.4 TCGA 中 HCC 患者临床病理特征及预后分析 从 TCGA 数据库中获取 HCC 患者中 TMOD3 的 mRNA 表达水平、临床信息及预后生存状态等数据。本研究共收集整理了 423 例 HCC 组织样本的 TMOD3 基因转录组数据。其中包括 TMOD3 mRNA 表达量、年龄、性别、病理分级、病理分期、远处转移情况(包括诊断时已处于晚期的患者和根治术后出现复发转移的患者)、淋巴结转移情况、随访时间以及生存状态等指标。以 TMOD3 基因的 mRNA 的表达水平中位数为分割点,分为 TMOD3 高表达组与 TMOD3 低表达组,以此分析 TMOD3 mRNA 表达水平与 HCC 患者临床病理特征及预后的关系。

1.5 基于临床样本的临床病理特征及预后分析

HCC 的组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司。组织微阵列(tissue microarray, TMA)由 162 个 HCC 肿瘤组织和 19 个癌旁组织组成,每个组织有对应的临床病理特征数据。HCC 组织芯片的免疫组化技术是使用免疫组化试剂盒(EnVisionTM Flex+, CAT)进行的。使用 Aperio 扫描仪(型号:Aperio XT, Leica Microsystems Wetzlar)对免疫组化染色进行评分。使用 CaseViewer 2.4 软件来读取组织芯片免疫组织化学染色切片,采用 Image-Pro Puls 软件对染色效果进行统计评分,根据细胞的染色范围(<5% 为 0 分;6%~25% 为 1 分;26%~50% 为 2 分;51%~75% 为 3 分;>75% 为 4 分)和染色的强度(阴性为 0 分;弱阳性为 1 分;中等阳性为 2 分;强阳性为 3 分)评分。最终分数为染色范围分数乘以染色强度分数。病例被分为 TMOD3 低表达组(0~6 分)和 TMOD3 高表达组(6 分以上)。分析 TMOD3 表达水平与 HCC 患者的年龄、性别、病理分期等临床病理特征及预后的关系。

1.6 统计学处理 采用 SPSS Statistics 27 以及 R 软件(版本号 4.0.3)进行统计学分析。所有计数资料以数量和百分比表示,符合正态分布的计量资料以平均值±标准差表示,不符合正态分布的计量资料以中位数(四分位数间距)表示。服从正态分布的计量资料的两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。不服从正态分布的计量资料以及等级资料采用非参数检验(Mann-Whitney 检验和 Wilcoxon 检验)。计数资料中的两组间比较采用卡方检验和 Fisher 确切概率检验。采用“DESeq2”包进行基因表达的差异分析,“survival”“survminer”和

“ggplot2”包用于生存分析。采用 Log-rank 检验以及 Kaplan-Meier 法绘制患者生存曲线图。采用 Logistic 回归进行单因素和多因素分析,利用 SPSS 进行 ROC 曲线的绘制,并通过比较 ROC 曲线下面积以及瓦尔德检验后得出的卡方值(χ^2) - 自由度(df)进行预测变量重要性的评估,并利用 Graph-Prism9.0 进行图片绘制。所有统计检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 *TMOD3* 的结构及其在细胞和组织中的定位

采用 HPA 数据库检索 *TMOD3* 在人类染色体中的定位,发现 *TMOD3* 位于 15 号染色体上,具体位置位于 51829628-51947295bp,结构预测可见图 1A。*TMOD3* 蛋白在 HCC 组织中呈现高表达的状态,表达位于细胞质中,见图 1B。接着探究 *TMOD3* 在细胞中的定位,发现 *TMOD3* 在肌动蛋白丝中表达,见图 1C、1D,这提示 *TMOD3* 在细胞的流动和定位中发挥着重要作用。

2.2 *TMOD3* 在 HCC 组织及癌旁组织中的表达差异 采用 GEPIA 工具探索 *TMOD3* 在 HCC 组织和配对的癌旁组织中的表达情况。结果显示,*TMOD3* 在 HCC 组织中升高,见图 2A。应用免疫组化技术测定 *TMOD3* 在组织芯片 HCC 和相匹配的癌旁组织中的表达,并根据染色效果的评分,将其分为低表达组和高表达组;结果显示,*TMOD3* 在 119 个 HCC 组织样本(73.45%)中呈高表达,在 43 个 HCC 组织样本(26.55%)中呈低表达,并且与癌旁组织样本相比,*TMOD3* 在 HCC 组织中的表达更高($t = 10.778$, $P = 0.001$) (图 2B、2C)。此外利用 E-TABM-36、GSE144269 以及 GSE14520 数据集对 HCC 以及匹

配的正常组织进行 *TMOD3* 表达的差异分析,均发现 *TMOD3* 在 HCC 组织中高表达,在正常组织中低表达(图 2D-2F)。

2.3 *TMOD3* 及其相互作用蛋白的功能和通路富集分析 利用 STRING 数据库中的蛋白质相互作用(Protein-Protein Interaction, PPI)网络分析工具探索 *TMOD3* 在 HCC 组织中的相互作用蛋白,取交互作用最强的前 10 名,见图 3A。将这些交互作用蛋白分别纳入 KEGG 分析以及 GO 分析中,以探究 *TMOD3* 及其交互作用蛋白主要的富集功能和通路,结果发现 *TMOD3* 及其交互作用蛋白主要富集于运动蛋白、肌动蛋白细胞骨架的调节、Rap1 信号通路和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路等,这也再次证明 *TMOD3* 及其交互作用蛋白的下游通路与肿瘤的复发转移密切相关(图 3B、3C)。

2.4 *TMOD3* 表达水平与肝癌患者临床病理特征的关系 将 TCGA 中提取出的数据,根据 *TMOD3* 基因的表达水平中位数作为分割点将其分为 *TMOD3* 高表达组与 *TMOD3* 低表达组,分析 *TMOD3* 表达水平与 HCC 患者临床病理特征的关系。结果显示,高表达 *TMOD3* 的患者病理分期更高、淋巴结转移的发生以及远处转移的发生比例更高($P < 0.05$),与性别、病理分级等无明显关系($P > 0.05$),见表 1。组织芯片免疫组化染色结果,按照 Image-Pro Puls 软件对染色效果统计评分,将其分为 *TMOD3* 高表达组(评分 > 6 分)与 *TMOD3* 低表达组(评分 ≤ 6 分),利用对应的临床数据分析 *TMOD3* 表达水平与 HCC 患者临床病理特征的关系。结果显示,高表达 *TMOD3* 水平的 HCC 患者的淋巴结转移、远处转移以及周围侵犯的发生比例更高($P < 0.05$),与性别、

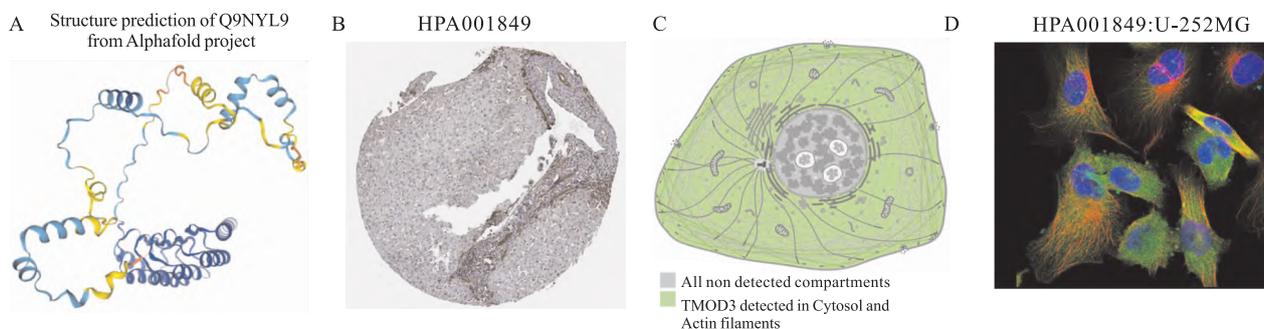


图 1 *TMOD3* 的结构及其在细胞和组织中的定位

Fig.1 Structure of *TMOD3* and its localization in cells and tissues

A: Structural prediction of *TMOD3* in the HPA project; B: Cytoplasmic expression of *TMOD3* protein in HCC tissues; C: Structural images showing the presence of *TMOD3* in the cytoplasm and actin filaments; D: Immunofluorescence images detecting *TMOD3* in the cytoplasm and actin filaments.

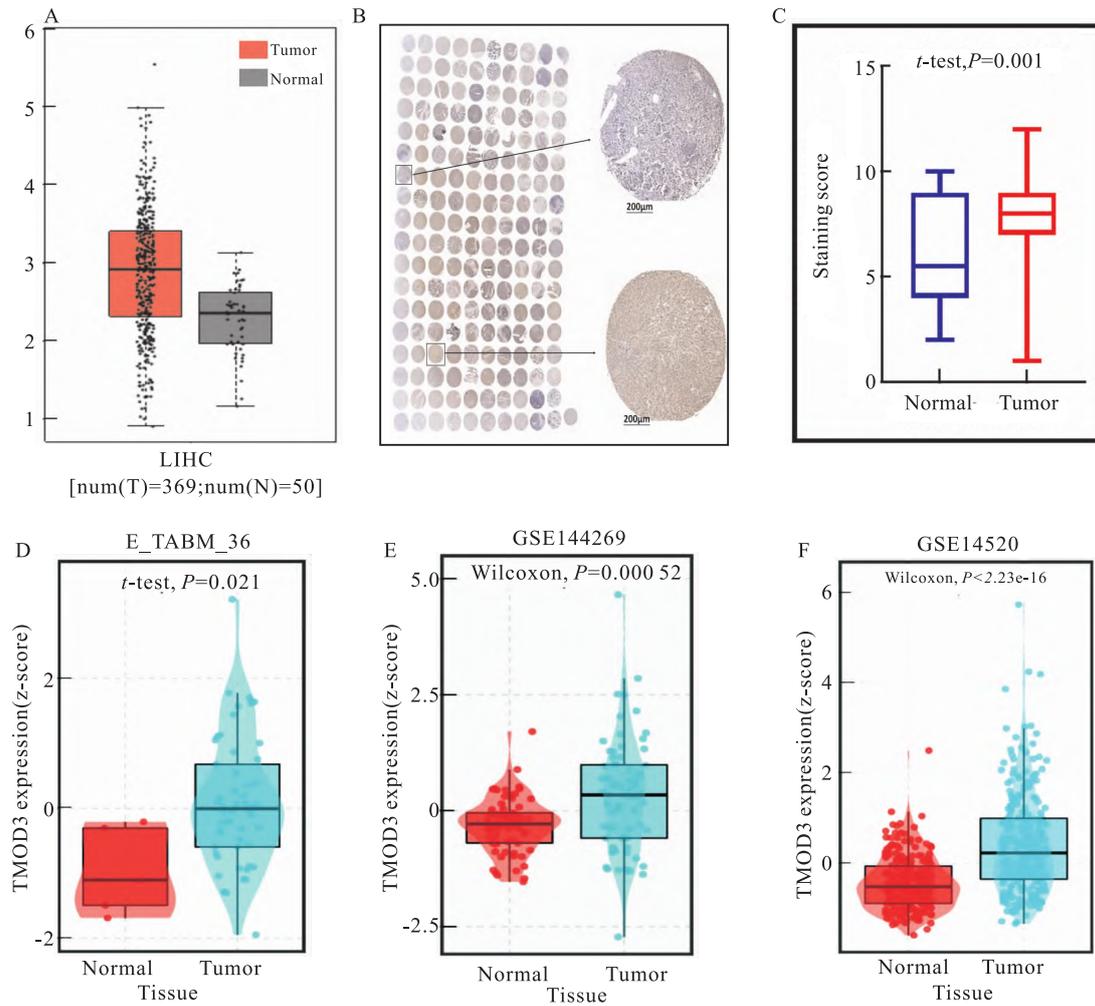


图2 TMOD3 在 HCC 组织和癌旁组织中的表达差异

Fig. 2 Expression differences of TMOD3 in HCC tissues and adjacent tissues

A: GEPIA database analysis results; B: Overview of TMOD3 immunohistochemical staining in the tissue microarray (TMA) and microscopic images at $\times 100$ magnification; C: Quantitative analysis of the TMA cohort; D - F: Analysis results of the E-TABM-36, GSE144269, and GSE14520 datasets.

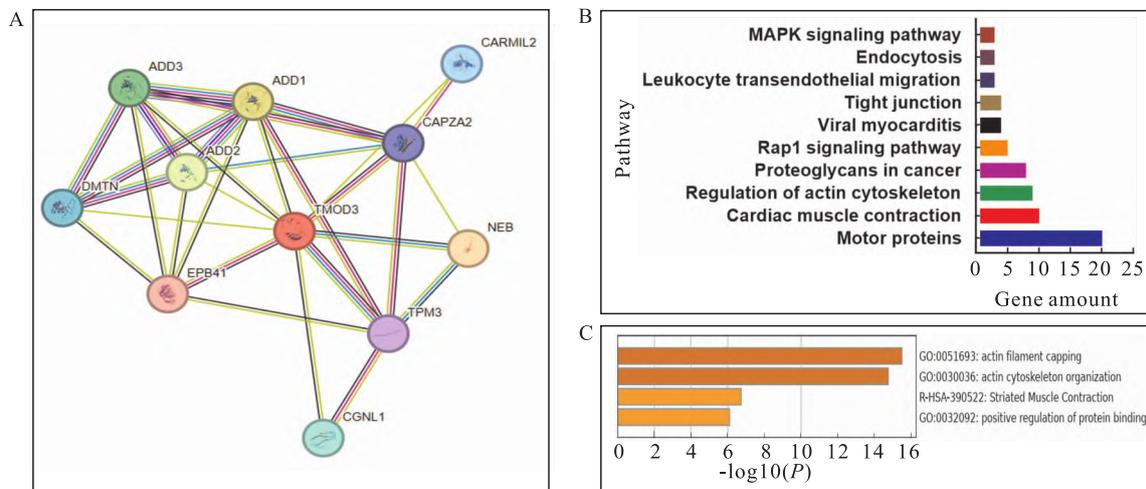


图3 TMOD3 及其相互作用蛋白的富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of TMOD3 and its interacting proteins

A: PPI interaction network of TMOD3; B: Bar chart of KEGG enrichment analysis results; C: Bar chart of GO enrichment analysis results.

表1 TCGA 数据中 *TMOD3* 表达水平与 HCC 患者临床病理特征的关系 [*n*(%)]

Tab.1 The correlation between *TMOD3* expression and clinicopathological features of HCC patients in TCGA data [*n*(%)]

Clinicopathological characteristics	Low expression (n = 212)	High expression (n = 211)	χ^2 value	P value
Age (year)			0.852	0.409
≤60	93(43.87)	102(48.34)		
>60	119(56.13)	109(51.66)		
Gender			1.879	0.102
Male	147(69.34)	133(63.03)		
Female	65(30.66)	78(36.97)		
Pathological grading			2.485	0.276
Moderately/Well differentiated	138(65.09)	127(60.19)		
Poorly/Undifferentiated	70(33.02)	80(37.91)		
Missing	4(1.89)	4(1.90)		
TNM stage			5.394	0.043
I / II	157(74.06)	135(63.98)		
III / IV	54(25.47)	76(36.02)		
Missing	1(0.47)	0(0)		
T stage			2.600	0.396
T1/T2	175(82.55)	171(81.04)		
T3/T4	37(17.45)	40(18.96)		
Lymph node metastasis			4.099	0.027
No	138(65.09)	116(54.98)		
Yes	72(33.96)	91(43.13)		
Missing	2(0.94)	4(1.90)		
Distant metastasis			16.954	<0.001
No	149(70.28)	107(50.71)		
Yes	63(29.72)	104(49.29)		
Family history			1.155	0.284
No	149(70.28)	138(65.40)		
Yes	63(29.72)	73(34.60)		
Hepatitis			1.994	0.131
No	124(58.49)	108(51.18)		
Yes	88(41.51)	103(48.82)		

年龄及脉管癌栓等无明显关系 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.5 *TMOD3* 表达水平与 HCC 患者预后分析 采用 Kaplan-Meier 法分析 *TMOD3* 表达量不同的患者在 TCGA 以及 GSE14520 数据集中的总体生存期差异。结果显示高表达 *TMOD3* 患者总体生存时间低于低表达组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4A、4D。接着分析组织芯片相关的 HCC 患者的随访数据, 使用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线并进行 Log-rank 检验, 结果显示 *TMOD3* 高表达组的总生存期低于低表达组 ($P < 0.001$), 见图 4B。此外还探究 *TMOD3* 高低表达的患者与无进展生存期 (progression free survival, PFS) 和无复发生存期 (recurrence free survival, RFS) 的关系, 结果表明在 TCGA 数据以及 GSE14520 数据集中, *TMOD3* 高表达组的

表2 组织芯片临床样本 *TMOD3* 表达水平与 HCC 患者临床病理特征的关系 [*n*(%)]

Tab.2 Correlation between *TMOD3* expression in Tissue microarray samples and clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma patients [*n*(%)]

Clinicopathological characteristics	Low expression (n = 43)	High expression (n = 119)	χ^2 value	P value
Age (year)			3.314	0.069
≤60	30(69.77)	64(53.78)		
>60	13(30.23)	55(46.22)		
Gender			0.157	0.692
Male	26(60.47)	76(63.87)		
Female	17(39.53)	43(36.13)		
T stage			2.619	0.454
T1/T2	32(74.42)	77(64.71)		
T3/T4	11(25.58)	42(35.29)		
Lymph node metastasis			8.924	0.003
No	39(90.70)	80(67.23)		
Yes	4(9.30)	39(32.77)		
Distant metastasis			9.362	0.002
No	40(93.02)	83(69.75)		
Yes	3(6.98)	36(30.25)		
Family history			3.350	0.067
Yes	14(32.56)	58(48.74)		
No	29(67.44)	61(51.26)		
Cirrhosis			0.061	0.805
Yes	24(55.81)	69(57.98)		
No	19(44.19)	50(42.02)		
Portal hypertension			1.013	0.314
Yes	3(6.98)	15(12.61)		
No	40(93.02)	104(87.39)		
AFP (ng/ml)			1.117	0.291
<400	18(41.86)	58(48.74)		
≥400	25(58.14)	61(51.26)		
Child classification			1.164	0.281
A/B	42(97.67)	111(93.28)		
C	1(2.33)	8(6.72)		
Surrounding invasion			6.773	0.009
Yes	1(2.33)	22(18.49)		
No	42(97.67)	97(81.51)		
Vascular tumor thrombus			0.597	0.440
Yes	10(23.26)	35(29.41)		
No	33(76.74)	84(70.59)		

RFS 以及 PFS 均低于 *TMOD3* 低表达组, 见图 4C、4E。这些结果均表明 *TMOD3* 的表达与 HCC 的预后, 尤其与 HCC 的复发转移存在着密切联系。

2.6 影响 HCC 远处转移的独立危险因素 将组织芯片对应的临床样本数据中 *TMOD3* 表达水平、年龄、性别、T 分期、家族史、肝硬化、甲胎蛋白、Child 分级等指标纳入单因素及多因素 Logistic 回归分析。结果显示在单因素 Logistic 回归分析中, 年龄 > 60 岁、T3/T4 分期、门脉高压、*TMOD3* 高表达是 HCC

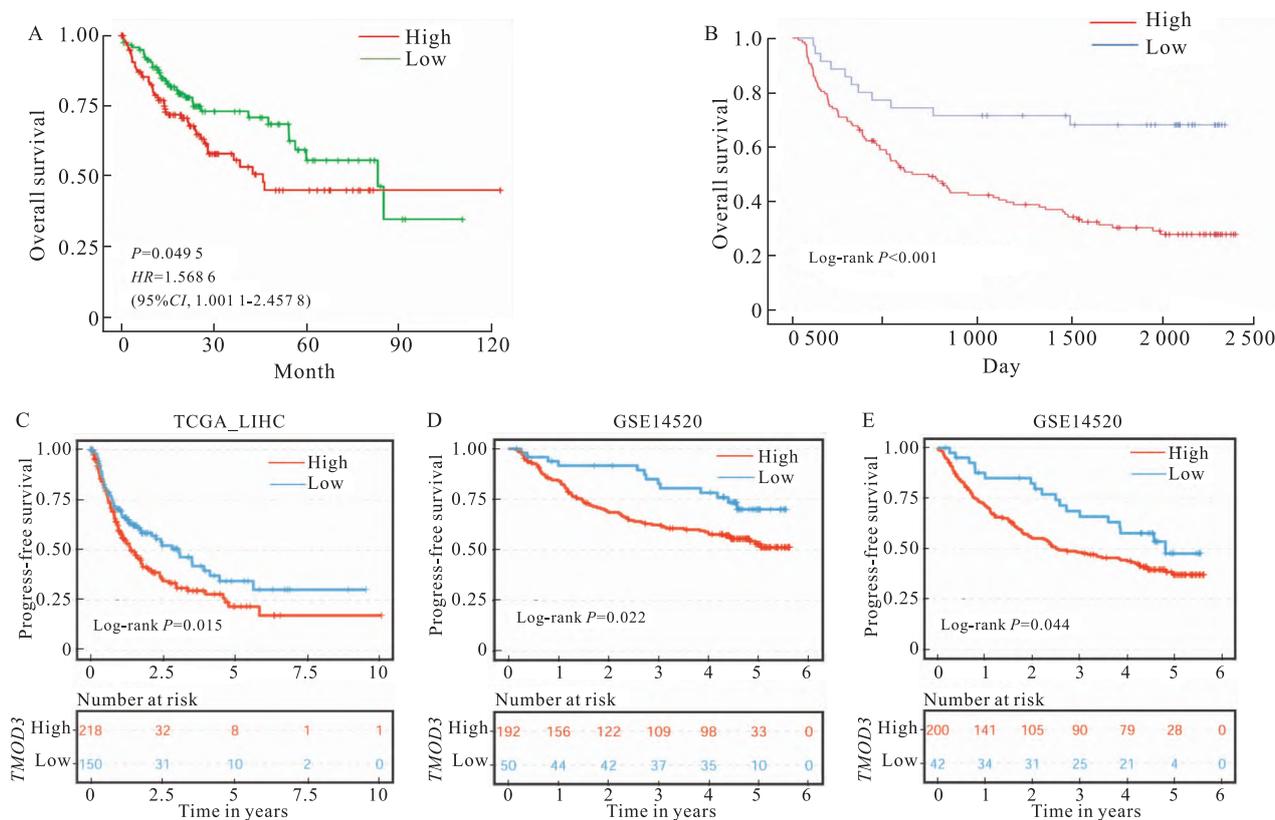


图4 TMOD3 高表达组与低表达组肝癌患者的生存曲线

Fig. 4 Survival curves of HCC patients in the TMOD3 low expression group compared to the high expression group

A: OS curve analysis of TMOD3 in TCGA; B: OS curve analysis of TMOD3 using clinical data from tissue microarrays; C: PFS curve analysis of TMOD3 in TCGA; D: OS curve analysis of TMOD3 in GSE14520; E: RFS curve analysis of TMOD3 in GSE14520.

患者远处转移的危险因素;在多因素 Logistic 回归分析中,仅有年龄 >60 岁 ($OR: 2.256, 95\%CI: 1.006 \sim 5.059, P=0.048$)、T3/T4 分期 ($OR: 1.551, 95\%CI: 1.039 \sim 2.314, P=0.032$) 和 TMOD3 高表达 ($OR: 4.359, 95\%CI: 1.235 \sim 15.384, P=0.022$) 为 HCC 患者远处转移的独立危险因素。见表 3。

2.7 TMOD3 的预测评价 将 Logistic 回归中单因素分析中有统计学的差异的变量进行 ROC 曲线分析,观察每个变量对于 HCC 转移的预测的曲线下面积(图 5A),发现 TMOD3 与年龄在预测肝癌的转移中的 ROC 曲线最高。同时还利用 $\chi^2 - df$ 进一步判断每个预测变量的重要程度,发现 TMOD3 和 T 分期在预测的重要程度上位于前列(图 5B)。提示 TMOD3 在预测 HCC 转移中的有着重要价值。

3 讨论

随着世界人口的迅速增长以及老龄化进程加速,各国的癌症负担会随着时间的推移而逐渐增加。根据近年报道的中国癌症数据结果表明,肝癌的发

病率逐年上升,在所有癌症中位列第 4,但其病死率却居第 2 位^[8]。HCC 作为肝癌最常见的类型,其早期症状多不典型,等到患者出现难以忍受的症状时,肿瘤多处于中晚期阶段,以致丧失手术根治机会。随着基因治疗技术的发展,分子靶向治疗已成为 HCC 诊疗的热点。深入探索 HCC 发生发展潜在的分子机制和预后标志物对于疾病的诊疗及随访等都至关重要,尤其对于术后复发转移或晚期不能手术的 HCC 患者,抑制 HCC 的进展,甚至达到转化手术的目的,使患者能够进行根治性手术,均对延长患者的生存期至关重要。

TMOD3 选择性地调控专门的原肌球蛋白(tropomyosin, TPM) - 纤维型肌动蛋白(fiber-actin)网络,并在与肌动蛋白结合后受丝/苏氨酸蛋白激酶 2 (serine/threonine kinase 2, AKT2) 磷酸化的调节,加速肿瘤转移^[9]。因此,本研究认为 TMOD3 可能在 HCC 的进展中起着重要的作用。虽然先前的研究探讨了 TMOD3 在非小细胞肺癌和膀胱转移性细胞癌等中的侵袭和转移的相关分子机制^[3, 10],但 TMOD3

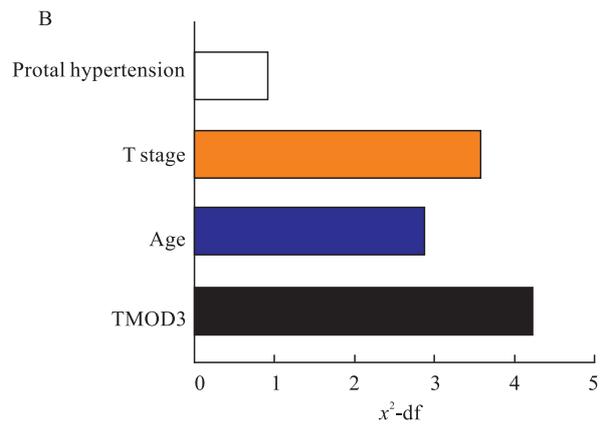
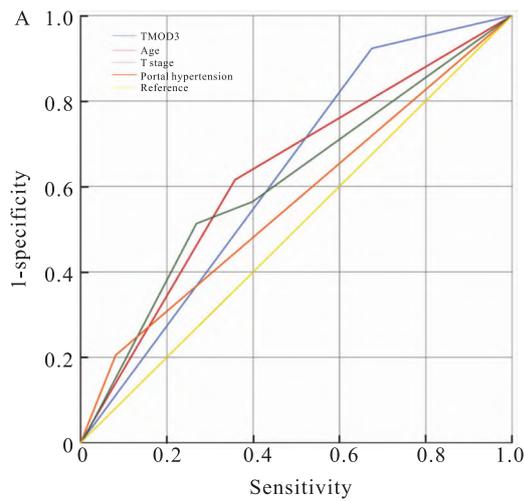


图5 TMOD3 在 HCC 转移中的预测价值

Fig. 5 The predictive value of TMOD3 in the metastasis of HCC

A: Receiver operating characteristic curves for predictor variables in Logistic regression; B: Evaluation of the importance of each variable in predicting HCC metastasis.

Variable	AUC	P value
TMOD3	0.624	0.020
Age	0.629	0.015
T stage	0.609	0.041
Portal hypertension	0.562	0.245

表3 Logistic 回归分析结果

Tab.3 Logistic regression analysis results

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value
Age (year)						
≤60		Ref.			Ref.	
>60	2.873	1.366 – 6.039	0.005	2.256	1.006 – 5.059	0.048
Gender						
Female		Ref.				
Male	0.696	0.330 – 1.448	0.332			
T stage						
T1/T2		Ref.			Ref.	
T3/T4	1.573	1.082 – 2.288	0.018	1.551	1.039 – 2.314	0.032
Family history						
No		Ref.				
Yes	1.437	0.698 – 2.961	0.325			
Cirrhosis						
No		Ref.				
Yes	1.088	0.524 – 2.261	0.820			
AFP (ng/ml)						
<400		Ref.				
≥400	0.998	0.485 – 2.051	0.995			
Child						
A/B		Ref.				
C	1.625	0.387 – 6.827	0.507			
Portal hypertension						
No		Ref.			Ref.	
Yes	2.916	1.061 – 8.015	0.038	2.260	0.718 – 7.118	0.164
Hepatitis b						
No		Ref.				
Yes	2.000	0.428 – 9.352	0.378			
TMOD3						
Low expression		Ref.			Ref.	
High expression	5.783	1.679 – 19.920	0.005	4.359	1.235 – 15.384	0.022

与 HCC 的侵袭和转移的关系尚不明确。其他多数数据库的研究只集中于选择枢纽基因,但没有具体分析其表达与患者病例特征和预后的关系^[11-12]。

本研究在应用了生信数据库分析方法的基础上,同时利用组织芯片的临床样本多维度进一步验证 TMOD3 的功能和在细胞中的定位及其在 HCC 中的表达与临床意义。发现 TMOD3 在细胞定位和表达上位于肌动蛋白丝中,并且通过公共数据库和生物信息学方法分析发现 TMOD3 在 HCC 组织中有着更高的表达状态。同时通过富集分析结果显示, TMOD3 及其相互作用蛋白富集的通路均与肿瘤的侵袭和转移密切相关。临床相关性分析中,高表达 TMOD3 的 HCC 患者与远处转移和淋巴结转移的发生相关。预后分析中无论是 OS 还是 RFS 以及 PFS 均与 TMOD3 的表达密切相关。综上,从结构、定位、表达、富集通路、临床特征多个方面证明了 TMOD3 与 HCC 复发转移的密切关系。同时,本研究还进一步利用多种统计学方法探究了 TMOD3 作为预测 HCC 复发转移生物标志物的潜力,发现 TMOD3 对于预测 HCC 转移具有良好的区分度以及预测价值,具备成为判断 HCC 侵袭性及预后指标的潜力。

与肿瘤侵袭相关的一项重要生理过程是 TMOD3 能与纤维肌动蛋白在黏附连接处结合,促进上皮细胞形态发生变化,这与上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 进程有着密不可分的关系^[13]。EMT 在肿瘤的侵袭、转移过程中起着关键作用,在 EMT 过程中,肿瘤细胞的细胞形态和表型变化明显,包括紧密连接的丧失、细胞极性和细胞骨架的重组,使细胞具有更多的侵袭性和表型^[14]。本研究只探究了 TMOD3 在肝癌中的表达及其与临床病理特征和预后的关系,而具体的作用机制尚未完全阐明,在后续的研究中需进一步证实。

本研究尚存在一些不足之处。首先,本研究还需要对 TMOD3 与 HCC 患者的预后和不良病理特征之间的关联进行额外的队列研究,以及利用外部验证队列来再次验证预测结果,以弥补单中心数据产生的偏差。此外,本研究未能通过细胞实验及动物实验证明 TMOD3 对 HCC 细胞侵袭和转移的影响。最后,数据均是 HCC 患者术后的临床病理信息,还缺乏正常人群和 HCC 患者样本的比较。如果能在血清学样本的研究中取得进展突破, TMOD3 用于评估 HCC 患者复发转移的能力将更强,可能更有助于 HCC 患者术后综合治疗的研究和临床应用。

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. doi:10.3322/caac.21660.
- [2] Shao J, Zhang H, Wang Z. Coronin 1c and F-actin promote metastasis of breast cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 5980-7. doi:10.12659/MSM.908929.
- [3] Paul D, Chanukuppa V, Reddy P J, et al. Global proteomic profiling identifies etoposide chemoresistance markers in non-small cell lung carcinoma[J]. *J Proteomics*, 2016, 138: 95-105. doi:10.1016/j.jprot.2016.02.008.
- [4] Digre A, Lindskog C. The Human Protein Atlas-Spatial localization of the human proteome in health and disease[J]. *Protein Sci*, 2021, 30(1): 218-33. doi:10.1002/pro.3987.
- [5] Li C, Tang Z, Zhang W, et al. GEPIA2021: integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W242-6. doi:10.1093/nar/gkab418.
- [6] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-46. doi:10.1093/nar/gkac1000.
- [7] Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D587-92. doi:10.1093/nar/gkac963.
- [8] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-63. doi:10.3322/caac.21834.
- [9] Versteijne E, Suker M, Groothuis K, et al. Preoperative chemoradiotherapy versus immediate surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer: results of the Dutch randomized phase III PREOPANC trial[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(16): 1763-73. doi:10.1200/JCO.19.02274.
- [10] Pawlak G, McGarvey T W, Nguyen T B, et al. Alterations in tropomyosin isoform expression in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder[J]. *Int J Cancer*, 2004, 110(3): 368-73. doi:10.1002/ijc.20151.
- [11] Huang X, Zhang G, Tang T, et al. Identification of tumor antigens and immune subtypes of pancreatic adenocarcinoma for mRNA vaccine development[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 44. doi:10.1186/s12943-021-01310-0.
- [12] Michael I P, Saghaforina S, Hanahan D. A set of microRNAs coordinately controls tumorigenesis, invasion, and metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(48): 24184-95. doi:10.1073/pnas.1913307116.
- [13] Parreno J, Fowler V M. Multifunctional roles of tropomodulin-3 in regulating actin dynamics[J]. *Biophys Rev*, 2018, 10(6): 1605-15. doi:10.1007/s12551-018-0481-9.
- [14] Wang J, Zhu H, Huang L, et al. Nrf2 signaling attenuates epithelial

lial-to-mesenchymal transition and renal interstitial fibrosis via
PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Exp Mol Pathol*, 2019, 111:

104296. doi:10.1016/j.yexmp.2019.104296.

Analysis of the potential role of TMOD3 in recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma

Luo Longbiao, Jiang Hui, Ma Dandan, Fu Hangwei, Sun Weiwei

(Dept of General Surgery, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070)

Abstract Objective To investigate the relationship between tropomodulin 3 (TMOD3) and the malignant biological characteristics of hepatocellular carcinoma, and the predictive potential of TMOD3 as a biomarker for the recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. **Methods** Firstly, the structure of TMOD3 and its subcellular localization in cells and tissues were analyzed using database of Human Protein Atlas. Then explored the differential expression of TMOD3 in hepatocellular carcinoma tissues and normal liver tissues and its impact on clinical pathological characteristics and prognosis using TCGA and GEO datasets. Subsequently, the STRING database was utilized to explore the interacting proteins of TMOD3, followed by enrichment analysis conducted using the Metascape database. Finally, Logistic regression was used to analyze the independent risk factors for metastasis of hepatocellular carcinoma and evaluated the importance of predictive variables using ROC curves and Wald tests. Survival analysis was conducted using the Kaplan-Meier curve and the Log-rank test. **Results** TMOD3 was localized to actin filaments in cells, and compared with normal tissues, the expression level of TMOD3 in liver cancer tissues is higher ($P < 0.05$), and high expression of TMOD3 was closely related to lymph node metastasis and distant metastasis of hepatocellular carcinoma patients ($P < 0.05$). Enrichment analysis results revealed that TMOD3 and its interacting proteins mainly function and signaling pathways related to tumor invasion and migration. Logistic regression found that TMOD3 was an independent risk factor for recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma (OR : 4.359, 95% CI : 1.235 – 15.384, $P = 0.022$). Survival analysis revealed that high expression of TMOD3 was associated with poor OS, DFS, and RFS of hepatocellular carcinoma patients ($P < 0.05$). Both ROC analysis and Wald test indicated that TMOD3 has good predictive characteristics for recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. **Conclusion** TMOD3 is closely associated with the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma and is an independent risk factor for the recurrence and metastasis of liver cancer. TMOD3 performs well in predicting the recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma and has the potential to become a biomarker for predicting the recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma.

Key words tropomodulin 3; hepatocellular carcinoma; metastasis; tissue microarray; biomarker; bioinformatics

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82300716)

Corresponding author Sun Weiwei, E-mail: 3295364@qq.com