DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20200715.005
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20200716.0944.001.html

ADH家族在肝细胞癌中的表达及其临床意义

帕成周,邬善敏✉
(武汉大学人民医院肝胆外科,湖北 武汉 430060)

[摘要] **目的**:探究ADH家族在肝细胞癌(HCC)中的表达及其在预后评价方面的作用。**方法**:本研究临床资料来源于TCGA数据库,利用Metabolic gEne RApid Visualizer数据库、TCGA数据库对ADH家族在正常肝组织和HCC的mRNA表达情况进行差异分析,筛选出差异表达的ADH家族进行Kaplan-Meier生存分析;采用Cox分析选择可能影响HCC预后的因素及验证HCC患者的独立危险因素。通过GeneMAMIA、STRING在基因层面和蛋白表达水平上探索ADH家族成员间的相互作用,并采用DAVID生物信息学资源对ADH家族进行功能富集分析。**结果**:在HCC中ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4、ADH7低表达;ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4低表达组生存率较差,可能与HCC患者不良预后相关;单因素Cox回归分析表明ADH1A、ADH1C、ADH4表达水平、肿瘤临床分期、T分期、M分期与患者总体生存率密切相关;多因素Cox回归分析则进一步提示ADH1A、ADH1C、ADH4低表达是影响HCC患者预后的独立危险因素。ADH1A-ADH1B、ADH1B-ADH1C、ADH1A-ADH1C基因之间存在通路,ADH家族与酯酶D、乙醛脱氢酶联系密切。ADH家族主要参与乙醇氧化及视黄醇代谢等生物过程,主要通过糖酵解/糖异生、化学致癌作用、细胞色素P450对药物的代谢等通路发挥生物学作用。**结论**:ADH1A、ADH1C、ADH4可能是HCC患者预后评判的有效生物标志物,为ADH家族在HCC的实际应用提供参考价值。

[关键词] 肝细胞癌;乙醇脱氢酶;TCGA
[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2021)17-1307-05

The expression and clinical significance of ADHs in hepatocellular carcinoma

PA Cheng-zhou, WU Shan-min✉
(*Department of Hepatobiliary Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan* 430060, *China*)

[*Foundation Project*]:*This study is supported by Wuhan Municipal key Scientific and Technological Project* (201161038342-02)
[*Author*]:*PA Cheng-zhou, Male, E-mail: pachengzhou@whu.edu.cn.*
[*Correspondence to*]:*WU Shan-min, Male, Chief Physician, Professor, E-mail:* 15327278328@163.*com.*
Received: 2020-05-11 *Revised*: 2020-07-15 *JHMU*, 2021;27(17):1307-1311

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To explore the expression and prognostic significance of ADHs in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods**: The clinical data in this study were retrieved from The Cancer Genome Atlas (TCGA). The expression of ADHs was differentially analyzed in normal liver tissues and HCC by using the Metabolic gEne RApid Visualizer and the TCGA database, and the differentially expressed ADHs were selected for Kaplan-Meier survival analysis. Cox analysis was performed to select factors that may influence the prognosis of HCC and to verify independent risk factors for HCC patients. The interaction among ADHs was explored at the gene level and protein expression level through GeneMAMIA and STRING, and the functional enrichment analysis of ADH family was carried out by using DAVID bioinformatics resources. **Results**: The expression levels of ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4 and ADH7 in HCC were low. Patients with low expression level of ADH1A, ADH1B, ADH1C and ADH4 had poor survival rates, which may be related to the poor prognosis of HCC. Univariate Cox regression analysis showed that the expression levels of ADH1A, ADH1C and ADH4, as well as the clinical stage, T stage and M stage of the tumor were closely related to the overall survival rate of the patients. Multivariate Cox regression analysis further suggested that the

[基金项目] 武汉市科技攻关项目(201161038342-02)
[作者简介] 帕成周,男,E-mail:pachengzhou@whu.edu.cn。
[通讯作者] 邬善敏,男,主任医师,教授,E-mail:15327278328@163.com。
[收稿日期] 2020-05-11 [修回日期] 2020-07-15 网络出版时间:2020-07-16 09:57:56

low expression of ADH1A, ADH1C and ADH4 were independent risk factors affecting the prognosis of HCC patients. There was a pathway between ADH1A-ADH1B, ADH1B-ADH1C and ADH1A-ADH1C, and ADHs were closely related to esterase D and aldehyde dehydrogenase. The ADHs were mainly involved in biological processes such as ethanol oxidation and retinol metabolism, and played a biological role in glycolysis/gluconeogenesis, chemical carcinogenesis and metabolism of xenobiotics by cytochrome P450. **Conclusion**: ADH1A, ADH1C and ADH4 may be biomarkers for the prognosis of HCC, providing reference value for the practical application of ADHs in HCC.

[KEYWORDS] Hepatocellular carcinoma; Alcoholic dehydrogenase; TCGA

原发性肝癌是全球第4位常见的癌症死亡原因，发病率位居第6位；是我国是第4位常见恶性肿瘤及第2位肿瘤致死病因[1,2]。其中肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）占所有原发性肝癌病例的90%，该病早期检测困难，进展为晚期后恶性程度高，发展迅速，预后差。目前，我国肝硬化主要病因是病毒性肝炎，但酒精性肝硬化的比例有所升高[3]。长期大量饮酒与肝脏脂肪变性和肝纤维化有关，最终可以进展为肝硬化，这是发展为HCC的主要危险因素[4]。乙醇脱氢酶（alcoholic dehydrogenase，ADH）分为5大类，包括7种基因型，其编码基因（*ADH7*、*ADH1C*、*ADH1B*、*ADH1A*、*ADH6*、*ADH4*和*ADH5*）位于四号染色体长臂（4q21-24）的区域内，长度约为365 kb，基因按上述排列顺序进行转录[5]。ADH在乙醇、视黄醇等物质代谢中发挥着重要的作用，将乙醇氧化为乙醛，若此酶表达异常或失调，会导致酒精代谢异常[6]。近年研究发现ADH家族在胃癌、乳腺癌、鼻咽癌中可以用于评估患病风险及评价疾病预后[7-9]。本研究利用生物信息学方法探究ADH家族在HCC中的表达情况及其预后评价作用，旨在为ADH家族的实际临床应用提供新思路。

1 资料与方法

1.1 数据来源及整理

癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）数据库（https://portal.gdc.cancer.gov/）收录了超过20 000个原发性肿瘤及与之匹配的正常样本，涵盖了33种癌症类型，共有2.5 P的基因组、表观基因组、转录组和蛋白质组数据。本研究自TCGA数据库下载肝细胞癌和正常肝组织经校正后的RNA-Seq基因表达谱，提取并整理数据集，此数据集中包含肝细胞癌374例，正常肝组织50例。TCGA数据库下载的临床信息数据集包含377例临床资料，其中240例资料较为完整。

1.2 ADH家庭成员的差异表达分析和预后评价

本研究利用在线资源Metabolic gEne RApid Visualizer数据库（http://merav.wi.mit.edu/）在线识别ADH家族基因，并逐个分析其在正常肝组织及HCC中的表达水平；同时，自TCGA下载的数据集利用R软件（v.3.6.0）通过limma包提取基因库表达数据，采用非参数t检验比较ADH家族基因在正常肝组织和HCC中的表达情况。将在两个数据库中表达具有差异的ADH家族成员取交集，运算并截断mRNA表达量的中位值，以此值分为高、低表达两组，筛除1例随访时间缺失的临床资料后，使用survival包采用Kaplan-Meier法进行生存分析。使用240例临床资料及ADH家族基因表达量进行Cox分析，采用单因素Cox分析选择可能影响HCC预后的因素，采用多因素Cox分析逐一验证HCC患者生存时间与ADH家族基因表达情况、临床特征（年龄、性别、病理分级、临床分期等）的相关性。本研究以$P<0.05$认为差异具有统计学意义。

1.3 ADH家族成员的相互作用和功能富集分析

GeneMAMIA（https://genemania.org/）常用于预测基因/基因集的功能，STRING（https://string-db.org/）常用于分析蛋白的相互作用。利用GeneMAMIA、STRING在基因层面及蛋白表达水平分析ADH家族的相互关系。最后，通过DAVID生物信息学资源6.8版（https://david.ncifcrf.gov/home.jsp）进行ADH家族基因功能富集分析，包括基因本体（GeneOntology，GO）富集分析和京都基因和基因组百科全书（KEGG）通路分析，并采用ImageGP（http://www.ehbio.com/ImageGP/）绘制气泡图。

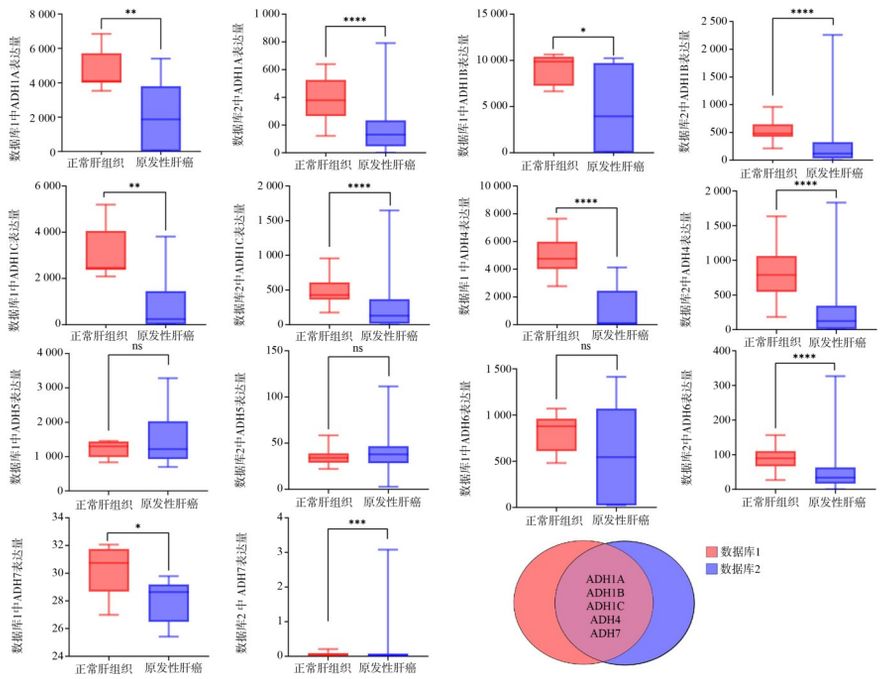
2 结果

2.1 ADH家族在正常肝组织和肝细胞癌组织中的表达差异

在Metabolic gEne RApid Visualizer数据库中，ADH家族中的ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4、ADH7在HCC组织中低表达（$P<0.05$）；在TCGA数据库中，ADH家族中的ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4、ADH6、ADH7在HCC组织中低表达（$P<0.05$）。两者交集包括ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4、ADH7，表明上述差异表达的基因可能与抑制肝组织癌变有关，见图1。

2.2 肝细胞癌中ADH家族成员不同表达水平间的预后评价

通过选取在两个数据库中均存在表达差异的



数据库1为Metabolic gEne RApid Visualizer；数据库2为TCGA。

图1　正常肝组织和肝细胞癌组织中ADH家族的表达差异比较

Fig 1　The expression differences of ADH family in normal liver tissues and HCC

ADH家族成员进行生存分析，结果显示在HCC患者中除ADH7外，ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4高表达组的生存率优于低表达组，且生存差异具有统计学意义（$P<0.05$），提示ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4低表达可能与HCC患者不良预后相关，见图2。单因素Cox回归分析表明ADH1A、ADH1C、ADH4表达水平、肿瘤临床分期、T分期、M分期与患者总体生存率密切相关，见表1；多因素Cox回归分析则进一步提示ADH1A（HR=0.997 9，95%CI：0.996-1.000，P=0.039 3）、ADH1C（HR=0.998 6，95%CI：0.998-1.000，P=0.009 4）、ADH4（HR=0.997 9，95%CI：0.997-0.999，P=0.001）低表达是影响HCC患者预后的独立危险因素。

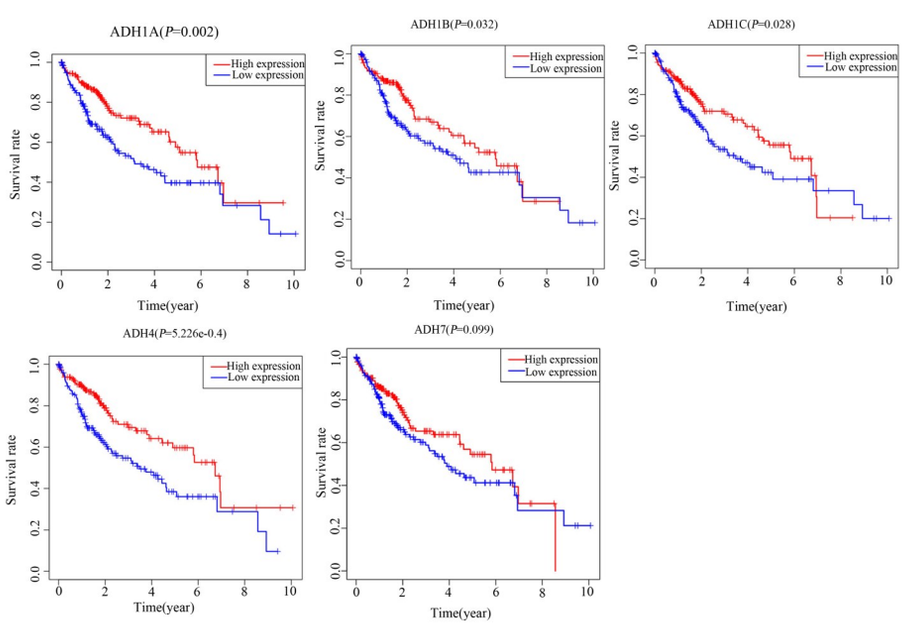


图2　肝细胞癌患者中ADH家族成员不同表达水平的生存分析

Fig 2　Survival analysis of ADH family with different expression levels in patients with HCC

表1　单因素Cox回归分析HHC患者临床特征、ADH家族表达量和总体生存率的相关性

Tab 1　univariate Cox regression analysis of the correlation between clinical characteristics, the expression of ADH family and overall survival rate

临床病理特征	单因素分析		
	HR	95%*CI*	*P*
年龄	1.005 0	0.987-1.023	0.591 2
性别	0.780 1	0.487-1.249	0.301 3
病理分级	1.017 2	0.746-1.387	0.914 3
临床分期	1.864 7	1.456-2.388	0.000 0
T分期	1.804 4	1.434-2.270	0.000 0
M分期	3.849 8	1.207-12.281	0.022 8
N分期	2.021 8	0.494-8.276	0.327 6
ADH1A表达水平	0.997 4	0.995-0.999	0.009 1
ADH1B表达水平	0.999 3	0.998-1.000	0.196 0
ADH1C表达水平	0.998 4	0.997-0.999	0.003 3
ADH4表达水平	0.997 9	0.997-0.999	0.001 0
ADH7表达水平	1.483 5	0.723-3.045	0.282 4

2.3　ADH家族基因互作与蛋白互作分析

GeneMANIA在基因层面上分析了ADH家族的关系，结果显示所有的ADH家族均存在共享的蛋白结构域，发现ADH7在ADH家族基因互作关系中较为独立，ADH1A-ADH1B、ADH1B-ADH1C、ADH1A-ADH1C之间存在通路，ADH1B-ADH1C存在物理相互作用，除ADH1A-ADH5以及ADH1C-ADH5以外均存在共表达关系，ADH4-ADH5以及ADH6分别与ADH1B、ADH1C之间不存在共定位的关系，见图3A。在蛋白表达水平上，STRING结果显示ADH家族中的所有成员均可通过与酯酶D(Esterase D，ESD)关联实现基因共现，ADH1A与ADH1B显示出共表达的关系。乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase，ALDH)在文本挖掘方面与各个ADH家族成员之间存在相互作用，见图3B。

2.4　ADH家族的功能富集分析

本研究中GO富集分析显示ADH家族具有锌离子结合、乙醇结合、视黄醇结合、氧化还原酶活性、乙醇脱氢酶活性、视黄醇脱氢酶活性等分子功能，主要参与乙醇氧化及视黄醇代谢等生物过程。KEGG分析显示ADH家族通过糖酵解/糖异生、化学致癌作用、酪氨酸代谢、脂肪酸降解、视黄醇代谢、细胞色素P450对药物的代谢等通路发挥生物学作用，见图4。

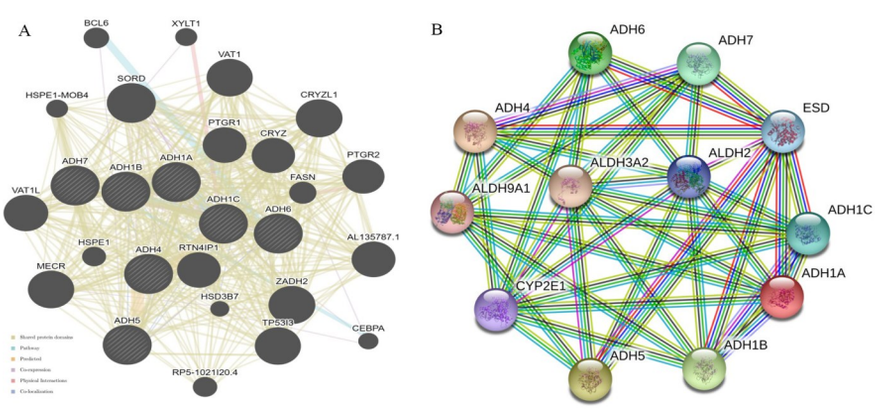


图3　ADH家族基因互作与蛋白互作分析

Fig 3　Gene interactions and protein interactions of the ADH family

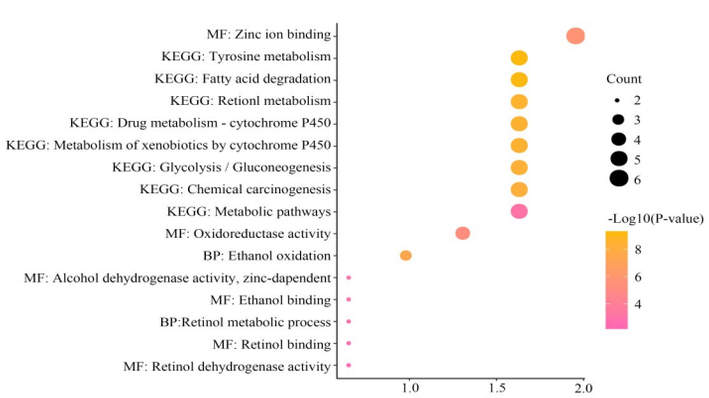


图4　ADH家族基因的GO富集分析及KEGG分析

Fig 4　GO enrichment analysis and KEGG analysis of ADH family

3 讨论

长期大量酒精摄入引起脂代谢紊乱，同时增加肠道通透性，促进革兰氏阴性菌释放的内毒素进入血液循环，单核细胞产生促炎症细胞因子，通过门静脉血流到达肝脏激活 Kupffer 细胞释放趋化因子，引起肝细胞损伤，激活的肝星状细胞和肌成纤维细胞产生的过量细胞外基质取代肝实质，促进肝硬化，最终可发展为肝癌[10]。此外，氧化应激、DNA损伤、p53基因突变、端粒缩短及功能障碍引发染色体不稳定，也会导致肝癌的发生[11]。

本研究中利用两个数据库资料进行ADH家族基因的表达差异分析发现，HCC组织中ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4、ADH7 mRNA表达水平显著降低，表明这些基因可能在肝癌中具有抑癌作用。为此，研究进行了生存分析验证，结果发现ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4低表达的HCC患者生存率较差，进一步提示差异表达的ADH家族低表达可能与HCC患者不良预后相关。在多因素Cox分析中，ADH1A、ADH1C、ADH4低表达是影响HCC患者预后的独立危险因素，未来可能可以利用ADH1A、ADH1B、ADH1C、ADH4等指标进行HCC患者的预后预测。

在基因层面的分析中，ADH7基因在ADH家族基因互作关系中较为独立。ADH7基因编码Ⅳ类ADHσ或μ亚基，此酶在胃和食管中表达丰富，乙醇氧化过程中效率低下，而在视黄醇代谢中的活性最高，因此与其他ADH家族成员有所不同[12,13]。ADH1A-ADH1B、ADH1B-ADH1C、ADH1A-ADH1C之间存在通路，主要由于它们编码的蛋白均属于Ⅰ类ADH。Ⅰ类ADH由α、β和γ亚基自由组合后形成同型二聚体/异型二聚体，并且不同亚基形成的二聚体具有高度相似性。ESD又名S-甲酰基谷胱甘肽水解酶，在蛋白互作分析中与ADH家族实现基因共现，它是一种广泛表达的非特异性酯酶，存在于所有生物体的细胞质囊泡中，参与谷胱甘肽的再生，降解甲醛，目前它在肿瘤生长过程中的分子作用机制尚不明确[14]。本研究中ALDH与各个ADH家族成员之间存在相互作用，ADH、ALDH均作为酒精代谢过程中的关键酶，酒精通过ADH氧化生成致癌物质乙醛，经ALDH氧化为无害的乙酸，乙酸易形成乙酰CoA进入三羧酸循环或参与脂肪酸合成[15]。ADH、ALDH家族基因中部分存在基因多态性。ADH1B和ADH1C基因的等位基因存在会导致其编码的ADH的活性不同，影响乙醇被氧化为乙醛的速率；对于ALDH来说，纯合突变型ALDH2*2具有极低的ALDH活性，饮酒后乙醛会积累，易出现脸红表现，降低酗酒率进而避免了肝脏损伤[16]。ADH、ALDH家族基因多态性与HCC发生的机制联系需要进一步进行探究。

尽管一些研究已经发现部分ADH家族基因多态性与酒精依赖之间存在联系，但ADH家族通过何种方式及调控通路来影响HCC细胞的生物学行为，需要进一步解析其作用机制。值得注意的是，ADH1A、ADH1C、ADH4可能是HCC患者预后评判的有效生物标志物，为HCC的防治提供了一定的理论依据和应用价值。

参考文献

1 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. 临床肝胆病杂志，2020，36(2)：277-292.

2 Villanueva A. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med，2019，380(15)：1450-1462.

3 高潇雪，刘立新. 酒精性肝病流行病学及发病机制研究进展[J]. 中华消化病与影像杂志(电子版)，2016，6(2)：62-65.

4 Mckillop IH，Schrum LW，Thompson KJ. Role of alcohol in the development and progression of hepatocellular carcinoma[J]. Hepat Oncol，2016，3(1)：29-43.

5 Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism：Role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants[J]. Alcohol Res Health，2007，30(1)：5-13.

6 Crabb DW，Matsumoto M，Chang D，et al. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology[J]. Proc Nutr Soc，2004，63(1)：49-63.

7 罗善山. 乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶基因家族在胃癌中的临床应用价值及ALDH4A1的机制探索[D]. 广西医科大学，2019. 193.

8 Park B，Kim JH，Lee ES，et al. Role of aldehyde dehydrogenases，alcohol dehydrogenase 1B genotype，alcohol consumption，and their combination in breast cancer in East-Asian women[J]. Sci Rep，2020，10(1)：6564.

9 吴梦鸽，张睿，刘芮吟，等. ADH1B对鼻咽癌细胞的增殖及迁移能力的影响[J]. 肿瘤预防与治疗，2019，32(6)：480-485.

10 Stickel F，Datz C，Hampe J，et al. Pathophysiology and management of alcoholic liver disease：Update 2016[J]. Gut Liver，2017，11(2)：173-188.