

## 减数分裂内切酶 1 高表达对肝细胞癌预后的影响

王可欣<sup>1</sup>, 陈椿<sup>2</sup>, 贺梦雯<sup>3</sup>, 李乐<sup>4</sup>, 刘妍<sup>4</sup>, 王洪波<sup>5</sup>, 王春艳<sup>5</sup>, 赵景民<sup>6</sup>, 纪冬<sup>1,2,3,5\*</sup>

<sup>1</sup>安徽医科大学解放军 307 临床学院/第五临床医学院, 安徽合肥 230032; <sup>2</sup>南方医科大学第二临床医学院, 广东广州 510515; <sup>3</sup>北京大学 302 临床医学院, 北京 100191; <sup>4</sup>解放军总医院第五医学中心感染病医学部, 北京 100039; <sup>5</sup>解放军总医院第五医学中心肝病医学部, 北京 100039; <sup>6</sup>解放军总医院第五医学中心病理科, 北京 100039

[中图分类号] R512.62 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1243.2024.0205

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 王可欣, 陈椿, 贺梦雯, 等. 减数分裂内切酶 1 高表达对肝细胞癌预后的影响[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(6): 643-650.

[收稿日期] 2023-09-15 [录用日期] 2024-02-01 [上线日期] 2024-02-05

**[摘要]** **目的** 探讨减数分裂内切酶 1(EME1)的高表达对肝细胞癌(HCC)预后的临床意义。**方法** 利用癌症和肿瘤基因组图谱(TCGA)数据库及高通量基因表达(GEO)数据库,对 HCC 肿瘤与非肿瘤组织差异表达基因进行筛选并进行生存分析。回顾性收集 2010 年 1 月—2014 年 12 月于解放军总医院第五医学中心行肝癌切除术的 80 例患者的病理组织样本,采用免疫组织化学法检测 EME1 的表达情况,进行生存分析,评估 EME1 对肝癌患者术后 5 年生存率的影响;采用基因富集分析预测 EME1 在 HCC 中的功能。**结果** TCGA 数据库筛选出 371 例 HCC 癌组织及 50 例非肿瘤组织样本,分析显示 EME1 mRNA 在 HCC 癌组织中明显高表达。筛选 GEO 数据库中的 107 例样本(包括 70 例 HCC 癌组织,37 例非肿瘤组织),癌组织的 EME1 mRNA 表达量明显高于非肿瘤组织( $P<0.05$ )。生存分析显示 EME1 高表达组术后 5 年总体生存率明显低于低表达组(44.1% vs. 53.0%,  $P<0.05$ )。免疫组化结果半定量分析显示,EME1 高表达组的总体生存率明显低于低表达组(32.8% vs. 45.0%,  $P<0.05$ )。多因素 COX 分析显示,EME1 高表达[风险比(HR)=2.234, 95%CI 1.073~4.649,  $P=0.032$ ]和中国肝癌分期(CNLC)高分期(HR=4.317, 95%CI 1.799~10.359,  $P=0.001$ )是影响 HCC 患者术后 5 年生存率的独立危险因素。**结论** EME1 在 HCC 组织中高表达,并与 HCC 患者的不良预后相关,可作为 HCC 治疗的潜在靶点。

**[关键词]** 肝细胞癌; 减数分裂内切酶 1; 免疫组化; 生存分析

### Effect of high expression of endonuclease meiotic 1 on the prognosis of hepatocellular carcinoma

Wang Ke-Xin<sup>1</sup>, Chen Chun<sup>2</sup>, He Meng-Wen<sup>3</sup>, Li Le<sup>4</sup>, Liu Yan<sup>4</sup>, Wang Hong-Bo<sup>5</sup>, Wang Chun-Yan<sup>5</sup>, Zhao Jing-Min<sup>6</sup>, Ji Dong<sup>1,2,3,5\*</sup>

<sup>1</sup>Chinese PLA 307 College/the Fifth Clinical College, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China

<sup>2</sup>Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

<sup>3</sup>Peking University 302 Clinical Medical School, Beijing 100191, China

<sup>4</sup>Senior Department of Infectious Disease, <sup>5</sup>Senior Department of Hepatology, <sup>6</sup>Department of Pathology, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

\*Corresponding author, Ji Dong, E-mail: jidg302@126.com; Zhao Jing-Min, E-mail: jmzhao302@163.com

This work was supported by the Natural Science Foundation of Beijing (7222173)

**[Abstract]** **Objective** To elucidate the clinical significance of high expression levels of endonuclease meiosis 1 (EME1) in the prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus (GEO) databases were used to screen and analyze differential gene expression between HCC and non-tumor tissues. A retrospective collection of liver tissue samples from 80 HCC patients who underwent hepatectomy in the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital between January 2010 and December 2014 was performed. Immunohistochemistry analysis was employed to detect the EME1 expression levels. Survival analysis was then conducted to assess the impact of EME1 expression on 5-year postoperative

[基金项目] 北京市自然科学基金面上项目(7222173)

[作者简介] 王可欣, 硕士研究生, 主要从事传染病的基础及临床研究工作

[通信作者] 纪冬, E-mail: jidg302@126.com; 赵景民, E-mail: jmzhao302@163.com

survival rate of HCC patients. Additionally, gene enrichment analysis was applied to predict the function of EME1 in HCC. **Results** A total of 371 HCC tissue samples and 50 non-tumor liver tissue samples from TCGA database were analyzed, revealing significantly higher EME1 expression in HCC tissues. Microarray analysis of 107 samples within the GEO database (70 HCC tissues and 37 non-tumor tissues) confirmed that EME1 mRNA expression was markedly elevated in HCC tissues compared with non-tumor tissues ( $P<0.05$ ). The 5-year overall survival (OS) rate was notably lower in high EME1 expression group than that in low expression group (44.1% vs. 53.0%,  $P<0.05$ ). Semi-quantitative immunohistochemistry analysis demonstrated that patients with high EME1 expression had a significantly lower OS rate than those with low EME1 expression (32.8% vs. 45.0%,  $P<0.05$ ). Multivariate COX regression analysis identified that high EME1 expression ( $HR=2.234$ , 95%CI 1.073-4.649,  $P=0.032$ ) and advanced China liver cancer (CNLC) staging ( $HR=4.317$ , 95%CI 1.799-10.359,  $P=0.001$ ) were independent risk factors for the 5-year OS of post-operation patients with HCC. **Conclusion** Elevated EME1 expression in HCC tissues correlates with an adverse prognosis of HCC and suggests that EME1 could serve as a potential therapeutic target for HCC.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma; endonuclease meiotic 1; immunohistochemistry; survival analysis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌的主要类型之一,也是目前导致全球肿瘤患者死亡的第二大因素<sup>[1-2]</sup>。我国HCC病死率高,主要原因是大多数HCC患者在诊断时即为晚期,而晚期HCC的治疗效果欠佳<sup>[3-5]</sup>。HCC的病因在不同区域差异很大,亚洲地区主要是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)慢性感染引起。HBV感染会引起DNA突变,导致基因组不稳定而发生HCC<sup>[6-11]</sup>。因此,DNA损伤修复对于维持基因组稳定性起重要作用。减数分裂内切酶1(endonuclease meiosis 1, EME1)首先被发现于裂解酵母中,属于EME1/MMS4家族,与核酸内切酶同源蛋白特异性内切酶亚基81(MUS81)相互作用<sup>[12]</sup>。EME1基因不仅参与了修复双链断裂、调节异常的Holliday连接及复制叉结构、维持基因组稳定性,还可能与肿瘤易感性有关<sup>[13-14]</sup>。目前关于EME1参与HCC的具体机制尚少见报道。本研究通过癌症和肿瘤基因图谱(TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>)数据库筛选出在HCC中高表达且差异倍数较大的EME1基因,探讨EME1基因高表达与HCC细胞增殖的临床相关性,以期寻找HCC的潜在靶向治疗位点。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集2010年1月—2014年12月于解放军总医院第五医学中心经肝组织病理学确诊的80例HCC患者临床资料进行回顾性分析。纳入标准:(1)病理学确诊为HCC;(2)年龄 $\geq 18$ 岁,性别不限;(3)病因是HBV感染;(4)定期来院复查。排除标准:(1)合并酗酒、吸毒、其他病毒性感染或其他肿瘤;(2)重要数据缺失。采集患者如下资料:(1)基线资料,包括性别、年龄、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肿瘤分化程度、中国肝癌分期(CNLC)<sup>[15]</sup>;(2)生存资料,所有患者均随访5年或死亡,失访数据按删失处理;(3)病理蜡块,调取患者的癌组织及非肿瘤组织(癌旁)蜡块,进行免疫组织

化学染色。本研究为回顾性研究,豁免研究对象签署知情同意书。本研究方案获解放军总医院第五医学中心伦理委员会审批(2020055D)。

**1.2 试剂及材料** 磷酸盐缓冲液(PBS)、二氨基联苯胺(DAB)显色剂、苏木精染料及一抗稀释液(北京阳光英锐生物科技有限公司),鼠源EME1单克隆抗体(美国Santa Cruz生物技术公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠的二抗检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.3 生物信息学分析** 通过TCGA数据库和高通量基因表达(GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库分析EME1 mRNA表达水平;采用R软件和Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)基因集富集分析软件进行数据分析;使用在线工具STRING(<https://cn.string-db.org/>)进行蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)分析,寻找与EME1蛋白紧密关联的基因,设置物种为智人,选择中等关联度0.400。

**1.4 免疫组织化学染色(IHC)检测EME1蛋白表达** 将患者的癌组织及非肿瘤组织蜡块制作成厚度为4  $\mu\text{m}$ 的切片,于70  $^{\circ}\text{C}$ 烤片20~30 min,二甲苯进行常规脱蜡,梯度乙醇进行水化,置于微波炉加热,用碱性乙二胺四乙酸(EDTA)修复液进行抗原修复10 min,胎牛血清封闭,滴加一抗EME1(1:650),4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日滴加二抗,DAB显色,苏木精对比染色,中性树胶封固。结果判读:在高倍镜下用显微镜从每个样本中捕获5个具有代表性的图像,进行如下评价。染色强度评分标准:0分为无染色,1分为浅黄色,2分为棕黄色,3分为深褐色。阳性细胞百分率评分标准:0分为0~5%阳性染色,1分为6%~25%阳性染色,2分为26%~50%阳性染色,3分为51%~75%阳性染色,4分为76%~100%阳性染色。将染色强度评分与阳性细胞百分率评分相乘(范围0~12)。取中位数6分为高、低表达的分界值。并利用ImageJ软件对免疫组化的图片进行半定量分析,计算平均光密度值(AOD)。

**1.5 统计学处理** 采用R4.3.0软件进行统计学分析。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验或Fisher's精确检验,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 或 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验或Mann-Whitney  $U$ 检验。考虑到两组比较时的选择偏倚及潜在混杂因素,采用逆概率处理加权(IPTW)方法对数据进行加权评分,以控制EME1高、低表达组间的基线特征差异。采用Kaplan-Meier曲线和log-rank检验进行生存分析,采用Cox比例风险回归模型确定HCC患者5年生存率的预测因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

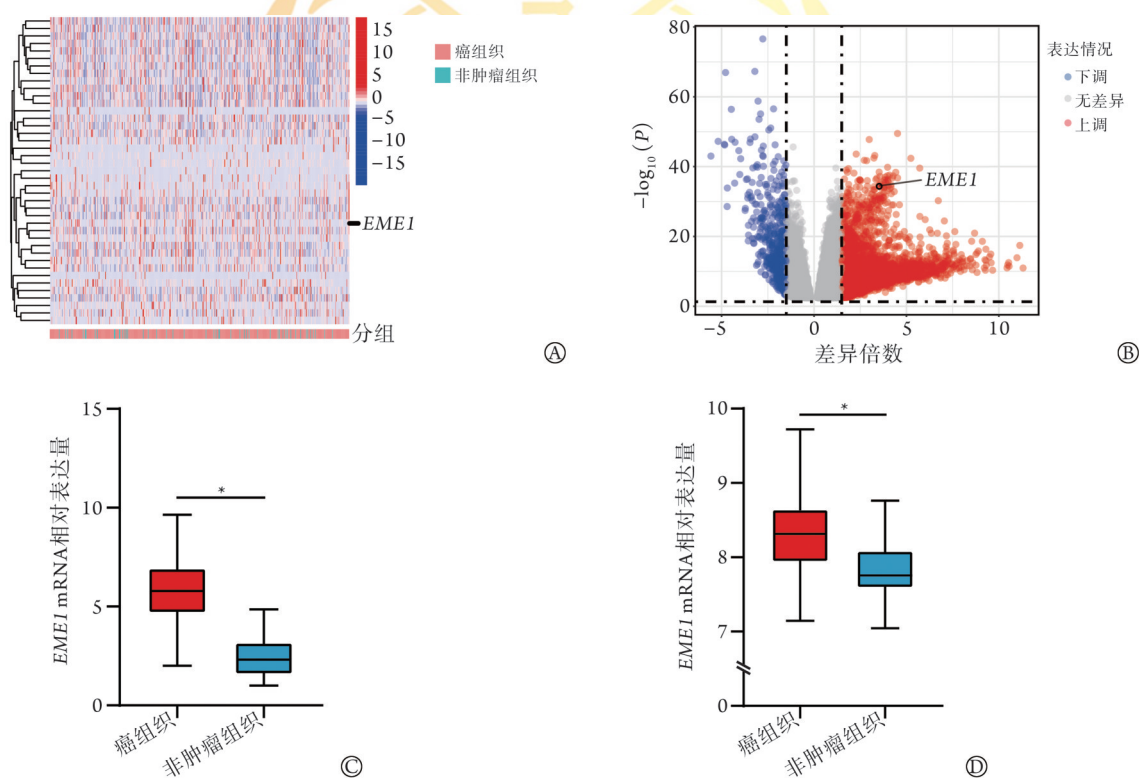
## 2 结果

**2.1 EME1在肝细胞癌中表达的生物学信息分析** 通过TCGA数据库筛选出信息完整的371例HCC癌

组织及50例非肿瘤组织样本,对所包含基因进行筛选及去重等数据处理,获得14 273个相关基因,利用R软件中的“edge”包进行差异性分析,结果显示EME1为高表达基因,HCC癌组织的EME1 mRNA表达量为 $5.77\pm 1.56$ ,高于非肿瘤组织( $2.43\pm 0.89$ ),差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图1A-C)。

从GEO数据库(GSE121248)下载微阵列数据,验证EME1基因在HCC中的表达情况,对GSE121248数据集中的107例组织样本(包括70例HCC癌组织标本、37例非肿瘤组织样本)进行生物信息学分析,结果显示HCC癌组织的EME1 mRNA表达量为 $8.30\pm 0.56$ ,高于非肿瘤组织( $7.81\pm 0.38$ ),差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图1D)。

**2.2 EME1蛋白在HCC癌细胞中的表达情况** EME1



EME1. 减数分裂内切酶1; A. 聚类图展示TCGA数据库中EME1基因表达情况; B. 火山图展示TCGA数据库中50例非肿瘤组织与371例肝组织中的基因表达差异情况; C. TCGA数据库中EME1基因在HCC癌组织与非肿瘤组织中表达存在显著差异; D. GEO数据库中EME1基因在HCC癌组织与非肿瘤组织中表达存在显著差异; \* $P<0.05$

图1 EME1 mRNA在肝细胞癌组织与非肿瘤组织中的表达情况

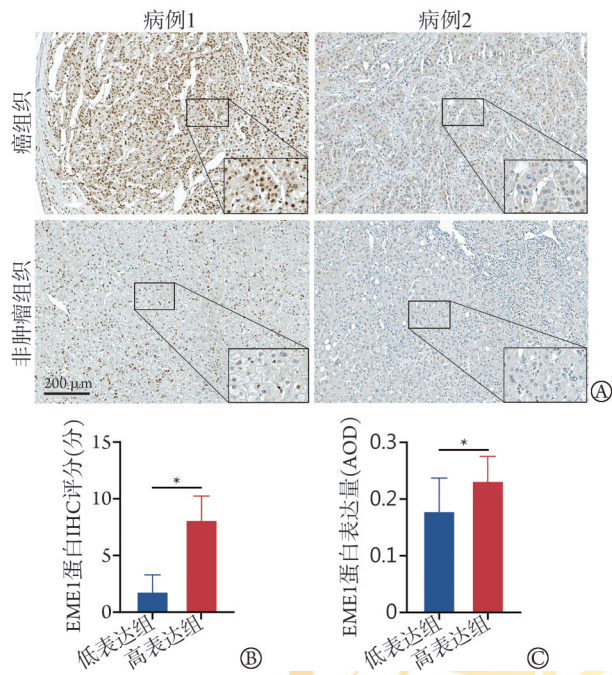
Fig.1 Expression levels of EME1 mRNA in HCC tissues and non-tumor tissues

蛋白主要表达于细胞核中(图2A),根据半定量分析结果(图2B),将80例HCC样本分为高表达组( $n=31$ ,EME1表达量为 $8.16\pm 1.46$ )及低表达组( $n=49$ ,EME1表达量为 $1.84\pm 2.08$ )。高表达组的AOD值为 $0.232\pm 0.042$ ,高于低表达组的 $0.179\pm 0.058$ ,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图2C)。两组性别、年龄、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBil)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、分化程度及CNLC分

期差异无统计学意义( $P>0.05$ ,表1)。

**2.3 EME1对肝细胞癌预后的影响** TCGA数据库中,根据EME1 mRNA表达水平的中位数( $5.78$ )将371例HCC患者分为高表达组(184例)与低表达组(187例)。绘制两组生存曲线,结果显示高表达组的5年累积总生存率为44.1%,明显低于低表达组的53.0% ( $P<0.05$ ,图3A)。

80例HCC患者中,Kaplan-Meier曲线显示EME1



EME1. 减数分裂内切酶 1; AOD. 平均光密度值; A. EME1 在 HCC 癌组织与非肿瘤组织中表达情况(免疫组化法,  $\times 200$ ), 病例 1 为 EME1 高表达样本, 病例 2 为 EME1 低表达样本; B. 高表达组与低表达组中 EME1 蛋白染色评分比较; C. 高表达组与低表达组中 EME1 蛋白 AOD 比较; \* $P < 0.05$

图 2 EME1 蛋白在肝细胞癌组织中的表达情况

Fig.2 Expression of EME1 protein in HCC tumor tissues

蛋白高表达组的 1、3 和 5 年生存率分别为 54.7%、41.0% 和 30.8%，分别低于低表达组的 80.3%、68.4%

表 1 EME1 蛋白表达与肝细胞癌临床指标的关系

Tab.1 Relationship between EME1 protein expression and clinicopathological features of HCC

指标	合计	EME1 蛋白相对表达量		Z/ $\chi^2$	P
		低表达组(n=49)	高表达组(n=31)		
性别[例(%)]				-	0.999 <sup>*</sup>
男	72(90.0)	44(89.8)	28(90.3)		
女	8(10.0)	5(10.2)	3(9.7)		
年龄[例(%)]				0.241	0.415
$\geq 52$ 岁	33(41.3)	21(42.9)	12(38.7)		
$< 52$ 岁	47(58.7)	28(57.1)	19(61.3)		
ALT[U/L, M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	43.0(27.8, 64.0)	44.0(30.0, 67.0)	39.0(26.5, 61.5)	839.502	0.429
AST[U/L, M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	37.0(29.0, 57.0)	38.0(29.0, 59.0)	37.0(28.0, 50.0)	844.503	0.401
TBil[ $\mu$ mol/L, M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	14.9(10.8, 21.7)	14.9(10.3, 19.8)	14.8(10.9, 21.9)	718.000	0.682
HBsAg[IU/ml, M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	7195.5(5823.8, 8253.0)	7356.0(6141.0, 8827.5)	6822.0(5578.5, 7769.0)	885.501	0.109
分化程度[例(%)]				-	0.856 <sup>*</sup>
低分化	2(2.5)	1(2.0)	1(3.2)		
中分化	71(88.7)	43(87.8)	28(90.3)		
高分化	7(8.8)	5(10.2)	2(6.5)		
CNLC[例(%)]				0.304	0.286
1/2	33(41.2)	23(46.9)	10(32.3)		
3/4	47(58.8)	26(53.1)	21(67.7)		

ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; TBil. 总胆红素; HBsAg. 乙型肝炎病毒表面抗原; CNLC. 中国肝癌分期; <sup>\*</sup>Fisher's 精确概率检验所得 P 值

和 46.9% ( $P < 0.05$ , 图 3B); IPTW 加权后, EME1 高表达组的 1、3 和 5 年生存率分别为 58.3%、44.2% 和 33.5%，分别低于低表达组的 80.4%、67.3% 和 43.3% ( $P < 0.05$ , 图 3C)。多因素 COX 回归分析中, ALT、AST 及 TBil 以其正常值上限为分界值, HBsAg 以 5000 IU/ml 为分界值<sup>[16]</sup>, 结果显示 EME1 蛋白高表达 [风险比(HR)=2.234, 95% 置信区间(CI)=1.073~4.649,  $P=0.032$ ] 及 CNLC 高分期(HR=4.317, 95%CI=1.799~10.359,  $P=0.001$ ) 是 HCC 患者 5 年生存率的独立危险因素(表 2)。

2.4 EME1 参与的生物学功能及蛋白互作进程 采用 GSEA 软件富集分析 TCGA 数据中 EME1 mRNA 高表达组相关基因的功能变化, 结果显示富集通路主要参与卟啉和叶绿素代谢、戊糖和葡萄糖酸酯互续以及其他聚糖降解等代谢途径( $P < 0.05$ , 图 4A—C)。使用 R 包“DEGs”筛选出 EME1 mRNA 高表达组与低表达组有差异的 2105 个基因, 并进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集结果显示, 差异基因主要存在于核质及细胞质等细胞成分, 具有参与核酸结合、DNA 合成及小分子合成等分子功能, 在细胞负调节、细胞器形成及含核碱基化合物代谢过程的调控等生物学过程中发挥着重要作用, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 4D)。KEGG 富集结果显示, EME1 及相关差异基因主要参与细胞周期、DNA 复制及同源重组等通路的调控, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,

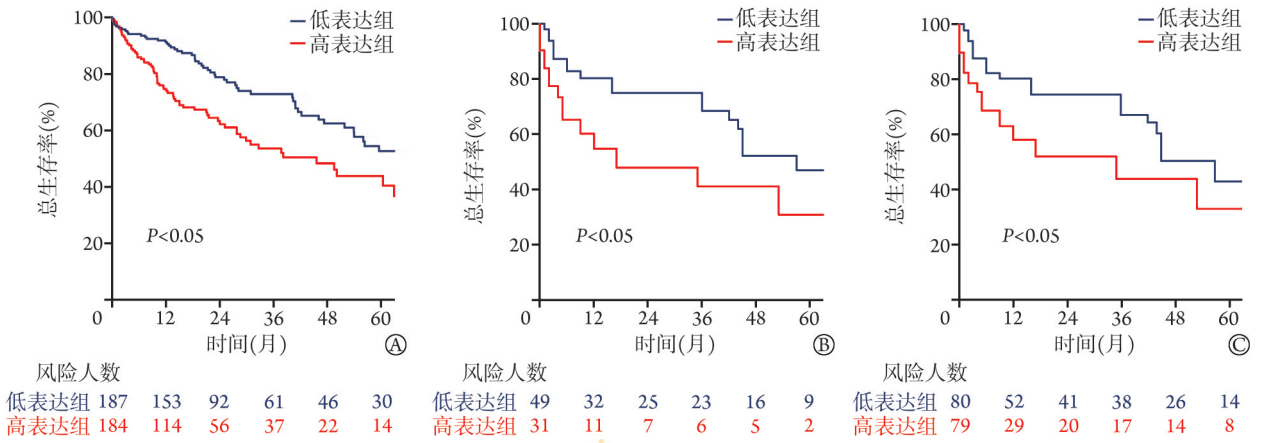


图3 EME1与肝细胞癌患者的预后关系  
 EME1. 减数分裂内切酶1; A.TCGA数据库中EME1高表达组与低表达组的Kaplan-Meier生存曲线; B.IPTW加权处理前EME1蛋白在HCC中低表达组与高表达组的Kaplan-Meier曲线; C.IPTW加权处理后EME1蛋白在HCC中低表达组与高表达组的Kaplan-Meier曲线

图3 Relationship between EME1 and prognosis of HCC patients

表2 肝细胞癌根治术后5年生存期的单因素与多因素Cox回归分析

Tab.2 Multivariate COX regression analysis of factors affecting 5-year survival of HCC patients after curative surgery

变量	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
年龄≥52岁(vs.<52岁)	0.696	0.347~1.396	0.307	-	-	-
EME1高表达组(vs.低表达组)	1.827	1.006~3.968	0.048	2.234	1.073~4.649	0.032
ALT≥40 U/L(vs.<40 U/L)	2.080	1.026~4.214	0.042	1.316	0.449~3.852	0.617
AST≥40 U/L(vs.<40 U/L)	1.827	0.927~3.601	0.082	2.279	0.809~6.422	0.119
TBil≥17.1 μmol/L(vs.<17.1 μmol/L)	1.519	0.773~2.982	0.225	-	-	-
HBsAg≥5000 IU/ml(vs.<5000 IU/ml)	1.223	0.505~2.966	0.656	-	-	-
CNLC III~IV期(vs. I~II期)	3.802	1.642~8.805	0.002	4.317	1.799~10.359	0.001

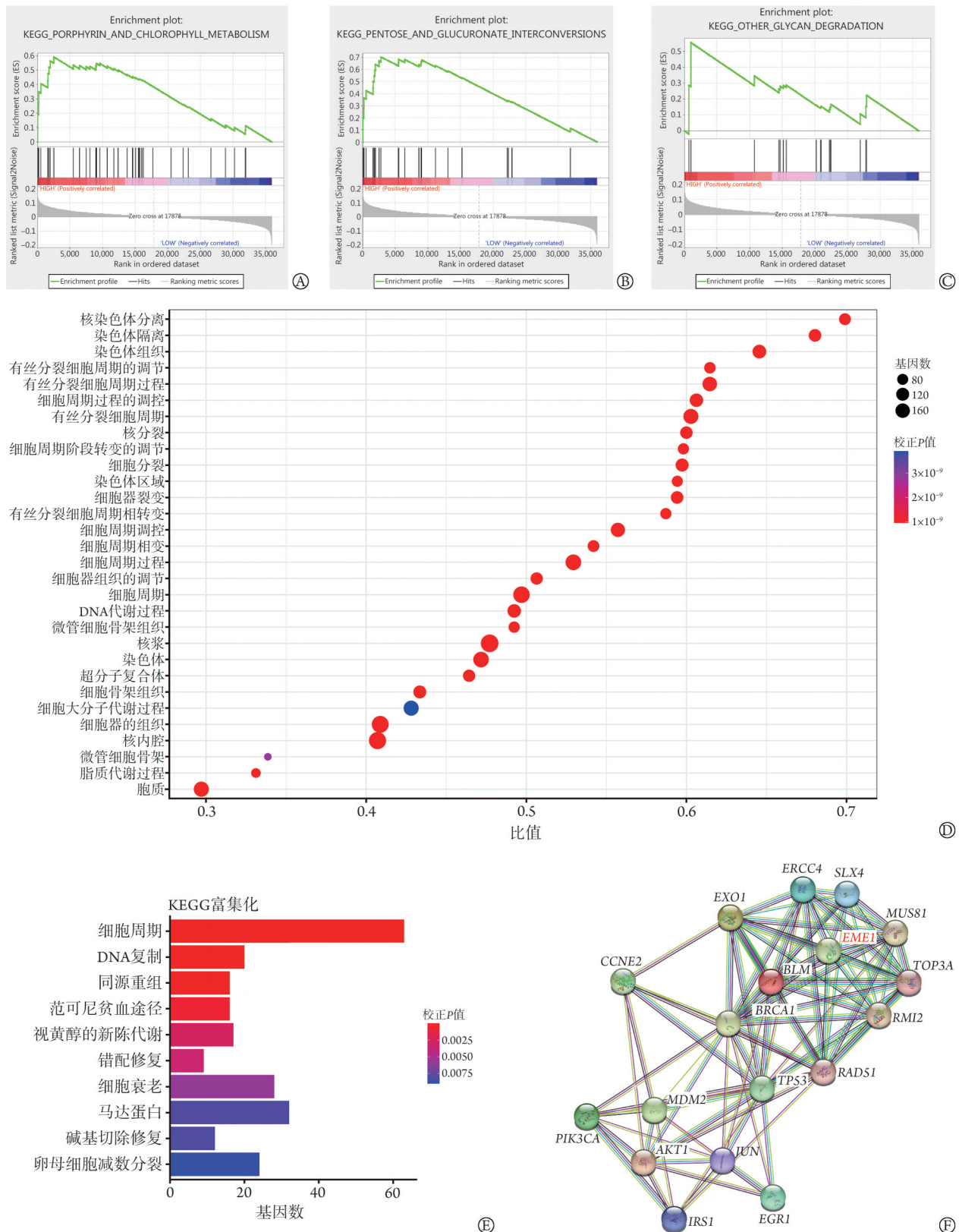
EME1. 减数分裂内切酶1; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; TBil. 总胆红素; HBsAg. 乙型肝炎病毒表面抗原; HR. 风险比; CI. 置信区间

图4E)。通过检索STRING数据库发现,与EME1最密切的互作蛋白主要有MUS81、RAD51、EXO1、RMI2、BRCA1、TOP3A、BLM、ERCC4和SLX4,这些蛋白均与细胞DNA损伤修复及维持基因稳定性有着密切的联系。EME1与细胞增殖有关的基因IRS1、AKT1、PIK3CA、TP53、CCNE2、MDM2、JUN、EGR1密切相关(图4F)。

### 3 讨论

EME1蛋白由583个氨基酸组成,分子量为65 kD,其编码基因定位于染色体17q21.3<sup>[17]</sup>,在较多成年人组织如肝、心脏及皮肤等,以及胚胎发育的不同阶段均有表达<sup>[12]</sup>。EME1蛋白通过C末端区域与MUS81结合形成具有结构特异性内切酶功能的异源二聚体蛋白复合物,对DNA结构进行切割,EME1是MUS81发挥核酸内切酶活性的必要条件<sup>[12,17]</sup>。MUS81-EME1复合物可以诱导底物的构象变化,在此过程中MUS81的疏水楔形结构及5'端至关重要,

这2个关键结构参与蛋白质-DNA的相互作用、3'端DNA底物的弯曲,以及在活性部位放置切割链<sup>[18]</sup>。有研究发现,用秋水仙碱处理分裂期的细胞,敲除了含有等位基因的EME1<sup>+/-</sup>细胞发生染色体突变的概率大于野生型细胞,说明EME1可维持染色体稳定<sup>[19]</sup>。通常情况下,脆性位点在体细胞中是稳定的,但在许多癌细胞中经常发生缺失或重排,MUS81-EME1的失稳参与肿瘤的发生发展过程<sup>[20]</sup>。在一项基于治疗性多肽药物的研究中提到,多肽通过与EME1结合,可扰乱MUS81-EME1复合体的结构,并降低胰腺癌细胞活力,从而延长患者的生存时间<sup>[21]</sup>。还有研究表明,EME1基因参与细胞增殖的过程可能与膀胱癌的预后有关<sup>[22]</sup>。EME1基因参与了细胞调节、增殖及迁移,与多种癌症复发有着密切联系。最新一项纳入了645例HCC患者及649例健康对照的研究发现,EME1基因的Glu69Asp错义多态性(Rs3760413)与广西人群患HCC的风险显著相关<sup>[23]</sup>。另一项纳入了36对原发胃癌及邻近非癌组织标本的



EME1. 减数分裂内切酶1; A—C. GSEA软件分析EME1 mRNA高表达组的相关基因功能变化的KEGG富集通路结果; D. 气泡图展示TCGA数据库的371个样本中EME1基因的相关生物学过程; E. 直方图显示EME1基因高表达组较低表达组差异基因的所在的主要通路; F. STRING数据库显示EME1蛋白与相关蛋白的相互作用

图4 EME1参与的生物学功能以及蛋白互作关系

Fig.4 Biological functions and protein interaction of EME1

研究发现, EME1 在胃癌组织及胃癌细胞系 AGS、MGC-80 细胞中均呈高表达, EME1 表达水平与胃癌分化程度及淋巴结转移都有着密切的联系。体内外实验中敲除 EME1 基因后, 胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力都受到了明显的抑制, 同时增加了细胞凋亡及细胞周期停滞的发生率, 这些现象的出现可能涉及 MYB/EME1/AKT 通路, 提示 EME1 可能是胃癌潜在的治疗靶点<sup>[13]</sup>。Tomoda 等<sup>[24]</sup>对几种不同的恶性肿瘤研究发现, EME1 比 ERCC1、RAD51、MUS81 能够更准确地预测肿瘤细胞对顺铂的敏感性, 因此 EME1 或可作为化疗敏感性的标志物。

本实验探究了 EME1 蛋白与 HCC 患者预后的关系, 研究发现 EME1 蛋白高表达的 HCC 患者总生存期更短, 这与另一文献中的结论 EME1 高表达与胃癌的不良预后密切联系一致<sup>[13]</sup>。多因素分析结果表明 EME1 蛋白高表达是 HCC 患者 5 年生存率的独立危险因素, 提示 EME1 有望成为独立预测 HCC 发生发展的标志物。目前早期 HCC 的主要治疗手段仍为手术切除, 治疗效果较好, 但部分根治患者在 5 年内出现复发, 目前尚无明确的复发预测因素<sup>[25]</sup>, 从而延误启动靶向免疫治疗的时机, 而 EME1 的表达情况或可成为启动治疗的生物学标志之一, 这也是未来的研究热点。从治疗角度而言, 虽然针对中晚期 HCC 的系统治疗已取得了长足的进步, 目前一线治疗药物的全球多中心随机双盲对照研究结果表明, 索拉非尼治疗的中位生存期为 10.7 月 (SHARP 研究)<sup>[26]</sup>, 仑伐替尼治疗的中位生存期为 13.6 月 (REFLECT 研究)<sup>[27]</sup>, 阿替利珠单抗联合贝伐珠单抗 (简称 “T+A” 方案) 治疗的中位生存期为 19.2 月 (IMbrave150 研究)<sup>[28]</sup>, 但距离预期尚有较大的距离, 因此寻找更加有效的治疗靶点以协同提高疗效尤为重要, 本研究结果提示 EME1 或可成为潜在的治疗靶点。

针对参与下游信号通路的机制, 本研究发现 EME1 与细胞增殖有关的基因 IRS1、PIK3CA、AKT1 等密切相关, 提示 EME1 可能通过参与调控细胞增殖来影响 HCC 的发生发展。胰岛素底物受体 1 (IRS1) 是胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF-IR) 的主要信号分子, 在同源重组 DNA 修复中发挥重要作用。Trojanek 等<sup>[29]</sup>发现 IGF-IR 介导的生长反应与 DNA 修复的协调可能是确保基因组正常稳定发育的关键, IRS1 在这一过程中发挥了核心作用, 且 IRS1 与 RAD51 在细胞质中表现出高亲和力, 当增殖的癌细胞不能磷酸化 IRS1 时, 低磷酸化的 IRS1 可能会抑制 RAD51 的核转位, 因此不利于 RAD51 的释放和双链断裂的修复。有研究通过 IHC 法检测 IRS1 在高血糖 HCC 患者与正常血糖 HCC 患者癌组织及非肿瘤组织

的表达情况发现, 两组患者中 IRS1 表达量均为癌组织高于非肿瘤组织, 高糖 HCC 患者出现了胰岛素抵抗导致 IRS1 的减少, 而索拉非尼可通过增加 IRS1 的表达改善建模 HepG2 细胞的胰岛素抵抗情况<sup>[30]</sup>。因此, 异常表达的 IRS1 会损害胰岛素抵抗的下游 AKT 信号通路, IRS1 与 PI3K/AKT 信号通路密切相关<sup>[31]</sup>。

本研究利用 STRING 数据库分析 EME1 蛋白互作关系发现, EME1 的互作蛋白主要集中在同源重组和维持染色体稳定等方面, 与参与同源重组及 DNA 修复的 MUS81、RAD51, 以及细胞增殖相关蛋白 IRS1、PIK3CA、AKT1 有着密切的联系, 推测 EME1 可能参与了 IRS1/PI3K/AKT 通路调节 HCC 细胞的增殖, 与肿瘤的发生发展有着密切的联系。

综上所述, EME1 在 HCC 组织中高表达, 并且与 5 年总生存率下降显著相关, EME1 可作为 HCC 发生发展的独立预测因子, 有望成为预测疗效的生物学标志物及潜在的治疗靶点。本研究是临床层面上的表象探索, 后续需要在细胞层面进行功能性研究探索具体的分子机制。

#### 【参考文献】

- [1] Hyuna S, Jacques F, Siegel Rebecca L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 雷艳文, 丁广成, 秦德华, 等. SBRT 联合卡瑞利珠单抗和阿帕替尼治疗晚期肝细胞癌的疗效及安全性[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(12): 1420-1426.
- [3] Mehta N, Guy J, Frenette CT, et al. Excellent outcomes of liver transplantation following down-staging of hepatocellular carcinoma to within Milan criteria: a multicenter study[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2018, 16(6): 955-964.
- [4] 王可欣, 纪冬. 乙型肝炎病毒与肝细胞癌关系研究进展 [J]. 传染病信息, 2022, 35(2): 166-171.
- [5] 陈松海, 王春艳, 郭畅, 等. 预测 HBV 相关肝细胞癌生存的列线图模型的建立 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(7): 1566-1571.
- [6] Qiu H, Cao S, Xu R. Cancer incidence, mortality, and burden in China: a time-trend analysis and comparison with the United States and United Kingdom based on the global epidemiological data released in 2020[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(10): 1037-1048.
- [7] 丁惠国, 屠红, 曲春枫, 等. 原发性肝癌的分层筛查与监测指南 (2020 版) [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(2): 83-99.
- [8] 张珊, 陈松海, 刘妍, 等. 非酒精性脂肪性肝病对乙肝病毒相关肝细胞癌患者生存的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(2): 157-162.
- [9] Wang JJ, Wang KX, Chen C, et al. Survival analysis and development of a prognostic nomogram for patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Heliyon, 2023, 9(10): e20850.
- [10] 王春艳, 杨武才, 谭文辉, 等. 慢性乙型肝炎免疫耐受期患者显著肝损伤的列线图模型及其预测价值分析 [J]. 临床肝胆病

- 杂志, 2021, 37(7): 1529-1533.
- [11] 张珊, 陈松海, 刘妍, 等. 非酒精性脂肪性肝病对乙型肝炎病毒相关肝细胞癌患者生存的影响[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(2): 157-162.
- [12] Abraham J, Lemmers B, Hande MP, *et al.* Eme1 is involved in DNA damage processing and maintenance of genomic stability in mammalian cells[J]. *EMBO J*, 2003, 22(22): 6137-6147.
- [13] Guo ZG, Liang EB, Li W, *et al.* Essential meiotic structure-specific endonuclease1 (*EME1*) promotes malignant features in gastric cancer cells *via* the Akt/GSK3B/CCND1 pathway[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 9869-9884.
- [14] Ying SM, Minocherhomji S, Chan KL, *et al.* MUS81 promotes common fragile site expression[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(8): 1001-1007.
- [15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. 传染病信息, 2020, 33(6): 481-500.
- [16] Ji D, Chen Y, Bi JF, *et al.* Entecavir plus Biejia-Ruangan compound reduces the risk of hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6): 1515-1524.
- [17] Ciccia A, Constantinou A, West SC. Identification and characterization of the human Mus81-Eme1 endonuclease[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(27): 25172-25178.
- [18] Gwon GH, Jo A, Baek K, *et al.* Crystal structures of the structure-selective nuclease Mus81-Eme1 bound to flap DNA substrates[J]. *EMBO J*, 2014, 33(9): 1061-1072.
- [19] Hiyama T, Katsura M, Yoshihara T, *et al.* Haploinsufficiency of the Mus81-Eme1 endonuclease activates the intra-S-phase and G<sub>2</sub>/M checkpoints and promotes rereplication in human cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(3): 880-892.
- [20] Calzetta NL, Besteiro MAG, Gottifredi V. Mus81-Eme1-dependent aberrant processing of DNA replication intermediates in mitosis impairs genome integrity[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(50): eabc8257.
- [21] Garton M, Corbi-Verge C, Hu Y, *et al.* Rapid and accurate structure-based therapeutic peptide design using GPU accelerated thermodynamic integration[J]. *Proteins*, 2019, 87(3): 236-244.
- [22] Han YY, Zheng QY, Tian Y, *et al.* Identification of a nine-gene panel as a prognostic indicator for recurrence with muscle-invasive bladder cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2019, 119(8): 1145-1154.
- [23] Wang YX, Huang XL, Su ZH, *et al.* The Glu69Asp polymorphism of *EME1* gene is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in Guangxi population, China[J]. *Int J Gen Med*, 2022, 15: 7855-7866.
- [24] Tomoda Y, Katsura M, Okajima M, *et al.* Functional evidence for Eme1 as a marker of cisplatin resistance[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(12): 2997-3001.
- [25] 王春艳, 纪冬, 陈艳, 等. 慢性乙型肝炎患者经恩替卡韦治疗后获得显著组织学应答的影响因素及列线图模型构建[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(2): 143-150.
- [26] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-390.
- [27] Kudo M, Finn RS, Qin S, *et al.* Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial[J]. *Lancet*, 2018, 391(10126): 1163-1173.
- [28] Galle PR, Finn RS, Qin S, *et al.* Patient-reported outcomes with atezolizumab plus bevacizumab *versus* sorafenib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (IMbrave150): an open-label, randomised, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(7): 991-1001.
- [29] Trojanek J, Ho T, del Valle L, *et al.* Role of the insulin-like growth factor I/insulin receptor substrate 1 axis in Rad51 trafficking and DNA repair by homologous recombination[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(21): 7510-7524.
- [30] 朱诗璇. 胰岛素抵抗环境下索拉非尼对肝癌细胞增殖的影响及其潜在机制[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- [31] Alaaeldin R, Abdel-Rahman IAM, Ali Hassan H, *et al.* Carpachromene ameliorates insulin resistance in HepG2 cells *via* modulating IR/IRS1/PI<sub>3</sub>k/akt/GSK3/FoxO1 pathway[J]. *Molecules*, 2021, 26(24): 7629.

(责任编辑: 张小利)



解放军医学杂志®