

·论著·

热休克蛋白家族 A 成员 5 在肝细胞癌中的表达及其与细胞转移、增殖及患者不良预后的关系

温杰¹, 施艺¹, 王志慧¹, 牛绍清^{2*}

1. 中山大学附属第一医院 肿瘤介入科, 广东 广州 510080

2. 中山大学附属第一医院 放射治疗科, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 探究热休克蛋白家族 A 成员 5(heat shock protein family A member 5, HSPA5)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中的表达情况,对 HCC 患者预后的影响,对 Huh7 细胞表型行为的影响及其可能机制。**方法** 利用癌症基因组图谱、基因表达综合数据库和国际癌症基因组联盟的 HCC 数据,以及 HCC 组织芯片的免疫组织化学检测,系统分析 HSPA5 在 HCC 组织中的表达水平及其与 HCC 转移风险的关系;通过单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型分析、Kaplan-Meier 法探讨 HSPA5 表达水平对 HCC 患者预后的影响;利用 siRNA 技术敲减 Huh7 细胞中的 HSPA5 后,通过克隆形成实验、羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE)细胞增殖检测及 Transwell 侵袭实验验证 HSPA5 对 Huh7 细胞增殖及侵袭能力的影响;通过京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)及基因本体(gene ontology, GO)富集分析初步探索 HSPA5 在 HCC 中潜在的调控机制,并采用蛋白质印迹法检测敲减 HSPA5 后, Huh7 细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ 的表达水平变化。**结果** HSPA5 的 mRNA 及蛋白水平在 HCC 癌组织及具有高转移风险的 HCC 癌组织中均处于高表达状态。HSPA5 高表达是 HCC 患者预后的独立危险因素。敲减 HSPA5 可抑制 Huh7 细胞的侵袭、克隆形成及增殖能力。富集分析显示, HSPA5 显著富集于 PPAR 信号通路、胆汁分泌通路及内质网相关通路等。敲减 HSPA5 可下调 PPAR γ 蛋白表达水平。**结论** HSPA5 或可通过激活 PPAR γ 通路促进 HCC 细胞转移及增殖,是 HCC 转移相关的潜在标志物及预后预测因子,靶向 HSPA5 或可为 HCC 的诊疗提供新思路。

【关键词】 肝细胞癌; 热休克蛋白家族 A 成员 5; 肿瘤转移; 预后

Heat shock protein family A member 5 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with metastasis, proliferation, and poor prognosis

Wen Jie¹, Shi Yi¹, Wang Zhihui¹, Niu Shaoqing^{2*}

1. Department of Interventional Oncology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

2. Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

*Corresponding author: Niu Shaoqing, E-mail: niushq5@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression of heat shock protein family A member 5 (HSPA5) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, its prognostic significance for HCC patients, its effects on the phenotypic behaviors of Huh7 cells, and the underlying mechanisms. **Method** HCC data from the cancer genome atlas (TCGA), gene expression omnibus (GEO), and the International Cancer Genome Consortium (ICGC) were analyzed, along with immunohistochemical staining of an HCC tissue microarray, to

基金项目:国家自然科学基金(82102818)

*通信作者:牛绍清, E-mail: niushq5@mail.sysu.edu.cn

systematically evaluate HSPA5 expression levels in HCC tissues and its association with metastatic risk. Univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models, and Kaplan–Meier analysis were performed to assess the impact of *HSPA5* expression on the prognosis of HCC patients. The siRNA technology was used to knockdown the expression of *HSPA5* in Huh7 cells, and then colony formation assay, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) cell proliferation assay, and Transwell invasion assay were conducted to determine the effects of *HSPA5* on the proliferation and invasion capacities of Huh7 cells. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and gene ontology (GO) enrichment analyses were conducted to preliminarily explore the potential regulatory mechanisms of *HSPA5* in HCC, followed by validation using western blotting to detect the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in Huh7 cells after knockdown of *HSPA5*. **Result** Both mRNA and protein levels of *HSPA5* were highly expressed in HCC tissues and in HCC tissues with high metastatic risk. High *HSPA5* expression was identified as an independent risk factor for poor prognosis in HCC patients. Knockdown of *HSPA5* significantly inhibited the invasion, colony formation, and proliferation of Huh7 cells. Enrichment analysis revealed that *HSPA5* was significantly enriched in pathways including the PPAR signaling pathway, bile secretion, and endoplasmic reticulum-associated pathways in HCC. Notably, knockdown of *HSPA5* significantly downregulated the protein expression level of PPAR γ . **Conclusion** *HSPA5* may promote HCC metastasis and proliferation through activating the PPAR γ signaling pathway. It represents a potential metastasis-associated biomarker and prognostic predictor for HCC. Targeting *HSPA5* may provide a new insight for the diagnosis and treatment of HCC.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Heat shock protein family A member 5; Metastasis; Prognosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球第六大常见癌症及第三大癌症相关死亡原因,全球每年新发 HCC 约 90.6 万例,死亡病例约 83 万例^[1]。HCC 具有高度转移倾向,总体预后较差^[2]。30%~50%的患者在病程中会发生肝外转移,其中,肺转移发生率为 43.8%~77.8%,骨骼转移发生率为 16.0%~52.5%^[1]。肺转移 HCC 患者 1 年总生存(overall survival, OS)率仅为 10%,5 年 OS 率仅 2.5%^[3]。HCC 转移涉及信号通路的异常激活(如 Wnt/转化生长因子- β),以及基质细胞和免疫细胞的互作(如肝星状细胞与调节性 T 细胞、M2 型巨噬细胞互作)^[4-6]。探索 HCC 转移相关的分子机制及其潜在靶点对改善 HCC 预后具有重要意义。

热休克蛋白家族 A 成员 5 (heat shock protein family A member 5, HSPA5),是由位于人类染色体 9q33.3 的 *HSPA5* 基因编码的由 654 个氨基酸组成的蛋白质^[7]。作为热休克蛋白 70 家族的成员, HSPA5 主要定位于内质网腔,作为分子伴侣参与新生蛋白质的折叠、组装^[8-9]。在生理条件下, HSPA5 维持在较低表达水平。当细胞面临内质网应激,如缺氧、氧化应激时, HSPA5 被显著诱导表达,通过激活未折叠蛋白反应恢复细胞内稳态^[10]。HSPA5 在多种肿瘤组织中处于高表达状态,包括乳腺癌、HCC、胃癌、胶质瘤、前列腺癌、胰腺导管腺癌、肺

癌及头颈部鳞状细胞癌^[11-18],并可促进肿瘤细胞增殖、侵袭等。特别是 HSPA5 可促进肿瘤细胞的治疗抵抗,其通过抑制凋亡促进化疗(简称化疗)耐药,如卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌^[19-21]。然而,目前关于 HSPA5 在 HCC 转移中的调控作用及其分子机制的认识仍十分有限。

基于此,本研究拟探讨 HSPA5 在 HCC 中的表达水平及其与患者预后的关系,验证 HSPA5 对 HCC 细胞生物学行为的影响,并初步探索 HSPA5 在 HCC 中的调控机制。

1 资料与方法

1.1 HSPA5 与 HCC 预后的相关性分析

首先,从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>)、基因表达综合(gene expression omnibus, GEO, 包括数据集 GSE14520 及 GSE5093, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)以及国际癌症基因组联盟(International Cancer Genome Consortium, ICGC)数据库(<https://dcc.icgc.org/>)下载 HCC 的 mRNA 表达矩阵及相应的临床信息。其中 ICGC 是一个大型的国际合作项目,旨在全面描述全球主要癌症类型的基因组突变异常,高质量地整合了来自全球 84 个癌症项目的多组学数据。

基于 TCGA-HCC 数据集的 373 例 HCC 癌

组织和50例癌旁正常肝组织,利用limma包(R 4.5.3)进行差异表达基因分析,筛选阈值为差异倍数(fold change, FC)>1.5且校正后 $P<0.05$ 。同时,借助“仙桃学术”工具(<https://www.xiantaozi.com/>)获取TCGA-HCC数据集中与生存预后相关的基因。为识别HCC转移相关基因,利用GSE5093-HCC数据集(含9例转移组与11例非转移组),以相同阈值(FC>1.5且校正后 $P<0.05$)通过limma包分析获得转移相关基因。将上述3个基因集(差异表达基因、预后相关基因、转移相关基因)取交集,共得到2个与HCC转移相关的预后基因:YWHAZ和HSPA5。

随后,利用TCGA-HCC和GSE14520数据集针对HSPA5进行预后分析。TCGA-HCC数据集中共有373例HCC患者,筛选随访时间 ≥ 30 d的病例,最终290例进入单因素及多因素Cox比例风险回归模型分析。以HSPA5表达水平中位值(8.951)为截断点,将TCGA-HCC患者分为高表达组($n=124$)和低表达组($n=166$)。GSE14520-HCC数据集中共有221例患者,该数据集提供了基于“预测转移风险模型”的转移风险评估,包括高转移风险组107例和低转移风险组114例。经筛选随访时间 ≥ 30 d的病例后,共195例被纳入单因素及多因素Cox比例风险回归模型分析。以HSPA5表达水平中位值(5.089)为截断点,将GSE14520-HCC患者分为高表达组($n=86$)和低表达组($n=109$)。采用单因素及多因素Cox比例风险回归模型分析评估各临床变量及HSPA5表达水平对预后的影响。

此外,采用Kaplan-Meier法评估HSPA5表达水平对HCC患者预后的影响,分析对象包括前述290例TCGA-HCC患者及195例GSE14520-HCC患者,并利用ICGC-HCC患者(包含243例HCC癌组织和202例癌旁正常肝组织)进行验证;筛选随访时间 ≥ 30 d的病例后,共获得213例ICGC-HCC患者;以HSPA5表达水平中位值(27.348)为截断点分为高表达组($n=107$)和低表达组($n=106$)。

最后,利用Kaplan-Meier法,在HCC综合分子数据库HCCDB (integrative molecular database of hepatocellular carcinoma, <http://lifeome.net/database/hccdb/search.html>)中,验证YWHAZ和HSPA5的预后价值。

1.2 评估HSPA5在HCC组织中的蛋白表达水平

本研究使用HCC组织芯片HLivH090PG01

(上海芯超生物科技有限公司,伦理委员会审核编号:YB M-05-02),芯片中含有30例HCC患者的HCC癌组织、癌旁正常肝组织及远端正常肝组织标本,其中女性3例,男性27例,最小年龄21岁,最大年龄69岁,中位年龄47岁。对组织芯片进行HSPA5免疫组织化学染色,所用一抗为武汉三鹰生物技术有限公司产品(货号11587-1-AP),工作浓度为1:100。因6例患者组织脱片严重,无法进行染色,最终纳入24例患者进行比较分析。

免疫组织化学染色的主要步骤:①脱蜡与水化。将切片依次置于二甲苯中脱蜡(2次,每次10 min),并依次经梯度乙醇(100%、95%、85%、75%)各水化5 min,最后用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)漂洗3次,每次3 min。②抗原修复。将切片浸没于柠檬酸盐抗原修复液(pH=6.0),微波炉中火加热维持微沸10 min进行抗原修复,室温自然冷却至常温;PBS洗涤3次,每次3 min。③内源性过氧化物酶阻断。用3%过氧化氢溶液室温避光孵育15 min, PBS洗涤3次,每次3 min。④封闭非特异性结合。滴加5%正常山羊血清室温封闭30 min,倾去封闭液, PBS洗涤3次,每次3 min。⑤一抗孵育。滴加适当稀释比例的一抗(HSPA5抗体),4℃湿盒中孵育过夜。次日用PBS洗涤3次,每次5 min。⑥二抗孵育。滴加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔IgG(H+L)二抗(碧云天生物技术有限公司,货号:A0208,工作浓度为1:100),湿盒中避光孵育60 min。PBS洗涤3次,每次5 min。⑦DAB显色。新鲜配制DAB显色工作液(原液:稀释液=1:100),避光现配现用,直接滴加覆盖组织,显微镜下实时观察,显色时长1~10 min,待特异性棕黄色阳性信号清晰显现后,立即以蒸馏水冲洗终止显色。⑧复染。用苏木精染液复染细胞核3 min左右,自来水洗,1%盐酸酒精分化2~3 s,自来水冲洗,氨水返蓝,流水冲洗。⑨脱水、透明与封片。将切片依次放入75%酒精3 min、85%酒精3 min、无水乙醇Ⅰ3 min、无水乙醇Ⅱ3 min、二甲苯Ⅰ10 min、二甲苯Ⅱ10 min脱水透明,将切片从二甲苯中拿出来稍晾干,中性树胶封片。⑩镜检与拍照。显微镜下观察染色结果,采集代表性图像。

免疫组织化学评分方法如下。染色强度评分标准:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性细胞率评分标准:0~5%为0分,>

5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%~75%为3分,>75%为4分。最终得分为两项评分的乘积。

1.3 HSPA5 mRNA 特异性干扰质粒 (siRNA-HSPA5) 转染

从山东维真公司购买 siRNA-HSPA5 (序列: GAGCGCAUUGAUACUAGAAAU) 及其对照质粒 siRNA-HSPA5 control (序列: AACTTGTTAGTTCCTCATCTCCTGTCTC), 取 2 μ g 质粒 DNA 使用脂质体转染试剂 Lipofectamine 3000 (赛默飞世尔科技公司, 货号: L3000001) 进行转染。转染后培养细胞 24 h 后通过蛋白质印迹法检测敲减效率。本研究的对照组和实验组分别为成功转染 siRNA-HSPA5 control 和 siRNA-HSPA5 的人肝癌细胞系 Huh7 细胞 (上海雅吉生物科技有限公司, 货号: YS1141C)。

1.4 蛋白质印迹法

在对照组和实验组细胞中加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 15 min, 取上清。使用 BCA 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 货号: P0399S) 测定蛋白浓度, 调整蛋白上样量至 30 μ g。制备 10% 浓度的分离胶和浓缩胶。每个样品孔加入 30 μ g 蛋白样品, 并加入预染蛋白 marker。浓缩胶 80 V 电泳约 30 min, 分离胶 120 V 电泳约 90 min, 直至溴酚蓝指示剂到达胶底。剪切与凝胶大小一致的 0.22 μ m 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 使用甲醇浸泡活化, 并裁剪与之大小匹配的滤纸。按“阳极-滤纸-膜-凝胶-滤纸-阴极”顺序组装转膜夹。恒流 300 mA, 冰浴中转膜 120 min。转膜后, 将 PVDF 膜置于含 5% 脱脂牛奶的 TBST 中, 室温摇床封闭 2 h。用一抗稀释液按 1:1000 稀释 HSPA5 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 11587-1-AP) 及过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 16643-1-AP), 按 1:5000 稀释 β -actin 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 20536-1-AP)。将膜与一抗孵育 (4 $^{\circ}$ C 摇床过夜)。次日用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。用二抗稀释液稀释 HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (碧云天生物技术有限公司, 货号: A0208), 工作浓度为 1:1000, 室温孵育 1 h, 后使用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。配置增强型化学发光液, 将 A 液和 B 液等体积混合, 均匀滴加在膜表面, 使用化学发光成像仪曝光采集图像。

1.5 细胞培养及 Transwell 细胞侵袭实验

将 Huh7 细胞培养于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度的培养箱中培养。每隔 2~3 d 更换培养液, 当细胞满度达到 80%~90% 时进行传代培养, 用于后续表型功能实验。

进行 Transwell 实验前, 将基质胶 (matrigel) 4 $^{\circ}$ C 过夜融化, 用预冷无血清培养基按 1:8 稀释。取 60 μ l 均匀加入上室, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 凝固成胶。将对照组和实验组细胞用无血清培养基重悬, 调整密度至 2.5 $\times$ 10⁵ 个/ml, 上室加入 200 μ l 细胞悬液, 下室加入 1 ml 含 10% FBS 的完全培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h。取出上室, 擦去未侵袭细胞, 4% 多聚甲醛固定下室细胞, 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 洗涤后晾干, 显微镜下计算穿膜细胞数。

1.6 克隆形成实验

将对照组和实验组细胞按照 100 个/孔的密度铺于 6 孔板, 置于培养箱中培养, 每 3 天换液 1 次, 培养 2 周至克隆形成 (细胞数 $\geq$ 50 个/克隆)。弃培养基, PBS 洗涤 1 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 弃固定液, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 流水洗净后晾干。显微镜下计算克隆数, 克隆形成率 = (形成的克隆数/接种的细胞数) $\times$ 100%。

1.7 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯细胞增殖检测

使用羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE) 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号: E-CK-A345) 进行实验。取对数生长期的 Huh7 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化液进行消化, 后轻轻吹打制成单细胞悬液。用血细胞计数板计数, 调整细胞浓度为 1 $\times$ 10⁶ 个/ml, 每组取 1 ml 细胞悬液 (共 2 组), 转移至无菌避光离心管中。向每个离心管中加入 1 μ l 5 mmol/L CFSE 工作液, 轻轻涡旋混匀, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中避光孵育 15 min。加入 5 倍体积的含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 轻轻混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 终止 CFSE 染色, 避免过度染色损伤细胞。200 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 每次 2 ml, 200 $\times$ g 离心 5 min, 去除残留染色液, 最后用 1 ml 含血清培养基重悬细胞, 取少量细胞用倒置显微镜观察染色效果 (细胞呈均匀绿色荧光为染色成功)。将成功染色后的细

胞悬液过 200 目筛网,去除细胞团块,采用流式细胞仪检测,以 488 nm 激光激发,通过 FL1 通道检测 CFSE 荧光信号,每组至少收集 10 000 个单细胞,记录荧光强度直方图,作为转染前细胞增殖基线数据。将剩余细胞重新接种到 6 cm 培养皿中(共 2 组),正常培养,过夜待细胞贴壁后分别进行 siRNA-HSPA5 control 和 siRNA-HSPA5 转染,24 h 后按上述步骤进行细胞计数及检测。使用 FlowJo 软件分析流式检测数据,计算各组细胞的 CFSE 荧光强度平均值,对比转染前与转染 siRNA-HSPA5 control 和 siRNA-HSPA5 后 24 h 的细胞增殖差异。

1.8 通路富集分析

利用 limma 包(R 4.5.3)分别分析上述 TCGA-HCC 和 GSE14520-HCC 数据集中 *HSPA5* 高、低表达组间的差异表达基因,筛选阈值为 $FC>1.5$ 且校正后 $P<0.05$ 。此外,本研究还下载了 GSE76427-HCC 和 GSE25097-HCC 的 mRNA 表达数据进行验证,同样依据 *HSPA5* 表达水平中位值分别将 2 个数据集划分为 *HSPA5* 高、低表达组(GSE76427-HCC 数据集中 *HSPA5* 高表达组 41 例、低表达组 73 例,GSE25097-HCC 数据集中 *HSPA5* 高表达组 125 例、低表达组 143 例),并分析组间的差异表达基因。随后,分别对上述 4 个数据集中筛选出的显著差异表达基因进行基因本体(gene ontology, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,并对这些 *HSPA5* 相关的 GO 条目与 KEGG 通路进行交集分析。

差异基因的 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析采用 DAVID6.8 在线分析工具(<https://david.ncifcrf.gov/>)完成。DAVID 是一个综合性功能注释数据库,集成了 GO、KEGG、蛋白质相互作用及疾病关联等多种信息。将筛选得到的差异基因列表提交至 DAVID 平台,以人类全基因组编码基因为背景基因集,采用 Fisher 确切概率法计算每个功能条目或通路中的富集显著性。以原始 $P<0.05$ 为初步筛选标准,采用 Benjamini-Hochberg 算法进行多重检验校正,校正后错误发现率(false discovery rate, FDR) <0.1 定义为显著富集条目。富集结果以气泡图形式展示,其中气泡大小代表该条目中富集的基因数目,颜色依据 $-\log_{10}(\text{FDR})$ 值反映富集显著性高低。富集气泡图通过 ggplot2 包(R 4.5.3)绘制完成。

1.9 统计学方法

使用 GraphPad Prism 6.01 和 SPSS 27 进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,计数资料采用频数或率或构成比(%)描述。使用 GraphPad Prism 6.01 进行生存分析,采用 Kaplan-Meier 法估计生存率,通过 Log-rank 检验比较组间生存率差异。使用 GraphPad Prism 6.01 进行组间差异分析,*HSPA5* mRNA 在各数据集不同组织中的表达水平差异、*HSPA5* 蛋白在组织芯片不同组织中的免疫组织化学评分差异采用双侧双样本 *t* 检验。使用 SPSS 27 进行单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *HSPA5* 是 HCC 预后的独立危险因素

在 TCGA-HCC 数据集中,相较于癌旁正常肝组织,HCC 癌组织中共鉴定出 998 个高表达基因和 396 个低表达基因(图 1A);利用“仙桃学术”工具共获得 5035 个 HCC 预后相关基因。在 GSE5093-HCC 数据集中,相较于转移组,非转移组的 HCC 癌组织中有 51 个显著低表达基因(图 1B)。上述 3 个数据集取交集后获得 2 个共同基因 *YWHAZ* 与 *HSPA5* (图 1C),提示二者可能在 HCC 转移及预后中发挥重要调控作用。HCCDB 数据验证 *HSPA5* 高表达的 HCC 患者预后较差(Log-rank $P=0.038\ 8$,图 1D),而 *YWHAZ* 表达水平对 HCC 患者预后的影响无统计学意义(Log-rank $P=0.430\ 0$,图 1E)。因此,我们推测 *HSPA5* 是 HCC 关键的转移相关预后因子。

在 TCGA-HCC 数据集中,*HSPA5* 在 HCC 癌组织中的 mRNA 表达水平高于癌旁正常肝组织($P<0.000\ 1$,图 1F)。被纳入分析的 TCGA-HCC 患者的基线资料如下:78.97%患者年龄 >50 岁;57.24%为 *HSPA5* 低表达;以白色人种(49.31%)与黄色人种(43.10%)为主,男性占多数(69.66%);病理分级以 G_2 和 G_3 级为主(分别占 47.93%和 35.52%),大多数患者的临床分期[美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)分期]为 I 期(53.10%,表 1)。单因素 Cox 比例风险回归模型分析显示,年龄($P=0.048$)、*HSPA5* 表达水平($P=0.036$)、人种($P=0.004$)和性别($P=0.013$)是影响预后的因素(表 2)。多因素 Cox 比例风险回归模型分析显示,*HSPA5* 高表达($HR=1.752$,95%CI

1.081~2.839, $P=0.023$)、白色人种($HR=2.123$, 95% CI 1.142~3.948, $P=0.017$) 及其他人种 ($HR=3.123$, 95% CI 1.321~7.384, $P=0.009$) 为预后的独立危险因素(表2)。Kaplan-Meier 法也证实 *HSPA5* 高表达的 TCGA-HCC 患者预后较差(Log-rank $P=0.034$ 4, 图 1G)。

在 GSE14520-HCC 数据集中, *HSPA5* 的表达水平在高转移风险组的 HCC 癌组织中较低转移风险组高($P<0.0001$, 图 1H)。被纳入分析的 GSE14520-HCC 患者的基线特征如下: 年龄>50 岁者占 49.23%, *HSPA5* 低表达者占 55.90%, 男性占 87.69%, 41.54% 患者的丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT) > 50 U/L, 60.51% 的肿瘤直径 ≤ 5 cm, 76.92% 为单发病灶, 73.85% 为巴塞罗那肝癌 (Barcelona clinic liver cancer, BCLC) 分期 A 期, 58.46% 出现肿瘤复发, 92.31% 合并肝硬化(表3)。单因素 Cox 比例风险回归模型分析显示, *HSPA5* 表达水平($P=0.026$)、肿瘤直径($P=0.008$)、BCLC 分期($P<0.001$)、复发状态($P<0.001$) 和肝硬化($P=0.044$) 为预后影响因素(表4)。多因素 Cox 比例风险回归模型分析显示, *HSPA5* 高表达 ($HR=1.752$, 95% CI 1.119~2.742, $P=$

表 1 290 例 TCGA-HCC 患者的临床病理基线特征[例(%)]

临床特征	数据
年龄	
≤50 岁	61 (21.03)
>50 岁	229 (78.97)
<i>HSPA5</i> 表达水平	
高表达	124 (42.76)
低表达	166 (57.24)
人种	
黄色人种	125 (43.10)
白色人种	143 (49.31)
其他	22 (7.59)
性别	
女性	88 (30.34)
男性	202 (69.66)
病理分级	
G ₁ 级	37 (12.76)
G ₂ 级	139 (47.93)
G ₃ 级	103 (35.52)
G ₄ 级	11 (3.79)
临床分期	
I 期	154 (53.10)
II 期	66 (22.76)
III 期	66 (22.76)
IV 期	4 (1.38)

表 2 TCGA-HCC 患者预后影响因素的单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型分析

临床特征	单因素分析		多因素分析	
	<i>HR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i> 值	<i>HR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i> 值
年龄		0.048		0.085
≤50 岁	1		1	
>50 岁	1.984 (1.007~3.906)	0.048	1.848 (0.918~3.702)	0.085
<i>HSPA5</i> 表达水平		0.036		0.023
低表达	1		1	
高表达	1.664 (1.033~2.682)	0.036	1.752 (1.081~2.839)	0.023
人种		0.004		0.015
黄色人种	1		1	
白色人种	2.558 (1.421~4.606)	0.002	2.123 (1.142~3.948)	0.017
其他	3.171 (1.343~7.492)	0.009	3.123 (1.321~7.384)	0.009
性别		0.013		0.236
女性	1		1	
男性	0.545 (0.337~0.882)	0.013	0.730 (0.433~1.229)	0.236
病理分级		0.155		
G ₁ 级	1			
G ₂ 级	1.497 (0.659~3.402)	0.336		
G ₃ 级	1.564 (0.670~3.651)	0.301		
G ₄ 级	4.201 (1.211~14.569)	0.024		
临床分期		0.208		
I 期	1			
II 期	1.208 (0.641~2.275)	0.558		
III+IV 期	1.637 (0.949~2.823)	0.076		

表 3 195 例 GSE14520-HCC 患者的临床病理基线特征[例(%)]

临床特征	数据	临床特征	数据
年龄		病灶数目	
≤50 岁	99(50.77)	单发	150(76.92)
>50 岁	96(49.23)	多发	45(23.08)
HSPA5 表达水平		巴塞罗那肝癌分期	
高表达	86(44.10)	A 期	144(73.85)
低表达	109(55.90)	B 期	22(11.28)
性别		C 期	29(14.87)
女性	24(12.31)	复发状态	
男性	171(87.69)	否	81(41.54)
丙氨酸转氨酶水平		是	114(58.46)
≤50 U/L	114(58.46)	肝硬化	
>50 U/L	81(41.54)	否	15(7.69)
肿瘤直径		是	180(92.31)
≤5 cm	118(60.51)		
>5 cm	77(39.49)		

0.014)、BCLC C 期($HR=3.664$, 95% CI 1.943~6.909, $P<0.001$)、肿瘤复发 ($HR=98.114$, 95% CI 13.591~708.307, $P<0.001$) 及合并肝硬化 ($HR=4.794$, 95% CI 1.164~19.748, $P=0.030$) 为预后的独立危险因素 (表 4)。Kaplan-Meier 法证实 HSPA5 高表达的 GSE14520-HCC 患者预后更差 (Log-rank $P=0.024$ 0, 图 1I)。

ICGC-HCC 数据的验证结果也提示, HCC 癌组织中的 HSPA5 表达水平较癌旁正常肝组织高 ($P<0.000$ 1, 图 1J), 且 HSPA5 高表达患者的预后更差 (Log-rank $P=0.033$ 2, 图 1K)。

最后, HCC 组织芯片的免疫组织化学评分结果显示, HSPA5 蛋白在 HCC 癌组织中的评分为 (8.17 ± 0.74) 分, 高于癌旁正常肝组织 [(4.79 ± 0.52) 分, $P=0.000$ 5] 和远端正常肝组织 [(3.29 ± 0.44) 分, $P<0.000$ 1], 且癌旁正常肝组织的 HSPA5 免疫组织化学评分也高于远端正常肝组织 ($P=0.033$) (图 1L、1M)。

2.2 HSPA5 促进 HCC 细胞的侵袭及增殖能力

本研究通过 siRNA 技术敲减 Huh7 细胞中的 HSPA5 蛋白表达 (图 2A), 并进行表型功能实验。结果显示, 与对照组相比, 实验组的穿膜细胞数目减少 [(187.30 ± 7.31) 个比 (63.67 ± 6.17) 个, $P=0.002$, 图 2B], 克隆形成能力减弱 [$(80\pm4)\%$ 比 $(20\pm2)\%$, $P=0.000$ 2, 图 2C], 增殖能力也减弱; 转染 24 h 后, 实验组的 CFSE 荧光衰减较对照组减缓, 提示敲低 HSPA5 可明显抑制 Huh7 细胞的分裂与增殖能力 (图 2D)。

2.3 HSPA5 对 HCC 调控的潜在影响

在 TCGA-HCC 数据集中, HSPA5 高表达组共有 897 个上调基因和 256 个下调基因 (图 3A), 其显著富集于 33 条 KEGG 通路 (排名前 10 的通路见图 3B) 及 1243 条 GO 条目 (排名前 10 的条目见图 3C)。在 GSE14520-HCC 数据集中, HSPA5 高表达组共有 193 个上调基因和 211 个下调基因, 其主要富集于 181 条 GO 条目 (排名前 10 的条目见图 3D)。此外, 2 个用于验证的数据集的分析结果显示, GSE76427-HCC 数据集的差异表达基因 (HSPA5 高表达组共有 26 个上调基因和 5 个下调基因) 富集于 469 条 GO 条目 (排名前 10 的条目见图 3E), GSE25097-HCC 数据集的差异表达基因 (HSPA5 高表达组共有 111 个上调基因和 148 个下调基因) 富集于 24 条 KEGG 通路 (排名前 10 的通路见图 3F) 及 981 条 GO 条目 (排名前 10 的条目见图 3G)。对上述富集通路进行交集分析, 共鉴定出 8 条 KEGG 通路, 包括细胞色素 P450 介导的异生物质代谢、胆汁分泌、丁酸代谢、脂肪酸降解、代谢通路、丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成及 PPAR 信号通路 (图 3H); 以及 9 条 GO 条目, 涉及对酸性化学物质/金属离子/应激的响应、内质网膜及其亚区、有机酸/含氧酸代谢过程、类固醇脱氢酶活性及生物质量调控 (图 3I)。由于 PPAR 信号通路在 HCC 脂质代谢重编程及肿瘤应激适应中发挥核心调控作用, 且与内质网应激密切相关, 本研究选择该通路进行实验验证, 结果显示, 敲减 HSPA5 可显著减少 PPAR γ 的蛋白表

表 4 GSE14520-HCC 患者预后影响因素的单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型分析

临床特征	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	P 值	HR (95%CI)	P 值
年龄		0.825		
≤50 岁	1			
>50 岁	1.050(0.681~1.619)	0.825		
HSPA5 表达水平		0.026		0.014
低表达	1		1	
高表达	1.639(1.062~2.530)	0.026	1.752(1.119~2.742)	0.014
性别		0.190		
女性	1			
男性	1.680(0.774~3.646)	0.190		
丙氨酸转氨酶水平		0.748		
≤50 U/L	1			
>50 U/L	1.074(0.694~1.661)	0.748		
肿瘤直径		0.008		0.427
≤5 cm	1		1	
>5 cm	1.802(1.165~2.787)	0.008	1.234(0.735~2.070)	0.427
病灶数目		0.213		
单发	1			
多发	1.359(0.839~2.201)	0.213		
巴塞罗那肝癌分期		<0.001		<0.001
A 期	1		1	
B 期	2.086(1.103~3.944)	0.024	0.972(0.502~1.884)	0.934
C 期	4.128(2.456~6.937)	<0.001	3.664(1.943~6.909)	<0.001
复发状态		<0.001		<0.001
否	1		1	
是	95.14(13.213~685.086)	<0.001	98.114(13.591~708.307)	<0.001
肝硬化		0.044		0.030
否	1		1	
是	4.236(1.041~17.235)	0.044	4.794(1.164~19.748)	0.030

达水平(图 3J)。

3 讨论

本研究发现,HSPA5 高表达是 HCC 患者预后的独立危险因素,与既往研究结果一致,如 Cui 等^[22]发现 HSPA5 在 HCC 癌组织中的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著高于正常组织,且其高表达与患者不良预后密切相关。本研究利用 HCC 组织芯片进行验证,发现 HSPA5 蛋白在 HCC 癌组织中的表达水平高于癌旁正常肝组织及远端正常肝组织,且癌旁正常肝组织的表达水平亦高于远端正常肝组织,提示 HSPA5 的异常高表达可能发生于 HCC 癌变的早期阶段,甚至在癌前病变阶段即已出现表达上调,具有作为 HCC 早期诊断潜在生物标志物的价值。这一结果与人类蛋白质图谱(human protein atlas, HPA)数据库中 HSPA5 在 HCC 癌组

织中呈中至强阳性染色,而正常肝组织无明显染色的特征高度吻合^[22],佐证了本研究结果的可靠性。此外,GSE14520-HCC 数据集的分析结果显示,HSPA5 在高转移风险 HCC 患者的肿瘤组织中的表达水平高于低转移风险患者,提示其可能与 HCC 的转移潜能密切相关。在 Huh7 细胞中敲减 HSPA5 后,Huh7 细胞的侵袭、克隆形成及增殖能力均受到抑制,也显示 HSPA5 可促进 HCC 细胞的转移与增殖等表型行为。

机制上,HSPA5 富集于多种信号通路,其中的 PPAR 信号通路尤为值得关注,该信号通路是调控脂质代谢、炎症反应及细胞能量稳态的关键枢纽。PPAR γ 可促进 HCC 细胞的脂肪酸生物合成相关基因(如 ATP-柠檬酸裂解酶、乙酰辅酶 A 羧化酶等)的转录,以及油酸等脂肪酸的从头合成。油酸通过增强巨噬细胞的脂肪酸氧化,促进 M2 型巨

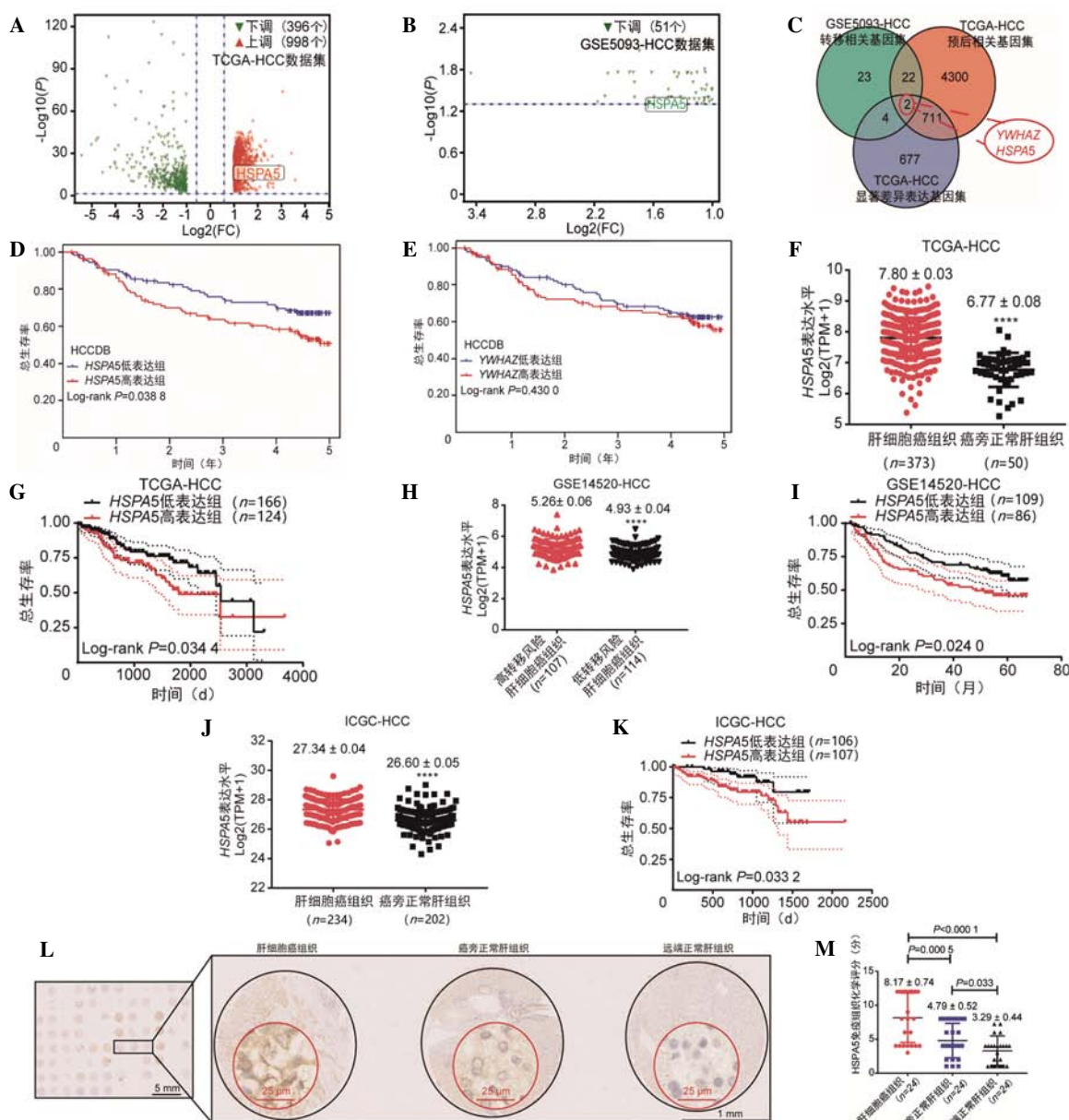


图1 *HSPA5* 在肝细胞癌组织中的表达水平及其对肝细胞癌患者预后的影响

注:A,TCGA-HCC 数据集中 HCC 癌组织与癌旁正常肝组织间的差异表达基因;B,GSE5093-HCC 数据集中与 HCC 转移相关的基因;C,差异表达基因、预后相关基因、转移相关基因的交集分析;D,HCCDB 中 *HSPA5* 表达水平对预后的影响;E,HCCDB 中 *YWHAZ* 表达水平对预后的影响;F,TCGA-HCC 数据集中 HCC 癌组织与癌旁正常肝组织间的 *HSPA5* 表达水平差异;G,TCGA-HCC 数据集中 *HSPA5* 表达水平对预后的影响;H,GSE14520-HCC 数据集中高转移风险 HCC 癌组织与低转移风险 HCC 癌组织间的 *HSPA5* 表达水平差异;I,GSE14520-HCC 数据集中 *HSPA5* 表达水平对预后的影响;J,ICGC-HCC 数据集中 HCC 癌组织与癌旁正常肝组织间的 *HSPA5* 表达水平差异;K,ICGC-HCC 数据集中 *HSPA5* 表达水平对预后的影响;L,*HSPA5* 蛋白在 HCC 癌组织、癌旁正常肝组织、远端正常肝组织中的免疫组织化学染色代表图;M,*HSPA5* 蛋白在 HCC 癌组织、癌旁正常肝组织、远端正常肝组织中的免疫组织化学评分。HCC,肝细胞癌。**** $P<0.0001$ 。

噬细胞极化,形成抑制性免疫微环境并介导 HCC 进展^[23]。PPAR γ 蛋白表达水平升高及其在细胞核内积聚可增加 M2 型巨噬细胞浸润水平从而促进 HCC 细胞的增殖及侵袭能力^[24]。此外,PPAR γ 异常上调也会导致有氧糖酵解和脂肪生成从而促

进 HCC 的发生发展^[25-26]。本研究结果证实,敲减 *HSPA5* 可下调 PPAR γ 表达,从而可能进一步抑制了 Huh7 细胞的肿瘤表型行为。

此外,胆汁分泌和初级胆汁酸生物合成通路的异常也与 HCC 的发生发展密切相关^[27]。如甘氨

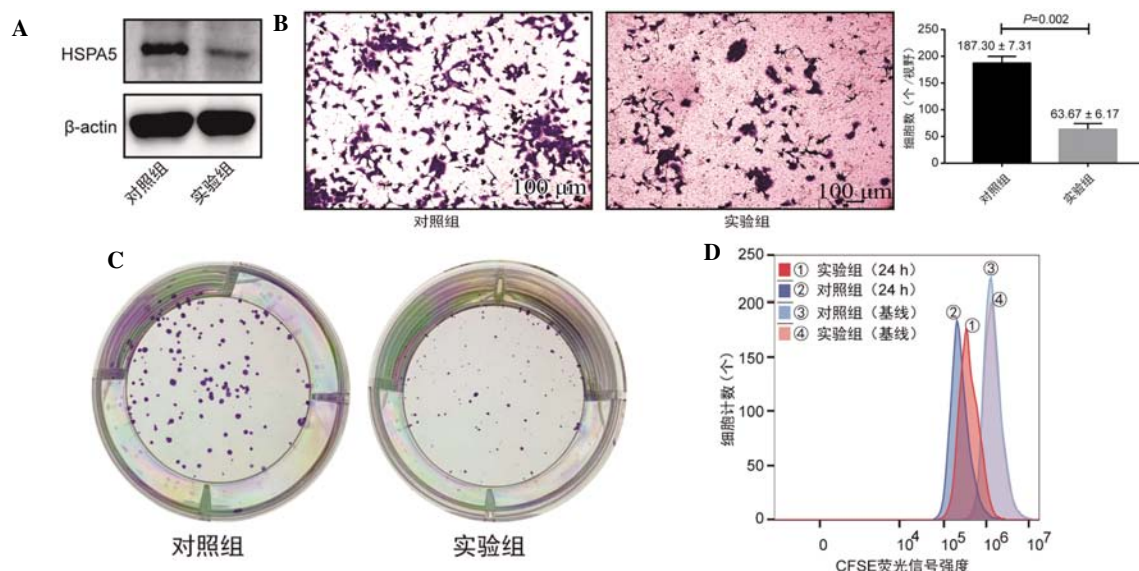


图 2 敲减 HSPA5 可抑制 Huh7 细胞的恶性生物学行为

注:A, siRNA-HSPA5 可显著下调 Huh7 细胞中的 HSPA5 蛋白表达水平;B, Transwell 细胞侵袭实验的结晶紫染色图及其定量结果;C, 克隆形成实验(结晶紫染色);D, CFSE 细胞增殖实验。

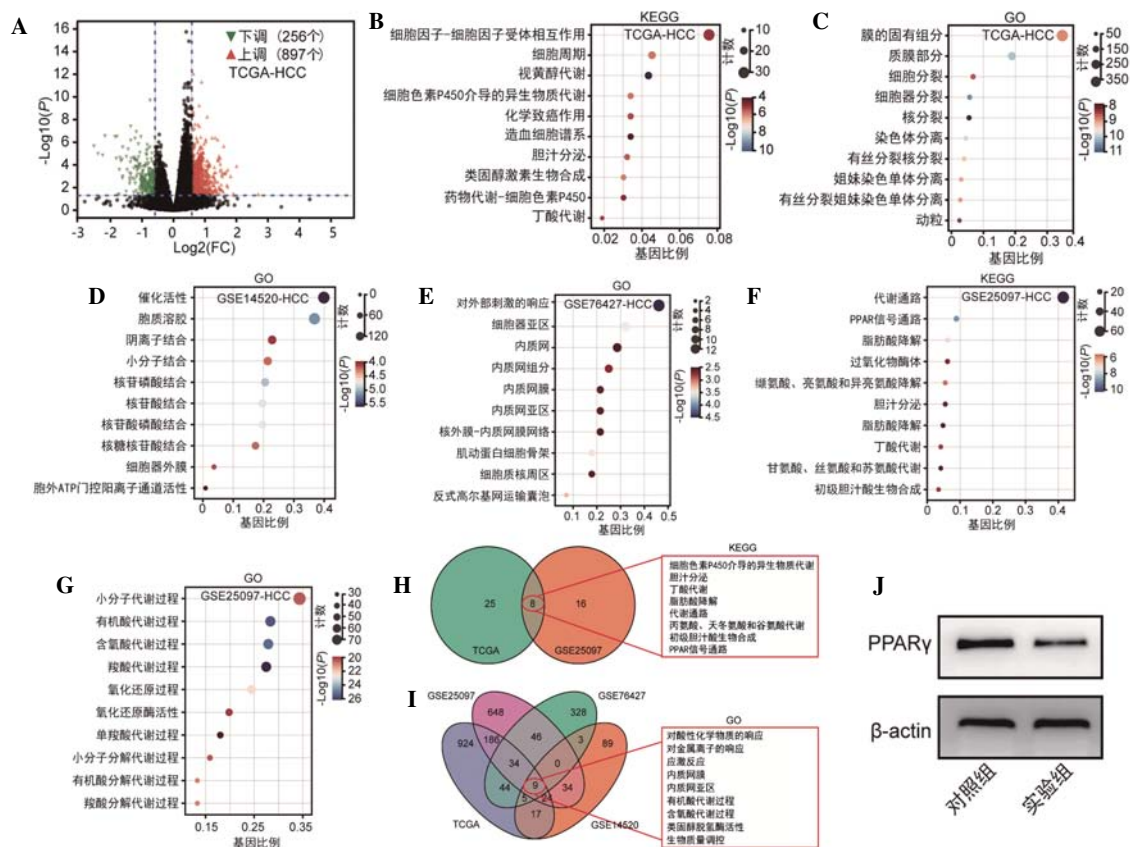


图 3 HSPA5 调控多种通路参与 HCC 的进程

注:A,TCGA-HCC 数据集中,*HSPA5* 高低表达组间的差异表达基因;B,TCGA-HCC 数据集中,差异表达基因富集的 KEGG 通路;C,TCGA-HCC 数据集中,差异表达基因富集的 GO 条目;D,GSE14520-HCC 数据集中,差异表达基因富集的 GO 条目;E,GSE76427-HCC 数据集中,差异表达基因富集的 GO 条目;F,GSE25097-HCC 数据集中,差异表达基因富集的 KEGG 通路;G,GSE25097-HCC 数据集中,差异表达基因富集的 GO 条目;H,TCGA-HCC 与 GSE25097-HCC 数据集共同富集的 KEGG 通路;I,TCGA-HCC、GSE14520-HCC、GSE76427-HCC、GSE25097-HCC 数据集共同富集的 GO 条目;J,Huh7 细胞中,敲减 *HSPA5* 可下调 PPAR γ 的蛋白表达水平。

胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、脱氧胆酸可诱导活性氧累积从而诱发 HCC^[28];牛磺石胆酸诱发的胆汁淤积可介导肝细胞持续的 DNA 损伤及慢性炎症,并诱发 HCC^[29]。细胞色素 P450 介导的异生物质代谢通路异常可导致外源性毒物和内源性代谢产物的蓄积,进而诱导肝细胞损伤和癌变^[27]。此外,脂肪酸降解以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等通路均属于细胞代谢相关通路,这些通路的异常激活是肿瘤代谢重编程的重要特征^[30]。HSPA5 同时也富集于内质网膜、内质网亚区、应激反应等过程,这与 HSPA5 主要定位于内质网腔的生物学特征相符^[31],而持续的内质网应激可介导营养枯竭与乳酸积累,并限制 CD8⁺T 细胞功能,形成免疫抑制微环境并推动 HCC 的发生。

综上所述,HSPA5 高表达是 HCC 患者预后的独立危险因素,敲减 HSPA5 或可通过抑制 PPAR γ 通路从而抑制 HCC 细胞的增殖及侵袭能力。HSPA5 可能可以作为预测 HCC 预后的标志物和潜在治疗靶点,在后续研究中需进一步深入探讨其潜在的分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 温杰、施艺、王志慧,负责实验设计、实验操作、数据收集和初步分析,并撰写论文的大部分内容;牛绍清,参与实验设计和数据分析,并撰写论文的部分章节;温杰、施艺、王志慧、牛绍清,负责数据的最终分析和论文的校对工作

人工智能使用声明 本文未使用任何人工智能相关工具对文字及图表进行处理

参考文献

- [1] Das J, Barman B, Sarma P, et al. Signalling pathways in hepatocellular carcinoma (HCC) metastasis and invasion: Molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. Biochem Biophys Rep, 2026, 45: 102403.
- [2] Zhang Qianqian, Miao Yingshuang, Hu Junyi, et al. The truncated AXIN1 isoform promotes hepatocellular carcinoma metastasis through SRSF9-mediated exon 9 skipping[J]. Mol Cell Biochem, 2025, 480 (4): 2247–2263.
- [3] Wang Hang, Huang Jiaxin, Zhang Wei, et al. Prognostic factors in patients with first diagnosis of hepatocellular carcinoma presenting with pulmonary metastasis and construction of a clinical prediction model [J]. Updates Surg, 2024, 76(1): 71–85.
- [4] Tian Haoyu, Wang Peng, Shao Haiho. Natural bioactive compounds targeting the Wnt/ β -catenin pathway for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatocell Carcinoma, 2025, 12: 1613–1622.
- [5] Ghorbani Vanan A, Nami M T, Ghorbaninezhad F, et al. Macrophage polarization in hepatocellular carcinoma: a lncRNA-centric perspective on tumor progression and metastasis[J]. Clin Exp Med, 2025, 25 (1): 173.
- [6] Ezhilarasan D, Najimi M. Deciphering the possible reciprocal loop between hepatic stellate cells and cancer cells in the tumor microenvironment of the liver[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2023, 182: 103902.
- [7] Song Wang, Rahimian N, Hasanzade Bashkandi A. GRP78: A new promising candidate in colorectal cancer pathogenesis and therapy [J]. Eur J Pharmacol, 2025, 995: 177308.
- [8] Deng Chao, Gong Siming, Lin Lizhen, et al. A human pan-cancer system analysis of heat shock protein family A member 5[J]. Am J Cancer Res, 2023, 13 (5): 1698–1717.
- [9] Wilson C A M, Alfaro-Valdes H M, Kaplan M, et al. Mechanical effect of protein glycosylation on BiP-mediated post-translational translocation and folding in the endoplasmic reticulum [J]. Biophys Rev, 2025, 17 (2): 435–447.
- [10] Rashid T A, Farhan S R, Khalaf A A, et al. Navigating cellular stress: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in the molecular pathogenesis of preeclampsia [J]. Cell Biochem Biophys, 2025, 83 (4): 4181–4199.
- [11] Fernandez P M, Tabbara S O, Jacobs L K, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions [J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 59 (1): 15–26.
- [12] Su Rongjian, Li Zhen, Li Hongdan, et al. GRP78 promotes the invasion of hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 20.
- [13] Zhang Jun, Jiang Yixing, Jia Zhiliang, et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2006, 23 (7–8): 401–410.
- [14] Pyrko P, Schöenthal A H, Hofman F M, et al. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant

- gliomas[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(20): 9809–9816.
- [15] Daneshmand S, Quek M L, Lin E, et al. Glucose – regulated protein GRP78 is up –regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival[J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(10): 1547–1552.
- [16] Thakur P C, Miller –Ocuin J L, Nguyen K, et al. Inhibition of endoplasmic –reticulum –stress –mediated autophagy enhances the effectiveness of chemotherapeutics on pancreatic cancer [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 190.
- [17] Xia Shengkai, Duan Wenze, Liu Wenwen, et al. GRP78 in lung cancer[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 118.
- [18] Schneider M, Winkler K, Kell R, et al. The chaperone protein GRP78 promotes survival and migration of head and neck cancer after direct radiation exposure and extracellular vesicle–transfer[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 842418.
- [19] Zhu Xiaolin, Zhang Yiping, Luo Qingyu, et al. The deubiquitinase USP11 promotes ovarian cancer chemoresistance by stabilizing BIP [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 264.
- [20] Ermakova S P, Kang B S, Choi B Y, et al. (–) – Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide–induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose–regulated protein 78[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(18): 9260–9269.
- [21] La Xiaoqin, Zhang Lichao, Li Zhuoyu, et al. (–) – Epigallocatechin gallate (EGCG) enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to 5 –FU by inhibiting GRP78/NF – κ B/miR –155 –5p/MDR1 pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(9): 2510–2518.
- [22] 崔兵, 许铖铖, 徐媛, 等. 铁死亡相关基因热休克蛋白 A5 与肝细胞癌因果关系的孟德尔随机化和中介分析[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2024, 53(6): 691–698.
- [23] Cao Jing, Chen Kui, Hu Kuan, et al. USP2 –mediated PPAR γ stabilization promotes hepatocellular carcinoma progression and M2 macrophage polarization via oleic acid[J]. *J Immunother Cancer*, 2025, 13(11): e012721.
- [24] Hu Meng, Zhang Nan, Wang Yaqi, et al. GNPAT promotes immunosuppression in hepatocellular carcinoma by activating the plasmalogen–PPAR γ pathway to drive M2 macrophage polarization [J]. *Front Immunol*, 2026, 17: 1765930.
- [25] Patitucci C, Couchy G, Bagattin A, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 α suppresses steatosis –associated liver cancer by inhibiting PPAR γ transcription [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(5): 1873–1888.
- [26] Li Xiao, Zhao Qi, Qi Jianni, et al. lncRNA Ftx promotes aerobic glycolysis and tumor progression through the PPAR γ pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(2): 551–566.
- [27] Xue Mengmeng, Yu Wei, Zhang Kuizhi, et al. GCDCA promotes hepatocellular carcinoma progression through S1PR2/PI3K/AKT –mediated polarization of M2 –type macrophages[J]. *Front Immunol*, 2026, 17: 1640450.
- [28] Fang Youwen, Han S I, Mitchell C, et al. Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2004, 40(4): 961–971.
- [29] Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, et al. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C –dependent mechanisms in cholestatic rat liver [J]. *Hepatology*, 2001, 33(5): 1206–1216.
- [30] Ward P S, Thompson C B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 297–308.
- [31] Chen Jian, Zhu Tieming, Deng Yaping, et al. Activation of HSPA5 contributes to pazopanib –induced hepatotoxicity through L –ornithine metabolism pathway and endoplasmic reticulum stress [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2025, 77(4): 564–581.

收稿日期:2026–03–26