

基于 GEO 芯片数据筛选铁死亡参与肝细胞癌的核心基因及中药治疗预测*

冯 逢¹, 林 镛¹, 彭子明¹, 班少群¹, 苏会吉¹, 毛德文², 韦艾凌², 龙富立^{1,2Δ}

1 广西中医药大学研究生院, 广西 南宁 530001; 2 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023

[摘要] 目的: 基于生物信息学筛选铁死亡参与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的核心基因, 并预测潜在干预中药。方法: 利用基因表达汇编(gene expression omnibus, GEO)数据库下载 GSE39791 芯片数据筛选 HCC 差异表达基因, 对差异上调、下调基因分别进行富集分析; 通过铁死亡数据库(ferroptosis database, FerrDb)检索铁死亡相关基因, 绘制 HCC 差异基因与铁死亡相关基因的韦恩图, 取交集基因。下载肝细胞癌 GSE57957 芯片数据验证交集基因的差异表达; 借助 Coremine 数据库预测干预交集基因的潜在中药, 筛选出可能通过调控铁死亡干预 HCC 的中药。结果: 共获得 301 个差异表达基因, 其中上调基因 45 个, 下调基因 256 个; 获得 259 个铁死亡相关基因; 与铁死亡相关的 HCC 差异表达基因共 10 个, 分别是 AKR1C3、HSPB1、MT1G、HAMP、CXCL2、GABARAPL1、NNMT、GPT2、CBS、HBA1; 预测得到乳香、合欢花、红参等 46 味中药。结论: 基于生物信息学筛选可能参与铁死亡以干预 HCC 的中药, 为临床用药及基础研究提供了新思路。

[关键词] 肝细胞癌; GEO 数据库; 铁死亡; 生物信息学; 中药

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2026)03-0078-06

Screening of Core Genes Involved in Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma Based on GEO Microarray Data and Prediction of TCM Treatment

FENG Feng¹, LIN Yong¹, PENG Ziming¹, BAN Shaoqun¹, SU Huiji¹, MAO Dewen², WEI Ailing², LONG Fuli^{1,2Δ}

1 Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2 The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China

Abstract Objective: To screen the core genes involved in ferroptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) based on bioinformatics, and to predict the potential TCM interventions. Methods: GSE39791 microarray dataset was downloaded from GEO database to screen for differentially expressed genes in HCC, to conduct enrichment analysis of up-regulated and down-regulated genes respectively; ferroptosis related genes were retrieved from FerrDb, and to draw the Venn diagram of HCC differential genes and ferroptosis-related genes, and to obtain the intersecting genes. HCC GSE57957 microarray dataset for HCC was downloaded to validate the differential expression of the intersecting genes; the potential TCM that intervene in intersecting genes was predicted via the Coremine database, and the herbs that may intervene in HCC by regulating ferroptosis were screened out. Results: The study identified 301 differentially expressed genes, among them, there were 45 up-regulated genes and 256 down-regulated genes; 259 ferroptosis-related genes were gained; ten HCC differentially expressed genes related to ferroptosis contained AKR1C3, HSPB1, and MT1G, HAMP, CXCL2, GABARAPL1, NNMT, GPT2, CBS and HBA1 respectively; and the study gained 46 herbs covering *Ruxiang* (Olibanum), *Hehuanhua* (Alibiziae flos), *Hongshen* (Ginseng radix et rhizoma rubra) and others. Conclusion: Identifying TCM that may intervene in HCC by regulating ferroptosis based on bioinformatics screening produces new thinking for clinical drug use and basic medical research.

Keywords hepatocellular carcinoma; GEO database; ferroptosis; bioinformatics; TCM

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,也是全球主要的癌症相关死亡原因^[1-2]。流行病学资料显示, HCC 的发病原因与乙型肝炎、丙型肝炎、饮酒、非酒精性脂肪性肝炎和肥胖等密切相关^[3-4]。在过去的几十年里,随着医疗技术的发展,治疗 HCC 的方法不断

改进。干预手段不仅适用于早期 HCC,也适用于晚期 HCC。值得注意的是,用于监测 HCC 的生物标志物在临床上没有明显改进。另一方面,出于预后和治疗反馈的目的,生物标志物可能具有临床作用。基于生物标志物为每种治疗方式选择合适的候选药物,这在临床决策过程中具有很强的适

用性。到目前为止,仍然需要特定的生物标志物来改善早期或非常早期阶段的HCC检测和治疗反馈。铁死亡(ferroptosis)是近年来新发现的一种程序性细胞死亡方式,其主要病理特征是脂质活性氧(reactive oxygen species,ROS)和铁离子的积聚导致线粒体体积变小、双层膜更致密、嵴减少及外膜破裂^[5-6]。同样地,研究表明铁死亡诱导剂作用于谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4),导致细胞抗氧化能力降低、ROS堆积,最终引起细胞氧化性死亡^[7]。这表明ROS堆积是铁死亡的基本特征。研究发现,经历铁死亡的癌细胞可能会释放氧化介质等信号因子影响抗肿瘤免疫^[8]。此外,还有研究表明免疫细胞CD8⁺T通过调控SLC3A2、SLC7A11基因的表达促进铁死亡,并且铁死亡的诱导有助于免疫疗法的抗肿瘤作用,这表明铁死亡可以参与机体的免疫系统干预肿瘤细胞的进展^[9]。总而言之,细胞的铁死亡与肝细胞癌发展密切相关。因此,借助生物信息学分析HCC参与铁死亡的基因,有助于筛选HCC的生物标志物。生物信息学是综合计算机科学、信息技术及数学的理论和方法来研究生物信息的交叉学科。本研究利用生物信息学工具,对肝细胞癌组织和正常肝组织进行基因表达分析,初步筛选得到与铁死亡相关的差异表达基因,并对相关中药进行预测,旨在为探索治疗HCC新策略提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据库与软件 GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>);Coremine数据库(<http://www.coremine.com/>);FerrDb数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/>);Cytoscape软件;R语言;Perl语言。

1.2 肝细胞癌差异表达基因的筛选 以“肝细胞癌”的英文“hepatocellular carcinoma”为关键词在GEO数据库中检索,筛选后下载编号为GSE39791的芯片数据。该芯片数据包含72例肝细胞癌组织样本和72例正常肝组织样本。以正常样本和肿瘤样本差异基因倍数的绝对值 ≥ 1 且 $P < 0.05$ 为筛选条件,分析芯片数据的差异基因。

1.3 差异基因的富集分析 运用R语言对“1.2”项筛选得到的HCC差异表达基因进行基因本体(gene ontology,GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集分析。根据 P 值选取排名前20的富集条目进行分析,若条目不足20条,则对所有条目进行分析。

1.4 铁死亡相关基因筛选 在铁死亡数据库(FerrDb)中下载铁死亡相关基因,包含促进铁死亡基因、抑制铁死亡基因及铁死亡标志基因。

1.5 HCC与铁死亡的交集基因 取“1.2”项得到的HCC差异表达基因与“1.4”项得到的铁死亡相关基因的重叠部分,得到交集基因,并绘制韦恩图。

1.6 交集基因的表达验证 同样以“Hepato-cellular carcinoma”为关键词在GEO数据库中检索,下载编号为GSE57957的芯片数据。该芯片数据包含39例肝细胞癌组织样本和39例正常肝组织样本。将“1.5”项得到的交集基因映射到GSE57957芯片的基因表达数据中,验证其是否同样具有差异性表达。

1.7 中药治疗预测 将经过验证的交集基因导入Coremine数据库,设置 $P < 0.05$ 为阈值,筛选出具有调控细胞铁死亡、防治HCC潜在作用的中药。

2 结果

2.1 肝细胞癌差异表达基因的筛选 利用R语言对GSE39791芯片数据进行整理,将筛选条件设置为 $|\log_2(FC)| \geq 1$ 且 $P < 0.05$,对正常肝组织和肝细胞癌组织的基因表达进行分析,共获得差异表达基因301个,其中在肝细胞癌组织中上调基因45个,下调基因256个,见图1(图中每1列表示1个样本,G2表示正常肝组织样本,G1表示肝细胞癌组织样本;每1行表示1个基因在不同样本的差异,红色表示上调,蓝色表示下调,灰色表示无明显差异)。

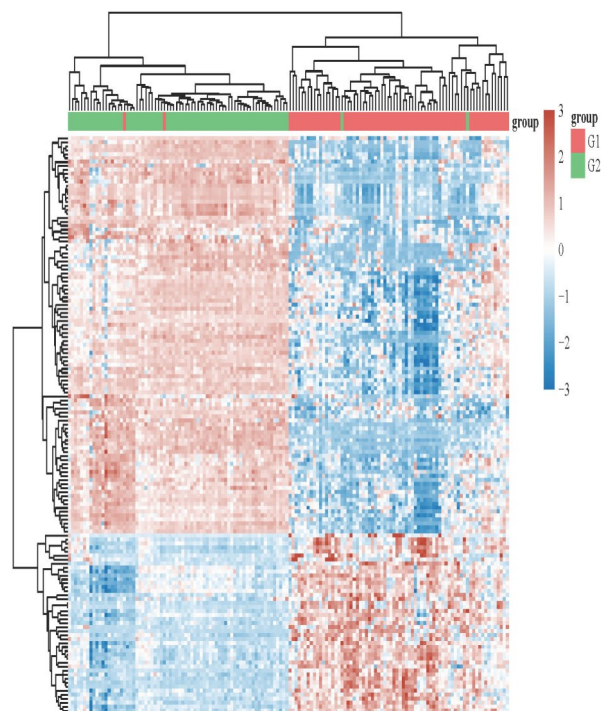


图1 肝细胞癌差异表达基因热图

同时,绘制火山图对差异表达倍数较大的基因进一步可视化,见图2(横坐标表示 $\log_2(FC)$,纵坐标表示 $-\log_{10}(P)$ 值,圆圈表示基因,蓝色圆圈表示在肝细胞癌组织中下调的基因,红色圆圈表示在肝细胞癌组织中上调的基因,灰色圆圈表示在肝细胞癌组织和正常肝组织中无明显差异的基因)。

2.2 肝细胞癌差异表达基因的富集分析 运用R语言对肝细胞癌差异表达上调基因、下调基因分别进行富集分析,设置 $P < 0.05$,根据 P 值选取排名前20的富集条目进行分析。结果见图3。

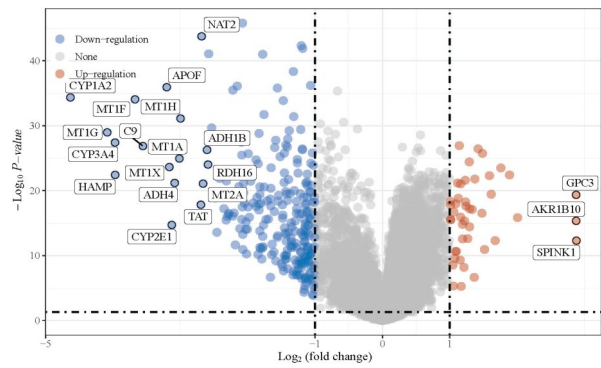


图2 肝细胞癌差异表达基因火山图

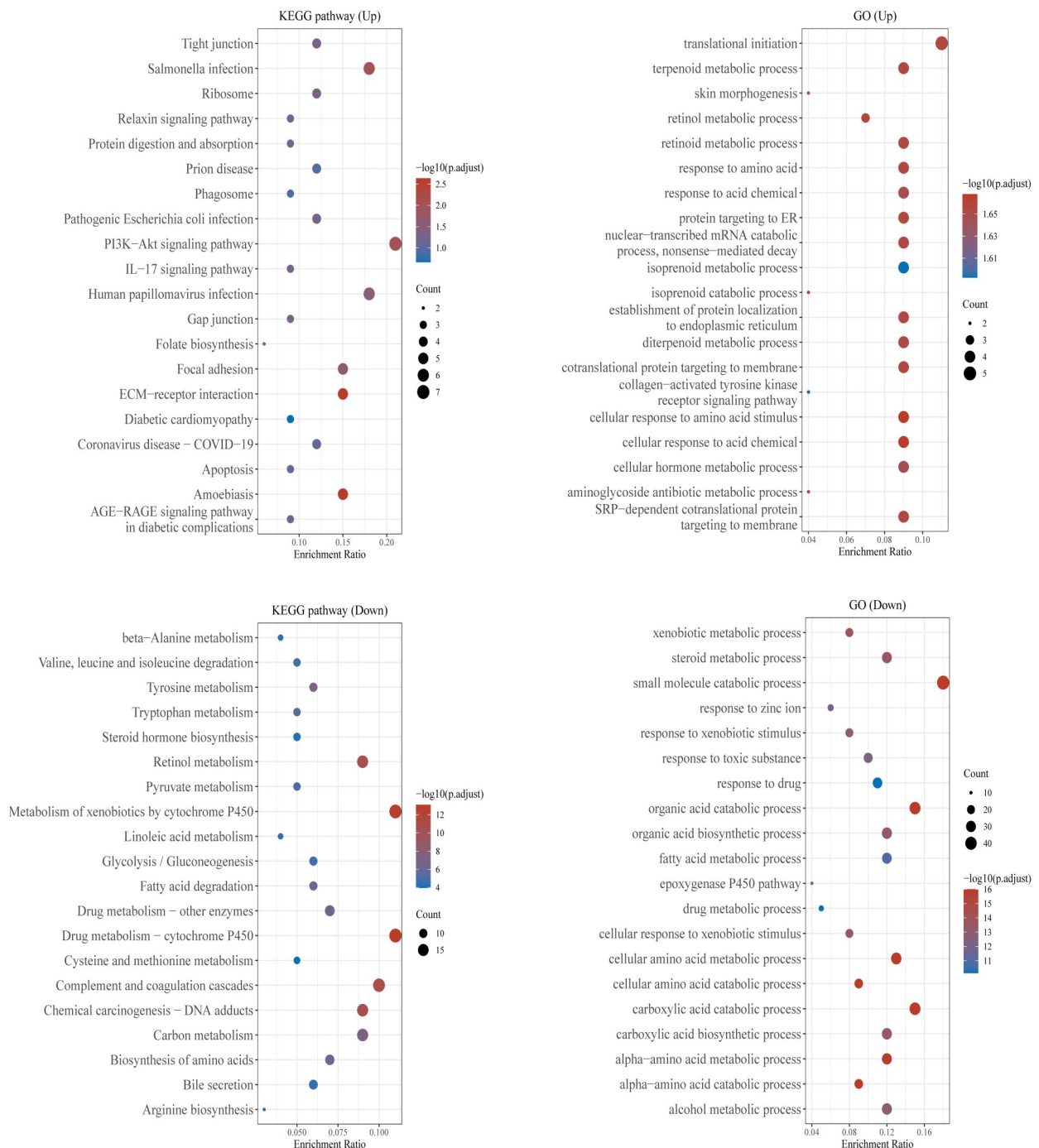


图3 肝细胞癌差异表达基因的富集分析

2.3 铁死亡相关基因 经检索获得促进铁死亡基因108个、抑制铁死亡基因69个、铁死亡标志基因111个。将所有铁死亡相关基因删除重复后共获得259个,见图4。

2.4 HCC与铁死亡的交集基因 将筛选得到的301个HCC差异表达基因与259个铁死亡相关基因进行映射,得到10个交集基因,见图5。

2.5 交集基因的表达验证 从GEO数据库下载GSE57957芯片的基因表达数据及探针文件,将“2.4”项筛选得到的10个交集基因进行映射,得到交集基因在GSE57957芯片中的表达情况,见图6。

由图可知,从GSE39791芯片筛选得到的10个与铁死亡相关的基因,在GSE57957芯片的基因表达中同样具有差异性,这说明了本研究结果具有一定的可靠性。

2.6 中药治疗预测 中药治疗预测设置 $P < 0.05$ 为筛选标准,通过Coremine数据库预测具有潜在调控细胞铁死亡、治疗HCC作用的中药。除NNMT基因外,其余9个基因均可映射出相关干预中药。删除重复项后,共得到46味中药。将基因与中药

的对应关系导入Cytoscape软件进行可视化分析,见图7。

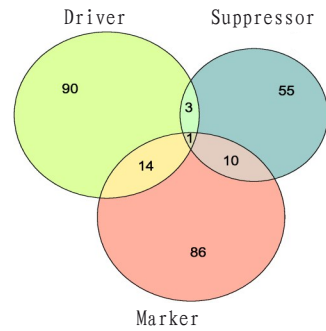


图4 铁死亡相关基因的交集韦恩图

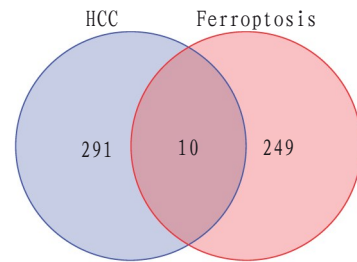


图5 肝细胞癌差异表达基因与铁死亡相关基因的交集韦恩图

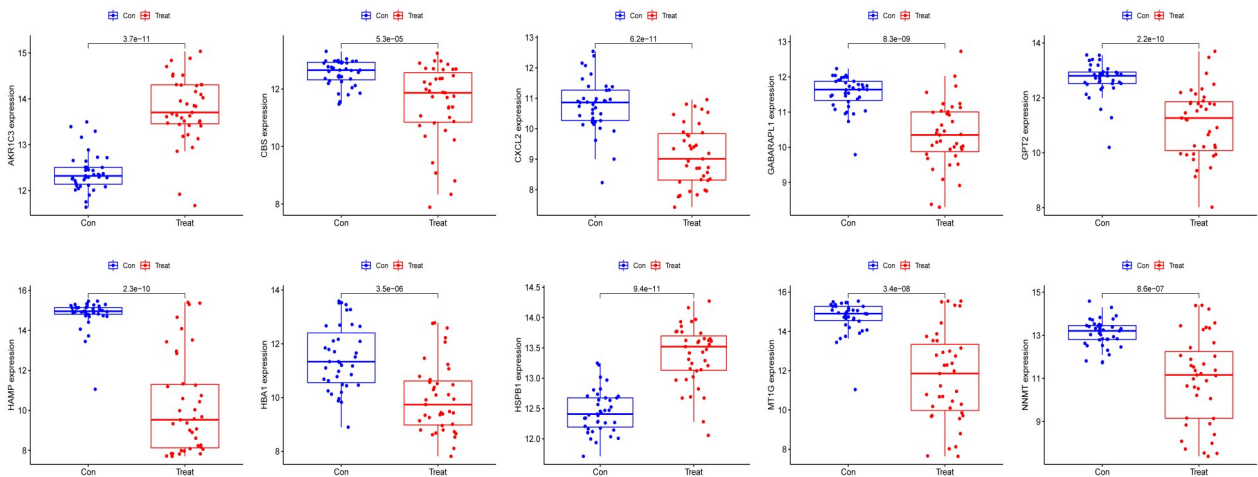


图6 交集基因的表达情况

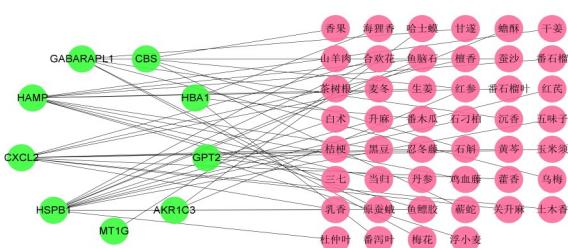


图7 中药治疗预测

该网络中乳香、合欢花、红参等中药的度值(degree)较高,提示其与调控细胞铁死亡、防治HCC的关系最为密切。

3 讨论

铁死亡是在研究小分子Erastin杀死含有致

癌基因RAS突变的肿瘤细胞的作用机制时被发现。2012年,在携带RAS突变基因的HT-1080纤维肉瘤细胞模型中,发现Erastin不仅能通过调节线粒体电压依赖性阴离子通道发挥抗肿瘤作用,同时减少胞内谷胱甘肽合成的基本原材料,导致铁依赖性脂质ROS的累积增加,从而破坏了细胞内氧化还原平衡,最终形成依赖于铁离子的氧化性死亡^[10]。从铁死亡的相关定义和发生过程来看,铁和脂质活性氧是介导铁死亡的关键因素。研究表明,在肝细胞癌患者中观察到异常的铁吸收情况;另一方面,肝细胞癌患者的脂质代谢同样也发生紊乱^[11]。

本研究通过对GSE39791芯片数据分析72例肝细胞癌组织和72例正常肝组织的差异表达基因,共获得差异表达基因301个,其中上调基因45个,下调基因256个。在上调的45个基因中,主要涉及PI3K-AKT信号通路、人乳头瘤病毒感染等信号通路和翻译起始、核苷酸代谢过程等生物学功能;在下调的256个基因中,主要涉及细胞色素P450对外源性物质的代谢、药物代谢-细胞色素P450等信号通路和小分子分解代谢过程、羧酸分解代谢过程等生物学功能。在铁死亡数据库中检索促进铁死亡基因、抑制铁死亡基因及铁死亡标志基因,获得259个铁死亡相关基因;与铁死亡相关的HCC差异表达基因共10个,分别是AKR1C3、HSPB1、MT1G、HAMP、CXCL2、GABARAPL1、NNMT、GPT2、CBS、HBA1。AKR1C3是一种属于醛酮还原酶家族的酶,其成员催化参与生物合成、中间代谢和解毒的氧化还原转化^[12]。AKR1C3通过激活NF- κ B信号释放促炎因子,促进STAT3的磷酸化并增加肿瘤细胞的增殖和侵袭;同时,STAT3还直接结合AKR1C3启动子并增加AKR1C3的转录,从而建立正调节反馈回路^[13-14]。热休克蛋白 β_1 (heat shock protein beta-1, HSPB1)也称为人HSP27或小鼠HSP25。一项研究表明,HSPB1可以作为新型抗癌疗法的靶点^[15]。MT1G是一种低分子量蛋白质,对锌离子具有高亲和力^[16]。MT1G通过抑制其泛素化因子MDM2的表达,从而提高p53的稳定性;同时,MT1G还可以通过与p53直接相互作用并为p53提供适当的锌离子,从而增强p53的转录活性^[17]。MT1G对p53的调节,导致下游因子p21和Bax的上调,导致细胞周期停滞和细胞凋亡^[18-19]。CXCL2是一种趋化因子配体,可以诱导各种细胞迁移,包括免疫细胞、上皮细胞和癌细胞。因此,CXCL2是肿瘤免疫、血管生成、影响疾病进展和治疗反应的重要调节剂^[20]。骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是一类未成熟的免疫细胞。MDSCs通过诱导Tregs的分化和扩增,抑制DCs、NK细胞和T细胞活性促进肿瘤细胞逃逸免疫^[21-23]。研究表明,CXCL2抑制MDSCs的产生,从而加强对CD8⁺T细胞、NK细胞、DC和Th1细胞等的免疫监视来改善HCC患者的预后^[24-25]。

借助Coremine数据库筛选干预AKR1C3、HSPB1、MT1G、HAMP等10个基因的中药,结果得到乳香、合欢花、红参等46味中药,这为临床用药提供了参考。乳香是一种含挥发油的胶质树脂,性辛、温,味苦,归心、肝、脾经,具有活血止痛、消肿生肌功效。由于乳香具有活血止痛功效,因而常被用于

肿瘤晚期的疼痛患者,在此过程中发现乳香及其提取成分有抗肿瘤作用。乳香的抗肿瘤作用在多种人肿瘤细胞系中得到证实,如脑膜瘤细胞^[26]、肝癌细胞^[27]、黑色素瘤^[28]、大肠癌细胞^[29]。红参中提取得到的人参总皂苷能够抑制肿瘤细胞增殖,延长患者存活时间,其所含人参皂苷Rh2、Rg3、Rg5、Rg1、Rh1和Rb1单体均具有较好抗肿瘤活性^[30-35]。合欢花、三七、当归等中药干预HCC的研究相对较少,本研究结果为此方面的研究提供了新思路及依据。

本研究的意义:1)铁死亡是近年来新发现的一种细胞程序性死亡方式,通过生物信息学筛选铁死亡参与HCC的核心基因,为探索HCC新治疗策略提供方向;2)通过Coremine数据库筛选具有调控细胞铁死亡、防治HCC潜在作用的中药,为探索HCC新治疗策略提供选择。

本研究的局限性:1)借助GEO数据库获得差异表达基因,但样本量有限,可能存在基因表达偏倚;2)铁死亡相关基因是基于现已发现的相关基因,可能存在遗漏;3)通过Coremine数据库预测潜在治疗的中药,但部分中药在HCC中缺乏实验研究证实。

参考文献

- [1] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10):589-604.
- [2] AKINYEIJU T, ABERA S, AHMED M, et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level: results from the global burden of disease study 2015[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(12):1683-1691.
- [3] DELLA CORTE C, AGHEMO A, COLOMBO M. Individualized hepatocellular carcinoma risk: the challenges for designing successful chemoprevention strategies[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(9):1359-1371.
- [4] XIE Y, LIU S, ZHAO Y, et al. Precore/core region mutations in hepatitis B virus DNA predict postoperative survival in hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0133393.
- [5] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3):369-379.
- [6] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2):273-285.
- [7] CUI S, CHANG P Y. Current understanding concerning intestinal stem cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(31):7099-7110.
- [8] FRIEDMANN ANGELI J P, KRYSKO D V, CONRAD M. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug

- resistance and immune evasion[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019,19(7):405-414.
- [9] STOCKWELL B R, JIANG X. A physiological function for ferroptosis in tumor suppression by the immune system[J]. *Cell Metab*, 2019,30(1):14-15.
- [10] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012,149(5):1060-1072.
- [11] CHEN J, CHLOUPKOVÁ M. Abnormal iron uptake and liver cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009,8(18):1699-1708.
- [12] EVANS K, DUAN J, PRITCHARD T, et al. OBI-3424, a novel AKR1C3-activated prodrug, exhibits potent efficacy against preclinical models of T-ALL [J]. *Clin Cancer Res*, 2019,25(14):4493-4503.
- [13] ZHOU Q, TIAN W, JIANG Z, et al. A positive feedback loop of AKR1C3-mediated activation of NF- κ B and STAT3 facilitates proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2021,81(5):1361-1374.
- [14] ZHU P, FENG R, LU X, et al. Diagnostic and prognostic values of AKR1C3 and AKR1D1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021,13(3):4138-4156.
- [15] SUN X, OU Z, XIE M, et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death[J]. *Oncogene*, 2015,34(45):5617-5625.
- [16] SATO M, KONDOH M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2002,196(1):9-22.
- [17] WANG Y, WANG G, TAN X, et al. MT1G serves as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by interacting with p53[J]. *Oncogenesis*, 2019,8(12):67.
- [18] ZHANG L, CHEN J, NING D, et al. FBXO22 promotes the development of hepatocellular carcinoma by regulating the ubiquitination and degradation of p21[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019,38(1):101.
- [19] LIN X L, LI K, YANG Z, et al. Dulcitol suppresses proliferation and migration of hepatocellular carcinoma via regulating SIRT1/p53 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2020,66:153112.
- [20] NAGARSHETH N, WICHA M S, ZOU W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017,17(9):559-572.
- [21] LU C, RONG D, ZHANG B, et al. Current perspectives on the immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: challenges and opportunities[J]. *Mol Cancer*, 2019,18(1):130.
- [22] KUMAR V, PATEL S, TCGYANOV E, et al. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment[J]. *Trends Immunol*, 2016,37(3):208-220.
- [23] YANG Y M, KIM S Y, SEKI E. Inflammation and liver cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. *Semin Liver Dis*, 2019,39(1):26-42.
- [24] SHI H, HAN X, SUN Y, et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 and CXCL2 produced by tumor promote the generation of monocytic myeloid-derived suppressor cells[J]. *Cancer Sci*, 2018,109(12):3826-3839.
- [25] XU J, PEI S, WANG Y, et al. Tpl2 protects against fulminant hepatitis through mobilization of myeloid-derived suppressor cells[J]. *Front Immunol*, 2019,10:1980.
- [26] PARK Y S, LEE J H, BONDAR J, et al. Cytotoxic action of acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) on meningioma cells[J]. *Planta Med*, 2002,68(5):397-401.
- [27] LIU J J, NILSSON A, OREDSSON S, et al. Keto- and acetyl-keto-boswellic acids inhibit proliferation and induce apoptosis in Hep G2 cells via a caspase-8 dependent pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2002,10(4):501-505.
- [28] ZHAO W, ENTSCHLADEN F, LIU H, et al. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells[J]. *Cancer Detect Prev*, 2003,27(1):67-75.
- [29] LIU J J, NILSSON A, OREDSSON S, et al. Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells[J]. *Carcinogenesis*, 2002,23(12):2087-2093.
- [30] 李秋影, 颜璐璐, 马晓慧, 等. 20(S)-人参皂苷 Rh2 对人结肠癌细胞增殖和周期的影响[J]. *中成药*, 2011,33(11):1874-1878.
- [31] 孙静, 刘静, 王鑫, 等. 活血化痰类中药治疗动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. *西部中医药*, 2025,38(3):84-89.
- [32] 杨倩, 王灿. 人参皂苷 Rg3 减轻帕金森小鼠神经系统氧化应激损伤的作用机制[J]. *西部中医药*, 2024,37(9):25-29.
- [33] 李晨阳, 张学红. 人参皂苷 Rg3 通过 PI3K/Akt 信号通路抑制大鼠卵巢型子宫内膜异位症血管生成相关因子表达机制研究[J]. *西部中医药*, 2022,35(11):66-72.
- [34] 姜卫卫, 刘嘉. 人参皂苷 Rb1、Rg3、Rh2 抗肿瘤作用与机制概况[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2013,15(7):1634-1637.
- [35] 苏涛, 孙宏晨, 马旭东. 人参皂苷 Rg3 抑制腺样囊性癌细胞 SACC-83 增殖作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011,17(23):195-198.

收稿日期:2025-06-11

*基金项目:国家自然科学基金(81760844);广西自然科学基金(2020GXNSFAA297098);广西中医药大学研究生教育创新计划项目(YCSY2020086)。

作者简介:冯逢(1995—),女,硕士学位,医师。研究方向:中医防治肝病的基础与临床研究。

△通讯作者:龙富立(1981—),男,博士学位,博士研究生导师,主任医师。研究方向:中医防治肝病的基础与临床研究。Email:longfuli005@163.com。