

# 泛素化连接酶TRIM56 在人肝细胞癌中的表达及其与预后 和免疫浸润关系的生物信息学分析

黄海芊<sup>1,2</sup>, 王堃<sup>3</sup> (1. 上海交通大学医学院附属仁济医院 检验科, 上海 200127; 2. 中南大学湘雅医学院 检验医学系, 湖南 长沙 410013; 3. 中南大学湘雅医院 检验科, 湖南 长沙 410008)

**摘要:** **目的** 采用生物信息学方法分析泛素化连接酶TRIM56在人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及其与预后和免疫浸润的关系。**方法** 采用UALCAN和TIMER数据库分析TRIM56在不同肿瘤中的表达。采用UALCAN、TIMER、GEPIA和Human Protein Atlas数据库分析TRIM56在人HCC中的表达。采用Kaplan-Meier Plotter数据库分析不同TRIM56 mRNA表达水平HCC患者的生存情况。采用TIMER数据库和GEPIA数据库对TRIM56的表达与肿瘤纯度及免疫浸润水平的相关性进行分析。采用GeneMANIA数据库筛选与TRIM56相互作用的基因, 并使用DAVID数据库对其进行富集分析。采用STRING数据库筛选与TRIM56相互作用的蛋白质, 并使用UbiBrowser数据库分析TRIM56可能的泛素化底物。**结果** GEPIA数据库和UALCAN数据库分析均表明TRIM56在人HCC组织中的表达水平升高, 其表达水平与肿瘤纯度和免疫细胞的浸润水平有关( $P$ 均 $< 0.05$ )。对于亚洲患者, TRIM56 mRNA高表达者的5年总生存率和无复发生存率均显著高于TRIM56 mRNA低表达者( $HR = 0.43$ ,  $\text{Log-rank } P = 0.029$ ;  $HR = 0.45$ ,  $\text{Log-rank } P = 0.016$ ); 而对于欧美患者, 两者差异均无统计学意义( $HR = 1.37$ ,  $\text{Log-rank } P = 0.22$ ;  $HR = 0.70$ ,  $\text{Log-rank } P = 0.14$ )。基因互作及富集分析表明, TRIM56可能参与核苷酸修复和线粒体自噬等过程, TP53是评分最高的预测泛素化底物(0.867分), 可能与TRIM56参与介导人HCC发生发展的机制相关。**结论** TRIM56可能与HCC的发生发展和免疫浸润有关, 其高表达可能提高亚洲HCC患者的生存率, 为进一步研究TRIM56在HCC中的潜在作用机制奠定了基础。

**关键词:** 生物信息学分析; TRIM56; 肝细胞癌

## Bioinformatics analysis of the expression of ubiquitinated ligase TRIM56 in human hepatocellular carcinoma and its relationship with prognosis and immune infiltration

Huang Haiqian<sup>1,2</sup>, Wang Kun<sup>3</sup> (1. Department of Laboratory Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Xiangya School of Medicine, Central South University, Hunan Changsha 410013, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the expression of ubiquitinated ligase TRIM56 in human hepatocellular carcinoma (HCC) and its relationship with prognosis and immune infiltration by bioinformatics methods. **Methods** The expression of TRIM56 in various tumors were analyzed by UALCAN and TIMER databases. The expression of TRIM56 in human HCC tissues were analyzed by UALCAN, TIMER, GEPIA and Human Protein Atlas databases.

Kaplan Meier Plotter database was used to analyze the survival status of HCC patients with different TRIM56 expression levels. TIMER database and GEPIA database were used to analyze the correlation between the expression of TRIM56 and tumor purity and immune infiltration levels. GeneMANIA database was used to screen genes related with TRIM56 and DAVID database was used to conduct enrichment analysis on them. STRING database was used to screen proteins related with TRIM56 and UbiBrowser database was used to analyze potential ubiquitination substrates of TRIM56. **Results** Both GEPIA and UALCAN database analyses indicated that the expression level of TRIM56 increased in human HCC tissues, and its expression levels were related to tumor purity and immune cell infiltration levels (all  $P < 0.05$ ). For Asian patients, the five-year overall survival rate and recurrence free survival rate of TRIM56 mRNA high expression patients were significantly higher than those of TRIM56 mRNA low expression patients ( $HR = 0.43$ , Log-rank  $P = 0.029$ ;  $HR = 0.45$ , Log-rank  $P = 0.016$ ). For European and American patients, there were no statistically significant differences in five-year overall survival rate or recurrence free survival rate ( $HR = 1.37$ , Log-rank  $P = 0.22$ ;  $HR = 0.70$ , Log-rank  $P = 0.14$ ). Gene interaction and enrichment analysis indicated that TRIM56 may be involved in processes such as nucleotide repair and mitochondrial autophagy. TP53 was the highest rated predicted ubiquitination substrate (0.867 points), which may be related to TRIM56's involvement in mediating the occurrence and development of human HCC. **Conclusions** TRIM56 may be related to the occurrence, development and immune infiltration of HCC, and its high expression may improve the survival rate of Asian HCC patients, which laid the foundation for further research on the potential mechanism of TRIM56 in HCC.

**Keywords:** Bioinformatic analysis; TRIM56; Hepatocellular carcinoma

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是指起源于肝细胞的恶性肿瘤, 起病隐匿, 发展迅速, 严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。目前常用的治疗方法有手术切除、肝移植、射频消融术等, 但仍有部分患者出现复发及转移, 预后并不理想。因此, 对HCC的发生机制进行研究, 寻找早期诊断标志物和免疫治疗新靶点具有重要临床意义。

TRIM56是TRIM (tripartite motif-containing protein) 蛋白家族的成员之一。研究发现, TRIM蛋白N末端的TRIM结构域为其特征性结构域, 使几乎所有的TRIM蛋白表现出泛素连接酶活性<sup>[2,3]</sup>, 介导各种底物和自身泛素化, 参与细胞内的多种生命活动<sup>[4]</sup>。研究发现, TRIM56可通过与干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 相互作用, 募集抗病毒激酶 (the antiviral kinase1, TBK1), 启动 I 型干扰素基因的表达, 对先天免疫应答进行调节<sup>[5]</sup>。此外, 也有研究表明, TRIM56可泛素化核因子 $\kappa$ B抑制蛋白 (inhibitor of nuclear factor kappa-B, I $\kappa$ B $\alpha$ ), 诱导p65磷酸化, 抑制乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 核心启动子活性, 从而在抗病毒防御中发挥作用<sup>[6]</sup>。TRIM56对肿瘤的作用则具有复杂性。TRIM56在部分肿瘤组织中表达上调, 促进肿瘤恶性进展<sup>[7-9]</sup>, 在部分

肿瘤组织中则表达下调, 抑制恶性进展<sup>[10-14]</sup>。由此可见, TRIM56可能参与了多种肿瘤的发生, 具有潜在的肿瘤预测意义和靶向治疗价值, 与HCC也可能具有相关性。因此, 本研究对HCC中TRIM56的表达进行生物信息学分析, 探讨TRIM56与HCC的相关性, 分析其可能的作用机制, 为治疗HCC提供新的可能方向。

## 1 资料与方法

### 1.1 TRIM56表达水平分析

首先对TRIM56的表达情况进行泛癌分析。使用TIMER (Tumor Immune Estimation Resource) 数据库 (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) 和UALCAN (The University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal) 数据库 (<https://ualcan.path.uab.edu/>) 对TRIM56 mRNA在各肿瘤组织中的表达水平进行分析, 使用UALCAN数据库对TRIM56蛋白在各肿瘤组织中的表达水平进行分析, 筛选与正常组织TRIM56表达有差异的肿瘤组织。使用基因表达谱交互分析 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) 数据库和UALCAN数据库对比TRIM56 mRNA在HCC组织与正常组织中表达水平的区别 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), 并利用UALCAN数据库对不同性别、年龄等患者TRIM56的表达进行分析。随后, 使用人

类蛋白质图谱数据库(Human Protein Atlas, HPA) (<https://www.protein.atlas.org/>)对TRIM56表达情况进行免疫组织化学实验验证。

1.2 不同TRIM56表达水平HCC患者的生存分析 Kaplan-Meier Plotter数据库([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com))是一个包含基因表达数据和临床数据的在线数据库,可用于评估不同基因的表达水平对肺癌、卵巢癌等癌症预后的影响。本研究使用Kaplan-Meier Plotter数据库对不同TRIM56表达水平HCC患者的生存情况进行分析,并进一步比较TRIM56表达水平对不同人种HCC患者生存情况的影响。

1.3 TRIM56表达与免疫浸润细胞的相关性分析 TIMER数据库预先计算了B细胞、CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞在32种肿瘤类型中的水平,可全面反映肿瘤免疫相互作用的分子特征<sup>[15]</sup>。本研究使用TIMER数据库对TRIM56的表达与HCC中免疫浸润的丰度及肿瘤纯度的相关性进行分析,并使用TIMER数据库和GEPIA数据库研究了TRIM56与多种免疫细胞标志物的关系。

1.4 与TRIM56相互作用的基因及其富集分析 GeneMANIA数据库(<http://genemania.org>)可根据功能分类、生物化学途径图等对基因数据进行分类并通过图形直观表达,辅助研究人员对大规模数据集进行数据统计<sup>[16]</sup>。本研究利用GeneMANIA数据库对与TRIM56相互作用的基因进行分析,并绘制相互作用基因网络图。随后利用DAVID数据库(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://david.ncifcrf.gov/>)对相关性较高的基因进行富集分析(包括KEGG分析和GO分析)。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用综合分析 STRING数据库(<https://string-db.org/>)可整合蛋白质间所有已知和预测的关联,是专门用于全生物体蛋白质关联网络的在线资源之一<sup>[17]</sup>,本研究利用STRING数据库构建TRIM56蛋白的蛋白质相互作用网络。考虑到TRIM56具有泛素化连接酶活性,通过UbiBrowser数据库(<http://ubibrowser.ncpsb.org.cn>)进一步对TRIM56可能的泛素化底物进行预测,该数据库是一个用于预测人类蛋白质组范围内E3-底物相互作用的集成数据库,可同时预测蛋白质上游E3连接酶和去泛素酶,有助于蛋白质泛素化的研究和复杂疾病药物靶点的开发<sup>[18]</sup>。

1.6 统计学处理 按照所使用的各网站标注的方法进行统计学分析。TRIM56在不同肿瘤组织中的表达分析等两组及多组间的比较均采用非参数检验;采用Cox比例风险回归模型比较不同TRIM56 mRNA表达水平HCC患者的生存曲线;TRIM56表达与免

疫浸润细胞的相关性分析采用Spearman秩相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TRIM56在不同肿瘤组织中的表达 TRIM56 mRNA在乳腺癌、甲状腺癌、子宫内膜癌等肿瘤组织中表达下调,而在食管癌、HCC、胃腺癌等肿瘤组织中表达上调(图1A、1B)。在蛋白质水平上,TRIM56在各肿瘤组织中的表达也呈现出复杂性(图1C)。同时,在mRNA水平表达上调(下调)明显的肿瘤组织( $P < 0.001$ )中TRIM56蛋白质水平也表达上调(下调),具有一致性。

2.2 TRIM56在HCC中的表达 使用GEPIA数据库分析表明,TRIM56 mRNA在HCC组织中表达显著增加( $P < 0.001$ ,图2A),这与使用UALCAN数据库所得结果相符合( $P < 0.001$ ,图2B)。使用UALCAN数据库对不同性别、年龄、人种、美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)分期及分化程度HCC组织中TRIM56 mRNA的表达水平进行分析,结果表明,AJCC 1期HCC患者的TRIM56 mRNA表达水平显著低于3期患者( $P = 0.02$ ),其余差异均无统计学意义,见图3。利用UALCAN数据库对TRIM56蛋白质表达水平进行分析,结果表明,HCC组织中TRIM56蛋白水平表达明显上调( $P = 7.61 \times 10^{-8}$ ),不同性别和年龄HCC患者TRIM56蛋白水平差异均无统计学意义( $P$ 值分别为0.34、0.33),见图4。此外,本研究利用HPA数据库图谱对TRIM56的表达进行了免疫组织化学实验验证,HCC细胞中出现细胞质阳性的TRIM56着色,即HCC组织中存在TRIM56蛋白的高表达,与之前所得结果相一致,见图5。

2.3 不同TRIM56 mRNA表达水平HCC患者的生存分析 使用Kaplan-Meier Plotter数据库分析不同TRIM56 mRNA表达水平HCC患者的5年生存情况,结果表明,不同TRIM56 mRNA表达水平HCC患者的总生存率和无复发生存率无显著差异( $HR = 0.79$ , Log-rank  $P = 0.23$ ;  $HR = 0.77$ , Log-rank  $P = 0.13$ )。对于亚洲患者,TRIM56 mRNA高表达者的总生存率和无复发生存率均显著高于TRIM56 mRNA低表达者( $HR = 0.43$ , Log-rank  $P = 0.029$ ;  $HR = 0.45$ , Log-rank  $P = 0.016$ );而在欧美患者中则未得出如此结果( $HR = 1.37$ , Log-rank  $P = 0.22$ ;  $HR = 0.70$ , Log-rank  $P = 0.14$ )。见图6。

2.4 TRIM56 mRNA表达与免疫浸润细胞的相关性 利用TIMER数据库对TRIM56 mRNA表达与免疫浸润水平的相关性进行分析(图5),采用Spearman秩相关法,结果表明TRIM56的表达与HCC中B细

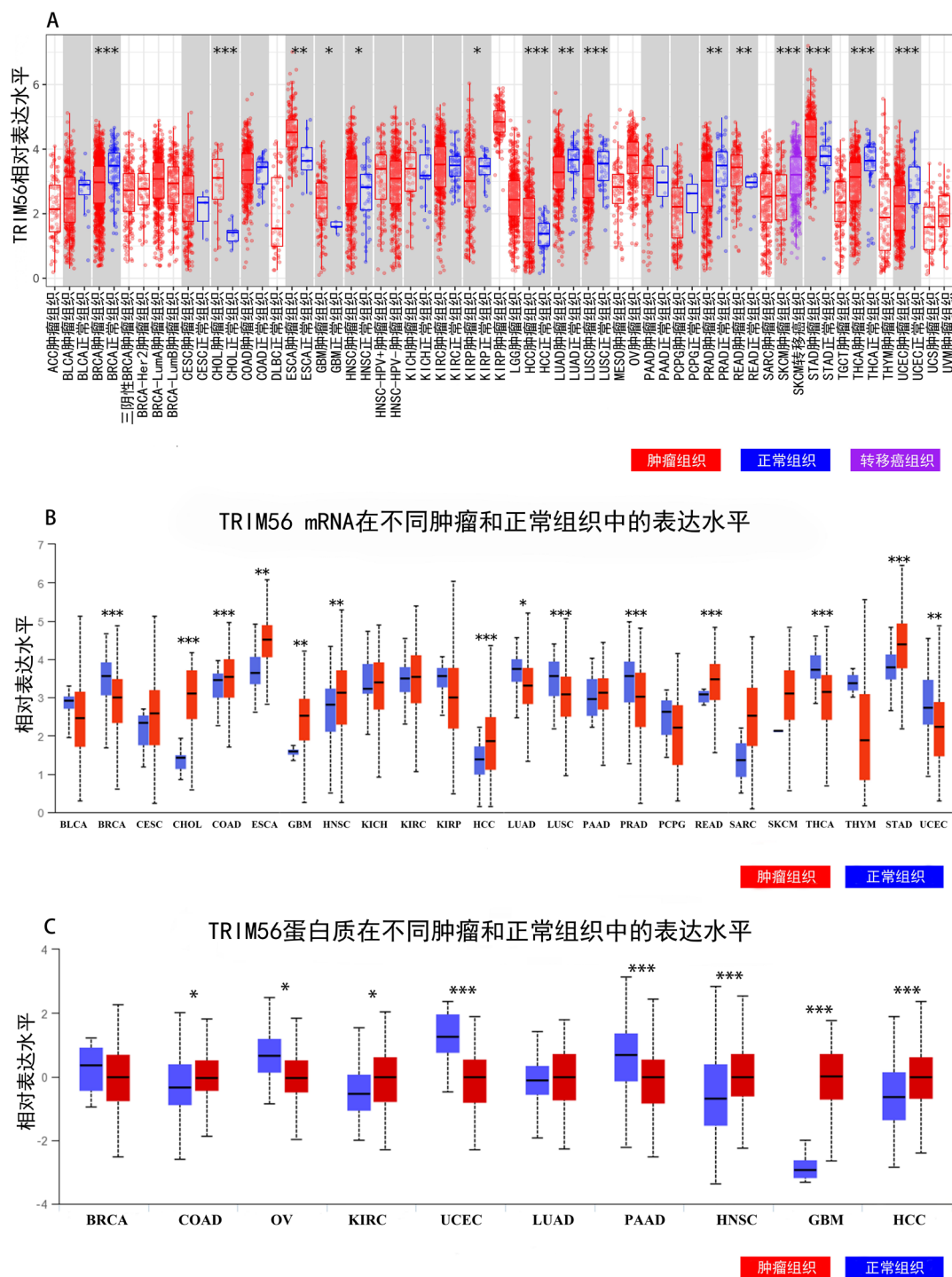


图 1 TRIM56 在不同肿瘤中表达水平

注: A 为 TRIM56 mRNA 在不同肿瘤中的表达水平 (TIMER); B 为 TRIM56 mRNA 在不同肿瘤中的表达水平 (UALCAN); C 为 TRIM56 蛋白在不同肿瘤中的表达水平 (UALCAN); \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; BLCA 为膀胱癌 (bladder urothelial carcinoma), BRCA 为乳腺癌 (breast invasive carcinoma), CESC 为宫颈鳞癌 (cervical squamous cell carcinoma), CHOL 为胆管癌 (cholangiocarcinoma), COAD 为结肠腺癌 (colon adenocarcinoma), ESCA 为食管癌 (esophageal carcinoma), GBM 为多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme), HNSC 为头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma), KICH 为肾嫌色细胞癌 (kidney chromophobe), KIRC 为肾透明细胞癌 (kidney renal clear cell carcinoma), KIRP 为肾乳头状细胞癌 (kidney renal papillary cell carcinoma), HCC 为肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma), LUAD 为肺腺癌 (lung adenocarcinoma), LUSC 为肺鳞状细胞癌 (lung squamous cell carcinoma), PAAD 为胰腺癌 (pancreatic adenocarcinoma), PCPG 为嗜铬细胞瘤和副神经节瘤 (pheochromocytoma and paraganglioma), PRAD 为前列腺腺癌 (prostate adenocarcinoma), READ 为直肠癌 (rectum adenocarcinoma), SKCM 为皮肤黑色素瘤 (skin cutaneous melanoma), STAD 为胃癌 (stomach adenocarcinoma), THCA 为甲状腺癌 (thyroid carcinoma), UCEC 为子宫体子宫内膜癌 (uterine corpus endometrial carcinoma), ACC 为肾上腺皮质癌 (adrenocortical carcinoma), LAML 为急性髓系白血病样肿瘤 (acute myeloid leukemia-like), LGG 为低级别胶质瘤 (low-grade glioma), MESO 为间皮瘤 (mesothelioma), OV 为卵巢浆液性囊腺癌 (ovarian serous cystadenocarcinoma), SARC 为肉瘤 (sarcoma), TGCT 为睾丸生殖细胞肿瘤 (testicular germ cell tumors), THYM 为胸腺癌 (thymoma), UCS 为子宫癌肉瘤 (uterine carcinosarcoma), UVM 为葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma)。

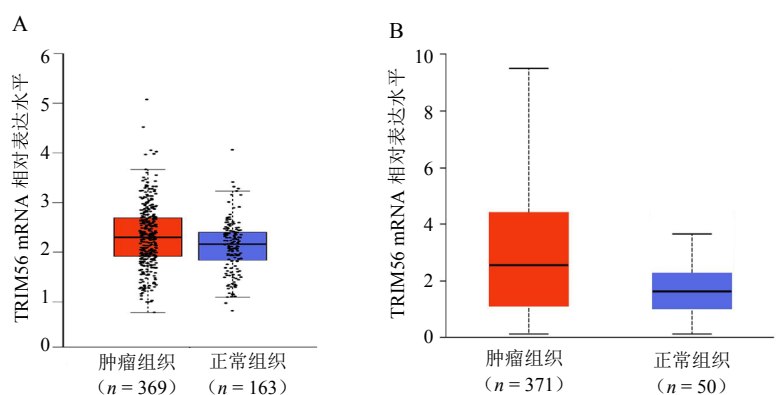


图2 GEPIA 数据库 (A) 和 UALCAN 数据库 (B) 分析 TRIM56 mRNA 在 HCC 中的表达水平  
注: TRIM56 mRNA 相对表达水平均为标准化后基因表达量  $\log_2$  (TPM + 1) 的结果 (TPM: transcripts per million)。

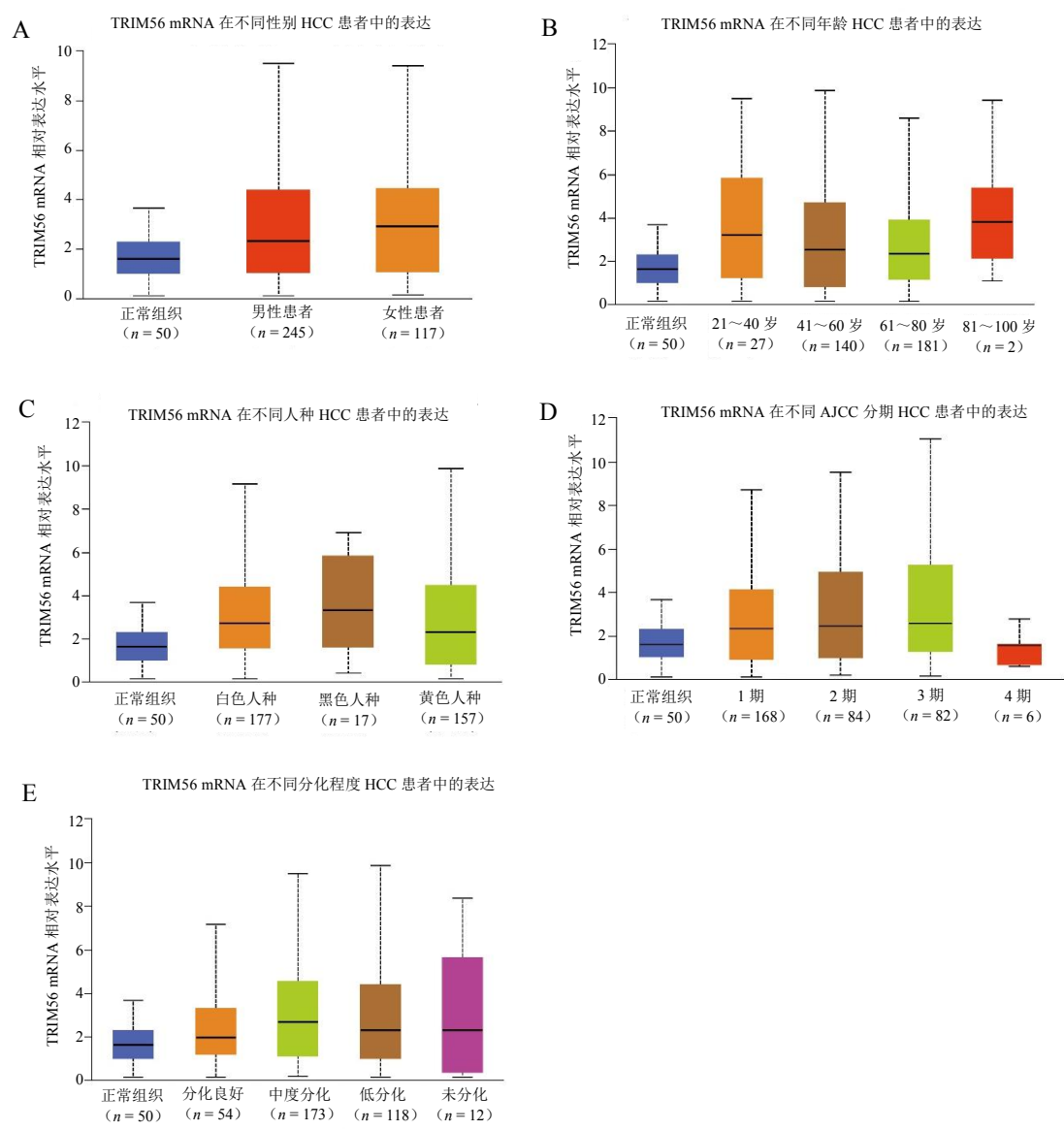


图3 UALCAN 数据库中不同性别 (A)、年龄 (B)、人种 (C)、AJCC 分期 (D)、分化程度 (E) HCC 组织中 TRIM56 mRNA 的表达水平

胞 ( $r = 0.208$ ,  $P < 0.001$ )、 $CD8^+$  T细胞 ( $r = 0.135$ ,  $P = 0.013$ )、 $CD4^+$  T细胞 ( $r = 0.339$ ,  $P < 0.001$ )、巨噬细胞 ( $r = 0.336$ ,  $P < 0.001$ )、中性粒细胞 ( $r = 0.433$ ,  $P < 0.001$ )及树突状细胞 ( $r = 0.302$ ,  $P < 0.001$ )的浸润水平均具有相关性。为深入探讨TRIM56在HCC肿瘤组织的各种免疫细胞浸润中的可能作用,使用GEPIA和TIMER数据库进一步分析TRIM56与不同免疫细胞对应的标志物间的关系,结果表明,T细胞、B细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞的大多数免疫标志物的水平与HCC中TRIM56的表达具有相关性,见表1。

**2.5 与TRIM56相互作用的基因及其富集分析** 使用GeneMANIA数据库对与TRIM56相互作用的基因进行分析(图7A),相关性排名前3的基因分别是STING1、MINDY4和LSM2。通过DAVID数据库对上述基因进行富集分析。KEGG分析(图7B)

表明这些基因主要与志贺菌病、泛素介导的蛋白水解、线粒体自噬等途径具有相关性(校正 $P$ 均 $< 0.001$ )。GO分析(图7C~7E)发现这些基因主要与线粒体外膜、细胞器外膜等膜结构及核糖体有关(校正 $P$ 均 $< 0.001$ ),它们主要参与核苷酸切除修复等生物过程(校正 $P$ 均 $< 0.001$ ),发挥蛋白质标签、泛素蛋白酶活性等分子作用。

**2.6 与TRIM56蛋白相互作用的蛋白质分析** 通过STRING数据库构建TRIM56蛋白的蛋白质相互作用网络(protein-protein interactions, PPI)以确定TRIM56在HCC发生发展中可能的作用机制(图8A)。进一步对TRIM56可能的泛素化底物进行预测(图8B),包括3种已知底物(VIM、STING1、SAP18)和18种预测底物,其中得分最高的3种预测底物分别为TP53(0.867分)、IRF3(0.832分)、ZMIZ1(0.826分)。

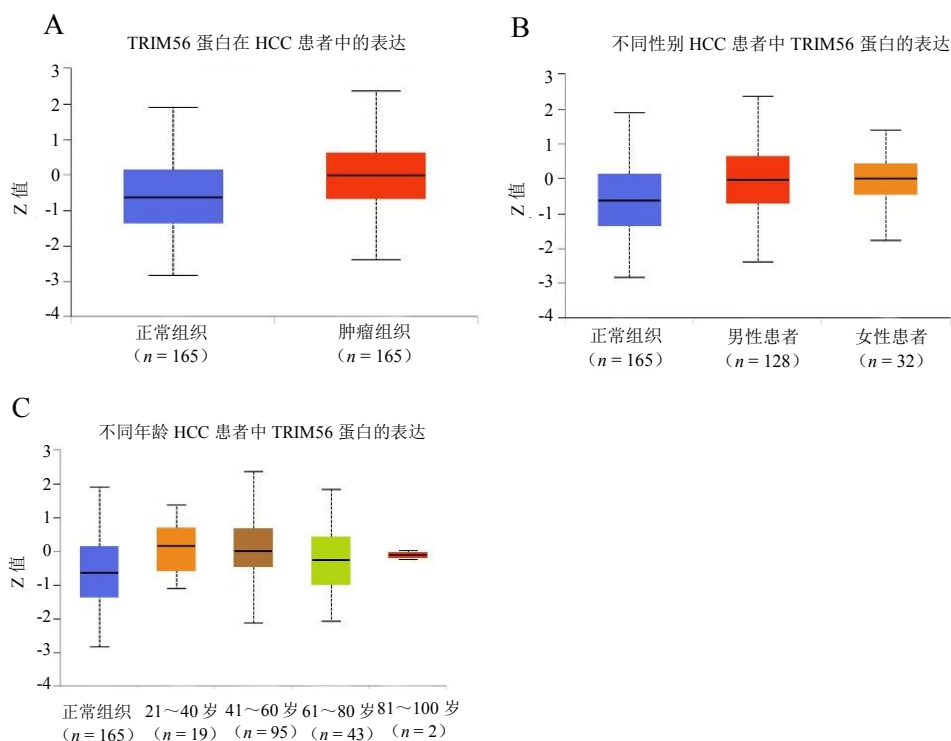


图4 UALCAN 数据库 HCC 组织中 TRIM56 蛋白的表达水平 (A) 以及不同性别 (B)、年龄 (C) HCC 患者 TRIM56 蛋白的表达水平

注: Z 值为样本数据与总体平均数的差除以总体标准差。

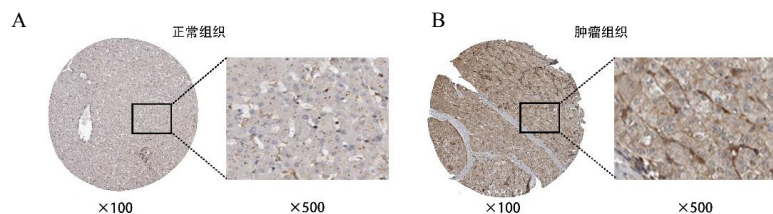


图5 TRIM56 在正常组织 (A) 和 HCC 组织 (B) 中的免疫组织化学图 (HPA 染色)



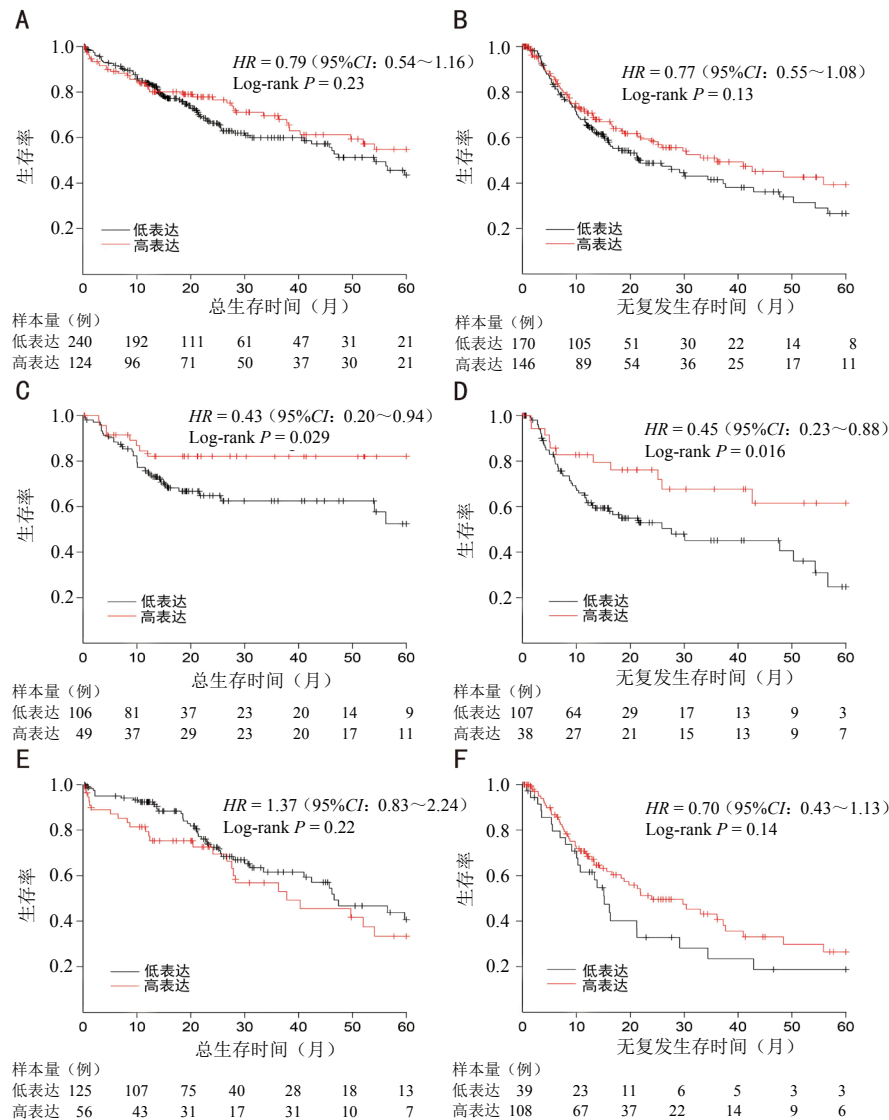


图6 不同 TRIM56 表达水平 HCC 患者的生存分析

注: A 为 TRIM56 不同表达水平的 HCC 患者总生存曲线; B 为 TRIM56 不同表达水平的 HCC 患者无复发生存曲线; C 为不同 TRIM56 表达水平亚洲 HCC 患者总生存曲线; D 为不同 TRIM56 表达水平亚洲 HCC 患者无复发生存曲线; E 为不同 TRIM56 表达水平欧美 HCC 患者总生存曲线; F 为不同 TRIM56 表达水平欧美 HCC 患者无复发生存曲线。

表1 TIMER 和 GEPIA 中 TRIM56 与免疫细胞标志物的 Spearman 相关性分析

| 细胞类型及其标志物                 | 无调整    |         | 纯度调整   |         | 肿瘤组织  |         | 正常组织   |         |
|---------------------------|--------|---------|--------|---------|-------|---------|--------|---------|
|                           | r      | P       | r      | P       | r     | P       | r      | P       |
| <b>B细胞</b>                |        |         |        |         |       |         |        |         |
| CD19                      | 0.074  | 0.156   | 0.069  | 0.200   | 0.053 | 0.310   | 0.430  | 0.002   |
| CD20 (KRT20)              | 0.180  | < 0.001 | 0.199  | < 0.001 | 0.110 | 0.029   | -0.150 | 0.290   |
| CD38                      | 0.175  | < 0.001 | 0.203  | < 0.001 | 0.200 | < 0.001 | 0.350  | 0.014   |
| <b>CD8<sup>+</sup>T细胞</b> |        |         |        |         |       |         |        |         |
| CD8A                      | 0.115  | 0.027   | 0.137  | 0.0107  | 0.120 | 0.017   | 0.440  | 0.002   |
| CD8B                      | -0.013 | 0.807   | -0.002 | 0.972   | 0.055 | 0.290   | 0.470  | < 0.001 |
| <b>Th1细胞</b>              |        |         |        |         |       |         |        |         |
| T-bet (TBX21)             | 0.113  | 0.029   | 0.128  | 0.017   | 0.140 | 0.007   | 0.560  | < 0.001 |
| STAT4                     | 0.121  | 0.020   | 0.139  | 0.010   | 0.190 | < 0.001 | 0.490  | < 0.001 |
| IL12RB2                   | 0.291  | < 0.001 | 0.293  | < 0.001 | 0.068 | 0.190   | 0.380  | 0.007   |
| WSX1 (IL27RA)             | 0.351  | < 0.001 | 0.379  | < 0.001 | 0.460 | < 0.001 | 0.530  | < 0.001 |
| STAT1                     | 0.448  | < 0.001 | 0.469  | < 0.001 | 0.300 | < 0.001 | 0.430  | 0.002   |
| IFN- $\gamma$ (IFNG)      | 0.076  | 0.143   | 0.100  | 0.064   | 0.120 | 0.024   | 0.360  | 0.011   |
| TNF- $\alpha$ (TNF)       | 0.268  | < 0.001 | 0.307  | < 0.001 | 0.250 | < 0.001 | 0.570  | < 0.001 |

续表 1

| 细胞类型及其标志物     | 无调整      |          | 纯度调整     |          | 肿瘤组织     |          | 正常组织     |          |
|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|               | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> |
| Th2细胞         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| GATA3         | 0.208    | < 0.001  | 0.260    | < 0.001  | 0.200    | < 0.001  | 0.170    | 0.250    |
| CCR3          | 0.195    | < 0.001  | 0.216    | < 0.001  | -0.005   | 0.920    | 0.370    | 0.008    |
| STAT6         | 0.479    | < 0.001  | 0.477    | < 0.001  | 0.440    | < 0.001  | 0.760    | < 0.001  |
| STAT5A        | 0.375    | < 0.001  | 0.404    | < 0.001  | 0.350    | < 0.001  | 0.680    | < 0.001  |
| 调节性T细胞        |          |          |          |          |          |          |          |          |
| FOXP3         | 0.350    | < 0.001  | 0.355    | < 0.001  | 0.062    | 0.240    | 0.210    | 0.150    |
| CD35 (IL2RA)  | 0.273    | < 0.001  | 0.305    | < 0.001  | 0.240    | < 0.001  | 0.110    | 0.430    |
| CCR8          | 0.456    | < 0.001  | 0.507    | < 0.001  | 0.230    | < 0.001  | 0.450    | < 0.001  |
| 自然杀伤细胞        |          |          |          |          |          |          |          |          |
| XCL1          | -0.010   | 0.841    | 0.006    | 0.905    | 0.046    | 0.380    | 0.380    | 0.006    |
| CD7           | -0.024   | 0.642    | -0.031   | 0.561    | -0.002   | 0.980    | 0.400    | 0.004    |
| KIR3DL1       | 0.127    | 0.015    | 0.164    | 0.002    | 0.200    | < 0.001  | 0.190    | 0.190    |
| 树突状细胞         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| CD1C          | 0.225    | < 0.001  | 0.231    | < 0.001  | 0.130    | 0.010    | 0.580    | < 0.001  |
| CD141 (THBD)  | 0.271    | < 0.001  | 0.287    | < 0.001  | 0.170    | 0.001    | 0.150    | 0.310    |
| CD11c (ITGAX) | 0.321    | < 0.001  | 0.360    | < 0.001  | 0.300    | < 0.001  | 0.370    | 0.007    |
| 巨噬细胞          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| CD68          | 0.287    | < 0.001  | 0.320    | < 0.001  | 0.290    | < 0.001  | 0.440    | 0.002    |
| CD11b (ITGAM) | 0.347    | < 0.001  | 0.374    | < 0.001  | 0.450    | < 0.001  | 0.560    | < 0.001  |
| 单核细胞          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| CD14          | -0.080   | 0.125    | -0.096   | 0.075    | -0.150   | 0.004    | -0.130   | 0.380    |
| CD16 (FCGR3B) | 0.221    | < 0.001  | 0.230    | < 0.001  | -0.001   | 0.990    | 0.380    | 0.007    |
| CD15 (CSF1R)  | 0.266    | < 0.001  | 0.310    | < 0.001  | 0.240    | < 0.001  | 0.410    | 0.003    |

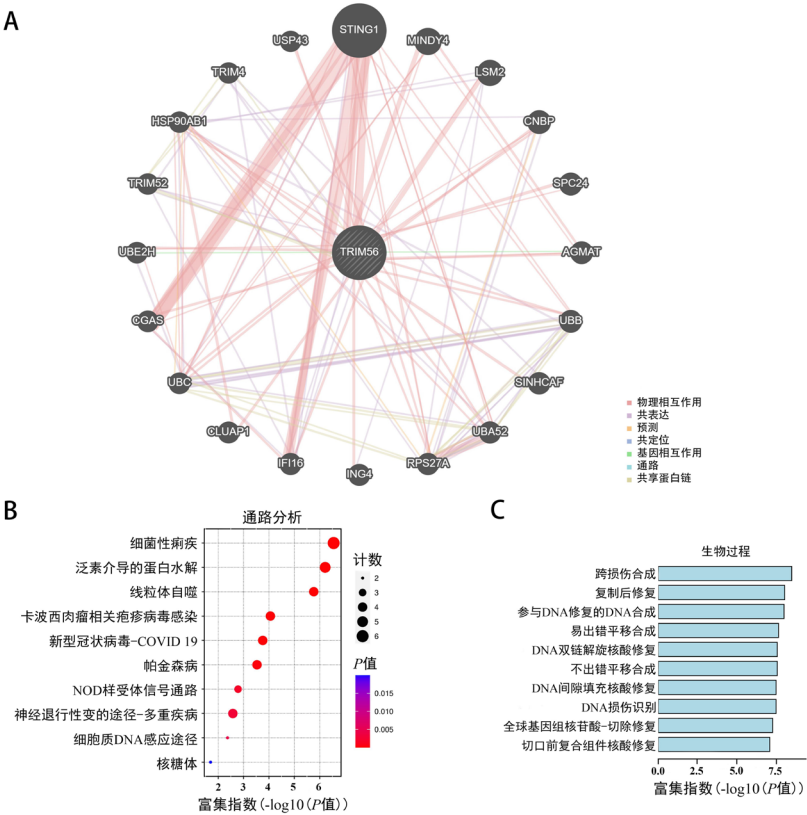
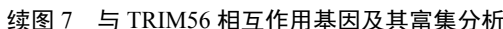


图 7 与 TRIM56 相互作用基因及其富集分析

注: A 为与 TRIM56 相互作用基因的网络图 (GeneMANIA); B 为与 TRIM56 相互作用基因的 KEGG 通路分析; C ~ E 为与 TRIM56 相互作用基因的 GO 分析。





**A**

Figure 2A is a network diagram showing interactions between TRIM56 and various proteins. The nodes are colored circles representing different proteins: TRIM56 (red), TRIM38 (green), TRIM32 (orange), TRIM23 (teal), TRIM21 (purple), TRIM41 (pink), TRAF1 (light blue), CGAS (light green), STING1 (brown), RNF26 (dark blue), and FAF2 (light green). The edges represent interactions, with colors indicating the type of interaction: red for known substrates and yellow for predicted substrates. TRIM56 is the central node, connected to all other nodes in the network.

**B**

Figure 2B is a radial network diagram showing interactions between TRIM56 and various proteins. The nodes are colored circles representing different proteins: TRIM56 (yellow), TRIM32 (blue), TRIM56 (blue), IRF7 (blue), TRIM21 (blue), IRF8 (blue), TRIM24 (blue), TRIM44 (blue), TRIM26 (blue), TRIM5 (blue), PIAS4 (blue), ZMIZ2 (blue), MID2 (blue), ZMIZ1 (blue), NEFL (blue), TRIM28 (blue), IRF3 (blue), TP53 (blue), VIM (red), STING1 (red), and SAP18 (red). The edges represent interactions, with colors indicating the type of interaction: red for known substrates and yellow for predicted substrates. TRIM56 is the central node, connected to all other nodes in the network.

图 8 与 TRIM56 蛋白相互作用的蛋白质分析

### 3 讨论

TRIM56参与多种途径和细胞过程的调节。研究表明, TRIM56与多种肿瘤的发生发展相关, 具有协助肿瘤早期诊断的潜能, 与HCC也可能具有潜在联系。为更详细了解TRIM56在HCC中的潜在功能和调控网络, 本研究对已知的测序数据进行了生物信息学综合分析。结果表明TRIM56在HCC组织中高表达, 其高表达不受性别、年龄等因素影响。这为TRIM56作为HCC早期诊断标志物提供了可能, 但未来仍需进一步探索和验证。

免疫疗法已成为一种新的肿瘤治疗模式，为使更多患者从中受益，探索新的靶点和机制至关重要。通过肿瘤纯度分析发现TRIM56表达水平与HCC免疫浸润水平呈正相关，与不同免疫细胞对应标志物的相关性也较高，但仍需进一步实验来验证TRIM56是否可作为其免疫疗法的有效靶点。尽管从整体而言不同TRIM56 mRNA表达水平HCC患者的生存情况无显著差异，但基于不同种族进行更具体的分类分析发现，TRIM56 mRNA高表达有利于

改善亚洲HCC患者的5年生存期，而对欧美患者无明显作用。这说明TRIM56对HCC发生发展的作用可能存在种族差别，对研究TRIM56与HCC间的关系提出了可能的新方向。

本研究还对TRIM56的相互作用基因进行了研究。GO分析表明, 这些基因主要参与核苷酸切除修复的过程, 而KEGG分析结果显示这些基因与线粒体自噬有明显相关性, 线粒体自噬过程的增强可能通过线粒体分裂增加导致活性氧产生增加, 起到促进HCC发展的作用, 可能作为TRIM56参与HCC发展的机制之一<sup>[24]</sup>。PPI分析结果表明, 与TRIM56相互作用的蛋白质多来自泛素-蛋白酶体系统, 说明TRIM56的E3泛素酶活性可能参与HCC发展<sup>[25]</sup>。此外, TRIM56与STING1、TBK1、CGAS和FAF2存在相互作用。其中, STING1在募集TBK1后进入细胞核启动 I 型干扰素基因的表达<sup>[19]</sup>, 说明TRIM56可能通过介导固有免疫及参与对抗肝炎病毒的免疫过程来影响HCC的发生发展。目前已有研究证明TRIM56参与抗肝炎病毒过程, 但与HCC

恶性进展间的联系仍需进一步研究<sup>[6]</sup>。FAF2则被发现与HCC<sup>[20]</sup>和酒精性肝病<sup>[21,22]</sup>有关,而CGAS在CGAS-STING信号通路中作为激活STING的上游分子也被发现参与促进肝纤维化和肝血窦微血栓的形成<sup>[23]</sup>。此外,泛素化底物预测分析显示TP53得分最高,而TP53作为一种重要的抑癌因子,在癌症发展和治疗中发挥基础性和多方面作用<sup>[26]</sup>,TRIM56可能通过泛素化TP53使其失去功能活性,从而促进HCC的发生发展。

综上所述,本研究对HCC中TRIM56的表达进行了生物信息学分析,发现TRIM56在HCC中表达增加,且可能通过不同机制参与HCC的发生发展。此外,本研究还发现TRIM56与HCC免疫浸润间存在明显正相关,这为进一步研究TRIM56能否作为HCC的免疫治疗靶点提供了方向,未来需进一步研究以得出更具体的结论。

#### 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):209-249.
- [2] ZHAN W, ZHANG S. TRIM proteins in lung cancer: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets[J]. *Life Sci*,2021,268:118985.
- [3] LU K, PAN Y, HUANG Z, et al. TRIM proteins in hepatocellular carcinoma[J]. *J Biomed Sci*,2022,29(1):69-88.
- [4] CAI C, TANG Y D, ZHAI J, et al. The RING finger protein family in health and disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*,2022,7(1):300-323.
- [5] TSUCHIDA T, ZOU J, SAITOH T, et al. The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA[J]. *Immunity*,2010,33(5):765-776.
- [6] TIAN X, DONG H, LAI X, et al. TRIM56 impairs HBV infection and replication by inhibiting HBV core promoter activity[J]. *Antiviral Res*,2022,207:105406.
- [7] YANG X, ZHANG Y, XUE Z, et al. TRIM56 promotes malignant progression of glioblastoma by stabilizing cIAP1 protein[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2022,41(1):336-354.
- [8] 薛敏. E3泛素连接酶TRIM56调控乳腺癌雌激素信号通路的机制研究[D]. 新乡: 新乡医学院,2020.
- [9] XUE M, ZHANG K, MU K, et al. Regulation of estrogen signaling and breast cancer proliferation by an ubiquitin ligase TRIM56[J]. *Oncogenesis*,2019,8(5):30-44.
- [10] 卢坤. TRIM56在肺癌中的功能及调控机制的研究[D]. 青岛: 青岛大学,2021.
- [11] GAO J, AO Y Q, ZHANG L X, et al. Exosomal circZNF451 restrains anti-PD1 treatment in lung adenocarcinoma via polarizing macrophages by complexing with TRIM56 and FXR1[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2022,41(1):295-316.
- [12] CHEN Y, ZHAO J, LI D, et al. TRIM56 suppresses multiple myeloma progression by activating TLR3/TRIF signaling[J]. *Yonsei Med J*,2018,59(1):43-50.
- [13] ZHAO L, WANG Z G, ZHANG P, et al. Poly r(C) binding protein 1 regulates posttranscriptional expression of the ubiquitin ligase TRIM56 in ovarian cancer[J]. *IUBMB Life*,2019,71(2):177-182.
- [14] ZHAO L, ZHANG P, SU X J, et al. The ubiquitin ligase TRIM56 inhibits ovarian cancer progression by targeting vimentin[J]. *J Cell Physiol*,2018,233(3):2420-2425.
- [15] LI T, FAN J, WANG B, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. *Cancer Res*,2017,77(21):e108-e110.
- [16] DENNIS G J R, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery[J]. *Genome Biol*,2003,4(5):P3.
- [17] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*,2021,49(D1):D605-D612.
- [18] WANG X, LI Y, HE M, et al. UbiBrowser 2.0: a comprehensive resource for proteome-wide known and predicted ubiquitin ligase/deubiquitinase-substrate interactions in eukaryotic species[J]. *Nucleic Acids Res*,2022,50(D1):D719-D728.
- [19] ZHANG R, KANG R, TANG D. The STING1 network regulates autophagy and cell death[J]. *Signal Transduct Target Ther*,2021,6(1):208-221.
- [20] LIU F, TIAN T, ZHANG Z, et al. Long non-coding RNA SNHG6 couples cholesterol sensing with mTORC1 activation in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Metab*,2022,4(8):1022-1040.
- [21] OSNA N A, RASINENI K, GANESAN M, et al. Pathogenesis of alcohol-associated liver disease[J]. *J Clin Exp Hepatol*,2022,12(6):1492-1513.
- [22] SCHWANTES-AN T H, DARLAY R, MATHURIN P, et al. Genome-wide association study and Meta-analysis on alcohol-associated liver cirrhosis identifies genetic risk factors[J]. *Hepatology*, 2021,73(5):1920-1931.
- [23] LUO S, LUO R, LU H, et al. Activation of cGAS-STING signaling pathway promotes liver fibrosis and hepatic sinusoidal microthrombosis[J]. *Int Immunopharmacol*,2023,125(Pt B):111132.
- [24] KE P Y. Mitophagy in the pathogenesis of liver diseases[J]. *Cells*,2020,9(4):831-896.
- [25] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system[J]. *Annu Rev Biochem*,1998,67:425-479.
- [26] HU J, CAO J, TOPATANA W, et al. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies[J]. *J Hematol Oncol*,2021,14(1):157-176.

收稿日期: 2023-06-06

黄海芊, 王堃. 泛素化连接酶TRIM56在人肝细胞癌中的表达及其与预后和免疫浸润关系的生物信息学分析[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2024,16(3): 22-31.