

甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶在肝细胞癌中的作用

刘文丽¹, 罗达亚², 刘卓琦², 杨晓红², 朱伟锋², 胡楷恒³, 肖影群¹ [1. 南昌市第九医院(南昌大学附属感染病医院) 病理科, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 江西 南昌 330006; 3. 南昌大学临床医学院(中外合作办学) 玛丽女王学院, 江西 南昌 330006]

摘要: 目的 采用生物信息学方法探讨甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶(betaine-homocysteine methyltransferase, BHMT)与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的作用及临床联系,为HCC的临床诊疗提供新思路。方法 使用Sanger Box在线软件分析BHMT在泛癌中的表达水平。通过UCSC Xena数据库分析BHMT mRNA的表达水平以及HCC中BHMT的甲基化数据和患者的临床特征信息,分析BHMT表达与这些数据的关系。通过TIMER在线软件分析HCC中BHMT的表达与免疫细胞浸润的相关性。通过LinkedOmics在线软件对HCC中BHMT进行GO功能与KEGG信号通路富集分析。收集2008年至2018年南昌市第九医院符合入选标准的28例HCC患者的石蜡标本,采用免疫组织化学法检测BHMT蛋白表达水平。结果 癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库和基因型组织表达(Genotype-Tissue Expression, GTEx)数据库显示, BHMT在包括HCC在内的多种肿瘤中低表达。UCSC XENA数据库分析表明, BHMT mRNA在HCC中呈低表达。BHMT mRNA低表达患者的生存时间显著低于高表达患者(Log rank $\chi^2=5.812$, $P=0.0159$); BHMT mRNA低表达患者中男性比例高于BHMT mRNA高表达者($\chi^2=46.600$, $P<0.001$), 两组间HCC Edmondson-Steiner分级、AJCC分级、TNM分期及生存状态差异无统计学意义(P 均 >0.05)。BHMT mRNA表达与其DNA甲基化水平呈负相关($r=-0.659$, $P<0.001$), 且BHMT表达与cg07418518、cg18483750等9个甲基化位点存在相关性(P 均 <0.05), 这9个位点的甲基化水平在HCC组织与正常组织中存在差异。临床样本分析也表明BHMT蛋白在HCC组织的表达水平显著低于癌旁组织(中位数: 3.000比1.000; $U=258$, $P=0.0401$), BHMT蛋白高表达患者和BHMT蛋白低表达患者微血管浸润程度差异有统计学意义($\chi^2=7.133$, $P=0.008$)。HCC组织CD4蛋白相对表达量显著低于癌旁组织(中位数: 3.000比1.000, $U=215$, $P<0.001$)。GO分析结果表明, HCC中BHMT在生物过程(biological process, BP)的富集主要与生物调节、代谢过程、刺激应答等有关;在细胞成分(cell component, CC)的富集主要与细胞膜、细胞核和膜腔等结构有关;在分子功能(molecular function, MF)的富集主要与蛋白质结合、离子结合和核酸结合等过程有关。KEGG信号通路分析表明,与BHMT正相关的通路主要富集于物质代谢(脂质、氨基酸、固醇等)和应答过程(急性炎症刺激、异生物刺激等);而与BHMT负相关的通路主要富集于细胞周期、信号通路、机体生物化学反应、免疫细胞活化等过程。结论 BHMT在HCC的发生发展中发挥关键作用。

关键词: 甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶; 肝细胞癌; 预后; 免疫浸润

The role of betaine-homocysteine methyltransferase on hepatocellular carcinoma

Liu Wenli¹, Luo Daya², Liu Zhuoqi², Yang Xiaohong², Zhu Weifeng², Hu Kaiheng³, Xiao Yingqun¹
[1. Department of Pathology, The Ninth Hospital of Nanchang (Affiliated Infectious Disease

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2025.04.005

基金项目: 江西省卫生健康委员会健康委科技计划项目(2021-4-0132); 南昌市科技计划项目(洪科字[2022]146号)

通信作者: 肖影群 Email: xiaoyq2008@126.com

Hospital of Nanchang University), Jiangxi Nanchang 330006, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, Nanchang University, Jiangxi Nanchang 330006, China; 3. Queen Mary College, Nanchang University, Jiangxi Nanchang 330006, China]

Abstract: Objective To investigate the role and clinical association between betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and hepatocellular carcinoma (HCC) by bioinformatics methods, in order to provide new insights for the clinical diagnosis and treatment of HCC. **Methods** The expression levels of BHMT in pan-cancer were analyzed by the online software Sanger Box. The expression levels of BHMT mRNA, the methylation data of BHMT in HCC and the clinical characteristics of patients, as well as the relationship between BHMT expression and these data were analyzed by UCSC Xena database. The correlation between BHMT expression and immune cell infiltration in HCC was analyzed by Timer online software. GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment analysis of BHMT in HCC were performed with LinkedOmics online software. Paraffin-embedded specimens from 28 eligible HCC patients in The Ninth Hospital of Nanchang from 2008 to 2018 were collected, and the expression levels of BHMT protein were detected by immunohistochemical methods. **Results** Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the Genotype-Tissue Expression (GTEx) project indicated that BHMT was downregulated in multiple tumor types, including HCC. Consistently, UCSC Xena analysis showed significantly reduced BHMT mRNA levels in HCC. Patients with low BHMT mRNA expression had significantly shorter survival time than those with high BHMT mRNA expression (Log rank $\chi^2=5.812$, $P=0.0159$); the proportion of males was higher in low BHMT mRNA expression group than in high expression group ($\chi^2=46.600$, $P<0.001$). No statistically significant differences were observed in HCC Edmondson-Steiner grade, AJCC stage, TNM stage, or survival state between two groups (all $P>0.05$). A negative correlation was observed between BHMT mRNA expression and its DNA methylation level ($r=-0.659$, $P<0.001$). Furthermore, BHMT expression was correlated with 9 methylation sites including cg07418518 and cg18483750 (all $P<0.05$), and the methylation levels of these 9 sites differed significantly between HCC tissues and normal tissues. Clinical samples analysis also demonstrated that the expression level of BHMT protein in HCC tissues was significantly lower than that in adjacent non-tumor tissues (median: 3.000 vs. 1.000; $U=258$, $P=0.0401$). A statistically significant difference was observed in microvascular invasion status between patients with high BHMT protein expression and those with low expression ($\chi^2=7.133$, $P=0.008$). The relative expression level of CD4 protein in HCC tissues was significantly lower than that in adjacent non-tumor tissues (median: 3.000 vs. 1.000, $U=215$, $P<0.001$). GO analysis revealed that BHMT in HCC was primarily enriched in biological processes (BP) related to biological regulation, metabolic processes, and response to stimuli; cellular components (CC) enrichment was associated with structures including cell membrane, nucleus, and membrane lumen; and molecular functions (MF) enrichment was involved in protein binding, ion binding, and nucleic acid binding. KEGG pathway analysis indicated that pathways positively correlated with BHMT were mainly enriched in substance metabolism (including lipids, amino acids, sterols, etc.) and response processes (such as acute inflammatory stimulus response, xenobiotic stimulus response, etc.); whereas pathways negatively correlated with BHMT were primarily enriched in processes including cell cycle, signaling pathways, organismal biochemical reactions, and immune cell activation. **Conclusion** BHMT played a crucial role on the development and progression of HCC.

Keywords: Betaine-homocysteine methyltransferase; Hepatocellular carcinoma; Prognosis; Immune infiltration

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是癌症患者常见的死亡原因。据世界卫生组织估计, 到2030年将有超过100万患者死于HCC^[1]。HCC患者5年生存率为18%, 是仅次于胰腺癌的第2大致命癌症^[2]。目前, 晚期HCC尚无有效的治疗方法, 因此, 寻找有效治疗HCC的方法至关重要。肿瘤代谢重编程是近年研究热点, 是肿瘤发生和发展过程中的重要事件^[3], 肿瘤细胞通过代谢重编程获取其生长、增殖、免疫逃逸和转移所需的能量、必需的大分子原料及适宜的反应环境。代谢重编程作为肿瘤的重要特征之一, 贯穿于肿瘤发生与发展的全程^[4], 从HCC发生与发展过程的代谢重编程中筛选相关的分子靶点将对HCC的预防和治疗具有重要参考价值。

甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶 (betaine-homocysteine methyltransferase, BHMT) 是一种依赖于锌离子的硫甲基转移酶, 作为同型半胱氨酸再甲基化为蛋氨酸过程的关键酶, 参与机体多种病理生理过程^[3,4]。已有研究表明, BHMT与卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌等密切相关^[5-7]。但目前关于BHMT与HCC间联系及作用机制的研究较少。本研究利用公共数据库分析了BHMT在泛癌和HCC中的表达情况及其与肿瘤预后和免疫浸润间的关系, 以期阐明HCC的发生机制提供思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集2008年至2018年南昌市第九医院符合入选标准的28例HCC患者的石蜡标本。纳入标准: 经病理确诊且术前未接受过治疗的HCC患者。排除标准: ①合并高血压、心血管疾病、内分泌疾病等其他疾病; ②妊娠患者。该研究经南昌市第九医院医学伦理委员会批准, 批号: [2022] 伦简审字 (09) 号。

1.2 泛癌中BHMT的表达 通过SangerBox3.0软件分析泛癌中BHMT的表达, 主要步骤如下: 在泛癌分析模块中选择基因表达差异分析, 输入BHMT, 在数据和样本来源分别选择癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库、TCGA + 基因型组织表达 (Genotype-Tissue Expression, GTEx) 数据库, 数据变换选 $\log_2(x+1)$, 点击提交。

1.3 BHMT在HCC中的表达及其与HCC临床病理的相关性 利用UCSC Xena数据库获取HCC中BHMT的mRNA表达数据及相关的临床病理信息和甲基化数据, 采用R语言分析BHMT表达与HCC预后、生存时间、病理分期分级的相关性。

1.4 BHMT蛋白的免疫组织化学分析 采用免疫组织化学法检测本院28例HCC患者的癌及癌旁组织石蜡标本中BHMT蛋白的表达。所有蜡块标本均行3 μm 切片, 脱蜡、复水, 先后经抗原修复、封闭、加入50~100 μl 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵化过夜, 加入50~100 μl 二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下PBS溶液中孵化30 min, 显色、复染、脱水、封片后显微镜下观察并进行统计学分析。一抗包括: 抗BHMT多克隆抗体 (1:300, Abcam ab243698)、抗CD4抗体 (即用型, 中杉金桥ZA-0519)、抗Ki67抗体 (即用型, 中杉金桥ZM-0166)。所用二抗均为增强酶标山羊抗小鼠/兔IgG (中山金桥PV-9000)。EDTA (pH 8.0, ZLI-9079)。每个样本的最终评估分数为每个样本染色强度乘以每个样本染色范围。染色强度评定标准: 无染色 (0分), 淡黄色 (1分), 棕黄色 (2分), 棕褐色 (3分)。染色范围评定标准: 无染色 (0分), 5%~25%染色范围 (1分), 26%~50%染色范围 (2分), 51%~75%染色范围 (3分), > 75%染色范围 (4分)。如果样本染色分数 < 1分, 则表明该样本染色结果为阴性; 反之则为阳性; 其中Ki67表达评估用染色范围表示。

1.5 BHMT与HCC免疫浸润的相关性分析 采用SangerBox 3.0软件中Timer板块分析BHMT基因表达水平与泛癌中6种免疫细胞浸润丰度间的相关性。操作步骤如下: 先输入基因BHMT, 在数据来源中选择TCGA, 数据变换选择 $\log_2(x+1)$, 点击提交。利用TIMER数据库分析HCC中BHMT基因表达与以上6种免疫细胞浸润丰度的关系及这6种免疫细胞与HCC患者累积生存率的关系。

1.6 HCC中BHMT的GO功能与KEGG信号通路富集分析 利用LinkedOmics数据库, 设置步骤如下: 选择“TCGA LIHC”, 在数据类型中选择“RNAseq”, 输入“BHMT”基因, 再选择“Date type-RNAseq”, 选择“Pearson Correlation test”, 点击“Submit Query”, 采用“Linkfinder”和“LinkInterpreter”分别对HCC中的BHMT进行相关基因表达分析和GO功能分析及KEGG信号通路富集分析。BHMT相关信号通路富集途径的排序通过错误发现率 (false discovery rate, FDR) 和归一化富集评分, 其中FDR < 0.05表示显著富集。

1.7 统计学处理 采用SPSS 21.0软件进行统计学分析, 其中BHMT mRNA和蛋白的相对表达量、CD4

蛋白相对表达量为非正态分布的计量资料,以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间比较采用Mann-Whitney U 检验,多组间比较采用非配对的Wilcoxon秩和检验。性别、AJCC分期、分化、TNM分期等为计数资料,以例数和(或)百分数表示,采用 χ^2 检验。采用受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线分析BHMT mRNA表达水平对HCC患者预后的预测价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BHMT在泛癌中的表达 TCGA数据库中26种肿瘤BHMT的表达水平见图1A,结果表明BHMT在胶质瘤、HCC、肾透明细胞癌等18种肿瘤组织中的表达显著低于正常组织(P 均 < 0.05)。TCGA结合GTEx数据库中34种肿瘤BHMT的表达水平见图1B,结果表明BHMT在睾丸癌、肺腺癌、肺鳞癌、急性髓细

胞样白血病4种肿瘤中的表达显著高于正常组织,在胶质瘤、HCC、肾透明细胞癌、白血病等25种肿瘤组织中的表达显著低于正常组织(P 均 < 0.05)。提示BHMT在多种肿瘤组织中表达显著失调。

2.2 BHMT在HCC中的表达 从UCSC XENA数据库下载正常肝组织及HCC组织中BHMT基因转录组数据、甲基化数据和HCC患者临床相关信息的数据。经分析发现,HCC组织中BHMT mRNA的相对表达量为5.291(3.453, 6.919),癌旁组织为7.506(3.453, 6.919),HCC组织中BHMT mRNA的相对表达量显著低于正常组织($U = 3300, P < 0.001$),见图2A。通过免疫组织化学法检测28例HCC患者石蜡标本BHMT蛋白的表达情况,结果显示HCC组织中BHMT蛋白表达量为1.000(0.000, 2.000),癌旁组织为3.000(1.000, 4.000),HCC

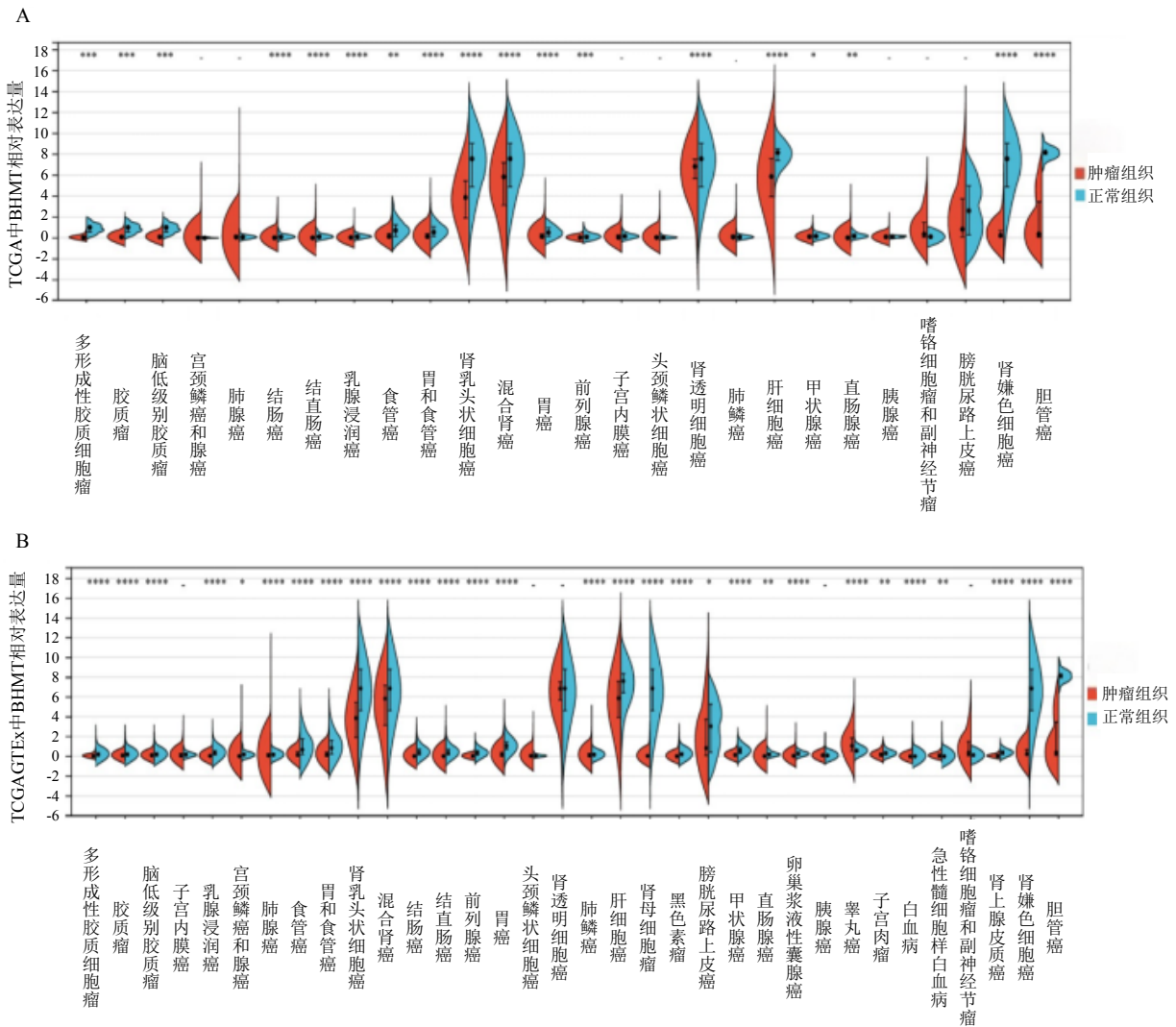


图1 TCGA数据库和GTEx数据库中泛癌组织BHMT的表达

注: A为TCGA数据库中泛癌组织BHMT的表达; B为TCGA+GTEx数据库中泛癌组织BHMT的表达; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

组织中BHMT蛋白表达量显著低于癌旁组织 ($U = 258, P = 0.0401$), 见图2B。

2.3 不同分期HCC患者的BHMT表达量 通过UCSC XENA数据库收集HCC患者的临床数据, 分析发现不同美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 分期 (I期、II期、III期、IV期) HCC患者BHMT mRNA相对表达量分别为5.506 (4.183, 6.994)、4.929 (2.918, 7.072)、4.146 (2.643, 6.856)、3.829 (1.063, 4.946), 差异有统计学意义 ($H = 9.928, P = 0.0192$); 不同埃德蒙森分级 (Edmondson-Steiner grade) (I级、II级、III级、IV级) HCC患者的BHMT mRNA相对表达量分别为6.406 (4.754, 7.266)、5.461 (3.519, 6.944)、4.533 (2.896, 6.619)、4.591 (1.709, 7.206), 差异有统计学意义 ($H = 13.270, P = 0.0041$), 见图3。

2.4 不同BHMT表达水平HCC患者的临床特征 利用UCSC XENA数据库中HCC患者的临床数据绘制ROC曲线, 结果表明BHMT mRNA表达水平预测HCC患者预后的曲线下面积为0.814, 最佳截断值为6.488, 特异度为89.2%, 敏感度为65.9%, 见图4A。根据最佳截断值分为BHMT mRNA低表达组 (< 6.488) 和高表达组 (≥ 6.488), 生存分析表

明, BHMT mRNA低表达患者的生存时间显著低于高表达组 (Log rank $\chi^2 = 5.812, P = 0.0159$), 见图4B。BHMT mRNA低表达组中男性比例高于BHMT mRNA高表达组 ($\chi^2 = 46.600, P < 0.001$), 两组间HCC Edmondson-Steiner分级、AJCC分期、TNM分期及生存状况差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 见表1。根据28例HCC患者BHMT蛋白相对表达量的中位数将患者分为BHMT蛋白高表达组 (14例) 和BHMT蛋白低表达组 (14例), 两组患者微血管浸润程度差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.133, P = 0.008$), 性别、NCLC分期、Edmondson-Steiner分级、TNM分期等差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 见表2。以上结果提示BHMT与HCC的发生发展存在一定联系。

2.5 BHMT甲基化分析 通过UCSC XENA数据库收集BHMT转录组及甲基化数据, 相关性分析表明BHMT mRNA表达与其DNA甲基化水平呈负相关, 甲基化水平越高, BHMT mRNA表达水平越低 ($r = -0.659, P < 0.001$), 见图5A, 同时BHMT mRNA表达水平与多个位点的甲基化水平有相关性, 见表3。通过对比BHMT启动子序列发现, cg07418518、cg18483750、cg18064071、cg10982664、cg13695646、cg05890484、cg09550809、cg23514016、cg23987322共9个位点为BHMT基因

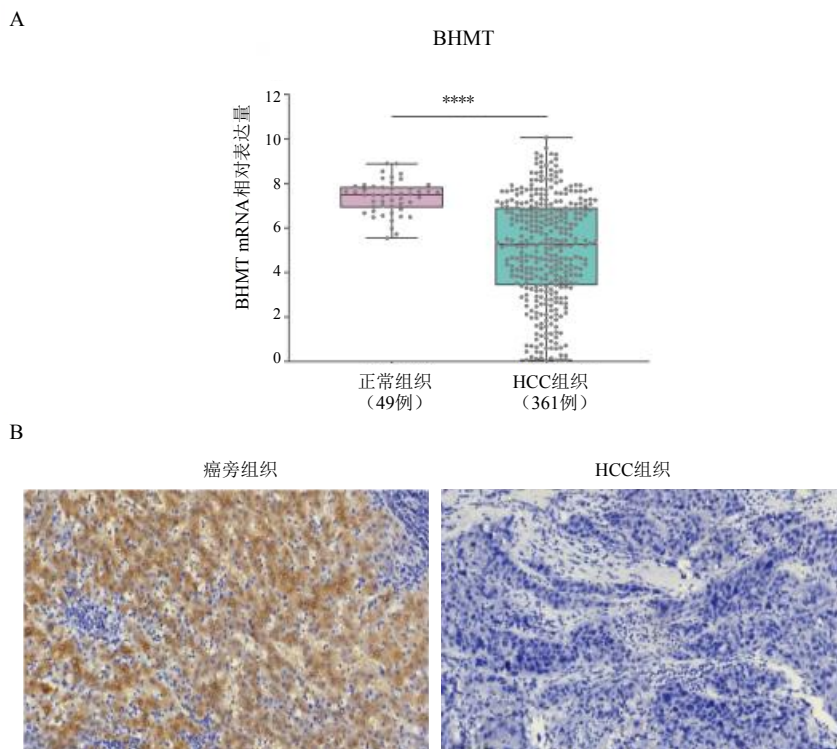


图2 BHMT在HCC中的表达

注: A为XENA数据库中BHMT mRNA的相对表达量, **** $P < 0.0001$; B为免疫组织化学检测HCC患者石蜡标本中BHMT的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)。

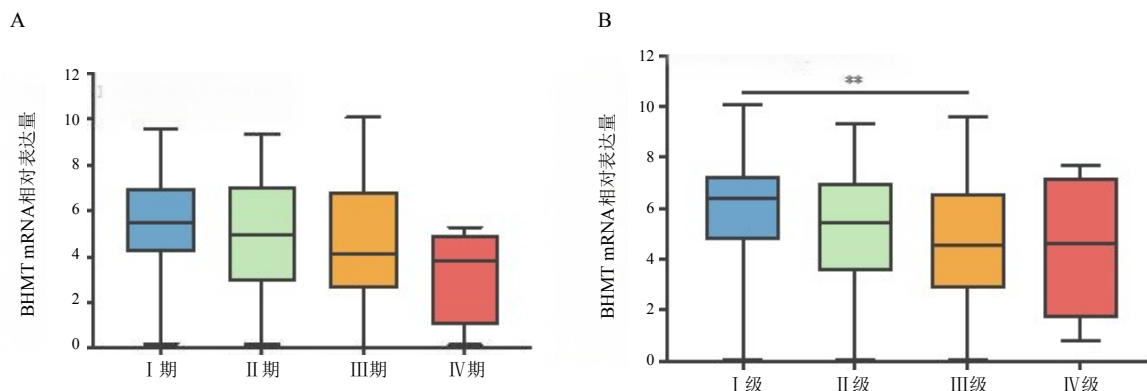


图3 不同AJCC分期(A)及Edmondson-Steiner分级(B) HCC患者的BHMT mRNA表达量
注: ** $P < 0.01$ 。

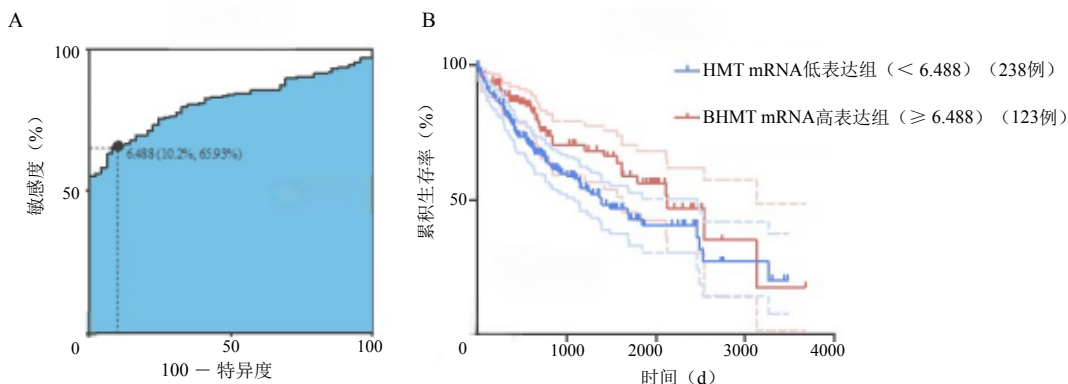


图4 BHMT mRNA表达水平预测HCC患者预后的ROC曲线(A)及不同BHMT mRNA表达水平HCC患者的生存曲线(B)

表1 UCSC XENA 数据库中BHMT mRNA高表达组和低表达组HCC患者的临床特征(例)

项目	例数	BHMT mRNA低表达组(238例)	BHMT mRNA高表达组(123例)	χ^2 值	P 值
性别					
男	174	84	90	46.600	< 0.001
女	187	154	33		
Edmondson-Steiner分级					
I~II级	224	140	84	2.799	0.094
III~IV级	132	94	38		
AJCC分期					
I~II期	549	163	86	0.073	0.788
III~IV期	88	59	29		
TNM分期					
肿瘤大小(T)					
T1~T2	266	177	89	0.177	0.674
T3~T4	92	59	33		
淋巴结(N)					
N0	245	166	79	0.323	0.553
N1	3	3	0		
远处转移(M)					
M0	259	181	78	0.573	0.449
M1	4	4	0		
生存状况					
生存	232	146	86	2.596	0.107
死亡	129	92	37		

表2 BHMT 蛋白高表达组和低表达组 HCC 患者的临床特征（例）

项目	例数	BHMT蛋白低表达组（14例）	BHMT蛋白高表达组（14例）	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别					
女	4	3	1	0.292	0.589
男	24	11	13		
年龄（岁）					
< 50	14	9	5	1.286	0.257
≥ 50	14	5	9		
Edmondson-Steiner分级					
I ~ II级	20	10	10	0.175	0.767
III ~ IV级	8	4	4		
NCLC分期					
I ~ II期	25	12	13	0.373	0.541
III ~ IV期	3	2	1		
肿瘤分化程度					
高分化	3	1	2	0.392	0.822
中分化	17	9	8		
低分化	8	4	4		
微血管浸润分级					
M0	18	6	12	7.133	0.008
M1	5	3	2		
M2	5	5	0		
CD4蛋白					
高表达	16	10	6	2.333	0.127
低表达	12	4	8		

启动子区域甲基化位点，这9个位点的甲基化水平在正常组织与HCC组织存在差异：cg07418518、cg18483750、cg18064071的甲基化水平在HCC组织中升高，cg10982664、cg13695646、cg23987322、cg05890484、cg09550809、cg23514016的甲基化水平在HCC组织中降低（*P*均< 0.05），见图5B。提示BHMT基因表达与其启动区DNA甲基化水平有关。

2.6 BHMT与HCC组织的免疫浸润 通过TIMER数据库基因模块分析发现，BHMT mRNA表达水平与HCC组织中B细胞（*r* = -0.223，*P* < 0.001）、CD4⁺ T细胞（*r* = -0.247，*P* < 0.001）、中性粒细胞（*r* = -0.126，*P* = 0.019）、树突状细胞（*r* = -0.154，*P* = 0.004）、巨噬细胞（*r* = -0.231，*P* < 0.001）的浸润呈负相关，与CD8⁺ T细胞浸润无显著相关性（*r* = -0.076，*P* = 0.159）。SangerBox软件分析表明HCC组织中BHMT mRNA表达与免疫浸润评分（*r* = -0.23，*P* < 0.001）、基质评分（*r* = -0.12，*P* = 0.02）、肿瘤纯度评分（*r* = -0.20，*P* < 0.001）均呈负相关。采用免疫组织化学法检测HCC患者石蜡组织中CD4蛋白的表达（图6），

表3 BHMT mRNA 相对表达量与其 DNA 位点甲基化水平的相关性分析

BHMT甲基化位点	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
cg07418518	-0.514	< 0.0001
cg18483750	-0.5902	< 0.0001
cg18064071	-0.6763	< 0.0001
cg10982664	-0.5996	< 0.0001
cg13695646	-0.6084	< 0.0001
cg05890484	-0.5096	< 0.0001
cg09559809	-0.5339	< 0.0001
cg23514016	-0.5257	< 0.0001
cg23987322	-0.5414	< 0.0001
cg02286091	-0.4828	< 0.0001
cg10660256	-0.5008	< 0.0001
cg11770080	-0.374	< 0.0001
cg18058747	-0.4189	< 0.0001
cg17785773	-0.4537	< 0.0001
cg25119155	-0.3602	< 0.0001

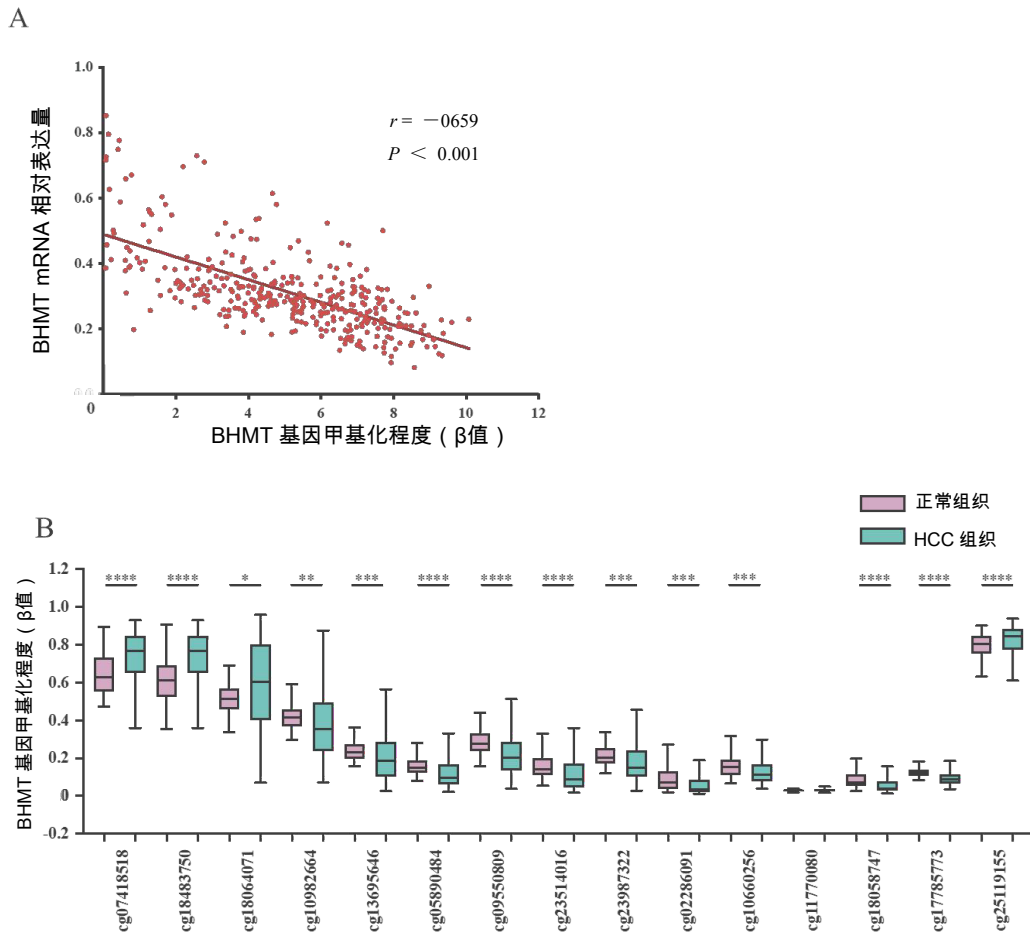


图5 BHMT基因启动子区域甲基化分析

注：A 为 HCC 组织中 BHMT mRNA 相对表达量与其 DNA 甲基化水平的相关性分析；B 为正常组织与 HCC 组织中 BHMT 基因不同位点甲基化水平；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ 。

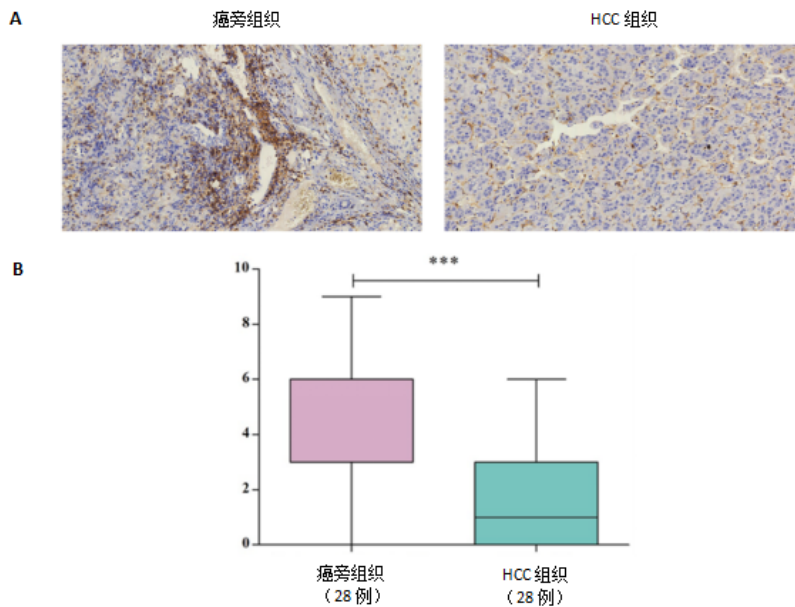


图6 免疫组织化学法检测 HCC 患者石蜡标本中 CD4 蛋白的表达

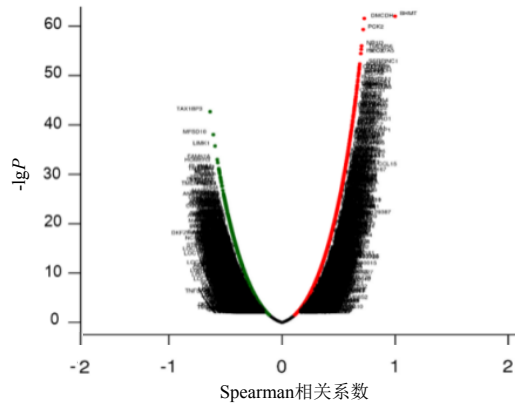
注：A 为 HCC 患者石蜡标本中 CD4 的免疫组织化学图（免疫组织化学染色， $\times 400$ ），B 为 CD4 蛋白的相对表达量，*** $P < 0.001$ 。

结果表明CD4在癌旁组织和HCC组织中的相对表达量分别为3.000（3.000， 6.000）、1.000（0.000， 3.000）， HCC组织CD4蛋白的相对表达量显著低于癌旁组织（ $U = 215, P < 0.001$ ）。以上结果提示， HCC组织中BHMT表达与免疫浸润呈负相关， 可能具有抑制炎症的作用。

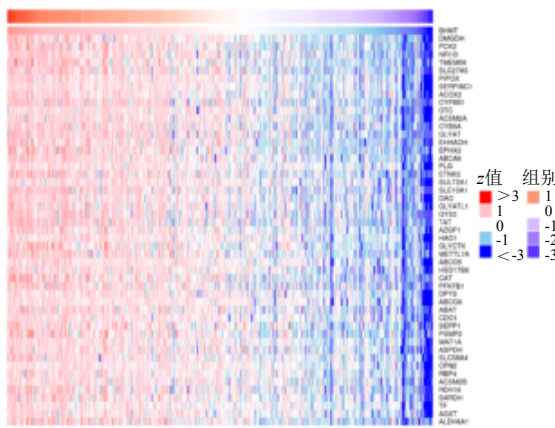
2.7 HCC组织中与BHMT相关基因分析及其GO与KEGG信号通路的富集分析 通过LinkedOmics数据库筛选HCC组织中与BHMT相关的19 922个基因， 其中7284个基因呈正相关， 12 638个基因呈负相关（图7A）。HCC组织中与BHMT表达呈正相关的前50个基因见图7B， 包括DMGDH、 PCK2、 TMEM56等； 与BHMT表达呈负相关的前50个基因见图7C， 包括TAX1BP3、 MFSD10、 LIMK1等。

利用该数据库对BHMT进行GO和KEGG信号通路富集分析。GO分析表明， HCC组织中BHMT在生物过程（biological process, BP）的富集主要与生物调节、 代谢过程、 刺激应答等有关； 在细胞成分（cell component, CC）的富集主要与细胞膜、 细胞核和膜腔等结构有关； 在分子功能（molecular function, MF）的富集主要与蛋白质结合、 离子结合和核酸结合等过程有关。（图7D）。KEGG信号通路分析结果表明， 与BHMT表达呈正相关的基因通路主要富集于物质代谢（脂质、 氨基酸、 类固醇等）和应激反应（急性炎症刺激、 异生物刺激）等（图7E）； 而与BHMT表达呈负相关基因的通路主要富集于细胞周期、 信号通路、 机体生化反应、 免疫过程）等（图7E）。

A



B



C

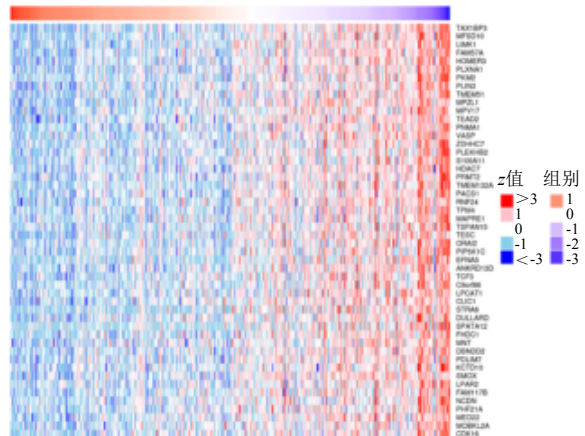


图7 HCC组织中与BHMT相关基因分析及其GO功能分析和KEGG信号通路的富集分析

注：A为Linkedomics数据库筛选与BHMT表达显著相关的差异基因；B为HCC组织中与BHMT表达呈正相关的前50个基因；C为HCC组织中与BHMT表达呈负相关的前50个基因；D为HCC组织中与BHMT基因的GO分析（BP、CC、MF）；E为HCC组织中与BHMT表达相关基因的KEGG通路分析，FDR为错误发现率（false discovery rate）。

分期、Edmondson-Steiner分级中存在差异,这可通过文献中BHMT^{-/-}小鼠能自发产生HCC进行解释^[13]。Gao等^[12]进一步揭示了BHMT在HCC发生发展中的作用,其通过HCC小鼠模型发现BHMT^{-/-}小鼠比野生型小鼠更易形成二乙基亚硝胺诱导的HCC及经皮下种植人源肝癌细胞系的肿瘤。相反,通过尾静脉注射BHMT质粒到小鼠体内可减轻BHMT^{-/-}小鼠肿瘤的形成。还有研究表明,在结肠肝样腺癌和HCC的鉴别诊断中将BHMT纳入联合分析可避免误诊,可提高HenParl和精氨酸酶1对HCC诊断的准确度^[14]。也有研究表明,BHMT、肝硬化、肿瘤大小,肿瘤数目等均是HCC患者短期总存活率的影响因素,BHMT表达与恶性肿瘤特征显著相关,其表达水平降低可能是晚期肿瘤标志之一^[15]。由此说明BHMT在HCC组织的异常表达可能与HCC的发生发展存在一定联系。

DNA甲基化可调控HCC相关基因的表达,DNA甲基化的改变在HCC早期就可能出现^[16]。本研究表明BHMT mRNA表达与其DNA甲基化水平呈负相关,且BHMT mRNA表达水平与多个甲基化位点有较强的相关性,与BHMT表达具有相关性的9个位点(cg07418518、cg18483750、cg18064071、cg10964c169、cg05890484、cg09550809、cg23514016、cg23987322)的甲基化水平在HCC组织和癌旁组织中也存在差异。可见HCC中BHMT基因表达可能与其甲基化改变有关。有研究指出在BHMT基因敲除的小鼠模型中发现了DNA位点的甲基化改变,可导致63个差异胞嘧啶鸟嘌呤(cytosine guanine, CPG)的甲基化丢失,其中有33个低甲基化的CPG岛^[17]。但要明确BHMT表达是否由DNA甲基化调控需进行更深入研究,而有研究表明S-腺苷甲硫氨酸和5'-甲硫腺苷能通过促进核转录因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)核结合和荧光素酶活性,促进BHMT甲基化,从而抑制BHMT表达^[18]。这为后续深入探究BHMT与HCC发生发展的机制提供了思路。

肿瘤微环境是肿瘤细胞生长增殖的场所,肿瘤细胞、免疫细胞、基质细胞等是肿瘤微环境的重要组成部分,这些细胞可通过相互作用来调控肿瘤进展。本研究表明,HCC中浸润的B细胞、CD4⁺T细胞、树突状细胞、中性粒细胞、巨噬细胞水平与BHMT低表达有关。B细胞来源于造血干细胞,能产生抗体,是主要的体液免疫细胞,在机体免疫和抗肿瘤免疫中发挥重要作用^[19]。与正常肝组织相比,HCC中B细胞相对比例显著降低,肿瘤浸润B细胞中

与抗原呈递和细胞增殖相关基因也减少^[20]。T细胞作为抗肿瘤免疫防御的效应细胞,通过识别肿瘤抗原来识别肿瘤细胞,表达肿瘤特异性抗原的受体,从而有效发挥控制肿瘤作用^[21]。在慢性感染和癌症中,抗原持续刺激可导致CD4⁺T细胞耗竭^[22]。巨噬细胞是组织驻留的分化单核细胞,可诱导形成具有不同活化状态和功能的M1和M2型巨噬细胞,在肿瘤预后和免疫治疗中均具有一定价值^[23]。中性粒细胞是体内数量最丰富的免疫细胞,在肿瘤微环境中具有促进或抑制肿瘤增殖的双重潜能,研究表明肿瘤中高度浸润的中性粒细胞与患者的生存预后密切相关^[24]。HCC组织中的免疫细胞间协调一致呈现抗原对于触发抗肿瘤的适应性免疫尤为重要。树突状细胞是一群具有多样化的专职抗原呈递细胞,能够捕捉肿瘤细胞的抗原,对其进行处理,并把肿瘤衍生肽呈现在主要组织相容性复合体表面,这种抗肿瘤作用在免疫反应中非常关键^[25]。基于生物信息学分析提示BHMT表达与HCC组织中的免疫浸润细胞呈负相关,但因不同数据库间数据收集和标准化存在差异,可能导致结果存在一定局限性。因此,需进一步的体内和体外研究证实具体的作用机制。本研究的临床标本验证提示HCC组织中BHMT蛋白表达水平与CD4蛋白无差异,可能原因:①用于验证的临床标本量较少,易受主观评分影响;②TIMER数据库分析得出的BHMT表达与CD4⁺T细胞浸润呈负相关,这也说明CD4 mRNA表达在HCC组织中升高,但临床样本的免疫组织化学结果显示CD4蛋白表达在HCC组织中降低,而Li等^[26]研究也表明CD4在mRNA和蛋白水平表达不一致。以上结果表明,HCC组织中BHMT表达与免疫浸润存在负相关,可能具有抑制炎症作用。

此外,KEGG信号通路分析表明,HCC组织中与BHMT呈正相关的通路主要富集于物质代谢和应激反应;BHMT相关基因分析结果表明DMGDH、PCK2等基因与BHMT呈显著正相关。有研究表明DMGDH、PCK2与物质代谢及应激反应密切相关^[27,28],因此推测BHMT可能通过调控这些基因来参与调控HCC发生发展中代谢重编程及应激过程。同时,本研究还发现HCC组织中与BHMT基因负相关的通路显著富集于细胞周期、信号转导、机体生物化学反应等通路。BHMT相关基因分析结果表明TAX1BP3、MFSD10等基因与BHMT呈显著负相关,其主要参与信号通路和细胞周期过程^[29,30]。BHMT基因敲除小鼠的体质量、脂肪组织质量均低于同背景的野生型小鼠,组织学和基因表达谱分析表明,在

BHMT基因敲除小鼠中脂肪生物学和能量代谢都发生了改变^[28]。以上结果提示BHMT可能通过调控DMGDH、PCK2等基因参与生物体的代谢,进而影响HCC的发生发展。

综上, BHMT在HCC组织中低表达, BHMT表达水平越低, HCC恶性程度越高、生存时间越短、预后越差、免疫浸润丰度越低。但BHMT在HCC发生发展中的调控作用及相关分子机制仍需更多研究证实。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

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、表格及图片进行处理。

参考文献

- GILLES H, GARBUTT T, LANDRUM J. Hepatocellular carcinoma[J]. Crit Care Nurs Clin North Am,2022,34(3):289-301.
- QIN H, SHENG W, ZHANG G, et al. Comprehensive analysis of cuproptosis-related prognostic gene signature and tumor immune microenvironment in HCC[J]. Front Genet,2023,14:1094793.
- STERNBACH S, WEST N, SINGHAL N K, et al. The BHMT-betaine methylation pathway epigenetically modulates oligodendrocyte maturation[J]. PLoS One,2021,16(5):e0250486.
- SINGHAL N K, STERNBACH S, FLEMING S, et al. Betaine restores epigenetic control and supports neuronal mitochondria in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis[J]. Epigenetics,2020,15(8):871-886.
- WESTON W C, HALES K H, HALES D B. Flaxseed increases animal lifespan and reduces ovarian cancer severity by toxically augmenting one-carbon metabolism[J]. Molecules,2021,26(18):5674.
- VAN PUYVELDE H, DIMOU N, KATSIKARI A, et al. The association between dietary intakes of methionine, choline and betaine and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis[J]. Cancer Epidemiol,2023,83:102322.
- HAZRA A, WU K, KRAFT P, et al. Twenty-four non-synonymous polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway and risk of colorectal adenoma in the nurses' health study[J]. Carcinogenesis, 2007,28(7):1510-1519.
- 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.
- PENG J P, ZHANG J, HUANG H W, et al. L-arginine-glycine amidinotransferase, betaine-homocysteine S-methyltransferase, and neuropolypeptide H3 are diminished in renal clear cell carcinoma of humans[J]. Saudi Med J,2011,32(5):467-473.
- ZENG L, ZHENG W, LIU X, et al. SDC1-TGM2-FLOT1-BHMT complex determines radiosensitivity of glioblastoma by influencing the fusion of autophagosomes with lysosomes[J]. Theranostics, 2023,13(11):3725-3743.
- Chen X, Jin J, Chang R, et al. Targeting the sulfur-containing amino acid pathway in leukemia[J]. Amino Acids,2024,56(1):47.
- GAO J, SHI X, SUN Y, et al. Deficiency of betaine-homocysteine methyltransferase activates glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) by decreasing arginine methylation of G6PD in hepatocellular carcinogenesis[J]. Sci China Life Sci,2024,67(8):1648-1665.
- TENG Y W, MEHEDINT M G, GARROW T A, et al. Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas[J]. J Biol Chem,2011,286(42):36258-36267.
- REIS H, PADDEN J, AHRENS M, et al. Differential proteomic and tissue expression analyses identify valuable diagnostic biomarkers of hepatocellular differentiation and hepatoid adenocarcinomas[J]. Pathology,2015,47(6):543-550.
- JIN B, GONG Z, YANG N, et al. Downregulation of betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) in hepatocellular carcinoma associates with poor prognosis[J]. Tumour Biol,2016,37(5):5911-5917.
- HE D, LIAO S, CAI L, et al. Integrated analysis of methylation-driven genes and pretreatment prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer,2021,21(1):599.
- LUPU D S, OROZCO L D, WANG Y, et al. Altered methylation of specific DNA loci in the liver of Bhmt-null mice results in repression of Iqgap2 and F2rl2 and is associated with development of preneoplastic foci[J]. FASEB J,2017,31(5):2090-2103.
- OU X, YANG H, RAMANI K, et al. Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine[J]. Biochem J,2007,401(1):87-96.
- BELTRAMINELLI T, DE PALMA M. Biology and therapeutic targeting of tumour-associated macrophages[J]. J Pathol,2020,250(5):573-592.
- XUE R, ZHANG Q, CAO Q, et al. Liver tumour immune microenvironment subtypes and neutrophil heterogeneity[J]. Nature,2022,612(7938):141-147.
- HATO L, VIZCAY A, EGUREN I, et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy[J]. Cancers (Basel),2024,16(5):981.
- NAGASAKI J, TOGASHI Y. A variety of 'exhausted' T cells in the tumor microenvironment[J]. Int Immunol,2022,34(11):563-570.
- SUGIURA R. Stress granules safeguard against MAPK signaling hyperactivation by sequestering PKC/Pck2: new findings and perspectives[J]. Curr Genet,2021,67(6):857-863.
- WANG Y, GAN Y, DONG Y, et al. Tax1 binding protein 3 regulates osteogenic and adipogenic differentiation through inactivating Wnt/ β -catenin signalling[J]. J Cell Mol Med,2023,27(7):950-961.
- NING J, WANG Y, TAO Z. The complex role of immune cells in antigen presentation and regulation of T-cell responses in hepatocellular carcinoma: progress, challenges, and future directions[J]. Front Immunol,2024,15:1483834.
- LI J, ZHANG Y, YANG C, et al. Discrepant mRNA and protein expression in immune cells[J]. Curr Genomics,2020,21(8):560-563.
- CHENG L C, BABOO S, LINDSAY C, et al. Identification of new transmembrane proteins concentrated at the nuclear envelope using organellar proteomics of mesenchymal cells[J]. Nucleus,2019,10(1):126-143.
- WARRIER M, PAULES E M, SILVA-GOMEZ J, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress activates FGF21 and is associated with browning and atrophy of white adipose tissue in Bhmt knockout mice[J]. Heliyon,2023,9(2):e13216.
- YANG H, ZHONG Y, GUO W, et al. TAX1BP3 is a SUMOylated nucleocytoplasmic shuttling protein and protects against vascular neointimal hyperplasia[J]. Circulation,2025,152(15):1087-1108.
- WANG S, WANG Y, GAN M, et al. Bioinformatics analysis of oxidative phosphorylation-related differentially expressed genes in osteoporosis[J]. Eur J Med Res,2025,30(1):294.

收稿日期: 2024-09-22

刘文丽, 罗达亚, 刘卓琦, 等. 甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶在肝细胞癌中的作用[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2025,17(4): 31-42.