

# MLLT1 超伸长复合亚基在肝细胞癌发生发展中的作用及其临床意义

于华婧 魏路阳 刘姗姗 管成剑 张忠涛\*

(首都医科大学附属北京友谊医院普外科, 国家消化系统疾病临床医学研究中心, 北京 100050)

**[摘要]** **目的** 探讨 MLLT1 超伸长复合亚基(MLLT1)在肝细胞癌发生中的作用以及其对肝细胞癌免疫微环境的影响。**方法** 利用多因素 Cox 回归分析以及 GEPIA、UALCAN 等肿瘤基因分析工具,探讨 MLLT1 基因在不同肿瘤中的表达情况和预后改变;利用 Real-time PCR、免疫印迹、免疫组织化学方法探讨 MLLT1 在肝细胞癌肿瘤组织和正常组织间的表达差异;利用 MTT 实验、细胞周期实验检测敲低 MLLT1 对细胞增殖和细胞周期的影响;探讨 MLLT1 与肿瘤微环境中免疫细胞及免疫浸润的相关性,以及与免疫新抗原、免疫检查点、肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性的相关性。**结果** MLLT1 基因在包括肝细胞癌在内的多种实体瘤中异常表达,敲低 MLLT1 会抑制肝癌细胞增殖能力并对细胞周期造成阻滞,且 MLLT1 的高表达与肝细胞癌的不良预后相关。MLLT1 的高表达也会影响肝细胞癌中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、中性粒细胞等免疫细胞的浸润。**结论** MLLT1 在肝细胞癌中高表达,MLLT1 能够影响肝癌细胞增殖和破坏细胞周期,并通过影响免疫微环境的稳态在肝细胞癌发生发展中扮演重要角色。

**[关键词]** MLLT1 超伸长复合亚基;肝细胞癌;生物信息学;免疫微环境;预后分析;实时定量聚合酶链反应;免疫印迹法;免疫组织化学

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2023.04.008

## Role and clinical significance of MLLT1 super elongation complex subunit in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma

YU Hua-jing, WEI Lu-yang, LIU Shan-shan, GUAN Cheng-jian, ZHANG Zhong-tao \*

(Department of General Surgery, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University and National Clinical Research Center for Digestive Diseases, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of MLLT1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and its impact on the tumor immune microenvironment. **Methods** Multivariate Cox regression analysis and tumor gene analysis tools such as GEPIA and UALCAN were used to explore the expression of the MLLT1 gene and its prognostic significance in different tumors. Real-time PCR, Western blotting, and immunohistochemistry were used to investigate the differential expression of MLLT1 between HCC tumor tissue and normal tissue. MTT assay and cell cycle analysis were performed to assess the effect of MLLT1 knockdown on cell proliferation and cell cycle. The correlation between MLLT1 and immune cells, as well as immune infiltrates in the tumor microenvironment, and their correlation with immune neoantigens, immune checkpoints, tumor mutation burden, and microsatellite instability were also explored. **Results** The MLLT1 gene was found to be aberrantly expressed in various solid tumors including HCC, and its high expression was associated with poor prognosis in HCC. Knockdown of MLLT1 inhibited HCC cell proliferation and blocked the cell cycle. High expression of MLLT1 was found to affect the content of multiple immune cells, including CD4<sup>+</sup>T cells and neutrophil granulocyte cells in the HCC microenvironment. **Conclusion** MLLT1 is highly expressed in HCC and knockdown of MLLT1 can inhibit HCC cell proliferation and block the cell cycle. MLLT1 has a certain degree of impact on the immune microenvironment of HCC. Therefore, MLLT1 may serve as a potential diagnostic biomarker and therapeutic target for HCC.

**[Key words]** MLLT1 super elongation complex subunit; Hepatocellular carcinoma; Bioinformatics; Immune microenvironment; Prognosis; Real-time PCR; Western blotting; Immunohistochemistry

**[收稿日期]** 2023-03-23 **[修回日期]** 2023-04-19

**[基金项目]** 国家自然科学基金(8207030706);国家自然科学基金青年基金(82103484, 82200964);北京市自然科学基金青年基金(7214218);北京市博士后基金(2022-ZZ-004);北京市教育委员会科技计划一般项目(KM202110025015);北京市医院管理中心青苗计划(QMS20220124)

**[作者简介]** 于华婧(1993—),女(汉族),山东省烟台市人,博士,在站博士后。

\* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: zhangzt@mail.ccmu.edu.cn Tel: (010) 63138689

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是成年人中最常见的原发性肝癌,也是肝硬化患者主要的致死原因<sup>[1,2]</sup>。肝细胞癌的发病原因主要是乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒的慢性感染,以及酗酒和代谢综合征<sup>[3]</sup>。近年来,全球开展了大规模的肝癌队列单细胞组学和表观组学图谱研究,揭示了肝细胞癌在免疫调控和表观遗传中的改变是引起其进展的关键调控机制之一<sup>[4,5]</sup>。免疫微环境稳态影响肝细胞癌发生、发展,揭示肝细胞癌免疫微环境的调控网络有助于预测新型免疫治疗靶点。MLLT1 超伸长复合亚基(MLLT1 super elongation complex subunit, MLLT1)蛋白最早因能够与谱系白血病(mixed lineage leukemia, MLL)蛋白形成 MLL-ENL 融合蛋白驱动白血病的发生而被大家熟知<sup>[6-9]</sup>,后期被发现可以作为表观识别因子,通过其 YEATS 结构域读取组蛋白乙酰化修饰在白血病和肾癌等恶性肿瘤中发挥驱动作用<sup>[10-12]</sup>。然而,其在肝细胞癌免疫调控中的功能和潜在调控机制研究还不十分清楚。因此,我们利用生物信息学及分子细胞学方法,探讨 MLLT1 在包括肝细胞癌发生发展中及肝细胞癌免疫调控中的作用,为找到影响肝细胞癌预后的潜在分子靶点提供线索。

## 材料和方法

### 1. MLLT1 在肝细胞癌等肿瘤中表达变化的生物信息学分析

以泛癌角度入手,利用癌症基因组图谱(Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库、肿瘤基因表达互相作用分析(gene expression profiling interactive analysis, GEPIA)<sup>[13,14]</sup>数据库及阿拉巴马大学伯明翰分校癌症数据库(The University of Alabama at Birmingham Cancer data analysis Portal, UALCAN)网站<sup>[15]</sup>检索 MLLT1 在包括肝细胞癌在内的多种肿瘤中的表达情况<sup>[16]</sup>,并分析 MLLT1 差异表达的癌症类型, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

根据 MLLT1 在肝癌组织中具有显著高表达的特征,选取肝细胞癌为代表深入分析 MLLT1 的表达与作用。利用 Km-plotter 网站在线分析,MLLT1 对肝细胞癌预后的影响情况。同时,利用基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)GSE124535 及 GSE25599,使用 R 语言 ggplot 2 软件包分析 MLLT1 在肝细胞癌进展中的差异表达情况,结果以箱形图呈现, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 2. MLLT1 在肝细胞癌中的表达检测

利用 Real-time PCR 对 MLLT1 mRNA 在肝细胞癌中的表达情况进行验证。采用 RNA 抽提试剂分别抽提 20 对肝细胞癌患者的癌和癌旁组织中的总

RNA,进行反转录和 PCR 扩增。引物序列:MLLT1 正向:5'-AGTCAAGCCCGTCCAACTC-3';MLLT1 反向:5'-CCTCCTCGCCTGACGAAGA-3'。

应用 Western blotting 对 MLLT1 蛋白在肝细胞癌中的表达情况进行验证,收集 6 对肝细胞癌患者的癌和癌旁组织样本,将组织匀浆、裂解后用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白质,然后转移到硝酸纤维素膜上,经 5%脱脂牛奶封闭 40 min 后,转移至抗体杂交盒中,随后加入按 1:1000 比例稀释后的兔源 MLLT1 多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:A18333)或鼠源  $\beta$ -actin 单克隆抗体(Santa cruz 公司,货号:sc-8432),4℃孵育过夜。次日用等渗缓冲液洗膜后,孵育相应的二抗(武汉艾博泰克生物科技有限公司)稀释液 1 h,使用化学发光试剂盒显影。

应用免疫组织化学实验对含有 50 例肝细胞癌患者癌和癌旁的组织芯片(北京中科光华科技有限公司)进行 MLLT1 特异性抗体染色,采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC 法),主要步骤如下:切片脱蜡至水;PBS 清洗后用 EDTA 微波修复,至沸后断电,10 min 后低火至沸;冷却后再次用 PBS 清洗,放入 3%过氧化氢中,浸泡 10 min,灭活内源性酶物质;再次用 PBS 清洗后甩干,用配置好的 5% BSA 封闭 30 min 后甩干;加相应比例的一抗冷藏冰箱 4℃孵育 12~16 h;PBS 清洗,加入 100  $\mu$ l 二抗,37℃孵育 60 min;PBS 清洗,加入 DAB 室温显色,光学显微镜下控制显色强度和um时间;三蒸水洗涤,加入苏木精复染 1 min,三蒸水洗涤后加入氨水浸泡 2 min,取出冲洗,最后在 37℃恒温箱内干燥过夜,中性树胶封片(每次 PBS 清洗均为 3 次,每次 5 min)。对 MLLT1 染色阳性部分采用免疫组织化学半定量方法进行阳性细胞计数。利用 HE 染色观察肝细胞形态和病理学改变。

### 3. MLLT1 对肝癌细胞增殖和细胞周期的影响

利用 MTT 实验检测细胞增殖能力,分为 3 组,分别将瞬时转染了 siControl、siMLLT1-1、siMLLT1-2 的 HepG2 细胞接种于 6 孔板,生长到对数期时,消化细胞并计数,稀释成每 100  $\mu$ l 体积约含  $1 \times 10^3$  个细胞的细胞悬液,充分混匀,以每孔 100  $\mu$ l 体积细胞悬液接种于 96 孔板内,连续培养 5 d;每天按比例配置并加入 CCK-8 稀释溶液(1:8),相同状况下细胞孵箱内培养 2 h 后取出,根据试剂盒说明书的推荐,检测 490 nm 处吸光度,随后进行数据分析。小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)购自苏州吉玛基因股份有限公司,siMLLT1-1 正向:5'-UCUUCUGAUACCUGAAGGCAGUGG-3'; siMLLT1-1 反向:5'-CCACUGCCUUCAGGUAUCAGGAAGA-3'; siMLLT1-2 正向:5'-GCUUCCUUCUUCUCU

GGAAACUAA-3’；siMLLT1-2 反向:5’-UUAGUUUCCAGAGAAGAAAGGAAGC-3’。

利用流式细胞术检测细胞周期, 首先将瞬时转染了 siControl、siMLLT1-1、siMLLT1-2 的 HepG2 以  $1\times10^3$  个细胞/孔的密度接种于 6 孔板, 干预 72 h 后制备成单细胞悬液, 冰乙醇固定过夜后, 按照试剂盒说明书用 PI 染色后加入 RNA 酶抑制剂, 于流式细胞仪 FL2 通道获取  $1\times10^4$  个细胞, 采用 ModFit v3.3 软件分析细胞  $G_0/G_1$ 、S、 $G_2/M$  期的百分比。

4. MLLT1 对肝细胞癌组织免疫微环境影响的分析

使用 Sangerbox 在线分析网站, 采用 ESTMATE 算法分析 MLLT1 表达与不同肿瘤免疫浸润的关系, 当  $P<0.05$  或  $R>0.2$  时, 为相关性有统计学意义; 通过计算每个肿瘤样本的新抗原数量, 探讨 MLLT1 表达与抗原数量的关系, 当  $P<0.05$  或  $R>0.2$  时, 为相

关性有统计学意义; 采用 *Spearman* 相关分析 33 种肿瘤组织 MLLT1 表达与肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMB) 和微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 的相关性。

结 果

1. 癌症多组学数据库深度解析 MLLT1 在泛癌尤其是肝细胞癌中的表达情况

为了探讨 MLLT1 在肿瘤中的作用, 我们首先利用 R 语言工具分析了 TCGA 数据库中 MLLT1 mRNA 在 33 种不同肿瘤组织中的表达情况。结果显示, MLLT1 在包括肝细胞癌在内的多种实体瘤中表达升高 (图 1), 提示 MLLT1 异常高表达与上述肿瘤的发生相关。本研究所涉及肿瘤相关中英文全称及缩写详见表 1。

表 1 中英文对照表  
Table 1 English-Chinese bilingual table

中文名称 Chinese name	英文名称 English name	缩写 abbrivation
肾上腺皮质癌	adrenocortical carcinoma	ACC
膀胱尿路上皮癌	bladder urothelial carcinoma	BLCA
乳腺浸润癌	breast invasive carcinoma	BRCA
宫颈鳞癌和腺癌	cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma	CESC
胆管癌	cholangiocarcinoma	CHOL
结肠癌	colon adenocarcinoma	COAD
弥漫性大 b 细胞淋巴瘤	lymphoid neoplasm diffuse large b-cell lymphoma	DLBC
食管癌	esophageal carcinoma	ESCA
多形成性胶质细胞瘤	glioblastoma multiforme	GBM
头颈鳞状细胞癌	head and neck squamous cell carcinoma	HNSC
肾嫌色细胞癌	kidney chromophobe	KICH
肾透明细胞癌	kidney renal clear cell carcinoma	KIRC
肾乳头状细胞癌	kidney renal papillary cell carcinoma	KIRP
急性髓细胞样白血病	acute myeloid leukemia	LAML
脑低级别胶质瘤	brain lower grade glioma	LGG
肝细胞肝癌	liver hepatocellular carcinoma	LIHC
肺腺癌	lung adenocarcinoma	LUAD
肺鳞癌	lung squamous cell carcinoma	LUSC
间皮瘤	mesothelioma	MESO
卵巢浆液性囊腺癌	ovarian serous cystadenocarcinoma	OV
胰腺癌	pancreatic adenocarcinoma	PAAD
嗜铬细胞瘤和副神经节瘤	pheochromocytoma and paraganglioma	PCPG
前列腺癌	prostate adenocarcinoma	PRAD
直肠腺癌	rectum adenocarcinoma	READ
肉瘤	sarcoma	SARC
皮肤黑色素瘤	skin cutaneous melanoma	SKCM
胃癌	stomach adenocarcinoma	STAD
睾丸癌	testicular germ cell tumors	TGCT
甲状腺癌	thyroid carcinoma	THCA
胸腺癌	thymoma	THYM
子宫内膜癌	uterine corpus endometrial carcinoma	UCEC
子宫肉瘤	uterine carcinosarcoma	UCS
葡萄膜黑色素瘤	uveal melanoma	UVM
mlt1 超伸长复合亚基	mlt1 super elongation complex subunit	MLLT1
肿瘤突变负荷	tumor mutational burden	TMB
卫星不稳定性	microsatellite instability	MSI

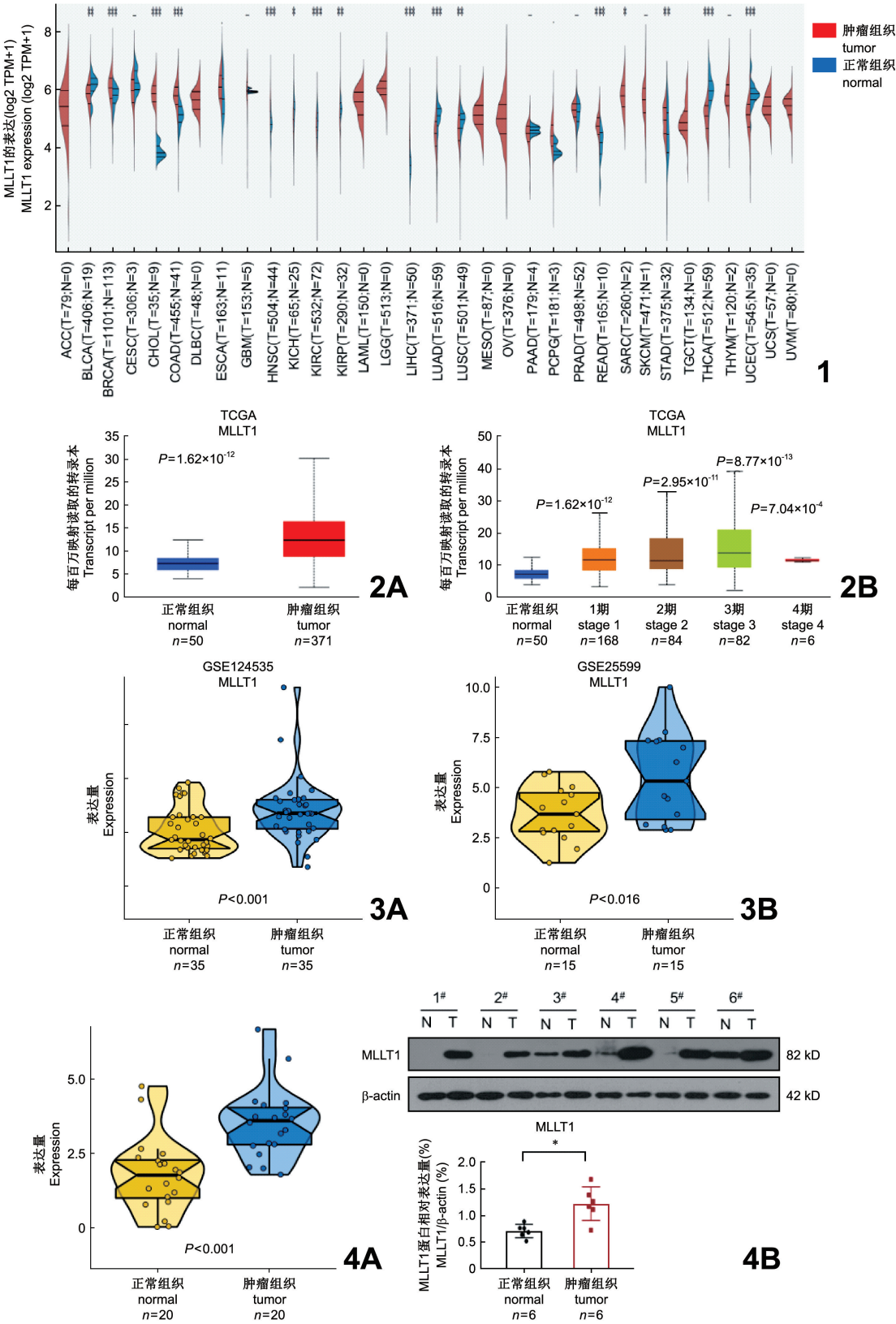


图1 MLLT1 mRNA在不同癌组织与正常组织中的表达差异

ACC. 肾上腺皮质癌;BLCA. 膀胱尿路上皮癌;BRCA. 乳腺浸润癌;CESC. 宫颈鳞癌和腺癌;CHOL.胆管癌;COAD. 结肠癌;DLBC. 弥漫性大B细胞淋巴瘤;ESCA. 食管癌;GBM. 胶质细胞瘤;HNSC. 头颈鳞状细胞癌;KICH. 肾嫌色细胞癌;KIRC. 肾透明细胞癌;KIRP. 肾乳头状细胞癌;LAML. 急性髓性白血病;LGG. 低级别胶质瘤;LIHC. 肝细胞癌;LUAD. 肺腺癌;LUSC. 肺鳞癌;MESO. 间皮瘤;OV. 卵巢浆液性囊腺癌;PAAD. 胰腺癌;PCPG. 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤;PRAD. 前列腺癌;READ. 直肠癌;SARC. 肉瘤;SKCM. 皮肤黑色素瘤;STAD. 胃癌;TGCT. 睾丸癌;THCA. 甲状腺癌;THYM. 胸腺癌;UCEC. 子宫内膜癌;UCS. 子宫肉瘤;UVM. 葡萄膜黑色素瘤

图2 MLLT1在TCGA肝细胞癌患者癌组织与癌旁组织(A)和不同级别肝细胞癌(B)中的表达差异

图3 MLLT1在GEO数据集肝细胞癌患者肿瘤组织和癌旁组织的表达差异

图4 MLLT1 在肝细胞癌肿瘤组织中的 mRNA (A) 和蛋白水平 (B) 均显著高于癌旁组织 T. 肿瘤组织;N. 正常组织

Fig.1 The mRNA expression difference of MLLT1 in different cancer tissues and normal tissues

ACC, Adrenocortical carcinoma;BLCA, Bladder urothelial carcinoma;BRCA, Breast invasive carcinoma;CESC, Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma;CHOL, Cholangio carcinoma;COAD, Colon adenocarcinoma;DLBC, Diffuse large B-cell lymphoma;ESCA, Esophageal carcinoma;GBM, Glioblastoma multiforme;HNSC, Head and neck squamous cell carcinoma;KICH, Kidney chromophobe carcinoma;KIRC, Kidney renal clear cell carcinoma;KIRP, Kidney renal papillary cell carcinoma;LAML, Acute myeloid leukemia;LGG, Brain low-grade glioma;LIHC, Liver hepatocellular carcinoma;LUAD, Lung adenocarcinoma;LUSC, Lung squamous cell carcinoma;MESO, Mesothelioma;OV, Ovarian serous cystadenocarcinoma;PAAD, Pancreatic adenocarcinoma;PCPG, Pheochromocytoma and paraganglioma;PRAD, Prostate adenocarcinoma;READ, Rectum adenocarcinoma;SARC, Sarcoma;SKCM, Skin cutaneous melanoma;STAD, Stomach adenocarcinoma;TGCT, Testicular germ cell tumor;THCA, Thyroid carcinoma;THYM, Thymoma;UCEC, Uterine corpus endometrial carcinoma;UCS, Uterine carcinosarcoma;UVM, Uveal melanoma

Fig.2 The expression of MLLT1 in hepatocellular carcinoma

A, The expression difference of MLLT1 in hepatocellular carcinoma tissues and normal tissues; B, The expression difference of MLLT1 on individual cancer stages

Fig.3 The expression difference of MLLT1 in tumor tissue and paracancer tissue of hepatocellular carcinoma patients in GEO dataset

Fig.4 The mRNA (A) and protein (B) levels of MLLT1 in hepatocellular carcinoma were significantly higher than those in paracancer tissue T. Tumor; N, Normal

由于 MLLT1 在肝细胞癌中的作用不甚清楚,因此深入分析 MLLT1 在肝癌中的表达与临床意义具有十分重要的意义。我们聚焦在肝细胞癌中,利用 UALCAN 工具分析 TCGA 数据集 371 份肝癌组织和匹配的 50 份癌旁组织样品中 MLLT1 的表达情况,发现 MLLT1 在肝癌组织中的表达高于正常组织(图 2);我们还使用 UALCAN 工具分析检测了 TCGA 数据集中不同进展阶段的肝细胞癌患者肿瘤组织以及匹配的正常组织中 MLLT1 的表达情况,发现 MLLT1 的表达与肝细胞癌的组织学分级相关,在 3 期肝细胞癌中 mRNA 水平增高最为显著(图 2)。更进一步地,我们利用 R 语言对 GEO 网站上下下载的 GSE124535 数据集、GSE25599 数据集进行分析,与 TCGA 分析结果相一致,MLLT1 在肝细胞癌组织中异常高表达(图 3)。

2. MLLT1 在临床肝癌组织及正常组织中的表达

本研究收集了 20 对肝细胞癌及癌旁组织进行 Real-time PCR 检测,结果显示,肝细胞癌组织中 MLLT1 mRNA 显著高于癌旁组织( $P<0.001$ ,图 4A)。我们还通过 Western blotting 的方法检测了 6 对新鲜的肝细胞癌和癌旁组织中 MLLT1 蛋白表达水平,结果显示,肝细胞癌组织中 MLLT1 表达水平显著高于癌旁组织(图 4B)。

为了探讨 MLLT1 在肝细胞癌临床病理层面扮演的角色,我们对含有 50 例肝细胞癌患者及癌旁组织的组织芯片进行 MLLT1 特异性抗体免疫组织化学染色实验,结果发现,MLLT1 主要定位于肝细胞癌肿瘤组织的细胞核内,在肿瘤组织中的表达量明显高于癌旁组织(图 5,表 2),结果与生物信息学分析及 mRNA、蛋白水平检测结果相一致。

3. MLLT1 对肝细胞癌细胞增殖能力、细胞周期调控和临床预后的影响

为了探讨 MLLT1 对肝癌细胞增殖能力和细胞

表 2 MLLT1 在肝细胞癌和相应癌旁组织的表达情况

Table 2 The expression of MLLT1 in HCC tissues and adjacent tissues

分组 groups	n	MLLT1 表达[ n(%) ] MLLT1 expression[ n(%) ]	
		高表达 (high)	低表达 (low)
肝细胞癌 hepatocellular carcinoma	50	32 (66.00)	17 (34.00)
癌旁组织 paracancer tissue	50	8 (16.00) *	42 (84.00) *

与肝细胞癌组相比较, \*  $P<0.001$   
Compared with the hepatocellular carcinoma group, \*  $P<0.001$

周期的影响,我们瞬时转染 siControl、siMLLT1-1、siMLLT1-2,进行 MTT 增殖实验和流式细胞学实验。我们发现,敲低 MLLT1, HepG2 细胞的增殖能力减弱(图 6),大部分细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期(图 7)。

另外,为了进一步探讨 MLLT1 是否参与了肝细胞癌的发生发展,我们进一步分析了 113 例 MLLT1 高表达和 251 例 MLLT1 低表达肝细胞癌患者的预后情况。生存分析曲线结果表明,MLLT1 高表达 [ 风险比率 (hazard ratio, HR) = 1.57,  $P = 0.025$  ] 与肝细胞癌患者较差的生存率相关(图 8)。因此,以上结果共同提示,MLLT1 的异常高表达与肝细胞癌的发生发展密切相关。

4. MLLT1 表达对肝细胞癌组织免疫微环境的影响

肝细胞癌中肿瘤微环境与免疫治疗的效果有着深层的联系,解析肿瘤微环境的特征有利于进一步理解癌症的进展和转移情况。因此,我们首先应用 Sangerbox 分析 MLLT1 的表达是否与肿瘤细胞的免疫浸润水平相关,结果发现,其在肝细胞癌中与 B 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、中性粒细胞等多种免疫细胞成正相关(图 9)。同时,我们还发现 MLLT1 在其他癌症中也与多种肿瘤细胞免疫浸润相关,具体免疫机制亟待探讨。

我们进一步提取常见的免疫检查点和免疫新抗

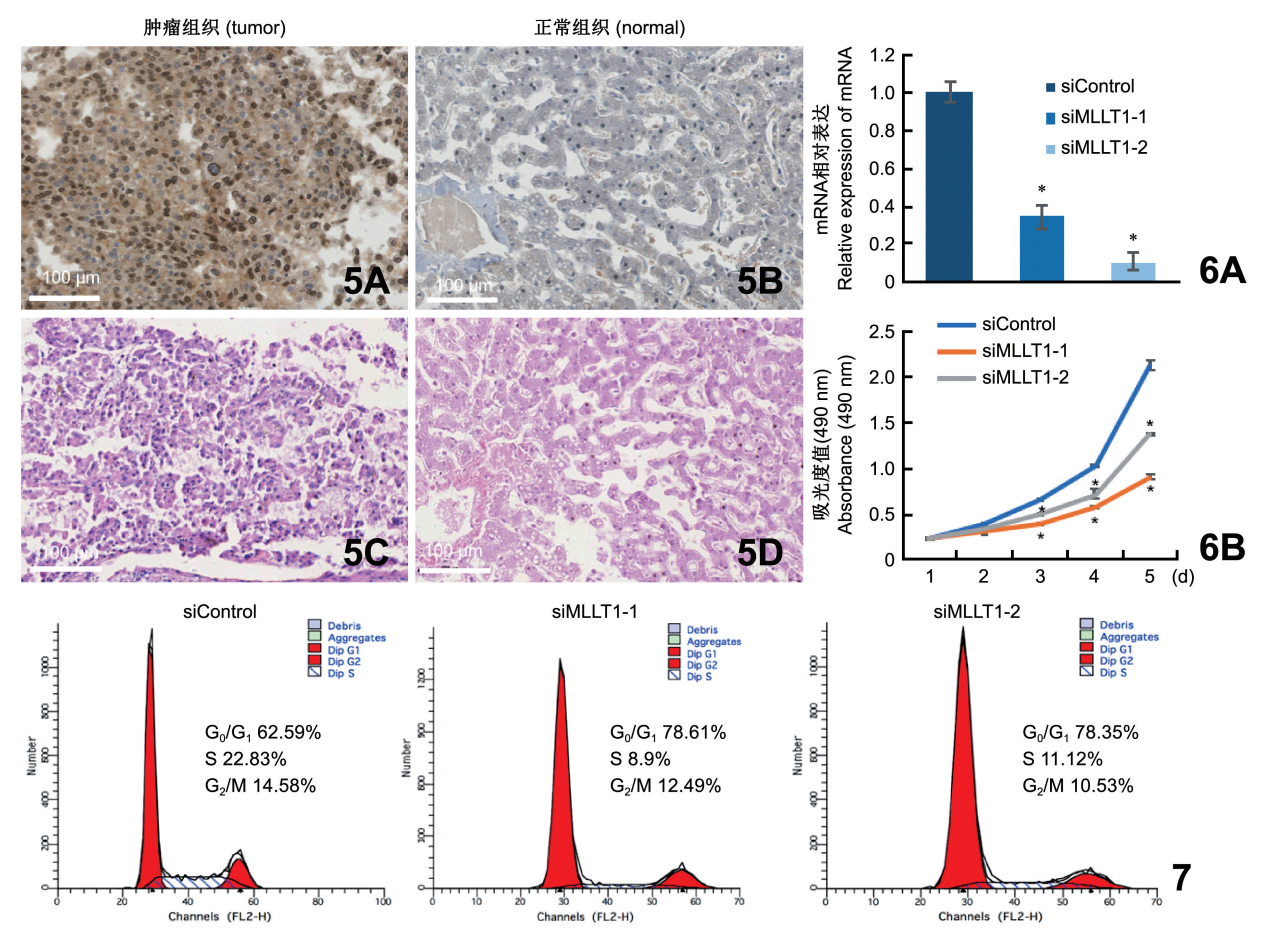


图 5 MLLT1 在肝细胞癌患者肿瘤组织和癌旁组织的免疫组织化学和 HE 染色结果 标尺示 100 μm

图 6 MLLT1 影响肝细胞癌细胞的增殖能力

A. 在人肝癌 HepG2 细胞中转染对照组、siMLLT1-1、siMLLT1-2 并进行 mRNA 水平检测; B. 将对照组、siMLLT1-1、siMLLT1-2 组细胞分别进行过细胞增殖实验生长曲线测定,误差线代表 3 次生物学重复的均值±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ );与对照组相比, \*  $P < 0.05$

图 7 MLLT1 影响肝癌细胞周期

Fig.5 Immunohistochemical and HE staining results of MLLT1 in tumor tissue and paracancer tissue of patients with hepatocellular carcinoma Bar = 100 μm

Fig.6 The effects of MLLT1 on hepatocyte proliferation

A, HepG2 cells were infected with siControl, siMLLT1-1, siMLLT1-2, the relative expression of MLLT1 mRNA were determined; B, The growth curves of siControl, siMLLT1-1 or siMLLT1-2 groups were measured with MTT assay; Each point represents the  $\bar{x}\pm s$  for three independent experiments; Compared with the control group, \*  $P < 0.05$

Fig.7 MLLT1 affects the cell cycle of liver cancer

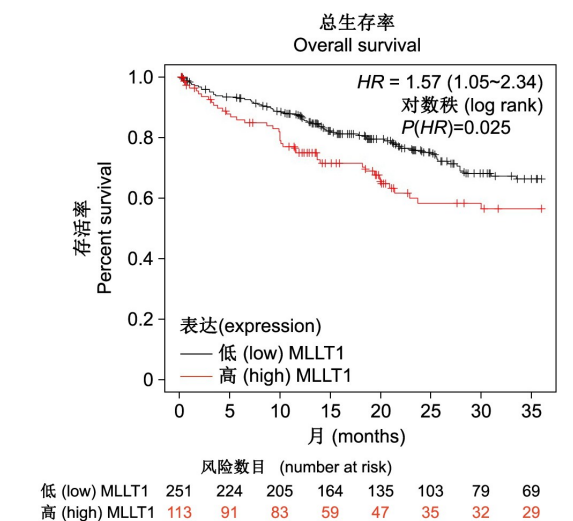


图 8 MLLT1 高表达与肝细胞癌患者的不良预后成正相关

Fig.8 High expression of MLLT1 was positively correlated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma patients

原相关基因,分别计算其与 MLLT1 的共表达情况,结果发现,MLLT1 表达在包括肝细胞癌在内的多种不同类型肿瘤中与免疫检查点基因的表达水平和新抗原数量成正相关(图 10)。

Spearman 相关分析结果发现,MLLT1 在 THYM、THCA、STAD、GBM、UCEC、LGG、BRCA、ESCA、ACC 中的表达与肿瘤突变负荷具有相关性(图 11A); MLLT1 在 CESC、BRCA、UCEC、SARC、PRAD、LUSC、LUAD、LIHC、KICH 中与微卫星不稳定性成正相关,而在 COAD、READ 中与微卫星不稳定性成负相关(图 11B)。

## 讨 论

近 10 年来,尽管 HBV 疫苗接种范围的推进, HCV 感染的治愈率增加以及临床管理的改善和科



图 11 肿瘤组织中 MLLT1 表达与肿瘤突变负荷(A)和微卫星不稳定性(B)的相关性

Fig.9 Correlation between MLLT1 expression and tumor immunoinfiltration

Fig.10 Correlation between MLLT1 expression with immune checkpoint genes and immune neoantigens in tumors

Fig.11 Correlation between MLLT1 expression in tumor tissue and tumor mutation load (A)and microsatellite instability (B)

学研究的进步有目共睹,但肝细胞癌引起的死亡人数仍然是个越来越令人担忧的问题<sup>[1~3]</sup>。多项研究表明,表观遗传因子的表达及活性调控网络直接影响着肿瘤的发生发展,这些蛋白及影响的信号通路的调控和作用方式是分子肿瘤学的重要科学问题。因此,寻找到一个有效的肿瘤相关蛋白作为治疗靶点,对于肝癌的整体治疗效果的提高意义重大。

在真核细胞中,蛋白质翻译后修饰可以通过条件蛋白质活性、稳定性以及互相作用网络使得细胞响应外界刺激维持正常的生理功能<sup>[17~19]</sup>。蛋白质翻译后修饰的水平依赖酰基转移酶和去酰化修饰酶的动态平衡而发生变化。酰化修饰的识别因子则可以通过结合修饰分子参与基因转录调控发挥生理功能。目前发现的主要酰化修饰识别结构域包括溴结构域、YEATS 结构域等<sup>[20~22]</sup>,其中 MLLT1 的 YEATS 结构域能够在白血病、肾癌中发生突变,促进其对乙酰化的识别和靶基因的激活,破坏发育过程中的正常细胞命运<sup>[23]</sup>。我们发现,MLLT1 在肝癌中高度扩增和异常表达,且直接影响肝细胞的细胞周期维持和增殖能力,但是否依赖于其识别乙酰化修饰的功能还有待后续更深入的机制研究。

此外,新近研究显示肝癌的进展与肿瘤免疫微环境息息相关<sup>[24~27]</sup>。然而,目前缺乏全面系统的生物信息学分析总结 MLLT1 在肿瘤免疫中的作用,以及其是否能够影响免疫细胞的浸润,以及免疫检查点基因表达,都有待进一步探索。本研究发现,MLLT1 在肝细胞癌中与中性粒细胞、巨噬细胞和 CD4<sup>+</sup> T 细胞的免疫浸润相关,并且与多种免疫调控因子的表达具有相关性。同时,MLLT1 的表达也对其他肿瘤中的免疫微环境造成影响,并呈现出因肿瘤类型所不同的免疫调控特征,未来在泛癌层面进一步揭示 MLLT1 在免疫调控中的作用有助于我们筛选 MLLT1 发挥潜在在特异性生物标志物功能的肿瘤类型。

本研究以 TCGA、GEO 等数据库的信息为基础,采用 GEPIA<sup>[13,15]</sup>、UALCAN<sup>[15]</sup>、R 语言等分析工具,探讨了 MLLT1 在肝细胞癌等多种癌症中的表达变化,随后聚焦 MLLT1 在肝细胞癌中的临床意义,通过检测临床组织标本中 MLLT1 mRNA 和蛋白水平变化,证实了其在肝细胞癌中表达增加,并在肝癌细胞系中验证了 MLLT1 可促进肝癌的发生发展;接下来,我们从肿瘤免疫微环境的角度阐述了 MLLT1 与

肿瘤细胞免疫浸润的关系,揭示了其与多种免疫相关因子的相互作用。以上将为肝细胞癌的早期诊断和免疫治疗提供新的实验基础和理论依据。

参 考 文 献

[ 1 ] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma [ J ]. N Engl J Med, 2019, 380(15): 1450-1462.

[ 2 ] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [ J ]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314.

[ 3 ] Gao Q, Zhu H, Dong L, et al. Integrated proteogenomic characterization of HBV-related hepatocellular carcinoma [ J ]. Cell, 2019, 179(2): 561-577 e522.

[ 4 ] Yang Z, Yan C, Ma J, et al. Lactylome analysis suggests lactylation-dependent mechanisms of metabolic adaptation in hepatocellular carcinoma [ J ]. Nat Metab, 2023, 5(1): 61-79.

[ 5 ] Bayo J, Fiore EJ, Dominguez LM, et al. A comprehensive study of epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma identifies potential therapeutic targets [ J ]. J Hepatol, 2019, 71(1): 78-90.

[ 6 ] Hu H, Saha N, Yang Y, et al. The ENL YEATS epigenetic reader domain critically links MLL-ENL to leukemic stem cell frequency in t(11;19) Leukemia [ J ]. Leukemia, 2023, 37(1): 190-201.

[ 7 ] Takacova S, Slany R, Bartkova J, et al. DNA damage response and inflammatory signaling limit the MLL-ENL-induced leukemogenesis in vivo [ J ]. Cancer Cell, 2012, 21(4): 517-531.

[ 8 ] Ui A, Nagaura Y, Yasui A. Transcriptional elongation factor ENL phosphorylated by ATM recruits polycomb and switches off transcription for DSB repair [ J ]. Mol Cell, 2015, 58(3): 468-482.

[ 9 ] Mueller D, Bach C, Zeisig D, et al. A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification [ J ]. Blood, 2007, 110(13): 4445-4454.

[ 10 ] Erb MA, Scott TG, Li BE, et al. Transcription control by the ENL YEATS domain in acute leukaemia [ J ]. Nature, 2017, 543(7644): 270-274.

[ 11 ] Wan L, Wen H, Li Y, et al. ENL links histone acetylation to oncogenic gene expression in acute myeloid leukaemia [ J ]. Nature, 2017, 543(7644): 265-269.

[ 12 ] Liu Y, Li Q, Alikarami F, et al. Small-molecule inhibition of the acyl-lysine reader ENL as a strategy against acute myeloid leukemia [ J ]. Cancer Discov, 2022, 12(11): 2684-2709.

[ 13 ] Li C, Tang Z, Zhang W, et al. GEPIA2021: integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA [ J ]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(W1): W242-W246.

[ 14 ] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [ J ]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W98-W102.

[ 15 ] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses [ J ]. Neoplasia, 2017, 19(8): 649-658.

[ 16 ] Guan ChJ, Yu HJ, Zhang XD, et al. Expression and clinical significance of phosphoglycerate kinase 1 in hepatocellular

carcinoma based on bioinformatics methods [J]. Acta Anatomica Sinica, 2022, 53(6): 744-753. (in Chinese)

管成剑, 于华婧, 张小东, 等. 基于癌症多组学数据库深度解析磷酸甘油激酶 1 在肝细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 解剖学报, 2022, 53(6): 744-753.

[17] Zhang D, Tang Z, Huang H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation [J]. Nature, 2019, 574(7779): 575-580.

[18] Yu H, Bu C, Liu Y, et al. Global crotonylome reveals CDYL-regulated RPA1 crotonylation in homologous recombination-mediated DNA repair [J]. Sci Adv, 2020, 6(11): eaay4697.

[19] Sabari BR, Zhang D, Allis CD, et al. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations [J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2017, 18(2): 90-101.

[20] Zhao D, Guan H, Zhao S, et al. YEATS2 is a selective histone crotonylation reader [J]. Cell Research, 2016, 26(5): 629-632.

[21] Li Y, Sabari Benjamin R, Panchenko T, et al. Molecular coupling of histone crotonylation and active transcription by AF9 YEATS domain [J]. Mol Cell, 2016, 62(2): 181-193.

[22] Asiaban JN, Milosevich N, Chen E, et al. Cell-based ligand discovery for the ENL YEATS domain [J]. ACS Chem Biol, 2020,

15(4): 895-903.

[23] Kabra A, Bushweller J. The intrinsically disordered proteins MLLT3 (AF9) and MLLT1 (ENL)-multimodal transcriptional switches with roles in normal hematopoiesis, MLL fusion leukemia, and kidney cancer [J]. J Mol Biol, 2022, 434(1): 167117.

[24] Gougelet A. Epigenetic modulation of immunity: towards new therapeutic avenues in hepatocellular carcinoma [J]? Gut, 2019, 68(10): 1727-1728.

[25] Wang S, Wu Q, Chen T, et al. Blocking CD47 promotes antitumour immunity through CD103(+) dendritic cell-NK cell axis in murine hepatocellular carcinoma model [J]. J Hepatol, 2022, 77(2): 467-478.

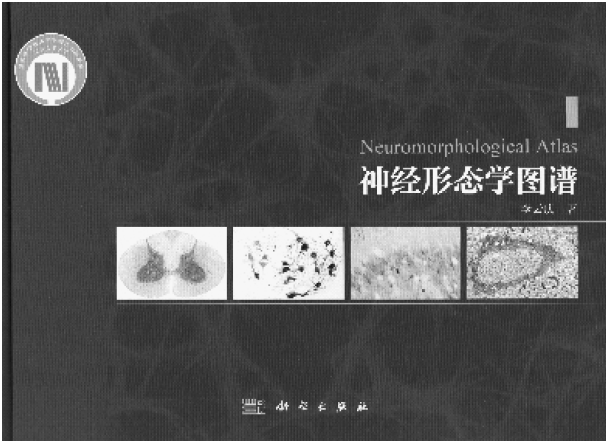
[26] Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, et al. B7-1 (CD80)-gene transfer combined with interleukin-12 administration elicits protective and therapeutic immunity against mouse hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 1999, 30(2): 422-429.

[27] Hattori E, Okumoto K, Adachi T, et al. Possible contribution of circulating interleukin-10 (IL-10) to anti-tumor immunity and prognosis in patients with unresectable hepatocellular carcinoma [J]. Hepatol Res, 2003, 27(4): 309-314.

(编辑 张艳)

• 书讯 •

《神经形态学图谱》出版



长期以来,对神经系统结构和功能的探索始终处于生命科学的前沿地位。各种先进的神经形态学研究技术的发明和应用,不断丰富着人们对神经系统的认识和理解。既往关于神经形态学的书籍多通过文字来介绍技术原理和操作步骤等,但在实际应用中,不同研究者和学生在方法理解和结果辨认等方面存在较大差异。因此,急需一部好的图谱来引导研究者和学生深入了解相关技术,以便熟练应用到自己的研究中。

《神经形态学图谱》由国家科学技术学术著作出版基金资助,由中国解剖学会理事长、空军军医

大学李云庆教授历时 8 年多,收集整理国内外 62 位学者提供的 330 幅精美图片编撰而成,是国内首部主要借助图片系统介绍神经形态学结构的图谱。

本图谱采用理论说明与实践结果相结合的方式,围绕传统神经形态学染色技术、神经纤维束路示踪技术、化学神经解剖学技术和电子显微镜技术 4 个主题,系统、全面展示了神经形态学研究技术的原理、优缺点及其所显示的神经结构。文字介绍与实验结果相互映衬、相互辅佐,使相关技术的科学内涵更加形象直观、便于理解和记忆。

本图谱按照先简单、后复杂,先发育、后成年,先外周、后中枢的规律排列图片,在图片的选择上也极力提倡各类神经形态学技术方法的综合应用,以便读者对神经形态学技术和神经系统的结构形成深刻的理解。此外,本图谱在图片的标注、裁剪、排列、组合等方面,也有值得读者借鉴之处。

正是基于本书的上述特点,中国科学院杨雄里教授在其“序”中对该图谱倾情力荐:“该图谱的出版将为学生们学习和了解神经系统的形态结构、学习神经科学的相关知识提供帮助,对于临床医务工作者或神经科学研究人员来说更是一本案头必备的工具书。”

希望本书的出版能够帮助广大读者更好地学习神经解剖学,探索神经系统的奥秘。