

EHHADH 是肝细胞癌脂肪酸代谢通路的关键基因 基于转录组分析

谢思雨, 李森生, 江峰乐, 易茜, 杨魏

南方医科大学基础医学院病理学教研室, 广东 广州 510515

摘要:目的 基于多数据库数据探索肝细胞癌(HCC)发生发展的驱动基因并挖掘HCC治疗的新生物靶点。方法 采用从TCGA、GEO和ICGC数据库中获取的858例HCC组织数据与493例癌旁组织数据(共1351例转录组和基因组数据),运用GSEA筛选HCC与癌旁的差异通路,进而筛选差异通路中显著富集的基因,获得Hub基因3-hydroxyacyl CoA脱氢酶(EHHADH)。基于TCGA的HCC数据集分析与EHHADH转录组水平下调相关的基因突变,发现TP53突变最显著相关。利用相关性分析探究TP53突变导致EHHADH表达下调的机制。基于Metascape数据库预测EHHADH参与HCC发展的信号通路,发现与铁死亡信号通路显著相关。对30例HCC癌组织及配对的癌旁正常组织进行免疫组化染色,验证EHHADH的表达情况。结果 三个HCC数据集均显示EHHADH在癌组织中相对于癌旁组织显著低表达($P<0.05$),且和肝细胞去分化程度显著相关($P<0.01$)。TCGA的HCC数据集体细胞突变景观分析显示HCC患者基因组中TP53突变率比例最高。EHHADH上游基因PPARGC1A转录组水平在TP53突变的HCC患者组中较未突变组显著下调($P<0.05$),并与EHHADH表达水平相关。GO和KEGG富集分析结果显示EHHADH参与到肿瘤脂肪酸代谢通路中。免疫组化结果验证HCC组织中EHHADH表达水平下调,且其表达水平与肝细胞去分化程度及铁死亡进程相关。结论 HCC组织中TP53突变可能诱导EHHADH上游基因PPARGC1A表达异常从而下调EHHADH表达。EHHADH在HCC癌组织中低表达与HCC癌组织的去分化程度加重及出现铁死亡逃逸现象密不可分,有可能成为HCC潜在治疗靶点。

关键词:肝细胞肝癌;3-hydroxyacyl CoA脱氢酶;TP53突变;去分化;铁死亡

EHHADH is a key gene in fatty acid metabolism pathways in hepatocellular carcinoma: a transcriptomic analysis

XIE Siyu, LI Miaosheng, JIANG Fengle, YI Qian, YANG Wei

Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the driving gene of hepatocellular carcinoma (HCC) occurrence and progression and its potential as new therapeutic target of HCC. **Methods** The transcriptome and genomic data of 858 HCC tissues and 493 adjacent tissues were obtained from TCGA, GEO, and ICGC databases. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) identified EHHADH (encoding enoyl-CoA hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) as the hub gene in the significantly enriched differential pathways in HCC. The downregulation of EHHADH expression at the transcriptome level was found to correlate with TP53 mutation based on analysis of the TCGA-HCC dataset, and the mechanism by which TP53 mutation caused EHHADH downregulation was explored through correlation analysis. Analysis of the data from the Metascape database suggested that EHHADH was strongly correlated with the ferroptosis signaling pathway in HCC progression, and to verify this result, immunohistochemical staining was used to examine EHHADH expression in 30 HCC tissues and paired adjacent tissues. **Results** All the 3 HCC datasets showed significantly lowered EHHADH expression in HCC tissues as compared with the adjacent tissues ($P<0.05$) with a close correlation with the degree of hepatocyte de-differentiation ($P<0.01$). The somatic landscape of HCC cohort in TCGA dataset showed that HCC patients had the highest genomic TP53 mutation rate. The transcriptomic level of PPARGC1A, the upstream gene of EHHADH, was significantly downregulated in HCC patients with TP53 mutation as compared with those without the mutation ($P<0.05$), and was significantly correlated with EHHADH expression level. GO and KEGG enrichment analyses showed that EHHADH expression was significantly correlated with abnormal fatty acid metabolism in HCC. The immunohistochemical results showed that the expression level of EHHADH in HCC tissues was down-regulated, and its expression level was related to the degree of hepatocytes de-differentiation and the process of ferroptosis. **Conclusion** TP53 mutations may induce abnormal expression of PPARGC1A to cause downregulation of EHHADH expression in HCC. The low expression of EHHADH is closely associated with aggravation of de-differentiation and ferroptosis escape in HCC tissues, suggesting the potential of EHHADH as a therapeutic target for HCC.

Keywords: hepatocellular carcinoma; enoyl-CoA hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; TP53 mutation; de-differentiation; ferroptosis

肝癌是我国一种常见的恶性肿瘤,恶性程度较高,病情进展较快^[1],也是60岁以下男性癌症死亡的主要原

收稿日期:2022-11-12

基金项目:科技部重点研发计划(2018YFA0800404)

作者简介:谢思雨,硕士,E-mail: 1025493266@qq.com

通信作者:杨魏,博士,教授,E-mail: yanglabgz@163.com;易茜,博士,

讲师,E-mail: yiqian2010@yeah.net

因^[2]。其中,肝细胞癌(HCC)占原发性肝癌的70%~80%^[3]。由于HCC通常被诊断为晚期,因此许多患者错过了最佳的治疗方法。HCC的发生机制还未研究透彻,且由于HCC是由多种致病因素引起的复杂疾病,有必要阐明HCC发生发展的潜在分子机制,特别是寻找潜在的分子生物学标记物来改善HCC患者的预后。既

往研究鉴定了甲胎蛋白、Glypican-3 等蛋白质为 HCC 发生发展的重要生物标志物,但由于 HCC 的异质性,其敏感性和特异度较低^[4]。随着基因测序技术和生物信息学数据的快速发展,人们将基因特征与临床参数相结合,以期提高 HCC 患者的预后^[5]。在生物信息学中,基因表达总览(GEO)、肿瘤基因组图谱(TCGA)、基因表达谱交互分析(GEPIA)、人类蛋白质图谱(HPA)等公共数据库是常用的数据库,Kaplan-Meier 绘图仪是分析基因预后价值的工具。通过这些技术,既往研究发现了与 HCC 的发生发展及预后相关的 Hub 基因^[6]。本研究通过运用 GSEA 筛选 HCC 组织与癌旁组织的差异通路,分析发现 Hub 基因 Enoyl-CoA 水合酶和 3-hydroxyacyl CoA 脱氢酶(EHHADH)作为重要分子参与到数条显著改变的脂肪酸代谢相关通路中。

EHHADH 是 3-hydroxyacyl-CoA 脱氢酶家族的成员,是过氧化体β氧化途径的四种酶之一,催化长链二羧酸降解,在肝细胞过氧化物酶脂肪氧化通路中起到重要作用^[7]。脂肪酸的β-氧化发生在线粒体和过氧化物体中。在线粒体中,脂肪酸分子被分解成乙酰辅酶 A,后者在柠檬酸循环中被氧化成二氧化碳以产生能量^[8,9]。在超长链脂肪酸的分解、胆汁酸的合成和髓鞘脂类的合成中,都涉及到过氧化物酶的β-氧化^[10,11]。最近,过氧化物体在人类健康方面受到了关注,它可能对许多疾病产

生影响,如神经退行性变、年龄相关疾病和癌症^[12]。过氧化物体功能障碍与 HCC 肿瘤细胞中多种代谢紊乱有关^[13]。既往研究表明 EHHADH 与多种肿瘤例如骨肉瘤、卵巢癌等的发生发展及耐药相关^[14-16]。然而,该基因在 HCC 中的表达与作用尚未被阐明。

本研究基于 GEO 数据库、TCGA 数据库、ICGC 数据库等,初步探讨了 HCC 组织中 EHHADH 的表达水平及对 HCC 的预后影响。推测 TP53 突变可能与 EHHADH 上游基因 PPARGC1A 转录组水平异常相关,进一步导致 EHHADH 转录组水平下调。并推测 EHHADH 参与阻止 HCC 细胞去分化及调控 HCC 细胞铁死亡进程。过表达 EHHADH 可能可以阻止 HCC 细胞去分化进程以及可能可以促进 HCC 细胞铁死亡;索拉菲尼治疗可能对高表达 EHHADH 的 HCC 有效。

1 资料和方法

1.1 数据来源及筛选(表 1)

基于肿瘤基因组图谱数据库(TCGA, <https://cancergenome.nih.gov/>),本研究收集了 HCC 数据集(LIHC)及癌旁组织的基因表达数据,同时整理了患者的临床信息,共包括 371 例 HCC 患者数据,其中 50 例患者同时含有癌旁组织和肿瘤组织,并将数据集命名为 HCC421。

表 1 本研究中所使用的数据情况

Tab.1 Data used in this study

Name	HCC421	HCC389	HCC488
Source	TCGA	ICGC-LIHC-JP	GSE14520
Plat	Illumina HiSeq		GPL571 GPL3921
Sample	Cancer tissue	371	240
	No-cancer tissue	50	202
Survival state	Total	421	442
	Alive	241	189
	Dead	130	43
Gender	FEMALE	121	61
	MALE	250	171
Tumor stage	I	171	36
	II	86	106
	III	3	
	IIIA	65	71
	IIIB	8	
	IIIC	9	
	IVB	2	
Grade	IV	2	19
	IVA	1	
	G1	55	Unknown
	G2	177	Unknown
	G3	122	Unknown
	G4	12	Unknown

基于国际癌症基因组联合会数据库(ICGC, <https://dcc.icgc.org/releases/current/Projects>), 本研究收集了240个HCC肿瘤组织样本和202个癌旁样本(ICGC-LIHC-JP), 并将数据集命名为HCC442。

基于高通量基因表达数据库(GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 本研究收集了247个HCC肿瘤组织样本和241个癌旁样本的基因表达数据(GSE14250), 并将数据集命名为HCC488。

蛋白质表达谱来自临床蛋白质组学肿瘤分析联盟(CPTAC, <https://proteomics.cancer.gov/programs/cptac>)和国际癌症蛋白质组联盟(ICPC, <https://icpc.global>)数据集的数据。

1.2 组织标本

石蜡组织样本从南方医科大学南方医院获取。纳入标准: 术后病理明确诊断为HCC; 手术时年龄 ≥ 18 岁; 能从病历资料中获取完整的人口学资料、病理诊断结果、肿瘤分期等信息, 暂无随访信息。排除标准: 调取蜡块标本时, 研究者判断认为可切片的组织量较少; 经研究者判断, 存在其他可能影响存档样本完整性的情况; 术前接受过肝动脉化疗栓塞治疗。符合条件的病例共30例。上述临床样本的获取由南方医科大学南方医院伦理委员会审查并批准, 伦理批件号为NFEC-2021-207。

1.3 GSEA

为初步筛选HCC发生发展中的驱动基因, 本研究运用OmicShare (<https://www.omicshare.com/tools>)进行GSEA分析。基于HCC488数据集与GSEA算法, 探索了HCC肿瘤组织相对于癌旁组织发生的通路改变。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

Hiplot (<https://hiplot.org>)是一款用于科学数据可视化的综合Web平台。本研究基于Hiplot工具绘制了显著改变的生物学通路及差异表达基因的韦恩图及渐变柱状图, 从而获得重复出现次数较多的Hub基因。

1.4 基因转录组水平差异及生存曲线绘制

为确定EHHADH在HCC中的表达模式, 本研究基于工具UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>), 分析EHHADH在21种肿瘤、癌旁组织中的差异表达。同时探讨了HCC细胞去分化程度、TP53突变与EHHADH表达之间的联系。UALCAN是基于TCGA、CPTAC、ICPC数据库的全面、用户友好和交互的网络数据资源工具, 可用于分析癌症OMICS数据^[17]。

为分析HCC421数据集与患者临床信息之间的相关性, 本研究在临床生信之家平台(www.aclbi.com)中, 基于Malta等人构建的OCLR算法来预测mRNAsi, 基于HCC421数据集数据与Spearman相关^[18, 19], 并通过线性变换, 将预测的肿瘤细胞干性指数映射到[0, 1]范围。基于单变量Cox回归分析本研究分析了两组数据之间的生存差异, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

为确定EHHADH独立危险因素, 基于HCC421、HCC488、HCC442数据集与R包“survminer”计算EHHADH转录组水平最佳分箱值后, 通过Hiplot在线可视化工具展示EHHADH高低表达组之间的生存差异。

1.5 基因突变瀑布图及相关性分析

为研究EHHADH在肿瘤基因组层面突变情况, 本研究基于HCC421数据集以及患者的临床信息, 利用R软件中的maftools软件包实现HCC患者的体细胞突变情况可视化。

为观察上述研究推测的若干个基因与EHHADH之间的关系, 作多个基因与EHHADH相关性热图, 基因之间的相关性展示通过R软件包ggstatsplot与pheatmap来实现, 多基因相关性图通过R软件包pheatmap进行展示。Spearman相关分析用于分析不符合正态分布的定量变量之间的相关性, $P < 0.05$ 为相关性具有统计学意义。

1.6 差异基因的功能和通路富集分析

为观察EHHADH与全部基因组间的关联分析从而探索EHHADH潜在的功能, 基于HCC421数据集的数据, 根据各个基因转录组水平, 采用Spearman相关性分析评估两两基因间的相关性, 分析获得基因列表。两基因相关性图通过R软件包ggstatsplot进行实现。

在线工具数据库Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)是一个基于Web的门户网站, 旨在为实验生物学家提供全面的基因列表注释和分析资源^[20]。使用Metascape, 基于上述分析所得到的基因列表根据相关性从强到弱排序, 选取前300个基因(剔除10个假基因后, 最后获得290个基因), 将此290个基因加上EHHADH, 共291个基因进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因和基因组百科全书KEGG通路富集分析, 阈值为 $FDR < 0.05$ 。

1.7 铁死亡标记基因表达差异

为了对高/低表达EHHADH的HCC样本进行铁死亡的差异分析, 本研究基于HCC421数据集, 评估患者肿瘤组织的铁死亡相关基因的表达与EHHADH表达之间的联系。结果通过R(v4.0.3)软件包ggplot2和pheatmap进行展示。铁死亡相关基因是由Liu等^[21]发现的一组在肿瘤细胞中发挥功能的基因集。

基于HCC421数据集以及患者的临床信息, EHHADH基因与各铁死亡相关基因之间的相关性展示通过R软件包ggstatsplot与pheatmap来实现Spearman相关分析用于分析不符合正态分布的定量变量之间的相关性, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

1.8 免疫组化分析

首先将石蜡包埋的肝癌组织或远癌正常组织蜡块以1.5 μm 连续切片及烤干, 使用二甲苯溶液和配制好的不同浓度的乙醇进行脱蜡, 之后使用柠檬酸缓冲液或

EDTA 缓冲液和内源性过氧化物酶进行抗原热修复和阻断,使用自配的PBS缓冲液冲洗两次,完成以上步骤后再加入一抗 4 °C 孵育过夜(EHHADH 稀释比 1:100, Shengon Biotech D222276),继续加入新型酶标羊抗兔 IgG 聚合物III,室温 1 h,接着使用 DAB(中杉金桥有限公司)显色 1 min,之后使用苏木精染核 1 min,最后梯度脱水并进行封片镜检。

石蜡块用石蜡切片机以 1.5 μm 连续切片。每 1 例蜡块随机抽取一张切片进行 HE 染色,使用二甲苯溶液和配制好的不同浓度的乙醇进行脱蜡,流水 1 min 后,苏木素浸泡 8 min,盐酸酒精分化 3 s,流水 15 min 反蓝,伊红 3 min,最后梯度脱水并进行封片镜检。

2 结果

2.1 脂肪酸氧化酶相关基因 EHHADH 下调在 HCC 最显著下调信号通路中富集

基于 HCC488 数据集与 GSEA 分析,本研究在对 247 个 HCC 组织与相对应的 241 个癌旁组织进行的差异分析中共找到了 61 条 KEGG 通路($P < 0.05$)。本研究分别选取上调与下调 KEGG 通路中 NES 值前 20 的通路(图 1A),并发现下调通路中,脂肪酸氧化酶相关基因 EHHADH 基因出现于 5 条通路中(图 1B),且其中 4 条(脂肪酸代谢、丁酸代谢、缬氨酸亮氨酸和异亮氨酸降解、色氨酸代谢)与 HCC 发展相关,从而确定 EHHADH 为下调通路中与脂肪酸氧化相关的 Hub 基因。

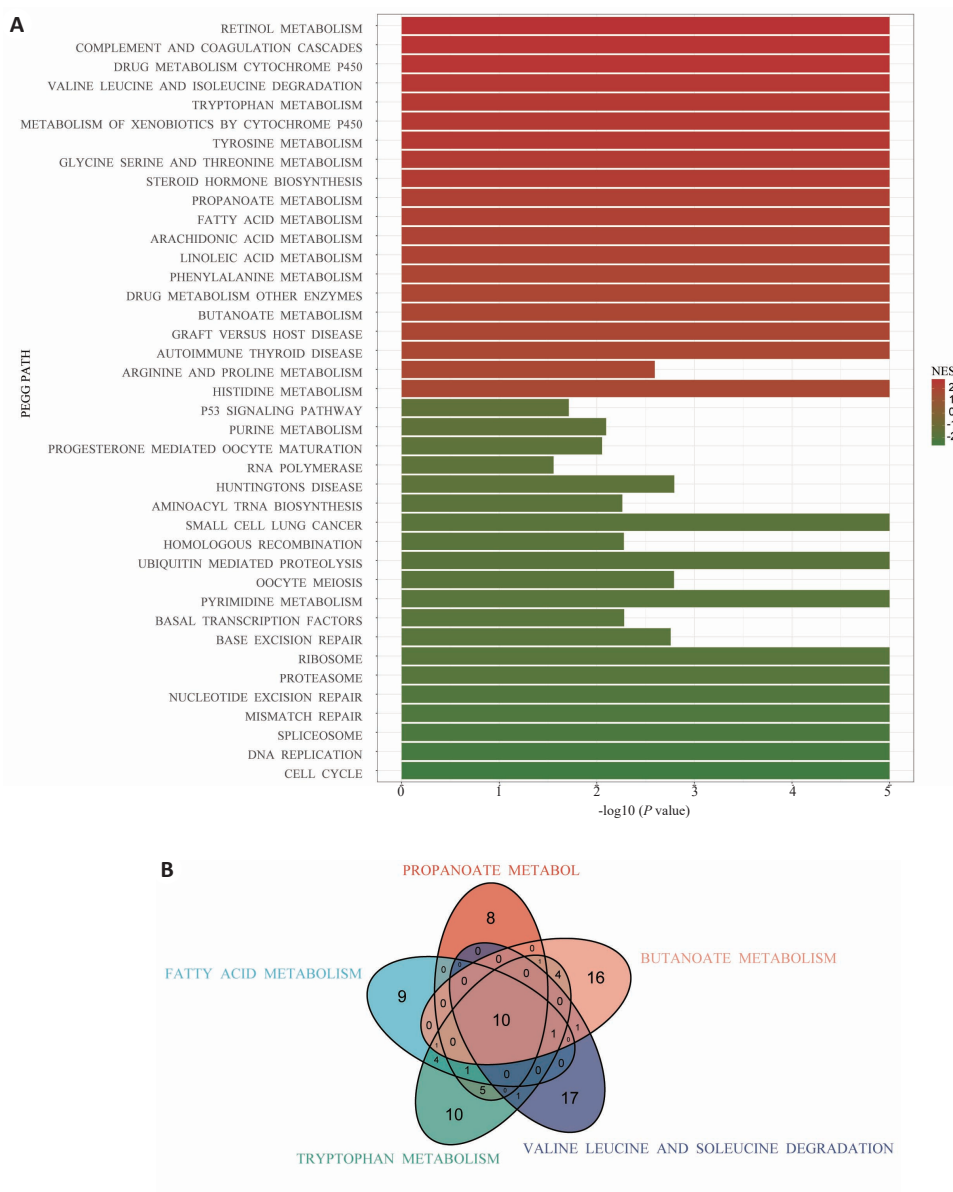


图1 基于HCC488数据集的GSEA分析

Fig.1 GSEA analysis based on HCC488 dataset. **A**: Gradient histogram consisting of the top 20 up-regulated and down-regulated KEGG pathways in HCC tissues compared with non-tumor tissues based on the results of GSEA analysis. **B**: Intersection of the genes of the top 20 up/down-regulated KEGG pathways show involvement of EHHADH in 5 down-regulated pathways.

基于上述研究支持,为确定 EHHADH 在 HCC 中的表达模式,基于 UALCAN 数据库分析 HCC 组织中 EHHADH 基因 mRNA 表达水平,UALCAN 数据库中 TCGA 数据库数据显示 EHHADH 转录组水平的中位数在远癌正常肝组织以及 HCC 组织分别是 119.136、52.731 每百万转录本(TPM),差异有统计学意义($P < 3.433$,图 2A)。同时,HCC488 数据集和 HCC442 数据集中,EHHADH 的表达模式与 HCC421 一致(图 2B、C)。

基于 UALCAN 数据库分析 HCC 组织中 EHHADH 基因编码的蛋白质水平,UALCAN 数据库中 CPTAC 数据库数据显示,EHHADH 的蛋白水平在 HCC 组相较于远癌正常组显著下降,差异有统计学意义($P < 9.183$,

图 2D)。此外,免疫组化结果显示,与远癌正常组织相比,HCC 组织中 EHHADH 的蛋白表达水平较低(图 2E~H)。

2.2 EHHADH 表达下调与 TP53 移码缺失或错义突变显著相关

本研究基于 HCC421 数据库数据,应用 Oncoplot 显示 HCC 患者的体细胞突变景观(图 3A)。结果表明在 HCC 患者的基因组中 TP53 突变率最高(突变率为 28%)。在低表达 EHHADH 组中 TP53 基因发生移码缺失或错义突变情况占本组 TP53 所有突变情况的 80%,在高表达 EHHADH 组中 TP53 基因发生移码缺失或错义突变情况占本组 TP53 所有突变情况的 60%,经卡方检验,在低表达 EHHADH 组中 TP53 基因发生移码缺失

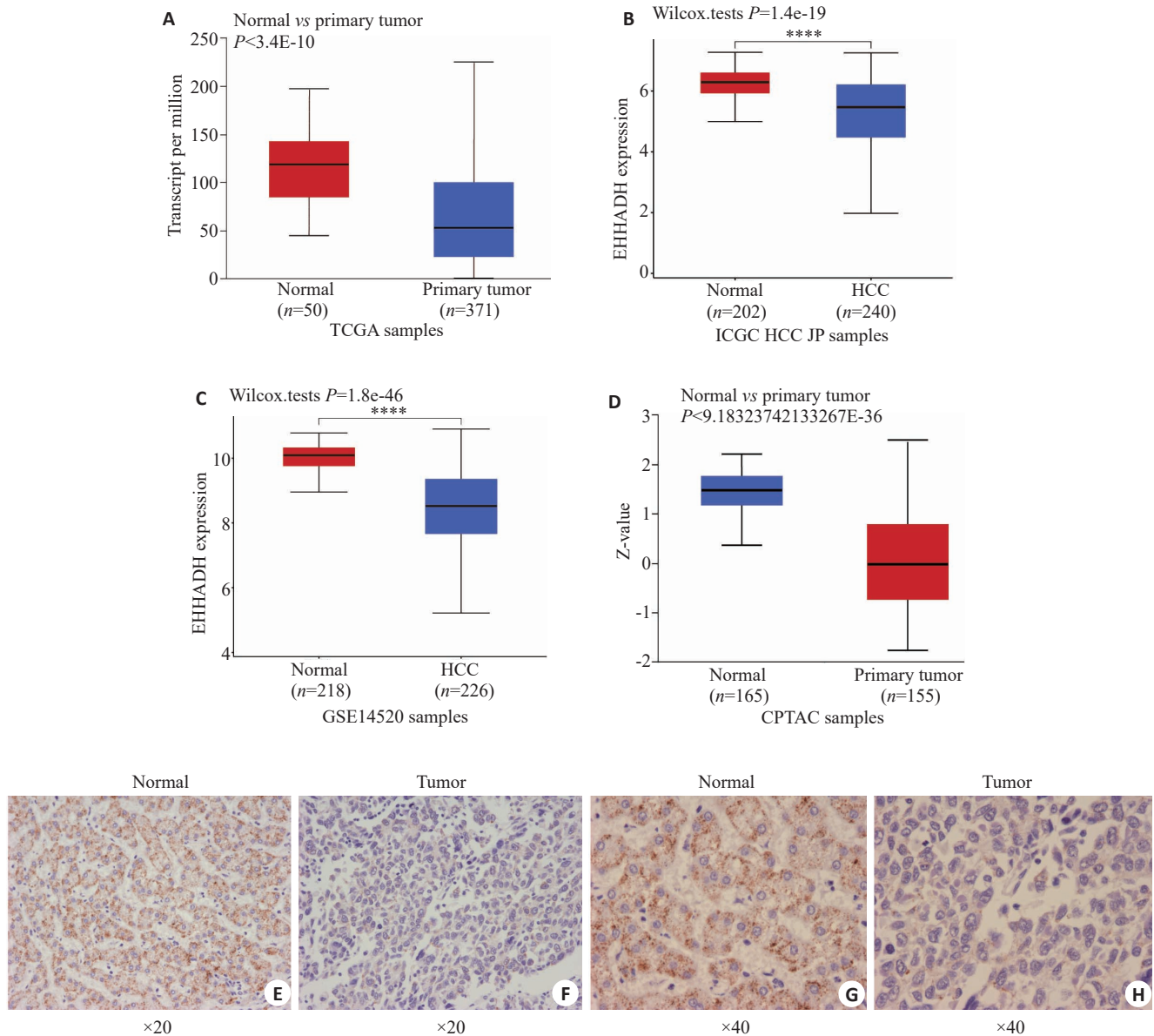


图2 EHHADH在远癌正常组织和肝癌组织中的表达

Fig.2 Expression of EHHADH in non-tumor tissues and tumor tissues of HCC. A-C: EHHADH expression in HCC and non-tumor tissues from HCC421 dataset, HCC442 dataset and HCC488 dataset. D: Protein expression of EHHADH in HCC and non-tumor tissues in CPTAC dataset. E-H: Representative results of immunohistochemistry showing EHHADH expression in non-tumor and HCC tissues. **** $P < 0.0001$.

或错义突变较高表达组更为明显($P<0.05$)。

基于UALCAN数据库中HCC421数据集分析,数据显示EHHADH基因转录组水平的中位数在TP53突变组患者HCC组织以及TP53未突变患者HCC组织分别是44.222、56.033 TPM, $P<2.532$,差异有统计学意义(图3B)。EHHADH转录组水平在TP53突变组患者中较TP53未突变患者显著下调。

由于EHHADH基因本身在HCC患者体细胞基因突变中占比仅约为1%,其转录组水平降低与其本身发生基因突变的关系不显著。且目前暂未有研究说明TP53与EHHADH二者间有直接的相互作用关系,所以我们推测EHHADH上游作用因子受TP53调控进而影响EHHADH的转录组水平变化。

KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) 中显示EHHADH主要参与花生四烯酸代谢途径及PPAR信号途径等。为了进一步探究EHHADH与PPAR家族的关系,我们做了以下分析:

基于UALCAN数据库分析HCC组织中上述基因mRNA表达水平, HCC421数据集显示PPARG、PPARD、PPARGC1B基因转录组水平在TP53突变组患者HCC组织较TP53未突变患者HCC组织中显著上调,PPARGC1A基因转录组水平在TP53突变组患者HCC组织较TP53未突变患者HCC组织中显著下调($P<0.05$,图3C~F)。基于相关性分析得出EHHADH与PPARA、PPARGC1A、PPARGC1B在转录水平显著相关R值分别为0.64、0.22、0.11,且PPARGC1A与EHHADH的相关性比PPARGC1B与EHHADH相关性更高($R=0.22>0.11$,图3G)。

2.3 EHHADH表达与HCC细胞去分化程度显著相关

基于HCC421数据集中EHHADH RNAseq数据和临床信息进行整合发现,EHHADH的转录组水平差异与患者年龄及肝细胞去分化程度高度相关($P<0.01$,表2)。

UALCAN数据库中TCGA数据库数据也显示EHHADH基因转录组水平的中位数在HCC细胞去分化程度Grade1、Grade2、Grade3、Grade4中分别是80.891、57.812、33.488、31.279 TPM。基于HCC421数据集数据,与Grade1(分化程度高)HCC患者相比,EHHADH在Grade2(中度分化)、Grade3(分化不良)、Grade4(未分化)HCC患者中转录组水平下降明显($P<0.05$,图4A)。与Grade2 HCC患者相比,EHHADH在Grade3 HCC患者中转录组水平下降明显($P<0.05$)。EHHADH与促进肝细胞去分化相关基因脂肪酸氧化酶3-羟辅酶A脱氢酶(HADHA)、乙酰辅酶A氧化酶(ACOX2)表达呈显著正相关关系,R值分别为0.47、0.34($P<0.05$,图4B、C)。经免疫组化实验验证HCC癌组织EHHADH量随癌组织分化程度降低而降

低(图5A~X)。

2.4 EHHADH低表达与铁死亡相关

利用HCC421数据集,进行全基因组与EHHADH之间的关联性分析,根据各个基因转录组水平,采用Spearman相关性分析评估两两基因间的相关性,选取相关性最高的前300个基因,剔除10个假基因后对这290个基因及EHHADH,即共291个基因进行GO及KEGG富集分析(图6A~F)。GO分析结果显示此291个基因分子功能及生物过程富集于氧化还原酶活性、有机羟基化合物代谢过程、脂质分解代谢过程、线粒体基质烯烃化合物代谢过程、脂质稳态、硫化物代谢过程、细胞氨基酸生物合成过程等。KEGG信号途径富集于PPAR信号通路、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等。其中大部分信号途径及富集的生物功能与铁死亡相关,例如氧化还原酶活性、脂质分解代谢过程、脂质稳态、硫化物代谢过程、细胞氨基酸生物合成过程、丙酮酸代谢、PPAR信号通路、氨基酸代谢过程(图6G)。

基于HCC421数据集,将HCC患者以EHHADH转录组水平中位数为分界线,分为高、低表达组,通过wilcox检验分析两组间Ferroptosis分子的表达分布。结果显示多个铁死亡的相关基因(HSPA5、EMC2、SLC7A11、NFE2L2、HSPB1、FANCD2、CISD1、FDFT1、SLC1A5、RPL8、NCOA4、LPCAT3、GLS2、DPP4、CS、CARS1、ATP5MC3、ACSL4、ATL1)转录组水平在两组间存在显著差异(图6H~J)。其中EHHADH转录组水平与负调控铁死亡进程基因HSPA5、SLC1A5转录组水平呈负相关关系,与正调控铁死亡进程基因NCOA4、GLS2、DPP4转录组水平呈正相关关系($P<0.05$, $R>0.2$,图6K)。

免疫组化结果显示在HCC组织中EHHADH蛋白质表达量与负调控铁死亡的标记基因FTH1蛋白表达量呈负相关性,与正调控铁死亡的标记基因NCOA4蛋白表达量呈正相关性(图6L~Q)。

2.5 EHHADH低表达与高干性评分相关

使用逻辑回归机器学习算法(OCLR),基于HCC421数据集中转录组数据,以HCC患者EHHADH转录组水平中位数为分界线将样本分为EHHADH高表达组和低表达组,计算干性指数来评估肿瘤细胞的干性程度。结果显示低表达组的干性评分显著高于高表达组,即低表达组肿瘤细胞的干性明显强于高表达组($P=0.0063$),低表达组肿瘤细胞增殖能力更强(图7A)。

2.6 EHHADH低表达与HCC患者生存预后差相关

基于TCGA数据库,利用Kaplan-Meier生存曲线分析患者生存率与EHHADH转录组水平的相关性,多种肿瘤中EHHADH基因单因素Cox分析结果以森林图

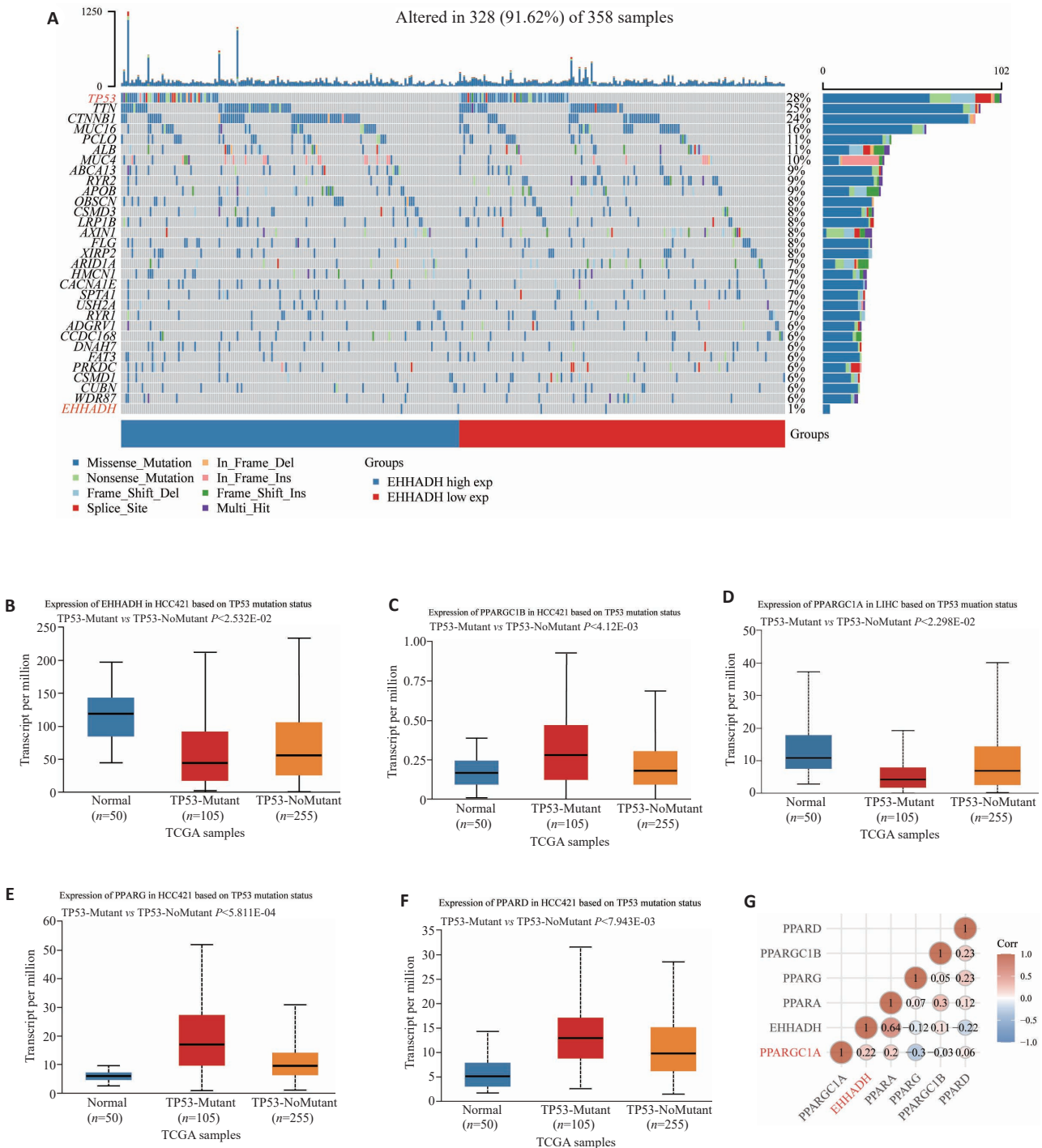


图3 HCC队列的体细胞景观

Fig.3 Somatic landscape of HCC cohort. **A**: OncoPrint shows the somatic landscape of HCC cohort. Genes are ordered by their mutation frequencies, samples are ordered by disease histology, as indicated by the annotation bar (bottom). Side bar plot shows the $-\log_{10}$ -transformed q-values, as estimated using MutSigCV. Waterfall plot shows mutation information for each gene for each sample. Color annotation of various cancer types are shown at the bottom. The barplot above the legend shows the number of mutation burden; **B-F**: EHHADH/PPARGC1B/PPARGC1A/PPARG/PPARD expression in TP53 Mutant tumor, TP53 Non-Mutant tumor and non-tumor tissues in TCGA data; **G**: A heatmap of the correlation between multiple genes and multiple genes. Blue represents positive correlation whereas red represents negative correlation, the darker the color, the stronger the relation

的形式呈现,结果显示在KIRC、LGG、LIHC数据集中的预后差异显著($P < 0.05$,图7B)。

利用Hiplot平台,基于HCC421数据集、HCC488

数据集、HCC442数据集进行Kaplan-Meier生存曲线分析HCC患者生存率与EHHADH转录组水平的相关性。选取每一数据集的EHHADH转录组水平最优分

表2 HCC421数据集中患者的临床信息

Tab.2 Clinical information of patients in HCC421 datasets

Clinical indicator	EHHADH exp>mid	EHHADH exp≤mid	P
Alive	129	112	
Dead	57	73	0.095
Mean (SD)	61.3 (13.2)	57.6 (13.7)	
Median [MIN, MAX]	64 [16, 90]	59 [17, 85]	0.009
Female	54	67	
Male	132	118	0.172
T1	102	79	
T2	42	50	
T3	20	25	
T3a	10	19	
T3b	2	4	
T4	7	6	
TX	1		
T2a		1	
T2b		1	0.173
I	96	75	
II	39	47	
III	2	1	
IIIA	26	39	
IIIB	3	5	
IIIC	3	6	
IVB	1	1	
IV		2	
IVA		1	0.26
G1	36	19	
G2	96	81	
G3	47	75	
G4	4	8	0.003

箱点为基线将患者分为高表达组(RHES)和低表达组(RLES),结果显示预后差异显著,其中HCC421数据集、HCC488数据集分析结果显示有显著的生存差异($P<0.05$),EHHADH高表达患者的生存时间显著长于低表达EHHADH患者(图7C、D);HCC442数据集分析结果显示没有显著的生存差异($P>0.05$,图7E)。

3 讨论

本研究通过对HCC488数据集中HCC组织与癌旁组织进行GSEA分析获得与HCC发展中脂肪酸氧化相关的Hub基因EHHADH。此基因主要参与过氧化体 β 氧化途径,起催化长链二羧酸降解作用,在肝细胞过氧化物酶脂肪酸氧化通路中起到重要作用^[7],且已有研究表明脂肪酸合成、 β 氧化和细胞脂质组成的改变会促进HCC的发生和发展^[22],所以本研究聚焦于探究基因EHHADH在HCC发生发展中的表达和作用。本研究发现HCC组织相对于癌旁组织,其EHHADH转录组水

平显著下调,EHHADH低表达组预后显著差于高表达组。且EHHADH低表达组肿瘤细胞的干性明显强于高表达组,表示低表达组肿瘤细胞增殖能力更强。综上所述,EHHADH可作为HCC患者的独立预后因素。

为研究EHHADH低表达促进HCC发展的机制,本研究通过分析HCC患者的体细胞突变景观发现TP53的突变与EHHADH的表达相关,KEGG中显示EHHADH主要参与PPAR信号途径。PPAR信号途径具有调节细胞周期和新陈代谢的作用,并已报道其参与多种癌症的发生发展^[23,24]。肝脏作为调控代谢的器官,PPAR信号途径在HCC中的发生发展中起尤为重要的作用^[25-27]。在PPAR信号途径中EHHADH以PPAR家族成员依赖的方式发挥其脂肪酸 β 氧化的功能^[9],其上游基因主要为PPAR家族基因,包括PPARA、PPARB、PPARG、PPARGC1A、PPARGC1B^[24]。本文进一步通过研究HCC肿瘤细胞中EHHADH表达量与PPAR家族基因表达量的相关性发现PPARGC1A转录组水平与

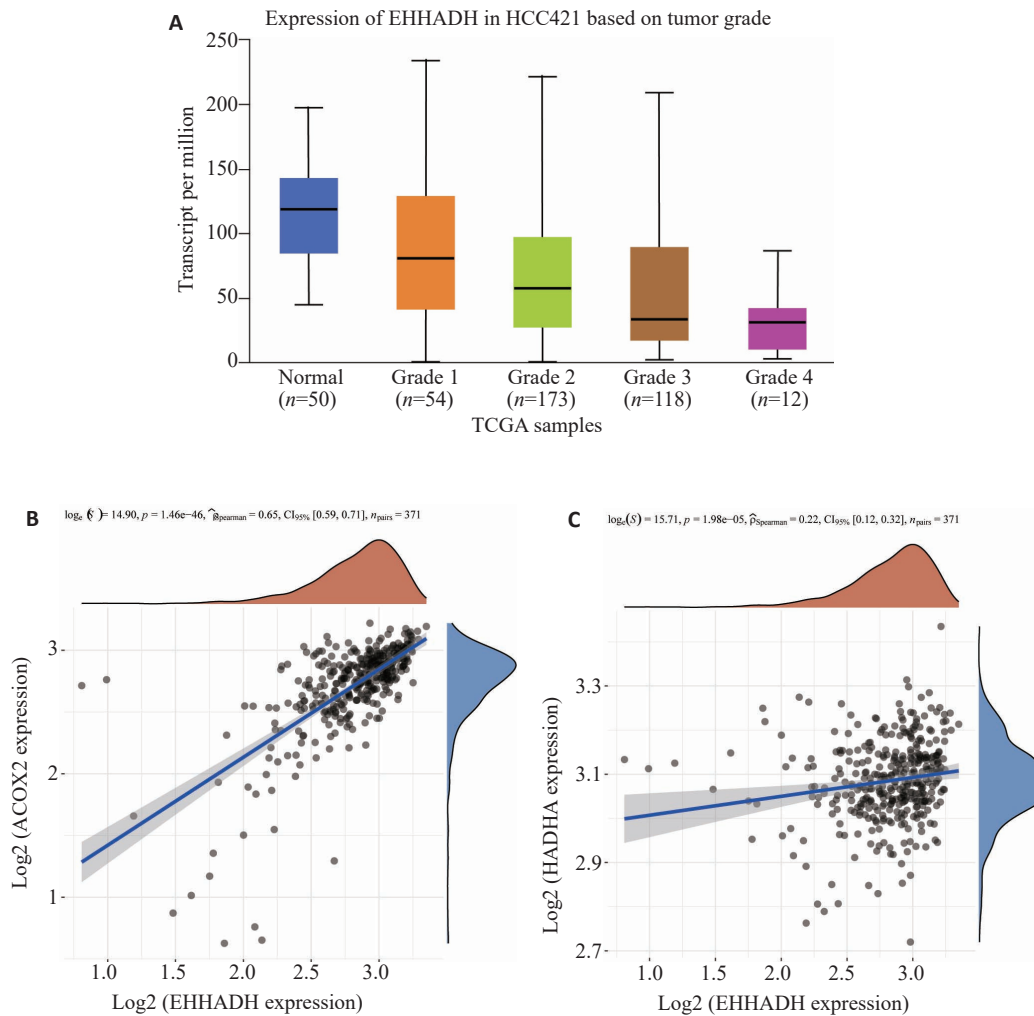


图4 EHHADH在不同分化程度的HCC组织中的表达

Fig.4 Expression of EHHADH in HCC tissues with different degrees of differentiation. A: EHHADH expression in HCC tissues with different degrees of differentiation from HCC421 dataset. B, C: Spearman correlation analysis of the expressions of the two genes.

TP53突变及EHHADH转录组水平相关。

由于PPARGC1A定位于4号染色体上,最新研究表明在卵巢癌中TP53突变导致4号染色体上发生显著的片段缺失现象^[28]。抑癌基因TP53突变是HCC最常见的基因突变,携带突变型TP53的HCC患者比携带野生型TP53的患者总生存期(OS)和无复发生存期更短^[29,30]。多项研究表明,TP53的缺失或错义突变导致线粒体功能障碍^[31-34],且TP53错义突变直接导致PPARGC1A编码的蛋白质PGC-1 α 水平下降^[35-37]。线粒体功能是转化和抑制肿瘤生长所必需的^[34,38],PGC-1 α 的主要生理功能是通过促进线粒体氧化磷酸化来控制能量代谢。由于目前还没有针对PGC-1 α 本身作用的药物^[39],因此,识别PGC-1 α 的下游分子从而抑制肿瘤生长至关重要。以往的研究表明,EHHADH的下调与线粒体脂肪酸氧化途径的抑制有关^[40],同时EHHADH转录组水平与PPARGC1A转录组水平相关^[41],且低表达EHHADH组的HCC患者较高表达EHHADH的HCC患者TP53错义突变率更

高。综上,我们猜测在HCC组织中TP53发生缺失或错义突变导致PPARGC1A转录组水平下降,引发线粒体功能障碍,最后导致EHHADH转录组水平下降。

在众多致病因素中,HCC肿瘤分化程度与肿瘤生长速度、转移、血管侵袭以及患者预后密切相关^[3,42-44]。在分化良好的HCC中,肿瘤生长缓慢、转移率低,肿瘤完全切除后复发率低,而肿瘤细胞去分化则促进其增殖、侵袭,诱导肿瘤在肝内外转移^[45,48]。目前抗癌药物的研究工作主要集中在开发识别刺激肿瘤细胞死亡的药物上。然而抗癌的方式不仅于此,还可以尝试指引癌细胞重新启动分化程序,从而抑制其自我更新复制的进程。这种方法目前被成功地用于治疗携带PML/RARA融合基因的急性早幼粒细胞白血病,其中全反式维甲酸和三氧化二砷诱导白血病细胞向成熟粒细胞的终末分化并阻止其自我更新^[47]。成人上皮性肿瘤是否保持潜在的分化能力,以及细胞调节中的不同结节是否可以被识别为恢复这种分化潜力的靶点,还需要进一步的

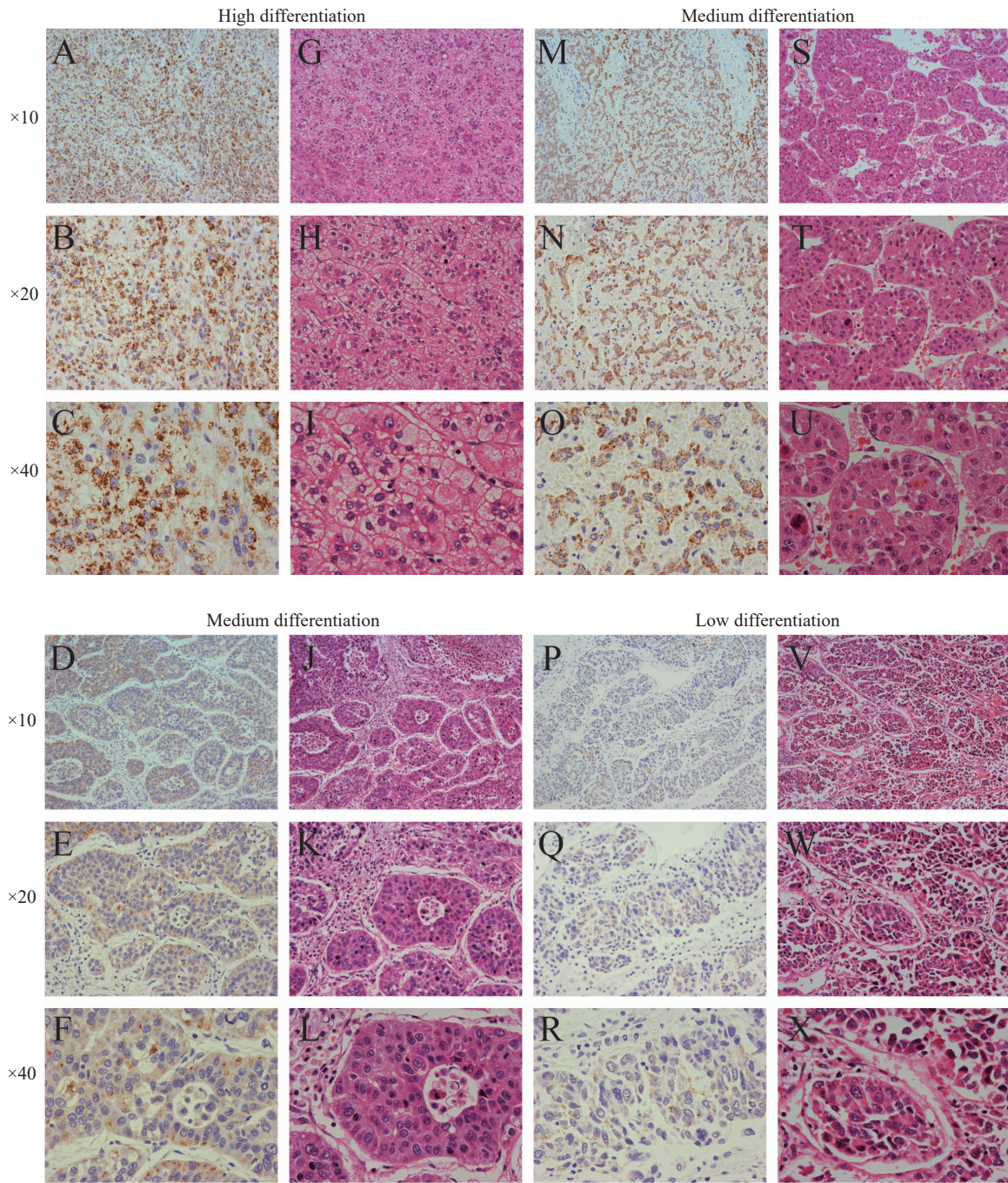


图5 不同分化程度的HCC组织切片免疫组化图及H&E图

Fig.5 Immunohistochemical and HE staining of HCC tissues with different degrees of differentiation. A-F/M-R: Representative image of immunohistochemistry showing EHHADH expression in HCC tissues with different degrees of differentiation. G-L/S-X: HE staining showing EHHADH expression in HCC tissues with different degrees of differentiation.

研究^[48]。HCC去分化过程中的代谢变化,尤其是脂肪酸氧化抑制,是HCC去分化过程中的重要特征。在HCC中,脂肪酸氧化功能障碍导致在去分化过程中过氧化体的数量减少,脂肪堆积到肿瘤间质^[49,50],肿瘤细胞为避免由脂肪酸氧化所产生大量的活性氧物种堆积,其脂肪酸氧化功能受抑制。因此本研究提出猜想,恢复脂肪酸氧化代谢稳态可能可以通过恢复肝细胞良好的分化状态从而改善HCC患者的预后。结合HCC421数据集中临床数据信息及免疫组织化学结果推测EHHADH

低表达可能导致HCC细胞去分化程度加重相关。

近年来,索拉菲尼作为目前指南推荐晚期HCC患者全身系统治疗的一线药物,一项纳入了3 256例患者信息的meta分析显示患者中位生存期为12.6(11.15~13.8)个月^[51]。已有研究阐明其涉及癌症相关蛋白激酶靶点的作用机制,这些发现突显了优化索拉菲尼与其他治疗策略联合使用的重要性。既往研究表明索拉菲尼是一种铁死亡诱导剂^[52],氧化应激与索拉菲尼诱导的肝癌细胞线粒体功能障碍密切相关,半胱氨酸的耗竭可能

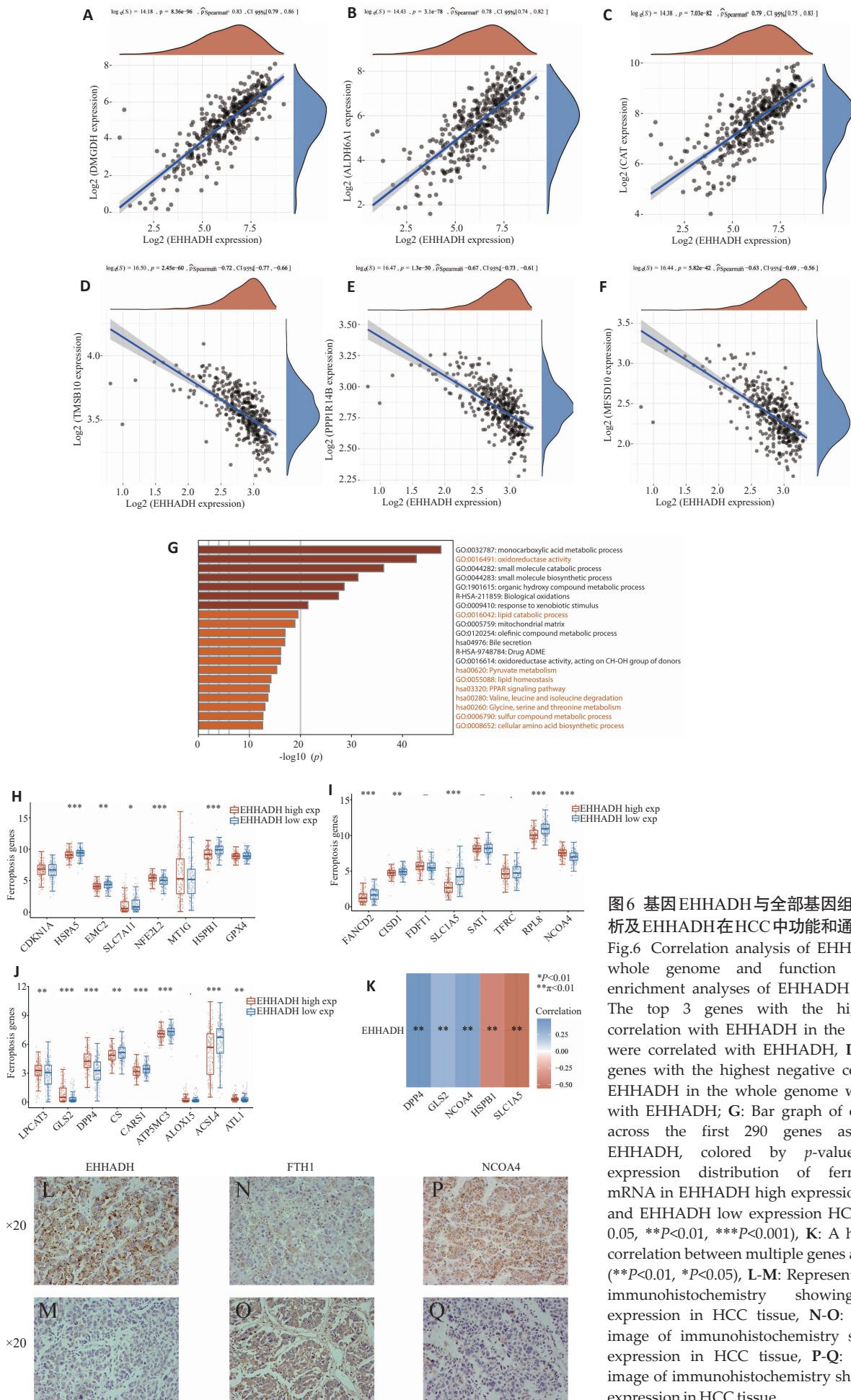


图6 基因EHHADH与全部基因组间的相关性分析及EHHADH在HCC中功能和通路的富集分析
 Fig.6 Correlation analysis of EHHADH with the whole genome and function and pathway enrichment analyses of EHHADH in HCC. A-C: The top 3 genes with the highest positive correlation with EHHADH in the whole genome were correlated with EHHADH, D-F: The top 3 genes with the highest negative correlation with EHHADH in the whole genome were correlated with EHHADH; G: Bar graph of enriched terms across the first 290 genes associated with EHHADH, colored by p -values, H-J: The expression distribution of ferroptosis-related mRNA in EHHADH high expression HCC tissues and EHHADH low expression HCC tissues. ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$), K: A heatmap of the correlation between multiple genes and EHHADH. ($**P < 0.01$, $*P < 0.05$), L-M: Representative image of immunohistochemistry showing EHHADH expression in HCC tissue, N-O: Representative image of immunohistochemistry showing FTH1 expression in HCC tissue, P-Q: Representative image of immunohistochemistry showing NCOA4 expression in HCC tissue.

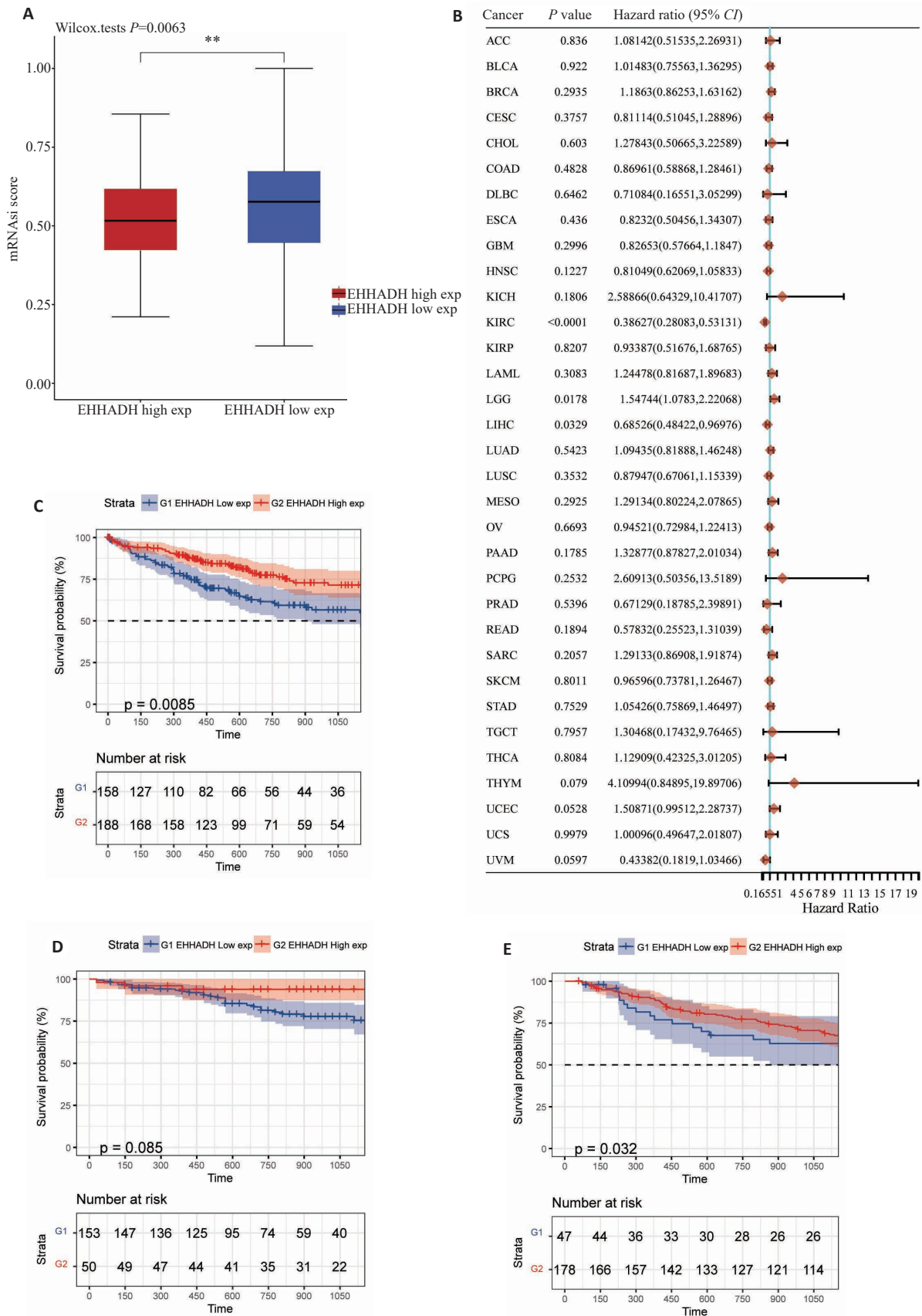


图7 EHHADH表达与HCC患者预后的关系

Fig.7 Association between EHHADH expression and prognosis of HCC patients. A: The distribution of OCLR scores in EHHADH high/low expression groups. B: Forest plot: The *p*-value, risk coefficient (HR) and confidence interval of EHHADH in multiple tumours are analyzed by univariate cox regression; C-E: Kaplan-Meier survival curve for HCC patients in the high- and low-expression EHHADH groups.

通过诱导铁死亡,从而与索拉非尼发挥协同作用^[53,54]。因此,促进肝癌细胞铁死亡可能可以改善肝癌对索拉非尼的耐药性。铁死亡是一种独特的细胞死亡程序,由依赖铁的磷脂过氧化驱动,主要特征包括铁堆积、脂质过氧化和GSH耗竭^[55]。有报道认为脂质过氧化是铁死亡最后一步的关键因素,脂肪酸代谢和铁死亡之间相互作用的异常与肿瘤的发生发展、转移和放射治疗抵抗有关。靶向脂肪酸代谢途径可能可以通过触发铁死亡来抑制肿瘤的发生和转移^[56]。本研究通过GO和KEGG富集分析,发现EHHADH参与的大部分信号途径及富集的生物功能与铁死亡相关,例如氧化还原酶活性、脂质分解代谢过程、脂质稳态、硫化物代谢过程、细胞氨基酸生物合成过程、丙酮酸代谢、PPAR信号通路、氨基酸代谢过程^[57-62]。结合铁死亡相关基因的差异分析及免疫组织化学结果,我们推测EHHADH可能参与细胞铁死亡调控,并与肿瘤细胞铁死亡逃逸相关。

综上所述,我们猜测由于HCC中发生TP53突变造成EHHADH转录组水平下调,进而促进了HCC细胞去分化,并且抑制HCC细胞铁死亡。过表达EHHADH是否可以阻止并逆转HCC细胞去分化进程,以及是否可以促进HCC细胞铁死亡,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Ren H, Li WJ, Liu X, et al. Identification and validation of a 6-metabolism-related gene signature and its correlation with immune checkpoint in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11(2): 783934.
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CAA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-32.
- [3] Okuda K. Hepatocellular carcinoma: clinicopathological aspects[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1997, 12(9/10): S314-8.
- [4] Casadei-Gardini A, Giulia O, Francesco C, et al. Developments in predictive biomarkers for hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2020, 20(1): 63-74.
- [5] Lin ZH, Zhang J, Zhuang LK, et al. Establishment of a prognostic model for hepatocellular carcinoma based on bioinformatics and the role of NR6A1 in the progression of HCC[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2022, 10(5): 901-12.
- [6] Office FE. Retraction: targeting and therapy of glioblastoma in a mouse model using exosomes derived from natural killer cells [J]. *Front Immunol*, 2019, 10(3): 1770.
- [7] Ferdinandusse S, Denis S, Van Roermund CWT, et al. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids[J]. *J Lipid Res*, 2004, 45(6): 1104-11.
- [8] Klootwijk ED, Reichold M, Helip-Wooley A, et al. Mistargeting of peroxisomal EHHADH and inherited renal Fanconi's syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(2): 129-38.
- [9] Houten SM, Denis S, Argmann CA, et al. Peroxisomal L-bifunctional enzyme (Ehhadh) is essential for the production of medium-chain dicarboxylic acids[J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(7): 1296-303.
- [10] Waterham HR, Ferdinandusse S, Wanders RJA. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(5): 922-33.
- [11] Franssen M, Lismont C, Walton P. The peroxisome-mitochondria connection: how and why?[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1126.
- [12] Islinger M, Voelkl A, et al. The peroxisome: an update on mysteries 2.0[J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 150(5): 443-71.
- [13] Cherkaoui-Malki M, Surapureddi S, El-Hajj HI, et al. Hepatic steatosis and peroxisomal fatty acid beta-oxidation [J]. *Curr Drug Metab*, 2012, 13(10): 1412-21.
- [14] He JF, Zhao HC, Deng DF, et al. Screening of significant biomarkers related with prognosis of liver cancer by lncRNA-associated ceRNAs analysis[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(3): 2464-77.
- [15] Peng H, Deng Y, Wang LH, et al. Identification of potential biomarkers with diagnostic value in pituitary adenomas using prediction analysis for microarrays method [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(3): 399-410.
- [16] Okamura S, Yoshino H, Kuroshima K, et al. EHHADH contributes to cisplatin resistance through regulation by tumor-suppressive microRNAs in bladder cancer[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 48.
- [17] 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): 649-58.
- [18] Lian H, Han YP, Zhang YC, et al. Integrative analysis of gene expression and DNA methylation through one-class logistic regression machine learning identifies stemness features in medulloblastoma[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(10): 2227-45.
- [19] Tathiane M, Malta. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation[J]. *Cell*, 2018, 173(2): 338-54. e15.
- [20] Zhou YY, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [21] Zekun, Liu. Systematic analysis of the aberrances and functional implications of ferroptosis in cancer [J]. *iScience*, 2020, 23(7): 101302.
- [22] Sangineto M, Villani R, Cavallone F, et al. Lipid metabolism in development and progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1419.
- [23] Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: physiological importance and clinical implications[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 166(3): 502-13.
- [24] Huang RZ, Zhang JQ, Li MX, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in pan-cancer[J]. *PPAR Res*, 2020, 20(7): 6527564.
- [25] Kimura O, Kondo Y, Shimosegawa T. PPAR could contribute to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *PPAR Res*, 2012, 32(8): 574180.
- [26] Pommergaard HC, Preuss Hasselby J, Linno Willemoe G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activity correlates with poor survival in patients resected for hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2021, 28(4): 327-35.
- [27] Galicia-Moreno M, Silva-Gomez JA, Lucano-Landeros S, et al. Liver cancer: therapeutic challenges and the importance of experimental models[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2021, 21(5): 8837811.
- [28] Baslan T, Morris JP 4th, Zhao Z, et al. Ordered and deterministic

- cancer genome evolution after p53 loss[J]. *Nature*, 2022, 608(7924): 795-802.
- [29] Balleyguier C, Canale S, Ben Hassen W, et al. Breast elasticity: principles, technique, results: an update and overview of commercially available software[J]. *Eur J Radiol*, 2013, 82(3): 427-34.
- [30] Junyu, Long, . Development and validation of a TP53-associated immune prognostic model for hepatocellular carcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2019, 42(5): 363-74.
- [31] Okita N, Ishikawa N, Mizunoe Y, et al. Inhibitory effect of p53 on mitochondrial content and function during adipogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(1): 91-7.
- [32] Taguchi A, Delgado O, Celiktaş M, et al. Proteomic signatures associated with p53 mutational status in lung adenocarcinoma [J]. *Proteomics*, 2014, 14(23/24): 2750-9.
- [33] Hallenborg P, Fjære E, Liaset B, et al. p53 regulates expression of uncoupling protein 1 through binding and repression of PPAR γ coactivator-1 α [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 310(2): E116-28.
- [34] Aquilano K, Baldelli S, Pagliei B, et al. p53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(4): 386-99.
- [35] Cordani M, Butera G, Pacchiana R, et al. Mutant p53-associated molecular mechanisms of ROS regulation in cancer cells [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 361.
- [36] Cordani M, Butera G, Dando I, et al. Mutant p53 blocks SESN1/AMPK/PGC-1 α /UCP2 axis increasing mitochondrial O₂ production in cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2018, 119(8): 994-1008.
- [37] Basu S, Gnanapradeepan K, Barnoud T, et al. Mutant p53 controls tumor metabolism and metastasis by regulating PGC-1 α [J]. *Genes Dev*, 2018, 32(3/4): 230-43.
- [38] Sahin E, Colla S, Liesa M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise [J]. *Nature*, 2011, 470(7334): 359-65.
- [39] Girnun GD. The diverse role of the PPAR γ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(4): 381-8.
- [40] Wang HB, Lu J, Chen XG, et al. Acquired deficiency of peroxisomal dicarboxylic acid catabolism is a metabolic vulnerability in hepatoblastoma[J]. *J Biol Chem*, 2021, 296(11): 100283.
- [41] Lee SJ, Choi SE, Lee HB, et al. A class I histone deacetylase inhibitor attenuates insulin resistance and inflammation in palmitate-treated C2C12 myotubes and muscle of HF/HFr diet mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11(6): 601448.
- [42] Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(2): 193-9.
- [43] Trevisani F, Cantarini MC, Wands JR, et al. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(7): 1299-305.
- [44] Kim SH, Lim HK, Choi D, et al. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: effect of histologic grade on therapeutic results [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2006, 186(5 Suppl): S327-33.
- [45] Yao DB, Dai CL, Peng SL. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation[J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(12): 1608-20.
- [46] Gomes LR, Terra LF, Sogayar MC, et al. Epithelial-mesenchymal transition: implications in cancer progression and metastasis [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(11): 1881-90.
- [47] de Thé H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(11): 775-83.
- [48] Fitamant J, Kottakis F, Benhamouche S, et al. YAP inhibition restores hepatocyte differentiation in advanced HCC, leading to tumor regression[J]. *Cell Rep*, 2015, 10(10): 1692-707.
- [49] Litwin JA, Beier K, Völkl A, et al. Immunocytochemical investigation of catalase and peroxisomal lipid β -oxidation enzymes in human hepatocellular tumors and liver cirrhosis[J]. *Virchows Arch*, 1999, 435(5): 486-95.
- [50] Yang SH, Watanabe J, Nakashima O, et al. Clinicopathologic study on clear cell hepatocellular carcinoma [J]. *Pathol Int*, 1996, 46(7): 503-9.
- [51] Jackson R, Psarelli EE, Berhane S, et al. Impact of viral status on survival in patients receiving sorafenib for advanced hepatocellular cancer: a meta-analysis of randomized phase III trials [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(6): 622-8.
- [52] Su YW, Zhao B, Zhou LF, et al. Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs[J]. *Cancer Lett*, 2020, 483(5): 127-36.
- [53] Li YC, Xia J, Shao FC, et al. Sorafenib induces mitochondrial dysfunction and exhibits synergistic effect with cysteine depletion by promoting HCC cells ferroptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534(4): 877-84.
- [54] Urano S, Ohara T, Noma K, et al. Iron depletion enhances the effect of sorafenib in hepatocarcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(6): 648-56.
- [55] Capelletti MM, Manceau H, Puy H, et al. Ferroptosis in liver diseases: an overview[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): E4908.
- [56] Yuan ZH, Liu T, Wang H, et al. Fatty acids metabolism: the bridge between ferroptosis and ionizing radiation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(2): 675617.
- [57] Guo C, Xue H, Guo T, et al. Recombinant human lactoferrin attenuates the progression of hepatosteatosis and hepatocellular death by regulating iron and lipid homeostasis in ob/ob mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11(8): 7183-96.
- [58] Hwang JS, Kim E, Lee HG, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor δ rescues xCT-deficient cells from ferroptosis by targeting peroxisomes[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143(5): 112223.
- [59] Bo, Yan, . Membrane damage during ferroptosis is caused by oxidation of phospholipids catalyzed by the oxidoreductases POR and CYB5R1[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(2): 355-69.e10.
- [60] Xie YC, Li JB, Kang R, et al. Interplay between lipid metabolism and autophagy[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(2): 431.
- [61] Wei YY, Ye W, Zhao W. Serum iron levels decreased in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma, as a risk factor for the prognosis of HBV-related HCC[J]. *Front Physiol*, 2018, 9(2): 66.
- [62] Samy ALPA, Shah D, Shahagadkar P, et al. Can diallyl trisulfide, a dietary garlic-derived compound, activate ferroptosis to overcome therapy resistance in prostate cancer[J]? *Nutr Health*, 2022, 28(2): 207-12.