

Identification and Evaluation of New Biomarkers for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma using Weighted Gene Co-expression Network Analysis

Samira Nomiri¹, Adib Mirki Fariz², Mohammad Faridouni³, Hossein Safarpour^{3*}

¹Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

²Student Research Committee, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

³Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

ABSTRACT

Background

In this study, we investigated the expression profile of this disease to identify new hub genes to help diagnose hepatocellular carcinoma (HCC).

Materials and Methods:

Weighted gene co-expression network (WGCNA) analysis was used in this study to identify key modules and hub genes associated with HCC in the GSE176271 dataset. We also looked at the clinical significance of key genes and the biological pathways linked to them in external databases. We validated the identified hub genes using data from the GEPIA and XenaBrowser databases.

Results:

The Midnight blue module was found to be significantly related to the pathological stage ($r=0.94$, $P=1e-11$). Five hub genes (CLEC4M, CLEC4G, FCN2, OIT3, and ASPG) were associated with prognosis using DEG identification and WGCNA analysis. The three biological pathways associated with the Midnight blue module were copper ion detoxification, cell ion homeostasis, and complement activation, as well as the lectin pathway.

Conclusion:

The current study's findings provide new and effective molecular targets for the detection of HCC, which can improve patients' prognosis.

Keywords: Carcinoma, Hepatocellular, Biomarker, Diagnosis, Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)

Please cite this paper as:

Nomiri S, Mirki Fariz A, Faridouni M, Safarpour H. Identification and evaluation of new biomarkers for the diagnosis of hepatocellular carcinoma using weighted gene co-expression network analysis. *Govaresh* 2023;28: 19-29.

*Corresponding author:

Hossein Safarpour,
Cellular and Molecular Research Center,
Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
Email: safarpour701@yahoo.com

Received: 25 Jun. 2022

Revised: 4 Jan. 2023

Accepted: 5 Jan. 2023

شناسایی و ارزیابی نشانگرهای جدید برای تشخیص بیماری کارسینوم هیپاتوسلولار با استفاده از روش آنالیز شبکه هم بیانی ژنی وزندار

سمیرا نومیری^۱، ادیب میرکی فریز^۲، محمد فریدونی^۲، حسین صفرپور^۳*

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
^۲ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
^۳ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

چکیده

زمینه و هدف:

در این مطالعه باهدف شناسایی هاب ژن‌های جدید برای کمک به تشخیص بیماری کارسینوم هیپاتوسلولار به بررسی پروفایل بیانی این بیماری پرداخته شد.

روش بررسی:

در این مطالعه آنالیز شبکه هم بیانی ژنی وزندار (WGCNA) برای شناسایی ماژول‌های کلیدی و هاب ژن‌های مرتبط با HCC در مجموعه داده‌های GSE176271 به کار گرفته شد. همچنین ما اهمیت بالینی ژن‌های کلیدی و مسیرهای بیولوژیک مرتبط با آنها را بررسی کردیم. در نهایت برای اعتبارسنجی هاب ژن‌های شناسایی شده از داده‌های پایگاه داده‌های GEPIA و XenaBrowser بهره گرفتیم.

یافته‌ها:

ماژول Midnight blue به طور قابل توجهی با مرحله پاتولوژیک (r=0.94, p-value=1e-11) مرتبط بود. با استفاده از تجزیه و تحلیل DEGs و WGCNA، پنج هاب ژن (ASPG و OIT^۳، FCN^۲، CLEC^۴G، CLEC^۴M) با تشخیص بیماری مرتبط بودند. سه مسیر بیولوژیک سم‌زدایی یون مس، هموستاز سلولی یون‌های فلزی و فعال‌سازی کمپلمان‌ها و مسیر لکتین مهم‌ترین مسیرهای مرتبط با ماژول Midnight blue بودند.

نتیجه‌گیری:

یافته‌های مطالعه حاضر اهداف مولکولی جدید و مؤثری را برای تشخیص HCC فراهم می‌کند که به بهبود پیش‌آگهی بیماران مبتلا کمک می‌کند.

کلیدواژه: کارسینوما هیپاتوسلولار، نشانگر زیستی، تشخیص، آنالیز شبکه هم بیانی ژنی وزندار (WGCNA)

گوارش / دوره ۲۸، شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۲ / ۱۹-۲۹

زمینه و هدف:

کارسینوم هیپاتوسلولار (HCC)^۱ شایع‌ترین نوع سرطان اولیه کبد بوده و سومین عامل مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان در سراسر جهان است (۱). هر چند هپاتکتومی و پیوند کبد سودمندترین درمان‌ها برای HCC هستند، اما بقای کلی (OS)^۲ در این بیماران به دلیل عود نئوپلاسم و متاستاز در خون پس از جراحی همچنان کم است (۲). علاوه بر این، پاتوژنز مولکولی HCC تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است و نیاز به بررسی بیشتر دارد. بنابراین، تلاش‌های زیادی برای شناسایی اهداف مولکولی جدیدی که می‌توانند برای بهبود درمان‌های HCC مورد استفاده قرار گیرند، در حال انجام است (۳).
 در حال حاضر، توالی‌یابی نسل بعدی (NGS)^۳ پیش‌بینی مراحل

*نویسنده مسئول: حسین صفرپور،

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی،

دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

پست الکترونیک: yahoo.com@safarpour701

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۴

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۵

^۱ Hepatocellular carcinoma

^۲ Overall survival

^۳ Next-Generation Sequencing

(۱۱). با وجود این که تعداد زیادی مجموعه داده ای در GEO در مورد HCC وجود دارد. اما، فقط برخی از مجموعه داده‌های موجود معیارهای استفاده از WGCNA دارند (به عنوان مثال، تعداد نمونه، بافت مورد نظر، نوع نمونه، کیفیت داده‌ها و تازگی مجموعه داده). با در نظر گرفتن این محدودیت‌ها، فیلترهایی را در جستجوی نتایج GEO اعمال کردیم و مجموعه داده‌های مناسب را تحلیل کردیم. برای آنالیز بیان ژن‌های مربوط به HCC در این مجموعه داده‌ای، بسته edgeR نرم‌افزار R نسخه ۳،۵،۳ به کار گرفته شد و معیار انتخاب ژن‌های دارای تغییر بیان $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 2$ و $\text{FDR} > 0,001$ قرار گرفت. سپس برای تمام بافت‌های HCC و بافت طبیعی مجاور آنالیز خوشه‌بندی انجام شد و نقاط پرت حذف شدند. سپس نمونه‌های باقی مانده مجدداً خوشه‌بندی شدند که اطلاعات صفات بالینی همبستگی بیشتری داشتند. در آخر به منظور انجام WGCNA، ۴۰۰۰ ژن برتر را با کارایی بیان بیشتر در بین نمونه‌ها انتخاب شد (۱۳، ۱۴).

ساخت شبکه هم بیانی و شناسایی ماژول‌های معنی‌دار:

برای ساخت شبکه هم بیانی از بسته "WGCNA" نرم‌افزار R استفاده شد. در ابتدا طبق آزمون پیرسون، ماتریس پروفایل بیان ژن به ماتریس مشابهت جفت ژن‌ها و به دنبال آن به ماتریس مجاورت تبدیل شد. سپس مقدار توان β توسط تابع pickSoftThreshold بسته WGCNA محاسبه گردید. در مرحله بعد، ماژول‌های ژنی با استفاده از خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی با معیار حداقل ۳۰ ژن در هر ماژول ($\text{minModuleSize} = 30$) شناسایی شدند (۱۵). همانند مطالعات قبلی، برای انجام خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی ژن‌ها از معیار *hclust* استفاده شد؛ به طوری که هر شاخه‌ی درخت خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی با یک ماژول مطابقت دارد. سپس داده‌های بالینی به آنالیز WGCNA اضافه شدند و به عنوان اساسی برای الگوریتم برش درخت پویا برای تقسیم ماژول‌های شبکه هم‌بیانی مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت، ماژول‌های دارای شباهت بالا در سطح همبستگی و معنی‌داری با مقدار آستانه ۰/۲۸ در هم ادغام شده‌اند. همانطور که در مطالعات آمده است، ژن‌های مختلف امضای ماژول (MEs)^۵ از نظر محاسباتی با صفات بالینی تا حدودی همبستگی دارند. اهمیت هر ژن نسبت به صفت بالینی انتخاب شده که از نظر کمی با معنی داری ژن (GS)^۶ مرتبط است و همچنین وابستگی به ماژول (MM)^۷ نیز که ارتباط بین ژن‌های هر ماژول و پروفایل‌های بیان ژنی HCC می‌باشد، محاسبه شدند. فاکتور GS در ماژول به نمایندگی از ضریب همبستگی بین سطح بیان ژن و ویژگی‌های بالینی و MM نشان دهنده ضریب همبستگی بین سطح بیان ژن ME است. وقتی GS و MM همبستگی بالایی با هم داشته باشند، مهمترین عناصر ماژول نیز ارتباط قوی با صفت بالینی انتخاب شده دارند. بر همین اساس ماژولی که بیشترین همبستگی از این نظر را داشت، انتخاب و برای ساخت شبکه‌های هم بیانی و شناسایی هاب‌ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۱۶، ۱۷).

اولیه تومور و شناسایی جهش‌های ژنی هدف را در بیماران مبتلا به HCC تسهیل کرده است. کارآزمایی‌های بالینی اخیر نیز نوید درمان اختصاصی‌تر و هدفمند را بر اساس نتایج آزمایش NGS برای HCC نشان داده که مستلزم تحقیقات بیشتری است (۴).

امروزه شبکه‌های همبستگی به طور فزاینده‌ای در زیست‌شناسی و علوم پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین آنالیز شبکه هم بیانی ژنی و ژنی (WGCNA)^۱ یک روش پیشرفته مبتنی بر زیست‌شناسی سیستمی برای کشف روابط پیچیده بین ژن‌ها و فنوتیپ‌ها است که می‌تواند ژن‌ها را خوشه‌بندی کرده، ماژول‌های ژنی (گروه‌های ژنی)^۲ با الگوهای بیان مشابه تشکیل دهد و رابطه بین ماژول‌ها و ویژگی‌های خاص (مثلاً اطلاعات بالینی بیماران) را تجزیه و تحلیل کند (۵، ۶). به عنوان مثال، Giulietti و همکارانش با استفاده از روش WGCNA، ژن‌های کلیدی دخیل در پیشرفت آدنوکارسینوم مجرای پانکراس را مورد بررسی قرار دادند (۷). و یا Wang و همکارانش ماژول‌های ژنی مهم و هاب‌ژن‌های (ژن‌هایی با همبستگی بالا در ماژول‌های کاندید) مرتبط با سرطان کولورکتال (CRC)^۳ را کشف کردند که منابعی برای درک پاتوژنز CRC ارائه می‌دهند (۸). در مطالعه دیگری که توسط Du و همکارانش انجام شد، ژن hnRNPU به عنوان یک بیومارکر جدید برای تشخیص و پیش‌آگهی HCC شناسایی شد (۹). همچنین در مطالعه‌ی Liu و همکارانش SLITRK۶ به عنوان یک هدف ژنی بالقوه جدید برای HCC تایید شد، که ممکن است مبنای نظری تازه‌ای برای تشخیص شخصی و شیمی درمانی HCC در آینده فراهم کند (۱۰).

در این مطالعه نیز، ما با استخراج داده‌های NGS بیماران HCC از پایگاه داده GEO، ژن‌های مرتبط با HCC را از طریق تجزیه و تحلیل بیان افتراقی بررسی، و با استفاده از WGCNA تغییرات ماژول را قبل و بعد از بیماری مقایسه کردیم و ژن‌های مربوطه را در مسیرهای عملکردی غنی شده با ماژول مطالعه کردیم تا تغییرات در تنظیم ژن در HCC را درک کنیم.

روش بررسی:

دریافت داده و آنالیز افتراقی بیان ژن:

مجموعه داده بیان ژنی GSE۱۷۶۲۷۱ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE176271>) که توسط وارگس^۴ و همکاران ارائه شده است، از پایگاه داده‌های GEO دانلود شد (۱۱، ۱۲). به طور خلاصه در این مطالعه، داده‌های متیلاسیون DNA، mRNA-seq و miRNA-seq از ۳۲ نمونه بافت تازه منجمد شامل ۱۶ نمونه HCC و ۱۶ بافت کبد طبیعی مجاور در بیماران آمریکایی آفریقایی تبار (AA) و آمریکایی اروپایی (EA) مبتلا به HCC با استفاده از ANOVA مخلوط مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سایت‌های سیتوزین-فسفات-گوانین (CpG)، mRNA و miRNAهایی شناسایی شدند که از نظر آماری به طور قابل توجهی در نمونه‌های HCC نسبت به نمونه‌های طبیعی مجاور تغییر می‌کنند

- ۱ weighted gene co-expression network analysis
- ۲ Gene Modules: A gene module is defined as a set of co-expressed genes to which the same set of transcription factors binds.
- ۳ Colorectal cancer
- ۴ Varghese

۵	Module eigengene
۶	Gene significance
۷	Module membership

پایین‌تر به دست آمد (شکل ۱-ج)؛ بنابراین، $\beta=8$ برای تولید یک درخت خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی با رنگ‌های مختلف که نشان‌دهنده ماژول‌های مختلف است، انتخاب شد. پس از قراردادن همه این ژن‌ها با الگوهای بیان مشابه در ماژول‌ها در مجموع ۱۳ ماژول (MEblack, MEblue, MEcyan, MEDarkgreen, MEDarkred, MEDarkturquoise, MEgreen, MEgrey, MELightcyan, MELightgreen, MELightyellow, MEMagenta, MEMidnightblue) با رنگ‌های مختلف نمایش داده شدند، توزیع هاب ژن‌ها در بین این ماژول‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است (جدول ۱ و شکل ۱-ج).

آنالیز روابط ماژول‌ها و صفات بالینی و آنالیز عملکردی ماژول معنی‌دار:

باتوجه به ضریب بین ME و صفات بالینی، ماژول Midnight blue به شدت با HCC همبستگی دارد ($r=0.94$, $p\text{-value}=1e-11$) (جدول ۱ و شکل ۱-د). همچنین نتایج آنالیز عملکردی نشان داد که ژن‌های این ماژول به طور قابل توجهی در سه مسیر بیولوژیک سم‌زدایی یون مس، هموستاز سلولی یون‌های فلزی و فعال‌سازی کمپلمان‌ها و مسیر لکتین نقش دارند ($p\text{-value}=0/001$) (شکل ۱-د).

ژن هاب استخراج از ماژول کلید:

پس از شناسایی ژن‌های مشترک بین DEG‌ها و هاب ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Venny مشخص شد که ژن‌های $CLEC4G$, $CLEC4M$, $FCN2$, $OIT3$ و $ASPG$ به طور معنی‌داری بین بافت HCC و بافت طبیعی مجاور تفاوت بیان داشتند (جدول ۲ و شکل ۱-ه). بررسی بیان ژن با استفاده از پایگاه‌های GEPIA و XenaBrowser نشان داد که سطوح بیان پنج ژن ذکر شده در بالا در بافت‌های HCC به طور قابل توجهی کمتر از نمونه‌های طبیعی بود که با نتایج تجزیه و تحلیل DEG‌s در مجموعه داده GSE176271 مطابقت داشت (شکل ۲ و ۳).

بحث:

کارسینوم هیپاتوسلولار یا HCC به‌عنوان یکی از شایع‌ترین تومورهای بدخیم، تأثیر چشمگیری بر سلامت و اقتصاد جامعه ایجاد می‌کند. این بیماری شامل یک سری تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی پیچیده است (۲۰) و کشف بیومارکرهای حساس و قابل اعتماد برای تشخیص آن می‌تواند به شناسایی بیماری در مراحل اولیه کمک کند. از این رو ما در این مطالعه با استفاده از روش WGCNA یک شبکه هم‌بیانی برای شناسایی ماژول کلیدی مرتبط با HCC ساختیم و نتایج نشان داد که ماژول Midnight blue بیشترین ارتباط را با بروز بیماری داشته و پنج ژن ($CLEC4G$, $CLEC4M$, $FCN2$, $OIT3$ و $ASPG$) به عنوان هاب ژن شناسایی شدند. همچنین بررسی عملکرد ژن‌های ماژول Midnight blue نشان داد که این ژن‌ها در فرایندهایی همچون سم‌زدایی یون مس، هموستاز سلولی یون‌های فلزی و فعال‌سازی کمپلمان‌ها و مسیر لکتین نقش دارند.

پروتئین CLEC4M (C-Type lectin domain family member 4) همچنین به‌عنوان CD209L نیز شناخته می‌شود) به

آنالیز عملکردی ماژول معنی‌دار:

آنالیز عملکردی ماژول‌های واجد شرایط با استفاده از زبان CluePedia نرم‌افزار Cytoscape انجام شد و فرایندها و مسیرهای بیولوژیک مرتبط با HCC و سطح معنی‌داری کمتر از $0/001$ انتخاب شدند. ابتدا ژن‌های ماژول وارد نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳,۶,۱ شد. پس از آن، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژن‌های ماژول انتخابی با استفاده از ابزار Cluepedia، اعمال مسیر KEGG و گزینه‌های Prosses بیولوژیکی و انتخاب آستانه معنی‌داری کمتر از $0/05$ انجام شد. علاوه بر این، اصطلاحات و مسیرهای هستی‌شناختی با مقدار کمتر از $0/05$ نامزد شدند (۱۳، ۱۴).

1.1. شناسایی و اعتبارسنجی هاب ژن‌ها:

هاب ژن‌های یک ماژول معمولاً دارای GS و MM بالا هستند (۱۸، ۱۹). بنابراین، ابتدا ژن‌هایی با $GS > 0/89$ و $MM > 0/92$ انتخاب کردیم. سپس با استفاده از نرم‌افزار (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>) "Venny" ژن‌های مشترک بین DEG‌ها و هاب‌ژن‌ها شناسایی شد. علاوه بر این، برای اعتبارسنجی نتایج آنالیز بیان ژن و همچنین تجزیه و تحلیل بقای کلی (OS) از پایگاه داده‌ای تجزیه و تحلیل تعاملی پروفایل بیان ژن (GEPIA) (<http://gepia.cancer-pku.cn>) و همچنین XenaBrowser (<https://xenabrowser.net>) استفاده شد.

یافته‌ها:

نتایج آنالیز افتراقی بیان ژن:

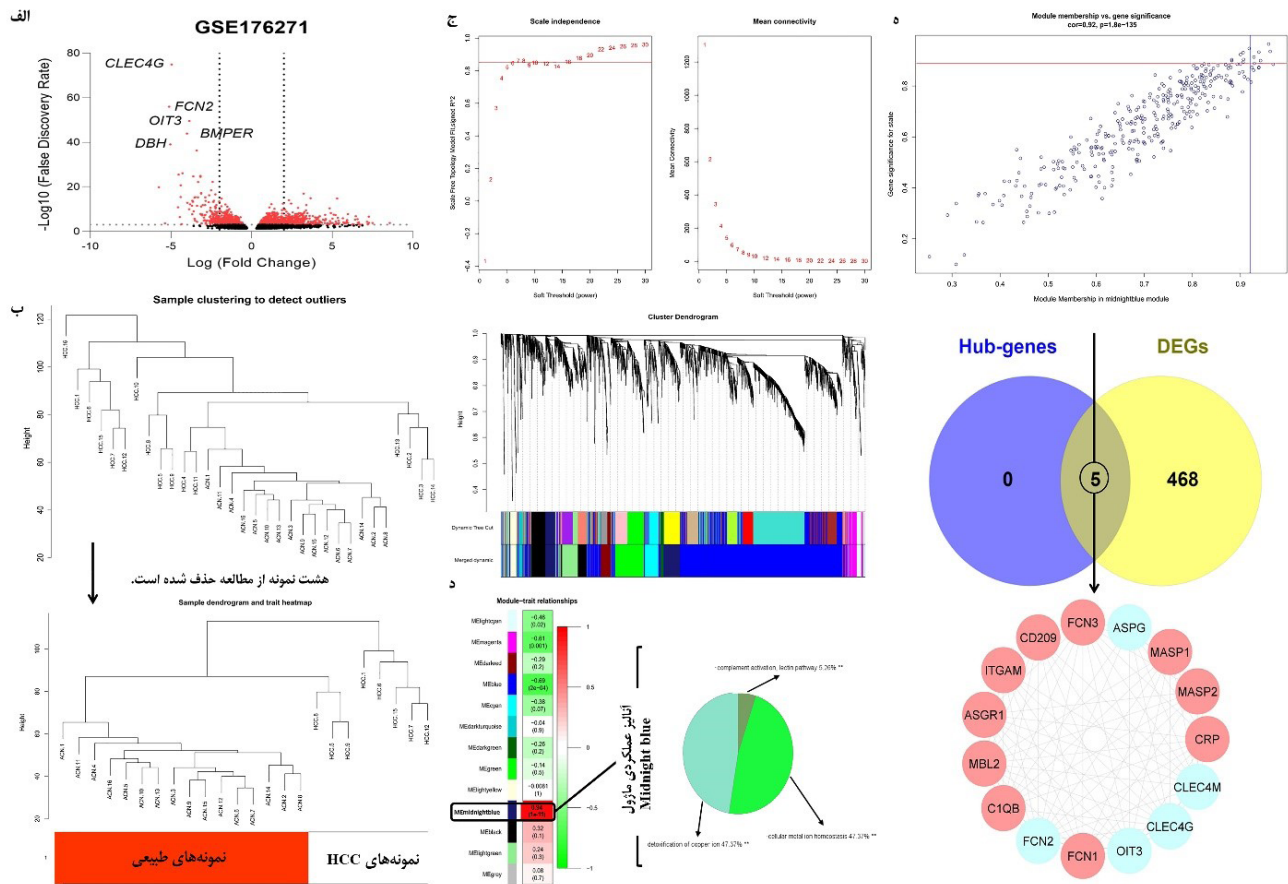
تعداد ۴۷۳ DEG^۱ در نمونه‌های HCC به دست آمد که شامل ۳۱۵ ژن با افزایش بیان و ۱۵۸ ژن با کاهش بیان بودند. ژن‌های $CLEC4G$, $FCN2$, $OIT3$, $BMPER$ و DBH بیشترین سطح معنی‌داری را در بین DEG‌های شناسایی شده داشتند (شکل ۱-الف). از آنجایی که تعداد ژن‌ها در طول WGCNA همیشه به $3000-5000$ محدود می‌شود، ۴۰۰۰ ژن برتر با واریانس بیشتر انتخاب شد. سپس آنالیز خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی بر روی ۳۲ نمونه با استفاده از مقادیر بیان این ۴۰۰۰ ژن انجام شد. نتایج نشان داد که این نمونه‌ها به جز هشت نمونه پرت، عمدتاً در دو گروه قرار می‌گیرند؛ بنابراین پارامتر "Height = ۱۱۵" بازنشانی و تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی دوباره انجام شد. نتایج خوشه‌بندی نشان داد که هشت نمونه پرت حذف شدند و ۲۴ نمونه باقیمانده به دو گروه مجزا تقسیم شدند. واضح‌تر، تمام بافت‌های HCC در یک گروه و تمام بافت‌های طبیعی مجاور در گروه دیگر قرار گرفتند که نشان‌دهنده تفاوت‌های نسبتاً بزرگ در بیان ژن بین بافت‌های طبیعی و بافت‌های سرطانی است (شکل ۱-ب).

ساخت ماژول‌های هم‌بیانی ژن:

در ابتدا، آستانه نرم با استفاده از آنالیز scale independence و mean connectivity ماژول‌ها با مقادیر توان متفاوت بین ۱ تا ۲۰ تعیین شد. در این مطالعه زمانی که مقدار β روی ۸ تنظیم شد، مقدار scale independence $0/85$ و mean connectivity

۱ Overall survival

۲ DEGs: Differentially Expressed Genes



شکل ۱. الف: نمودار آتشفشانی DEGها: محور عمودی مقدار میانگین $\log_{10}(\text{FDR})$ (محور y) مقدار میانگین $\log_{10}(\text{FC})$ (محور x) مقدار نشان دهنده DEG های معنیدار میباشد. **ب:** خوشه بندی سلسله مراتبی نمونه‌های HCC برای شناسایی داده‌های پرت. **ج:** شناسایی ماژولهای همبانی: **۱.** انتخاب توان β . **۲.** درخت خوشه‌بندی سلسله مراتبی؛ شاخه‌های درخت خوشه‌بندی مربوط به ماژولهای ژنی هستند. رنگها در نوار افقی نشان‌دهنده ماژولها هستند. **د:** بررسی معناداری ماژولها و ارتباط آنها با وقوع بیماری؛ **۲.** بررسی عملکردی و هستی‌شناسانه ژنهای ماژول Brown. هر رنگ نشان‌دهنده یک مسیر است. درصدها تعداد ژنهای دخیل در هر مسیر را نشان میدهد و ستارهها نیز نشان‌دهنده معناداری هر مسیر است. **ه:** **۱.** بررسی GS و MM برای ماژولهای **Midnightblue**; **۲.** دیاگرام ژنهای مشترک بین DEG ها و ماژول **Midnightblue**. رنگ آبی نشان‌دهنده ماژول **Midnightblue** و رنگ زرد نشان‌دهنده DEGها است. **۳.** شبکه همبانی ماژولهای **Midnightblue**. دایره‌های آبی رنگ ماژولهای مشترک هستند.

می‌دهد. طبق بررسی‌های انجام شده، این تناقض در مشاهدات ممکن است ناشی از این واقعیت باشد که CLEC4M به طور اختصاصی هم در سلول‌های اندوتلیال سینوسی و هم در بافت‌های توموری HCC بیان می‌شود. سینوزئیدهای کبدی از یک سری سلول‌های اندوتلیال سینوسی و سلول‌های کوپفر تشکیل شده‌اند که اکسیژن و مواد مغذی را برای سلول‌های کبدی فراهم کرده و نوعی شبکه توزیع را در سراسر کبد تشکیل می‌دهند (۲۲-۲۴). پروتئین CLEC4M توانایی اتصال به مولکول چسبندگی بین سلولی ۳ (ICAM3) را دارا بوده و منجر به فعال شدن و فرخوانی سلول‌های ICAM3⁺ - و شروع پاسخ ایمنی به پاتوژن‌ها یا سلول‌های سرطانی می‌شود.

بنابراین، یکریز محیط با سطح بیان پایین CLEC4M و عروق ناکامل ممکن است به تکثیر سلول‌های تومور و فرار از نظارت ایمنی در سلول‌های HCC کمک کند. به دنبال آن، افزایش تدریجی در

خانواده لکتین نوع C تعلق دارد و در سلول‌های اندوتلیال غدد لنفاوی، سینوزئیدها و سلول‌های اندوتلیال سینوسی کبد بیان می‌شود. مطالعات انجام شده در زمینه تغییر بیان CLEC4M در بیماران HCC نشان می‌دهد که افزایش بیان این ژن در بافت‌های توموری HCC با زمان‌های کوتاه‌تر OS و RFS بعد از جراحی در بیماران مبتلا به HCC مرتبط است. در مطالعه دیگری که توسط Luo و همکاران در زمینه تأثیر تغییر بیان CLEC4M در HCC انجام شد نیز دیده شد که بیان CLEC4M در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های طبیعی به طور معنی‌داری کاهش یافته است (۲۱). ما نیز در این مطالعه مشاهده کردیم که بیان CLEC4M در بیماران HCC نسبت به بافت نرمال مجاور آن کاهش معنی‌داری داشته است. همچنین نتایج بررسی پایگاه داده‌های XenaBrowser و GEPIA هم تأیید کننده این مطلب بودند. این موضوع، نقش بحث برانگیز CLEC4M را در پیشرفت تومور نشان

جدول ۱. اسامی مازولهای بدست آمده برای شبکه ی همبستگی HCC

ردیف	اسم مازول	تعداد ژن	ارتباط با بیماری	معنیداری
۱	ME midnightblue	۳۳۰	۰.۹۴	۱۱-۱۰
۲	ME black	۲۸۰	۰.۳۳	۰.۱
۳	ME lightgreen	۲۱۹	۰.۲۴	۰.۳
۴	ME grey	۳۵	۰.۰۸	۰.۷
۵	ME lightyellow	۶۶	-۰.۰۸۱	۱.۰
۶	ME darkturquoise	۳۹	-۰.۰۴	۰.۹
۷	ME green	۳۴۴	-۰.۱۴	۰.۵
۸	ME darkgreen	۴۰	-۰.۲۶	۰.۲
۹	ME darkred	۱۲۸	۰.۲۹	۰.۲
۱۰	ME cyan	۱۶۱	-۰.۳۸	۰.۰۷
۱۱	ME lightcyan	۱۰۰	-۰.۴۶	۰.۰۲
۱۲	ME magenta	۱۴۵	-۰.۶۱	۰.۰۰۱
۱۳	ME blue	۲۱۱۳	-۰.۶۹	۰.۴-۲۰

جدول ۲. اسامی ژنهای مشترک بین DEGها و هابژنهای مازول Midnightblue

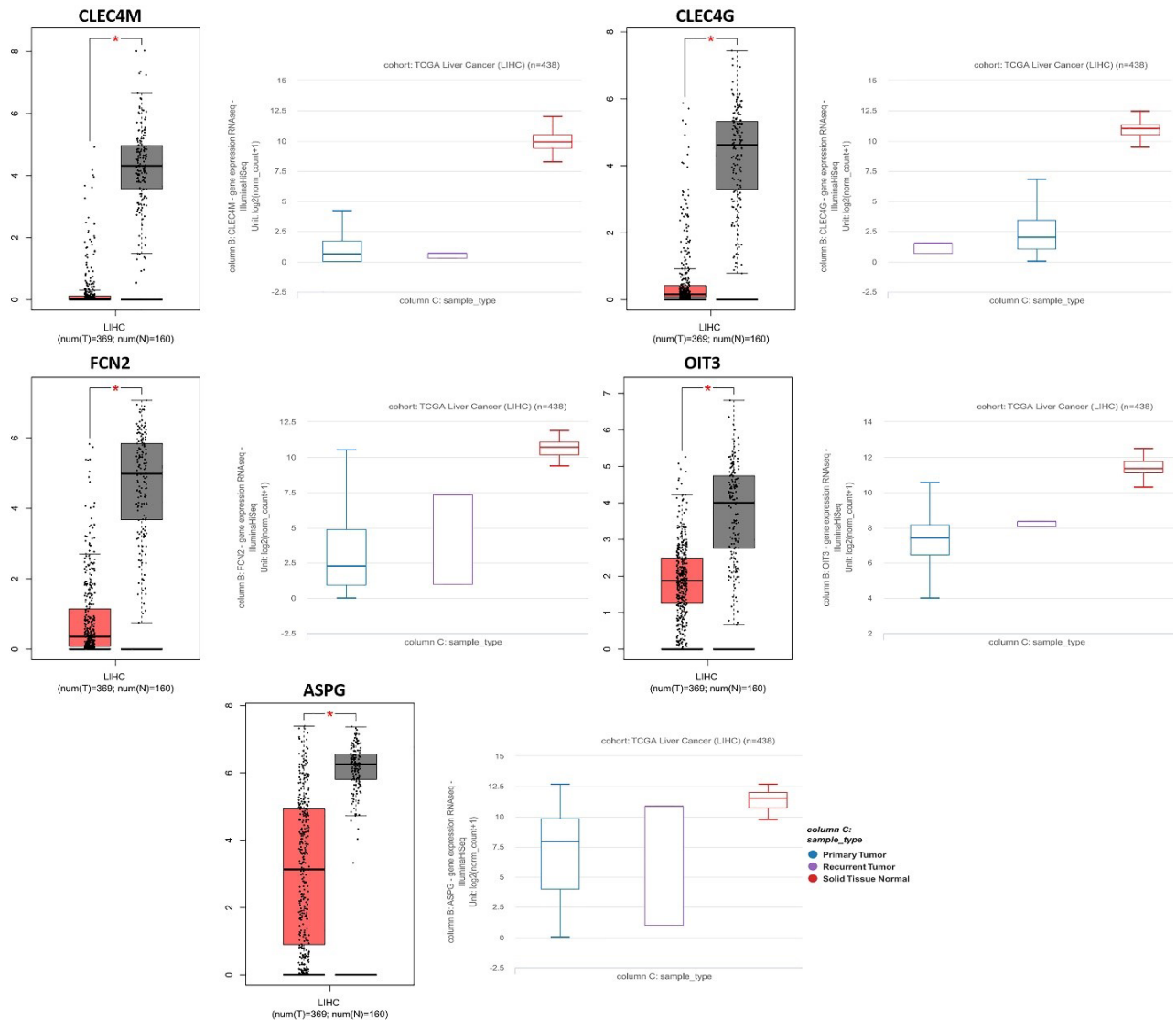
نام ژن	LogFC	P-Value
CLEC4M	-۵/۷۵	۱,۴۷e-۲۰
CLEC4G	-۴/۹۶	۱,۳۱e-۷۵
FCN2	-۵/۱۲	۱,۰۵e-۵۶
OIT3	-۳/۸۷	۲,۶۶e-۵۰
ASPG	-۲/۱۸	۵e-۰۴

پیدایش سینوزوئیدهای کبدی و عروق اطراف آن ممکن است تغذیه و اکسیژن کافی متناسب با رشد تومور را فراهم کند، درحالی که به آن زمان می‌دهد تا با فشارهای ایمنی محیط میزبان سازگار شود (۲۱). پروتئین CLEC4G یا LSECtin که به ابر خانواده گیرنده‌های لکتین نوع C تعلق دارد، یک پروتئین غشایی نوع II بوده و به طور خاص در سلول‌های LSEC و کوپفر کبد بیان می‌شود. ژن این پروتئین یک گیرنده متصل شونده به گلیکان و عضوی از خانواده لکتین نوع C را کد می‌کند که در پاسخ ایمنی نقش دارد. گیرنده‌های لکتین نوع C، نوعی گیرنده‌های تشخیص الگو هستند که روی سلول‌های ایمنی قرار گرفته‌اند و در شناسایی و جذب گلیکوپروتئین‌های خودی و غیر خودی، واسطه‌گری برای چسبندگی سلولی، پاک‌سازی گلیکوپروتئین‌ها و عملکردهای سیگنالینگ سلولی نقش دارند. پروتئین این ژن به N-گلیکان‌های پیچیده پروتئین‌های پوشش ویروس ابولا، فیلوویروس نیل غربی و ویروس SARS متصل می‌شود. مطالعات بر روی موش‌ها، نشان داده است که این پروتئین سلول‌های T فعال را تشخیص داده و سیگنال‌دهی با واسطه گیرنده سلول T را به طور منفی تنظیم می‌کند. همچنین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده ایمنی کبدی با واسطه سلول‌های NK در موش عمل می‌کند (۲۵). مطالعات نشان می‌دهند هنگامی که LSECtin در کبد بیان می‌شود، به عنوان یک مولکول مهارکننده عمل کرده و توانایی ایمنی سلول‌های T را برای ارتقای تحمل HBV محدود

می‌کند (۲۶). از نظر ایمونولوژیکی، تومورها کاملاً شبیه عفونت‌های مزمن ویروسی هستند. از آنجایی که نقش بالقوه LSECtin در ایمنی ضد توموری ناشناخته باقی مانده است، فرضیه‌ها بر این بوده که سلول‌های توموری ممکن است از طریق LSECtin پاسخ‌های ایمنی سلول‌های T ضد توموری را مختل کنند و این مکانیسم به تغییر تعادل به سمت یک محیط سرکوب کننده ایمنی در محل تومور کمک کند (۲۷). اما نتایج مطالعه ما حاکی از کاهش بیان این ژن در نمونه‌های توموری می‌باشد که در پایگاه‌های GEPIA و XenaBrowser مورد تایید قرار گرفته است. با توجه به اینکه مطالعات زیادی در مورد نقش این ژن در سرکوب یا القای سرطان صورت نگرفته نمی‌توان دلیل علمی برای این موضوع ارائه کرد و اثبات آن نیاز به آزمایشات بیشتر دارد.

ژن FCN2 پروتئین فیکولین ۲- (L-ficolin, FCN2) را کد می‌کند که یک پروتئین محلول در سرم بوده و عمدتاً در کبد سنتز می‌شود. این پروتئین از طریق مسیر لکتین نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی دارد که با نتیجه آنالیز عملکردی مازول Midnight blue مشخص شد که در فرایند فعال‌سازی کیمپلمان‌ها و مسیر لکتین نیز نقش دارد. زیرا یک گیرنده تشخیص الگو (PRR) است که می‌تواند مولکول‌های خاص مرتبط با پاتوژن‌های خاصی را شناسایی کند؛ بنابراین، هنگامی که تولید فیکولین ۲- کاهش می‌یابد، عملکرد ایمنی در بافت‌های HCC نیز می‌تواند کاهش یابد. تحقیقات مرتبط با ویروس هپاتیت B و HCC و فیکولین ۲- انسانی نشان می‌دهند که سطح بیان فیکولین ۲- در سرم و کبد در بیماران HCC و سیروز در مقایسه با افراد سالم به طور قابل توجهی پایین است (۲۸). ما نیز در این مطالعه مشاهده کردیم که بیان CLEC4M در بیماران HCC نسبت به بافت نرمال مجاور آن کاهش معنی‌داری داشته است. همچنین نتایج بررسی پایگاه داده‌های GEPIA و XenaBrowser نیز تایید کننده این مطلب بودند. ژن FCN2 در بسیاری از بیماری‌های عفونی از جمله HBV و HCV فعال بوده است، با این حال، تحقیقات کمی عملکرد FCN2 را در HCC گزارش کرده‌اند. علاوه بر این، به طور قاطع گزارش شده است که مسیر سیگنالینگ TGF-β نقش مهمی در تنظیم شروع بدخیمی، پیشرفت و متاستاز، از جمله در سرطان پستان، سرطان پانکراس، کارسینوم کولون و کارسینوم سلول کبدی ایفا می‌کند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که کاهش FCN2 TGF-β1 را در سلول‌های HCC به شدت تعدیل می‌کند، در همین حال، فعال‌سازی TGF-β1 منجر به فسفوریلاسیون Smad2 و Smad3 می‌شود. از این رو، روی هم رفته، مسدود کردن مسیرهای سیگنالینگ TGF-β/Smad ممکن است یک درمان هدفمند برای متاستاز سلول‌های HCC با بیان FCN2 بالا ارائه دهد (۲۹).

ژن OIT3 یا LZP نوعی ژن اختصاصی کبد است که پروتئین حاوی دامنه زونا پلوسیدا (ZP) به نام پروتئین حاوی دامنه ZP ویژه کبد (LZP) را کد می‌کند. اگرچه این پروتئین عمدتاً روی پوشش هسته‌ای سلول‌های کبدی قرار گرفته است اما می‌تواند وارد جریان خون شود. همچنان که نتایج مطالعه ما نیز نشان داده است، بیان پروتئین LZP در HCC و رده‌های سلولی آن کاهش می‌یابد. برخی مطالعات نشان می‌دهند که کاهش سطح RNA پیام‌رسان HLZP (mRNA) می‌تواند، حداقل در برخی از نمونه‌های HCC، به وضعیت متیلاسیون پروموتور احتمالی LZP مرتبط باشد. پژوهش‌ها

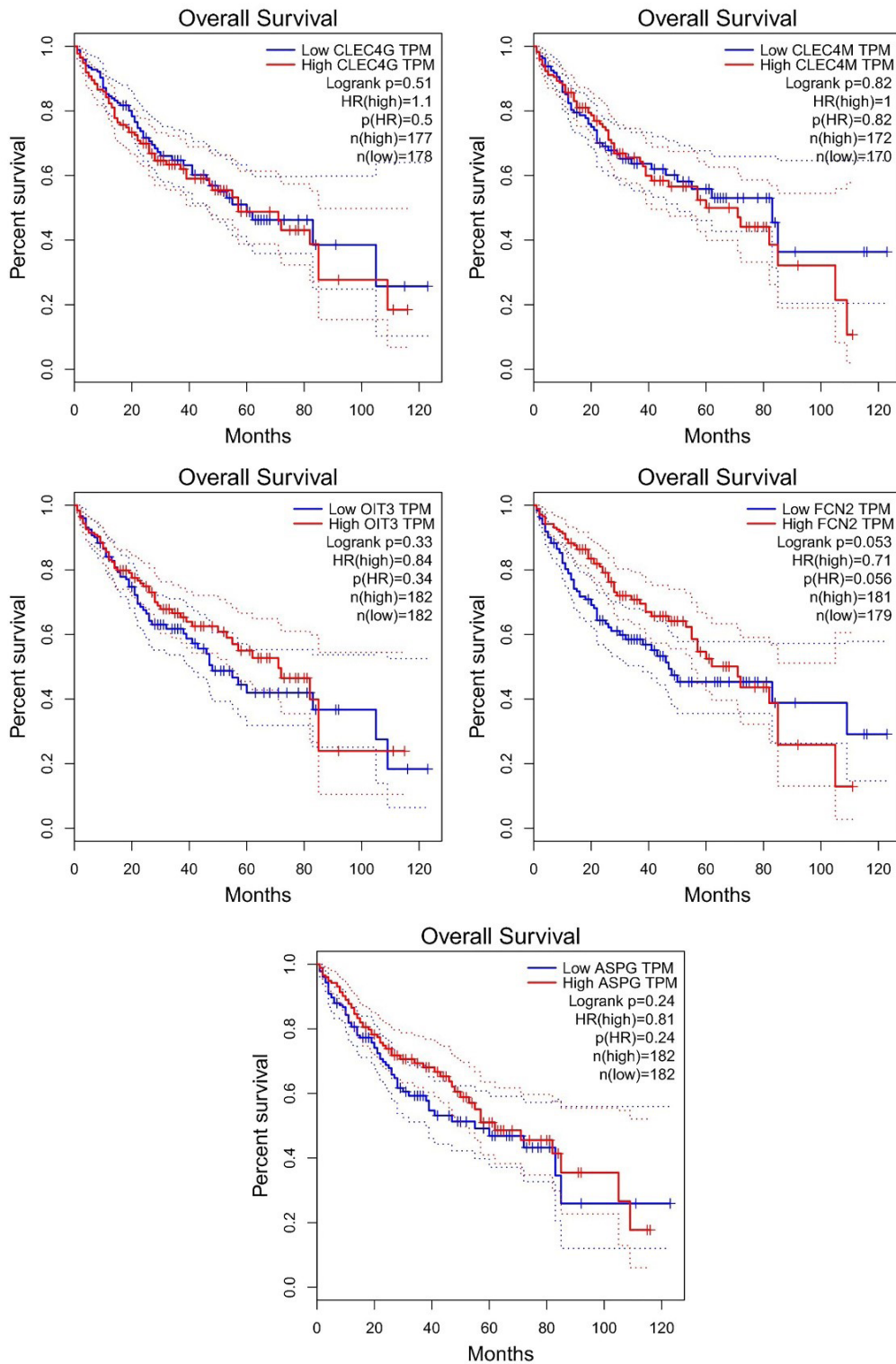


شکل ۲. نتایج اعتبارسنجی ژنهای *CLEC4M*، *CLEC4G*، *FCN2*، *OIT3* و *ASPG* در پایگاه داده‌های GEPIA؛ نمودارها نشان دهنده ی میزان تغییر بیان ژن هستند. رنگ قرمز: نمونه توموری و رنگ خاکستری: نمونه نرمال. و نتایج اعتبارسنجی ژنهای *CLEC4M*، *CLEC4G*، *FCN2*، *OIT3* و *ASPG* در پایگاه داده‌های XenaBrowser؛ نمودارها نشان‌دهنده ی میزان تغییر بیان ژن هستند

یک ویژگی مرتبط با کاهش بدخیمی سلولی است. همچنین پیشنهاد شده است که *ASPG*، از طریق فعالیت لیزوفسفولیپازی خود که واسطه تبدیل لیزوفسفاتیدیل اینوزیتول به گلیسروفسفوانوزیتول بوده و یک پیام‌رسان مهم درون‌سلولی مشتق شده از مسیر RAS است نقش مهمی در کنترل تکثیر سلولی ایفا می‌کند. همچنین در مطالعه‌ای که در زمینه شناسایی مسیرهای کلیدی و ژن‌های دخیل در بیماری کبد چرب غیرالکلی توسط لیو^۱ و همکاران صورت گرفت مشاهده شد که بیان ژن *ASPG* در نمونه‌های توموری Liu در مقایسه با نمونه‌های طبیعی به طور قابل توجهی کاهش یافتند (۳۰).

نشان می‌دهند که *LZP* احتمالاً می‌تواند به‌عنوان نشانگر زیستی بالقوه برای تشخیص پاتولوژیک HCC استفاده شود اما اثبات آن نیاز به آزمایش‌های بیشتر دارد.

ژن *ASPG* کدکننده نوعی پروتئین ۶۰ کیلو دالتونی به نام اسپاراژینار بوده که لیزوفسفولیپاز نیز نامیده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که این پروتئین به‌احتمال زیاد دارای فعالیت‌های اسپاراژینازی، لیزوفسفولیپازی، ترانس آسیلازی و PAF (فاکتور فعال‌کننده پلاکت) استیل هیدرولازی باشد. اثر اصلی *ASPG* که در سلول‌های یوکاریوتی مشاهده شده، کاهش فعالیت کانال سدیم اپیتلیال (ENaC) بوده که



شکل ۳. نتایج آنالیز بقای کلی (OS) ژنهای CLEC4G، CLEC4M، OIT3، FCN2 و ASPG در پایگاه داده‌های GEPIA؛ نمودارها تاثیر تغییرات بیان ژن مورد نظر بر بقای بیمار را نشان میدهند.

پایین تری دارند که نشان دهنده رابطه معکوس بین MT و آپوپتوز در تومورهای کبدی انسان، به ویژه در موارد متاستاتیک است (۴۳). در مطالعه دیگری، فقدان یا کاهش رنگ پذیری MT و افزایش نرخ آپوپتوز در موارد HCC در مقایسه با کبد سیروتیک یا طبیعی مجاور مشاهده شد که از یافته‌های مطالعه تانیموتو حمایت می‌کند (۴۴). از طرفی در مطالعه ابارا^۴ مشاهده شده که میزان تجمع Cu در سلول‌های HCC کوچک، که در آن Cu به صورت Cu-MT یا Zn-Cu وجود داشت، بیشتر از پارانشیم کبد اطراف آن بود. تجمع Cu و MT حضور MT در کبد ممکن است با سرطان‌زایی کبد مرتبط باشد، که مطابق با داده‌های تجربی به دست آمده در موش‌های لانگ-ایوانز است که HCC به صورت خود به خودی در آنها ایجاد می‌شود (۴۵). در مطالعه ژانگ^۵ و همکاران بررسی شد که MT^{۱H} که عضوی از خانواده MTها می‌باشد به عنوان سرکوبگر تومور در HCC عمل می‌کند و با تعامل و ارتقای فعالیت هیستون متیل ترانسفراز یوکروماتین هیستون متیل ترانسفراز ۱ (EHMT^۱) که در سرطان‌زایی سرطان پروستات نقش دارد، باعث پیشرفت بیماری می‌شود که همچنان در افراد مبتلا به HCC مورد بحث قرار می‌گیرد (۴۶، ۴۷). در مطالعه دیگری که توسط گونگ^۶ صورت گرفته مشاهده شد که ناحیه پروموتور MT^{۱H} در HCC هیپرمتیله شده و برعکس، دمتیلاسیون پروموتور MT^{۱H} سرکوب بیان MT^{۱H} را معکوس می‌کند (۴۸). تنظیم بیان MT^{۱H} از طریق کاهش مسیرهای متعددی که در سرطان‌زایی شرکت دارند، مانند مسیرهای NF-κB مرتبط با التهاب، Jak-STAT، TNF و Wnt با بروز HCC مرتبط است. همچنین در مطالعه ۵۵۵ مشاهده شده که کاهش MT^{۱M} یکی دیگر از اعضای خانواده MT باعث افزایش فعالیت NF-κB شده و منجر به مهار آپوپتوز و کمک به پیشرفت HCC می‌شود (۴۹).

نتیجه‌گیری:

در مجموع، ما با استفاده از روش WGCNA به بررسی تغییرات ژنتیکی فرایند سرطان‌زایی HCC در بین نمونه‌های سالم و HCC پرداختیم. طبق نتایج حاصل از این پژوهش، تعداد ۱۳ ماژول شناسایی شد که از بین آنها ماژول Midnight blue ارتباط قابل ملاحظه‌ای با بروز HCC داشت. بررسی عملکرد ژن‌های این ماژول نشان داد که این ژن‌ها در مسیرهای سم‌زدایی یون مس، هموستاز سلولی یون‌های فلزی و فعال‌سازی کمپلمان‌ها و مسیر لکتین نقش مهمی دارند. همچنین هاب ژن‌های مشترکی بین ژن‌های کلیدی ماژول Midnight blue و DEGها شناسایی شد که بعد از بررسی تغییر بیان آنها در پایگاه‌های GEPIA و XenaBrowser و مطالعه مقالات به‌عنوان بیومارکرهای احتمالی مرتبط با HCC معرفی شدند. شناسایی این هاب ژن‌ها به درک بهتر مسیرهای بیولوژیک و ژن‌های کلیدی مرتبط با پیشرفت بیماری و استفاده از نشانگرهای پیش‌آگهی و پیش‌بینی‌کننده برای HCC را روشن کند که نیاز به تجزیه و تحلیل بیشتر و آزمایش‌های فراوان تری است.

بررسی عملکردی ماژول Midnight blue نشان داد، این ماژول در فرایندهای هموستاز سلولی یون‌های فلزی، سم‌زدایی یون مس نیز نقش دارد. با بررسی ژن‌های مرتبط با این فرایندها در CluePedia مشاهده شد که ژن‌های MT^{۱E}, MT^{۱F}, MT^{۱G}, MT^{۱H}, MT^{۱L}, MT^{۱M}, MT^{۱HL} که همگی در ماژول Midnight blue حضور دارند در مسیرهای هموستاز سلولی یون‌های فلزی، سم‌زدایی یون مس دارای نقش کلیدی هستند.

خانواده متالوتیونین (MTs)^۱ پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم، غنی از سیستئین و میل ترکیبی بالا برای یون‌های فلزی بوده و در بسیاری از فرایندهای پاتوفیزیولوژیک، از جمله هموستاز و سم‌زدایی یون‌های فلزی، محافظت سلولی در برابر آسیب اکسیداتیو، تکثیر سلولی و آپوپتوز، مقاومت به دارو و رادیوتراپی و فرایند سرطان‌زایی نقش دارند (۳۱). MTها به دلیل توانایی در اتصال به فلزات سنگین به عنوان واسطه‌های سم‌زدایی سلولی فلزاتی مانند کادمیوم (Cd)، جیوه (Hg)، مس (Cu) و نقره (Ag) مورد توجه قرار گرفته‌اند. این پروتئین‌ها با اتصال به فلزات ضروری بیولوژیک مانند روی (Zn) و Cu به عنوان یک مخزن برای آنها عمل کرده و از این طریق انتقال برگشت‌پذیر این یون‌ها را به ماکرومولکول‌های سلولی تسهیل می‌کنند. بسیاری از پروتئین‌های سلولی، آنزیم‌ها، DNA و RNA پلیمرها و فاکتورهای رونویسی برای فعالیت بیولوژیکی خود به روی نیاز دارند، بنابراین MTها عملکرد خود را با عمل به عنوان دهنده Zn (MT) یا به عنوان گیرنده Zn (apo-MT) کنترل می‌کنند. تحقیقات نشان می‌دهند که Apo-MT باعث از بین رفتن ظرفیت اتصال فاکتورهای رونویسی DNA انگشت روی در شرایط آزمایشگاهی می‌شوند، در حالی که Zn متصل به MT فعالیت آنها را تقویت می‌کند (۳۲، ۳۳). به عنوان مثال، پروتئین سرکوبگر تومور p۵۳ دارای یک دمین اتصال به DNA بوده که توسط یک یون Zn تثبیت شده، که برای عملکرد p۵۳ ضروری است (۳۴-۳۸). شلاته شدن Zn موجب تخریب دمین اتصال به DNA پروتئین p۵۳ شده و پروتئین را به فنوتیپ ایمونولوژیکی مشابه با بسیاری از اشکال p۵۳ جهش یافته تبدیل می‌کند (۳۹). افزایش بیان مداوم Apo-MT از طریق القای حالت null-p۵۳ پتانسیل حذف Zn از p۵۳ و غیرفعال کردن آن را به طور مشابه با سایر شلاتورهای روی دارد (۴۰). اخیراً مشاهده شده است که ظرفیت الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس خاص MT برای ایجاد توقف رشد سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه، این فرضیه را پشتیبانی می‌کند، همانطور که فرکانس پایین‌تر جهش p۵۳ مشاهده شده در موارد سرطان پستان که بیان بیش از حد MT را نشان می‌دهند (۴۱). در مطالعه‌ای که توسط تانیموتو^۳ و همکاران با هدف بررسی تغییرات ایمونوهیستوشیمی پروتئین‌های MT در HCC صورت گرفت مشاهده شد که سلول‌های غیر توموری کبدی رنگ‌پذیری بیشتری در مورد MT ارائه کردند. و مشخص شد که بیان شدید MT در ندول‌های سیروزی غیر سرطانی در HCC و بیان کم آن در سیروزی کبدی غیر توموری احتمالاً نشان‌دهنده رابطه بین بیان MT و پیشرفت بیماری است (۴۲). این محققان همچنین مشاهده کردند که در نمونه‌های اولیه HCC در مقایسه با موارد متاستاتیک، ایمونوهیستوشیمی MT متوسط و شاخص آپوپتوز

۴ Ebara
۵ Zhang
۶ Gong

۲ Metallothioneins
۳ Tanimoto

REFERENCES

1. Cancer Today [Internet]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0.
2. Cao M, Li H, Sun D, Chen W. Cancer burden of major cancers in China: a need for sustainable actions. *Cancer Commun (Lond)* 2020;40(5):205-10. doi: 10.1002/cac2.12025
3. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 2018;391(10125):1023-75. doi: 10.1016/s0140-6736(17)33326-3
4. Hayashi H, Takiguchi Y, Minami H, Akiyoshi K, Segawa Y, Ueda H, et al. Site-specific and targeted therapy based on molecular profiling by next-generation sequencing for cancer of unknown primary site: a nonrandomized phase 2 clinical trial. *JAMA Oncol* 2020;6(12):1931-8. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.4643
5. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 2008;9:559. doi: 10.1186/1471-2105-9-559
6. Zheng PF, Zou QC, Chen LZ, Liu P, Liu ZY, Pan HW. Identifying patterns of immune related cells and genes in the peripheral blood of acute myocardial infarction patients using a small cohort. *J Transl Med* 2022;20(1):321. doi: 10.1186/s12967-022-03517-1
7. Giulietti M, Occhipinti G, Principato G, Piva F. Weighted gene co-expression network analysis reveals key genes involved in pancreatic ductal adenocarcinoma development. *Cell Oncol (Dordr)* 2016;39(4):379-88. doi: 10.1007/s13402-016-0283-7
8. Wang P, Zheng H, Zhang J, Wang Y, Liu P, Xuan X, et al. Identification of key gene modules and genes in colorectal cancer by co-expression analysis weighted gene co-expression network analysis. *Biosci Rep* 2020;40(9):BSR20202044. doi: 10.1042/bsr20202044
9. Du Y, Ma X, Wang D, Wang Y, Zhang T, Bai L, et al. Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein as a candidate biomarker for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Oncol* 2021;12(5):2361-76. doi: 10.21037/jgo-21-468
10. Liu X, Liu Y, Liu Z, Zhang Y, Ma Y, Bai J, et al. Identification of SLITRK6 as a novel biomarker in hepatocellular carcinoma by comprehensive bioinformatic analysis. *Biochem Biophys Rep* 2021;28:101157. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101157
11. Varghese RS, Barefoot ME, Jain S, Chen Y, Zhang Y, Alley A, et al. Integrative analysis of DNA methylation and microRNA expression reveals mechanisms of racial heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Front Genet* 2021;12:708326. doi: 10.3389/fgene.2021.708326
12. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* 2013;41(Database issue):D991-5. doi: 10.1093/nar/gks1193
13. Zhang S, Cao R, Li Q, Yao M, Chen Y, Zhou H. Comprehensive analysis of lncRNA-associated competing endogenous RNA network in tongue squamous cell carcinoma. *PeerJ* 2019;7:e6397. doi: 10.7717/peerj.6397
14. Wang C, Liu S, Zhang X, Wang Y, Guan P, Bu F, et al. SKA3 is a prognostic biomarker and associated with immune infiltration in bladder cancer. *Hereditas* 2022;159(1):20. doi: 10.1186/s41065-022-00234-z
15. Tian Z, He W, Tang J, Liao X, Yang Q, Wu Y, et al. Identification of important modules and biomarkers in breast cancer based on WGCNA. *Onco Targets Ther* 2020;13:6805-17. doi: 10.2147/ott.s258439
16. Gao M, Kong W, Huang Z, Xie Z. Identification of key genes related to lung squamous cell carcinoma using bioinformatics analysis. *Int J Mol Sci* 2020;21(8):2994. doi: 10.3390/ijms21082994
17. Zhou Y, Qiu J, Liu S, Wang P, Ma D, Zhang G, et al. CFDP1 promotes hepatocellular carcinoma progression through activating NEDD4/PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Cancer Med* 2023;12(1):425-44. doi: 10.1002/cam4.4919
18. Lou Y, Tian GY, Song Y, Liu YL, Chen YD, Shi JP, et al. Characterization of transcriptional modules related to fibrosing-NAFLD progression. *Sci Rep* 2017;7(1):4748. doi: 10.1038/s41598-017-05044-2
19. Hu Y, Pan J, Xin Y, Mi X, Wang J, Gao Q, et al. Gene expression analysis reveals novel gene signatures between young and old adults in human prefrontal cortex. *Front Aging Neurosci* 2018;10:259. doi: 10.3389/fnagi.2018.00259
20. Li X, Xu W, Kang W, Wong SH, Wang M, Zhou Y, et al. Genomic analysis of liver cancer unveils novel driver genes and distinct prognostic features. *Theranostics* 2018;8(6):1740-51. doi: 10.7150/thno.22010
21. Luo L, Chen L, Ke K, Zhao B, Wang L, Zhang C, et al. High expression levels of CLEC4M indicate poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2020;19(3):1711-20. doi: 10.3892/ol.2020.11294
22. Crouch EE, Doetsch F. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. *Nat Protoc* 2018;13(4):738-51. doi: 10.1038/nprot.2017.158
23. Brunt EM, Gouw AS, Hubscher SG, Tiniakos DG, Bedossa P, Burt AD, et al. Pathology of the liver sinusoids. *Histopathology* 2014;64(7):907-20. doi: 10.1111/his.12364
24. Patten DA, Wilson GK, Bailey D, Shaw RK, Jalkanen S, Salmi M, et al. Human liver sinusoidal endothelial cells promote intracellular crawling of lymphocytes during recruitment: a

- new step in migration. *Hepatology* 2017;65(1):294-309. doi: 10.1002/hep.28879
24. GeneCards [Internet]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CLEC4G&keywords=LSECTin>.
 25. Liu B, Wang M, Wang X, Zhao D, Liu D, Liu J, et al. Liver sinusoidal endothelial cell lectin inhibits CTL-dependent virus clearance in mouse models of viral hepatitis. *J Immunol* 2013;190(8):4185-95. doi: 10.4049/jimmunol.1203091
 26. Xu F, Liu J, Liu D, Liu B, Wang M, Hu Z, et al. LSECTin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res* 2014;74(13):3418-28. doi: 10.1158/0008-5472.can-13-2690
 27. Chen T, Hu Y, Ding Q, Yu J, Wang F, Luo F, et al. Serum ficolin-2 concentrations are significantly changed in patients with hepatitis B virus infection and liver diseases. *Viral Sin* 2015;30(4):249-60. doi: 10.1007/s12250-015-3605-4
 28. Yang G, Liang Y, Zheng T, Song R, Wang J, Shi H, et al. FCN2 inhibits epithelial-mesenchymal transition-induced metastasis of hepatocellular carcinoma via TGF- β /Smad signaling. *Cancer Lett* 2016;378(2):80-6. doi: 10.1016/j.canlet.2016.05.007
 29. Liu J, Lin B, Chen Z, Deng M, Wang Y, Wang J, et al. Identification of key pathways and genes in nonalcoholic fatty liver disease using bioinformatics analysis. *Arch Med Sci* 2020;16(2):374-85. doi: 10.5114/aoms.2020.93343
 30. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2004;45(2):103-18. doi: 10.1111/j.1365-2559.2004.01922.x
 31. Zeng J, Vallee BL, Kägi JH. Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(22):9984-8. doi: 10.1073/pnas.88.22.9984
 32. Zeng J, Heuchel R, Schaffner W, Kägi JH. Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Lett* 1991;279(2):310-2. doi: 10.1016/0014-5793(91)80175-3
 33. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994;265(5170):346-55. doi: 10.1126/science.8023157
 34. Coffey AI, Knowles PP. Divalent metal ions induce conformational change in pure, human wild-type p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* 1994;1209(2):279-85. doi: 10.1016/0167-4838(94)90197-x
 35. Hainaut P, Milner J. A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer Res* 1993;53(8):1739-42.
 36. Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 1993;7(12B):2556-64. doi: 10.1101/gad.7.12b.2556
 37. Rainwater R, Parks D, Anderson ME, Tegtmeyer P, Mann K. Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol* 1995;15(7):3892-903. doi: 10.1128/mcb.15.7.3892
 38. Méplan C, Richard MJ, Hainaut P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene* 2000;19(46):5227-36. doi: 10.1038/sj.onc.1203907
 39. Hainaut P, Milner J. A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer Res* 1993;53(8):1739-42.
 40. Abdel-Mageed A, Agrawal KC. Antisense down-regulation of metallothionein induces growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 1997;4(3):199-207.
 41. Tanimoto K, Akbar SM, Yamauchi Y, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Immunohistochemical localization of metallothionein in hepatocellular carcinoma: preferential expression in non-cancerous cirrhotic nodules. *Oncol Rep* 1998;5(4):805-9. doi: 10.3892/or.5.4.805
 42. Deng DX, Chakrabarti S, Waalkes MP, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma. *Histopathology* 1998;32(4):340-7. doi: 10.1046/j.1365-2559.1998.00348.x
 43. Cai L, Wang GJ, Xu ZL, Deng DX, Chakrabarti S, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma (HCC) from northern China. *Anticancer Res* 1998;18(6B):4667-72.
 44. Ebara M, Fukuda H, Hatano R, Saisho H, Nagato Y, Suzuki K, et al. Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *J Hepatol* 2000;33(3):415-22. doi: 10.1016/s0168-8278(00)80277-9
 45. Zhang F, Guo S, Zhong W, Huang K, Liu Y. Integrative analysis of metallothioneins identifies MT1H as candidate prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Front Mol Biosci* 2021;8:672416. doi: 10.3389/fmolb.2021.672416
 46. Han YC, Zheng ZL, Zuo ZH, Yu YP, Chen R, Tseng GC, et al. Metallothionein 1h tumour suppressor activity in prostate cancer is mediated by euchromatin methyltransferase 1. *J Pathol* 2013;230(2):184-93. doi: 10.1002/path.4169
 47. Gong W, Liu Y, Qu H, Liu A, Sun P, Wang X. The effect of CTCF binding sites destruction by CRISPR/Cas9 on transcription of metallothionein gene family in liver hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;510(4):530-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.107
 48. Mao J, Yu H, Wang C, Sun L, Jiang W, Zhang P, et al. Metallothionein MT1M is a tumor suppressor of human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2012;33(12):2568-77. doi: 10.1093/carcin/bgs287