

铁死亡相关基因热休克蛋白 A5 与肝细胞癌因果关系的孟德尔随机化和中介分析

崔 兵¹, 许钺钺², 徐 媛¹, 陈阿琴¹, 毛朝明², 陈跃华²

1. 江苏大学附属医院输血科, 江苏 镇江 212001

2. 江苏大学附属医院核医学科, 江苏 镇江 212001

[摘要] **目的:** 探讨铁死亡相关基因热休克蛋白 A5(HSPA5)与肝癌发展的因果关系及其作用机制。**方法:** 采用两步两样本孟德尔随机化(MR)设计评估 HSPA5、调节性T细胞及肝癌之间的因果关系。首先通过公开的全基因组关联研究(GWAS)数据库筛选与 HSPA5、调节性T细胞、肝癌相关的单核苷酸多态性作为工具变量,采用MR分析 HSPA5对肝癌的直接影响,接着通过两步MR分析调节性T细胞在这一过程中可能的中介作用。同时,以肝癌为暴露因素,HSPA5为结局变量进行了反向MR分析。所有MR分析均以逆方差加权法作为主要的因果关联检验方法,通过MR-Egger、加权中值法、加权众数法和简单众数法验证结果的稳健性,并采用Cochrane's Q统计量评估工具变量的异质性,MR-Egger回归的截距项和MR-PRESSO进行多效性检验,留一法进行敏感性分析。利用癌症基因组图谱(TCGA)数据库和人类蛋白质图谱(HPA)数据库验证 HSPA5在肝癌组织中的表达水平及其与调节性T细胞的相关性,揭示 HSPA5与调节性T细胞在肝癌进展中的相互作用机制及其与患者预后的关系。**结果:** MR分析结果显示, HSPA5表达增加与肝癌风险呈正相关(均 $P<0.01$),而反向MR分析未发现肝癌与 HSPA5之间存在关联($P>0.05$)。HSPA5表达与调节性T细胞功能显著相关(均 $P<0.05$),且调节性T细胞在肝癌微环境中的富集与肝癌进展呈正相关(均 $P<0.05$)。中介效应分析结果显示,调节性T细胞在 HSPA5和肝癌间的中介效应分别占5.00%和7.45%。TCGA和HPA数据库分析显示,肝癌组织中 HSPA5的mRNA和蛋白质表达水平均高于正常组织,且高表达与患者不良预后显著相关。免疫浸润分析验证了 HSPA5与调节性T细胞之间的显著正相关性,且调节性T细胞在肝癌中的高浸润与肝癌进展密切相关。**结论:** HSPA5的高表达与肝癌的发生及不良预后显著相关,并可能通过调控调节性T细胞在肿瘤微环境中的功能促进肝癌发展。



[关键词] 肝细胞癌;热休克蛋白 A5;铁死亡;调节性T细胞;孟德尔随机化;全基

收稿日期(Received):2024-03-20 接受日期(Accepted):2024-11-07 网络预发表日期(Online):2024-11-11

基金项目(Funding):镇江市社会发展指导性科技计划(FZ2022084)

第一作者(First author):崔 兵,主管技师,主要从事肿瘤分子生物学及生物信息学分析研究;E-mail: 1000012309@ujs.edu.cn;https://orcid.org/0000-0002-0132-5419

通信作者(Corresponding author):许钺钺,主管技师,主要从事肝肿瘤的发生及进展研究;E-mail: 1000012208@ujs.edu.cn;https://orcid.org/0000-0003-1994-0273

基因组关联分析

[中图分类号] R735.7 [文献标志码] A

Causal relationship between ferroptosis-related gene HSPA5 and hepatocellular carcinoma: a study based on mendelian randomization and mediation analysis

CUI Bing¹, XU Chengcheng², XU Yuan¹, CHEN Aqin¹, MAO Chaoming², CHEN Yuehua²
(1. Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China; 2. Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China)

Corresponding author: XU Chengcheng, E-mail: 1000012208@ujs.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0003-1994-0273>

[**Abstract**] **Objective:** To explore a causal relationship between ferroptosis-related gene heat shock protein A5 (HSPA5) and hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** A two-sample Mendelian randomization (MR) design was employed to evaluate the causal relationships among HSPA5, regulatory T cells (Tregs), and HCC. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with HSPA5, Tregs and HCC were selected as instrumental variables through publicly available genome-wide association studies (GWAS) databases. MR analysis was used to assess the direct effect of HSPA5 on HCC, followed by two-step MR to analyze the potential mediating role of Tregs. Reverse MR analysis was conducted with HCC as the exposure and HSPA5 as the outcome. Inverse variance weighting was the primary method for testing causal associations in all MR analyses. Robustness of the results was confirmed through MR-Egger, weighted median, weighted mode, and simple mode methods. Heterogeneity of instrumental variables was evaluated using Cochran's Q statistic, while pleiotropy was tested by MR-Egger intercept and MR-PRESSO, with leave-one-out sensitivity analysis performed for robustness. Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Human Protein Atlas (HPA) were utilized to verify the expression levels of HSPA5 in HCC tissues and its correlation with Tregs to reveal the interaction mechanisms between HSPA5 and Tregs in HCC progression and their relationship with patient prognosis. **Results:** MR analysis showed a positive correlation between elevated HSPA5 expression and HCC risk (all $P < 0.01$), while reverse MR analysis found no statistically significant association between HCC and HSPA5 ($P > 0.05$). HSPA5 expression was significantly correlated with Tregs function (all $P < 0.05$), and the enrichment of Tregs in HCC microenvironment was positively associated with HCC progression (all $P < 0.05$). Mediation analysis indicated that Tregs accounted for 5.00% and 7.45% of the mediation effect between HSPA5 and HCC. TCGA and HPA database analysis revealed that both HSPA5 mRNA and protein expression levels were higher in HCC tissues compared to normal tissues, and high HSPA5 expression was significantly associated with poor prognosis. Immune infiltration analysis confirmed a significant positive correlation between HSPA5 and Tregs, with high Tregs infiltration closely related to HCC progression. **Conclusions:** Elevated HSPA5 expression is significantly associated with HCC development and poor prognosis. HSPA5 may promote

HCC progression by regulating the function of Tregs in the tumor microenvironment.

[**Key words**] Hepatocellular carcinoma; Heat shock protein A5; Ferroptosis; Regulatory T cells; Mendelian randomization; Genome-wide association study

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2024, 53(6): 691-698.]

[**缩略语**] 热休克蛋白 A5(heat shock protein A5, HSPA5); 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX); 孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR); 全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS); 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP); 逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW); 人类蛋白质图谱(Human Protein Atlas, HPA); 癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA); 信使RNA(messenger RNA, mRNA); 比值比(odds ratio, OR); 置信区间(confidence interval, CI); 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF); 血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR); 溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11); Egl-9 家族缺氧诱导因子(Egl-9 family hypoxia-inducible factor, EGLN)

肝癌在全球范围内是导致癌症相关死亡的第三大原因,其发病率和病死率的持续上升对肿瘤学领域提出了严峻挑战^[1]。尽管肝切除、肝移植、局部消融、介入治疗及免疫治疗等多种治疗手段已取得一定进展,但肝癌的整体治疗效果依然不尽如人意^[2],迫切需要深入研究肝癌的发病机制及发展治疗新方法。

近期,铁死亡作为一种新兴的非凋亡细胞死亡方式,通过依赖铁离子的脂质过氧化作用,在多种癌症特别是肝癌治疗中显示出潜在的应用价值^[3-4]。研究发现,铁死亡不仅可以通过遗传及表观遗传学改变和代谢重编程促进肿瘤进展,还能通过激活特定免疫途径推动肿瘤发展^[5-6]。HSPA5作为一种分子伴侣蛋白,对于内质网蛋白质折叠及压力减轻至关重要,影响癌细胞的存活和增殖^[7]。已有研究指出,HSPA5与铁死亡的关键调节因子GPX4相互作用,会直接影响细胞在应激条件下生存与铁死亡的平衡,以促进结直肠癌的发展^[8]。然而,HSPA5在肝细胞癌(以下简称肝癌)中的具体作用尚未明确。

MR是一种通过分析遗传变异来推断暴露因素与疾病结果之间因果关系的方法。MR分析的核心在于利用GWAS识别的与特定疾病密切相关SNP作为评估暴露和结果因果关系的工具变量。这种方法所涉及的遗传变异在减数分裂中随机分配,通常不受环境因素干扰^[9]。本研究利

用两步两样本MR方法,探讨HSPA5与肝癌之间、HSPA5与免疫细胞之间,以及免疫细胞与肝癌之间的潜在因果关系;通过两步MR分析进一步研究免疫细胞在HSPA5与肝癌关系中的中介作用,旨在为肝癌的发生发展机制提供新的见解并探索新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 资料来源

eqtl-a-ENSG00000044574(HSPA5)数据来源于IEU OpenGWAS项目,肝癌实验组和验证组数据来源于芬兰数据库(FINNGEN_C3_LIVER_INTRAHEPATIC_BILE_DUCTS_EXALLC和FINNGEN_C3_BILIARY_GALLBLADDER_EXALLC),免疫表型的GWAS数据提取自GWAS目录(登录号从GCST0001391到GCST0002121)。

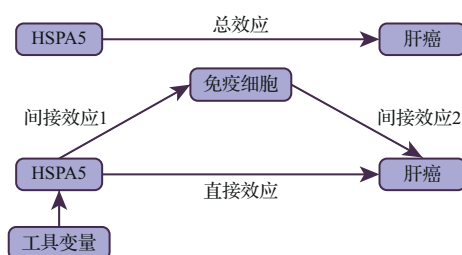
1.2 工具变量筛选方法

为确保MR分析获得可靠结果,必须满足以下三个关键假设:①选定的工具变量必须包括与HSPA5相关的独立SNP;②所有通过质量控制筛选的工具变量不应与混杂因素相关;③工具变量对HSPA5的影响必须仅通过与肝癌的关系来介导。对SNP进行质量控制,以满足MR分析的上述假设。首先,以全基因组显著性阈值 $P < 5 \times 10^{-8}$ 、 $P < 5 \times 10^{-6}$ 和 $P < 5 \times 10^{-8}$ 分别筛选HSPA5相关SNP、调节性T细胞相关SNP,以及肝癌相关

SNP。其次,对HSPA5和调节性T细胞的SNP进行聚类处理,只保留独立的SNP。参考欧洲国际千人基因组计划数据,本研究进行了聚类的连锁不平衡分析(阈值设置为 $R^2 < 0.001$,聚类窗口大小=10 000 kb)^[10]。再次,去除回文SNP,以确保SNP对HSPA5的影响与对肝癌的影响对应相同的等位基因。最后,使用 F 统计来排除弱工具变量($F < 10$)。具体公式为 $F = R^2(n-k-1)/k(1-R^2)$,其中 R^2 为由SNP解释的HSPA5方差, n 为样本量, k 为工具变量数。

1.3 MR分析方法

本研究采用两步两样本MR设计,评估HSPA5、调节性T细胞及肝癌之间的因果关系。首先通过MR分析测试HSPA5对肝癌的直接影响,再通过两步MR分析探讨调节性T细胞在这一过程中可能的中介作用,见图1。同时,为探讨肝癌对HSPA5的潜在因果效应,本研究以与肝癌相关SNP作为工具变量,HSPA5作为结局变量进行了反向MR分析。所有MR分析均以IVW作为主要的因果关联检验方法,并通过MR-Egger、加权中值法、加权众数法和简单众数法对结果进行验证。为提高结果的稳健性,实验组与验证组使用来自不同数据库的肝癌数据。



HSPA5可通过不同途径对肝癌产生潜在影响。HSPA5对肝癌的整体影响为总效应;直接作用于肝癌发展为直接效应;通过免疫细胞间接影响肝癌发展为间接效应,分为间接效应1和间接效应2。

图1 孟德尔随机化分析流程图

Figure 1 Flowchart of the mendelian randomization analysis

1.4 MR分析的稳健性和可靠性检验

为确保MR分析结果的可靠性,本研究进行了异质性、多效性和敏感性分析。采用Cochrane's Q 统计量评估工具变量的异质性, $P < 0.05$ 表示存在异质性;多效性检验通过MR-Egger回归的截距项和MR-PRESSO进行,其中MR-PRESSO用于检测并校正水平性多效性导致的离群值;敏感性分析

采用“留一法”,以排除个别SNP对结果的影响,确保单一SNP不会显著影响HSPA5、调节性T细胞与肝癌之间的因果关系。

1.5 中介效应分析

采用中介效应分析探讨调节性T细胞在HSPA5与肝癌因果关系中的中介作用。各效应量的计算公式如下:总效应= $C \times 100\%$,间接效应= $A \times B \times 100\%$,直接效应(C')= $(C - A \times B) \times 100\%$,中介效应占比= $A \times B / C \times 100\%$ 。其中, A 为HSPA5与免疫细胞MR分析的 β 值, B 为免疫细胞与肝癌MR分析的 β 值, C 为HSPA5与肝癌MR分析的 β 值。

1.6 临床资料验证

为进一步验证HSPA5与肝癌及调节性T细胞之间的相关性,本研究通过下载UALCAN数据库、HPA公共免疫组化数据库和TCGA数据库中的资料,分析了HSPA5 mRNA在所有肿瘤中的表达水平、HSPA5的mRNA和蛋白质在肝癌组织和正常肝脏组织中表达的差异、HSPA5与肝癌中调节性T细胞的相关性,以及HSPA5 mRNA表达与肝癌患者预后的关系。

1.7 统计学方法

所有分析均使用R软件(4.1.1版)进行。MR分析使用R软件包“TwoSampleMR”进行,通过OR量化HSPA5对肝癌的影响。统计学显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 HSPA5与肝癌的关系

IVW分析结果显示,HSPA5与肝癌呈正相关($OR = 2.0676$, $95\%CI$: 1.3568~3.1505, $P = 0.0007$),这种正相关性在验证集数据中同样可以观察到($OR = 1.6406$, $95\%CI$: 1.0147~2.6524, $P = 0.0434$),且MR-Egger、加权中值法、简单众数法和加权众数法等分析结果与IVW分析结果方向基本一致,见表1。TCGA数据库分析显示,HSPA5在包括肝癌在内的大多数癌症中高表达(附图1);在肝癌中,肝癌组织($n = 371$)和正常肝组织($n = 50$)中HSPA5 mRNA表达量分别为 9.2181 ± 0.7319 和 8.0713 ± 0.5670 ,差异有统计学意义($t = 12.9241$, $P < 0.05$),且高表达量的患者预后更差(图2);HPA公共免疫组化数据库也显示,HSPA5蛋白在肝癌组织中的表达量多于正常肝组织(图3)。反向MR分析

结果显示,肝癌与HSPA5之间不存在统计学意义的关联(表1)。结果提示,HSPA5在肝癌中高表达,对肝癌发生发展存在单向因果效应。

2.2 HSPA5与调节性T细胞的关系

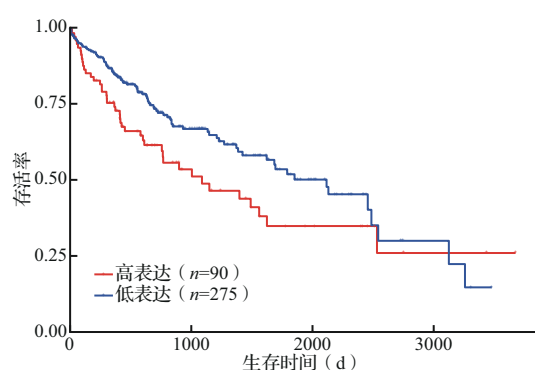
IVW 分析结果显示,HSPA5 与调节性 T 细胞呈正相关($OR=1.3269,95\%CI:1.0001\sim1.7605,P=0.0499$),其他分析方法的结果与IVW 分析结

果方向基本一致(表1)。使用 XCELL 方法、QUANTISEQ 方法和 CIBERSORT-ABS 分析得到 HSPA5 mRNA 表达量与调节性 T 细胞的相关系数分别为 0.1257、0.2451 和 0.2858(均 $P<0.01$),表明 HSPA5 mRNA 表达量与调节性 T 细胞浸润呈显著正相关。结果提示,HSPA5 可能通过调控调节性 T 细胞在肿瘤微环境中的作用参与肝癌的免疫

表1 孟德尔随机化分析结果一览表
Table 1 Results of mendelian randomization analysis

暴露	结局	分析方法	β 值	SE值	P值	OR值	95%CI
HSPA5	肝癌(实验集)	MR-Egger	0.8738	0.2977	0.0991	2.3961	1.3368~4.2946
		加权中值法	0.7664	0.2502	0.0022	2.1521	1.3179~3.5139
		逆方差加权法	0.7264	0.2149	0.0007	2.0676	1.3568~3.1505
		简单众数法	0.8780	0.3244	0.0734	2.4060	1.2740~4.5436
		加权众数法	0.7770	0.2877	0.0737	2.1750	1.2376~3.8221
HSPA5	肝癌(验证集)	MR-Egger	0.6496	0.3828	0.2319	1.9147	0.9040~4.0548
		加权中值法	0.3612	0.2213	0.1026	1.4351	0.9300~2.2144
		逆方差加权法	0.4951	0.2451	0.0434	1.6406	1.0147~2.6524
		简单众数法	0.1582	0.3680	0.6963	1.1714	0.5694~2.4095
		加权众数法	0.2346	0.2715	0.4512	1.2643	0.7425~2.1528
HSPA5	调节性T细胞	MR-Egger	-0.0020	0.1917	0.9919	0.9979	0.6853~1.4528
		加权中值法	0.2827	0.1471	0.0546	1.3268	0.9944~1.7701
		逆方差加权法	0.2829	0.1443	0.0499	1.3269	1.0001~1.7605
		简单众数法	0.5244	0.3024	0.1579	1.6895	0.9340~3.0561
		加权众数法	0.0304	0.1653	0.8631	1.0308	0.7456~1.4251
调节性T细胞	肝癌(实验集)	MR-Egger	0.1014	0.081	0.2366	1.1067	0.9442~1.2970
		加权中值法	0.1290	0.0809	0.1109	1.1377	0.9708~1.3333
		逆方差加权法	0.1283	0.0595	0.0311	1.1369	1.0117~1.2776
		简单众数法	0.0191	0.1057	0.8599	1.0193	0.8284~1.2539
		加权众数法	0.1376	0.0838	0.1267	1.1475	0.9736~1.3524
调节性T细胞	肝癌(验证集)	MR-Egger	0.0942	0.0627	0.1611	1.0988	0.9717~1.2425
		加权中值法	0.1391	0.0624	0.0257	1.1492	1.0169~1.2985
		逆方差加权法	0.1304	0.0461	0.0047	1.1393	1.0408~1.2469
		简单众数法	0.1757	0.0874	0.0674	1.1921	1.0044~1.4148
		加权众数法	0.1583	0.0676	0.0374	1.1715	1.0260~1.3376
肝癌(实验集)	HSPA5	MR-Egger	0.0509	0.1483	0.7391	1.0522	0.7869~1.4071
		加权中值法	-0.0275	0.0247	0.2647	0.9728	0.9269~1.0211
		逆方差加权法	0.0344	0.0823	0.6760	1.0350	0.8809~1.2161
		简单众数法	-0.0245	0.0350	0.4992	0.9758	0.9111~1.0450
		加权众数法	-0.0282	0.0257	0.2994	0.9722	0.9244~1.0226
肝癌(验证集)	HSPA5	MR-Egger	0.0271	0.1045	0.8193	1.0275	0.8373~1.2610
		加权中值法	-0.0101	0.0379	0.7892	0.9899	0.9191~1.0662
		逆方差加权法	-0.0079	0.0318	0.8052	0.9922	0.9322~1.0560
		简单众数法	0.0467	0.0602	0.4939	1.0478	0.9313~1.1790
		加权众数法	-0.0363	0.0440	0.4695	0.9643	0.8846~1.0511

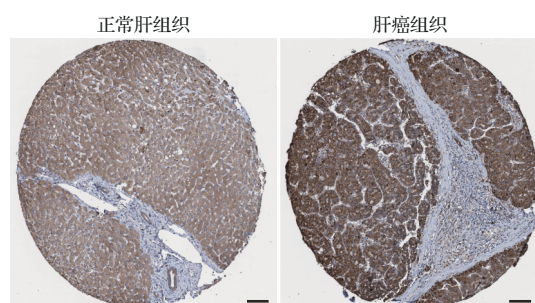
HSPA5:热休克蛋白A5;SE:标准差;OR:比值比;CI:置信区间。



每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数(FPKM) $\geq$ 9.7023为高表达, FPKM $<$ 9.7023为低表达. HSPA5:热休克蛋白A5.

图2 不同HSPA5 mRNA表达水平肝细胞癌患者的生存曲线

Figure 2 Survival curves of hepatocellular carcinoma patients based on HSPA5 mRNA expression levels



HSPA5主要定位于细胞质区域,肝癌组织显示出中等至强阳性染色(棕色),正常肝脏组织则无明显染色. 标尺=200 μ m. HSPA5:热休克蛋白A5.

图3 HSPA5在正常肝组织和肝癌组织中的表达情况

Figure 3 Expression of HSPA5 in normal liver tissues and hepatocellular carcinoma

抑制。

2.3 调节性T细胞与肝癌关系

IVW分析结果显示,调节性T细胞与肝癌实验组呈正相关($OR=1.1369$, $95\%CI: 1.0117\sim 1.2776$, $P=0.0311$),这种正相关性在验证集数据中同样可以观察到($OR=1.1393$, $95\%CI: 1.0408\sim 1.2469$, $P=0.0477$),且MR-Egger、加权中值法、简单众数法和加权众数法等分析结果与IVW分析结果方向基本一致,见表1。免疫浸润分析结果亦显示调节性T细胞在肝癌中处于高浸润状态(图4)。结果提示,调节性T细胞可能在肝癌的免疫逃逸和肿瘤进展中发挥关键

作用。

2.4 MR分析的稳健性和可靠性

HSPA5与肝癌(实验集)、HSPA5与肝癌(验证集)、HSPA5与调节性T细胞、调节性T细胞与肝癌(实验集)、调节性T细胞与肝癌(验证集)均未发现异质性(均 $P>0.05$)及多效性(均 $P>0.05$),见表2。留一法敏感性分析表明,逐个剔除SNP后重复进行MR分析,结果无显著变化,因此未发现对因果关系有显著影响的SNP(附图2)。结果表明,本研究中MR分析结果具有较高的稳健性和可靠性。

2.5 调节性T细胞在肝癌发生、发展的中介效应

肝癌(实验集)分析结果显示,调节性T细胞-肝癌的总效应、间接效应、直接效应分别为72.64%、3.63%、69.01%,调节性T细胞的中介效应占比为5.00%;肝癌(验证集)分析结果显示,调节性T细胞-肝癌的总效应、间接效应、直接效应分别为49.51%、3.69%、45.82%,调节性T细胞中介效应占比为7.45%。结果提示,调节性T细胞在HSPA5介导的肝癌进展过程中可能发挥了调控作用。

3 讨论

HSPA5在多种肿瘤包括肝癌中表达量增加,并通过调控铁死亡参与癌细胞的生长、转移和耐药性,对患者的预后有重大影响^[11-12]。研究者针对HSPA5在肿瘤细胞铁死亡中的具体调控机制开展了很多研究。如靶向抑制头颈鳞癌细胞HSPA5,可以减少GPX4和铁调素1等抗铁死亡因子的激活,同时上调酰基辅酶A合成酶长链家族4等促铁死亡元件,从而促进铁死亡发生^[13];在胰腺导管

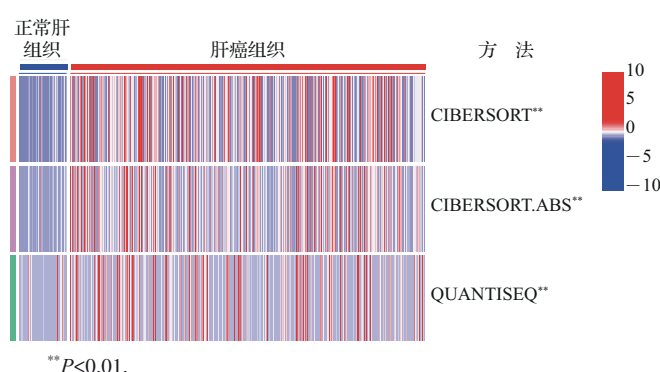


图4 调节性T细胞在肝癌中的免疫浸润分析结果

Figure 4 Immune infiltration of regulatory T cells in hepatocellular carcinoma

表2 MR 分析的异质性和多效性检验结果

Table 2 Results of the heterogeneity and sensitivity analysis

MR 分析	异质性检验				多效性检验			
	MR-Egger		逆方差加权法		MR-Egger		MR-PRESSO	
	Cochran's Q	P 值	Cochran's Q	P 值	Egger 截距	P 值	全局检验	P 值
HSPA5 与肝癌(实验集)	1.0290	0.5978	1.5411	0.6728	-0.0439	0.5485	2.2234	0.8523
HSPA5 与肝癌(验证集)	4.9675	0.0834	5.8188	0.1208	-0.0442	0.6175	11.9221	0.2861
HSPA5 与调节性T细胞	1.7419	0.6277	5.5015	0.2396	0.0551	0.1479	13.7459	0.2918
调节性T细胞与肝癌(实验集)	6.2589	0.8555	6.4998	0.8888	0.0198	0.6331	15.4209	0.7023
调节性T细胞与肝癌(验证集)	8.9441	0.6270	9.6663	0.6452	0.0265	0.4136	21.0715	0.3634

MR: 孟德尔随机化;HSPA5:热休克蛋白 A5.

腺癌细胞中,E1A 结合蛋白 P300 通过乙酰化 HSPA5 激发铁死亡^[14];此外,HSPA5 通过 VEGFA/VEGFR2 途径促进膀胱肿瘤进展,并通过 P53/SLC7A11/GPX4 途径增强铁死亡抵抗力^[7]。以上研究均聚焦 HSPA5 对癌细胞铁死亡的调控,而针对 HSPA5 进行肿瘤患者免疫细胞调控铁死亡的研究较少。

众多研究结果表明,铁死亡在肝癌的发病机制和进展中起着重要作用^[15]。HSPA5 在肝癌中高表达^[16],但 HSPA5 与肝癌之间的因果关系及是否有相关免疫细胞起中介作用目前尚不清楚。在肝癌复杂的免疫微环境中,调节性 T 细胞不仅在维持免疫平衡方面发挥关键作用,还能通过免疫抑制途径调控肿瘤动态^[17]。研究发现,肝癌患者的外周血和肿瘤组织中调节性 T 细胞水平升高与预后较差和存活率降低相关^[18-19]。这些细胞通过多种机制抑制效应 T 细胞、树突状细胞和 NK 细胞的活性,包括分泌抑制性细胞因子如 IL-10 和转化生长因子-β,以及表达免疫检查点分子细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 和程序性死亡-1^[20-21]。可见调节性 T 细胞能通过阻止免疫系统对癌细胞产生有效反应,从而促进肿瘤生长和转移。此外,研究普遍认为,铁死亡在调节性 T 细胞调控肿瘤进展方面起到重要作用。如铁死亡调节剂 GPX4 成为调节性 T 细胞稳定性的关键,其缺乏预示着脂质过氧化物的积累和随后调节性 T 细胞的铁死亡^[22];调节性 T 细胞中 GPX4 的特异性消除加剧了这种现象,最终抑制了肿瘤生长并强化了针对免疫逃避的防御;在缺氧条件下,调节性 T 细胞的转录组发生显著转变,特别是影响了铁死亡相关基因(如 *EGLN1* 和 *EGLN3*),提示铁死亡可以在缺氧条件下调节调节性 T 细胞功能^[23-24]。本文资料

显示,HSPA5 与肝癌的发生、调节性 T 细胞与肝癌的发生均呈正相关,且 HSPA5 与调节性 T 细胞也呈正相关,虽然中介效应占比较小,但仍可以推测 HSPA5 可通过影响调节性 T 细胞的铁死亡调控肝癌的发生发展。但是,调节性 T 细胞的中介效应相对较弱,提示在 HSPA5 与肝癌的关系中可能存在其他重要的调控因子。

综上,本研究探讨了 HSPA5 在肝癌发展中的角色及其与免疫细胞的相互作用,为肝癌治疗提供了新的视角。本研究的优势在于采用了两步两样本 MR 和两步 MR 分析设计,有效降低了潜在混杂因素和反向因果的影响,为探索 HSPA5 与肝癌之间因果关系及中介因子提供了有力支持。此外,本研究综合运用了遗传学分析、基因表达和免疫细胞浸润的数据,全面阐明了 HSPA5 在肝癌中的作用机制,为肝癌的治疗策略提供了新的靶点。但本研究结果仍须在不同人群和环境中进一步验证,以确保其广泛适用性和普遍性。

本文附图见电子版。



志谢 研究得到镇江市社会发展指导性科技计划(FZ2022084)支持

Acknowledgements This work was supported by the Zhenjiang City Guiding Science and Technology Development Program (FZ2022084)

医学伦理 研究不涉及人体或动物实验

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2024. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] HUANG J, NGAI C H, DENG Y, et al. Cancer incidence and mortality in Asian countries: a trend analysis[J]. **Cancer Control**, 2022, 29: 10732748221095955.
- [2] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, 2020, 1873 (1): 188314.
- [3] LEI G, ZHUANG L, GAN B. The roles of ferroptosis in cancer: tumor suppression, tumor microenvironment, and therapeutic interventions[J]. **Cancer Cell**, 2024, 42(4): 513-534.
- [4] 陈峻逸, 杨翔, 方学贤, 等. 铁死亡与重大慢性疾病[J]. **浙江大学学报(医学版)**, 2020, 49(1): 44-57.
CHEN Junyi, YANG Xiang, FANG Xuexian, et al. The role of ferroptosis in chronic diseases[J]. **Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)**, 2020, 49 (1): 44-57. (in Chinese)
- [5] LU Y, CHAN Y T, TAN H Y, et al. Epigenetic regulation of ferroptosis via ETS1/miR-23a-3p/ACSL4 axis mediates sorafenib resistance in human hepatocellular carcinoma[J]. **J Exp Clin Cancer Res**, 2022, 41(1): 3.
- [6] HUANG Y, WANG S, KE A, et al. Ferroptosis and its interaction with tumor immune microenvironment in liver cancer[J]. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, 2023, 1878(1): 188848.
- [7] WANG Q, KE S, LIU Z, et al. HSPA5 promotes the proliferation, metastasis and regulates ferroptosis of bladder cancer[J]. **Int J Mol Sci**, 2023, 24(6): 5144.
- [8] WANG R, HUA L, MA P, et al. HSPA5 repressed ferroptosis to promote colorectal cancer development by maintaining GPX4 stability[J]. **Neoplasma**, 2022, 69(5): 1054-1069.
- [9] CARTER A R, SANDERSON E, HAMMERTON G, et al. Mendelian randomisation for mediation analysis: current methods and challenges for implementation[J]. **Eur J Epidemiol**, 2021, 36(5): 465-478.
- [10] FANG Z, SONG M, LEE D H, et al. The role of mendelian randomization studies in deciphering the effect of obesity on cancer[J]. **J Natl Cancer Inst**, 2022, 114 (3): 361-371.
- [11] DENG C, GONG S, LIN L, et al. A human pan-cancer system analysis of heat shock protein family A member 5 [J]. **Am J Cancer Res**, 2023, 13(5): 1698-1717.
- [12] GUO C, ZHAO W, WANG W, et al. Study on the antitumor mechanism of tanshinone II A *in vivo* and *in vitro* through the regulation of PERK-ATF4-HSPA5 pathway-mediated ferroptosis[J]. **Molecules**, 2024, 29 (7): 1557.
- [13] LI J, XIAO W, WEI W, et al. HSPA5, as a ferroptosis regulator, may serve as a potential therapeutic for head and neck squamous cell carcinoma[J]. **Mol Immunol**, 2023, 158: 79-90.
- [14] WANG Y, LIU Y, WANG C, et al. EP300 promotes ferroptosis via HSPA5 acetylation in pancreatic cancer [J]. **Sci Rep**, 2023, 13(1): 15004.
- [15] XU Y, XING Z, ABDALLA IBRAHIM SULIMAN R, et al. Ferroptosis in liver cancer: a key role of post-translational modifications[J]. **Front Immunol**, 2024, 15: 1375589.
- [16] WANG Q, SHU R, HE H, et al. Co-silencing of Birc5 (survivin) and Hspa5 (Grp78) induces apoptosis in hepatoma cells more efficiently than single gene interference[J]. **Int J Oncol**, 2012, 41(2): 652-660.
- [17] WOLF D, SOPPER S, PIRCHER A, et al. Treg(s) in cancer: friends or foe?[J]. **J Cell Physiol**, 2015, 230 (11): 2598-2605.
- [18] GAO Y, YOU M, FU J, et al. Intratumoral stem-like CCR4⁺ regulatory T cells orchestrate the immunosuppressive microenvironment in HCC associated with hepatitis B[J]. **J Hepatol**, 2022, 76(1): 148-159.
- [19] BOZWARD A G, WARRICKER F, OO Y H, et al. Natural killer cells and regulatory T cells cross talk in hepatocellular carcinoma: exploring therapeutic options for the next decade[J]. **Front Immunol**, 2021, 12: 643310.
- [20] TIE Y, TANG F, WEI Y Q, et al. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets[J]. **J Hematol Oncol**, 2022, 15(1): 61.
- [21] LI C, JIANG P, WEI S, et al. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects[J]. **Mol Cancer**, 2020, 19(1): 116.
- [22] XU C, SUN S, JOHNSON T, et al. The glutathione peroxidase Gpx4 prevents lipid peroxidation and ferroptosis to sustain Treg cell activation and suppression of antitumor immunity[J]. **Cell Rep**, 2021, 35 (11): 109235.
- [23] HUA Y, YANG S, ZHANG Y, et al. Modulating ferroptosis sensitivity: environmental and cellular targets within the tumor microenvironment[J]. **J Exp Clin Cancer Res**, 2024, 43(1): 19.
- [24] WU Q, YOU L, NEPOVIMOVA E, et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape[J]. **J Hematol Oncol**, 2022, 15(1): 77.

[本文编辑 余方 刘丽娜]