

TRIM31 与慢性肝病的孟德尔随机化及生物信息学分析



尤君怡¹, 梁国强², 宋秀道³

1. 南京中医药大学附属苏州市中医医院中医外科 (江苏苏州 215009)
2. 南京中医药大学附属苏州市中医医院中心实验室 (江苏苏州 215009)
3. 南京中医药大学附属苏州市中医医院中医药科技转化中心 (江苏苏州 215009)

【摘要】目的 使用两样本孟德尔随机化 (Mendelian randomization, MR) 分析评估肝脏 TRIM31 表达水平与慢性肝病的因果关系, 以及生物信息学方法分析 TRIM31 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中的作用。**方法** 利用 FinnGen R10 数据库中非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化、肝硬化、HCC 的遗传数据, 以及 GTEx Portal 肝组织 cis-eQTL 数据中与 TRIM31 表达显著相关的单核苷酸多态性作为工具变量, 采用逆方差加权法作为主要方法进行 MR 分析。使用 TCGA 分析 TRIM31 在 HCC 中的表达, 并利用 CIBERSORT 算法分析 TRIM31 表达与免疫细胞浸润的相关性, ROC 曲线评估诊断准确性。使用 TCGA 数据库进行高和低 TRIM31 表达组之间的差异基因表达分析, 并进行 GO 富集、KEGG 通路富集和基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)。**结果** MR 分析结果显示, 肝脏 TRIM31 表达与 NAFLD [OR=0.98, 95%CI (0.91, 1.05), P=0.515]、NASH [OR=0.98, 95%CI (0.74, 1.29), P=0.868]、肝纤维化 [OR=1.35, 95%CI (0.84, 2.17), P=0.218]、肝硬化 [OR=1.06, 95%CI (0.95, 1.17) P=0.292] 均不存在显著关联; 与 HCC [OR=1.26, 95%CI (1.07, 1.49), P=0.007] 存在显著关联。TCGA 数据分析显示, HCC 组织中 TRIM31 mRNA 水平显著增加 (P < 0.001)。ROC 分析显示, TRIM31 在 HCC 诊断中的曲线下面积为 0.794 [95%CI (0.738, 0.851)]。高 TRIM31 表达与免疫评分增加以及活化记忆 CD4⁺T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞的比例增加相关, 而与单核细胞和 M2 型巨噬细胞比例减少相关。GSEA 分析显示, TRIM31 高表达的 HCC 样本中显著富集与肿瘤恶性进展密切相关的信号通路, 包括生物氧化信号通路 (FDR < 0.05, NES=2.329)、钙信号传导通路 (FDR < 0.05, NES=2.283) 等。**结论** 肝脏 TRIM31 表达上调可能增加 HCC 患病风险, 可能与肿瘤免疫微环境的调控有关, 为 HCC 发病机制的研究提供理论依据。

【关键词】 孟德尔随机化; 三重基序蛋白 31; 慢性肝病; 肝细胞癌; 生物信息学

【中图分类号】 R 575.2; R 735.7 **【文献标识码】** A

Mendelian randomization and bioinformatics analysis of TRIM31 with chronic liver disease

YOU Junyi¹, LIANG Guoqiang², SONG Xiudao³

1. Surgical Department of Traditional Chinese Medicine, Suzhou Hospital of Traditional Chinese

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202410153

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82374546); 苏州市姑苏卫生人才计划人才科研项目 (GSWS2021048); 江苏省中医药科技发展计划项目 (MS2024079); 江苏省卫生健康委医学科研项目 (M2024049); 苏州市科技发展计划 (基础研究-医学应用基础研究) 项目 (SKY2023218)

通信作者: 宋秀道, 副主任药师, 硕士研究生导师, Email: fsyy00530@njucm.edu.cn

Medicine affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China

2. Central laboratory, Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China

3. Centre for Translation of Traditional Chinese Medicine Science and Technology, Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Hospital affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China

Corresponding author: SONG Xiudao, Email: fsyy00530@njucm.edu.cn

【Abstract】Objective Using two-sample Mendelian randomization (MR) to explore the causal relationship between the expression level of tripartite motif 31 (TRIM31) in chronic liver disease, and using bioinformatics methods to analyze the role of TRIM31 in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The genetic data for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), liver fibrosis, cirrhosis, and HCC from the FinnGen R10, as well as the instrumental variables of single nucleotide polymorphisms (SNPs) significantly associated with TRIM31 expression in the cis eQTL data of GTEx Portal liver tissue were used for MR analysis, with the inverse-variance weighting as the main analysis method. The expression level of TRIM31 in HCC was analyzed using TCGA data, and the correlation between TRIM31 expression and immune cell infiltration was analyzed using the CIBERSORT algorithm. The diagnostic accuracy was evaluated by ROC curves. Differential gene expression analysis between high and low TRIM31 expression groups was performed using the TCGA database, and Gene Ontology (GO) enrichment, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment, and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) were conducted. **Results** The MR analysis results showed that the expression of TRIM31 in the liver was not significantly associated with NAFLD [OR=0.98, 95%CI(0.91, 1.05), $P=0.515$], NASH [OR=0.98, 95%CI(0.74, 1.29), $P=0.868$], liver fibrosis [OR=1.35, 95%CI(0.84, 2.17), $P=0.218$], and cirrhosis [OR=1.06, 95%CI(0.95, 1.17), $P=0.292$], but was significant associated with HCC [OR=1.26, 95%CI(1.07, 1.49), $P=0.007$]. TCGA data analysis showed that compared with normal liver tissue, TRIM31 mRNA levels were significantly increased in HCC ($P<0.001$). ROC analysis showed that the area under the curve for TRIM31 in HCC diagnosis was 0.794[95%CI(0.738, 0.851)]. High TRIM31 expression was associated with increased immune scores and proportions of activated memory CD4⁺ T cells, follicular helper T cells, regulatory T cells, while being inversely related to monocytes and M2 macrophages. GSEA analysis revealed that HCC samples with high TRIM31 expression were significantly enriched in signaling pathways closely associated with malignant progression, including the biological oxidation signaling pathway (FDR<0.05, NES=2.329) and calcium signaling pathway (FDR<0.05, NES=2.283). **Conclusion** Upregulated expression of liver TRIM31 may increase the risk of HCC, potentially through its regulation of the tumor immune microenvironment. These findings provide a theoretical basis for research into the pathogenesis of HCC.

【Keywords】 Mendelian randomization; Tripartite motif 31; Chronic liver disease; Hepatocellular carcinoma; Bioinformatics

三重基序 (tripartite motif, TRIM) 蛋白家族是 E3 泛素连接酶亚家族之一, 通过调控靶蛋白泛素化参与转录调节、细胞凋亡及肿瘤发生等关键生物学过程^[1-2]。其中 TRIM31 作为新成员, 在炎症、免疫和致癌等多种生物学过程中具有重要功能^[3]。值得注意的是, TRIM31 在肝脏疾病中似乎呈现不同表达模式——高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease,

NAFLD) 模型显示其表达显著下调^[4], 而在肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 组织中却显著上调并与肿瘤进展相关^[5]。这种差异提示 TRIM31 可能在 NAFLD 疾病谱的不同阶段具有动态调控作用。NAFLD 作为全球患病率达 30% 的慢性肝病^[6], 其疾病谱涵盖从单纯脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化、肝硬化直至 HCC 的连续

进程^[7]。尤其 NASH 阶段以快速炎症反应和纤维化为特征,进展为肝硬化后 HCC 年发病率可达 10.6%^[8]。解析 TRIM31 在疾病谱各阶段的因果关联,对揭示肝病进展机制具有重要意义。

孟德尔随机化 (Mendelian randomization, MR) 分析通过利用遗传变异的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 作为工具变量,可有效规避传统研究的混杂偏倚,为因果推断提供可靠方法^[9-10]。结合全基因组关联研究 (Genome-Wide Association Study, GWAS) 和表达数量性状遗传位点 (expression quantitative trait loci, eQTL), MR 已广泛应用于基因表达与疾病关联研究^[11-12]。因此,本研究采用两样本 MR 分析评估肝脏 TRIM31 表达与 NAFLD 疾病谱 (NAFLD、NASH、肝纤维化、肝硬化及 HCC) 的因果关联。同时整合 TCGA 数据库,分析 TRIM31 在 HCC 中的表达特征、功能通路及免疫微环境调控作用,为探索肝病进展机制和靶向治疗策略提供新依据。

1 资料与方法

1.1 MR分析

1.1.1 研究设计

选用 TRIM31 表达作为暴露因素,提取与 TRIM31 表达显著相关的 SNPs 作为工具变量,将 NAFLD 疾病谱中 NAFLD、NASH、肝纤维化、肝硬化以及 HCC 疾病类型分别作为结局因素进行 MR 分析。MR 分析应满足以下 3 个假设:①工具变量与肝脏 TRIM31 表达密切相关;②工具变量与混杂因素相互独立;③工具变量仅能通过暴露因素影响结局因素,即不存在多效应^[13]。研究设计见附件图 1。

1.1.2 数据来源

通过芬兰基因组研究 FinnGen R10 (https://www.finnngen.fi/en/access_results)^[14] 获取 NAFLD、NASH、肝纤维化、肝硬化、HCC 相关数据 (见附件表 1)。肝组织 TRIM31 表达的 cis-eQTL 数据来源于基因-组织表达 (Genotype-Tissue Expression, GTEx) Portal V8 数据库 (<https://www.gtexportal.org/home%5B33>)^[15],并从中提取 SNPs 染色体位置、等位基因、eQTL 样本数、其他等位基因频率和 *P* 值等信息。所有数据为公开获取数据,无需伦理审批。

1.1.3 筛选工具变量

参考其他研究^[16],设置 *P* 值 ($P < 10^{-5}$) 和连锁不平衡参数 ($r^2=0.1$ 、 $kb=100$) 作为标准筛选 SNPs,保留 $F > 10$ 的 SNPs 作为有效工具变量,避免弱工具偏倚和保证各工具变量之间相互独立。

1.1.4 分析方法

采用逆方差加权法 (inverse-variance weighting, IVW) 作为主要方法,同时结合加权中位数法 (weighted median estimator, WME)、MR-Egger 回归法、简单众数法 (simple mode, SM) 和加权众数法 (weighted mode, WM) 评估因果关系^[17]。通过水平多效性和异质性进行敏感性分析,以检测结论是否稳健。水平多效性采用 MR Egger 和 MR-PRESSO 进行判断,当 $P > 0.05$,说明不存在水平多效性;异质性检验采用 Cochran's *Q* 检验,当 $P > 0.5$ 时说明不存在异质性,当 $P \leq 0.5$ 时说明异质性存在,此时采用 IVW 随机效应结果。采用留一法评估每个 SNPs 是否影响结果的稳定性。

1.2 TRIM31与HCC临床病理特征相关性分析

从 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>)^[18] 下载并整理 TCGA-LIHC 项目的 RNAseq 数据,采用 R 软件 stat 包 (v4.2.1),针对每个变量单独构建和 TRIM31 分子的 Logistic 模型,评估 TRIM31 表达水平与 HCC 临床病理特征之间的关系。以 TRIM31 表达水平的中位值为阈值,将患者分为高表达组与低表达组,采用 Cox 回归计算 TRIM31 表达对总生存期 (overall survival, OS) 及无进展间隔期 (progression-free interval, PFI) 的风险比 (hazard ratio, HR) 及 95% 置信区间 (confidence interval, CI)。

1.3 TRIM31与免疫细胞浸润的相关性分析

应用 TCGA 数据库 TCGA-LIHC 项目的 TRIM31 RNAseq 数据,评估 TRIM31 表达对疾病诊断的精确度,并比较 TRIM31 高表达组和低表达组与 HCC 免疫/基质/估计分数;基于 CIBERSORT (CIBERSORT.R 脚本分析) 核心算法^[19],利用 CIBERSORTx 网站 (<https://cibersortx.stanford.edu/>) 提供的 22 种免疫细胞的标志物比较免疫细胞在肝癌 TRIM31 高表达和低表达组的表达差异,并分析免疫细胞与 TRIM31 表达水平的相关性。

1.4 GO注释富集、KEGG通路富集以及GSEA分析

TCGA中HCC样本根据TRIM31 mRNA中位数水平分为高、低TRIM31表达组,使用R软件DESeq2包(v1.36.0)筛选出高、低TRIM31表达组之间的差异表达基因,筛选条件为 $|\text{LogFC}| > 1$ 和校正后 P 值 < 0.05 ;使用R软件clusterProfiler包(v4.4.4)^[20]和GOplot包(v1.0.2)^[21]对差异表达基因进行GO功能和KEGG通路富集分析;使用R软件clusterProfiler包对差异表达基因进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)分析,校正后 P 值 < 0.05 和错误发生率(false discovery rate, FDR) < 0.25 被认为差异具有统计学意义。

1.5 统计学分析

所有统计分析采用R 4.2.2版本软件,MR分析采用TwoSampleMR包(v0.5.6)^[22]。TRIM31表达的正态分布数据以均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对样本 t 检验;TRIM31表达的偏态分布数据以中位数和四分位数 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间比较采用Mann-Whitney U 检验。采用pROC包(v1.18.0)对数据进行ROC曲线分析,评估TRIM31表达对疾病的诊断精确度;采

用estimate包(v1.0.13)算法比较TRIM31高表达组和低表达组与HCC免疫/基质/估计分数。

2 结果

2.1 MR分析

2.1.1 工具变量

在GTEx Portal数据库提取到肝组织TRIM31基因的265个SNPs数据,根据工具变量筛选原则,最终纳入6个SNP进行后续MR分析,见附件表2。

2.1.2 MR分析

IVW结果显示,肝脏TRIM31表达与NAFLD[OR=0.98, 95%CI(0.91, 1.05), $P=0.515$]、NASH[OR=0.98, 95%CI(0.74, 1.29), $P=0.868$]均可能具有负向关联但无统计学意义;与肝纤维化[OR=1.35, 95%CI(0.84, 2.17), $P=0.218$]可能具有正向因果关联但无统计学意义;与肝硬化[OR=1.06, 95%CI(0.95, 1.17), $P=0.292$]可能具有正向因果关联但无统计学意义;与HCC[OR=1.26, 95%CI(1.07, 1.49), $P=0.007$]可能具有正向因果关联,结果有统计学意义,WME与IVW的结果一致,但SM与WM结果仅提示正相关关系无统计学差异,见表1。

表1 TRIM31表达与NAFLD、NASH、肝纤维化、肝硬化及HCC的MR分析结果

Table 1. MR analysis results between TRIM31 expression and NAFLD, NASH, liver fibrosis, cirrhosis, and HCC

结局	方法	SNP数	OR值(95%CI)	P值
NAFLD	MR Egger回归法	5	0.44 (0.12, 1.58)	0.298
	WME	5	0.95 (0.86, 1.04)	0.243
	IVW	5	0.98 (0.91, 1.05)	0.515
	SM	5	0.92 (0.78, 1.08)	0.348
	WM	5	0.92 (0.79, 7.56)	0.321
NASH	MR Egger回归法	5	0.06 (0.00, 1.58)	0.335
	WME	5	0.90 (0.63, 1.30)	0.581
	IVW	5	0.98 (0.74, 1.29)	0.868
	SM	5	0.85 (0.51, 1.42)	0.575
	WM	5	0.85 (0.53, 1.37)	0.547
肝纤维化	MR Egger回归法	5	9.60 (0.00, 96.045.73)	0.663
	WME	5	1.73 (1.15, 2.60)	0.008
	IVW	5	1.35 (0.84, 2.17)	0.218
	SM	5	1.89 (1.15, 3.10)	0.066
	WM	5	1.89 (1.14, 3.13)	0.069
肝硬化	MR Egger回归法	5	0.73 (0.12, 4.46)	0.755
	WME	5	1.06 (0.94, 1.21)	0.346
	IVW	5	1.06 (0.95, 1.17)	0.292
	SM	5	1.06 (0.90, 1.25)	0.524
	WM	5	1.06 (0.90, 1.25)	0.516

续表1

结局	方法	SNP数	OR值 (95%CI)	P值
HCC	MR Egger回归法	5	0.62 (0.03, 14.25)	0.786
	WME	5	1.33 (1.06, 1.66)	0.014
	IVW	5	1.26 (1.07, 1.49)	0.007
	SM	5	1.35 (1.01, 1.81)	0.116
	WM	5	1.35 (1.04, 1.76)	0.088

注: NALFD.非酒精性脂肪性肝病; NASH.非酒精性脂肪性肝炎; HCC.肝细胞癌; IVW.逆方差加权法; WME.加权中位数法; SM.简单众数法; WM.加权众数法。

2.1.3 敏感性分析

MR Egger 检验结果显示, NAFLD、NASH、肝纤维化、肝硬化及 HCC 5 个结局中的 P 值均 > 0.05 , 表明不存在多效性; MR-PRESSO 检验结果显示未检测出异常 SNPs ($P > 0.05$), 见附件表3。异质性分析结果显示, HCC、NAFLD、NASH 以及肝硬化方面, 异质性检验 P 值均 > 0.05 , 表明不存在异质性; 但肝纤维化的 MR Egger 和 IVW 方法的异质性检验 P 值 < 0.05 , 见附件表 3, 因此进一步使用 IVW 随机效应模型分析, 显示结果稳健一致 ($P=0.218$)。留一法敏感性分析显示, 单个 SNP 对整体结果的影响不大, 见附件图 2。

2.2 TRIM31与HCC临床病理特征相关性分析

基于 TCGA 数据库分析 374 个 HCC 样本及 50 个癌旁组织样本中 TRIM31 的表达水平, 结果显示 HCC 组织中 TRIM31 mRNA 表达水平中位数为 2.17 (0.91, 3.26), 明显高于正常肝组织的 0.44 (0.17, 1.02), 差异具有统计学意义

($U=3\ 843, P < 0.001$)。TCGA 数据库中 50 个 HCC 与癌旁配对组织中 TRIM31 mRNA 表达水平分别为 (1.94 ± 1.386)、(0.75 ± 0.825), 差异具有统计学意义 ($t=5.650, P < 0.001$)。采用 ROC 曲线评估 TRIM31 表达水平在 HCC 诊断中的性能, 结果显示 AUC 为 0.794[95%CI (0.738, 0.851)], 表明其对 HCC 具有一定的诊断价值, 见图 1。

进一步对 TCGA-LIHC 数据进行单因素 Logistic 回归分析, 以评估 TRIM31 表达水平与 HCC 临床病理特征之间的关系, 结果显示, TRIM31 表达水平与 HCC 的组织学分级显著相关 [OR=1.557, 95%CI (1.016, 2.384), $P=0.042$], 而其他临床病理特征 (T 分期、N 分期、M 分期、肿瘤状态、病理分期) 无显著相关, 表明高表达 TRIM31 的患者可能具有较高的组织学分级, 见表 2。但生存分析显示, TRIM31 表达与 HCC 患者 OS [HR=1.25, 95%CI (0.88, 1.76), $P=0.212$] 及 PFI [HR=1.17, 95%CI (0.88, 1.56), $P=0.288$] 均无显著相关性, 见附件图 3。

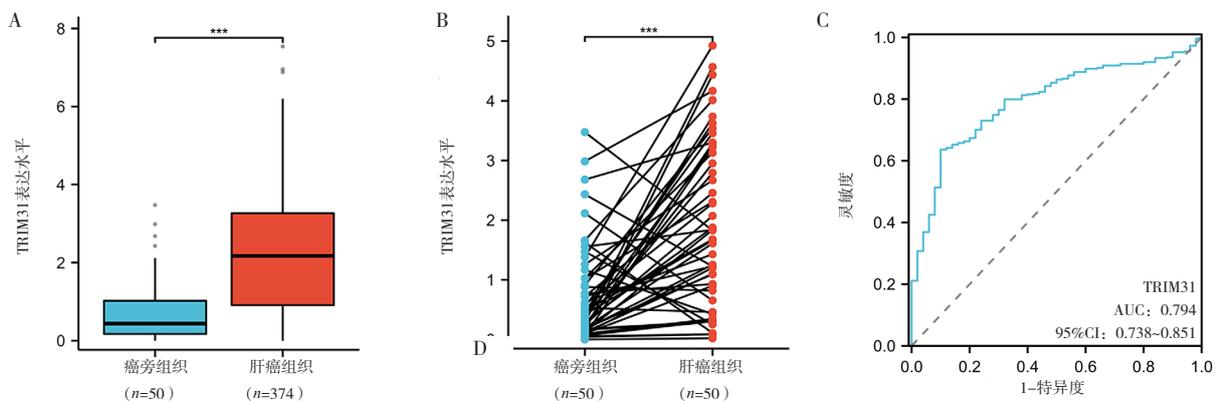


图1 TRIM31在肝细胞癌中的表达情况与ROC曲线

Figure 1. TRIM31 expression in hepatocellular carcinoma and its ROC curve

注: A.HCC及癌旁组织样本中TRIM31的表达水平; B.HCC与癌旁的配对组织中TRIM31 mRNA表达水平; C.ROC曲线评估TRIM31诊断准确性; *** $P < 0.001$ 。

表2 TRIM31表达水平与肝细胞癌临床病理特征Logistics回归结果

Table 2. Logistics regression results of TRIM31 expression and clinical pathological characteristics of hepatocellular carcinoma

特征	总样本量	OR值 (95%CI)	P值
病理T分期 (T3和T4 vs. T1和T2)	371	0.951 (0.595, 1.521)	0.834
病理N分期 (N1 vs. N0)	258	3.048 (0.313, 29.689)	0.337
病理M分期 (M1 vs. M0)	272	0.319 (0.033, 3.103)	0.325
病理分期 (III期和IV期 vs. I期和II期)	350	0.940 (0.582, 1.519)	0.801
肿瘤状态 (肿瘤 vs. 癌旁)	355	1.097 (0.720, 1.670)	0.667
组织学分级 (G3和G4 vs. G1和G2)	369	1.557 (1.016, 2.384)	0.042

2.3 TRIM31表达水平与免疫浸润的关系

对 TRIM31 表达与免疫 / 基质 / 估计分数之间进行相关性分析, 以探讨其对 HCC 肿瘤微环境的影响。结果显示, 与低 TRIM31 表达组相比, 高 TRIM31 表达组免疫评分和估计评分均显著增加 (图 2-A)。TRIM31 高表达组与低表达组之间免疫细胞比例的比较结果显示, 高表达 TRIM31 组的活化记忆 CD4⁺T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞、静息树突状细胞、中性粒细胞均显著高于低 TRIM31 表达组, 高表达 TRIM31 组的单核细胞、M2 型巨噬细胞以及静息肥大细胞均显著低于低 TRIM31 表达组 (图 2-B)。最后, TRIM31 和免疫细胞之间的相关性分析结果显示, TRIM31 与调节性 T 细胞 ($r=0.334$, $P < 0.001$) 具有显著正相关, 与 M2 型巨噬细胞呈显著负相关 ($r=-0.288$, $P < 0.001$) (图 2-C)。

2.4 TRIM31在HCC中的潜在调控途径

根据 TRIM31 的中位数表达水平, 将肝癌患者分为高、低 TRIM31 表达组, 筛选得到两组间 930 个差异表达基因 (图 3-A)。GO 富集分析显示, 这些差异表达基因主要富集于激素水平调节、激素代谢过程以及消化等生物过程, 细胞顶端部分、基顶细胞质膜以及突触膜等细胞成分, 以及受体-配体活性、信号传导受体激活活性以及激素活性等分子功能 (图 3-B)。KEGG 通路富集分析显示, 这些基因主要富集于神经活性配体-受体相互作用、细胞色素 P450 介导的异物代谢以及药物代谢-细胞色素 P450 等通路 (图 3-B)。GSEA 分析显示, TRIM31 高表达的 HCC 样本中显著富集与肿瘤恶性进展密切相关的信号通路, 包括生物氧化信号通路、钙信号传导通路等 (图 3-C)。

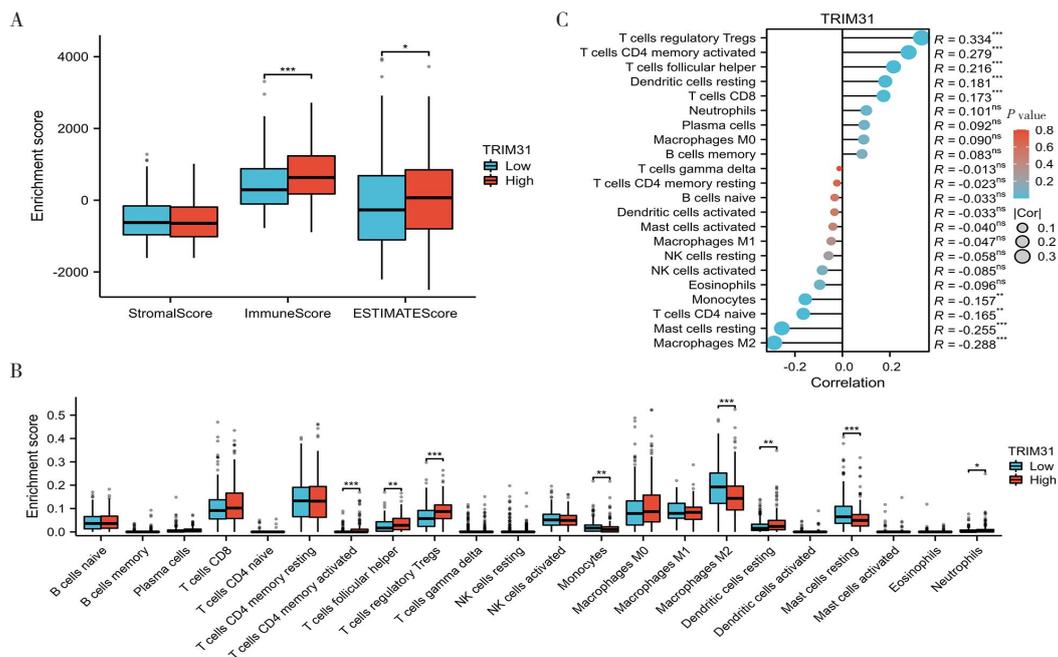


图2 肝细胞癌中TRIM31表达水平与免疫浸润的关系

Figure 2. Relationship between TRIM31 expression and immune infiltration in hepatocellular carcinoma

注: A. HCC中TRIM31表达与免疫/基质/估计分数之间的关系; B. 差异TRIM31表达对免疫细胞浸润的影响; C. TRIM31表达与免疫细胞浸润的相关性; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

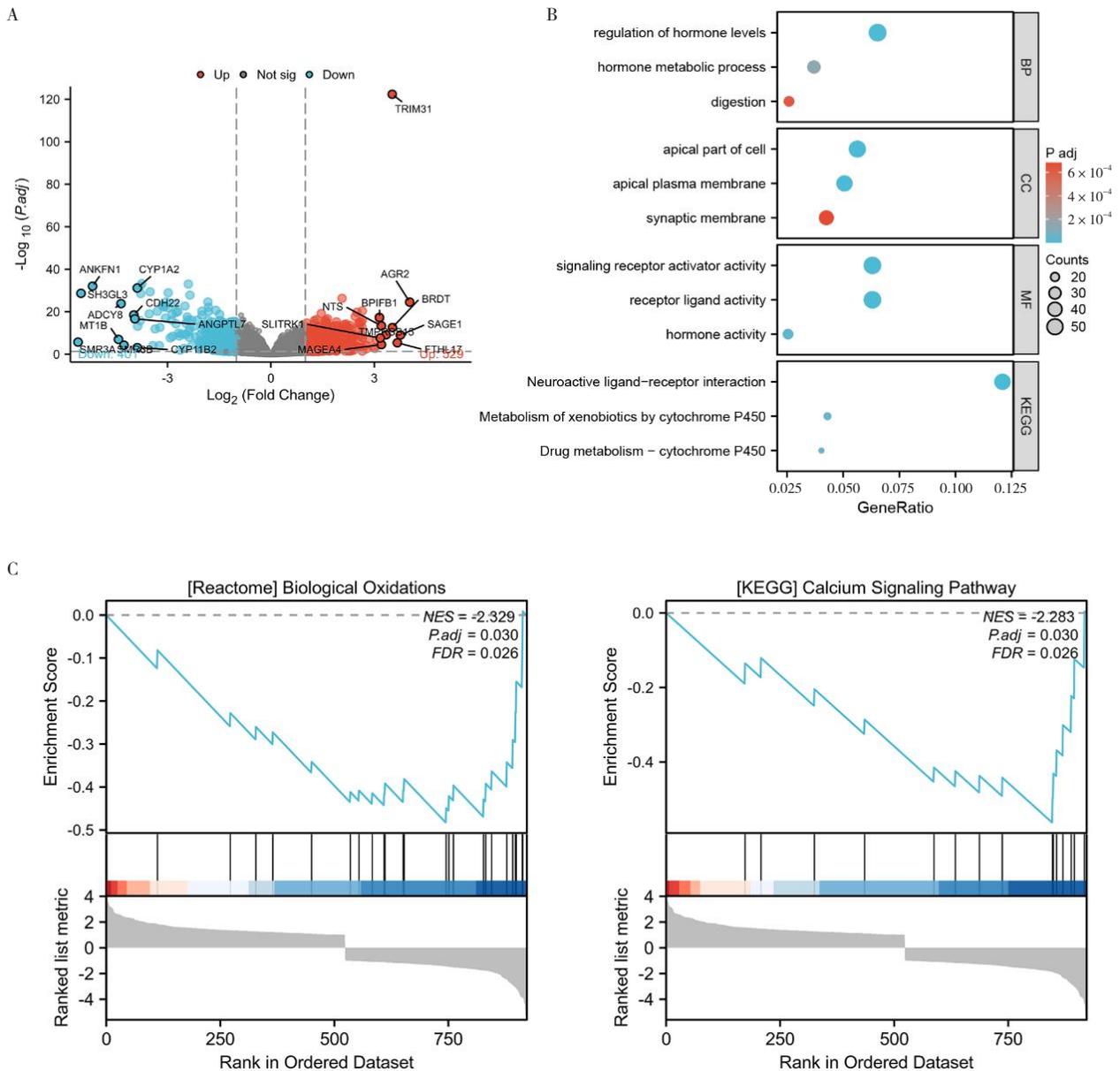


图3 TRIM31在肝细胞癌中调控的潜在途径

Figure 3. Potential pathways of TRIM31 regulation in hepatocellular carcinoma

注：A. TRIM31高表达组和低表达组之间的差异表达基因火山图；B. 肝细胞癌中与TRIM31表达相关的差异表达基因的GO注释和KEGG通路分析；C. 肝细胞癌中与TRIM31表达相关的差异表达基因的基因集富集分析。

3 讨论

近年来研究发现，在NAFLD至HCC自然进程中，不同的病理阶段TRIM31表达似乎不同。本研究通过双样本MR方法，分析了肝脏TRIM31表达与NAFLD、NASH、肝纤维化、肝硬化以及HCC等慢性肝病之间的因果关系。结果提示肝脏TRIM31表达可能与HCC具有显著正向因果关联，即肝脏TRIM31表达会增加HCC的发病风险，这对于HCC的病因探究、诊断、治疗及预防具有重要的临床意义。因此本研究进一步采用生物信

息学分析TRIM31在HCC中的作用，结果显示TRIM31在HCC中表达显著上调，机制可能与免疫细胞浸润有关。

有研究显示TRIM31可通过靶向肝细胞中的Rhbdf2减轻NAFLD模型小鼠的病情进展^[4]，这提示TRIM31水平下降可增加NAFLD的患病风险。在四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型中，肝脏TRIM31表达显著降低，且进一步分析发现TRIM31/NLRP3信号通路可介导桑黄铜对肝纤维化的改善作用^[23]，可见TRIM31也可能是预防和治理肝纤维化的关键靶点之一。此外，在NASH

临床患者和啮齿动物模型中, 肝脏 TRIM31 的表达显著下调, 且进一步研究显示肝细胞特异性 TRIM31 缺失会阻碍肝脏代谢平衡, 同时导致糖代谢综合征、脂质积累、炎症上调, 并显著促进 NASH 进展^[24]。尽管未达到统计学显著性阈值, 本研究的效应方向提示肝脏 TRIM31 表达降低可能与 NAFLD、肝纤维化及 NASH 发生风险升高存在潜在关联, 这与文献^[4, 23-24]报道中 TRIM31 在 NAFLD、肝纤维化及 NASH 模型肝组织均表达下调的现象相印证。

临床研究显示与配对的 HCC 患者远端非癌肝组织相比, 肝癌组织中 TRIM31 的表达明显上调, 且体外实验进一步揭示 TRIM31 可通过过度激活哺乳动物雷帕霉素靶复合物 1 通路促进 HCC 细胞的恶性行为^[5]。此外, TRIM31 可通过调控 p53-AMPK 轴促进 HCC 细胞的抗锚固性^[25]。miR-29c-3p 作为一种肿瘤抑制基因, 亦可通过降低 TRIM31 的表达来抑制 HCC 的恶性进展^[26]。本研究发现, 肝脏 TRIM31 在 HCC 中显著高表达, 且肝脏 TRIM31 表达与 HCC 风险存在正向因果关系。高表达 TRIM31 组的活化记忆 CD4⁺T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞、静息树突状细胞以及中性粒细胞均显著增加, 而单核细胞、M2 型巨噬细胞以及静息肥大细胞均显著降低, 提示 TRIM31 可能通过调节肿瘤免疫反应相关通路参与 HCC 的发生发展。已有研究报道, IL-17 可通过依赖 TRIM31 的 MEF2C K63 连接型多泛素化作用诱导非小细胞肺癌细胞中 PD-L1 基因转录^[27], 而 PD-L1 与 T 细胞表面的 PD-1 的相互作用是导致免疫抑制的关键机制之一, 这提示 TRIM31 可参与调控免疫相关信号通路。进一步的差异表达分析和富集分析结果显示, 高 TRIM31 表达组富集了生物氧化信号通路与钙信号传导通路, 也支撑了肝脏 TRIM31 在 HCC 发生发展中的重要作用。

本研究也存在一定局限性。首先, 提取到的充当工具变量的 TRIM31 cis-eQTL 较少, 需要进一步扩大样本量来提高评估的准确性。其次, 本研究是基于来自芬兰人群的 GWAS 汇总数据进行的, 是否适用于其他人群, 需要其他人群的样本进行验证。此外, 本研究虽然通过生物信息学方法分析了 TRIM31 在 HCC 中的表达及其潜在功能, 尤其在 HCC 免疫微环境中的作用, 但缺少实验

证, 本研究团队计划通过体外和体内实验(如细胞系模型、动物模型)验证 TRIM31 在 HCC 中的表达及其对肿瘤免疫微环境的影响, 通过敲除或过表达 TRIM31, 观察其对肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭, 尤其对免疫细胞浸润的影响。

综上所述, 本研究采用两样本 MR 方法探究了 TRIM31 与 NAFLD、NASH、肝纤维化、肝硬化以及 HCC 之间的因果关联, 识别出 TRIM31 与 HCC 发病风险存在因果关联, 且生物生信学手段鉴定了 TRIM31 在 HCC 患者中高表达, 可能通过重塑肿瘤免疫微环境参与 HCC 进展, 为 HCC 发病机制研究提供了新的思路, 同时为下一步实验性研究提供了方向。

附件见《医学新知》官网附录 (<https://yxxz.whuzhmedj.com/futureApi/storage/appendix/202410153.pdf>)

伦理声明: 不适用

作者贡献: 研究设计: 宋秀道; 数据采集与论文撰写: 尤君怡、宋秀道; 数据分析与论文审定: 尤君怡、梁国强、宋秀道

数据获取: 本研究中使用和(或)分析的数据可在芬兰基因组研究 FinnGen R10 (https://www.finngen.fi/en/access_results)、基因-组织表达 GTEx Portal V8 数据库 (<https://www.gtexportal.org/home%5B33>) 以及 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 获取

利益冲突声明: 无

致谢: 不适用

参考文献

- 1 Hatakeyama S. TRIM family proteins: roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4): 297-311. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.01.002.
- 2 Deng NH, Tian Z, Zou YJ, et al. E3 ubiquitin ligase TRIM31: a potential therapeutic target[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 176: 116846. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116846.
- 3 Guo Y, Lin P, Hua Y, et al. TRIM31: a molecule with a dual role in cancer[J]. Front Oncol, 2022, 12: 1047177. DOI: 10.3389/fonc.2022.1047177.
- 4 Xu M, Tan J, Dong W, et al. The E3 ubiquitin-protein ligase Trim31 alleviates non-alcoholic fatty liver disease by targeting Rhbdf2 in mouse hepatocytes[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1052. DOI: 10.1038/s41467-022-28641-w.

- 5 Guo P, Ma X, Zhao W, et al. TRIM31 is upregulated in hepatocellular carcinoma and promotes disease progression by inducing ubiquitination of TSC1-TSC2 complex[J]. *Oncogene*, 2018, 37(4): 478–488. DOI: [10.1038/onc.2017.349](https://doi.org/10.1038/onc.2017.349).
- 6 Han SK, Baik SK, Kim MY. Non-alcoholic fatty liver disease: definition and subtypes[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29(Suppl): S5–S16. DOI: [10.3350/cmh.2022.0424](https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0424).
- 7 European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(2): 1121–1140. DOI: [10.1007/s00125-016-3902-y](https://doi.org/10.1007/s00125-016-3902-y).
- 8 Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Lancet*, 2021, 397 (10290): 2212–2224. DOI: [10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3).
- 9 Smith GD, Ebrahim S. Mendelian randomization: can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? [J] *Int J Epidemiol*, 2003, 32(1): 1–22. DOI: [10.1093/ije/dyg070](https://doi.org/10.1093/ije/dyg070).
- 10 Davies NM, Holmes MV, Davey Smith G. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians[J]. *BMJ*, 2018, 362: k601. DOI: [10.1136/bmj.k601](https://doi.org/10.1136/bmj.k601).
- 11 Wei T, Zhu Z, Liu L, et al. Circulating levels of cytokines and risk of cardiovascular disease: a Mendelian randomization study[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1175421. DOI: [10.3389/fimmu.2023.1175421](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1175421).
- 12 GTEx Consortium. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues[J]. *Science*, 2020, 369(6509): 1318–1330. DOI: [10.1126/science.aaz1776](https://doi.org/10.1126/science.aaz1776).
- 13 Baiocchi M, Cheng J, Small DS. Instrumental variable methods for causal inference[J]. *Stat Med*, 2014, 33(13): 2297–2340. DOI: [10.1002/sim.6128](https://doi.org/10.1002/sim.6128).
- 14 Kurki MI, Karjalainen J, Palta P, et al. FinnGen provides genetic insights from a well-phenotyped isolated population[J]. *Nature*, 2023, 613(7944): 508–518. DOI: [10.1038/s41586-022-05473-8](https://doi.org/10.1038/s41586-022-05473-8).
- 15 GTEx Consortium. Genetic effects on gene expression across human tissues[J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 204–213. DOI: [10.1038/nature24277](https://doi.org/10.1038/nature24277).
- 16 Mostafavi H, Spence JP, Naqvi S, et al. Systematic differences in discovery of genetic effects on gene expression and complex traits[J]. *Nat Genet*, 2023, 55(11): 1866–1875. DOI: [10.1038/s41588-023-01529-1](https://doi.org/10.1038/s41588-023-01529-1).
- 17 李欣雨, 聂多锐, 肖婷芬, 等. 基于孟德尔随机化分析全身炎症因子与肝癌发生风险的因果关系 [J]. *数理医药学杂志*, 2024, 37(8): 592–599. [Li XY, Nie DR, Xiao TF, et al. Causal association between systemic inflammatory factors and the risk of hepatocellular carcinoma based on Mendelian randomization[J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 2024, 37(8): 592–599.] DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202405001](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202405001).
- 18 Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways[J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1061–1068. DOI: [10.1038/nature07385](https://doi.org/10.1038/nature07385).
- 19 Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453–457. DOI: [10.1038/nmeth.3337](https://doi.org/10.1038/nmeth.3337).
- 20 Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284–287. DOI: [10.1089/omi.2011.0118](https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118).
- 21 Walter W, Sánchez-Cabo F, Ricote M. GOrplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(17): 2912–2914. DOI: [10.1093/bioinformatics/btv300](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv300).
- 22 翁丽燕, 翁金燕, 徐靖. 他汀类药物与 1 型或 2 型糖尿病的因果关系: 一项两样本孟德尔随机化研究 [J]. *药物流行病学杂志*, 2024, 33(8): 869–876. [Weng LY, Weng JY, Xu J. Causal associations between statins and type 1 or type 2 diabetes: a two-sample Mendelian randomization study[J]. *Chinese Journal of Pharmacoepidemiology*, 2024, 33(8): 869–876.] DOI: [10.12173/j.issn.1005-0698.202403050](https://doi.org/10.12173/j.issn.1005-0698.202403050).
- 23 Ge C, Tan J, Lou D, et al. Mulberryin confers protection against hepatic fibrosis by Trim31/Nrf2 signaling[J]. *Redox Biol*, 2022, 51: 102274. DOI: [10.1016/j.redox.2022.102274](https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102274).
- 24 Xu MX, Tan J, Ge CX, et al. Tripartite motif-containing protein 31 confers protection against nonalcoholic steatohepatitis by deactivating mitogen-activated protein kinase kinase 7[J]. *Hepatology*, 2023, 77(1): 124–143. DOI: [10.1002/hep.32526](https://doi.org/10.1002/hep.32526).
- 25 Guo P, Qiu Y, Ma X, et al. Tripartite motif 31 promotes resistance to anoikis of hepatocarcinoma cells through regulation of p53-AMPK axis[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 368(1): 59–66. DOI: [10.1016/j.yexcr.2018.04.013](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.04.013).
- 26 Lv T, Jiang L, Kong L, et al. MicroRNA-29c-3p acts as a tumor suppressor gene and inhibits tumor progression in hepatocellular carcinoma by targeting TRIM31[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(3): 953–964. DOI: [10.3892/or.2020.7469](https://doi.org/10.3892/or.2020.7469).
- 27 Ying S, Wu N, Ruan Y, et al. IL-17 triggers PD-L1 gene transcription in NSCLC cells via TRIM31-dependent MEF2C K63-linked polyubiquitination[J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 81. DOI: [10.1186/s12885-025-13473-w](https://doi.org/10.1186/s12885-025-13473-w).

收稿日期: 2024 年 10 月 29 日 修回日期: 2025 年 01 月 27 日
本文编辑: 李绪辉 曹越

引用本文: 尤君怡, 梁国强, 宋秀道. TRIM31 与慢性肝病的孟德尔随机化及生物信息学分析[J]. *医学新知*, 2025, 35(3): 303–311. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202410153](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202410153).
You JY, Liang GQ, Song XD. Mendelian randomization and bioinformatics analysis of TRIM31 with chronic liver disease[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2025, 35(3): 303–311. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202410153](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202410153).