

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.04.02

伴 HBV 感染性肝癌调控枢纽基因筛选与初步鉴定

孙维华, 朱 祥, 尧晨光, 孙 鸽, 寇 铮*, 胡康洪*

(湖北工业大学中德生物医学中心, 武汉 430068)

摘要:慢性乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染引起的原发性肝癌涉及多种基因、转录本和蛋白质的相互作用及调控。从单个基因的角度来看,某个基因的表达量的改变只能对肝癌发生发展的局部作出解释而无法从整体行为进行深入和全面的探索,无法满足高度复杂性的调控研究需要。筛选乙肝相关性肝癌的基因芯片数据获取差异表达基因后,应用加权基因共表达网络分析算法构建基因共表达网络,识别与肝癌发生相关的模块,利用可视化筛选枢纽基因,并针对枢纽基因进行基因本体富集分析和初步验证。富集分析和文献挖掘一致发现,某些枢纽基因确实与多种癌症的发生与发展存在显著的关联。权重基因共表达网络分析方法被证明是一个高效的系统生物学方法,应用该方法发现了新的 HBV 相关性肝癌枢纽基因。经实验验证,发现枢纽基因 SHARPIN 促进细胞迁移。该研究对肝癌发生的调控机制以及发现 HBV 慢性感染导致肝癌的新型诊断标志物和(或)药物作用靶点提供了新的视野。

关键词:乙型肝炎病毒(HBV);HBV 相关性肝癌;GO 分析;WGCNA;共表达模块;枢纽基因;SHARPIN

中图分类号:Q343.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2016)04-203-10

Screening and preliminary identification of regulatory hub genes for the HBV-related hepatocellular carcinoma

SUN Weihua, ZHU Xiang, YAO Chenguang, SUN Ge, KOU Zheng*, HU Kanghong*

(Sino-German Biomedical Center, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China)

Abstract: Primary hepatocellular carcinoma (HCC) caused by chronic hepatitis B virus (HBV) infection involves in a variety of genes, transcripts, proteins and their interactions and regulations. From the perspective of a single gene, the alteration of its expression profiles only explains the local occurrence of liver cancer but not in the overall and comprehensive understanding, which is unable to meet needs of the highly complex disease network studies. Differentially expressed genes screened from the gene chip data of HBV-related HCC were analyzed by the weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) algorithm to construct the co-expression gene network and identify the HCC-related modules. In this paper, hub genes were visually screened and determined via the gene ontology enrichment analysis with the preliminary identification. Given to the function analysis and the literature surveys, we consistently found that indeed there is a significant association between some genes and the pathogenesis of multiple cancers. WGCNA, an approach of system biology, was applied to screen the hub genes for HBV-related HCC and approved to be efficient. SHARPIN, one of the screened hub genes, was found to promote cell migration. The present study has given the novel insight into the understanding of the regulatory mechanism during the progression of liver cancer and the discovery of new diagnosis biomarkers as well as antiviral targets.

Keywords: HBV-related hepatocellular carcinoma; GO analysis; WGCNA; Co-expression modules; Hub gene; SHARPIN

收稿日期:2016-06-05;修回日期:2016-10-10.

基金项目:湖北省自然科学基金重点项目(No. 2014CFA075);武汉市科技局应用基础研究项目(No.2015060101010033)。

作者简介:孙维华,男,硕士研究生,研究方向:分子病毒学;E-mail: 1439635515@qq.com.

* 通信作者:胡康洪,男,教授,博士生导师,研究方向:分子病毒学、传染病学;E-mail: hukh@mail.hbut.edu.cn;

寇铮,男,副教授,硕士生导师,研究方向:分子病毒学;E-mail: 417404109@qq.com.

据普查资料显示,肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)的年死亡率仅次于胃癌和肺癌,成为威胁人类健康的重要肿瘤疾病之一,而全球60%~80%的肝癌与乙肝病毒感染相关^[1-3]。HCC表现出地理区域相关的差异特征,约占肿瘤的4%^[4]。目前,应用于临床的抗肝癌药物有限,分子机制的研究发展较慢,肝癌治疗缺乏突破性,尚待深入研究重要分子及蛋白质的结构功能、表达调控及生理和病理环境下的调控机制。

伴HBV感染性肝癌的发生与发展涉及HBV和宿主基因的共同调控影响。随着分子生物学、细胞生物学等技术的应用,有关肝细胞癌发生发展中机制方面的研究取得了一定进展,主要集中在肝癌细胞增生机制,肝癌细胞凋亡机制的失活,细胞分化异常,肿瘤血管生成以及信号转导通路。RBR蛋白家族成员Parkin基因与泛素相关蛋白分解途径有关,已发现Parkin的缺失能促进肝癌的发生与发展^[5-6]。另外,研究发现细胞因子,如肝细胞生长因子、与血小板源性生长因子、转化生长因子等与肝癌的进程密切相关^[7-9]。但是,仅仅从局部关注单个或某几个基因已经不能满足这种具有高度复杂性的调控研究^[10]。立足于调控网络整体,肿瘤组织中某些基因异常表达且与其他多个基因关系密切,它们的表达可能在肿瘤的发生发展过程中扮演重要的角色,这类处于调控网络枢纽位置的基因称作枢纽基因(Hub genes)。近年来,随着基因芯片、RNA-Seq等高通量测序技术的兴起,产生了大规模组学数据^[10],进一步数据分析与挖掘将有利于系统性地研究多个基因表达关联性。因此,根据基因芯片数据来研究伴HBV感染性肝癌发生与发展过程中的枢纽基因具有明显意义。

在生物信息学领域中,网络分析的应用日渐成熟。其中,作为系统生物学分析方法中极具潜力的一种新方法,权重基因共表达网络分析(Weight Gene Co-express Network Analysis, WGCNA)以其在描述解析分子作用机制和网络关系等方面具有的独特优势迅速脱颖而出。自开发以来,WGCNA已成功应用于多种生物环境,并取得了一系列的研究成果^[11-14]。

本研究采用WGCNA进行研究^[15-16],从大量基因中筛选与乙肝相关性肝癌密切相关的枢纽基因。结合基因本体富集分析,进行功能注释,然后对基因模块进行功能分析,研究枢纽基因与肝癌发生与发展间的关联性^[17],这些工作能够为某些信号通路的调控机制提供参考,有利于构建评估HCC早期诊断预测平台,降低人群HCC发病率及死亡率。有理由相信,随着基因筛选方法的不断发展,WGCNA有望

揭示HBV相关性肝癌发生与发展的分子机制,并在识别潜在的治疗靶点等领域发挥越来越大的作用。

1 材料与方法

1.1 数据与材料

本文数据集来源于NCBI数据库中的数据GSE47197(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE47197>)。质粒pcDNA3.1-SHARPIN由本实验室构建,酶切位点BamHI和XbaI;上游引物:CGCGGATCCATGGCGCCGCCAGCGG,下游引物:TGCTCTAGACTAGGTGGAAGCTGCAGCAAG,酶切鉴定后送到武汉天一辉远公司进行测序并成功验证。在大肠杆菌DH5 α 中扩增,Takara质粒中量提取试剂盒提取纯化,-20℃保存。HepG2细胞为中国科学院武汉病毒研究所李朝阳研究员惠赠,培养细胞用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM(FBS及DMEM购自Biological Industries[®])。

1.2 WGCNA

1.2.1 构建差异表达谱矩阵数据

鉴于一个基因对应一个探针,而一个探针对应多个Identifier VALUE,需另外下载注释文件(其中共计28782个Identifier VALUE实际对应16390个基因)用于计算同一基因的Identifier VALUE平均值,通过Multi Experiment Viewer,计算每个基因的倍数差异值(取对数变换),并推断差异发生的概率 p ,当倍数差异值大于预设倍数,且筛选 $p < 0.05$ 时即判定为差异表达基因(即该基因表达无差异的概率小于0.05)。最终分别构建了癌症(Tumor)组和癌旁(Non-tumor)组基因差异表达谱矩阵。

1.2.2 去除离群的样本

离群样本定义为使聚类树形图高度发生明显偏移的样本。离群的样本对网络模块分析结果具有较大的影响,在构建网络之前,必须先检查是否存在离群样本,去除相关数据。通过取样本的平均表达值构建距离矩阵,选择类平均法对样本进行层次聚类,绘制样本聚类树形图。

1.2.3 基因模块分析

作为一种系统生物学分析方法,WGCNA分析建立了幂指数邻接函数,具体方法就是对基因表达相关系数取 n 次幂指数加权,即用邻接系数 α_{ij} 作为衡量它们之间相关关系的指标: $\alpha_{ij} = power(S_{ij}, \beta) = |S_{ij}|^\beta$,使得相关系数数值的分布在加权系数 β 作用下逐渐符合无尺度分布。其中,算法定义了相关系数至少应达到0.8,则表达量数据就转换为调控关系。基因间相关系数经过幂函数处理,理论上能够按表达模式对

基因进行分类。通过动态剪切树聚类分析获取多个共表达模块,这样每个模块里的基因具有非常类似的表达模式,它以颜色命名模块。WGCNA 选择加权系数的来无限逼近 Scale-free 网络分布,使得网络调控关系符合“无尺度关系”,即服从幂律分布。

WGCNA 的主要任务就是构建加权基因共表达网络/模块,分析的核心步骤如图 1 所示:

总之,WGCNA 使用拓扑重叠矩阵 (Topological Overlap Matrix, TOM) 来计算基因与基因之间的关联程度,得到的模块具有生物学意义。

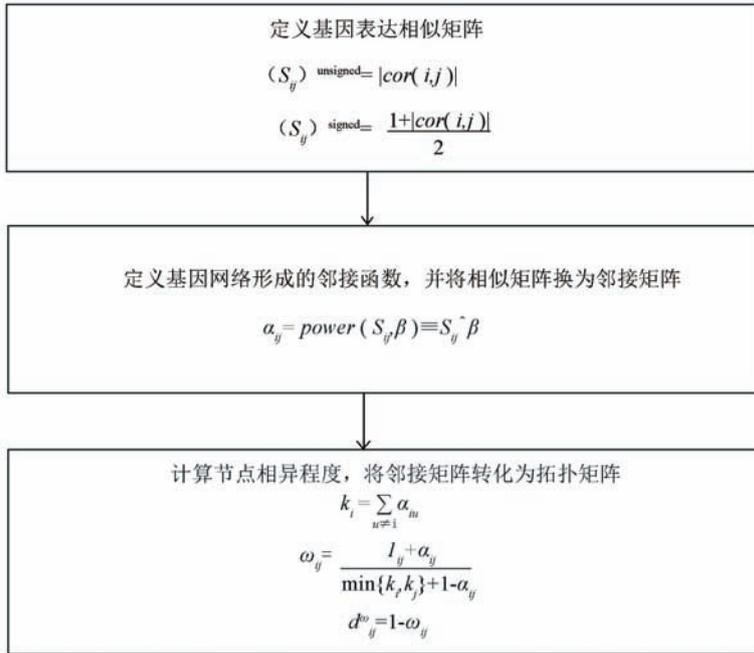


图 1 WGCNA 算法基本步骤
Fig. 1 The basic steps of WGCNA

1.3 基因富集分析

利用生物信息学在线工具 GOrrilla 对筛选的网络模块基因进行 GO 富集分析,利用 PANTHER 进行通路分析,并以统计学方法计算 *p* 值,预测其生物学功能。

1.4 枢纽基因筛选

为了直观地展示模块内部的调控关系网络,我们将以癌症组计算得到的模块为分类标准,计算癌旁组的 TOM,然后利用 VisANT 软件对癌症组与癌旁组同一类模块进行可视化展示^[18],对比模块中各基因的节点数并筛选枢纽基因。

1.5 SHARPIN 对 HepG2 迁移影响

实验观察本研究筛选出来的枢纽基因之一,SHANK 家族蛋白的 RH 结构域交互作用蛋白 (SHANK-associated RH domain interacting protein,以下简称 SHARPIN),对 HepG2 细胞的迁移影响:(a)在细胞培养板六孔板中以每孔 5×10^5 个细胞铺板,过夜长满后,换无血清培养基培养 12 h;(b)用 10 μ l 枪头沿着直尺垂直于背后的横线划痕,用 PBS 小心清洗划下的细胞;(c)按实验设置分别转染各组细胞,4~6 h 后换成含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,分别于 0/24/48 h 取样,使用 Olympus IX 73 倒置荧光显微镜观察并拍照记录。

2 结果

2.1 数据基本信息

GSE47197 全基因组表达数据包括 61 个癌症组与 63 个癌旁组数据,这些数据均已经过背景校正和标准化处理。由于数据中包括的基因探针数量太大,质量低且差异不显著的数据较多,在构建基因共表达模块与网络时,为了减轻噪音和减轻计算机的运行负担,还需要筛选差异基因保留差异较大的基因。通过 Multi Experiment Viewer 软件,滤过差异并不显著的基因,最后保留 5 968 个差异基因 (*abFC* > 2, *FDR* < 0.05) 作为本文的重点研究对象。

2.2 样本数据初筛

采用层次聚类法,得到癌症组及癌旁组样本聚类图 (见图 2 和图 3),发现 61 个癌症组样本表达谱数据中存在 1 个离群的样本,而 63 个癌旁组织样本表达谱数据中存在 3 个离群的样本。离群样本经过剪枝去除 (剪枝高度分别为 115 和 90),最后剩余 60 个癌组织样本和 60 个癌旁组织样本分别进入后续的网络分析。

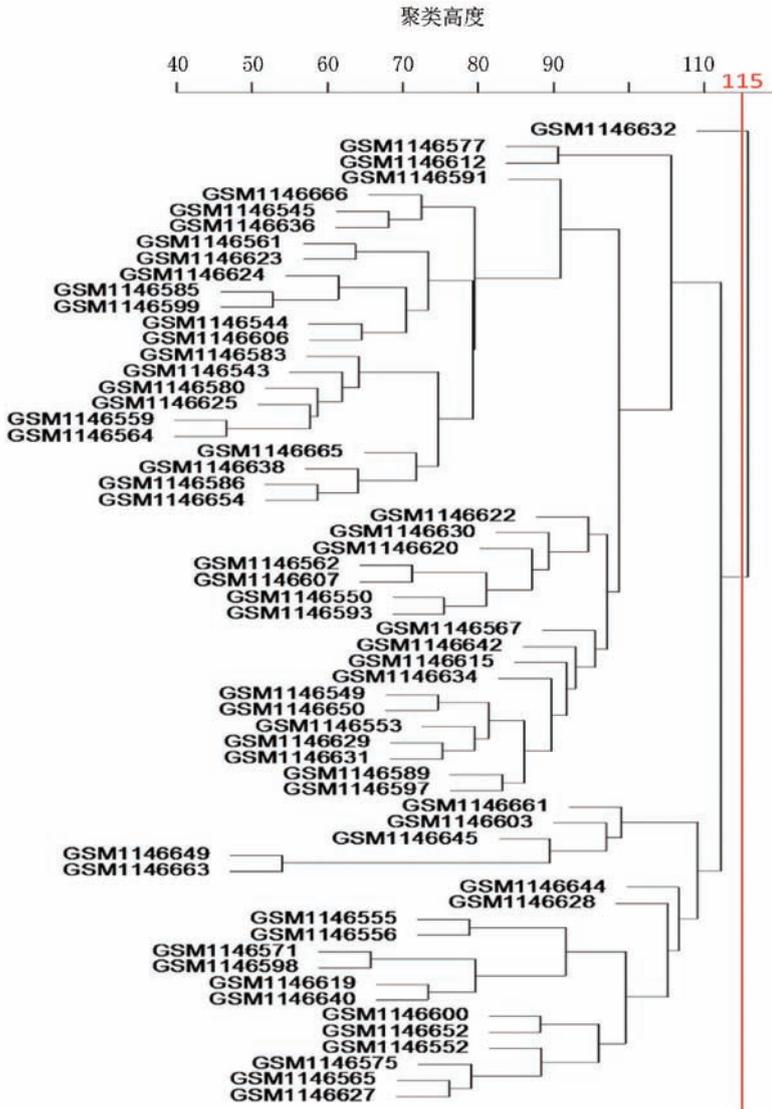


图2 癌组织样本聚类树

Fig. 2 Tumor samples clustering

2.3 阈值选择与网络拓扑结构分析

选择合适的邻接矩阵权重参数 β 以尽量满足无尺度分布。参数 β 从 1~20 取值,对某节点连接度的对数 $\log(i)$ 与该节点出现的概率的对数 $\log(p(i))$ 建立线性模型,参数 β 即系数 R 的平方,按照候选的参数 β ,返回被检测的网络参数(见图 4 和图 5)。我们选取了首次接近 0.90 时的 β 值来构建基因网络/模块,针对肿瘤组织和癌旁组织样本模型,我们分别选择 $\beta=9$ 和 $\beta=10$,这样既保证了网络接近于无尺度网络同时也是使曲线趋于平滑的最小阈值,并且它也使得网络的平均链接程度不会太小,这有利于网络包含足够的信息(例如,挖掘模块)。

2.4 TOM 聚类鉴定基因模块

选取 $\beta=9$ 来计算癌症组的网络拓扑重叠 TOM,利用层次聚类法得到基因系统聚类树。根据动态分

层剪切树算法来挖掘基因模块。设置每个基因模块中基因数目最小为 50,设定基因的聚类高度上限为 0.995。基因模块分析结束后,计算每个基因模块的特征向量基因 ME (Module Eigengene) 对这些模块聚类作降维处理,将距离较近的模块合并成新的模块(设置 $\text{height}=0.25$)。

如图 6 所示,观察 16 个模块最终降维得到 13 个共存于基因模块,而模块中的基因个数从 74 到 1161 不等。另外,grey 模块表示未分配到任何一个模块的基因集,其中含有 1169 个基因。

根据拓扑重叠程度,选择全部的基因制作热图(见图 7)。通过 WGCNA,我们识别了癌症中相关度高的基因模块,即共表达模块代表的基因在功能上具有紧密的关系。

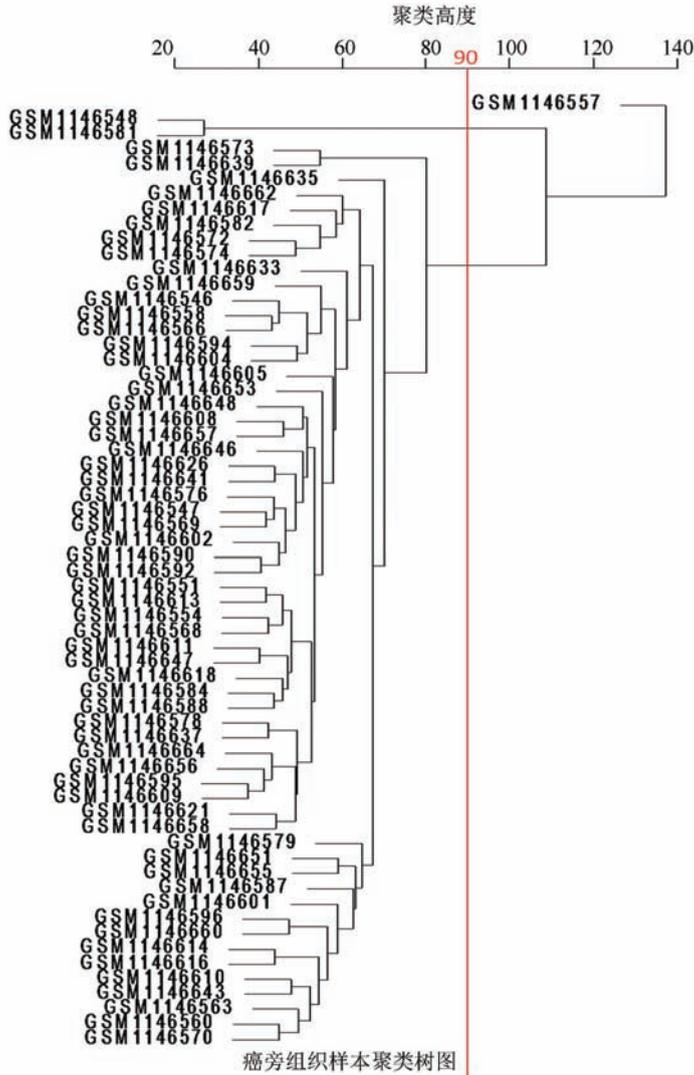


图 3 癌旁组织样本聚类树

Fig. 3 Non-tumor samples clustering

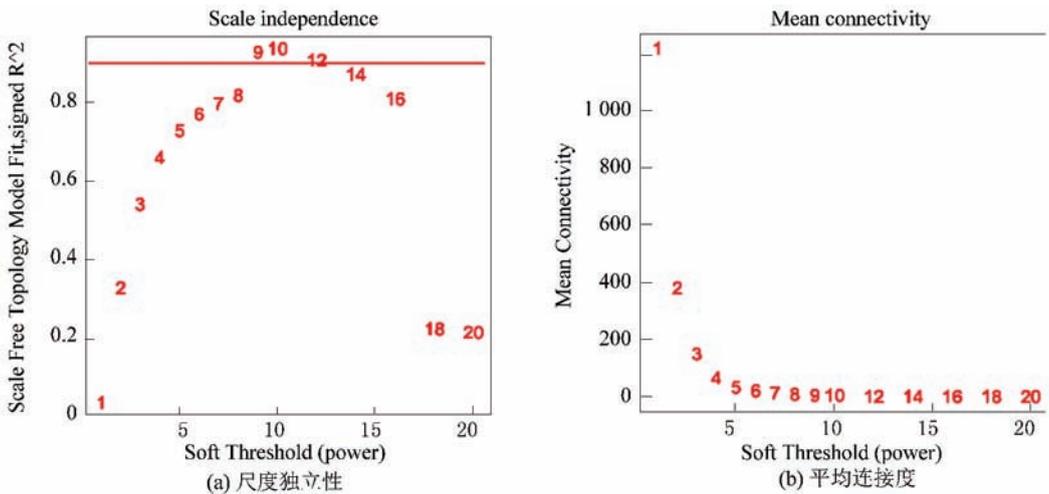
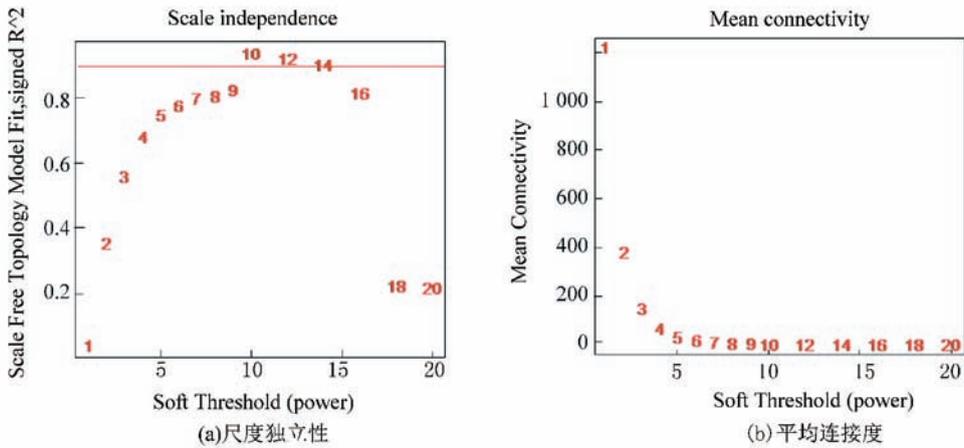


图 4 癌症组参数 β 选取参考图

Fig. 4 Figures for selecting β in tumor sample

注:图 4 的横轴均代表权重参数 β , (a) 图的纵轴代表对应的网络中 $\log(i)$ 与 $\log(p(i))$ 相关系数的平方, 该系数越高 (最小应达到 0.8, 完美无尺度网络的模型适应指数是 1), 表明该网络越逼近无尺度网络的分布; (b) 图的纵轴代表模型中所有基因邻接系数的均值, 它反映了网络的平均连接水平。

图 5 癌旁组参数 β 选取参考图Fig. 5 Figures for selecting β in non-tumor sample

注:图 5 的横轴均代表权重参数 β , (a) 图的纵轴代表对应的网络中 $\log(i)$ 与 $\log(p(i))$ 相关系数的平方, 该系数越高 (最小应达到 0.8, 完美无尺度网络的模型适应指数是 1), 表明该网络越逼近无尺度网络的分布; (b) 图的纵轴代表模型中所有基因邻接系数的均值, 它反映了网络的平均连接水平。

2.5 基因模块的功能分析

经过 GO 富集分析, 我们得到了各个模块的详细信息(见表 1), 发现它们主要参与免疫系统调节、小分子代谢过程、刺激反应、炎症反应凝血级联反应、细胞外基质受体相互作用、细胞周期、趋化因子和细胞因子介导的炎症反应信号通路、血管形成等分子功能和生物学过程及信号通路, 可能与 HBV 相

关肝癌的发生有一定的联系。

根据富集分析结果, 选择与癌症的发生与发展相关性较高的模块为主要研究对象; 基于 Eigengenes 的 PANTHER 分析, 发现 Pink 模块与 Magenta 模块的相关基因与 T 细胞的活化和通路趋化因子以及细胞因子介导的炎症反应信号通路存在显著富集关联 (Enrichment 倍数 > 5, p 值 = 0.000)。

表 1 GOrilla GO 功能富集分析结果

Table 1 The GO analysis of GOrilla

Module	Description	P-value	Enrichment	Size/Recognize
turquoise	xenobiotic metabolic process	6.35×10^{-17}	5.44	1 161/1 114
brown	response to organic substance	1.80×10^{-15}	2.01	689/662
blue	single-organism metabolic process	7.71×10^{-22}	1.46	861/793
salmon	response to stimulus	1.79×10^{-5}	2.48	488/351
cyan	negative regulation of cellular process	1.61×10^{-4}	2.67	82/59
red	porphyrin-containing compound metabolic process	1.05×10^{-5}	36	260/221
black	regulation of cellular process	3.49×10^{-4}	1.6	221/141
pink	energy derivation by oxidation of organic compounds, regulation of peptidase activity, regulation of endopeptidase activity, anatomical structure development	3.78×10^{-5}	12	220/211
magenta	response to stimulus, immune response, positive regulation of response to stimulus, positive regulation of immune system process	1.37×10^{-13}	1.29	268/263
purple	single-organism metabolic process, organic acid catabolic process, carboxylic acid catabolic process, response to stimulus	8.34×10^{-5}	1.95	145/130
tan	cellular process, multi-organism behavior, response to chemical, cellular response to metal ion	1.42×10^{-4}	1.4	109/105
yellow	ion homeostasis, chemical homeostasis, response to lipid, positive regulation of cellular biosynthetic process	1.04×10^{-5}	40.6	295/254

* Size: 模块内的基因数; Recognized: 被 GOrilla 识别的基因数; p 值: 相关性检验参数, 根据 $p\text{-value}/(n(\text{number of terms}))$ 调整后的 $p\text{-value}$ 。

2.6 枢纽基因识别

结合模块分析与富集分析的结果, 将显著通路模块中的基因调控关系可视化展示, 以 Pink 模块与 Magenta 模块为例(见图 8, 同一模块的拓扑重叠阈

值相同)。其中, Pink 选择的权重值标准为 0.07 ~ 0.16, Magenta 选择的权重值标准为 0.18 ~ 0.28。通过可视化展示, Pink 模块与 Magenta 模块中的基因存在多个枢纽基因(见表 2)。

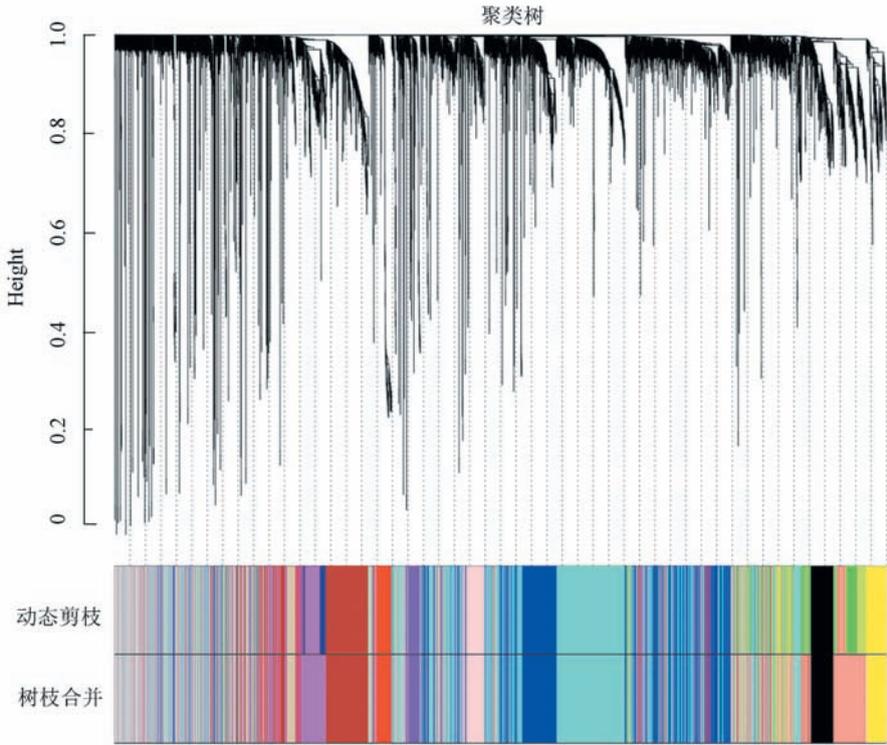


图 6 动态分层聚类*

Fig. 6 Merged dynamic cluster

注:不同的颜色表示不同的基因模块,Dynamic Tree Cut 对应最初得到的 16 个模块,Merged dynamic 对应最终得到的合并之后的 13 个模块。

* 彩图见电子版(<http://swxx.alljournals.cn/ch/login.aspx>) (2016 年第 4 期 Doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.04.02)。

全基因网络热图

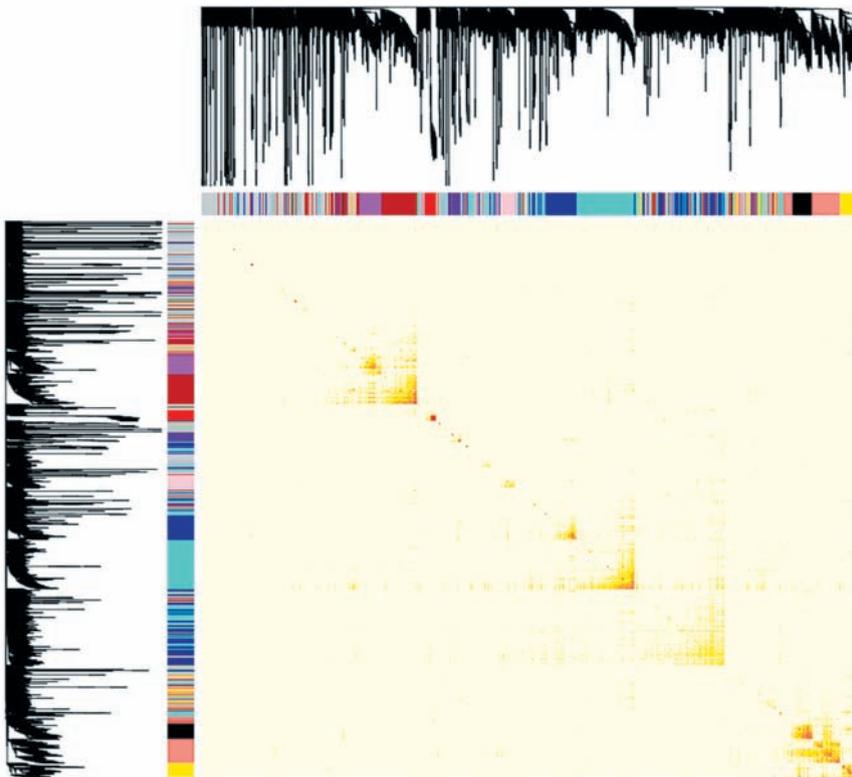


图 7 TOM 图展示基因网络的基因相互关系热图*

Fig. 7 TOMplot: topological overlap matrix plot

注:该图基于拓扑重叠,选择所有基因进行作图,热图中每一行及每一列均对应一个基因,颜色越深,提示基因间的相关性或者拓扑重叠越高,基因之间的关系越密切。图中的左侧和上方为基因聚类树形图集对应的基因模块。

* 彩图见电子版(<http://swxx.alljournals.cn/ch/login.aspx>) (2016 年第 4 期 Doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.04.02)。

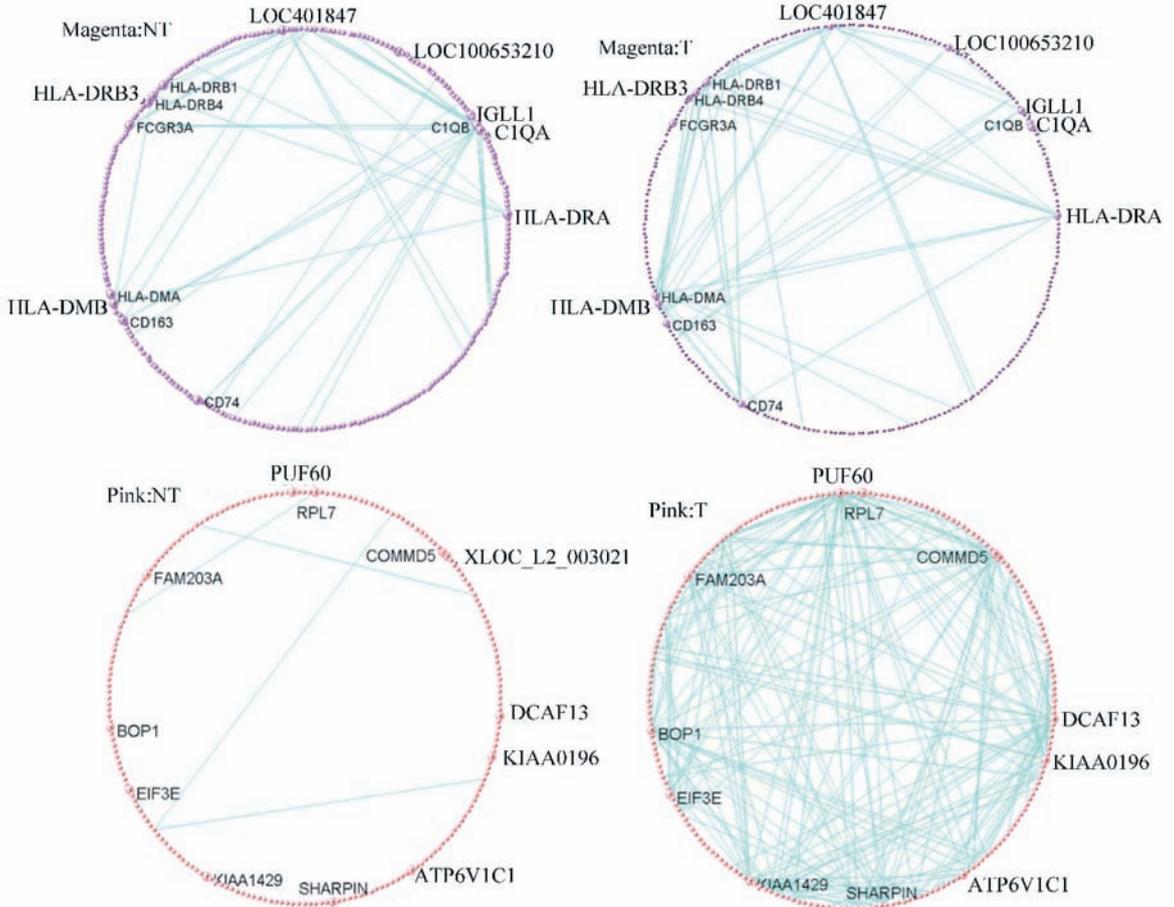


图 8 模块中的关键节点基因

Fig.8 The hub genes indicated in the module

注:左栏 NT 表示癌旁组织,右栏 T 表示癌组织,根据节点度数差值反映枢纽基因的重要程度。

表 2 模块中的关键节点枢纽基因

Table2 The hub Genes of modules

Module	Hub Genes
Pink(0.07-0.16)	ATP6V1C1、BOP1、COMMD5、DCAF13、EIF3E、FAM203A、KIAA0196、KIAA1429、SHARPIN
Magenta(0.18-0.28)	C1QA/B、FCGR3A、HLA-DMA/B、HLA-DRA、HLA-DRB1/3/4

2.7 SHARPIN 对 HepG2 细胞的迁移影响

细胞划痕实验结果见图 9,实验结果显示:右栏图 9(b) 过表达 SHARPIN 组与左栏图 9(a) 对照组进行比较,除了刚开始转染的 0 小时(见图 9)无差别外,转染 24 小时后图 9(b) 过表达 SHARPIN 组比图 9(a) 对照组迁移更明显(见图 9);48 小时后,这种差别更大,图 9(b) 过表达 SHARPIN 组中左右二边红线边界的间距只有图 9(a) 对照组间距的 50% 左右(见图 9)。该结果显示,SHARPIN 基因能够促进细胞迁移,符合 GO 分析结果,提示上调 SHARPIN 基因促进乙肝相关性肝癌发生或发展。

4 讨论与结论

目前学术界普遍认为 HBV 相关性肝癌的发生与发展的情况异常复杂,不仅与 HBV 相关,还与肝细胞微环境密切相关。细胞内的调控网络发生异常导致肝癌的发生,其中伴随着某些信号通路的改变,但大部分的调控关系仍处于长期探索中。

本研究首先从 NCBI 的 GEO 数据库下载 HBV 相关性肝癌的表达数据集 GSE47197(含 124 个样本),利用 WGCNA 模拟基因簇筛选出了 HBV 相关性肝癌基因模块并对模块进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,发现了与 HBV 相关性肝癌显著相关的基因模块内的枢纽基因,如 IGF2、CD163、EIF3E、CARM1、HLA-DRB1/3/4、CD72 等,注释到了细胞外基质(ECM)受体相互作用、整合素信号通路、趋化因子和细胞因子介导的炎症反应信号通路、血管形成等生物学过程。值得注意的是部分模块同时显著富集到 T 细胞的活化和趋化因子和细

胞因子介导的炎症反应信号通路,提示这些通路模块中的基因与 HBV 相关性肝癌的发生发展有着显著的内在关联^[19,20]。基于此,这些工作有助于为肝

癌发生的调控机制的研究以及肝癌的治疗诊断、靶点选择提供更多的参考信息。

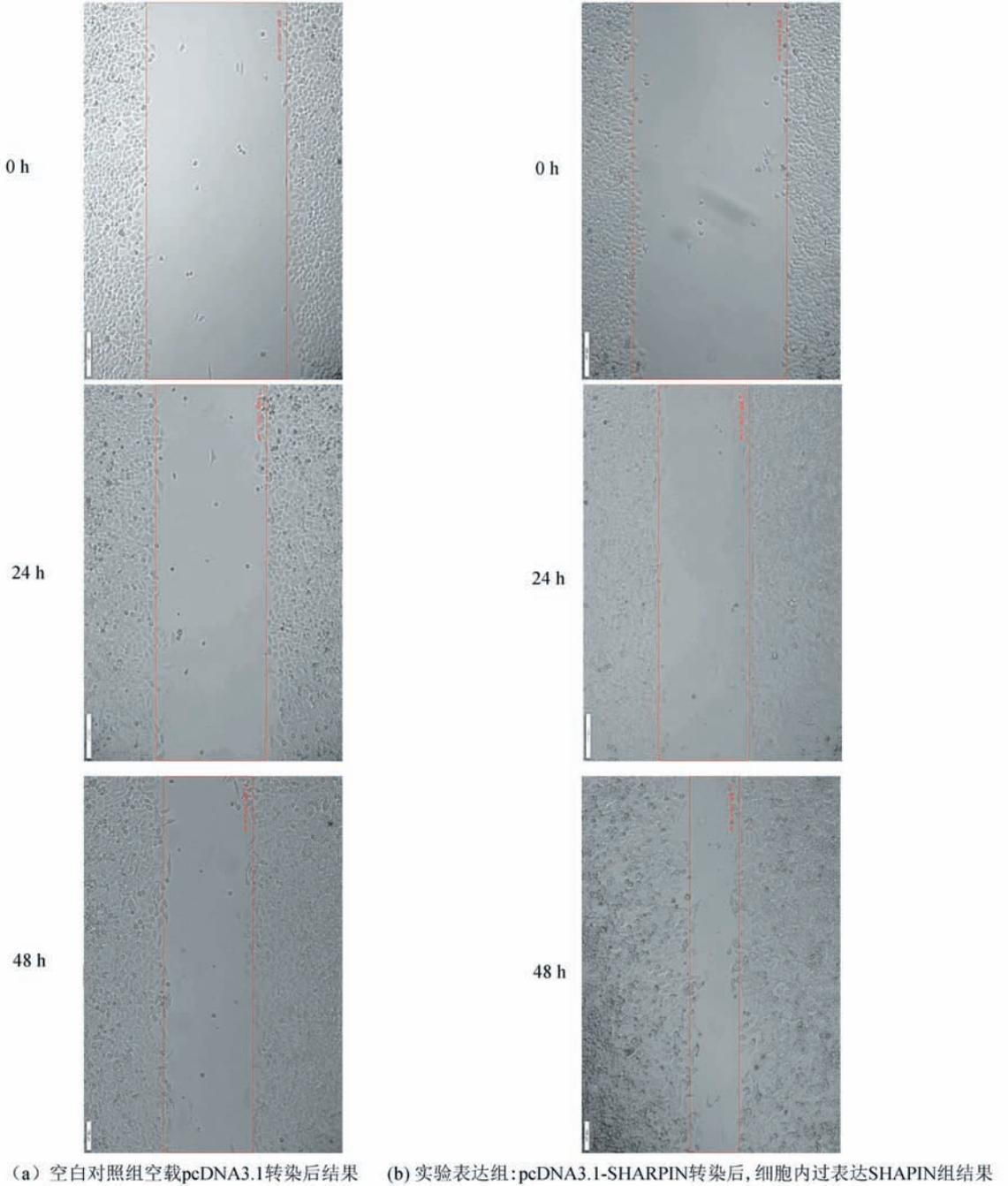


图 9 HepG2 细胞在转染质粒 0h/24h/48h 时的迁移情况

Fig. 9 Migration of HepG2 at 0h/24h/48h post transfection

显然,和全局网络中的枢纽基因相比,这些模块中的枢纽基因更具有生物学意义,其中部分枢纽基因功能已经得到行业的普遍认可,如 CD74、CD163、EIF3E、HLA-DRB1/3/4 等,这恰好说明通过 WGCNA 筛选出的枢纽基因具有生物学意义;相反地,有些基因的功能,尤其它们在肝癌中行使的生物学功能还不太清楚,如 SHARPIN、BOP1、FCGR3A 等^[21-23]。

本研究筛选出来的枢纽基因 SHARPIN,经实验验证发现能促进细胞迁移,提示该基因对于研究 HBV 相关性肝癌的发生与发展具有价值。前期有文献报道 SHARPIN 上调 ERK/Akt 信号通路,而细胞因子 Akt 和 ERK 参与增殖、分化、侵袭和转移。总体来看,关于 SHARPIN 在 HBV 相关性肝癌发生发展中上下游分子的相互作用等方面,目前知之甚

少。我们的该项研究,对肝癌发生的调控机制以及发现 HBV 慢性感染导致肝癌的新型诊断标志物和(或)药物作用靶点,提供了新的视野。

参考文献(References)

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61(2):69–90. DOI: 10.3322/caac.20107.
- [2] BOSETTI C, TURATI F, LA-VECCHIA C. Hepatocellular carcinoma epidemiology[J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2014, 28(5):753–770. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.08.007.
- [3] 张原青, 郭津生. 乙型肝炎病毒促进肝细胞性肝癌发生的机制[J]. *中华肝脏病杂志*, 2016, 24(2):152–156. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2016.02.018.
ZHANG Yuanqing, GUO Jinsheng. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2016, 24(2):152–156. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2016.02.018.
- [4] ZENG H, ZHENG R, GUO Y, et al. Cancer survival in China, 2003–2005: A population-based study[J]. *International Journal of Cancer*, 2015, 136(8):1921–1930. DOI: 10.1002/ijc.29227.
- [5] WOO M G, XUE K, LIU J, et al. Calpain-mediated processing of p53-associated parkin-like cytoplasmic protein (PARC) affects chemosensitivity of human ovarian cancer cells by promoting p53 subcellular trafficking[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(6):3963–3975. DOI: 10.1074/jbc.M111.314765.
- [6] WANG F, DENSON S, LAI J, et al. Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma[J]. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2004, 40(2):85–96. DOI: 10.1002/gcc.20020.
- [7] LAI J P, CHIEN J R, MOSER D R, et al. hSulf1 sulfatase promotes apoptosis of hepatocellular cancer cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(1):231–248. DOI: 10.1053/j.gastro.2003.09.043.
- [8] POTAPOVA O, FAKHRAI H, BAIRD S, et al. Platelet-derived growth factor-B/v-sis confers a tumorigenic and metastatic phenotype to human T98G glioblastoma cells[J]. *Cancer Research*, 1996, 56(2):280–286. DOI: 10.1139/cjpp-79-7-566.
- [9] BOMMIREDDY R, ORMSBY I, YIN M, et al. TGF β 1 Inhibits Ca²⁺-Calcineurin-Mediated activation in thymocytes[J]. *Journal of Immunology*, 2003, 170(7):3645–3652. DOI: 10.4049/jimmunol.170.7.3645.
- [10] MINGUEZ B, HOSHIDA Y, VILLANUEVA A, et al. Gene-expression signature of vascular invasion in hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Hepatology*, 2011, 55(6):1325–1331. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.034.
- [11] PING Y, DENG Y, WANG L, et al. Identifying core gene modules in glioblastoma based on multilayer factor-mediated dysfunctional regulatory networks through integrating multi-dimensional genomic data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(4):1997–2007. DOI: 10.1093/nar/gkv074.
- [12] LIU Z P. Reverseengineering of genome-wide gene regulatory networks from gene expression data[J]. *Current Genomics*, 2015, 16(1):3–22. DOI: 10.2174/1389202915666141110210634.
- [13] HE D, LIU Z P, HONDA M, et al. Coexpression network analysis in chronic hepatitis B and C hepatic lesion reveals distinct patterns of disease progression to hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2012, 4(3):140–152. DOI: 10.1093/jmcb/mjs011.
- [14] IVLIEV A E, T HOEN P A, SERGEEVA M G. Coexpression network analysis identifies transcriptional modules related to proastrocytic differentiation and sprouty signaling in glioma[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(24):10060–10070. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2465.
- [15] TAMINAU J, MEGANCK S, LAZAR C, et al. Unlocking the potential of publicly available microarray data using inSilicoDb and inSilicoMerging R/Bioconductor packages[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13(1):1–9. DOI: 10.1186/1471-2105-13-335.
- [16] LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1):1–13. DOI: 10.1186/1471-2105-9-559.
- [17] WANG J G, HUANG Q, LIU Z P, et al. NOA: a novel network ontology analysis method[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(13):e87. DOI: 10.1093/nar/gkr251.
- [18] HU Z, SNITKIN E S, DELISI C. Visant: An integrative framework for networks in systems biology[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9(4):317–325. DOI: 10.1093/bib/bbn020.
- [19] UTSUNOMIYA T, SHIMADA M, KUDO M, et al. A comparison of the surgical outcomes among patients with HBV-positive, HCV-positive, and non-B non-C hepatocellular carcinoma: a nationwide study of 11,950 patients[J]. *Annals of Surgery*, 2015, 261(3):513–520. DOI: 10.1097/SLA.0000000000000821.
- [20] SINGAL A K, SALAMEH H, KUO Y F, et al. Meta-analysis: the impact of oral anti-viral agents on the incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2013, 38(2):98–106. DOI: 10.1111/apt.12344.
- [21] WANG Z, POTTER C S, SUNDBERG J P, et al. SHARPIN is a key regulator of immune and inflammatory responses[J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2012, 16(10):2271–2279. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01574.x.
- [22] CHUNG K Y, CHENG I K, CHING A K, et al. Block of proliferation 1 (BOP1) plays an oncogenic role in hepatocellular carcinoma by promoting epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Hepatology*, 2011, 54(1):307–318. DOI: 10.1002/hep.24372.
- [23] CONESA-ZAMORA P, SANTA CLARA V, GADEA-NIÑOLES E, et al. Association of polymorphism in FcGR3A gene and progression of low-grade precursor lesions of cervical carcinoma[J]. *Human Immunology*, 2009, 71(3):314–317. DOI: 10.1016/j.humimm.2009.11.012.