Statistics and Application 统计学与应用, 2019, 8(1), 95-107
Published Online February 2019 in Hans. http://www.hanspub.org/journal/sa
https://doi.org/10.12677/sa.2019.81011

Hans汉斯

Staging Study of Hepatocellular Carcinoma Based on Network Analysis and Random Forest Method

Xin Li

School of Mathematics and Physics, North China Electric Power University, Beijing
Email: ymygxinxin@163.com

Received: Jan. 12th, 2019; accepted: Jan. 24th, 2019; published: Jan. 31st, 2019

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is an invasive malignant tumor. Although the diagnostic techniques and treatment levels of hepatocellular carcinoma have made great progress, the early diagnosis of HCC is still a huge challenge. In this paper, we attempt to analyze core genes associated with clinical staging by gene network for information on the discovery of early HCC patients and improving the diagnostic techniques and treatment levels of HCC. First, we selected the gene expression data of 219 patients with early postoperative HCC in the GEO database, performed differential expression analysis, and randomly divided the data into training set and test set. We use the genes of training set to clustering out five modules by weighted gene co-expression network (WGCNA), and performed functional enrichment and pathway enrichment analysis for each gene module. We found that the blue module is related to some biological processes such as cell proliferation, division, cycle and DNA replication initiation, replication, repair, and this module is also related to some pathways such as cell cycle, P53 signaling pathway, HTLV-I infection, hepatitis B. These processes and pathways are closely related to the occurrence and development of HCC. Therefore, we use the enriched genes of the module for PPI network analysis, and 10 core genes that we selected with high connectivity is BUB1B, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CDC20, MAD2L1, MCM4, PCNA, RFC4, and TOP2A. Then through the supervised learning of core genes in random forests, a classification model of BCLC staging was established and then applied to the test set. The study found that the method has a great help for the classification of early patients, and the correct rate reached 95.52%, but for the patients in the middle and late stages. The classification effect is not very good. This study raises awareness of the pathogenesis and staging of HCC. And it provides a new direction for HCC targeted therapy.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, WGCNA, PPI Network, Random Forest

文章引用: 李鑫. 基于网络分析和随机森林方法的肝细胞癌分期研究[J]. 统计学与应用, 2019, 8(1): 95-107.
DOI: 10.12677/sa.2019.81011

基于网络分析和随机森林方法的肝细胞癌分期研究

李　鑫

华北电力大学，北京
Email: ymygxinxin@163.com

收稿日期：2019年1月12日；录用日期：2019年1月24日；发布日期：2019年1月31日

摘　要

肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是一种侵袭性恶性肿瘤，尽管肝细胞癌诊断技术及治疗水平有了较大的进步，但对HCC的早期诊断依然是个巨大的挑战。在本文中，我们试图通过基因网络分析与临床分期相关的核心基因，用于对早期HCC患者的发现提供信息和提高HCC诊断技术及治疗水平。首先，我们选用GEO数据库中包含219例早期术后HCC患者的基因表达数据，进行差异表达分析，并且将数据随机分为训练集与测试集，其中训练集采用加权基因共表达网络(WGCNA)分析聚类出五个模块，对各基因模块进行功能富集和通路富集分析，我们发现其中blue模块与细胞增殖、分裂、周期以及DNA复制启动、复制、修复等生物过程相关，与细胞周期、P53信号通路、HTLV-I感染、乙型肝炎等通路相关，这些过程和通路均与HCC的发生发展密切相关。因此，选取模块的富集基因进行PPI网络分析，选取连通度较大的10个核心基因BUB1B、CCNA2、CCNB1、CCNB2、CDC20、MAD2L1、MCM4、PCNA、RFC4、TOP2A，通过随机森林对核心基因进行监督学习，建立BCLC分期的分类模型，然后应用于测试集，研究发现该方法对于BCLC早期患者的分类有很大程度的帮助，正确率达到95.52%，但是对于患者的中后期分类效果不是很理想。该研究提高了对HCC的发病机制和分期研究的认识，为HCC靶向治疗提供了新的方向。

关键词

肝细胞癌，加权基因共表达网络分析，PPI网络，随机森林

1. 引言

肝细胞癌(HCC)是全球最常见的恶性肿瘤，占所有癌症病例的5%以上，是全球癌症死亡的第五大原因[1] [2]。在发展中国家最为普遍，其发病率呈上升趋势，具有术后转移和复发的比例较高，长期生存率较低的特点[3]。全世界几乎 80%的 HCC 病例都存在由慢性肝炎、炎症和纤维化引起的肝硬化等致癌性损伤[4]。纤维化和肝硬化的其他病因因素如遗传性血色素沉着症或非酒精性脂肪肝疾病也对 HCC 的发展有潜在影响[5] [6]。由于在 HCC 早期阶段缺乏症状和疾病的快速进展，大约 80%的 HCC 患者被诊断为晚期疾病[7]。一般来说，肝切除和原位肝移植被认为是 HCC 的唯一治疗方法，当肿瘤负荷无法通过

手术切除时，HCC 的预后较差[8]。尽管在过去几十年中做出了重大努力，但是干扰 HCC 进展的治疗选择非常有限，并且需要用于有效治疗的新型治疗策略。

由于近年基因组学、转录组学以及测序技术的蓬勃发展，加权基因共表达网络(Weighted Gene Co-expression Network Analysis, WGCNA)正逐渐在生物学研究领域拓展其应用面，目前该方法已成功应用于癌症相关研究。在前列腺癌中来应用该方法构建 mRNA 和 microRNA 表达网络[9]；该方法鉴定出 ASPM 基因为胶质母细胞瘤的新型分子生物标志物[10]，还用来构建了神经胶质瘤的促细胞分化和发芽信号相关的共表达网络[11]。分期系统一方面可以评估病人的预后从而选择正确的治疗方法，另一方面，它也是比较不同治疗试验的重要工具，恶性肿瘤的分期是选择和改善治疗方法的基础。好的分期系统须具备简单、应用方便、可重复性好，并且能够提供可靠的疾病自然病史的信息和根据不同的治疗组分类等特点。但是目前，各地不同的分期系统中，尚没有一个分期系统被一致认为是最完善的。本文借助基因表达数据，应用该方法与 PPI 网络结合筛选出核心基因，希望通过借助癌症发展的重要过程分析出与分期相关的特征基因，借助随机森林模型建立分类模型，深入学习癌症患者分期过程的分子学研究。

2. 材料与方法

2.1. 数据介绍

微阵列数据在 Gene Expression Omnibus (GEO; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)上公开获得登录号 GSE14520 的肝癌数据。其中我们选取在 96 HT HG-U133A 2.0 微阵列平台上进行处理过的 221 例肿瘤样本以及 220 例正常样本。去掉缺失临床信息的患者后剩余 219 例肿瘤样本。临床信息包括性别(Gender)、年龄(Age)、HBV 活动状态(HBV viral status)、丙氨酸转移酶(ALT)、肿瘤大小(Main Tumor Size)、结节型(Multinodular)、肝硬化(Cirrhosis)、切除前患者的血清 AFP 水平(AFP)和 HCC 预后分期系统巴塞罗那诊所肝癌(BCLC)、癌症肝意大利计划(CLIP)及肿瘤淋巴结转移(TNM)等。其中 BCLC 分期中有 148 例早期患者，22 例中期患者，29 例进展期患者及 20 例极早期患者。数据中探针总数是 22,268 个，将基因与探针对应，其中删除 810 个单个探针对照多个基因和 1029 个无基因对照的探针，整合单个基因对应多组探针的情况中，本文选取表达量最高的作为最终基因的表达量，最终得到 12,742 个基因。

2.2. 数据预处理

初始数据通常具有冗余性、不完整性和不规范性的特点，会影响到我们对数据的直接分析，如果数据中存在噪音干扰，还会造成结果的偏差。因此，本文对数据的处理采用分位数标准化[12]来去除掉芯片之间的系统误差。差异表达基因的选取过程采用 R3.4.1 中 limma 包[13]进行分析，选取|lFC|大于 1，p 值小于 0.05 的基因进行后续研究，筛选出 927 个差异表达基因，其中有 332 个上调基因，有 595 个下调基因。

将 219 个样本随机分为训练集和测试集，其中训练集含 110 个样本，测试集含有 109 个样本，由于因加权基因共表达网络的结果容易受到离群样本影响，所以训练集和测试集均采用芯片间相关度(inter-array correlation, IAC) [14]方法来评估芯片数据的分布情况。训练集通过 WGCNA 方法[15]挖掘基因模块，将各个模块进行 GO 功能富集分析，了解各模块聚类原因，然后选取与 HCC 发展密切相关的模块，先取该模块 GO 功能富集的基因放入在线工具 string 中做 PPI 网络选取出连接度高的 10 核心基因。将这些核心基因建立随机森林模型，测试集用于测试集模型对于患者分期的分辨能力。

2.3. WGCNA 方法

加权基因共表达网络分析(Weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)是用于描述跨微阵列样品的基因之间的相关模式的系统生物学方法。网络中的每一个节点代表一个基因，如果在不同条件

下基因之间的表达存在共性，那么这两个基因在同一个基因共表达网络，或在同一个模块(module)中。下面使用 WGCNA [16]方法构建 HCC 样本中基因的共表达网络。首先，计算基因共表达的相关矩阵：

$$S_{ij}=\left|\mathrm{cor}\left(x_i,x_j\right)\right| \tag{1}$$

其中 x_i 和 x_j 分别是基因和的基因表达量。通过两个量的皮尔森系数 cor 转化为相互作用矩阵 S_{ij}。再计算基因之间的邻接系数：

$$a_{ij}=S_{ij}^{\beta} \tag{2}$$

其中，a_{ij} 表示邻接系数，即通过 β 次方的幂指数运算对每对基因的相关系数进行加权。其中 β 称之为软阈值。这种转变旨在给予强联系更多的权重，并降低预测共表达网络中弱连接的重要性，以提高共表达网络的可靠性。最后，考虑到某个基因与分析中其他所有基因之间的关系，将邻接矩阵转换为拓扑矩阵 $\Omega=\left[\omega_{ij}\right]$，矩阵中的元素如下：

$$\omega_{ij}=\left(l_{ij}+a_{ij}\right)/\left(\min\left\{k_i,k_j\right\}+1-a_{ij}\right) \tag{3}$$

其中，$l_{ij}=\sum_{\mu}a_{i\mu}a_{\mu j}$ 表示基因公共连接的节点之间邻接系数乘积的总和，$k_i=\sum_{\mu}a_{i\mu}$ 和 $k_j=\sum_{\mu}a_{\mu j}$ 分别表示基因 i、j 与各自连接节点之间邻接系数的加和。通过节点间的相异程度 $d_{ij}^{\omega}=1-\omega_{ij}$ 来衡量基因模块所具有的生物学意义，因此通过 d_{ij}^{ω} 来实现网络的构建。

2.4. 随机森林

随机森林(Random Forest)，顾名思义就是由很多随机生成的树构成的森林，由于生成树是随机的，所以是相互独立的，彼此没有关联或者依赖性。随机森林分类的基本思想[17]：第一步，利用 Bootstrap 抽样从原始训练集抽取 k 个样本，并且每个样本的样本容量均与原始训练集中相同；第二步，对 k 个样本分别建立 k 个决策树模型得到 k 种分类结果；第三步，依据 k 种分类结果对每个记录进行投票表决从而决定其最终分类。分类的正确率通过抽样过程中所形成的袋外数据(OOB)来进行预测，对每次的预测结果进行汇总便可得到错误率 OOB 估计，从而对组合分类的正确率进行评估。

随机森林中的每棵分类树都是二叉树，其生成遵循自上向下的递归分裂原则，即从根节点对训练集进行依次划分，在二叉树中根节点需包含所有的训练数据，并遵循节点不纯度最小原则分裂为左、右两节点，分别包含训练数据的一个子集，并且节点遵从相同规则继续分裂，直到满足分支停止规则停止生长。如果节点 n 上的分类数据均来自同一类别，则该节点的不纯度 $I(n)=0$。其中，不纯度度量方法为 Gini 准则[18]，即假定 $P(\omega_j)$ 为节点 n 上属于 ω_j 类样本个数占训练样本总数的频率，则 Girfi 准则表示如下：

$$I(n)=\sum_{i\neq j}P(\omega_i)P(\omega_j)=1-\sum_j P^2(\omega_j) \tag{4}$$

3. 统计分析

3.1. WGCNA 分析

因加权基因共表达网络的结果对离群样本敏感，应去除其中的离群样本，因此本文采用了芯片间相关性(inter-array correlation, IAC) [14]方法来评估芯片数据分布情况。其中，具有低平均 IAC 值或者无法在树形图上聚类的样本为离群样本。IAC 方法：第一步，计算出每个芯片的平均芯片间相关性标记为 A；第二步，计算出每个芯片平均芯片间相关性 A 的平均值标记为 A'；第三步，计算出所有芯片平均芯片间相关性 A 的标准差标记为 sd；第四步，根据(A-A')/sd 计算每个样本的偏倚度标记为 num。

为保证网络构建结果的可靠性，首先需要对数据源进行质量控制，包括芯片表达数据预处理和异常样本的去除。借助 IAC 方法去除离群样本并根据样本聚类树高度衡量去除效果。我们经过三次上述步骤操作，见图 1，样本的聚类树高度由高于 0.6 降至低于 0.4。经处理后，训练集剩余 99 个样本，测试集剩余 92 个样本。

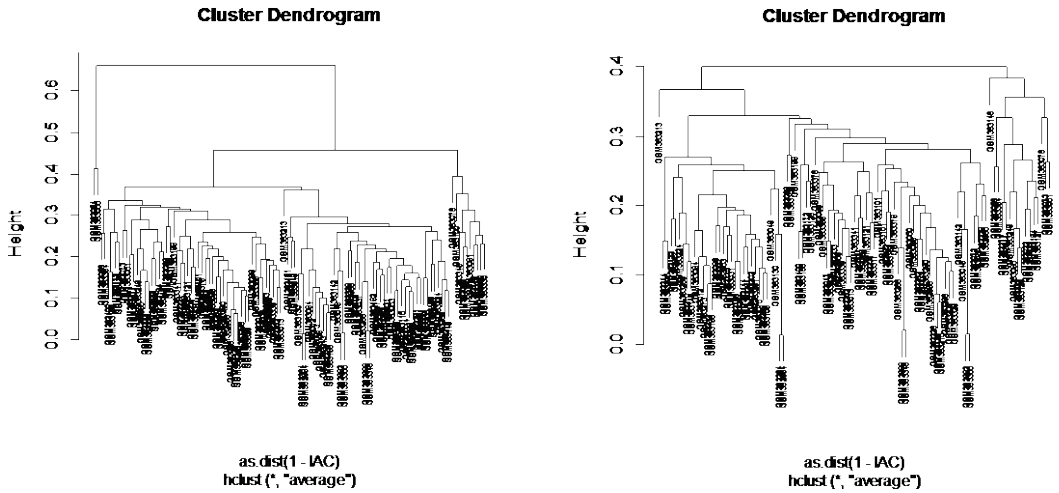


Figure 1. Training set tumor sample hierarchical clustering tree
图 1. 训练集去除离群样本前后聚类树

加权基因共表达网络需满足无尺度网络条件，定义基因共表达矩阵中的元素是基因相关系数的加权值，选择权重标准是每个基因网络中包含基因之间的连接需服从无尺度网络分布(scale-free networks) [16]，即连接数为 i 的概率 p(i)与 i 的 r 次方成反比，即 $p(i)\sim i^{-r}$。研究选择合适的加权系数逼近无尺度网络分布，使得连接数 i 的节点对数值(log(i))与此节点出现概率的对数值(log(p(i)))呈负相关，相关系数至少应达到 0.8，在不同模块中基因的平均连接度较高才使得检测的模块更有意义。

接下来，我们选择适当的加权参数 P，以便对邻接矩阵加权后使之符合无尺度网络标准。经过计算，在不同的软阈值情况下，绘制节点连接度的对数 log(i)与该节点出现的概率的对数 log(p(i))之间的相关系数图，图 2 中左图展示了不同软阈值对应的 log(i)与 log(p(i))之间的相关系数，系数越高表示网络越符合无尺度网络分布，右图则表示不同软阈值对应基因邻接系数的均值，反映了网络的平均连接水平。我们选择 p = 5 构建基因网络，log(i)与 log(p(i))的相关系数接近 0.8。我们分析绘制了网络中节点的连接度分布图以及 log(p(i))与 log(i)的散点图，从图 3 中可以看出线性回归结果符合无尺度网络标准，其相关系数为 0.84。

我们经上述研究最终选取 p = 5，然后按照 WGCNA 算法，计算 HCC 差异表达的相关矩阵、邻接矩阵、以及拓扑矩阵，然后经聚类分析得到基因的系统聚类树。根据动态混合剪切法[19]，第一步，同样设定单个基因模块最，小基因数为 30，并选择中等程度(deep Split = 2)的分类方式构建初等网络；第二步，便求得每个基因模块的 ME，并对 ME 进行聚类，再将相似度高的 ME 所对应的基因模块进行合并，确定五个基因模块。如图 4 所示五个模块分别为 blue、brown、green、turquoise、yellow，并且模块中含有 37 到 569 个基因，23 个基因未能分配到任何基因模块中。见表 1，显示了各模块的基因数。我们采用模块内部连接度(Intramodular connectivity, IC)来描述特定的模块中的节点与模块中其他节点的关联程度，模块身份(modular membership, MM)来表示基因在相应模块中基因的重要性。图 5 中可以看出 blue 模块的 IC 与 MM 相关系数达到 0.98。

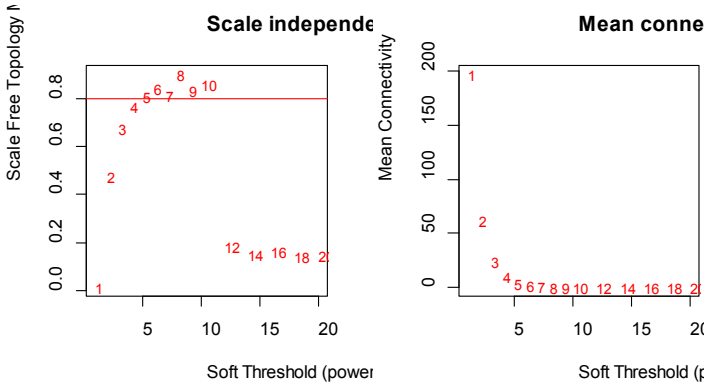


Figure 2. Determination of soft thresholds in WGCNA
图 2. WGCNA 方法中软阈值的确定

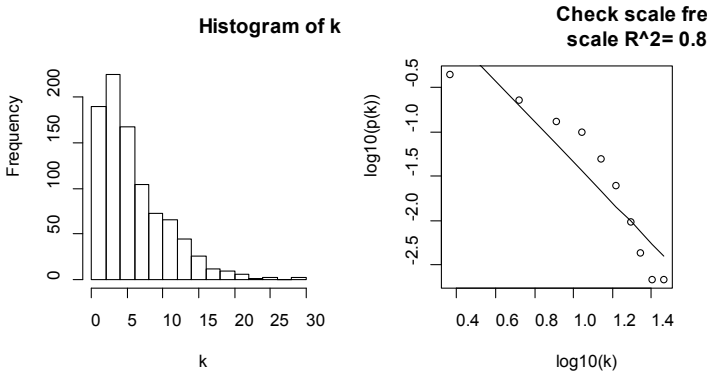


Figure 3. Scale-free network test with soft threshold power = 5 of training set
图 3. 训练集软阈值为 5 时无尺度网络检验

Table 1. Training set clustering module and the number of genes in the corresponding module
表 1. 训练集聚类模块及相应模块中的基因个数

Module	blue	brown	green	turquoise	yellow	grew
Number	168	67	37	569	63	23

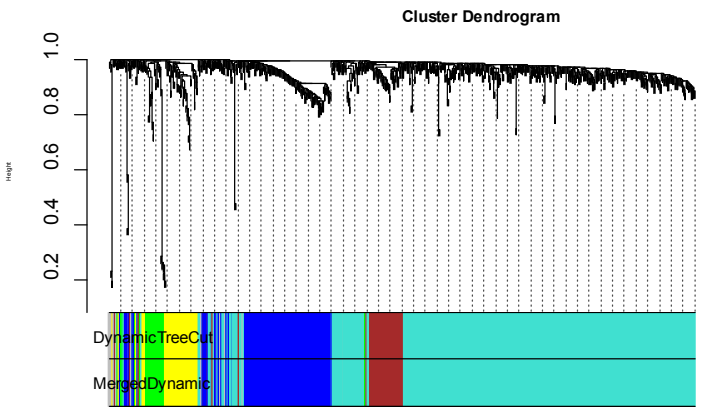


Figure 4. Initial and final modules derived from dynamic shearing with the WGCNA method
图 4. 训练集样本聚类树及初始划分、合并模块图

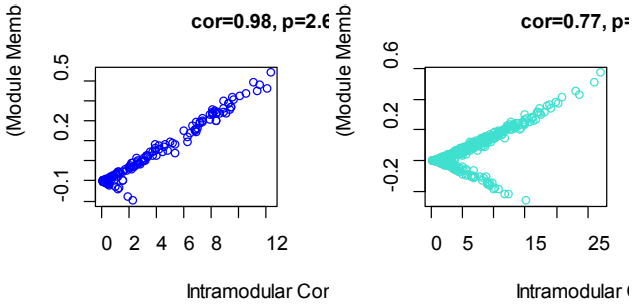


Figure 5. MM and IC relationship diagram between training set blue module and turquoise module
图 5. 训练集 blue 模块和 turquoise 模块中 MM 与 IC 关系图

3.2. 基因模块的功能富集分析及通路分析

我们将每个模块的基因放入在线工具 DAVID [20] (https://david.ncifcrf.gov/)进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，以及相应的可视化分析。在五个模块富集结果中，我们发现 blue 模块中的基因参与了细胞周期、细胞分裂、细胞凋亡、以及 p53 信号通路等众多与癌症的发生发展的重要过程中。因此，为了深入了解 HCC 的分期发展，我们接下来对该模块的核心基因进行深入的研究分析。

首先，在 GO 术语富集过程中，blue 模块基因分别富集到基因执行的分子功能(Molecular Function)、基因所处的细胞组分(Cellular Component)、基因参与的生物学过程(Biological Process)三大基因注释中，如图 6 所示。其中功能富集结果见表 2 显示，blue 模块中的基因被富集到细胞分裂、有丝分裂核分裂、有丝分裂细胞周期的 G1/S 转换及 G2/M 转换、细胞增殖、姐妹染色单体凝聚力、DNA 复制启动、DNA 复制、DNA 修复、对药物的反应、蛋白质 SUMO 化等重要的生物过程，如图 7 所示，左图展示的相应 GO 功能下基因的富集图，红点对应上调基因，蓝点对应下调基因，可以看出 blue 模块中的大部分基因为上调基因。右图为部分 blue 模块 GO 术语的 ID 号及对应的生物含义。

Blue 模块基因参与到了细胞周期、卵母细胞减数分裂、p53 信号通路、DNA 复制、RNA 转运、嘧啶代谢、错配修复、核苷酸切除修复等重要信号通路，见表 3。

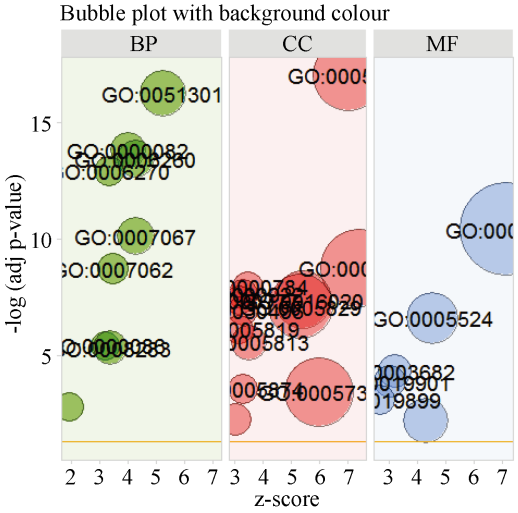
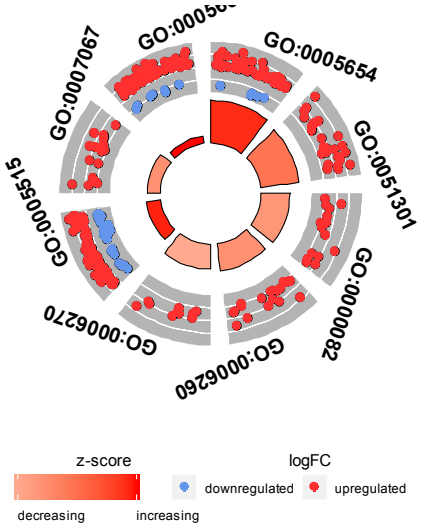


Figure 6. Three major functions of GO terminology for gene clustering in the blue module
图 6. Blue 模块中基因聚类的 GO 术语三大功能



ID	Description
GO:000	nucleoplasm
GO:005	cell division
GO:000	G1/S transition of
GO:000	DNA replication
GO:000	DNA replication in
GO:000	protein binding
GO:000	mitotic nuclear divi
GO:000	nucleus

Figure 7. Some GO function enrichment in the blue module and the gene up and down display in the corresponding process
图 7. Blue 模块中部分 GO 功能富集及对应过程中基因上、下调展示

Table 2. Some related processes of the blue module in GO function enrichment
表 2. GO 功能分析 blue 模块基因富集的相关生物学过程

ID	Term	Count	P Value
GO:0051301	cell division	27	5.40E−17
GO:0006260	DNA replication	18	3.56E−14
GO:0007067	mitotic nuclear division	18	7.39E−11
GO:0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle	16	1.47E−14
GO:0008283	cell proliferation	15	4.84E−06
GO:0007062	sister chromatid cohesion	12	1.84E−09
GO:0006270	DNA replication initiation	11	1.22E−13
GO:0000086	G2/M transition of mitotic cell cycle	10	3.65E−06
GO:0042493	response to drug	10	1.58E−03

Table 3. Some related paths of the blue module in the Kegg path enrichment process
表 3. KEGG 通路分析 blue 模块基因富集的相关通路

ID	Term	Count	P Value
hsa04110	Cell cycle	20	9.32E−17
hsa03030	DNA replication	12	1.35E−13
hsa00240	Pyrimidine metabolism	7	1.31E−03
hsa03430	Mismatch repair	4	2.32E−03
hsa03013	RNA transport	8	3.87E−03
hsa04115	p53 signaling pathway	5	7.68E−03
hsa05166	HTLV-I infection	9	9.89E−03
hsa03420	Nucleotide excision repair	4	1.74E−02
hsa05161	Hepatitis B	6	2.72E−02
hsa04114	Oocyte meiosis	5	3.86E−02

3.3. PPI 网络分析和 Cytoscape 可视化分析

我们选取 GO 功能富集中且的生物过程的基因。通过在线工具 STRING (https://string-db.org/)将得到的 100 个基因进行 PPI 网络[21]分析，通过 Cytoscape 工具[22]将网络可视化，选取连通度较大的前 10 个核心基因，进行深入学习。见表 4，展示了所选的核心基因的相关连通度等信息。

Table 4. Inter-gene connectivity in the PPI network analyzed by the Cytoscape tool
表 4. Cytoscape 工具分析出的 PPI 网络中基因间的连通度

Name	Betweenness Centrality	Closeness Centrality	Clustering Coefficient	Degree
CCNB1	0.015	0.910	0.699	73
TOP2A	0.041	0.910	0.686	73
RFC4	0.019	0.900	0.683	72
MAD2L1	0.012	0.880	0.733	70
PCNA	0.027	0.880	0.680	70
CCNB2	0.010	0.862	0.752	68
CCNA2	0.007	0.853	0.776	67
MCM4	0.006	0.835	0.795	65
CDC20	0.006	0.835	0.795	65
BUB1B	0.005	0.835	0.801	65

3.4. 随机森林对核心基因监督学习

我们通过网络分析得到重要模块基因的子集是相关的并且与癌症相关，但是构成该子集的基因对于癌症的重要性以及对于分期的作用是未知的，需要通过机器学习方法来发现和选择。随机森林分类算法本身可以对基因的重要性进行排序。我们将所选取的 10 个核心基因建立随机森林分类模型，通过对训练集的深度学习建立模型，然后通过测试集对模型进行检验。

我们分别绘制了基于 OOB 数据的模型误判率散点图以及相关误差与随机森林中决策树数量的关系图，如图 8，在构造随机森林模型过程中，从散点图中可以看出，当 mtry = 6 时，其误判率较低，从而我们可以再进一步的确定应该使用的决策树数量。在右图中看出，当模型中决策树的数量小于 400 时，模型误差出现较大的波动，当决策树的数量大于 400 时，模型误差趋于稳定。所以我们可以将模型中的决策树数量大致确定为 400 左右来达到最优模型。我们还绘制出了随机森林模型中每棵树的节点个数柱形图，如图 9 所示，可以看出在构建的随机森林模型中，最小的决策树有 12 个节点，最大的决策树有 26 个节点，树之间的节点个数有所差异。

在随机森林分类问题中，randomForest 包中提供了两个计算变量重要性的指标，一个为基于 OOB，计算预测误差率的指标 MeanDecreaseAccuracy，并且通过 OOB 数据进行验证，它在特征选择方面的可信度较高。另一个则是基于样本拟合的模型计算 Gini 系数的指标 MeanDecreaseGini，在建立模型的过程中，通过计算每个变量在分叉节点不纯度的减少量之和来衡量变量重要性。从图 10 中可以看出基因中的细胞周期蛋白 A2 (CCNA2)和细胞周期蛋白 B1 (CCNB1)等变量较为重要，经研究发现这两个基因均参与到了免疫应答和细胞周期过程，并且在正常癌旁组织中和癌症中存在着不同的功能激活和抑制转换机制[23]。

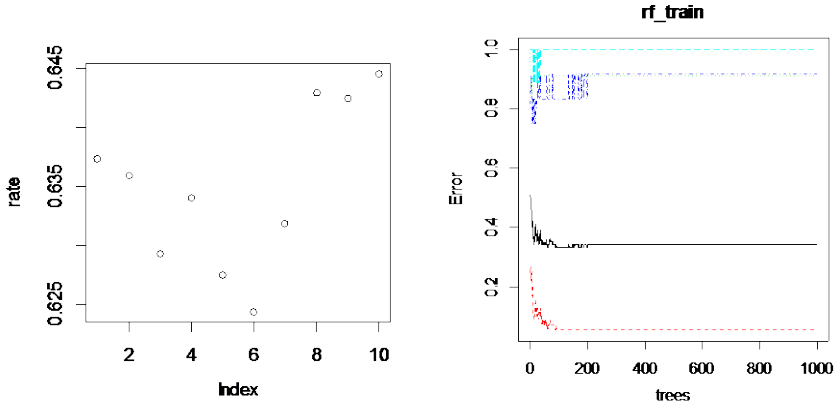


Figure 8. Relationship between false positive rate scatter plot and related errors and the number of decision trees in random forests
图 8. 误判率散点图和相关误差与随机森林中决策树数量的关系图

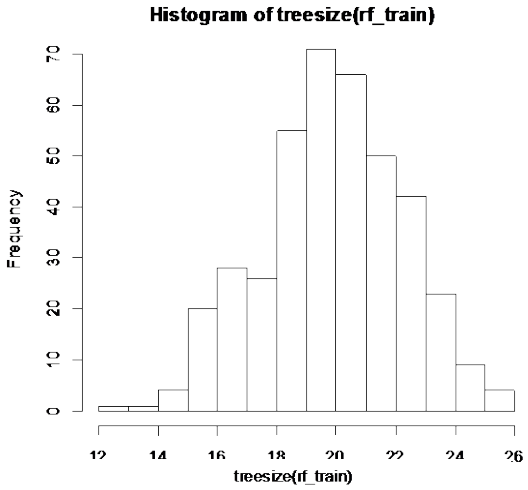


Figure 9. Column number of nodes
图 9. 节点数柱状图

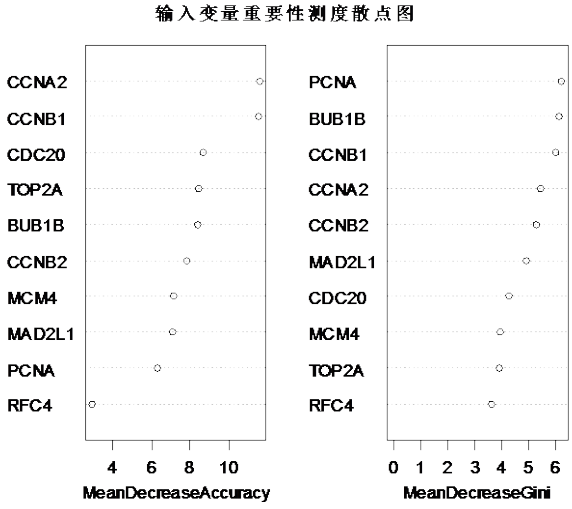


Figure 10. Random forest variable importance measure scatter plot
图 10. 随机森林变量重要性测度散点图

Table 5. Classification results of training set and test set
表 5. 训练集与测试集的分类结果

训练集(99 例)					
Real/Pred	A	B	C	0	Class.error
A	64	3	0	0	0.0448
B	11	1	0	0	0.9167
C	9	0	0	0	0.9090
0	10	0	0	1	1.0000
测试集(92 例)					
Real/Pred	A	B	C	0	Class.error
A	65	2	0	0	A
B	6	0	0	0	B
C	11	0	0	0	C
0	8	0	0	0	0

通过训练集建立模型，并对测试集进行预测，见表 5，展示了预测结果同训练集和测试集实际结果之间的差别情况。列为数据真实的分期状况，行为预测的分期情况，可以看出训练集中处于 A 期真实有 67 例患者，预测正确的有 64 例，3 例被预测为 B 期，预测的准确率高达 95.52%；测试集处于 A 期的有 67 例患者，其中 65 例预测准确，2 例被预测为 B 期患者，准确率高达 97.01%。但是对于无分期患者以及中晚期的患者的分类效果不佳。最终得出随机森林分类率为 70.65%。

4. 结论

本文主要研究了肝细胞癌的分期，旨在通过基因研究对 HCC 患者 BCLC 分期有进一步的了解，可以通过核心基因方向对于 HCC 患者的 BCLC 分期能够更为准确，从而对 BCLC 分期产生积极的推动作用。

本文建立了对 BCLC 分期的分类模型。首先借助 WGCNA 方法对差异表达基因进行聚类分析得出五个模块，经过对每个模块进行了富集分析后，发现 blue 模块中的基因参与了众多癌症发生发展过程。随后结合 PPI 网络，筛选出该模块中前十个核心基因，通过这是个随机变量建立随机森林分类模型，结果发现这是个基因对于 BCLC 分期早期患者的分类效果极佳，正确率达到 95.52%，对于中晚期患者的分类效果不明显。

本文选出的十个模块的核心基因分别为 CCNB1、TOP2A、RFC4、MAD2L1、PCNA、CCNB2、CCNA2、MCM4、CDC20、BUB1B。这些基因参与到细胞分裂、有丝分裂核分裂、有丝分裂细胞周期的 G1/S 转换及 G2/M 转换、细胞增殖、姐妹染色单体凝聚力、DNA 复制启动、DNA 复制、DNA 修复、对药物的反应、蛋白质 SUMO 化等重要的生物过程以及细胞周期、卵母细胞减数分裂、p53 信号通路、DNA 复制、RNA 转运、嘧啶代谢、错配修复、核苷酸切除修复等重要信号通路。我们将这些基因放入 GO 注释以及通路中，了解其对 HCC 的预后作用。我们的讨论如下：

1) 这些基因均参与到了 GO:0000278 注释有丝分裂细胞周期(mitotic cell cycle)的功能中，其中 MCM4、PCNA、RFC4、TOP2A 四个基因参与到了 DNA 复制(DNA replication)过程，细胞周期中，当 DNA 复制启动蛋白异常高表达，必然导致细胞快速完成的 DNA 复制，使得细胞进入高度增殖状态，例如：增生细胞核抗原(PCNA)基因的表达与诸多肿瘤的恶性程度、浸润、转移密切相关，PCNA 蛋白的表达与肝脏肿瘤的恶性行为也存在密切联系[24]；研究表明，TOP2A 蛋白表达水平与组织学分级、肿瘤大小、分子分型均具有相关性[25]。BUB1B、CCNA2、CCNB2 三个基因参与到了有丝分裂(Mitosis)过程，

癌症的形成过程中多种基因相互作用，恶性肿瘤均表现出增殖的活跃，所以 HCC 也不例外，因此使得涉及到细胞增生分裂的有丝分裂过程在肿瘤的生长进程中也格外重要。

2) 这些筛选的核心基因富集到了细胞周期、卵母细胞减数分裂、p53 信号通路、DNA 复制这些相关通路中。其中 CCNB1 和 CCNB2 均在 p53 信号通路中，这些蛋白质的调剂严重影响着细胞周期 G2 停滞(Cell cycle G2 arrest)。彭绍华等[26]研究表明细胞周期蛋白在肝细胞癌组织中呈不同程度的高表达，使得细胞周期缩短，癌细胞增生活跃，细胞凋亡减少，恶性表型增加。

致　谢

在此向悉心指导我的导师张娟老师献上诚挚的谢意！在文章撰写的过程中，张老师给予我细心的指导和支持，培养了我解决问题的能力和克服困难的毅力，同时，老师严肃的科学态度和严谨的治学精神深深的感染着我，让我更加认真的对待科研和学习，也让我明白在未来的生活和工作中明白做任何事情都要认认真真，循序渐进！

参考文献

[1] El-Serag, H.B. and Rudolph, K.L. (2007) Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, **132**, 2557-2576. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061

[2] Mikulits, W. (2018) Epithelial to Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. *Future Oncology*, **5**, 1169.

[3] 李保国. 肝细胞癌预后相关细胞分子生物标志物研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2015, 42(5): 395-398.

[4] Kensler, T.W., Qian, G.S., Chen, J.G., *et al.* (2003) Translational Strategies for Cancer Prevention in Liver. *Nature Reviews Cancer*, **3**, 321-329. https://doi.org/10.1038/nrc1076

[5] Jou, J., Choi, S.S. and Diehl, A.M. (2008) Mechanisms of Disease Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*, **28**, 370-379. https://doi.org/10.1055/s-0028-1091981

[6] Wallace, D.F. and Subramaniam, V.N. (2009) Co-Factors in Liver Disease: The Role of HFE-Related Hereditary Hemochromatosis and Iron. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*)/*General Subjects*, **1790**, 663-670. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.09.002

[7] Sun, V. and Sarna, L. (2008) Symptom Management in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, **12**, 759-766. https://doi.org/10.1188/08.CJON.759-766

[8] Tanaka, S. and Arii, S. (2010) Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, **48**, 1312-1327.

[9] Wang, L., Tang, H., Thayanithy, V., *et al.* (2009) Gene Networks and microRNAs Implicated in Aggressive Prostate Cancer. *Cancer Research*, **69**, 9490-9497. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2183

[10] Horvath, S., Zhang, B., Carlson, M., *et al.* (2006) Analysis of Oncogenic Signaling Networks in Glioblastoma Identifies ASPM as a Molecular Target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 17402-17407. https://doi.org/10.1073/pnas.0608396103

[11] Ivliev, A.E., 't Hoen, P.A.C. and Sergeeva, M.G. (2010) Coexpression Network Analysis Identifies Transcriptional Modules Related to Proastrocytic Differentiation and Sprouty Signaling in Glioma. *Cancer Research*, **70**, 10060-10070. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2465

[12] Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Åstrand, M., *et al*. (2003) A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Variance and Bias. *Bioinformatics*, **19**, 185-193. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.2.185

[13] Smyth, G.K. (2005) Limma: Linear Models for Microarray Data. *Bioinformatics & Computational Biology Solutions Using R & Bioconductor*, 397-420.

[14] 王攀. 加权基因共表达网络分析(WGCNA)在食管鳞癌中的应用[D]: [博士学位论文]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院; 北京协和医学院; 中国医学科学院; 清华大学医学部, 2014.

[15] Langfelder, P. and Horvath, S. (2008) WGCNA: An R package for Weighted Correlation Network Analysis. *BMC Bioinformatics*, **9**, 559. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559

[16] 宋长新, 雷萍, 王婷. 基于 WGCNA 算法的基因共表达网络构建理论及其 R 软件实现[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(1): 135-141.

[17] Kandaswamy, K.K., Chou, K.C., Martinetz, T., *et al*. (2011) AFP-Pred: A Random Forest Approach for Predicting An-

tifreeze Proteins from Sequence-Derived Properties. *Journal of Theoretical Biology*, **270**, 56-62. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.10.037

[18] 武晓岩, 李康. 随机森林方法在基因表达数据分析中的应用及研究进展[J]. 中国卫生统计, 2009, 26(4): 437-440.

[19] Langfelder, P., Zhang, B. and Horvath, S. (2008) Defining Clusters from a Hierarchical Cluster Tree: The Dynamic Tree Cut Package for R. *Bioinformatics*, **24**, 719-720. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm563

[20] Marr, D. (1982) Vision: A Computational Investigation into the Human Representation and Processing of Visual Information. *Quarterly Review of Biology*, **8**.

[21] 李敏, 陈建二, 王建新. 基于复杂网络理论的 PPI 网络拓扑分析[J]. 计算机工程与应用, 2008, 44(8): 20-22.

[22] Saito, R., Smoot, M.E., Ono, K., *et al*. (2012) A Travel Guide to Cytoscape Plugins. *Nature Methods*, **9**, 1069-1076. https://doi.org/10.1038/nmeth.2212

[23] 周慧蕾. CCNB1 和 CCNA2 在人类正常邻近组织和肺癌中不同功能激活及抑制转换机制与网络构建[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京邮电大学, 2015.

[24] 李立人, 施公胜, 孙超. PCNA 和 VEGF 在肝细胞肝癌中的表达意义[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(4): 560-561.

[25] 华骁帆. 早期非特殊性浸润性乳腺癌 TOP2a 蛋白表达与分级、分期及分子分型相关性分析[D]: [硕士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2016.

[26] 彭绍华, 杨剑锋, 谢平平, 等. 细胞周期蛋白在肝细胞癌组织中的表达及其与肿瘤细胞凋亡的关系[J]. 癌症, 2005, 24(6): 695-698.