

本文引文格式:农琛,刘德文,赖凤明,等.铜死亡相关性 lncRNA 在甲状腺癌中的表达模式
以及预后价值[J].右江民族医学院学报,2023,45(3):384-395.

【论著与临床报道】

铜死亡相关性 lncRNA 在甲状腺癌 中的表达模式以及预后价值

农琛¹,刘德文¹,赖凤明¹,唐玉莲²,王太重²

- (1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 探索与铜死亡相关的 lncRNA 在甲状腺癌 (thyroid carcinoma, THCA) 中的表达模式及预后价值。方法 基于 TCGA 数据集,通过共表达获得相关的 lncRNA。将 THCA 患者随机分成训练集和验证集,基于 Cox 和 LASSO 回归分析确定预后关键基因,采用验证集和整个队列对独立预后基因进行验证,同时通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 验证关键基因在 THCA 中的表达情况。最后对风险模型进行富集分析、肿瘤微环境分析、免疫相关性分析以及药物敏感性分析。**结果** 12 个铜死亡基因通过共表达获得 1 270 个相关的 lncRNA。在 16 个与铜死亡预后相关的基因中, TMEM220-AS1、LINC01711 和 AC003086.1 被确定为关键基因。风险评分在训练集和整个队列中均展示出良好的预测性能,并且 qPCR 结果与生信结果一致。高低风险组的患者在生物学功能、免疫细胞浸润程度以及免疫检查点均存在明显的不同。此外,风险评分与 THCA 的药物敏感性显著相关。**结论** 本研究证明了铜死亡相关性 lncRNA 在 THCA 中存在显著差异表达,并且 3 个关键的 lncRNA 在预测 THCA 的预后和生存方面具有一定价值。

关键词: 甲状腺肿瘤;铜死亡;lncRNA;预后标志物;免疫检查点

中图分类号:R736.1 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2023)03-0384-12

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.03.004

Expression pattern and prognostic value of cuproptosis-related lncRNAs in thyroid carcinoma

Nong Chen¹, Liu Dewen¹, Lai Fengming¹, Tang Yulian², Wang Taizhong²

- (1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression pattern and prognostic value of cuproptosis-related long non-coding RNAs (lncRNAs) in thyroid carcinoma (THCA). **Methods** Based on the TCGA dataset, the related lncRNAs were obtained by co-expression. The patients with THCA were randomly divided into a training set and a validation set. The key prognostic genes were identified using Cox and LASSO regression analyses, and the independent prognostic genes were validated in the validation sets and the entire cohort. Real-time quantitative fluorescence polymerase chain reaction (qPCR) was performed to validate the expression of key genes in THCA. Additionally, enrichment analysis, tumor microenvironment analysis, immune correlation analysis, and drug sensitivity analysis were conducted for the risk model. **Results** 12 cuproptosis genes obtained a total of 1,270 related lncRNAs through co-expression. Among the 16 genes related to the prognosis of

基金项目:广西自然科学基金项目(2019JJB140028)

第一作者简介:农琛(1995-),男,在读硕士研究生,研究方向:地中海贫血分子生物学诊断,E-mail:948187066@qq.com

通讯作者简介:王太重(1964-),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:生物化学与分子生物学检验相关研究,E-mail:2361653538@qq.com

cuproptosis, TMEM220-AS1, LINC01711, and AC003086.1 were identified as key genes. The risk score showed good predictive performance in the training set and the entire cohort, and the qPCR results were consistent with the bioinformatics analysis results. Significant differences were observed in biological function, degree of immune cell infiltration, and immune checkpoints between patients in the high-risk and low-risk groups. Moreover, the risk scores were significantly correlated with drug susceptibility in THCA. **Conclusion**

This study demonstrates significant differential expression of cuproptosis-related lncRNAs in THCA, and the three key lncRNAs are of certain value as prognostic markers for predicting the prognosis and survival of THCA.

Key words: thyroid tumor; cuproptosis; lncRNA; prognostic markers; immune checkpoint

甲状腺癌(thyroid carcinoma, THCA)好发于女性,在女性常见的恶性肿瘤中排名第五位^[1-2],同时它也是全球最常见的内分泌癌^[3]。该病主要分为 4 种类型,包括未分化的 THCA(ATC, 小于 2%),髓样癌(MTC, 小于 2%),滤泡癌(FTC, 10%~15%)以及状癌(PTC, 80%~85%)^[4]。它通常的临床表现为颈部肿块,通过对食道和器官的占据作用而导致吞咽困难,发音困难以及呼吸困难等^[5-6]。尽管前期的研究发现 THCA 死亡率相对较低,但近几十年来,THCA 的发病率一直稳步上升,平均每年上升约 3.4%,对于一些国家来说,THCA 是增长最快的恶性肿瘤^[7]。随着免疫治疗的不断发展,免疫检查点抑制剂已经成为多种恶性肿瘤的一线治疗药物,大多数医疗机构都已经将免疫疗法归入常规抗癌治疗的行列中^[8-9]。特别是用于 CTLA-4 和 PD-1 治疗的免疫检查点阻滞剂(ICBS)已成为 THCA 的二线治疗药物^[10-11]。然而肿瘤与免疫的关系错综复杂,对免疫治疗应答或抵抗的评估仍然是一项艰巨任务,探寻潜在的生物标志物将有助于改善患者预后不良的状况,减少经济上的负担。

铜是人体必须的微量元素,也是酶辅助因子,同时也可以通过多种途径抑制肿瘤的发生,但如果体内铜的稳态失衡,也会导致细胞死亡^[12-14]。有研究认为铜死亡是通过铜离子与线粒体呼吸中三羧酸循环的脂酰化组分的直接结合而发生,导致脂酰化蛋白质的聚集,它们可以诱导蛋白质毒性应激反应并最终导致死亡^[15]。近期多项研究表明铜死亡相关基因在肺腺癌^[16]、透明细胞肾细胞癌^[17]以及肝癌^[18]等恶性肿瘤中均具有显著的作用,铜在抗肿瘤治疗中对细胞凋亡具有天然抵抗力。据报道^[19-21],长度仅为 200 个核苷酸的长链非编码 RNA(lncRNA)可以通过基因的转录和转录后修饰在癌变和癌症转移中起到重要的作用。然而,目前关于铜死亡相关性 lncRNA 与 THCA 患者的预后研究还是很少。因此,本研究旨在探索铜死亡相关性 lncRNA 的表达模式,并评估他们在 THCA 中的预后价值。

在这项研究中,利用癌症基因组图谱(TCGA)数

据集的转录组数据系统性地对参与 THCA 修饰的铜死亡相关性 lncRNA 进行评估,并开发了 lncRNA 特征性预后模型。为更准确地预测 THCA 患者的预后、细化风险分层、指导治疗决策,该风险模型的预测性能能够在内部验证集以及整体队列中被成功验证。随后,基于 THCA 患者的高低风险评分进行分类,深入分析了免疫评分和免疫细胞浸润之间的关系,进一步探讨铜死亡相关性 lncRNA 在肿瘤免疫微环境中的作用,以期临床专家制定个性化免疫治疗方案提供策略。

1 材料与方法

1.1 基因组数据和临床信息的下载 本次研究于 2022 年 7 月 2 日从 The Cancer Genome Atlas(TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载 THCA 患者的测序转录组数据、相应的临床信息以及突变数据。相关的临床补充数据从 UCSC Xena 进行下载(<https://xena.ucsc.edu/>),其中包括生存时间、生存状态、年龄、性别、肿瘤的分级和分期等信息。此外,根据已经发表的文献获得了与铜死亡相关的基因^[22],其中包括 FDX1、LIPT1、DLD、LIAS、DLAT、PDHA1、PDHB、MTF1、GLS、CDKN2A、SLC31A1 和 ATP7B。

1.2 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 检测 THCA 组织 本项目经过右江民族医学院附属医院医学伦理委员会同意并实施,伦理审查号为 YYFY-LL-2022-89。以下实验均严格按照说明书进行。使用 Trizol 法从 10 个 THCA 标本和癌旁组织中提取总 RNA。用微量紫外分光光度计(TGEM Plus)检查总 RNA 浓度和纯度。然后,使用 RevertAid™ Master Mix (Thermo Fisher, M16315)试剂将标本逆转录成 cDNA,在 LightCycler96 仪器上使用 Hieff™ qPCR SYBR Green Master Mix (Yeasen, 11201ES08)对铜死亡修饰的关键调控基因进行 qPCR 分析。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行数据分析,以 GAPDH 为内参,将基因表达量归一化处理。本研究使用的引物均从生工生物工程(上海)股份有限公司处设计并购买,引物的具体序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
TMEM220-AS1	CTTCACTCGCTGGCTGTAGG	GGCCACACTTGCACCATATC
LINC01711	AGGTCAGGCCATACCCA	CCAGCCATCAGGTTCTGT
AC003086.1	ACCCGCTTGGTGCTCTGAATTAAG	TTGCAGGCAGCCGGTTTGTGTC

1.3 生物信息学分析 通过 R 软件中的 4 个生物信息学软件包(limma, dplyr, ggalluvial, ggplot2)筛选出 THCA 患者中与铜死亡相关的差异 lncRNA, 相关系数的过滤标准为 $|\text{Pearson } R| > 0.4$ and $P < 0.001$ 。

为了构建预后风险模型和验证其准确性, 首先将 TCGA 数据库中的 THCA 数据集以 1:1 的比列随机分为训练集和验证集, 训练集利用单变量 Cox 回归分析来评估铜死亡相关 lncRNA 与总生存(OS)之间的关系。随后, 为了避免过拟合, 进行了 LASSO 回归分析, 以消除与 glmnet 包高度相关的基因。最终, 获得 3 个关键预后基因, 并使用它们构建预后风险模型。在对模型进行准确性测试时, 使用验证集和整个队列来进行验证。将基因表达量与 LASSO 回归得到的系数相乘就能得到风险评分, 然后根据中位数将 THCA 患者分为低风险组和高危组。采用 survival 包进行 Kaplan-Meier 分析。使用 ROC 曲线以及风险曲线来检验预后模型的准确性。低危组和高危组之间的相关基因差异通过 limma 包进行评估, 并以热图显示。此外, 采用单因素 Cox 回归分析和多因素 Cox 回归分析来评估风险评分是否为独立的预后指标。使用 rms 包, 以风险评分为基础, 建立一个预后 Nomogram 模型, 预测 THCA 患者 1 年、3 年和 5 年的生存期。

为了对低风险组和高危组中不同表达的基因进

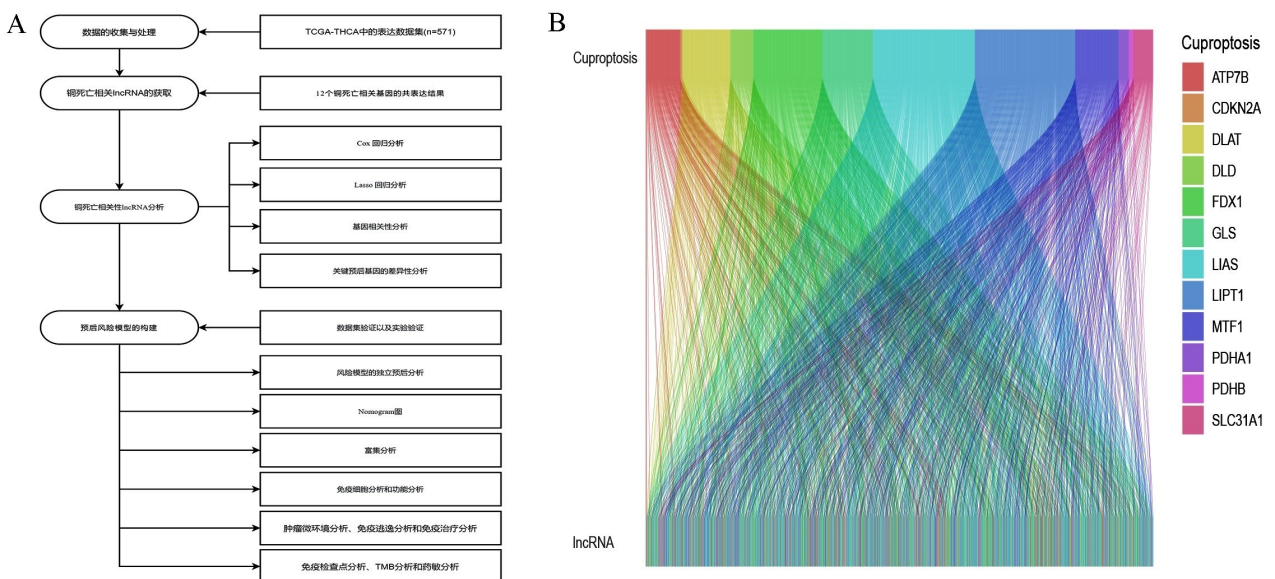
行功能注释, 进行了基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genome, KEGG)分析。

最后, 为了深入分析 Risk Score 与免疫状态相关性, 使用 gsva 包计算 16 种免疫细胞浸润得分和 13 条免疫相关通路得分。采用 maftools 包对样本的突变数据进行处理获得肿瘤组织突变负荷(Tumor Mutational Burden, TMB)评分以及可视化。采用 Wilcoxon 秩和检验对免疫检查点的基因表达情况进行分析。此外, 还使用 pROphetic 包^[23]来预测可用于治疗高风险组和低风险组 THCA 的药物的 IC50 值。

1.4 统计学方法 所有统计分析均使用 R 软件(R 4.1.2 版本, <https://www.r-project.org/>)进行。 $P < 0.05$ 为显著性阈值。

2 结果

2.1 THCA 中铜死亡相关的 lncRNA 鉴定 图 1A 显示了这项研究的流程图。本研究分析了 12 个铜死亡相关基因的 lncRNA 在 THCA 和癌旁组织中的差异表达, 基于 Pearson 分析, 获得 1 270 个与铜死亡相关的 lncRNA。Sankey 图显示了铜死亡相关基因与铜死亡相关性 lncRNA 的关系(见图 1B)。随后, 根据随机分配原则, 将具有完整信息的 504 例患者按照 1:1 分为训练组($n = 252$)和测试组($n = 252$)。

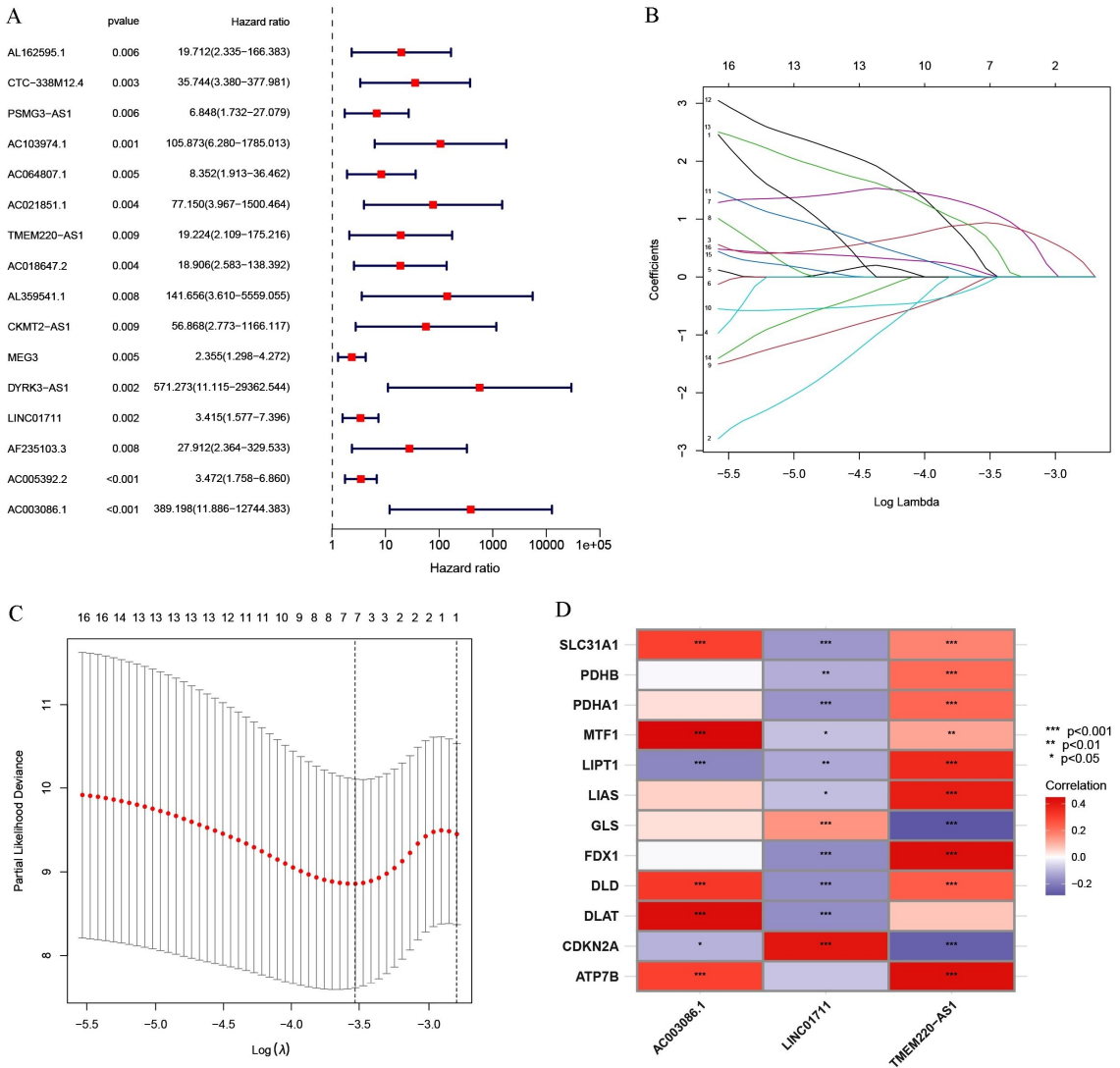


注: A. 铜死亡相关性 lncRNA 分析的全过程; B. 桑基图显示铜死亡相关基因和铜死亡相关 lncRNA 之间的关系。

图 1 铜死亡相关性 lncRNA 的获取以及流程图

2.2 基于铜死亡相关性 lncRNA 的表达水平建立预后风险模型 为了判断铜死亡相关的 lncRNA 与 THCA 患者预后的价值以及关系强度,本研究采用单因素 Cox 分析筛选出 16 个具有差异的预后相关 lncRNA,结果显示见图 2A,有 16 个 lncRNA 与 OS 显著相关($P < 0.01$),并且全部为高危基因。这 16 个 lncRNA 分别为:AL162595.1、CTC-338M12.4、PSM G3-AS1、AC103974.1、AC064807.1、AC021851.1、TMEM220-AS1、AC018647.2、AL359541.1、CKMT2-AS1、MEG3、DYRK3-AS1、LINC01711、AF235103.3、

AC005392.2、AC003086.1, $HR > 1$, 见表 2。随后,本研究使用 LASSO 回归分析来确定具有最佳建模能力的 lncRNA(见图 2B、图 2C),对交叉验证结果进行多次逐步 Cox 回归分析,最终筛选出 3 个最优 lncRNA (TMEM220-AS1、LINC01711、AC003086.1) 建立 THCA 预后风险模型。根据 3 个铜死亡相关的 lncRNA 的风险系数和基因表达量计算每个样本的风险评分,风险评分计算公式 = $(7.076 * TMEM220-AS1 \text{ 表达量}) + (2.770 * LINC01711 \text{ 表达量}) + (9.633 * AC003086.1 \text{ 表达量})$ 。



注:A. 铜死亡相关 lncRNA 的单因素 Cox 回归分析;B、C. 使用 LASSO 回归来构造风险模型;

D. 铜死亡相关基因与三个关键的 lncRNA 的关系。

图 2 基于铜死亡相关 lncRNA 的预后基因筛选

2.3 预后风险模型的性能评价 为了探讨预后风险模型的性能,根据风险评分的中位数将训练集的患者分为低风险组($n = 126$)和高危组($n = 126$)。Kaplan-Meier 生存曲线表明,与低风险评分患者相比,高风险评分患者的整体生存率更差,二者 OS 有显著差异($P < 0.05$)(见图 3A)。基于风险评分对患者的生

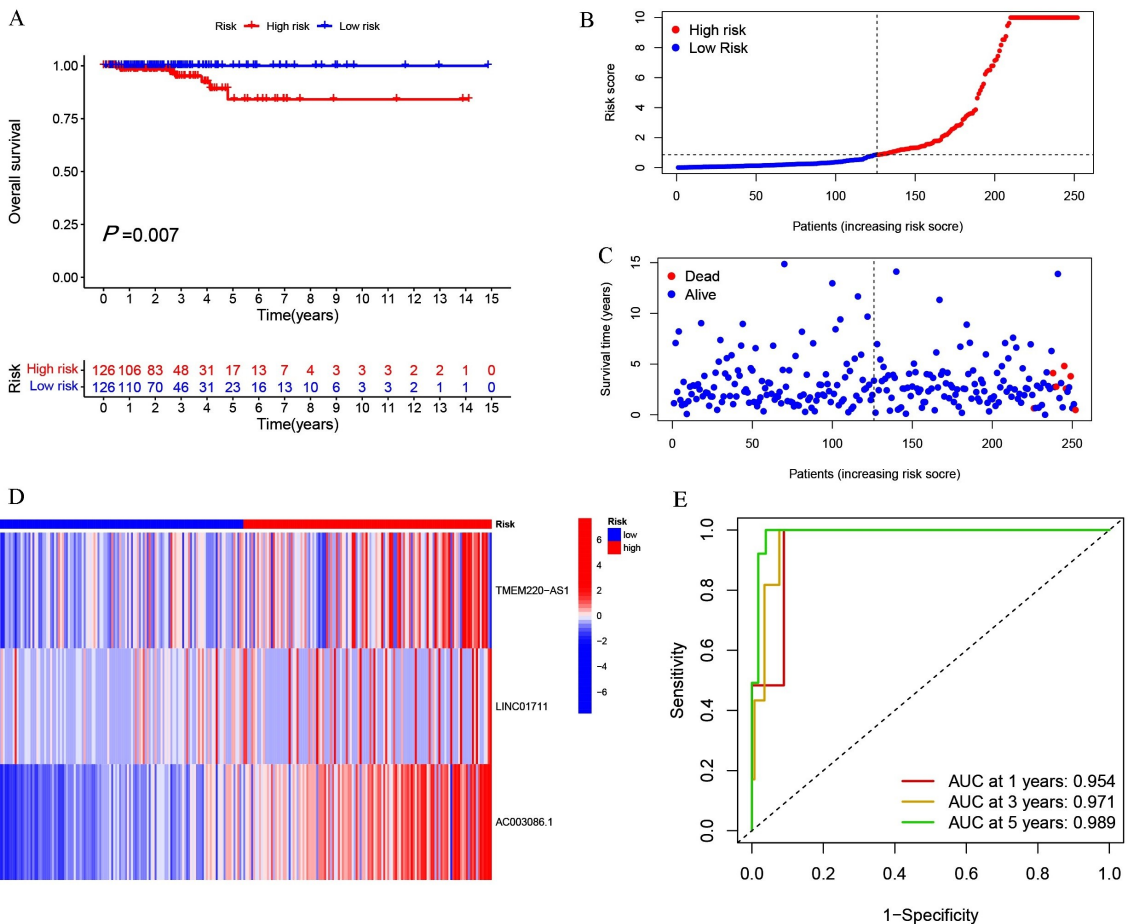
存分布情况进行分析,结果表明(见图 3B、图 3C),随着风险评分的增加,THCA 患者的生存时间逐渐缩短,死亡人数逐渐增加。并且通过热图显示(见图 3D),三个构成预后风险模型的 lncRNA 都在高风险组中高表达,具有显著差异。训练集的 1 年、3 年和 5 年 OS 的 AUC 分别为 0.954、0.971 以及 0.989(见图

3E),说明模型对 THCA 患者预后的预测能力具有较好的敏感性和特异性。同时,为了检验模型在其它数据集中的准确性,使用相同的风险模型计算公式在验证集和整个队列中进行验证,结果都取得相似的结果(见图 4A~图 4H)。此外,在基于风险模型、铜死亡相

关基因、铜死亡相关 LncRNA 和所有相关基因构成的主成分分析中(见图 4I~图 4L),可以直观地看出风险模型能够有效地将 THCA 患者分为高风险人群和低风险人群。这些结果都说明该模型的准确性良好。

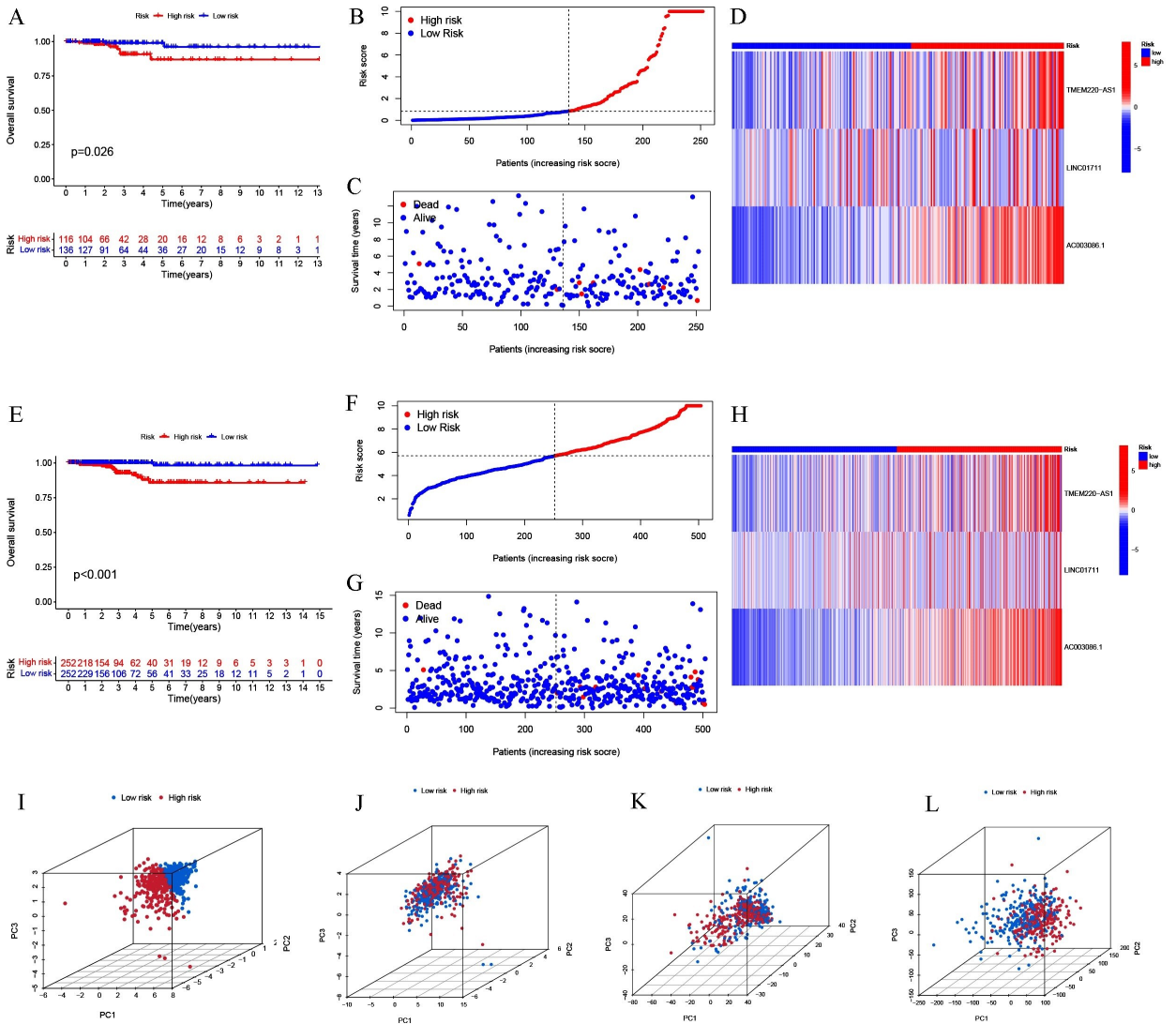
表 2 铜死亡相关 lncRNA 的单因素 Cox 回归分析

Id	HR	HR, 95L	HR, 95H	Pvalue
AL162595.1	19.71223	2.335413	166.3826	0.006157
CTC-338M12.4	35.74388	3.38013	377.981	0.002958
PSMG3-AS1	6.848435	1.73202	27.07883	0.006086
AC103974.1	105.8734	6.279608	1785.013	0.001218
AC064807.1	8.351874	1.913077	36.46158	0.004762
AC021851.1	77.15012	3.966866	1500.464	0.004105
TMEM220-AS1	19.22401	2.109181	175.2161	0.008745
AC018647.2	18.90644	2.582905	138.3921	0.0038
AL359541.1	141.6562	3.60969	5559.055	0.008156
CKMT2-AS1	56.86789	2.77327	1166.117	0.008747
MEG3	2.354588	1.29787	4.271677	0.004834
DYRK3-AS1	571.2731	11.1146	29362.54	0.001588
LINC01711	3.414641	1.576517	7.395906	0.001843
AF235103.3	27.91207	2.364202	329.5334	0.008215
AC005392.2	3.472402	1.757627	6.860142	0.000339
AC003086.1	389.1982	11.88565	12744.38	0.000806



注:A. 训练集的生存分析,蓝色表示低风险组,红色表示高风险组;B、C. 训练集中的生存分析与风险评分的关系;D. LncRNA 在高危组和低危组的表达情况;E. 风险模型的 ROC 曲线验证。

图 3 预后风险模型的效果评估



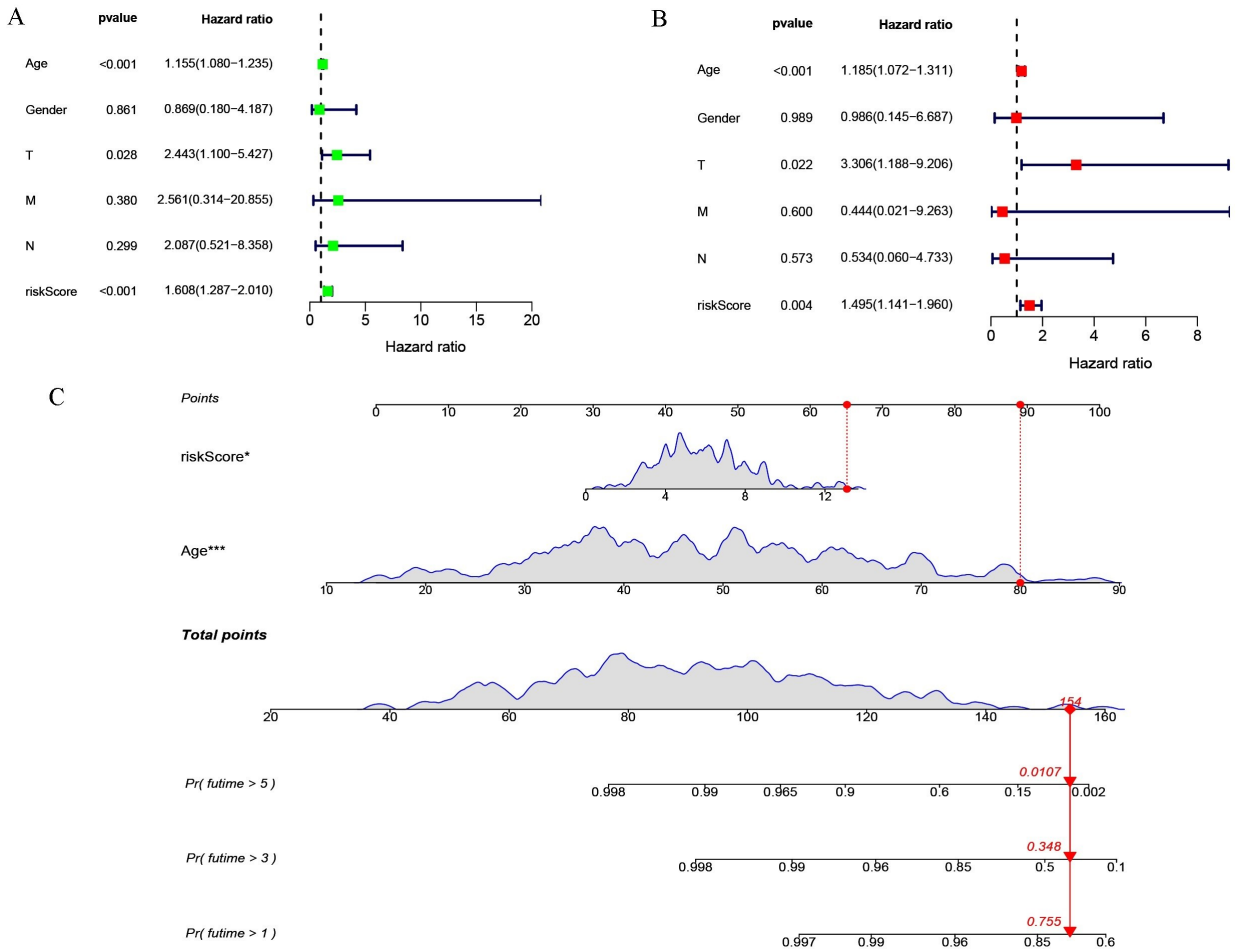
注:A~D. 与验证集相关的生存分析、生存状态分布分析和 lncRNA 表达情况;E~H. 与整个队列相关的生存分析、生存状态分布分析和 lncRNA 表达情况;I~L. 4 张图分别显示了风险模型、铜死亡相关基因、铜死亡相关 lncRNA 和所有相关基因的主成分分析。

图 4 使用验证集和整个队列来验证风险模型的准确性

2.4 风险模型的独立预后分析 为了判断模型中的预后因素是否能够独立显示 THCA 患者的预后情况,本研究对 504 例 THCA 患者进行分析,在排除临床治疗信息不完整的病例后,将剩余的 281 例 THCA 患者纳入单变量 Cox 回归分析中。单因素分析结果显示年龄、T 分期和 Risk Score 与 THCA 患者的 OS 显著相关 ($P < 0.05$) (见图 5A)。再将上述的 3 个危险因素纳入多变量 Cox 回归分析,结果显示年龄、T 分期和 Risk Score 是独立于 THCA 患者 OS 的危险因素 ($P < 0.05$) (见图 5B)。综上所述,风险评分可以独立于性别、肿瘤分期对 THCA 患者的预后情况进行独立预测。随后,根据风险评分、年龄和 T 分期制作了 Nomogram 图 (见图 5C),该图得分可用于推测 THCA 患者未来 1 年、3 年、5 年的生存率。最后,为了 Nomogram 图能够达到更好的预测效果,分别绘制了 1、3、5 年的生存率预测 ROC 图以及校准曲线,结果显示,1

年、3 年、5 年的 AUC 分别为 0.994、0.978、0.965,结合校正曲线,可以很好地预测 THCA 患者的预后生存情况。

2.5 THCA 标志物与临床特征的关系以及功能富集分析 为了研究诊断模型的临床效用以及阐明相关的生物学功能,本研究首先探讨了该模型是否适用于不同临床分组的病人。结果表明 (见图 6A、图 6B),风险评分与临床分期存在显著差异, I ~ II 期和 III ~ IV 期具有统计学意义 ($P < 0.05$)。然后对低风险评分组和高风险评分组的差异 lncRNA 进行了 GO 和 KEGG 富集化分析。GO 分析表明,上调的基因主要集中在免疫相关的生物学功能中,如抗原结合、免疫球蛋白复合体和免疫球蛋白的生成 (见图 6C)。KEGG 分析显示,这些基因主要在细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用以及趋化因子信号通路中显著富集 (见图 6D)。



注:A.对训练组进行单因素Cox回归分析;B.对训练组THCA的OS进行多因素COX回归分析;C.诺模图预测THCA患者1年、3年以及5年内的生存情况,诺模图由风险评分和年龄指标组成,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。

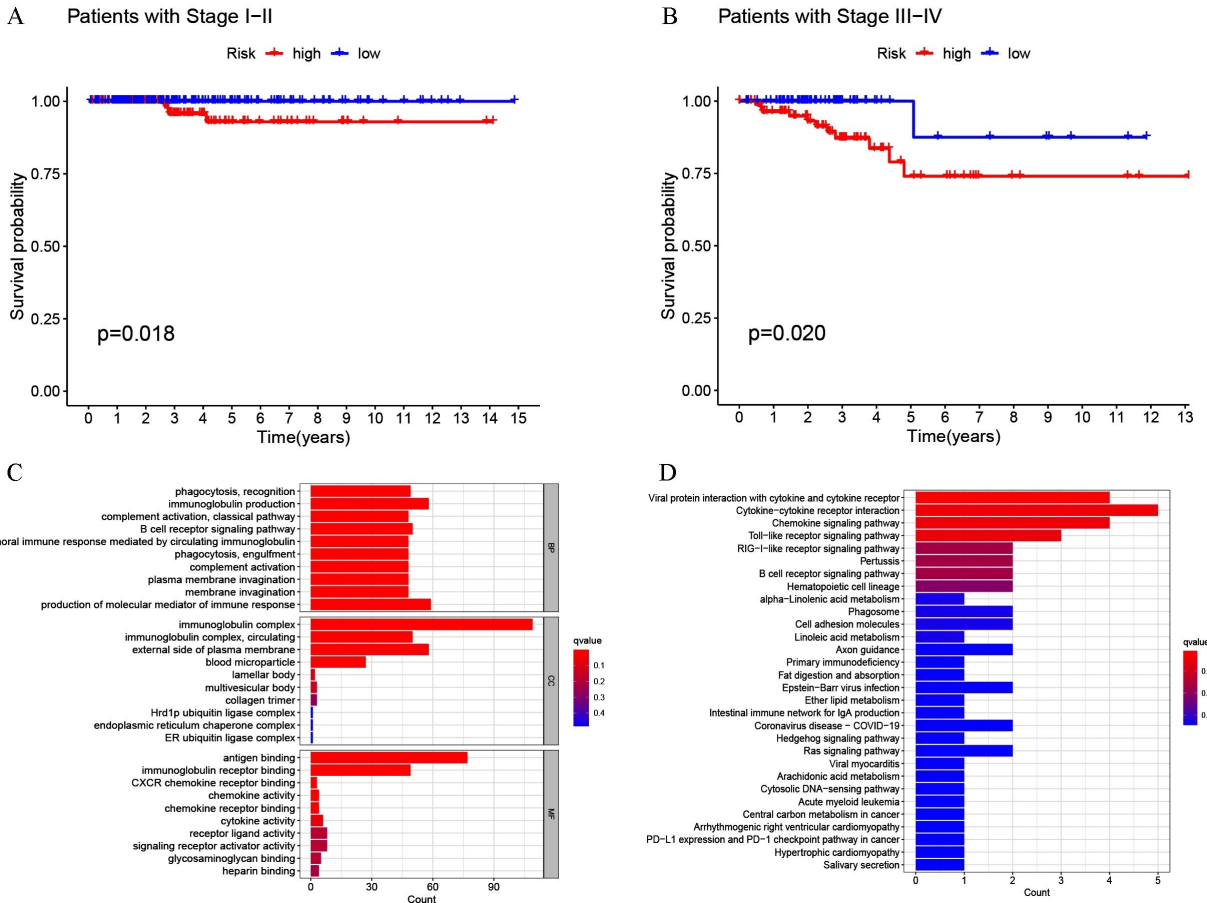
图5 风险模型的独立预后分析以及预后的生存时间分析

2.6 风险评分与免疫浸润的相关性分析 在基于3个基因作为预后标志物的风险模型中,研究了风险评分与免疫状态的相关性,以量化免疫渗透,指导临床免疫治疗。采用Single ssGSEA对免疫细胞评分和免疫相关功能进行量化。结果显示(见图7A),高危组中浆细胞、静息NK细胞以及巨噬细胞M2明显减少,而记忆CD4⁺T细胞明显增加。在免疫功能分析中(见图7B),高危组中的人类白细胞抗原、I型干扰素反应和细胞溶解活性等11个免疫功能全部下降,这与上面的免疫细胞分析不谋而合。这表明高危组中的患者可能存在免疫力低下以及诱发自身免疫性疾病的风险,提示需要对这些情况进行检查。

2.7 探讨风险评分与免疫治疗的潜在关系 首先分析了肿瘤的微环境,发现低危组的ImmuneScore和STIMA TEscore都高于高危组($P < 0.001$)(见图8A),提示免疫细胞在低危组中的含量更高,该结果与Single ssGSEA分析一致。根据肿瘤免疫功能障碍与排异(TIDE)分析,高危组的TIDE评分低于低危组($P < 0.01$)(见图8B),这说明在低风险组中,免疫逃逸的潜能更大,而高风险组在接受免疫治疗时,获得的

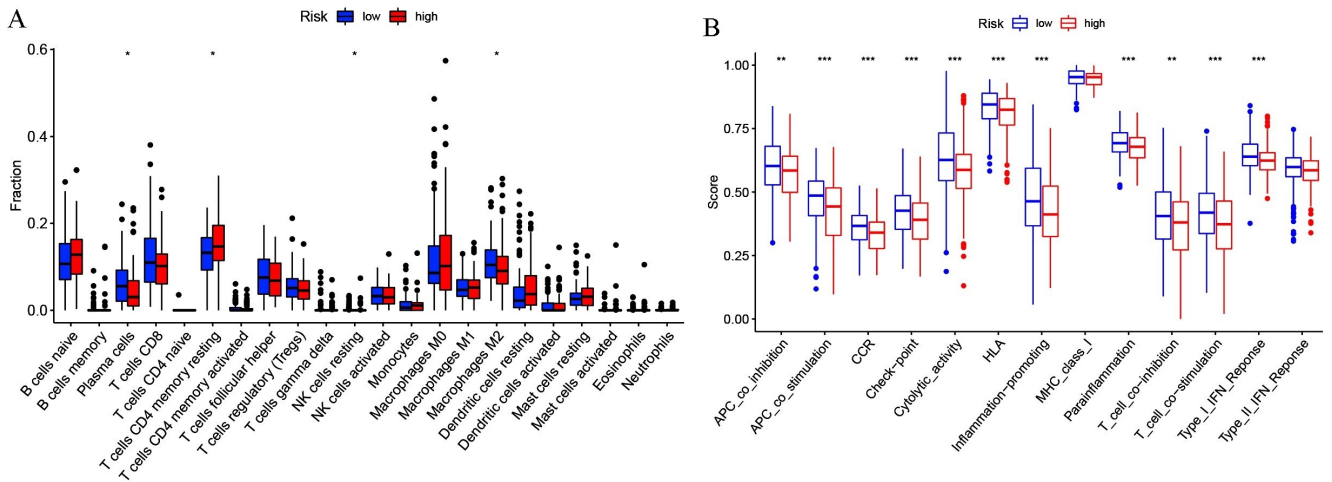
免疫疗效更高。为了验证这一猜测,本研究分析了CTLA-4和PD-1免疫治疗研究中的501名THCA患者,结果显示,在CTLA-4和PD-1治疗组中,高危组的后续药物治疗效果高于低危组($P < 0.001$)(见图8C)。临床研究表明,免疫疗法主要用于THCA的晚期介入治疗,或与手术、放疗、化疗等治疗相结合,其抗肿瘤效果会更好^[24-25]。因此,结合上述分析,可以推测,在低危组中,由于肿瘤微环境中免疫细胞的显著增加,加大了肿瘤细胞免疫逃逸的可能性,通过比较,高危组在常规CTLA-4和PD-1免疫疗法中获得更高的收益。

2.8 探索治疗THCA的潜在治疗药物 为了提高免疫药物的疗效和效益,本研究分析了79个重要的免疫检查点的相关性,其中免疫检查点基因取自HUFF等^[26]已经发表的文章。结果显示,风险评分与BTN2A1和PVR的表达呈正相关,高危组中35个免疫检查点显著下调,提示肿瘤免疫抑制微环境可能严重影响甲状腺癌患者的预后和生存时间。在此基础上,进一步分析了肿瘤的突变负荷。总体而言,高危组的突变率(74.69%)接近低危组(76.45%),两者之间



注:A. I ~ II 患者的 Kaplan-Meier 曲线;B. III ~ IV 期患者的 Kaplan-Meier 曲线;
C. 利用 GO 对高表达基因进行功能注释;D. KEGG 对高表达基因的功能注释。

图 6 预后模型、临床特征和功能富集分析之间的关系

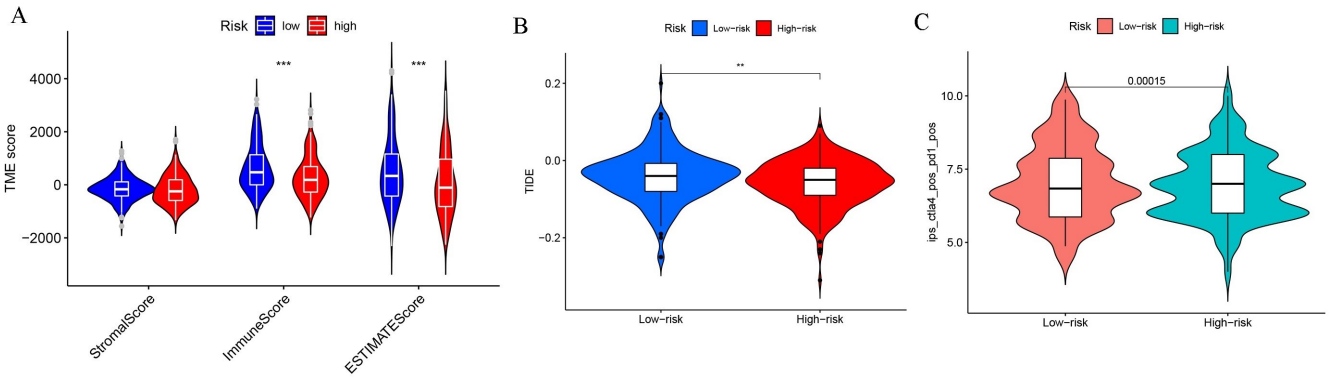


注:A、B. 显示了 16 个免疫细胞和 13 个免疫相关功能的分数,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 7 风险评分与免疫浸润的关系

差异无统计学意义。为了探讨 TMB 与风险评分的关系,进行了配对比较。结果表明,H-TMB+高风险的 OS 最差,而 L-TMB+低风险的 OS 最好。4 组之间的比较有统计学意义($P < 0.001$)。最后,对患者进行了药物敏感性分析,以确定潜在的治疗药物,结果显示有 35 种潜在药物可供选择,在这里展示了对高危组更

加具有敏感性的 14 种药物(见图 9)。已知一种药物的 IC50 得分越低,表明该风险组中的患者对该药物更敏感。其中高危组中的 AC220 药物显著低于低危组($P < 0.001$),说明高危组对该药物具有高敏感性。意味着这些药物在未来的 TCHA 治疗中具有潜在的作用。



注:A. 高危组与低危组肿瘤微环境的差异;B. 高危组和低危组的免疫逃逸分析;C. 在 TCGA 数据集分析中, 接受 CTLA-4 和 PD-1 免疫治疗的高风险群体和低风险群体比较情况, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 8 风险评分和免疫治疗之间的潜在关系

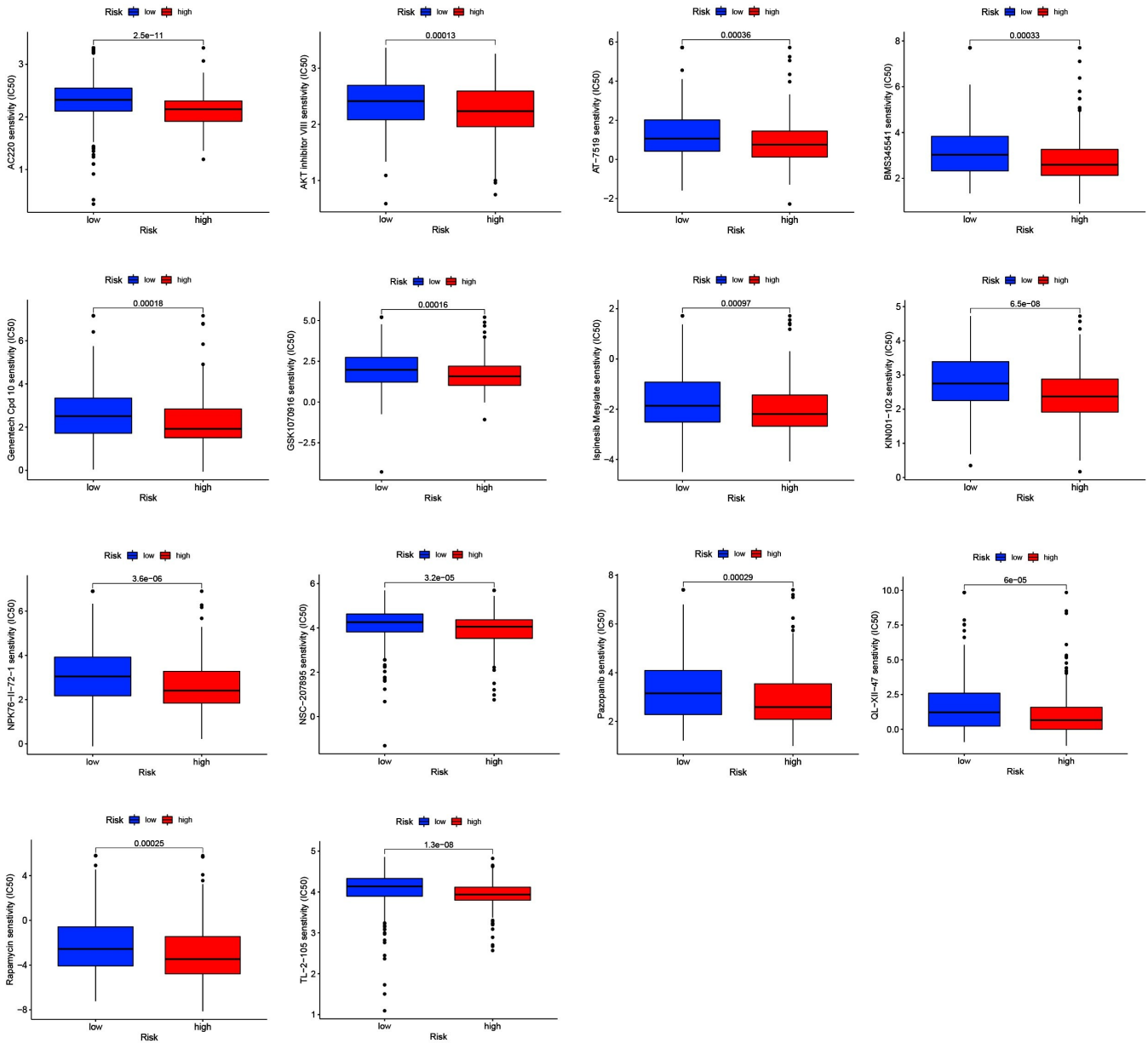
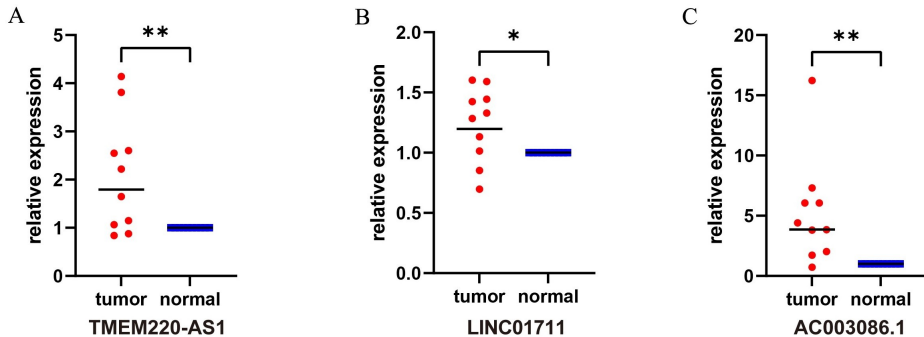


图 9 治疗 THCA 高危人群敏感的潜在药物

2.9 THCA 中铜死亡关键 lncRNA 的表达水平 为了进一步验证 3 个铜死亡相关的 lncRNA 在临床 THCA 组织中的表达情况,本研究对 10 例 THCA 患者的相关组织进行 qPCR 分析,结果如图 10 所示,从 qPCR

的结果中可以得知,肿瘤组织中 TMEM220-AS1、LINC01711、AC003086.1 的表达水平均显著高于正常组织($P < 0.05$),结合生物信息学分析,二者的结果一致,因此可以考虑将它们作为新的预后标志物。



注:A. TMEM220-AS1 在甲状腺癌和正常组织中的表达;B. LINC01711 在甲状腺癌和正常组织中的表达;

C. AC003086.1 在甲状腺癌和正常组织中的表达,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 10 铜死亡相关的 lncRNA 在甲状腺癌和癌旁组织中的 mRNA 表达情况

3 讨论

THCA 是最常见的内分泌肿瘤,在过去 10 年中该疾病的发病率显著增加,从而构成重大的公共卫生负担^[27-28]。目前,针对 THCA 患者的特效药还没有开发出来,并且患者的整体生存情况让人担忧,因此,深入研究 THCA 的发病机制以及探讨可能存在的诱发条件都显得格外的重要。在已经发表报道中,铜死亡相关基因和 lncRNA 的表达在不同类型的肿瘤中有所不同,并且与很多疾病的发生发展都具有紧密的联系^[29]。在本研究中,筛选出 3 个铜死亡相关的 lncRNA(TMEM220-AS1、LINC01711、AC003086.1)并构建了 THCA 预后模型,随后基于风险评估构建了 Nomogram 图,分别经过验证集的验证以及校准图表明,3 个关键 lncRNA 可作为 THCA 患者的预后标志物,Nomogram 图预测 THCA 患者的 1 年、3 年以及 5 年 OS 与实际观察结果吻合较好,预测值的上下波动符合校准的参考范围。通过实验验证,进一步确定了 3 个关键 lncRNA 在正常组织和 THCA 组织中的表达存在明显差异。

在预后模型中, TMEM220-AS1、LINC01711、AC003086.1 的表达与 THCA 患者的预后呈现正相关。在近期研究中发现, TMEM220-AS1 过表达可以抑制肝癌细胞的迁移、侵袭和增殖,其通过增加 TMEM220-AS1 的表达以及灭活 Wnt/ β -catenin pathway 来抑制肝癌细胞的恶性行为^[30]。同期,也有相关的研究表明低水平的 TMEM220-AS1 可以通过肝癌中的 miR-484/MAGI1 axis 促进肝癌的增殖和转移^[31]。还有学者通过生物信息学分析,将其鉴定为肝癌的预后标志物^[32]。这些研究都表明 TMEM220-

AS1 在肿瘤的发生发展中具有重要的作用,然而,关于 TMEM220-AS1 在 THCA 中的影响机制少有报道。当 LINC01711 在食管癌中的差异表达具有重要意义时,科学家发现 LINC01711 可以通过上调 FSCN1 和下调 miR-326 促进食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭,从而影响癌症的发生和发展^[33]。更有科研人员认为,该基因与自噬相关,可以作为食管鳞癌的肿瘤标志物^[35]。在最近的研究发现,LINC01711 也参与了三阴性乳腺癌和成纤维细胞纤维化的表达^[34-36]。尽管如此,关于 LINC01711 的科研成果还是很少,本次研究结果表明,LINC01711 也有可能作为 THCA 的预后标志物。本研究认为 AC003086.1 具有成为 THCA 肿瘤标志物的潜力,同时希望后续能够有更多的相关报道。

随着对预后模型的不断探索,该模型在指导免疫药物的使用、治疗和预后方面具有很大的潜力。众所周知,由结构、功能代谢、基质细胞、肿瘤细胞和免疫细胞组成的微环境称为肿瘤微环境^[37-38]。以往的研究表明,TME 中的免疫细胞具有双重作用,既能促进肿瘤的发生,也可以抑制肿瘤的表达,其比例也影响抗肿瘤免疫治疗的效果^[39-40]。并且,免疫治疗在不同患者之间存在明显的治疗差异,这种差异主要是由于肿瘤微环境中免疫环境的异质性造成的^[41]。从构建的风险模型可以看出,高风险组患者在接受相同的免疫治疗时能够获得比低风险组患者更好的疗效,可推测是由于低危组的免疫细胞增加,加大了免疫逃逸的可能性,导致两组之间存在明显的疗效差异。因此,低风险组患者在接受常规 CTLA-4 和 PD-1 免疫治疗时,可以考虑购买廉价药物,以节省成本,减少药物资源的浪

费。此外,在单样本基因浓缩分析中,风险评分越高,记忆 CD4⁺T 细胞的渗透程度越大,浆细胞、静息 NK 细胞以及巨噬细胞 M2 的下降趋势越明显。

ADDEO A 等^[42]认为,使用免疫检查点抑制剂(ICD)可以显著治疗 TMB 评分高的肿瘤。为此,本次研究通过 TMB 分析发现,高危人群和低危人群之间,体细胞的突变数量并没有显著差异。但在预后方面,高危组高 TMB 患者中 50% 的患者总体生存时间不超过 5 年,提示 TMB 可能在 THCA 中起重要作用,但具体机制仍有待研究。当对 79 个关键免疫检查点进行相关性筛选时,发现 37 个免疫检查点在高低风险组中存在显著差异,这为 THCA 患者在接受 ICI 治疗时提供了更多和更好的选择。最后,通过 pRophetic 包分析筛选出 35 种具有潜在治疗 THCA 疗效的药物。这些发现将为 THCA 患者的预后治疗提供更多的理论依据和免疫治疗策略。

综上所述,本研究证明了铜死亡相关性 lncRNA 在 THCA 中存在显著差异表达,并且 3 个关键的 lncRNA 在预测 THCA 的预后和生存方面具有一定价值。本次研究的发现将帮助肿瘤学家在制定免疫治疗方案时获得更多的理论指导。但是,本研究还存在一些不足之处:①由于 THCA 相关的数据并不是很多,因此研究数据均来自 TCGA 数据库,缺乏外部数据库的验证;②该模型仍处于理论阶段,后续的研究仍然需要大量的临床实验数据来支撑。

参考文献:

[1] ZHANG C J, LI Z T, QI F, et al. Exploration of the relationships between tumor mutation burden with immune infiltrates in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(22): 648.

[2] LAM D, DAVIES L, SAWKA A M. Women and thyroid cancer incidence: overdiagnosis versus biological risk[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2022, 29(5): 492-496.

[3] SHANK J B, ARE C, WENOS C D. Thyroid cancer: global burden and trends[J]. *Indian J Surg Oncol*, 2022, 13(1): 40-45.

[4] BALOCH Z W, ASA S L, BARLETTA J A, et al. Overview of the 2022 WHO classification of thyroid neoplasms[J]. *Endocr Pathol*, 2022, 33(1): 27-63.

[5] NABHAN F, DEDHIA P H, RINGEL M D. Thyroid cancer, recent advances in diagnosis and therapy[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(5): 984-992.

[6] DENG Y J, LI H T, WANG M, et al. Global burden of thyroid cancer from 1990 to 2017[J]. *JAMA Netw Open*, 2020, 3(6): e208759.

[7] ZHEN J, SONG Z, SU W J, et al. Integrated analysis of

RNA-binding proteins in thyroid cancer[J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0247836.

[8] SCHARDT J. The use of immune checkpoint inhibitors in routine oncology[J]. *Z Rheumatol*, 2020, 79(8): 809-817.

[9] MARIN-ACEVEDO J A, KIMBROUGH E O, LOU Y Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 45.

[10] SHI X, LI C W, TAN L C, et al. Immune co-inhibitory receptors PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, and TIGIT in medullary thyroid cancers: a large cohort study[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(1): 120-132.

[11] PANDEY R K, SHUKLA S, HUSAIN N, et al. Correlation between programmed death ligand-1 (PD-L1) expression and driver gene mutations in non-small cell lung carcinoma-adenocarcinoma phenotype [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022, 23(1): 131-142.

[12] RUIZ L M, LIBEDINSKY A, ELORZA A A. Role of copper on mitochondrial function and metabolism[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 711227.

[13] KAHLSON M A, DIXON S J. Copper-induced cell death [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1231-1232.

[14] ZEHRA S, TABASSUM S, ARJMAND F. Biochemical pathways of copper complexes: progress over the past 5 years[J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(4): 1086-1096.

[15] COBINE P A, BRADY D C. Cuproptosis: Cellular and molecular mechanisms underlying copper-induced cell death[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(10): 1786-1787.

[16] MO X C, HU D, YANG P S, et al. A novel cuproptosis-related prognostic lncRNA signature and lncRNA MIR31HG/miR-193a-3p/TNFRSF₂₁ regulatory axis in lung adenocarcinoma[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 927706.

[17] XU S X, LIU D Z, CHANG T H, et al. Cuproptosis-associated lncRNA establishes new prognostic profile and predicts immunotherapy response in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 938259.

[18] ZHANG Z, ZENG X Y, WU Y H, et al. Cuproptosis-related risk score predicts prognosis and characterizes the tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 925618.

[19] TAN Y T, LIN J F, LI T, et al. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(2): 109-120.

[20] LIU S J, DANG H X, LIM D A, et al. Long noncoding RNAs in cancer metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(7): 446-460.

[21] HERMAN A B, TSITSIPATIS D, GOROSPE M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2252-2266.

[22] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle pro-

- teins[J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-1261.
- [23] GEELEHER P, COX N, HUANG R S. pRRophetic: an R package for prediction of clinical chemotherapeutic response from tumor gene expression levels [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107468.
- [24] CUNHA L L, WARD L S. Translating the immune microenvironment of thyroid cancer into clinical practice [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2022, 29(6): R67-R83.
- [25] AGRAWAL A K, NORONHA V, PATIL V, et al. Systemic therapy in thyroid cancer [J]. *Indian J Surg Oncol*, 2022, 13(1): 68-80.
- [26] HU F F, LIU C J, LIU L L, et al. Expression profile of immune checkpoint genes and their roles in predicting immunotherapy response [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(3).
- [27] CAO M M, LI H, SUN D Q, et al. Cancer burden of major cancers in China: a need for sustainable actions [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(5): 205-210.
- [28] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-791.
- [29] ZHOU Y, SHU Q, FU Z L, et al. A novel risk model based on cuproptosis-related lncRNAs predicted prognosis and indicated immune microenvironment landscape of patients with cutaneous melanoma [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 959456.
- [30] LIU Y, LIU R K, ZHAO J J, et al. LncRNA TMEM220-AS1 suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion by regulating the TMEM220/ β -catenin axis [J]. *J Cancer*, 2021, 12(22): 6805-6813.
- [31] CAO C, LI J, LI G Z, et al. Long non-coding RNA TMEM220-AS1 suppressed hepatocellular carcinoma by regulating the miR-484/MAGI1 axis as a competing endogenous RNA [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 681529.
- [32] DU W B, CHEN W B, SHU Z Y, et al. Identification of prognostic biomarkers of hepatocellular carcinoma via long noncoding RNA expression and copy number alterations [J]. *Epigenomics*, 2020, 12(15): 1303-1315.
- [33] XU M L, LIU T C, DONG F X, et al. Exosomal lncRNA LINC01711 facilitates metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via the miR-326/FSCN1 axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(15): 19776-19788.
- [34] SHI X B, LIU X X, PAN S P, et al. A novel autophagy-related long non-coding RNA signature to predict prognosis and therapeutic response in esophageal squamous Cell Carcinoma [J]. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 8325-8339.
- [35] VISHNUBALAJI R, ALAJEZ N M. Epigenetic regulation of triple negative breast cancer (TNBC) by TGF- β signaling [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15410.
- [36] ILIEVA M, MILLER H E, AGARWAL A, et al. FibroDB: expression analysis of protein-coding and long non-coding RNA genes in fibrosis [J]. *Noncoding RNA*, 2022, 8(1): 13.
- [37] WU T, DAI Y. Tumor microenvironment and therapeutic response [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387: 61-68.
- [38] ELIA I, HAIGIS M C. Metabolites and the tumour microenvironment: from cellular mechanisms to systemic metabolism [J]. *Nat Metab*, 2021, 3(1): 21-32.
- [39] KHALAF K, HANA D, CHOU J T T, et al. Aspects of the tumor microenvironment involved in immune resistance and drug resistance [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 656364.
- [40] PENA-ROMERO A C, ORENES-PINERO E. Dual effect of immune cells within tumour microenvironment: pro- and anti-tumour effects and their triggers [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1681.
- [41] DAI E Y, ZHU Z, WAHED S, et al. Epigenetic modulation of antitumor immunity for improved cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 171.
- [42] ADDEO A, FRIEDLAENDER A, BANNA G L, et al. TMB or not TMB as a biomarker: that is the question [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 163: 103374.

收稿日期: 2022-12-05; 修回日期: 2023-01-09