

本文引文格式:张钊银,王洪伟,苏萌,等.头颈部鳞状细胞癌血管生成预后模型的构建及验证[J].右江民族医学院学报,2023,45(5):722-730,746.

【论著与临床报道】

头颈部鳞状细胞癌血管生成预后模型的构建及验证

张钊银¹,王洪伟¹,苏萌¹,王珊¹,姚金光²

(1. 右江民族医学院口腔医学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 通过生物信息学的方法构建头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)血管生成相关基因(angiogenesis related genes, ARGs)预后模型,验证模型的预测价值。方法 从UCSC Xena数据库下载头颈部鳞状细胞癌(TCGA-HNSCC)数据集,获取差异表达的ARGs,通过单因素Cox回归分析、蛋白互作网络(PPI)筛选预后相关核心ARGs,利用LASSO回归分析构建预后模型,分析高低风险组的预测效能,并使用GSE41613数据集进行验证。利用ESTIMATE算法对高低风险组进行免疫浸润分析,分析高低风险组免疫检查点基因表达的差异。对高低风险组进行药物敏感性分析。RT-qPCR验证PLAU、VEGF-C两个预后基因在舌鳞状细胞癌的表达情况。结果 在TCGA-HNSCC中获得了414个差异表达的ARGs,基于14个ARGs构建了HNSCC预后模型。Kaplan-Meier生存曲线显示高风险组的生存时间低于低风险组($P < 0.001$),ROC曲线显示其具有较高的预测价值(1年、3年、5年的AUC值分别为0.675、0.688、0.644),其预后价值在GSE41613数据集得到了验证。免疫浸润分析提示低风险组具有更高的免疫浸润评分,低风险组高表达免疫检查点基因。药物敏感性分析表明高低风险组对包括顺铂(cisplatin)、Tozasertib在内的多种药物的敏感性存在差异($P < 0.05$)。RT-qPCR结果显示PLAU、VEGF-C高表达于舌鳞状细胞癌($P < 0.05$)。结论 由14个ARGs组成的HNSCC风险评分模型,可有效预测HNSCC患者的预后及对药物治疗的反应。

关键词:血管生成;肿瘤,鳞状细胞;预后模型;免疫浸润;药物敏感性

中图分类号:R730.26

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)05-0722-10

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.05.005

Construction and validation of an angiogenesis-related prognostic model in head and neck squamous cell carcinoma

Zhang Zhaoyin¹, Wang Hongwei¹, Su Meng¹, Wang Shan¹, Yao Jinguang²

(1. School of Stomatology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To construct a prognostic model for angiogenesis-related genes (ARGs) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) using bioinformatics methods and validate its predictive value.

Methods The HNSCC dataset (TCGA-HNSCC) was downloaded from the UCSC Xena database to obtain differentially expressed ARGs, univariate Cox regression analysis and protein-protein interaction (PPI) network were used to screen prognostic-related core ARGs. We then constructed a prognostic model using LASSO regression and analyzed its predictive efficacy in high and low-risk groups. We verified the model using the GSE41613 dataset. The ESTIMATE algorithm was used to analyze the immune infiltration of the high and

基金项目:右江民族医学院研究生创新计划项目(YZCXJH2023020)

第一作者简介:张钊银(1998-),男,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:口腔颌面外科,E-mail:1359011031@qq.com

通讯作者简介:姚金光(1965-),男,博士,教授,主任医师,博士/硕士研究生导师,研究方向:头颈肿瘤侵袭、转移分子机制研究,E-mail:yao7760698@126.com

low-risk groups, and differential expression of immune checkpoint genes between these groups was analyzed. Drug sensitivity was also analyzed for these groups. RT-qPCR was used to verify the expression of two prognostic genes, *PLAU* and *VEGF-C*, in tongue squamous cell carcinoma. **Results** We identified 414 differentially expressed ARGs in TCGA-HNSCC and constructed a prognostic model for HNSCC based on 14 ARGs. Kaplan-Meier survival curve showed that the high-risk group had shorter survival times compared to the low-risk group ($P < 0.001$), and the ROC curve demonstrated its strong predictive value (AUC values at 1, 3 and 5 years were 0.675, 0.688 and 0.644, respectively), and the model's prognostic value was validated in the GSE41613 dataset. Immune infiltration analysis suggested that the low-risk group had a higher immune infiltration score and high expression of immune checkpoint genes. Drug sensitivity analysis revealed varying sensitivity to multiple drugs, including Cisplatin and Tozasertib between high and low-risk groups ($P < 0.05$). The results of RT-qPCR showed that *PLAU* and *VEGF-C* were highly expressed in tongue squamous cell carcinoma ($P < 0.05$). **Conclusion** The HNSCC risk score model composed of 14 ARGs can effectively predict the prognosis and drug therapy response in HNSCC patients.

Key words: angiogenesis; tumor, squamous cell; prognostic model; immune infiltration; drug sensitivity

研究显示^[1],头颈部肿瘤是全世界第六大常见的恶性肿瘤,其中超过 90%属于鳞状细胞癌,被称之为头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC),其主要起源于口腔、鼻咽、口咽、下咽和喉部的黏膜上皮,包括吸烟、酗酒、HPV 病毒感染等在内是其重要的危险因素^[2-3]。由于其早期症状不明显,大多数 HNSCC 被发现时已属于晚期(Ⅲ期或Ⅳ期),其治疗后复发及转移风险高,5 年生存率不足 50%^[4-6]。因此,迫切需要寻找有效的标志物来预测 HNSCC 预后和对药物治疗的反应。

血管生成是一种从现有血管系统的内皮生成新的血管,用于组织生长和伤口愈合的生物学过程^[7]。研究表明^[8],血管生成的调节是促血管生成因子和抗血管生成因子共同调控的,但在肿瘤组织中其调控失衡,导致病理性血管生成,并可通过分泌高水平的促血管生成因子,形成不成熟和可渗透血管为特征的异常血管网络,这会导致肿瘤灌注不良及缺氧反应,形成高度抑制性的肿瘤免疫微环境进而导致肿瘤免疫逃逸,最终使肿瘤更具侵袭性^[9-10]。目前,抗血管生成药物已经在部分实体瘤中证明了其良好的应用价值,包括转移性结直肠癌、肾癌、晚期非小细胞肺癌等^[11-14],证实了其能延长生存期。HUA Y H 等^[15]学者最新研究表明,抗 PD-1 单克隆抗体联合抗 VEGF 药物在复发/转移性 HNSCC 患者中安全有效,能延长总生存期,说明了抗血管生成药物在 HNSCC 的治疗中具有潜在的应用价值。然而,目前基于血管生成相关基因(angio-genesis related genes, ARGs)构建 HNSCC 预后模型少见报道。本研究旨在利用生物信息学寻找 HNSCC 中差异表达的预后相关 ARGs,并构建预后模型,评估模型的预测价值及对治疗的反应,为 HNSCC 临床诊断和治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 临床样本来源 收集 2019 年 9 月至 2023 年 4 月于右江民族医学院附属医院口腔科就诊且接受手术治疗的 11 例舌鳞状细胞癌患者的癌组织及对应的癌旁组织为研究对象,所有组织标本离体后放入 RNA 保存液并置于 -80° 长期保存,包括男性 9 例,女性 2 例,平均年龄为 (58.90 ± 6.80) 岁,术前已排除放化疗等辅助治疗,术后经病理检查确诊。本研究经右江民族医学院附属医院伦理委员会审批(伦理审批编号:YYFY-LL-2023-116),所有患者均签署知情同意书。

1.2 数据来源 从 UCSC Xena 数据库(<http://xena.ucsc.edu/>)下载头颈部鳞状细胞癌(TCGA-HNSC-C)的 RNA-seq 数据和生存数据,筛选样本编号结尾为 01A(即原发肿瘤)的样本作为训练集,包含 495 例癌组织样本及 44 例正常组织样本。从 GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库下载 GSE41613 作为验证集,注释平台为 GPL570,包含 97 例口腔鳞状细胞癌样本(见表 1),其中 494 例带有完整生存数据。从 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)和 MSigDB(<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>)数据库中获取 ARGs, GeneCards 中筛选关键词为“Angiogenesis”,筛选条件为 Relevance score 大于平均值(1.047),获得 1 292 个 ARGs, MSigDB 数据库的筛选关键词为“ANGIOGENESIS”,获取 ANGIOGENESIS(Systematic name 为“M14493”)数据集共 48 个 ARGs,取上述两个数据集的并集并去除重复基因最终得到 1 298 个 ARGs,获得数据时间为 2023 年 3 月 20 日。本研究所用数据都来自公共数据库,故无需伦理委员会审批。

表 1 TCGA-HNSCC 和 GSE41613 临床基线表

	TCGA-HNSCC (n = 495)	GSE41613 (n = 97)
年龄/岁		
<60	216(43.64)	47(48.45)
>60	278(56.16)	50(51.55)
缺失	1(0.20)	—
性别		
男	363(73.33)	66(68.04)
女	132(26.67)	31(31.96)
T 分期		
T1+T2	175(35.35)	—
T3+T4	305(61.62)	—
TX+缺失	15(3.03)	—
N 分期		
N0+N1	318(64.24)	—
N2+N3	155(31.31)	—
NX+缺失	22(4.45)	—
M 分期		
M0	465(93.94)	—
M1	5(1.01)	—
MX+缺失	25(5.05)	—
临床分期		
I 期+II 期	113(22.83)	41(42.27)
III 期+IV 期	368(74.34)	56(57.73)
缺失	14(2.83)	—

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

1.3 差异表达 ARGs 的鉴定 首先利用 R 语言“DESeq2”包筛选出 HNSCC 的差异表达基因,以 $\text{padj} < 0.05$, $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$ 作为标准筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并与 ARGs 取交集,获得差异表达的 ARGs,并使用“ggthemes”包绘制差异基因火山图。

1.4 预后相关核心 ARGs 的鉴定 将 HNSCC 差异相关 ARGs 的表达数据与生存数据整合,使用“survival”包进行单因素 Cox 回归分析,以 $\text{pvalue} < 0.05$ 筛选获得预后相关 ARGs。将筛选得到的预后相关 ARGs 上传至 STRING(<https://cn.string-db.org>)数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interacton, PPI),选择相互作用评分为 medium confident(0.4),并将相互作用结果上传至 Cytoscape 软件(Version 3.9.0),使用 Cytoscape 中的“MCODE”插件筛选评分最高的模块基因作为预后相关核心 ARGs,并进行可视化。

1.5 预后风险模型的构建和验证 合并 HNSCC 中预后相关核心 ARGs 的表达数据及生存数据,使用“survival”、“glmnet”包对预后相关核心 ARGs 进行 LASSO 回归分析,以 lambda.min 为最佳筛选标准,

最终得到与预后显著相关的 ARGs 并计算每个样本的风险评分,计算公式为:风险评分 = $\sum_{i=1}^n (\text{Exp}_i * \text{coef}_i)$ 。n 表示基因数量,exp 表示基因表达量,coef 表示基因风险系数。根据风险评分的中位值,将样本分为高风险组和低风险组。使用“survminer”绘制高低风险组的 Kaplan-Meier 生存曲线。使用“time ROC”绘制 1 年、3 年、5 年的 ROC 曲线并计算 AUC 值。合并验证集 GSE41613 中预后相关核心 ARGs 的表达数据及生存数据,使用与上述相同的风险评分计算方法将验证集样本分为高低风险组,绘制验证集高低风险组的 Kaplan-Meier 生存曲线及 1 年、3 年、5 年的 ROC 曲线。

1.6 免疫浸润分析 使用 ESTIMATE 算法计算肿瘤组织中的基质评分(stromalscore)、免疫评分(immunescore)、以及基于前两者计算得出的 ESTIMATE 评分(ESTIMATEScore)和肿瘤纯度(tumor-purity),分析高低风险组肿瘤免疫浸润情况。分析高低风险组免疫检查点(immune checkpoint, IC)基因表达的差异。

1.7 药物敏感性分析 从药敏数据库 GDSC(<https://www.cancerrxgene.org/>)中下载并整理药敏数据,基于药物半抑制浓度(IC50),使用“oncoPredict”包计算高低风险组对 198 种化疗药物的敏感性。

1.8 两个核心预后基因的 RT-qPCR 验证 对基于构建预后模型的预后相关核心 ARGs 进行生存分析,对两个预后基因进行 RT-qPCR 验证。使用 Total RNA Kit I 试剂盒(Omega Bio-Tek)提取总 RNA,对提取的 RNA 进行质量检测。使用 Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix[YEASEN, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司]逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,使用 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 试剂[YEASEN, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司]并根据说明书进行 RT-qPCR 反应测定,使用 β -ACTIN 作为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量分析计算相对表达量。RT-qPCR 引物序列:PLAU 上游引物:5'-TAACGATCCCCAGTTTGGCAC-3';下游引物:5'-GGTCAGCAGCACACAGCATT-3'; VEGF-C 上游引物:5'-CACGAGCTACCTCAGCAAGA-3';下游引物:5'-GCTGCCTGACACTGTGGTA-3'; β -ACTIN 上游引物:5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3';下游引物:5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3',引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.9 统计学方法 使用 R 语言(version 4.2.3)及 GraphPad Prism 9 进行数据分析和图形绘制。针对两组数据的比较,对符合正态分布的数据使用 t 检验,

而非正态分布的数据则使用 WilCoX 秩和检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 差异表达 ARGs 的鉴定 利用R语言“DESeq2”包从 HNSCC 患者以 $padj < 0.05, |\log_2\text{FoldChange}|$

≥ 1 作为标准筛选出 4 769 个 DEGs,并通过火山图展示(见图 1A),与从 GeneCards 和 MSigDB 获得的 1 298 个 ARGs 取交集,获得 414 个差异表达的 ARGs,并通过韦恩图进行展示(见图 1B)。

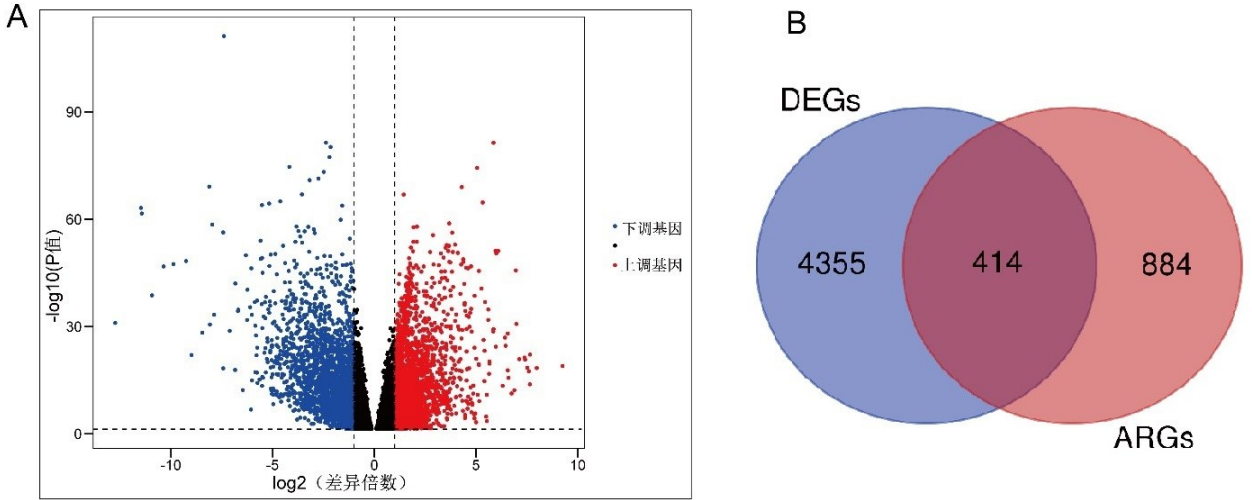
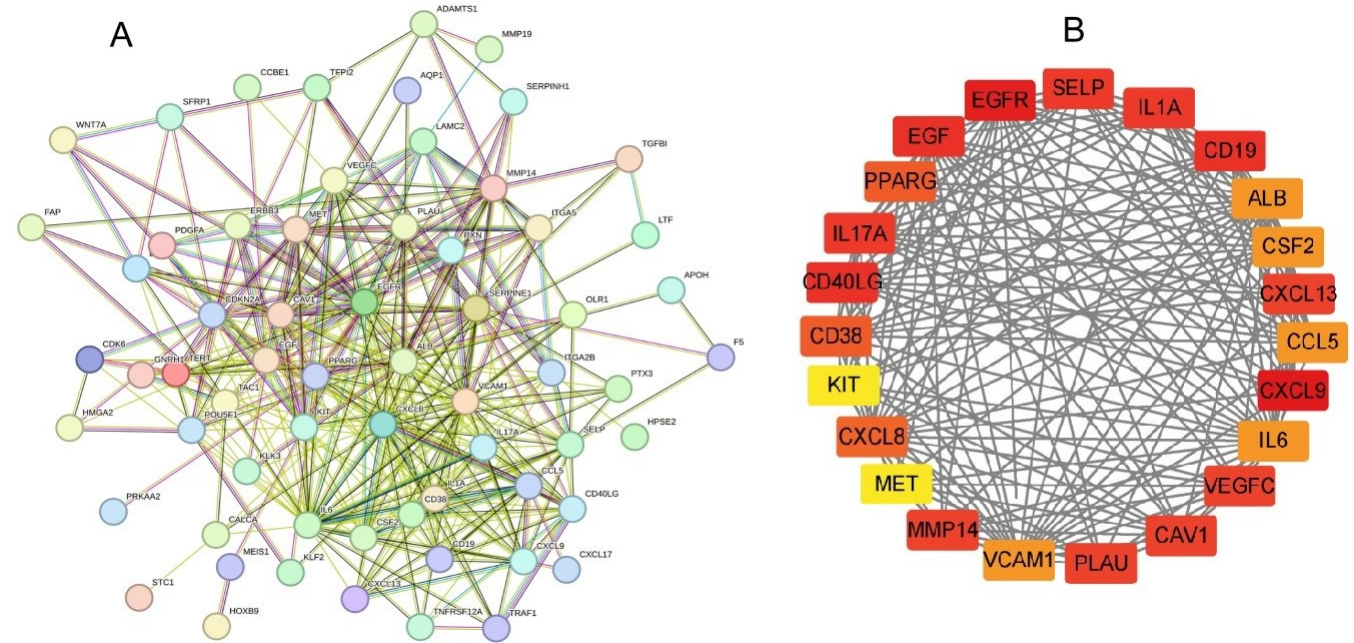


图 1 HNSCC 差异基因火山图和差异表达 ARGs 韦恩图

2.2 预后相关核心 ARGs 的鉴定 利用单因素 Cox 回归分析,以 $pvalue < 0.05$ 筛选得到 72 个预后相关 ARGs(见图 2A)。在 STRING 数据库上构建了 72 个

节点基因及 379 条边数的 PPI 网络,利用 Cytoscape 中的“MCODE”插件筛选得到 23 个预后相关核心 ARGs(见图 2B)。



注:A. 72 个预后相关 ARGs 的 PPI 蛋白互作网络,圆圈表示蛋白质,圆圈之间连线表示蛋白质间相互作用,连线越多代表相互作用越强;B. “MCODE”插件筛选出的 23 个预后相关核心 ARGs,颜色深浅与评分呈正相关,颜色越深,评分越高。

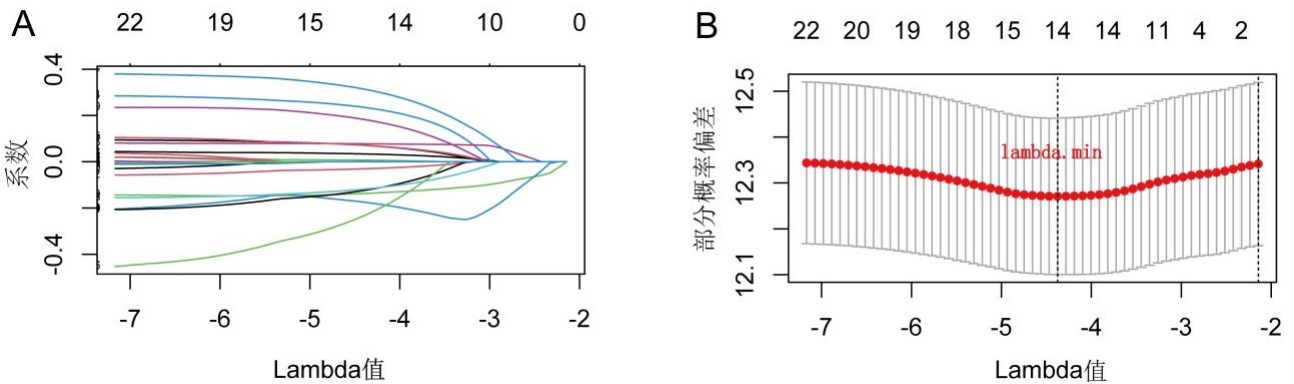
图 2 预后相关 ARGs 的 PPI 蛋白互作网络和预后相关核心 ARGs

2.3 预后风险评分模型的构建和验证 对上述得到的 23 个预后相关核心 ARGs 进行进行 LASSO 回归

分析(见图 3A、图 3B),得到 14 个与预后显著相关的 ARGs,并展示了这 14 个基因单因素 Cox 回归分析结

果及 coef 值(见表 2)。根据 coef 值计算风险评分,具体公式为: 风险评分 = IL6 表达 \times 0.033491083 + CCL5 表达 \times (-0.030218342) + IL1A 表达 \times 0.006785821 + ALB 表达 \times 0.233992094 + PLAU 表达 \times 0.077462404 + EGFR 表达 \times 0.07040458 + CD19 表达 \times (-0.136937929) + CD40LG 表达 \times (-0.175847268) + KIT 表达 \times (-0.122645187) + VEGFC 表达 \times 0.070554947 + IL17A 表达 \times (-0.229373238) + PPARG 表达 \times 0.312332183 + CD38 表达 \times (-0.117538852) + EGF 表达 \times 0.18141696, 根据风险评分的中位值将样本分为高风险组和低风险组, 作为训练集。使用这 14 个基因相同

的 coef 值并根据基因在验证集 GSE41613 中的表达量计算风险评分(计算方法同训练集), 并根据风险评分的中位值将样本分为高风险组和低风险组。生存分析显示在 HNSCC 训练集中高风险组的生存时间低于低风险组 ($P < 0.001$), 见图 4A, 同时在验证集中高风险组的生存时间同样低于低风险组 ($P = 0.01$), 见图 4B, 说明高风险组患者相对于低风险组生存时间更短、死亡率更高。ROC 曲线显示验证集中 1 年、3 年、5 年的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为(1 年 = 0.675, 3 年 = 0.688, 5 年 = 0.644), 见图 4C, 在验证集中 ROC 曲线下面积(AUC)分别为(1 年 = 0.645, 3 年 = 0.654, 5 年 = 0.647), 见图 4D, 说明模型具有较强的预测效力。



注: A. LASSO 系数分布特征; B. LASSO 模型中最佳参数(lambda.min)的选择。

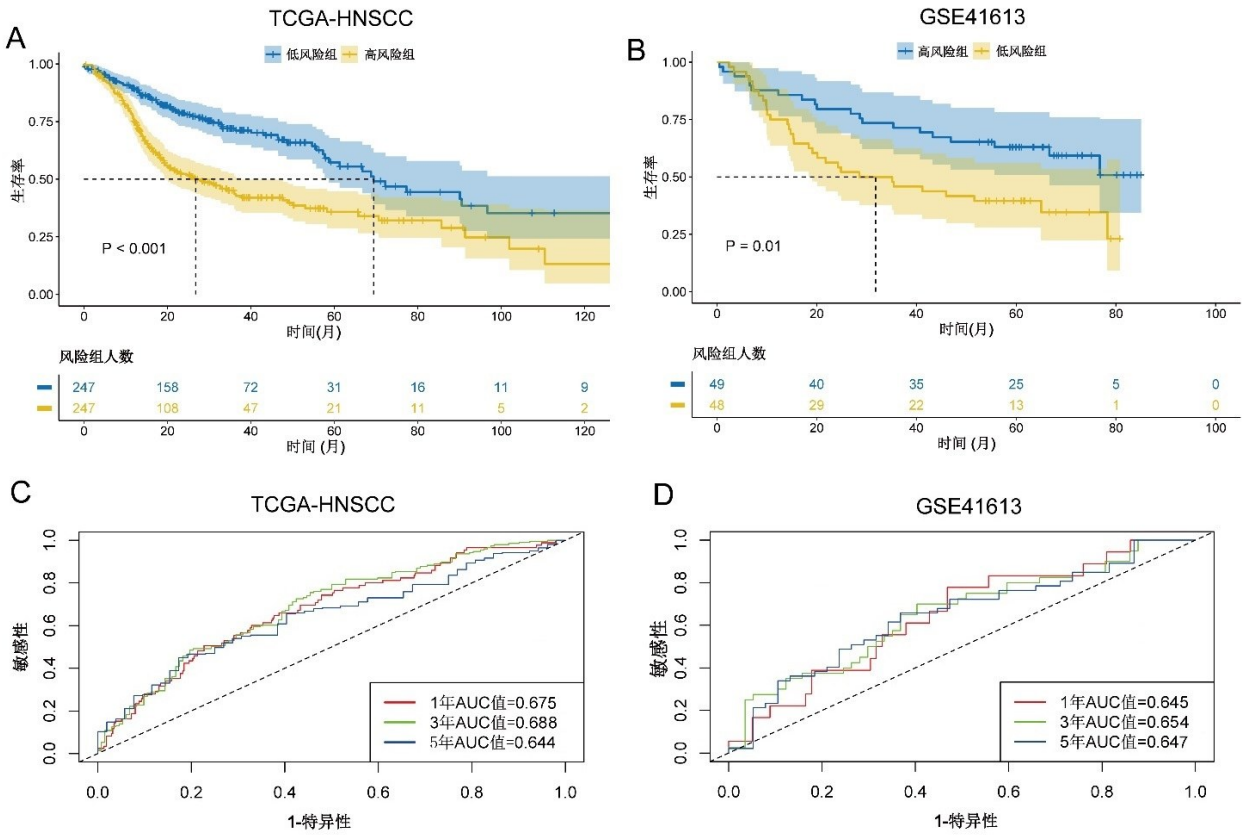
图 3 预后相关核心 ARGs 预后风险评分模型的构建

表 2 14 个与预后显著相关的 ARGs 单因素 Cox 回归分析结果及 coef 值

Gene	HR	pvalue	lower	upper	Coef 值
IL6	1.116613	0.021693	1.016262	1.226873	0.033491
CCL5	0.900816	0.018595	0.825769	0.982684	-0.03022
IL1A	1.094956	0.027285	1.010221	1.186798	0.006786
ALB	1.312621	0.014523	1.055359	1.632596	0.233992
PLAU	1.223032	0.001039	1.08439	1.379399	0.077462
EGFR	1.12575	0.035591	1.008013	1.257238	0.070405
CD19	0.664512	0.000792	0.52339	0.843686	-0.13694
CD40LG	0.450871	0.000501	0.287887	0.706128	-0.17585
KIT	0.793818	0.030462	0.644018	0.978461	-0.12265
VEGFC	1.125971	0.015093	1.023221	1.239039	0.070555
IL17A	0.262696	0.01973	0.08539	0.808161	-0.22937
PPARG	1.221708	0.046224	1.003359	1.487574	0.312332
CD38	0.839224	0.017031	0.72669	0.969185	-0.11754
EGF	1.323355	0.049139	1.001057	1.749419	0.181417

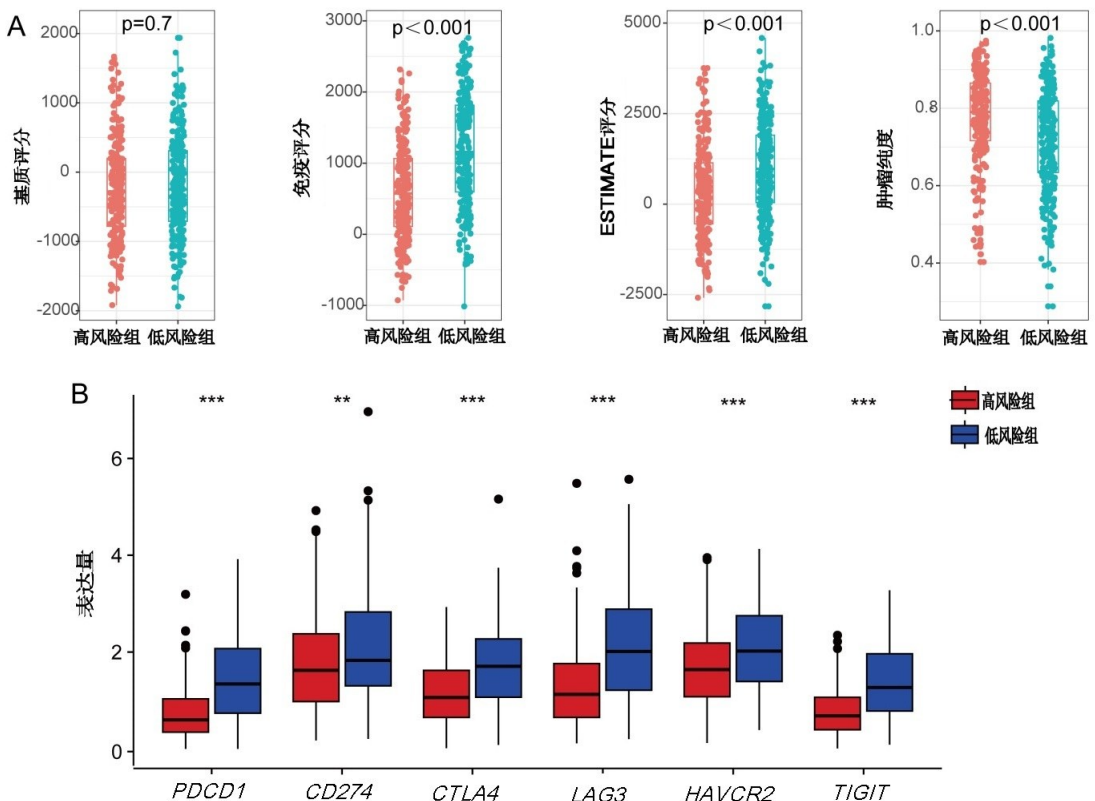
2.4 免疫浸润分析 进一步的免疫浸润分析显示, 在 ESTIMATE 算法中, 高低风险组的肿瘤基质评分无显著差异, 低风险组的肿瘤免疫评分和 ESTIMATE 评分高于高风险组 ($P < 0.001$), 高风险组具有更高的

肿瘤纯度 ($P < 0.001$), 如图 5A。低风险组高表达 PDCD1、CD274、CTLA4、LAG3、HAVCR2、TIGIT 等 6 种免疫检查点基因 ($P < 0.05$), 如图 5B。



注:A. 训练集 TCGA-HNSCC 高低风险组生存曲线;B. 验证集 GSE41613 高低风险组生存曲线;C. 训练集 TCGA-HNSCC:1年、3年、5年的 ROC 曲线;D. 验证集 GSE41613:1年、3年、5年的 ROC 曲线。

图 4 训练集和验证集 Kaplan-Meier 生存曲线和 1 年、3 年、5 年 ROC 曲线

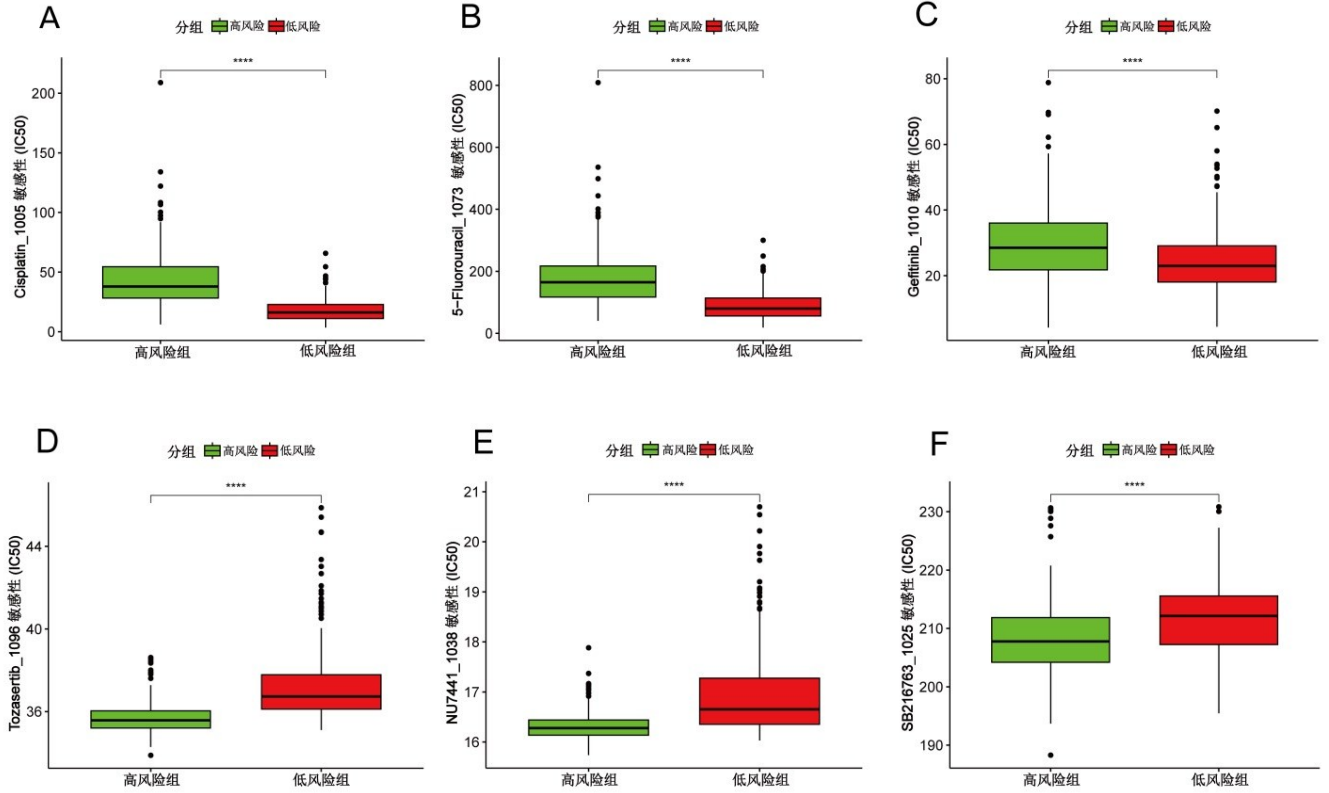


注:A. 高低风险组基质评分、免疫评分、ESTIMATE 评分、肿瘤纯度的差异;B. 高低风险组 $PDCD1$ 、 $CD274$ 、 $CTLA4$ 、 $LAG3$ 、 $HAVCR2$ 、 $TIGIT$ 6 个免疫检查点基因的表达差异。* $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 5 高低风险组免疫浸润分析及与免疫检查点基因表达的相关性

2.5 药物敏感性分析 基于药敏数据库 GDSC,使用 R 语言“oncoPredict”包计算高低风险组对 198 种化疗药物的敏感性(基于 IC50)。结果显示低风险组患者对包括顺铂(cisplatin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、吉非替尼(gefitinib)等 HNSCC 常用化疗药物 IC50 值

更低($P < 0.05$),见图 6A~图 6C),低风险组患者对这些药物更敏感。而高风险组对包括 Tozasertib、NU7441、SB216763 等药物 IC50 值更低($P < 0.05$),见图 6D~图 6F,高风险组患者对这些药物更敏感。

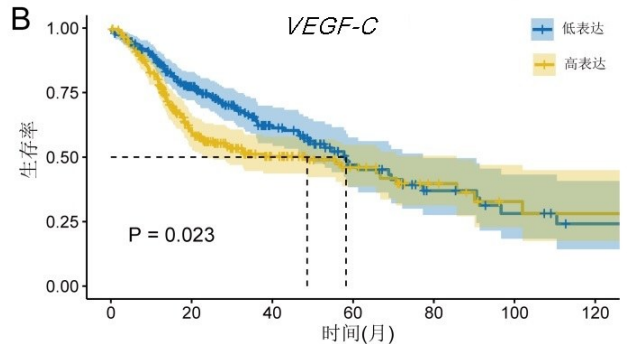
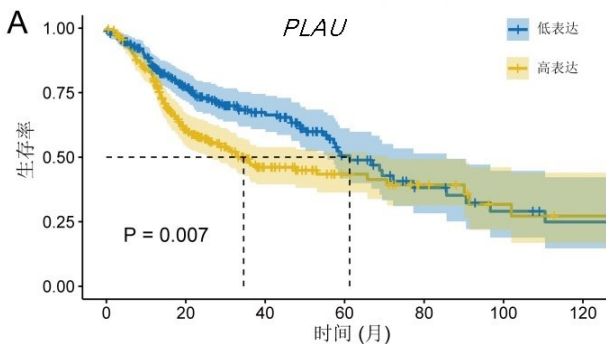


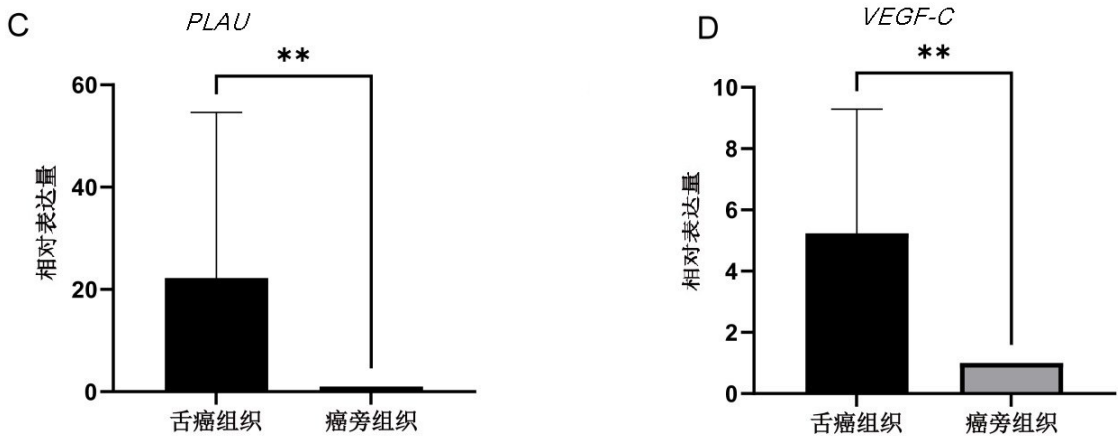
注:A~F.依次为高低风险组对顺铂、5-氟尿嘧啶、吉非替尼、Tozasertib、NU7441、SB216763 的敏感性(IC50),药物 IC50 越低说明药物处理更具敏感性。**** $P < 0.0001$ 。

图 6 高低风险组药物敏感性分析

2.6 核心预后基因的 RT-qPCR 验证 对基于构建预后模型的 14 个预后相关核心 ARGs 进行生存分析,发现 *PLAU*、*VEGF-C* 是影响预后的两个关键基因, *PLAU*($P = 0.007$),*VEGF-C*($P = 0.023$),见图 7A、

图 7B)。RT-qPCR 结果表明,与对应癌旁组织相比, *PLAU*、*VEGF-C* 在舌鳞状细胞癌组织中的表达均显著上调($P < 0.05$),见图 7C、图 7D。





注:A. *PLAU* 在 TCGA-HNSCC 的生存曲线;B. *VEGF-C* 在 TCGA-HNSCC 的生存曲线;C. *PLAU* 在舌鳞状细胞癌及对应癌旁中的表达情况;D. *VEGF-C* 在舌鳞状细胞癌及对应癌旁中的表达情况。* $P < 0.01$ 。

图 7 *PLAU* 和 *VEGF-C* 的 Kaplan-Meier 生存曲线及在舌鳞状细胞癌中的表达情况

3 讨论

HNSCC 通常被发现时已属于局部晚期,超过一半的患者会发生局部复发或远处转移^[16],并且其复发和转移后的治疗效果差^[17],开发可靠的预后和分子标志物并早期施以干预能大大改善 HNSCC 的生存状况。肿瘤血管生成是肿瘤治疗中一个很有吸引力的重要靶标,约 90% 的 HNSCC 高度表达血管生成因子,如 *VEGF*^[18],并且高表达 *VEGF* 预示着其较差的生存率^[19-20]。基于抗血管生成药物的研究已经在 HNSCC 中进行,HOANG T 等^[21]研究表明,贝伐珠单抗(一种抗 *VEGF* 的单克隆抗体)在头颈部鳞癌细胞系和异种模型中能抑制肿瘤血管生成,显著增强放疗对肿瘤的抑制作用。因此,基于肿瘤血管生成相关基因的表达探究其与 HNSCC 治疗及预后的关系具有重要研究价值。在本研究中,从 TCGA-HNSCC 数据集中鉴定出了 414 个差异表达的 ARGs。通过单因素 Cox 回归分析、构建 PPI 蛋白相互作用网络结合 Cytoscape 的“MCODE”插件筛选核心模块及 LASSO 回归分析,最终得到 14 个与预后显著相关的 ARGs 并成功构建了预后模型,使用 Kaplan-Meier 生存分析及 1 年、3 年、5 年 ROC 曲线评估高低风险组的预测效能,结果显示风险评分具有良好的预测价值,且预后价值在 GSE41613 数据集都得到了验证,说明基于 14 个 ARGs 构建的预后模型能很好地预测 HNSCC 患者的预后。

免疫治疗目前已经成为治疗 HNSCC 患者的一个很有前景的治疗方法^[22],肿瘤免疫浸润意味着免疫系统的初步识别,可能提示抗肿瘤免疫应答,肿瘤免疫浸润水平同时影响着免疫检查点抑制剂(ICIs)的抗肿瘤疗效^[23-24]。基于 ESTIMATE 算法进行了高低风险组免疫浸润分析,结果提示低风险组具有更高的免疫评分,这提示低风险组相对于高风险组具有更高的免疫

细胞浸润水平。针对免疫检查点的抗肿瘤研究已经在 HNSCC 中不断开展^[25],本次研究结果提示低风险组高表达包括 *PDCD1*、*CD274*、*CTLA4* 等 6 个免疫检查点基因,这提示针对低风险组的免疫检查点抑制剂可能更容易取得疗效。通过免疫浸润分析结果发现,低风险组显示出“热”肿瘤免疫,显示出更强的免疫原性,而高风险组更多表现为“冷”肿瘤免疫,这对今后进一步深入认识血管生成与肿瘤免疫浸润的关系具有重要意义。对高低风险评分组的药物敏感性分析提示低风险评分组对目前 HNSCC 常用化疗药顺铂(cisplatin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、吉非替尼(gefitinib)更敏感。顺铂+5-氟尿嘧啶联合治疗是目前治疗 HNSCC 的传统标准治疗方案,而西妥昔单抗是第一个被批准用于 HNSCC 治疗的分子靶向药物^[26],低风险评分的患者可能预示针对这 3 个 HNSCC 常用治疗药物更好的治疗效果。而高风险评分组则对 Tozasertib、NU7441、SB216763 3 种药物更敏感,由于高风险评分预示着患者更差的预后,故针对这 3 种药物的研究将更具前景。为了进一步寻找核心预后基因,本研究对建模的 14 个 ARGs 进行了生存分析,发现 *PLAU*、*VEGFC* 是其中影响预后的两个关键基因。已有的研究表明 *PLAU*、*VEGFC* 与 HNSCC 进展密切相关,CHEN G J 等^[27]研究表明 *PLAU* 能促进 HNSCC 的增值和上皮间质转化,本研究中选取 HNSCC 中的舌鳞状细胞癌组织进行 RT-qPCR 验证,结果表明 *PLAU* 在舌鳞状细胞癌中高表达于癌旁组织,但目前 *PLAU* 在舌鳞状细胞癌中的功能和机制少见报道,值得进一步深入研究。*VEGF-C* 即血管内皮生长因子 C,较早的研究表明 *VEGF-C* 广泛高表达于 HNSCC 血管与淋巴管组织,表明其参与了 HNSCC 的血管及淋巴管生成^[28],SASAHIRA T 等^[29]研究表明 *VEGF-*

C 在转移性舌癌细胞中的表达高于非转移性舌癌细胞,并且 RT-qPCR 结果也表明 VEGF-C 在舌鳞状细胞癌组织中显著上调,故 VEGF-C 很可能与 HNSCC 特别是舌鳞状细胞癌的复发转移密切相关。

综上所述,通过生物信息学方法构建了基于 14 个 ARGs 的 HNSCC 预后模型,该模型能有效预测 HNSCC 患者的预后和对药物治疗的反应,同时本次研究预测出了 Tozasertib 等 3 种针对高 ARGs 评分患者治疗敏感的药物。最后,利用 RT-qPCR 对其中的两个预后基因 *PLAU*、*VEGF-C* 进行了验证,这两个预后基因在 HNSCC 特别是在舌鳞状细胞癌中的机制值得进一步深入探究,但以上研究结果尚需进一步的实验验证及临床研究加以证明。

参考文献:

- [1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018; GLOBOCAN sources and methods[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [2] GUPTA B, JOHNSON N W, KUMAR N. Global epidemiology of head and neck cancers: a continuing challenge [J]. *Oncology*, 2016, 91(1): 13-23.
- [3] MICHAUD D S, LANGEVIN S M, ELIOT M, et al. High-risk HPV types and head and neck cancer[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(7): 1653-1661.
- [4] BECKHAM T H, LEEMAN J E, XIE P, et al. Long-term survival in patients with metastatic head and neck squamous cell carcinoma treated with metastasis-directed therapy[J]. *Br J Cancer*, 2019, 121(11): 897-903.
- [5] CHOW L Q M. Head and neck cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(1): 60-72.
- [6] 罗倩,詹雪冰,况云舒,等.头颈部鳞状细胞癌焦亡相关 lncRNA 对预后风险模型的构建与评估[J]. *右江民族医学院学报*, 2022, 44(5): 666-674.
- [7] CARMELIET P. Angiogenesis in life, disease and medicine[J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 932-936.
- [8] TONINI T, ROSSI F, CLAUDIO P P. Molecular basis of angiogenesis and cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22(42): 6549-6556.
- [9] VIALARD C, LARRIVÉE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets[J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(4): 409-426.
- [10] RAHMA O E, HODI F S. The intersection between tumor angiogenesis and immune suppression [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(18): 5449-5457.
- [11] SONG Y X, FU Y, XIE Q, et al. Anti-angiogenic agents in combination with immune checkpoint inhibitors: a promising strategy for cancer treatment [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1956.
- [12] DAMATO A, IACHETTA F, ANTONUZZO L, et al.

Phase II study on first-line treatment of NIVolumab in combination with folfoxiri/bevacizumab in patients with Advanced ColoRectal cancer RAS or BRAF mutated - NIVACOR trial (GOIRC-03-2018) [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 822.

- [13] RINI B I, PLIMACK E R, STUS V, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(12): 1116-1127.
- [14] WANG P L, FANG X Z, YIN T W, et al. Efficacy and safety of anti-PD-1 plus anlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer after previous systemic treatment failure—a retrospective study [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 628124.
- [15] HUA Y H, DONG R Z, JIN T, et al. Anti-PD-1 monoclonal antibody combined with anti-vegf agent is safe and effective in patients with recurrent/metastatic head and neck squamous cancer as second-line or beyond treatment [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 781348.
- [16] FERRIS R L, BLUMENSCHNEIN G J R, FAYETTE J, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(19): 1856-1867.
- [17] WANG H H, ZHAO Q, ZHANG Y Y, et al. Efficacy and safety of systemic treatments for patients with recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 173: 105866.
- [18] MICAILY I, JOHNSON J, ARGIRIS A. An update on angiogenesis targeting in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancers Head Neck*, 2020, 5: 5.
- [19] SMITH B D, SMITH G L, CARTER D, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(10): 2046-2052.
- [20] MINETA H, MIURA K, OGINO T, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(6): 775-781.
- [21] HOANG T, HUANG S, ARMSTRONG E, et al. Enhancement of radiation response with bevacizumab [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1): 37.
- [22] COHEN E E W, BELL R B, BIFULCO C B, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 184.
- [23] BADER J E, VOSS K, RATHMELL J C. Targeting metabolism to improve the tumor microenvironment for cancer immunotherapy [J]. *Mol Cell*, 2020, 78(6): 1019-1033.

(下转第 746 页)

- 理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [19] TAMFU A N, CEYLAN O, CÂRÂC G, et al. Antibiofilm and anti-quorum sensing potential of cycloartane-type triterpene acids from Cameroonian grassland *Propolis*: phenolic profile and antioxidant activity of crude extract[J]. *Molecules*, 2022, 27(15): 4872.
- [20] PAPENFORT K, BASSLER B L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(9): 576-588.
- [21] SULLY E K, MALACHOWA N, ELMORE B O, et al. Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(6): e1004174.
- [22] NGUYEN J N T, HARBISON A M. Scanning electron microscopy sample preparation and imaging[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1606: 71-84.
- [23] 李丽, 王馨, 张悦婧, 等. 非生物胁迫对烟草悬浮细胞胞内和胞外 ATP 水平的影响[J]. *植物研究*, 2023, 43(2): 179-185.
- [24] CHEN Y N, LI H L, HUANG J J, et al. Antimicrobial activities and mechanism of sturgeon spermary protein extracts against *Escherichia coli* [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 1021338.
- [25] AKHOVA A V, TKACHENKO A G. ATP/ADP alteration as a sign of the oxidative stress development in *Escherichia coli* cells under antibiotic treatment [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 353(1): 69-76.
- [26] OUSSALAH M, CAILLET S, LACROIX M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* [J]. *J Food Prot*, 2006, 69: 1046-1055.

收稿日期: 2023-06-20; 修回日期: 2023-07-29

(上接第 730 页)

- [24] OLIVA M, SPREAFICO A, TABERNA M, et al. Immune biomarkers of response to immune-checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(1): 57-67.
- [25] MEI Z, HUANG J W, QIAO B, et al. Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 16.
- [26] KITAMURA N, SENTO S, YOSHIZAWA Y, et al. Current trends and future prospects of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 240.
- [27] CHEN G J, SUN J W, XIE M R, et al. PLAU promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 651882.
- [28] NEUCHRIST C, EROVIC B M, HANDISURYA A, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck [J]. *Head Neck*, 2003, 25(6): 464-474.
- [29] SASAHIRA T, KIRITA T, KURIHARA M, et al. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(12): 2285-2294.

收稿日期: 2023-06-02; 修回日期: 2023-07-18