



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.01.006
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.01.006
China Journal of General Surgery, 2023, 32(1):74-86.

· 基础研究 ·

铜死亡相关基因在肝细胞癌中的表达及其临床意义

孟云^{1,2}, 董保龙², 董晓骅³, 彭江山¹, 郭辉军¹, 张旭升¹, 杜雪芹², 杨晓军^{1,2,3,4,5}

(1. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院 普通外科, 甘肃 兰州 730000; 3. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000; 4. 甘肃省外科肿瘤分子诊断与精准治疗重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 5. 甘肃省消化道恶性肿瘤防控工程研究中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要

背景与目的: 肝细胞癌 (HCC) 是一种全球常见的恶性肿瘤, 具有高复发率和高病死率。铜死亡是一种新型的程序性细胞死亡, 涉及肿瘤细胞的增殖和生长、血管生成和转移。因此, 本研究探讨铜死亡相关基因 (CRGs) 在 HCC 中的表达与预后的关系, 并建立预后相关的列线图模型以及分析 CRGs 与 HCC 免疫细胞浸润的关系。

方法: 使用 R 语言 “limma” 包对 TCGA 数据库下载的 HCC 组织与正常组织的数据中 CRGs 进行差异表达分析; “clusterProfiler” 包进行 GO 和 KEGG 分析; 单因素 Cox 回归分析筛选与预后相关的 CRGs, Lasso-Cox 回归分析构建 HCC 中 CRGs 相关预后评分模型; “ggsurvplot” 包以总生存 (OS) 为结局绘制 Kaplan-Meier 生存曲线; “survival ROC” 包绘制 ROC 曲线评估预后评分的准确性; “regplot” 和 “rms” 包绘制列线图 and 校准曲线; 利用 TIMER 数据库分析 CRGs 的表达与 6 种免疫细胞丰度之间的关系。

结果: 与正常组织相比, HCC 组织 19 个 CRGs 中的 16 个有差异表达 (上调: PDHB、PDHA1、MTF1、LIPT1、LIPT2、LIAS、GLS、DLD、DLST、DLAT、CDKN2A、ATP7A; 下调: SLC31A1、GCSH、DBT、NLRP3); NLRP2 的突变频率最高 (12%)。GO 和 KEGG 分析表明, CRGs 富集于三羧酸循环、碳代谢作用、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生和铂类药物耐药性等信号通路。基于单因素 Cox 回归分析和 Lasso-Cox 回归分析筛选出影响 HCC 预后 OS 的 3 个 CRGs (CDKN2A、GLS、DLAT) 作为预后生物标志物构建预后模型, 并使用回归系数构建预后评分: 风险评分 = $0.22 \times \text{DLAT (表达水平)} + 0.11 \times \text{CDKN2A (表达水平)} + 0.03 \times \text{GLS (表达水平)}$ 。Kaplan-Meier 曲线显示, 高风险评分 HCC 患者预后较差 ($P < 0.05$), 用风险模型的时间依赖 ROC 曲线评价模型预测性能, 1、3、5 年的 AUC 分别为 0.741, 0.657, 0.633。将年龄、性别、T 分期、N 分期、M 分期、病理分型、CDKN2A、GLS 和 DLAT 纳入构建列线图, 校准图显示列线图预测和实际观察之间有良好的 consistency。GLS、DLAT 和 CDKN2A 与 HCC 免疫细胞浸润呈正相关, 并与免疫检查点 PDCD1、CD274、HAVCR2 明显相关 (均 $P < 0.05$)。进一步分析表明, HCC 组织中 CDKN2A、GLS 和 DLAT 表达越高, 患者巴塞罗那病理分期越晚, 组织学分级越差 (均 $P < 0.05$)。

结论: 与铜死亡相关的基因特征可以作为 HCC 患者潜在的预后预测因子, 并可能为 HCC 治疗提供新的途径。

关键词

癌, 肝细胞; 铜死亡; 预后; 列线图; 免疫

中图分类号: R735.7

基金项目: 甘肃省人民医院国家级科研培育计划重点基金资助项目 (19SYPIA-12); 甘肃省科技厅创新基地和人才计划基金资助项目 (20JR10RA433); 甘肃省科技厅科技计划重点研发计划基金资助项目 (21YF5WA027); 甘肃省卫生健康行业科研计划基金资助项目 (GSWSKY2020-45); 甘肃省人民医院科技创新青年基金资助项目 (21GSSYC-4); 甘肃省教育厅优秀研究生“创新之星”基金资助项目 (2021CXZX-735)。

收稿日期: 2022-08-31; **修订日期:** 2023-01-10。

作者简介: 孟云, 甘肃中医药大学第一临床医学院硕士研究生, 主要从事肝胆胰良恶性疾病基础与外科手术方面的研究 (董保龙为共同第一作者)。

通信作者: 杨晓军, Email: yangxjmd@aliyun.com

Expressions of cuproptosis-related genes in hepatocellular carcinoma and their clinical significance

MENG Yun^{1,2}, DONG Baolong², DONG Xiaohua³, PENG Jiangshan¹, GUO Huijun¹, ZHANG Xusheng¹, DU Xueqin², YANG Xiaojun^{1,2,3,4,5}

(1. The First Clinical Medicine College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Department of General Surgery, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China; 3. The First Clinical Medical School of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 4. Gansu Key Laboratory of Molecular Diagnostics and Precision Medicine for Surgical Oncology, Lanzhou 730000, China; 5. Gansu Research Center of Prevention and Control Project for Digestive Oncology, Lanzhou 730000, China)

Abstract

Background and Aims: Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common malignancy with a high recurrence and mortality rate. Cuproptosis is a new type of programmed cell death involved in tumor cells' proliferation, growth, angiogenesis, and metastasis. Therefore, this study aims to investigate the relationship between the expression of cuproptosis-related genes (CRGs) and the prognosis in HCC, establish a prognosis-related nomogram model, and analyze the association of CRGs with the immune cell infiltration in HCC.

Methods: Differential expression analysis of CRGs in the TCGA database was performed using the R language "limma" package; the "clusterProfiler" package was used for GO and KEGG analysis; the prognostic CRGs were screened by univariate Cox regression analysis; the prognostic scoring model based on CRGs for HCC was constructed by Lasso-Cox regression analysis; the "ggsurvplot" package drew the Kaplan-Meier survival curve draws using overall survival (OS) as the outcome variable; the "survival ROC" package created the ROC curve for assessing the accuracy of the prognostic score; the nomogram and the calibration curves were drawn by the 'regplot' and 'rms' packages; the associations between the expression of CRGs and the abundance of six immune cells were analyzed using the TIMER database.

Results: Among the 19 CRGs, there were 16 differentially expressed ones in HCC tissue compared with normal tissue (up-regulation: PDHB, PDHA1, MTF1, LIPT1, LIPT2, LIAS, GLS, DLD, DLST, DLAT, CDKN2A, and ATP7A; down-regulation: SLC31A1, GCSH, DBT, and NLRP3), and NLRP 2 had the highest mutation frequency of 12%. GO, and KEGG analyses showed that CRGs were enriched in signaling pathways such as the tricarboxylic acid cycle, carbon metabolism, pyruvate metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, and platinum drug resistance. Three CRGs (CDKN2A, GLS, and DLAT) that affected the OS were screened by univariate Cox regression analysis and LASSO Cox regression analysis for the construction of the prognostic model, and the prognostic score was constructed using regression coefficient: risk score=0.22×DLAT (expression level) + 0.11×CDKN2A (expression level) + 0.03×GLS (expression level). The Kaplan-Meier curve analysis showed that the HCC patients with high-risk scores had a poor prognosis ($P<0.05$), and the model prediction performance was evaluated by the time-dependent ROC curve of the risk model, and the AUC at 1, 3, and 5 years was 0.741, 0.657 and 0.633, respectively. The nomogram was constructed by incorporating age, sex, T stage, N stage, M stage, pathological classification, CDKN2A, GLS, and DLAT. The calibration map showed good consistency between the nomogram prediction and the actual observation. There were positive correlations of GLS, DLAT, and CDKN2A with HCC immune cell infiltration and a significant correlation with immune checkpoints PDCD 1, CD274, and HAVCR2 (all $P<0.05$). Further analysis indicated that the higher CDKN2A, GLS, and DLAT expression in HCC tissue, the later the Barcelona pathological stage, the

worse the histological grade in patients (all $P < 0.05$).

Conclusion: Gene signatures associated with cuproptosis can be used as potential prognostic predictors for HCC patients and may provide new insights into the treatment of HCC.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Cuproptosis; Prognosis; Nomograms; Immune

CLC number: R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球第五大最常见的恶性肿瘤, 也是全球癌症病死率的第三大常见原因^[1], 5年生存率约为7%^[2]。在我国目前已经超越胃癌位居我国恶性肿瘤死因的第二位^[3]。HCC的发展是一个从慢性炎症, 肝硬化, 原发性HCC到转移性HCC的多步骤连续过程^[4], 主要致病因素有慢性乙型和丙型肝炎病毒感染、慢性饮酒和非酒精性脂肪肝^[5]。HCC通常在晚期发现, 治疗潜力有限, 致使高病死率^[2,6]。因此, 迫切需要开发更有效的预后模型, 为HCC的早期预防及临床诊治措施的研发奠定基础, 以期降低发病率与病死率。

铜是人体生命活动不可或缺的微量元素^[7]。研究^[8-10]表明, 与健康人相比, 癌症患者血清和肿瘤组织中的铜水平显著升高。虽然铜稳态的失调可能触发细胞毒性, 但细胞内铜水平的改变可能影响癌症的发生发展^[11]。铜离子载体和铜螯合剂已应用于抗癌治疗^[12-14]。最近一项研究^[15]发现了一种不同于凋亡、坏死、焦亡和铁死亡的铜诱导细胞死亡的方式, 并将其称为“铜死亡”。当已知的细胞死亡机制被阻断时, 铜离子仍能诱导细胞死亡, 在线粒体呼吸过程中, 铜离子通过与线粒体三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环中的脂酰化成分直接结合导致脂酰化蛋白的聚集而发生铜死亡。此外, 铜离子还可以降低Fe-S团簇的蛋白质水平。它们都能诱导蛋白质毒性应激反应, 并最终导致死亡^[15]。

铜在肝脏中的代谢和对肝癌发展的作用目前仍在研究中。张燕军等^[16]研究发现, 铜含量与肝硬化和HCC密切相关, 血清铜和铜蓝蛋白水平可作为检测HCC的标志物。Koizumi等^[17]研究表明, 氧化还原活性的游离铜水平的升高可能与急性肝炎有关, 并最终发展为肝癌。此外, Siddiqui等^[18]研究表明, 氧化铜纳米颗粒诱导HepG2细胞的细胞毒性和凋亡呈剂量依赖性, 这很可能分别是由活性氧和线粒体途径介导的。以上研究表明铜死

亡可能与肝恶性肿瘤密切相关, 为发现HCC的新治疗方法提供了途径。

本研究探讨HCC中铜死亡相关基因 (cuproptosis-related genes, CRGs) 的分子改变和临床相关性, 为铜死亡调节因子在HCC中的进一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 数据集来源及预处理

从TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://portal.gdc.cancer.gov>) 数据库中收集HTseq-FPKM格式的424例HCC患者的样本基因表达及相关临床信息, 对原始数据进行log₂转化得到TPM格式的RNAseq数据。CRGs来源于近期的两项报道^[15, 19], 分别为SLC31A1、PDHB、PDHA1、NLRP3、NFE2L2、MTF1、LIPT1、LIPT2、LIAS、GLS、GCSH、FDX1、DLD、DLST、DBT、DLAT、CDKN2A、ATP7A和ATP7B, 结合标准化后基因表达矩阵得到CRGs表达矩阵文件。所有的基因特征 (如染色体位置、基因类型、集成id和官方符号) 均由基因编码项目 (v22) 进行注释^[20]。临床协变量, 包括总生存 (overall survival, OS) 结局、年龄、性别、肿瘤分期和组织学分级, 均来自先前的相关资源^[21]。本研究仅纳入有生存信息的HCC患者。

1.2 差异表达分析与突变分析

分析肿瘤和正常样本之间CRGs表达水平的差异, 以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 2/3$ 为差异表达基因的阈值。为了获得CRGs的突变图, 使用cBioPortal数据库 (<http://www.cbioportal.org>) 进行基因突变分析。

1.3 CRGs网络富集分析和蛋白质间的相互作用分析

采用“clusterProfiler”包^[22]对19个的CRGs进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析。GO分析包括生物学过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular

component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。为了分析这些基因的潜在相互作用, 使用 GENEMANIA (<http://genemania.org>) 网站^[23]进行蛋白质相互作用网络分析。

1.4 预后模型的构建

采用单因素 Cox 分析筛选预后相关基因, 采用“glmnet”包进行 Lasso-Cox 回归分析得到 3 个基因用于构建预后评分模型。患者风险评分= \sum (每个基因表达水平 \times 相应系数)。根据风险评分的中位数将患者分为高风险组和低风险组。用 R 包“ggsurvplot”比较高危组和低危组的 OS, 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。使用 R 包“survival ROC”计算受试者工作特征 (ROC) 曲线分析检验独立风险因素预测生存率的敏感度和特异度, 评估模型预测准确性。经过多因素 Cox 分析, 纳入年龄、性别、T 分期、N 分期、M 分期、病理分型、CDKN2A、GLS 和 DLAT 等变量, 采用 R 包“regplot”构建 HCC 患者列线图, 使用 R 包“rms”进行分析绘制校准曲线。

1.5 与免疫浸润的相关性分析

利用 TIMER 数据库 (cistrome. shinyapps. io/timer)^[24]研究 CRGs 的表达与 6 种免疫细胞 (CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、B 细胞、中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞) 丰度以及免疫检查点 PDCD1、CD274、HAVCR2 之间的关系。

1.6 统计学处理

对 TCGA 中的 HCC 患者进行了描述性统计分析。连续变量用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 统计, 分类变量用频率和比例统计。采用 Kruskal-Wallis 秩和检验^[25]检测 HCC 患者在不同分类的病理分期和组织学分级中 CRGs 表达的差异。所有统计分析均采用 R 版本 4.1.1 进行。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 中 CRGs 的差异表达及基因突变情况

从 TCGA 下载数据中比较肿瘤和正常组织之间的差异表达基因, 结果显示, 19 个 CRGs 中, PDHB、PDHA1、MTF1、LIPT1、LIPT2、LIAS、GLS、DLD、DLST、DLAT、CDKN2A 和 ATP7A 在肿瘤组织中高表达; SLC31A1、GCSH、DBT、NLRP3 在肿瘤组织中低表达, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 1A-B)。此外, 不同基因表达之间的相关性分析发现

(图 1C), MTF1 与 ATP7A 呈高度正相关 ($r = 0.729$, $P < 0.001$) (图 1D); 19 个 CRGs 中 NLRP2 的突变频率最高, 为 12% (图 1E)。

2.2 CRGs 的功能富集和蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 分析

为验证 CRGs 的生物学功能, 进行 GO 和 KEGG 的功能富集分析。参与的 BP 包括 TAC、柠檬酸代谢、乙酰辅酶 A 的代谢、TCA 的代谢过程、丙酮酸对乙酰辅酶 A 的生物合成; 参与的 CC 包括线粒体基质、氧化还原酶复合物、二氢脂酰脱氢酶复合物、TAC 酶复合物、晚期胞内体; 参与的 MF 包括具有氧化还原酶活性, 作用于供体的醛或氧基, NAD 或 NADP 作为受体、具有转移酶活性的转移酰基、过渡金属离子跨膜转运体活性、除氨基酰基以外具有转移酶活性的酰基。KEGG 包括 TCA 循环、碳代谢作用、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生和铂类药物耐药性。通过 PPI 分析 CRGs 的相互作用, 结果显示 DLD、DLST、DLAT 和 PDHA1 是枢纽基因 (图 2) (表 1)。

2.3 CRGs 预后模型的构建

进一步评估 HCC 中 CRGs 表达与预后的关系发现, 在调整年龄、性别、种族和病理分期后, 在单因素 Cox 比例风险回归模型中, PDHA1 ($HR = 1.467$, 95% $CI = 1.036 \sim 2.077$)、DLST ($HR = 1.505$, 95% $CI = 1.063 \sim 2.131$)、DLAT ($HR = 1.689$, 95% $CI = 1.191 \sim 2.396$)、ATP7A ($HR = 1.432$, 95% $CI = 1.013 \sim 2.024$)、CDKN2A ($HR = 1.790$, 95% $CI = 1.262 \sim 2.538$) 和 GLS ($HR = 1.592$, 95% $CI = 1.124 \sim 2.255$) 与 OS 相关 (均 $P < 0.05$), 其过表达与 HCC 患者较差的生存率相关, 显示出致癌因子的特征 (表 2)。

利用 Lasso-Cox 回归分析构建了 HCC 中 CRGs 关于 OS 的预后模型。以 OS 为结局得到 3 个基因, 使用其回归系数构建预后评分: 风险评分 = $0.22 \times DLAT + 0.11 \times CDKN2A + 0.03 \times GLS$ (图 3)。

以风险评分中位数为临界值, 将 TCGA-HCC 队列患者分为高风险组 ($n = 159$) 和低风险组 ($n = 158$)。高风险组患者生存时间较低风险患者生存时间缩短 (图 4A); Kaplan-Meier 曲线显示, 高风险组生存时间缩短 ($HR = 1.90$, 95% $CI = 1.34 \sim 2.70$, $P < 0.001$) (图 4B); ROC 曲线评价模型预测性能, 曲线下面积 (AUC) 在 1 年时达到 0.741, 3 年时达到 0.657, 5 年时达到 0.633 (图 4C)。

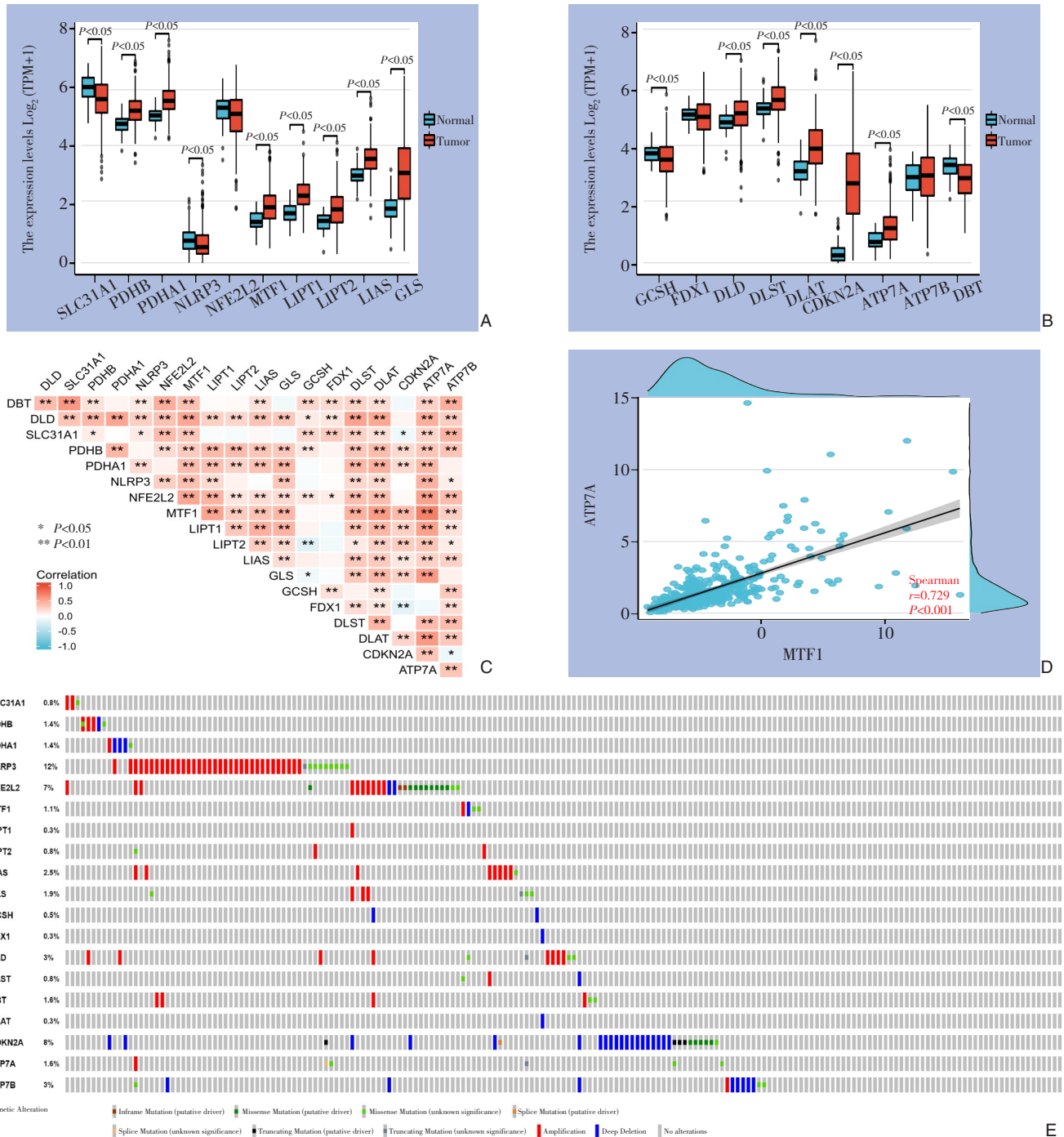


图1 HCC中CRGs的表达和基因改变 A-B: 在HCC和正常组织中19个CRGs的表达; C-D: CRGs表达之间的相关性; E: HCC中19个CRGs的突变频率

Figure 1 Expression and genetic alteration of CRGs in HCC A-B: Expressions of 19 CRGs in HCC and normal tissues; C-D: Correlations between the expression of CRGs; E: Mutation frequencies of 19 CRGs in HCC

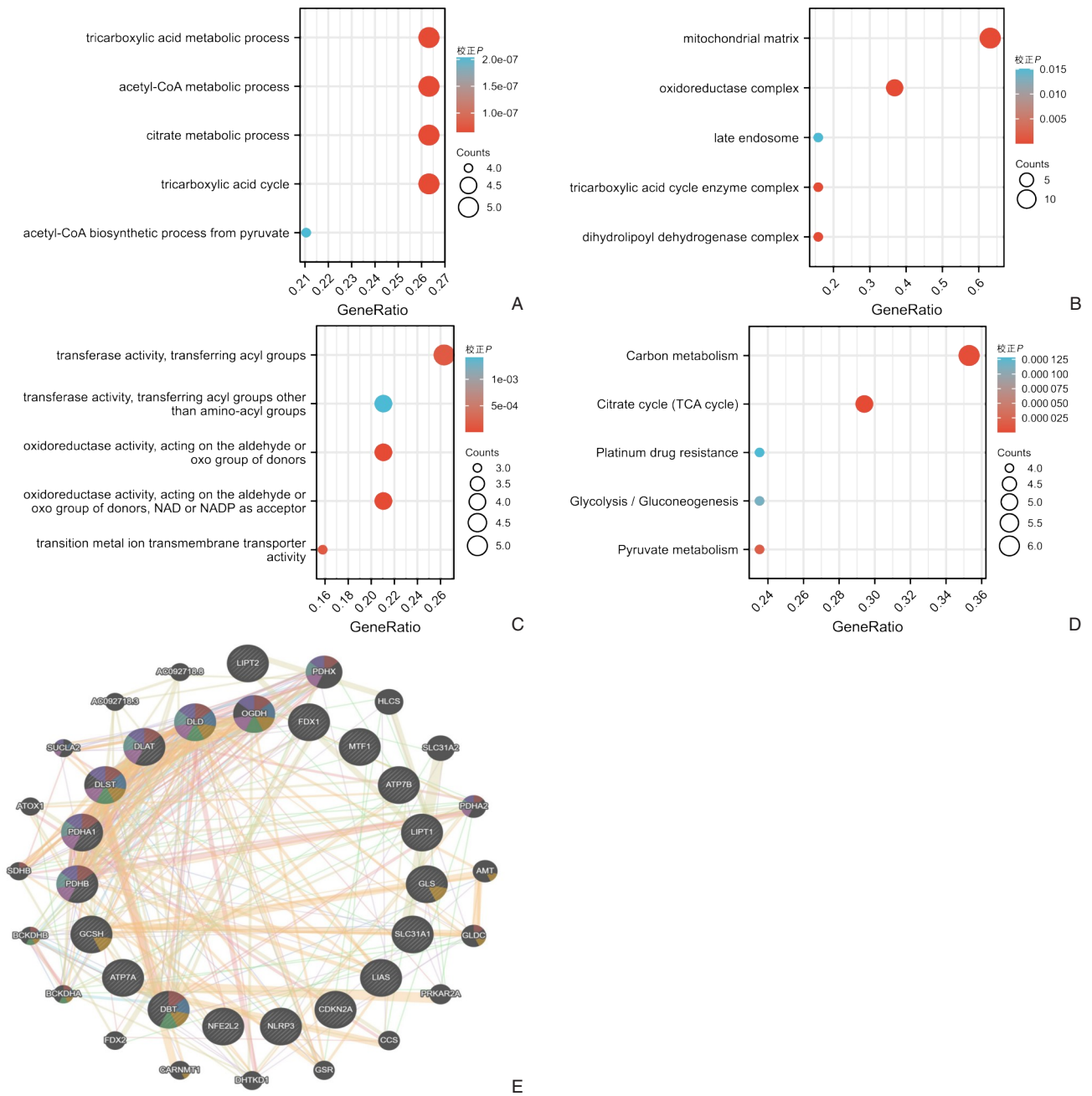


图 2 TCGA-HCC 患者 CRGs 的 GO/KEGG 富集和 PPI 分析 A: CRGs 参与的 BP; B: CRGs 参与的 CC; C: CRGs 发挥的 MF; D: KEGG 通路; E: HCC 中 CRGs 的相互作用蛋白

Figure 2 GO/KEGG enrichment and PPI analysis of CRGs in TCGA-HCC patients A: BP associated with CRGs; B: CC associated with CRGs; C: MF played by CRGs; D: KEGG pathway; E: Interacting proteins of CRGs in HCC

表 1 CRGs 的 GO 和 KEGG 的功能富集分析
Table 1 Functional enrichment analysis of GO and KEGG for CRGs

本体	ID	描述	在对应通路中的比例	校正 <i>P</i>
BP	GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	5/19	6.39e-08
BP	GO:0006101	citrate metabolic process	5/19	6.39e-08
BP	GO:0006084	acetyl-CoA metabolic process	5/19	6.39e-08
BP	GO:0072350	tricarboxylic acid metabolic process	5/19	6.39e-08
BP	GO:0006086	acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate	4/19	2.04e-07
CC	GO:0005759	mitochondrial matrix	12/19	5.20e-14
CC	GO:1990204	oxidoreductase complex	7/19	1.58e-10
CC	GO:0045240	dihydropyridin dehydrogenase complex	3/19	1.74e-06
CC	GO:0045239	tricarboxylic acid cycle enzyme complex	3/19	2.88e-06
CC	GO:0005770	late endosome	3/19	0.015
MF	GO:0016620	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	4/19	3.60e-06
MF	GO:0016903	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors	4/19	4.22e-06
MF	GO:0016746	transferase activity, transferring acyl groups	5/19	1.36e-04
MF	GO:0046915	transition metal ion transmembrane transporter activity	3/19	1.36e-04
MF	GO:0016747	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	4/19	0.001
KEGG	hsa00020	citrate cycle (TCA cycle)	5/17	1.44e-07
KEGG	hsa01200	carbon metabolism	6/17	2.23e-06
KEGG	hsa00620	pyruvate metabolism	4/17	1.69e-05
KEGG	hsa00010	glycolysis/gluconeogenesis	4/17	1.14e-04
KEGG	hsa01524	platinum drug resistance	4/17	1.28e-04

表 2 CRGs 单因素 Cox 回归分析
Table 2 Univariate Cox regression analysis of the CRGs

特征	例数(<i>n</i>)	HR(95% CI)	<i>P</i>
SLC31A1(低 vs. 高)	373	0.728(0.515~1.029)	0.072
PDHB(低 vs. 高)	373	1.280(0.907~1.807)	0.160
PDHA1(低 vs. 高)	373	1.467(1.036~2.077)	0.031
LIPT1(低 vs. 高)	373	1.268(0.897~1.792)	0.179
DLD(低 vs. 高)	373	1.064(0.754~1.501)	0.726
DLST(低 vs. 高)	373	1.505(1.063~2.131)	0.021
DBT(低 vs. 高)	373	0.845(0.598~1.193)	0.339
LIAS(低 vs. 高)	373	1.165(0.825~1.645)	0.385
FDX1(低 vs. 高)	373	0.806(0.571~1.138)	0.221
DLAT(低 vs. 高)	373	1.689(1.191~2.396)	0.003
GCSH(低 vs. 高)	373	1.181(0.834~1.673)	0.348
ATP7A(低 vs. 高)	373	1.432(1.013~2.024)	0.042
ATP7B(低 vs. 高)	373	0.807(0.571~1.142)	0.226
CDKN2A(低 vs. 高)	373	1.790(1.262~2.538)	0.001
GLS(低 vs. 高)	373	1.592(1.124~2.255)	0.009
LIPT2(低 vs. 高)	373	1.105(0.783~1.560)	0.570
MTF1(低 vs. 高)	373	1.292(0.914~1.826)	0.147
NFE2L2(低 vs. 高)	373	1.171(0.827~1.658)	0.375
NLRP3(低 vs. 高)	373	1.252(0.886~1.771)	0.203

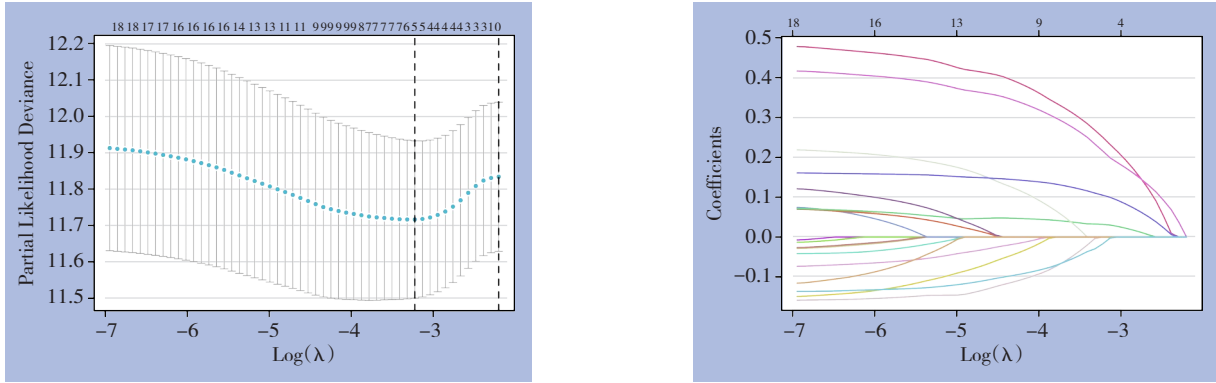


图3 TCGA-HCC队列CRGs预后模型构建

Figure 3 Prognostic model construction of CRGs in the TCGA-HCC cohort

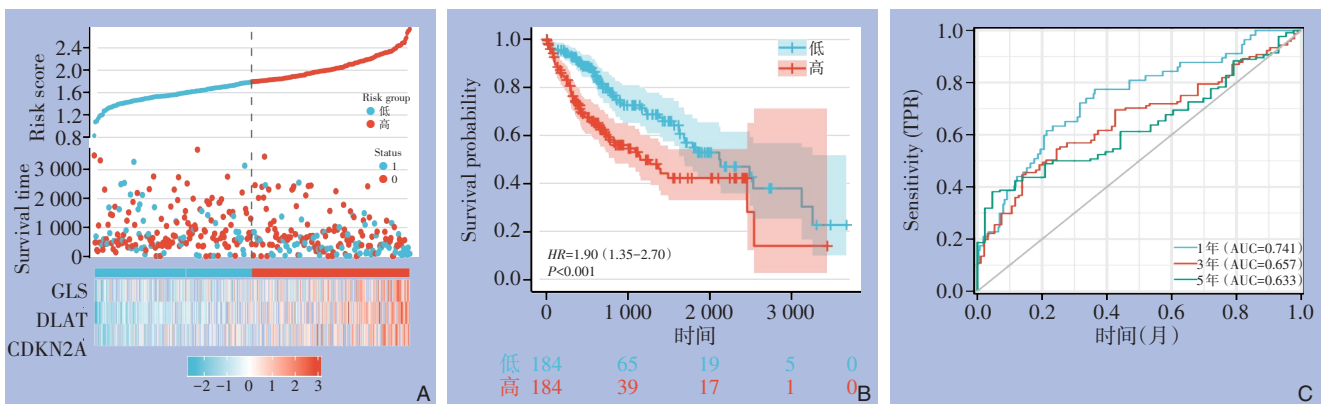


图4 TCGA HCC患者CRGs的临床相关性 A: CRGs风险评分、生存状态和预后的分布; B: Kaplan-Meier曲线; C: ROC的1、3、5年生存期预测

Figure 4 Clinical relevance of CRGs in TCGA HCC patients A: Distribution of risk score, survival status and prognosis of CRGs; B: Kaplan Meier diagram; C: The 1-, 3- and 5-year survival prediction of ROC

2.4 列线图的开发与验证

为了便于预测模型的临床应用,整合TCGA患者的临床信息和基因特征,采用多变量Cox回归将年龄、性别、T分期、N分期、M分期、病理分型、CDKN2A、GLS和DLAT纳入来建立列线图(图5)。

对OS结果采用了鉴别和校准方法(图6A)。OS的C指数为0.696(0.663~0.728),反映了列线图相对较好的预测性能。同时,校准图显示,在生存1、3、5年时,预测的OS与观察到的OS之间具有良好的一致性(图6B)。

Characteristics	Total(n)	HR(95% CI)	Univariate analysis	P
GLS	373			
低	187			
高	186	1.592(1.124-2.255)		0.009
DLAT	373			
低	186			
高	187	1.689(1.191-2.396)		0.003
CDKN2A	373			
低	187			
高	186	1.790(1.262-2.538)		0.001

Characteristics	Total(n)	HR(95% CI)	Multivariate analysis	P
GLS	373			
低	187			
高	186	1.465(1.024-2.096)		0.037
DLAT	373			
低	186			
高	187	1.481(1.034-2.122)		0.032
CDKN2A	373			
低	187			
高	186	1.747(1.229-2.483)		0.002

图5 铜死亡相关预后生物标志物的单因素和多因素Cox回归分析 A: 单因素Cox回归分析; B: 多因素Cox回归分析

Figure 5 Univariate and multivariate Cox regression of Cuproptosis-Related prognostic biomarkers A: Univariate Cox regression; B: Multivariate Cox regression

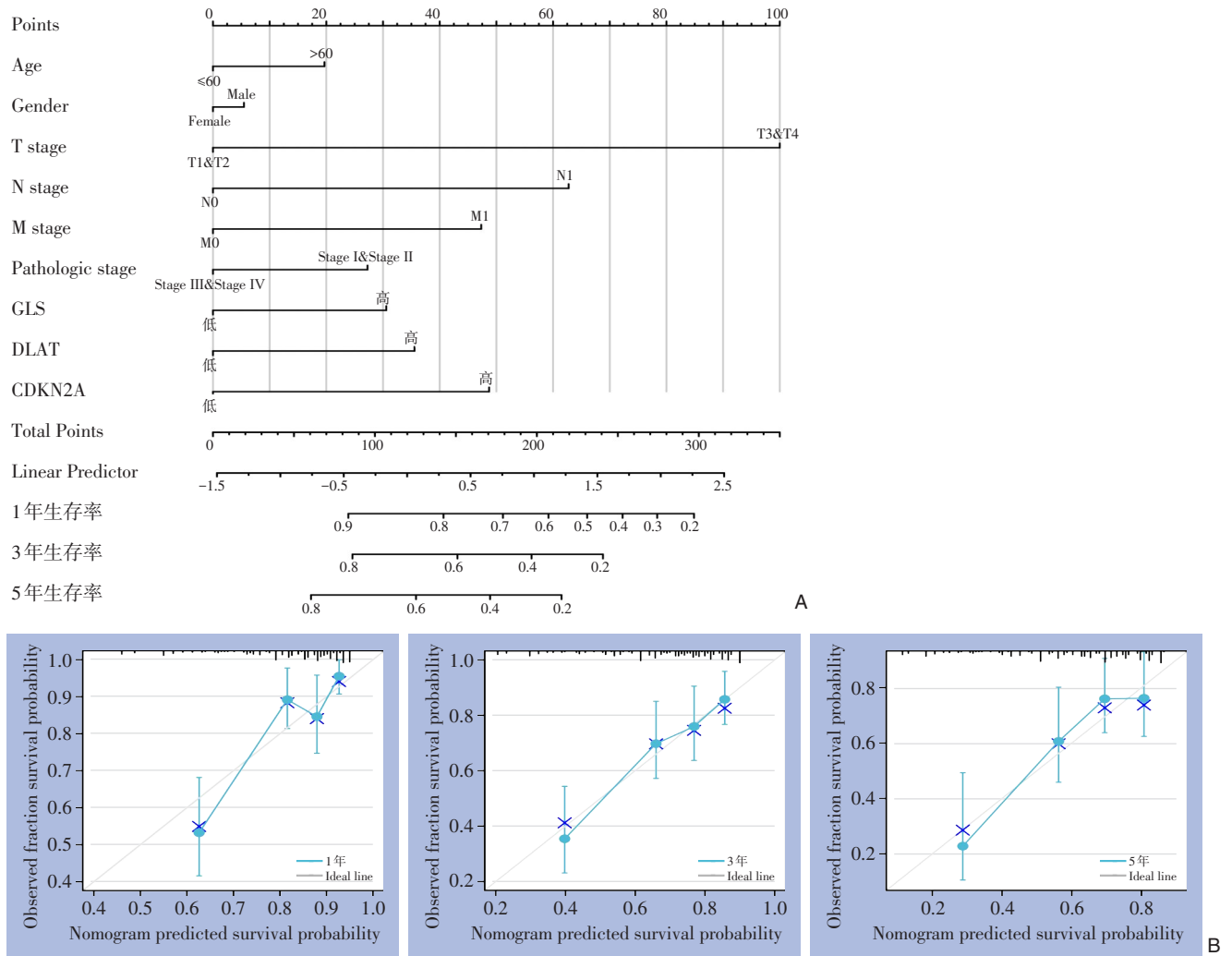


图6 预测HCC患者1、3、5年OS的列线图 and 校准曲线 A: 列线图; B: 列线图预测的校准曲线

Figure 6 Nomograms and calibration curves predicting 1-, 3- and 5-year OS of HCC patients A: Nomograms; B: Calibration curves predicted by the nomograms

2.5 HCC 中 CRGs 的表达与免疫浸润水平的相关性

目前尚不清楚 CRGs 是否会影响肿瘤微环境中的免疫细胞招募，从而影响 HCC 的预后。因此，本研究分析了 GLS、DLAT 和 CDKN2A 与 HCC 中免疫浸润的关系。GLS、DLAT 和 CDKN2A 的表达水平与 B 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞的免疫浸润水平均呈正相关（均 $P < 0.05$ ）（图 7）。结果还显示，HCC 中 GLS 的表达与 PDCD1、CD274、HAVCR2 的表达水平呈正相关（均 $P < 0.05$ ）；DLAT 的表达与 CD274 和 HAVCR2 的表达水平相关（均 $P < 0.05$ ）；CDKN2A 的表达与 PDCD1、CD274 和 HAVCR2 的表达相关（均 $P < 0.05$ ）（图 8）。

2.6 HCC 在不同病理阶段和组织学分级中的 CRGs 的差异表达

如图 9 所示，无论肿瘤分期和组织学分级如何，GLS、DLAT 和 CDKN2A 的表达均呈上升趋势。在肿瘤分期中，GLS、DLAT 和 CDKN2A 在 I、III 期的表达水平差异有统计学意义（均 $P < 0.05$ ），CDKN2A 在 I、II、III 期的表达水平差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）（图 9A-C）。在组织学分级中，除 DLAT 在组织学分级中表达水平差异无统计学意义外（ $P > 0.05$ ），GLS、CDKN2A 在 HCC 的组织学分级中的表达水平存在差异（均 $P < 0.05$ ）（图 9D-F）。以上结果表明，GLS、DLAT 和 CDKN2A 的表达水平可能与 HCC 的不良预后密切相关。

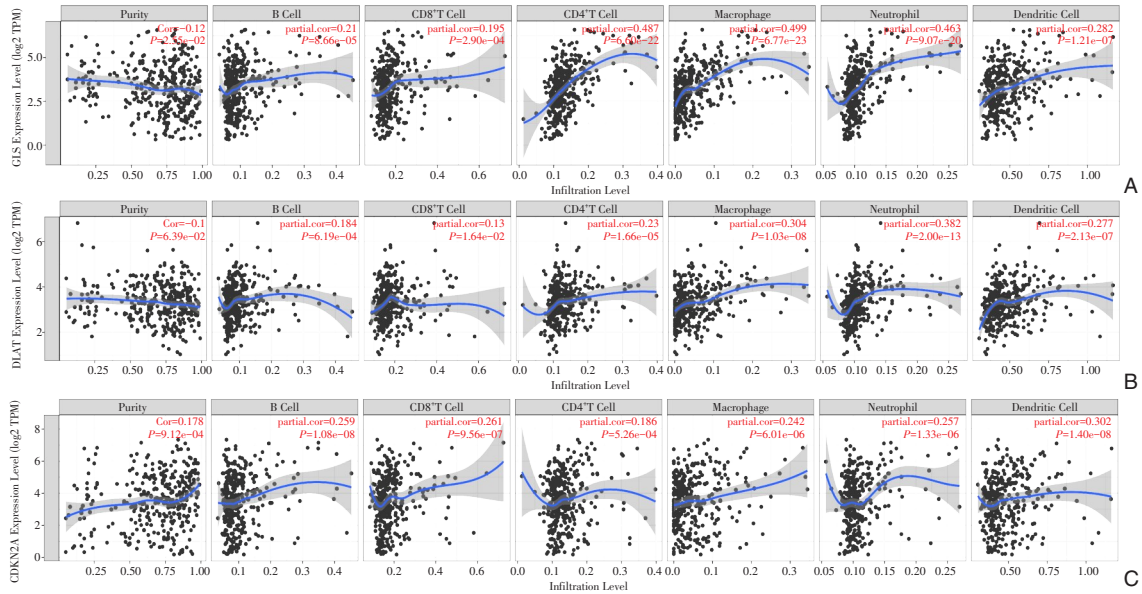


图7 TIMER数据库中的CRGs表达与免疫浸润的相关性 A: GLS; B: DLAT; C: CDKN2A

Figure 7 Correlation between the expressions of CRGs and immune infiltration in the TIMER database A: GLS; B: DLAT; C: CDKN2A

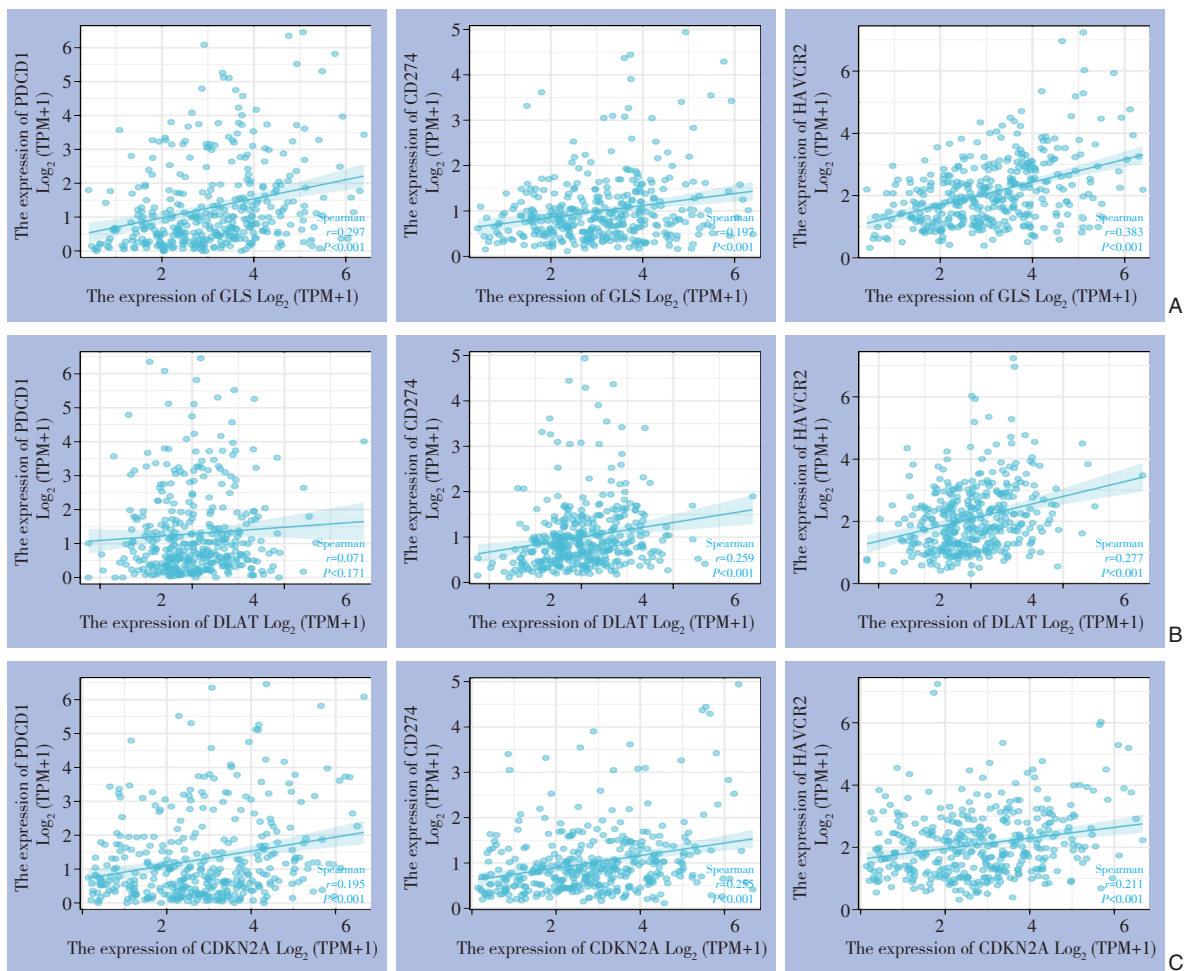


图8 HCC患者CRGs表达与免疫检查点(PDCD1、CD274、HAVCR2)表达的相关性 A: GLS; B: DLAT; C: CDKN2A

Figure 8 Correlations between the expressions of CRGs and the expressions of immune checkpoints (PDCD1, CD274 and HAVCR2) A: GLS; B: DLAT; C: CDKN2A in HCC patients

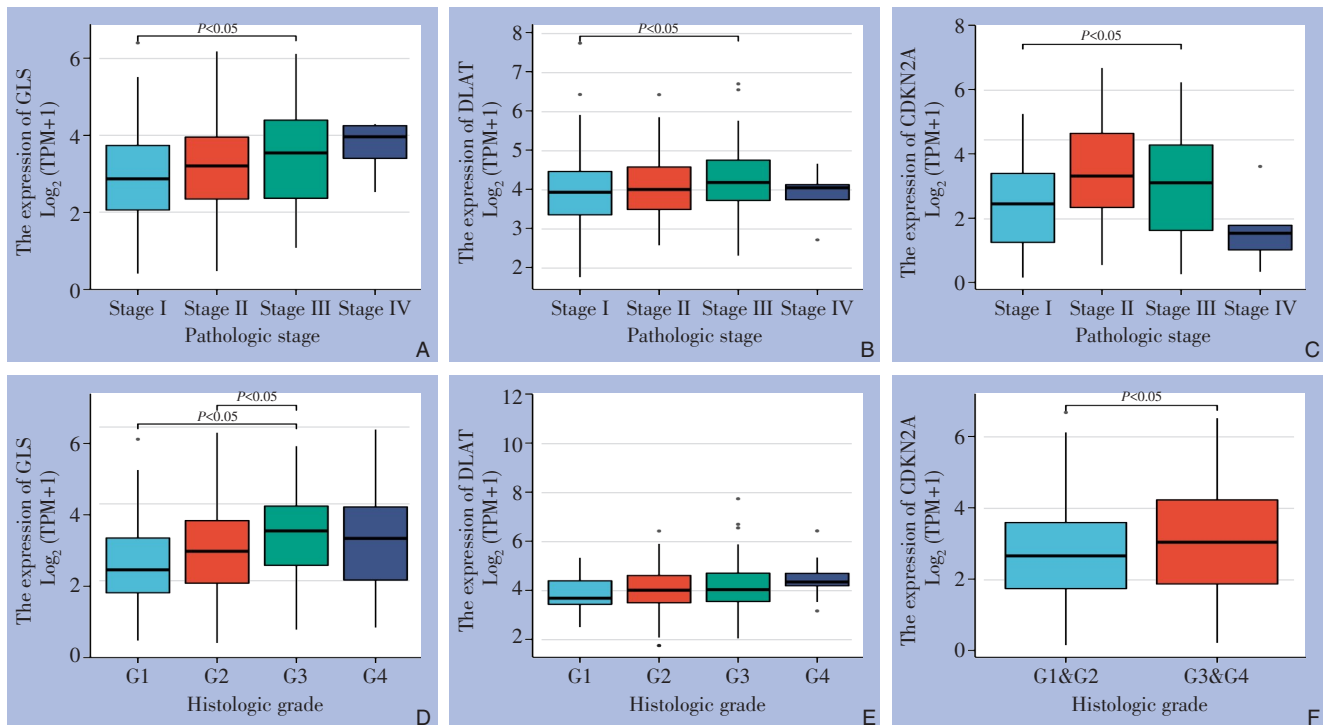


图9 GLS、DLAT和CDKN2A在不同病理特征HCC患者中的表达 A-C: 不同病理分期; D-F: 不同组织学分级
Figure 9 Expressions of GLS, DLAT and CDKN2A in HCC patients with different pathological characteristics A-C: Different Pathological stages; D-F: Different histological grades

3 讨论

铜死亡是最近新发现的一种细胞内游离铜积累, 蛋白质脂化导致细胞毒性应激诱导细胞死亡的形式^[15]。目前铜死亡在HCC中的相关机制研究较少。HCC患者发现时间较晚, 治疗潜力有限, 病死率高, 使开发稳定的预后指标变得非常重要。本研究基于TCGA数据建立了一个包含3个基因的铜死亡相关评分模型预测HCC预后, 高风险评分组HCC患者生存期短于低风险评分组。此外, 风险评分是HCC患者独立的预测因子, 与临床特征和免疫功能密切相关。

本研究通过对19个CRGs的功能分析, PDHB、PDHA1、MTF1、LIPT1、LIPT2、LIAS、GLS、DLD、DLST、DLAT、CDKN2A和ATP7A等大多数基因在HCC组织中高表达; LC31A1、GCSH、DBT和NLRP3在HCC组织中低表达, 这些结果均未见报道。CDKN2A的表达在细胞周期控制中起作用, 并与多种肿瘤的起源密切相关^[26-29]。既往研究^[30]显示, CDKN2A在子宫内膜癌中表达上调, 可能与子宫内膜癌的发病机制有关。尚未有其他研究阐明CRGs在HCC中的表达和功能。相关分析表明, 大部分CRGs之间呈正相关。GLS和PDHA1在促进前

列腺癌患者更大的谷氨酰胺依赖方面发挥了协同作用^[31]。此外, PDHA1、PDHB、DLAT和DLD在丙酮酸脱氢酶复合物缺乏症中发挥了协同作用^[32]。GO和KEGG分析显示, CRGs在TCA循环、碳代谢作用、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生和铂类药物耐药性通路中富集, 显示CRGs对于HCC的进展, 预后以及化疗耐药性等方面具有重要意义。

进一步预后分析显示, GLS、DLAT和CDKN2A水平较高的HCC患者OS较低, 表明GLS、DLAT和CDKN2A是HCC潜在的不良预后的生物标志物。有研究^[33]表明GLS可以差异地调节人类癌症的预后。另一项研究^[34]也表明CDKN2A可作为人类子宫内膜癌的预后生物标志物。Chen等^[35]发现LIPT1与尿路上皮癌生存率相关。越来越多的证据^[36]表明, 较低水平的PDHA表达与肿瘤细胞的有氧糖酵解和恶性程度显著相关。此外, 本研究进行了Lasso-Cox回归分析, 建立了一个包括GLS、DLAT和CDKN2A等与预后相关的标志物的生存模型, 它们在预测HCC患者的预后方面具有良好的表现。

在免疫浸润分析结果显示, CDKN2A、GLS和DLAT的表达与B细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞等免疫细胞的丰度呈正相关。有研究^[37]报道在HCC中,

CDKN2A 的表达与 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和中性粒细胞的浸润水平呈正相关, CDKN2A 通过影响肿瘤免疫微环境促进 HCC 进展。另一项整合生物信息学分析^[38]显示, CDKN2A 与多发性骨髓瘤中的 CD4⁺调节性 T 细胞、T 细胞衰竭和中性粒细胞等免疫信号显著相关。也有研究^[39]表明, STAT5 和 CDKN2A/CDKN2B 可促进 CD8⁺T 细胞的增殖和终末分化。Colliou 等^[40]则通过相关研究发现, DLAT 基因的表达可显著增加肠道 Th17 细胞, 从而预防相关炎症疾病。

综上所述, 本研究结果对于后续铜死亡在 HCC 的基础研究具有一定的参考价值, 可在一定程度上减少实验中的浪费。但研究仍存在一定的局限性: 第一, 尽管筛选了 HCC 铜死亡预后基因并建立了预后模型, 但没有进一步验证, 这是迫切需要在未来进行的研究; 第二, 所采用的芯片数据虽然已满足研究所需的样本量, 但仍有可能因样本量过少而导致结果存在一定偏倚; 第三, 尽管已经筛选出 HCC 相关的铜死亡基因, 但未能阐明其具体作用机制, 这有待后续研究进一步深入挖掘。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Liu X, Qiao Y, Ting X, et al. Isocitrate dehydrogenase 3A, a rate-limiting enzyme of the TCA cycle, promotes hepatocellular carcinoma migration and invasion through regulation of MTA1, a core component of the NuRD complex[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(10):3212-3229.
- [2] Wang XK, Liao XW, Huang R, et al. Clinical significance of long non-coding RNA DUXAP8 and its protein coding genes in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2020, 11(20): 6140-6156. doi: 10.7150/jca.47902.
- [3] Amicone L, Marchetti A. Microenvironment and tumor cells: two targets for new molecular therapies of hepatocellular carcinoma[J]. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3: 24. doi: 10.21037/tgh.2018.04.05.
- [4] Sun HL, Cui R, Zhou JK, et al. ERK Activation Globally Downregulates miRNAs through Phosphorylating Exportin-5[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(5): 723-736. doi: 10.1016/j.ccell.2016.10.001.
- [5] Lee EW, Khan S. Recent advances in transarterial embolotherapies in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2017, 23(4):265-272. doi: 10.3350/cmh.2017.0111.
- [6] Fekry B, Ribas-Latre A, Baumgartner C, et al. Incompatibility of the circadian protein BMAL1 and HNF4 α in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2018, 9:4349. doi: 10.1038/s41467-018-06648-6.
- [7] Lee SM, Chung CY, Liu P, et al. Activity-based sensing with a metal-directed acyl imidazole strategy reveals cell type-dependent pools of labile brain copper[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(35): 14993-15003. doi: 10.1021/jacs.0c05727.
- [8] Blockhuys S, Celauro E, Hildesjö C, et al. Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers[J]. *Metallomics*, 2017, 9(2): 112-123. doi: 10.1039/c6mt00202a.
- [9] Ge EJ, Bush AI, Casini A, et al. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(2):102-113. doi: 10.1038/s41568-021-00417-2.
- [10] Ishida S, Andreux P, Poitry-Yamate C, et al. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(48):19507-19512. doi: 10.1073/pnas.1318431110.
- [11] Babak MV, Ahn D. Modulation of intracellular copper levels as the mechanism of action of anticancer copper complexes: clinical relevance[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 852. doi: 10.3390/biomedicines9080852.
- [12] Davis CI, Gu XX, Kiefer RM, et al. Altered copper homeostasis underlies sensitivity of hepatocellular carcinoma to copper chelation[J]. *Metallomics*, 2020, 12(12):1995-2008. doi: 10.1039/d0mt00156b.
- [13] Chen D, Cui QC, Yang HJ, et al. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(21): 10425-10433. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2126.
- [14] O'Day SJ, Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, et al. Final results of phase III SYMMETRY study: randomized, double-blind trial of elesclomol plus paclitaxel versus paclitaxel alone as treatment for chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(9):1211-1218. doi: 10.1200/JCO.2012.44.5585.
- [15] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J]. *Science*, 2022, 375(6586):1254-1261. doi: 10.1126/science.abf0529.
- [16] 张燕军, 赵东海, 黄昌霞, 等. 肝硬化和肝癌患者体内铜含量变化及其临床意义[J]. *中华内科杂志*, 1994, 33(2): 113-116. doi: 10.1007/BF02007173. Zhang YJ, Zhao DH, Huang CX, et al. The change of copper contents and its clinical significance in patients with liver cirrhosis and hepatocarcinoma[J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 1994, 33(2):113-116. doi: 10.1007/BF02007173.
- [17] Koizumi M, Fujii J, Suzuki K, et al. A marked increase in free copper levels in the plasma and liver of LEC rats: an animal model for Wilson disease and liver cancer[J]. *Free Radic Res*, 1998, 28(5):

- 441–450. doi: [10.3109/10715769809066881](https://doi.org/10.3109/10715769809066881).
- [18] Siddiqui MA, Alhadlaq HA, Ahmad J, et al. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e69534. doi: [10.1371/journal.pone.0069534](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069534).
- [19] Yang LQ, Yu JL, Tao L, et al. Cuproptosis-related lncRNAs are biomarkers of prognosis and immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Front Genet, 2022, 13: 947551. doi: [10.3389/fgene.2022.947551](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.947551).
- [20] Frankish A, Diekhans M, Ferreira AM, et al. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D766–773. doi: [10.1093/nar/gky955](https://doi.org/10.1093/nar/gky955).
- [21] Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, et al. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics[J]. Cell, 2018, 173(2):400–416. doi: [10.1016/j.cell.2018.02.052](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.052).
- [22] Yu GC, Wang LG, Han YY, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS A J Integr Biol, 2012, 16(5):284–287. doi: [10.1089/omi.2011.0118](https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118).
- [23] Franz M, Rodriguez H, Lopes C, et al. GeneMANIA update 2018[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1):W60–64. doi: [10.1093/nar/gky311](https://doi.org/10.1093/nar/gky311).
- [24] Li TW, Fan JY, Wang BB, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. Cancer Res, 2017, 77(21): e108–110. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-17-0307](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0307).
- [25] Brown GW, Hayden GF. Nonparametric methods. Clinical applications[J]. Clin Pediatr (Phila), 1985, 24(9): 490–498. doi: [10.1177/000992288502400905](https://doi.org/10.1177/000992288502400905).
- [26] Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16[J]. Int J Cancer, 2012, 130(8):1715–1725. doi: [10.1002/ijc.27316](https://doi.org/10.1002/ijc.27316).
- [27] Kimura H, Klein AP, Hruban RH, et al. The role of inherited pathogenic CDKN2A variants in susceptibility to pancreatic cancer[J]. Pancreas, 2021, 50(8): 1123–1130. doi: [10.1097/MPA.0000000000001888](https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001888).
- [28] Śledzińska P, Bebyn MG, Furtak J, et al. Prognostic and predictive biomarkers in gliomas[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19):10373. doi: [10.3390/ijms221910373](https://doi.org/10.3390/ijms221910373).
- [29] Bui TO, Dao VT, Nguyen VT, et al. Genomics of clear-cell renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur Urol, 2022, 81(4): 349–361. doi: [10.1016/j.eururo.2021.12.010](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.12.010).
- [30] Su L, Wang HW, Miao JW, et al. Clinicopathological significance and potential drug target of CDKN2A/p16 in endometrial carcinoma[J]. Sci Rep, 2015, 5:13238. doi: [10.1038/srep13238](https://doi.org/10.1038/srep13238).
- [31] Li YQ, Li XR, Li XL, et al. PDHA1 gene knockout in prostate cancer cells results in metabolic reprogramming towards greater glutamine dependence[J]. Oncotarget, 2016, 7(33): 53837–53852. doi: [10.18632/oncotarget.10782](https://doi.org/10.18632/oncotarget.10782).
- [32] Inui T, Wada Y, Shibuya M, et al. Intravenous ketogenic diet therapy for neonatal-onset pyruvate dehydrogenase complex deficiency[J]. Brain Dev, 2022, 44(3): 244–248. doi: [10.1016/j.braindev.2021.11.005](https://doi.org/10.1016/j.braindev.2021.11.005).
- [33] Saha SK, Islam SMR, Abdullah-AI-Wadud M, et al. Multiomics analysis reveals that GLS and GLS2 differentially modulate the clinical outcomes of cancer[J]. J Clin Med, 2019, 8(3):355. doi: [10.3390/jcm8030355](https://doi.org/10.3390/jcm8030355).
- [34] Zhang J, Wang ZW, Zhao R, et al. An integrated autophagy-related gene signature predicts prognosis in human endometrial Cancer[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 1030. doi: [10.1186/s12885-020-07535-4](https://doi.org/10.1186/s12885-020-07535-4).
- [35] Chen YB, Xu T, Xie F, et al. Evaluating the biological functions of the prognostic genes identified by the Pathology Atlas in bladder cancer[J]. Oncol Rep, 2021, 45(1): 191–201. doi: [10.3892/or.2020.7853](https://doi.org/10.3892/or.2020.7853).
- [36] Zhong Y, Huang R, Li X, et al. Decreased Expression of PDHE1 α Predicts Worse Clinical Outcome in Esophageal Squamous Cell Carcinoma[J]. Anticancer Res, 2015, 35(10):5533–5538.
- [37] Luo JP, Wang J, Huang JH. CDKN2A is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in hepatocellular carcinoma[J]. Biosci Rep, 2021, 41(10): BSR20211103. doi: [10.1042/BSR20211103](https://doi.org/10.1042/BSR20211103).
- [38] Tuerxun N, Wang J, Qin YT, et al. Identification of key genes and miRNA-mRNA regulatory networks associated with bone marrow immune microenvironment regulations in multiple myeloma by integrative bioinformatics analysis[J]. Hematology, 2022, 27(1): 506–517. doi: [10.1080/16078454.2022.2068873](https://doi.org/10.1080/16078454.2022.2068873).
- [39] Grange M, Giordano M, Mas A, et al. Control of CD8 T cell proliferation and terminal differentiation by active STAT5 and CDKN2A/CDKN2B[J]. Immunology, 2015, 145(4): 543–557. doi: [10.1111/imm.12471](https://doi.org/10.1111/imm.12471).
- [40] Colliou N, Ge Y, Sahay B, et al. Commensal Propionibacterium strain UF1 mitigates intestinal inflammation via Th17 cell regulation[J]. J Clin Invest, 2017, 127(11): 3970–3986. doi: [10.1172/JCI95376](https://doi.org/10.1172/JCI95376).

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 孟云, 董保龙, 董晓骅, 等. 铜死亡相关基因在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(1):74–86. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.01.006](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.01.006)

Cite this article as: Meng Y, Dong BL, Dong XH, et al. Expressions of cuproptosis-related genes in hepatocellular carcinoma and their clinical significance[J]. Chin J Gen Surg, 2023, 32(1): 74–86. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.01.006](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.01.006)