



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.01.009  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.01.009  
China Journal of General Surgery, 2024, 33(1):74-87.

· 基础研究 ·

## 肝癌铜死亡相关基因及其与预后、免疫浸润的关系分析

陈伟毅<sup>1</sup>, 胡柯<sup>1</sup>, 刘雨<sup>2</sup>, 彭靖<sup>3</sup>, 李小成<sup>3</sup>, 段绍毅<sup>1</sup>, 陈立军<sup>1</sup>, 杨骐彰<sup>1</sup>

(湖南医药学院 1. 医学院 2. 基础医学院, 湖南 怀化 418000; 3. 湖南医药学院第一附属医院 普通外科, 湖南 怀化 418000)

### 摘要

**背景与目的:** 肝癌是消化道恶性肿瘤之一, 发病率高、病死率高。铜死亡是一种铜依赖、新型的细胞死亡方式, 继发于铜过载诱发的线粒体功能受损。铜死亡在多种肿瘤中扮演重要作用, 但其与肝癌的关系尚不清楚。因此, 本研究探讨铜死亡相关基因在肝癌中的表达特征, 以及与肝癌预后及免疫浸润的关系。

**方法:** 从TCGA和GTEx数据库下载肝癌和正常肝脏组织转录组数据进行差异表达和突变分析。采用R语言“clusterProfiler”包进行GO和KEGG富集分析。采用LASSO、单因素和多因素回归分析筛选影响肝癌患者预后的基因并构建风险因子图。使用R包“rms”构建列线图。使用UALCAN数据库分析铜死亡相关基因与肝癌临床病理特征的关系并验证。使用Spearman相关性分析铜死亡相关基因与免疫细胞浸润和免疫检查点的相关性。采用TIMER2.0数据库分析铜死亡相关基因表达与肿瘤相关成纤维细胞(CAF)浸润的相关性, 采用TISDB数据库分析CDKN2A和DLAT表达与髓源抑制性细胞(MDSC)浸润丰度的相关性。

**结果:** 与正常肝脏组织比较, 9个铜死亡相关基因在肝癌中表达显著升高, CDKN2A突变频率最高。铜死亡相关基因主要参与蛋白质脂酰化、三羧酸循环、柠檬酸循环等生物过程。基于LASSO、单因素与多因素回归分析筛选出影响肝癌患者总体生存率(OS)的基因CDKN2A和DLAT, 并以此构建风险因子图, 时间依赖性受试者工作特征曲线显示其具有较好的预测能力。通过单因素和多因素回归分析筛选出CDKN2A、DLAT、T分期和肿瘤状态是影响肝癌患者OS的独立预后因素, 基于上述因素构建了列线图, 校正曲线显示该列线图预测和实际观察之间有很好的 consistency。UALCAN数据库分析发现CDKN2A、DLAT与肝癌临床分期、肿瘤分级有关, 且GEO数据库、HPA数据库及肝癌细胞中的验证结果与之一致。相关性分析显示, CDKN2A和DLAT表达与免疫细胞浸润和免疫检查点表达相关; TIMER2.0数据库分析显示, DLAT表达与CAF浸润明显正相关; TISDB数据库分析显示, CDKN2A和DLAT表达与MDSC浸润丰度无相关性。

**结论:** 铜死亡相关基因CDKN2A、DLAT可能是肝癌新的预后生物标志物和免疫治疗的新靶点。

### 关键词

肝肿瘤; 铜死亡; 预后; 计算生物学

中图分类号: R735.7

**基金项目:** 湖南省自然科学基金资助项目(2022JJ50290); 湖南省卫生健康委科研立项课题基金资助项目(202104081483); 国家级大学生创新创业训练计划基金资助项目(202212214009); 2022年度湖南省大学生创新创业训练计划基金资助项目(5021)。

**收稿日期:** 2023-10-07; **修订日期:** 2023-12-21。

**作者简介:** 陈伟毅, 湖南医药学院讲师, 主要从事消化系统肿瘤防治方面的研究。

**通信作者:** 陈伟毅, Email: cwyeason@163.com

## Analysis of cuproptosis-related genes in liver cancer and their association with prognosis and immune infiltration

CHEN Weiyi<sup>1</sup>, HU Ke<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>2</sup>, PENG Jing<sup>3</sup>, LI Xiaocheng<sup>3</sup>, DUAN Shaoyi<sup>1</sup>, CHEN Lijun<sup>1</sup>, YANG Qizhang<sup>1</sup>

(1. School of Medicine 2. School of Basic Medical Sciences, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China,

3. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China)

### Abstract

**Background and Aims:** Liver cancer is one of the malignant tumors of the digestive system, characterized by high incidence and mortality rates. Cuproptosis, a novel copper-dependent form of cell death, occurs as a result of mitochondrial dysfunction induced by copper overload. Cuproptosis plays a significant role in various tumors, but its relationship with liver cancer remains unclear. Therefore, this study was conducted to investigate the expression characteristics of cuproptosis-related genes in liver cancer and their association with prognosis and immune infiltration.

**Methods:** Transcriptome data of liver cancer and normal liver tissues were downloaded from TCGA and GTEx databases for differential expression and mutation analysis. The R language "clusterProfiler" package was used for GO and KEGG enrichment analysis. LASSO, univariate, and multivariate regression analyses were employed to screen genes affecting the prognosis of liver cancer patients and a risk factor graph was constructed. A nomogram was constructed using the "rms" package in R. The UALCAN database was used to analyze the relationship between cuproptosis-related genes and clinicopathologic features of liver cancer and then the findings were validated. Spearman correlation analysis was used to examine the correlation between cuproptosis-related genes and immune cell infiltration and immune checkpoint expressions. TIMER2.0 database was used to analyze the correlation between the expressions of copper cuproptosis-related genes and cancer-associated fibroblast (CAF) infiltration, while TISDB database was utilized to analyze the correlation between CDKN2A and DLAT expression and myeloid-derived suppressor cell (MDSC) infiltration abundance.

**Results:** Compared to normal liver tissue, nine cuproptosis-related genes showed significantly increased expression in liver cancer, with CDKN2A having the highest mutation frequency. These genes were mainly involved in processes such as protein lipidation, tricarboxylic acid cycle, and citric acid cycle. Based on LASSO, univariate, and multivariate regression analysis, CDKN2A and DLAT were identified as genes influencing the overall survival (OS) of liver cancer patients, and a risk factor graph was constructed. Time-dependent ROC curves indicated their good predictive ability. Univariate and multivariate regression analysis revealed that CDKN2A, DLAT, T stage, and tumor status were independent prognostic factors for OS in liver cancer patients. A nomogram was constructed based on these factors, and calibration curves demonstrated good consistency between the predicted and observed values. UALCAN database analysis found associations of CDKN2A and DLAT with clinical stage and tumor grade in liver cancer, with validation results from GEO and HPA database as well as liver cancer cells aligning with these findings. Correlation analysis indicated that the expressions of CDKN2A and DLAT were correlated with immune cell infiltration and immune checkpoint expressions. TIMER2.0 database analysis revealed a significant positive correlation between DLAT expression and CAF infiltration, while TISDB database analysis showed no correlation of CDKN2A and DLAT expression with MDSC infiltration abundance.

**Conclusion:** Cuproptosis-related genes CDKN2A and DLAT may serve as novel prognostic biomarkers and potential targets for immunotherapy in liver cancer.

**Key words** Liver Neoplasms; Cuproptosis; Prognosis; Computational Biology

**CLC number:** R735.7

原发性肝癌又称为肝癌，是消化道恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。据最新统计，肝癌发病率在全国癌症发病率中占第4位，病死率占癌症死因第2位，因此肝癌已成为严重危害人们身体健康的主要疾病之一<sup>[2]</sup>。针对肝癌的治疗，首选手术切除，然而由于肝癌发病隐匿、侵袭性强、进展迅速、早期诊断困难，大多数肝癌患者在确诊时往往已进入疾病的中晚期或发生了远处转移，失去了手术机会，而其他的治疗如局部射频消融、经导管动脉化疗栓塞、全身化疗等效果并不理想<sup>[3-4]</sup>。因此，寻找新的生物标志物和治疗靶点对提高肝癌的临床疗效至关重要。

最近，一种新的细胞死亡形式—铜死亡被发现<sup>[5]</sup>。铜死亡是由于铜离子在细胞内的过度积累导致硫辛酰化蛋白异常聚集，干扰线粒体呼吸相关的铁硫簇蛋白，引起蛋白质毒性应激反应，最终导致细胞死亡，与目前已知的其他细胞死亡形式，如细胞凋亡、铁死亡、自噬和程序性坏死等不同<sup>[6-7]</sup>。

研究<sup>[8-9]</sup>发现铜离子水平在肝癌患者血清及肝脏中明显升高，血清铜和铜蓝蛋白水平可作为检测肝癌的标志物。有研究<sup>[10]</sup>报道肝癌患者血清铜离子水平与肝癌特异性生存期和总体生存期显著相关，表明血清铜水平可能是肝癌患者生存期的独立预测因子。同时有文献<sup>[11]</sup>表明使用铜处理肝癌细胞可增强其增殖和迁移能力。上述研究表明铜离子在肝癌的发生发展中起着重要作用，诱导铜死亡可能是治疗肝癌一个新的途径。

因此，本研究采用生物信息学方法研究铜死亡相关基因与肝癌预后和免疫浸润的关系，以期为肝癌的治疗和预后评估提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

从TCGA数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 中下载了来自肝癌 (TCGA-LIHC) 队列的424例样本转录组数据及其临床信息，其中正常肝脏组织样本53例，肝癌组织样本371例 (表1)，去除临

床信息缺失的样本，从 Genotype-Tissue Expression (GTEx) (<https://commonfund.nih.gov/GTEx>) 数据库下载了110例正常肝脏组织的转录组数据。采用R (4.2.1) 软件将转录组数据标准化为 Transcripts per million (TPM) 格式，并转换为 log<sub>2</sub> (TPM+1)。

**表1 TCGA-LIHC数据集中肝癌患者的临床信息[n (%)]**  
**Table 1 The clinical information of liver cancer patients in the TCGA-LIHC dataset [n (%)]**

资料	数值
T分期	
T1	195(52.6)
T2	84(22.6)
T3	78(21.0)
T4	14(3.8)
N分期 <sup>1)</sup>	
N0	255(69.1)
N1	2(0.5)
Nx	112(30.4)
M分期	
M0	271(73.0)
M1	6(1.6)
Mx	94(25.4)
生存情况	
存活	219(59.0)
死亡	152(41.0)
性别	
女	128(34.5)
男	243(65.5)

注:1)369例有N分期资料

Note: 1) 369 cases with N stage information

### 1.2 方法

**1.2.1 铜死亡相关基因表达差异和突变分析** 10个铜死亡相关基因 (LIPT1、CDKN2A、GLS、FDX1、MTF1、PDHA、DLAT、LIAS、PDHB、DLD) 来源于 Tsvetkov 等<sup>[12]</sup> 的一项报道。采用 Wilcoxon rank sum test 比较铜死亡相关基因在肝癌组织和正常肝脏组织中的表达差异。采用R软件中的“maftools”分析铜死亡相关基因的突变景观。

**1.2.2 GO和KEGG富集分析、蛋白质互作(PPI)网络** 使用R软件中的“clusterProfiler”包对铜死亡相关基因进行GO和KEGG富集分析，采用

GeneMANIA 网站 (<http://genemania.org>) 构建 PPI 互作网络。

**1.2.3 风险因子图构建** 首先采用 LASSO 回归分析来缩小基因范围,之后通过单因素和多因素回归分析筛选影响肝癌患者总体生存率 (overall survival, OS) 的预后基因。根据多因素回归结果,采用公式计算患者风险评分 =  $\sum$  (每个基因表达量  $\times$  多因素回归系数),根据风险评分的中位数将患者分为高风险组和低风险组,并构建风险因子图。采用 Kaplan-Meier 生存曲线比较高风险组和低风险组患者 OS 的差异。采用 R 包 “Survival ROC” 绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线分析风险因子图预测患者 OS 的特异度和敏感度。采用 Kaplan-Meier 生存曲线比较 CDKN2A/DLAT/GLS 高表达组与低表达组之间患者 OS 的差异。

**1.2.4 列线图构建** 采用单因素和多因素回归分析筛选影响肝癌患者 OS 的独立预后因素,然后基于上述因素使用 R 包 “rms” 构建列线图,绘制校正曲线评估列线图的预测准确性。

**1.2.5 CDKN2A 和 DLAT 在肝癌不同临床病理特征的表达差异** 采用 UALCAN 数据库分析 CDKN2A 和 DLAT 在肝癌各个临床分期、肿瘤分级之间的表达差异。

**1.2.6 CDKN2A 和 DLAT 在肝癌中的表达验证** 从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 下载 GSE144269、GSE207435 两个数据集, GSE144269 包含 70 例配对肝癌组织样本, GSE207435 包含 27 例配对肝癌组织样本,采用独立样本 *t* 检验比较 CDKN2A 和 DLAT 在肝癌组织和正常肝脏组织中的表达差异。利用人类蛋白图谱 (HPA) (<https://www.proteinatlas.org>) 数据库中的组织化学染色验证 CDKN2A 和 DLAT 蛋白在肝癌组织和正常肝脏组织中的表达差异。

**1.2.7 细胞来源及细胞培养** 人肝癌 HepG2、HuH-7 细胞、人正常肝细胞 QSG-7701 购于中国科学院上海细胞库,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养。

**1.2.8 Western blot 检测蛋白表达** 使用 RIPA 裂解液对不同细胞冰上裂解 30 min, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清,使用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 $\times$  蛋白质上样缓冲液,95 °C 加热 10 min 使蛋白变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 (1:1 000) 4 °C 过夜孵育。TBST 洗膜后,与一抗相应种属的

二抗 (1:10 000) 室温孵育 2 h。TBST 洗膜后进行化学发光显影。以 GAPDH 为内参计算蛋白相对表达量。CDKN2A、DLAT、GAPDH 抗体均购自美国 Abcam 公司。

**1.2.9 免疫浸润相关性分析** 采用 R 包 “GSVA” 中的 ssGSEA 法计算 24 种免疫细胞 (aDC、B cells、CD8 T cells、cytotoxic cells、DC、eosinophils、iDC、macrophages、mast cells、neutrophils、NK CD56bright cells、NK CD56dim cells、NK cells、pDC、T cells、T helper cells、Tcm、Tem、Tfh、Tgd、Th1 cells、Th17 cells、Th2 cells、Treg) 的浸润丰度,利用 Spearman 相关性分析 CDKN2A 和 DLAT 表达与 24 种免疫细胞浸润丰度的相关性。采用 TIMER2.0 数据库分析 CDKN2A 和 DLAT 表达与肿瘤相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblast, CAF) 细胞浸润的相关性,采用 TISDB 数据库分析 CDKN2A 和 DLAT 表达与髓源抑制性细胞 (MDSC) 浸润丰度的相关性。采用 Spearman 相关性分析 CDKN2A/DLAT 表达与免疫检查点 CD274、CTLA4、HAVCR2、LAG3、PDCD1、TIGIT、PDCD1LG2 表达之间的相关性。

## 1.3 统计学处理

数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 R (4.2.1) 软件进行统计分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 铜死亡相关基因在肝癌中的表达、相关性及突变情况

在 10 个铜死亡相关基因中,9 个基因 (CDKN2A、DLD、DLAT、LIAS、GLS、LIPT1、MTF1、PDHA1、PDHB) 在肝癌组织中表达明显升高 (均  $P < 0.05$ ),1 个基因 (FDX1) 在肝癌组织和正常肝组织中表达无明显差异 ( $P > 0.05$ ) (图 1A)。相关性分析发现 10 个铜死亡相关基因彼此互相关联,其中 DLAT 与 MTF1 呈高度正相关 ( $r = 0.567$ ,  $P < 0.001$ )

(图 1B-C)。基因突变分析发现在 364 例肝癌样本中,有 18 例样本铜死亡相关基因发生了体细胞突变,占 4.95% (图 1D),其中错义突变是最常见的突变类型,单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是最普遍的 DNA 变异,C>T 和 C>A 是最常见的单核苷酸变异类型,CDKN2A 突变频率最高 (图 1E)。

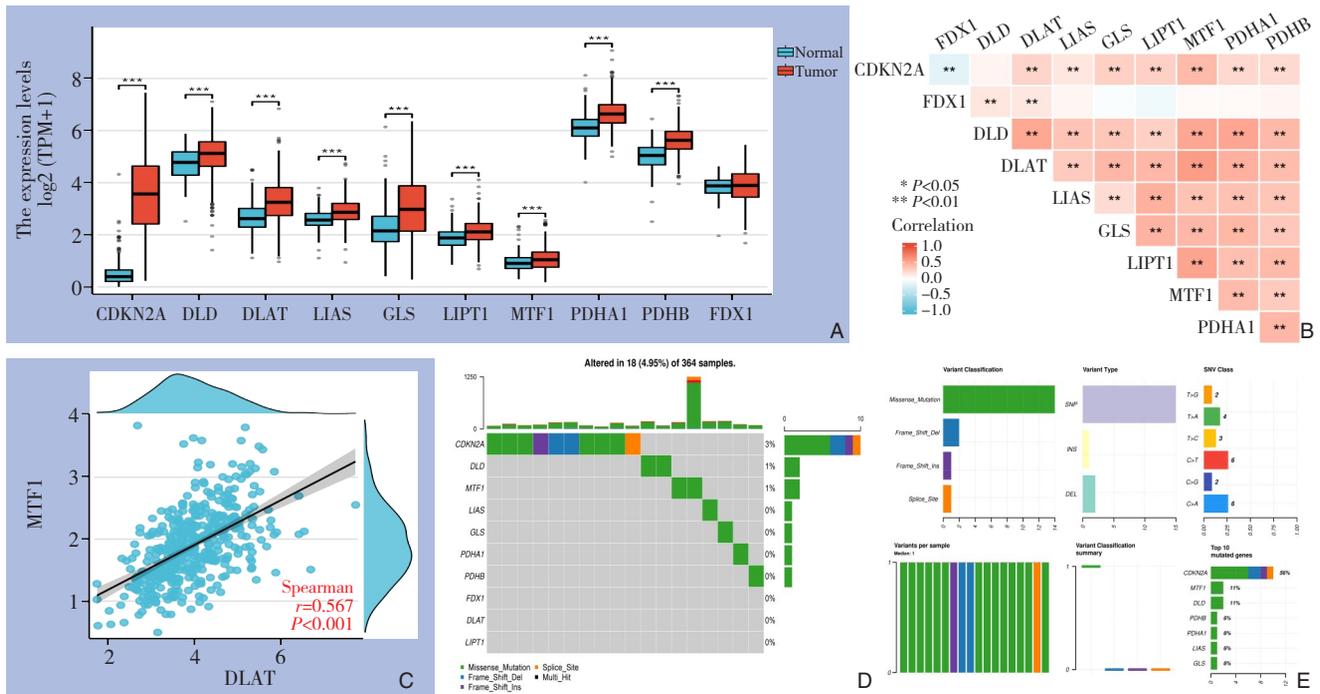


图1 铜死亡相关基因在肝癌中的表达、相关性和突变情况 A: 铜死亡相关基因在肝癌组织和正常肝组织中的表达差异; B: 铜死亡相关基因的相关性分析; C: DLAT与MTF1的相关性; D-E: 铜死亡相关基因的突变频率和突变类型

Figure 1 Expression pattern, correlation and mutation of cuproptosis-related genes in liver cancer A: The expression of cuproptosis-related genes in liver cancer and normal tissues; B: Correlation between the expression of cuproptosis-related genes; C: Correlation between the expression of DLAT and MTF1; D-E: Mutation frequency and classification of cuproptosis-related genes in liver cancer

### 2.2 铜死亡相关基因GO、KEGG富集分析和PPI网络

对10个铜死亡相关基因进行GO富集分析,结果显示,10个基因主要参与乙酰辅酶A从丙酮酸生物合成过程、蛋白质脂酰化、三羧酸循环、葡萄糖代谢过程、氧化应激反应等生物学功能(图2A)。KEGG富集分析显示,10个基因主要参与硫辛酸代谢、柠檬酸(TCA)循环、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生、癌症的中心碳代谢等(图2B)。利用GeneMANIA网站构建了10个基因的PPI网络,发现DLAT、PDHB、DLD、PDHA1为核心基因(图2C)。

### 2.3 基于铜死亡相关基因的风险因子图构建

首先对10个铜死亡相关基因进行LASSO回归以缩小基因范围,从中筛选出CDKN2A、DLAT、

GLS和LIPT1等四个肝癌OS预后相关基因(图3),然后采用单因素和多因素回归分析,确定CDKN2A和DLAT是影响肝癌患者OS的预后相关基因(表2)。根据公式:风险评分=0.573×CDKN2A表达量+0.409×DLAT表达量,计算肝癌患者的风险评分。根据风险评分的中位数,将肝癌患者分为低风险组和高风险组,并构建风险因子图(图4A)。Kaplan-Meier生存分析显示低风险组患者比高风险组患者有更好的OS(图4B)。时间依赖性ROC曲线显示风险因子模型1、3、5年的曲线下面积(area under curve, AUC)值分别为0.736、0.642、0.630,表明该模型具有较好的预测能力(图4C)。Kaplan-Meier生存分析显示低表达CDKN2A、DLAT、GLS患者比高表达CDKN2A、DLAT、GLS患者有更好的OS(图4D-F)。

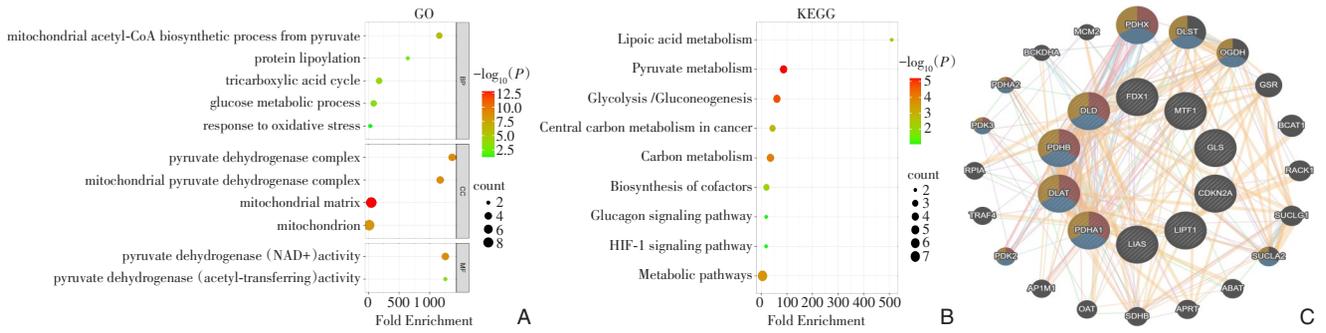


图 2 GO、KEGG 富集分析和 PPI 网络 A: GO 富集分析; B: KEGG 富集分析; C: PPI 网络

Figure 2 GO, KEGG pathway enrichment and PPI network analysis A: GO enrichment analysis; B: KEGG pathway enrichment analysis; C: PPI network analysis

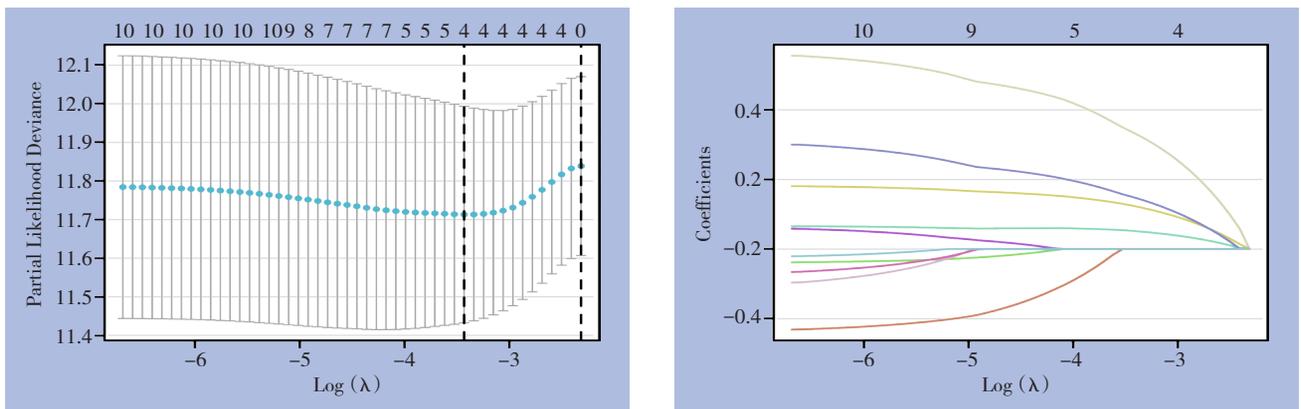


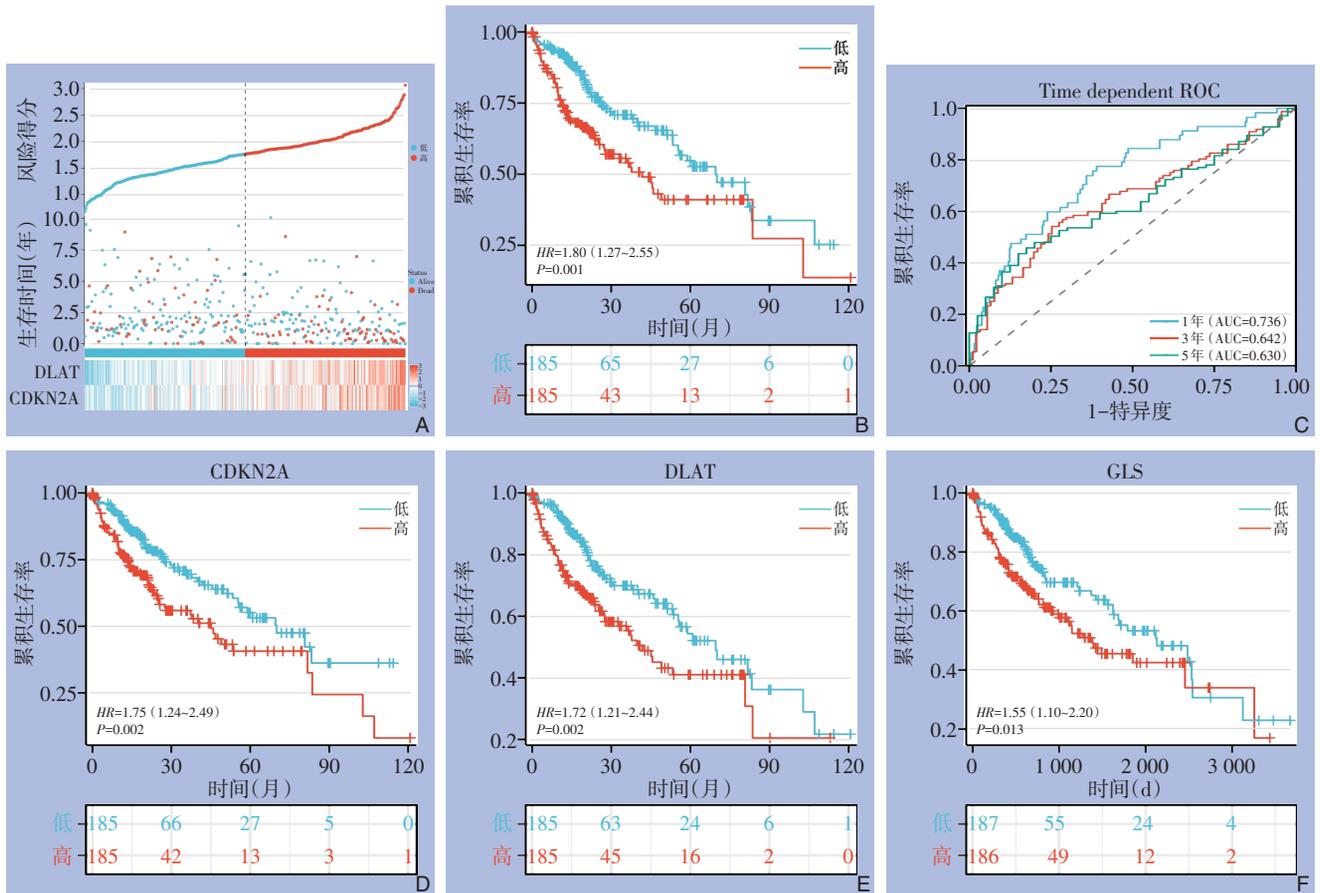
图 3 铜死亡相关基因 LASSO 回归分析

Figure 3 Cuproptosis-related genes screened by the Lasso cox regression analysis

表 2 单因素和多因素 Cox 回归分析筛选 OS 相关因素

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis of factors for OS

基因	n	单因素		多因素	
		HR	P	HR	P
CDKN2A					
低	187	—		—	
高	186	1.763(1.243~2.501)	<0.01	1.774(1.249~2.521)	<0.01
DLAT					
低	186	—		—	
高	187	1.627(1.148~2.307)	<0.01	1.505(1.050~2.157)	<0.05
GLS					
低	187	—		—	
高	186	1.552(1.096~2.197)	<0.05	1.369(0.952~1.967)	0.09
LIPT1					
低	187	—		—	
高	186	1.354(0.955~1.920)	0.089	1.223(0.857~1.746)	0.266



**图 4 基于铜死亡相关基因的风险因子图构建** A: 基于 CDKN2A 和 DLAT 的风险因子图; B: Kaplan-Meier 生存曲线比较高风险组和低风险组患者 OS; C: 时间依赖 ROC 曲线评估风险因子图模型预测能力; D-F: CDKN2A、DLAT、GLS 高表达组和低表达组患者 Kaplan-Meier 生存曲线比较

**Figure 4 Construction of the risk score model of cuproptosis-related genes in liver cancer** A: The risk score model based on CDKN2A and DLAT; B: Kaplan-Meier survival analysis of the high-risk group and low-risk group; C: Time-dependent ROC curves assessing the prediction ability of the risk score model; D-F: Comparison of Meier survival curves between patients with high and low CDKN2A, DLAT and GLS expressions

**2.4 基于铜死亡相关基因的肝癌预后列线图的构建与验证**

通过单因素和多因素 Cox 回归分析，确定 CDKN2A、DLAT、T 分期和肿瘤状态是肝癌患者 OS 的独立预后因素（图 5A-B），基于上述因素构建了预测肝癌患者 1、3、5 年 OS 的列线图（图 5C）。校正曲线显示该列线图预测和实际观察之间有很好的 consistency（图 5D）。

**2.5 铜死亡相关基因 CDKN2A 和 DLAT 与肝癌临床病理特征的关系**

采用 UALCAN 数据库分析 CDKN2A 和 DLAT 与肝癌临床病理特征的相关性。结果显示，CDKN2A 在肝癌临床分期 1、2、3 期中的表达均显著高于正

常组织，其中在临床 2、3 期的表达均明显高于临床 1、4 期，表明 CDKN2A 与肝癌临床分期相关（图 6A）。其次，CDKN2A 在肝癌各肿瘤分级中的表达均明显高于正常组织，并随着肿瘤分级增加而不断增高，其中在肿瘤 3 级的表达明显高于肿瘤 1、2 级，表明 CDKN2A 与肝癌肿瘤分级相关（图 6B）。DLAT 在肝癌临床分期 1、2、3 期表达均明显高于正常组织，但各分期之间表达无明显差异（图 6C）。DLAT 在肝癌各肿瘤分级中的表达均明显高于正常组织，并随着肿瘤分级增加而不断增高，其中在肿瘤 2、3 级的表达明显高于肿瘤 1 级，表明 DLAT 与肝癌肿瘤分级相关（图 6D）。

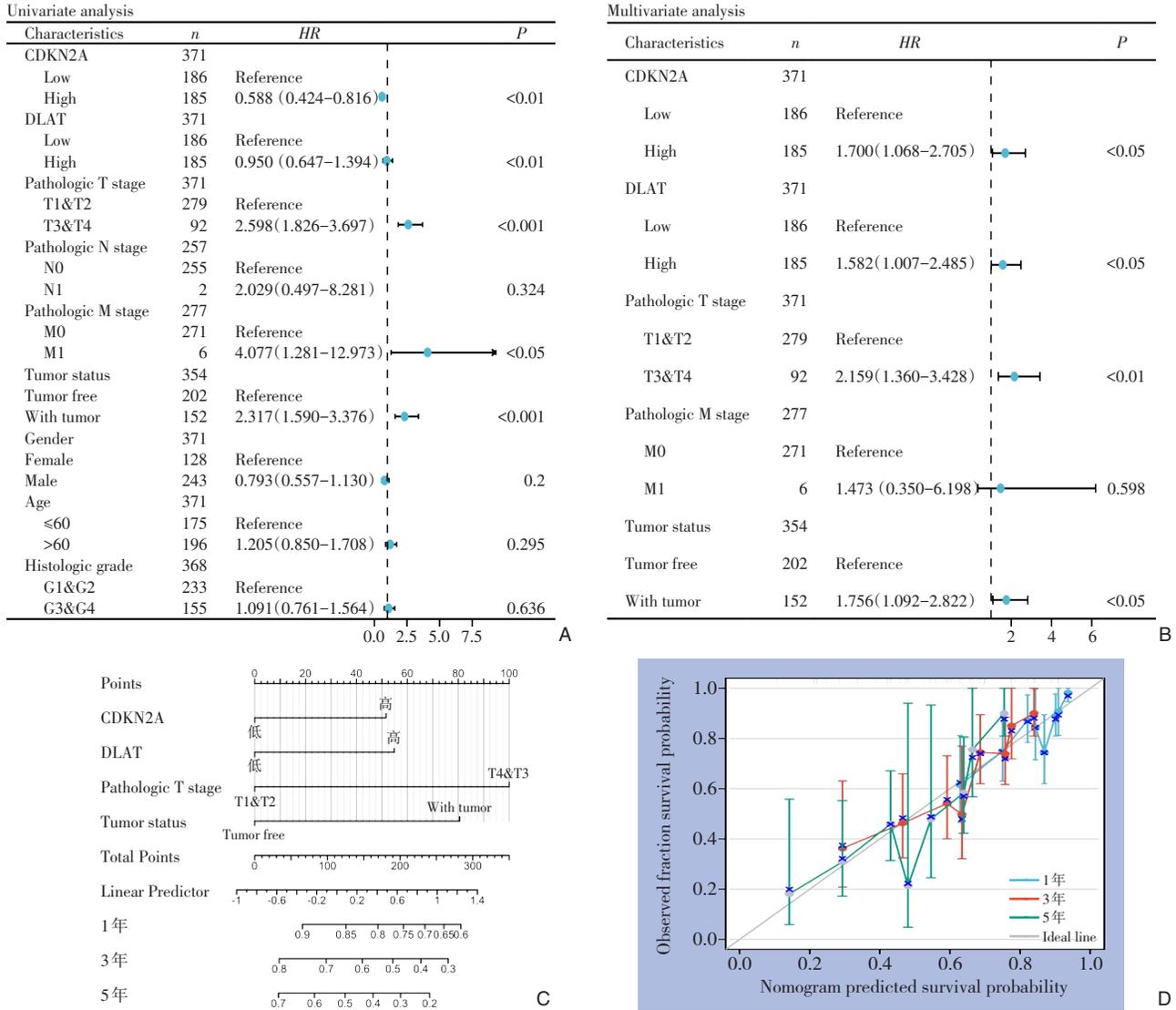


图 5 基于铜死亡相关基因肝癌患者预后列线图构建 A: 单因素回归分析; B: 多因素回归分析; C: 列线图预测肝癌患者 1、3、5年 OS; D: 校准曲线  
 Figure 5 Construction of nomogram for prognosis in liver cancer patients A: Univariate analysis; B: Multivariate analysis; C: Nomogram for predicting 1-, 3-, and 5-year OS in liver cancer patients; D: The calibration curves for the nomogram

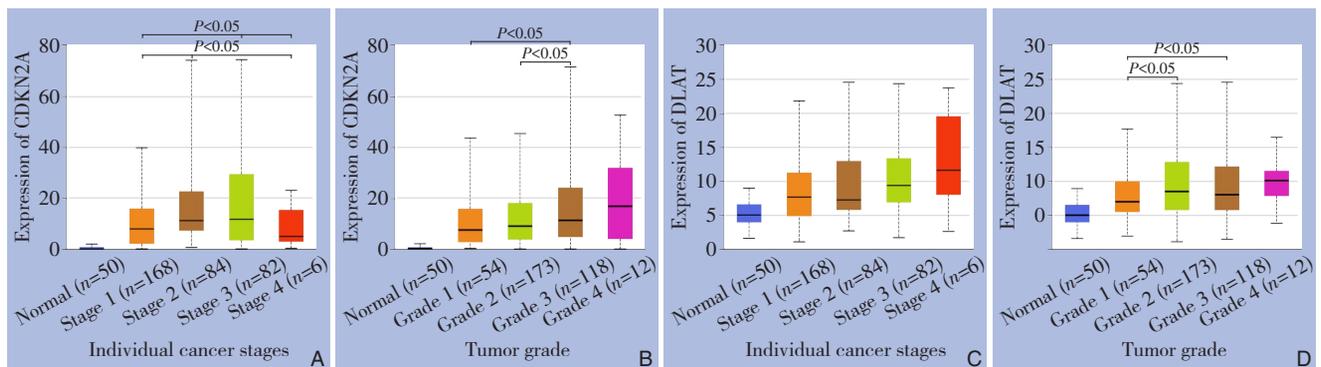


图 6 CDKN2A 和 DLAT 在肝癌不同临床病理特征中的表达 A-B: CDKN2A 在肝癌各临床分期和肿瘤分级中的表达; C-D: DLAT 在肝癌各临床分期和肿瘤分级中的表达  
 Figure 6 Expression of CDKN2A and DLAT in liver cancer with different clinicopathologic features A-B: CDKN2A expressions in different clinical stages and tumor grades; C-D: DLAT expressions in different clinical stages and tumor grades

## 2.6 铜死亡相关基因CDKN2A和DLAT在肝癌中的表达验证

从GEO数据库中下载数据集GSE144269和GSE207435,分析CDKN2A和DLAT在肝癌中的表达,结果发现CDKN2A和DLAT在肝癌组织中的表达均明显高于正常组织(均 $P < 0.05$ ) (图7A-D)。HPA数据库分析发现CDKN2A和DLAT在肝癌组织

中的表达均明显高于正常组织(图7E-F)。采用Western blot检测CDKN2A、DLAT在肝癌细胞HuH-7、HepG2和肝细胞QSG-7701中的表达,结果发现,CDKN2A、DLAT在肝癌细胞HuH-7和HepG2中的表达均明显高于肝细胞QSG-7701(均 $P < 0.05$ ) (图7G-H)。

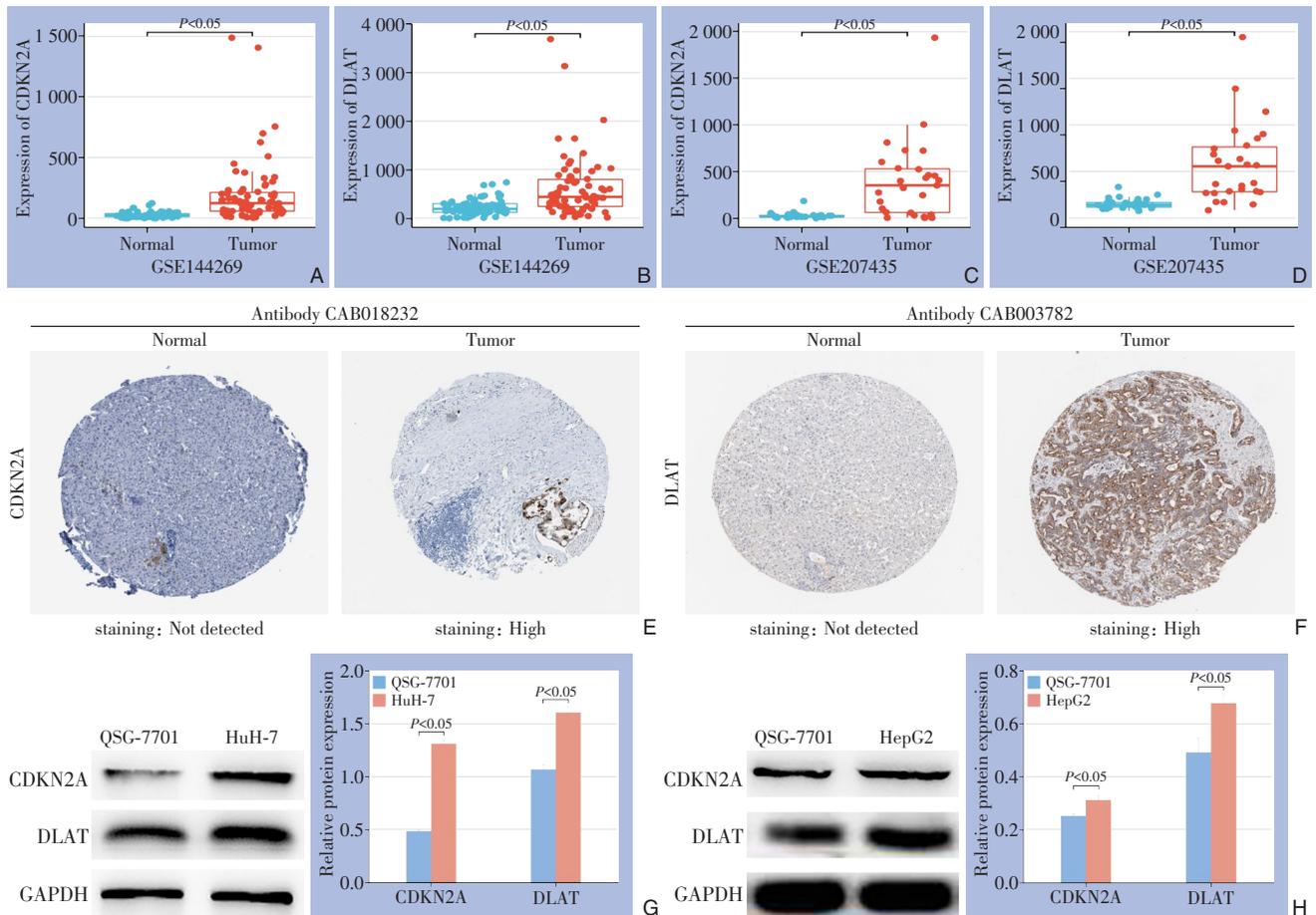


图7 CDKN2A和DLAT在肝癌中的表达验证 A-D: CDKN2A和DLAT在GSE144269/GSE207435中的表达分析; E-F: HPA数据库分析CDKN2A和DLAT在肝癌组织中的表达; G-H: Western blot检测CDKN2A和DLAT表达

Figure 7 Validation of differential expression of CDKN2A and DLAT in liver cancer A-D: CDKN2A and DLAT expressions in GSE144269 and GSE207435; E-F: CDKN2A and DLAT expression in HPA dataset; G-H: The protein expressions of CDKN2A and DLAT measured by Western blot analysis

## 2.7 铜死亡相关基因CDKN2A和DLAT与免疫细胞浸润的相关性

采用Spearman相关性分析了CDKN2A和DLAT表达与24种免疫细胞浸润丰度的相关性,结果显示:CDKN2A表达与Th2 cells、aDC等免疫细胞浸润丰度呈明显正相关,与eosinophils、CD8 T cells、NK cells、Th17 cells、mast cells、neutrophils、iDC、DC等免疫细胞浸润丰度呈明显负相关(图8A)。DLAT表达与Tcm、T helper cells、Tem、Th2 cells、

macrophages等免疫细胞浸润丰度呈明显正相关,与cytotoxic cells、pDC、Th17 cells、DC、B cells、NK CD56dim cells等免疫细胞浸润丰度呈明显负相关(图8B)。采用TIMER2.0数据库分析CDKN2A和DLAT表达与Cancer associated fibroblast (CAF)细胞浸润的相关性,结果显示:CDKN2A表达与CAF浸润无相关性,DLAT表达与CAF细胞浸润明显正相关(图8C-D)。采用TISDB数据库分析CDKN2A和

DLAT 表达与 MDSC 细胞浸润丰度的相关性, 结果显示, CDKN2A 和 DLAT 表达与 MDSC 细胞浸润丰

度无相关性 (图 8E-F)。

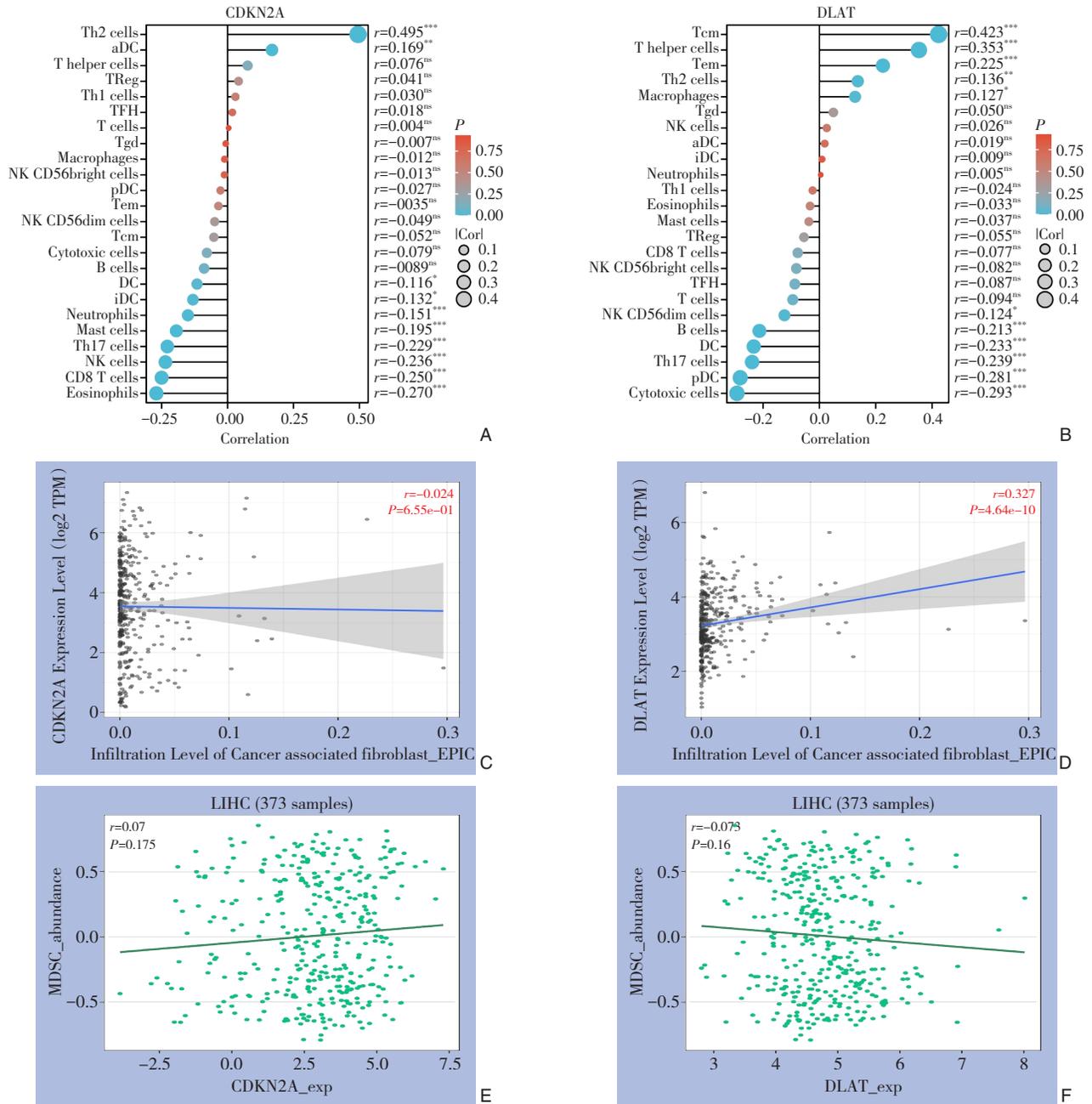


图 8 CDKN2A 和 DLAT 与免疫细胞浸润的相关性 A: CDKN2A; B: DLAT; C-D: CDKN2A 和 DLAT 与 CAF 细胞浸润相关性; E-F: CDKN2A 和 DLAT 与 MDSC 细胞浸润丰度相关性

Figure 8 Correlation of CDKN2A and DLAT with immune cell infiltration in liver cancer A: CDKN2A; B: DLAT; C-D: The correlation of CDKN2A and DLAT with CAF infiltration; E-F: The correlation of CDKN2A and DLAT with MDSC infiltration abundance

### 2.8 铜死亡相关基因 CDKN2A 和 DLAT 与免疫检查点的相关性

CDKN2A、DLAT 与免疫检查点相关性分析结果显示, CDKN2A 表达与免疫检查点 CD274、

CTLA4、HAVCR2、LAG3、PDCD1、TIGIT 等呈明显正相关 (图 9A-F), DLAT 表达与免疫检查点 CD274、HAVCR2、PDCD1LG2、TIGIT 等呈明显正相关 (图 9G-J)。

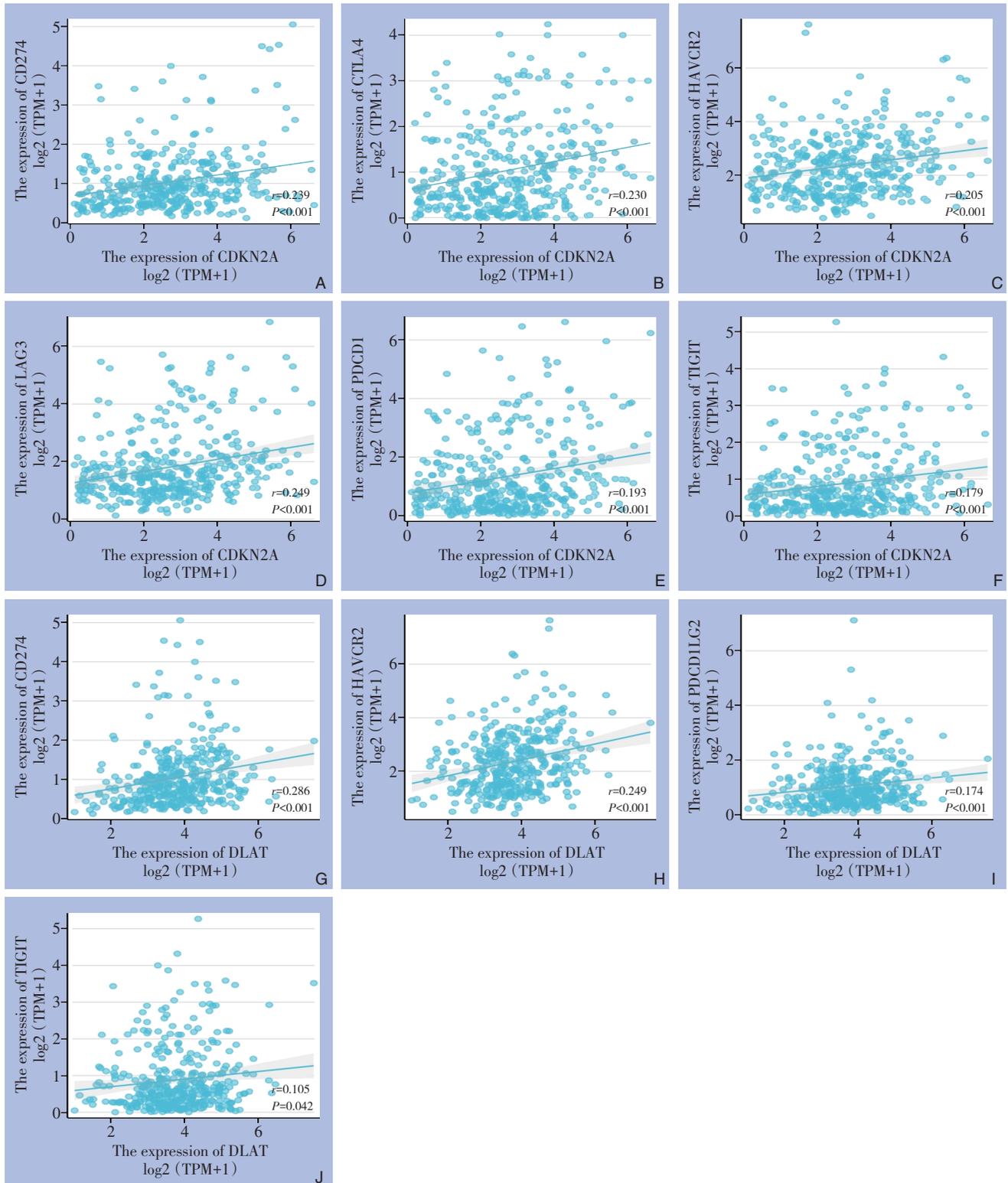


图9 CDKN2A和DLAT与免疫检查点的相关性 A-F: CDKN2A; G-J: DLAT

Figure 9 The correlation of CDKN2A and DLAT with immune checkpoints A-F: CDKN2A; G-J: DLAT

### 3 讨论

肝癌是消化系统一种常见的恶性肿瘤，其发病隐匿、进展迅速、恶性程度高，临床缺乏有效的治疗手段。因此，迫切需要寻找肝癌新的预后

标志物和治疗靶点<sup>[13]</sup>。铜死亡是一种铜依赖的、程序性的、新的细胞死亡方式，继发于铜过载诱发的线粒体功能受损<sup>[14-15]</sup>。铜死亡与肝癌的关系目前尚不清楚。本研究拟分析铜死亡相关基因在肝癌中的作用，并借此发掘出新的肝癌筛查、治疗

及预后评估手段。

本研究发现大多数铜死亡相关基因在肝癌中表达显著升高,并且铜死亡相关基因在肝癌样本中有一定的突变率。该研究结果与Zhang等<sup>[16-18]</sup>研究结果一致。研究发现铜离子可以促使肝癌生长和转移,因此肝癌组织倾向于保持较高浓度的铜离子。但肝癌并不会发生铜死亡<sup>[19]</sup>,其原因可能是由于铜死亡相关基因在肝癌中表达失衡和突变,促使肝癌能够逃避铜死亡。因此,如果能够纠正铜死亡相关基因的表达失衡和突变,诱导肝癌细胞铜死亡,可能是治疗肝癌的一种新的途径。

之后本研究从10个铜死亡相关基因中筛选出CDKN2A和DLAT,并基于这2个基因构建了风险因子模型,时间依赖曲线显示该模型具有较好的预测能力。与本研究结果相反,Chen等<sup>[20]</sup>采用了5个铜死亡相关基因构建了肝癌风险因子模型;Liu等<sup>[21]</sup>建立了9个基因的肝癌风险因子模型。上述研究结果的差异主要是由于采用筛选的铜死亡相关基因不同。本研究采用的是Tsvetkov等<sup>[12]</sup>报道的10个铜死亡相关基因,Chen等<sup>[20]</sup>选用的是在肝癌中发现的136个铜死亡相关基因,而Liu等<sup>[21]</sup>是将铜死亡相关的mRNA和lncRNA联合起来进行筛选。

列线图是肿瘤预后评估的常用工具<sup>[22-23]</sup>。相较于传统的肿瘤TNM分期系统,列线图包含更详细的临床信息,可以提供更准确的患者生存概率估计<sup>[24-25]</sup>。Chen等<sup>[26]</sup>将TNM分期、年龄和铜死亡相关lncRNA风险评分作为参数构建肝癌患者列线图预测预后,并具有较高的准确性。Liu等<sup>[27]</sup>将肿瘤分期和铜死亡相关基因风险评分作为参数构建了肝癌患者预后列线图,具有较好的预测效果。本研究首次将CDKN2A、DLAT、T分期和肿瘤状态纳入预测因素构建肝癌患者的预后列线图,校正曲线显示该列线图预测和实际观察之间有很好的-一致性。因此,本研究所建立的列线图可以为临床医生评估肝癌患者预后以及制定个性化治疗方案提供一种新的、更有效的方法。

肿瘤微环境中的免疫浸润细胞在肿瘤发生、发展中发挥关键作用<sup>[28]</sup>,并严重影响患者的临床预后<sup>[29-30]</sup>。本研究首先发现CDKN2A和DLAT与肝癌患者预后相关,之后发现CDKN2A和DLAT与Th2 cells、aDC、T helper cells等免疫细胞浸润,以及CD274、CTLA4、HAVCR2等免疫检查点表达相

关。因此,本研究认为CDKN2A和DLAT可能通过影响免疫细胞浸润和免疫检查点表达,影响肝癌患者预后。CDKN2A和DLAT可能是肝癌免疫治疗的潜在靶点。

然而本研究也存在一些局限:第一,本研究只采用TCGA数据库构建了肝癌患者的预后模型,没有外部数据集进一步验证;第二,对于CDKN2A和DLAT在肝癌中的表达,缺乏临床样本的验证;第三,对于CDKN2A和DLAT与肝癌免疫细胞浸润的相关性,仅采用生物信息学方法分析,没有进行实验验证。

综上所述,本研究全面分析了铜死亡相关基因在肝癌中的表达特征。其中铜死亡相关基因CDKN2A和DLAT在肝癌中表达显著升高,基于CDKN2A和DLAT构建的风险因子图能够很好地预测肝癌患者预后,CDKN2A和DLAT表达与肝癌临床分期、免疫细胞浸润和免疫检查点表达等显著相关。因此,CDKN2A和DLAT有望成为肝癌新的预后生物标志物和免疫治疗的新靶点。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:陈伟毅负责课题设计、起草论文和修改论文;胡柯和刘雨负责起草论文和修改论文;彭靖、李小成和陈立军负责数据获取、整理和分析,段绍毅和杨骐彰负责数据分析和作图。

## 参考文献

- [1] 彭炯敏, 欧阳锡武, 王文龙, 等. miR-18a-3p在肝癌中的表达及其调控ADCY1表达对肝癌细胞侵袭及增殖的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(5): 648-657. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.05.010.
- [2] Peng EM, Ouyang XW, Wang WL, et al. Expression of miR-18a-3p in liver cancer and the influence of its regulating ADC Y1 expression on invasion and proliferation of liver cancer cells[J]. China Journal of General Surgery, 2022, 31(5): 648-657. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.05.010.
- [3] 万文武, 张瑜, 丁兵, 等. 肝切除术与TACE治疗原发性肝癌破裂出血疗效的倾向评分匹配分析[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(1): 22-30. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.01.003.
- [4] Wan WW, Zhang Y, Ding B, et al. Efficacy of hepatectomy and TACE for rupture and bleeding of primary liver cancer: a propensity score matching based analysis[J]. China Journal of General Surgery, 2022, 31(1): 22-30. doi: 10.7659/j.issn.1005-

- 6947.2022.01.003.
- [3] 王峻, 刘洪, 王四明. 肝癌切除术序贯腹腔热灌注化疗在肝癌自发性破裂出血中的临床应用[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(7): 1014–1022. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.006.
- Wang J, Liu H, Wang SM. Clinical application of sequential hepatectomy and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy in spontaneous rupture and hemorrhage of liver cancer[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(7):1014–1022. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.006.
- [4] Anwanwan D, Singh SK, Singh S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1):188314. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188314.
- [5] Zhao J, Guo S, Schrodi SJ, et al. Cuproptosis and cuproptosis-related genes in rheumatoid arthritis: implication, prospects, and perspectives[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 930278. doi: 10.3389/fimmu.2022.930278.
- [6] Xie J, Yang Y, Gao Y, et al. Cuproptosis: mechanisms and links with cancers[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1):46. doi: 10.1186/s12943-023-01732-y.
- [7] Wang D, Tian Z, Zhang P, et al. The molecular mechanisms of cuproptosis and its relevance to cardiovascular disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114830. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114830.
- [8] Baldari S, Di Rocco G, Toietta G. Current biomedical use of copper chelation therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):1069. doi: 10.3390/ijms21031069.
- [9] 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.
- 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.
- [10] Fang AP, Chen PY, Wang XY, et al. Serum copper and zinc levels at diagnosis and hepatocellular carcinoma survival in the Guangdong Liver Cancer Cohort[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(11): 2823–2832. doi: 10.1002/ijc.31991.
- [11] Davis CI, Gu X, 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.
- [12] 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.
- [13] 林康强, 喻亚群. 实体肿瘤治疗疗效评估系统的发展及其在肝癌靶向治疗中的应用现状[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(7):958–965. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.07.013.
- Lin KQ, Yu YQ. Development of efficacy evaluation system for solid tumors and its application status in targeted therapy of liver cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2022, 31(7):958–965. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.07.013.
- [14] Chen L, Min J, Wang F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7:378. doi: 10.1038/s41392-022-01229-y.
- [15] Wang W, Lu Z, Wang M, et al. The cuproptosis-related signature associated with the tumor environment and prognosis of patients with glioma[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 998236. doi: 10.3389/fimmu.2022.998236.
- [16] Zhang Z, Zeng X, Wu Y, et al. Cuproptosis-related risk score predicts prognosis and characterizes the tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 925618. doi: 10.3389/fimmu.2022.925618.
- [17] Hu D, Wang Y, Shen X, et al. Genetic landscape and clinical significance of cuproptosis-related genes in liver hepatocellular carcinoma[J]. *Genes Dis*, 2023, 11(2): 516–519. doi: 10.1016/j.gendis.2023.03.010.
- [18] 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.
- Meng Y, Dong BL, Dong XH, et al. Expressions of cuproptosis-related genes in hepatocellular carcinoma and their clinical significance[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(1):74–86. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.01.006.
- [19] Yang M, Wu X, Hu J, et al. COMMD10 inhibits HIF1 $\alpha$ /CP loop to enhance ferroptosis and radiosensitivity by disrupting Cu-Fe balance in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2022, 76(5): 1138–1150. doi: 10.1016/j.jhep.2022.01.009.
- [20] Chen Y, Tang L, Huang W, et al. Identification of a prognostic cuproptosis-related signature in hepatocellular carcinoma[J]. *Biol Direct*, 2023, 18(1):4. doi: 10.1186/s13062-023-00358-w.
- [21] Liu Y, Liu Y, Ye S, et al. Development and validation of cuproptosis-related gene signature in the prognostic prediction of liver cancer[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 985484. doi: 10.3389/fonc.2022.985484.[LinkOut]
- [22] 郭瑶, 但家强, 袁智英. 甲状腺髓样癌术后生存影响因素分析及列线图的构建[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(5):698–706. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.05.009.
- Guo Y, Dan JQ, Yuan ZY. Analysis of prognostic factors and nomogram construction for postoperative survival of medullary thyroid carcinoma[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(5):698–706. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.05.009.
- [23] 施华清, 柴长鹏, 陈洲, 等. 胰腺癌患者预后预测动态在线列线图的构建及应用[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(9):1162–1172.

- doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.09.005.
- Shi HQ, Chai CP, Chen Z, et al. Construction and application of online dynamic nomogram for predicting prognosis of pancreatic cancer patients[J]. China Journal of General Surgery, 2022, 31(9): 1162-1172. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.09.005
- [24] Zhang W, Ji L, Wang X, et al. Nomogram predicts risk and prognostic factors for bone metastasis of pancreatic cancer: a population-based analysis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 12:752176. doi: 10.3389/fendo.2021.752176.
- [25] Wang J, Wen Q, Wang X, et al. Nomogram for predicting cancer-specific survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma: a SEER-based population study[J]. Gpb, 2022, 41(6):591-601. doi: 10.4149/gpb\_2022040.
- [26] Chen S, Liu P, Zhao L, et al. A novel cuproptosis-related prognostic lncRNA signature for predicting immune and drug therapy response in hepatocellular carcinoma[J]. Front Immunol, 2022, 13: 954653. doi: 10.3389/fimmu.2022.954653.
- [27] Liu Z, Qi Y, Wang H, et al. Risk model of hepatocellular carcinoma based on cuproptosis-related genes[J]. Front Genet, 2022, 13: 1000652. doi:10.3389/fgene.2022.1000652.
- [28] Iglesias-Escudero M, Arias-González N, Martínez-Cáceres E. Regulatory cells and the effect of cancer immunotherapy[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1):1-15. doi: 10.1186/s12943-023-01714-0.
- [29] Wang G, Miao C, Mo L, et al. MYCBP2 expression correlated with inflammatory cell infiltration and prognosis immunotherapy in thyroid cancer patients[J]. Front Immunol, 2022, 13:1048503. doi: 10.3389/fimmu.2022.1048503.
- [30] Huang C, Liu J. Identification of the immune cell infiltration landscape in head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) for the exploration of immunotherapy and prognosis[J]. Genet Res, 2022, 2022:1-15. doi: 10.1155/2022/6880760.
- ( 本文编辑 宋涛 )
- 本文引用格式:** 陈伟毅, 胡柯, 刘雨, 等. 肝癌铜死亡相关基因及其与预后、免疫浸润的关系分析[J]. 中国普通外科杂志, 2024, 33(1): 74-87. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.01.009
- Cite this article as:** Chen WY, Hu K, Liu Y, et al. Analysis of cuproptosis-related genes in liver cancer and their association with prognosis and immune infiltration[J]. Chin J Gen Surg, 2024, 33(1): 74-87. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.01.009

## 本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕4个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(IQR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 $t$ 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 $\chi^2$ 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理地解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$  (或 $P < 0.01$ ) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 $t$ 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 $q$ 检验等), 统计量的具体值(如 $t=3.45$ ,  $\chi^2=4.68$ ,  $F=6.79$ 等)应尽可能给出具体的 $P$ 值(如 $P=0.0238$ ); 当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出95%置信区间。

中国普通外科杂志编辑部