



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.11.009  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.11.009  
Chinese Journal of General Surgery, 2022, 31(11):1471-1482.

· 基础研究 ·

## 铜死亡相关基因PDHA1与乳腺癌的预后关系及列线图的构建

杨秋怡, 易嘉宁, 郭妙兰, 范培芝, 喻洁, 曾杰

(湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院 乳甲外科, 湖南 长沙 410005)

### 摘要

**背景与目的:** 丙酮酸脱氢酶E1组分 $\alpha$ 亚基(PDHA1)是丙酮酸脱氢酶复合物的关键调控位点,发挥着连接糖酵解和三羧酸循环的重要作用,对癌症代谢转变具有重要意义。最新研究发现了一种新的细胞死亡方式,即铜死亡。PDHA1是铜死亡的相关基因,参与铜死亡过程的调控。本研究旨在利用生物信息学方法探讨PDHA1与乳腺癌预后的关系并建立预后相关的列线图模型。

**方法:** 运用TCGA、TIMER、UALCAN、HPA、STRING、Gene MANIA、Kaplan-Meier、GEPIA、GeneCards等多个数据库对PDHA1在乳腺癌中的临床病理特征关系、表达情况、蛋白互作用网络、基因-基因互作用网络、预后价值、基因集富集分析等进行分析,并使用R语言构建列线图模型。

**结果:** PDHA1表达水平与乳腺癌T分期( $P<0.001$ )、病理分期( $P=0.031$ )、人种( $P<0.001$ )、组织学类型( $P<0.001$ )、PR状态( $P<0.001$ )、ER状态( $P<0.001$ )、PAM50亚型( $P<0.001$ )有关。TCGA数据库结果显示,乳腺癌组织PDHA1 mRNA的表达水平明显低于正常乳腺组织( $P<0.001$ ),UALCAN数据库结果显示,PDHA1蛋白在乳腺癌中低表达( $P<0.001$ ),HPA数据库进一步验证了该结果。PPI蛋白互作用网络显示有15个与PDHA1相关的互作蛋白。基因-基因互作用关系网络图得到20个PDHA1相关的互作基因。PDHA1高表达组患者的总生存期( $HR=1.26$ ,  $95\% CI=1.02\sim 1.54$ ,  $P=0.029$ )、无复发生存期( $HR=1.18$ ,  $95\% CI=1.05\sim 1.32$ ,  $P=0.0051$ )、进展后生存期( $HR=1.41$ ,  $95\% CI=1.07\sim 1.86$ ,  $P=0.015$ )、无转移生存期( $HR=1.29$ ,  $95\% CI=1.1\sim 1.52$ ,  $P=0.0023$ )均低于PDHA1低表达组。GSEA结果表明PDHA1共表达基因在乳腺癌中主要参与S期、三羧酸循环等通路。从GeneCards中找到10种与PDHA1表达相关的化合物。将PDHA1表达、年龄、放疗、N分期和M分期纳入构建列线图,校准图显示列线图预测和实际观察之间有极好的一致性。

**结论:** PDHA1高表达乳腺癌患者预后较PDHA1低表达患者差。PDHA1表达水平是影响乳腺癌患者预后的相关因素。基于PDHA1表达的列线图模型对于乳腺癌患者预后的评估有一定的价值。

### 关键词

乳腺肿瘤; 丙酮酸脱氢酶E1组分 $\alpha$ 亚基; 预后; 计算生物学; 列线图

中图分类号: R737.9

## Relationship between cuproptosis related gene PDHA1 and prognosis of breast cancer and its nomogram construction

YANG Qiuyi, YI Jianing, GUO Miaolan, FAN Peizhi, YU Jie, ZENG Jie

(Department of Breast and Thyroid Surgery, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University/Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China)

**基金项目:** 湖南省自然科学基金资助项目(2022JJ30335); 湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院博士基金资助项目(BSJJ202107)。

**收稿日期:** 2022-08-23; **修订日期:** 2022-10-07。

**作者简介:** 杨秋怡, 湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院硕士研究生, 主要从事乳腺及甲状腺疾病方面的研究。

**通信作者:** 曾杰, Email: zengjie227@126.com

**Abstract**

**Background and Aims:** The  $\alpha$  subunit of pyruvate dehydrogenase E1 component (PDHA1) is the key regulatory site of pyruvate dehydrogenase complex, playing an important role in connecting glycolysis and tricarboxylic acid cycle, and it is of great significance for the metabolic transformation of cancers. The latest research has found a new cell death mechanism, namely cuproptosis. PDHA1 is a gene related to cuproptosis and participates in the regulation of its process. The purpose of this study was to explore the relationship between PDHA1 and the prognosis of breast cancer by using bioinformatics methods and establish a nomogram model related to the prognosis.

**Methods:** The clinicopathologic relationship, expression, protein-protein interaction network, gene-gene interaction network, prognostic value, gene set enrichment of PDHA1 in breast cancer were analyzed by using the TCGA, TIMER, UALCAN, HPA, STRING, Gene MANIA, Kaplan-Meier, GEPIA, GeneCards and other databases. The nomogram model was constructed with R language.

**Results:** PDHA1 expression was associated with breast cancer T Stage ( $P<0.001$ ), pathologic stage ( $P=0.031$ ), race ( $P<0.001$ ), histological type ( $P<0.001$ ), PR status ( $P<0.001$ ), ER status ( $P<0.001$ ), and PAM50 subtype ( $P<0.001$ ). TCGA database results showed that the expression level of PDHA1 mRNA in breast cancer tissues was significantly lower than that in normal breast tissues ( $P<0.001$ ), while UALCAN database results showed that PDHA1 protein was lowly expressed in breast cancer ( $P<0.001$ ), which was further verified by HPA database. The PPI protein-protein interaction network revealed 15 PDHA1-related interaction proteins. Twenty PDHA1-related interacting genes were obtained from the gene-gene interaction network diagram. Patients in the PDHA1 high-expression group had lower overall survival ( $HR=1.26$ , 95%  $CI=1.02-1.54$ ,  $P=0.029$ ), relapse-free survival ( $HR=1.18$ , 95%  $CI=1.05-1.32$ ,  $P=0.005$ ), post-progression survival ( $HR=1.41$ , 95%  $CI=1.07-1.86$ ,  $P=0.015$ ), and metastasis-free survival ( $HR=1.29$ , 95%  $CI=1.1-1.52$ ,  $P=0.002$ ). GSEA results showed that PDHA1 co-expressed genes were mainly involved in the S stage and tricarboxylic acid cycle in breast cancer. Ten compounds related to PDHA1 expression were identified from GeneCards. A nomogram model was constructed by integrating the PDHA1 expression, age, radiation therapy, N stage and M stage, and the calibration chart shows that there was excellent consistency between the nomogram prediction and the actual observation.

**Conclusion:** The prognosis of breast cancer patients with high PDHA1 expression is worse than that of patients with low PDHA1 expression. The expression level of PDHA1 is a related factor affecting the prognosis of breast cancer patients. The nomogram model constructed based on PDHA1 expression has certain value in estimating the prognosis of breast cancer patients.

**Key words**

Breast Neoplasms; The  $\alpha$  Subunit of Pyruvate Dehydrogenase E1 Component; Prognosis; Computational Biology; Nomograms

**CLC number:** R737.9

乳腺癌 (breast cancer) 已超过肺癌成为女性最常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 是全球女性癌症死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。随着早期筛查的进步以及抗癌策略的不断发展, 乳腺癌的治疗有了很大的改善。然而, 乳腺癌的复发及转移率仍然很高。由于肿瘤的异质性和复杂性, 现有的生物标志物在预测乳腺癌预后方面受到限制<sup>[3]</sup>。因此, 为了提高预后并指导个体化精准治疗, 探索新的生物标志物作为临床研

究领域的预后指标成为迫切需要。

即使在氧气存在的情况下, 肿瘤细胞的增殖也以增加糖酵解代谢为特征, 称为有氧糖酵解, 即 Warburg 效应<sup>[4]</sup>。有氧糖酵解已被证实可促进肿瘤的发生、发展<sup>[5-6]</sup>。丙酮酸脱氢酶复合物 (pyruvate dehydrogenase complex, PDHC) 是位于线粒体基质的多酶复合物, 发挥催化作用可以使丙酮酸氧化脱羧转化成乙酰辅酶 A, 从而将糖酵解、

三羧酸循环以及氧化磷酸化联系起来<sup>[7-8]</sup>。PDHC 由丙酮酸脱氢酶 (E1)、二氢硫辛酰胺转乙酰酶 (E2) 和二氢硫辛酸脱氢酶 (E3) 组成, 其中丙酮酸脱氢酶 (E1) 由  $\alpha$  和  $\beta$  亚单位组成,  $\alpha$  亚单位即 PDHA1, 是 PDHC 的活性调控位点<sup>[9]</sup>。最近, Tsvetkov 等<sup>[10]</sup>研究发现一种新的细胞死亡途径, 即铜离子载体诱导的细胞死亡, 称为铜死亡 (cuproptosis), 并已证明铜直接与三羧酸循环中的脂酰化成分结合, 导致蛋白质毒性应激, 最终导致细胞死亡。并且该研究为确定介导铜死亡的特定代谢途径, 进行了全基因组 CRISPR/Cas9 功能缺失筛选, 获得了 10 个铜死亡相关基因: FDX1、LIAS、LIPT1、DLD、DLAT、PDHA1、PDHB、MTF1、GLS、CDKN2A, PDHA1 作为铜死亡的相关基因, 参与铜死亡过程的调控。研究发现, PDHA1 的表达与多种肿瘤的预后相关, 如胃癌<sup>[11]</sup>、子宫颈鳞状细胞癌<sup>[12]</sup>、肝癌<sup>[13]</sup>、头颈鳞状细胞癌<sup>[14]</sup>、肾细胞癌<sup>[15]</sup>、卵巢癌<sup>[16]</sup>等。而乳腺癌中 PDHA1 表达与预后关系却少有研究。本研究旨在运用生物信息学方法探讨 PDHA1 与乳腺癌预后关系并构建预后相关的列线图模型。

## 1 资料与方法

### 1.1 数据来源

癌症基因组图谱数据库 (the cancer genome atlas, TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 是目前最大的癌症基因信息数据库, 保存了包括基因表达数据、拷贝数变异等数据<sup>[17]</sup>。从 TCGA 数据库中并下载乳腺癌患者的基因信息和临床病理数据。利用 R 语言整理其临床资料, 选择 TNM 分期、病理分期、人种、年龄、组织学类型、ER、PR 和 HER-2 状态、PAM50 亚型、绝经状态、放疗情况、生存时间、生存状态等信息完整的患者共 1 065 例, 将患者分为 PDHA1 高表达者 533 例, 低表达者 532 例, 比较其临床参数。

### 1.2 PDHA1 在乳腺癌组织中的表达水平

肿瘤免疫评估资源 (TIMER) 数据库 (<https://cistrome.shinyapps.io/timer>) 是一个准确且方便地分析肿瘤免疫的工具, 包含 32 种癌症类型, 涵盖 10 897 个来自 TCGA 数据库中的样本<sup>[18]</sup>, 本研究利用 TIMER 数据库差异表达模块分析 PDHA1 基因在多种癌症中的表达情况。利用 TCGA 数据库对乳腺

癌中 PDHA1 mRNA 的表达进行分析。UALCAN 数据库 (<http://ualcan.path.uab.edu>) 是一个基于 TCGA 数据库中相关癌症数据进行在线分析和挖掘的网站工具<sup>[19]</sup>。本研究利用该数据库分析比较 PDHA1 在人正常乳腺组织和乳腺癌组织中的蛋白表达。HPA 数据库 (The Human Protein Atlas) (<https://www.proteinatlas.org>) 是 2003 年由瑞典科学家发起的项目, 旨在利用不同的组学技术绘制细胞、组织和器官中所有的人类蛋白质图谱。利用该数据库分析 PDHA1 免疫组织化学结果, 进一步验证 PDHA1 的表达水平。

### 1.3 构建蛋白质-蛋白质互作网络 (PPI), 基因-基因互作网络

STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org>) 是专门用于生物体范围蛋白质关联网络的几个在线资源之一<sup>[20]</sup>。利用该数据库中蛋白质互作信息对 PDHA1 构建蛋白质互作网络 (PPI)。Gene MANIA 数据库可对基因数据集进行分析和预测, 以分子网络的形式显示这些基因之间的关系 (<http://genemania.org>)<sup>[21]</sup>。利用该数据库绘制 PDHA1 的基因-基因互作关系网络图

### 1.4 生存分析

Kaplan-Meier Plotter 数据库 (<http://kmplot.com/annalys>) 包括基因表达数据和临床数据<sup>[22]</sup>。利用该数据库在线分析上述数据中 PDHA1 的表达对乳腺癌患者总生存期 (overall survival, OS)、无复发生存期 (relapse free survival, RFS)、进展后生存期 (post progression survival, PPS)、无转移生存期 (distant metastasis free survival, DMFS) 的影响。并在 TCGA 数据库中进一步验证 PDHA1 的表达对乳腺癌患者 OS 的影响。运用单因素和多因素 Cox 回归分析研究 PDHA1 在乳腺癌中的预后价值。将 TNM 分期、Stage 分期、人种、年龄、组织学类型、ER、PR 和 HER-2 状态、PAM50 亚型、绝经状态、放疗情况等分层分析各亚组中 PDHA1 的表达与乳腺癌患者 OS 的关系。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 1.5 构建基因集富集分析 (GSEA)

通过 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn>)<sup>[23]</sup> 筛选出 PDHA1 的共表达基因, 使用 R 包 “clusterProfiler” 对其进行 GSEA, 使用校正的  $P$  值和归一化的富集分数 (NES) 表征富集分析的结果。用 “ggplot2” 包使 GSEA 富集分析可视化。

## 1.6 基因-化合物相互作用分析

GeneCards 数据库 (www.genecards.org) 是一个全面的、权威的人类基因注释信息纲要, 提供了所有已知和预测的人类基因的简明基因组、蛋白质组、转录组、疾病和功能数据<sup>[24]</sup>, 本研究利用该数据库寻找与 PDHA1 基因有关的潜在相互作用的化合物。

## 1.7 列线图的构建与校准

运用 R 语言 survival 和 rms 软件包 (survival package R 3.6.3、rms package R 3.6.3) 构建乳腺癌预后因素预测列线图模型, 将基于单因素和多因素 Cox 回归分析中筛选出来的影响乳腺癌预后的独立危险因素及 PDHA1 的表达纳入列线图中。并绘制

校准曲线以评估 PDHA1 列线图的预测和实际观察之间的一致性。

## 2 结果

### 2.1 PDHA1 表达与临床特征的关系

采用  $\chi^2$  检验分析 PDHA1 表达与乳腺癌临床病理特征之间的关系。PDHA1 基因低表达组和高表达组在 T 分期 ( $P<0.001$ )、病理分期 ( $P=0.031$ )、人种 ( $P<0.001$ )、组织学类型 ( $P<0.001$ )、PR 状态 ( $P<0.001$ )、ER 状态 ( $P<0.001$ )、PAM50 亚型 ( $P<0.001$ ) 方面比较, 差异具有统计学意义 (表 1)。

表 1 来自 TCGA 数据库的乳腺癌样本中 PDHA1 表达与临床病理学特征之间的关联 [n (%)]

Table 1 Association between PDHA1 expression and clinicopathologic characteristics in breast cancer samples from the TCGA database [n (%)]

特征	PDHA1 低表达 (n=532)	PDHA1 高表达 (n=533)	P	特征	PDHA1 低表达 (n=532)	PDHA1 高表达 (n=533)	P
T 分期				PR 状态			
T1	164(30.8)	111(20.8)	<0.001	阴性	106(19.9)	232(43.5)	<0.001
T2	284(53.4)	331(62.1)		不确定	2(0.4)	2(0.4)	
T3	75(14.1)	62(11.6)		阳性	400(75.2)	274(51.4)	
T4	9(1.7)	26(4.9)		ER 状态			
N 分期				阴性	52(9.8)	185(34.7)	<0.001
N0	246(46.2)	261(49.0)	不确定	0(0.0)	2(0.4)		
N1	182(34.2)	167(31.3)	阳性	456(85.7)	322(60.4)		
N2	56(10.5)	60(11.3)	0.750	HER-2 状态			0.074
N3	37(7.0)	37(6.9)		阴性	287(53.9)	261(49.0)	
M 分期				不确定	6(1.1)	6(1.1)	
M0	428(90.6)	461(86.5)	0.168	阳性	66(12.4)	91(17.1)	
M1	6(1.1)	14(2.6)		PAM50 亚型			
病理分期				正常乳腺样型	22(4.1)	18(3.4)	<0.001
I	104(19.5)	76(14.3)	luminal A 型	373(70.1)	178(33.4)		
II	285(53.6)	321(60.2)	luminal B 型	83(15.6)	119(22.3)		
III	124(23.3)	114(21.4)	HER-2 过表达型	26(4.9)	56(10.5)		
IV	6(1.1)	12(2.3)	基底样型	28(5.3)	162(30.4)		
人种				月经状态			0.879
亚洲人	27(5.1)	33(6.2)	绝经前	109(20.5)	115(21.6)		
黑人或非裔美国人	65(12.2)	114(21.4)	围绝经期	19(3.6)	20(3.8)		
白种人	405(76.1)	332(62.3)	绝经后	350(65.8)	343(64.4)		
年龄(岁)				肿瘤位置			0.561
≤60	291(54.7)	297(55.7)	左	271(51.0)	282(52.9)		
>60	241(45.3)	236(44.3)	右	261(49.0)	251(47.1)		
组织学类型				放疗			0.542
浸润性导管癌	320(60.2)	437(82.0)	否	213(40.0)	219(41.1)		
浸润性小叶癌	150(28.2)	52(9.8)	是	278(52.3)	262(49.2)		

### 2.2 PDHA1 在乳腺癌中的表达水平

TIMER 数据库分析显示 PDHA1 在乳腺癌中低表达 ( $P<0.001$ ), 另外, 肾上腺皮质癌 (ACC)、食管癌 (ESCA)、肾透明细胞癌 (KIRC)、急性髓性白血病 (LAML) 等肿瘤中 PDHA1 也明显呈低表达 ( $P<0.001$ ) (图 1A); TCGA 数据库分析显示乳腺癌患者 PDHA1 mRNA 的表达水平显著低于正常

乳腺组织 ( $P<0.001$ ) (图 1B); 利用 UALCAN 数据库分析 PDHA1 蛋白在正常与乳腺癌组织中的表达情况, 结果 (图 1C) 显示 PDHA1 蛋白在乳腺癌组织中低表达 ( $P<0.001$ ), HPA 数据库显示乳腺正常组织中 PDHA1 染色为高水平, 而在乳腺癌组织中 PDHA1 染色为低水平, 进一步验证 PDHA1 蛋白在乳腺癌组织中低表达这一结果 (图 1D)。

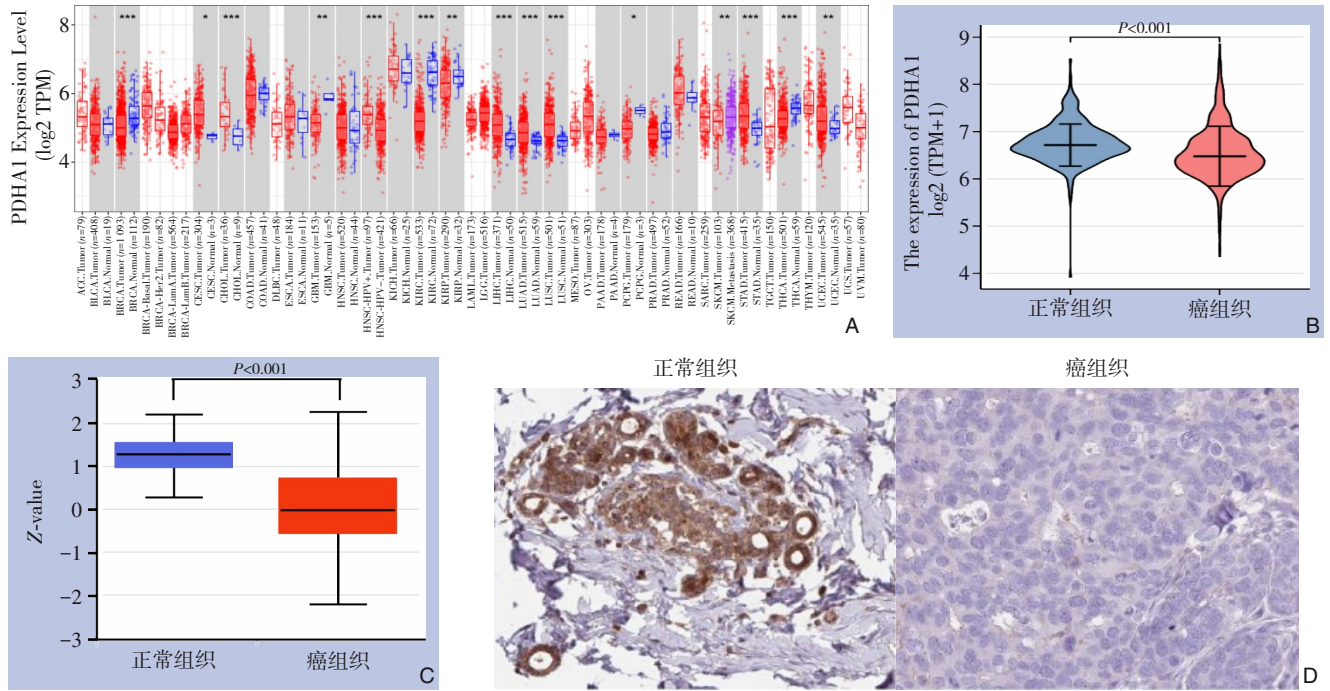


图 1 PDHA1 的表达分析 A: PDHA1 在不同肿瘤中的表达; B: 乳腺癌组织及正常组织中 PDHA1 的表达情况; C: UALCAN 数据库中 PDHA1 蛋白在乳腺癌和正常组织中的表达情况; D: HPA 数据库中 PDHA1 蛋白在乳腺癌和正常组织中的表达情况

Figure 1 Analysis of PDHA1 expression A: Expressions of PDHA1 in different tumors; B: Expressions of PDHA1 in breast cancer and normal tissue; C: Expressions of PDHA1 protein in breast cancer and normal tissues in UALCAN database; D: Expressions of PDHA1 protein in breast cancer and normal tissues in HPA database

### 2.3 构建蛋白 PPI 网络

通过构建 PPI 蛋白互作网络, 与 PDHA1 相关互作蛋白有 15 个, 包括: PDHB、DLD、PDHX、IDH2、DLAT、IDH3A、IDH3G、SUCLA2、PDP1、PDK4、PDK1、PDK3、IDH3B、DLST、OGDH (图 2)。

### 2.4 构建基因-基因互作网络

通过构建基因-基因互作网络, 与 PDHA1 相关互作基因有 20 个, 即 PDK1、PDK2、PDK3、DLAT、PDHX、PDHA2、PDHB、CS、HSD17B10、DLD、PDP1、TRIM2、TRIM3、OGDH、ACO11462.1、DHTKD1、OGDHL、ABAT、OAT (图 3)。

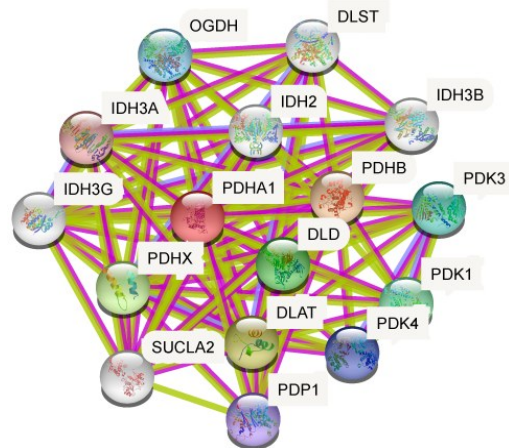


图 2 DHA1 相互作用蛋白网络分析  
Figure 2 Analysis of PDHA1 interaction protein network

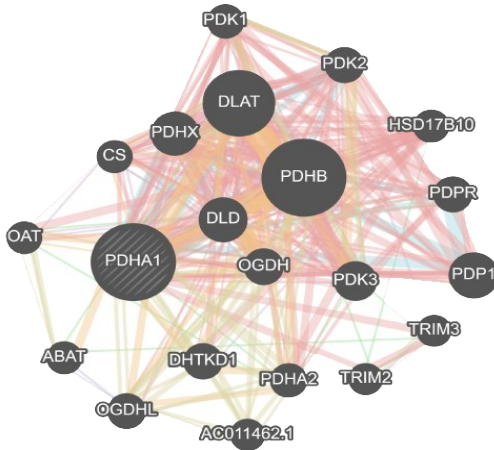


图3 PDHA1基因-基因互作网络

Figure3 PDHA1 gene-gene interaction network

2.5 PDHA1在乳腺癌中表达的预后价值

乳腺癌患者中PDHA1的表达与OS、RFS、

PPS、DMFS预后结果的关系如图4所示：PDHA1基因高表达组的OS ( $HR=1.26$ ,  $95\% CI=1.02\sim 1.54$ ,  $P=0.029$ )、RFS ( $HR=1.18$ ,  $95\% CI=1.05\sim 1.32$ ,  $P=0.005$ )、PPS ( $HR=1.41$ ,  $95\% CI=1.07\sim 1.86$ ,  $P=0.015$ )、DMFS ( $HR=1.29$ ,  $95\% CI=1.1\sim 1.52$ ,  $P=0.002$ )均低于低表达组。在TCGA数据库中进一步得到验证PDHA1基因高表达组的OS低于低表达组 ( $HR=1.47$ ,  $95\% CI=1.06\sim 2.05$ ,  $P=0.021$ )。单因素Cox回归分析结果提示TNM分期、病理分期、年龄、分子分型、绝经状态、放射治疗和PDHA1表达均为影响患者预后的因素 ( $P<0.05$ )。多因素Cox回归分析显示PDHA1表达不是乳腺癌患者预后的独立危险因素 (表2)。另外, 在年龄 $>60$ 岁、T2期、N3期、M0期、病理II期、绝经后、左乳乳腺癌患者的OS中, PDHA1高表达组低于PDHA1低表达组 (图5) ( $P<0.05$ )。

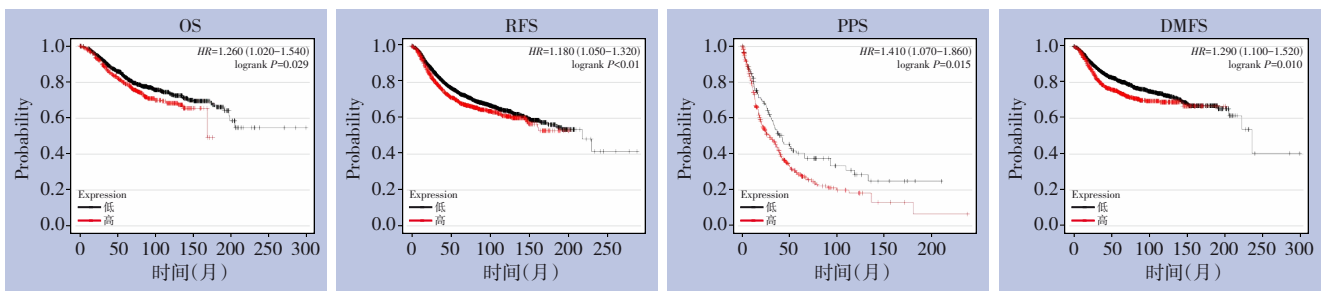


图4 PDHA1表达与乳腺癌的预后的关系

Figure 4 Relationship between PDHA1 expression and prognosis of breast cancer

表2 PDHA1单因素和多因素Cox回归分析

Table 2 Univariate Cox regression analysis and multivariate Cox regression analysis of PDHA1

项目	例数(n)	单因素		多因素	
		HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
T分期	1 061				
T1	274	—	—	—	—
T2	615	1.268(0.842~1.911)	0.256	0.775(0.317~1.896)	0.577
T3	137	1.579(0.937~2.661)	0.086	1.111(0.390~3.164)	0.844
T4	35	3.749(1.953~7.195)	<0.001	0.857(0.219~3.349)	0.825
N分期	1 045				
N0	507	—	—	—	—
N1	348	1.826(1.232~2.706)	0.003	1.020(0.488~2.135)	0.957
N2	116	2.502(1.472~4.253)	<0.001	2.108(0.576~7.718)	0.260
N3	74	4.202(2.323~7.601)	<0.001	3.948(1.172~13.298)	0.027
M分期	909				
M0	889	—	—	—	—
M1	20	4.327(2.508~7.465)	<0.001	12.048(1.830~79.303)	0.010

表 2 PDHA1 单因素和多因素 Cox 回归分析 (续)

Table 2 Univariate Cox regression analysis and multivariate Cox regression analysis of PDHA1 (continued)

项目	例数( <i>n</i> )	单因素		多因素	
		HR(95% CI)	<i>P</i>	HR(95% CI)	<i>P</i>
病理分期	1 041				
I	179	—	—	—	—
II	606	1.595(0.923~2.758)	0.095	2.810(0.732~10.783)	0.132
III	238	2.966(1.666~5.280)	<0.001	5.629(0.988~32.089)	0.052
IV	18	11.568(5.550~24.113)	<0.001	—	—
人种	975				
亚洲人	60	—	—	—	—
黑人或非裔美国人	178	1.550(0.470~5.105)	0.472	—	—
白种人	737	1.297(0.410~4.102)	0.657	—	—
年龄(岁)	1 064				
≤60	588	—	—	—	—
>60	476	2.036(1.468~2.822)	<0.001	2.343(1.256~4.371)	0.007
组织学类型	959				
浸润性导管癌	757	—	—	—	—
浸润性小叶癌	202	0.860(0.546~1.355)	0.516	—	—
PR 状态	1 016				
阴性	237	—	—	—	—
不确定	2	13.114(3.130~54.943)	<0.001	—	—
阳性	777	0.704(0.487~1.017)	0.061	0.569(0.227~1.428)	0.230
PR 状态	1 015				
阴性	338	—	—	—	—
不确定	4	0.877(0.120~6.410)	0.897	—	—
阳性	673	0.763(0.541~1.075)	0.122	—	—
HER-2 状态	717				
阴性	548	—	—	—	—
不确定	12	0.000(0.000~Inf)	0.994	—	—
阳性	157	1.611(0.981~2.644)	0.059	—	—
PAM50 亚型	1 024				
正常乳腺样型	190	1.187(0.756~1.864)	0.457	1.583(0.548~4.572)	0.396
luminal A 型	550	—	—	—	—
luminal B 型	202	1.689(1.103~2.587)	0.016	1.335(0.674~2.642)	0.407
HER-2 过表达型	82	2.292(1.341~3.919)	0.002	1.108(0.357~3.437)	0.859
月经状态	955				
绝经前	224	—	—	—	—
围绝经期	39	0.398(0.053~2.993)	0.371	0.949(0.120~7.481)	0.960
绝经后	692	2.218(1.316~3.737)	0.003	1.507(0.671~3.385)	0.320
肿瘤位置	1 064				
左	553	—	—	—	—
右	511	0.776(0.559~1.077)	0.130	—	—
放疗	971				
否	432	—	—	—	—
是	539	0.558(0.381~0.819)	0.003	0.420(0.247~0.712)	0.001
PDHA1	1 064				
低表达	531	—	—	—	—
高表达	533	1.474(1.061~2.047)	0.021	1.210(0.670~2.185)	0.526

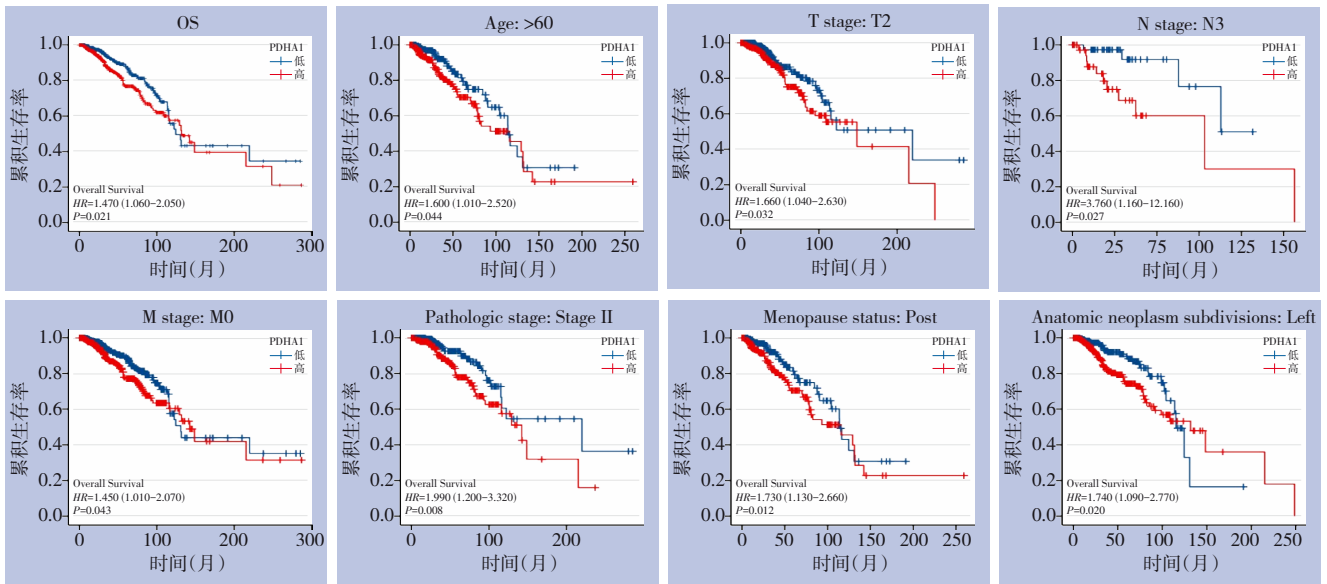


图5 PDHA1表达与乳腺癌各亚组预后的关系

Figure 5 Relationship between PDHA1 expression and prognosis of breast cancer subgroups

## 2.6 共表达基因的基因集富集分析(GSEA)

通过 GEPIA 数据库进行相关性分析, 筛选得到 PDHA1 的共表达基因, 为了进一步探索 PDHA1 共表达基因相关的信号通路, 对其进行 GSEA 富集分析, 并绘制山峦图 (图 6A-B)。结果显示与乳腺癌中 PDHA1 共表达基因显著相关的 6 条通路包括: S 期、姐妹染色单体分离、细胞周期检查点、细胞外基质组织、核心基质、三羧酸循环通路。

## 2.7 化合物预测分析

从 GeneCards 数据库中得到与 PDHA1 有关的化合物共 10 种: 辅酶 A、CPI-613、硫辛酰胺、辅酶、 $\alpha$ -酮异戊酸酯、2-氧代丁酸、丙酮酸、辅羧酶、

二氧化碳、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (图 7)。其中已批准的化合物是: 丙酮酸、辅羧酶、二氧化碳、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; 尚在实验中的是: 硫辛酰胺、辅酶、 $\alpha$ -酮异戊酸酯、2-氧代丁酸; 尚在研究中的是: 辅酶 A、CPI-613。

## 2.8 构建预后列线图模型

建立一种临床适用的预测乳腺癌患者预后的列线图来预测 1、3、5 年生存率 (图 8A)。5 个预后参数: PDHA1 表达、年龄、放疗、N 分期和 M 分期被纳入预测模型。校准图显示列线图预测和实际观察之间有极好的一致性 (图 8B)。



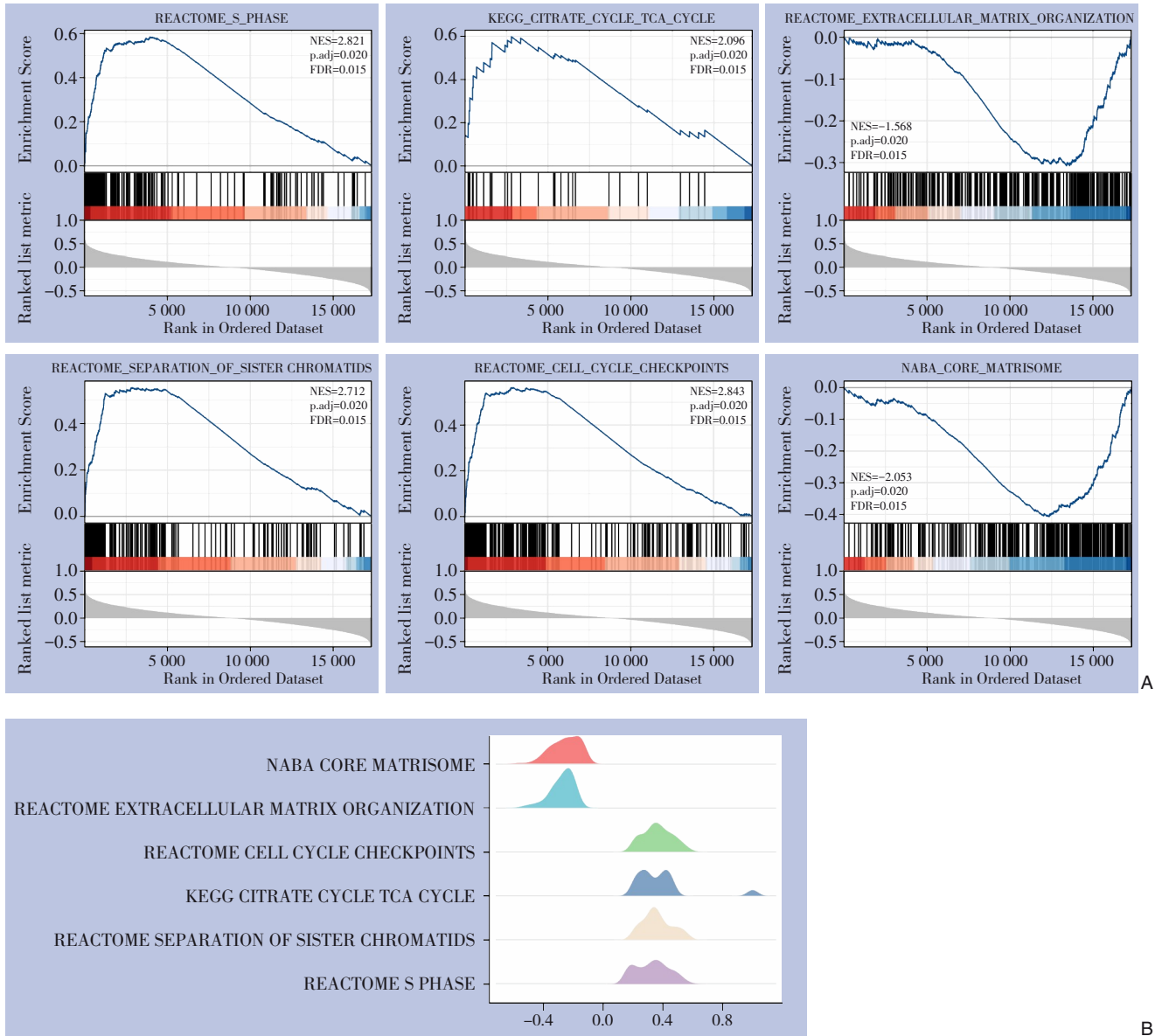
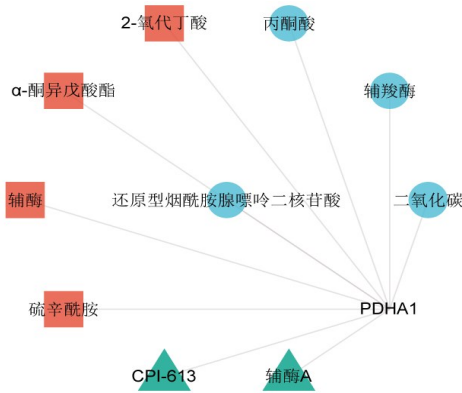


图6 集富集分析 A: PDHA1 共表达基因基因集富集分析; B: PDHA1 共表达基因基因集富集分析山峦图

Figure 6 Enrichment analysis A: Gene set enrichment analysis of PDHA1 co-expressed gene; B: Mountains map for enrichment analysis of PDHA1 co-expressed gene set



Cluster ● 已批准 ■ 实验中 ▲ 研究中

图7 PDHA1 相关化合物

Figure 7 PDHA1 related compounds

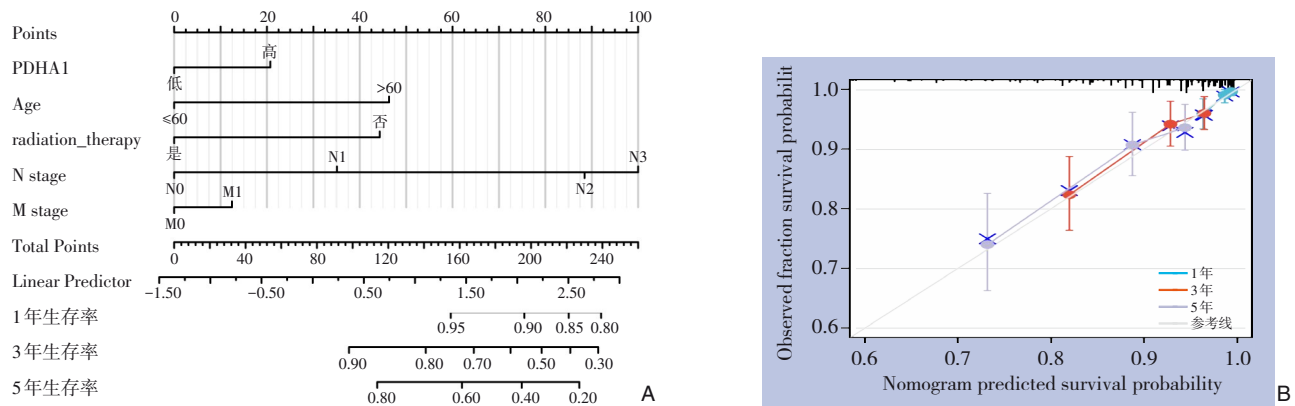


图8 列线图预测模型 A: 乳腺癌预后模型列线图的构建; B: 乳腺癌预后列线图模型校准图

Figure 8 Nomogram prediction model A: Construction of nomograms for prognosis model of breast cancer; B: Calibration curves of breast cancer prognostic nomogram model

### 3 讨论

PDHA1 作为丙酮酸脱氢酶复合物的关键调控位点, 发挥着连接糖酵解和三羧酸循环的重要作用, 对癌症代谢转变具有重要意义。最新研究<sup>[10]</sup>发现了一种细胞体内依赖铜离子并且受到调控的新的死亡方式, 即铜死亡, PDHA1 是铜死亡的相关基因, 参与铜死亡过程的调控。

Sun 等<sup>[13]</sup>研究发现: 肝癌中 PDHA1 表达低于正常肝脏组织, 其表达与肝癌的肿瘤大小、肿瘤分化和肿瘤分期相关; Song 等<sup>[11]</sup>研究发现胃癌中 PDHA1 的表达低于正常胃黏膜组织, 其表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期和神经浸润显著相关; 吴雅珣等研究<sup>[12]</sup>发现: 子宫颈鳞状细胞癌组织中 PDHA1 表达显著高于癌旁鳞状上皮组织, 其表达与患者年龄、肿瘤浸润深度、盆腔淋巴结转移、FIGO 分期有关。本研究发现: 与癌旁乳腺组织相比, PDHA1 在乳腺癌组织中表达下调, 其表达与 T 分期 ( $P<0.001$ )、病理分期 ( $P=0.031$ )、人种 ( $P<0.001$ )、组织学类型 ( $P<0.001$ )、PR 状态 ( $P<0.001$ )、ER 状态 ( $P<0.001$ )、PAM50 亚型 ( $P<0.001$ ) 相关。Sun 等<sup>[13]</sup>报道肝癌中 PDHA1 表达水平降低与患者 OS 低有关; Song 等<sup>[11]</sup>报道胃癌中 PDHA1 的低表达与患者较差的总体生存率显著相关。然而吴雅珣等<sup>[12]</sup>研究报道子宫颈鳞状细胞癌 PDHA1 高表达患者的 OS 较低表达患者的长; Chen 等<sup>[14]</sup>发现头颈鳞状细胞癌中较高的 PDHA1 表达似乎与患者 5 年内较差的 OS 相关, 而在长期 (>6 年) 环境中, PDHA1 表达较高的头颈鳞状细胞

癌患者却表现出稳定的生存趋势; Jiang 等<sup>[25]</sup>研究发现: 与正常组织相比, 乳腺癌中 PDHA1 的表达下调, 而 PDHA1 水平升高的乳腺癌患者 OS、RFS 均较差, 这与本研究结果一致。本研究发现: 乳腺癌中 PDHA1 低表达组患者的 OS ( $P=0.029$ )、RFS ( $P=0.0051$ )、PPS ( $P=0.015$ )、DMFS ( $P=0.0023$ ) 均较 PDHA1 高表达组患者的长。另外进一步分层分析中: 年龄>60 岁、T2 期、N3 期、M0 期、病理 II 期、绝经后患者的 OS PDHA1 高表达组低于 PDHA1 低表达组 ( $P<0.05$ )。值得关注的是, PDHA1 在乳腺癌组织中的表达低于正常乳腺组织, 但 PDHA1 低表达乳腺癌患者却有较好的预后, 提示 PDHA1 可能在乳腺癌发生发展过程中不仅发挥单一的抑癌或促癌作用。

为分析 PDHA1 在乳腺癌发生发展中的生物学功能及分子调控机制, 本研究利用 Gene MANIA 数据库绘制 PDHA1 基因-基因互作网络, 结果显示与 PDHA1 相关互作基因有 20 个, 其中 DLD, DLAT, PDHB 是参与铜死亡过程的基因; 另外 GSEA 结果显示 PDHA1 共表达基因显著相关的通路共 6 条, 包括与铜死亡密切相关的三羧酸循环通路。Tsvetkov 等<sup>[10]</sup>研究证明铜死亡主要取决于细胞内铜的积累。一项 Meta 分析<sup>[26]</sup>显示: 与良性乳腺疾病和健康对照组相比, 乳腺癌患者的血清铜水平显著升高。由此, PDHA1 可能通过调节铜死亡在乳腺癌中发挥关键作用。而曹静等<sup>[27]</sup>研究发现 PDHA1 表达及活性下降可导致 Warburg 效应增强, 肿瘤细胞加速分裂, 从而导致肿瘤的侵袭性增加。Liu 等<sup>[28]</sup>研究显示乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白

(HBXIP) 调节糖代谢重编程并下调乳腺癌中的细胞色素 c 氧化酶 2 (SCO<sub>2</sub>) 和 PDHA1, SCO<sub>2</sub> 和 PDHA1 的下调导致乳酸产生和细胞内葡萄糖的增加, 以及活性氧 (ROS) 的减少, 促进乳腺癌细胞的生长。因此, 笔者推测 PDHA1 可能通过调控 Warburg 效应与铜死亡过程促进乳腺癌的发生发展进而影响患者预后, 这需后续实验进一步研究。

列线图对肿瘤预后的评估具有重大价值。宋张骏等<sup>[29]</sup>研究利用 SEER 数据库中的临床病理资料构建的列线图预后模型可以准确预测初诊乳腺癌肝转移患者预后状态。Sha 等<sup>[30]</sup>研究将年龄、肿瘤分期和铜死亡相关基因评分 (CRG-score) 作为参数所构建的列线图用于预测三阴性乳腺癌患者的总生存率具有较高的准确性。本研究首次将 PDHA1 的表达、年龄、放疗、N 分期和 M 分期纳入预测模型构建乳腺癌患者的预后预测列线图, 校准图结果显示列线图预测和实际观察之间有极好的一致性。本研究构建的列线图可为临床医生对乳腺癌患者预后的评估以及为乳腺癌患者制定个体化治疗方案提供依据。基于 PDHA1 对乳腺癌患者预后具有良好的预测作用, 本研究利用 GeneCards 数据库寻找与 PDHA1 有关的潜在相互作用的化合物, 得到辅酶 A、CPI-613、硫辛酰胺、辅酶等 10 种可能使 PDHA1 的表达发生逆转, 有望成为治疗乳腺癌的化合物。

但本研究存在一定的局限: 仅在数据库对乳腺癌 PDHA1 的表达及预后进行了研究, 缺乏进一步的体内和体外实验验证; 对于 PDHA1 如何调控铜死亡及 Warburg 效应进而影响乳腺癌发生发展缺乏了解, 后期我们将设计具体实验进一步探究。

综上所述, PDHA1 基因高表达组患者的 OS、RFS、PPS、DMFS 较 PDHA1 低表达组患者的短, PDHA1 表达水平是影响乳腺癌患者预后的相关因素。本研究所构建的列线图可为临床医生更准确地判断乳腺癌患者的预后, 有望为乳腺癌患者制定个体化治疗方案提供依据。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

## 参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for

36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660.

[2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1):7–34. doi: 10.3322/caac.21551.

[3] Hunter NB, Kilgore MR, Davidson NE. The long and winding road for breast cancer biomarkers to reach clinical utility[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(21):5543–5545. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2451.

[4] Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3):211–218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.

[5] Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression[J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(7): 912–919. doi: 10.1080/09553002.2019.1589653.

[6] Lu JR. The Warburg metabolism fuels tumor metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(1/2):157–164. doi: 10.1007/s10555-019-09794-5.

[7] Sun WQ, Liu Q, Leng JY, et al. The role of Pyruvate Dehydrogenase Complex in cardiovascular diseases[J]. *Life Sci*, 2015, 121:97–103. doi: 10.1016/j.lfs.2014.11.030.

[8] Jelinek BA, Moxley MA. Detailed evaluation of pyruvate dehydrogenase complex inhibition in simulated exercise conditions[J]. *Biophys J*, 2021, 120(5): 936–949. doi: 10.1016/j.bpj.2021.01.018.

[9] Patel MS, Nemeria NS, Furey W, et al. The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(24): 16615–16623. doi: 10.1074/jbc.R114.563148.

[10] 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.

[11] Song L, Liu DY, Zhang XL, et al. Low expression of PDHA1 predicts poor prognosis in gastric cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(3):478–482. doi: 10.1016/j.prp.2018.12.038.

[12] 吴雅珣, 张邢松, 沈蓉, 等. 子宫颈鳞状细胞癌中 PDHA1 的表达及临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2022, 38(3):284–288. doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2022.03.006.

Wu YX, Zhang XS, Shen R, et al. Expression of PDHA1 in cervical squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2022, 38(3):284–288. doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2022.03.006.

[13] Sun JH, Li JJ, Guo ZX, et al. Overexpression of pyruvate dehydrogenase E1 $\alpha$  subunit inhibits Warburg effect and induces cell apoptosis through mitochondria-mediated pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Res*, 2019, 27(4):407–414. doi:

- 10.3727/096504018X15180451872087.
- [14] Chen TY, Hsieh YT, Huang JM, et al. Determination of pyruvate metabolic fates modulates head and neck tumorigenesis[J]. *Neoplasia*, 2019, 21(7):641–652. doi: 10.1016/j.neo.2019.04.007.
- [15] Bian ZL, Fan R, Xie LM. A novel cuproptosis-related prognostic gene signature and validation of differential expression in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Genes*, 2022, 13(5): 851. doi: 10.3390/genes13050851.
- [16] Li YQ, Huang RX, Li XL, et al. Decreased expression of pyruvate dehydrogenase A1 predicts an unfavorable prognosis in ovarian carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(9):2076–2087.
- [17] Wang ZN, Jensen MA, Zenklusen JC. A practical Guide to the cancer genome atlas (TCGA)[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1418: 111–141. doi: 10.1007/978-1-4939-3578-9\_6.
- [18] 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.
- [19] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649–658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002.
- [20] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605–D612. doi: 10.1093/nar/gkaa1074.
- [21] Vlasblom J, Zuberi K, Rodriguez H, et al. Novel function discovery with GeneMANIA: a new integrated resource for gene function prediction in *Escherichia coli*[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(3):306–310. doi: 10.1093/bioinformatics/btu671.
- [22] Hou GX, Liu PP, Yang J, et al. Mining expression and prognosis of topoisomerase isoforms in non-small-cell lung cancer by using OncoPrint and Kaplan-Meier plotter[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174515. doi: 10.1371/journal.pone.0174515.
- [23] Tang ZF, Li CW, Kang BX, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98–102. doi: 10.1093/nar/gkx247.
- [24] Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator[J]. *Database (Oxford)*, 2010, 2010:baq020. doi: 10.1093/database/baq020.
- [25] Jiang BH, Zhu HB, Feng WJ, et al. Database mining detected a cuproptosis-related prognostic signature and a related regulatory axis in breast cancer[J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 9004830. doi: 10.1155/2022/9004830.
- [26] Feng Y, Zeng JW, Ma Q, et al. Serum copper and zinc levels in breast cancer: a meta-analysis[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2020, 62: 126629. doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126629.
- [27] 曹静, 曾宪旭, 雷冬梅, 等. 肺鳞癌 LC-42 及腺癌 SELS 细胞中 PDHA1 及 GBP1 表达的测定[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2021, 56(2):232–235. doi: 10.13705/j.issn.1671-6825.2020.07.024.
- Cao J, Zeng XX, Lei DM, et al. Detection of PDHA1 and GBP1 expressions in lung squamous cell carcinoma LC-42 and lung adenocarcinoma SELS cells[J]. *J Journal of Zhengzhou University: Medical Sciences*, 2021, 56(2):232–235. doi: 10.13705/j.issn.1671-6825.2020.07.024.
- [28] Liu FB, Zhang WY, You XN, et al. The oncoprotein HBXIP promotes glucose metabolism reprogramming via downregulating SCO2 and PDHA1 in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 27199–27213. doi: 10.18632/oncotarget.4508.
- [29] 宋张骏, 刘奋德, 王虎霞, 等. 初诊乳腺癌肝转移患者列线图预后模型的构建[J]. *中国普通外科杂志*, 2021, 30(11):1274–1284. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.002.
- Song ZJ, Liu FD, Wang HX, et al. Construction of a prognostic nomogram model for newly diagnosed patients with breast cancer liver metastases[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2021, 30(11):1274–1284. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.002.
- [30] Sha SN, Si LY, Wu XR, et al. Prognostic analysis of cuproptosis-related gene in triple-negative breast cancer[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:922780. doi: 10.3389/fimmu.2022.922780.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 杨秋怡, 易嘉宁, 郭妙兰, 等. 铜死亡相关基因 PDHA1 与乳腺癌的预后关系及列线图的构建[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(11): 1471–1482. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.11.009

**Cite this article as:** Yang QY, Yi JN, Guo ML, et al. Relationship between cuproptosis related gene PDHA1 and prognosis of breast cancer and its nomogram construction[J]. *Chin J Gen Surg*, 2022, 31(11): 1471–1482. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.11.009