DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230721.003
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20230721.1632.006

基于铜死亡相关LncRNAs评估胃癌预后、免疫浸润及中药预测

贠张君[1],沈 洋[1],米虽才[2],刘 铸[1],范秋月[1],刘爱琪[1],翟苗杰[1],侯 丽[1]✉
(1.北京中医药大学东直门医院,北京 100700;2.厦门市中医院肿瘤科,福建 厦门 361015)

[摘要] **目的**:基于铜死亡相关的LncRNAs(cuproptosis-related LncRNAs,CRLs)建立胃癌(gastric cancer,GC)预后模型,预测调控铜死亡相关基因(cuproptosis-related genes,CRGs)的中药。**方法**:从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas,TCGA)数据库获取443例GC的临床资料及RNA-seq,通过Pearson分析、Cox回归、最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator,LASSO)回归等方法筛选CRLs构建预测GC预后的风险模型,结合风险评分和临床特征构建列线图。通过受试者工作特征曲线、Kaplan-Meier曲线和C-指数验证模型的准确性。评估风险评分与免疫浸润、免疫检查点基因表达和化疗/靶向药的相关性。应用Coremine Medical数据库预测调控CRGs的潜在中药。**结果**:基于7个CRLs(AP001107.9、VCAN-AS1、AC016394.2、LINC02675、AC100814.1、HAGLR和LINC01094)的风险评分构建GC风险模型。风险模型预测GC患者1、3、5年生存率的AUC分别为0.720、0.682、0.711,其预后价值优于年龄、Grade分级、TNM分期。结合年龄、TNM分期的风险模型预测GC患者1年生存率的AUC为0.793。风险评分与肿瘤浸润淋巴细胞、调节性T细胞等免疫细胞富集程度及LAG3、ICOS、CD28、NRP1等22个免疫检查点基因表达和13种化疗/靶向药的敏感性具有相关性。对CRGs具有潜在调节作用的中药有58种,其功效以清热解毒、活血止痛为主,主归肝、脾、肺经,螺旋藻和蛇床子对铜死亡机制的关键基因*FDX1*具有潜在调控作用。**结论**:基于7个CRLs构建的风险模型可评估GC的预后、免疫,螺旋藻及蛇床子可能对铜死亡机制具有重要的调控效能。

[关键词] 铜死亡;LncRNAs;胃癌;预后模型;免疫浸润;中药
[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)21-1642-13

Assessment of gastric cancer prognosis, immune infiltration based on cuproptosis-related LncRNAs and prediction of traditional Chinese medicine

YUN Zhang-jun[1], SHEN Yang[1], MI Sui-cai[2], LIU Zhu[1], FAN Qiu-yue[1], LIU Ai-qi[1], ZHAI Miao-jie[1], HOU Li[1]✉
(1. *Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100700, *China*; 2. *Department of Oncology, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen* 361015, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by National Natural Science Foundation of China* (81573959); *Capital Health Development Research Special Project* (2020-2-4193)
[*Author*]: *YUN Zhang-jun, Ph.D student, E-mail: yunzj*1219@163.*com.*
[*Correspondence to*]: *HOU Li, Ph.D., Chief Physician, E-mail: houli*1203@126.*com.*
Received: 2023-05-11 *Revised*: 2023-07-19 *JHMU*, 2023;29(21):1642-1654

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: Constructing a prognostic model for gastric cancer (GC) based on cuproptosis-related LncRNAs (CRLs) and predict the traditional Chinese medicine that regulates cuproptosis-related genes (CRGs). **Methods**: Clinical data and RNA-seq of 443 GC cases were obtained from The Cancer Genome Atlas database, and CRLs were screened by Pearson analysis, Cox regression, and least absolute shrinkage and selection operator regression to construct a risk model to predict GC prognosis, and the nomogram was constructed by combining risk scores and clinical characteristics. The accuracy of the model was validated by the receiver operating characteristic curve, Kaplan-Meier curves and C-index. The correlation of risk scores with immune

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81573959);首都卫生发展科研专项项目(2020-2-4193)
[作者简介] 贠张君,在读博士生,E-mail: yunzj1219@163.com。
[通讯作者] 侯丽,博士,主任医师,E-mail:houli1203@126.com。
[收稿日期] 2023-05-11 [修回日期] 2023-07-19 网络出版时间:2023-07-24 10:36:05

infiltration, immune checkpoint gene expression and chemotherapy/targeted agents was assesssed. The Coremine Medical database was applied to predict potential traditional Chinese medicine that regulates CRGs. **Results**: Risk models for GC were constructed based on the risk scores of seven CRLs (AP001107.9, VCAN-AS1, AC016394.2, LINC02675, AC100814.1, HAGLR, and LINC01094). The AUC of the risk model predicting 1-, 3-, and 5-year survival in GC patients was 0.720, 0.682, and 0.711, respectively and its prognostic value was better than age, grade classification, and TNM stage. The AUC of the risk model combining age and TNM stage to predict 1-year survival in GC patients was 0.793. The risk score correlated with the degree of enrichment of immune cells such as tumor-infiltrating lymphocytes and regulatory T cells and the expression of 22 immune checkpoint genes such as *LAG3*, *ICOS*, *CD28*, *NRP1* and the sensitivity of 13 chemotherapeutic/targeted agents. There were 58 traditional Chinese medicine with potential regulatory effects on CRGs, mainly for clearing heat and detoxing, promoting blood circulation and relieving pain, which were mainly attributed to the liver, spleen and lung meridians. Spirulina and osthole had potential regulatory effects on *FDX1*, a key gene in the death mechanism of cuproptosis. **Conclusion**: A risk signature constructed based on seven CRLs could assess the prognosis and immunity of GC, and Spirulina and Serpentine may have important regulatory efficacy on the mechanism of copper cuproptosis.

[**KEYWORDS**] Cuproptosis; LncRNAs; Gastric cancer; Prognostic signature; Immune infiltration; Traditional Chinese medicine

胃癌(gastric cancer,GC)是指原发于胃上皮的恶性肿瘤。据世界卫生组织最新的癌症统计数据显示,2020年GC新发病例数108.9万,死亡病例数76.9万,发病率位居全球恶性肿瘤第6位,死亡率居第3位[1]。我国是GC大国,2020年全球约一半的新发和死亡病例在中国,严重威胁国民生命健康。GC早期缺乏特异性症状,因此增加了GC诊断和治疗的难度。临床分期可以在一定程度上评估患者的预后,帮助患者选择合适的治疗策略,但是其准确性仍有待提高。因此,有必要进一步探索具有更高预后效能的生物标志物,尽早识别高危患者,制定个体化治疗方案提高治疗有效率。

铜是机体内许多生物学过程所必需的辅助因子,但其浓度超过一定阈值时可具有一定毒性并诱导细胞死亡。Tsvetkov等[2]的研究发现,细胞内过量的铜会引发线粒体脂质化蛋白的聚集和Fe-S簇蛋白的不稳定,导致蛋白质毒性应激,抑制线粒体呼吸调节功能诱导细胞死亡。其不同于以往的调节性细胞死亡(如凋亡、铁凋亡和坏死),这种新型的细胞死亡方式称之为"铜死亡"。另外,研究表明依赖线粒体呼吸的细胞比依赖糖酵解的细胞对铜离子的敏感性高1 000倍,铜死亡机制可能对线粒体呼吸敏感的细胞更加敏感。另一项研究发现,线粒体呼吸功能对GC的进展具有重要作用,通过敲除TIMMDC1(位于线粒体内膜4通道的膜蛋白)抑制线粒体呼吸可显著抑制GC细胞的增殖和转移,线粒体呼吸功能可能在GC的发生发展中具有重要作用[3]。同时,已有研究证实双硫仑(DSF)/铜复合物可通过多种途径抑制GC细胞的增殖和转移[4,5],铜螯合剂还有望成为突破乳腺癌、肝癌、肺癌和黑色素瘤等多种癌症耐药瓶颈的治疗药物[6-9]。因此,深入研究铜死亡机制在GC中的作用具有重要价值。

长链非编码RNAs(long noncoding RNA,LncRNAs)是一种长度大于200个核苷酸但不编码蛋白质的RNA转录本[10]。LncRNAs调控人类70%的基因表达,并可与DNA、RNA和蛋白质相互作用,发挥增强或抑制作用[11]。虽然外显子组测序的临床应用识别了许多适合靶向治疗的蛋白质编码突变,但编码基因组在所有基因序列中占比不到2%[11]。越来越多的证据表明,在特定的细胞类型中LncRNAs比mRNA的调控作用更加精准,LncRNAs的突变对癌症表型具有同等重要的驱动作用[12]。例如,某些LncRNAs可以促进胆囊癌细胞增殖[13],抑制卵巢癌转移[14],并增强乳腺癌化疗耐药性[15]。LncRNA ABL在GC细胞中显著高表达,其通过结合APAF1抑制caspase酶活化促进GC细胞增值[16]。因此,LncRNAs对肿瘤发病机制及治疗策略的研究具有重大前景。

值得注意的是,铜死亡相关LncRNAs(cuproptosis -related LncRNAs,CRLs)对GC的治疗、预后、免疫功能评估价值尚未得到系统性评价,铜死亡在GC中的机制也待进一步阐明。另外,中药作为天然产物对于肿瘤治疗药物的研发具有重大价值,其活性成分不仅在铁死亡[17]、细胞焦亡[18]、细胞凋亡[19]等多个细胞死亡途径具有重要驱动作用,还具有安全、经济等优点。因此,本研究以铜死亡为切入点,筛选和评估CRLs对GC的预后价值,探讨CRLs与免疫细胞浸润、免疫功能、化疗药物敏感性之间的关系,并预测对调控铜死亡相关基因(cuproptosis-related genes,CRGs)具有潜在调控作用的中药,以期为GC的治疗、预后以及新药研发提供参考

依据。

1 材料与方法

由于本研究是对先前公开发表的数据进行再次分析，因此无需额外的伦理批准。

1.1 数据获取

从癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）数据库（https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-STAD）获取443例GC患者的临床、转录组和肿瘤突变负荷数据，应用Perl脚本获得标准化的基因表达矩阵，并对数据进行log2处理。通过GENCODE v40的注释文件（https://www.gencodegenes.org/）区分转录组数据中的lncRNA和mRNA。

1.2 CRLs的识别

从先前的基础研究[2,20,21]中，确定16个CRGs（*NLRP3*、*ATP7B*、*ATP7A*、*SLC31A1*、*FDX1*、*LIAS*、*LIPT1*、*LIPT2*、*DLAT*、*PDHA1*、*MTF1*、*GLS*、*CDKN2A*、*DBT*、*GCSH*、*DLST*），提取CRGs在443例GC中的表达数据。将CRGs和LncRNAs表达数据进行Pearson相关性分析获得CRLs，筛选条件为|Pearson相关系数|＞0.4，P＜0.001。Pearson相关系数＞0代表正调控，若其＜0则为负调控。使用R“ggplot2”，“ggalluvial”和“dplyr”绘制CRGs和CRLs的桑基图。

1.3 风险模型的构建和验证

按照7∶3将GC患者（All）随机分为训练组（Train）和验证组（Vali），在Train组中通过单因素Cox回归筛选与预后显著相关的CRLs（P＜0.05），风险比（hazard rates，*HR*）用于确定CRLs为危险因素（HR＞1）或保护因素（*HR*＜1）。随后应用最小绝对收缩和选择算子（least absolute shrinkage and selection operator，LASSO）回归对CRLs再次筛选。为了避免过拟合，采用10折交叉验证法选择最佳惩罚参数。最终将LASSO回归识别的CRLs纳入多因素Cox比例风险回归中，通过计算每个CRL的风险评分构建风险模型。风险评分计算方法如下：

$$Risk\ Score=\sum_{i=1}^{n}(coefi*x_i)$$

N表示风险模型中CRLs的数量，$coef_i$表示多因素Cox回归分析中CRLs的相关回归系数，x_i表示CRLs的表达水平。

根据中位风险评分，将Train组和Vali组GC患者分别分为低危组和高危组。通过Kaplan-Meier（KM）曲线比较高、低危组的总生存期（overall survival，OS）和无进展生存期（progression free survival，PFS）评估风险模型预测GC生存率的准确性，应用试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线预测患者1、3、5年生存率，以验证风险模型的准确性。

1.4 构建结合临床特征的列线图

为提高预测GC生存率的准确性，应用R“survival“和“RMS”包构建结合临床特征的列线图，并使用ROC曲线、校准曲线、C-指数评估列线图的准确性。随后，对年龄、性别、Stage分期、Grade分级、风险评分进行单因素和多因素Cox回归分析，评估风险评分是否可做为GC的独立预后因素。

1.5 临床亚组分析和主成成分分析

将GC患者分为早期（Ⅰ～Ⅱ期）和晚期（Ⅲ～Ⅳ期），根据中位风险评分将早期和晚期组GC患者分别分为高、低危组，使用KM生存曲线比较高、低危组间生存率差异，以检验风险模型评估预后是否可独立于临床分期。通过主成分分析（principal component analysis，PCA）验证模型中CRLs的分组能力。

1.6 功能富集分析

为探究风险评分与生物学过程的关系，根据中位风险评分将GC患者分为高、低危组，使用R“limma”包识别组间差异基因，筛选条件为| log2（fold change）|＞1和FDR＜0.05。应用“clusterProfiler”包对差异基因进行基因本体论（gene ontology，GO）富集分析（adjusted P＜ 0.05）。

1.7 免疫功能、突变基因及药物敏感性分析

根据中位风险评分将GC患者分为高、低危组，基于单样本基因集富集分析（single-sample gene set enrichment analysis，ssGSEA）比较高、低危组中16种免疫细胞、13条免疫相关通路的浸润评分以及免疫检查点抑制基因表达差异，以确定风险评分与免疫功能之间的关系。为评价风险评分与突变基因的关系，基于GC的肿瘤突变负荷（tumor mutational burden，TMB）数据，应用R“maftools”包将高、低危组中癌症相关基因的突变频率可视化。最后，使用“pRophetic”算法评估化疗/靶向药物的50％抑制浓度（IC50），以确定风险评分在预测药物敏感性方面的价值。组间差异均采用Wilcoxon符号秩检验评估。

1.8 CRGs的中药预测

将CRGs导入Coremine数据库（https://corem-

ine.com/medical/#search)映射出具有潜在调控作用的中药,筛选条件为Significance<0.01。通过古今云医案平台(https://www.yiankb.com/)将中药的性味归经及功效分布可视化展示。

表1 443例GC的临床特征

Tab 1 Clinical characteristics of 443 gastric cancer

患者	n(%)
年龄(中位年龄,岁)	30~90 (67)*
性别[n(%)]	
女性	158 (35.67)
男性	285 (64.33)
Grade分级 [n(%)]	
G1	12 (2.71)
G2	159 (35.89)
G3	263 (59.37)
G4	0 (0.00)
NA	9 (2.03)
Stage分期[n(%)]	
Stage Ⅰ	59 (13.32)
Stage Ⅱ	130 (29.35)
Stage Ⅲ	183 (41.31)
Stage Ⅳ	44 (9.93)
NA	27 (6.09)
T分期[n(%)]	
T1	23 (5.19)
T2	93 (20.99)
T3	198 (44.70)
T4	119 (26.86)
NA	10 (2.26)
N分期[n(%)]	
N0	132 (29.80)
N1	119 (26.86)
N2	85 (19.19)
N3	88 (19.86)
NA	19 (4.29)
M分期[n(%)]	
M0	391 (88.26)
M1	30 (6.77)
NA	22 (4.97)
生存期	
中位总体生存期(d)	418

*年龄范围(中位年龄)。

1.9 统计学处理

使用Pearson相关性分析确定CRLs。在Train组中,通过单因素Cox、Lasso、多因素Cox回归构建风险模型。Train组和Vali组之间的临床特征差异通过卡方检验进行。风险模型的准确性通过timeROC曲线和C-index评估。组间免疫浸润和化疗药物敏感性差异均采用Wilcoxon符号秩检验评估,R语言为4.2.2版本。

2 结果

2.1 CRLs的获取

本研究使用TCGA-STAD队列中443例GC的临床数据,其临床特征见表1。

表2 Train组和Vali组GC患者的临床特征比较

Tab 2 The comparison of clinical characteristics of GC patients between the Train and Vali groups

临床特征	Train组(n)	%	Vali组(n)	%	P
年龄					
≤65	115	44.23	48	43.24	>0.05
>65	144	55.38	61	54.95	-
NA	1	0.38	2	1.80	-
性别					
女性	92	35.38	41	36.94	>0.05
男性	168	64.62	70	63.06	-
Grade分级					
G1	5	1.92	5	4.50	>0.05
G2	91	35.00	43	38.74	-
G3	156	60.00	62	55.86	-
NA	8	3.08	1	0.90	-
Stage分期					
Stage Ⅰ	36	13.85	14	12.61	>0.05
Stage Ⅱ	75	28.85	36	32.43	-
Stage Ⅲ	107	41.15	42	37.84	-
Stage Ⅳ	26	10.00	12	10.81	-
NA	16	6.15	7	6.31	-
T分期					
T1	12	4.62	6	5.41	>0.05
T2	52	20.00	26	23.42	-
T3	123	47.31	44	39.64	-
T4	67	25.77	33	29.73	-
NA	6	2.30	2	1.80	-
N分期					
N0	75	28.85	33	29.73	>0.05
N1	64	24.62	33	29.73	-
N2	53	20.38	21	18.92	-
N3	53	20.38	21	18.92	-
NA	15	5.77	3	2.70	-
M分期					
M0	227	87.31	101	90.99	>0.05
M1	18	6.92	7	6.31	-
NA	15	5.77	3	2.70	-

从TCGA-STAD队列中仅获得407例GC的转录组数据,包括19 939个mRNAs和16 876个lncRNAs。通过Pearson相关性分析筛选出429个CRLs,见图1。

2.2 风险模型的构建和验证

在删除临床数据缺失的GC患者后,共371例患者被随机分配到Train组(n=260)和Vali组(n=111),两组之间的临床特征无差异,具有可比性,见表2。在Train组中,通过单因素Cox分析获得27个与生存预后相关的CRLs(图2A),其中4个为保护

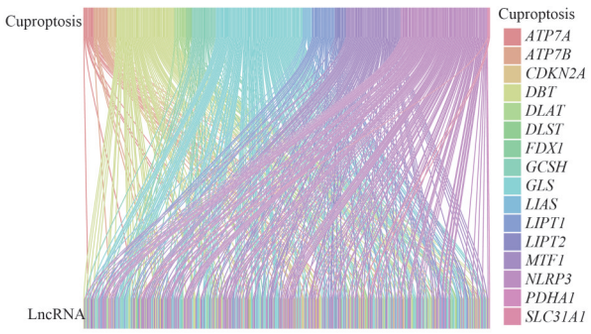


图1　CRGs与LncRNAs之间联系的桑基图

Fig 1　Sankey diagram of the association between CRGs and LncRNAs

基因(*HR*<1),23个为危险基因(*HR*>1)。随后根据LASSO回归和多因素Cox回归分析(图2B、C),最终确立7个CRLs(AP001107.9、VCAN-AS1、AC016394.2、LINC02675、AC100814.1、HAGLR、LINC01094)纳入风险模型。风险模型中7个CRLs和CRG之间的相关性见图2D。

通过计算7个CRLs的风险评分构建风险模型,风险评分通过以下公式计算:风险分数=(−0.215×AP001107.9的表达水平)+(0.688×VCAN-AS1的表达水平)+(−0.416×AC016394.2的表达水平)+(0.459×LINC02675的表达水平)+(0.253×AC100814.1的表达水平)+(0.196×HAGLR表达水平)+(0.583×LINC01094的表达水平)。根据中位风险分数,将Train组(图3A)和Vali组(图3B)的GC患者分别分为高危组和低危组。两组中高危组死亡人数均显著高于低危组(图3C、D)。Train组(图3E)和Vali组(图3F)中高、低危组间的CRLs的表达量存在差异,2个保护性lncRNAs(AP001107.9和AC016394.2)在低危组的表达量增加,5个风险lncRNAs(VCAN-AS1、LINC02675、AC100814.1、HAGLR、LINC01094)在高危组增加。生存分析显示高危组OS和PFS显著差于低危组(图3G~J,$P<0.05$)。风险模型预测Train组1、3、5年生存率的AUC为0.720、0.682和0.711(图3K),预测All组1、3、5年生存率的AUC为0.713、0.620和0.676(图3M)。

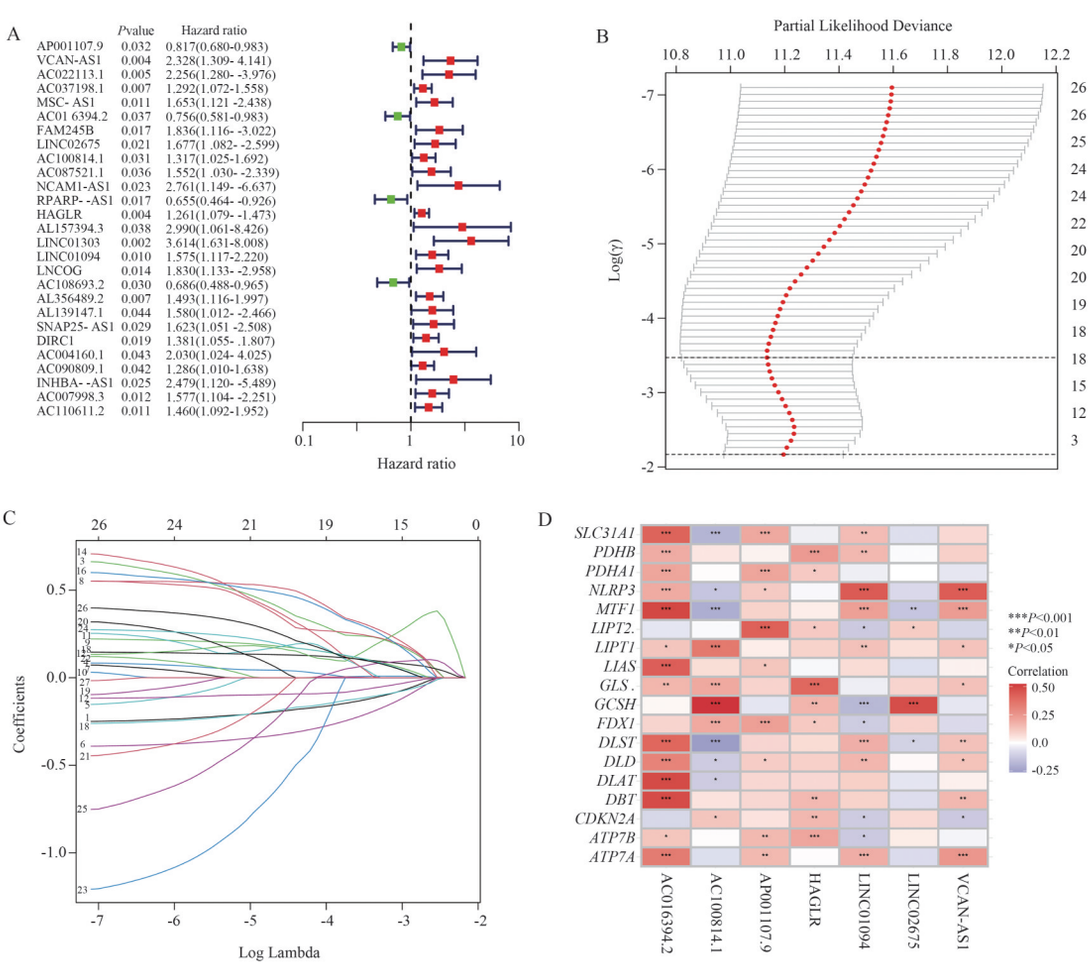
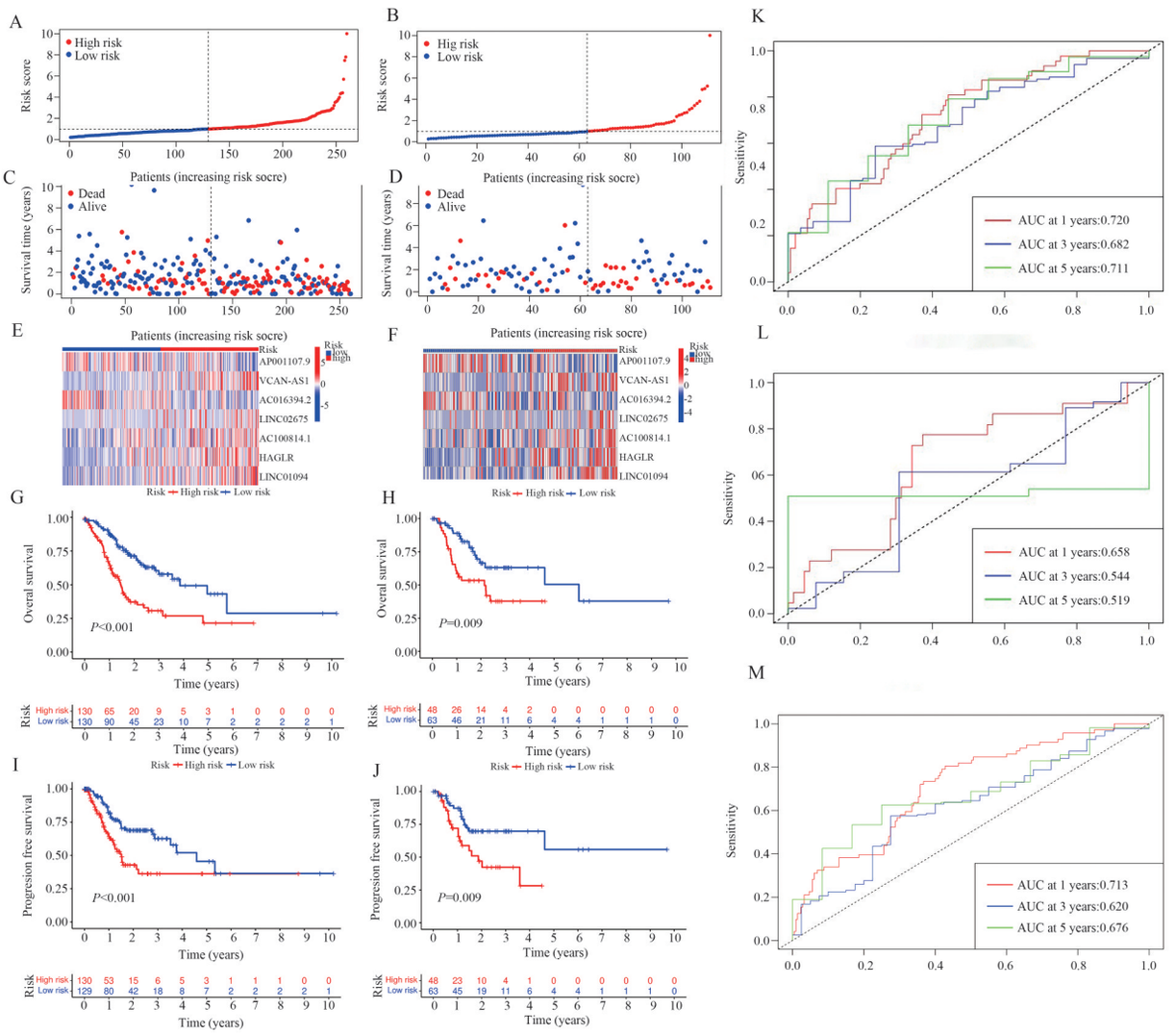


图2　风险模型的构建

Fig 2　Construction of the risk model



Train组(A)和Vali组(B)的风险分数;Train组(C)和Vali组(D)中GC患者的死亡人数随着风险分数的增加而增加;风险模型中的CRLs在Train组(E)和Vali组(F)中的表达;Train(G,I)和Vali组(H,J)中高危、低危组OS和PFS生存曲线($P<0.05$);风险模型在Train组(K)、Vali组(L)和All组(M)中预测1,3,5年生存率的ROC曲线。

图3　风险模型的预后效能

Fig 3　Prognostic efficacy of the risk model

2.3　风险模型的独立预后分析和列线图构建

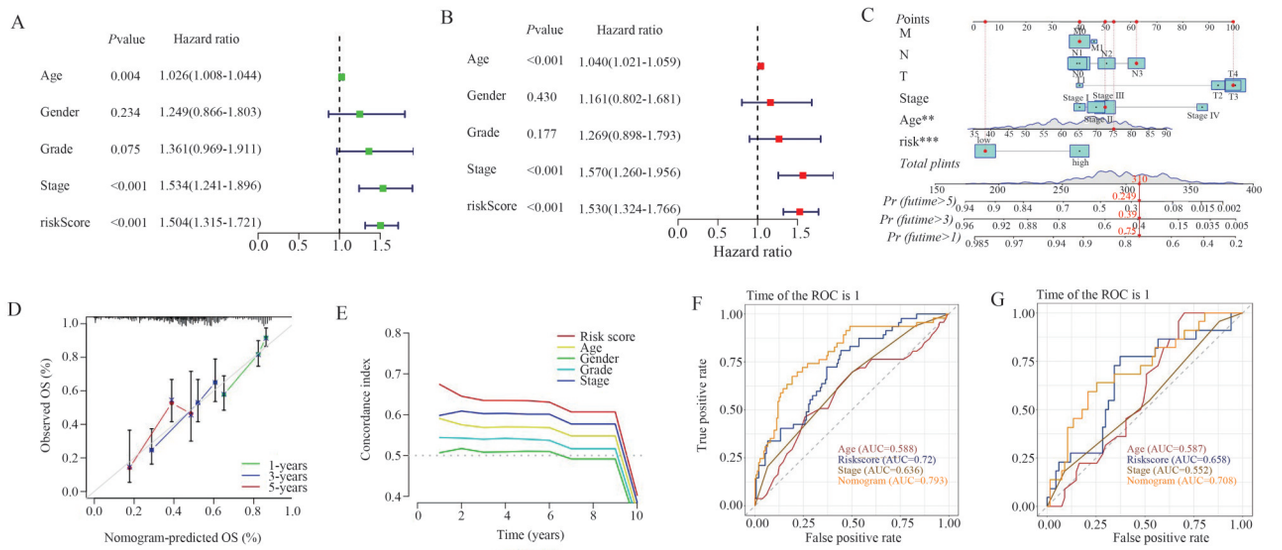
通过单因素Cox回归分析和多因素Cox回归分析检验风险模型的独立预后效能。结果显示,风险模型可以独立于其他临床特征评估GC的预后($P<0.001$)(图4A、B)。结合临床特征和风险评分进一步构建列线图。如图所示,假如患者总分为310分,其在未来1、3、5年内存活的概率分别是75%、39%和24.9%(图4C)。1、3、5年的校准曲线表明列线图具有准确的预后能力(图4D)。风险模型比年龄、性别、TNM分期、Grade分级的预后效能更准确(图4E)。在Train组(图4F)和Vali组(图4G)中,基于列线图预测GC患者的OS明显高于其他预测因子。因此,结合临床特征的风险模型可以更好的预测GC患者的生存预后。

2.4　临床亚组分析和PCA分析

将GC患者按Stage分期分组后,在Ⅰ-Ⅱ期和Ⅲ-Ⅳ期亚组中,高危组GC的生存率显著低于低危组($P<0.05$)(图5A、B),表明风险模型评估预后的能力可独立于临床分期。另外,PCA分析显示,基于所有基因(图5C)、CRGs(图5D)或CRLs(图5E)的表达量不能明显区分高危组和低危组。然而,根据风险模型中7个CRLs的表达,可以将GC患者显著区分为高危组和低危组(图5F)。因此,风险模型可以更好的对GC进行预后风险评估。

2.5　差异基因的GO富集分析

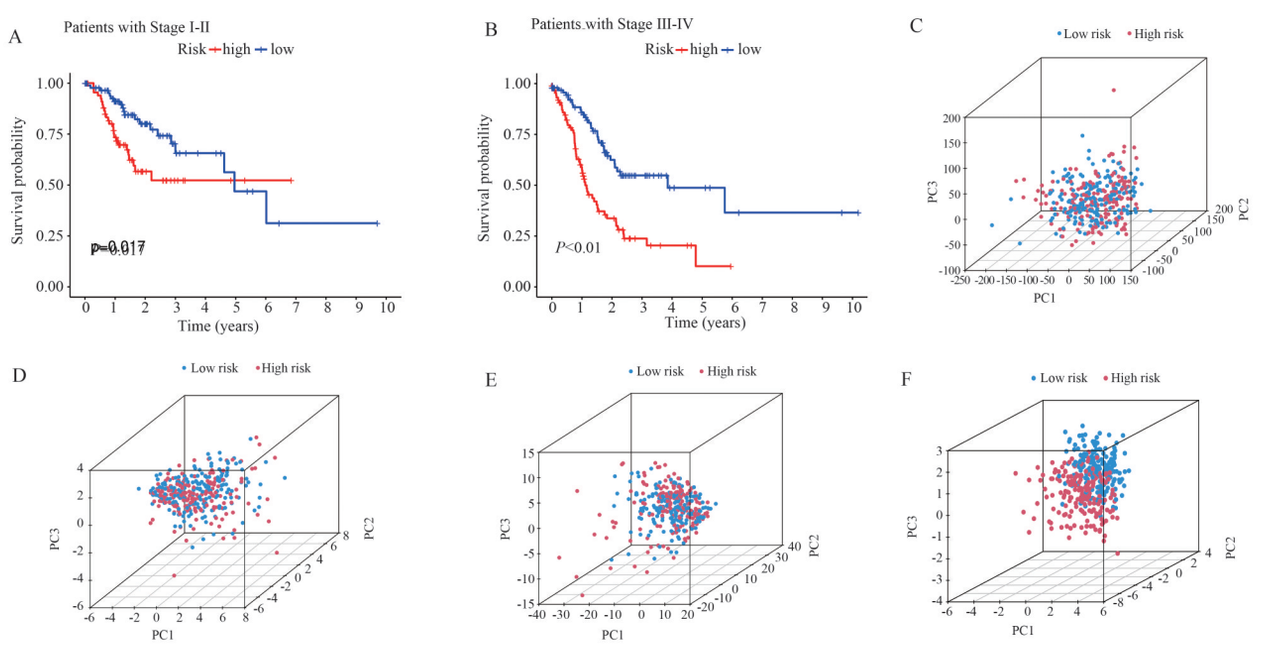
共获得304个差异基因,差异基因的GO富集分析显示,生物学过程(biological process,BP)、细胞组分(cellular component,CC)和分子功能(molec-



A:单因素;B:多因素 Cox 回归分析的森林图;C:结合风险评分和临床特征的列线图;D:校准曲线评估列线图在预测患者存活时间的准确性;E:C-指数评估风险评分预测患者生存时间的优越性;F:Train 组;G:Vali组中列线图与其他临床特征预测患者 1 年总体生存率的 ROC 曲线。

图 4　风险模型的独立预后能力和列线图的构建

Fig 4　Independent prognostic capability of the risk model and construction of nomogram



(A)Ⅰ-Ⅱ期和Ⅲ-Ⅳ期(B)亚组中高、低危组 Kaplan-Meier 曲线;基于所有基因(C)、CRGs(D)、CRLs(E)和风险模型中 7 个 CRLs(F)的表达区分高、低危患者的主成分分析图。

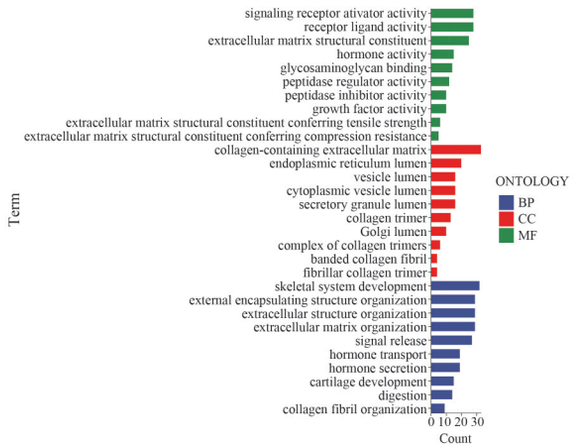
图 5　临床亚组分型的生存曲线及 PCA 分析

Fig 5　Survival curves for clinical subgroup types and PCA analysis

ular function,MF)均显著富集在细胞外基质(extracellular matrix,ECM)。见图 6。

2.6　风险模型的综合免疫浸润分析

ssGSEA 分析显示,高危组抗体药物偶联物(aDCs)、巨噬细胞(Macrophages)、中性粒细胞(Neutrophils)、浆细胞样树突细胞(pDCs)、T 辅助细胞(T helper cells)、肿瘤浸润的淋巴细胞(TIL)、调节性 T 细胞(Treg)评分显著高于低危组($P<0.05$)(图 7A)。免疫功能差异分析显示,抗原呈递细胞共刺激(APC costimulation)、副炎症(parainflammation)、趋化因子受体(CCR)等在高危组显著上调($P<0.05$)(图 7B)。另外,22 个免疫检查点基



蓝色(BP):生物学过程;红色(CC):细胞成分;绿色(MF):分子功能。

图6 差异基因的GO富集分析

Fig 6 GO enrichment analysis of differential genes

因在高危组中显著高表达($P<0.05$)(图7C)。总之,高危组的免疫细胞评分、免疫功能评分和免疫检查点基因的表达均高于低危组,风险模型可以用于预测GC患者的免疫状况。

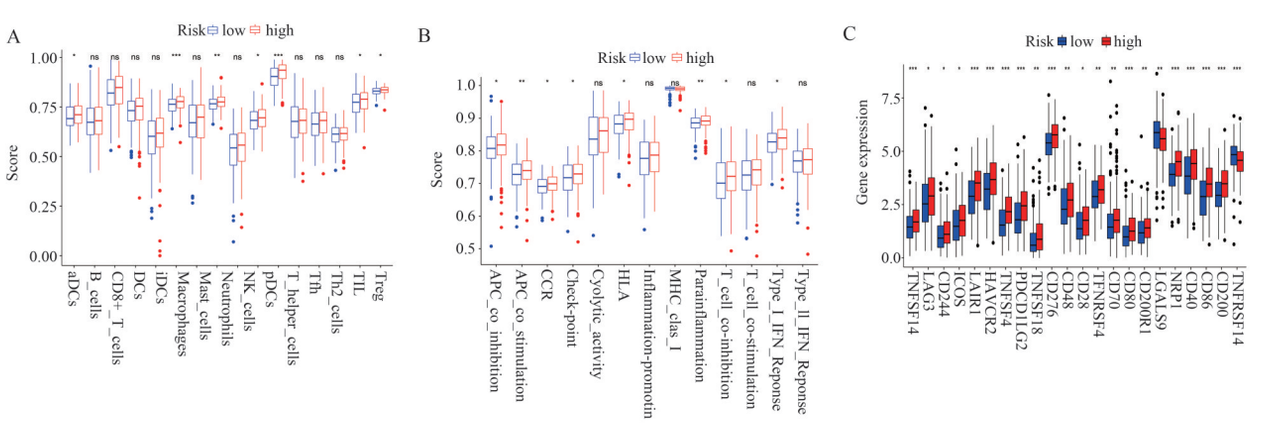
2.7 癌症相关基因突变和药物敏感性分析

高、低危组中前20个突变基因见图8,高危组(图8A)中突变频率最高的前五个基因是*TNN*(47%)、*TP53*(46%)、*MUC16*(24%)、*CSMD3*(24%)和*LRP1B*(23%)基因。*TNN*(53%)、*TP53*(38%)、*MUC16*(36%)、*ARID1A*(32%)和*LRP1B*(30%)是低风险组(图8B)中突变频率最高的前五个基因。高危组中仅抑癌基因TP53的突变率较高(46%对38%),而低危组中其他癌症相关基因的突变率相对较高。

表3 CRGs的中药预测

Tab 3 Prediction of copper death genes in Chinese medicine

CRGs	中药
NLRP3	黄蜀葵花、人参、秦皮、红参、沙苑子、冬凌草、桂丁、稀莶草、黄芪、蟛蜞菊、蓄草、桂枝、丹参、南星、半夏、珍珠、北枳椇子、竹节参、牛蒡子、柴胡、铁皮石斛、紫苑、大青叶、枫香脂、泽漆、赤芍、清风藤、牛蒡根、川萆薢、紫草、天麻
ATP7B	肉桂
ATP7A	龟甲、羊肝、肉桂
SLC31A1	羊肝、莪术、姜黄、郁金、杨梅、李子仁
FDX1	螺旋藻、羊肉、蛇床子
LIAS	牛胆
DLD	海蛤壳
DLAT	苦豆草
PDHA1	甘草
MTF1	鱼脑石、鱼鳔胶
GLS	薄荷、白芍、柴胡
CDKN2A	虎刺
DLST	榧子、龙眼肉、松节油、松叶、松花粉、鱼脑石、鱼鳔胶、松香、紫苏



基于ssGSEA评分比较高、低危组16种免疫细胞(A)和13种免疫相关功能(B)的箱式图;组间免疫检查点基因表达的箱式图(C)。

图7 风险模型与肿瘤免疫微环境的关系

Fig 7 Relationship between risk model and tumor immune microenvironment

两组间138种化疗/靶向药物的敏感性显示,13种药物在组间表现出差异性(图9A~M,图10A~M),高危组对TAK1抑制剂((5Z)-7-Oxozeaenol)、IPI3K/mTOR抑制剂(BEZ235)、CDKs和PKC抑制剂(CGP-60474)、阿糖胞苷(Cytarabine)、达沙替尼(Dasatinib)和LCK/SRC抑制剂(WH-4-023)更加敏感;低危组对HSP抑制剂(AUY922)、HER2抑制剂(CP724714)、Wnt/β-catenin/PPAR抑制剂(FH535)、AKT抑制剂(GSK690693)、重组人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导

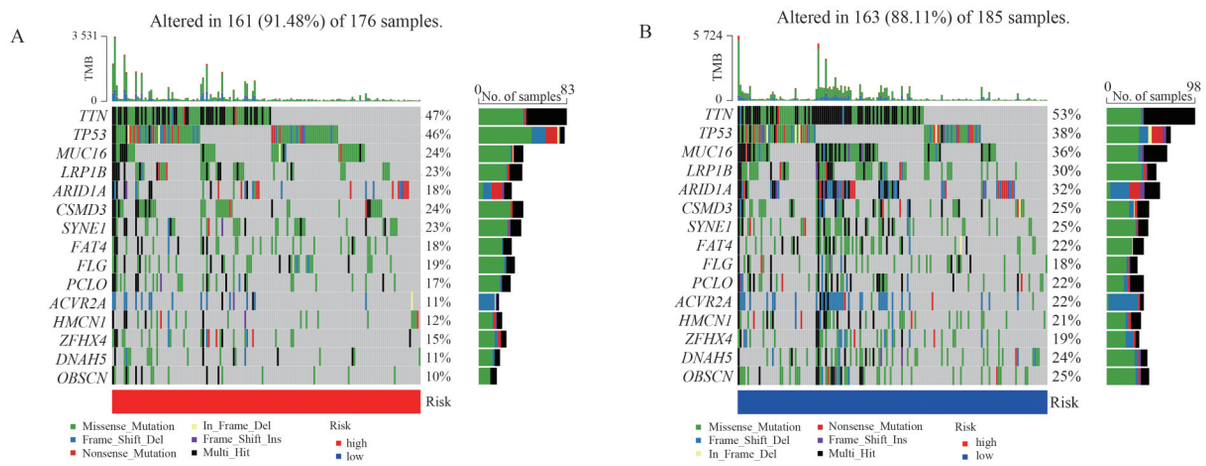


图 8　癌症相关基因突变频率的瀑布图

Fig 8　Waterfall plot of mutation frequencies in cancer-related genes

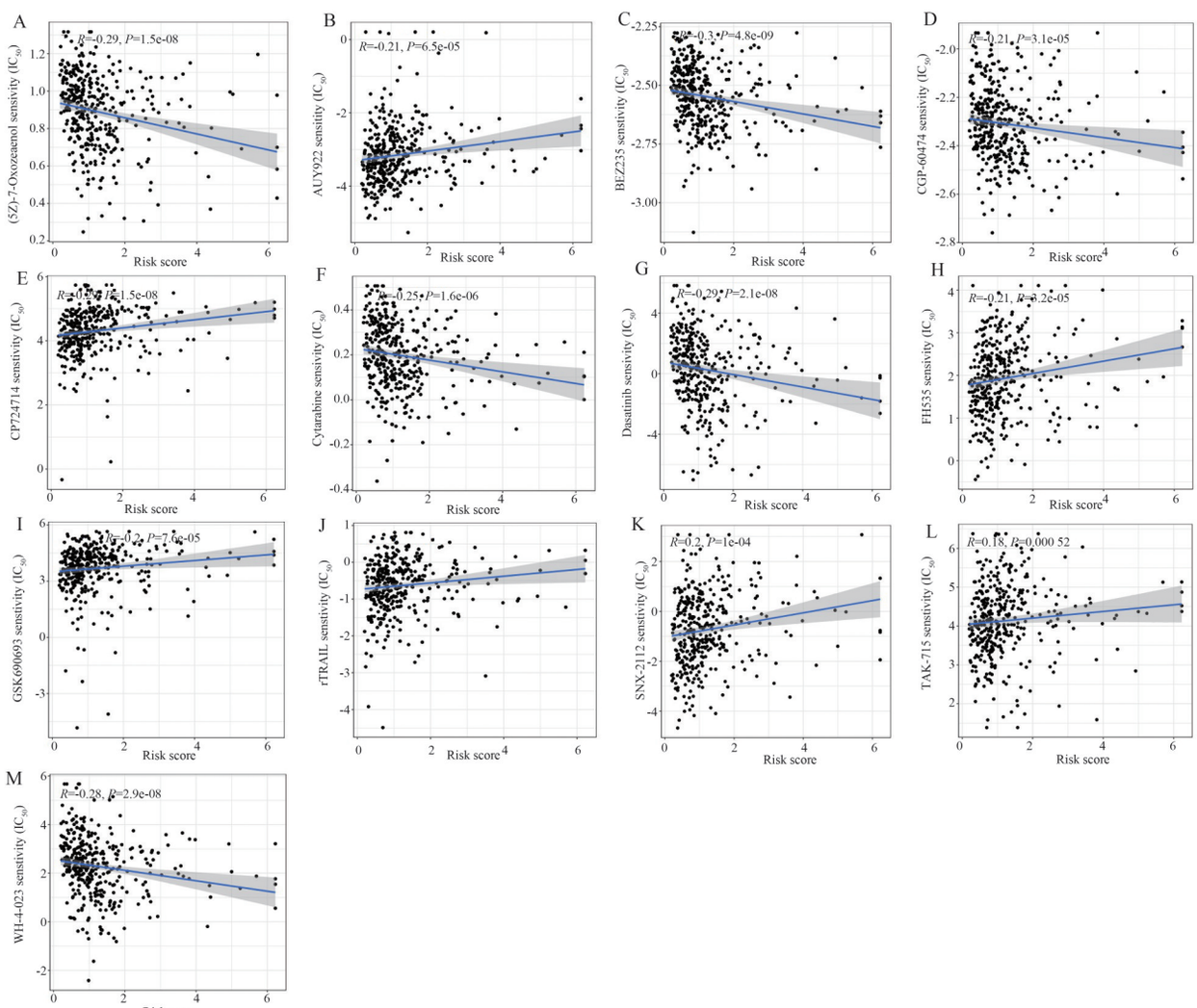


图 9　13 种药物 IC_{50} 值与风险评分的相关性散点图

Fig 9　Scatter plot of correlation between IC_{50} values and risk scores for 13 drugs

配体变体(rTRAIL)、HSP90 抑制剂(SNX-2112)和　　p38 MAPK 抑制剂(TAK-715)更加敏感。

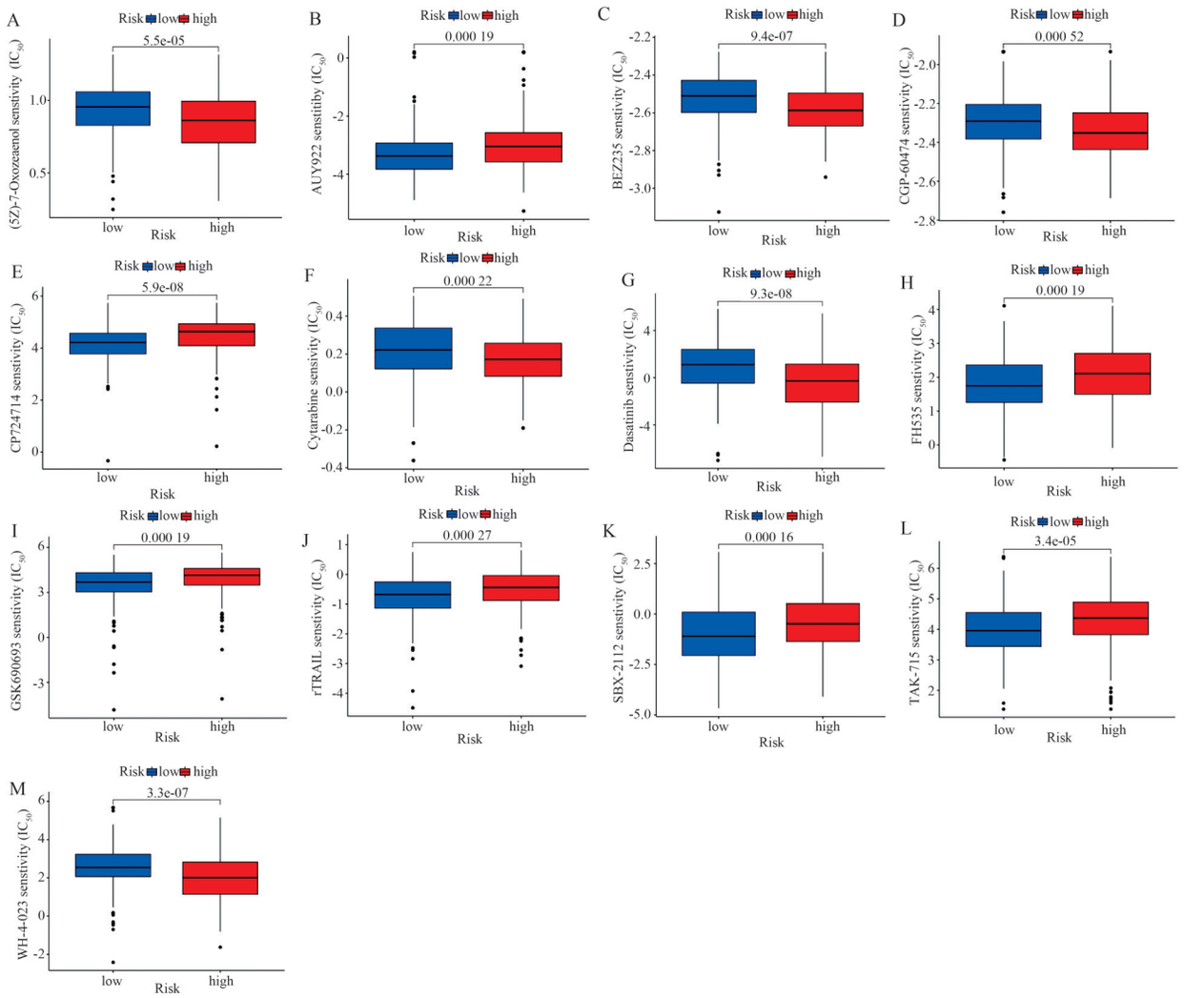


图10　高、低风险组之间13种药物敏感性差异的箱线图

Fig 10　Boxplot of differences in sensitivity to 13 drugs between high and low risk groups

2.8　CRGs的中药预测

共获得13个CRGs映射出的58味中药，见表3，上述中药对CRGs具有潜在调节作用。调控CRGs的中药药性主要偏寒（图11A），药味偏甘、苦、平（图11B），主归肝、脾、肺经（图11C），功效以清热解毒、活血止痛（图11D）为主。

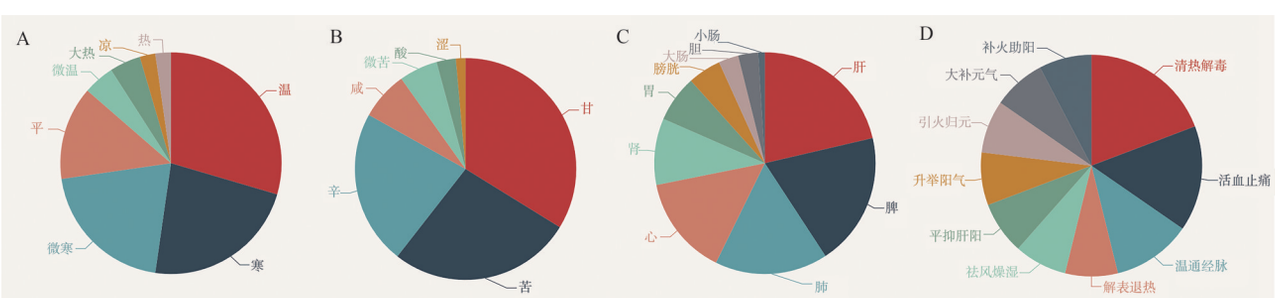


图11　调控CRGs中药的性味、归经与功效分布

Fig 11　Medicinal properties, medicinal flavor, meridian tropism and efficacy distribution of Chinese medicines regulating CRGs

3　讨论

细胞死亡可分为意外性细胞死亡（accidental cell death，ACD）和调节性细胞死亡（regulated cell death，RCD），后者又分为凋亡性RCD和非凋亡性

RCD[22-24]。近三十多年来，临床肿瘤学一直致力于研发通过诱导细胞死亡来消除癌细胞的治疗策略。现有研究表明，癌细胞凋亡抵抗是导致癌症治疗失败的主要原因，通过非凋亡性RCD途径来消除癌细胞比凋亡性RCD途径更加有效[22-25]。铜死亡是一种新发现的死亡方式，与线粒体呼吸能密切相关，属于非调节性RCD的一种[2]。基于线粒体呼吸调节对GC细胞的重要作用[3]，通过铜死亡机制诱导GC细胞凋亡似乎是有前景的研究策略，因此深入探索铜死亡机制在GC中的作用具有重要价值。

本研究基于TCGA数据库433例GC患者的临床和转录组数据，最终确定7个与预后显著相关的CRLs（AP001107.9、VCAN-AS1、AC016394.2、LINC02675、AC100814.1、HAGLR、LINC01094），根据每个CRL的表达水平和相关回归系数计算风险评分构建风险模型，风险模型可以更好的预测GC生存预后。风险模型中部分CRLs对GC的预后效能在先前的研究中已被证实。如Li等[29]研究发现，lncRNA VCAN-AS1在GC细胞中显著高表达并与GC不良预后显著相关，与野生型p53表达呈负相关。VCAN-AS1与eIF4A3结合后可显著下调TP53表达促进GC细胞增殖和转移[26]。Ln-cRNA HAGLR在GC组织和细胞中表达水平均升高，并与较差的生存期相关[27]。其通过影响乳酸脱氢酶a的代谢导致GC细胞对5-Fu耐药。同时，HAGLR在乳腺癌、肝癌、食管癌等多种肿瘤的增殖和转移中也发挥了重要作用[28-30]。另外两项基于自噬相关LncRNAs建立的GC预后模型中同样纳入了HAGLR和LINC01094[31,32]，这表明自噬和铜死亡之间可能存在联系。Polishchuk等[33]的研究证实了这一观点，敲低ATP7B可激活自噬相关基因保护细胞免受铜诱导的凋亡，因此自噬与铜死亡的关系值得进一步深入研究。然而，AP001107.9、AC016394.2、LINC02675和AC100814.1在GC中的作用尚未报道，上述LncRNs在GC中的潜在作用仍需进一步探索，其有望成为评估GC治疗和预后的生物标志物。

肿瘤免疫微环境对GC免疫治疗敏感性和预后评估十分重要。本研究综合免疫浸润分析显示，高危组GC患者存在丰富的免疫细胞浸润，如肿瘤浸润淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、调节性T细胞等。一方面，高危组较差的生存预后可能与肿瘤免疫微环境有关。肿瘤免疫微环境大致可分为三种类型[34,35]：(1)免疫炎症型：肿瘤内部有大量免疫细胞浸润；(2)免疫排斥型：虽然有丰富的免疫细胞存在，但免疫细胞位于肿瘤细胞间质，不能穿透间质到达肿瘤实质；(3)免疫沙漠型：肿瘤内部和周围缺乏免疫细胞浸润。结合GO富集分析结果，两组间差异基因显著富集在ECM，因此高危组患者体内可能为免疫排斥型肿瘤微环境，此环境下丰富富集的免疫细胞无法穿透基质到达肿瘤实质对癌细胞进行有效的免疫清除，从而使其生存预后更差。另一方面，高危组GC肿瘤浸润淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、调节性T细胞水平升高预示着较差的生存预后。肿瘤浸润淋巴细胞包括$CD8^+$ T细胞、$CD4^+$ T细胞、调节性T细胞、肿瘤相关巨噬细胞和肿瘤相关中性粒细胞等[36]。研究发现，肿瘤患者高水平的巨噬细胞、中性粒细胞和调节性T细胞常提示较差的生存预后[36]。Thompson等[37]发现预后较差的GC患者$CD8^+$ T细胞浸润水平较高。本研究同样显示高危组患者$CD8^+$ T细胞浸润程度更高，但两组之间的差异并无统计学意义。就调节性T细胞而言，同样有研究表明其外周血水平的升高预示着GC患者较差的生存期[38]。此外，本研究发现高危组患者中性粒细胞浸润显著增加，这可能归因于中性粒细胞高表达免疫抑制分子程序性死亡配体1（PD-L1），使肿瘤逃避免疫监视而促进肿瘤进展[39]。在免疫功能方面，高危组副炎症水平显著升高。副炎症是一种低度炎症，位于典型炎症和稳态之间，由于组织应激或功能障碍引起的适应性反应。Aran等[40]发现，肿瘤中高水平的副炎症与p53缺失呈正相关，副炎症可能是使p53途径失活的主要驱动力之一，并且高副炎症水平的癌症预后不良。本研究中癌症相关基因突变频率同样表明高危组（即高副炎症水平）TP53突变频率高于低危组（46% *vs* 38%）。另外，22个免疫检查点基因在高危组中呈现出高表达，部分基因已被发现是GC的潜在免疫治疗靶点。LAG3是FDA批准第三种免疫检查点抑制剂的靶点。先前的研究也提供了ICOS[41]、CD28[42]和NRP1[43]是GC潜在免疫治疗靶点的证据，高风险评分的GC可能从上述22个免疫检查点抑制剂的治疗中获益更多。

在调控CRGs的58味中药中，功效以清热解毒、活血止痛为主。其中，FDX1[2]是调控铜死亡机制的关键基因，作用于FDX1的潜在中药为螺旋藻、蛇床子。螺旋藻主要成分螺旋藻晒多糖具有抗氧化损伤、调节免疫等功能，可显著抑制GC细胞增殖[44,45]。蛇床子的主要活性成分蛇床子素具有抗氧化应激、抗血栓、抗癌等作用，其可作用于磷脂酰肌醇3激酶/Akt蛋白激酶B通路[46]、胱天蛋白酶-3依

赖的凋亡通路[47]诱导GC细胞凋亡。然而,上述中药是否可通过调控*FDX1*基因调控铜死亡机制诱导癌细胞死亡的研究尚未报道,螺旋藻及蛇床子对铜死亡机制的调控作用值得深入探索。

综上所述,本研究基于7个CRLs建立了GC的预后模型,该模型预后GC的效能优异,并且可评估GC患者免疫功能、免疫检测点基因表达及其对13种化疗药物的敏感性,螺旋藻及蛇床子等中药可能对铜死亡机制的调节具有潜在作用。

作者贡献度说明:

负张君、沈洋:文章设计、数据分析及手稿撰写;米虽才、刘铸、范秋月、刘爱琪:相关文献搜集与整理,数据分析;翟苗杰:文章格式检查;侯丽:提供整体思路和修改意见。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.

2 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.

3 Liu Y, Huang Y, Zhang J, et al. TIMMDC1 knockdown inhibits growth and metastasis of gastric cancer cells through metabolic inhibition and AKT/GSK3beta/beta-Catenin signaling pathway[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(10): 1256-1267.

4 Wang L, Chai X, Wan R, et al. Disulfiram chelated with copper inhibits the growth of gastric cancer cells by modulating stress response and wnt/beta-catenin signaling[J]. Front Oncol, 2020, 10(21): 595718.

5 Liu Y, Guan X, Wang M, et al. Disulfiram/copper induces antitumor activity against gastric cancer via the ROS/MAPK and NPL4 pathways[J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 6579-6589.

6 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.

7 Brady DC, Crowe MS, Greenberg DN, et al. Copper chelation inhibits BRAF(V600E)-driven melanomagenesis and counters resistance to BRAF (V600E) and MEK1/2 inhibitors[J]. Cancer Res, 2017, 77(22): 6240-6252.

8 Tsang T, Posimo JM, Gudiel AA, et al. Copper is an essential regulator of the autophagic kinases ULK1/2 to drive lung adenocarcinoma[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(4): 412-424.

9 Cui L, Gouw AM, Lagory EL, et al. Mitochondrial copper depletion suppresses triple-negative breast cancer in mice[J]. Nat Biotechnol, 2021, 39(3): 357-367.

10 Bridges MC, Daulagala AC, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function[J]. J Cell Biol, 2021, 220(2): e202009045.

11 Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. Cancer Cell, 2016, 29(4): 452-463.

12 Cabili MN, Trapnell C, Goff L, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses[J]. Genes Dev, 2011, 25(18): 1915-1927.

13 Liu S, Li H, Zhu Y, et al. LncRNA MNX1-AS1 sustains inactivation of hippo pathway through a positive feedback loop with USP16/IGF2BP3 axis in gallbladder cancer[J]. Cancer Lett, 2022, 547(28): 215862.

14 Tabury K, Monavarian M, Listik E, et al. PVT1 is a stress-responsive lncRNA that drives ovarian cancer metastasis and chemoresistance [J]. Life Sci Alliance, 2022, 5(11): e202201370.

15 Ma J, Zhao W, Zhang H, et al. Long non-coding RNA ANRIL promotes chemoresistance in triple-negative breast cancer *via* enhancing aerobic glycolysis[J]. Life Sci, 2022, 306(1): 120810.

16 Wang Q, Chen C, Xu X, et al. APAF1-binding long noncoding RNA promotes tumor growth and multidrug resistance in gastric cancer by blocking apoptosome assembly[J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(28): e2201889.

17 徐文慧, 李沧海, 姜廷良. 铁死亡通路与中药干预机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(20): 4019-4026.

18 陈博, 孙夕童, 王伟, 等. 细胞焦亡在胃癌中的作用及中医药调控研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(15):212-220.

19 冯心怡, 褚泽文, 罗园园, 等. 南蛇藤及其有效成分抗胃癌作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3863-3869.

20 Dong J, Wang X, Xu C, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome activation prevents copper-induced neuropathology in a murine model of Wilson's disease[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(1): 87.

21 Muchenditsi A, Talbot CC, Gottlieb A, et al. Systemic deletion of Atp7b modifies the hepatocytes' response to copper overload in the mouse models of Wilson disease [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 5659.

22 Tang D, Kang R, Berghe TV, et al. The molecular machinery of regulated cell death[J]. Cell Res, 2019, 29(5): 347-364.

23 Koren E, Fuchs Y. Modes of regulated cell death in cancer[J]. Cancer Discov, 2021, 11(2): 245-265.

24 Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(3): 486-541.

25 Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(7): 395-417.

26 Feng L, Li J, Li F, et al. Long noncoding RNA VCAN-AS1 contributes to the progression of gastric cancer via regulating p53 expression[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5): 4388-4398.

27 Hu J, Huang L, Ding Q, et al. Long noncoding RNA HAGLR sponges miR-338-3p to promote 5-Fu resistance in gastric cancer through targeting the LDHA-glycolysis pathway[J]. Cell Biol Int, 2022, 46(2): 173-184.

28 Jin L, Luo C, Wu X, et al. LncRNA-HAGLR motivates triple negative breast cancer progression by regulation of WNT2 via sponging miR-335-3p[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(15): 19306-19316.

29 Li L, Wang Y, Zhang X, et al. Long non-coding RNA HOXD-AS1 in cancer[J]. Clin Chim Acta, 2018, 487(12): 197-201.

30 Yang C, Shen S, Zheng X, et al. Long noncoding RNA HAGLR acts as a microRNA-143-5p sponge to regulate epithelial-mesenchymal transition and metastatic potential in esophageal cancer by regulating LAMP3 [J]. FASEB J, 2019, 33(9): 10490-10504.

31 Chen D, Wang M, Xu Y, et al. A novel autophagy-related incRNA prognostic signature associated with immune microenvironment and survival outcomes of gastric cancer patients[J]. Int J Gen Med, 2021, 14(10): 6935-6950.

32 Wang W, Pei Q, Wang L, et al. Construction of a prognostic signature of 10 autophagy-related lncRNAs in gastric cancer[J]. Int J Gen Med, 2022, 15(5): 3699-3710.

33 Polishchuk EV, Merolla A, Lichtmannegger J, et al. Activation of autophagy, observed in liver tissues from patients with wilson disease and from ATP7B-deficient animals, protects hepatocytes from copper-induced apoptosis[J]. Gastroenterology, 2019, 156(4): 1173-1189.

34 Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point [J]. Nature, 2017, 541(7637): 321-330.

35 Lanitis E, Dangaj D, Irving M, et al. Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors[J]. Ann Oncol, 2017, 28(12): xii18-xii32.

36 Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, et al. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer[J]. Oncoimmunology, 2012, 1(8): 1323-1343.

37 Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma[J]. Gut, 2017, 66(5): 794-801.

38 Ichihara F, Kono K, Takahashi A, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(12): 4404-4408.

39 Wang TT, Zhao YL, Peng LS, et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway[J]. Gut, 2017, 66(11): 1900-1911.

40 Aran D, Lasry A, Zinger A, et al. Widespread parainflammation in human cancer[J]. Genome Biol, 2016, 17(1): 145.

41 Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, et al. ICOS(+) Foxp3(+) TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with Helicobacter pylori[J]. Int J Cancer, 2017, 140(3): 686-695.

42 Chen C, Gu YM, Zhang F, et al. Construction of PD1/CD28 chimeric-switch receptor enhances anti-tumor ability of c-Met CAR-T in gastric cancer[J]. Oncoimmunology, 2021, 10(1): 1901434.

43 Mei B, Chen J, Yang N, et al. The regulatory mechanism and biological significance of the Snail-miR590-VEGFR-NRP1 axis in the angiogenesis, growth and metastasis of gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 241.

44 乔明霞, 于蕾妍, 郝言芝, 等. 复合螺旋藻多糖对人胃癌MGC细胞的抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1385-1386.

45 尚俊英, 谢裕安, 陈文彰, 等. 螺旋藻硒多糖组分的提纯及其体外抗肿瘤作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(6): 630-633.

46 张楠, 景永帅, 张丹参. 蛇床子素抗癌作用机制及其剂型研究[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 729-730.

47 杨赟, 杨柳, 李晓静, 等. 蛇床子素通过促进胃癌细胞N87凋亡和细胞周期阻滞而抑制细胞增殖[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(1): 74-80.

[本文编辑] 谭贝加 宋睿璞 朱 昊