

· 临床研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.22.013

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240903.0939.004\(2024-09-03\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240903.0939.004(2024-09-03))

口腔鳞状细胞癌患者铜死亡相关基因预后模型的构建和验证*

黄凯, 郭俊峰, 刘欢, 张纲[△]

(陆军军医大学第二附属医院口腔科, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 构建并验证口腔鳞状细胞癌(OSCC)患者铜死亡相关基因预后风险模型。**方法** 在肿瘤基因组图谱(TCGA)数据库中下载 OSCC 患者临床及转录组数据, 筛选出 OSCC 患者铜死亡相关基因, 使用共表达分析、Wilcoxon 秩和检验、Cox 分析和 AIC 逐步算法构建铜死亡相关基因风险模型, 并评估其准确性。**结果** 共筛选出 340 例 OSCC 患者作为训练组和内部验证组, 24 例患者作为外部验证组, 成功建立了 OSCC 患者铜死亡相关基因风险模型。该模型由细胞周期蛋白依赖性激酶调节亚基 2(CKS2)、三角形四肽重复域 21A(TTC21A)、锌指含 MYND 型 10(ZMYND10) 3 个铜死亡相关基因构成, 受试者工作特征(ROC)曲线的曲线下面积(AUC)为 0.710, 具有理想的预测性能。其中风险评分高的 OSCC 患者预后相对较差, 并且上述模型评分是 OSCC 患者预后的一个独立影响因素($HR=1.472, 95\%CI: 1.141\sim 1.899, P=0.003$)。**结论** 本研究构建的模型可为 OSCC 患者的诊疗和预后评估提供可靠依据。

[关键词] 铜死亡; 口腔鳞状细胞癌; TCGA 数据库; 预后; 模型

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)22-3435-06

Construction and validation of cuproptosis-related genes prognostic model for oral squamous cell carcinoma*

HUANG Kai, GUO Junfeng, LIU Huan, ZHANG Gang[△]

(Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To construct and verify the prognostic risk model for cuproptosis-related genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** The clinical and transcriptomic data of OSCC patients were downloaded from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The cuproptosis-related genes in the patients with OSCC were screened out. The cuproptosis-related genes risk model was constructed by the coexpression analysis, Wilcoxon rank sum test, Cox analysis and AIC step-by-step algorithm. Then its accuracy was evaluated. **Results** A total of 340 cases of OSCC were screened out and served as the training group and internal verification group. A total of 24 cases served as the external verification group. The cuproptosis-related genes risk model in the patients with OSCC was successfully constructed. This model was composed of cyclin dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS2), tetratricopeptide repeat domain 21A (TTC21A) and zinc finger, MYND-type containing 10 (ZMYND10) copper death-related genes. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) was 0.710, possessing the ideal predictive performance. Among them, the prognosis in the OSCC patients with high risk score was relatively poor. In addition, the above model score was an independent influencing factor for the prognosis in OSCC patients ($HR=1.472, 95\%CI: 1.141\sim 1.899, P=0.003$). **Conclusion** The constructed model could provide the reliable basis for the diagnosis, treatment and prognosis evaluation in the patients with OSCC.

[Key words] cuproptosis; oral squamous cell carcinoma; TCGA database; prognosis; model

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是人类最常见的癌症之一^[1-2], 在全身恶性肿瘤中约占 3%, 在口腔恶性肿瘤中占比高达 90%^[3-4]。

根据 2021 年发布的 GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据, 新发 OSCC 有 377 713 例, 死亡 177 757 例^[5], 远高于 2012 年全球报告的 300 000 例新发病例

* 基金项目: 陆军军医大学名师建设立项(417Z1433); 陆军军医大学第二附属医院青年博士人才孵化计划(2023YQB042)。△ 通信作者, E-mail: zhanggan01@tmmu.edu.cn。

和 145 000 例死亡病例^[6]。尽管近十年来 OSCC 的治疗(包括但不限于手术切除、放疗、化疗及靶向治疗)不断改善和提高,但 OSCC 患者的生存率并没有明显的提升,一直维持在 50%左右^[7-8]。因此,迫切需要探索新的预后评估手段,指导诊疗方案的改善和提高预后评估准确性,改善患者生活质量,进一步提高患者的 5 年生存率。

铜作为生命必需的矿物元素,参与众多生物过程,包括线粒体呼吸、铁摄取、抗氧化等^[9]。近期研究揭示,癌症患者体内铜水平明显异于常人^[10-11]。铜死亡作为一种新型细胞死亡方式,通过铜积累触发线粒体脂质化蛋白聚集和 Fe-S 簇蛋白不稳定,导致细胞死亡^[12],而诱导细胞死亡是治疗肿瘤的有效策略^[13]。本研究旨在挖掘 OSCC 中铜死亡相关基因,构建回归模型,为 OSCC 的预后评估提供新见解,并探索铜死亡作为 OSCC 治疗的新途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料

在 TCGA 数据库(<https://cancergenome.nih.gov/>)中筛选出 340 例 OSCC 患者的肿瘤组织 341 份(其中 ID 为 TCGA-UF-A71A 的患者有 01A 和 06A 两份肿瘤组织标本)、正常组织标本 32 份。下载其临床及转录组数据,将其按照 1:1 随机分为训练组和内部验证组^[14]。同时,在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载 OSCC 患者微阵列数据集 GSE23558(包括 27 例 OSCC 患者,其中有 3 例失访^[15])作为外部验证组,见图 1。



图 1 研究对象纳入过程

1.2 筛选 OSCC 中的铜死亡相关基因

根据 TSVETKOV 等^[12]发表在 *Science* 的研究成果收集并整理参与铜离子载体诱导死亡的铜死亡相关基因。筛选 TCGA 数据库中 OSCC 患者测序数据中的相关基因,并与收集到的铜死亡相关基因进行共表达分析,以 Pearson 相关系数 > 0.6 为标准筛选出 OSCC 患者铜死亡相关基因。

1.3 铜死亡相关基因差异表达分析

通过 Wilcoxon 秩和检验分析 OSCC 患者癌旁和癌组织中铜死亡相关基因的差异表达情况,以 |癌与癌旁表达量的比值(logFC)| > 1 , 错误发现率(FDR) < 0.05 为标准提取在 OSCC 癌旁和癌表达差异显著的铜死亡相关基因,并使用 Cytoscape 绘制共表达网络图,同时使用 R 语言中的 pheatmap 包及 plot 函数绘制热图和火山图。

1.4 构建铜死亡相关基因风险回归模型

在 R 语言中加载 survival 包,使用单因素 Cox 分析训练组 OSCC 患者相关数据与差异表达的铜死亡相关基因,筛选出与 OSCC 患者预后显著相关的铜死亡相关基因。随后,利用 survival 包 step 函数在逐步算法中通过 AIC 构建风险回归模型。同时,使用 rms 包绘制该模型的列线图。

1.5 评估铜死亡相关基因风险回归模型

将风险评分结果的中位值作为训练组 OSCC 患者高、低风险组的划分标准,在 R 语言中加载 survival 包,使用 Kaplan-Meier 法对训练组 OSCC 患者进行生存分析,随后加载 survivalROC 包,绘制受试者工作特征(ROC)曲线,对该铜死亡相关基因风险模型的准确性进行评估。最后使用单因素、多因素独立预后分析对该模型的准确性进行综合评估。

1.6 验证铜死亡相关基因风险回归模型

将内部及外部验证组 OSCC 患者数据作为验证数据集,按照建模标准将内部及外部验证组 OSCC 患者分为高、低风险组,并计算其风险值,使用 Kaplan-Meier 法对验证数据集进行生存分析,绘制生存曲线和 ROC 曲线,双重验证该模型对 OSCC 患者预后评估的准确性。同时使用 R 语言中的 survival 和 rms 包绘制校准曲线来验证该模型的准确性。

2 结果

2.1 铜死亡相关基因风险回归模型的建立

共收集了 340 例 OSCC 患者的临床及转录组数据。从 *Science* 铜死亡相关最新研究成果^[12]中获取了 28 个铜死亡相关基因,通过在 TCGA 数据库共表达分析,鉴定出 1 003 个 OSCC 患者铜死亡相关基因,进一步通过差异分析得到 254 个差异表达的铜死亡相关基因。使用单因素 Cox 分析,获得了 5 个铜死亡相关基因($P < 0.05$),且具有预后评估价值,其表达在 OSCC 患者癌旁和癌组织中具有明显差异,见表 1。随后根据 AIC 逐步算法建立 OSCC 患者的铜死亡相关基因风险回归模型,去除共线性基因后,该模型由细胞周期蛋白依赖性激酶调节亚基 2(cyclin dependent kinases regulatory subunit 2,CKS2)、三角形四肽重复域 21A(tetratricopeptide repeat domain 21A, TTC21A)、锌指含 MYND 型 10(zinc finger, MYND-type containing 10,ZMYND10)3 个铜死亡相关基因构成。

表 1 具有预后评估价值的铜死亡相关基因在 OSCC 患者癌和癌旁组织中的差异表达

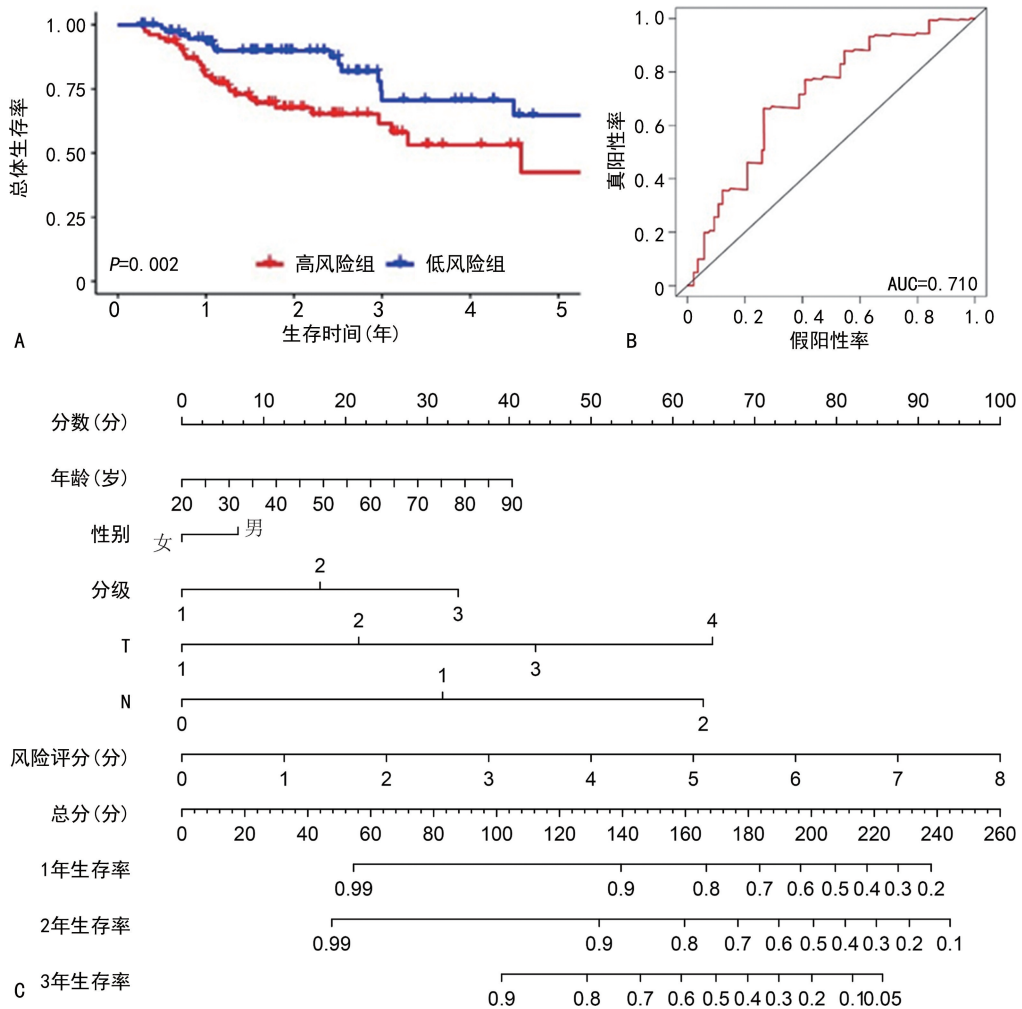
项目	logFC	FDR	P
RPA3	1.14	7.78×10^{-11}	5.10×10^{-12}
CBX3	1.24	3.90×10^{-15}	1.58×10^{-17}
CKS2	1.67	5.97×10^{-12}	2.49×10^{-13}
TTC21A	-1.17	0.04	0.03
ZMYND10	-4.48	0.02	0.01

2.2 铜死亡相关基因风险回归模型的评估

通过 Kaplan-Meier 法对训练组 OSCC 患者的生存分析发现,该模型有效评估了 OSCC 患者的预后,低风险组患者的生存时间明显高于高风险组患者 ($P=0.002$),而且随着风险评分的逐渐升高,患者的风险分数增加、预后变差。通过 ROC 曲线对该模型的预测能力进行检测,该模型的曲线下面积(AUC)为 0.710,具有理想的预测性能。随后,根据上述模型绘制了预测患者生存率的列线图,按照图中的项目评分

并求和,用以估算患者 1~3 年的生存率,见图 2。

进一步对铜死亡相关基因风险回归模型的准确性进行评估。通过单因素独立预后分析发现,铜死亡相关基因风险回归模型有效评估了 OSCC 患者的预后状况 ($P=0.003$),见图 3;多因素独立预后分析发现,铜死亡相关基因风险回归模型的风险评分具有独立预后评估价值,可独立作为 OSCC 患者的预后评估指标 ($P=0.028$),说明该模型具有良好的预测性能,见图 4。



A. 训练组 OSCC 患者的生存曲线 ($P < 0.05$); B. 训练组 OSCC 患者的 ROC 曲线; C. OSCC 患者铜死亡相关基因风险回归模型列线图。

图 2 OSCC 患者铜死亡相关基因风险回归模型的评估

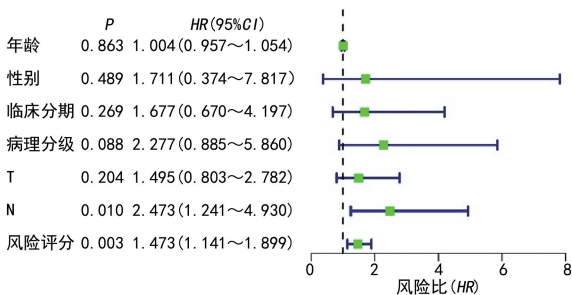


图 3 训练组 OSCC 患者的单因素独立预后分析 ($P < 0.05$)

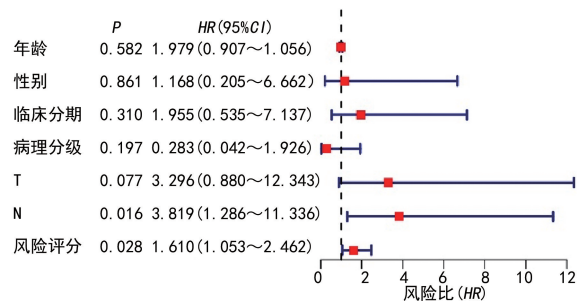


图 4 训练组 OSCC 患者的多因素独立预后分析 ($P < 0.05$)

2.3 铜死亡相关基因风险回归模型的验证

将内部及外部验证组 OSCC 患者数据分别代入该铜死亡相关基因风险回归模型,使用 Kaplan-Meier 法对内部验证组进行生存分析,发现该模型可有效评估 OSCC 患者的预后状况,低风险组患者的生存时间明显高于高风险组患者($P=0.022$),而且随着风险评

分的逐渐升高,患者的风险分数增加、预后变差。内部验证组的 ROC 曲线的 AUC 为 0.657,具有较为满意的预测性能。同时,内部验证组的校准曲线结果也证实模型的准确性良好。在外部验证组中获得了与内部验证组高度一致的结果,上述双重验证的结果进一步表明该模型具有理想的预测性能,见图 5。

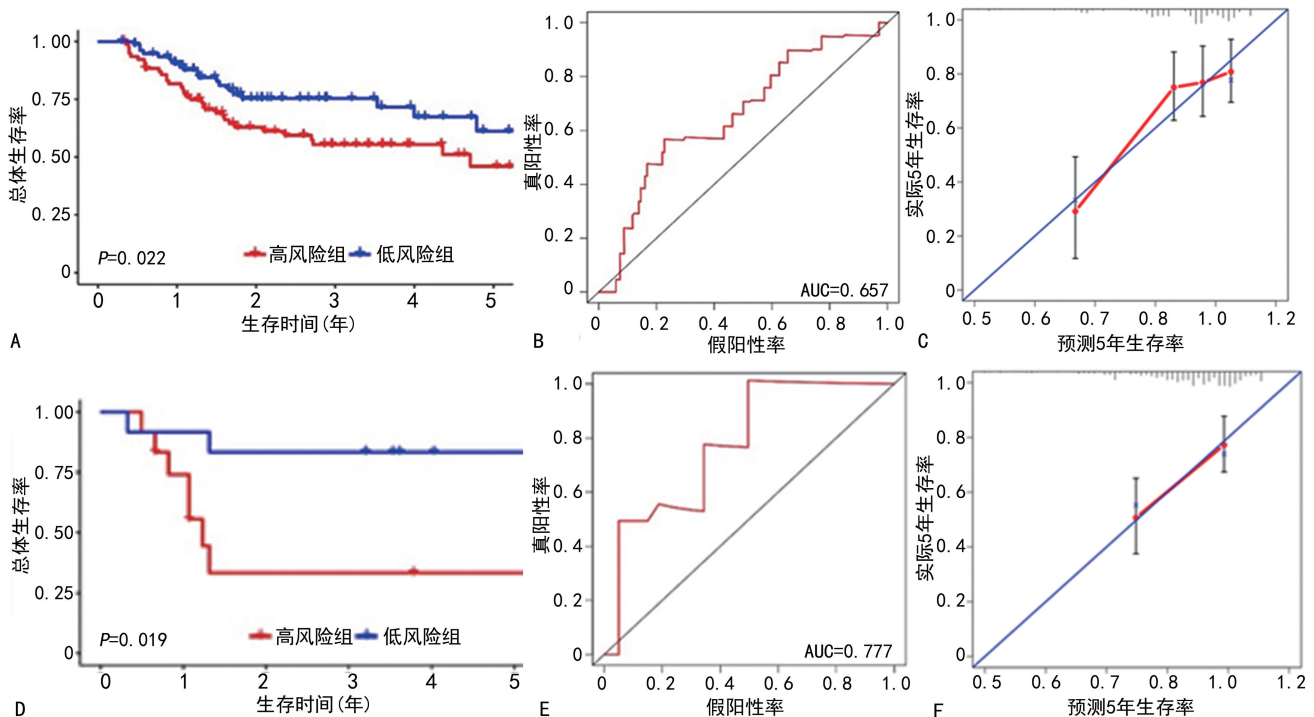


图 5 铜死亡相关基因风险回归模型的验证
A. 内部验证组 OSCC 患者的生存曲线($P<0.05$);B. 内部验证组 OSCC 患者的 ROC 曲线;C. 内部验证组校准曲线;D. 外部验证组 OSCC 患者的生存曲线($P<0.05$);E. 外部验证组 OSCC 患者的 ROC 曲线;F. 外部验证组校准曲线。

图 5 铜死亡相关基因风险回归模型的验证

3 讨论

OSCC 是口腔癌中恶性程度最高的肿瘤类型,死亡率超过 50%^[16]。尽管可采取手术干预、放射治疗和铂类药物的化学治疗等综合治疗,但由于解剖位点、潜在分子病理特征和病理阶段的差异,治疗效果欠佳,患者预后一般^[17]。因此,探索精准有效的预后评估方式对提高患者生存质量及 5 年生存率极为重要。

铜由于其氧化和再生活性,在游离氧代谢物的产生中起着重要作用^[18]。有研究报道,自由基在各种癌症的发展和预后中起着主要作用,由于氧化过程的增加,血清铜水平升高可能会增加患口腔癌的风险^[19]。最近发现铜死亡是一种新的调节性细胞死亡方式,在肿瘤的发生、发展中起着至关重要的作用^[12]。有研究表明铜死亡、槟榔碱、肿瘤相关成纤维细胞与 OSCC 转移之间有密切的联系,为槟榔碱相关的 OSCC 的转移机制研究提供了新思路^[20]。在结直肠癌中,4-辛基衣康酸可通过靶向 GAPDH 促进铜死亡来抑制有氧糖酵解^[21]。铜死亡还可以调节前列腺癌的肿瘤微环境并影响其预后^[22]。YUAN 等^[23]发现铜死亡与 OS-

CC 免疫微环境的塑造密切相关;GONG 等^[24]的研究表明 FAM27E3、LINC02367 和 MYOSLID 等特定 lncRNA 有望成为 OSCC 相关的生物标志物,为 OSCC 的诊断提供了新思路。

本研究发现 OSCC 患者中 3 个铜死亡相关基因(CKS2、TTC21A、ZMYND10)的表达特征,成功建立了一种铜死亡相关基因预后风险评分模型,而且该风险回归模型的风险评分具有独立预后评估价值,可独立作为 OSCC 患者的预后评估指标。CKS2 在人类不同肿瘤的多种细胞生命活动过程的调节中起着至关重要的作用^[25]。有研究报道,CKS2 在胶质瘤组织中明显过表达,且与胶质瘤患者的不良预后相关^[26]。在乳腺癌中 CKS2 可促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭,并且其过表达与患者的不良预后相关,证实 CKS2 可能是治疗乳腺癌的潜在靶点^[27]。在上皮性卵巢癌中 CKS2 可促进肿瘤的进展和转移,是患者预后不良的独立预测因子,同时有研究表明 CKS2 可能通过调节上皮性卵巢癌中的 Akt/mTOR 途径发挥肿瘤启动子的作用,并可作为上皮性卵巢癌的一种有前途的预后生物标志物^[28]。TTC21 编码三角形四肽重复序列家

族中的蛋白质,在各种组织和器官中表达^[29]。有学者发现 TTC21A 高表达可预测肾透明细胞癌的不良预后和免疫浸润^[30],在结直肠癌中 TTC21A 高表达提示预后不良,并影响免疫浸润水平^[31],而 TTC21A 在肺腺癌中表达增加预示着良好的预后和高免疫浸润水平^[32]。ZMYND10 是一种表观遗传调控的抑癌基因,可通过 miR145-5p/NEDD9 轴在乳腺癌中发挥抑癌作用^[33]。也有研究报道 ZMYND10 的表达水平可能影响鼻咽癌患者的生存^[34]。构成该模型的 3 个基因均与肿瘤的发生、发展相关,可作为预测生存的指标。

本研究结果表明,新的铜死亡相关基因风险回归模型具有准确评估 OSCC 预后的潜力,并可以为开发新的铜死亡生物标志物和靶向治疗提供一些见解。与以往的研究相比,本研究模型使用了内部验证组和外部验证组进行了模型准确性的双重验证,得到了高度一致的验证结果,进一步证实了该模型具有较好的预测性能,为下一步临床推广运用奠定了基础。本研究也存在一定的局限性:该模型是基于 TCGA 数据库中 OSCC 患者队列构建和验证的,虽然采用了外部验证组进行了双重验证,但外部验证组患者数量有限,本研究中的铜死亡相关基因在 OSCC 进展中的作用和机制尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] DAN H, LIU S, LIU J, et al. RACK1 promotes cancer progression by increasing the M2/M1 macrophage ratio via the NF- κ B pathway in oral squamous cell carcinoma[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(4):795-807.
- [2] WANG F, LIAO Y, ZHANG M, et al. N6-methyladenosine demethyltransferase FTO-mediated autophagy in malignant development of oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2021, 40(22):3885-3898.
- [3] ZHAO W, CUI Y, LIU L, et al. METTL3 facilitates oral squamous cell carcinoma tumorigenesis by enhancing c-Myc stability via YTHDF1-mediated m6A modification[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20:1-12.
- [4] LU Y, ZHENG Z, YUAN Y, et al. The emerging role of exosomes in oral squamous cell carcinoma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 628103.
- [5] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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.
- [6] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):E359-386.
- [7] HASEGAWA K, FUJII S, MATSUMOTO S, et al. YAP signaling induces PIEZO1 to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation[J]. *J Pathol*, 2021, 253(1):80-93.
- [8] PENG Q S, CHENG Y N, ZHANG W B, et al. circRNA_0000140 suppresses oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by targeting miR-31 to inhibit Hippo signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2):112.
- [9] RUIZ L M, LIBEDINSKY A, ELORZA A A. Role of copper on mitochondrial function and metabolism[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8:711227.
- [10] GE E J, BUSH A I, CASINI A, et al. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(2):102-113.
- [11] 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.
- [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.
- [13] LI T, WANG Y, XIANG X, et al. Development and validation of a ferroptosis-related lncRNAs prognosis model in oral squamous cell carcinoma[J]. *Front Genet*, 2022, 13:847940.
- [14] GUO J, TANG H, HUANG P, et al. Single-cell profiling of tumor microenvironment heterogeneity in osteosarcoma identifies a highly invasive subcluster for predicting prognosis [J]. *Front Oncol*, 2022, 12:732862.
- [15] BHOSALE P G, CRISTEA S, AMBATIPUDI S, et al. Chromosomal alterations and gene expression changes associated with the progression of leukoplakia to advanced gingivobuccal cancer[J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(3):396-409.
- [16] SONG X, YANG X, NARAYANAN R, et al. Oral squamous cell carcinoma diagnosed from saliva metabolic profiling[J]. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A, 2020, 117(28):16167-16173.
- [17] ZHAO C, ZHANG Z, DAI X, et al. Actein antagonizes oral squamous cell carcinoma proliferation through activating FoxO1[J]. *Pharmacology*, 2021, 106(9):551-563.
- [18] THEOPHANIDES T, ANASTASSOPOULOU J. Copper and carcinogenesis[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, 42(1):57-64.
- [19] KESHANI F, KHALESİ S, AGHAZ A, et al. Screening of oral squamous cell carcinoma by serum changes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Dent Res J (Isfahan)*, 2021, 18:88.
- [20] LI J, CHEN S, LIAO Y, et al. Arecoline is associated with inhibition of cuproptosis and proliferation of cancer-associated fibroblasts in oral squamous cell carcinoma: a potential mechanism for tumor metastasis [J]. *Front Oncol*, 2022, 12:925743.
- [21] YANG W, WANG Y, HUANG Y, et al. 4-Octyl itaconate inhibits aerobic glycolysis by targeting GAPDH to promote cuproptosis in colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 159:114301.
- [22] LI C, XIAO Y, CAO H, et al. Cuproptosis regulates microenvironment and affects prognosis in prostate cancer [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2024, 202(1):99-110.
- [23] YUAN D, LI X Q, QU F W, et al. Landscape and the immune patterns of cuproptosis in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2023, 52(10):951-960.
- [24] GONG H, LIU Z, YUAN C, et al. Identification of cuproptosis-related lncRNAs with the significance in prognosis and immunotherapy of oral squamous cell carcinoma [J]. *Comput Biol Med*, 2024, 171:108198.
- [25] YOU H, LIN H, ZHANG Z. CKS2 in human cancers: clinical roles and current perspectives (review)[J]. *Mol Clin Oncol*, 2015, 3(3):459-463.
- [26] YU K, JI Y, LIU M, et al. High expression of CKS2 predicts adverse outcomes: a potential therapeutic target for glioma[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:881453.
- [27] HUANG N, WU Z, HONG H, et al. Overexpression of CKS2 is associated with a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in breast cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6):4761-4769.
- [28] XU J H, WANG Y, XU D. CKS2 promotes tumor progression and metastasis and is an independent predictor of poor prognosis in epithelial ovarian cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(8):3225-3234.
- [29] ALLARD B A, WANG W, POTTORF T S, et al. Thm2 interacts with paralog, Thm1, and sensitizes to Hedgehog signaling in postnatal skeletogenesis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(7):3743-3762.
- [30] LIN J, NONG D, WANG W, et al. High expression of TTC21A predicts unfavorable prognosis and immune infiltrates in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Front Genet*, 2022, 13:967378.
- [31] LI N, ZHOU Z, ZHANG L, et al. High expression of TTC21A predict poor prognosis of colorectal cancer and influence the immune infiltrating level[J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(5):981-992.
- [32] WANG W, REN S, WANG Z, et al. Increased expression of TTC21A in lung adenocarcinoma infers favorable prognosis and high immune infiltrating level [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78:106077.
- [33] WANG Y, DAN L, LI Q, et al. ZMYND10, an epigenetically regulated tumor suppressor, exerts tumor-suppressive functions via miR145-5p/NEDD9 axis in breast cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1):184.
- [34] FANG L, SHI L, WANG W, et al. Identifying key genes and small molecule compounds for nasopharyngeal carcinoma by various bioinformatic analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(37):e27257.