

基于铁死亡相关基因构建头颈部鳞状细胞癌的预后预测模型并验证

贺 晴 曹晓林 韩弈垣 刘翰林

摘要 **目的** 构建基于铁死亡相关基因(ferroptosis-related genes, FRGs)的头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)预后预测模型并验证。**方法** 从TCGA和GEO数据库下载HNSCC RNA-seq数据及相关临床数据,分别作为训练队列和验证队列。从FerrDb网站提取共259个FRGs。利用单因素COX回归分析在训练队列中筛选与HNSCC患者预后有关的FRGs($P < 0.01$)。利用Lasso COX回归分析构建预后预测模型,并根据风险评分公式计算各临床样本的风险系数,然后使用Kaplan-Meier生存曲线和时间依赖性受试者操作特征(time-dependent receiver operating characteristic, time ROC)曲线评估该模型效能。同理,验证该模型在验证队列中的可行性和可重复性。最后采用单因素及多因素COX回归分析对该预后预测模型进行独立预后分析。**结果** 训练队列中与HNSCC患者预后显著相关的FRGs共有12个,在此基础上利用Lasso COX回归算法构建了11个FRGs构成的预后预测模型。Kaplan-Meier生存曲线分析显示,高风险组的总生存率明显低于低风险组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。time ROC曲线分析显示,该模型预测第1、3、5年总生存的曲线下面积(area under the curve, AUC)分别为0.649、0.729、0.688。独立预后分析显示,该评分模型可作为预测HNSCC的独立预后因素($P < 0.001$)。该模型在验证队列中得到了进一步验证。**结论** 本研究构建了11个FRGs的预后预测模型,且可作为HNSCC患者的独立预后因素。

关键词 头颈部鳞状细胞癌 铁死亡相关基因 TCGA GEO 预后模型

中图分类号 R739.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.04.016

Construction and Validation of the Prognostic Predication Model for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Based on Ferroptosis-related Genes. HE Qing, CAO Xiaolin, HAN Yiyuan, et al. The Forth Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310053, China

Abstract **Objective** To construct the prognostic predication model of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) based on ferroptosis-related genes (FRGs). **Methods** The RNA-seq data and clinical data of HNSCC patients were downloaded from the TCGA and GEO database, and sets as the training cohort and the validation cohort, respectively. A total of 259 FRGs were extracted from FerrDb website. Univariate COX regression analysis was used to screen the FRGs associated with the prognosis of HNSCC patients in the training cohort ($P < 0.01$). Lasso COX regression analysis was applied to construct the prognostic predication model, and the risk coefficient of each clinical sample was calculated according to the risk scoring formula. Then the Kaplan-Meier survival curves and the time-dependent receiver operating characteristic (time ROC) curve were performed to evaluate the effectiveness of the model. Similarly, verify the feasibility and repeatability of the model in the validation cohort. Finally, univariate and multivariate COX regression analysis were used to analyze the prognostic model independently. **Results** There were 12 FRGs significantly associated with in the prognosis of HNSCC patients in the training cohort. And the prognostic prediction model including 11 FRGs was constructed using Lasso COX regression algorithm. The Kaplan-Meier survival curve analysis showed that the overall survival rate of the high-risk group was significantly lower than that of the low-risk group ($P < 0.001$). Time ROC curve analysis showed that the area under the curve of the model for predicting 1-, 2-, and 3-year overall survival was 0.649, 0.729 and 0.688, respectively. Independent prognostic analysis showed that the model could be an independent prognostic factor to predict the prognosis of HNSCC patients ($P < 0.001$). The model was further validated in the validation cohort. **Conclusion** This study successfully constructed a prognostic prediction model based on 11 FRGs, which could be used as an independent prognostic factor to predict the prognosis of HNSCC patients.

Key words Head and neck squamous cell carcinoma; Ferroptosis-related genes; TCGA; GEO; Prognostic model

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2015KYB284)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学第四临床医学院(贺晴、韩弈垣、刘翰林);310006 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院耳鼻咽喉头颈外科(曹晓林)

通信作者:曹晓林,电子邮箱:doctorcaoxiaolin@163.com

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)起源于口腔、咽腔、喉腔等的黏膜上皮细胞,其发生率位居恶性肿瘤第 6 位。2018 年的全球数据统计显示,当年有 89 万新增 HNSCC 病例,其中有 46 万病例死亡^[1,2]。由于 HNSCC 发病隐匿性及高度侵袭性,尽管采用了包括手术在内的综合治疗,如放化疗、免疫治疗,该肿瘤的预后仍不理想,5 年生存率仅为 25% ~ 60%^[3]。因此,寻找 HNSCC 预后相关的生物学标志物对 HNSCC 患者的预后进行早期评估,进而明确影响 HNSCC 预后的相关因素探讨新的肿瘤研究目标,成为了必然。

铁死亡是一种新的细胞程序性死亡方式^[4]。它的发生可通过谷胱甘肽途径、泛醌途径、四氢生物蝶呤途径的任意途径截断从而使细胞内脂质过氧化,最终导致细胞死亡^[5]。目前在 FerrDb 网站上共有 259 种铁死亡相关基因(ferroptosis - relate genes, FRGs),分为基因调控因子及化学物质调控因子两类。根据功能的不同,基因调控因子又分为驱动因子、抑制因子、标记因子,化学物质调控因子分为诱导剂、抑制剂。本研究旨在探讨 FRGs 在 HNSCC 中的表达,并构建出有意义的 FRGs 相关的 HNSCC 预后预测模型。

材料与方 法

1. 数据收集与预处理:从 TCGA 数据库 UCSC 网站下载 528 例头颈部鳞状细胞癌患者的 RNA - seq 数据和相应的临床信息,去除没有总体生存(overall survival, OS)信息或者 OS 为 0 的样本作为训练队列($n = 494$)。使用 R 包“GEOquery”从 GEO 数据库下载微阵列数据集(GSE41613)的 RNA - seq 数据和临床信息,去除 OS 为 0 及死亡原因不详或非原发肿瘤死亡的样本作为验证队列($n = 76$)。使用 GPL570 平台的注释信息将探针替换为基因 ID。上述两个队列样本的主要人口统计学和临床特征详见表 1。为了后续分析独立临床变量与预后的关系,将缺失部分临床变量或变量不详的样本剔除后,共纳入 TCGA 训练队列($n = 460$)及 GSE41613 验证队列($n = 76$)用作分析。

2. 建立 FRG 的预后特征:从在线 FerrDb 数据库得到 259 个铁死亡相关基因,在 TCGA 训练队列中所有样本中共检测到 239 个基因表达,随后将 239 个 FRGs 的表达水平与 494 例 HNSC 患者的 OS 相关联,通过单变量 COX 回归分析获得 12 个具有预后意义的基因($P < 0.01$)作为 OS 的独立预测因子。

表 1 训练队列及验证队列的临床资料

项目	TCGA ($n = 494$)	GSE41613 ($n = 76$)
年龄(岁)		
≥60	278	40
<60	216	36
性别		
女性	132	24
男性	362	52
临床分级		
I ~ II 级	112	35
III ~ IV 级	368	41
NA	14	-
T 分期		
T ₁	33	-
T ₂	141	-
T ₃	129	-
T ₄	176	-
T _x /NA	15	-
N 分期		
N ₀	237	-
N ₁	80	-
N ₂	150	-
N ₃	5	-
NA/N _x	22	-
M 分期		
M ₀	464	-
M ₁	5	-
M _x /NA	25	-

3. 预后预测模型的构建和验证:使用 R 包“glmnet”进行最小绝对收缩和选择算子(Lasso)COX 回归分析找到了与预后相关的最显著的 11 个 FRGs,并根据其对应的 COX 回归系数来构建预后预测模型。该模型提供了一个计算每个样本风险评分的公式:Risk score = $\beta_1 \times \exp G_1 + \beta_2 \times \exp G_2 + \dots + \beta_n \times \exp G_n$ 。根据训练队列中风险评分的中位数将训练队列中的患者分为高风险组($n = 247$)和低风险组($n = 247$)。使用 R 包“ggpubr”根据高低风险组的生存情况绘制散点图。分别使用 R 包“survival”“time ROC”采用 Kaplan - Meier 生存曲线和时间依赖性受试者工作特征曲线(time ROC)分析,评估预后预测模型对预后的预测能力。同理,验证该模型在验证队列的可行性和可重复性。

4. 独立预后分析:使用 R 包“survival”“forestplot”进行单因素及多因素 COX 回归分析评估训练队列及验证队列中各临床特征(包括年龄、性别、肿瘤 TNM 分期、临床分期)及该模型风险评分与患者预后的关系,并绘制森林图,判断该模型是否能作为独立的预后指标。

5. 统计学方法:使用 R 3.6.3 软件对数据进行统

计分析与绘图。两组间的比较采用 *Wilcoxon* 秩和检验进行统计分析,生存曲线的组间差异采用 *Log-rank* 检验。采用 *COX* 回归分析计算风险比 (hazard ratio, HR),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 与预后显著相关 FRGs 的鉴定:单因素 *COX* 分析显示,12 个 FRGs 基因可以用作 HNSCC 患者 OS 的独立预测因素,其中 3 个为保护因素 ($HR < 1$),9 个为风险因素 ($HR > 1$),详见图 1。

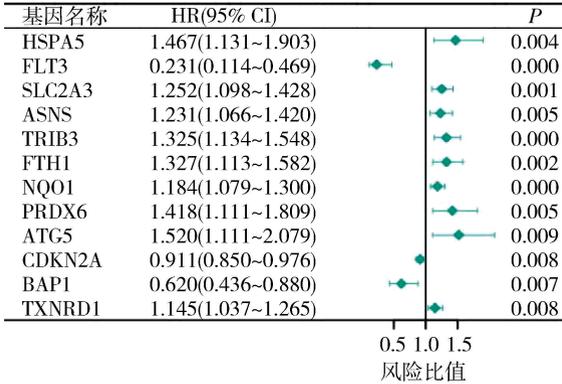


图 1 12 个与 HNSCC 患者 OS 相关的 FRGs 的单因素 *COX* 回归分析森林图

2. 训练队列中的预后预测模型构建:根据单因素 *COX* 回归分析得到的 12 个 FRGs,进行 *Lasso COX* 回

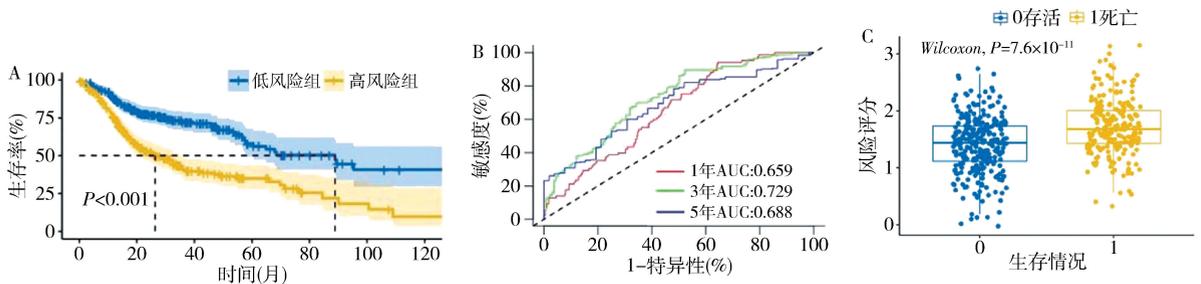


图 2 训练队列的预后预测模型评估

A. 训练队列的高、低风险组患者的 *Kaplan-Meier* 生存曲线图;B. 预后预测模型的时间 ROC 曲线及第 1、3、5 年的 AUC 值;C. 风险评分与生存情况之间的散点图

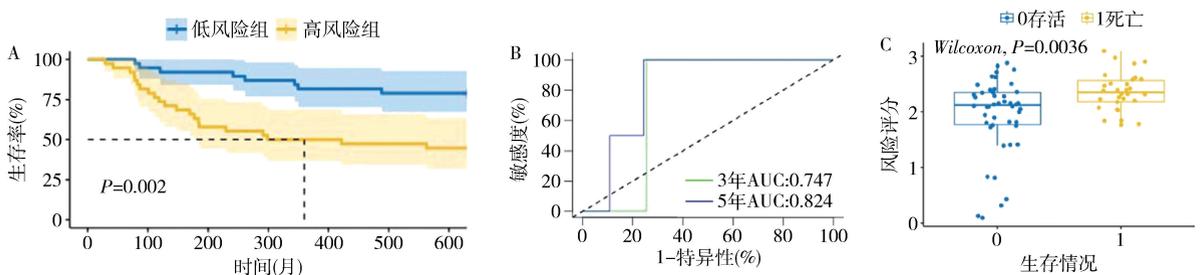


图 3 验证队列的预后预测模型验证

A. 高、低风险组患者的 *Kaplan-Meier* 生存曲线图;B. 时间 ROC 曲线及第 3、5 年的 AUC 值;C. 风险评分与生存情况之间的散点图

归分析得到了 11 个对 HNSCC 患者 OS 有重要影响的 FRGs,并进行 10 倍交叉验证,避免过度拟合,最终根据 *Lasso COX* 回归分析中最小 lambda 值,构建了 11 个铁死亡相关因子的预后预测模型。风险评分计算公式为: $HSPA5$ 的表达值 $\times 0.0419 - FLT3$ 的表达值 $\times 1.1826 + SLC2A3$ 的表达值 $\times 0.1758 + ASNS$ 的表达值 $\times 0.0152 + TRIB3$ 的表达值 $\times 0.1011 + FTH1$ 的表达值 $\times 0.0783 + NQO1$ 的表达值 $\times 0.0526 + PRDX6$ 的表达值 $\times 0.1278 + ATG5$ 的表达值 $\times 0.2813 - CDKN2A$ 的表达值 $\times 0.0709 - BAP1$ 的表达值 $\times 0.4057$ 。*Kaplan-Meier* 生存曲线图显示高风险组的生存率明显较低风险组低(图 2A)。时间依赖性 ROC 曲线图显示第 1、3、5 年 AUC 分别为 0.649、0.729、0.688(图 2B)。高低风险组之间的生存情况比较差异有统计学意义(图 2C)。

3. 验证队列中的预后预测模型验证:根据上面得到的风险评分公式计算验证队列中每位患者的风险评分来验证模型的准确性及可重复性。使用上述方法,根据风险评分的中位数将患者分为高风险 ($n = 38$) 和低风险组图 ($n = 38$)。很显然,*Kaplan-Meier* 生存曲线图显示高风险组的生存率明显较低风险组的低(图 3A)。时间依赖性 ROC 曲线图显示第 3、5 年的 AUC 值分别为 0.747、0.824(图 3B)。高低风险组之间的生存情况比较,差异有统计学意义(图 3C)。

4. 风险评分的独立预后价值:在训练(TCGA)队列中,单因素 COX 回归分析显示,性别($P=0.043$)、M 分期($P=0.002$)、风险评分($P<0.001$)与 OS 显著相关(图 4A),其中风险评分越高的患者预后较差,男性患者及有远处转移的患者提示预后较差。对单因素 COX 分析中与 OS 显著相关的 3 个变量进行多变量 COX 分析,显示性别($P=0.033$)、M 分期($P=0.003$)、风险评分($P<0.001$)可作为独立预后

因子(图 4B)。在验证(GSE41613)队列中,单因素 COX 回归分析显示,临床分级($P<0.001$)、风险评分($P=0.004$)与 OS 显著相关(图 4C),其中风险评分及临床分级越高的患者预后较差。对单因素 COX 分析中与 OS 显著相关的 2 个变量进行多变量 COX 分析,显示临床分级($P<0.001$)、风险评分($P=0.007$)可作为独立预后因子(图 4D)。

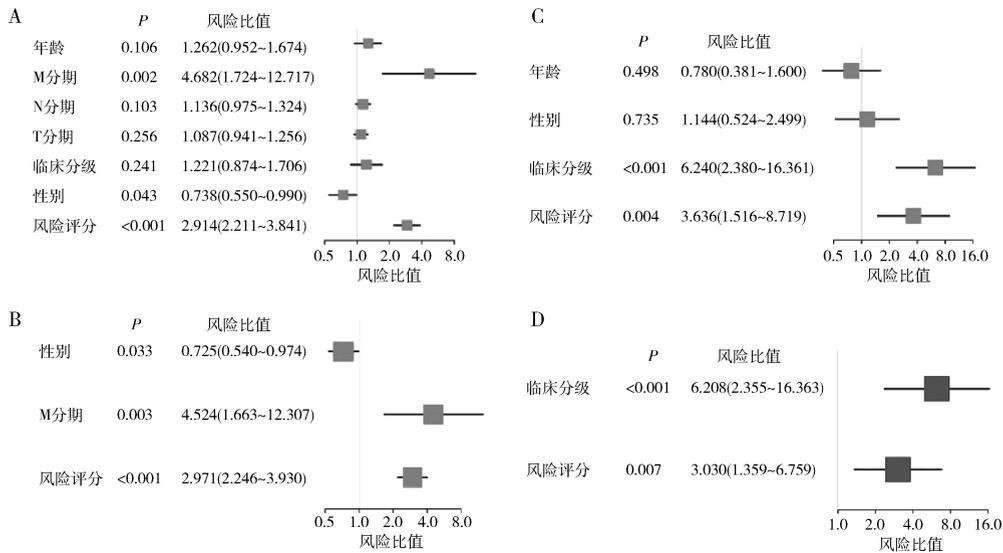


图 4 训练及验证队列各临床特征及风险评分的单因素及多因素 COX 回归分析森林图

讨 论

近 10 年来,得益于不同类型的高通量组学(基因组学、转录组学、蛋白组学、放射组学)分析的发展及公共数据库的丰盈,研究者们通过生物信息学方式筛选出了许多 HNSCC 诊断及预后相关的生物学标志物,给未来提高临床诊断率及开发新的治疗方法带来了希望^[3]。

铁死亡作为一种新型的细胞死亡方式,成为了近年来的研究热点。随着铁死亡的认识不断加深,已经发现铁死亡与各种人类疾病密切相关,例如动脉粥样硬化、神经退行性疾病、急性肝肾损伤等^[6-8]。此外,有研究证实,铁死亡与肿瘤发生、发展存在密切关联,研究人员发现了 FRGs 在 20 种肿瘤中存在异常表达^[9]。

本研究通过公共数据库的挖掘,系统分析了 259 个 FRGs 在 HNSCC 组织中的表达与其生存率之间的关系,并最终建立了 11 个 FRGs(包括 HSPA5、FLT3、SLC2A3、ASNS、TRIB3、FTH1、NQO1、PRDX6、ATG5、CDKN2A、BAP1)构成的预后预测模型。

本研究发现,FLT3、CDKN2A、BAP1 与 HNSCC 良

好预后相关,HSPA5、SLC2A3、ASNS、TRIB3、FTH1、NQO1、PRDX6、ATG5 与预后不良有关。HSPA5 属于热休克蛋白家族的一员,通过与 GPX4 结合,可以负调节人类胰腺导管癌细胞的铁死亡^[10]。在对胶质瘤细胞的研究中也发现,HSPA5 可能是二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA)诱导的铁死亡中的负调节因子^[11]。FLT3 是一种受体型酪氨酸激酶,FLT3 抑制剂是防止脂质过氧化抵抗谷氨酸毒性的有效保护剂,而谷氨酸毒性与细胞凋亡、坏死、铁死亡有关。FLT3 抑制剂可以阻断神经元中的铁死亡细胞的死亡^[12]。SLC2A3、ASNS、TRIB3 是铁死亡的生物学标志物。

在众多铁死亡相关研究中,可以观察到随着铁死亡的发生,在 mRNA 水平上观察到这些基因的表达增多。然而,这些基因在铁死亡的具体分子调控机制还未知^[13,14]。FTH1 是一种铁蛋白重链,在帕金森病的 6-OHDA 模型中,FTH1 通过噬铁抑制铁死亡。NQO1 是一种 NADPH 脱氢酶,敲除肝癌细胞中的 FTH1、NQO1,可以促进 erastin 和 sorafenib 诱导的铁

死亡^[15,16]。PRDX6 是铁死亡的负调节因子,PRDX6 通过其 iPLA2 活性去除脂质活性氧,从而保护细胞免受铁死亡^[17]。ATG5 是一种自噬蛋白,ATG5 可通过自噬调节 HNSCC 的迁移、侵袭和凋亡^[18]。两项独立的研究表明,通过敲除 ATG5,细胞的铁死亡水平显著降低^[19,20]。

BAP1 是一种肿瘤抑制因子 BRCA1 相关蛋白,BAP1 通过抑制 SLC7A11 的表达来抑制胱氨酸摄取,导致脂质过氧化和铁死亡^[21,22]。而 SLC7A11 被证实是 HPV 阳性 HNSCC 的生物学标志物和治疗靶点^[23]。既往研究表明,这些基因可能在不同的水平,通过不同的方式调节铁死亡,从而影响相关疾病的发生和发展。

本研究也分析了 Kaplan - Meier 生存曲线及时间依赖的 ROC 曲线,结果显示该模型在预测 HNSCC 患者预后生存方面具有良好的效果。并且通过单因素及多因素 COX 回归分析证明该模型可作为独立的预后因子。此外,本研究还发现性别、远处转移、临床分级也可作为独立的预后因子,提示男性患者、有远处转移及临床分级越高的患者预后欠佳。这些结果与临床和既往的研究结果相符,笔者筛选出的 FRGs 和以此基础上初步建立的预测模型可能提高 HNSCC 的评估预后的水平。

本研究确认并验证了基于 11 个铁死亡相关基因对头颈部鳞状细胞癌患者的临床预后模型,并证明了该模型可作为独立预后因素。然而,这 11 个铁死亡相关基因在 HNSCC 中的具体作用和调控机制仍需要开展进一步的实验验证,并且还需要开展前瞻性临床研究来验证预后预测模型的临床应用价值。

参考文献

- 1 Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. International Journal of Cancer, 2019, 144 (8): 1941 - 1953
- 2 Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma[J]. Nature Reviews. Disease Primers, 2020, 6 (1): 92
- 3 Budach V, Tinhofer I. Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review[J]. The Lancet. Oncology, 2019, 20(6): e313 - e326
- 4 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron - dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149 (5): 1060 - 1072
- 5 Stockwell BR, Jiang X, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis[J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(6): 478 - 490
- 6 彭琪, 关秀茹. 自噬和铁死亡在动脉粥样硬化中的研究进展

- [J]. 医学研究杂志, 2021, 50(10): 17 - 21
- 7 Ren JX, Sun X, Yan XL, et al. Ferroptosis in neurological diseases [J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2020, 14: 218
- 8 Lu Q, Wang M, Gui Y, et al. Rheb1 protects against cisplatin - induced tubular cell death and acute kidney injury via maintaining mitochondrial homeostasis[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11(5): 364
- 9 Liu Z, Zhao Q, Zuo ZX, et al. Systematic analysis of the aberrances and functional implications of ferroptosis in cancer [J]. iScience, 2020, 23(7): 101302
- 10 Zhu S, Zhang Q, Sun X, et al. HSPA5 regulates ferroptotic cell death in cancer cells[J]. Cancer Research, 2017, 77(8): 2064 - 2077
- 11 Chen Y, Mi Y, Zhang X, et al. Dihydroartemisinin - induced unfolded protein response feedback attenuates ferroptosis via PERK/ATF4/HSPA5 pathway in glioma cells[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR, 2019, 38(1): 402
- 12 Kang Y, Tiziani S, Park G, et al. Cellular protection using Flt3 and PI3K α inhibitors demonstrates multiple mechanisms of oxidative glutamate toxicity[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3672
- 13 Jiang Y, Mao C, Yang R, et al. EGLN1/c - Myc-induced lymphoid - specific helicase inhibits ferroptosis through lipid metabolic gene expression changes[J]. Theranostics, 2017, 7(13): 3293 - 3305
- 14 Dixon SJ, Patel DN, Welsch M, et al. Pharmacological inhibition of cystine - glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis[J]. eLife, 2014, 3: e02523
- 15 Sun X, Ou Z, Chen R, et al. Activation of the p62 - Keap1 - NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. Hepatology: Baltimore, 2016, 63(1): 173 - 184
- 16 Tian Y, Lu J, Hao X, et al. FTH1 inhibits ferroptosis through ferritinophagy in the 6 - OHDA model of parkinson's disease[J]. Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2020, 17(4): 1796 - 1812
- 17 Lu B, Chen XB, Hong YC, et al. Identification of PRDX6 as a regulator of ferroptosis[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2019, 40(10): 1334 - 1342
- 18 Fan T, Chen Y, He Z, et al. Inhibition of ROS/NUPR1 - dependent autophagy antagonises repeated cadmium exposure - induced oral squamous cell carcinoma cell migration and invasion [J]. Toxicology Letters, 2019, 314: 142 - 152
- 19 Hou W, Xie Y, Song X, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin[J]. Autophagy, 2016, 12(8): 1425 - 1428
- 20 Gao M, Monian P, Pan Q, et al. Ferroptosis is an autophagic cell death process[J]. Cell Research, 2016, 26(9): 1021 - 1032
- 21 Zhang Y, Shi J, Liu X, et al. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression [J]. Nature Cell Biology, 2018, 20 (10): 1181 - 1192
- 22 Zhang Y, Koppula P, Gan B. Regulation of H2A ubiquitination and SLC7A11 expression by BAP1 and PRC1 [J]. Cell Cycle (Georgetown, Tex), 2019, 18(8): 773 - 783
- 23 Hémon A, Louandre C, Lailler C, et al. SLC7A11 as a biomarker and therapeutic target in HPV - positive head and neck Squamous Cell Carcinoma [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 533(4): 1083 - 1087

(收稿日期: 2022 - 05 - 13)

(修回日期: 2022 - 05 - 23)