

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202323196

· 论著 ·

Nanopore 测序揭示 m6A 修饰铁死亡相关基因在中晚期头颈部鳞状细胞癌中的表达及临床意义

庄黎明¹, 丁雅婷², 蔡成福^{3,4}, 叶辉³, 蔡耿明^{3,4}

(1. 福建医科大学附属泉州市第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 福建 泉州 362000; 2. 泉州市医学高等专科学校附属医院耳鼻咽喉科, 福建 泉州 362000; 3. 厦门医学院附属海沧医院耳鼻咽喉头颈外科, 福建 厦门 361026; 4. 福建医科大学临床医学部, 福建 福州 350122)

摘要: **目的** 研究 N6-甲基腺苷 (m6A) 修饰在中晚期头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 的作用和基因相关通路, 为头颈部 HNSCC 患者的个体化精准治疗提出新的观点及研究参考。**方法** 选取 3 对临床中晚期 HNSCC 患者的癌及其癌旁组织 (6 个样本) 进行测序, 从癌和癌旁组织的转录组、m6A 相关差异基因中筛选出两者共同的差异基因, 通过基因本体 (GO) 分析、pathway 分析及蛋白相互作用 (PPI) 分析, 找出其中的枢纽 (*hub*) 基因, 随后对网络中的基因进行基因集变异分析 (GSVA), 从而得到 m6A 修饰影响的基因及通路。**结果** 从癌与癌旁组织的差异基因中筛选出 96 个转录组 m6A 相关的上调基因、159 个 m6A 相关下调基因; 信号通路分析发现 PPAR 通路、免疫相关通路下调, 代谢通路上调; 构建 PPI 后发现, CDK1 呈现上调趋势, 而 DCN 及 ARG2 均呈现下调趋势; GSVA 分析发现 PI3K/AKT 信号通路在癌组织中上调; PPI 中的 *hub* 基因共表达分析发现 AGR2 和 CDK1 在 m6A 调控下, 与铁死亡相关基因联系很密切。**结论** m6A 修饰与 *FOXA1*、*RPL8*、*DNC*、*CDK1*、*ApoE*、*POSTN*、*YWHAZ*、*MMP13* 等铁死亡相关基因紧密相关, m6A 修饰可能通过铁死亡相关基因影响免疫、代谢相关通路, 从而在中晚期 HNSCC 中起重要作用。

关键词: Nanopore 测序; N6-甲基腺苷; AGR2; 头颈部鳞状细胞癌
中图分类号: R739.91

Expressions and clinical significances of m6A-modified iron death-related genes in middle and advanced head and neck squamous cell carcinoma

ZHUANG Liming¹, DING Yating², CAI Chengfu^{3,4}, YE Hui³, CAI Gengming^{3,4}

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China; 2. Department of Otorhinolaryngology People's Hospital Affiliated to Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China; 3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Haicang Hospital Affiliated to Xiamen Medical College, Xiamen 361026, China; 4. Department of Clinical Medicine, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China)

Abstract: **Objective** To study the role and gene-related pathways of N6-methyladenosine (m6A) modification in middle and advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), and to propose new perspectives and research references for individualized and precise treatment of HNSCC patients. **Methods** Cancer and paracancerous tissues (6 samples) from 3 middle and advanced HNSCC patients were selected for sequencing, and the transcriptomes and m6A-related differential genes from the cancer and paracancerous tissues were screened to identify common differential genes shared by both, and the hub genes were identified through gene ontology (GO) analysis, pathway analysis, and protein-protein interaction (PPI) analysis, and then the network of the genes in the network were subsequently subjected to gene

基金项目:福建省自然科学基金项目(2020J011281)。

第一作者简介:庄黎明,女,主任医师,副教授。

通信作者:蔡耿明,Email:cgmgx@hotmail.com;叶辉,Email:entyh@126.com;蔡成福,Email:caicf@xmu.edu.cn

set variation analysis (GSVA) to obtain the genes and pathways affected by m6A modification. **Results** From the differential genes of cancer and paracancer tissues, 96 m6A-related up-regulated genes and 159 m6A-related down-regulated genes were screened out from the transcriptome. Signaling pathway analysis revealed that peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) pathway, immune-related pathway were down-regulated, and metabolic pathway was up-regulated. After constructing the PPI, the cell-cycle protein-dependent kinase 1 (CDK1) was up-regulated, and the decorin (DCN) and anterior gradient 2 (ARG2) were down-regulated. Gene set variation analysis (GSVA) revealed that the PI3K/AKT signaling pathway was up-regulated in cancer tissues. Coexpression analysis of hub genes in the PPIs revealed that AGR2 and CDK1 were very closely linked to iron death-related genes under the regulation of m6A. **Conclusions** m6A modification is closely associated with iron death-related genes such as FOXA1, ribosomal protein L8 (RPL8), DNC, CDK1, apolipoprotein E (ApoE), Periostin (POSTN), YWHAZ, Matrix metalloproteinase-13 (MMP13), etc. m6A modification may affect immune and metabolism-related pathways through iron death-related genes, and thus play an important role in middle and advanced HNSCC.

Keywords: Nanopore sequencing; N6-methyladenosine; Anterior gradient 2; Head and neck squamous cell carcinoma

头颈癌(head neck cancer, HNC)是世界上第 8 种最常见的癌症。根据 2020 年全球癌症统计, HNC 的发病人数约为 870 000 例, 占有恶性肿瘤的 4.5%。HNC 的发病机制是一个多步骤的过程, 涉及分子变化的渐进积累。进一步阐明 HNC 发展中涉及的分子事件, 可能有助于识别潜在和有效的生物标志物, 并为靶向治疗提供新的方向^[1]。头颈部鳞状细胞癌(head neck squamous cell carcinoma, HNSCC)是其中发生率最高的一类。标准疗法如保留器官的微创手术方法、放疗和多模式治愈性疗法等的改进已经可以更好地保留患者的头颈部器官的功能, 并提高患者的 5 年生存率^[2-4], 但是复发性或转移性患者的疗效及预后仍差强人意。基于 T 细胞的免疫治疗, 已被证明能提高复发性或转移性 HNSCC 患者的总生存率^[5], 但只有很低比例的患者对此疗法有响应, 还存在免疫耐受和免疫逃逸等问题, 因此, 转移性、复发性和晚期 HNSCC 患者的预后仍然不理想。对 HNSCC 进展和转移形成的机制已经有深入的研究, 但仍需要开发新的治疗策略^[2]。

RNA 修饰, 例如 N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A), 在表观遗传基因调控和细胞功能中发挥着不可忽视的作用, 与许多人类疾病密切相关。m6A 是在真核细胞中记录的最常见的转录后 RNA 修饰, 这些修饰大多发生在 5'-和 3'-非翻译区 (UTRs) 以及内部长外显子的信使核糖核酸终止密码子附近, 在许多生理和病理过程中起着重要作用, 包括产生免疫反应、微小 RNA 的编辑和各种癌症的进展^[6]。目前已有研究表明, m6A 修饰失调与胶质母细胞瘤、乳腺癌、胃癌、结直肠癌及甲状腺乳头状癌^[7] 等肿瘤的发生发展密切相关。有研究表明^[8], 喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carci-

noma, LSCC) 患者的预后, 可以通过 m6A 相关的 LncRNA 表达量构建的预后模型预测。然而, m6A 修饰在 HNSCC 进展中的作用还需要进一步研究^[9]。

1 材料与方法

1.1 分析流程

分析过程流程见图 1。

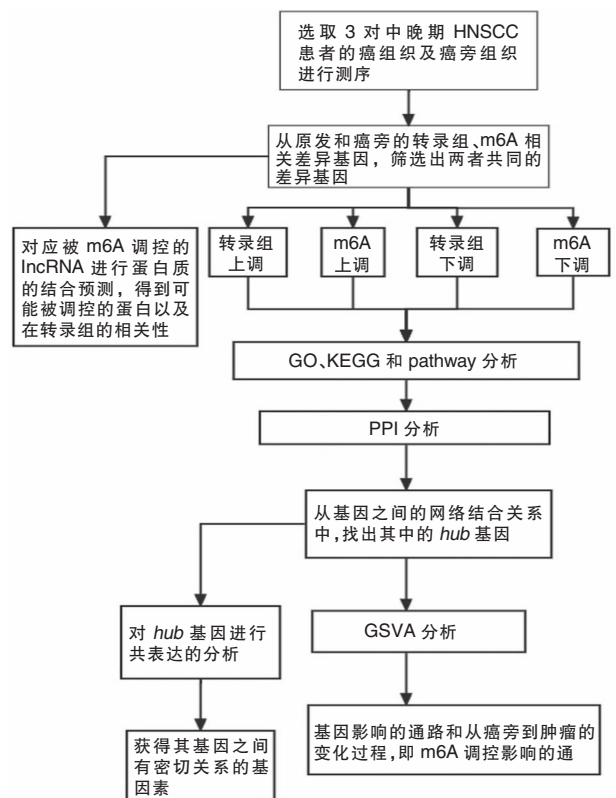


图 1 数据收集分析过程 注: HNSCC (头颈部鳞状细胞癌); GO (基因本体); KEGG (京都基因与基因组); PPI (蛋白相互作用); GSVA (基因集变异分析)。

1.2 数据处理

1.2.1 RNA提取、文库制备和测序 RNA提取、文库制备和高通量测序的数据分析均由中国有限公司赛格健康科技有限公司进行。按照 Chomczynski 等^[10]的方法,使用 TRIzol (Invitrogen™, Cat. No. 15596018),从临床收集的3对癌及癌旁组织样品中提取总 RNA。在 DNaseI (Thermo Scientific™, Cat. No. EN0521)提取 RNA 后进行 DNA 消化。RNA 质量通过用 Nanodrop™OneC 分光光度计 (Thermo Scientific™, Cat. No. ND-ONEC-W)检测 A260/A280 来测定。RNA 经证实完整性及合格后通过 Qubit™3 荧光计 (Invitrogen™, Cat. No. Q33216)与 Qubit™ RNA HS 测定试剂盒 (Invitrogen™, Cat. No. Q32855)进行定量。对应于 250 ~ 500 bp 的文库产物进行富集、定量,并最终在 NovaSeq (Illumina®)上测序。

1.2.2 RNA 序列数据分析 原始测序数据首先通过 SOAPnuke (版本 1.6.0)进行过滤,去除低质量及被污染的读数。Clean Reads 首先根据唯一分子标识符 (unique molecular identifier, UMI) 序列进行聚类,相同 UMI 序列分组到同一聚类。生成所有子聚类后,进行多序列比对,得到每个子聚类的一个一致序列。

1.2.3 新基因和转录物的预处理、比对和分析 使用 Guppy 软件 (版本 5.0.16)^[11]对原始读取进行基础调用,评估读取质量,Guppy 还对适配器序列进行了修剪。Nanofilt (2.7.1 版)过滤低质量 (Q 值 < 7) 和短长度读数 (< 50bp)^[12]。使用 Fclmr2 (版本 0.1.2)和短长度 RNA-Seq 数据校正剩余的干净读数^[13]。然后,使用 Minimap2 (2.17-r941 版)将每个文库的干净读数与其基因组进行比对^[14]。使用 Samtools (1.10 版)计算干净读数与参考基因的比对率^[15]。为了减少结果的冗余,合并仅在 5' 端外显子差异的比对,并使用 StringTie 软件 (版本:2.1.4; 参数: -保守性-L-R) 获得非冗余转录序列。Gffcompare 软件 (版本:0.12.1; 参数: -R-C-K-M) 用于将转录物与基因组的已知转录物进行比较,并发现新的转录物和新的基因。为了获得新转录物的全面功能信息,根据序列相似性和基序相似性对 7 个数据库的转录物进行了注释,包括 NR、Pfam、UniProt、京都基因与基因组 (kyoto encyclopedia of genes and genomes KEGG)、基因本体 (gene ontology, GO)、KOG/COG 和 pathway。

1.2.4 基因转录物的结构分析 将转录本与已知的基因组转录本进行比较,以校正边界。

1.2.5 测序质量控制 对牛津纳米孔测序技术 (oxford nanopore technologies, ONT)^[16]原始测序数据进行质量控制。

1.2.6 数据过滤 根据二代及三代数据过滤标准,对数据进行过滤,从而得到有效数据。

1.2.7 功能注释和通路富集分析 对上述对照组鉴定的差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 进行功能注释,GO 富集分析使用了 GO 术语的注释和可视化和元景观。GO 术语的不同表达基因列表之间的重叠通过富集分析圆图进行。然后将 DEG 引入 FunRich (功能富集分析工具) (<http://www.funrich.org/>) 用于 KEGG 通路分析。GENEMANIA 用于构建 DEG 的基因-基因相互作用网络,以评估这些基因的功能。

1.2.8 蛋白-蛋白相互作用 (protein protein interaction, PPI) 网络的构建 交集的基因通过 string V11.0 进行基因之间的相互作用预测,得到它们之间的关系,筛选标准为 combined_score >= 0.4。并通过 Cytoscape 软件 (V3.5.1) 进行网络图的构建可视化。共表达的 hub 基因通过对 PPI 中的基因进行共表达分析,从而发现它们之间的表达关系,进而发现它们在此实验中的调控关系。

1.2.9 基因集变异分析 (gene set variation analysis, GSVA) 使用软件 R (版本 3.6) 的 GSVA 包分析 m6A。

2 结果

2.1 转录组差异基因与差异 m6A 的差异基因的交集

首先通过癌与癌旁组织对比得到转录组差异基因筛选出来,标准为 $P < 0.05$ 且 $\log_2 > 1$ 或者 $\log_2 < -1$ 。将 m6A 的差异基因筛选出,标准为 $P < 0.05$ 且 $\log_2 > 1$ 或者 $\log_2 < -1$ 。通过两组差异基因筛选出转录组上调和 m6A 上调的基因以及转录组下调和 m6A 下调的基因。我们得到 96 个上调基因 (转录组上调 m6A 上调) 和 159 个下调基因 (转录组下调 m6A 下调)。

2.2 交集基因的富集分析

首先将交集基因按照上调和下调基因来做富集分析,从而得到它们各自的方向,具体见表 1。

表 1 交集基因的富集分析

编码	描述	基因比	背景比率	<i>P</i>	矫正后 <i>P</i>	<i>Q</i>	基因识别符	拷贝数
GO: 0006957	补体激活, 替代途径	4/125	18/18 800	5.30233E-06	0.009540862	0.008911685	<i>C3/C7/CFD/CFH</i>	4
GO: 0016266	O-聚糖加工	5/125	43/18 800	9.42773E-06	0.009540862	0.008911685	<i>GCNT3/GALNT5/B3GNT3/GALNT12/ST3GAL4</i>	5
GO: 0055072	铁离子稳态	6/125	85/18 800	2.18072E-05	0.014347479	0.013401327	<i>CP/LTF/EPAS1/BDH2/CYBRD1/SCARA5</i>	6
GO: 0007589	体液分泌	6/125	89/18 800	2.83547E-05	0.014347479	0.013401327	<i>STATH/CD01/AQPI/SCNN1B/NPR1/AGR2</i>	6
GO: 0032941	组织分泌	4/125	39/18 800	0.000127936	0.051788665	0.048373436	<i>STATH/AQPI/SCNN1B/AGR2</i>	4
GO: 0006493	蛋白 O-连接糖基化	5/125	89/18 800	0.000318602	0.096721733	0.09034337	<i>GCNT3/GALNT5/B3GNT3/GALNT12/ST3GAL4</i>	5
GO: 0055076	过渡金属稳态	6/125	139/18 800	0.000334512	0.096721733	0.09034337	<i>CP/LTF/EPAS1/BDH2/CYBRD1/SCARA5</i>	6
GO: 0006826	铁离子转运	4/125	59/18 800	0.000638987	0.161663778	0.15100278	<i>CP/LTF/CYBRD1/SCARA5</i>	4
GO: 0030278	骨化调节	5/125	118/18 800	0.001152531	0.177542781	0.165834634	<i>MGP/LTF/STATH/OSRI/DHRS3</i>	5
GO: 0030324	肺发育	6/125	179/18 800	0.001261134	0.177542781	0.165834634	<i>HOPX/IGFBP5/FOXAI/EPAS1/LAMA5/AGR2</i>	6
GO: 0006959	体液免疫反应	8/125	317/18 800	0.001277583	0.177542781	0.165834634	<i>LTF/C3/C7/CLU/CFD/SPINK5/WFDC2/CFH</i>	8
GO: 0030282	骨矿化作用	5/125	121/18 800	0.001288989	0.177542781	0.165834634	<i>MGP/LTF/STATH/OSRI/CLEC3B</i>	5
GO: 0006631	脂肪酸代谢过程	9/125	395/18 800	0.001307103	0.177542781	0.165834634	<i>AKR1C1/PTGIS/C3/PER2/ACOX1/BDH2/ACSL3/FAAH2/TNXB</i>	9
GO: 0030323	呼吸管发育	6/125	183/18 800	0.001412018	0.177542781	0.165834634	<i>HOPX/IGFBP5/FOXAI/EPAS1/LAMA5/AGR2</i>	6
GO: 0048662	平滑肌细胞增值负调控	4/125	73/18 800	0.001422709	0.177542781	0.165834634	<i>IGFBP5/NPR1/OGN/NDRG2</i>	4
GO: 0010951	内肽酶活性负调控	7/125	251/18 800	0.001458220	0.177542781	0.165834634	<i>LTF/C3/LXN/TIMP3/AQPI/SPINK5/WFDC2</i>	7
GO: 0006956	补体激活	5/125	131/18 800	0.001830846	0.177542781	0.165834634	<i>C3/C7/CLU/CFD/CFH</i>	5
GO: 0010466	肽酶活性负调控	7/125	262/18 800	0.001861256	0.177542781	0.165834634	<i>LTF/C3/LXN/TIMP3/AQPI/SPINK5/WFDC2</i>	7
GO: 0042045	上皮细胞液体转运	2/125	10/18 800	0.001905855	0.177542781	0.165834634	<i>AQPI/SCNN1B</i>	2
GO: 0071073	磷脂生物合成正调节	2/125	10/18 800	0.001905855	0.177542781	0.165834634	<i>ADGRF5/ACSL3</i>	2
GO: 0001503	骨化	9/125	420/18 800	0.001988831	0.177542781	0.165834634	<i>MGP/LTF/IGFBP5/STATH/OSRI/SLC26A2/CLEC3B/MAP2K6/DHRS3</i>	9
GO: 0002385	黏膜免疫反应	3/125	38/18 800	0.002042494	0.177542781	0.165834634	<i>LTF/GP2/PIGR</i>	3
GO: 0030500	调节骨矿化	4/125	81/18 800	0.002087848	0.177542781	0.165834634	<i>MGP/LTF/STATH/OSRI</i>	4

对这部分基因进行功能以及 pathway 的富集分析,对显著性差异基因功能分别做了柱状图(图 2),显著性筛选的标准为 $P < 0.05$ 。

2.3 差异基因信号通路分析

根据差异基因通路中每一通路的显著性水平

(P 值)和所包含的差异基因数据(表 2)构建显著性差异基因通路的分布图。对部分显著性差异基因通路做了气泡图(图 3)。从通路的结果中可以看出:在癌组织中 PPAR 通路下调,免疫相关通路下调,以及代谢通路的上调,从而影响了肿瘤的发展和增殖。

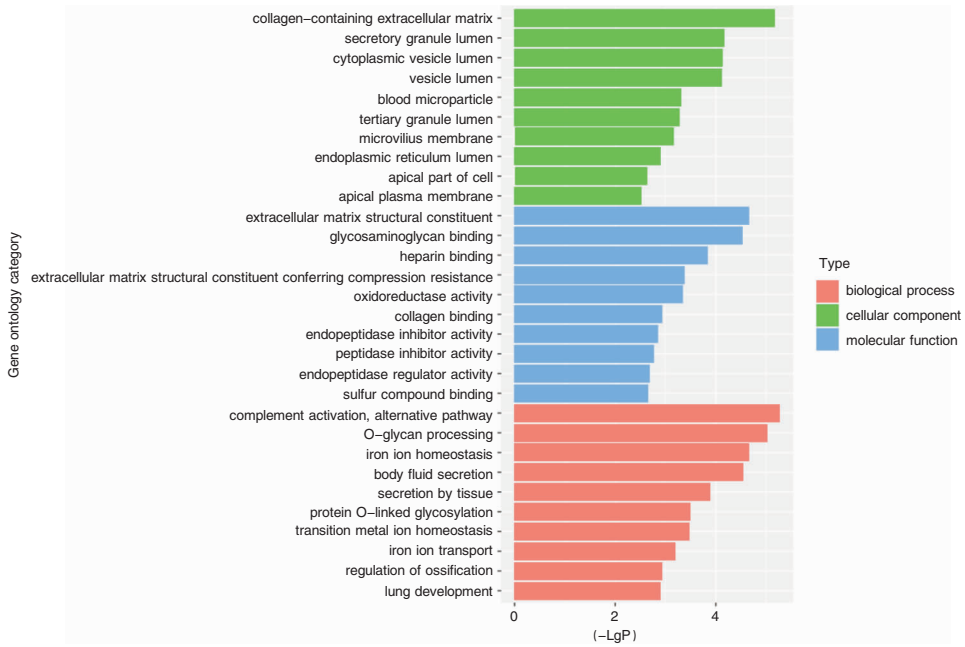


图 2 部分基因功能及 pathway 富集分析中显著性差异的基因 注:纵坐标为差异基因功能名称,横坐标为 P 值的负对数(-LgP);图中仅显示按照-LgP 排序最大的各前 10 项。collagen-containing extracellular matrix(含胶原蛋白的细胞外基质);secretory granule lumen(分泌颗粒腔);cytoplasmic vesicle lumen(细胞质囊腔);vesicle lumen(囊泡腔);blood microparticle(血液微粒);tertiary granule lumen(三级颗粒腔);microvillus membrane(微滤膜);endoplasmic reticulum lumen(内质网腔);apical part of cell(细胞顶端);apical plasma membrane(顶端质膜);extracellular matrix structural constituent(细胞外基质结构成分);glycosaminoglycan binding(糖胺聚糖结合);heparin binding(肝素结合);extracellular matrix structural constituent conferring compression resistance(细胞外基质中具有抗压性的结构成分);oxidoreductase activity(氧化还原酶活性);collagen binding(胶原蛋白结合);endopeptidase inhibitor activity(内肽酶抑制剂活性);peptidase inhibitor activity(肽酶抑制剂活性);endopeptidase regulator activity(内肽酶调节器活性);sulfur compound binding(硫化物结合);complement activation, alternative pathway(补体激活,替代途径);O-glycan processing(O 型糖加工);iron ion homeostasis(铁离子稳态);body fluid secretion(体液分泌);secretion by tissue(组织分泌);protein O-linked glycosylation(蛋白质 O 链接糖基化);transition metal ion homeostasis(过渡金属离子稳态);iron ion transport(铁离子运输);regulation of ossification(骨化调节);lung development(肺发育)。下同。

表 2 差异基因数据分析

编码	描述	基因比	背景比率	P	矫正后 P	Q	基因识别符	拷贝数
hsa00512	黏蛋白型 O-糖生物合成	5/54	36/8 190	3.32939E-06	0.000469444	0.000452096	GCNT3/GALNT5/B3GNT3/GALNT12/ST6GALNAC1	5
hsa04610	补体和凝血级联	5/54	86/8 190	0.000239667	0.016896499	0.016272104	C3/C7/CLU/CFD/CFH	5
hsa04924	肾素分泌	3/54	69/8 190	0.010447595	0.380094668	0.366048616	AQP1/NP1/CLCA4	3
hsa03320	PPAR 信号通路	3/54	75/8 190	0.013097555	0.380094668	0.366048616	ACO1/PLTP/ACSL3	3
hsa00601	糖磷脂的生物合成-内酯和新内酯系列	2/54	27/8 190	0.013478534	0.380094668	0.366048616	B3GNT3/ST3GAL4	2
hsa05150	金黄色葡萄球菌感染	3/54	96/8 190	0.025165767	0.502134409	0.48357849	C3/CFD/CFH	3
hsa04216	铁死亡	2/54	41/8 190	0.029697453	0.502134409	0.48357849	CP/ACSL3	2
hsa00071	脂肪酸降解	2/54	43/8 190	0.032432011	0.502134409	0.48357849	ACO1/ACSL3	2
hsa00514	其他类型 O-糖生物合成	2/54	47/8 190	0.038184202	0.502134409	0.48357849	GALNT5/GALNT12	2
hsa00440	磷酸盐和磷酸盐代谢	1/54	6/8 190	0.038925737	0.502134409	0.48357849	CHPT1	1
hsa04672	产生 IgA 的肠道免疫网络	2/54	49/8 190	0.041196136	0.502134409	0.48357849	PIGR/CCL28	2
hsa05144	疟疾	2/54	50/8 190	0.042734843	0.502134409	0.48357849	HBA1/ACKR1	2

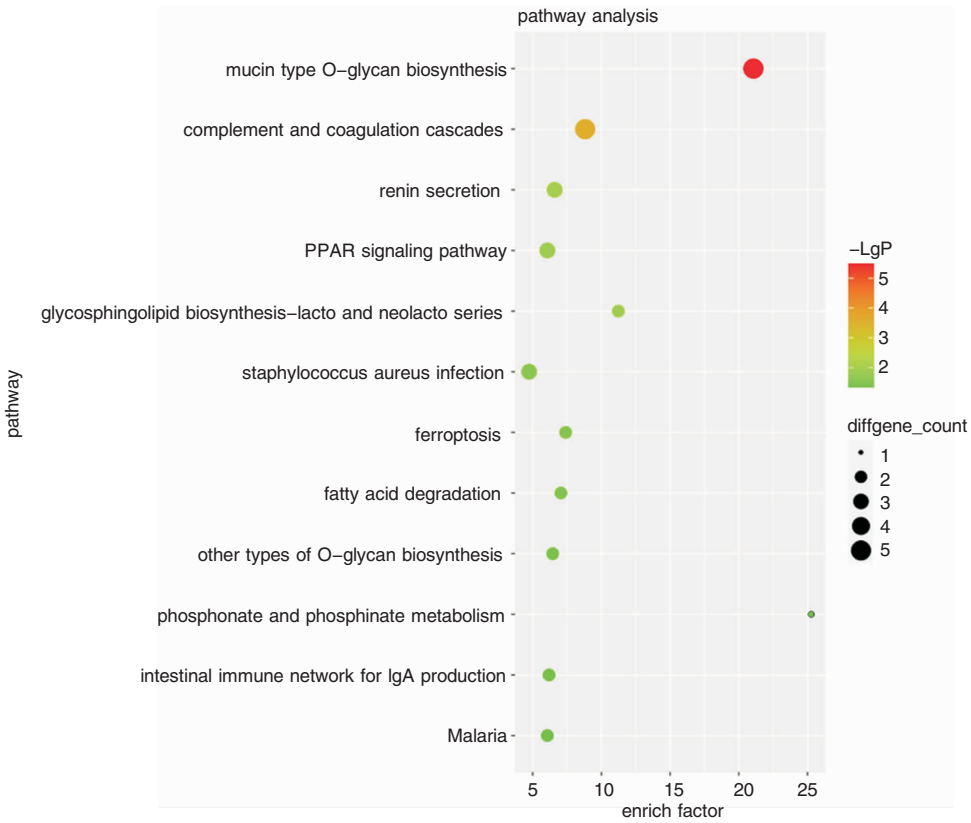


图 3 显著性差异基因通路气泡图 注:纵坐标为差异基因通路名称,横坐标为富集程度(enrich factor);mucin type O-glycan biosynthesis(黏蛋白型 O-糖的生物合成);complement and coagulation cascades(补体和凝血级联);renin secretion(肾素分泌);PPAR signaling pathway(PPAR 信号通路);glycosphingolipid biosynthesis-lacto and neolacto series(糖磷脂的生物合成-内酯和新内酯系列);staphylococcus aureus infection(金黄色葡萄球菌感染);ferroptosis(铁死亡);fatty acid degradation(脂肪酸降解);other types of O-glycan biosynthesis(其他类型的 O-糖生物合成);phosphonate and phosphinate metabolism(膦酸盐和膦酸盐代谢);intestinal immune network for IgA production(产生 IgA 的肠道免疫网络);malaria(疟疾)。下同。

2.4 PPI 的建立

通过 string V11.0 对上述交集的基因进行基因之间的相互作用预测,得到它们之间的关系,并通过 Cytoscape 软件进行网络图的构建可视化构建,点用来表示基因,线用来表示基因之间的关系,其中颜色表示上下调的关系和程度,红色表示上调基因,而绿色表示下调基因,颜色越深表示变化越显著。

通过构建差异基因的作用网络,得到基因之间的作用关系。基因的度排序结果见表 3。通过癌与癌旁组织进行差异基因分析发现,DCN、GLU、ARG2、C3 均呈现下调趋势,而 CDK1、APOE、POSTN、RPL8、YWHAZ、MMP13 均呈现上调的趋势(表 3)。

2.5 m6A_GSVA

通过癌和癌旁组织的 6 个样本的转录组测序技术(RNA sequencing, RNAseq),其每千个碱基的转录每百万映射的 Transcript(Transcript per Kilobase per Million mapped reads, TPM)值进行 GSVA 分析(GSVA:用来体现每个样本的在某个通路的变化情况)。

运用 t 检验方法筛选,通过基因的信号值预测每个样本的富集得分值,计算两组之间的富集差异性,得到有差异富集的通路。从图 4 可见 PI3K/AKT 信号通路为在肿瘤中上调,PPAR 通路在肿瘤中为抑制通路。

表 3 基因的度与作用趋势

基因名称	度	形式
DCN	12	下调
CDK1	11	上调
APOE	11	上调
POSTN	10	上调
CLU	10	下调
AGR2	10	下调
RPL8	8	上调
YWHAZ	8	上调
MMP13	8	上调
C3	8	下调

注:度表示基因和其他基因关联的个数,如度 = 10 代表与该基因有相互作用关系的基因有 10 个,度越大,代表与它有相互作用的基因越多。

2.6 共表达的 hub 基因

通过对 PPI 中的基因进行共表达分析,从而发现它们之间的表达关系,进而发现它们在此实验中的调控关系。通过计算 PPI 中的基因之间的共表达

关系,具体见图 5。从图 5 中 PPI 共表达关系,我们发现 AGR2、CDK1 在 m6A 调控下,与周围的基因联系很密切,具体结果见表 4。

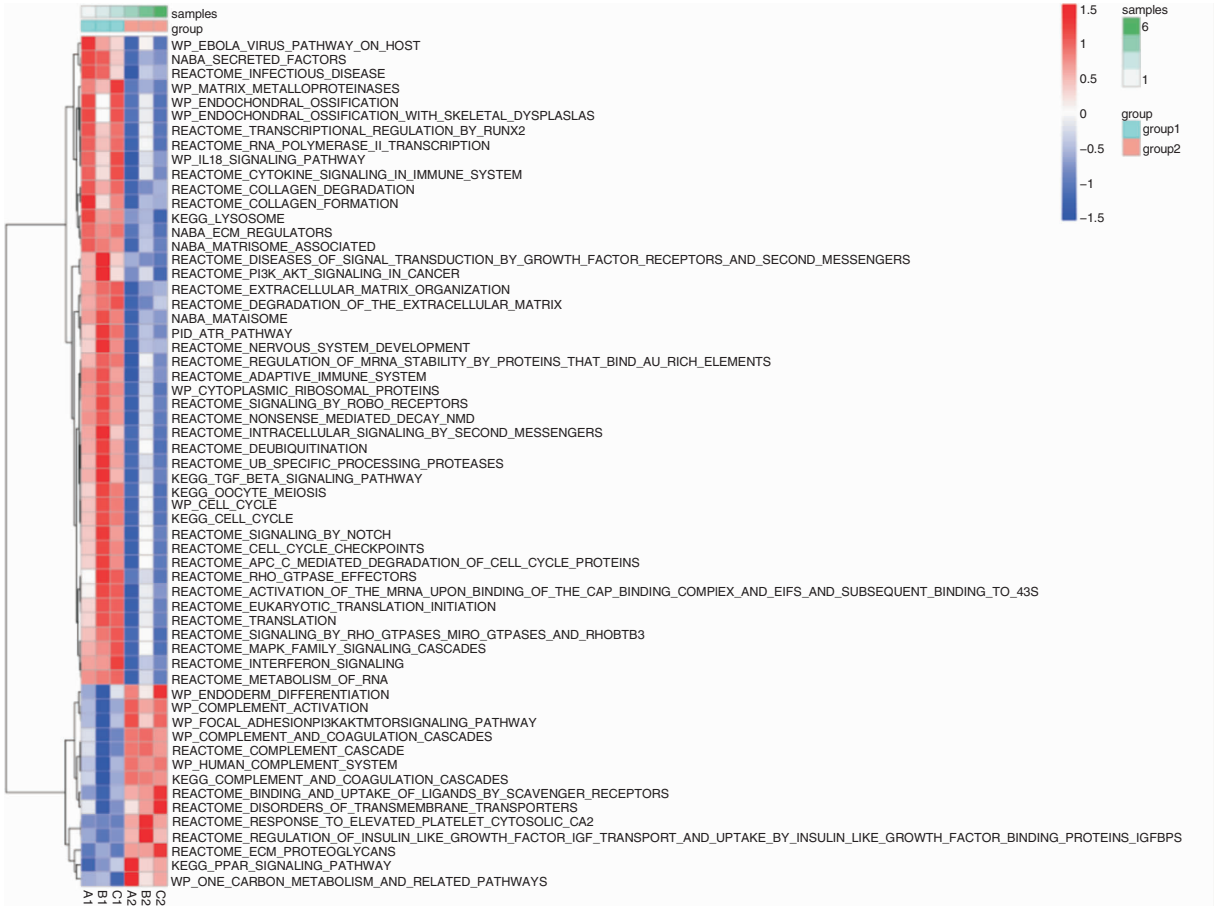


图 4 6 个样本在不同分型的样本富集得分值 注:图中颜色是由蓝向红来变化,表示富集分数数值的升高,表示通路被激活。

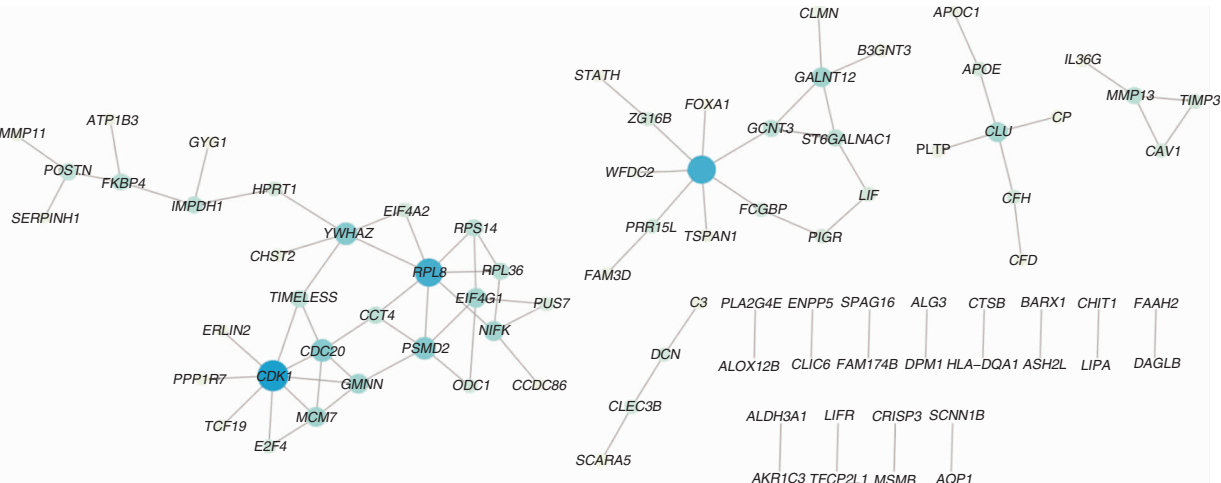


图 5 PPI 中基因的共表达关系 注:深蓝色表示基因的度越大,而浅色表示基因的度越小。

表 4 共表达基因的度

名称	度
<i>CDK1</i>	8
<i>AGR2</i>	7
<i>RPL8</i>	7
<i>CDC20</i>	5
<i>YWHAZ</i>	5
<i>PSMD2</i>	5
<i>NIFK</i>	4
<i>EIF4G1</i>	4
<i>GMNN</i>	4
<i>MCM7</i>	4
<i>CLU</i>	4
<i>GALNT12</i>	4

3 讨论

由于肿瘤的异质性、对包括免疫治疗在内的多种治疗效果不佳,以及耐药性等问题的存在。HNSCC 患者,特别是复发性和中晚期患者的治疗效果和预后并不令人满意,适当的个体化治疗方案需要进一步去探索和建立,从而有效提高和改善 HNSCC 患者的治疗效果和预后。既往的研究表明,m6A 调节因子的异常表达可能与多种癌症的发生发展有关,包括乳腺癌、膀胱癌、胶质瘤和结直肠癌等。与正常组织相比,某些 m6A 相关基因在 HNSCC 组织中的表达上调,与免疫细胞浸润以及免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 治疗的反应和结果有关^[6]。从 PPI 共表达关系图中,我们发现在 m6A 调控下,共表达基因与周围的基因联系很密切,它们处于网络的中心位置。

细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cell cycle protein-dependent kinase 1, CDK1) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,是细胞周期的主调节因子^[17],它对细胞周期调节至关重要。CDK1 在控制 DNA 复制、修复及 mRNA 转录等功能作用中均能起到一定的作用^[18]。一般情况下,细胞周期控制的失调主要引起肿瘤生长^[19],CDK1 的上调与肿瘤的增殖和进展相关。一项研究表明^[20],铁死亡相关基因与 CDK1 密切相关。并且有研究已验证了 CDK1 可使 LA 相关蛋白 1 (LARPI) 磷酸化^[21]。几项研究均显示了 LARPI 在几种恶性肿瘤中显著上调^[22-25]。与之相关的是,LARPI 可作为 CDK1 的底物在部分癌症中上调,从而提高异常翻译存活率,导致癌细胞增殖增加。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 是一种参与脂质转运和脂蛋白代谢的多功能蛋白,介导组织和细胞中的脂质分布/再分配。它还可以调节炎症和免疫

功能,保持细胞骨架的稳定性,改善神经组织功能。近年来,ApoE 频繁出现在肿瘤研究中,并逐渐成为肿瘤的生物标志物。研究发现 ApoE 在许多肿瘤细胞,包括神经胶质瘤、卵巢肿瘤、口腔鳞状细胞癌、胰腺导管细胞癌等大多数实体瘤组织中高表达。ApoE 可以调节巨噬细胞的极化变化,参与肿瘤免疫微环境的构建,调节肿瘤炎症和免疫反应,在肿瘤侵袭和转移中发挥作用。许多研究已经证实 ApoE 促进肿瘤的发展、增殖和转移,但最近的研究也发现 ApoE 具有保护作用^[26]。Periostin (POSTN) 属于基质细胞蛋白,分泌到细胞外环境中的非结构 ECM 蛋白,在大多数成年组织中以低水平表达。这些蛋白质与细胞表面受体相互作用,介导细胞和细胞外通讯。Periostin 在各种实体上皮肿瘤中过表达,其与细胞表面受体整合素的相互作用调节细胞内信号通路,对癌症有直接影响。它在转移中上调,并可影响转移病灶的大小和数量^[27]。编码核糖体蛋白 (ribosomal protein L8, RPL8) 是 60S 亚基的组成部分,该蛋白属于核糖体蛋白的 L2P 家族,位于细胞质中。RPL8 是一种铁死亡相关基因,它的表达随胰腺肿瘤分级而显著改变,与胰腺癌预后相关,与胶质瘤癌症进展有关^[28-29]。血小板参与肿瘤血管生成和癌症进展,是癌症生物标记物的潜在来源。研究发现,RPL8 在癌症患者的血小板蛋白质组中上调^[30]。

簇蛋白是一种进化高度保守的糖蛋白,簇蛋白通过调节多种信号通路介导各种癌症 (如前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、结肠癌、膀胱癌和癌症) 中的癌症进展,在调节几个基本生理过程中发挥了突出作用,包括程序性细胞死亡、转移、侵袭、增殖和细胞生长^[31]。簇蛋白介导的线粒体自噬可以抑制口腔癌症的干性和自我更新能力^[32]。它在神经保护和癌症以及化疗耐药性方面具有重要意义,被认为既是一种生物标志物,也是一种非常可探索的新治疗靶点,适用于多种疾病^[33]。但簇蛋白在恶性肿瘤中的作用一直存在争议,它可以促进体外的肿瘤发生和对化疗药物的耐药性。然而,簇蛋白在小鼠体内也可能限制神经母细胞瘤和癌症的发展,研究发现,它在抑制细胞死亡、调节促生存信号传导和增强肿瘤细胞化疗耐药性方面至关重要。簇蛋白高表达与膀胱癌患者生存率低明显相关,被定义为膀胱癌中的一种癌基因。它通过抑制细胞凋亡来增强癌症对顺铂的耐药性^[34]。蛋白聚糖由铁死亡的细胞释放,然后作为警报信号触发先天和适应性免疫反应。铁死亡期间蛋白聚糖的早期释放是一个活跃的

过程,涉及分泌性大自噬/自噬和溶酶体胞吐作用。一旦释放,细胞外蛋白聚糖与巨噬细胞上的受体高级糖基化终产物特异性受体(AGER)结合,以NF κ B/NF- κ B依赖的方式触发促炎细胞因子的产生^[35]。YWHAZ(也称为14-3-3 ζ)是许多信号转导途径的中心枢纽蛋白,在肿瘤进展中起着重要作用。越来越多的证据表明,YWHAZ在多种类型的癌症中经常上调,并在细胞生长、细胞周期、凋亡、迁移和侵袭等广泛的细胞活动中起致癌基因的作用。此外,YWHAZ可能是几种癌症的诊断、预后和化疗耐药性的潜在生物标志物^[36]。临床上,YWHAZ高表达提示胃癌、膀胱尿路上皮癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、非小细胞肺癌等多种癌症患者预后差有关^[37-42]。经典的铁死亡诱导剂erastin促进了软骨细胞中基质金属蛋白酶13的表达,同时抑制了II型胶原的表达^[43-44]。AGR2基因位于染色体7p21.3内,是一种蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI),PDI家族成员作为氧化还原酶而发挥作用,负责催化二硫键的形成或重排,这是发生于细胞内质网中的一种关键蛋白质修饰。许多研究已证实,AGR2高表达于含有黏液分泌功能细胞的组织。肿瘤微环境(tumour microenvironment, TME)中成分复杂,包含肿瘤细胞、免疫细胞、肿瘤相关炎症细胞和成纤维细胞等细胞,此外还有组织间质、血管、细胞因子和趋化因子等。颈癌研究中发现,AGR2的表达于与ALDH1、Sox2和Oct4之间存在相关性,表明AGR2可能与头颈癌有关^[45]。此外,AGR2在各种上皮肿瘤中表达上调,通过激活包括p53激活途径在内的多种途径促进肿瘤的侵袭性生长、血管生成、侵袭、转移和耐药性等恶行生物学行为^[46]。

有趣的是,与已有研究相反,测序结果发现CLU、AGR2在中晚期HNSCC癌组织中表达,我们认为:①实验所收集的标本为中晚期HNSCC标本,与上述研究的标本有所不同。②它们可以逃离这个位置,在细胞表面或细胞外基质中发挥作用。③转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的缺失可以抑制AGR2。因为除了通过关键信号系统诱导AGR2外,还可以通过TGF- β 的介导调节AGR2,即TGF- β /AGR2轴。TGF- β 的缺失可以抑制AGR2从而可以抑制p53肿瘤抑制活性^[20]。④测序显示FOXA1低表达,而功能研究表明,FOXA1在前列腺癌中存在两种相悖的功能:FOXA1通过雄激素受体(androgen receptor, AR)途径诱导

前列腺癌细胞繁殖,同时FOXA1也可以通过不依赖AR途径抑制癌细胞迁移和上皮-间皮转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)。AR及其辅因子FOXA1与一个特定的内含子雄激素响应元件结合,通过MBOAT2调节前列腺癌的铁死亡^[47]。FOXA1是Yes相关蛋白(yes-associated protein, YAP)依赖性的转录因子,在转录因子CP2(transcription factor CP2, TFCP2)作为YAP调控转录因子的情况下,可以于YAP一起调节FOXA1,诱导铁蛋白轻链(ferritin light chain, FLT)转录,从而抑制铁死亡^[35,48]。

我们测序的数据结果表明,m6A修饰与FOXA1、RPL8、DCN等铁死亡相关基因紧密相关。铁死亡是铁依赖性的,以脂质过氧化为主要特征的一种区别于凋亡细胞死亡的一种独特的程序性死亡类型。已在包括癌症等的自身免疫疾病中被探索研究,并被作为新的治疗策略^[49-50]。因此我们推测,m6A修饰铁死亡相关基因在中晚期HNSCC中起重要作用,这需要进一步的实验深入研究证实。本研究探讨了m6A介导的中晚期HNSCC表观转录组学,对中晚期HNSCC的免疫逃逸进行初步的探讨,为HNSCC的个体化精准治疗提出新的观点。

参考文献:

- [1] Liu YQ, Zou HY, Xie JJ, et al. Paradoxical roles of desmosomal components in head and neck cancer[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6):914.
- [2] Chow LQM. Head and neck cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(1):60-72.
- [3] Shen Y, Li X, Wang D, et al. COL3A1: Potential prognostic predictor for head and neck cancer based on immune-microenvironment alternative splicing[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(4):4882-4894.
- [4] Terazawa K, Ohashi T, Shibata H, et al. Immune-modified Glasgow prognostic score: A new prognostic marker for head and neck cancer[J]. *Head Neck*, 2022, 44(11):2555-2563.
- [5] Karpathiou G, Vincent M, Dumollard JM, et al. PD-L1 expression in head and neck cancer tissue specimens decreases with time[J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 237:154042.
- [6] Chen J, Lu T, Zhong F, et al. A Signature of N6-methyladenosine regulator-related genes predicts prognoses and immune responses for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:809872.
- [7] 李祖飞,赵晓畅,何帅. 20种m6A甲基化调节基因与甲状腺乳头状癌的相关性分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2023, 29(2):57-64.
- [8] 李念燊,韩杏倩,何金阳,等. 基于N6-甲基腺苷相关长链非编码核糖核酸表达的喉鳞状细胞癌预后分析[J]. *中国耳鼻咽喉*

颅底外科杂志,2023,29(1):81-91.

- [9] Jin S, Li M, Chang H, et al. The m6A demethylase ALKBH5 promotes tumor progression by inhibiting RIG-I expression and interferon alpha production through the IKK ϵ /TBK1/IRF3 pathway in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2022,21(1):97.
- [10] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987,162(1):156-159.
- [11] Knyazev A, Glushkevich A, Fesenko I. Direct RNA sequencing dataset of SMG1 KO mutant *Physcomitrella* (*Physcomitrium patens*) [J]. *Data Brief*, 2020,33:106602.
- [12] De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, et al. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data [J]. *Bioinformatics*, 2018,34(15):2666-2669.
- [13] Wang JR, Holt J, McMillan L, et al. FMLRC: Hybrid long read error correction using an FM-index [J]. *BMC Bioinformatics*, 2018,19(1):50.
- [14] Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences [J]. *Bioinformatics*, 2018,34(18):3094-3100.
- [15] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools [J]. *Bioinformatics*, 2009,25(16):2078-2079.
- [16] [Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing] [J]. *Nat Biotechnol*, 2016,34(5):518-524.
- [17] Enserink JM, Kolodner RD. An overview of Cdk1-controlled targets and processes [J]. *Cell Div*, 2010,5:11.
- [18] Wang Q, Bode AM, Zhang T. Targeting CDK1 in cancer: mechanisms and implications [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2023,7(1):58.
- [19] Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022,23(1):74-88.
- [20] Meng Q, Xu Y, Ling X, et al. Role of ferroptosis-related genes in coronary atherosclerosis and identification of key genes: integration of bioinformatics analysis and experimental validation [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2022,22(1):339.
- [21] Haneke K, Schott J, Lindner D, et al. CDK1 couples proliferation with protein synthesis [J]. *J Cell Biol*, 2020,219(3):e201906147.
- [22] Mura M, Hopkins TG, Michael T, et al. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression [J]. *Oncogene*, 2015,34(39):5025-5036.
- [23] Xie C, Huang L, Xie S, et al. LARP1 predict the prognosis for early-stage and AFP-normal hepatocellular carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2013,11:272.
- [24] Ye L, Lin ST, Mi YS, et al. Overexpression of LARP1 predicts poor prognosis of colorectal cancer and is expected to be a potential therapeutic target [J]. *Tumour Biol*, 2016,37(11):14585-14594.
- [25] Xu Z, Xu J, Lu H, et al. LARP1 is regulated by the XIST/miR-374a axis and functions as an oncogene in non-small cell lung carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017,38(6):3659-3667.
- [26] Miao G, Zhuo D, Han X, et al. From degenerative disease to malignant tumors: Insight to the function of ApoE [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023,158:114127.
- [27] Dorafshan S, Razmi M, Safaei S, et al. Periostin: biology and function in cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2022,22(1):315.
- [28] Park JM, Mau CZ, Chen YC, et al. A case-control study in Taiwanese cohort and meta-analysis of serum ferritin in pancreatic cancer [J]. *Sci Rep*, 2021,11(1):21242.
- [29] Yun D, Wang X, Wang W, et al. A novel prognostic signature based on glioma essential ferroptosis-related genes predicts clinical outcomes and indicates treatment in glioma [J]. *Front Oncol*, 2022,12:897702.
- [30] Walraven M, Sabrkhanly S, Knol JC, et al. Effects of cancer presence and therapy on the platelet proteome [J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(15):8236.
- [31] Zhang Y, Lv X, Chen L, et al. The role and function of CLU in cancer biology and therapy [J]. *Clin Exp Med*, 2023,23(5):1375-1391.
- [32] Praharaj PP, Patra S, Mishra SR, et al. CLU (clusterin) promotes mitophagic degradation of MSX2 through an AKT-DNM1/Drp1 axis to maintain SOX2-mediated stemness in oral cancer stem cells [J]. *Autophagy*, 2023,19(8):2196-2216.
- [33] Rodríguez-Rivera C, Garcia MM, Molina-álvarez M, et al. Clusterin: Always protecting. Synthesis, function and potential issues [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021,134:111174.
- [34] You J, Han Y, Qiao H, et al. Hsa_circ_0063804 enhances ovarian cancer cells proliferation and resistance to cisplatin by targeting miR-1276/CLU axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2022,14(11):4699-4713.
- [35] Zhang X, Yu K, Ma L, et al. Endogenous glutamate determines ferroptosis sensitivity via ADCY10-dependent YAP suppression in lung adenocarcinoma [J]. *Theranostics*, 2021,11(12):5650-5674.
- [36] Gan Y, Ye F, He XX. The role of YWHAZ in cancer: A maze of opportunities and challenges [J]. *J Cancer*, 2020,11(8):2252-2264.
- [37] Zhao J, Fu X, Chen H, et al. G3BP1 interacts with YWHAZ to regulate chemoresistance and predict adjuvant chemotherapy benefit in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2021,124(2):425-436.
- [38] Yu CC, Li CF, Chen IH, et al. YWHAZ amplification/overexpression defines aggressive bladder cancer and contributes to chemo-/radio-resistance by suppressing caspase-mediated apoptosis [J]. *J Pathol*, 2019,248(4):476-487.
- [39] Mei J, Liu Y, Yu X, et al. YWHAZ interacts with DAAMI to promote cell migration in breast cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2021,7(1):221.
- [40] Lage-Vickers S, Bizzotto J, Valacco MP, et al. The expression of YWHAZ and NDRG1 predicts aggressive outcome in human prostate cancer [J]. *Commun Biol*, 2021,4(1):103.
- [41] Du G, Yu X, Chen Y, et al. MiR-1-3p suppresses colorectal cancer cell proliferation and metastasis by inhibiting YWHAZ-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Front Oncol*, 2021,11:634596.

- [42] Jia J, Sun J, Wang W, et al. Long noncoding RNA MLK7-AS1 promotes non-small-cell lung cancer migration and invasion via the miR-375-3p/YWHAZ axis[J]. *Front Oncol*, 2021,11:626036.
- [43] Yao X, Sun K, Yu S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis[J]. *J Orthop Translat*,2020,27:33-43.
- [44] Wang X, Liu Z, Peng P, et al. Astaxanthin attenuates osteoarthritis progression via inhibiting ferroptosis and regulating mitochondrial function in chondrocytes[J]. *Chem Biol Interact*, 2022,366:110148.
- [45] Curtarelli RB, Gonçalves JM, Dos Santos LGP, et al. Expression of cancer stem cell biomarkers in human head and neck carcinomas: a systematic review[J]. *Stem Cell Rev Rep*,2018,14(6):769-784.
- [46] Kawata-Shimamura Y, Eguchi H, Kawabata-Iwakawa R, et al. Biomarker discovery for practice of precision medicine in hypopharyngeal cancer: a theranostic study on response prediction of the key therapeutic agents[J]. *BMC Cancer*,2022,22(1):779.
- [47] Liang D, Feng Y, Zandkarimi F, et al. Ferroptosis surveillance independent of GPX4 and differentially regulated by sex hormones[J]. *Cell*,2023,186(13):2748-2764. e22.
- [48] Zhang X, Sun F, Qiao Y, et al. TFCEP2 is required for YAP-dependent transcription to stimulate liver malignancy[J]. *Cell Rep*, 2017,21(5):1227-1239.
- [49] Alvarez SW, Sviderskiy VO, Terzi EM, et al. NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis [J] [published correction appears in *Nature*,2022,609(7929):E12]. *Nature*,2017,551(7682):639-643.
- [50] Lee JY, Nam M, Son HY, et al. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway determines ferroptosis sensitivity in gastric cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020,117(51):32433-32442.

(收稿日期:2023-06-17)

本文引用格式:庄黎明,丁雅婷,蔡成福,等. Nanopore 测序揭示 m6A 修饰铁死亡相关基因在中晚期头颈部鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2023,29(5):60-70. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202323196

Cite this article as:ZHUANG Liming, DING Yating, CAI Chengfu, et al. Expressions and clinical significances of m6A-modified iron death-related genes in middle and advanced head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2023, 29(5):60-70. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202323196