

网络出版时间:2025-11-13 09:00:15 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251205.1439.003

胃癌铁死亡相关基因预后模型及实验验证

张 钊^{1,2},田洪军³,丁克硕^{4,5},朱 勇⁵,林 峰²,杨思佳³,王文斌^{1,2,3}

(¹ 安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022;² 安徽省公共卫生临床中心,合肥 230011;

³ 安徽医科大学第二附属医院普外科,合肥 230601;⁴ 安徽医科大学第一附属医院病理科,合肥 230022;

⁵ 安徽医科大学基础医学院,合肥 230032)

摘要 **目的** 确定与胃癌预后相关的铁死亡基因,并探索这些基因的潜在分子功能。**方法** TCGA 数据库中提取胃癌患者癌组织和癌旁组织基因表达和临床信息,R 软件中的“DESeq2”包进行铁死亡基因的差异表达分析。基于 LASSO 算法的 Cox 回归分析确定关键基因及构建胃癌预后模型;风险评分中位数确定胃癌高低风险组;Kaplan-Meier 生存曲线分析和 ROC 曲线分析评估模型准确性;“CIBERSORT”包确定胃癌患者免疫细胞浸润情况;胃癌及癌旁组织样本检测预后差异表达基因(DEGs)的 mRNA 表达;体外实验验证羟基羧酸受体 1(HCAR1)对胃癌恶性生物学行为的影响。**结果** 基于 TCGA 数据库与铁死亡相关基因构建了新型预后模型。在训练和验证队列均显示出强大的生存预测能力。8 对胃癌和癌旁组织 RT-qPCR 显示,6 个预后 DEGs 在癌组织中的表达与模型预测一致。体外实验证实,降低关键基因 HCAR1 表达可抑制胃癌细胞增殖、侵袭及转移。**结论** 铁死亡相关基因构建的预后模型具有稳定的预测能力,可以判断胃癌患者的预后情况和生存率。

关键词 胃癌;铁死亡相关基因;TCGA 数据库;预后模型;免疫微环境;生物标志物

中图分类号 R 73

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)12-2215-12

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.12.004

胃癌是全球五大常见肿瘤之一,尤其东亚人群的胃癌负担最重^[1],严重危害人类健康,大多患者被诊断时处于晚期,生存率低^[2],是癌症相关死亡的第三大原因^[3]。因此,探索新型诊断生物标志物与治疗靶点迫在眉睫。铁死亡是由脂质过氧化物在细胞膜上的过量积累引发的铁依赖性细胞死亡形式^[4],其具体机制是谷胱甘肽过氧化物酶 4 活性的丧失,导致脂质活性氧的积累,特别是脂质氢过氧化物的增加^[5]。目前部分铁死亡相关基因(ferroptosis-related genes,FRGs)被证明与胃癌相关^[6-8]。因此,FRGs 与胃癌预后的关系需要进一步研究。该研究基于 TCGA 数据库,使用差异表达的 FRGs 开发预后模型并通过基因集富集分析和免疫浸润分析进一步探讨 FRGs 在胃癌中的作用机制,初步验证羟基羧酸受体 1(hydroxycarboxylic acid receptor 1,

HCAR1)在体外对胃癌的影响,为胃癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 数据来源 从 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/repository>)下载 404 例样本(包括 32 例正常样本和 372 例肿瘤样本)的转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-Seq)数据以及相应的临床特征,再将 Ensembl ID 转换为官方基因符号,并对数据进行 $\log_2(\text{表达量} + 1)$ 处理。从基 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE84433>)中选择 GSE84437 公共基因表达数据集,下载 357 例肿瘤样本的 RNA-Seq 数据以及相应的临床特征,再使用 GPL6947 芯片将芯片基因符号转换为官方基因符号。见表 1。

1.1.2 铁死亡相关基因的来源 FRGs 相关基因是从 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/index.html>)中下载,其中包含 483 个经过验证的 FRGs。

1.1.3 组织样本 8 对胃癌组织样本和癌旁组织均来自安徽医科大学第一附属医院北区病理科,并且经过安徽医科大学第一附属医院北区医学伦理委

2025-08-21 接收

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:82203866);国家自然科学基金基金孵育计划项目(编号:2023GMFY02);安徽省教育厅重点项目(编号:2024AH050802);安徽省转化医学研究所重点项目(编号:2022zhyx-B08);安徽医科大学“早期接触科研”项目(编号:2023-ZQKY-114)

作者简介:张 钊,男,硕士研究生;

王文斌,男,主任医师,博士生导师,通信作者,E-mail: ni-hao22009256@163.com

表1 TCGA 和 GEO 数据库中的患者临床信息
Tab.1 Clinical information of patients in TCGA and GEO databases

Clinical feature	Total patients (n = 729)		TCGA (n = 372)		GSE84437 (n = 357)	
	Number	Percentage (%)	Number	Percentage (%)	Number	Percentage (%)
Age (years)						
≤65	292	40.05	164	44.09	128	35.85
>65	434	59.53	205	55.11	229	64.15
Unknown	3	0.41	3	0.81	0	0
Gender						
Female	248	34.02	133	35.75	115	32.21
Male	481	65.98	239	64.25	242	67.79
Status						
Alive	434	59.53	251	67.47	183	51.26
Dead	295	40.47	121	32.53	174	48.74
Stage						
1 - 2	161	22.09	161	43.28	0	0
3 - 4	188	25.79	188	50.54	0	0
Unknown	380	52.13	23	6.18	357	100.00
T						
T1 - T2	143	19.62	97	26.08	46	12.89
T3 - T4	578	79.29	267	71.77	311	87.11
TX	8	1.09	8	2.15	0	0
N						
N0 - N1	431	59.12	205	55.11	226	63.31
N2 - N3	280	38.41	149	40.05	131	36.69
NX	16	2.19	16	4.30	0	0
Unknown	2	0.27	2	0.54	0	0

员会批准(批准号:PJ-YX2025-018),并获得患者的知情同意。

1.1.4 胃癌细胞系 人胃癌细胞系(AGS 和 MKN-28)购自美国典型培养物保藏中心。

1.1.5 主要试剂与仪器 PRMI 1640 培养基、10%胎牛血清和 Lipofectamine 2000(货号:C22400500 BT、A5670801、2536760)购自赛默飞世尔科技(上海)有限公司;青-链霉素溶液和噻唑兰(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂(货号:C0222、C0009S)购自上海碧云天生物技术有限公司;RNA isolater、cDNA 合成试剂盒(货号:R401-01、R323-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;SYBR qPCR 预混液(货号:22204)购自上海吐露港生物科技有限公司;RT-qPCR 引物和 siRNA 均由通用生物(安徽)股份有限公司合成。酶标仪(型号:Multiskan FC)购自赛默飞世尔科技(上海)有限公司;离心机(型号:Z 216 MK)购自德国 HERMLE 公司;倒置显微镜(型号:CKX53)购自日本奥林巴斯株式会社。

1.2 方法

1.2.1 差异表达分析 “DESeqs”包被用于筛选胃癌和癌旁组织样本之间基因的表达^[9]。差异表达

基因(differentially expressed genes, DEGs)的筛选的标准是 $|\log_2(FC)| > 1$ 和 $P_{\text{adjust}} < 0.05$ 。

1.2.2 共表达网络的构建 为了证明差异表达 FRGs 之间的相互作用情况,使用 Cytoscape 软件(版本号 3.10.2, <http://www.cytoscape.org/>) 构建共表达网络。

1.2.3 铁死亡相关预后特征的构建 将 DEGs 与 FRGs 的交集作为预后候选基因。再对这些预后候选基因应用 LASSO-Cox 回归分析^[10]。最后,通过选择与最小 10 倍交叉验证相关的最佳惩罚参数 λ , 建立最佳预后模型。随后基于“GSVA”包根据每个样本中关键基因的表达量来计算每个样本的风险评分。根据风险评分的中位数,将训练队列中的患者分为低风险组和高风险组。通过使用“survminer”包比较高低风险组之间的总生存期(overall survival, OS)并生成了 Kaplan-Meier 曲线。为了评估预测模型的预测准确性生成 ROC 曲线^[11]。为了评估模型的可行性,使用 GSE84433 作为测试组来验证从 TCGA 数据库中得到的预后模型,对 GSE84433 使用 TCGA 数据库中相同公式计算风险评分,同时执行相同的验证方法。

1.2.4 功能富集分析 使用“clusterProfiler”包对

筛选出的铁死亡相关预后候选基因进行京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路和基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析^[12]。基因富集分析包括 3 个 GO 术语, 即生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cell component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。选择具有统计学意义的基因和信号通路。

1.2.5 免疫细胞浸润与免疫微环境的评估 “ESTIMATE”包用于评估胃癌患者的免疫浸润情况^[13]。使用“CIBERSORT”包评估两组患者免疫细胞浸润的差异^[14]。“CIBERSORT”是一种分析工具, 基于基因表达数据估算免疫细胞的丰度。CIBERSORT 的 LM22 定义了从 CIBERSORT 官方网站 (<http://CIBERSORT.stanford.edu/>) 中获得的 22 个免疫细胞亚群。

1.2.6 胃癌细胞系培养 人胃癌细胞系 (AGS 和 MKN-28) 在完全 PRMI 1640 培养基中培养。完全 PRMI 1640 培养基是由 PRMI 1640 培养基、10% 胎牛血清和 1% 的青-链霉素溶液组成, 在 37 °C、5% CO₂ 的潮湿环境中培养。

1.2.7 RT-qPCR 检测 使用 RNA isolater 根据标准方案从组织或细胞系中提取总细胞和组织 RNA。再将获得的 RNA 用于使用 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。使用 SYBR qPCR 预混液定量基因表达, 并使用 2^{-ΔΔC_T} 方法计算表达水平, 其中充当标准化的内部参考 β-actin。用于 RT-qPCR 检测的所有引物均由通用生物 (安徽) 股份有限公司合成, 相关的引物序列见表 2。

1.2.8 siRNA 转染 将处于对数生长期的胃癌细胞接种在 6 孔板中。当融合度到达 70% 时, 使用 Lipofectamine® 2000 转染 siRNA^[15], NC 组转染 siRNA 的阴性对照, siRNA 组转染相应 siRNA。细胞培养 24 h 后用于后续细胞功能实验。使用 siRNA 序列见表 3。

1.2.9 细胞增殖与转移测定 使用 MTT 测定来检测细胞增殖情况^[16]。将原始细胞数 1 000 的细胞接种到 96 孔板中, 在第 1、3、5 天分别检测细胞活力。同时, 为了检测细胞转移情况^[17], 进行了细胞迁移、侵袭和划痕实验。细胞迁移实验: 将饥饿 12 h 的细胞密度调整为 2 × 10⁴ 个/孔, 每个小室中加入 200 μL 细胞悬液。小室下面添加完全培养基 500 μL, 培养箱培养 24 h。取出小室 PBS 洗 2 次, 500 μL 4% 多聚甲醛固定 30 min。清洗干净后用 1% 结晶紫避光染色 15 min 后洗 2 次。用棉签将小室内未迁移细胞擦去, 放在显微镜下拍照, ImageJ 软件进行细胞计数。细胞侵袭实验: 在小室内铺上 100 μL 稀释后的基质胶, 培养箱中放置凝固后, 同细胞迁移实验步骤进行实验、拍照和计数。细胞划痕实验: 接种于 6 孔板的细胞汇合度至 80% 时, 200 μL 枪头在孔内划一条垂直划痕。培养箱培养 0 h 和 48 h 后显微镜下拍照。迁移率 = (0 h 划痕面积 - 培养后划痕面积) / 0 h 划痕面积 × 100%。

1.3 统计学处理 Wilcoxon 检验用于比较肿瘤浸润免疫细胞的比例以及胃癌组织和癌旁组织的基因表达。采用 Spearman 相关分析探究关键基因和免疫细胞之间的相关性。进行单因素 Cox 回归分析和多因素 Cox 回归分析确定 OS 的独立预后因素。通

表 2 引物序列

Tab.2 Primer sequences

Primer	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
AKR1C2	AAGTAAAGCTCTAGAGGCCGT	CTCTGGTCGATGGGAATTGCT
HCAR1	CACCAGGAGGGAGGACAAAC	CGTAGAGGAGCGATTGGGTC
ALOX12	GAGGAATTTTGATAAGGCAGTG	CCCGACGGAGCAACTGTA
CPEB1	TGTCTCTCCAAAGGGTATGTG	TGGGCTCCGGACAAAGTTAC
DUOX1	CGACATTGAGACTGAGTTGA	CTGGAATGACGTTACCTTCT
MYB	GGCGAGCCCTTGCA	CTCCTCCATCTTTCCACAGGAT
β-actin	TCTCCAAGTCCACACAGG	GGCACGAAGGCTCATCA

表 3 siRNA 序列

Tab.3 siRNA sequences

siRNA	Sense	Antisense
siHCAR1 #1	AGACGUAGACACUGGGCUUTT	AAGCCCAGUGUCUACGUCUTT
siHCAR1 #2	UCAUCAUGGUGUGGCAAUTT	AUUGCCACCACCAUGAUGATT

过进行时间依赖性 ROC 曲线分析来评估 OS 预后模型的预测准确性。方差分析用于 MTT 实验、RT-qPCR、细胞迁移、侵袭和划痕实验的组间比较。R 软件(4.10 版)应用于所有统计分析,“ggplot2”包用于图形可视化。统计学显著性定义为 $P < 0.05$, 所有 P 值均为双尾。

2 结果

2.1 胃癌患者中铁死亡相关差异表达基因的鉴定

本研究从 TCGA 数据库下载 404 例样品共有 19 604 个 mRNA, FerrDb 数据库中下载 483 个 FRGs。在正常组织和肿瘤组织之间的 TCGA-STAD 样本中鉴定了 2 637 个差异表达的 DEGs ($\log_2 |FC| > 1.5, P_{\text{adjust}} < 0.05$), 其中包括 1 230 个上调的基因和 1 407 个下调的基因。图 1A 中的火山图展示了差异表达情况。最后, 通过筛选出的 DEGs 与 FerrDb 数据库取交集, 确定 41 个与铁死亡相关的 DEGs (图 1B)。建立热图以显示这 41 个 FRGs 在胃癌组织和癌旁组织之间的表达 (图 1C)。为了进一步评估这些 FRGs 之间的关系, 建立基因共表达网络 (图 1D)。

2.2 FRGs 鉴定和功能富集分析 为了研究 41 个 FRGs 的生物学功能, 使用“clusterProfiler”包进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。这些关键基因富集在脂肪酸代谢过程、脂肪酸生物合成、不饱和脂肪酸的代谢及脂肪酸衍生物的代谢等生物过程 (图 1E)。同时, 关键基因主要与 NADPH 氧化酶复合物、氧化还原酶复合物、细胞质应激颗粒和脂滴等细胞成分相关 (图 1F)。此外, 这些关键基因还激活 aldo - 酮还原酶活性、结合胆汁酸以及激活 NADP^+ - 氧化还原酶活性 (图 1G)。41 个候选预后基因的 KEGG 通路分析显示, 这些关键基因富集在花生四烯酸代谢、流体剪切应力、动脉粥样硬化及化学致癌作用相关的活性氧以及 Apelin 信号通路 (图 1H)。

2.3 FRGs 预后模型的构建以及对患者预后的预测 为了检查这些 FRGs 的预后价值, 将 TCGA-STAD 数据库作为训练组, GSE84433 作为测试组。对训练集使用 LASSO-Cox 回归分析, 从 41 个 FRGs 中筛选出 6 个最佳预后相关基因。Cvfit 和 Lambda 曲线见图 2A、2B。进行 Cox 单变量和多变量回归分析, 以评估该特征的独立预测潜力。首先, 单变量 Cox 回归分析表明, T、M、N 分期及 Stage 与患者的

年龄可以作为预测 TCGA 数据库中胃癌患者预后的独立预后因素 (表 4)。此外, 多变量 Cox 回归分析显示, 胃癌患者的年龄与预后相关 (表 5)。预测列线图通过将多个相关因素的分数相加来计算这些患者的生存可能性。与理想列线图的 1、3 和 5 年生存率相比, 模型能够比较准确预测患者的 1、3 和 5 年生存率 ($C\text{-index} = 0.657, 95\% CI: 0.630 \sim 0.685$) (图 2C、2D)。

表 4 胃癌患者生存的单变量 Cox 回归分析

Tab. 4 Univariate Cox regression analysis of the survival of gastric cancer patients

Characteristic	HR (95% CI)	P value
Pathologic T stage		
T1 - T2	Reference	
T3	1.713 (1.103 - 2.660)	0.016
T4	1.729 (1.061 - 2.819)	0.028
Pathologic N stage		
N0	Reference	
N1	1.629 (1.001 - 2.649)	0.049
N2	1.655 (0.979 - 2.797)	0.060
N3	2.709 (1.669 - 4.396)	<0.001
Pathologic M stage		
M0	Reference	
M1	2.254 (1.295 - 3.924)	0.004
Gender		
Female	Reference	
Male	1.267 (0.891 - 1.804)	0.188
Age (years)		
≤65	Reference	
>65	1.620 (1.154 - 2.276)	0.005
Pathologic stage		
Stage I	Reference	
Stage II	1.551 (0.782 - 3.078)	0.209
Stage III	2.381 (1.256 - 4.515)	0.008
Stage IV	3.991 (1.944 - 8.192)	<0.001

随后, 评估了预后模型的预后价值, 根据风险评分的中位数将训练组样本分为高风险组和低风险组。将风险评分的分布和 OS 状态的分布可视化, 表明上述两个风险组的样本分布合理 (图 2E)。使用 Kaplan-Meier 生存分析显示高危组胃癌患者的 OS 率比低风险组差 (图 2F)。训练组生成了时间依赖性 ROC 曲线。ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 在 1、3 和 5 年均保持在 0.6 以上 (图 2G)。为了进一步评价这种预后模型的预测效果, 在验证组中对分布图、热图、Kaplan-Meier 生存分析和时间依赖性 ROC 分析进行了双重验证。上述两个风险组的样本也合理分布在验证组 (图 2H - 2J)。

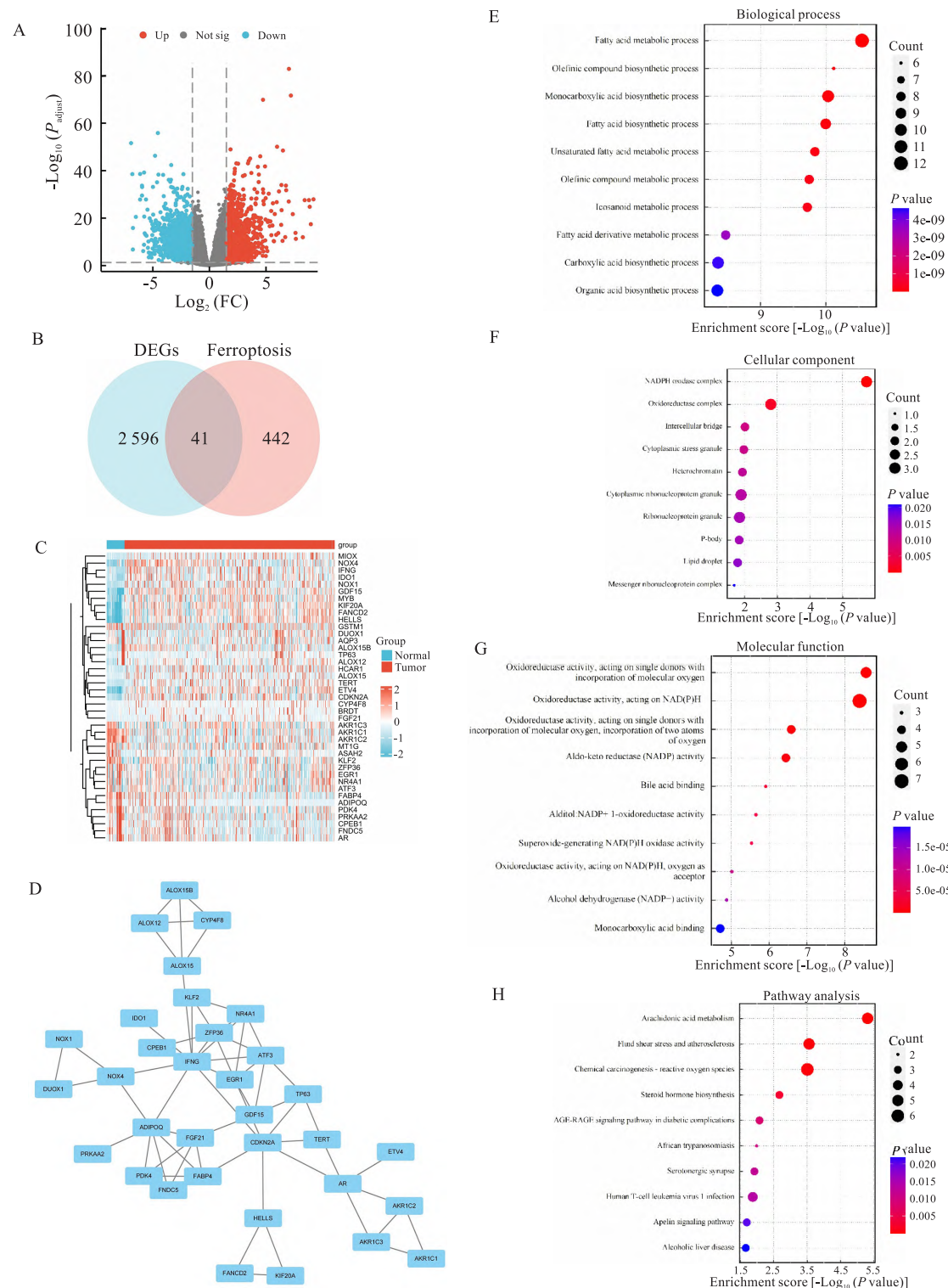


图1 差异表达铁死亡相关基因的筛选和功能富集分析

Fig.1 Screening and functional enrichment analysis of differentially expressed ferroptosis-related genes

A: Volcano diagram of differentially expressed genes in gastric cancer; B: Venn diagram of differentially expressed genes and ferroptosis genes; C: Expression heatmap of ferroptosis-related differentially expressed genes in tumors and normal tissues; D: Co-expression network of ferroptosis-related differentially expressed genes; E: BP terminology for ferroptosis-related differentially expressed gene enrichment; F: CC terminology for ferroptosis-related differentially expressed gene enrichment; G: MF term for ferroptosis-related differentially expressed gene enrichment; H: KEGG pathway for ferroptosis-related differentially expressed gene enrichment.

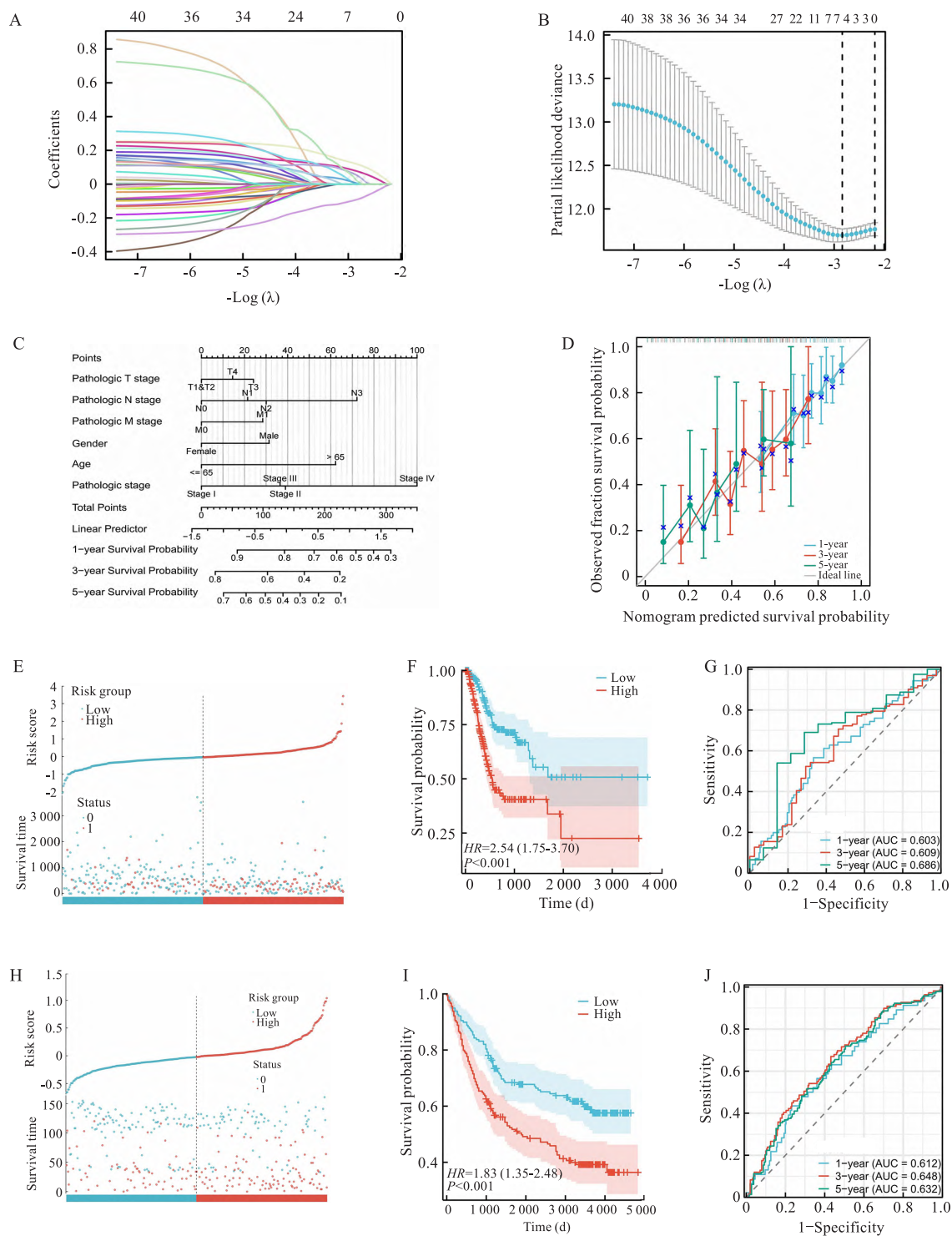


图2 构建铁死亡相关预后模型和预后潜力分析

Fig.2 Construction of a ferroptosis-related prognostic model and analysis of its prognostic potential

A: Minimum absolute shrinkage cross-validation fit curve; B: Minimum absolute shrinkage lambda curve; C: Nomogram predicting 1-, 3-, and 5-year overall survival of gastric cancer patients; D: Calibration curve for assessing the accuracy of the nomogram model, with the grey diagonal dashed line representing the ideal nomogram; E: Distribution of risk scores and the overall survival status along with risk scores in the TCGA database; F: Kaplan-Meier curve of survival status and survival time in the TCGA database; G: ROC curve of the ferroptosis gene model for 1-, 3-, and 5-year OS in TCGA database patients; H: Distribution of risk scores and the overall survival status along with risk scores in the GSE84433 database; I: Kaplan-Meier curve of survival status and survival time in the GSE84433 database; J: ROC curve of the ferroptosis gene model for 1-, 3-, and 5-year OS in GSE84433 database patients.

表 5 胃癌患者生存的多变量 Cox 回归分析

Tab.5 Multivariate Cox regression analysis of the survival of gastric cancer patients

Characteristic	HR (95% CI)	P value
Pathologic T stage		
T1 – T2	Reference	
T3	1.257 (0.652 – 2.425)	0.495
T4	1.090 (0.520 – 2.286)	0.820
Pathologic N stage		
N0	Reference	
N1	1.225 (0.618 – 2.427)	0.561
N2	1.335 (0.575 – 3.098)	0.501
N3	1.976 (0.849 – 4.597)	0.114
Pathologic M stage		
M0	Reference	
M1	1.196 (0.499 – 2.866)	0.688
Age (years)		
≤65	Reference	
>65	1.811 (1.247 – 2.630)	0.002
Pathologic stage		
Stage I	Reference	
Stage II	1.443 (0.535 – 3.896)	0.469
Stage III	1.474 (0.394 – 5.510)	0.565
Stage IV	2.973 (0.775 – 11.408)	0.112

高风险人群的病死率高于低风险人群。

2.4 胃癌患者预后模型与临床病理特征为负相关关系 模型中的 5 个基因被认为是风险基因,它们在 TCGA-STAD 数据库的高危组中上调。只有 MYB 是一种保护性基因,在高危组中下调(图 3A)。比较两个风险亚组之间的临床病理特征差异(图 3A)。上述临床特征也分别在图 3B – 3D 中进行了比较。患者的年龄越大,风险越高。Stage IV 期患者的危险评分明显高于 Stage I 期患者。与低风险组相比,高风险组患者在 TMN 分期中的 N 期更晚。结果表明,这种预后模型通过相关基因表达水平评估胃癌患者的风险评分,在预测胃癌患者的预后方面具有突出的潜力。

2.5 基于预后特征的胃癌患者的免疫相关分析

为了进一步探讨胃癌患者预后模型与免疫微环境之间的关系,使用“CIBERSORT”包确定所有胃癌患者的免疫细胞浸润情况。22 种免疫细胞的比例如图 4A 所示。为了确定高危组和低危组之间浸润免疫细胞的差异,比较两组之间的基质评分、免疫评分和 ESTIMATE 评分。结果显示,高危组的基质评分和 ESTIMATE 评分显著高于低危组($P < 0.05$),但两组的免疫评分无明显差异(图 4C – 4E)。这一发现可能表明,在肿瘤进展过程中,基质细胞可能发挥

了潜在的促癌作用,值得进一步探索具体的基质细胞对肿瘤进展的影响。虽然整体的免疫评分在两组之间无明显差异,但幼稚 B 细胞、静息 CD4⁺ T 记忆细胞、M0 和 M1 巨噬细胞、滤泡辅助 T 细胞、调节 T 细胞、静息 NK 细胞、单核细胞、静息和激活的肥大细胞在两组之间存在显著差异(图 4B),这可能与胃癌预后差有关。此外,还分析了预后模型的 6 个基因与免疫细胞及其间的相关性(图 4F)。综上所述,胃癌患者的风险水平与免疫细胞浸润相关。

2.6 关键基因在组织样本验证以及体外功能实验验证 为了研究 6 个预后 DEGs 的相对基因表达差异,取患者的胃癌组织和癌旁组织。RT-qPCR 结果与 TCGA-STAD 数据集的分析一致(图 5A)。选择预后模型中贡献最大的基因以及在样品中表达差异最大的基因 HCAR1 进行体外功能验证。胃癌细胞系 AGS 和 MKN-28 被用于细胞功能验证。敲低胃癌细胞中 HCAR1 的表达,并使用 RT-qPCR 检测了细胞中 HCAR1 的表达水平(图 5B、5D)。MTT 实验表明,HCAR1 的沉默抑制了 2 种胃癌细胞的增殖(图 5C、5E)。此外,使用 Transwell 实验和划痕实验检测 HCAR1 对胃癌细胞迁移和侵袭的影响。结果显示,沉默 HCAR1 可以抑制胃癌细胞的迁移和侵袭(图 5F – 5K)。

3 讨论

目前,铁死亡及相关基因在癌症发生发展中的作用受到广泛关注。然而,在胃癌研究中,铁死亡对胃癌的作用及其具体机制仍不明确。本研究建立了新型铁死亡预后模型,以探讨铁死亡基因与患者预后的关联,为预测胃癌患者的预后及肿瘤的恶性程度提供建议。

本研究将铁死亡相关基因与 TCGA 数据库中胃癌患者的差异表达谱结合,使用 LASSO-COX 分析筛选出 6 个关键基因 (AKR1C2、HCAR1、DUOX1、ALOX12、MYB、CPEB1) 作为预后基因特征中的预测变量,以评估患者的预后。最后利用病理标本以及体外实验验证预测模型的准确性。

铁死亡是一种特殊的细胞程序性死亡,也被认为是一种免疫源性细胞死亡。这些铁死亡相关预后基因在肿瘤中发挥着重要作用。AKR1C2 是醛酮还原酶家族成员,可以调节类固醇激素,被报道激活胃癌及食管鳞状细胞癌中的 PI3K/AKT 信号通路,促

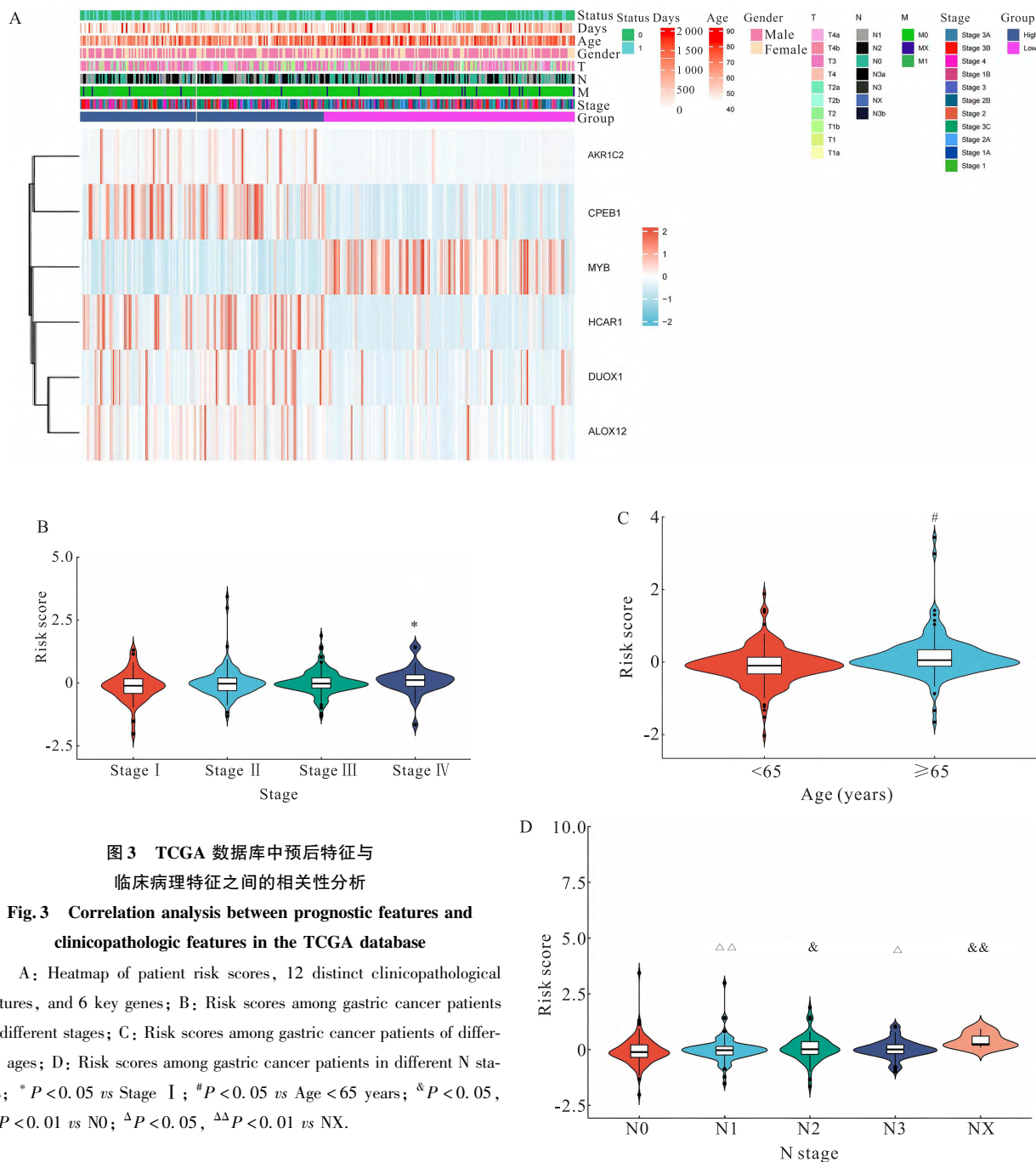


图3 TCGA 数据库中预后特征与临床病理特征之间的相关性分析

Fig.3 Correlation analysis between prognostic features and clinicopathologic features in the TCGA database

A: Heatmap of patient risk scores, 12 distinct clinicopathologic features, and 6 key genes; B: Risk scores among gastric cancer patients in different stages; C: Risk scores among gastric cancer patients of different ages; D: Risk scores among gastric cancer patients in different N stages; * $P < 0.05$ vs Stage I; # $P < 0.05$ vs Age < 65 years; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs N0; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs NX.

进食管癌的进展^[18]。HCAR1 为 G 蛋白偶联受体,与乳酸代谢息息相关。Zhao et al^[19] 研究表明 HCAR1 通过乳酸调节肿瘤中的铁死亡。DUOX1 是 NADPH 氧化酶家族的成员,在生成甲状腺过氧化物酶和乳过氧化物酶活性中发挥主要作用,作为关键因子影响肺癌的进展^[20]。ALOX12 来自脂氧合酶蛋白家族,主要负责催化花生四烯酸转化为 12-羟基二十碳四烯酸,在多发性骨髓瘤中能够抑制巨噬

细胞介导的化疗耐药^[21]。CPEB1 为 RNA 结合蛋白,调控 mRNA 的翻译和多腺苷酸化过程,被证明在乳腺癌中介导上皮间充质转化和转移^[22]。MYB 作为转录因子发挥作用,对于生长、分化和存活等关键细胞过程至关重要,其高表达与结直肠癌良好的预后相关^[23]。除此之外,铁死亡通过先天性和适应性免疫反应引起免疫抑制,从而促进肿瘤进展^[24]。其次,肿瘤的高基质评分与肿瘤患者的较差预后相

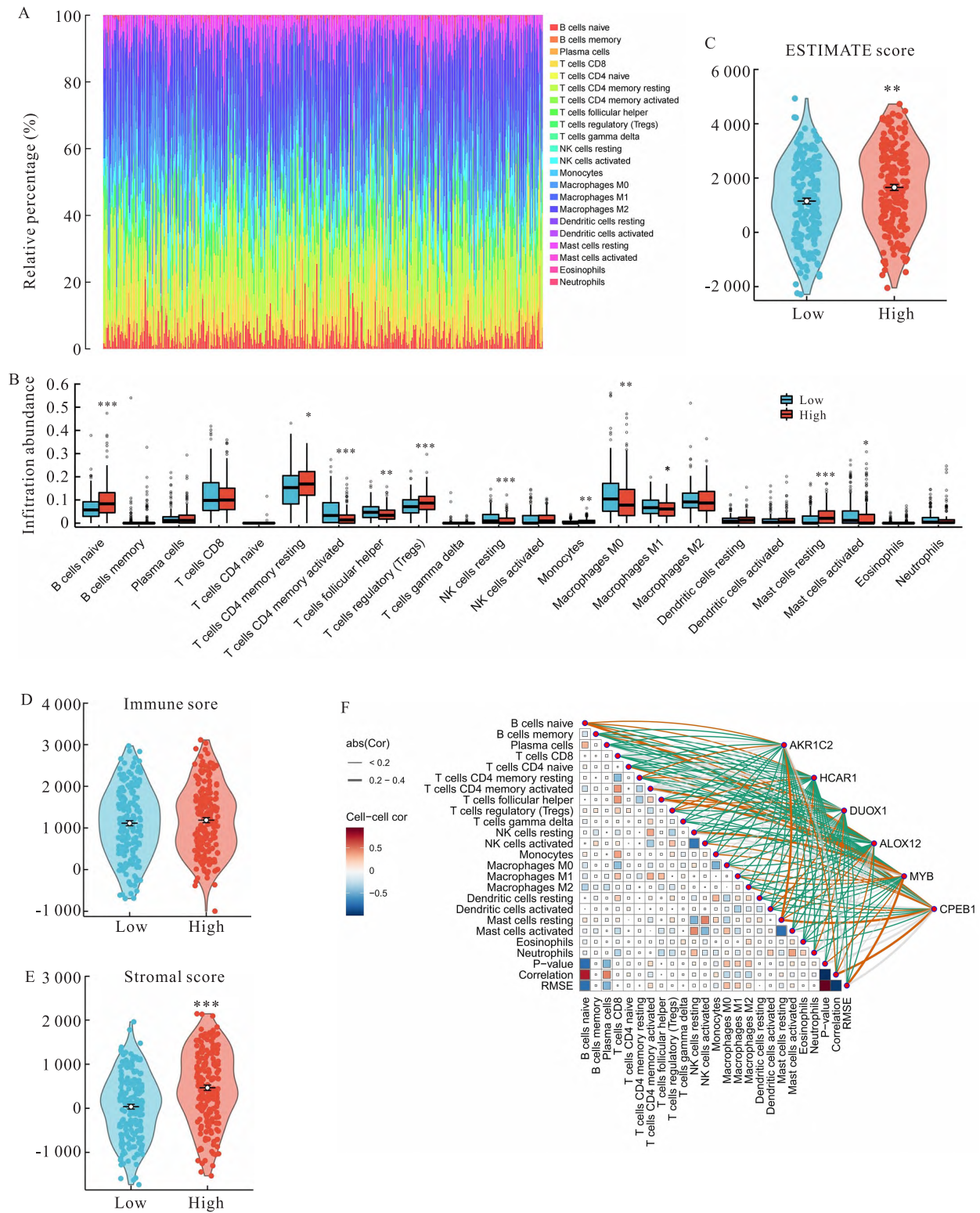


图4 胃癌患者免疫浸润情况分析

Fig.4 Analysis of immune invasion in gastric cancer patients

A: Distribution of immune cells associated with the ferroptosis-related gene prognostic model in tumor cells; B: Differences in 22 immune cells between high-risk and low-risk groups of gastric cancer patients; C: Comparison of ESTIMATE scores between high-risk and low-risk groups of gastric cancer patients; D: Comparison of immune scores between high-risk and low-risk groups of gastric cancer patients; E: Comparison of stromal scores between high-risk and low-risk groups of gastric cancer patients; F: Correlation analysis between key ferroptosis-related genes and immune cells, as well as among immune cells; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Low-risk group.

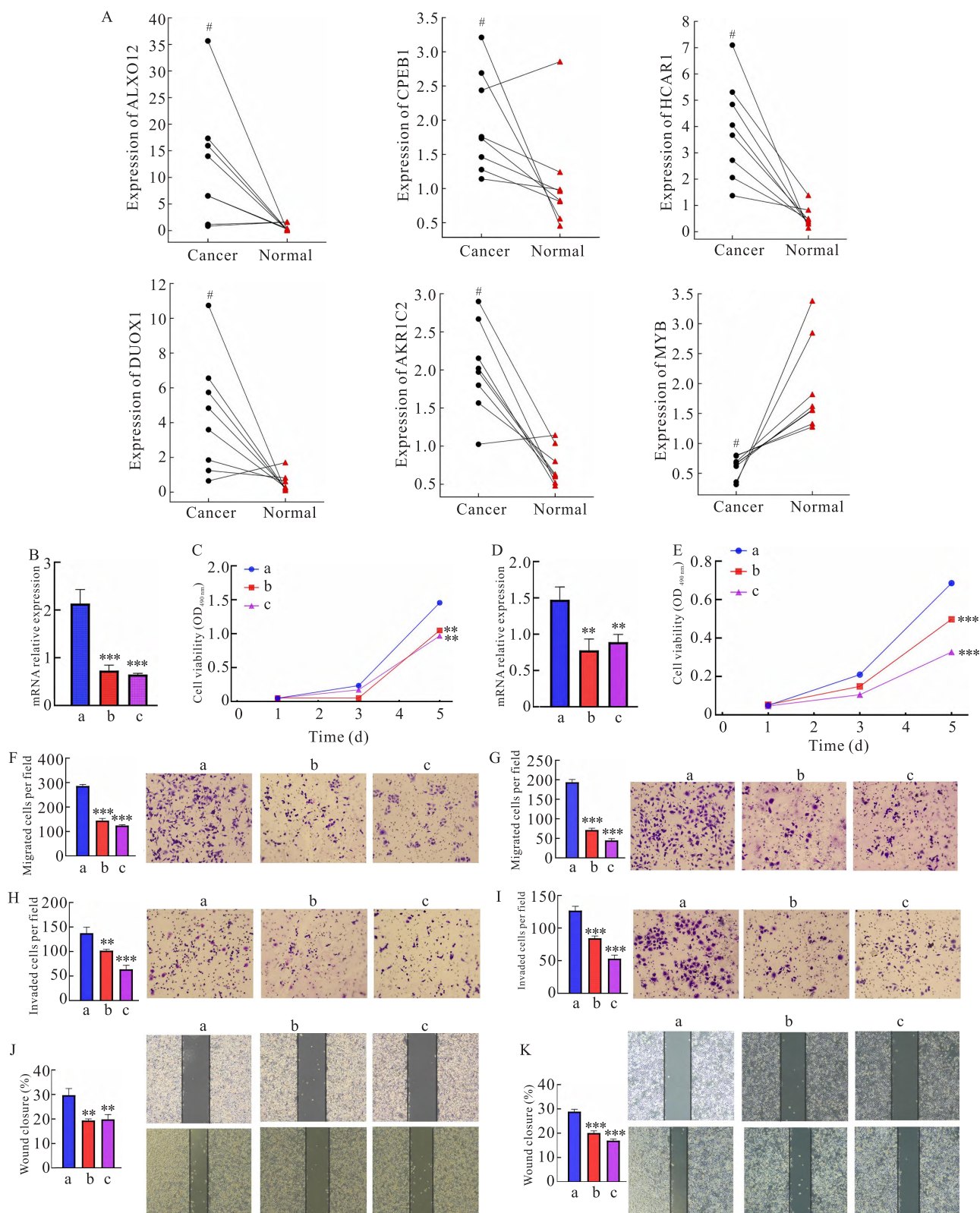


图5 6个关键基因在组织样品和HCARI的体外功能实验验证

Fig. 5 The expression level of six key genes in clinical tissue samples and the *in vitro* validation of function of HCARI

A: Expression differences of 6 key genes in 8 pairs of gastric cancer tissue samples; B: HCARI expression levels in AGS cell; C: MTT levels in AGS cell; D: HCARI expression levels in MKN-28 cell; E: MTT levels in MKN-28 cell; F: Migration levels in AGS cell; G: Migration levels in MKN-28 cell; H: Invasion levels in AGS cell; I: Invasion levels in MKN-28 cell; J: Wound healing levels in AGS cell; K: Wound healing levels in MKN-28 cell; a: si-NC group; b: si-HCAR1#1 group; c: si-HCAR1#2 group; # $P < 0.05$ vs Normal group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs si-NC group.

关^[25],这与本研究中基质和 ESTIMATE 评分在高低危中的分布基本一致。故认为铁死亡在癌症发展过程中发挥着重要作用,此过程中免疫浸润也充当重要角色。

本研究存在一定的局限性。首先,本研究的组织样本仅包括 8 个胃癌患者及其癌旁组织样本,更多的样本将有助于得出更可靠的结论;其次,本研究未对这些基因进行更深入的研究,也未探索这些基因在胃癌中的潜在机制。因此,有必要对这些基因进行更深入的研究,以明确它们如何通过铁死亡影响胃癌的进展。

综上所述,本研究构建的基于 FRGs 的模型对患者预后具有稳定的预测能力。同时,确定了预后模型与免疫浸润之间的关系,为未来铁死亡在胃癌中的研究提供了理论基础,为预测胃癌患者的预后提供新的见解,也为临床治疗实践提供新的靶点。

参考文献

- [1] López M J, Carbajal J, Alfaro A L, et al. Characteristics of gastric cancer around the world[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2023, 181: 103841. doi:10.1016/j.critrevonc.2022.103841.
- [2] Catalano V, Labianca R, Beretta G D, et al. Gastric cancer[J]. *Crit Rev Oncol*, 2009, 71(2): 127–64. doi:10.1016/j.critrevonc.2009.01.004.
- [3] Smyth E C, Nilsson M, Grabsch H I, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635–48. doi:10.1016/S0140-6736(20)31288-5.
- [4] Lei G, Zhuang L, Gan B. The roles of ferroptosis in cancer; tumor suppression, tumor microenvironment, and therapeutic interventions[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(4): 513–34. doi:10.1016/j.ccell.2024.03.011.
- [5] Yang W S, Stockwell B R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165–76. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.014.
- [6] Li D, Wang Y, Dong C, et al. CST1 inhibits ferroptosis and promotes gastric cancer metastasis by regulating GPX4 protein stability via OTUB1[J]. *Oncogene*, 2023, 42(2): 83–98. doi:10.1038/s41388-022-02537-x.
- [7] Ouyang S, Li H, Lou L, et al. Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer[J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102317. doi:10.1016/j.redox.2022.102317.
- [8] Yang Z, Zou S, Zhang Y, et al. ACTL6A protects gastric cancer cells against ferroptosis through induction of glutathione synthesis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4193. doi:10.1038/s41467-023-39901-8.
- [9] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- [10] Wang Z, Cheng S, Liu Y, et al. Gene signature and prognostic value of ubiquitination-related genes in endometrial cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2023, 21(1): 3. doi:10.1186/s12957-022-02875-w.
- [11] Kamarudin A N, Cox T, Kolamunnage-Dona R. Time-dependent ROC curve analysis in medical research: current methods and applications[J]. *BMC Med Res Methodol*, 2017, 17(1): 53. doi:10.1186/s12874-017-0332-6.
- [12] Yu G, Wang L G, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284–7. doi:10.1089/omi.2011.0118.
- [13] Li T, Fan J, Wang B, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): e108–10. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0307.
- [14] Chen B, Khodadoust M S, Liu C L, et al. Profiling tumor infiltrating immune cells with CIBERSORT[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1711: 243–59. doi:10.1007/978-1-4939-7493-1_12.
- [15] Ding K, Yuan Y, Chong Q Y, et al. Autocrine prolactin stimulates endometrial carcinoma growth and metastasis and reduces sensitivity to chemotherapy[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(6): 1595–611. doi:10.1210/en.2016-1903.
- [16] Li G, Wu X, Qian W, et al. CCAR1 5' UTR as a natural miR-1254 overrides tamoxifen resistance[J]. *Cell Res*, 2016, 26(6): 655–73. doi:10.1038/cr.2016.32.
- [17] Ding K, Tan S, Huang X, et al. GSE1 predicts poor survival outcome in gastric cancer patients by SLC7A5 enhancement of tumor growth and metastasis[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(11): 3949–64. doi:10.1074/jbc.RA117.001103.
- [18] Zhang Z F, Huang T J, Zhang X K, et al. AKR1C2 acts as a targetable oncogene in esophageal squamous cell carcinoma via activating PI3K/AKT signaling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 9999–10012. doi:10.1111/jcmm.15604.
- [19] Zhao Y, Li M, Yao X, et al. HCAR1/MCT1 regulates tumor ferroptosis through the lactate-mediated AMPK-SCD1 activity and its therapeutic implications[J]. *Cell Rep*, 2020, 33(10): 108487. doi:10.1016/j.celrep.2020.108487.
- [20] Little A C, Sham D, Hristova M, et al. DUOX1 silencing in lung cancer promotes EMT, cancer stem cell characteristics and invasive properties[J]. *Oncogenesis*, 2016, 5(10): e261. doi:10.1038/oncsis.2016.61.
- [21] Dong H, Chen J, Zhang H, et al. Palmitic acid inhibits macrophage-mediated chemotherapy resistance in multiple myeloma via ALOX12 signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 143(Pt 1): 113320. doi:10.1016/j.intimp.2024.113320.
- [22] Nagaoka K, Fujii K, Zhang H, et al. CPEB1 mediates epithelial-to-mesenchyme transition and breast cancer metastasis[J]. *Oncogene*, 2016, 35(22): 2893–901. doi:10.1038/onc.2015.350.
- [23] Tichy M, Knopfová L, Jarkovsky J, et al. High c-myc expression

- associates with good prognosis in colorectal carcinoma[J]. J Cancer, 2019, 10(6): 1393–7. doi:10.7150/jca.29530.
- [24] Kim R, Taylor D, Vonderheide R H, et al. Ferroptosis of immune cells in the tumor microenvironment[J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(8): 542–52. doi:10.1016/j.tips.2023.06.005.
- [25] Deng X, Lin D, Zhang X, et al. Profiles of immune-related genes and immune cell infiltration in the tumor microenvironment of diffuse lower-grade gliomas[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(10): 7321–31. doi:10.1002/jcp.29633.

Prognostic model of ferroptosis-related genes in gastric cancer and experimental validation

Zhang Zhao^{1,2}, Tian Hongjun³, Ding Keshuo^{4,5}, Zhu Yong⁵, Lin Feng², Yang Sijia³, Wang Wenbin^{1,2,3}

(¹Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Anhui Provincial Public Health Clinical Center, Hefei 230011; ³Dept of General Surgery,

The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ⁴Dept of Pathology,

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

⁵School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To identify ferroptosis-related genes associated with gastric cancer prognosis and investigate their potential molecular functions. **Methods** Gene expression profiles and clinical information of gastric cancer tissues and adjacent normal tissues were obtained from TCGA database. Differential expression analysis of ferroptosis-related genes was performed using the "DESeq2" package in R software. Key genes were identified and a prognostic model for gastric cancer was constructed through Cox regression analysis based on the LASSO algorithm. Patients were stratified into high-risk and low-risk groups according to the median risk score. The accuracy of the model was evaluated using Kaplan-Meier survival analysis and ROC curve analysis. Immune cell infiltration in gastric cancer patients was assessed with the "CIBERSORT" package. The mRNA expression of differentially expressed genes (DEGs) with prognostic significance was examined in both gastric cancer and adjacent normal tissue samples. *In vitro* experiments were conducted to validate the impact of hydroxycarboxylic acid receptor 1 (HCAR1) on the malignant biological behavior of gastric cancer. **Results** Based on ferroptosis-related genes from the TCGA database, a novel prognostic model was constructed. It demonstrated robust predictive power for survival in both training and validation cohorts. RT-qPCR analysis of 8 pairs of gastric cancer and normal tissues revealed that the expression patterns of 6 prognostic DEGs in cancer tissues were consistent with those predicted by the model. *In vitro* experiments confirmed that downregulation of the key gene HCAR1 could inhibit the proliferation, invasion, and metastasis of gastric cancer cells. **Conclusion** The ferroptosis-related gene based prognostic model exhibits robust predictive capability, allowing for accurate determination of prognosis and survival in individuals with gastric cancer.

Key words gastric cancer; ferroptosis-related genes; TCGA database; prognostic model; immune microenvironment; biomarkers

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82203866); Incubation Program of National Natural Science Foundation of China (No. 2023GMFY02); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2024AH050802); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2022zhxy-B08); "Early Exposure to Research" Training Program for Clinical Medicine at Anhui Medical University (No. 2023-ZQKY-114)

Corresponding author Wang Wenbin, E-mail: nihao22009256@163.com