

铁死亡基因 NOX4、PDK4、PRKAA2、FABP4 在胃腺癌预后中的价值

刘勤敏¹ (通讯作者) 罗永进² 刘少强¹

1 赣南医科大学第一附属医院医学影像科, 江西赣州, 341000;

2 安远县人民医院 CT/MR 室, 江西安远, 342100;

摘要: 目的: 通过分析胃腺癌的 RNA-seq 和临床数据以及铁死亡相关基因数据来筛选胃腺癌潜在的治疗靶点或预后基因。方法: 从癌症基因组图谱 (Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库下载 RNA 测序 (RNA-seq) 数据和临床数据, 从 FerrDb V2 网站下载铁死亡相关基因数据。使用 R 软件对下载的数据进行生物信息学和统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果: 我们一共筛选出 1384 个差异表达基因, 其中包括 24 个与铁死亡相关的差异表达基因。在这 24 个基因中, 我们进一步筛选了与生存预后相关的四个关键基因: NOX2、PRKAA2、FABP4 和 PDK4。通过单基因生存分析和 Cox 回归分析, 我们发现 NOX2、PRKAA2、FABP4 和 PDK4 低表达的 STAD 患者的生存时间明显更长, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 我们筛选出了 4 个与胃腺癌预后有关的铁死亡相关差异表达基因, 这 4 个基因有可能成为胃腺癌治疗的靶点。

关键词: 胃腺癌; 差异表达基因; 铁死亡; 预后

DOI: 10.69979/3029-2808.25.10.012

引言

胃腺癌 (Stomach adenocarcinoma, STAD) 是一种起源于胃黏膜上皮细胞的恶性肿瘤, 其病理类型存在异质性。1965 年, P. Lauren 根据肿瘤是否伴有肠上皮化生, 将 STAD 分为肠型和弥漫型 (1)。根据世界卫生组织 (the World Health Organization, WHO) 2019 年发布的第 5 版分类系统, STAD 最常见的病理学类型包括管状腺癌、乳头状腺癌、低黏附型癌、黏液腺癌及混合型腺癌 (2)。据国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 2024 年发布的数据, 虽然 STAD 的发病率远低于肺癌 (11.7%), 但其依然是全球癌症相关死亡的第五位致死癌种 (3, 4)。STAD 的发病与幽门螺杆菌感染、遗传因素、环境因素、膳食因素等多重因素相关, 尽管在过去五十年全球 STAD 的发病率持续下降, 但其全球 5 年生存率仍保留在 25-30% 的低水平, 其预后不良构成了严重的公共卫生负担 (5)。因此, STAD 的诊断、治疗及预后在全球仍面临着严峻的挑战。

铁死亡 (Ferroptosis) 是一种铁依赖性、非凋亡性的程序性细胞死亡形式, 由哥伦比亚大学 Brent R. Stockwell 教授团队于 2012 年首次提出 (6)。铁死亡是

一种铁依赖性、受调控的、独特的细胞死亡模式, 该过程由脂质过氧化介导, 引起细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 大量蓄积, 最终通过级联放大效应导致细胞死亡 (7)。大量研究表明, 铁死亡与肿瘤的抑制或进展存在着显著相关。例如, Ma 等学者发现, CD36 表达上调的 CD8+T 细胞通过摄取过量多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 促进铁死亡发生, 导致其丧失肿瘤免疫监视功能, 从而导致肿瘤进展加速 (8)。Wang 等学者提出, 活化的 CD8+T 细胞通过分泌干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 下调胱氨酸/谷氨酸逆向转运体系统 (System Xc⁻) 的关键亚基 SLC3A2 与 SLC7A11 的表达, 进而增强肿瘤细胞的脂质过氧化水平, 最终诱导铁死亡并抑制肿瘤生长进程 (9)。这些研究都证实铁死亡在肿瘤发生、发展及治疗抵抗中均发挥关键调控作用。

STAD 细胞可通过上调谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Glutathione peroxidase 4, GPX4) 来逃逸铁死亡, 进而促进肿瘤进展; 而通过基因敲除 GPX4 或药物抑制铁死亡抵抗, 可显著抑制肿瘤增殖并延缓转移进程 (10)。HCP5 基因编码的微蛋白 HCP5-132aa 通过增强 RNA 结合蛋白 YBX1 与 ELAVL1 的互相作用, 维持 SLC7A11 的表达水平,

进而抑制铁死亡并驱动 STAD 细胞的增殖与转移(11)。上述研究表明,针对 STAD 中铁死亡相关基因的探索,不仅能发掘新的潜在治疗靶点,还可作为 STAD 预后评估的生物标志物,为优化临床诊疗策略及改善患者预后提供重要价值。

1 材料与方法

1.1 数据获取和处理

本研究于 2024 年 8 月 31 日从 TCGA 官网(<https://portal.gdc.cancer.gov>)获取 379 例 STAD 样本及 34 例正常组织的 RNA 测序图谱与临床数据,并基于 GTF 注释文件将 Ensembl 基因 ID 转换为标准基因符号。通过 FerrDb V2 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>)筛选出 717 个铁死亡相关基因,含 369 个驱动基因与 348 个抑制基因。数据分析采用 R 软件(4.4.0 版)及在线分析平台完成。

1.2 筛选差异表达基因

本研究采用 R 软件进行样本数据预处理,通过'Limma'程序包筛选 DEGs。设定阈值标准为 P 值 <0.01 且错误发现率(false discovery rate, FDR) <0.01 ,并以 $|\log_2\text{FC}|>2$ 及校正后 $P<0.01$ 作为显著差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的筛选条件。利用火山图实现差异基因可视化表达,进一步取 DEGs 与铁死亡基因的交集筛选铁死亡相关 DEGs,并通过韦恩图展示交集基因分布。

1.3 铁死亡相关 DEGs 的功能富集分析

利用热图对铁死亡相关 DEGs 进行可视化,利用 R 软件进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析,利用“微生信”在线网站(<https://www.bioinformatics.com.cn>)对铁死亡相关 DEGs 进行基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析,包括生物过程(biological process, BP),细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)。P <0.05 为差异有统计学意义。

1.4 蛋白-蛋白互作(Protein-protein interaction, PPI)网络分析及关键基因筛选

采用蛋白质-蛋白质相互作用检索工具 STRING(网

址: <http://string-db.org>, 12.0 版本)对 PPI 网络进行预测,利用 Cytoscape 软件(3.10.2 版本)筛选关键基因。在此研究中,我们根据节点得分选取了排名前十的基因作为关键基因。

1.5 单基因生存分析、Cox 回归分析并构建预后模型

对筛选出来的关键基因进行单基因生存分析, P <0.05 为差异有统计学意义。随后,利用“微生信”在线网站,选取具有统计学显著性的基因进行 Cox 回归分析,并绘制森林图。

1.6 统计学分析

本研究所有统计分析均采用 R 软件及专业在线工具完成, P <0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异表达基因

对微阵列数据结果实施标准化处理后,采用 Limma 程序包筛选出 1384 个 DEGs,其中包含 503 个上调基因与 881 个下调基因(图 1)。随后将这 1384 个 DEGs 与我们预先下载的 717 个铁死亡基因取交集,最终筛选出 25 个铁死亡相关 DEGs。这 25 个基因中包含 5 个上调驱动基因、7 个上调抑制基因、2 个下调驱动基因及 11 个下调抑制基因(表 1)。值得注意的是,PRKAA2 重叠存在于下调驱动基因和下调抑制基因中。基于 FerrDb 网站的评分系统及进一步的 KEGG 通路富集分析,我们认为 PRKAA2 应当被归类为下调驱动基因。最终我们整理出 24 个铁死亡相关 DEGs,并通过热图直观展示其表达谱特征(图 2)。

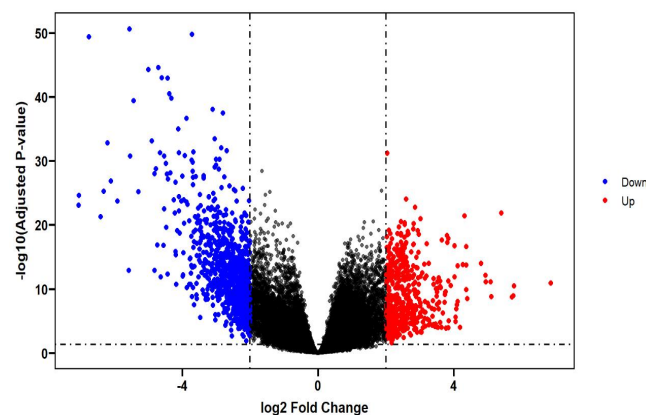


图 1 STAD 的 DEGs

表 1 铁死亡相关 DEGs

基因名	上调驱动基因	上调抑制基因	下调驱动基因	下调抑制基因
	NOX1, NOX4, MYB, IDO1, HOTAIR	HELLS, RRM2, GDF15, KIF20A, ETV4, TERT, LINC01833	PRKAA2, CPEB1	AKR1C1, AKR1C2, FND5, BEX1, ASA2, FABP4, SOX2, PDK4, ADIPOQ, GSTM1

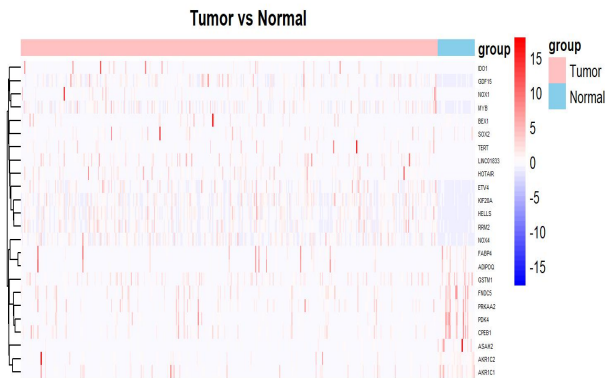


图 2 铁死亡相关 DEGs

2.2 铁死亡相关 DEGs 功能富集分析

通过 KEGG 通路分析发现，铁死亡相关 DEGs 主要富集于化学致癌-活性氧通路（图 3），且涵盖上调和下调基因。GO 分析结果显示：在 BP 中，铁死亡相关 DEGs 的变异显著富集于脂肪酸代谢过程、单羧酸生物合成过程、细胞酮体代谢过程等；CC 的变异显著富集于 NADPH 氧化酶复合物、氧化还原酶复合物、细胞间桥等；MF 的变异显著富集于氧化还原酶活性（作用于 NAD(P)H）、胆汁酸结合、单羧酸结合等（图 4）。

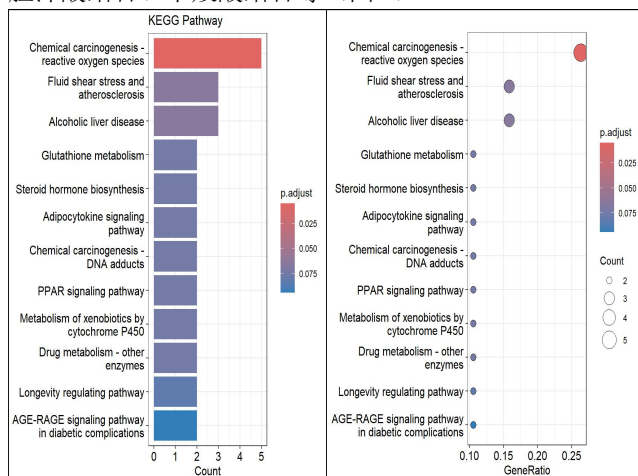


图 3 铁死亡相关 DEGs 的 KEGG 通路分析

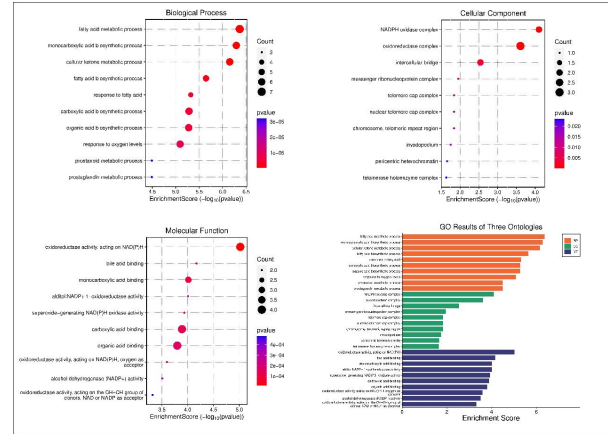


图 4 铁死亡相关 DEGs 的 GO 分析结果

2.3 PPI 网络分析及关键基因

基于 STRING 数据库构建了包含 24 个铁死亡相关 DEGs 的 PPI 网络，进而采用 Cytoscape 软件依据节点评分筛选出十大关键基因（图 5）。

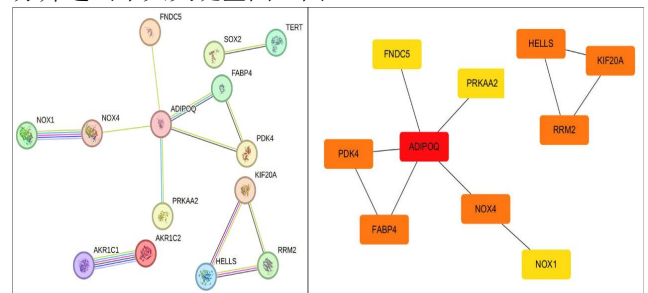


图 5 铁死亡相关 DEGs 的 PPI 网络分析及关键基因

2.4 单基因生存分析、Cox 回归分析及预后模型

对上述 10 个关键基因进行单基因生存分析后，最终筛选出四个具有统计学意义的关键基因：FABP4、NOX4、PDK4 及 PRKAA2 ($P < 0.05$)（图 6），进一步通过 Cox 回归分析发现，上述基因的风险比 (hazard ratio, HR) 均低于临界值 1（图 7）。

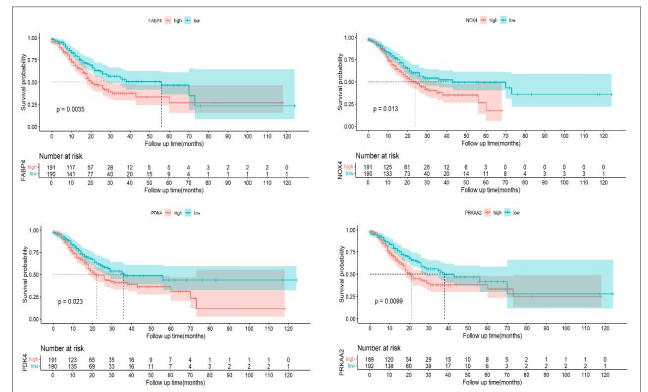


图 6 FABP4、NOX4、PDK4 及 PRKAA2 的单基因生存分析

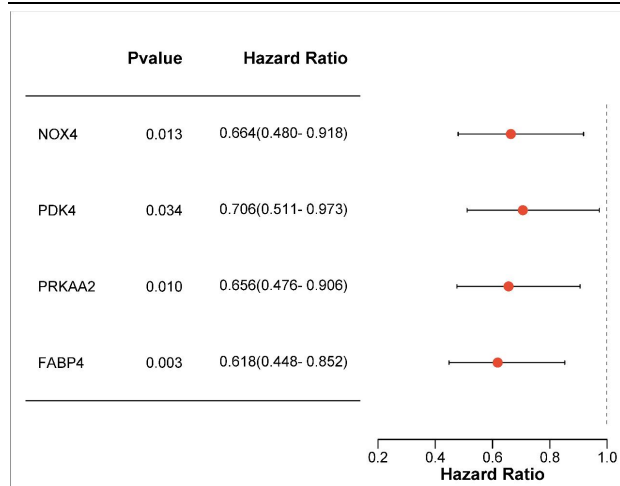


图7 FABP4、NOX4、PDK4 及 PRKAA2 的 Cox 回归分析

3 讨论

在过去的数年间,铁死亡作为一种细胞死亡模式受到广泛研究。在本研究中,我们对 STAD 组织中铁死亡相关 DEGs 进行了系统分析。NOX4 作为铁死亡驱动基因,在 STAD 组织中高表达,本研究这一发现与既往研究结果一致(12)。NOX4 作为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH)氧化酶家族成员,其主要功能是产生 ROS,这些 ROS 参与细胞内多种生理及病理过程,包括信号转导、血管生成、免疫应答和细胞死亡等,从而调控细胞代谢、增殖及凋亡进程(13)。在 STAD 中,NOX4 表达上调可能增强肿瘤细胞对铁死亡的敏感性并促进其发生(14)。然而本研究发现,NOX4 高表达并未延长患者生存期;相反,与低表达组相比,NOX4 高表达组患者生存时间显著缩短。笔者认为造成这种结果的原因主要是由于 NOX4 表达上调,通过调控肿瘤细胞代谢、增殖及迁移过程,最终促进胃腺癌 STAD 进展与恶化(15, 16)。

FABP4 和 PDK4 作为铁死亡抑制基因,在 STAD 组织中呈现较低的表达水平,与高表达组患者相比,FABP4 和 PDK4 低表达组患者表现出更长的生存时间。FABP4 是一种主要表达于脂肪细胞和巨噬细胞的脂肪酸结合蛋白,该蛋白通过调控脂肪酸代谢,参与多种脂质信号通路的系统性代谢调节,与多种疾病的发生发展密切相关(17, 18)。肿瘤微环境中肿瘤内皮细胞及脂肪细胞分泌的 FABP4 可诱导肿瘤细胞内脂滴蓄积,通过增强氧化应激抵抗能力进而抑制铁死亡发生,最终促进肿瘤进展(19)。因此,FABP4 低表达的 STAD 患者表现出更长的生存期。PDK4 作为铁死亡抑制基因,通过阻断丙酮酸脱

氢酶介导的丙酮酸氧化进入三羧酸循环及后续脂肪酸合成过程,从而抑制铁死亡的发生(20)。体外实验及高脂饮食诱导的糖尿病小鼠模型研究均表明,抑制 PDK4 可增强 System Xc⁻ 抑制剂的抗肿瘤活性,进而显著抑制肿瘤生长(20)。因此,与 PDK4 高表达患者相比,低表达患者的生存时间更长。

本研究发现的另一个关键基因 PRKAA2 引起了笔者的困惑:从 FerrDb V2 网站下载的数据显示,PRKAA2 同时具有铁死亡的驱动基因和抑制基因双重身份——其驱动基因 FerrDb 评分为 2,而抑制基因评分为 1。通过 DAVID 网站对 PRKAA2 进行的 KEGG 通路分析表明,该基因的肿瘤相关通路主要包括:PI3K-Akt 信号通路、mTOR 信号通路、Apelin 信号通路、FoxO 信号通路以及 AMPK 信号通路。前三条通路主要通过多种复杂机制促进肿瘤生长(21, 22),FoxO 信号通路则通过参与氧化应激相关通路诱导细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞生长(23)。然而,PRKAA2 在这四条通路中的直接作用尚不明确,其主要通过 AMPK 信号通路发挥间接调控作用。AMPK 信号通路的作用机制较为复杂,可通过抑制 mTOR 信号通路来遏制肿瘤细胞生长(24)。DAVID 通路分析表明,AMPK 信号通路还可通过磷酸化作用合成 eNOS,催化 L-精氨酸生成一氧化氮,最终产生 ROS 并导致细胞死亡。另一方面,AMPK 亦可发挥致癌基因作用,促进肿瘤细胞增殖(25)。PRKAA2 基因编码的蛋白质是 AMPK 的 $\alpha 2$ 催化亚基(26),该亚基参与 AMPK 信号通路中的多种调控机制,包括促进铁死亡过程(27)。因此,本研究将 PRKAA2 归类为铁死亡驱动基因。基于单基因 Cox 回归分析,PRKAA2 基因在 STAD 组织中低表达的风险比小于 1,我们推测 AMPK 信号通路在 STAD 中的促肿瘤作用大于其抑制作用,因此,我们认为 PRKAA2 高表达促进肿瘤生长。

本研究存在以下局限性:(1)所有结论均基于生物信息学分析;(2)缺乏体外和体内实验数据的支持。后续将通过实验研究并结合其他生物标志物进一步验证本研究结果。

4 结论

本研究通过对 TCGA 数据库获取的 RNA-seq 数据及临床资料分析,筛选出 4 个与 STAD 患者生存预后相关的铁死亡相关 DEGs——NOX2、PRKAA2、FABP4 和 PDK4,数据分析显示,这 4 个基因低表达组患者生存时间显著延长($P < 0.05$)。因此,这 4 个基因有望成为 STAD 预

后评估的新型生物标志物或治疗靶点，为 STAD 患者的治疗策略开辟新的途径。

参考文献

- [1]Lauren P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA:DIFFUSE AND SO-CALLED INTES TINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLI NICAL CLASSIFICATION. *Acta pathologica et micro biologica Scandinavica*. 1965;64:31-49.
- [2]Kushima R. The updated WHO classification of digestive system tumours-gastric adenocarcino ma and dysplasia. *Der Pathologe*. 2022;43(1):8-15.
- [3]Anderson WF, Rabkin CS, Turner N, Fraumeni JF, Jr., Rosenberg PS, Camargo MC. The Changing Fac e of Noncardia Gastric Cancer Incidence Among US Non-Hispanic Whites. *Journal of the National Cancer Institute*. 2018;110(6):608-15.
- [4]Arnold M, Park JY, Camargo MC, Lunet N, Forman D, Soerjomataram I. Is gastric cancer becoming a rare disease?A global assessment of predicted incidence trends to 2035. *Gut*. 2020;69(5):823-9.
- [5]Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17036.
- [6]Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis:an iron -dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060-72.
- [7]Stockwell BR. Ferroptosis turns 10:Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications. *Cell*. 2022;185(14):2401-21.
- [8]Ma X, Xiao L, Liu L, Ye L, Su P, Bi E, et al. CD36 -mediated ferroptosis dampens intratumoral CD8 (+)T cell effector function and impairs their antitumor ability. *Cell metabolism*. 2021;33(5):1001-12. e5.
- [9]Wang W, Green M, Choi JE, Gijón M, Kennedy PD, Johnson JK, et al. CD8(+)T cells regulate tumou r ferroptosis during cancer immunotherapy. *Natu re*. 2019;569(7755):270-4.
- [10]Cheng X, Dai E, Wu J, Flores NM, Chu Y, Wang R, et al. Atlas of Metastatic Gastric Cancer Links Ferroptosis to Disease Progression and Immuno therapy Response. *Gastroenterology*. 2024;167(7):1345-57.
- [11]Li Q, Guo G, Chen Y, Lu L, Li H, Zhou Z, et al. H CP5 Derived Novel Microprotein Triggers Progre ssion of Gastric Cancer through Regulating Fer roptosis. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*. 2024;11(46):e2407012.
- [12]Tang CT, Lin XL, Wu S, Liang Q, Yang L, Gao YJ, et al. NOX4-driven ROS formation regulates prol iferation and apoptosis of gastric cancer cell s through the GIL1 pathway. *Cellular signalling*. 2018;46:52-63.
- [13]Vermot A, Petit-Härtlein I, Smith SME, Fiesch i F. NADPH Oxidases (NOX):An Overview from Disco very, Molecular Mechanisms to Physiology and Pa thology. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2021;10(6).
- [14]Wang L, Gong W. NOX4 regulates gastric cance r cell invasion and proliferation by increasin g ferroptosis sensitivity through regulating R OS. *International immunopharmacology*. 2024;132:112052.
- [15]Zhang J, Li H, Wu Q, Chen Y, Deng Y, Yang Z, et al. Tumoral NOX4 recruits M2 tumor-associated m acrophages via ROS/PI3K signaling-dependent va rious cytokine production to promote NSCLC gro wth. *Redox biology*. 2019;22:101116.
- [16]Helfinger V, Henke N, Harenkamp S, Walter M, E pah J, Penski C, et al. The NADPH Oxidase Nox4 me diates tumour angiogenesis. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2016;216(4):435-46.
- [17]Tu WJ, Zeng XW, Deng A, Zhao SJ, Luo DZ, Ma GZ, et al. Circulating FABP4 (Fatty Acid-Binding Pro tein 4) Is a Novel Prognostic Biomarker in Pati ents With Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2017;48(6):1531-8.
- [18]Yang J, Liu X, Shao Y, Zhou H, Pang L, Zhu W. Di

agnostic, Prognostic, and Immunological Roles of FABP4 in Pancancer: A Bioinformatics Analysis. Computational and mathematical methods in medicine. 2022; 2022: 3764914.

[19] Luis G, Godfroid A, Nishiumi S, Cimino J, Blacher S, Maquoi E, et al. Tumor resistance to ferroptosis driven by Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) in cancer cells and Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP4) in tumor microenvironment promote tumor recurrence. Redox biology. 2021; 43: 102006.

[20] Song X, Liu J, Kuang F, Chen X, Zeh HJ, 3rd, Kang R, et al. PDK4 dictates metabolic resistance to ferroptosis by suppressing pyruvate oxidation and fatty acid synthesis. Cell reports. 2021; 34(8): 108767.

[21] Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. Molecular cancer. 2023; 22(1): 138.

[22] Saiki H, Hayashi Y, Yoshii S, Kimura E, Nakagawa K, Kato M, et al. The apelin- apelin receptor signaling pathway in fibroblasts is involved in tumor growth via p53 expression of cancer cells. International journal of oncology. 2023; 63(6).

[23] Zuo M, Tong R, He X, Liu Y, Liu J, Liu S, et al.

FOXO signaling pathway participates in oxidative stress-induced histone deacetylation. Free radical research. 2023; 57(1): 47-60.

[24] Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. Nature cell biology. 2011; 13(9): 1016-23.

[25] Hsu CC, Peng D, Cai Z, Lin HK. AMPK signaling and its targeting in cancer progression and treatment. Seminars in cancer biology. 2022; 85: 52-68.

[26] Lin L, Flisikowski K, Schwarzenbacher H, Scharfe M, Severitt S, Blöcker H, et al. Characterization of the porcine AMPK alpha 2 catalytic subunit gene (PRKAA2): genomic structure, polymorphism detection and association study. Animal genetics. 2010; 41(2): 203-7.

[27] Liu L, Guan X, Zhao Y, Wang X, Yin C, Liu Q, et al. [Mechanism of miR-186-5p Regulating PRKAA2 to Promote Ferroptosis in Lung Adenocarcinoma Cells]. Zhongguo fei ai za zhi=Chinese journal of lung cancer. 2023; 26(11): 813-21.

赣州市科技计划项目：《USPIO-PEG-sLex 介导人胃癌 HGC-27 细胞及移植瘤模型铁死亡的实验研究》，项目编号：GZ2021ZSF089