

基于 YTHDC2、IGF2BP2 和 HNRNPC 的头颈部鳞状细胞癌 N6-甲基腺苷风险模型构建及临床应用评估

岳蔷薇 徐乐 张东升

山东第一医科大学附属省立医院口腔科, 济南 250021

[摘要] 目的 利用生物信息学技术构建头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) N6-甲基腺苷 (m^6A) 调节因子模型, 进行预后及肿瘤免疫微环境评估。方法 利用 R 语言对癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库 HNSCC 患者进行 m^6A 调节因子风险预后模型构建, 然后对不同风险组进行差异基因分析、细胞类型富集分析和临床相关性分析。结果 HNSCC 中 15 个 m^6A 调节因子表达异常, 根据异常表达基因构建了 HNSCC YTHDC2、IGF2BP2 和 HNRNPC 三基因独立预后风险模型, 其中高风险组免疫抑制相关因子及免疫细胞显著增多, 抗肿瘤免疫相关因子及免疫细胞减少, 呈现促肿瘤的免疫微环境。结论 联合 YTHDC2、IGF2BP2 和 HNRNPC 的 m^6A 调节因子风险预后模型可以有效评估 HNSCC 患者预后及肿瘤免疫浸润状态。

[关键词] 头颈部鳞状细胞癌; N6-甲基腺苷; 预后风险模型; 肿瘤免疫微环境; 生物信息学分析

[中图分类号] Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2022.06.012



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Construction and clinical evaluation of N6-methyladenosine risk signature of YTHDC2, IGF2BP2, and HNRNPC in head and neck squamous cell carcinoma Yue Qiangwei, Xu Le, Zhang Dongsheng. (Dept. of Stomatology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China)

Supported by: Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2021MH353). Correspondence: Zhang Dongsheng, E-mail: ds63zhang@sdu.edu.cn.

[Abstract] **Objective** This work aimed to construct N6-methyladenosine (m^6A) regulator-based prognostic signature and evaluate the prognostic value and the intervention on tumor immune microenvironment of this m^6A risk signature. **Methods** Using transcriptome and clinical data of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) from The Cancer Genome Atlas (TCGA), we profiled m^6A regulators and constructed an m^6A risk signature. The relationship between m^6A modulation and immune function was studied by differential gene expression, cell type enrichment, and correlation analyses. **Results** Fifteen m^6A regulators had aberrant expression in HNSCC. A three-gene m^6A prognostic signature (i.e., YTHDC2, IGF2BP2, and HNRNPC) was constructed and identified as an independent prognostic indicator for HNSCC. The m^6A regulator signature-based high-risk group revealed pro-tumoral immune microenvironment due to the dysregulation of immune-related gene expression, abnormal enrichment of multiple immunocytes, and production of immunoregulatory factors. **Conclusion** This comprehensive analysis of m^6A regulators and tumor immune landscape in HNSCC revealed that the m^6A signature of YTHDC2, IGF2BP2, and HNRNPC could serve as a promising biomarker for monitoring HNSCC development and may be a potential target for tumor therapy in the future.

[Key words] head and neck squamous cell carcinoma; N6-methyladenosine; prognostic risk signature; tumor immune microenvironment; bioinformatic analysis

[收稿日期] 2022-02-21; **[修回日期]** 2022-09-08

[基金项目] 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2021MH353)

[作者简介] 岳蔷薇, 主管护师, 学士, E-mail: 32161343@qq.com

[通信作者] 张东升, 主任医师, 博士, E-mail: ds63zhang@sdu.edu.cn

cn

头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 是全身最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率为 40%~50%^[1]。尽管肿瘤研究飞

速进展,但HNSCC总生存率仍未显著提高^[2],因此亟需新的预后评估分子标志物。N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m⁶A)是真核生物RNA中最常见的修饰方式^[3-4],异常表达的m⁶A调节基因可能与HNSCC发生发展密切相关^[5]。肿瘤微环境是肿瘤生长的温床,其中浸润性免疫细胞如同双刃剑影响癌细胞^[6]。研究^[7-8]证实m⁶A RNA甲基化与免疫功能密切相关。然而,在HNSCC中关于肿瘤m⁶A RNA甲基化、免疫功能和肿瘤临床特征之间的相关性仍不明确。因此,本实验基于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA),通过生物信息学分析探索了HNSCC中m⁶A调节基因的表达、功能、临床意义及其与免疫功能之间的关系,为HNSCC预后和治疗提供指导。

1 材料和方法

1.1 数据获取和处理

在TCGA数据库(<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>)中下载TCGA-HNSC队列的转录组数据和临床数据,其中包括502个肿瘤样本和44个正常对照组织样本。临床数据主要包括肿瘤患者相应临床病理特征,包括年龄、性别、病理分级、肿瘤分期和生存数据。

1.2 m⁶A调节因子差异表达及相互作用分析

使用limma R包筛选肿瘤和正常样本之间的差异表达基因,筛选阈值设定为调整P值(adjusted P value, adj. P) < 0.05,且差异倍数|log₂FC| ≥ 1。使用R语言的ggplot2软件包绘制差异基因提琴图及Pearson相关分析图。

1.3 m⁶A调节因子风险预后模型构建及评估

利用单因素COX分析评估m⁶A调节因子预后相关性,然后将P值小于0.05的预后相关基因进行LASSO回归分析构建风险预后模型。通过将预后模型中每个基因表达量与相应风险系数的乘积相加,获得每位患者的风险评分。根据风险评分,HNSCC患者被均匀地分为高风险组和低风险组。分别使用单因素和多因素独立预后分析评估m⁶A调节因子风险预后模型在HNSCC患者预后评估中的临床价值,并使用R语言的ggplot2软件包绘制COX回归分析树叶图。

1.4 m⁶A风险组免疫微环境功能状态评估

使用xCell工具计算34个主要的免疫炎症细胞的丰度^[9],并绘制了雷达图展示了各细胞类型在高、低风险组中的分布差异。

1.5 数据统计

所有统计分析均在R语言(版本4.1.2)中进行,P < 0.05被认为具有统计学意义。t检验和方差分析用于比较连续变量,卡方检验用于比较分类临床病理变量,Pearson相关性分析用于满足正态分布的连续变量。

2 结果

2.1 m⁶A调节因子的表达和相互关系

HNSCC正常组织和肿瘤组织之间存在15个m⁶A相关基因的异常表达(图1A)。除YTHDC2表达下降外,METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429、RBM15、FTO、ALKBH5、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3和HNRNPC基因在肿瘤组织中均表达升高。15个差异表达的m⁶A调节因子之间相互关联,形成了一个复杂的m⁶A调控网络(图1B)。

2.2 m⁶A调节因子风险预后模型构建及评估

通过单因素COX回归分析,YTHDC2、IGF2BP2和HNRNPC与HNSCC患者预后显著相关(图2A)。其中,YTHDC2是HR小于1的保护基因(HR=0.846),而IGF2BP2(HR=1.015)和HNRNPC(HR=1.013)是风险基因。通过LASSO回归分析发现需要YTHDC2、IGF2BP2和HNRNPC 3个基因共同构建风险预后模型,并得到风险评分公式如下:风险评分=(-0.169)×YTHDC2+(0.010)×IGF2BP2+(0.012)×HNRNPC。根据个体风险评分,分别将200和186名HNSCC患者分为高风险组和低风险组。与低风险组相比,高风险组患者的总生存率显著降低(P=3.528×10⁵,图2B)。高风险组和低风险组在性别(P < 0.05)、病理分级(P < 0.005)和临床分期(P < 0.05)方面存在显著差异(表1)。在高风险组中,男性患者比例更高,且肿瘤分期和病理分级更高。

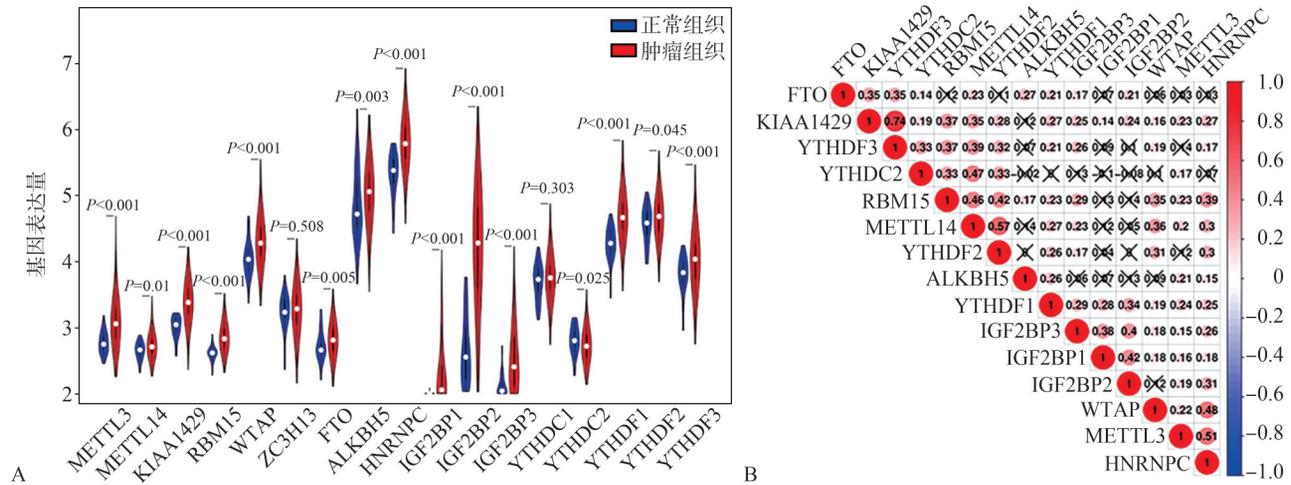
单因素独立预后分析显示年龄(P=0.034,HR=1.406)、分期(P < 0.001,HR=1.399)和风险评分(P=0.001,HR=1.683)与总生存率显著相关(图2C)。进一步的多因素独立预后分析将年龄(P=0.035,HR=1.418)、分期(P < 0.001,HR=1.430)和风险评分(P=0.003,HR=1.657)确定为独立的预后因素(图2D)。

2.3 m⁶A风险组免疫微环境功能状态评估

在高、低风险组之间共有156个差异表达基因,其中35个基因表达上调,121个基因表达下

调 (图 3A), 其中涉及许多免疫相关基因 (图 3B)。为了进一步探索肿瘤免疫/炎症功能状态的差异, 比较了高、低风险组中各细胞类型的丰度。如图 3C 所示, 其中大多数免疫细胞类型富集评分在高风险组中显著降低, 例如 B 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞、M1 型巨噬细胞等。相反, 高风险组的前

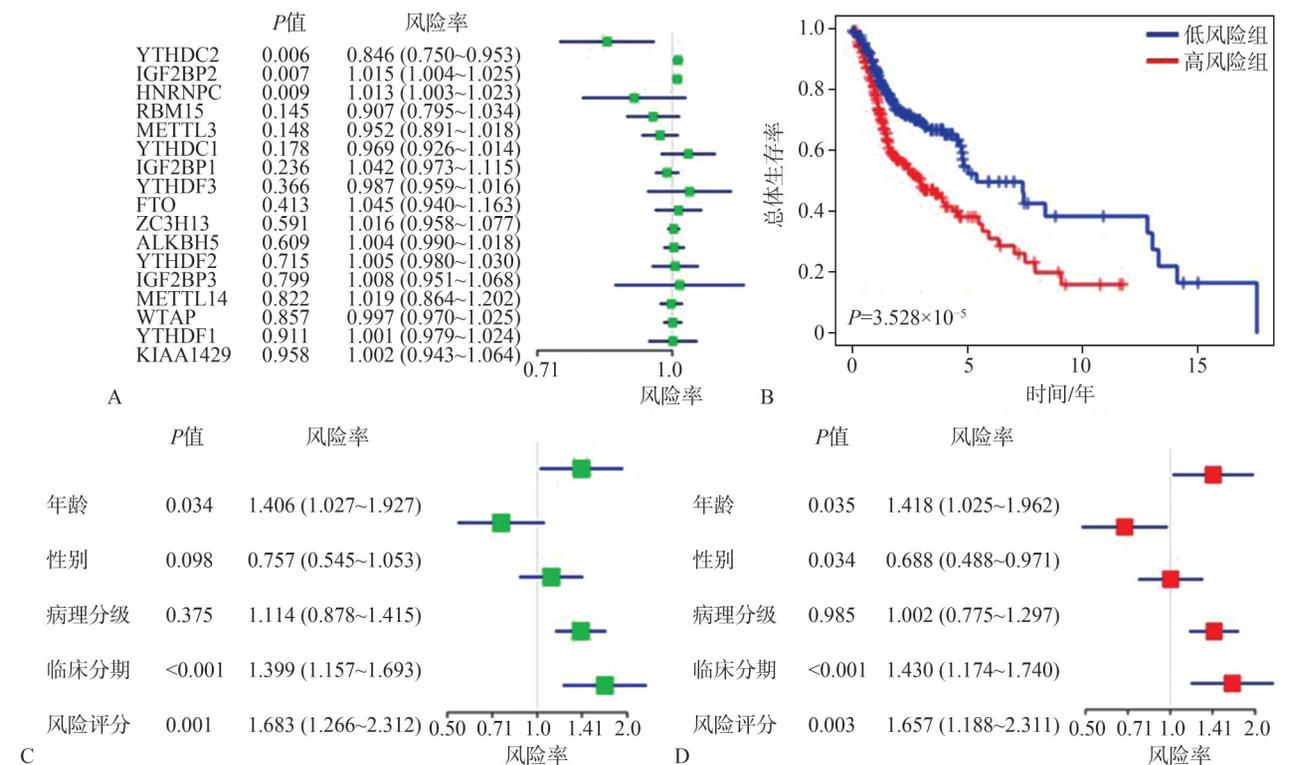
B 细胞、辅助 T 淋巴细胞富集分数更高。进一步挖掘前面所得到的 m⁶A 风险分组相关的差异基因, 发现抗肿瘤因子如 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素 (interleukin, IL) -12A 和 IL-12B 在高风险组中表达下调, 而促肿瘤因子 CD155 在高风险组中略有上调 (图 3D)。



A: m⁶A 相关基因差异表达分析; B: m⁶A 相关基因表达相关性分析。

图 1 TCGA HNSCC 患者 m⁶A 调节因子差异表达及相互作用分析

Fig 1 The expression profile and interrelation of m⁶A RNA regulators in TCGA HNSCC cohort



A: m⁶A 相关基因单因素 COX 回归分析; B: m⁶A 风险模型高、低风险组生存分析; C: 临床指标单因素独立预后分析; D: 多因素独立预后分析。

图 2 m⁶A 调节因子风险预后模型构建及评估

Fig 2 Construction and evaluation of the prognostic signature based on m⁶A regulators in TCGA HNSCC cohort

表 1 HNSCC 患者 m⁶A 风险分组的临床特征分析
Tab 1 Clinical characteristics of HNSCC samples of m⁶A risk groups

临床特征		风险分组		P 值
		低风险	高风险	
年龄/岁	≤65	121	135	0.611
	>65	65	65	
性别	女性	59	44	0.031*
	男性	127	156	
临床分期	I 期	17	5	0.047*
	II 期	22	26	
	III 期	34	38	
	IV 期	113	131	
病理分级	1 级	34	15	0.002***
	2 级	118	128	
	3 级	33	57	
	4 级	1	0	

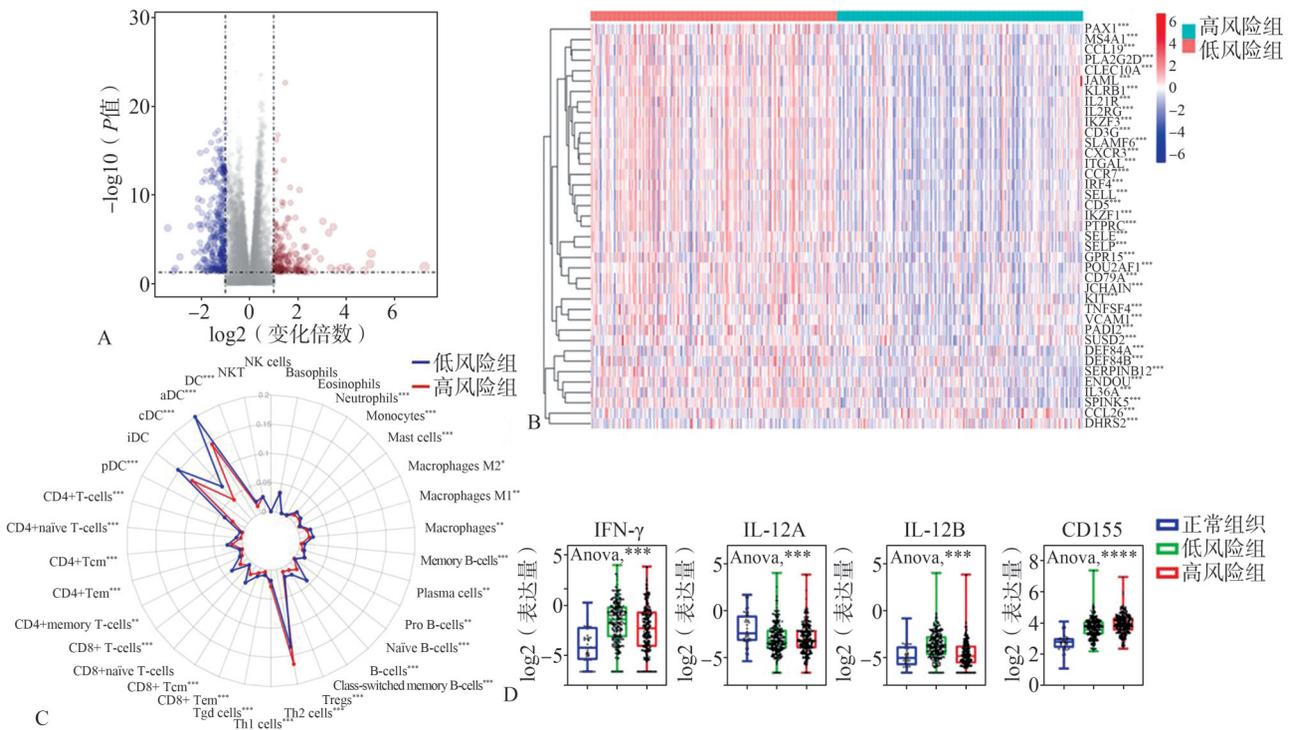
注: *为 P<0.05, ***为 P<0.005。

3 讨论

临床中常用 TNM 分期指导肿瘤的诊断治疗, 但有报道指出相同临床分期的 HNSCC 患者会对治疗产生不同的反应, 导致预后无法预测^[10], 因此

亟需提出新的分子标志物为 HNSCC 预后评估和治疗选择提供参考。研究^[3]发现 m⁶A 甲基化在恶性肿瘤发生进展中发挥重要作用, 然而在 HNSCC 的研究仍不明确。本研究基于 TCGA 数据库 HNSCC 患者转录组及临床数据, 通过生物信息学分析, 阐明 m⁶A 甲基化在 HNSCC 预后评估中的重要价值, 为 HNSCC 临床治疗提供了研究方向。

m⁶A 甲基化是 RNA 中最丰富的修饰方式, 其调节因子通常在恶性肿瘤中异常表达。与既往研究^[11]结果相似。其中, 甲基化转移酶包括 METTL3、METTL14、KIAA1427、RBM15、WTAP、ZC3H13, 去甲基化酶包括 FTO、ALKBH5, 而 m⁶A 结合蛋白通过识别并结合 m⁶A 位点, 发挥不同的 RNA 调节作用: 维持 RNA 稳定性 (IGF2BP1/2/3)、促进 mRNA 翻译 (YTHDF1)、调控 RNA 降解 (YTHDF2) 等。本研究发现 HNSCC 肿瘤组织中 m⁶A 调节因子呈现异常表达, 17 个调节因子中有 15 个表达失调, 这表明 m⁶A 调节因子可能与肿瘤发生和临床预后相关。而进一步相关性分析中发现这 15 个调节因子相互之间存在着表达相关性, 这提示 m⁶A 调控是一个复杂的网络。其中多项研究^[12-14]已经证实 ALKBH5、METTL3 及 YTHDF1 在 HNSCC 发生和化疗耐受中发挥了重要调节作用。



A: m⁶A 相关基因风险组差异基因火山图; B: m⁶A 风险组免疫相关基因差异分析热图; C: m⁶A 风险组免疫细胞富集分数差异分析雷达图; D: 口腔正常黏膜和口腔癌 m⁶A 风险组肿瘤相关免疫因子差异表达分析。**P<0.01, ***P<0.001。

图 3 m⁶A 风险分组 HNSCC 患者肿瘤免疫微环境功能状态分析

Fig 3 Analysis of tumor immune microenvironment of different m⁶A risk groups in HNSCC

然而,大多数异常表达的m⁶A调节因子在HNSCC中尚未有明确报道,这需要未来更深入的研究来揭示其潜在机制。

为了进一步明确m⁶A调节因子在HNSCC中的临床意义,本研究构建了由YTHDC2、IGF2BP2和HNRNPC组成的风险预后模型。根据m⁶A风险模型划分风险组,发现与低风险组相比,高风险组患者其肿瘤恶性程度更高,且伴随着较差的预后结果。并且与年龄和临床分期相同,该风险模型已被验证可以作为独立因素评价HNSCC患者的预后。

在该预后模型中,YTHDC2被预测为HNSCC预后评价的保护因子,表明它可能在HNSCC中发挥抑癌基因作用。然而,YTHDC2在肿瘤发生中的作用目前仍存争议。研究^[15-16]发现在胰腺癌及肝癌中YTHDC2发挥促癌作用,这与本研究中YTHDC2表现出的抑癌作用相矛盾。事实上,m⁶A调节基因可能在不同类型癌症中发挥不同作用。例如,METTL3在胶质母细胞瘤中充当肿瘤抑制基因^[17],而在膀胱癌中却能促进肿瘤进展^[18]。因此,YTHDC2在HNSCC中的作用及机制需要进一步研究明确。与YTHDC2不同,IGF2BP2和HNRNPC是HNSCC肿瘤发生的危险因素。抑制HNRNPC通过抑制下游干扰素反应,来抑制乳腺癌的生长^[19],而过表达HNRNPC通过改变选择性切割和多聚腺苷化(alternative cleavage and polyadenylation, APA)表达促进结直肠癌进展^[20];同样IGF2BP2可以通过调控性别决定区Y盒状蛋白2(sex determining region Y box protein 2, SOX2)表达来促进结直肠癌进展^[21]。

尽管关于肿瘤m⁶A修饰的研究日益增多,但其对肿瘤免疫微环境的影响尚未阐明。为此本研究比较了m⁶A风险组之间的基因表达谱和免疫细胞类型富集评分。结果显示,高风险组患者免疫评分较低,且伴有大量细胞因子、趋化因子和相关受体表达失调。这提示m⁶A甲基化修饰与肿瘤免疫调控密切相关。

进一步分析肿瘤微环境免疫细胞评分,发现大多数抗肿瘤免疫细胞在m⁶A高风险组中浸润减少,主要包括M1型巨噬细胞、树突状细胞、CD4⁺T淋巴细胞、CD8⁺T淋巴细胞和B淋巴细胞,而免疫抑制性Th2淋巴细胞浸润显著增多,这表明m⁶A异常调控与HNSCC微环境的促肿瘤免疫状态相关。尽管YTHDC2、IGF2BP2和HNRNPC的免疫调节机制尚未阐明,考虑到m⁶A基因是一个相

互关联的调控网络,其他m⁶A调控基因的免疫调节作用可以提供参考。研究^[22]发现YTHDF2可以通过CCR7-lncDpf3参与调控树突状细胞迁移,并通过m⁶A依赖方式促进IFNB的mRNA降解,进而抑制干扰素反应^[23]。除YTHDF2外,敲除YTHDF1可以显著提高抗原特异性CD8⁺T淋巴细胞抗肿瘤反应以及细胞程序性死亡-配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)阻断剂的治疗效果^[8]。而METTL3可以通过增加TRIAP、CD40和CD80的翻译来促进树突状细胞激活^[24]。这提示m⁶A调节基因参与了免疫微环境调控。为了探索潜在机制,分析了m⁶A风险组之间的免疫调节因子表达。结果表明,在高风险组中,免疫刺激因子包括IFN- γ 、IL-12A/B的表达显著降低,而免疫抑制因子CD155的表达略有上调。这与免疫抑制的肿瘤微环境免疫状态相一致,再次验证了m⁶A调节基因在免疫调节中发挥重要作用。

综上所述,基于m⁶A调节因子YTHDC2、IGF2BP2和HNRNPC构建的HNSCC风险预后模型可以作为新的生物标志物,评判HNSCC患者预后,而异常的m⁶A调节与肿瘤微环境免疫状态密切相关。因此,m⁶A RNA甲基化可能成为一个潜在的治疗靶点,不仅可以杀死肿瘤细胞,还可以辅助抗肿瘤免疫治疗。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] 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-E386.
- [2] Cramer JD, Burtneess B, Le QT, et al. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2019, 16(11): 669-683.
- [3] Huang H, Weng H, Chen J. m6A modification in Coding and Non-coding RNAs: roles and therapeutic implications in cancer[J]. Cancer Cell, 2020, 37(3): 270-288.
- [4] Liu J, Li K, Cai J, et al. Landscape and regulation of m6A and m6Am methylome across human and mouse tissues[J]. Mol Cell, 2020, 77(2): 426-440.e6.
- [5] Zhao X, Cui L. Development and validation of a m6A RNA methylation regulators-based signature for predicting the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(10): 2156-2169.

- [6] Terlizzi M, Casolaro V, Pinto A, et al. Inflammasome: cancer's friend or foe[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143(1): 24-33.
- [7] Zhang B, Wu Q, Li B, et al. m6A regulator-mediated methylation modification patterns and tumor microenvironment infiltration characterization in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 53.
- [8] Han D, Liu J, Chen C, et al. Anti-tumour immunity controlled through mRNA m6A methylation and YTHDF1 in dendritic cells[J]. *Nature*, 2019, 566(7743): 270-274.
- [9] Aran D, Hu Z, Butte AJ. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape[J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 220.
- [10] Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(5): 269-282.
- [11] Li Y, Xiao J, Bai J, et al. Molecular characterization and clinical relevance of m6A regulators across 33 cancer types[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 137.
- [12] Shriwas O, Priyadarshini M, Samal SK, et al. DDX3 modulates cisplatin resistance in OSCC through ALK-BH5-mediated m6A-demethylation of FOXM1 and NANOG[J]. *Apoptosis*, 2020, 25(3/4): 233-246.
- [13] 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.
- [14] Ban Y, Tan P, Cai J, et al. LNCAROD is stabilized by m6A methylation and promotes cancer progression via forming a ternary complex with HSPA1A and YBX1 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(6): 1282-1296.
- [15] Tanabe A, Konno J, Tanikawa K, et al. Transcriptional machinery of TNF- α -inducible YTH domain containing 2 (YTHDC2) gene[J]. *Gene*, 2014, 535(1): 24-32.
- [16] Fanale D, Iovanna JL, Calvo EL, et al. Germline copy number variation in the YTHDC2 gene: does it have a role in finding a novel potential molecular target involved in pancreatic adenocarcinoma susceptibility[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(8): 841-850.
- [17] Cui Q, Shi H, Ye P, et al. m6A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(11): 2622-2634.
- [18] Cheng M, Sheng L, Gao Q, et al. The m6A methyltransferase METTL3 promotes bladder cancer progression via AFF4/NF- κ B/MYC signaling network[J]. *Oncogene*, 2019, 38(19): 3667-3680.
- [19] Wu Y, Zhao W, Liu Y, et al. Function of HNRNPC in breast cancer cells by controlling the dsRNA-induced interferon response[J]. *EMBO J*, 2018, 37(23): e99017.
- [20] Fischl H, Neve J, Wang Z, et al. hnRNPc regulates cancer-specific alternative cleavage and polyadenylation profiles[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(14): 7580-7591.
- [21] Li T, Hu PS, Zuo Z, et al. METTL3 facilitates tumor progression via an m6A-IGF2BP2-dependent mechanism in colorectal carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 112.
- [22] Liu J, Zhang X, Chen K, et al. CCR7 Chemokine receptor-inducible lnc-Dpf3 restrains dendritic cell migration by inhibiting HIF-1 α -mediated glycolysis[J]. *Immunity*, 2019, 50(3): 600-615.
- [23] Winkler R, Gillis E, Lasman L, et al. m6A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(2): 173-182.
- [24] Wang H, Hu X, Huang M, et al. Mettl3-mediated mRNA m6A methylation promotes dendritic cell activation[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1898.

(本文编辑 杜冰)