

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250806.002

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250806.0917.004>

范可尼贫血互补群D2基因在人胸膜间皮瘤中的表达及临床意义

赵 丹^{1,2}, 李正亮³, 杨文仲^{1,2}, 李锦松^{1,2}, 王小忆^{1,2}, 张国美⁴✉, 熊 伟^{1,2}✉

(1. 大理大学基础医学院, 云南 大理 671000; 2. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000; 3. 大理大学第一附属医院放射科, 云南 大理 671000; 4. 大理大学第一附属医院超声科, 云南 大理 671000)

[摘要] **目的:**探讨范可尼贫血互补群D2(fanconi anemia complementation group D2, *FANCD2*)基因在胸膜间皮瘤(pleural mesothelioma, PM)中的表达水平及敲低*FANCD2*基因对PM细胞NCI-H2052增殖和迁移的影响。**方法:**应用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库下载PM基因表达数据、临床病理数据与生存状态数据;使用R语言、Perl软件等程序包作*FANCD2*在PM中的差异分析、临床病理相关性分析、COX单因素和多因素分析、免疫浸润分析及基因富集分析。采用qRT-PCR和WB检测间皮瘤细胞中*FANCD2*的表达水平。通过CCK-8、克隆形成实验、划痕实验及细胞周期检测评估敲低*FANCD2*对PM细胞NCI-H2052增殖与迁移能力的影响。**结果:**生信分析和体外细胞学实验结果表明,与正常对照组织和人正常间皮细胞Met-5A相比,不同类型的PM组织和PM细胞中*FANCD2*基因明显高表达($P<0.001$);*FANCD2*表达量与PM肿瘤分期具有明显相关性($P<0.05$);*FANCD2*基因高表达与PM患者预后不良正相关($P<0.001$);*FANCD2*基因高表达与PM中M2巨噬细胞等浸润水平正相关($P<0.05$),并在细胞周期、卵母细胞减数分裂、细胞衰老等通路明显富集。在PM细胞NCI-H2052中通过siRNA敲低*FANCD2*基因表达能导致细胞周期G1/S期阻滞,并明显抑制PM细胞增殖和迁移。**结论:***FANCD2*在PM组织中高表达,是判断PM预后的良好指标之一,敲低*FANCD2*基因表达能导致细胞周期G1/S期阻滞,并明显抑制PM细胞增殖和迁移。

[关键词] 胸膜间皮瘤;范可尼贫血互补群D2;预后;生物信息学

[中图分类号] R734.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)16-1201-14

Expression and clinical significance of fanconi anemia complementation group D2 (*FANCD2*) in human pleural mesothelioma (PM)

ZHAO Dan^{1,2}, LI Zhengliang³, YANG Wenzhong^{1,2}, LI Jinsong^{1,2}, WANG Xiaoyi^{1,2}, ZHANG Guomei⁴✉, XIONG Wei^{1,2}✉

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China; 2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali 671000, China; 3. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, China; 4. Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82160516); Joint Special Project for Basic Research in Local Undergraduate Universities of Yunnan Province (202101BA070001-128, 202401BA070001-093); Second Batch of Discipline Team Construction Project of the First Affiliated Hospital of Dali University (DFYXK2023019); Fourth Batch of Discipline Team Construction Project of the First Affiliated Hospital of Dali University (DFYXK2024002)

[Author]: ZHAO Dan, Email: zdan0223@163.com; LI Zhengliang, Email: 407874365@qq.com.

[Correspondence to]: ZHANG Guomei, E-mail: 573022216@qq.com; XIONG Wei, Ph.D., Professor, E-mail: xiongwei@dali.edu.cn.

Received: 2025-06-12 **Revised:** 2025-07-02

JHMu, 2026;32(16):1201-1214

[基金项目] 国家自然科学基金(82160516);云南省地方本科高校基础研究联合专项面上项目(202101BA070001-128, 202401BA070001-093);大理大学第一附属医院第二批学科队伍建设项目(DFYXK2023019);大理大学第一附属医院第四批学科队伍建设项目(DFYXK2024002)

[作者简介] 赵丹, E-mail: zdan0223@163.com; 李正亮, E-mail: 407874365@qq.com。

[通讯作者] 张国美, E-mail: 573022216@qq.com; 熊伟, 博士, 教授, E-mail: xiongwei@dali.edu.cn。

[收稿日期] 2025-06-12 **[修回日期]** 2025-07-02 **网络出版时间:** 2025-08-06 10:30:26

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To explore the expression level of the fanconi anemia complementation group D2 (*FANCD2*) gene in pleural mesothelioma (PM) and the effect of knockdown of the *FANCD2* gene on the proliferation and migration of PM cells NCI-H2052. **Methods:** The cancer genome atlas (TCGA) database was used to download PM gene expression data, clinicopathological data and survival status data. R language, Perl software and other software packages were used for *FANCD2* differential analysis, clinicopathological correlation analysis, COX univariate and multivariate analysis, immune infiltration analysis and gene enrichment analysis. qRT-PCR and WB were used to detect the expression of *FANCD2* in mesothelioma cells. The effects of knockdown of *FANCD2* on the proliferation and migration abilities of pleural mesothelioma cells were evaluated through CCK-8 assay, colony formation assay, scratch assay and detection of cell cycle changes. **Results:** The results of bioinformatics analysis and *in vitro* cytology experiments showed that compared to normal control tissues and human normal mesothelial cells Met-5A, *FANCD2* gene was significantly higher in different types of PM tissues and PM cells ($P < 0.001$); The expression level of *FANCD2* was significantly correlated with the tumor stage of PM ($P < 0.05$). High expression of the *FANCD2* gene was positively correlated with poor prognosis in patients with PM ($P < 0.001$); The high expression of *FANCD2* was positively correlated with the infiltration level of M2 macrophages in PM ($P < 0.05$), and was significantly enriched in pathways such as the cell cycle, oocyte meiosis, and cell senescence. Knockdown of *FANCD2* gene expression by siRNA in PM cell NCI-H2052 can lead to G1/S phase arrest of the cell cycle and significantly inhibit PM cell proliferation and migration. **Conclusion:** The high expression of *FANCD2* in PM tissues is one of the good indicators for judging the prognosis of PM, and knocking down *FANCD2* gene expression can lead to G1/S phase arrest of the cell cycle and significantly inhibit PM cell proliferation and migration.

[Key words] Pleural mesothelioma; Fanconi anemia complementation group D2; Prognosis; Bioinformatics

胸膜间皮瘤(pleural mesothelioma, PM)是位于胸膜腔的罕见难治性间皮细胞肿瘤^[1]。依据组织分型可将PM分为上皮型、双相型以及肉瘤型,其中上皮型约占PM病例的80%,且预后较好^[2]。PM的诊断依靠临床表现、影像学表现以及病理学报告,胸膜腔穿刺是其确诊的金标准^[3]。PM最常见的临床表现是继发胸膜腔积液之后的进行性呼吸困难,由于较难与其他肺部疾病进行鉴别诊断,PM患者常常处于晚期^[4]。PM对于包括手术切除、顺铂+培美曲塞化疗、放疗在内的联合治疗方案疗效不佳,中位生存时间为9~12个月,5年生存率约为5%^[5]。

在PM患者中常见抑癌基因和表观修饰的改变,其中BRCA1相关蛋白1(BRCA1 associated protein 1, *BAP1*)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子2A(cyclin dependent kinase inhibitor 2A, *CDKN2A*)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子2B(cyclin dependent kinase inhibitor 2B, *CDKN2B*)、神经纤维瘤病2型(neurofibromin 2, *NF2*)、甲硫腺苷磷酸化酶(methylthioadenosine phosphorylase, *MTAP*)、肿瘤蛋白p53(tumor protein p53, *TP53*)等基因的突变率大于10%^[6,7];另外,有36%的PM患者携带有包括共济失调毛细血管扩张突变基因(ataxia telangiectasia mutated, *ATM*)、*BAP1*、*CDKN2A*、范可尼贫血互补群D2(fanconi anemia complementation group D2, *FANCD2*)等基因在内的致病性突变^[8]。范可尼贫血(fanconi anemia, FA)是一种包括骨髓异常、高发癌症、先天性障碍在内的罕见人类基因疾病,FA信号通路是DNA复制和损

伤修复网络的重要一环^[9,10];而FA信号通路的中心环节是FANCD2-FA互补组I(FA complementation group I, FANCI)基质复合体的泛素化^[11]。*FANCD2*基因位于染色体3p25.3,包含45个外显子,以*FANCD2*为中心的FA通路缺陷不仅导致基因组不稳定,而且会诱导肿瘤发生。近年来,多项证据表明,*FANCD2*基因在乙型肝炎相关肝细胞癌中过表达^[12],且明显促进肺腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力^[13],在髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)中恶性声波刺猬亚型(SHH-MB)^[14]、子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)^[15]、骨肉瘤(osteosarcoma, OS)^[16]等肿瘤细胞中高度表达。然而,*FANCD2*在PM中的表达及临床意义目前尚不明确,本研究利用生物信息学分析了*FANCD2*基因在PM中的表达情况,通过体外实验验证了敲低*FANCD2*基因对PM细胞增殖和迁移的影响,为PM的临床诊断和药物开发提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 肿瘤公共数据库数据分析

利用TIMER(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)数据库分析*FANCD2* mRNA在各种恶性肿瘤中的表达水平,通过ucsc xena网站(<https://xena.ucsc.edu/>)下载间皮瘤数据集(TCGA-MESO.htseq-fpkm.tsv.gz)、肺腺癌数据集(TCGA-LUAD.htseq-fpkm.tsv.gz)以及肺鳞癌数据集(TCGA-LUSC.htseq-fpkm.tsv.gz),及通过GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载间皮瘤数据集。使用Perl软件(5.40.2.1)提取表达矩阵并

将Ensemble ID转换基因ID,在R软件(4.3.1版)使用limma和ggpubr程序包提取表达数据中的*FANCD2*基因表达量并分组比较正常与肿瘤样本的*FANCD2*基因表达水平,绘制表达差异散点图(表1)。

表 1 样本来源及例数(*n*)

Tab 1 Sample source and number cases(*n*)

数据库	正常组织 (<i>n</i>)	PM组织 (<i>n</i>)
TCGA	108	86
GEO GSE12345	4	9
GEO GSE42977	9	39
GEO GSE51024	41	55

1.2 *FANCD2*基因表达与临床病理相关性的研究

通过ucsc xena网站下载间皮瘤临床病理数据集(TCGA-MESO.GDC_phenotype.tsv.gz)。根据样本ID合并基因表达数据和临床病理数据,对合并数据进行赋值处理,并根据*FANCD2*基因表达量(mininum: 0.997 9, medium: 2.621 0, maximum: 4.714 2)中位值将PM患者样本分为高表达组和低表达组,筛查和注释数据后做相关统计学分析。在R软件中使用epicalc和cdgsr程序包分析*FANCD2*基因表达量与PM患者年龄、性别、Stage分期、M分期、N分期、T分期、组织分型的单因素和多因素的相关性。

1.3 *FANCD2*基因与PM患者预后相关研究

进入GEPIA官网(<http://gepia.cancer-pku.cn/>),在单基因分析模块输入*FANCD2*基因,选择生存曲线作图,保持95%置信区间,选择MESO数据库并单击plot作图。

1.4 *FANCD2*基因与肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)和免疫细胞浸润相关性分析

使用“estimateScore”算法计算所有MESO样本的Stromal Score、Immune Score和ESTIMATE Score,并用小提琴图展示*FANCD2*基因与间皮瘤肿瘤微环境的相关性。基于TCGA数据库分析*FANCD2*与多种肿瘤浸润免疫细胞的相关性。筛选有统计学意义的免疫细胞类型并输出为可视化图表。此外,本研究还在TCGA数据库间皮瘤样本中分析*FANCD2*与多种免疫检查点基因表达的相关性。

1.5 *FANCD2*基因富集(gene set enrichment analysis, GSEA)分析

为了分析PM中与*FANCD2*表达相关的信号通路,利用基因本体(GO)、京都基因和基因组百科

全书(KEGG)等知名分类系统进行富集分析^[17,18],同时使用TCGA-PM数据集进行GSEA分析,以反映*FANCD2*在PM中的功能。将TCGA数据库PM样本按照*FANCD2*基因mRNA表达量的中位数分为高表达组和低表达组,并对两组进行差异分析,根据处理后基因的logFC值从大到小排序,序列上部是上调的差异基因,序列下部是下调的差异基因,进行GSEA分析。计算基因集的富集分数(enrichment score, ES),对基因集的ES值显著性检验,估计ES的显著性。最后进行多重假设检验,根据基因集的大小对ES标准化,得到标准化后富集分数(normalized enrichment score, NES),随后用NES计算假阳性率,从而得到显著富集的基因集。并基于TCGA下载的间皮瘤数据使用R软件(4.2.2版)的“pheatmap”包筛选出PM中与*FANCD2*相关程度高的一些基因,使用R软件(4.2.2版)的“colorspace”、“stringi”、“ggplot2”、“citclize”、“RColorBrewer”、“clusterProfiler”“org.Hs.eg.db”及“enrichplot”包对共表达基因进行GO功能富集和KEGG信号通路富集分析。

1.6 细胞培养

正常人胸膜间皮细胞系MeT-5A购自上海青旗生物技术发展有限公司,人PM细胞系MTSO-211H、NCI-H28、NCI-H2052和NCI-H2452购自中国科学院上海细胞库。MeT-5A细胞使用含有厄尔平衡盐溶液(BSS),0.75 mmol/L的L-谷氨酰胺和1.25 g/L的碳酸氢钠的培养基199(Nissui公司,Japan)培养,并补充3.3 nmol/L的表皮生长因子、400 nmol/L氢化可的松、870 nmol/L胰岛素、20 mmol/L的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES)和10%(v/v)胎牛血清(FBS)。MTSO-211H、NCI-H28、NCI-H2052和NCI-H2452细胞使用含谷氨酰胺RPMI 1640培养基(香港EVACell公司)添加10% FBS及1%双抗(链霉素/青霉素)培养,放置于37℃、5% CO₂无菌恒温培养箱中进行常规培养。所有细胞系通过短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分析进行鉴定,并使用Trans-Detect荧光素酶支原体检测试剂盒检查有无支原体的污染。

1.7 稳转细胞构建

SiControl、si-*FANCD2*-1和si-*FANCD2*-2沉默慢病毒载体由山东维真生物公司合成。将5×10⁴个NCI-H2052细胞铺入6孔板中,待细胞贴壁后加入慢病毒载体和助染剂polybrebe。孵育48 h后镜下观察细胞荧光状态,待稳定转染后使用嘌呤霉素

筛选细胞,去除未成功转染的细胞,进而构建稳转细胞系。

1.8 实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)

RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(购自 TIANGE-DP 230410)分别提取 MeT-5A 细胞株和不同 PM 细胞株的 mRNA,按照 HiScript II RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)说明书进行逆转录反应获取 cDNA。使用 Servicebio 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 以 MeT-5A 细胞和不同 PM 细胞的 cDNA 为模板在实时荧光 PCR 分析仪(艾普拜生物科技有限公司)进行 qRT-PCR 完成扩增。以上操作按说明书进行。*FANCD2* 基因引物序列正向引物:5'-ACATACCTCGACT-CATTGTCAGT-3',反向引物:5'-TCGGAG-GCTTGAAAGGACATC-3'。*β-actin* 基因正向引物:5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC,反向引物:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。扩增系统包括 10 μL 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix、正向和反向引物各 0.4 μL、2 μL cDNA 和 7.2 μL ddH₂O。避光条件下加样。扩增条件为 95 °C 预变性 30 s、95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 1 min,以此为 1 个循环,循环 40 次。在 35 个 PCR 循环的终点进行解离曲线分析。采用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量。*β-actin* 作为内参基因,每个样品设置 3 个复孔,实验独立重复 3 次,计算取其平均值。

1.9 Western blot 检测

各组细胞接种到 6 孔板中,48 h 后收集细胞,加入 150 μL 的预冷 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min(期间每 10 分钟涡旋混匀 1 次)使其充分裂解。4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。根据 BCA 蛋白定量试剂说明书在 96 孔板中制备蛋白浓度待测液,轻轻混匀于 37 °C 孵育 30 min 后,利用酶标仪测量吸光度值,收集数据绘制标准曲线后,使用 RIPA 裂解液作为稀释液以统一所有蛋白样品浓度。将蛋白质样品 100 °C 金属浴 10 min 变性后,即可进行 SDS-PAGE 电泳(80 V, 40 min; 120 V, 90 min),转膜(使用 PVDF 膜)以及封闭(5% 脱脂牛奶),在用 TBST 清洗 3 次(10 min/次)后添加一抗 4 °C 摇床过夜(12~16 h)。第二天取出室温摇床孵育 30 min,弃一抗,使用 TBST 清洗 3 次,加入二抗室温摇床孵育 2 h,再次 TBST 清洗 3 次后即可滴加显影液利用化学发光成像系统进行显影并拍摄记录,通过 ImageJ 软件分析条带灰度值。实验独立重复 3 次,计算取其平均值。

1.10 CCK-8 测定

使用 Cell Counting Kit-8(CCK8)(日本 Dojindo 公司)试剂检测细胞增殖能力,并在 24、48、96 h 分别进行评估。实验独立重复 3 次,计算取其平均值。

1.11 克隆形成实验

将细胞以每孔 1 000 个细胞的浓度接种到 6 孔板中,每 3 天用新鲜培养基更换 1 次培养基。培养 12 d 后,用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,用 0.5% 结晶紫染色 30 min,再用 PBS 洗涤并拍照,用 ImageJ 计算集落数。实验独立重复 3 次,计算取其平均值。

1.12 划痕试验

将细胞接种到 6 孔板中,一旦细胞融合超过 95%,使用移液管尖端在每个孔中制作 3 个伤口。在显微镜下于 0 h 和 48 h 拍摄随机选择的视野。细胞迁移率计算为 0 h 时细胞迁移面积与伤口面积的比值。实验独立重复 3 次,计算取其平均值。

1.13 细胞周期检测

将细胞接种到 6 孔板中,48 h 后收集细胞,并在 4 °C 下用 70% 乙醇固定过夜。在 37 °C 下,用含有 50 μg/mL 碘化丙啶(PI, Beyotime, C1052)和 100 μg/mL RNase A(Beyotime, ST576)PBS 对固定细胞进行染色,使用 Beckman A00-1-1102 流式细胞仪分析 PI 荧光直方图上每个细胞周期的百分比。实验独立重复 3 次,计算取其平均值。

1.14 统计学处理

在线数据库分析采用数据库默认统计方法,采用 R 软件以及 Graphpad Prism10.0 处理数据,运用卡方检验及双向无序 R×C 表资料的 Fisher 确切概率法分析 *FANCD2* 基因表达水平与 PM 患者临床病理参数的相关性。预后分析采用 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-rank 检验进行生存分析、单因素及多因素 COX 回归分析。相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

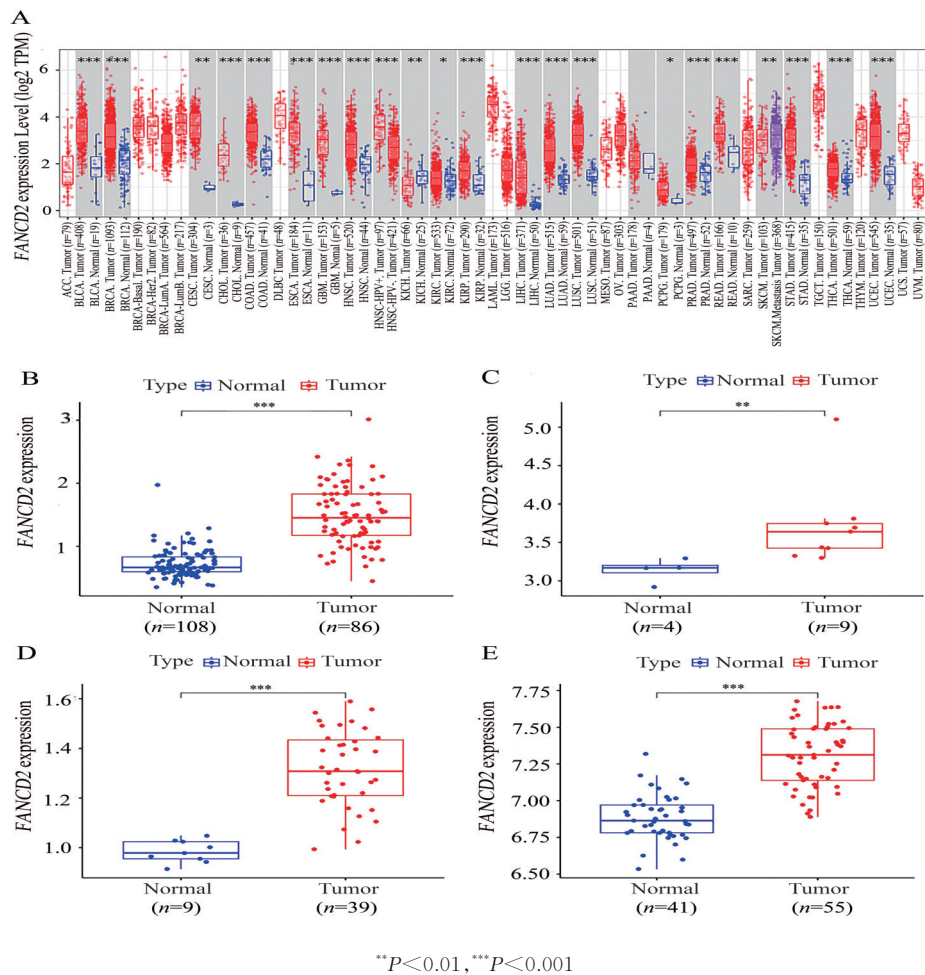
2 结果

2.1 *FANCD2* mRNA 在不同肿瘤中的表达

数据库分析发现,*FANCD2* 的表达在膀胱癌(bladder cancer, BLCA)、宫颈鳞癌(cervical squamous cell carcinoma, CESC)、结肠癌(colon adenocarcinoma, COAD)、食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)、头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)、肝细胞肝癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)、胰腺癌(pancreatic adenocarcinoma, PAAD)、前列腺癌(prostate adenocarcinoma, PRAD)、直肠腺癌(rectum adenocarcinoma,

READ)、胃癌(stomach adenocarcinoma, STAD)等肿瘤组织中的表达水平较正常组织高($P<0.001$)(图 1A)。此外,在TCGA数据库中,以108例正常肺组织样本为对照,本研究发现在86例PM组织样本中 *FANCD2* 基因 mRNA 表达水平升高

(图 1B)。除此之外,在GEO数据库3个不同的数据集 GSE12345、数据集 GSE42977 和数据集 GSE51024 分别验证了与正常间皮组织相比, *FANCD2* 基因 mRNA 表达量同样明显升高(图 1C~E)。



A:TIMER 数据库中 *FANCD2* 在不同癌症中的表达;B:TCGA 数据库 *FANCD2* 基因的表达;C:GEO GSE12345 数据集中 *FANCD2* 的表达;D:GEO GSE42977 数据集中 *FANCD2* 的表达;E:GEO GSE51024 数据集中 *FANCD2* 的表达

图 1 *FANCD2* 基因在正常组织和肿瘤组织中的表达

Fig 1 Expression of *FANCD2* gene in normal tissues and tumor tissues

2.2 *FANCD2* mRNA 表达水平与 PM 患者临床病理参数的相关性

基于TCGA数据库数据分析,PM患者不同的临床病理特征在 *FANCD2* 高低表达组的分布情况见表 2。其中, *FANCD2* 表达与PM患者年龄、性别、组织分型等无明显相关性($P>0.05$),而与肿瘤T分期有明显相关性($P<0.05$)。

2.3 *FANCD2* 基因 mRNA 表达与患者预后的关系

基于TCGA数据库数据进行生存分析,结果表明 *FANCD2* 高、低表达组的总生存期(overall survival, OS)差异具有统计学意义, *FANCD2* 高表达

组的总生存期低于低表达组(Logrank $P=0.00015$, $HR=2.6$)(图 2A);同样, *FANCD2* 高、低表达组的无疾病进展生存期(disease free survival, DFS)差异具有统计学意义(Logrank $P=0.028$, $HR=1.9$)(图 2B)。由此可知, *FANCD2* 基因高表达提示PM患者预后不良。单因素、多因素COX分析进一步证实,肿瘤组织类型和 *FANCD2* 基因表达水平是与PM预后相关的独立危险因素($P<0.05$)(表 3)。

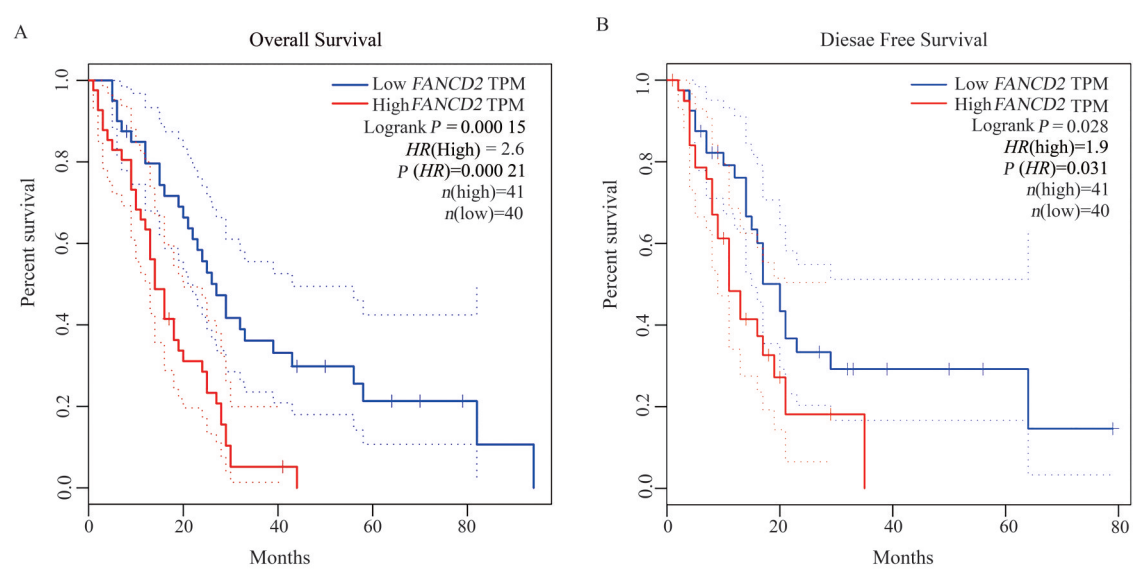
2.4 *FANCD2* mRNA 表达与 PM 免疫特征关系的分析

从TME分析可得,相较于 *FANCD2* 低表达

表2 PM患者 <i>FANCD2</i> 基因 mRNA 表达水平与临床病理参数的相关性 [<i>n</i> =86, <i>n</i> (%)]					
Tab 2 Correlation between <i>FANCD2</i> mRNA expression and clinicopathological parameters in PM patients [<i>n</i> =86, <i>n</i> (%)]					
临床病理参数	<i>n</i>	<i>FANCD2</i> 低表达	<i>FANCD2</i> 高表达	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)				3.150	0.076
<60	33	21(63.64)	12(36.36)		
≥60	53	22(41.51)	31(58.49)		
性别				0.080	0.782
女	16	7(43.75)	9(56.25)		
男	70	36(51.43)	34(48.57)		
AJCC分期				5.100	0.164
I期	10	4(40.00)	6(60.00)		
II期	16	11(68.75)	5(31.25)		
III期	44	18(40.91)	26(59.09)		
IV期	16	10(62.50)	6(37.50)		
T分期				10.290	0.036
T1	14	7(50.00)	7(50.00)		
T2	26	17(65.38)	9(34.62)		
T3	31	10(32.26)	21(67.74)		
T4	13	9(69.23)	4(30.77)		
TX	2	0(0.00)	2(100.00)		
N分期				1.910	0.752
N0	43	21(48.84)	22(51.16)		
N1	10	6(60.00)	4(40.00)		
N2	26	14(53.85)	12(46.15)		
N3	3	1(33.33)	2(66.67)		
NX	4	1(25.00)	3(75.00)		
M分期				0.370	0.083
M0	56	28(50.00)	28(50.00)		
M1	3	2(66.67)	1(33.33)		
MX	27	13(48.15)	14(51.85)		
肿瘤类型				2.934	0.230
双相型	23	8(34.78)	15(65.22)		
上皮型	61	34(55.74)	27(44.26)		
肉瘤型	2	1(50.00)	1(50.00)		

组,在高表达组中的基质细胞评分升高,而免疫细胞评分差异无统计学意义($P>0.05$)(图3A)。 *FANCD2*基因与免疫细胞浸润相关性见图3B,免疫细胞浸润分析结果显示, *FANCD2*和M2巨噬细胞、M1巨噬细胞、M0巨噬细胞等多种免疫细胞的浸润呈正相关,但与活化NK细胞、活化树突状细胞、浆细胞等免疫细胞的浸润呈负相关。其中, *FANCD2*基因在间皮瘤中与M2巨噬细胞浸润正相关,与活化NK细胞、活化树突状细胞浸润呈负相

关,差异具有统计学意义($P<0.05$)(图3C~E)。 另外,本研究在PM表达数据库中筛选出与 *FANCD2*具有表达相关性的基因(图4A),基因共表达分析显示,蛋白磷酸酶2A的癌性抑制因子(cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A, *CIP2A*)、永恒的昼夜节律调节器基因(timeless circadian regulator gene, *TIMELESS*)、DNA聚合酶 θ (DNA polymerase θ , Pol θ , *POLQ*)、*FANCI*、姐妹染色单体共凝结建立N-乙酰转移酶2(establish-



A;*FANCD2*基因 mRNA 表达与PM患者OS的关系;B;*FANCD2*基因 mRNA 表达与PM患者DFS的关系

图2 *FANCD2*基因表达水平与PM患者预后的相关性

Fig 2 Correlation between *FANCD2* expression and prognosis of PM patients

表3 影响PM患者预后的临床病理参数单因素多因素分析

Tab 3 Univariate and multivariate analysis of clinicopathological parameters affecting the prognosis of PM patients

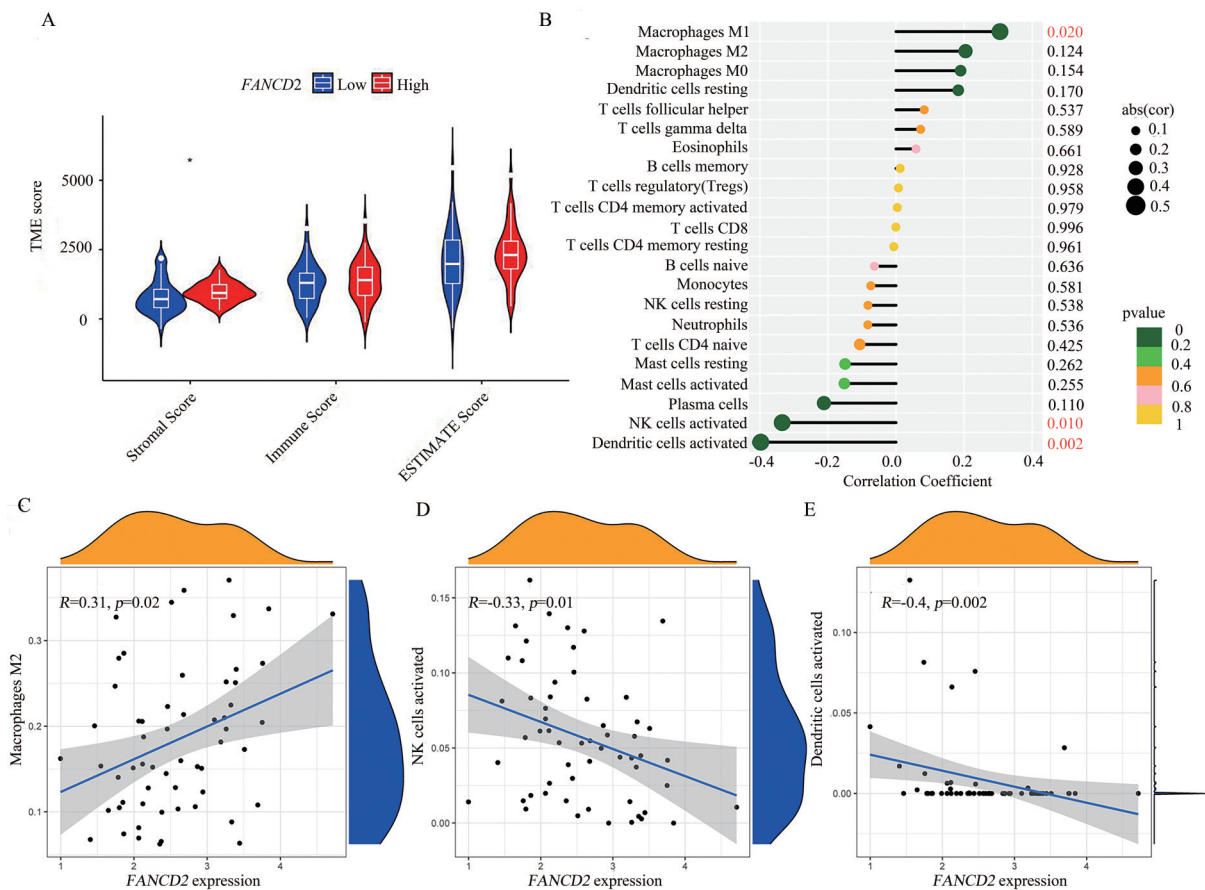
临床病理参数	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%CI)	P	HR (95%CI)	P
年龄(≥60岁 vs. <60岁)				
AJCC分期(vs. I期)				
II期	0.63(0.26~1.50)	0.296	0.40(0.06~2.53)	0.332
III期	0.79(0.38~1.67)	0.545	0.52(0.09~3.05)	0.467
IV期	0.70(0.30~1.67)	0.424	2.47(0.11~54.8)	0.568
T分期(vs. T1)				
T2期	0.98(0.47~2.04)	0.955	1.94(0.39~9.61)	0.415
T3期	1.14(0.56~2.32)	0.716	1.35(0.28~6.44)	0.708
T4期	0.77(0.33~1.83)	0.557	0.21(0.11~3.91)	0.298
TX期	2.12(0.46~9.81)	0.336	2.89(0.37~22.63)	0.312
N分期(vs. N0)				
N1期	0.88(0.42~1.82)	0.729	1.40(0.49~3.95)	0.529
N2期	0.77(0.44~1.34)	0.351	0.84(0.40~1.74)	0.630
N3期	1.69(1.52~5.53)	0.385	1.45(0.25~8.22)	0.677
NX期	1.74(0.53~5.68)	0.632	1.60(0.35~7.34)	0.548
M分期(vs. M0分期)				
M1分期	1.89(0.45~7.90)	0.386	0.15(0.06~22.23)	0.928
MX分期	0.64(0.38~1.10)	0.105	0.64(0.35~1.18)	0.151
肿瘤类型(vs. 混合型)				
上皮型	0.52(0.31~0.87)	0.014	0.38(0.20~0.71)	0.003
肉瘤型	3.45(0.44~26.94)	0.237	1.56(0.18~13.60)	0.688
<i>FANCD2</i> 表达量(高表达 vs. 低表达)	2.85 (1.74~4.66)	< 0.001	2.98 (1.60~5.55)	< 0.001

ment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2, *ESCO2*)、BUB1有丝分裂检查点丝氨酸/苏氨酸

激酶(BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B, *BUB1B*)与*FANCD2*呈明显正相关(图4B),

而干扰素诱导的跨膜蛋白 2(interferon induced transmembrane protein 2, *IFTM2*)、肿瘤抑制候选基因 1(tumor suppressor candidate 1, *TUSC1*)、转录延伸因子 A (SII)样 2(transcription elongation factor A like 2, *TCEAL2*)、磷脂酶 A2 组 IB 基因(phospholipase A2 group IB, *PLA2G1B*)、细胞色素 b5A 型基因(cytochrome b5 type A, *CYB5A*)与 *FANCD2*

呈明显负相关。同时,通过进一步分析 *FANCD2* 基因和多个免疫检查点基因表达水平的相关性,见图 4C、D,本研究发现 *FANCD2* 基因的表达水平与 *CD276*、TNF 受体超家族成员 25(TNF receptor superfamily member 25, *TNFRSF25*)、神经纤毛蛋白(neuropilin 1, *NRP1*)等免疫检查点基因表达呈正相关。



A:*FANCD2* mRNA 表达与肿瘤微环境的关系;B:*FANCD2* mRNA 表达与免疫细胞浸润的关系;C:*FANCD2* mRNA 表达与M2巨噬细胞浸润的关系;D:*FANCD2* mRNA 表达与活化的NK细胞浸润的关系;E:*FANCD2* mRNA 表达与活化树突状细胞浸润的关系

图3 PM中 *FANCD2* 基因表达水平与免疫细胞浸润的相关性

Fig 3 Correlation between *FANCD2* expression and immune infiltration in PM

2.5 基因富集分析

为了明确 *FANCD2* 在 PM 中的功能,对其进行 GO 与 KEGG 分析。在 GO 分析中显示 *FANCD2* 主要定位于纺锤体、染色体、凝集染色体、着丝粒、中间体等区域。与染色体分离、核裂解、核染色质分离、核有丝分裂、姐妹染色单体分离、有丝分裂姐妹染色单体分离等生物过程有关。参与微管、微管蛋白结合、丝氨酸蛋白激酶活性、微管运动活动、Yto 骨骼运动活动、组蛋白激酶活性等生化过程(图 5A)。在 KEGG 富集分析中,主要与细胞周期、卵母

细胞减数分裂等信号通路相关(图 5B)。基于 PM 表达数据本研究进一步对 *FANCD2* 基因进行基因集富集分析。结果显示,*FANCD2* 高表达组主要与黏着连接、扩张型心肌病、受体之间相互作用、黏着斑、肥厚型心肌病等信号通路相关(图 5C)。然而, *FANCD2* 低表达组主要富集在补体激活、循环免疫介导的体液免疫反应、体液免疫球蛋白复合物、循环免疫球蛋白复合物、免疫球蛋白受体结合等信号通路(图 5D)。

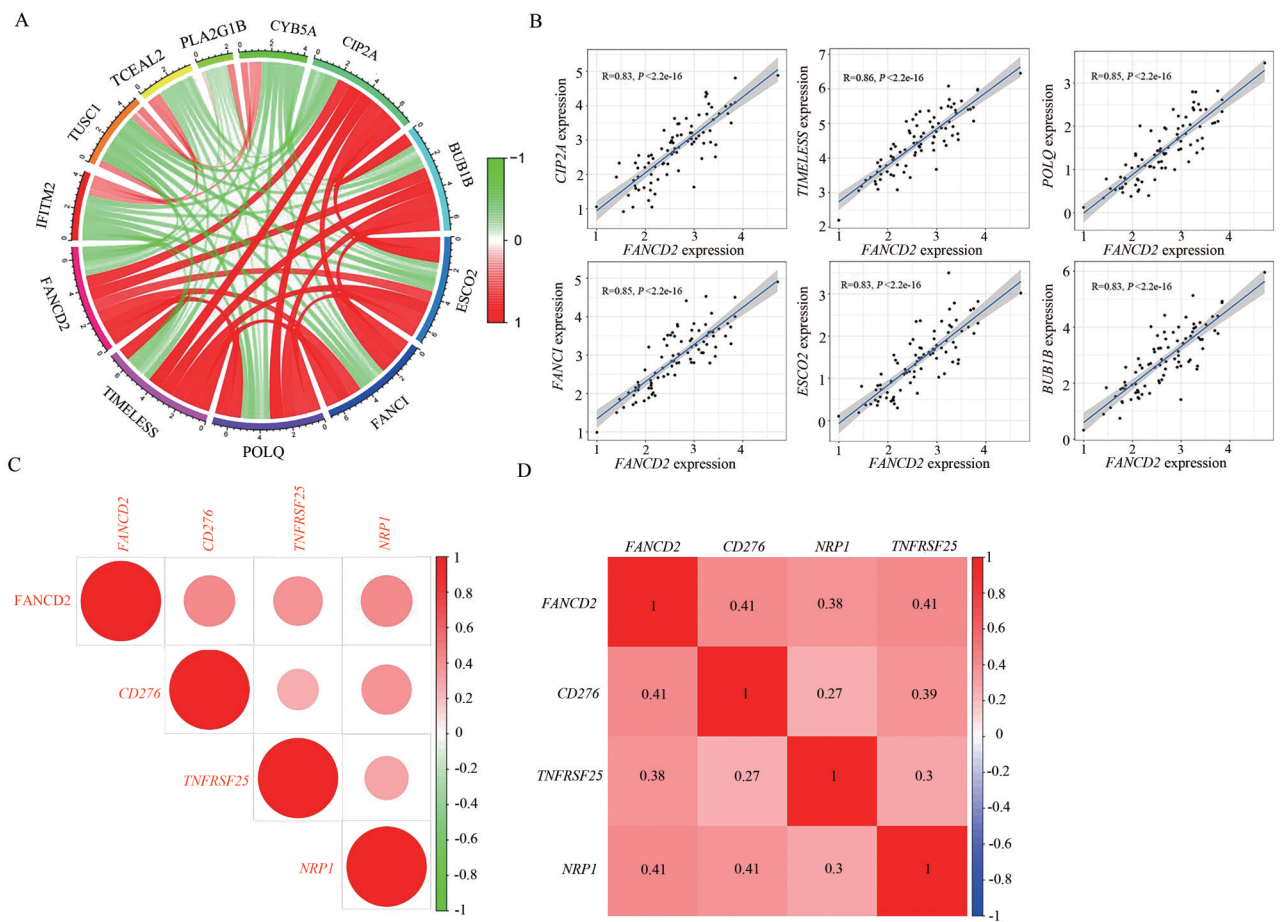


图4 *FANCD2* mRNA 表达与免疫检查点基因表达的相关性

Fig 4 Correlation between the expression of *FANCD2* mRNA and the expression of immune checkpoint genes

2.6 *FANCD2* 基因 mRNA 和蛋白质水平在 PM 细胞中高表达

RT-qPCR 实验结果进一步证实, 相比较于人正常胸膜间皮细胞 MeT-5A, *FANCD2* mRNA 在 4 株不同 PM 细胞株 (MTSO-211H、NCI-H28、NCI-H2052 和 NCI-H2452) 中的表达明显上调 (图 6A); Western blot 检测结果同样显示, 与人正常胸膜间皮细胞 MeT-5A 相比, *FANCD2* 蛋白在 4 株不同类型的 PM 细胞中的表达也明显上调 (图 6B)。

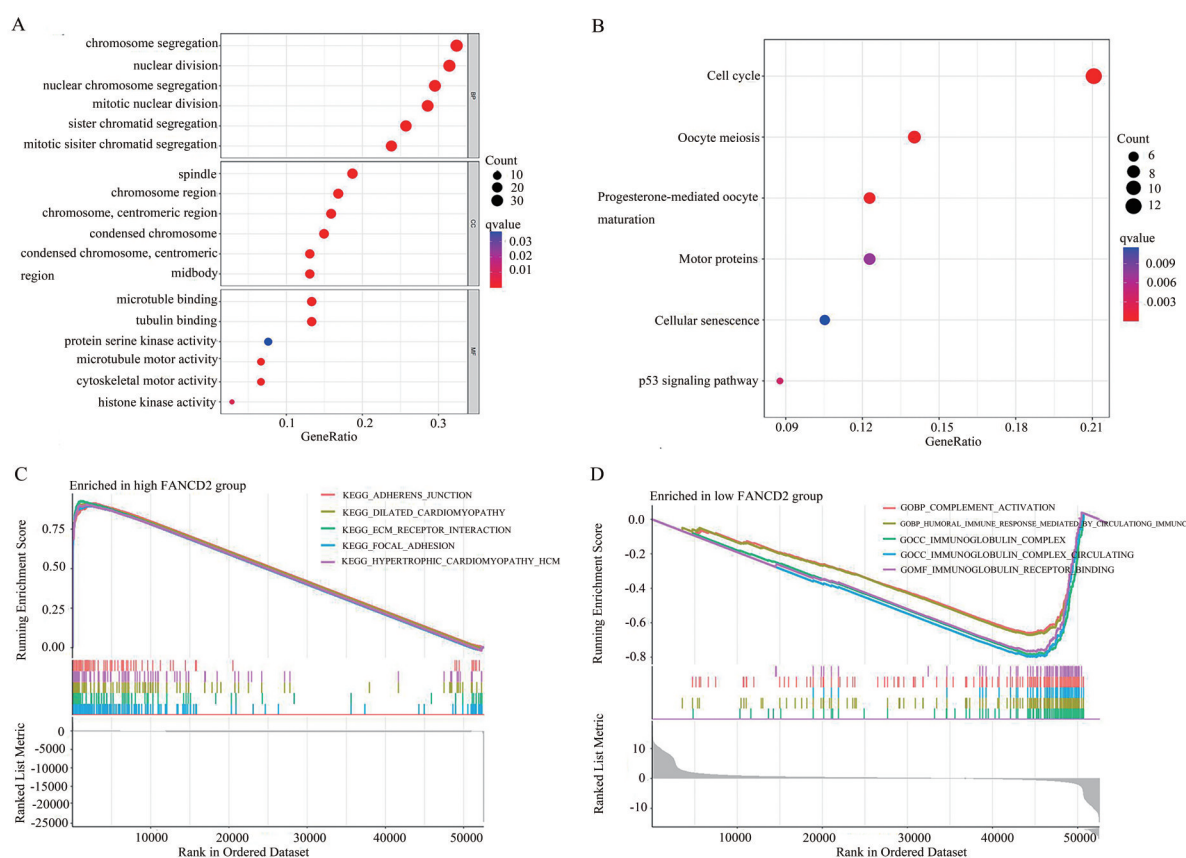
2.7 敲低 *FANCD2* 基因明显抑制 PM 细胞增殖和迁移

采用慢病毒载体介导转染, 将 si-*FANCD2*-1、si-*FANCD2*-2 及阴性对照 siControl 分别导入 NCI-H2052 细胞。转染后利用嘌呤霉素进行 48 h 筛选, 并通过传代培养, 成功建立敲低 *FANCD2* 的 NCI-H2052 稳转细胞株。实验发现, 敲低 *FANCD2* 后, 细胞内 *FANCD2* 蛋白及 mRNA 表达水平出现明显下调 ($P<0.01$) (图 7A、B)。CCK-8 实验结果显示, 随着时间推移, 细胞抑制率逐步升高, 在 48、96 h 时

间点, 细胞存活率与对照组相比差异具有统计学意义 ($P<0.01$) (图 7C)。克隆形成实验数据表明, 相较于对照组, si-*FANCD2*-1、si-*FANCD2*-2 组细胞的克隆形成数量明显减少 ($P<0.01$) (图 7D、E)。上述结果充分表明, 敲低 *FANCD2* 能够有效抑制间皮瘤细胞的增殖能力。此外, 划痕实验结果显示, 48 h 时 si-*FANCD2*-1、si-*FANCD2*-2 组间皮瘤细胞的迁移率较对照组明显下降 ($P<0.01$) (图 7F、G)。这一实验进一步证实敲低 *FANCD2* 可明显抑制 NCI-H2052 细胞的迁移能力。

2.8 敲低 *FANCD2* 基因对 PM 细胞周期的影响

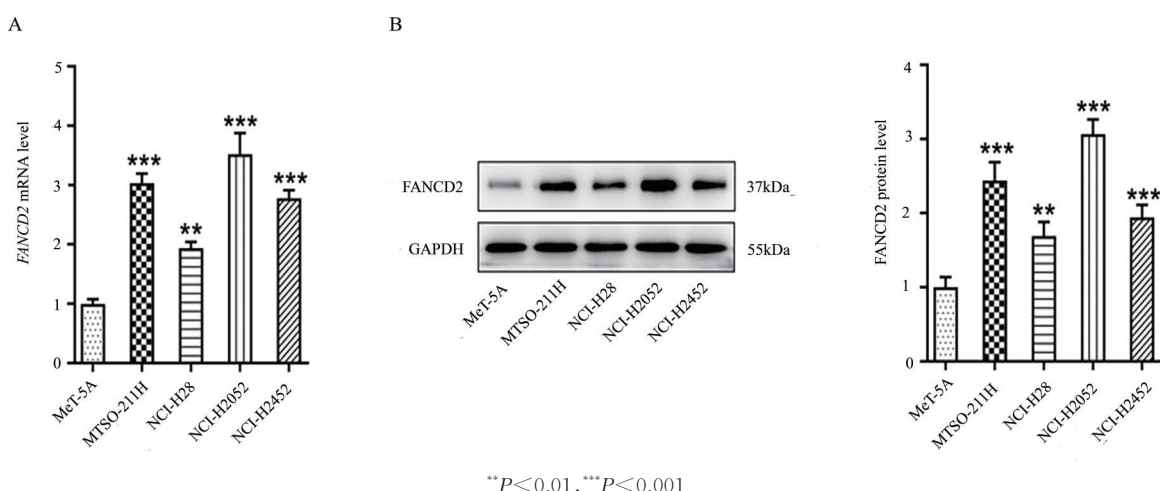
流式细胞术检测结果显示, 在 si-*FANCD2*-1、si-*FANCD2*-2 组中 G0/G1 期的细胞比例较 siControl 组增多, 相对应的 si-*FANCD2*-1、si-*FANCD2*-2 组 S 期的细胞比例较 siControl 组减少, 差异具有统计学意义 ($P<0.001$), 提示细胞周期出现 G1/S 期阻滞 (图 8A、B)。敲低 *FANCD2* 基因表达后, si-*FANCD2* 组细胞周期相关蛋白如细胞周期蛋白依赖性激酶 6 (cyclin-dependent kinase 6, CDK6)、



A:GO 富集分析,包括生物过程(biological process,BP)、分子功能(molecular function,MF)和细胞成分(cellular components,CC)分析;
B:KEGG 富集分析;C:*FANCD2* 高表达组的 GSEA 分析;D:*FANCD2* 低表达组的 GSEA 分析

图 5 *FANCD2* 表达的功能富集分析

Fig 5 Functional enrichment analysis of *FANCD2* expression



** $P<0.01$, *** $P<0.001$

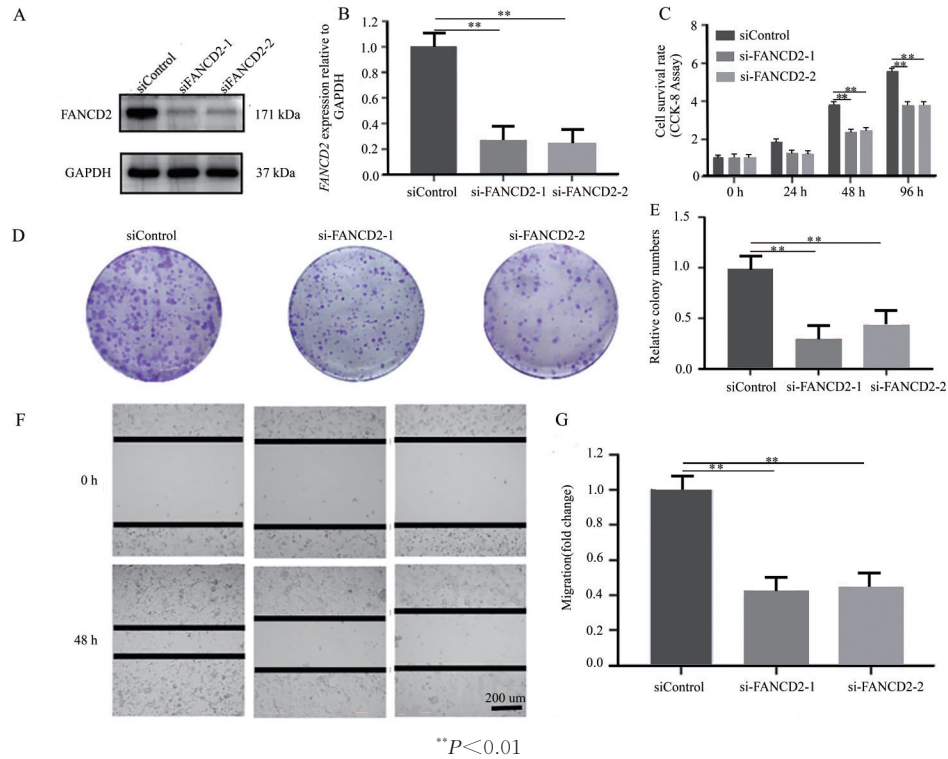
A:RT-qPCR 检测正常间皮细胞株 MeT-5A 和不同 PM 细胞株中 *FANCD2* mRNA 的表达;B:Western blot 检测正常间皮细胞株 MeT-5A 和不同 PM 细胞株中 *FANCD2* 蛋白的表达

图 6 *FANCD2* mRNA 和蛋白质在正常间皮细胞株 MeT-5A 和不同 PM 细胞株中的表达

Fig 6 The expression of *FANCD2* mRNA and protein in the normal mesothelial cells MeT-5A and different PM cell lines

细胞周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4,CDK4)、G1/S-特异性周期蛋白-D1(G1/S-specific cyclin-D1,cyclin D1)的表达水平较 siCon-

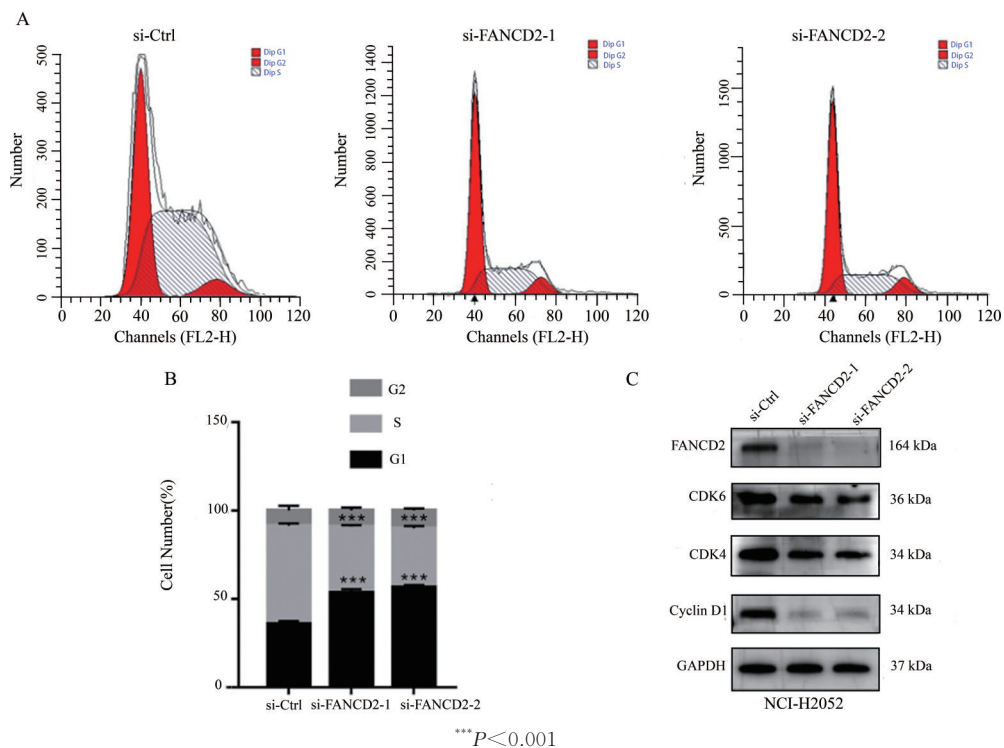
trol 组明显下降(图 8C)。以上结果说明 *FANCD2* 通过抑制细胞周期蛋白介导的细胞周期阻滞来降低 PM 细胞的增殖能力。



A: Western blot检测细胞中FANCD2蛋白表达水平; B: RT-qPCR检测细胞中FANCD2 mRNA表达水平; C: CCK-8实验检测细胞增殖能力; D、E: 克隆形成实验检测细胞增殖能力; F、G: 细胞划痕实验检测48 h细胞迁移率

图7 敲低FANCD2对NCI-H2052细胞增殖能力的影响

Fig 7 Effect of knocking down FANCD2 on the proliferation ability of PM cells



A: NCI-H2052细胞周期分布图; B: NCI-H2052细胞相对数; C: 敲低FANCD2后NCI-H2052细胞内CDK6、CDK4和Cyclin D1表达水平的变化

图8 敲低FANCD2基因表达后NCI-H2052细胞周期的变化

Fig 8 Effect of knocking down FANCD2 on the cell cycle of PM cells

3 讨论

大多数PM患者在确诊时已处于局部晚期,需

采用多模式综合治疗。PM的治疗方案取决于肿瘤分期、组织学亚型及患者的体能状态^[19]。鉴于转移

性疾病的治疗选择有限,且实体瘤存在明显的时空遗传异质性,导致治疗反应不佳和高复发率,预后普遍较差,因此亟需为PM寻找新的生物标志物以改善治疗效果^[20]。研究表明,*FANCD2*在癌症中参与调控肿瘤发生、细胞凋亡及其他生命过程^[21],如胶质母细胞瘤^[22]、食管鳞状细胞癌(esophagus squamous cell carcinoma, ESCC)^[23]和肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)^[24]。作为与铁死亡相关的基因,*FANCD2*可调节铁死亡进程。铁死亡与多种癌症类型的进展密切相关,在PM中尤其发挥关键作用,*FANCD2*被确认为这一过程的重要调节因子,并对疾病预后产生明显影响^[25]。已有研究证实,*FANCD2*基因高表达提示PM预后不良,敲低*FANCD2*基因的表达水平会增加PM细胞对铁死亡诱导剂的敏感性^[25]。

本研究通过整合TCGA及GEO数据库PM患者的临床数据与转录组测序数据,评估了*FANCD2*基因的表达特征。基于TCGA和GEO数据库获取PM患者的临床信息及RNA测序数据,并提取出*FANCD2*基因表达水平数据。基因表达差异分析显示,与正常间皮组织相比,PM组织中*FANCD2*基因mRNA表达量明显升高。除此之外,研究发现*FANCD2*基因表达量与PM患者中患者年龄和肿瘤T分期有显著相关性,符合现实生活中PM的人群分布特征^[26]。*FANCD2*基因高表达提示PM患者预后不良,单因素Cox回归分析表明,PM病理类型及*FANCD2*表达水平与PM患者预后明显相关。多因素Cox回归进一步证实,非上皮型PM及*FANCD2*基因高表达是患者预后不良的独立危险因素。故*FANCD2*基因具有明显的独立预测效能,提示其可能作为PM患者的预后生物标志物。肿瘤浸润免疫细胞对肿瘤进展及机体免疫检查点阻断治疗应答具有重要调控作用^[27]。本研究发现,*FANCD2*表达与M2型巨噬细胞浸润呈明显正相关。相关研究揭示,M2巨噬细胞可能作为免疫抑制性细胞群,通过促进免疫抑制性肿瘤微环境的形成、增强肿瘤免疫逃逸能力,最终导致肿瘤发生及进展的加速^[28]。成功的免疫治疗不仅取决于肿瘤微环境中免疫细胞的充分浸润,还取决于免疫检查点的表达^[29]。免疫检查点分析表明,*FANCD2*的表达与CD276、TNFRSF25、NRP1等免疫检查点分子的表达呈明显正相关。其中CD276在癌细胞中高表达,可促进肿瘤免疫逃逸并协助癌细胞逃避免疫监视^[30]。除此之外,NRP1不仅对肿瘤微环境中调节性T细胞(Treg)的内源性稳定具有重要作用,还

能明显抑制CD8⁺T细胞的抗肿瘤功能。因此,NRP1可作为具有重要肿瘤免疫学及免疫治疗价值的检查点靶标^[31,32]。之后,本研究通过对表达差异的基因进行GSEA富集分析发现,*FANCD2*基因可能通过细胞周期、细胞衰老、卵母细胞减数分裂等信号通路影响PM的生物学功能。既往相关研究发现,敲低*FANCD2*基因表达可增加DNA损伤和减少S期细胞,进而降低肿瘤细胞的增殖能力,这与PM中*FANCD2*在细胞周期、卵母细胞减数分裂和DNA复制的基因富集结果一致^[15]。除此之外,有研究通过筛选发现*CIP2A*、*TIMELESS*、*POLQ*、*FANCI*、*ESCO2*、*BUB1B*等多个基因与*FANCD2*基因表达呈明显正相关。其中,*CIP2A*作为蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)的内源性抑制剂,主要通过抑制PP2A介导的蛋白激酶B去磷酸化及稳定骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(myelocytomatosis oncogene, MYC)蛋白发挥促癌作用。而PM患者普遍存在*CIP2A*的过表达。该发现为通过个体化联合治疗方案改善PM患者预后提供了重要理论依据^[33]。相关研究也表明,*ESCO2*基因在LIHC、PAAD、LUAD及间皮瘤(mesothelioma, MESO)等多种恶性肿瘤中高表达且患者生存期明显缩短,其表达水平对癌症患者预后具有可靠预测效能。此外,*ESCO2*还参与细胞周期进程与肿瘤细胞增殖的调控网络^[34]。最近有研究显示,*FANCD2*明显促进LUAD细胞的增殖、侵袭和迁移能力,其促进癌症细胞增殖的能力可以通过调节细胞周期来实现^[35]。通过分析*FANCD2*在不同肿瘤中的致癌作用,发现*FANCD2*是癌症治疗的潜在生物标志物和治疗靶点^[35]。

为进一步探究*FANCD2*基因在PM发生、发展过程中,是否通过调控细胞周期在增殖与迁移中发挥作用,本实验构建了敲低*FANCD2*基因表达的稳转PM细胞株。实验结果显示,与对照组相比,敲低*FANCD2*基因表达后的PM细胞增殖能力和迁移能力明显降低,证实了PM细胞株中高表达的*FANCD2*能够促进肿瘤细胞增殖与迁移。为进一步剖析*FANCD2*影响PM细胞增殖的潜在分子机制,运用流式细胞术,检测敲低*FANCD2*基因对细胞周期的影响。实验数据表明,敲低*FANCD2*基因后,处于G0/G1期的细胞比例明显增加,而S期细胞比例则相应减少,提示细胞周期出现G1/S期阻滞。此外,敲低*FANCD2*后,其相关的细胞周期调控蛋白如CDK4、CDK6和cyclin D1表达水平也明显下降。CDK4/6和cyclin D1的下调可能介导G1/S

期转换受阻并最终导致PM细胞生长受到抑制。该结果进一步揭示,*FANCD2*可能通过调节细胞周期进程,参与对PM细胞增殖的调控。除此之外,相关研究表明,负责同源重组DNA修复的Fanconi贫血/BRCA2通路是PM化疗和放射耐药的关键通路。*FANCD2*可以作为PM治疗的靶点^[36]。在癌症早期,基因组不稳定性升高,*FANCD2*可能因DNA损伤增加而被激活(如发生泛素化修饰)。血液或体液样本中*FANCD2*的异常片段(如循环肿瘤DNA中的突变)可能成为早期筛查的潜在指标,尤其适用于缺乏特异性标志物的癌症(如胰腺癌)。放疗和部分化疗药物(如顺铂、丝裂霉素)通过诱导DNA损伤杀伤肿瘤细胞,而*FANCD2*介导的修复通路会降低肿瘤对这些治疗的敏感性。若肿瘤中*FANCD2*高表达,可能提示其DNA修复能力强,对顺铂等药物耐药,可能需调整治疗方案。相关研究也表明,*FANCD2*表达与增殖相关特征Ki-67、Cyclin A和MAI的表达密切相关,*FANCD2*和Ki-67在浸润性乳腺癌细胞中共表达^[37],提示*FANCD2*与其他标志物(如p53、Ki-67、DNA损伤相关基因)联合检测可提高预后评估的准确性。

综上所述,*FANCD2*作为参与DNA复制和损伤修复的关键调控因子,可能参与细胞周期的调控,进而影响PM细胞的增殖和迁移,但其具体作用机制仍有待实验验证。本研究仍然存在一定的局限性,后期将继续扩大临床标本量,并且收集PM患者的临床信息及生存资料来进一步验证*FANCD2*基因在PM疾病诊断的作用及预后评估中的价值。未来本课题组也将进一步探索*FANCD2*基因在PM中的生物学功能及其可能的分子机制,为未来PM治疗提供新的潜在靶点。

作者贡献度说明:

赵丹、李正亮:实验设计、文章撰写;杨文仲:数据分析、作图;王小忆、李锦松:数据整理;张国美、熊伟:研究指导、论文审阅、经费支持。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Janes SM, Alrifai D, Fennell DA. Perspectives on the treatment of malignant pleural mesothelioma[J]. N Engl J Med, 2021, 385(13): 1207-1218.
- Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, et al. The 2015 World Health Organization classification of tumors of the pleura: Advances since the 2004 classification[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(2): 142-154.
- Carbone M, Adusumilli PS, Alexander HR, et al. Mesothelioma: Scientific clues for prevention, diagnosis, and therapy[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 402-429.
- Musk AW, de Klerk N, Reid A, et al. Asbestos-related diseases[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2020, 24(6): 562-567.
- Meyerhoff RR, Yang CF, Speicher PJ, et al. Impact of mesothelioma histologic subtype on outcomes in the surveillance, epidemiology, and end results database[J]. J Surg Res, 2015, 196(1): 23-32.
- Hiltbrunner S, Fleischmann Z, Sokol ES, et al. Genomic landscape of pleural and peritoneal mesothelioma tumours[J]. Br J Cancer, 2022, 127(11): 1997-2005.
- Shao C, Li G, Huang L, et al. Prevalence of high tumor mutational burden and association with survival in patients with less common solid tumors[J]. JAMA Netw Open, 2020, 3(10): e2025109.
- Belcaid L, Bertelsen B, Wadt K, et al. New pathogenic germline variants identified in mesothelioma[J]. Lung Cancer, 2023, 179: 107172.
- Nepal M, Che R, Ma C, et al. *FANCD2* and DNA damage[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8): 1804.
- Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, et al. Arrest of S-phase progression is impaired in fanconi anemia cells[J]. Exp Cell Res, 2000, 260(2): 208-215.
- Li L, Tan W, Deans AJ. Structural insight into FANCI-FANCD2 monoubiquitination [J]. Essays Biochem, 2020, 64(5): 807-817.
- Tang X, Luo B, Huang S, et al. *FANCD2* as a novel prognostic biomarker correlated with immune and drug therapy in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma [J]. Eur J Med Res, 2023, 28(1): 419.
- Xie X, Zhao Y, Du F, et al. Pan-cancer analysis of the tumorigenic role of fanconi anemia complementation group D2 (*FANCD2*) in human tumors[J]. Genomics, 2024, 116(1): 110762.
- Zhou H, Wang YX, Wu M, et al. *FANCD2* deficiency sensitizes SHH medulloblastoma to radiotherapy via ferroptosis[J]. J Pathol, 2024, 262(4): 427-440.
- Zheng C, Ren Z, Chen H, et al. *FANCD2* promotes the malignant behavior of endometrial cancer cells and its prognostic value [J]. Exp Cell Res, 2022, 421(2): 113388.
- Li X, Liu J. *FANCD2* inhibits ferroptosis by regulating the JAK2/STAT3 pathway in osteosarcoma [J]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 179.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased cov-

- erage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- 18 Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
 - 19 Brims F, Gunatilake S, Lawrie I, et al. Early specialist palliative care on quality of life for malignant pleural mesothelioma: A randomised controlled trial[J]. *Thorax*, 2019, 74(4): 354-361.
 - 20 Wilson HL, D'Agostino RB, Meegalla N, et al. The prognostic and therapeutic value of the mutational profile of blood and tumor tissue in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncologist*, 2021, 26(2): e279-e289.
 - 21 Xia P, Sun Y, Zheng C, et al. p53 mediated apoptosis in osteosarcoma MG-63 cells by inhibition of FANCD2 gene expression[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7): 11101-11108.
 - 22 Song L, Wu J, Fu H, et al. Abnormally expressed ferroptosis-associated FANCD2 in mediating the temozolomide resistance and immune response in glioblastoma[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 921963.
 - 23 Lei LC, Yu VZ, Ko JMY, et al. *FANCD2* confers a malignant phenotype in esophageal squamous cell carcinoma by regulating cell cycle progression[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(9):2545.
 - 24 Miao H, Ren Q, Li H, et al. Comprehensive analysis of the autophagy - dependent ferroptosis - related gene *FANCD2* in lung adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 225.
 - 25 Wang Z, Huang J, Yang M, et al. Identification of the ferroptosis-related prognostic gene signature in mesothelioma[J]. *Gene*, 2024, 919: 148498.
 - 26 Lagergren J, Lagergren P. Oesophageal cancer [J]. *BMJ*, 2010, 341: c6280.
 - 27 Petitprez F, Meylan M, de Reynies A, et al. The tumor microenvironment in the response to immune checkpoint blockade therapies[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 784.
 - 28 Song D, Yang Q, Li L, et al. Novel prognostic biomarker TBC1D1 is associated with immunotherapy resistance in gliomas[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1372113.
 - 29 Li Y, Wu X, Sheng C, et al. IGSF8 is an innate immune checkpoint and cancer immunotherapy target [J]. *Cell*, 2024, 187(11): 2703-2716 e23.
 - 30 Flem-Karlsen K, Fodstad O, Tan M, et al. B7-H3 in Cancer-beyond immune regulation [J]. *Trends Cancer*, 2018, 4(6): 401-404.
 - 31 Chuckran CA, Cillo AR, Moskovitz J, et al. Prevalence of intratumoral regulatory T cells expressing neuropilin-1 is associated with poorer outcomes in patients with cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(623): eabf8495.
 - 32 Liu C, Somasundaram A, Manne S, et al. Neuropilin-1 is a T cell memory checkpoint limiting long-term antitumor immunity [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(9): 1010-1021.
 - 33 Pippa R, Boffo S, Odero MD, et al. Data mining analysis of the PP2A cell cycle axis in mesothelioma patients [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(6): 5284-5292.
 - 34 Huang Y, Chen D, Bai Y, et al. ESCO2's oncogenic role in human tumors: A pan-cancer analysis and experimental validation[J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 452.
 - 35 Xie X, Zhao Y, Du F, et al. Pan-cancer analysis of the tumorigenic role of Fanconi anemia complementation group D2 (*FANCD2*) in human tumors[J]. *Genomics*, 2024, 116(1):110762.
 - 36 Roe OD, Anderssen E, Sandeck H, et al. Malignant pleural mesothelioma: Genome-wide expression patterns reflecting general resistance mechanisms and a proposal of novel targets[J]. *Lung Cancer*, 2010, 67(1): 57-68.
 - 37 Van der Groep P, Hoelzel M, Buerger H, et al. Loss of expression of FANCD2 protein in sporadic and hereditary breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107(1):41-47.

[本文编辑] 朱 昊