·肝脏肿瘤·

DOI：10.12449/JCH240917

基于生物信息学分析构建肝细胞癌患者新型双硫死亡相关预后模型

宋 铮[1,2]，罗 维[3]，常秀娟[2]，杨永平[1,2]

1 北京大学302临床医学院，北京 100039

2 解放军总医院第五医学中心肝病医学部，北京 100039

3 湖北科技学院药学院，湖北 咸宁 437100

通信作者：杨永平，yongpingyang@hotmail.com（ORCID：0000-0002-8307-1095）

摘要：目的 探讨双硫死亡基因在肝细胞癌（HCC）中的表达情况，研究双硫死亡对HCC的预后价值并构建预后模型，分析其影响HCC的生物学过程和对索拉非尼耐药的影响。**方法** 从TCGA-LIHC数据库中收集HCC患者的mRNA表达谱和相应临床数据。利用LASSO-Cox回归算法构建TCGA队列中的4基因预后预测模型。在外部数据集ICGC和GSE14520队列中验证模型的预后效能。基于癌症药物敏感性基因组学数据分析双硫死亡模型对索拉非尼治疗反应的预测作用。此外，进行GO和KEGG功能分析，以深入了解双硫死亡相关基因的生物学功能。计量资料两组间比较采用成组t检验；计数资料两组间比较采用χ^2检验。采用Kaplan-Meier曲线和Log-rank检验评估预后差异；采用单因素和多因素Cox回归分析研究风险评分是否独立影响患者预后。**结果** 在TCGA队列中行单因素Cox回归分析，7个已知的双硫死亡相关基因与HCC总生存期（OS）显著相关（P值均<0.05）；进一步通过LASSO-Cox回归分析，构建双硫死亡相关的基因（DRG）预后模型，并计算风险评分（RS-DRG），RS-DRG=0.061 6×GYS1表达水平+0.152 8×LRPPRC表达水平+0.268 3×RPN1表达水平+0.183 5×SLC7A11表达水平。Log-rank检验表明双硫死亡模型中高风险评分患者的OS明显低于低风险评分患者（P<0.001）。根据多因素Cox回归结果，在TCGA和ICGC队列中，风险评分都是OS的独立预测因子（TCGA：HR=1.869，P=0.002；ICGC：HR=3.469，P=0.004）。Spearman相关分析表明RS-DRG与肿瘤微环境中的多种免疫细胞类型（包括B淋巴细胞、$CD4^+$ T淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞）的浸润水平呈显著正相关（P值均<0.05）。高风险评分组患者索拉非尼IC_{50}值更低，对索拉非尼更敏感（P<0.001）。KEGG/GO富集分析显示双硫死亡风险差异基因显著富集于多种有丝分裂相关的分子功能。**结论** 本研究构建了一种新的双硫死亡相关基因预后模型，在预测HCC预后方面具有潜在的临床应用价值；以双硫死亡基因为靶点可能是治疗HCC的一种很有前景的方法。

关键词： 癌，肝细胞；二硫化物类；计算生物学；比例危险度模型

基金项目： 中国科技部传染病专业国家重点项目（2018ZX10725506）；首都临床特色诊疗技术研究及转化应用（Z221100007422002）

Construction of a novel disulfidptosis-related prognostic model for patients with hepatocellular carcinoma based on bioinformatics analysis

SONG Zheng[1,2], LUO Wei[3], CHANG Xiujuan[2], YANG Yongping[1,2]. (*1. Peking University 302 Clinical Medical School, Beijing 100039, China; 2. Department of Hepatology, The Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100039, China; 3. School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China*)

Corresponding author: YANG Yongping, yongpingyang@hotmail.com (*ORCID: 0000-0002-8307-1095*)

Abstract: Objective To investigate the expression of disulfidptosis-related genes in hepatocellular carcinoma (HCC) and the prognostic value of disulfidptosis in HCC, to construct a prognostic model, and to analyze its impact on the biological processes of

HCC and sorafenib resistance. **Methods** The TCGA-LIHC database was used to collect the mRNA expression profiles and corresponding clinical data of HCC patients, and the LASSO-*Cox* regression algorithm was used to construct a four-gene predictive model for prognosis in the TCGA cohort. The external datasets ICGC and GSE14520 were used to validate the prognostic efficacy of the model, and the Cancer Drug Sensitivity Genomics (GDSC) data were used to investigate the value of the disulfidptosis model in predicting sorafenib treatment response, and gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were used to investigate the biological functions of disulfidptosis-related genes. The independent-samples *t* test was used for comparison of continuous data between two groups, and the chi-square test was used for comparison of categorical data between two groups. The Kaplan-Meier curve and the log-rank test were used to evaluate the difference in prognosis, and univariate and multivariate *Cox* regression analyses were used to investigate whether risk score was an independent influencing factor for patient prognosis. **Results** The univariate *Cox* regression analysis in the TCGA cohort showed that seven known disulfidptosis-related genes were significantly associated with overall survival (OS) in HCC (all $P<0.05$). The LASSO-*Cox* regression analysis was used to construct a prognostic model based on disulfidptosis-related genes (DRG), and the risk score RS-DRG was calculated as RS-DRG=(0.061 6)×GYS1 expression level+(0.152 8)×LRPPRC expression level+(0.268 3)×RPN1 expression level+(0.183 5)×SLC7A11 expression level. The log-rank test showed that the patients with a high risk score based on the disulfidptosis model had a significantly lower OS than those with a low risk score ($P<0.001$). Based on the results of the multivariate *Cox* regression analysis, risk score was an independent predictive factor for OS in both TCGA and ICGC cohorts (TCGA: hazard ratio [*HR*]=1.869, $P=0.002$; ICGC: *HR*=3.469, $P=0.004$). The Spearman correlation analysis showed that RS-DRG was significantly positively correlated with the infiltration level of various immune cells (including B lymphocytes, $CD4^+$ T lymphocytes, neutrophils, macrophages, and dendritic cells) in tumor microenvironment (all $P<0.05$). The patients in the high-risk score group had a significantly lower IC50 value of sorafenib and were more sensitive to sorafenib ($P<0.001$). The KEGG/GO enrichment analysis showed that the differentially expressed disulfidptosis-related genes were significantly enriched in various mitosis-related molecular functions. **Conclusion** This study constructed a novel prognostic model based on disulfidptosis-related genes, which has a potential clinical value in predicting the prognosis of HCC, and targeting disulfidptosis-related genes may provide a promising approach for HCC treatment.

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Disulfides; Computational Biology; Proportional Hazards Models

Research funding: The State Key Projects Specialized on Infectious Disease, Chinese Ministry of Science and Technology (2018ZX10725506); Research and Translational Application of Clinical Characteristic Diagnosis and Treatment Technology in the Capital (Z221100007422002)

肝细胞癌(HCC)被公认为全球第六大常见肿瘤，并且是导致肝硬化患者死亡的主要原因之一[1]。据预测，其发病率在未来还将有所上升[2]。尽管目前存在有效的治疗方案，但患者的总体生存率仍然较低，晚期患者的5年生存率仅为10%[3]。高度的异质性和复发率是HCC治疗的重大挑战，影响预后预测[4]。因此，迫切需要阐明HCC的分子机制，开发可以作为诊断和治疗靶点的新型分子，以改善HCC患者的临床预后。

近期研究揭示了一种新型细胞死亡方式——双硫死亡，这是一种独立于已知细胞死亡途径的程序性细胞死亡方式。当细胞过度表达SLC7A11时，在葡萄糖缺乏条件下会出现NADPH分子供应不足，导致无法将胱氨酸还原为半胱氨酸，引发二硫化物的积累，进而在肌动蛋白细胞骨架蛋白中形成异常的二硫键。随着这种积累的继续，最终会导致F-肌动蛋白崩溃，细胞因此迅速死亡[5]。

目前，二硫化物代谢与癌症之间的紧密联系备受关注[6]。在过度表达SLC7A11的癌细胞中，抑制葡萄糖转运体可以诱导二硫化物的耗竭，进而显著阻碍肿瘤的发生发展[7]。由于HCC细胞对氧化应激显示出高度敏感性[8]，并且SLC7A11在HCC组织中表达显著，因此，以双硫死亡通路为治疗靶点成为HCC治疗的新策略。然而，要深入了解双硫死亡的具体机制并评估其在HCC中的治疗潜力，仍需要进一步研究。本研究收集了HCC患者的mRNA表达谱和临床数据，包括TCGA、ICGC和GEO数据库。在TCGA-LIHC队列中，建立了一个以双硫死亡相关基因为基础的4基因预后模型，通过时间依赖性受试者工作特征曲线(ROC曲线)分析检测了风险评分的预测准确性，并通过ICGC-LIRI-JP和GSE14520(GPL3721)队列验证其可靠性。随后，通过深入进行功能富集分析，探讨了双硫死亡调节HCC发生发展的潜在机制。最后，

结合药物敏感性数据分析了双硫死亡对HCC患者索拉非尼治疗效果的影响。

1 资料与方法

1.1 数据收集和整理 从TCGA-LIHC数据库中获取了包含371例HCC患者的三级RNA测序数据和相应的临床信息。为确保数据的一致性，采用了“edgeR”软件包中的缩放方法，对基因表达谱进行了归一化处理。为了验证结果的稳定性，引入了ICGC-LIRI-JP项目的231个HCC样本和GSE14520（GPL3721）的225个HCC样本的RNA-seq数据和临床信息进行队列验证。所有数据均符合TCGA、ICGC和GEO的数据访问和发布政策，并且是公开可获取的。为了深入探索SLC7A11在HCC组织不同细胞群中的表达水平，收集了GSE146409中经过严格质量控制和细胞类型注释的单细胞测序数据，以确保分析的准确性。

1.2 细胞培养 Huh7和HepG2细胞购买自American Type Culture Collection（ATCC）。细胞在含有10% FBS、10 U/mL青霉素和10 g/mL链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基（DMEM）中培养，并置于37 ℃、5% CO_2的湿润培养箱中生长。为了研究SLC7A11对肝癌细胞在葡萄糖缺乏环境下双硫死亡的调控，使用Entranster-H4000（恩格林，中国）将SLC7A11过表达质粒（擎科生物，中国）转染到HCC细胞中。

1.3 实时荧光定量PCR（qRT-PCR） 为了从样本中提取总RNA，使用了TRIzol试剂（Thermo，Ambion）进行细胞裂解。随后，反转录程序为：25 ℃进行5 min，55 ℃进行30 min，75 ℃进行10 min，接着使用SuperScript Ⅲ Platinum一步法逆转录聚合酶链式反应试剂盒（Thermo Fisher Scientific，inc.）和SYBR qPCR Mix（Low ROX）（Genstar，Columbia）准备PCR反应体系。PCR的温度循环条件如下：95 ℃ 57 s，95 ℃ 16 s，56.5 ℃ 33 s，共进行40个循环。SLC7A11的PCR正向引物：5′-TCTCCAAAGGAGTTACCTGC-3′；反向引物：3′-AGACTCCCCTCAGGTAAAGTGAC-5′。

1.4 Western Blot实验 细胞蛋白提取后采用了双喹啉酸（BCA）试剂盒进行蛋白定量，并使用Western Blot进行蛋白质测定。SLC7A11抗体购买自MERCK公司（1∶1 000，GSAB5700735），次级抗体采用辣根过氧化物酶标记，并使用ECL试剂盒（Promega，W1015）进行蛋白质检测。

1.5 双硫死亡指标检测 采用$NADP^+$/NADPH检测试剂盒（WST-8法）（碧云天）、ATP检测试剂盒（碧云天）和胱氨酸摄取荧光法测试盒（Elabscience）分别进行NAPDH、ATP和胱氨酸摄取率检测。所有操作均按照说明书进行。

1.6 构建和验证双硫死亡相关预后模型 从已发表的文献中确定了10个与双硫死亡相关的基因（disulfidptosis-related gene，DRG）。使用“circlize”软件包评估这些基因在HCC中的相互关系，并进行可视化。采用单因素Cox分析法评估DRG对总生存期（OS）的影响。为防止过度拟合，使用“glmnet”软件包中的LASSO-Cox回归算法构建预后模型。候选预后DRG的归一化表达矩阵作为自变量，患者OS作为响应变量。通过十倍交叉验证确定了模型的惩罚参数λ，选择偏离度部分似然值最低的λ值。根据基因的归一化表达水平和回归系数计算患者风险评分，将患者分为高风险组和低风险组。之后，对风险评分的预测准确性进行时间依赖性ROC分析；同时，进行单因素和多因素Cox回归分析，以研究风险评分是否独立影响患者预后。

1.7 免疫浸润相关性分析 为了确保免疫评分评估的准确性，采用TIMER算法中的“immuneconv”软件包进行免疫评分分析，考虑组织特异性估算免疫细胞数量。因数据非正态分布，使用Spearman相关性分析评估DRG与免疫评分的相关性。

1.8 免疫检查点相关性分析 从TCGA-LIHC数据集中提取了SIGLEC15、TIGIT、CD274、HAVCR2、PDCD1、CTLA4、LAG3和PDCD1LG2等免疫检查点相关转录本的表达值进一步分析。根据SLC7A11的中位表达水平，将TCGA-LIHC数据集中的HCC样本分为两组。研究两组间免疫检查点表达水平差异。

1.9 功能富集分析 根据中位风险评分，TCGA-LIHC和ICGC-LIRI-JP项目中的HCC患者被分为高风险组和低风险组，分析两组之间差异表达基因（DEG）（$|LogFC|\geq 1$，$P_{adj}<0.05$）。两个数据集的DEG交集被视为可靠的双硫死亡风险差异基因（RDDG）。为了深入了解RDDG的生物学功能，使用R软件包"clusterProfiler"进行基因本体（GO）和京都基因组百科全书（KEGG）分析。为了校正多重检验，使用本杰明-霍奇伯格方法调整这些分析得出的P值。

1.10 索拉非尼治疗反应评估 每个样本的索拉非尼治疗反应预测均基于最大的公开药物基因组学数据库——癌症药物敏感性基因组学进行。预测过程采用“pRRophetic”软件包实现。样本的半数最大抑制浓度

(IC_{50})通过脊回归估算得出，所有参数均设为默认值。为消除不同组织和组织类型之间的批次效应，对重复基因表达量进行平均处理。

1.11 统计学方法 所有统计分析均使用R软件(4.0.3版)进行。为了比较肿瘤和邻近非肿瘤组织的基因表达水平，采用成组t检验进行组间比较。计数资料采用χ^2检验进行组间比较。采用Kaplan-Meier曲线和Log-rank检验评估预后差异；采用单因素和多因素Cox回归分析研究风险评分是否独立影响患者预后。P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SLC7A11在HCC中的差异表达和潜在生物学功能 在TCGA-LIHC队列中，与癌旁组织相比，SLC7A11在HCC中表达明显升高(图1a)。根据GSE146409数据集的单细胞测序结果分析各细胞簇(图1b)，在具有恶性增殖能力的癌细胞中SLC7A11的表达量相比于正常肝细胞大幅增加(图1c)。为了深入研究，根据SLC7A11在TCGA-LIHC队列中的中位表达水平，将HCC组织分为高SLC7A11组和低SLC7A11组。高SLC7A11组的多种免疫细胞浸润显著增加，包括B淋巴细胞、$CD8^+$ T淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞(图1d)。此外，高SLC7A11组中免疫检查点相关基因CD274、CTLA4、HAVCR2、PDCD1、PDCD1LG2和TIGIT的表达水平也显著上调(图1e)。以上结果提示，SLC7A11可能在HCC的免疫微环境中扮演重要角色。

为了进一步验证SLC7A11在肝癌细胞中相对于正常肝细胞的表达差异，进行qRT-PCR实验，结果表明在HepG2和Huh7细胞中，SLC7A11的表达量显著高于LO2细胞(图1f)。在HepG2和Huh7细胞中转染SLC7A11过表达质粒，进行qRT-PCR实验和Western Blot实验，提示SLC7A11的mRNA(图1g、h)和蛋白(图1i、j)表达均增加。给予低葡萄糖培养基培养24 h后，CCK8实验表明，转染了SLC7A11过表达质粒的HepG2和Huh7细胞活力相比转染了空载体的HepG2和Huh7细胞活力显著下降(图1k、l)。此外，在给予低葡萄糖培养基培养24 h后，过表达SLC7A11的HCC细胞中表现出更低的NADPH水平(图2a)，更低的ATP水平(图2b)和更高的胱氨酸摄取率(图2c)，证明了在肝癌细胞中SLC7A11过表达在葡萄糖缺乏的环境下引起肝癌细胞双硫死亡。

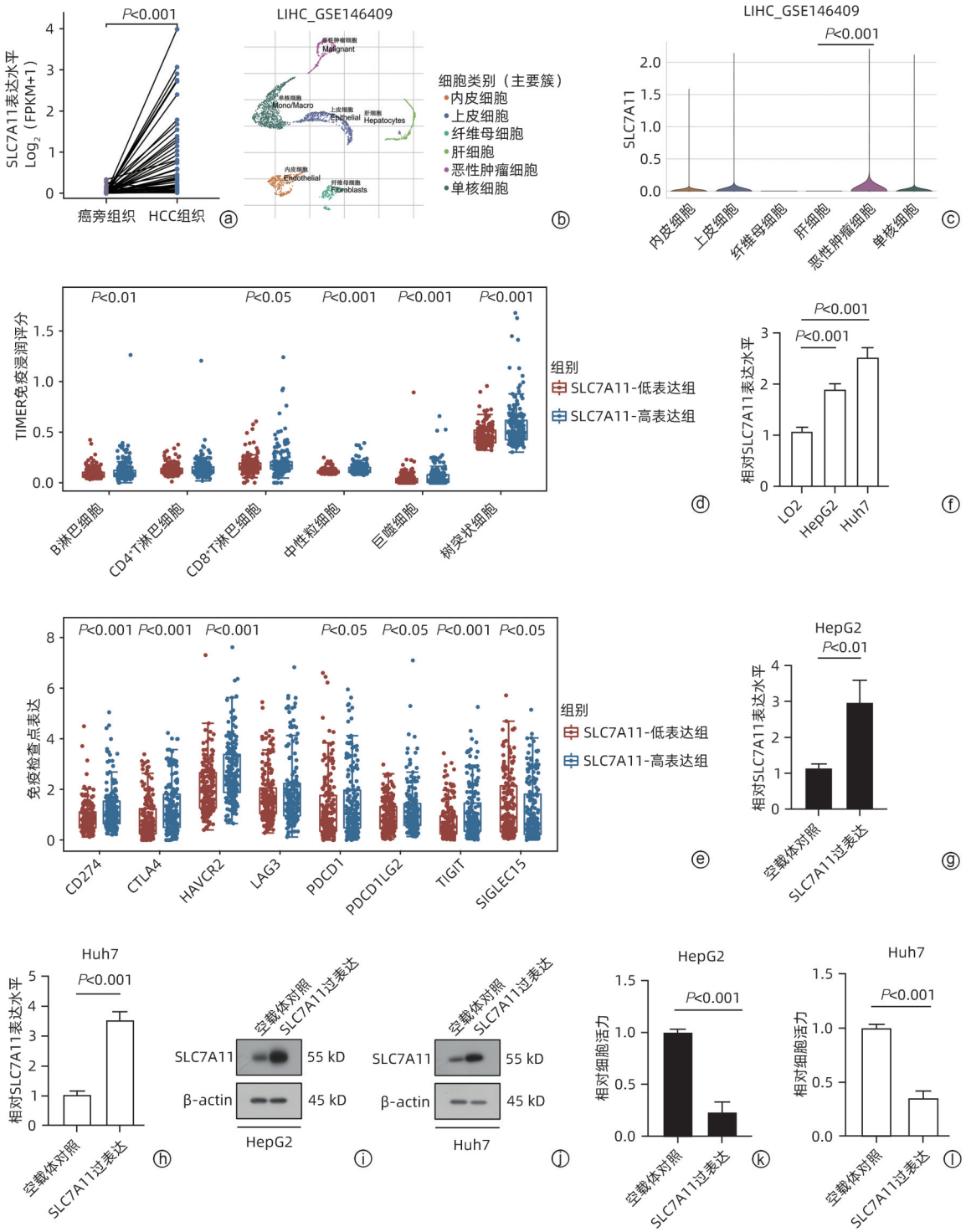
2.2 TCGA队列中预后相关DRG的鉴定 在HCC组织中，与配对的邻近组织相比，所有DRG的表达水平均显著升高(图3a)，其中7个DRG在单因素Cox回归分析中与OS有显著相关性，包括GYS1、OXSM、LRPPRC、NCKAP1、RPN1、SLC3A2和SLC7A11(图3b)。

2.3 依据TCGA队列构建预后模型 通过LASSO-Cox回归分析，构建一个纳入DRG的预后模型(图4a、b)。使用最小λ值0.040 1，并计算了双硫死亡基因相关的风险评分(RS-DRG)，具体公式如下：RS-DRG=0.061 6×GYS1表达水平+0.152 8×LRPPRC表达水平+0.268 3×RPN1表达水平+0.183 5×SLC7A11表达水平。

根据RS-DRG的中位值，将患者分为高RS-DRG组(n=185)和低RS-DRG组(n=185)。TCGA队列中高RS-DRG与高AFP水平、更高的组织学分级以及晚期病理分期有显著的相关性(P<0.05)(附录A)。图4c显示，与低RS-DRG组相比，高RS-DRG组的患者死亡风险更高。此外，Kaplan-Meier生存曲线也证实，高RS-DRG组患者的总体生存概率明显低于低RS-DRG组(P<0.001)(图4d)。使用时间依赖的ROC曲线评估了风险评分对OS的预测能力，结果显示在1、3和5年时的ROC曲线下面积(AUC)分别为0.765、0.681和0.611(图4e)。最后，对RS-DRG进行免疫评分分析，结果显示RS-DRG与肿瘤微环境中的多种免疫细胞类型(包括B淋巴细胞、$CD4^+$ T淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞)的浸润水平呈显著正相关(P值均<0.05)(图4f)。

2.4 外部数据集验证预后模型 在ICGC队列中，经过生存期分析验证，除了CYS1(P_{adj}<0.05)以外，其他3个基因(LRPPRC、RPN1和SLC7A11)均与不良的OS有显著的相关性(图5a)。为了评估这个基于TCGA队列构建的模型的稳定性，采用了同样的公式计算中位数，将ICGC队列的患者也区分为高RS-DRG组和低RS-DRG组。在ICGC队列中，高RS-DRG组患者与更高级的TNM分期以及更多的门静脉和静脉侵犯有显著的相关性(P值均<0.05)(附录B)。相较于低RS-DRG组，高RS-DRG组的患者面临更高的早期死亡风险(图5b)，并且其生存率也显著较低(P<0.001)(图5c)。此外，该模型在预测1、2、3年生存率时的AUC分别为0.723、0.746、0.771(图5d)。

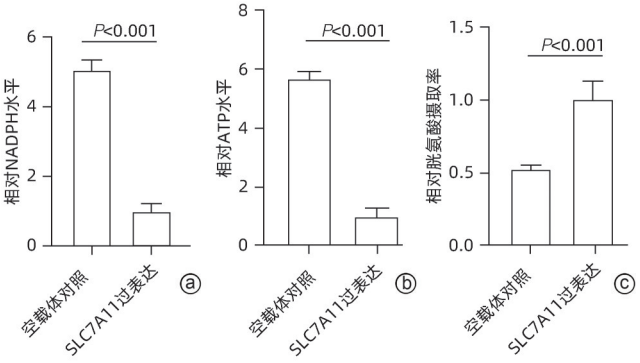
同样地，GSE14520队列中的患者也被分为高RS-DRG组和低RS-DRG组。与低RS-DRG组相比，高RS-DRG组的患者早期死亡概率更高(图5e)，其生存时间也显著较短(P=0.028)(图5f)。在该队列中，该模型在预测预测1、2、3年生存率时的AUC分别为0.585、0.620、0.576(图5g)。



注：a，SLC7A11在HCC和癌旁组织中的表达；b，GSE146609中细胞簇划分；c，SLC7A11在HCC组织不同细胞簇中的表达；d，SLC7A11高、低表达的HCC患者免疫细胞评分；e，SLC7A11高、低表达的HCC患者免疫检查点水平；f，qRT-PCR检测SLC7A11在肝癌细胞和肝细胞中表达水平；g、h，qRT-PCR检测HepG2细胞、Huh7细胞中SLC7A11过表达；i、j，Western Blot检测HepG2细胞、Huh7细胞中SLC7A11过表达；k、l，CCK8实验检测过表达SLC7A11的HepG2细胞、Huh7细胞在葡萄糖缺乏的环境下24 h后的细胞活力。

图1　SLC7A11在HCC中的差异表达和潜在生物学功能

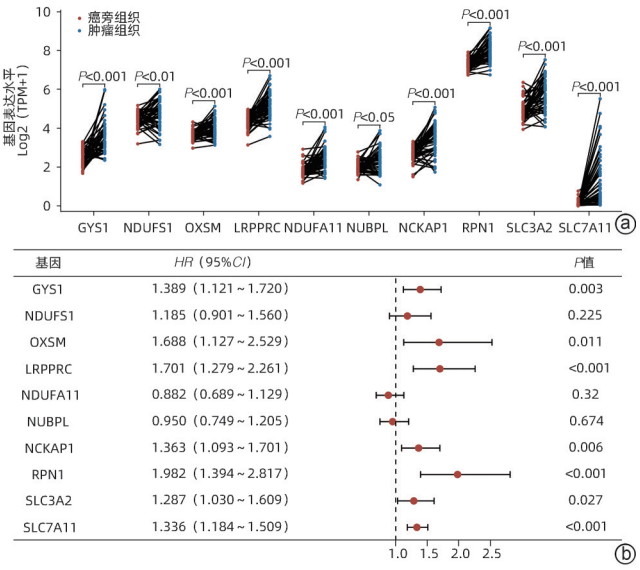
Figure 1　Differential expression and potential biological function of SLC7A11 in HCC



注：a，NADPH；b，ATP；c，胱氨酸摄取率。

图2 SLC7A11影响HepG2细胞在葡萄糖饥饿环境下发生双硫死亡

Figure 2 The effect of SLC7A11 on disulfidptosis in HepG2 cells under glucose starvation conditions



注：a，DRG在HCC组织和癌旁组织中的表达差异；b，DRG表达与OS之间的单因素Cox回归分析结果。

图3 TCGA队列中HCC预后相关DRG的鉴定

Figure 3 Identification of prognostic related DRG in the TCGA cohort

2.5 RS-DRG风险评分的独立预后价值 在TCGA和ICGC两个队列中，单因素和多因素Cox回归分析均显示RS-DRG风险评分为OS的独立影响因子（P值均<0.05）（图6）。此外，在GSE14520（GPL3721）队列中进行的单因素Cox回归分析也显示，RS-DRG与OS之间存在显著关联（HR=1.608，95%CI：1.050～2.464，P=0.029）。但在该队列的多因素分析中，RS-DRG并未显示出作为OS独立预测因子的能力（HR=1.501，95%CI：0.964～2.336，P=0.072）。

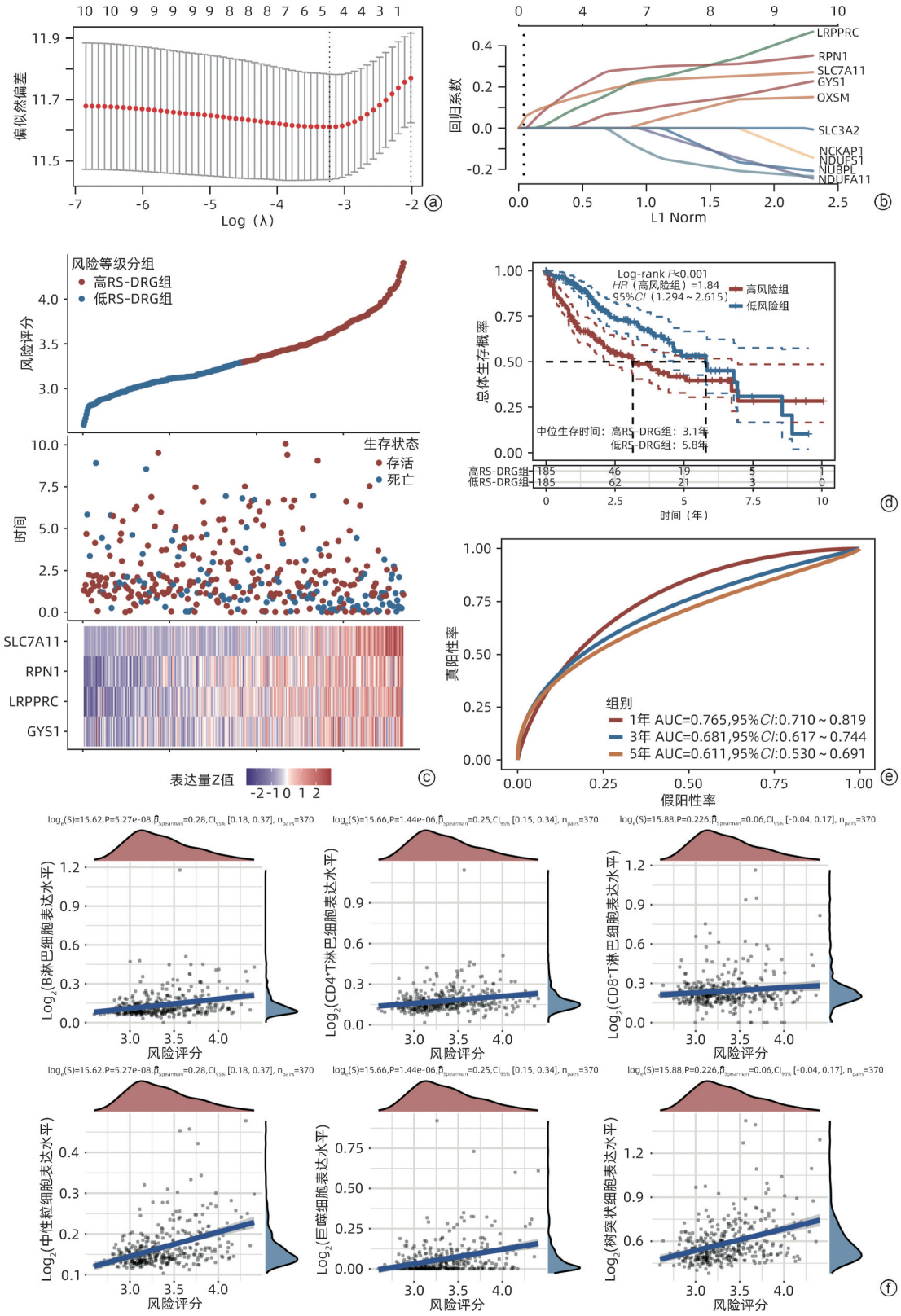
2.6 RS-DRG风险评分预测HCC患者使用索拉非尼治疗的反应 在评估HCC药物疗效和反应时发现，高风险组的患者索拉非尼IC_{50}值更低，索拉非尼治疗效果更好（图7a），RS-DRG预测索拉非尼反应的AUC达0.791（图7b）。进一步评估RS-DRG中4个基因与索拉非尼敏感性的关系，发现GYS1、LRPPRC、RPN1和SLC7A11的表达均与治疗反应呈负相关（P_{adj}<0.05）（图7c～f）。

2.7 TCGA和ICGC队列中RS-DRG风险评分功能分析 为了深入了解与RS-DRG相关的生物学功能和通路，通过结合TCGA和ICGC队列中的DEG（|LogFC|>1；P_{adj}<0.05）鉴定了可靠的RDDG（图8a～c），并进行了GO富集和KEGG通路分析。结果符合预期，显示出RDDG显著富集于多种有丝分裂相关的分子功能，如核分裂、有丝分裂中的微管细胞骨架组织、细胞器裂变以及有丝分裂纺锤体组织等（P_{adj}<0.05）。同时，也揭示出RDDG在细胞基底部分、基质膜和质膜上的富集（P_{adj}<0.05）（图8d）。此外，PPI网络分析揭示出相互作用的核心蛋白主要集中于调控细胞周期和有丝分裂的蛋白上（相互作用得分阈值为0.7，高置信度）（图8e）。最后对TCGA-LIHC和ICGC项目中的DEG执行了GSEA富集分析，结果显示主要富集于细胞连接组织、过氧物酶体和角质化等通路（P_{adj}<0.05）（图8f）。

3 讨论

本研究探索了4个与双硫死亡有关的基因，通过Lasso-Cox方法构建了一个新型HCC预后风险模型，并在2个外部独立队列（ICGC；GSE14520）中进行了模型验证。研究发现，双硫死亡风险评分与HCC的免疫浸润程度有显著关联，且较低的双硫死亡风险评分预示着HCC患者索拉非尼的治疗效果更佳。进一步的功能分析揭示了肝癌细胞中双硫死亡与细胞有丝分裂过程以及细胞外基质成分之间的紧密联系。重要的是，研究首次揭示了双硫死亡与HCC预后之间的相互作用，为当前对该疾病的理解提供了新的视角。

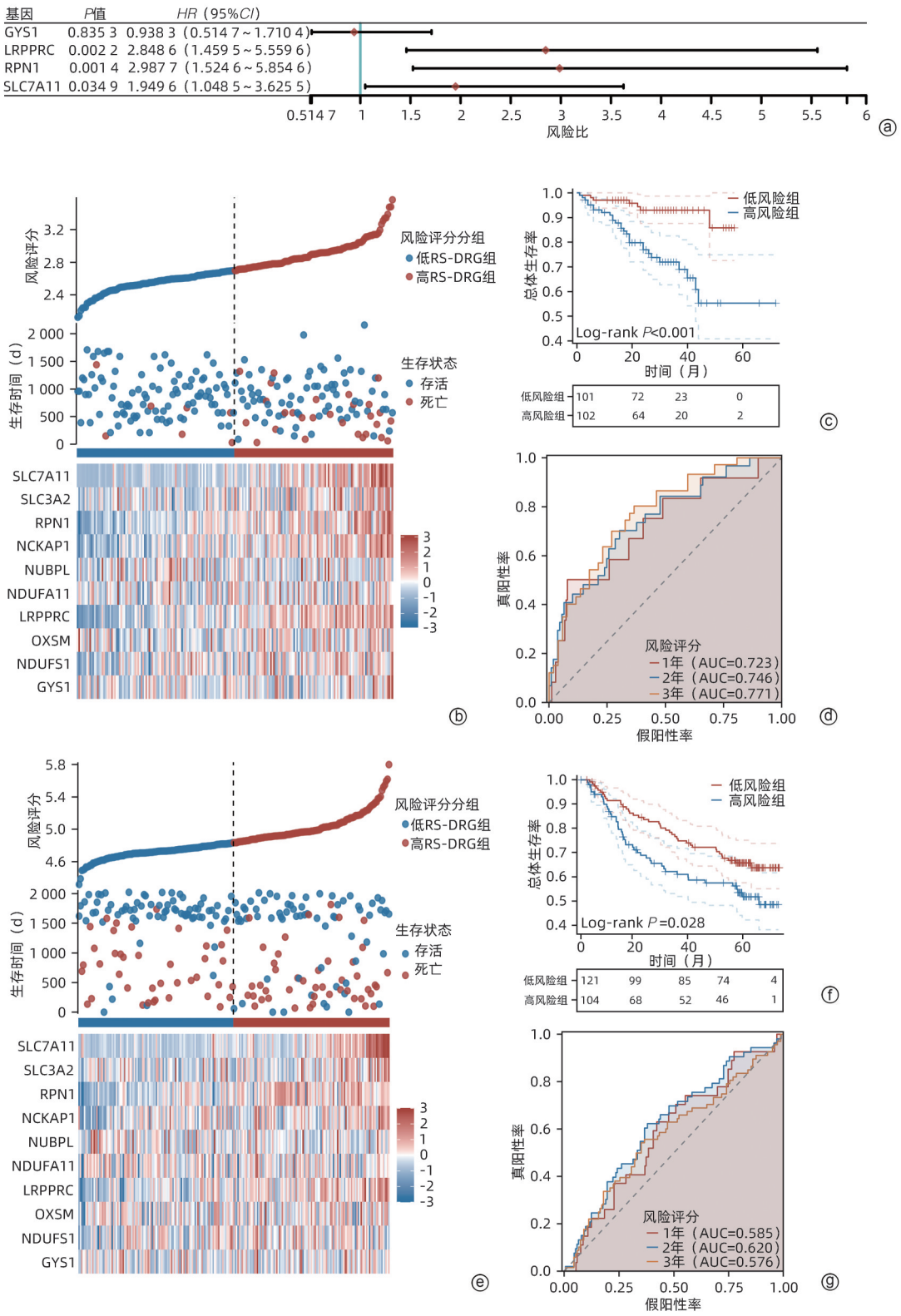
在高表达SLC7A11的癌细胞中，葡萄糖缺乏所引发的双硫死亡与过去研究中观察到的细胞凋亡存在显著差异。Liu等[5]的研究取得了重大突破，抑制二硫化物的积累能有效防止细胞在葡萄糖缺乏的环境中死亡，从而确立了这种特殊类型的细胞死亡与二硫化物应激之间的直接联系。HCC的肿瘤微环境常伴随着缺氧状况[9]。SLC7A11在肿瘤组织中的表达显著高于其周围正常组织。此外，单细胞分析进一步显示，具有高强度恶性增殖能力的HCC细胞中，SLC7A11的表达水平更高。因此，本研究结果表明，相较于邻近的正常组织，



注：a、b，采用10折交叉验证的LASSO Cox回归分析评估DRG的预后价值；c，TCGA队列中不同风险组HCC患者的生存状况；d，高RS-DRG组和低RS-DRG组HCC患者Kaplan-Meier曲线；e，时间依赖ROC曲线；f，6种免疫细胞浸润与RS-DRG之间的Spearman相关性。

图4　依据TCGA队列构建的预后模型及免疫相关性分析

Figure 4　Construction of a prognostic model in the TCGA cohort and immune correlation analysis



注:a,ICGC队列中单因素Cox回归分析与OS有关的基因;b,ICGC队列中不同风险组HCC患者的生存分布;c,ICGC队列中高风险组和低风险组HCC患者OS的Kaplan-Meier曲线;d,ICGC队列中时间依赖ROC曲线验;e,GSE14520队列中不同风险组HCC患者的生存分布;f,GSE14520队列中高风险组和低风险组HCC患者OS的Kaplan-Meier曲线;g,GSE14520队列中时间依赖ROC曲线。

图5 在ICGC队列和GSE14520队列中验证预后模型

Figure 5 Validation of the prognostic model in the ICGC and GSE14520 cohort

单因素分析

变量	*HR*（95%*CI*）	*P*值
风险评分（高 vs 低）	1.900（1.335～2.704）	<0.001
炎症（是 vs 否）	1.228（0.755～1.997）	0.409
年龄（岁）	1.012（0.999～1.026）	0.078
性别（男 vs 女）	0.816（0.573～1.163）	0.260
组织学分级（G3+G4 vs G1+G2）	1.120（0.781～1.606）	0.539
肿瘤分期（III+IV vs Ⅰ+Ⅱ）	2.518（1.725～3.677）	<0.001

多因素分析

变量	*HR*（95%*CI*）	*P*值
风险评分（高 vs 低）	1.869（1.267～2.757）	0.002
肿瘤分期（III+IV vs Ⅰ+Ⅱ）	2.298（1.566～3.372）	<0.001

TCGA-LIHC数据集

单因素分析

变量	*HR*（95%*CI*）	*P*值
风险评分（高 vs 低）	4.568（1.987～10.498）	<0.001
年龄（岁）	1.015（0.980～1.052）	0.400
性别（男 vs 女）	0.534（0.264～1.080）	0.081
病毒（HBV vs 其他）	0.769（0.349～1.695）	0.515
TNM分期（III+IV vs Ⅰ+Ⅱ）	2.836（1.449～5.551）	0.002
门静脉侵犯（是 vs 否）	3.142（1.599～6.174）	<0.001
静脉侵犯（是 vs 否）	2.400（1.175～4.903）	0.016
胆管侵犯（是 vs 否）	0.531（0.072～3.890）	0.533
纤维化程度（严重 vs 轻微）	1.089（0.548～2.163）	0.808
饮酒史（是 vs 否）	0.400（0.203～0.788）	0.008
吸烟史（是 vs 否）	0.657（0.339～1.276）	0.215

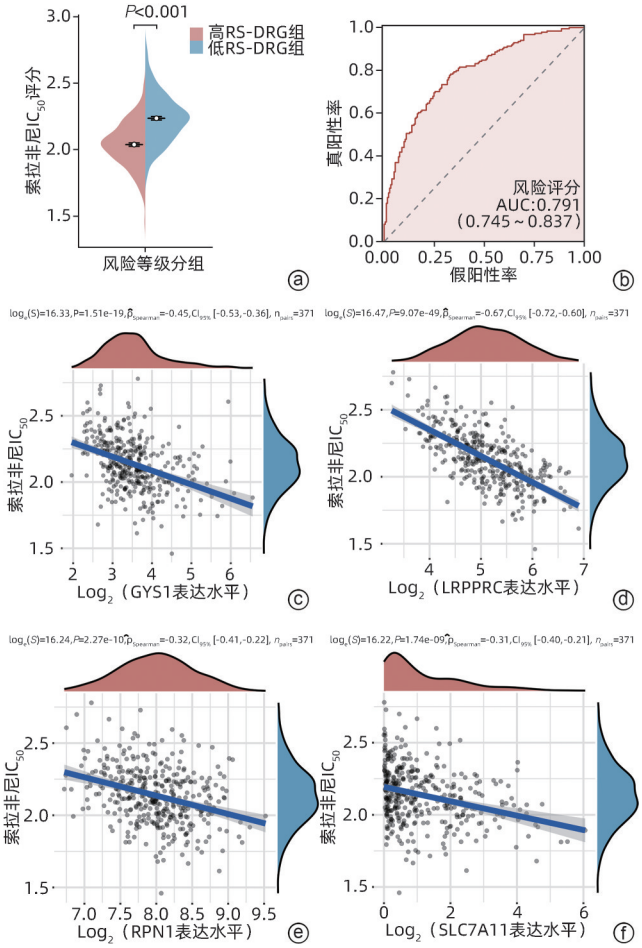
多因素分析

变量	*HR*（95%*CI*）	*P*值
风险评分（高 vs 低）	3.469（1.493～8.065）	0.004
性别（男 vs 女）	0.465（0.196～1.103）	0.082
TNM分期（III+IV vs Ⅰ+Ⅱ）	2.535（1.072～5.999）	0.034
门静脉侵犯（是 vs 否）	1.757（0.816～3.781）	0.150
静脉侵犯（是 vs 否）	1.678（0.713～3.952）	0.236
饮酒史（是 vs 否）	0.375（0.166～0.849）	0.019

ICGC-LIRI-JP数据集

图6　RS-DRG风险评分的独立预后价值

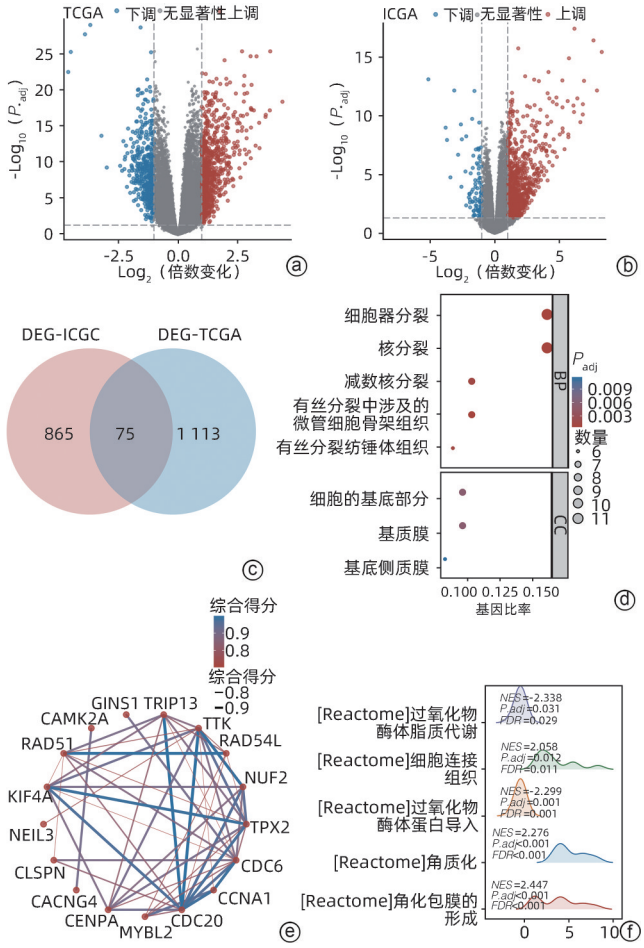
Figure 6　Independent prognostic value of RS-DRG value



注：a，不同风险评分组中索拉非尼IC50分数的分布；b，风险评分预测HCC患者对索拉非尼疗效的AUC值；c～f，索拉非尼IC50分数与GYS1、LRPPRC、RPN1和SLC7A11表达的Spearman相关性分析。

图7　RS-DRG预测HCC患者使用索拉非尼治疗的反应

Figure 7　RS-DRG predicted the response of sorafenib treatment in HCC



注：a、b，根据风险评分高低筛选差异表达基因；c，两个数据集的差异表达基因的交集；d，差异基因GO和KEGG通路富集分析；e，差异基因PPI网络分析；f，差异基因的GSEA富集分析。

图8　TCGA和ICGC队列中风险评分功能分析

Figure 8　Functional analyses of risk score in the TCGA and ICGC cohort

HCC组织对缺氧环境引发的双硫死亡表现出更高的敏感性。该发现开启了一个全新的研究窗口，即针对葡萄糖转运体进行治疗，以在HCC细胞中诱导双硫死亡的产生，同时保护正常细胞。这是一个充满希望的研究途径，有望在未来为HCC的治疗提供新的策略。

HCC的高度异质性导致了不同的临床结果和治疗反应[10]。靶向双硫死亡有望成为治疗HCC的新策略。为了深入探索这一可能性，本研究聚焦于双硫死亡如何抑制HCC的进展，建立了一个由4个基因构成的新型双硫死亡预后模型：SLC7A11、LRPPRC、GYS1和RPN1。这4个基因都在HCC的发展和免疫浸润中扮演了重要角色。SLC7A11的高表达会增加胱氨酸的摄取，进而导致二硫化物的积累和随后的二硫化物应激反应[11]。然而，在葡萄糖缺乏的环境中，由于磷酸戊糖途径产生的NADPH有限，细胞无法有效应对这种二硫化物应激[5]。GYS1是一个在糖原合成中起关键作用的酶，它在缺氧条件下会被迅速诱导，并与糖原积累呈正相关。尽管过去的肿瘤学研究表明GYS1的表达与多种癌症相关，但它对HCC的具体影响仍然未知[12-13]。LRPPRC参与线粒体的氧化磷酸化过程，在HCC组织中显著上调，并与更高级的病理分期、更低的总生存率和无病生存率有关[14-15]。有趣的是，抑制GYS1和LRPPRC可以与葡萄糖饥饿协同作用，从而诱导双硫死亡[5]。RPN1编码内质网中的一种N-寡糖转移酶[16]，是双硫死亡过程中必不可少的基因，但其潜在机制仍不清楚。综上所述，预后模型中的所有基因都与调节细胞双硫死亡相关，且每一个都是导致HCC预后不良的风险因素。

尽管对于双硫死亡与癌症的关系已有一定了解[6]，但肿瘤免疫与双硫死亡之间的具体作用仍不明确。在HCC中，双硫死亡风险特征模型评分与免疫细胞浸润之间存在显著相关性，进一步证明了双硫死亡机制与免疫浸润之间的密切关系。笔者分析表明，HCC患者中出现较高双硫死亡风险与肿瘤微环境中B淋巴细胞、$CD4^+$ T淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的浸润增加有关。然而，双硫死亡如何影响抗肿瘤免疫细胞的具体功能和机制尚未明了，还需要实验室和临床研究的进一步证据。

本研究观察到RS-DRG评分与HCC患者接受索拉非尼治疗的敏感性之间存在显著相关性。一些研究人员[17]提出，索拉非尼通过诱导铁死亡来对HCC产生抑制作用。本研究中，RS-DRG值高的患者，其索拉非尼的IC_{50}值较低，这意味着对索拉非尼的治疗反应更为敏感。因此，这部分患者可以被视为索拉非尼治疗的理想人选。在临床治疗中，临床医生可以根据患者的基因检测结果预测患者的双硫死亡风险，从而更有效地指导患者进行索拉非尼的靶向治疗。然而，对于RS-DRG值较低的HCC患者，可能代表了对索拉非尼治疗具有耐药性的特定亚组。通过深入了解这些发现，可以为这一特定亚群探索潜在的治疗方法，这有助于克服索拉非尼的耐药性，从而提高疗效。

在研究不同风险组之间的DEG时，进行了GO和KEGG分析，观察到与有丝分裂相关的各种分子功能出现富集，包括核分裂、微管细胞骨架组织、细胞器裂变和有丝分裂纺锤体组织等。从双硫死亡的分子学机制上判断，这很有可能是由于葡萄糖缺乏的环境下，SLC7A11过表达的肝癌细胞内二硫化物异常积累，影响了细胞有丝分裂中纺锤体的形成。Liu等[5]发现，二硫化物积累导致肌动蛋白细胞骨架蛋白中的二硫键异常，肌动蛋白网络崩溃，随后细胞死亡。本研究首次提出，HCC细胞的双硫死亡可能与细胞有丝分裂和细胞周期关系密切。这一新颖发现表明，细胞骨架蛋白中二硫键的形成以及细胞分裂初始阶段纺锤体的形成过程和运动功能与二硫化物积累诱导的细胞死亡之间存在潜在联系。本研究为了解HCC进展的内在机制开辟了新的途径。然而，要验证和支持这一假设，还迫切需要进一步实验研究。

综上所述，本研究成功构建了一种基于肝癌细胞双硫死亡机制的新型HCC预后模型，并验证了该模型在TCGA数据库中能够独立预测HCC患者的总体生存率，同时通过外部数据集（ICGC；GSE14520）进一步确认了其预测性能。此外，研究还揭示了双硫死亡与HCC肿瘤微环境中免疫细胞浸润以及索拉非尼治疗反应之间的潜在关联，为深入了解HCC的生物学机制提供了新的线索。研究还发现双硫死亡与细胞有丝分裂之间存在潜在关联，这一发现为探索HCC的发生和发展机制提供了新的视角。这些结果不仅有助于加深对HCC生物学特性的理解，还可能为开发更有效的治疗策略提供重要参考。

但本研究也存在一些局限性。首先，面临着缺乏前瞻性真实世界数据的问题，这无疑阻碍了确认其临床实用性的能力。因此，为了在真实世界环境中验证该模型的有效性，利用前瞻性数据开展进一步的研究是至关重要的。其次，依靠单一标志构建预后模型的固有局限性，这可能会导致预后评估的不准确和偏差。为了克服这个问题，未来的研究可以考虑结合多个标志或因素，

以更全面和准确地预测患者的预后情况。此外，必须强调的是，本研究中涉及的关键环节即双硫死亡和有丝分裂之间的具体关系尚未得到实验研究或阐明。虽然本研究确定了这两种现象之间的潜在联系，但要充分了解其潜在机制并阐明二者之间相互作用的性质，还需要进一步的实验研究。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：宋铮、罗维参与研究数据的获取分析解释过程以及论文起草；常秀娟修改文章内容；杨永平设计研究思路。



附录A和B见二维码

参考文献：

[1] CAO PB, YANG AQ, LI PY, et al. Genomic gain of *RRS1* promotes hepatocellular carcinoma through reducing the RPL11-MDM2-p53 signaling[J]. Sci Adv, 2021, 7(35): eabf4304. DOI: 10.1126/sciadv.abf4304.

[2] FENG M, SURESH K, SCHIPPER MJ, et al. Individualized adaptive stereotactic body radiotherapy for liver tumors in patients at high risk for liver damage: A phase 2 clinical trial[J]. JAMA Oncol, 2018, 4(1): 40-47. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.2303.

[3] WEI L, LEE D, LAW CT, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4681. DOI: 10.1038/s41467-019-12606-7.

[4] FENG MX, MA MZ, FU Y, et al. Elevated autocrine EDIL3 protects hepatocellular carcinoma from anoikis through RGD-mediated integrin activation[J]. Mol Cancer, 2014, 13: 226. DOI: 10.1186/1476-4598-13-226.

[5] LIU XG, NIE LT, ZHANG YL, et al. Actin cytoskeleton vulnerability to disulfide stress mediates disulfidptosis[J]. Nat Cell Biol, 2023, 25(3): 404-414. DOI: 10.1038/s41556-023-01091-2.

[6] ZHENG PJ, ZHOU CT, DING YM, et al. Disulfidptosis: A new target for metabolic cancer therapy[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 103. DOI: 10.1186/s13046-023-02675-4.

[7] ZHAO SY, WANG LY, DING W, et al. Crosstalk of disulfidptosis-related subtypes, establishment of a prognostic signature and immune infiltration characteristics in bladder cancer based on a machine learning survival framework[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1180404. DOI: 10.3389/fendo.2023.1180404.

[8] KUDO Y, SUGIMOTO M, ARIAS E, et al. PKCλ/ι loss induces autophagy, oxidative phosphorylation, and NRF2 to promote liver cancer progression[J]. Cancer Cell, 2020, 38(2): 247-262.e11. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.05.018.

[9] WU QC, ZHOU WH, YIN SY, et al. Blocking triggering receptor expressed on myeloid cells-1-positive tumor-associated macrophages induced by hypoxia reverses immunosuppression and anti-programmed cell death ligand 1 resistance in liver cancer[J]. Hepatology, 2019, 70(1): 198-214. DOI: 10.1002/hep.30593.

[10] CALDERARO J, ZIOL M, PARADIS V, et al. Molecular and histological correlations in liver cancer[J]. J Hepatol, 2019, 71(3): 616-630. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.06.001.

[11] ZHONG ZY, ZHANG CJ, NI S, et al. NFATc1-mediated expression of SLC7A11 drives sensitivity to TXNRD1 inhibitors in osteoclast precursors[J]. Redox Biol, 2023, 63: 102711. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102711.

[12] FAVARO E, BENSAAD K, CHONG MG, et al. Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells[J]. Cell Metab, 2012, 16(6): 751-764. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.10.017.

[13] XIE H, SONG J, GODFREY J, et al. Glycogen metabolism is dispensable for tumour progression in clear cell renal cell carcinoma[J]. Nat Metab, 2021, 3(3): 327-336. DOI: 10.1038/s42255-021-00367-x.

[14] LIU JY, CHEN YJ, FENG HH, et al. LncRNA SNHG17 interacts with LRPPRC to stabilize c-Myc protein and promote G1/S transition and cell proliferation[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 970. DOI: 10.1038/s41419-021-04238-x.

[15] WANG HH, TANG AM, CUI YY, et al. LRPPRC facilitates tumor progression and immune evasion through upregulation of m^6A modification of PD-L1 mRNA in hepatocellular carcinoma[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1144774. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1144774.

[16] LIU XY, XIAO WD, ZHANG YN, et al. Reversible phosphorylation of Rpn1 regulates 26S proteasome assembly and function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(1): 328-336. DOI: 10.1073/pnas.1912531117.

[17] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Broadening horizons: The role of ferroptosis in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(5): 280-296. DOI: 10.1038/s41571-020-00462-0.

收稿日期：2023-12-25；**录用日期：**2024-03-18

本文编辑：刘晓红

引证本文：SONG Z, LUO W, CHANG XJ, et al. Construction of a novel disulfidptosis-related prognostic model for patients with hepatocellular carcinoma based on bioinformatics analysis[J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(9): 1822-1832.
宋铮, 罗维, 常秀娟, 等. 基于生物信息学分析构建肝细胞癌患者新型双硫死亡相关预后模型[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(9): 1822-1832.