DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0182
文章编号 1671-8852(2025)04-0493-07

甲状腺未分化癌相关铁死亡关键基因筛选及免疫浸润分析

徐 润 李金朋 陈伟贞 吴高松
武汉大学中南医院甲状腺乳腺外科 湖北 武汉 430071

摘要 目的：分析甲状腺未分化癌（ATC）组织中铁死亡相关基因的表达，构建PPI网络并对ATC中与铁死亡通路相关的重要基因进行关键基因验证和免疫浸润检测。方法：从GEO数据库中获取数据，归一化后筛选差异基因进行富集分析，与数据库取交集后，通过蛋白互作（PPI）网络及MCC评分确定得到铁死亡关键基因，评估诊断价值。使用CIBERSORT分析评估样本的免疫浸润情况。结果：确定8个铁死亡基因与ATC密切相关，并具备潜在诊断作用。GO和KEGG分析得出了可能与肿瘤相关的细胞途径和生物成分。此外，通过免疫浸润分析确定了ATC样本中免疫细胞的组成和与铁死亡基因的相关性，发现铁死亡关键基因影响免疫细胞表达从而导致肿瘤进展，揭示调节性T细胞-CD4记忆激活T细胞通路在ATC中的潜在作用。结论：本研究确定了8个铁死亡关键基因为ATC诊断的生物标志物和潜在治疗靶点，同时还发现可能通过影响调节性T细胞-CD4记忆激活T细胞导致免疫环境紊乱的通路，为进一步探讨ATC的发病机制提供理论基础。

关键词 甲状腺未分化癌；铁死亡；生物信息学分析；生物标志物；免疫浸润
中图分类号 R736.1
文献标识码 A
开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

Screening of hub iron death-related genes in anaplastic thyroid carcinoma and immune infiltration analysis

XU Run, LI Jinpeng, CHEN Weizhen, WU Gaosong
Dept. of Breast and Thyroid Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To analyze the expression of iron death-related genes in anaplastic thyroid carcinoma (ATC) tissue, construct a protein-protein interaction (PPI) network, and detect hub gene and immune infiltration related to the iron death pathway in ATC. **Methods:** Data were obtained from the GEO database, normalized, and screened for differential genes for enrichment analysis, and after taking the intersection with the database, the hub genes related to iron death were determined to be obtained through the protein-protein interaction (PPI) network and the MCC score to assess the diagnostic value. Additionally, CIBERSORT analysis was used to assess the immune infiltration status of samples. **Results:** Eight iron death genes were identified to be closely associated with ATC and potentially serve as diagnostic markers. GO and KEGG analyses yielded cellular pathways and biological components that may be relevant to tumors. Furthermore, immune infiltration analysis determined the

课题来源：湖北省自然科学基金面上项目（编号：2021CFB427）；武汉大学中南医院转化医学与交叉学科研究联合基金项目（编号：ZNJC202304）
作者简介：徐润，男，1998—，医学硕士生，主要从事甲状腺乳腺肿瘤研究，E-mail:xurunwhu@163.com
通信作者：吴高松，男，1966—，医学博士，主任医师，博士生导师，主要从事甲状腺乳腺肿瘤研究，E-mail:Wugaosongtj@163.com

composition of immune cells in ATC samples and their correlation with iron death genes, revealing that hub iron death genes influence immune cell expression, thereby contributing to tumor progression. It unveiled the potential role of the regulatory T cell-CD4 memory-activated T cell pathway in ATC. **Conclusion:** This study identified eight hub iron death genes as diagnostic biomarkers and potential therapeutic targets for ATC. Additionally, it discovered pathways possibly causing immune environment disturbance through the regulation of regulatory T cell-CD4 memory activated T cells, laying the foundation for further exploration of the pathogenesis of ATC.

Key Words Anaplastic Thyroid Carcinoma; Ferroptosis; Bioinformatics Analysis; Biomarkers; Immune Infiltration

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤,根据2023年全球癌症统计,甲状腺癌已位列女性恶性肿瘤的第7位[1]。我国2022年甲状腺癌新发病人数达46.61万例,人民健康受到严重威胁[2]。未分化型甲状腺癌(anaplastic thyroid carcinoma,ATC)是甲状腺癌恶性程度最高的分型,虽然ATC发病率较低,但患者病情进展快于分化型和低分化型,中位生存期远低于甲状腺癌患者的平均生存期,仅为4~10个月。目前尚没有理想的治疗手段,不仅传统的手术切除及放射性碘治疗对ATC效果较差,化学药物治疗和新型靶向治疗也没有明显的效果,患者死亡原因主要是局部肿瘤过大压迫气管或肿瘤远处转移导致的多器官衰竭[3-4]。因此,研究ATC的发生发展机制及寻找新的诊断方法及治疗靶点是目前研究的热点与难点。

铁死亡是特殊的由磷脂过氧化驱动的细胞死亡过程,特点是铁元素的参与,可被包括氧化还原平衡、氨基酸、脂肪和糖的代谢、线粒体活性和铁处理等多个细胞代谢通路调控,与多种疾病有重要联系。许多器官病理损伤过程是由铁死亡引起的。据报道,耐药性癌细胞,特别是处于间质状态且易于转移的癌细胞,对铁死亡非常敏感。因此,在治疗器官缺血损伤、肿瘤耐药和其他与脂质过氧化相关的退行性疾病方面,靶向铁死亡诱导和抑制的药物具有巨大研究价值[5-7]。

研究[8]表明,ATC的发生和进展过程中都有铁死亡信号通路的身影。研究[9]发现,在ATC中,肿瘤细胞的增殖、迁移和转移与铁死亡信号通路的活性密切相关。此外,该通路的激活还可能与ATC的耐药性相关。这些发现为将铁死亡作为治疗ATC的潜在靶点提供了新的证据,同时也为开发新的治疗策略提供了重要线索。

此次实验借助GEO公共数据库中的生物信息学方法筛选铁死亡相关基因,评估免疫细胞浸润水平并进行相关性分析,有助于探索ATC发生发展的分子机制,进一步揭示免疫系统与ATC的作用机制,为临床诊疗ATC提供可能的潜在生物标志物和新的免疫治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 数据来源 在GEO数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)中搜索ATC患者的样本转录组测序信息,排除不符合要求的样本后筛选得到GSE53072和GSE65144两个ATC数据集,将其纳入研究。GSE53072包括5例肿瘤和4例正常样本,而GSE65144则包括12例肿瘤和13例正常组织样本。在FerrDb数据库(http://www.zhounan.org/ferrdb/current/)下载页面获取铁死亡相关的驱动基因、抑制基因、标记基因及未分类的基因,合并整理后得到564个基因信息。

1.2 数据集中的差异基因表达分析 使用R软件对样本数据集GSE53072和GSE65144进行预处理,对数据进行归一化及标准化后合并。使用“Limma”包对数据进行差异分析计算,将表达量为$\log_2$(fold change,FC)>1.5同时满足adj. P<0.05的基因确认为我们需要的差异基因后,通过“pheatmap”及“ggplot2”包展示筛选得到的数据。

1.3 功能富集分析 使用“clusterProfiler”包对差异基因的基因本体论(gene ontology,GO)进行功能注释,探索与铁死亡相关的细胞组分和生物过程。由京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集分析得到潜在通路。通过“ggplot2”包对得到的基因的功能及潜在通路可视化。

1.4 构建蛋白互作网络并筛选Hub基因 将差异基因与整理得到的铁死亡相关基因取交集,以韦恩图表示两个基因集相交得到潜在的生物标志物。

登陆 STRING 在线网站（https://www.string-db.org/）上传铁死亡相关基因集，选择种属为人种，设置 confidence 评分＞0.4 为蛋白互作（protein-protein interaction，PPI）要求，完成 PPI 分析，得到网络图后下载文件进一步分析。通过 CytoHubba 插件挖掘 Hub 基因，并使用 MCC 算法进行评分，确定评分最高的前 8 位基因为研究所需的铁死亡关键基因集。

1.5　评估铁死亡关键基因诊断价值　绘制铁死亡关键基因在 ATC 与正常组织样本的表达水平，使用“pROC”包绘制受试者工作特征曲线，计算其曲线下面积（area under curve，*AUC*），当 *AUC* 值大于 0.75 时认为其具有较好的诊断价值。

1.6　CIBERSORT 免疫浸润分析　使用“CIBERSORT”包进行反卷积分析，评估 ATC 和正常组织样本中 22 个免疫细胞的免疫浸润情况，观察潜在生物标志物在 ATC 患者肿瘤样本及正常组织样本中免疫细胞的差异表达情况，分析其免疫浸润特征。将 Hub 基因与免疫细胞进行相关性分析。选择两个最重要的关键免疫细胞进行可视化。

1.7　统计学分析　所有数据的统计学分析均使用 R 软件（4.3.2 版本）验证。当计算得到的 $P<0.05$ 时认为数据差异有统计学意义。

2　结果

2.1　筛选 ATC 差异基因　通过 R 软件预处理样本数据集 GSE53072 和 GSE65144，进行数据标准化，如图 1 所示，筛选得到 1 303 个差异表达的基因，其中有 655 个过表达的基因，648 个呈低表达的基因。

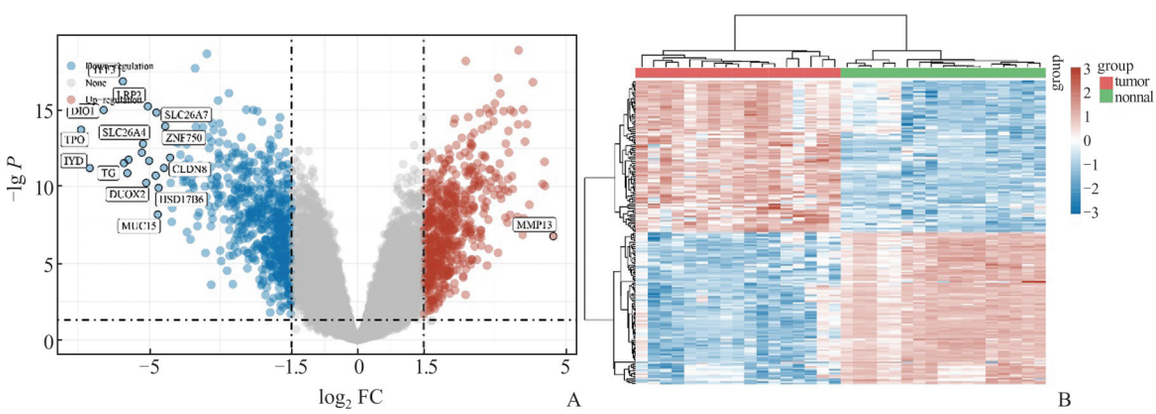


图 1　数据集 GSE53072 和 GSE65144 数据预处理后差异分析

A. 差异表达基因火山图；B. ATC 患者肿瘤组织样本（tumor）及正常组织样本（normal）间差异基因的热图

2.2　GO、KEGG 富集分析　KEGG 富集分析得到 20 个上调基因相关条目和 20 个下调基因相关条目，上调基因相关条目主要集中在细胞因子与细胞因子受体的相互作用及 COVID-19 等疾病（图 2A），下调基因相关条目主要集中在紧密连接及甲状腺激素合成等（图 2B）。GO 分析共得到 20 个上调基因相关条目和 20 个下调基因相关条目，上调基因相关条目中细胞组分主要集中在细胞外结构组织及细胞外基质组织等，生物过程主要集中在细胞器分裂及核分裂等（图 2C）。下调基因相关条目中细胞组分主要集中在突触组织等，生物过程主要集中在离子跨膜转运的调节及细胞连接组装等（图 2D）。

2.3　蛋白互作网络构建、筛选铁死亡关键基因　铁死亡相关基因与 ATC 差异基因相互映射得到潜在重要基因 41 个（图 3A）。通过 STRING 数据库构建差异基因的蛋白互作网络，网络由 41 个重要基因构成的节点及其相互连接的 118 条边构成（图 3B）。CytoHubba 插件取 Degree 值最大的前 10 个基因，使用 MCC 算法评分，确定得分前 8 的基因为铁死亡关键基因。按得分高低排序即 IL6、TLR4、HMOX1、CYBB、NOX4、DUOX1、NCF2、DUOX2，确定为 ATC 相关铁死亡关键基因集（图 3C）。

2.4　绘制箱图及受试者工作特征曲线验证　箱图比较铁死亡关键基因在样本中的表达情况，图 4A 显示 ATC 患者肿瘤样本中 IL6、TLR4、CYBB、NOX4、NCF2、HMOX1 表达均显著上调，而 DUOX1、DUOX2 表达则显著下调。进一步分析受试者工作特征曲线后得到图 4B，并且计算得到 8 个关键基因 *AUC* 值，IL6（*AUC*=0.768）、TLR4（*AUC*=0.775）、HMOX1（*AUC*=0.938）、CYBB（*AUC*=0.969）、NOX4（*AUC*=0.896）、DUOX1（*AUC*=0.962）、NCF2（*AUC*=0.983）、DUOX2（*AUC*=0.972）。证明 8 个铁死亡关键基因均能够较为准确地诊断 ATC，具有良好的诊断价值，可能

成为潜在的诊断ATC的生物标志物。

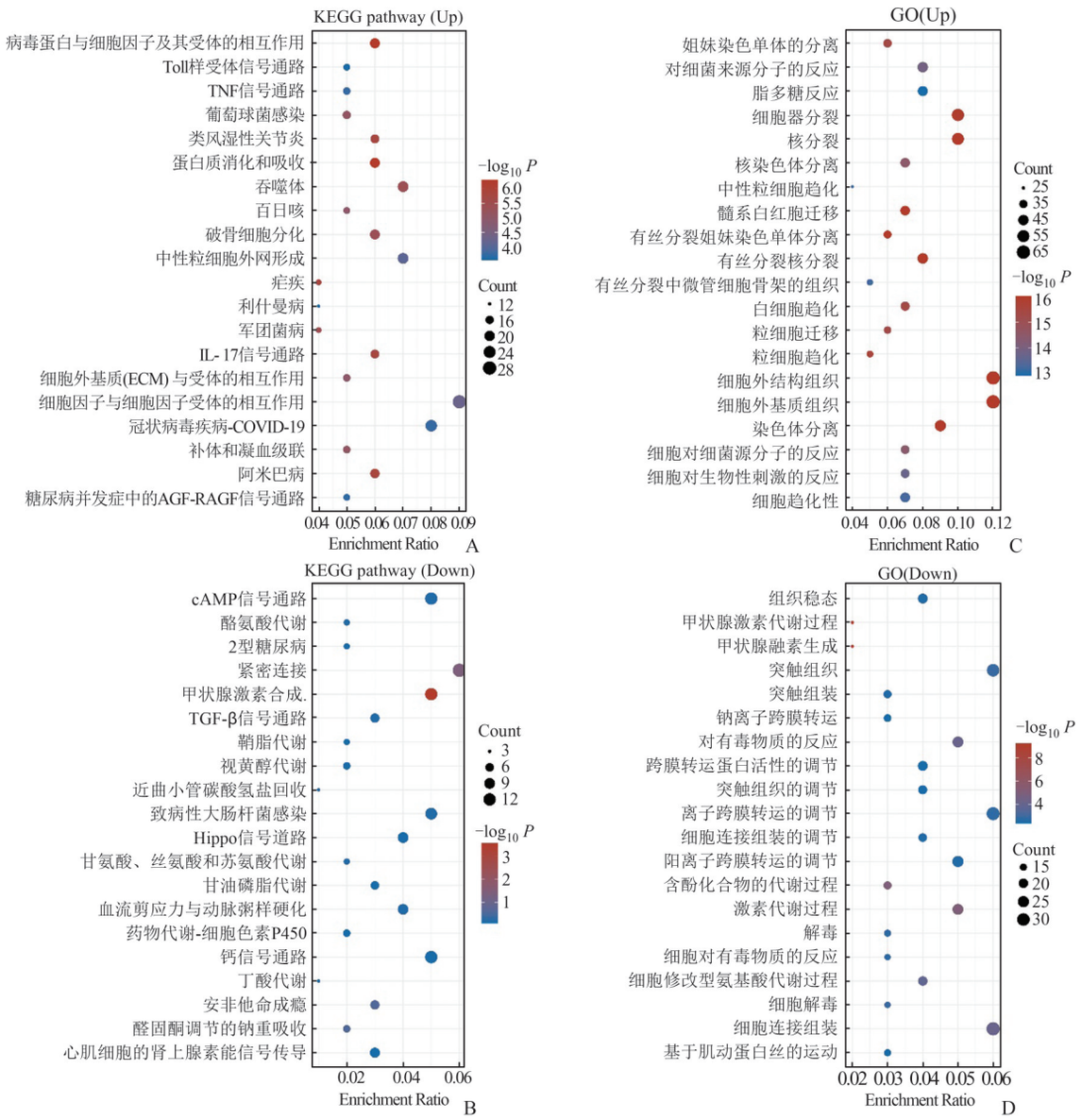


图2 ATC与正常组织样本差异基因的富集分析

A、B. 上调和下调的基因的KEGG富集分析;C、D. 上调和下调的基因的GO富集分析

2.5 铁死亡关键基因与免疫浸润的相关性研究 通过反卷积算法分析ATC样本中免疫浸润特征,得到了ATC患者肿瘤组织及正常组织样本中22种免疫细胞的组成矩阵直方图(图5A)以及相关性热图(图5B)。图5C展示了ATC患者肿瘤样本及正常组织样本中各免疫细胞的表达水平,提示其中肿瘤样本中单核细胞和调节性T细胞减少,而CD4记忆T细胞及M1巨噬细胞显著增加。图5D为铁死亡关键基因与免疫细胞之间的热图,可以看到ATC样本中浆细胞,调节性T细胞,活化型巨噬细胞、CD4记忆激活T细胞以及M2型巨噬细胞与铁死亡关键基因集中大多数基因的相关性较强。这提示铁死亡关键基因可能通过协同作用或直接调节多个免疫细胞参与了ATC的进展。

进一步分析调节性T细胞和CD4记忆激活T细胞与铁死亡关键基因集的相关性,发现调节性T细胞与IL6、TLR4、HMOX1的表达水平呈负相关,与DUOX1、DUOX2的表达水平呈正相关(图6A)。而CD4记忆激活T细胞和基因集的相关性与调节性T细胞恰好相反(图6B),同时直方图中显示两者表达水平也相反,提示两者之间存在某种抑制关系,也进一步证实铁死亡关键基因影响了ATC的免疫环境。

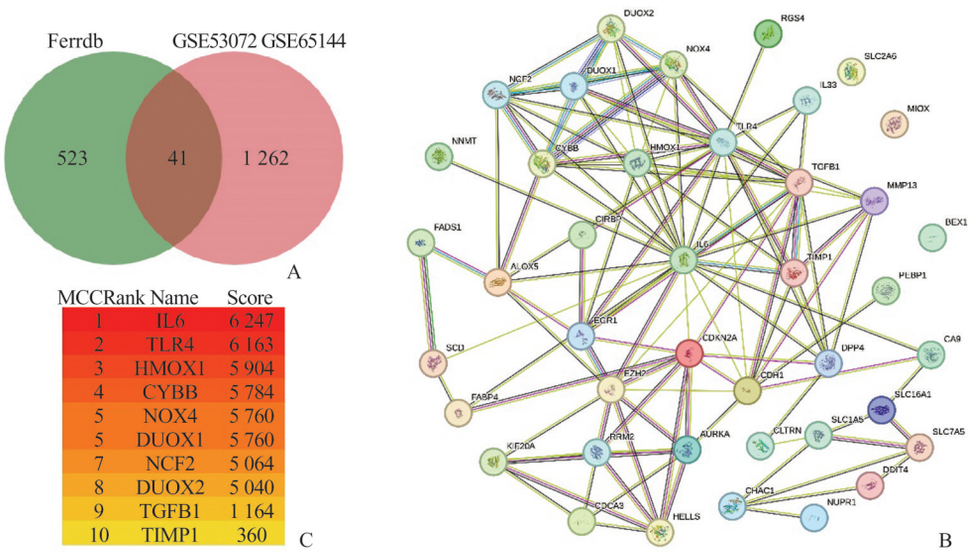


图 3　铁死亡关键基因筛选及蛋白互作网络构建

A. 差异基因与 FerrDb 数据库的 Venn 图；B. 铁死亡基因 PPI 网络；C. 铁死亡基因 MCC 评分

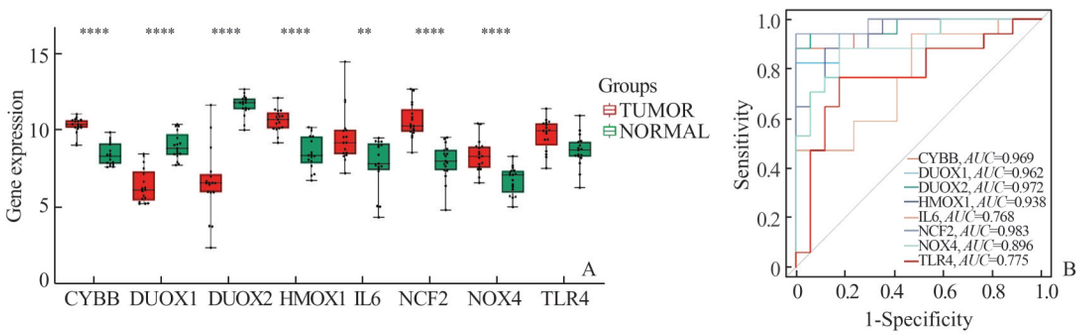


图 4　铁死亡关键 Hub 基因的表达情况及诊断价值

A. 铁死亡关键基因在 ATC 及正常组织样本中表达水平；B. 铁死亡关键基因诊断 ATC 的灵敏程度。$^{**}P<0.01$；$^{****}P<0.000\,1$

3　讨论

ATC 属于甲状腺癌中一类罕见的分型，虽然 ATC 为罕见的恶性肿瘤，但却是甲状腺癌患者死亡的主要原因。目前对 ATC 没有有效的治疗方法，手术治疗、化疗及靶向治疗效果都不令人满意，患者生存期短，死亡率高[10]。目前 ATC 的发病机制尚不明确，因此寻找 ATC 治疗的新靶点及相关的诊断生物标志物成为需要迫切解决的问题。随着测序方法的不断发展和肿瘤数据库的不断完善，以及蛋白组学的发展，对病因学和肿瘤细胞的分子生物学有了进一步的研究，也使得新的分子标志物被利用于患者的诊断和个体化靶向治疗的运用，为提高 ATC 患者治疗效果提供更多的帮助。

铁死亡是一种独特的细胞程序性死亡过程[11]。铁死亡广泛参与了恶性肿瘤的发生发展进程，在防治癌症方面具有巨大潜力[12]。然而，与 ATC 相关的铁死亡相关通路及基因发挥的作用尚未完全阐明。那么鉴定 ATC 相关的铁死亡关键基因可以给 ATC 相关通路提供新的研究思路，并为临床治疗提供新的诊断标志物和治疗靶点。本研究使用 GEO 中的数据集鉴定得到了 ATC 患者肿瘤组织样本及正常组织样本中的差异基因。通过查询 FerrDb 数据库得到铁死亡通路相关基因，经过映射并构建蛋白互作网络后我们筛选出了 8 个差异表达的与铁死亡通路密切相关的基因，分别为 IL6、TLR4、HMOX1、CYBB、NOX4、DUOX1、NCF2、DUOX2。根据受试者工作特征曲线分析计算出每个基因的 *AUC* 值，8 个基因的 *AUC* 值均大于 0.75，说明其诊断价值优异，或许能作为新型的 ATC 诊断标志物。

最新研究[13]发现，白细胞介素-6（IL-6）可通过诱导头颈部鳞状细胞癌的铁死亡耐药性来促进肿瘤进展，这一发现揭示了 IL-6/STAT3/xCT 轴是一种驱动肿瘤进展的新机制，可能被用作预防肿瘤发

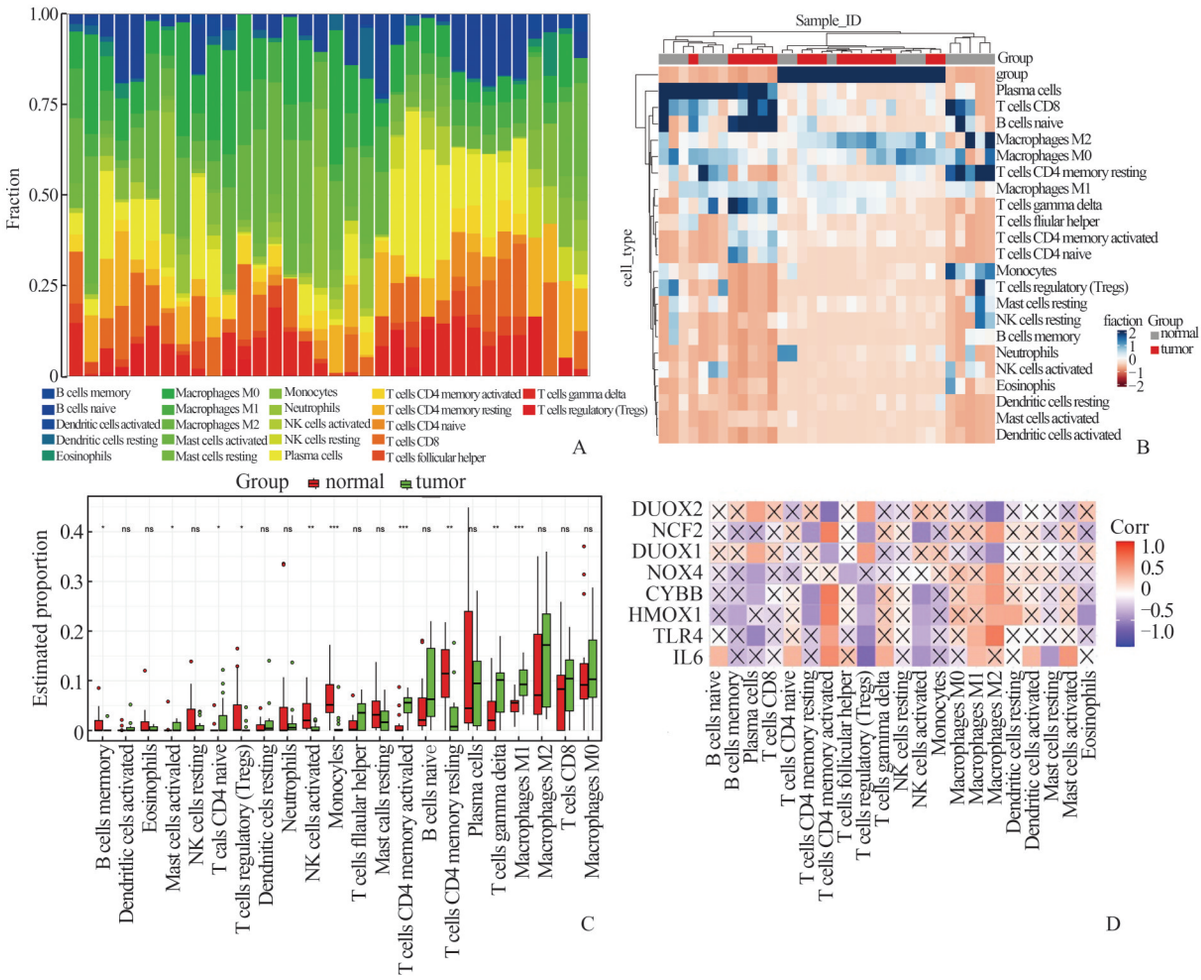


图 5 ATC 患者样本中免疫细胞组成和与铁死亡关键基因的相关性

A. ATC 中 22 个免疫细胞的组成比例;B. ATC 与正常组织样本之间免疫细胞的热图;C. ATC 及正常组织样本之间免疫细胞的表达水平;D. 免疫细胞和 Hub 基因的相关性热图。ns:$P>0.05$;$^{*}P<0.05$;$^{**}P<0.01$;$^{***}P<0.001$

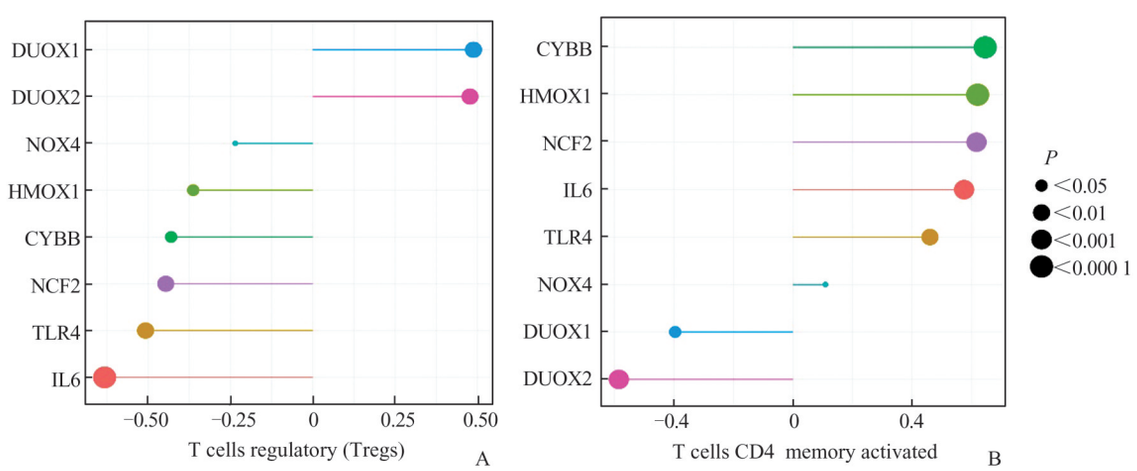


图 6 调节性 T 细胞和 CD4 记忆激活 T 细胞与铁死亡关键基因的相关性

A. 调节性 T 细胞与铁死亡关键基因集的棒棒糖图;B. CD4 记忆激活 T 细胞与铁死亡关键基因集的棒棒糖图

生或治疗的靶点。CYBB 基因编码产生成人的 NADPH 氧化酶酶亚基,当受到抑制剂抑制时,可以抑制 Erastin(一种致癌的鼠肉瘤蛋白选择性致命小分子)诱导的铁死亡[14]。TLR4(Toll 样受体 4)是一

种重要的免疫受体。相关研究[15]证明了抑制 TLR4-p38 MAPK 信号传导可以调节神经细胞在缺氧缺血性脑损伤或缺氧葡萄糖剥夺诱导条件下的铁死亡，可能在脑内稳态及脑内肿瘤发展中具有新的作用。NOX4 是 NADPH 氧化酶 4 的简称，它是一种在细胞内产生活性氧的酶。研究[16]表明，阿尔茨海默病中的 NOX4 异常表达促进了星形胶质细胞中的脂质过氧化导致线粒体代谢受损，导致了脑细胞铁死亡，也可能参与了一些肿瘤细胞的铁死亡过程。血红素氧合酶 1（HMOX1）是细胞内的重要调节因子，参与调节血红素代谢和解毒，同时也与细胞凋亡和抗氧化应激等相关。HMOX1 过表达加速了 Erastin 诱导的细胞死亡；而 HMOX1 增多则中断了 Erastin 触发的癌细胞铁死亡事件[17]。至于 NCF2[18]、DUOX1 和 DUOX2[14]，目前研究说明不足以证实其在铁死亡中具体的作用。其在铁死亡机制中的角色有待更多的实验去探索。

对 ATC 样本中铁死亡关键基因的免疫相关性分析发现，除 NOX4 外其余基因均与 CD4 记忆激活 T 细胞和调节性 T 细胞密切相关。T 细胞可以通过分泌干扰素 γ、促进肿瘤细胞铁死亡[12]。调节性 T 细胞可以通过释放细胞因子并且调节其他免疫细胞的活性来抑制肿瘤生长转移[19]。在肿瘤微环境中，CD4 记忆激活 T 细胞可以抑制其他免疫细胞的活性，阻止免疫细胞对肿瘤细胞的攻击，从而促进肿瘤的逃逸和生长[20]。ATC 样本中这两种 T 细胞的表达失去平衡，而且两者铁死亡关键基因的相关性互为相反关系，这可以推测双方可能通过抑制作用互相调控。同时有研究[21]证实了调节性 T 细胞可通过去除 CD4 记忆激活 T 细胞维持免疫稳态，自我激活的 CD4 T 细胞分泌白细胞介素 2，从而触发邻近调节性 T 细胞中的旁分泌信号传导。因此，调节性 T 细胞的局部密度和功能增加，限制了 CD4 T 细胞增殖和存活所需的输入。ATC 中调节性 T 细胞表达下调可能会减少对 CD4 记忆激活 T 细胞的抑制作用，导致免疫环境的紊乱，内环境缺乏肿瘤细胞有效的免疫杀伤物质，肿瘤的发生以及生长转移失去控制。因而，本研究推测铁死亡关键基因可能通过共同影响 CD4 记忆激活 T 细胞和调节性 T 细胞的表达参与了 ATC 的发生发展。铁死亡会影响免疫细胞的差异表达，导致调节性 T 细胞丧失对 CD4 记忆激活 T 细胞的清理作用，可能是 ATC 与铁死亡相关的发病机制之一。但研究仍存在部分限制，目前的研究尚不能明确其因果关系，其和免疫细胞间的作用机制仍需要进一步研究。此外，缺乏细胞实验及动物实验数据从外部验证生物信息学分析得到的结果。

综上所述，通过对 GEO 数据库来源的样本进行生物信息学分析，本研究确定了与 ATC 诊断相关的铁死亡基因，探索了可能相关的细胞通路，明确了关键基因存在诊断价值，并分析了样本中免疫细胞的构成，发现铁死亡基因可能参与调节性 T 细胞-CD4 记忆激活 T 细胞通路导致免疫紊乱，在 ATC 的发生发展中起到重要作用。总之，该研究结果验证了铁死亡关键基因可以作为 ATC 诊断标志物及可能的治疗靶点。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1): 17-48.

[2] ZHENG R S, ZHANG S W, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1): 1-9.

[3] JANNIN A, ESCANDE A, AL GHUZLAN A, et al. Anaplastic thyroid carcinoma: An update[J]. Cancers, 2022, 14(4): 1061.

[4] MANIAKAS A, DADU R, BUSAIDY N L, et al. Evaluation of overall survival in patients with anaplastic thyroid carcinoma, 2000 - 2019[J]. JAMA Oncol, 2020, 6(9): 1397-1404.

[5] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-282.

[6] 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.

[7] TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: Molecular mechanisms and health implications[J]. Cell Res, 2021, 31(2): 107-125.

[8] D′APRILE S, DENARO S, PAVONE A M, et al. Anaplastic thyroid cancer cells reduce CD71 levels to increase iron overload tolerance[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 780.

[9] WU J J, LIANG J Y, LIU R Q, et al. Autophagic blockade potentiates anlotinib - mediated ferroptosis in anaplastic thyroid cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2023, 30(9): e230036.

（下转第 504 页）