综合分析 m6A RNA 甲基化调节因子与肺癌免疫浸润及预后的相关性

宣自学,叶强,姜金颖,张国兵,杨秀丽,邵燕飞,石佳娜,黄萍*(浙江省人民医院,杭州医学院附属人民医院药学 部,杭州 310014)

摘要:目的 初步探究 N6 甲基化腺苷(N6-methyl-adenosine, m6A)甲基化调节因子在肺癌肿瘤免疫微环境中的潜在作用 及机制。方法 基于 TCGA 数据库,本研究利用生物信息学综合分析 m6A RNA 甲基化调节因子与肺癌免疫浸润及预后 的相关性。结果 多个 m6A RNA 甲基化调节因子在肺鳞癌和肺腺癌中差异性表达。然而, ALKBH5 仅在肺鳞癌中显著 高表达, METTL3 和 YTHDF3 仅在肺腺癌中显著高表达, HNRNPA2B1 与肺鳞癌 YTHDC1、肺腺癌 RBM15 表达相关。 通过对18个m6A甲基化调节因子的一致性聚类,发现肺鳞癌不同亚型的总生存率无统计学差异。在肺腺癌中,PD-1、 PD-L1 表达在癌及癌旁组织中无显著差异,且与 m6A 甲基化调节因子无明显相关性。聚类分析后发现 m6A 甲基化调节 因子在肺腺癌肿瘤免疫微环境中起重要作用,其中 Cluster 2 组 PD-L1 表达下降、免疫细胞浸润较高,但是生存期较 Cluster 1 组延长。Cluster 2 组与树突细胞静息、肥大细胞静息、 $\gamma\delta$ T 细胞浸润更相关。Cluster 1 组生存期短可能与 G2M 检查点、 E2F 通路、MYC 通路、MTORC1 通路、Wnt/beta-catenin 通路,以及树突状细胞激活、巨噬细胞 M1、滤泡 T 辅助细胞浸 润水平较高有关。单因素 Cox 分析结果表明 4 个甲基化结合蛋白与预后相关,其中 IGF2BP3、HNRNPA2B1 和 IGF2BP2 为危险因子, YTHDF2 为保护因子。结论 m6A RNA 甲基化调节因子与肺腺癌免疫浸润及预后有密切相关性。 关键词: N6 甲基化腺苷; 肺鳞癌; 肺腺癌; 免疫浸润; 免疫微环境

中图分类号: R966

文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)21-2721-09 DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.21.015

引用本文:宣自学, 叶强, 姜金颖, 等. 综合分析 m6A RNA 甲基化调节因子与肺癌免疫浸润及预后的相关性[J]. 中国现代 应用药学, 2021, 38(21): 2721-2729.

Comprehensive Analysis of Immune Infiltrates and Prognosis of m6A RNA Methylation Regulators in Lung Cancer

XUAN Zixue, YE Qiang, JIANG Jinying, ZHANG Guobing, YANG Xiuli, SHAO Yanfei, SHI Jiana, HUANG Ping*(Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To preliminarily explore the potential role and mechanism of N6-methyl-adenosine(m6A) methylation regulators in the immune microenvironment of lung cancer. METHODS The correlation of immune infiltrates and prognosis of m6A RNA methylation regulators in lung cancer was comprehensively analyzed by bioinformatics, based on TCGA database. RESULTS Some m6A RNA methylation regulators were differentially expressed in lung squamous carcinoma(LUSC) and lung adenocarcinoma(LUAD). However, ALKBH5 was significantly high expressed only in LUSC, METTL3 and YTHDF3 were significantly high expressed only in LUAD, and HNRNPA2B1 was associated with the expression of YTHDC1 in LUSC and RBM15 in LUAD. By consistent clustering of 18 m6A methylation regulators, it was found that there was no statistically significant difference of the overall survival(OS) among different subtypes of LUSC. In LUAD, there was no significant difference in the expression of PD-1 and PD-L1 between cancer and adjacent tissues, and there was also no significant correlation with m6A methylation regulators. Cluster analysis revealed that m6A methylation regulators played an important role in the immune microenvironment of LUAD, in which the expression of PD-L1 decreased and the infiltration of immune cells was higher in Cluster 2, but the OS was longer than that in Cluster 1. Cluster 2 was more correlated with dendritic cell resting, mast cell resting, T cells gamma delta. The short OS of Cluster 1 may be related to the G2M checkpoint, E2F pathway, MYC pathway, MTORC1 pathway, Wnt/beta-catenin pathway, as well as the higher level of dendritic cells activated, macrophages M1 and T cells follicular helper. Univariate Cox analysis showed that four methylated binding proteins were associated with prognosis, IGF2BP3, HNRNPA2B1 and IGF2BP2 were risk factors and YTHDF2 was protection factor. CONCLUSION m6A RNA methylation regulators are closely related to the immune infiltration and prognosis of LUAD.

KEYWORDS: N6-methyl-adenosine(m6A); lung squamous carcinoma; lung adenocarcinoma; immune infiltration; immune microenvironment

*通信作者:黄萍,女,博士,主 E-mail: xuanzixue0222@163.com

中国现代应用药学 2021 年 11 月第 38 卷第 21 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 November, Vol.38 No.21 · 2721 ·

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LGF18H160022);浙江省省部共建项目(WKJ-ZJ-1716);浙江省康恩贝医院管理软科学研究项目 (2019ZHA-KEB313)

作者简介: 宣自学, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)85893117 任药师 Tel: (0571)85893117 E-mail: huangping1841@zjcc.org.cn

肺癌是世界范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一^[1]。据 2018 年国家癌症中心统计,我国肺癌的发病率和病死率居于首位^[2]。非小细胞肺癌约占肺癌的 80%~85%,主要包括肺鳞癌(lung squamous carcinoma, LUSC)和肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD) 2 种病理学亚型^[3]。

N6 甲基化腺苷(N6-methyl-adenosine, m6A)是 真核生物 mRNA 上最为常见的一种 RNA 修饰^[4], 主要受甲基化转移酶(METTL3、METTL14、 METTL16、WTAP、VIRMA、RBM15等),去甲 基化酶(FTO、ALKBH5),甲基化结合蛋白 (YTHDC1、YTHDC2、YTHDF1、YTHDF2、 YTHDF3、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、 HNRNPA2B1、EIF3A等)动态调控^[5]。研究表明, m6A 甲基化修饰在多种肿瘤的发生发展中发挥重 要调控作用^[6-7],单个 m6A RNA 甲基化调节因子 在肺癌中的作用研究较多^[8],但是 m6A 甲基化调 控因子在 LUSC 和 LUAD 肿瘤微环境中的潜在作 用尚不清楚。本研究系统评估 18 个 m6A RNA 甲 基化调节因子在 LUSC 和 LUAD 中的表达情况, 以及与免疫浸润及预后的相关性。

1 方法

1.1 TCGA 中 LUSC 和 LUAD 的 m6A RNA 甲基 化调节因子数据

从 肿 瘤 基 因 组 数 据 库 (TCGA, https://tcga-data.nci.nih.gov/tvga/)下载 501 例 LUSC 和 513 例 LUAD 患者的 RNA-seq 转录组数据和相 应的临床数据,见表 1^[9]。根据 TCGA 中可获得的 mRNA 表达数据,分析 18 个 m6 A RNA 甲基化调 节因子(METTL3、METTL14、METTL16、WTAP、 VIRMA、RBM15、FTO、ALKBH5、YTHDC1、 YTHDC2、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、 IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、HNRNPA2B1、 EIF3A)数据。

表1 TCGA 中 LUSC 和 LUAD 的临床信息

Tab. 1Clinical information of LUSC and LUAD fromTCGA

临床信息	LUSC	LUAD
年龄/岁	67.33±8.58	65.3±10.0
性别(男/女)/例	370/131	237/276
TNM 分期/例		
Ι	249	274
II	161	121
III	84	84
IV	7	26

1.2 m6A RNA 甲基化调节因子表达分析及各因子间相关性分析

分别分析 18 个 m6A RNA 甲基化调节因子的 mRNA 在癌和癌旁组织中表达情况,采用 R 软件 pheatmap 软件包绘制热图,并且通过 Bioconducter 的 limma 数据包进行 Wilcox 秩和检验比较癌和癌 旁组织间的差异^[10]。分析 18 个 m6A RNA 甲基化 调节因子 mRNA 表达间的相关性,并且探讨 PD-1、 PD-L1 与 m6A RNA 甲基化调控因子的关系,使用 corplot 软件包计算各调节因子间的 pearson 相关系 数,绘制相关性热图,进行相关性检验^[11]。

1.3 LUSC 和 LUAD m6A 调控因子与临床病理特征聚类分析

使用 Consensus Clust Plus 软件包进行一致性 聚 类 分 析 , 根 据 累 积 分 布 函 数 (cumulative distribution function, CDF)曲线的聚类分数,并评 估 Delta 面积等确定最佳聚类数(k 值)^[11]。利用 Survival 软件包进行 KM 生存分析并绘制生存曲 线,通过 long-rank 检验计算 P 值,比较不同聚类 分型与总生存率的关系。利用卡方检验,比较分 型间的 m6A 调控因子、PD-1 及 PD-L1 表达差异, 并采用 R 软件 pheatmap 包绘制热图^[12]。

1.4 探讨 m6A 调控因子对 LUAD 肿瘤免疫微环 境及预后的影响

首先,使用 R 软件 CIBERSORT 包(https:// cibersort.stanford.edu/)来评估不同亚型之间 22 种 免疫细胞类型的频率差异^[13],分析不同亚组之间 22 种免疫细胞类型的分数。此外,利用基因集富集 分析,以 P<0.05 和 NES>1.0 为条件,筛选导致不 同亚组间肿瘤免疫微环境差异的潜在调控机制^[9]。

采用 survival 软件包对 18 个 m6A 甲基化调节 因子进行单因素 Cox 分析,筛选条件 P<0.05,以 确定 LUAD 肿瘤组织中 RNA m6A 甲基化调节因 子 mRNA 表达与预后的相关性,并通过 forest 软 件包绘制森林图^[14]。

2 结果

2.1 m6A RNA 甲基化调节因子在 LUSC 和 LUAD 中差异性表达

在 LUSC 18 个 m6A 甲基化调节因子中,去甲 基化酶 ALKBH5,甲基化结合蛋白 EIF3A、 HNRNPA2B1、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、 YTHDF1、YTHDF2,以及甲基化转移酶 RBM15、 VIRMA 显著性高表达(P<0.05 或 P<0.001),去甲 基化酶 FTO 和甲基化转移酶 METTL14 均显著性 低表达(P<0.01)。在 LUAD 18个 m6A 甲基化调节 因子中,甲基化结合蛋白 EIF3A、HNRNPA2B1、 IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、YTHDF1、YTHDF2、 YTHDF3,甲基化转移酶 METTL3、RBM15、VIRMA 显著高表达(P<0.05 或 P<0.01 或 P<0.001),去甲基 化酶 FTO 和甲基化转移酶 METTL14 均显著性低表 达(P<0.05 或 P<0.01)结果见图 1。

比较发现,去甲基化酶 ALKBH5 仅在 LUSC 中差异性高表达,甲基化转移酶 METTL3 和甲基 化结合蛋白 YTHDF3 仅在 LUAD 中差异性高表 达。相似的是,甲基化结合蛋白 EIF3A、 HNRNPA2B1、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、 YTHDF1、YTHDF2 在 LUSC 和 LUAD 中均显著 性高表达,去甲基化酶 FTO 和甲基化转移酶 METTL14 均显著性低表达,甲基化转移酶 RBM15、VIRMA 均显著性高表达。 2.2 m6A RNA 甲基化调节因子在 LUSC 和 LUAD 中表达间的相关性分析

在 LUSC 中, 18 个 m6A 甲基化调节因子的 mRNA 表达间的相关性分析结果显示,甲基化转 移酶 METTL14 与甲基化结合蛋白 YTHDC1 (Pearson 相关系数为 0.5),甲基化结合蛋白 YTHDF3(Pearson 相关系数为 0.53),甲基化结合蛋白 YTHDF3(Pearson 相关系数为 0.53),甲基化结合蛋白 YTHDC1 与甲基化结合蛋白 HNRNPA2B1(Pearson 相关系数为 0.56)表达存 在相关性,见图 2A。

在 LUAD 中,甲基化转移酶 METTL14 与甲 基化结合蛋白 YTHDC1(Pearson 相关系数为0.58), 甲基化转移酶 VIRMA 与甲基化结合蛋白 YTHDF3(Pearson 相关系数为0.66),甲基化转移酶 RBM15 与甲基化结合蛋白 HNRNPA2B1(Pearson 相关系数为0.52)表达存在相关性,见图2B。



图 1 TCGA 队列中 LUSC 和 LUAD 的 m6A RNA 甲基化调控因子 A-18个 m6A RNA 调节因子在 LUSC 组织和癌旁组织中的表达热图和表达水平柱状图;B-18个 m6A RNA 调节因子在 LUAD 组织和癌旁组织中 的表达热图和表达水平柱状图。与癌旁组织比,¹⁾P<0.05,²)P<0.01,³⁾P<0.001。

Fig. 1 m6A RNA methylation regulators of LUSC and LUAD in TCGA cohort

A-heatmap and expression levels of 18 m6A RNA regulators in LUSC tissue and tissues adjacent to cancer; B-heatmap and expression levels of 18 m6A RNA regulators in LUAD tissue and tissues adjacent to cancer. Compared with tissues adjacent to cancer, $^{11}P<0.05$, $^{21}P<0.01$, $^{31}P<0.001$.

中国现代应用药学 2021 年 11 月第 38 卷第 21 期



图 2 m6A RNA 甲基化调控因子在 LUSC(A)和 LUAD(B)中的表达相关性分析 Fig. 2 Correlation analysis between expression of m6A RNA methylation regulators in LUSC(A) and LUAD(B)

经比较,不难发现,甲基化转移酶 METTL14、 VIRMA 分别与甲基化结合蛋白 YTHDC1、 YTHDF3在LUSC和LUAD中表达均存在相关性。 不同的是,在 LUSC 中,甲基化结合蛋白 HNRNPA2B1与甲基化结合蛋白 YTHDC1 相关, 而在 LUAD 中甲基化结合蛋白 HNRNPA2B1 与甲 基化转移酶 RBM15 表达相关。

2.3 LUSC 和 LUAD 肿瘤组织的一致性聚类分析 一致性聚类分析显示,k=2 时,LUSC 和 LUAD
的 CDF 值增速平缓,Delta 面积于 k>3 时增大不明显,见图 3;分型矩阵显示 k=2,没有样品特别小的分组,分组内的相关性高,分组间相关性低。
因此,k=2 的聚类稳定性在 k=2~9 最佳。根据 m6A 调节剂的表达水平,将 501 例 LUSC 患者和 513
例 LUAD 均分为 2 种亚型。结果发现,LUSC
Cluster 1(n=259)和 Cluster 2(n=242),LUAD Cluster
1(n=255)和 Cluster 2(n=258),见图 3。

2.4 LUSC 和 LUAD m6A 相关调控因子与临床病 理特征聚类分析

通过 Survival 软件包进行 KM 生存分析并绘制生存曲线,以及 long-rank 检验,发现在 LUSC 中 Cluster 1 与 Cluster 2 的总生存率无统计学差异,在 LUAD 中 Cluster 2 的总生存率长于 Cluster 1,见图 4。随后,重点研究 LUAD m6A 调控因子对LUAD 肿瘤免疫微环境及预后的影响。

本研究发现甲基化转移酶 METTL14、 VIRMA、RBM15,以及甲基化结合蛋白 YTHDC1、 YTHDC2、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、 HNRNPA2B1、EIF3A 在 LUAD 的 Cluster 1 组中 表达量显著高于 Cluster 2 组(*P*<0.01 或 *P*<0.001)。 LUAD 的 Cluster 1 组中去甲基化酶 ALKBH5 表达 量显著低于 Cluster 2 组(*P*<0.01)。另外, LUAD 的 Cluster 1 组中 PD-L1/CD274 表达量显著高于 Cluster 2 组, 见图 5。

2.5 m6A调控因子对LUAD肿瘤免疫微环境及预 后的影响

为了探讨 LUAD 中 PD-1/PD-L1 与 m6A RNA 甲基化的关系,评估了 PD-1、PD-L1 与 m6A 调 节因子的相关性。研究发现 PD-1、PD-L1 表达量 与 18 个 m6A 相关调控因子表达相关性不强,见 图 6。

为了研究 m6A 调控因子对 LUAD 肿瘤免疫微 环境的影响,评估上调 m6A 调控因子表达的 Cluster 1 和下调 m6A 调控因子表达的 Cluster 2 的 免疫评分和免疫浸润水平。首先,分析了 2 个亚 组之间 22 种免疫细胞类型的分数,发现 Cluster 2 的免疫评分高于 Cluster 1,见图 6。Cluster 1 显示 树突状细胞激活(Dendritic cells activated)、巨噬细 胞 M1(Macrophages M1)、滤泡 T 辅助细胞(T cells follicular helper)的浸润水平较高,而 Cluster 2 与树 突细胞静息(Dendritic cells resting)、肥大细胞静息 (Mast cells resting)、 $\gamma\delta$ T 细胞(T cells gamma delta) 浸润更相关,见图 6。



A, C-LUSC 中 *k*=2~9 的一致聚类累积分布函数和 Delta 面积; B, D-LUAD 中 *k*=2~9 的一致聚类累积分布函数和 Delta 面积; E-*k*=2 时 LUSC 的一致性聚类矩阵; F-*k*=2 时 LUAD 的一致性聚类矩阵。

Fig. 3 Consensus clustering of m6A-related genes in LUSC and LUAD

A, C-consensus clustering cumulative distribution function and Delta area for k=2-9 in LUSC; B, D-consensus clustering cumulative distribution function and Delta area for k=2-9 in LUAD; E-consensus clustering matrix for k=2 LUSC; F-consensus clustering matrix for k=2 LUAD.



图 4 TCGA 队列中 LUSC 和 LUAD Cluster1/2 亚组的临床病理特征和生存差异

A-LUSC 的 Cluster1/2 中 m6A 相关基因的热图; B-LUSC 中 Cluster1/2 亚组的 Kaplan-Meier 生存曲线; C-LUAD 的 Cluster1/2 中 m6A 相关基因 的热图; D-LUAD 中 Cluster1/2 亚组的 Kaplan-Meier 生存曲线。

Fig. 4 Differential clinicopathological features and survival of LUSC and LUAD in Cluster1/2 subtypes in TCGA Cohort A-heatmap of m6A-related genes of Cluster1/2 in LUSC; B-Kaplan-Meier curves of OS for Cluster1/2 in LUSC; C-heatmap of m6A-related genes of Cluster1/2 in LUAD; D-Kaplan-Meier curves of OS for Cluster1/2 in LUAD.

中国现代应用药学 2021 年 11 月第 38 卷第 21 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 November, Vol.38 No.21 · 2725 ·





Fig. 5 Expression of m6A-related genes of Cluster 1/2 in LUAD Compared with Cluster 1, ${}^{1)}P < 0.01$, ${}^{2)}P < 0.001$.

为了阐明导致 2 个亚组间肿瘤免疫微环境差 异的潜在调控机制,本研究进行了基因集富集分 析(GSEA)。结果表明,肿瘤的恶性特征包括 G2M 检查点(NES=2.22, P<0.001)、E2F 靶向通路 (NES=2.11, P<0.001)、MYC_TARGETS_V2(NES= 1.95, P<0.001)、MYC_TARGETS_V1(NES=1.79, P=0.020)、MTORC1 通路(NES=1.74, P=0.008)、 Wnt/beta-catenin 通路(NES=1.71, P=0.022)与 Cluster 1 动态相关,见图 7。因此,这些信号通路 可能与 Cluster 1 的不同肿瘤免疫微环境有关。 2.6 预后相关基因分析

根据单因素 Cox 分析结果,有4个 m6A 甲基 化调节因子的基因与生存期均显著相关(P<0.05), 可以作为 LUAD 的预后相关基因。这4个基因是 甲基化结合蛋白 IGF2BP3、HNRNPA2B1、 IGF2BP2、YTHDF2,它们都是 LUAD 的风险基因, IGF2BP3、HNRNPA2B1 和 IGF2BP2 表达越高则 LUAD 患者预后越差。YTHDF2 表达越高 LUAD 患者预后越好,见图 8。

3 讨论

肿瘤细胞与免疫系统之间存在复杂而动态的 相互作用,不同的免疫细胞类型在调节肿瘤进展 中发挥重要作用^[15-16]。m6A RNA 甲基化调节因子 在肺癌中具有重要调节作用^[17-18]。但是,基于 18 个 m6A RNA 甲基化调节因子与 LUSC 和 LUAD 免疫浸润及预后的相关性尚未见研究。本研究发 现,EIF3A、HNRNPA2B1、IGF2BP1、IGF2BP2、 IGF2BP3、YTHDF1、YTHDF2 在 LUSC 和 LUAD 中均显著性高表达,FTO 和 METTL14 均显著性低 表达。METTL14、VIRMA 分别与 YTHDC1、 YTHDF3 表达均存在相关性。在 LUSC 中, ALKBH5 显著高表达,HNRNPA2B1 与 YTHDC1



图 6 在 LUAD 中 PD-1/PD-L1 与 m6A RNA 甲基化和免疫细胞浸润的关系 A-TCGA 中 PD-1/PD-L1 与 m6A 甲基化调控因子的相关性; B-Cluster1/2 亚组的免疫评分; C-TCGA 中 Cluster1/2 亚组 22 种免疫细胞的浸润水 平。与 Cluster 1 比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001。

Fig. 6 Association of PD-1/PD-L1 with m6A RNA methylation and the landscape of immune cell infiltration in LUAD A-correlation of PD-1/PD-L1 with m6A methylation regulators in TCGA; B-immunoscore in the Cluster1/2 subtypes; C-infiltrating levels of 22 immune cell types in Cluster1/2 subtypes in the TCGA cohort. Compared with Cluster 1, ${}^{1}P$ <0.05, ${}^{2}P$ <0.01, ${}^{3}P$ <0.001.



图7 基因集富集分析显示信号在 Clusterl 中有差异富集

Fig. 7 Gene set enrichment analysis showed that signaling were differentially enriched in Cluster1



图 8 单变量 Cox 回归分析 m6A 相关基因的森林图 Fig. 8 Forest plot of m6A-related genes using univariate Cox regression analysis

表达存在相关性。与 LUSC 相比, METTL3 和 YTHDF3 在 LUAD 中显著高表达, HNRNPA2B1 与 RBM15 表达相关。通过对 18 个 m6A 调节因子 的一致性聚类,发现 LUSC 不同亚型的总生存率 无统计学差异。相似的是,Liu 等^[19]发现在 13 个 m6A 调节因子中,多数 m6A 调控基因的表达水平 在 LUSC 和 LUAD 中显著改变,聚类分析可以将 LUAD 患者分为临床结果显著不同的 2 个亚组, 但不能将 LUSC 患者分成临床结果显著的不同亚 组。与 Liu 等研究相比,本研究覆盖的 m6A 调节 因子更全面,一共涉及 18 种 m6A 调节因子,因 此本研究结果更有意义。

随后,本课题组系统地探讨了 LUAD 的 m6A 调节因子与 PD-1、PD-L1 和免疫浸润的相关性。 研究结果表明,PD-1、PD-L1 表达在 LUAD 癌及 癌旁组织中无显著差异, PD-1、PD-L1 表达与 m6A 调节因子无明显相关。近年来, PD-1/PD-L1 免疫 检查点抑制剂药物在临床得到广泛应用^[20], PD-L1 是一种可靠的免疫疗效预测标志物, PD-L1 表达 越高, PD-1/PD-L1 抑制剂的疗效越好^[21-22]。然而, 本研究结果提示 Cluster 2 组 PD-L1 表达下降、免 疫细胞浸润较高,但是生存期较 Cluster 1 组延长。 具体分析后,发现 Cluster 2 与树突细胞静息、肥 大细胞静息、γδ T 细胞浸润更相关。通过 GESA 分析,发现 Cluster 1 组生存期短可能与 G2M 检查 点、E2F 通路、MYC 通路、MTORC1 通路、 Wnt/beta-catenin 通路,及树突状细胞激活、巨噬 细胞 M1、滤泡 T 辅助细胞浸润水平较高有关。

基于 18 个 m6A RNA 甲基化调节因子的单因 素 Cox 分析,结果表明 4 个甲基化结合蛋白与预 后相关,IGF2BP3、HNRNPA2B1 和 IGF2BP2 为 危险因子,YTHDF2 为保护因子。有研究显示, IGF2BP3 可通过调控 PKM 的可变剪接参与肺癌的 发生^[23],HNRNPA2B1 在肺癌细胞迁移、侵袭和 上皮-间质转化中起到促进作用^[24],IGF2BP2 的缺 失显著抑制了非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭^[25]。 以上研究进一步证实 IGF2BP3、HNRNPA2B1 和 IGF2BP2 在肺癌中高表达,是肺癌的促癌基因, 可能能够预测患者预后。另有研究表明,YTHDF2 在肺癌组织中上调,促进肺癌细胞生长^[26]。因此, YTHDF2 预后价值还可能存在争议,需要进一步 研究阐明。

综上所述,本研究基于 TCGA 数据库综合分析 LUSC 和 LUAD m6A RNA 甲基化调节因子与免疫浸润及预后的相关性。然而,本研究存在一些局限性,下一步将开展基础实验,验证本研究结果,以进一步阐明 m6A RNA 甲基化调节因子在LUAD 肿瘤免疫,以及肿瘤微环境中的作用。

REFERENCES

- ZHANG X X, WU L, XU Y, et al. Trends in the incidence rate of lung cancer by histological type and gender in Sichuan, China, 1995-2015: A single-center retrospective study[J]. Thorac Cancer, 2018, 9(5): 532-541.
- [2] CAO M M, CHEN W Q. Epidemiology of lung cancer in China[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(1): 3-7.
- [3] ZHANG L M, CHEN J H, CHENG T L, et al. Identification of the key genes and characterizations of tumor immune microenvironment in lung adenocarcinoma (LUAD) and lung squamous cell carcinoma(LUSC)[J]. J Cancer, 2020, 11(17): 4965-4979.
- [4] JI L C, CHEN S, GU L Q, et al. Exploration of potential roles of m6A regulators in colorectal cancer prognosis[J]. Front Oncol, 2020(10): 768. Doi: 10.3389/fonc.2020.00768.
- [5] FANG Q X, CHEN H S. The significance of m6A RNA methylation regulators in predicting the prognosis and clinical course of HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med, 2020, 26(1): 1-12.
- [6] XUAN Z X, WANG R Y, HU Y, et al. Role of m6A demethylase FTO in tumors and it's research progress[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(6): 760-763.
- [7] SU Y S, HUANG J Q, HU J C. m6A RNA methylation regulators contribute to malignant progression and have clinical prognostic impact in gastric cancer[J]. Front Oncol, 2019(9): 1038. Doi: 10.3389/fonc.2019.01038.
- [8] LI J, HAN Y, ZHANG H M, et al. The m6A demethylase FTO

中国现代应用药学 2021 年 11 月第 38 卷第 21 期

promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m6A level of USP₇ mRNA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 512(3): 479-485.

- [9] YI L L, WU G W, GUO L H, et al. Comprehensive analysis of the PD-L1 and immune infiltrates of m6A RNA methylation regulators in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Mol Ther - Nucleic Acids, 2020(21): 299-314.
- [10] QU N F, QIN S Y, ZHANG X M, et al. Multiple m⁶A RNA methylation modulators promote the malignant progression of hepatocellular carcinoma and affect its clinical prognosis[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 165.
- [11] LU S S, YU Z Z, XIAO Z Q, et al. Gene signatures and prognostic values of m6A genes in nasopharyngeal carcinoma[J]. Front Oncol, 2020(10): 875. Doi: 10.3389/fonc.2020.00875.
- [12] LI W, CHEN Q F, HUANG T, et al. Profiles of m6A RNA methylation regulators for the prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2020, 19(4): 3296-3306.
- [13] 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): 1-21.
- [14] LIU T, LI C Y, JIN L P, et al. The prognostic value of m6A RNA methylation regulators in colon adenocarcinoma[J]. Med Sci Monit, 2019(25): 9435-9445.
- [15] XU F, CHEN J X, YANG X B, et al. Analysis of lung adenocarcinoma subtypes based on immune signatures identifies clinical implications for cancer therapy[J]. Mol Ther - Oncolytics, 2020(17): 241-249.
- [16] HAO D P, LIU J, CHEN M, et al. Immunogenomic analyses of advanced serous ovarian cancer reveal immune score is a strong prognostic factor and an indicator of chemosensitivity[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(15): 3560-3571.
- [17] SHI Y L, FAN S Q, WU M G, et al. YTHDF₁ links hypoxia adaptation and non-small cell lung cancer progression[J]. Nat

Commun, 2019, 10(1): 1-14.

- [18] LI H, ZHANG Y, GUO Y J, et al. ALKBH₁ promotes lung cancer by regulating m6A RNA demethylation[J]. Biochem Pharmacol, 2021(189): 114284.
- [19] LIU Y, GUO X C, ZHAO M, et al. Contributions and prognostic values of m 6 A RNA methylation regulators in non-small-cell lung cancer[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(9): 6043-6057.
- [20] QIU J W, LU C T, ZENG X H, et al. Preliminary discussion for combinations and administration sequence of PD-1 inhibitors in the day-time chemotherapy center[J]. Pharm Today(今日药学), 2019, 29(12): 812-815.
- [21] SACHER A G, GANDHI L. Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer[J]. JAMA Oncol, 2016, 2(9): 1217.
- [22] PATEL S P, KURZROCK R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(4): 847-856.
- [23] HUANG X Q, ZHANG J, JIANG Y Q, et al. IGF₂BP₃ may contributes to lung tumorigenesis by regulating the alternative splicing of PKM[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020(8): 679. Doi: 10.3389/fbioe.2020.00679.
- [24] YU P F, KANG A R, JING L J, et al. Long non-coding RNA CACNA1G-AS1 promotes cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by HNRNPA2B1 in non-small cell lung cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(4): 993-1002.
- [25] HUANG R S, ZHENG Y L, LI C, et al. MicroRNA-485-5p suppresses growth and metastasis in non-small cell lung cancer cells by targeting IGF₂BP₂[J]. Life Sci, 2018(199): 104-111.
- [26] SHENG H, LI Z, SU S X, et al. YTH domain family 2 promotes lung cancer cell growth by facilitating 6-phosphogluconate dehydrogenase mRNA translation[J]. Carcinogenesis, 2020, 41(5): 541-550.

收稿日期: 2020-11-02 (本文责编:沈倩)