

铜代谢相关基因差异表达对良恶性胸腔积液性质判断的研究

张坤玮¹, 王翠峰^{2*}

¹内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头

²内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院检验科, 内蒙古 包头

收稿日期: 2025年4月28日; 录用日期: 2025年5月21日; 发布日期: 2025年5月29日

摘要

目的: 本研究旨在通过转录组测序分析CMRGs在良恶性胸腔积液中的表达特征, 筛选潜在诊断标志物。方法: 收集胸腔积液标本进行转录组测序, 通过转录组测序及生物信息学分析筛选出目的基因, 通过RT-qPCR验证关键基因表达。结果: 共筛选出470个差异表达基因, 其中411个上调, 59个下调。GO/KEGG富集分析显示, 差异基因主要与钙离子结合、O-聚糖加工、双细胞紧密连接组件功能等因素相关, 在途径方面显著富集于细胞粘附分子、花生四烯酸代谢等通路。与154个铜代谢相关基因取交集, 发现显著下调基因MT1E、MT1X和MT2A, ROC曲线显示其对肺癌的诊断效能较高(AUC分别为0.694、0.817和0.840), 其中MT1X和MT2A的诊断效能高于传统指标癌胚抗原。此外, lncRNA LOC105369559与铜代谢相关基因共表达网络关联密切。RT-qPCR验证结果与测序趋势一致, 均具有统计学差异。结论: 细胞粘附分子途径以及花生四烯酸代谢途径与恶性胸腔积液进展相关; 恶性胸腔积液差异表达的lncRNA LOC105369559与铜代谢相关基因关联性最强; 差异表达的铜代谢相关基因MT1E、MT1X、MT2A和lncRNA LOC105369559在恶性胸腔积液中的表达显著下调; MT1X和MT2A在引起恶性胸腔积液的肺癌诊断中优于传统指标。

关键词

胸腔积液, 铜代谢, 转录组测序

Study on Differential Expression of Copper Metabolism-Related Genes in Differentiating Benign and Malignant Pleural Effusions

Shenwei Zhang¹, Cuifeng Wang^{2*}

¹Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou Inner Mongolia

*通讯作者。

文章引用: 张坤玮, 王翠峰. 铜代谢相关基因差异表达对良恶性胸腔积液性质判断的研究[J]. 临床医学进展, 2025, 15(5): 2321-2333. DOI: 10.12677/acm.2025.1551625

Abstract

Objective: This study aims to analyze the expression characteristics of copper metabolism-related genes (CMRGs) in benign and malignant pleural effusions through transcriptome sequencing and to screen potential diagnostic biomarkers. **Methods:** Pleural effusion specimens were collected for transcriptome sequencing. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using transcriptomic and bioinformatics analyses, followed by RT-qPCR validation of key genes. **Results:** A total of 470 DEGs were identified, including 411 upregulated and 59 downregulated genes. GO/KEGG enrichment analysis revealed that these DEGs were primarily associated with biological processes such as calcium ion binding, O-glycan processing, and bicellular tight junction assembly. Pathway analysis highlighted significant enrichment in cell adhesion molecules and arachidonic acid metabolism. Intersection with 154 copper metabolism-related genes identified three significantly downregulated genes: MT1E, MT1X, and MT2A. ROC curve analysis demonstrated their high diagnostic efficacy for lung cancer (AUC values: 0.694, 0.817, and 0.840, respectively), with MT1X and MT2A outperforming the traditional biomarker carcinoembryonic antigen (CEA). Additionally, the lncRNA LOC105369559 exhibited a strong co-expression network with copper metabolism-related genes. RT-qPCR validation confirmed consistent expression trends with transcriptome sequencing, showing statistically significant differences. **Conclusion:** Cell adhesion molecule and arachidonic acid metabolism pathways are implicated in the progression of malignant pleural effusions. The differentially expressed lncRNA LOC105369559 shows the strongest association with copper metabolism-related genes. The copper metabolism-related genes MT1E, MT1X, MT2A, and lncRNA LOC105369559 are significantly downregulated in malignant pleural effusions. Notably, MT1X and MT2A exhibit superior diagnostic performance to CEA in identifying lung cancer-associated malignant pleural effusions.

Keywords

Pleural Effusion, Copper Metabolism, Transcriptome Sequencing

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

恶性胸腔积液(MPE)是肺癌等恶性肿瘤发生转移的重要临床表现,其早期的精准鉴别对患者的治疗方案和预后影响较大[1]。现有的诊断技术存在着敏感度或特异度较低的局限性[2],故继续探寻高诊断效能的靶标仍很重要。铜稳态的破坏已被证实参与肿瘤生长以及迁移,但是目前未见铜代谢相关基因(CMRGs)在MPE中的相关报道,对良恶性胸腔积液性质判断的研究尚不明确。转录组测序(RNA-Seq)作为分析肿瘤分子机制的技术日渐成熟,可结合生物信息学分析探究疾病潜在靶标。本研究着手分析良性和恶性胸腔积液的转录组测序信息,探索CMRGs在良恶性胸腔积液中的表达差异,期待可为患者的诊断寻找潜在的生物标志物,为临床精准诊断提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

实验对象

本实验将 2023~2025 年内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院检验科收集的 85 例胸腔积液标本纳入研究。通过结合患者的病例资料, 通过严格的纳入和排除标准进行筛选后剩余 66 例进行实验, 包括 MPE 33 例和 BPE 33 例。本课题已通过医院医学伦理会审核。

病例纳入标准: (1) 出现胸腔积液的患者并经过影像学检查确认; (2) 患者的病理诊断明确以及临床资料完善; (3) 既往未接受化疗或放射治疗的患者。病例排除标准: (1) 临床诊断不明确的患者标本; (2) 患者的病因复杂, 合并多种疾病者; (3) 已经经过手术、化疗、放射治疗等抗肿瘤治疗的患者。

病例分组依据: (1) 对照组入组标准: ① 由于肺炎、肺脓肿或者结核等感染导致的胸腔积液; ② 由于上腔静脉回流障碍、充血性心衰、缩窄性心包炎或低蛋白血症等导致的漏出性积液; ③ 发育性淋巴管引流异常导致的胸腔积液。(2) 恶性测定入组标准: 严格按照新版恶性胸腔积液诊断和治疗专家共识作为判断标准, 再结合患者临床资料和病理结果加强诊断依据, 确保入组的精确性。

2.2. 实验方法

2.2.1. RNA-Seq 测序

将收集到的 3 例恶性胸腔积液和 3 例良性胸腔积液送检进行转录组测序。

2.2.2. 差异基因表达分析

使用 RSEM 软件对基于的表达定量计算, DESeq2 软件对两组之间基因进行差异表达分析, 计算每个基因的差异表达倍数和调整后的显著性 P 值。DEGs 的筛选条件: 差异表达倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$, $P < 0.05$, 此时认为基因存在差异性。使用 R 包 pheatmap 绘制表达量聚类热图, 采用 R 语言 ggplots2 软件包绘制 DEGs 的火山图。

2.2.3. 富集分析

使用 R 软件中的 phyper 函数, 进行差异表达的 GO 注释及 KEGG 注释, 当调整 P 值小于 0.05 则认为其差异显著。观察其生物学功能和富集通路现象。

2.2.4. 铜代谢相关基因获取

从分子特征数据库(MSigDB) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) 下载铜代谢相关基因, 同时补充了铜死亡基因, 用于后续分析。

2.2.5. 受试者工作特征曲线(ROC)分析

UCSC XENA (<https://xenabrowser.net/datapages/>) 下载经 Toil 流程统一处理的 TCGA 和 GTEx 的 TPM 格式的 RNAseq 数据。提取肺癌对应 TCGA 的数据和 GTEx 中对应的正常组织数据, 总共含有 1013 个肺癌和 397 个正常组织。使用 R 包 pROC 包进行对数据进行 ROC 分析, 结果用 ggplot2 包进行可视化。

2.2.6. 相关性分析

使用 Spearman 相关性系数算法计算基因表达相关性, 根据预设筛选标准, 当基因对的相关系数绝对值超过 0.9 且其 P 值小于 0.01 时, 即可判定两者存在统计学显著的共表达关系。使用 igraph、ggplot2 包绘制相关性桑基图和网络图。

2.2.7. RT-qPCR 方法检测基因表达

将收集到的 30 例恶性胸腔积液和 30 例良性胸腔积液用于后续验证实验, 从 -80°C 冰箱中取出收集的

标本, 重新溶解并混合, 然后用新的无酶 EP 管分装标本, 每管标本约 100 μ l 左右, 按顺序编号, 放在冰上备用。提取总 RNA。RNA 逆转录成 cDNA: 冰上操作。将逆转录条件设置为: 45 $^{\circ}$ C, 30 min; 95 $^{\circ}$ C, 5 min 进行逆转录。进行 RT-qPCR 实验, 用 96 孔板加样, 测定 β -actin、MT1E、MT1X、MT2A 和 LOC105369559 的 mRNA 表达量, 每个样本设置 3 个复孔测。反应参数设置为: ① 95 $^{\circ}$ C, 30 sec, 1 个循环; ② 95 $^{\circ}$ C, 5 sec, 60 $^{\circ}$ C, 30 sec, 40 个循环; ③ 95 $^{\circ}$ C, 15 sec, 60 $^{\circ}$ C, 60 sec, 95 $^{\circ}$ C, 15 sec, 1 个循环。参照选择 β -actin, PCR 各引物序列如下表 1:

Table 1. PCR primer sequences
表 1. PCR 引物序列表

基因名称		引物序列
MT1E	F	5'-ACCTCCTGCAAGAAGAGTGAGT-3'
	R	5'-CCAGCCTTGAGTTCCTCCCAAT-3'
MT1X	F	5'-CTCGAAATGGACCCCAACTG-3'
	R	5'-TGTACTGTGGCTGGGAAACG-3'
MT2A	F	5'-ATGGATCCCAACTGCTCCTG-3'
	R	5'-AGCAGCAGCTTTTCTTGCAG-3'
LOC105369559	F	5'-AGAGGGAGATTGGCCAGCTA-3'
	R	5'-TGAAAACTCCACGTGCTGGT-3'
β -actin	F	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'
	R	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

2.3. 统计方法

相关性分析采用 sperman 相关性系数算法计算, 认为在相关系数绝对值大于 0.9, $P < 0.01$ 时有统计学意义。将 RT-qPCR 的上机数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 处理及分析数据并记录, 并应用 GraphPad Prism9.0 进行作图及两独立样本 t 检验估计正态分布变量的统计显著性, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3. 结果

3.1. RNA-Seq 质量统计

为了探究铜代谢相关基因在良恶性胸腔积液中的表达情况, 通过 RNA-Seq 得到原始数据, 首先需分析测序结果的可靠性。将得到的下机数据(表 2)进行统计分析, 其中样本 A1、A2 和 A3 为 BPE 组, 样本 B1、B2 和 B3 为 MPE 组。将数据整理、过滤后, 得到每个样本过滤前总的 reads 数分布在 141.82~144.31 百万条, 过滤掉低质量片段后总的 reads 数分布在 131.91~134.19 百万条之间, clean reads 比例分布在 92.49%~93.24%之间, 各样本的 Q30 比例分布在 93.27%~94.55%之间。以上均代表测序质量较好, 可以用于后续分析。

3.2. 差异表达基因的筛选

使用 DESeq2 软件进行良恶性胸腔积液之间的差异表达分析, 筛选条件为: 表达差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$, 显著性 $P < 0.05$, 对筛选到的显著 DEGs 集进行统计, 得到以下结果: 总共测得 47,137 个基因, 包含 25,195 个 mRNA 和 19,483 个 lncRNA, 其中共有 470 个 DEGs, 其中上调基因 411

个, 下调基因 59 个。图 1 为差异基因的火山图, 其中红色代表上调的差异基因, 绿色代表下调的差异基因, 灰色代表没有统计学差异的基因。

Table 2. Reads filtering statistics

表 2. Reads 过滤统计表

sample	Total Raw Reads (M)	Total Clean Reads (M)	Clean Reads Q30 (%)	Clean Reads Ratio (%)
A1	141.82	131.93	94.46	93.02
A2	144.31	134.13	94.02	92.95
A3	141.82	132.23	93.27	93.24
B1	144.31	133.47	94.3	92.49
B2	144.31	134.19	94.55	92.99
B3	144.31	134.15	94.38	92.96

注: Total Raw Reads (M): 过滤前 reads 数(百万条); Total Clean Reads (M): 过滤后 reads 数(百万条); Clean Reads Q30 (%): 过滤后 reads 质量大于 Q30比例; Clean Reads Ratio (%): 过滤后 reads比例。

得出的 470 个 DEGs 中包括 422 个 mRNA 和 48 个 lncRNA, 进而, 为了系统地识别差异表达基因的生物学联系并识别与肿瘤相关通路, 我们对筛选出来的 DEGs 进行了 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析从分子功能(MF)、细胞的组件作用(CC)、参与的生物学过程(BP), 这三个方面对不同组别的差异表达基因进行进一步的分析。

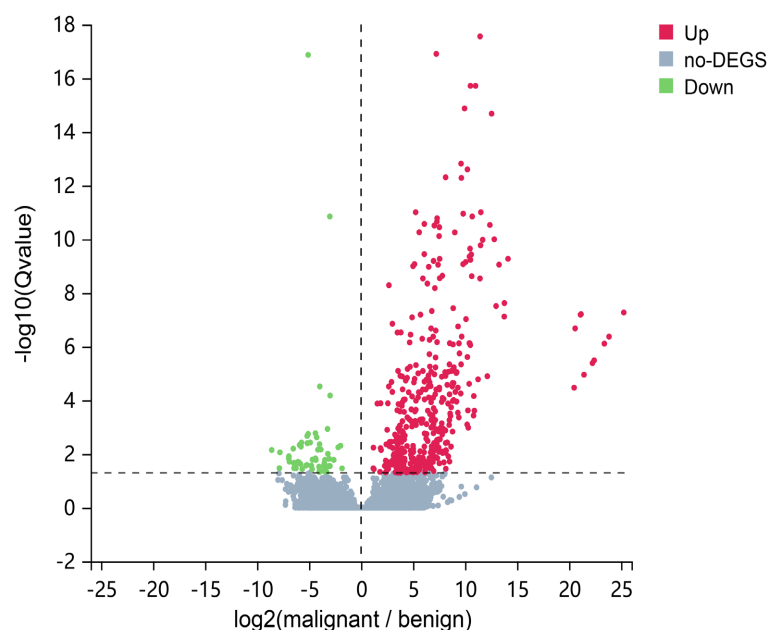


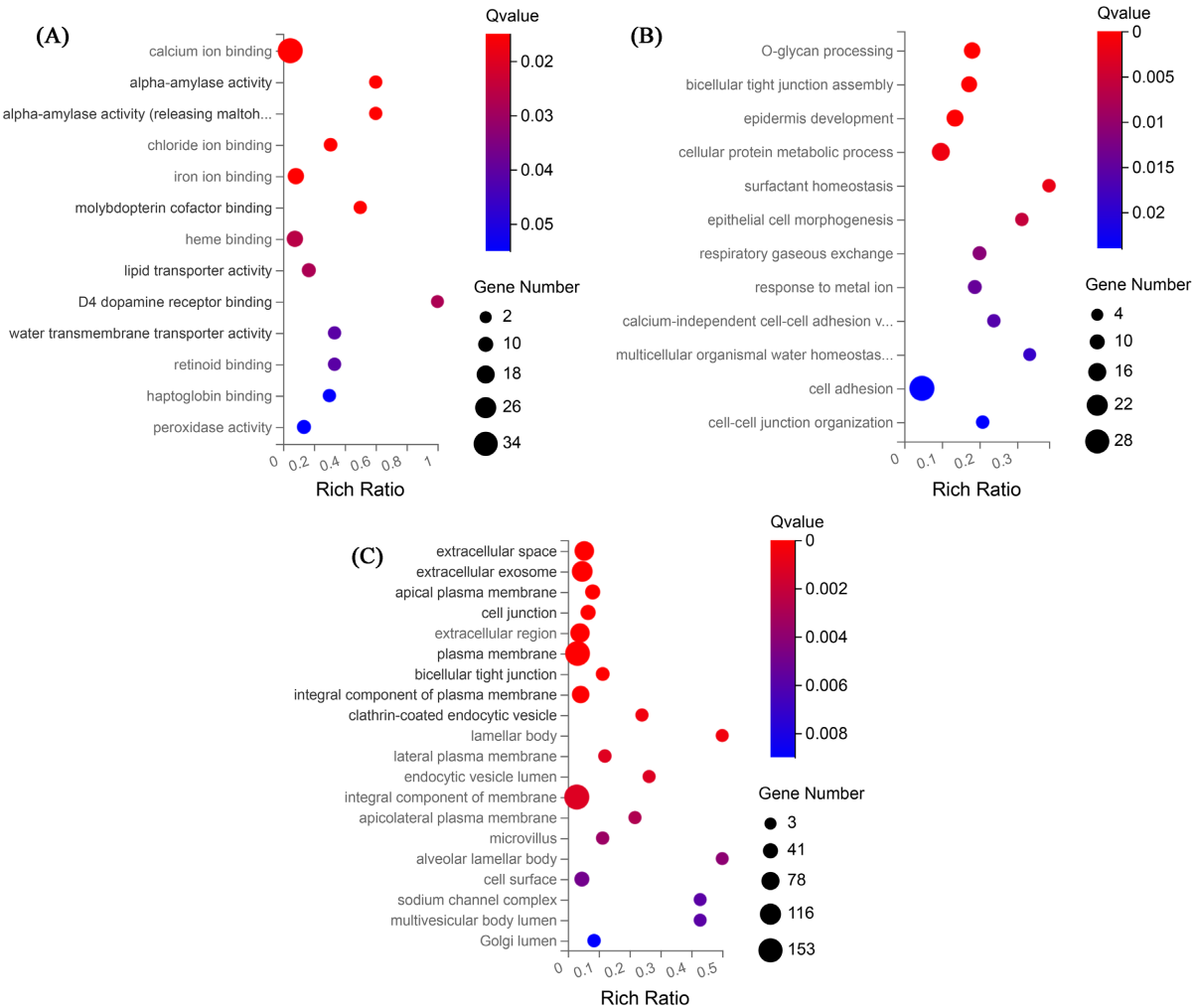
Figure 1. Differential gene volcano plot

图 1. 差异基因火山图

3.3. 差异表达基因的富集分析

根据对良恶性胸腔积液的 DEGs 进行 GO 分析, DEGs 在 MF、BP 和 CC 三个方面, 共富集了 2804 个条目, 当调整 P 值小于 0.05 时表示显著, 其中 DEGs 在 MF 方面显著富集的是: 钙离子结合、 α -淀粉

酶活性、 α -淀粉酶活性(释放麦芽六糖)等功能(图 2(A)); 在 BP 方面富集的是: O-聚糖加工、双细胞紧密连接组件、表皮发育、细胞蛋白代谢等过程(图 2(B)); 而在 CC 方面显著富集的是: 细胞外空间、细胞外分泌体、顶端质膜、细胞连接等结构(图 2(C))。



注: (A) MF 富集气泡图; (B) BP 富集气泡图; (C) CC 富集气泡图

Figure 2. GO enrichment bubble plot
图 2. GO 富集气泡图

将差异性表达的基因进行 KEGG 数据库通路分析, 从而确定 DEGs 发挥的主要生物学功能。两组的 DEGs 进行 KEGG 信号通路富集分析后, 共富集了 263 个通路, 其中显著富集的通路有 7 个(图 3), 了解到两组的 DEGs 显著富集在细胞粘附分子、花生四烯酸代谢、紧密连接、矿物质吸收等途径。

3.4. 差异表达基因与铜代谢相关基因的分析

从差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析中我们发现其中涉及了细胞紧密连接或细胞粘附功能条目, 有研究报道肿瘤的进展、迁移与其有着密切联系[3] [4]。同样地, 我们观察到 KEGG 富集到了矿物质吸收通路, 表明 MPE 与 BPE 中金属离子调控通路有显著差异。基于铜稳态受通路中的基因调控, 同时铜代谢相关的基因(CMRGs)在肿瘤增殖、血管生成和转移中起着重要作用[5] [6]。使用分子特征数据库

(MSigDB)筛选并加入铜死亡相关基因共 154 个 CMRGs, 然后把 DEGs 与 CMRGs 取交集, 共得到了 3 个基因(图 4)。分别是 MT1E、MT1X 和 MT2A, 说明这 3 个铜代谢相关基因在良恶性胸腔积液中的表达存在差异。

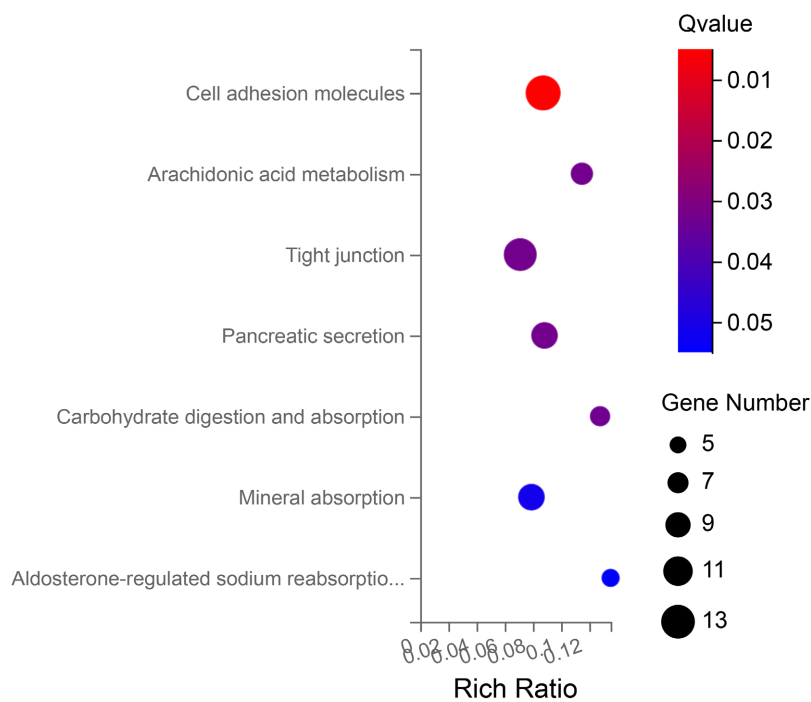


Figure 3. KEGG enrichment bubble plot

图 3. KEGG 富集气泡图

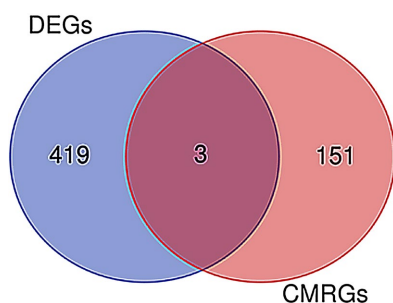
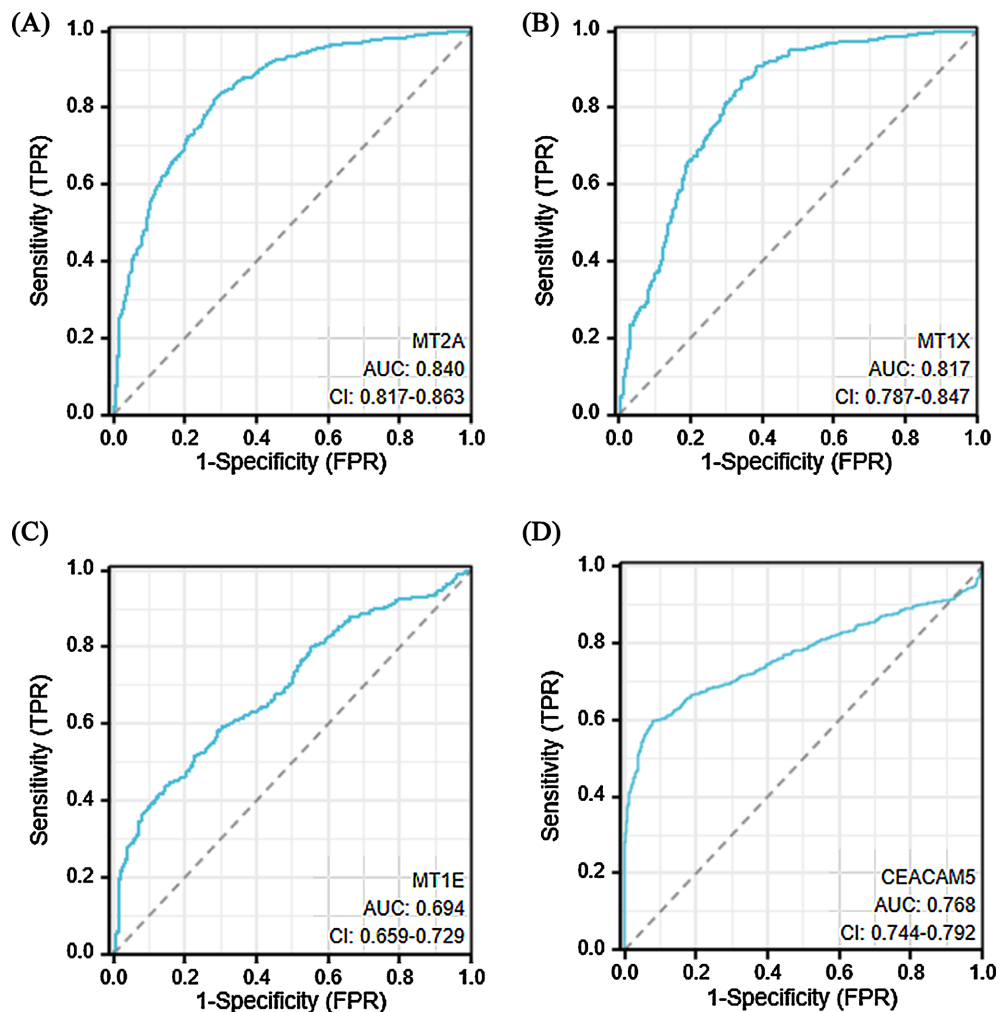


Figure 4. Venn diagram of DEGs and CMRGs

图 4. DEGs 和 CMRGs 维恩图

进一步探究 MT1E、MT1X 和 MT2A 在肺癌和正常人群中的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)来观察其诊断性能, 在 TCGA 和 GTEx 的数据集中进行验证, 总共含有 1013 个肺癌组织和 397 个正常肺组织测序表达量信息, 通过与临床常用筛查肺癌的肿瘤标记物癌胚抗原(CEACAM5) [7] [8] 进行比较判断。使用 R 包分析得到 ROC 曲线(图 5)以及曲线下面积(AUC)分别为 MT1E (AUC = 0.694), MT1X (AUC = 0.817) MT2A (AUC = 0.840), CEACAM5 (AUC = 0.768), AUC 取值范围一般在 0.5 和 1 之间, AUC 越接近于 1, 说明选择的变量在想要预测的结局的诊断效果越好。结果表明 MT1E、MT1X 和 MT2A 在肺腺癌患者的诊断中具有较好的效能, 其中 MT2A 与 MT1X 的诊断效能高于 CEACAM5。



注: (A) MT2A 诊断肺癌的 ROC 曲线; (B) MT1X 诊断肺癌的 ROC 曲线; (C) MT1E 诊断肺癌的 ROC 曲线; (D) CEACAM5 诊断肺癌的 ROC 曲线。横坐标 X 轴为 1-特异性, 也称为假阳性率, X 轴越接近零准确率越高; 纵坐标 Y 轴称为敏感度, 也称为真阳性率(敏感度), Y 轴越大代表准确率越好。

Figure 5. ROC curve of target genes for diagnosing lung cancer
图 5. 目的基因诊断肺癌的 ROC 曲线

3.5. 差异表达的 CMRGs 与免疫浸润的相关性

通过 Timer 数据库计算差异表达的 CMRGs MT1X、MT1E 和 MT2A 在 LUAD 中与 B 细胞、CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的浸润程度数据, 并估算其与不同类型免疫细胞浸润丰度之间的关系(见图 6)。可以观察到 MT2A 表达与中性粒细胞和树突状细胞浸润呈正相关($P < 0.05$), MT1X 和 MT1E 与免疫细胞浸润的相关性系数较小。

3.6. 差异表达的 lncRNA 和铜代谢相关基因的相关性分析

根据现有研究显示, 长链非编码 RNA(lncRNA)在肺癌、胃癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的病理进程中发挥重要调控作用[9] [10]。构建了以归一化信号强度为基础的 lncRNA-mRNA 共表达网络模型。根据预设筛选标准, 当基因对的相关系数绝对值超过 0.9 且其 P 值小于 0.01 时, 即可判定该 lncRNA 与 mRNA 间存在统计学显著的共表达关系, 绘制出共表达桑基图(图 7)和网络图(图 8), 共得到了 82 个网络节点,

与 CMRGs 的 mRNA 连接关系最密切的 lncRNA 为 LOC105369559, 表明在恶性胸腔积液中 LOC105369559 参与 CMRGs 的调控, 并且其扮演了一个重要的角色。

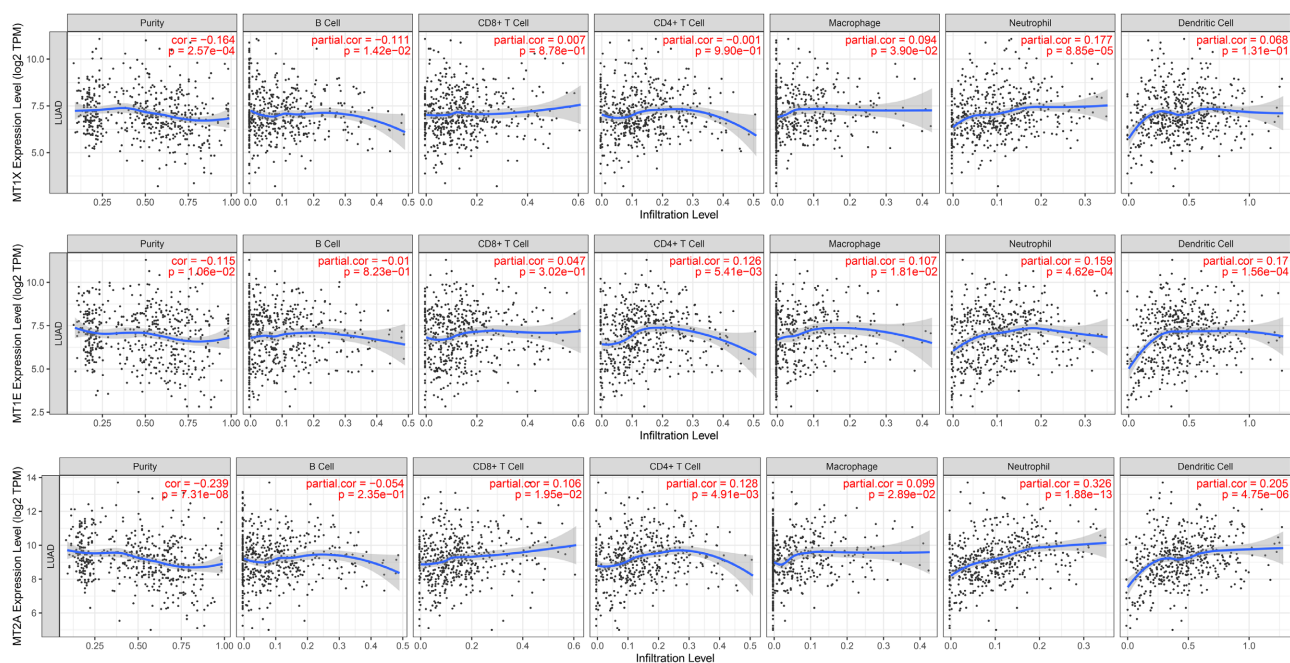


Figure 6. The correlation between CMRGs and immune cell infiltration

图 6. CMRGs 与免疫细胞浸润的相关性

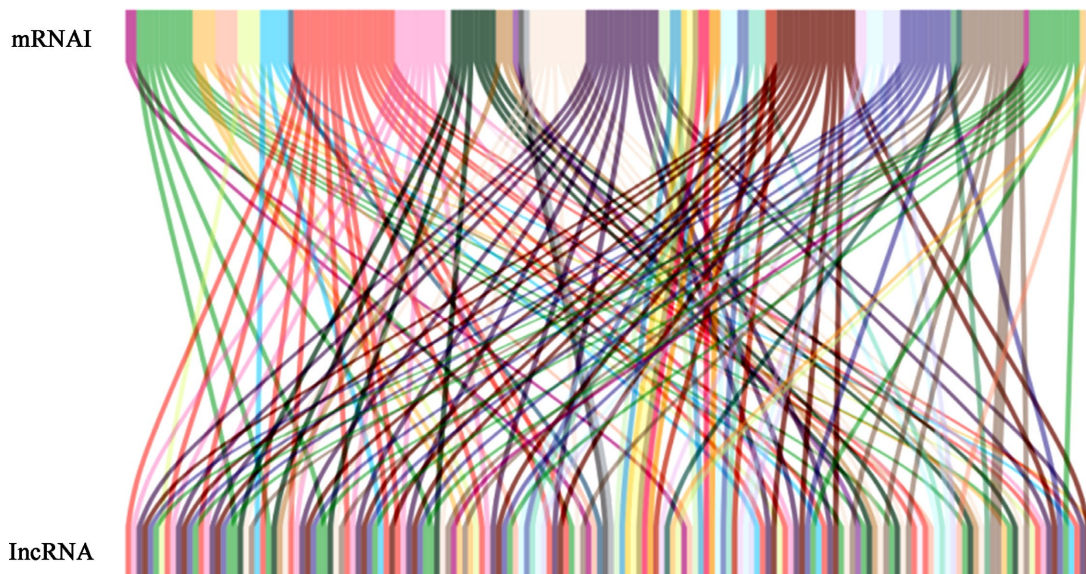


Figure 7. Sankey diagram of co-expression correlations between differential lncRNAs and CMRGs

图 7. 差异 lncRNA 和 CMRGs 共表达相关性桑基图

3.7. RT-qPCR 验证关键基因

RNA-Seq 的准确性是面向整体的数据, 其可能会受到测序深度或者测序误差等的影响, 导致对某个基因的表达量测量出现错误结果, 所以后续对结果进行 RT-qPCR 验证可以提高筛选结果的准确性。本研

究使用 RT-qPCR 对 MT1E、MT1X、MT2A 的 mRNA 表达水平和 LOC105369559 的 lncRNA 表达水平进行验证, 并得到图 9 的结果。RT-qPCR 得出目的基因在 MPE 和 PE 中表达水平趋势和测序一致, 其中 MT1E 的 $P=0.0252$, MT1X 的 $P=0.0016$, MT2A 的 $P=0.0442$, LOC105369559 的 $P=0.0024$, $P<0.05$ 提示有统计学意义。

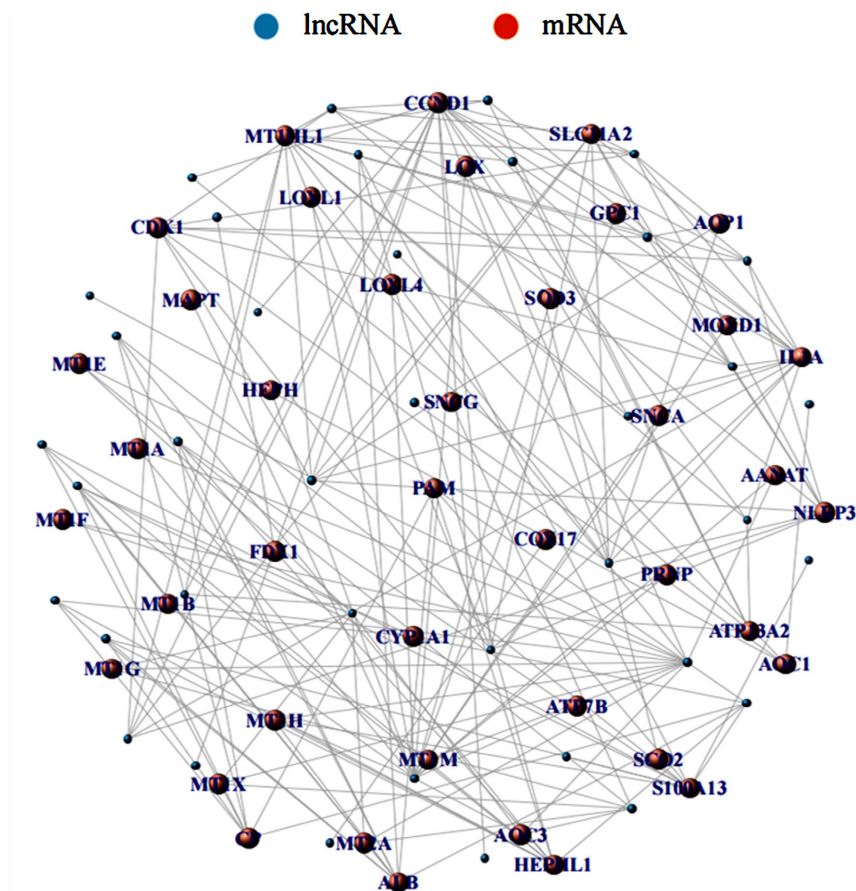
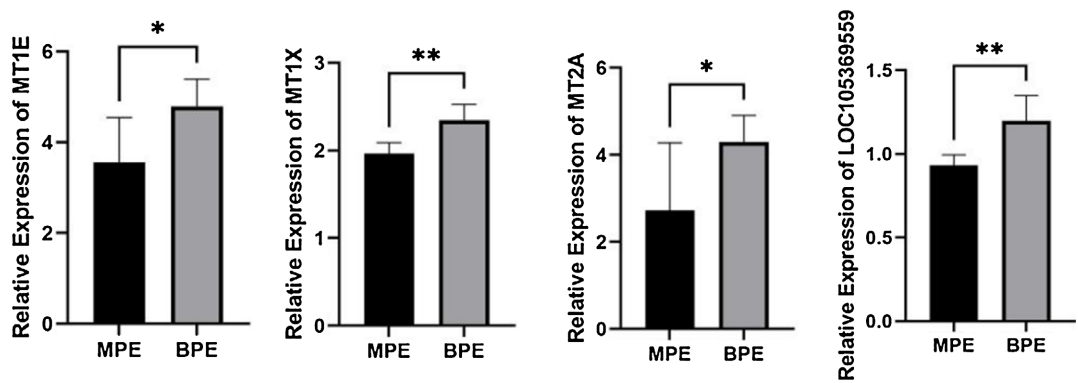


Figure 8. Co-expression correlation network of differential lncRNAs and CMRGs
图 8. 差异 lncRNA 和 CMRGs 共表达相关性网络图



注: *代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$ 。
Figure 9. RT-qPCR validation of key genes
图 9. RT-qPCR 验证关键基因

4. 讨论

通过对 DEGs 富集分析得到显著富集于细胞粘附分子(cell adhesion molecules, CAMs)、花生四烯酸(AA)代谢等通路。同样以上通路对调控肿瘤的进展起到关键作用。Wei 等[11]发现线粒体核糖体蛋白 L19 (MRPL19)的高表达通过调控细胞粘附分子通路, 促进肿瘤微环境改变、上皮-间质转化(EMT)进程以及免疫逃逸, 从而驱动肺癌的恶性进展使得预后不良, 同时其表达与 miR-26a-5p 相关, 阻断 miR-26a-5p 可能会限制肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移[12]; GATA6 通过激活囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)来抑制 AA 代谢途径的激活从而发挥抑制肺癌转移的作用[13]; 上述研究结果发现调节肺癌中的 CAMs 途径和 AA 代谢途径可以影响肺癌的进展, 本研究在 MPE 中观察到这些通路的显著富集, 那么针对 CAMs 和 AA 通路中的关键因子开发的方案可能会有利于 MPE 患者的治疗和预后情况。

本研究的富集结果显示矿物质吸收通路在 MPE 中的富集, 同样引起了我们的注意, 既往该通路在 MPE 中的研究报道较少, 随着其中 CMRGs 对肿瘤的调节作用渐渐引起关注, 其重要性被逐步证实, 成为近年来的研究焦点, 探究 CMRGs 在 MPE 中的表达情况可能对 MPE 的诊断和患者的治疗提供新的生物标志物。我们发现其在 MPE 中的表达下调与前人在多种肿瘤中探究到的结果有一致和相反的情况。MT1E 的下调与前列腺癌的进展相关, 可能的机制是异常的 MT1E 启动子甲基化导致的[14]。MT1E 也被证明可以影响 EMT 表型的变化, 其过表达后可以通过增加上皮钙黏蛋白表达, 降低神经钙黏蛋白和波形蛋白的表达从而抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力[15]。后续可以探究 MPE 中的 MT1E 甲基化水平和 MT1E 对 EMT 的影响进一步阐明其和肿瘤的作用机制。在透明细胞肾癌中 MT1X 表达上调, 其可能是通过促进 TGF- β 1 的过表达抑制免疫细胞的增殖, 此时肿瘤细胞更具有侵袭性[16]。与本研究在 MPE 中观察的 MT1X 表达情况相反, 可能是由于肿瘤的异质性导致了这一结果。也有报道称体外实验中肝癌细胞 MT1X 的表达下调, 其过表达延缓了细胞的 G1/S 周期的进展并促进了细胞凋亡, 又在裸鼠体内观察到其上调抑制了肿瘤生长和肺转移 MT1X 可能是通过抑制肝癌中的 NF- κ B 途径的激活来诱导细胞周期停滞和细胞凋亡[17]。这与本研究探究出的 MT1X 在 MPE 中的表达情况相同。过表达的 MT2A 可以减少磷酸化的核心激酶 MST1/2 和 LATS1/2 进而减少下游效应因子 YAP/TAZ 的磷酸化, 抑制 Hippo 信号通路从而促进细胞的增殖、迁移和抵抗凋亡等过程[18], MT2A 的上调可以使磷酸化 I κ B- α 与 CyclinD1 显著降低从而抑制 NF- κ B 通路的激活, 有效减少急性髓系白血病的异常增殖[19]。可见 MT1E、MT1X 和 MT2A 在多种肿瘤类型中进行了研究, 但其在 MPE 中的情况的尚不明确, 本研究得出的 MT1E、MT1X 和 MT2A 在 MPE 中 mRNA 的表达水平相对 BPE 中降低的结论, 为这一方向的研究空缺提供研究数据。

接着, 我们通过与癌胚抗原这个常用指标的诊断效能对比, 得到筛选出的 3 个 CMRGs 的判断性能, 由于 MPE 和 BPE 测序数据集较少, 我们观察在肺癌和正常肺组织数据集中的诊断性能来判断其性能趋势。得到的结果是相对于目前临床上的常用标志物癌胚抗原, MT2A 和 MT1X 的 AUC 皆大于癌胚抗原, 诊断性能更具优势, 有望通过更进一步的研究与验证后应用于 MPE 的鉴别诊断中。

lncRNA 在基因表达调控、染色质重塑和细胞周期调控上起着重要作用, 近些年越来越多的相关研究表明 lncRNA 与癌症等疾病的关联紧密[20] [21]。为了探究本研究得到的 MPE 中差异表达的 lncRNA 是否与 CMRGs 存在相互影响的关系, 试图找出关键 lncRNA。我们通过计算其与 CMRGs 共表达相关性, 绘制出网络图, 得到连接最多的 lncRNA 为 LOC105369559, 意味 LOC105369559 可能在 MPE 中对于铜稳态的调控起关键作用。本研究得到的 CMRGs 共表达枢纽 lncRNA 目前有报道的相关文献很少, LOC105369559 对 MPE 以及其他肿瘤的调控机制仍待研究。

RNA-seq 所得到的结果可能会由于误差出现错误, 对筛选出的 mRNA 和 lncRNA 进一步通过 RT-qPCR 验证分析, 得到的差异趋势与测序结果的方向相同, 提高了结果的准确性。

综上所述, 本研究通过对 MPE 以及 BPE 进行转录组学测序, DEGs 分析, 发现了 MT1E、MT1X、

MT2A 和 LOC105369559 在 MPE 中表达显著下调, 对 PE 的性质判断有提示性意义, 后续可以通过研究分子机制进一步探索其作用条件。

5. 结论

细胞粘附分子途径以及花生四烯酸代谢途径与恶性胸腔积液进展相关。恶性胸腔积液差异表达的 lncRNA LOC105369559 与铜代谢相关基因关联性最强。差异表达的铜代谢相关基因 MT1E、MT1X、MT2A 和 lncRNA LOC105369559 在恶性胸腔积液中的表达显著下调。MT1X 和 MT2A 在引起恶性胸腔积液的肺癌诊断中优于传统指标。

参考文献

- [1] Gayen, S. (2022) Malignant Pleural Effusion: Presentation, Diagnosis, and Management. *The American Journal of Medicine*, **135**, 1188-1192. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2022.04.017>
- [2] Madani, M.H., Riess, J.W., Brown, L.M., Cooke, D.T. and Guo, H.H. (2023) Imaging of Lung Cancer. *Current Problems in Cancer*, **47**, Article 100966. <https://doi.org/10.1016/j.currproblecancer.2023.100966>
- [3] Salustros, N., Grønberg, C., Abeyathna, N.S., Lyu, P., Örædd, F., Wang, K., *et al.* (2022) Structural Basis of Ion Uptake in Copper-Transporting P1b-Type Atpases. *Nature Communications*, **13**, Article No. 5121. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32751-w>
- [4] Means, M.J., Santos, F.J.R., Sotardi, S.T. and Beslow, L.A. (2022) Menkes Disease: Clinical Presentation and Imaging Characteristics. *Neuropediatrics*, **53**, 218-220. <https://doi.org/10.1055/a-1762-0354>
- [5] Forcella, M., Lau, P., Oldani, M., Melchiorretto, P., Bogni, A., Gribaldo, L., *et al.* (2020) Neuronal Specific and Non-Specific Responses to Cadmium Possibly Involved in Neurodegeneration: A Toxicogenomics Study in a Human Neuronal Cell Model. *NeuroToxicology*, **76**, 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.11.002>
- [6] da Silva, D.A., De Luca, A., Squitti, R., Rongioletti, M., Rossi, L., Machado, C.M.L., *et al.* (2022) Copper in Tumors and the Use of Copper-Based Compounds in Cancer Treatment. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **226**, Article 111634. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111634>
- [7] Blumenthal, R.D., Leon, E., Hansen, H.J. and Goldenberg, D.M. (2007) Expression Patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in Primary and Metastatic Cancers. *BMC Cancer*, **7**, Article No. 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-2>
- [8] Baczyńska, D., Wietrzyk, J., Madej, J., Krop-Watorek, A., Dabrowska, A., Widerak, K., *et al.* (2003) The Tumorigenic Potential of Human CX-1 Colon Adenocarcinoma Cells Depends on Carcinoembryonic Antigen (CEACAM5) Expression. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **8**, 471-486.
- [9] Farzaneh, M., Nasrolahi, A., Ghaedrahmati, F., Masoodi, T., Najafi, S., Sheykhi-Sabzehpoush, M., *et al.* (2023) Potential Roles of LncRNA-Xist/miRNAs/mRNAs in Human Cancer Cells. *Clinical and Translational Oncology*, **25**, 2015-2042. <https://doi.org/10.1007/s12094-023-03110-y>
- [10] Rajagopal, T., Talluri, S., Akshaya, R.L. and Dunna, N.R. (2020) HOTAIR LncRNA: A Novel Oncogenic Propellant in Human Cancer. *Clinica Chimica Acta*, **503**, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.12.028>
- [11] Wei, D., Sun, D., Sirera, R., Afzal, M.Z., Leong, T.L., Li, X., *et al.* (2023) Overexpression of MRPL19 in Predicting Poor Prognosis and Promoting the Development of Lung Adenocarcinoma. *Translational Lung Cancer Research*, **12**, 1517-1538. <https://doi.org/10.21037/tlcr-23-306>
- [12] Liu, L., Li, S., Qu, Y., Bai, H., Pan, X., Wang, J., *et al.* (2023) Ablation of ERO1A Induces Lethal Endoplasmic Reticulum Stress Responses and Immunogenic Cell Death to Activate Anti-Tumor Immunity. *Cell Reports Medicine*, **4**, Article 101206. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101206>
- [13] Lin, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Weng, J., Shen, R., Lin, Y., *et al.* (2025) GATA6 Suppresses Lung Adenocarcinoma Progression by Activating CFTR to Modulate Arachidonic Acid Metabolism. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **28**, 582-591. <https://doi.org/10.2174/0113862073269158240122072743>
- [14] Zhuang, X., Chen, P., Yang, K., Yang, R., Man, X., Wang, R., *et al.* (2024) MT1E in AML: A Gateway to Understanding Regulatory Cell Death and Immunotherapeutic Responses. *Journal of Leukocyte Biology*, **116**, 1515-1529. <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiae151>
- [15] 刘其成. MT1E 基因在肝癌中发挥抑癌作用的分子机制及其功能研究[D]: [博士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- [16] Ding, Y., Fang, J., Chen, M., Xu, Y., Liu, N., Fang, S., *et al.* (2022) MT1X Is an Oncogene and Indicates Prognosis in Ccrcc. *Bioscience Reports*, **42**, BSR20221128. <https://doi.org/10.1042/bsr20221128>
- [17] Liu, Z., Ye, Q., Wu, L., Gao, F., Xie, H., Zhou, L., *et al.* (2018) Metallothionein 1 Family Profiling Identifies MT1X as

- a Tumor Suppressor Involved in the Progression and Metastatic Capacity of Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, **57**, 1435-1444. <https://doi.org/10.1002/mc.22846>
- [18] Murphy, E. and Steenbergen, C. (2008) Mechanisms Underlying Acute Protection from Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiological Reviews*, **88**, 581-609. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2007>
- [19] Bosman, M.C.J., Schuringa, J.J. and Vellenga, E. (2016) Constitutive NF- κ B Activation in AML: Causes and Treatment Strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **98**, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.001>
- [20] Tan, Y., Lin, J., Li, T., Li, J., Xu, R. and Ju, H. (2020) LncRNA-Mediated Posttranslational Modifications and Reprogramming of Energy Metabolism in Cancer. *Cancer Communications*, **41**, 109-120. <https://doi.org/10.1002/cac2.12108>
- [21] Grammatikakis, I. and Lal, A. (2021) Significance of LncRNA Abundance to Function. *Mammalian Genome*, **33**, 271-280. <https://doi.org/10.1007/s00335-021-09901-4>