

基于机器学习与生物信息学整合的慢性阻塞性肺疾病铜死亡相关诊断标志物筛选

赵 玮, 胡晨阳*

山东大学齐鲁医院呼吸与危重症医学科, 山东 济南

收稿日期: 2025年5月9日; 录用日期: 2025年6月2日; 发布日期: 2025年6月10日

摘 要

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)作为全球主要致死疾病之一, 与铜死亡密切相关。本研究旨在从铜死亡相关基因中筛选COPD诊断生物标志物。我们分析了来自GEO数据库的三个数据集(GSE106986、GSE103174、GSE71220)。在标准化及归一化后, 基于文献中确定的铜死亡相关基因, 我们在GSE106986中进行差异表达分析, 识别出7个铜死亡相关差异表达基因及2个患者亚群(C1/C2)。通过GO和KEGG富集分析、相关性分析及单样本基因集富集分析, 提示差异基因与炎症、氧化应激和免疫应答相关通路有关。进一步采用WGCNA、LASSO和SVM算法筛选出5个核心基因, 其中RALB和SLC31A1为关键诊断标志物。在GSE103174和GSE71220中验证其诊断性能, ROC曲线显示RALB和SLC31A1联合AUC为0.77。

关键词

慢性阻塞性肺疾病, 铜死亡, 机器学习

Identification of Cuproptosis-Related Diagnostic Biomarkers in COPD by Integrating Machine Learning and Bioinformatics

Wei Zhao, Chenyang Hu*

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan Shandong

Received: May 9th, 2025; accepted: Jun. 2nd, 2025; published: Jun. 10th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 赵玮, 胡晨阳. 基于机器学习与生物信息学整合的慢性阻塞性肺疾病铜死亡相关诊断标志物筛选[J]. 临床个性化医学, 2025, 4(3): 477-488. DOI: 10.12677/jcpm.2025.43371

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a leading global cause of mortality, is closely linked to cuproptosis. This study aimed to identify diagnostic biomarkers for COPD from cuproptosis-related genes. Three GEO datasets (GSE106986, GSE103174, GSE71220) were analyzed. After normalization, differential expression analysis in GSE106986 identified 7 cuproptosis-related DEGs and 2 patient subgroups (C1/C2) using literature-curated cuproptosis genes. GO/KEGG enrichment, correlation, and single-sample GSEA revealed associations with inflammation, oxidative stress, and immune pathways. WGCNA, LASSO, and SVM identified 5 hub genes, with RALB and SLC31A1 as key diagnostic markers. Validation in GSE103174 and GSE71220 showed combined AUC of 0.77 for RALB and SLC31A1.

Keywords

COPD, Cuproptosis, Machine Learning

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

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种临床症状为慢性咳嗽、咳痰、喘息及呼吸困难等疾病[1]。当下 COPD 是全球第三大死亡原因[2]。2019 年,约有 320 万人死于 COPD [3],该疾病每年给全球经济造成的负担超过数千亿美元[4]。研究表明,COPD 的症状是不可逆的[5],现有治疗策略主要集中于延缓疾病进展[6]。因此,探索 COPD 的新型诊断生物标志物和治疗靶点已成为日益紧迫的需求。

金属离子对细胞代谢至关重要[7]。它不仅作为多种酶和蛋白质的辅因子发挥作用,还参与调控细胞内的信号转导和基因表达过程[8]。然而,金属离子的过量或缺乏都可能影响人类健康[9]。研究表明, Fe^{2+} 可通过调节脂质过氧化过程产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致细胞膜损伤,进而导致细胞死亡,这一现象被称为铁死亡[10]。而 Ca^{2+} 已被证实可通过调控 mTOR 和 AMPK 等自噬相关蛋白影响自噬[11]。这两种细胞死亡途径已被证明在肺腺癌[12]、肝细胞癌[13]及 COPD [14] [15]中发挥着重要作用。

铜死亡是一种 Cu^{2+} 与脂酰化蛋白结合诱导的以内质网应激和线粒体功能障碍为特征的坏死性细胞死亡[16],已被确认为 COPD 发病机制的重要参与者。 Cu^{2+} 的过度积累引发氧化应激和线粒体功能障碍,进一步加剧了 COPD 中的炎症反应和组织损伤[17]。尽管已有许多证据表明铜死亡与 COPD 发病机制相关,但两者间的具体分子相互作用仍需阐明。本研究采用多种生物信息学方法解析铜死亡与 COPD 之间的相关分子特征,筛选出高效诊断生物标志物,为 COPD 的预防和诊断提供新的方向。

2. 材料与方法

2.1. 数据收集

从基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中获取了 3 个与 COPD 相关的全基因组表达谱(GSE106986、GSE103174、GSE71220)。我们从既往研究中整理出 52 个铜死亡(cuproptosis)相关基因[18] [19]。

2.2. 功能分析

我们采用 CIBERSORT 和 ssGSEA 方法[20], 通过 Wilcoxon 符号秩检验评估组间差异的统计学显著性并使用 R 包“clusterProfiler”(v.4.4.4)进行 GO/KEGG 分析[21]。随后采用 R 包“estimate”(v.1.0.13)系统计算免疫评分、基质评分及 ESTIMATE 评分。通过 Benjamini-Hochberg 多重比较校正算法重新校准统计学显著性水平。

2.3. COPD 患者的无监督聚类分析

我们在 SangerBox 在线平台(<http://sangerbox.com/>)进行了无监督聚类分析[22]。随后, 利用平台内置的可视化模块执行主成分分析。

2.4. 加权基因共表达网络分析

在加权基因共表达网络分析中, 我们构建了无标度共表达网络并选择最优幂值($R^2 = 0.9$)以确保网络符合无标度拓扑模型。模块识别通过 1-TOM 矩阵的层次聚类完成。为定量评估表型关联性, 我们计算模块显著性(MS)作为模块特征基因与临床结局的相关性, 同时通过置换检验量化基因显著性(GS)以评估单个基因的疾病关联强度。

2.5. 机器学习确定关键基因

本研究采用机器学习方法筛选 COPD 与铜死亡的共同枢纽基因。首先, 我们采用自适应惩罚调优策略, 通过 R 包“glmnet”进行 LASSO 回归[23]。随后进行特征验证: 采用 SVM 方法, 结合递归特征消除法, 以 R 包“e1071”实现模型训练[24], 以平均误分类率作为模型比较的核心性能指标。

2.6. 诊断准确性验证

本研究通过 SPSS (v.25.0)软件进行 ROC 曲线分析, 系统性评估了筛选的关键基因的诊断鉴别能力。

2.7. 统计分析

采用 Mann-Whitney U 检验分析基因表达模式的组间差异显著性。通过 GraphPad Prism (v.9.0)、SPSS (v.25.0)和 R (v.4.1.0)实现高级统计建模与绘图。以双侧 p 值 < 0.05 作为统计学显著性标准, 通过 Benjamini-Hochberg (BH)方法获得校正后 p 值($p.adjust$)。

3. 结果

3.1. COPD 患者铜死亡相关基因的表达和免疫浸润

为探究铜死亡相关基因在 COPD 发病机制及进展中的作用, 我们在 GSE106986 数据集中对 52 个铜死亡相关基因进行表达谱分析, 发现仅 7 个铜死亡相关基因在 COPD 患者与健康对照组间呈现显著表达差异(图 1(a))。其中, GLS、MAP2K1、SLC31A1、STEAP1 和 STEAP2 在 COPD 中显著上调, 而 ATP7A 和 VEGFA 则下调。随后我们对这 7 个铜死亡相关差异表达基因进行相关性分析, 结果显示 VEGFA 与其他基因存在显著关联, 其中 VEGFA 与 STEAP2 的相关系数最高($r = 0.81$) (图 1(b))。

对 GSE106986 数据集的免疫浸润分析表明, COPD 患者 CD4⁺初始 T 细胞显著减少($p < 0.05$), 其他免疫细胞亚群无显著差异(图 1(c))。ssGSEA 分析显示, COPD 患者初始 B 细胞、成熟 NK 细胞和调节性 T 细胞的富集评分升高($p < 0.05$), 其余免疫细胞亚群无显著变化(图 1(d))。这种双重免疫分型方法揭示了 COPD 病理中独特的免疫景观紊乱, 其特征为 T 细胞耗竭与代偿性 B/NK 细胞激活并存。

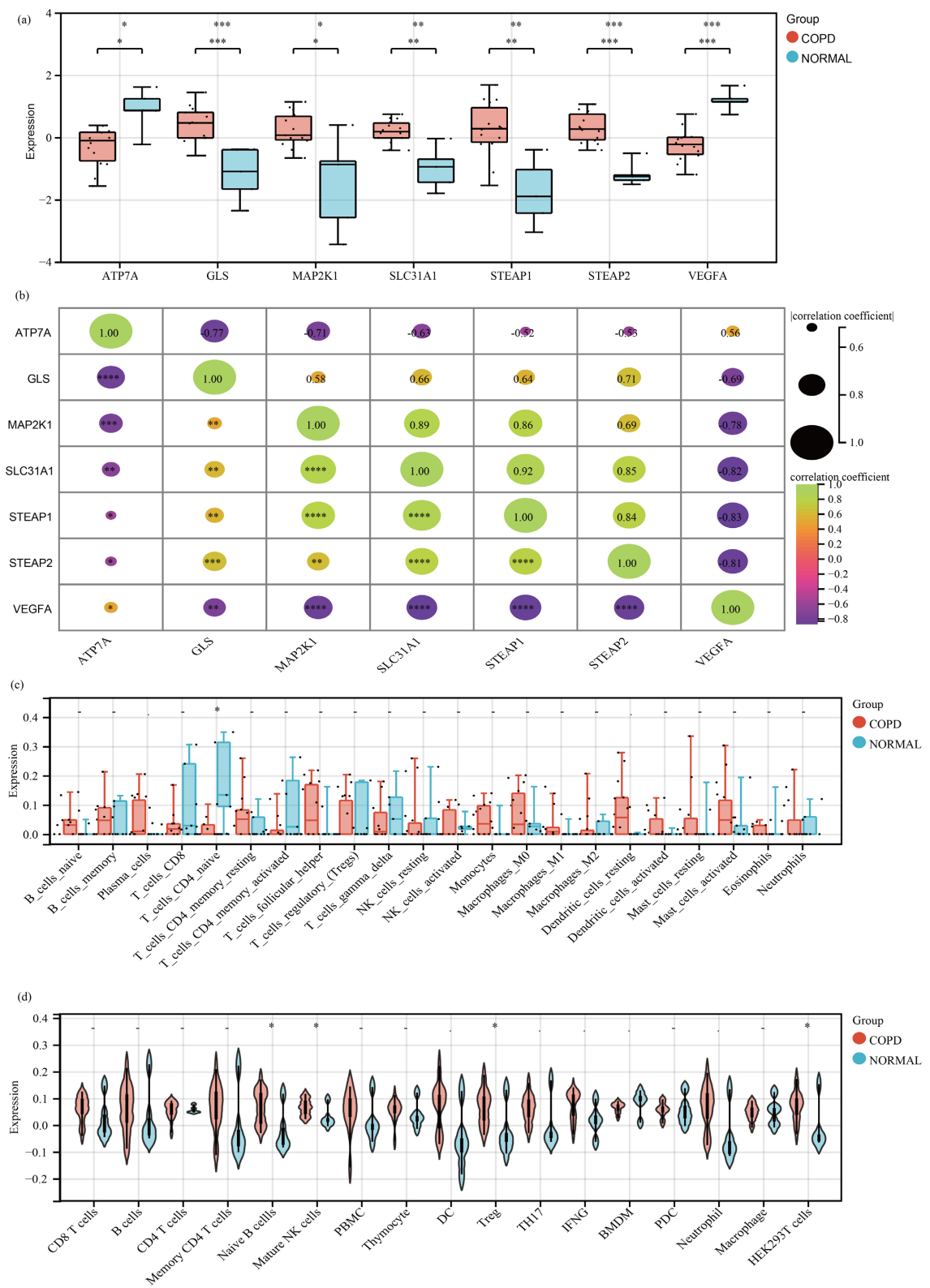


Figure 1. Cuprotoxis-related differentially expressed genes between COPD patients and normal controls in the GSE106986 dataset

图 1. 在 GSE106986 数据集中鉴定 COPD 患者与正常对照间铜死亡相关差异表达基因

3.2. 基于铜死亡相关基因的 COPD 患者聚类分析

为探究基于铜死亡相关差异基因的 COPD 患者亚表型分型, 我们对 GSE106986 数据集实施无监督聚类分析, 识别出两个具有差异基因表达模式的铜死亡相关亚群(C1 和 C2) (图 2(a)~(c))。共识矩阵分析显示 $k=2$ 时聚类稳定性良好(图 2(d), 图 2(e)), 主成分分析进一步证实了亚群间存在显著区别(图 2(f))。

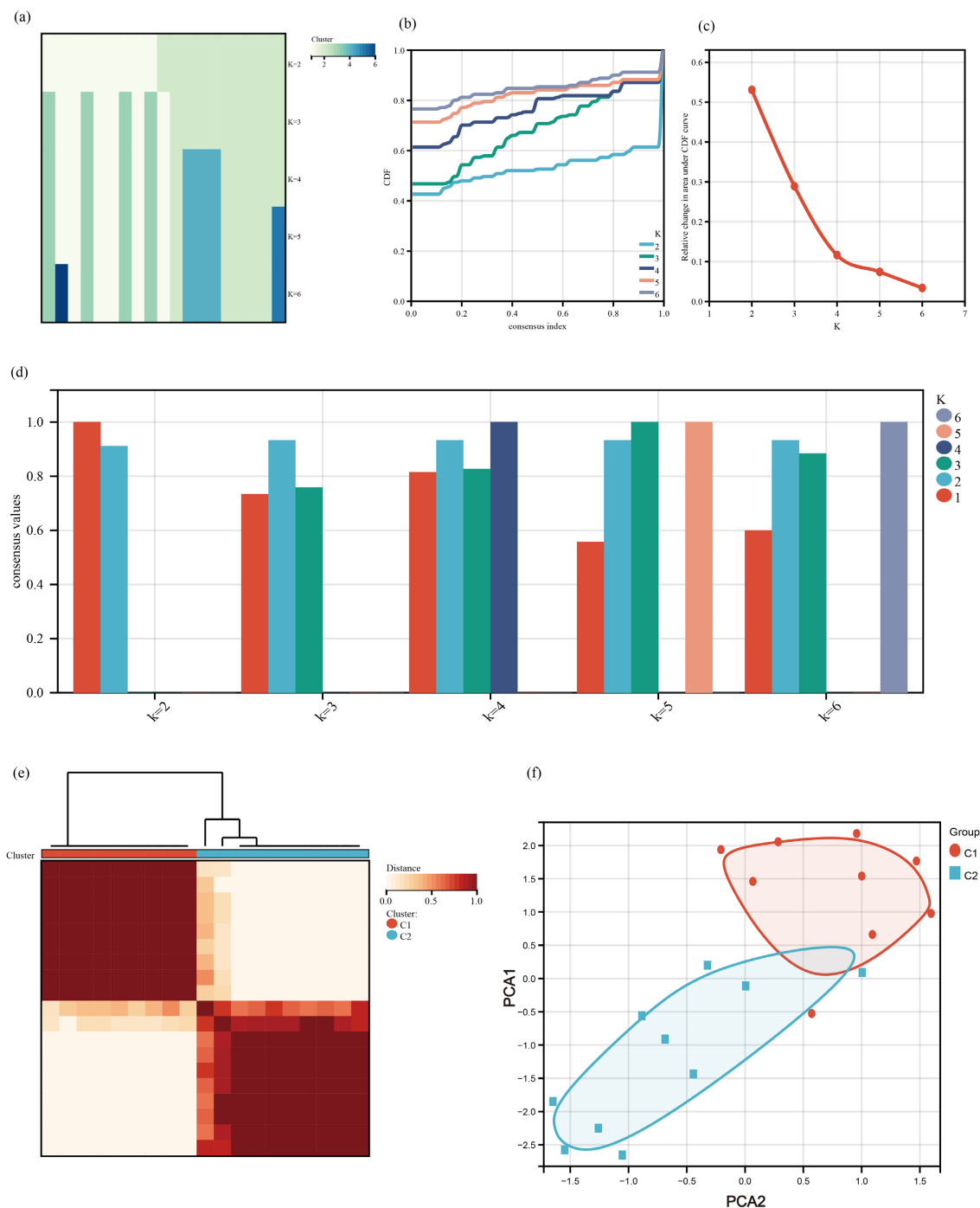


Figure 2. Identification of COPD subtypes based on cuprotoxicity-related differentially expressed genes

图 2. 基于铜死亡相关差异表达基因的 COPD 患者亚型的鉴定

3.3. C1 和 C2 的功能富集分析

为阐明 C1 和 C2 亚群间的分子差异, 我们对其进行了差异基因表达分析。上述 7 个铜死亡相关差异表达基因在 C1 与 C2 间呈现统计学显著的表达差异(图 3(a))。然后我们进行了多种功能富集分析: 火山图展示了差异表达基因在两组间的分布(图 3(b)); GO 分析显示差异表达基因主要涉及细胞内分子定位、运输及细胞质相关功能(图 3(c)); GSEA 揭示差异表达基因显著富集于 DNA 错配修复途径、RNA 聚合酶依赖的转录激活及蛋白质运输网络等核心细胞过程(图 3(d))。此外, 我们计算了 C1 和 C2 的免疫评分、基质评分及 ESTIMATE 评分, 但两组间无显著差异(图 3(e)~(g))。

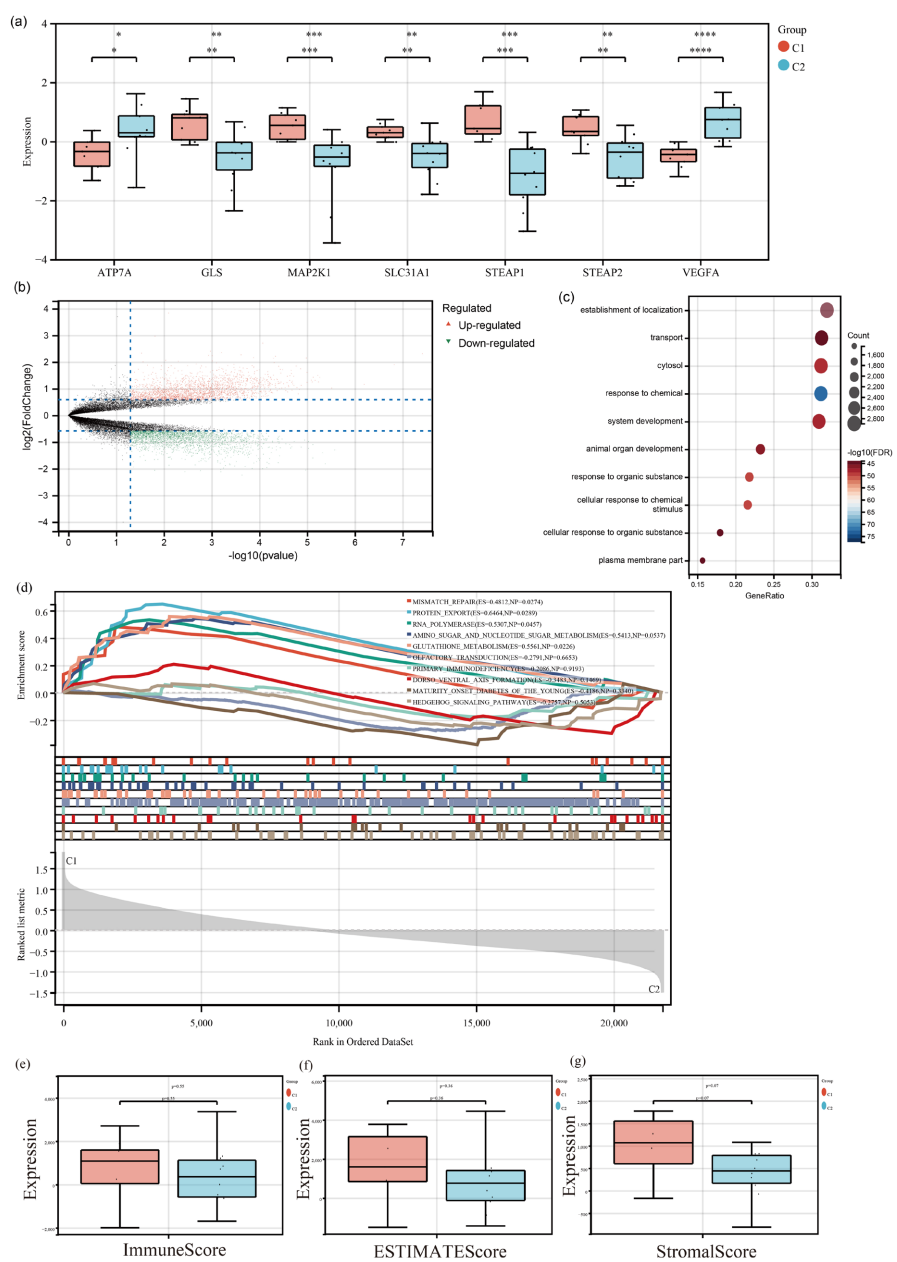


Figure 3. Functional enrichment analysis of cuprotoxicity-related differentially expressed genes in COPD patients
图 3. COPD 患者铜死亡相关差异表达基因的功能富集分析

3.4. 加权基因共表达网络及模块分析

通过加权基因共表达网络分析, 我们基于无标度拓扑模型($R^2=0.95$)和软阈值幂值 8 (图 4(a), 图 4(b)) 构建了 C1 和 C2 的共表达模块, 并通过层次聚类识别出 18 个不同颜色的模块(图 4(c))。模块 - 性状关系的热图可视化(图 4(d), 图 4(e))展示了基因表达的一致性模式, 而模块特征基因 - 性状相关性分析显示青色模块与两类 COPD 患者亚型存在显著关联(图 4(f))。

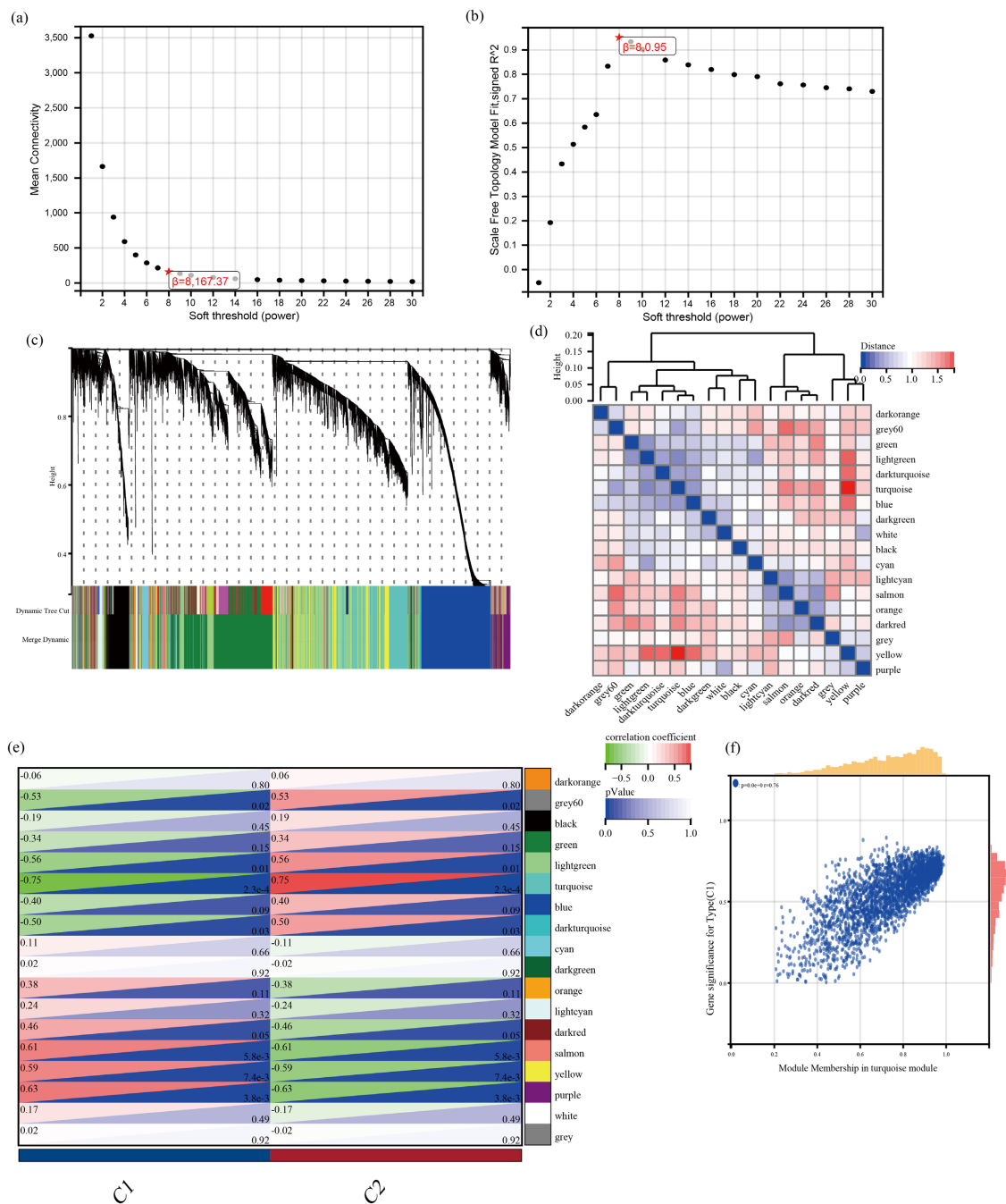


Figure 4. WGCNA of COPD-associated cuprotoxis-related differentially expressed genes
图 4. 基于铜死亡相关差异表达基因的加权基因共表达网络分析

3.5. 关键基因的筛选和验证

为筛选 COPD 发生发展的关键基因, 我们将青绿色模块中的 2685 个基因与 GSE106986 数据集中的差异表达基因取交集, 获得 833 个基因(图 5(a))。随后采用 LASSO 和 SVM 两种机器学习算法, 从 833 个基因中筛选核心基因(图 5(b), 图 5(c))。SVM 算法识别出 16 个关键基因: RHOD、MVD、CTHRC1、HS3ST2、LMO3、LPCAT1、MID1、HTR1F、SYNDIG1L、AADAT、ADCK1、RRAD、KDM3A、TMEM150C、URB1-AS1 和 RALB; LASSO 算法则筛选出 14 个非零回归系数基因: AADAT、CRYM、GTF2A1、GFOD1、RHOD、ADCK1、RALB、PLCXD1、IKZF1、C9orf170、ENSG00000225879、SOGA3、LAMB2P1 和 SYNDIG1L。两种算法共同筛选出 5 个重叠基因(AADAT、RHOD、ADCK1、RALB 和 SYNDIG1L)(图 5(d))。结合先前鉴定的 7 个铜死亡相关差异表达基因, 最终确定 12 个核心基因。通过基因互作网络分析(图 5(e)), 发现 VEGFA 与 MAP2K1 呈显著负相关, 其相关系数最高。

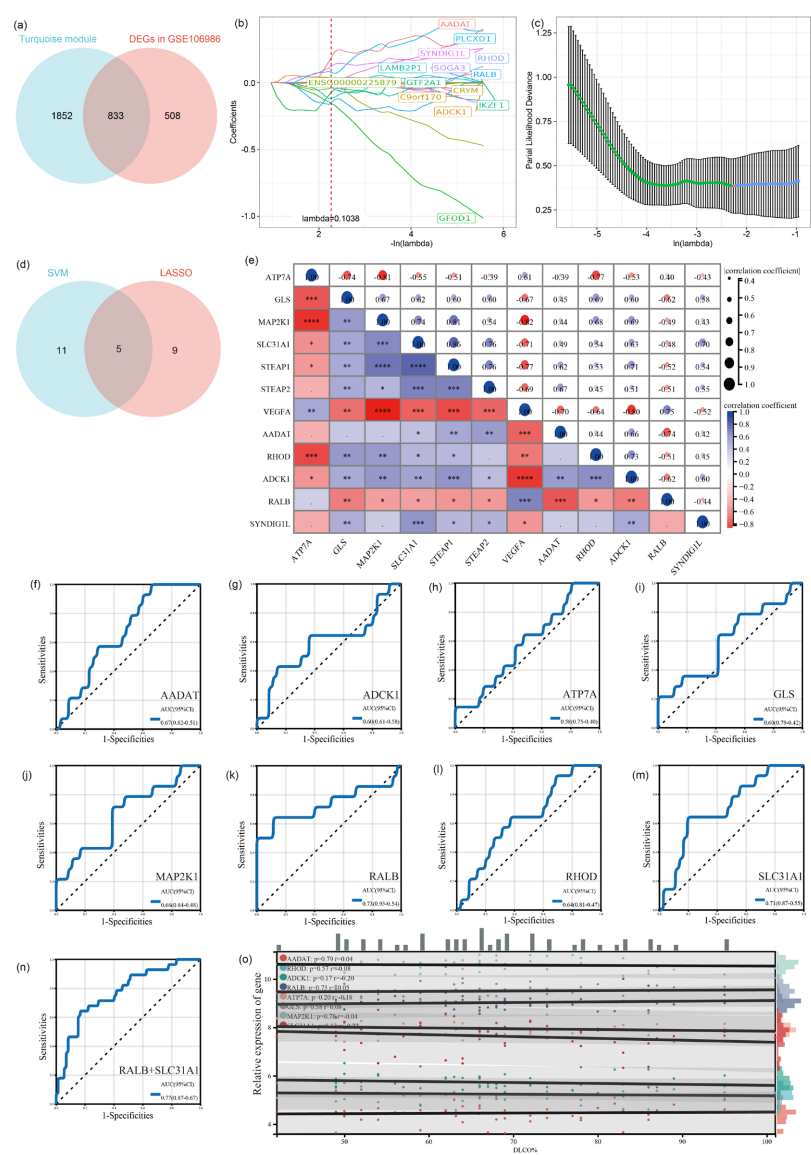


Figure 5. Identification of hub genes and diagnostic biomarkers
图 5. 核心基因与诊断生物标志物的鉴别

为验证 COPD 诊断标志物, 以 GSE103174 作为训练集、GSE71220 作为验证集。12 个核心基因中, 仅 8 个基因(AADAT、ADCK1、ATP7A、GLS、MAP2K1、RALB、RHOD 和 SLC31A1)在两个数据集中同时存在。ROC 曲线分析显示, 这 8 个基因的 AUC 值分别为 0.67、0.60、0.58、0.60、0.66、0.73、0.64 和 0.71。其中 RALB 和 SLC31A1 的 AUC 值超过 0.7, 提示其卓越的诊断效能。二者联合诊断模型的 AUC 值达 0.77 (图 5(f)~(n))。此外, 8 个核心基因与肺一氧化碳弥散量(DLCO%)无显著相关性(图 5(o))。

3.6. COPD 诊断生物标志物的验证

最后我们评估了 RALB 和 SLC31A1 作为 COPD 诊断潜在生物标志物的临床相关性。我们选择 GSE71220 作为验证集, 8 个核心基因的 AUC 值分别为 0.55、0.60、0.52、0.62、0.55、0.70、0.63 和 0.72。值得注意的是, RALB 与 SLC31A1 联合诊断 COPD 的 AUC 值达 0.75 (图 6(a)~(i))。对 GSE103174 和 GSE71220 数据集的综合分析显示, COPD 患者与健康对照组存在显著差异基因表达模式: COPD 患者中 RALB 显著下调, 而 SLC31A1 呈现明显上调(图 6(j)~(k))。

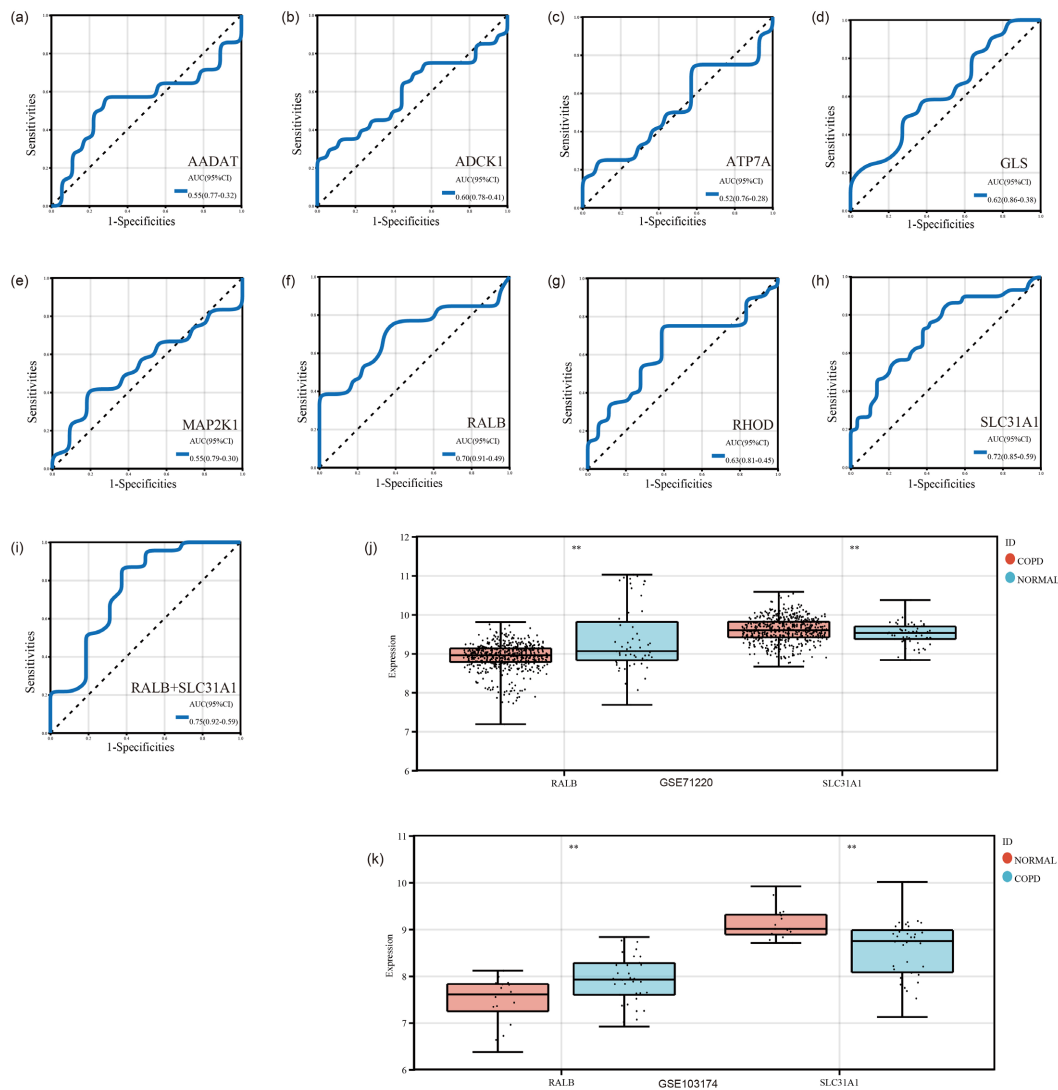


Figure 6. Validation of diagnostic biomarkers in COPD patients
图 6. COPD 患者诊断生物标志物的验证

4. 讨论

铜作为人体生理活动中不可或缺的微量元素, 在酶促催化、氧化还原稳态维持及细胞间通讯网络的调控等功能中发挥着作用[25]。铜元素的吸收、转运、储存及排泄等多环节的协同作用维持细胞内 Cu^{2+} 的动态平衡[26]。有研究显示, 铜的过度积累可引发活性氧(ROS)过量生成, 导致氧化应激及细胞损伤[27]。研究表明, Cu^{2+} 可通过激活 NF- κ B 信号通路触发促炎反应, 进而通过增强趋化反应及白细胞浸润加剧炎症病理过程[28]。

铜死亡是近年来生物医学研究中新发现的一种铜依赖性细胞死亡途径, 其潜在的分子调控网络及机制尚不完全清楚[29]。研究显示, Cu^{2+} 可与线粒体内的巯基结合, 破坏线粒体呼吸链功能, 导致 ROS 过度累积, 最终引发细胞死亡[30]。COPD 的发生发展与氧化应激增强及炎症反应加剧密切相关[31]。然而, 目前关于 COPD 与铜死亡之间的实验证据仍十分匮乏。

本研究系统评估了 COPD 患者与正常对照中铜死亡相关基因的表达模式, 并基于铜死亡相关差异表达基因对 COPD 患者进行聚类分析, 以识别潜在诊断生物标志物。通过整合多维生物信息学分析最终证实 RALB 和 SLC31A1 在 COPD 诊断中具有卓越性能。

RALB (RAS 样原癌基因 B) 是 RAS 超家族 GTP 酶的重要成员, 通过其固有的 GTP 水解活性调节细胞内关键信号通路, 从而控制重要生物学过程[32]。它不仅与铜死亡相关, 还涉及自噬、凋亡和铁死亡[33]。既往研究表明, 在癌症中, RALB 通过激活 PI3K/AKT 和 mTORC1 通路抑制凋亡, 在代谢性疾病和神经退行性疾病中, RALB 通过调控自噬和代谢进程影响疾病发展[34]。在肺癌中, RALB 通过调控细胞骨架重组和囊泡运输增强细胞迁移与侵袭。在肺纤维化中, RALB 通过自噬调控成纤维细胞的迁移与增殖, 促进瘢痕形成。在急性肺损伤中, RALB 通过破坏紧密连接蛋白导致内皮屏障完整性丧失, 增加肺泡-毛细血管膜液体渗出, 驱动肺水肿的病理生理进展[35]。在 COPD 中, RALB 通过磷酸化依赖的激酶级联激活 NF- κ B 信号通路, 诱导促炎细胞因子分泌, 同时通过调控 Nrf2 转录调节 ROS 代谢及氧化还原平衡, 形成炎症与氧化应激的恶性循环, 加剧肺实质损伤, 从而调控 COPD 的气道重塑与肺泡破坏[36]。

SLC31A1 基因编码铜转运蛋白 1 (CTR1), 作为铜摄取和细胞内分布的主要介导者, 通过协调离子转运与氧化还原平衡维持铜稳态。其表达异常可破坏铜稳态, 加剧氧化失衡与炎症反应, 促进神经退行性疾病、代谢综合征及慢性肺部炎症等的病理进程[37]。研究表明, Cu^{2+} 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)等致癌信号通路的关键辅因子。SLC31A1 表达失调导致细胞内 Cu^{2+} 水平病理性升高, 损害线粒体膜电位, 导致 ATP 合成受损, 最终导致氧化还原失衡与能量代谢紊乱[38]。研究指出, 在肺纤维化中, SLC31A1 通过调控 Cu^{2+} 水平影响 TGF- β 等信号通路, 促进成纤维细胞活化与增殖。此外, SLC31A1 通过磷酸化依赖信号通路调控基质金属蛋白酶活性, 打破细胞外基质成分的代谢平衡, 加速蛋白水解降解, 加剧病理纤维化。同时, SLC31A1 还通过调节细胞内 Cu^{2+} 吸收, 诱导过量 ROS 生成、损伤肺组织, 推动 COPD 的发生发展[39]。

5. 结论

在本研究中, 我们对 COPD 患者和健康对照组进行生物信息学分析, 筛选出 8 个铜死亡相关差异表达基因。外部数据集验证表明, RALB 和 SLC31A1 呈现统计学显著的差异表达模式, ROC 曲线分析显示二者联合对 COPD 预测具有更优的诊断效能。这些发现共同为 COPD 诊断标志物及治疗靶点的研究提供了新方向。

参考文献

- [1] Rabe, K.F. and Watz, H. (2017) Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Lancet*, **389**, 1931-1940.

- [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31222-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31222-9)
- [2] Opina, M.T.D., Nicklas, B.J., Lovato, J.F., Files, D.C., Kritchevsky, S.B. and Moore, W.C. (2019) Association of Symptoms of Obstructive Lung Disease and All-Cause Mortality in Older Adult Smokers. *Journal of the American Geriatrics Society*, **67**, 2116-2122. <https://doi.org/10.1111/jgs.16052>
 - [3] Calzetta, L., Aiello, M., Frizzelli, A., Camardelli, F., Cazzola, M., Rogliani, P., *et al.* (2022) Stem Cell-Based Regenerative Therapy and Derived Products in COPD: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells*, **11**, Article 1797. <https://doi.org/10.3390/cells11111797>
 - [4] Iheanacho, I., Zhang, S., King, D., Rizzo, M. and Ismaila, A.S. (2020) Economic Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A Systematic Literature Review. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, **15**, 439-460. <https://doi.org/10.2147/copd.s234942>
 - [5] Jian, T., Ding, X., Li, J., Wu, Y., Ren, B., Li, J., *et al.* (2020) Triterpene Acids of Loquat Leaf Improve Inflammation in Cigarette Smoking Induced COPD by Regulating AMPK/Nrf2 and NF- κ B Pathways. *Nutrients*, **12**, Article 657. <https://doi.org/10.3390/nu12030657>
 - [6] Jang, Y.O., Lee, S.H., Choi, J.J., Kim, D., Choi, J., Kang, M., *et al.* (2020) Fecal Microbial Transplantation and a High Fiber Diet Attenuates Emphysema Development by Suppressing Inflammation and Apoptosis. *Experimental & Molecular Medicine*, **52**, 1128-1139. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0469-y>
 - [7] Tsvetkov, P.O., Roman, A.Y., Baksheeva, V.E., Nazipova, A.A., Shevelyova, M.P., Vladimirov, V.I., *et al.* (2018) Functional Status of Neuronal Calcium Sensor-1 Is Modulated by Zinc Binding. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **11**, Article 459. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00459>
 - [8] Shin, J., Wakeman, C.A., Goodson, J.R., Rodionov, D.A., Freedman, B.G., Senger, R.S., *et al.* (2014) Transport of Magnesium by a Bacterial Nrap-Related Gene. *PLOS Genetics*, **10**, e1004429. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004429>
 - [9] Crisponi, G. (2021) Essential and Toxic Metal Ions in Human Health and Disease; from Chemical Features to Clinical Roles. *Current Medicinal Chemistry*, **28**, 7187-7189. <https://doi.org/10.2174/09298673283521116120553>
 - [10] Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., *et al.* (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, **149**, 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
 - [11] Sukumaran, P., Nascimento Da Conceicao, V., Sun, Y., Ahamad, N., Saraiva, L.R., Selvaraj, S., *et al.* (2021) Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cells*, **10**, Article 2125. <https://doi.org/10.3390/cells10082125>
 - [12] Li, Y., Wang, R., Deng, Y., Wu, S., Sun, X. and Mu, H. (2022) Molecular Characteristics, Clinical Significance, and Cancer Immune Interactions of Cuproptosis and Ferroptosis-Associated Genes in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article 975859. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.975859>
 - [13] Liu, Y., Liu, Y., Ye, S., Feng, H. and Ma, L. (2022) Development and Validation of Cuproptosis-Related Gene Signature in the Prognostic Prediction of Liver Cancer. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article 985484. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985484>
 - [14] Uriu-Adams, J.Y. and Keen, C.L. (2005) Copper, Oxidative Stress, and Human Health. *Molecular Aspects of Medicine*, **26**, 268-298. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.015>
 - [15] Stockwell, B.R., Friedmann Angeli, J.P., Bayir, H., Bush, A.I., Conrad, M., Dixon, S.J., *et al.* (2017) Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease: An Iron-Dependent form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, **171**, 273-285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>
 - [16] Tsvetkov, P., Coy, S., Petrova, B., Dreishpoon, M., Verma, A., Abdusamad, M., *et al.* (2022) Copper Induces Cell Death by Targeting Lipoylated TCA Cycle Proteins. *Science*, **375**, 1254-1261. <https://doi.org/10.1126/science.abf0529>
 - [17] Ghio, A. and Hilborn, E. (2017) Indices of Iron Homeostasis Correlate with Airway Obstruction in an NHANES III Cohort. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, **12**, 2075-2084. <https://doi.org/10.2147/copd.s138457>
 - [18] Xie, J., Yang, Y., Gao, Y. and He, J. (2023) Cuproptosis: Mechanisms and Links with Cancers. *Molecular Cancer*, **22**, Article No. 46. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01732-y>
 - [19] Chong, W., Ren, H., Chen, H., Xu, K., Zhu, X., Liu, Y., *et al.* (2024) Clinical Features and Molecular Landscape of Cuproptosis Signature-related Molecular Subtype in Gastric Cancer. *iMeta*, **3**, e190. <https://doi.org/10.1002/imt2.190>
 - [20] Newman, A.M., Liu, C.L., Green, M.R., Gentles, A.J., Feng, W., Xu, Y., *et al.* (2015) Robust Enumeration of Cell Subsets from Tissue Expression Profiles. *Nature Methods*, **12**, 453-457. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3337>
 - [21] Yu, G., Wang, L., Han, Y. and He, Q. (2012) Clusterprofiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, **16**, 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
 - [22] Shen, W., Song, Z., Zhong, X., Huang, M., Shen, D., Gao, P., *et al.* (2022) Sangerbox: A Comprehensive, Interaction-Friendly Clinical Bioinformatics Analysis Platform. *iMeta*, **1**, e36. <https://doi.org/10.1002/imt2.36>

- [23] Friedman, J., Hastie, T. and Tibshirani, R. (2010) Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software*, **33**, 1-22. <https://doi.org/10.18637/jss.v033.i01>
- [24] Li, S., Que, Y., Yang, R., He, P., Xu, S. and Hu, Y. (2023) Construction of Osteosarcoma Diagnosis Model by Random Forest and Artificial Neural Network. *Journal of Personalized Medicine*, **13**, Article 447. <https://doi.org/10.3390/jpm13030447>
- [25] Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J. and Margaritis, I. (2016) Dietary Copper and Human Health: Current Evidence and Unresolved Issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **35**, 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.02.006>
- [26] Festa, R.A. and Thiele, D.J. (2011) Copper: An Essential Metal in Biology. *Current Biology*, **21**, R877-R883. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>
- [27] Gaetke, L. (2003) Copper Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidant Nutrients. *Toxicology*, **189**, 147-163. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00159-8)
- [28] Kim, B., Nevitt, T. and Thiele, D.J. (2008) Mechanisms for Copper Acquisition, Distribution and Regulation. *Nature Chemical Biology*, **4**, 176-185. <https://doi.org/10.1038/nchembio.72>
- [29] Chen, X., Cai, Q., Liang, R., Zhang, D., Liu, X., Zhang, M., *et al.* (2023) Copper Homeostasis and Copper-Induced Cell Death in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease and Therapeutic Strategies. *Cell Death & Disease*, **14**, Article No. 105. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05639-w>
- [30] Cobine, P.A. and Brady, D.C. (2022) Cuproptosis: Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Copper-Induced Cell Death. *Molecular Cell*, **82**, 1786-1787. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.001>
- [31] Apperley, S., Park, H.Y., Holmes, D.T., Man, S.F.P., Tashkin, D., Wise, R.A., *et al.* (2015) Serum Bilirubin and Disease Progression in Mild COPD. *Chest*, **148**, 169-175. <https://doi.org/10.1378/chest.14-2150>
- [32] Bodemann, B.O. and White, M.A. (2008) Ral GTPases and Cancer: Linchpin Support of the Tumorigenic Platform. *Nature Reviews Cancer*, **8**, 133-140. <https://doi.org/10.1038/nrc2296>
- [33] Peschard, P., McCarthy, A., Leblanc-Dominguez, V., Yeo, M., Guichard, S., Stamp, G., *et al.* (2012) Genetic Deletion of RALA and RALB Small GTPases Reveals Redundant Functions in Development and Tumorigenesis. *Current Biology*, **22**, 2063-2068. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.013>
- [34] Neel, N.F., Rossman, K.L., Martin, T.D., Hayes, T.K., Yeh, J.J. and Der, C.J. (2012) The RalB small GTPase Mediates Formation of Invadopodia through a GTPase-Activating Protein-Independent Function of the RalBP1/RLIP76 Effector. *Molecular and Cellular Biology*, **32**, 1374-1386. <https://doi.org/10.1128/mcb.06291-11>
- [35] Yang, W.S. and Stockwell, B.R. (2016) Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in Cell Biology*, **26**, 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>
- [36] Lim, K., O'Hayer, K., Adam, S.J., Kendall, S.D., Campbell, P.M., Der, C.J., *et al.* (2006) Divergent Roles for RalA and RalB in Malignant Growth of Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Current Biology*, **16**, 2385-2394. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.023>
- [37] Chen, Z., Li, Y. and Liu, X. (2023) Copper Homeostasis and Copper-Induced Cell Death: Novel Targeting for Intervention in the Pathogenesis of Vascular Aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **169**, Article ID: 115839. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115839>
- [38] Oxford, G., Owens, C.R., Titus, B.J., Foreman, T.L., Herlevsen, M.C., Smith, S.C., *et al.* (2005) RalA and RalB: Antagonistic Relatives in Cancer Cell Migration. *Cancer Research*, **65**, 7111-7120. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-1957>
- [39] Martin, T.D., Chen, X.W., Kaplan, R.E., *et al.* (2014) Ral and Rheb GTPase Signaling in Tumorigenesis. *Oncogene*, **33**, 739-747.