

构建铜死亡相关 lncRNA 模型评估头颈鳞状细胞癌预后

刘佳琿, 田汝究, 李玉梅, 宋西成

青岛大学附属烟台毓璜顶医院 耳鼻咽喉头颈外科/山东省神经免疫交互与调控重点实验室/山东省耳鼻喉疾病临床医学研究中心/烟台市耳鼻喉疾病重点实验室, 山东 烟台 264000

摘要: **目的** 构建一个铜死亡相关长链非编码 RNA (long non-coding ribonucleotide, lncRNA) 模型, 探讨其在预测头颈鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 患者预后中的价值, 并通过药物敏感性分析初步探索 HNSCC 患者对多种化疗药物的敏感性。 **方法** 从癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据库下载 HNSCC 患者的转录组数据、肿瘤突变谱和临床信息, 鉴定并筛选与预后有关的铜死亡相关 lncRNA (cuproptosis-related lncRNA, CRL) 并建立预后模型。根据风险评估将患者分为低危组和高危组, 采用生存曲线、受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线、一致性指数和校准曲线评价预后模型的性能。Cox 回归分析确定 HNSCC 的独立预后影响因素, 建立预测列线图。功能富集分析与免疫浸润分析进一步探索预后模型的潜在分子机制和生物学基础。分析不同预后患者的肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMB) 及对化疗药物的敏感性。 **结果** 共鉴定出 781 个 CRL, 筛选得到 9 个预后相关的 CRL 被纳入预后模型的构建。生存曲线显示高危组患者与 HNSCC 不良预后相关 ($P < 0.05$)。在训练集中, 预后模型预测 1、3、5 年生存率的 ROC 曲线下面积 (Area Under the Curve, AUC) 分别为 0.694、0.753、0.643, 且预后模型的一致性指数高于临床特征。年龄、肿瘤分期和风险评估是 HNSCC 的独立预后影响因素 (P 均 < 0.05)。功能富集分析显示, 低危组和高危组之间的差异表达基因主要富集免疫相关蛋白和功能。免疫浸润分析显示, 低危组患者 8 种免疫细胞表达水平和 7 个免疫功能评分较高。生存曲线显示, 低 TMB + 低危组患者预后最好, 高 TMB + 高危组患者预后最差 ($P < 0.05$)。药物敏感性分析显示, 顺铂、依托泊苷、吉西他滨、丝裂霉素 C、索拉非尼、长春瑞滨是治疗高危组患者的潜在药物, 而雷帕霉素、苯乙双胍是低危组患者的潜在治疗药物。 **结论** 基于 9 个 CRL 构建的 HNSCC 患者预后预测模型可以较好预测 HNSCC 患者的预后, 为进一步研究 HNSCC 治疗提供参考。

关键词: 铜死亡; 长链非编码 RNA; 头颈鳞状细胞癌; 预后模型; 药物敏感性

中图分类号: R739.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3770(2026)02-0049-16

引用格式: 刘佳琿, 田汝究, 李玉梅, 等. 构建铜死亡相关 lncRNA 模型评估头颈鳞状细胞癌预后 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2026, 40(2):49-64. LIU Jiahui, TIAN Ruxian, LI Yumei, et al. Construct of a cuproptosis-related lncRNA model to predict prognosis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2026, 40(2):49-64.

Construct of a cuproptosis-related lncRNA model to predict prognosis in head and neck squamous cell carcinoma

LIU Jiahui, TIAN Ruxian, LI Yumei, SONG Xicheng

Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao University/ Shandong Provincial Key Laboratory of Neuroimmune Interaction and Regulation/ Shandong Provincial Clinical Research Center for Otorhinolaryngologic Diseases/ Yantai Key Laboratory of Otorhinolaryngologic Diseases, Yantai 264000, Shandong, China

Abstract: Objective To construct a cuproptosis-related long non-coding ribonucleotide (lncRNA) model and explore its prognostic value in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), and to preliminarily explore the drug sensitivity of HNSCC patients by drug sensitivity analysis. **Methods** Transcriptome data, tumor mutation profiles, and clinical information of HNSCC patients were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. Pearson correlation analysis was used to identify lncRNAs co-expressed with cuproptosis-related gene. Univariate Cox regression and least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) regression were used to screen the prognostic cuproptosis-related lncRNA (CRL) and establish a prognostic model. The risk score of each patient was calculated, and the median was used as the cutoff to divide the patients into low-risk and

收稿日期: 2025-02-05

基金课题: 泰山学者计划项目 (ts20190991); 山东省重点研发计划项目 (2022CXPT023)

通信作者: 宋西成。E-mail: drxhsong@163.com

high-risk groups for survival difference analysis. Kaplan-Meier (KM) curve, receiver operating characteristic (ROC) curve, C-index, and calibration curve were used to evaluate the performance of the prognostic model. Independent prognostic risk factors were identified by univariate and multivariate Cox regression analysis. A predictive nomogram was then constructed based on the risk scores and clinical characteristics. Functional enrichment analysis and immune infiltration analysis were performed to further explore the potential molecular mechanism and biological basis of the prognostic model. Finally, the tumor mutational burden (TMB) and drug sensitivity of patients with different prognosis were analyzed. **Results** A total of 781 CRLs were identified, and 9 prognostic CRLs were selected and included in the prognostic model. The KM curve showed that the high-risk group was associated with poor prognosis of HNSCC ($P < 0.05$). In the train set, the area under the ROC curves (AUCs) of the CRL prognostic model for 1-year, 3-year, and 5-year survival rates were 0.694, 0.753, and 0.643, respectively. In addition, the C-index of the model was higher than that of the clinical characteristics. Age, tumor stage, and risk score were independent prognostic risk factors (all $P < 0.05$). Functional enrichment analysis showed that the differentially expressed genes between the low-risk and high-risk groups were mainly enriched in immune-related proteins and functions. Immune infiltration analysis showed that the expression levels of 8 immune cells and 7 immune function scores were higher in the low-risk group. KM curve showed that patients with low TMB + low risk have the best prognosis, and patients with high TMB + high risk have the worst prognosis ($P < 0.05$). Drug sensitivity analysis showed that cisplatin, etoposide, gemcitabine, mitomycin C, sorafenib, and vinorelbine were potential drugs for the treatment of high-risk patients, while rapamycin and phenformin were potential drugs for the treatment of low-risk patients. **Conclusion** The prognostic prediction model of HNSCC patients based on 9 CRLs can well predict the prognosis of HNSCC patients, and evaluated the sensitivity of patients to chemotherapy drugs to provide a reference for the study of HNSCC treatment.

Key words: Cuproptosis; Long non-coding ribonucleotide; Head and neck squamous cell carcinoma; Prognostic model; Drug sensitivity

头颈鳞状细胞癌 (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) 是头颈部最常见的恶性肿瘤^[1-2], 尽管可以通过手术、放疗和化疗等方式治疗, 但 HNSCC 患者的 5 年生存率仍为 50% 左右^[3]。临床医生通常根据 TNM 分期来制定肿瘤的治疗策略和评价预后, 但由于 HNSCC 独特的异质性, 仅根据 TNM 分期来指导治疗和预测预后的效果不佳^[4]。目前, 迫切需要能够预测 HNSCC 预后和揭示新的干预靶点的新策略。

铜稳态失衡会影响肿瘤的生长^[5]。铜死亡是一种依赖于细胞内 Cu^{2+} 积累的新的程序性细胞死亡形式^[6-7], Cu^{2+} 载体可能是癌细胞的潜在治疗靶点, 更好地了解铜死亡对肿瘤患者的治疗和预后至关重要^[8]。长链非编码 RNA (long non-coding ribonucleotide, lncRNA) 参与基因表达、细胞周期、分化和生长等多种生物过程的调控, 与多种类型的癌症有关^[9], 多项研究报道了 lncRNA 在预测包括 HNSCC 在内的多种癌症预后中的作用^[9-11]。本研究基于癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库, 采用生物信息学方法分析 HNSCC 中与铜死亡相关基因 (cuproptosis related gene, CRG) 共表达的 lncRNA, 构建基于铜死亡相关 lncRNA (cuproptosis-related lncRNA, CRL) 的

HNSCC 预后模型。随后, 通过功能富集分析和免疫浸润分析探讨模型与预后相关的可能机制, 并分析不同预后患者的肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMB) 和对化疗药物的敏感性。

1 资料与方法

1.1 数据收集

从 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 下载 508 例 HNSCC 样本的 RNA-seq 转录组数据、肿瘤突变谱和临床信息。将所有 HNSCC 患者随机分为训练集 241 例和测试集 240 例, 相应的临床信息 (性别、年龄、肿瘤分期、肿瘤分级、TNM 分期、是否接受化疗和是否接受放疗) 见表 1。从既往文献中检索了 19 个 CRG (ATP7A、MTF1、ATP7B、DBT、DLAT、DLST、FDX1、GCSH、SLC31A1、DLD、LIAS、LIPT1、LIPT2、PDHA1、PDHB、CDKN2A、GLS、NLRP3 和 NFE2L2) 以鉴定 CRL^[6-7,12]。从人类蛋白质图谱 (The Human Protein Atlas, HPA) 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>) 获得特定蛋白在 HNSCC 中的生存分析结果, 以及在正常组织和 HNSCC 癌症组织中的免疫组织化学染色图片。

表 1 训练集和测试集中 HNSCC 患者的临床特征 [n(%)]
 Table 1 Clinical characteristics of HNSCC patients in the training set and testing set [n(%)]

特征	训练集	测试集	χ^2	P
年龄/岁			1.402	0.277
≤65	164 (68.05)	151 (62.92)		
>65	77 (31.95)	89 (37.08)		
性别			0.297	0.660
女	61 (25.31)	66 (27.50)		
男	180 (74.69)	174 (72.50)		
分级			2.072	0.748
G ₁	28 (11.62)	31 (12.92)		
G ₂	143 (59.34)	146 (60.83)		
G ₃	61 (25.31)	50 (20.83)		
G ₄	1 (0.41)	1 (0.42)		
未知	8 (3.32)	12 (5.00)		
分期			4.693	0.834
I	13 (5.39)	10 (4.17)		
II	34 (14.11)	35 (14.58)		
III	38 (15.77)	39 (16.25)		
IV	115 (47.72)	130 (54.17)		
未知	41 (17.01)	26 (10.83)		
T 分期			6.652	0.155
T ₁	27 (11.20)	17 (7.08)		
T ₂	65 (26.97)	67 (27.92)		
T ₃	42 (17.43)	53 (22.08)		
T ₄	74 (30.71)	82 (34.17)		
未知	33 (13.69)	21 (8.75)		
M 分期			1.007	>0.999
M ₀	89 (36.93)	88 (36.67)		
M ₁	0 (0.00)	1 (0.42)		
未知	152 (63.07)	151 (62.92)		
N 分期			4.617	0.964
N ₀	78 (32.37)	82 (34.17)		
N ₁	32 (13.28)	33 (13.75)		
N ₂	74 (30.71)	85 (35.42)		
N ₃	3 (1.24)	4 (1.67)		
未知	54 (22.41)	36 (15.00)		
化疗			0.174	0.676
接受	80 (33.20)	84 (35.00)		
未接受	161 (66.80)	156 (65.00)		
放疗			0.629	0.428
接受	136 (56.43)	144 (60.00)		
未接受	105 (43.57)	96 (40.00)		

1.2 方法

1.2.1 CRL 谱的获取

采用 Strawberry Perl 软件 (版本 3.50) 提取所有 lncRNA 表达数据,采用“limma”R 包从 HNSCC 患者 mRNA 数据中提取 CRG 表达数据。将 CRG 与 lncRNA 的相关系数绝对值大于 0.4 且 $P < 0.001$ 的

lncRNA 视为 CRL。最后用桑基图可视化与 CRG 存在相关性的 lncRNA。

1.2.2 CRL 预后模型的构建和验证

采用单因素 Cox 回归初步筛选 HNSCC 患者中与预后相关的 CRL,然后采用最小绝对收缩和选择算子 (least absolute shrinkage and selection operator, LASSO) 回归分析进一步筛选,并在训练集中构建预后模型。该模型可以通过计算风险评分对 HNSCC 患者进行分层,风险评分由以下公式计算。

$$\text{风险评分} = \sum_{i=1}^n \exp i * \beta_i$$

根据中位风险评分将患者分为低危组和高危组。利用“pheatmap”R 包可视化低危组和高危组中用于建立预后模型的 CRL 的表达。然后,利用“limma”和“scatterplot3d”R 包根据基因表达构建了低危组和高危组的主成分分析。使用“survminer”R 包进行生存分析。采用生存曲线比较低危组和高危组患者的总生存期 (overall survival, OS)。为了评估 CRL 预后模型的预测性能,使用的“timeROC”R 包分析 1、3、5 年生存率的受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线。随后,使用一致性指数和 ROC 曲线比较风险评分和其他临床特征预测预后的表现。

1.2.3 确定与 OS 相关的独立危险因素

为了确定与患者预后相关的独立危险因素,我们首先使用单因素 Cox 回归分析年龄、性别、肿瘤分级、TNM 分期和风险评分与 OS 之间的风险关系。然后将 $P < 0.05$ 的危险因素纳入多因素 Cox 回归分析,确定独立危险因素。最后,根据 HNSCC 患者的单因素和多因素 Cox 分析结果绘制森林图。

1.2.4 建立预测预后的列线图

根据患者的风险评分及其他临床特征 (年龄、性别、肿瘤分级、TNM 分期、T 分期、N 分期和 M 分期) 建立临床列线图,为预测 HNSCC 患者 1、3、5 年 OS 提供可靠的工具。然后用校准曲线对列线图的预测性能进行评价。

1.2.5 功能富集分析与免疫浸润分析

为了进一步探索预后模型的潜在分子机制和生物学基础,我们首先使用“limma”R 包筛选低危组和高危组之间的差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG)。然后,使用“clusterProfiler”、“org. Hs. eg. db”和“enrichplot”R 包对 DEG 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基

因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 途径富集分析。为探讨两组免疫细胞浸润水平的差异,使用“GSVA” R 包进行单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA), 计算低危组与高危组中 16 种免疫细胞的浸润评分和 13 个免疫相关通路的评分。

1.2.6 TMB 的评估和生存分析

TMB 定义为每百万碱基中检测到的体细胞基因编码错误、碱基替换和基因插入或缺失的总数^[13]。应用“maftools” R 包分析体细胞突变数据的 MAF 文件,计算低危组和高危组患者的 TMB 评分。同时,选取 15 个突变频率最高的基因进行可视化。然后,根据中位数将所有患者分为低 TMB 组和高 TMB 组,比较两组的 OS。最后,根据 TMB 和风险评估将所有患者分为低 TMB + 低风险组、高 TMB + 高风险组、高 TMB + 低风险组、低 TMB + 高风险组 4 个不同的亚组,并通过生存曲线比较 4 个亚组的 OS。

1.2.7 药物敏感性分析

使用美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准或正在研究中的未来可能用于 HNSCC 治疗的药物进行敏感性分析。“pRRophetic” R 包用于预测 HNSCC 患者对多种化疗药物的敏感性^[14]。采用 Pearson 相关性分析风险

评分与药物敏感性的相关性,比较低危组和高危组的药物敏感性。

1.3 统计学处理

使用 R studio 软件 (版本 4.1.2) 和 R 包进行。采用“glmnet” R 包进行 LASSO 回归分析,并采用 10 倍交叉验证寻找最佳惩罚参数 λ 。采用对数秩检验比较不同生存曲线。采用 Bonferroni 法对亚组比较的 P 值进行校正。采用单因素和多因素 Cox 回归评估风险率。两组间分类资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 数据提取结果

从 TCGA 数据库共获得 508 例 HNSCC 样本,其中 27 例为正常对照组,481 例为肿瘤组。分组临床信息统计结果显示,训练集和测试集的患者在性别、年龄、肿瘤分期、肿瘤分级、TNM 分期、是否接受化疗和是否接受放疗方面差异无统计学意义 (P 均 > 0.05 , 表 1)。

2.2 CRL 预后模型的建立

通过 Pearson 相关性分析,基于 $|r| > 0.4$ 和 $P < 0.05$, 共鉴定出 781 个与 CRG 共表达的 lncRNA (图 1)。

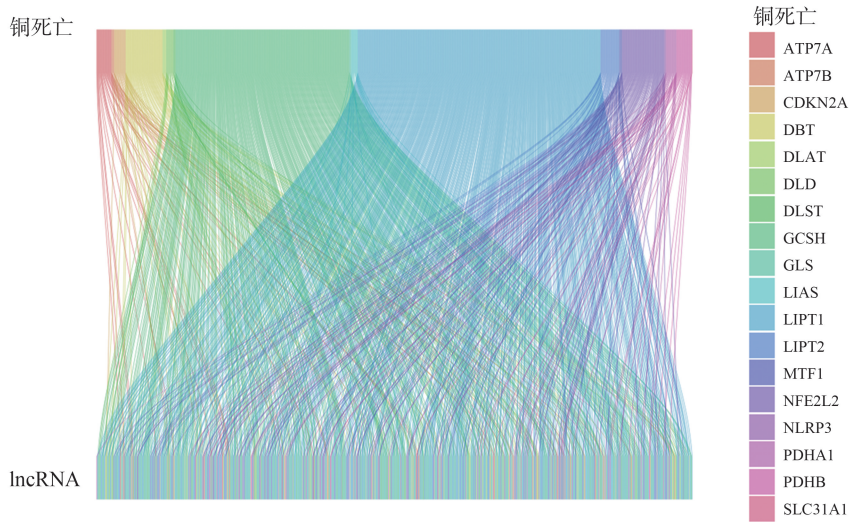


图 1 显示铜死亡相关基因和 lncRNA 共表达关系的桑基图

Figure 1 Sankey diagram for showing cuproptosis-related genes and lncRNAs with coexpression relationship

单因素 Cox 回归分析筛选出 21 个与预后有关的 CRL ($P < 0.05$, 图 2A)。LASSO 回归分析进一步筛选出 9 个与预后相关的 CRL (ECE1-AS1、AL031282.2、AL132800.1、FAM27E3、SNHG16、CDKN2A-DT、LINC01133、AL157932.1 和 AC090587.1) 纳入风险模型 (图 2B 和 2C)。并计算每位患者的风险评分,

根据中位风险评分,将患者分为低危组和高危组 (图 2D 和 2E)。热图表明,训练集和测试集中,AL132800.1、FAM27E3、SNHG16 和 AL157932.1 在 高危组中的表达量较高,ECE1-AS1、AL031282.2、CDKN2A-DT、LINC01133 和 AC090587.1 则在低危组中表达量较高 (图 2F 和 2G)。

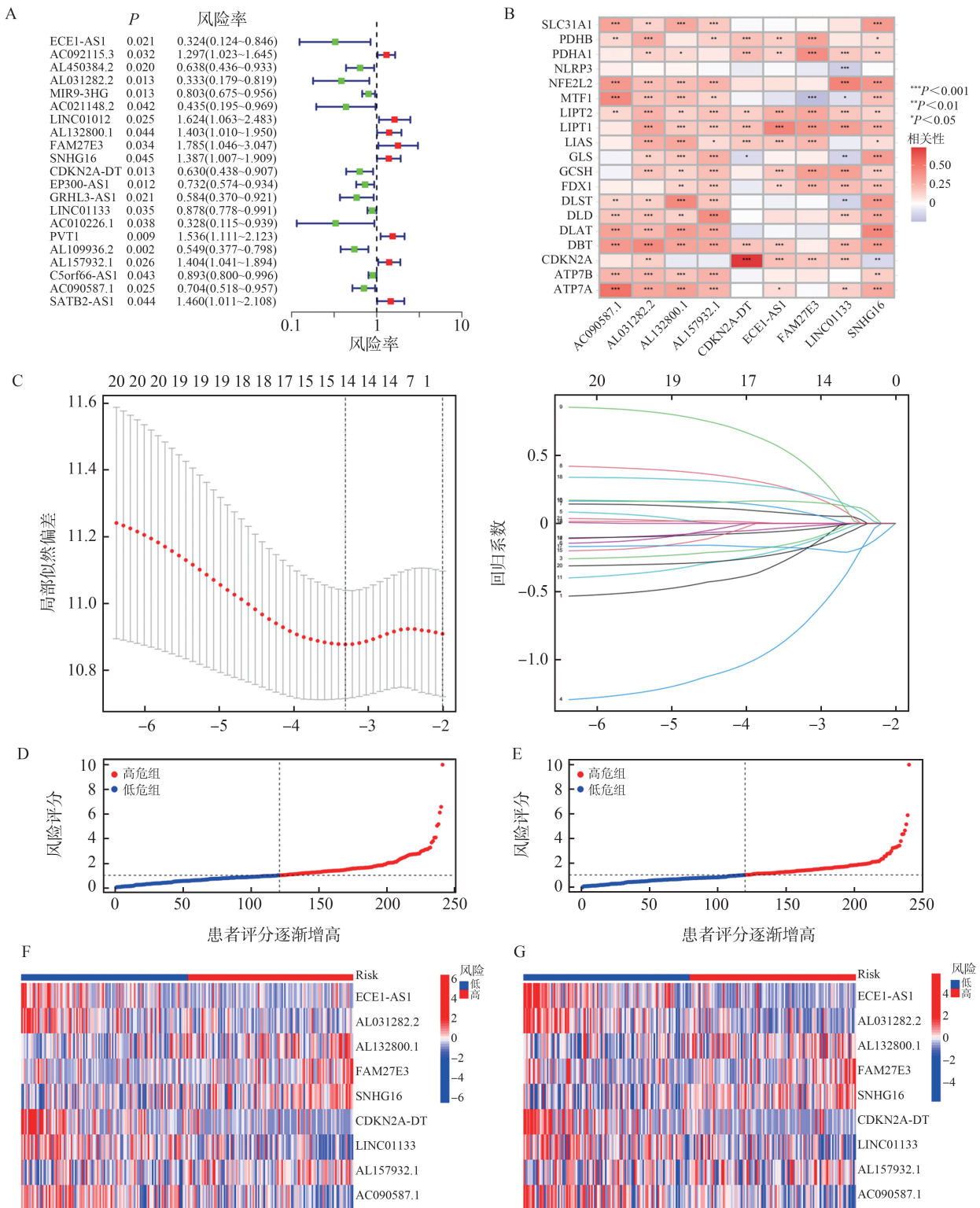


图2 基于TCGA数据库的CRL预后模型
 A: 差异表达的CRL单因素Cox回归分析的森林图; B: CRG与用于建立预后模型的lncRNA相关性的热图; C: 通过LASSO回归和10倍交叉验证筛选出与预后相关的CRL; D、E: 训练集和测试集中低危组和高危组HNSCC患者的风险评分分布; F、G: 训练集和测试集中9个lncRNA在低危组和高危组表达情况的热图

Figure 2 CRLs prognostic model based on TCGA
 A: Forest plot of differentially expressed CRLs by univariate Cox regression analysis; B: Heatmap showing the correlation between CRGs and lncRNAs used to establish prognostic model; C: LASSO regression with a 10-fold cross-validation for the prognostic value of the CRLs; D、E: Risk score distribution of HNSCC patients in the low-risk and high-risk groups, in the training set and testing set; F、G: Heatmap showing the expression of 9 lncRNAs in the low-risk and high-risk groups, in the training set and testing set

2.3 CRL 预后模型能预测 HNSCC 患者预后

对训练集、测试集和总数数据集按低危组和高危组进行生存分析,结果表明,低危组患者的生存率均高于高危组(P 均 < 0.05 ,图 3A、3B 和 3C)。在训练集中,风险评分预测 1、3、5 年生存率的 ROC 曲线下面积(area under the curve, AUC)分别为 0.694、0.753、

0.643(图 3D),风险评分的 AUC 和一致性指数高于年龄、性别、肿瘤分级和肿瘤分期(图 3G 和 3J)。测试集(图 3E、3H 和 3K)和总数数据集(图 3F、3I 和 3L)中得到相似的结果。以上结果表明,CRL 模型可以较好地评估 HNSCC 患者的预后,并且比传统的临床预后特征具有更高的准确性。

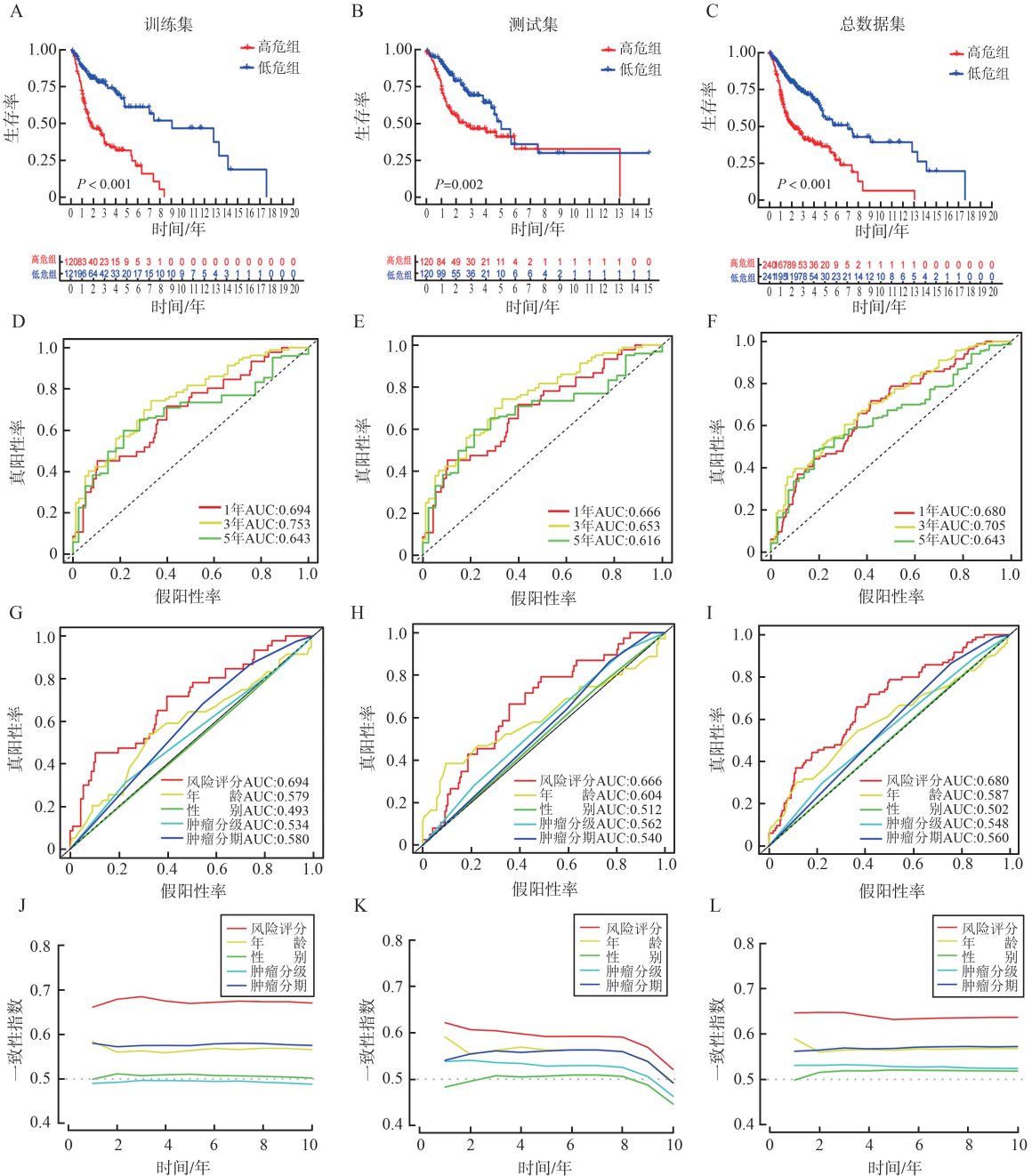


图 3 CRL 预后模型的预测性能
A、B、C: 训练集、测试集和总数数据集中,低危组和高危组的生存曲线; D、E、F: 风险评分预测训练集、测试集和总数数据集 1、3、5 年生存期的 ROC 曲线; G、H、I: 风险评分、年龄、性别、肿瘤分级和肿瘤分期预测训练集、测试集和总数数据集生存期的 ROC 曲线; J、K、L: 风险评分、年龄、性别、肿瘤分级和肿瘤分期预测训练集、测试集和总数数据集生存期的一致性指数

Figure 3 Predictive performance of the CRLs prognostic model
A、B、C: KM curve shows the OS of the low-risk and high-risk groups in the training set, the testing set and all patients, respectively; D、E、F: ROC curve analysis of the risk signature for predicting 1-year, 3-year, and 5-year OS in the training set, the testing set and all patients, respectively; D、H、I: ROC curve analysis of the risk factors, age, gender, tumor grade, and tumor stage in predicting OS in the training set, the testing set and all patients, respectively; J、K、L: C-index of the risk factors, age, gender, tumor grade, and tumor stage in predicting OS in the training set, the testing set and all patients, respectively

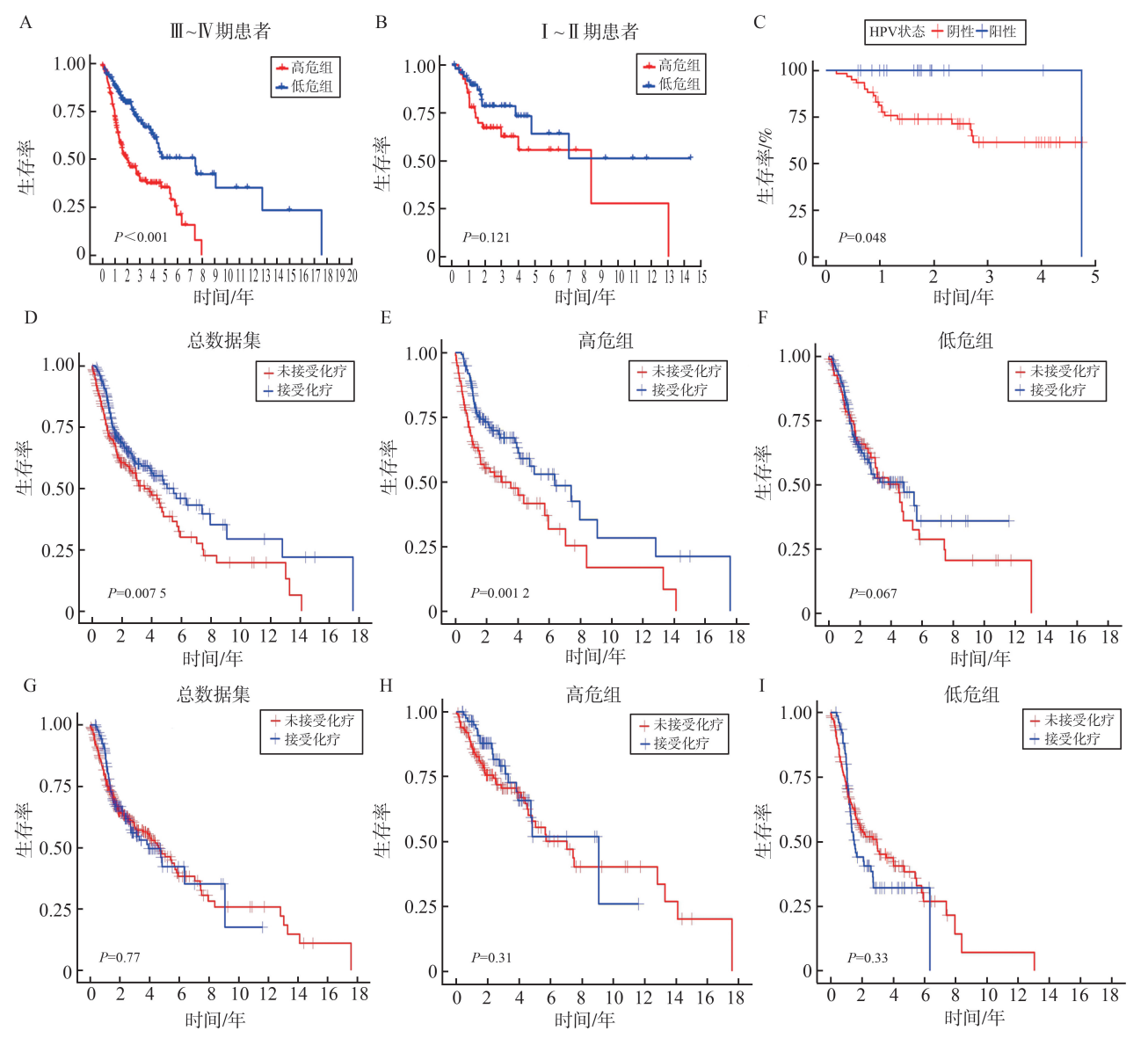
2.4 CRL 预后模型在不同亚组中的预测效能

亚组分析显示,总数据集Ⅲ~Ⅳ期患者中低危组的生存率高于高危组($P < 0.05$,图4A),而Ⅰ~Ⅱ期患者的生存率差异无统计学意义($P > 0.05$,图4B)。对TCGA数据库中包含人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus, HPV)感染状态的HNSCC患者进行生存分析,结果表明HPV阴性患者生存率较低($P < 0.05$,图4C)。如表2所示,HPV阴性患者占高危组的大多数($P < 0.05$)。在总数据集中,接受放疗的患者生存率显著高于未接受放疗的患者($P < 0.05$,图4D)。进一步分析显示,在总数据集中具有相同结果($P < 0.05$,图4E),在低危组中生存率差异却无统计学意义($P > 0.05$,图4F)。而患者是否接受化疗,在总数据集、高危组和低危组中生存率差异均无统计学意义(P 均 > 0.05 ,图4G、

4H和4I)。HNSCC可发生于头颈部多个解剖部位,我们对发生于喉部和其它部位的患者进行生存分析,发现二者生存率在总数据集和高危组中差异均无统计学意义(P 均 > 0.05 ,图4J和4K),而在低危组中喉癌的生存率较高($P < 0.05$,图4L)。这些结果表明,CRL模型更适合预测Ⅲ-Ⅳ期患者的预后,高危组患者更适合接受放疗。并且,HPV阳性患者和低危组喉癌患者预后较好。

表2 TCGA数据库中包含HPV感染状态的HNSCC患者在低危组和高危组的分布[n(%)]

HPV 状态	低危组	高危组	χ^2	P
阴性	30(62.50)	30(96.77)	12.113	<0.001
阳性	18(37.50)	1(3.23)		



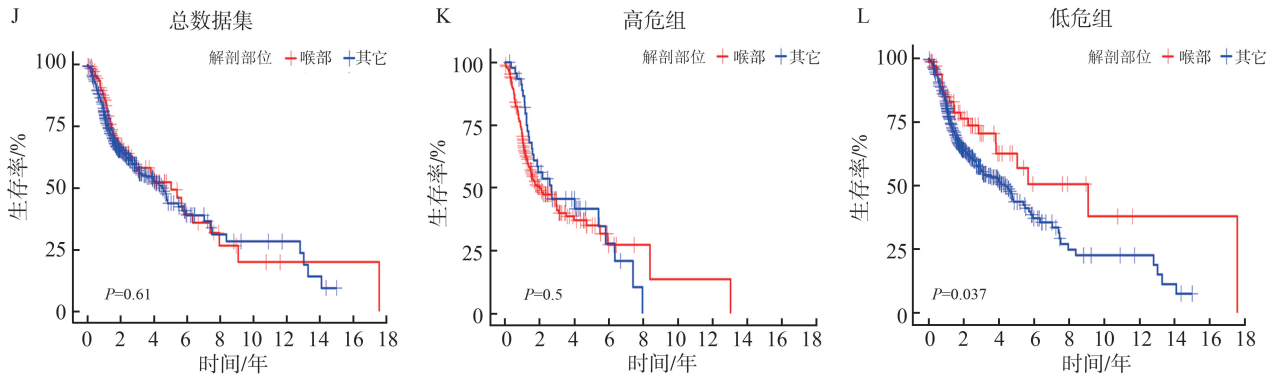


图4 CRL 预后模型在不同亚组的预测性能

A、B: 总数据集中不同分期低危组和高危组的生存曲线; C: TCGA 数据库中包含 HPV 感染状态的 HNSCC 患者的生存曲线; D、E、F: 总数据集、高危组和低危组中, 患者是否接受放疗的生存曲线; G、H、I: 总数据集、高危组和低危组中, 患者是否接受化疗的生存曲线; J、K、L: 总数据集、高危组和低危组中, 发生于喉部或其它部位的 HNSCC 患者的生存曲线

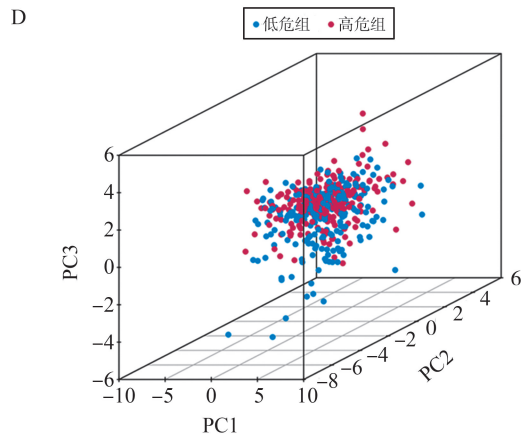
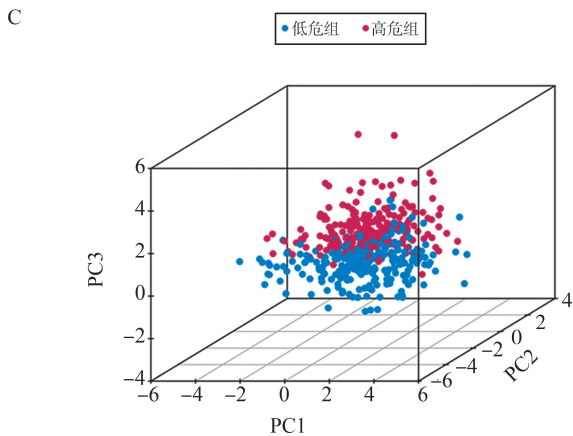
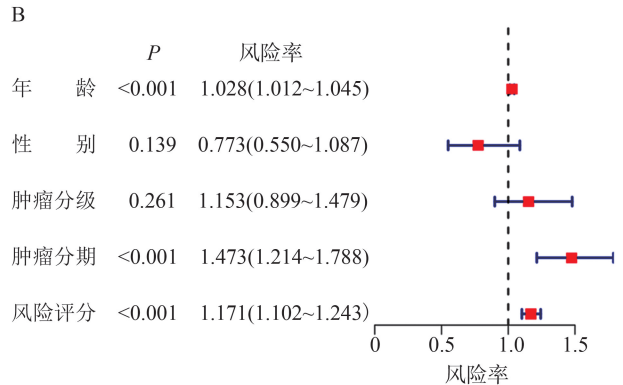
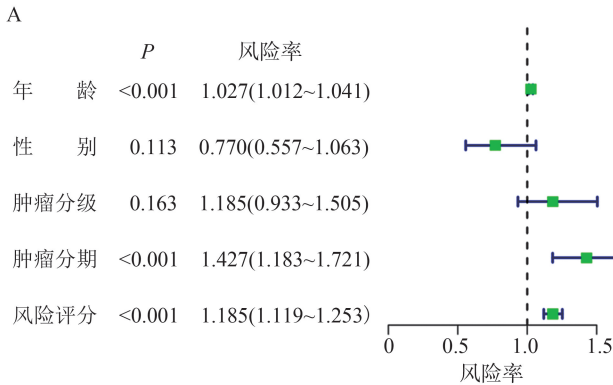
Figure 4 Predictive performance of the CRL prognostic model in different subgroups

A、B: KM curve of all patients shows the OS of the low-risk and high-risk groups under different stage conditions; C: KM curve shows the OS of HNSCC patients with HPV infection status included in the TCGA database; D、E、F: KM curve shows the OS of patients receiving or not receiving radiotherapy in all patients, high-risk and low-risk groups, respectively; G、H、I: KM curve shows the OS of patients receiving or not receiving chemotherapy in all patients, high-risk and low-risk groups, respectively; J、K、L: KM curve shows the OS of HNSCC originating from the larynx or other sites, in all patients, high-risk and low-risk groups, respectively

2.5 CRL 预后模型具有潜在的临床应用价值

Cox 回归分析显示, 年龄、肿瘤分期和风险评估是 HNSCC 的独立预后影响因素 (P 均 < 0.05 , 图 5A 和图 5B)。此外, 主成分分析表明, 用于构建 CRL 模型的 9 个 lncRNA 可以区分低危组和高危组患者, 但所有与 CRG 共表达的 lncRNA、所有 CRG 或所有的基因均无法区分 (图 5C、5D、5E 和 5F)。以

上结果说明基于 CRL 预后模型的风险评分, 是 HNSCC 的独立预后影响因素。随后, 为了扩展 CRL 预后模型的临床适用性和应用, 我们将风险评分和临床特征整合并建立了列线图 (图 5G)。校准曲线表明, 列线图预测的生存率与实际生存率相近, 说明列线图具有较高的可靠性 (图 5H)。



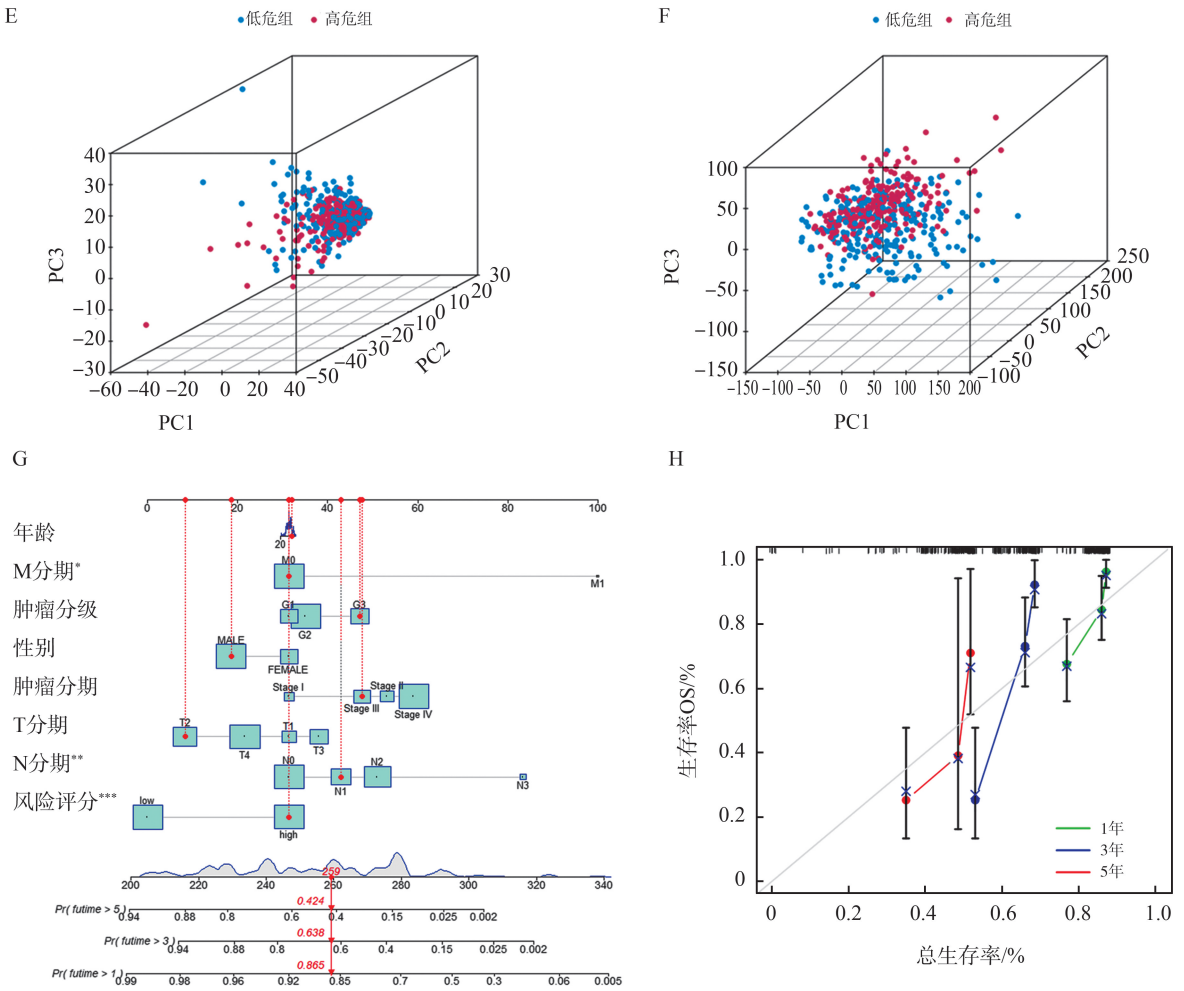


图 5 CRL 预后模型的临床价值
 A、B: HNSCC 独立预后影响因素的单因素和多因素 Cox 回归分析; C、D、E、F: 基于 CRL、所有与 CRG 共表达的 lncRNA、CRG 和所有基因的低危组和高危组主成分分析; G: 临床特征和 CRL 预后模型预测生存期的列线图; H: 列线图预测 1、3、5 年生存率的校准曲线

Figure 5 Clinical value of CRLs prognostic model.
 A、B: Results of univariate and multivariate Cox regression analysis of independent prognostic factors of HNSCC, respectively; C、D、E、F: Principal component analysis in low-risk and high-risk groups based on the expression of CRLs, all lncRNAs co-expressed with CRGs, CRGs, and all genes; G: A nomogram for predicting OS by both clinical characteristics and CRLs prognostic model; H: Calibration curve of the nomogram for predicting 1-year, 3-year, and 5-year OS

2.6 基因集富集分析和免疫浸润分析

GO 富集分析结果显示, 低危组和高危组之间的 DEG 主要富集免疫相关蛋白和功能, 如 B 细胞受体信号通路、循环免疫球蛋白介导的体液免疫应答、免疫球蛋白复合物、质膜外侧、抗原结合和免疫球蛋白受体结合 (图 6A)。KEGG 通路富集分析结果显示, 差异基因主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用、造血细胞谱系和细胞粘附分子等相关的通路 (图 6B)。免疫浸润结果显示, 两组之间的 B 细胞、CD8+ T 细胞、肥大细胞、中性粒细胞、浆细胞样树突状细胞、滤泡辅助性 T 细胞、辅助性 T 细胞 2 型细胞和肿瘤浸润淋巴细胞表达差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05, 图 6C)。

ssGSEA 结果表明, 两组之间的 7 个免疫功能评分 (检查点、T 细胞共刺激、II 型干扰素、人类白细胞抗原、促炎、T 细胞共抑制和抗原呈递细胞共刺激) 差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05, 图 6D)。在 B 细胞受体信号通路富集的基因中, CD79A 不仅是 B 细胞受体的重要组成部分, 也是 B 细胞发育所必需的^[15,16], 而在我们的研究中, 两组之间 B 细胞的表达差异恰好具有统计学意义。在 HPA 数据库中免疫组织化学染色结果显示 CD79A 在 HNSCC 组织中过表达 (图 6E)。此外, HPA 数据库显示, CD79A 高表达的 HNSCC 患者预后优于低表达的患者 (图 6F), 表明 CD79A 可能是 HNSCC 潜在的免疫干预靶点。

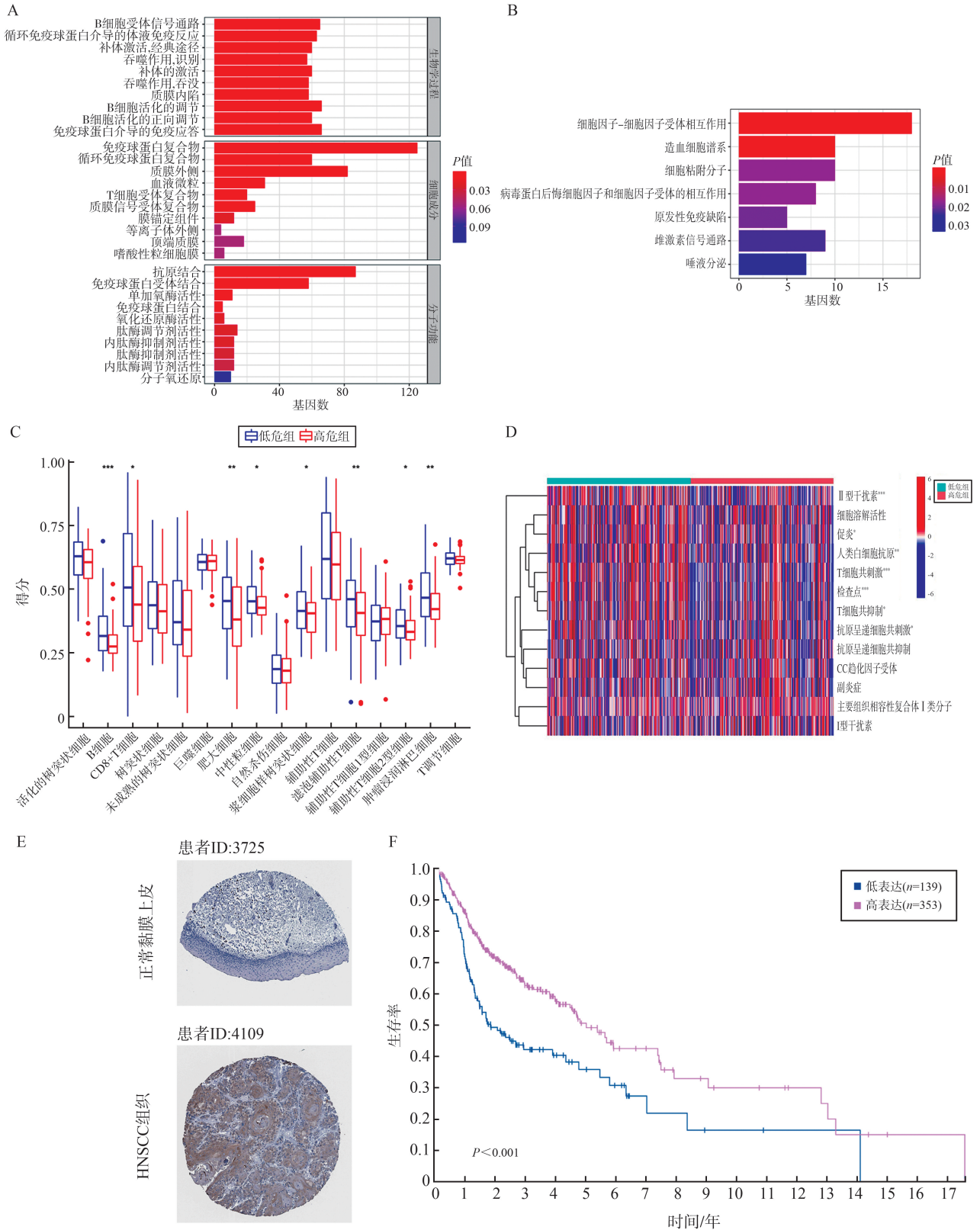


图 6 低危组和高危组之间 DEGs 的功能富集分析以及免疫浸润分析
A:GO 富集分析; B:KEGG 富集分析; C:16 种免疫细胞的比较; D:13 种免疫相关通路的热图; E:CD79A 在正常黏膜上皮和 HNSCC 组织中的免疫组织化学染色结果; F:HNSCC 中,CD79A 低表达组和高表达组的生存曲线

Figure 6 Functional enrichment analysis of the DEGs in low-risk and high-risk groups
A: GO analysis; B: KEGG analysis; C: Comparison of 16 types of immune cells; D: Heatmap of the 13 immune-related pathways; E: Immunohistochemical staining results of CD79A in normal mucosal epithelium and HNSCC tissues; F: KM survival curves of CD79A low and high expression groups in HNSCC

2.7 不同风险组的 TMB 有益于 HNSCC 的预后预测

高危组中存在基因突变的 HNSCC 患者比例为 95.38%, 显著高于低危组的 88.61% ($P < 0.05$)。前 15 位突变基因热图显示, TP53 和 FAT1 等基因在 高危组中的突变显著高于低危组 (图 7A 和 7B)。根据中位 TMB 将所有患者分为低 TMB 组和高 TMB 组, 生存曲线显示低 TMB 组的生存率高于高 TMB

组 ($P < 0.05$, 图 7C)。根据 TMB 和风险评分对 HNSCC 患者进行分层, 生存曲线显示低 TMB+低危组患者预后最好, 其次是高 TMB+低危组患者、低 TMB+高危组患者, 高 TMB+高危组患者预后最差 (P 均 < 0.05 , 图 7D)。该结果说明, TMB 结合风险评分可以详细地对 HNSCC 进行风险分层, 评估 HNSCC 患者的预后。

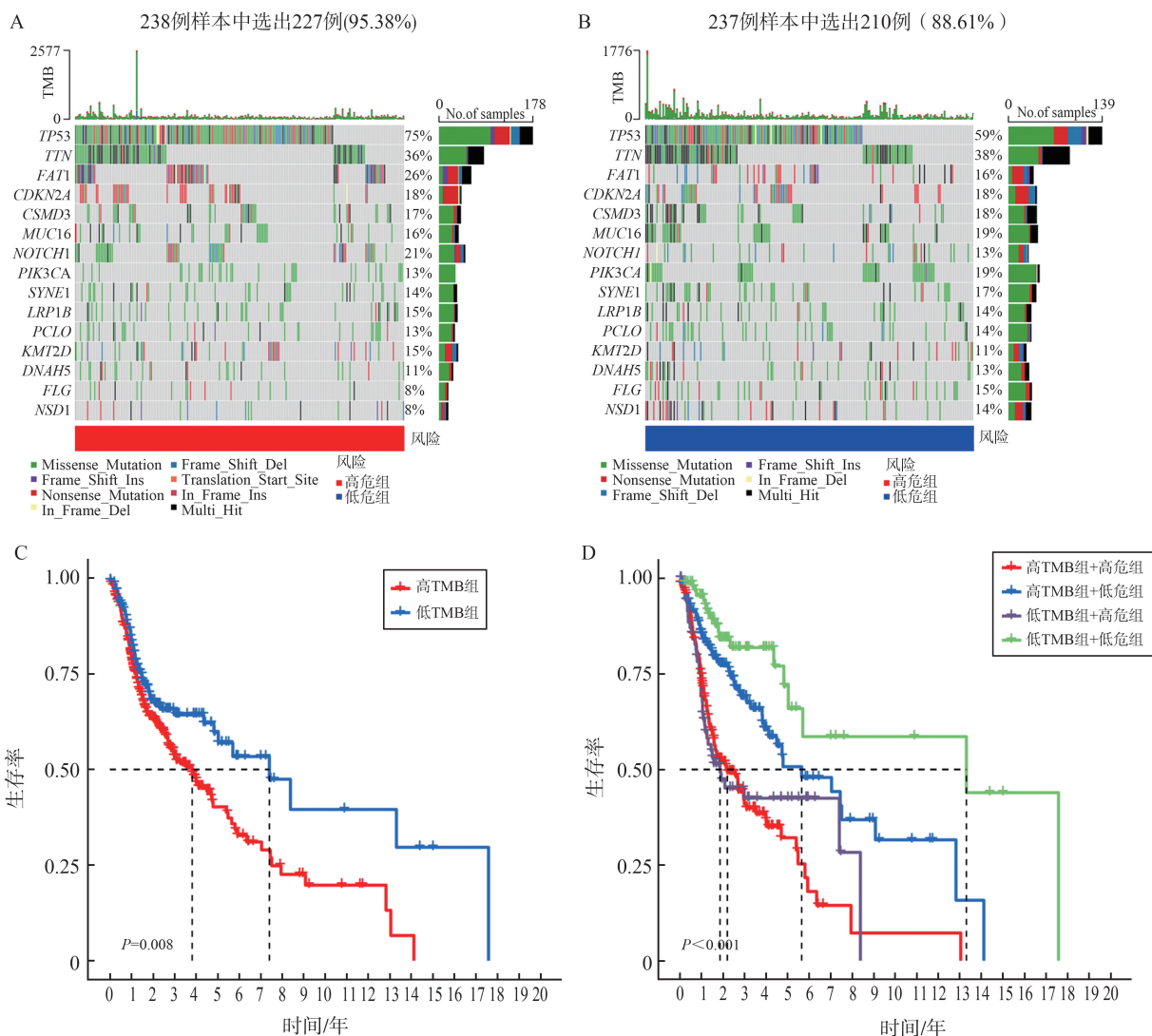


图 7 不同危险组的 TMB 及生存预测价值

A, B: 高危组和低危组患者的前 15 位突变基因热图; C: 低 TMB 组和高 TMB 组的生存曲线; D: 低 TMB+低危组、低 TMB+高危组、高 TMB+低危组和高 TMB+高危组的生存曲线

Figure 7 TMB and survival prediction value in different risk groups

A, B: Heatmap of the top 15 mutated genes in high-risk and low-risk groups; C: KM curves of OS in the low-TMB and high-TMB groups; D: KM curves of OS in the low-TMB + low-risk group, low-TMB + high-risk group, high-TMB + low-risk group, and high-TMB + high-risk group

2.8 风险评分与药物敏感性的相关分析

药物敏感性分析显示, 顺铂、依托泊苷、吉西他滨、丝裂霉素 C、索拉非尼、长春瑞滨的半抑制浓度 (the half maximal inhibitory concentration, IC50) 与风险评分呈负相关 (P 均 < 0.05), 雷帕霉素、苯乙双胍的 IC50 与风险评分呈正相关 (P 均 < 0.05 , 图

8A)。低危组和高危组患者对这 8 种药物的敏感性比较显示, 顺铂、依托泊苷、吉西他滨、丝裂霉素 C、索拉非尼、长春瑞滨的 IC50 在 高危组患者中显著降低, 是治疗高危组的潜在药物, 而雷帕霉素、苯乙双胍是治疗低危组患者的潜在药物 (P 均 < 0.05 , 图 8B)。

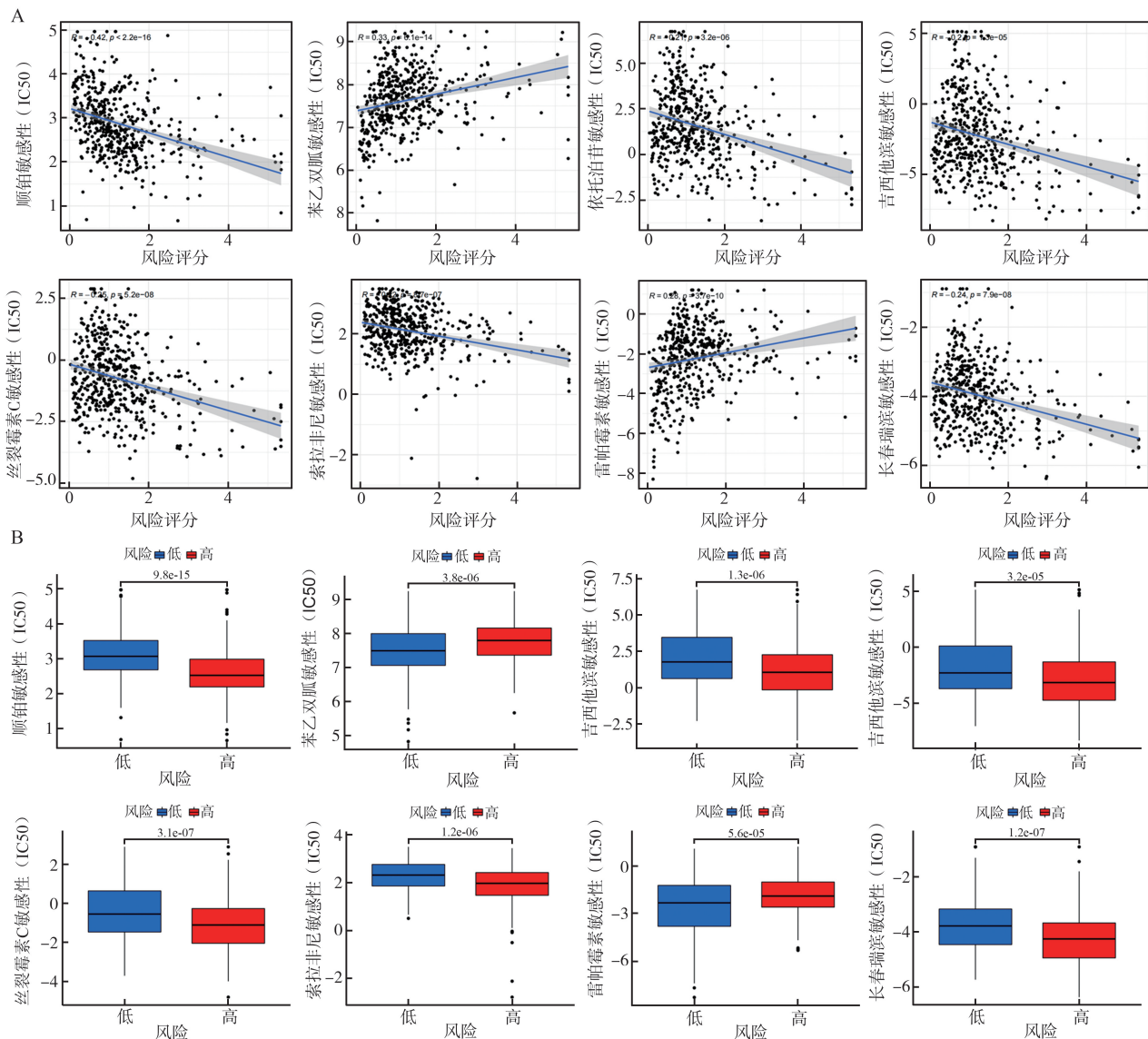


图 8 低危组和高危组的药物敏感性分析

A: 顺铂、苯乙双胍、依托泊苷、吉西他滨、丝裂霉素 C、索拉非尼、雷帕霉素和长春瑞滨与风险评分的相关性分析; B: 顺铂、苯乙双胍、依托泊苷、吉西他滨、丝裂霉素 C、索拉非尼、雷帕霉素和长春瑞滨在低危组和高危组中的 IC50 比较

Figure 8 Drug sensitivity analysis of low-risk and high-risk groups

A: Correlation analysis between cisplatin, phenformin, etoposide, gemcitabine, mitomycin C, sorafenib, rapamycin, and vinorelbine and risk score; B: IC50 comparison of cisplatin, phenformin, etoposide, gemcitabine, mitomycin C, sorafenib, rapamycin, and vinorelbine between the low-risk and high-risk groups

3 讨论

HNSCC 在病因、癌变机制、形态学等传统临床特征上都是一种复杂的异质性疾病,其预后与流行病学因素、解剖部位和肿瘤分期有关^[17-18]。然而,随着精准医学的不断发展,传统的临床预后因素的参考价值越来越有限,迫切需要开发新的预测 HNSCC 预后的工具。本研究通过生物信息学分析,基于 CRL 构建了一种新的能较好预测 HNSCC 患者预后的模型,并证明该风险评分是 HNSCC 的独立预后影响因素。进行亚组分析探讨模型与患者肿瘤分期、HPV 感染状态、是否接受放化疗以及肿瘤

解剖部位的关系,探索机制发现其可能与免疫相关通路以及 TP53 等基因突变有关。此外,还分析了患者的药物敏感性,为 HNSCC 药物治疗的研究提供一定参考。总之,本研究对探索 HNSCC 新的生物标志物和药物治疗有着重要意义。

铜死亡作为一种新发现的细胞程序性死亡机制,在预测 HNSCC 预后方面的研究成为国内外热点^[19-22]。但是,这种铜依赖性细胞死亡涉及复杂的调控机制^[23],其在 HNSCC 预后预测方面的价值尚未完全挖掘。因此,我们基于 TCGA 数据库,构建用于预测 HNSCC 患者预后的 CRL 模型。在癌症的临床研究中,OS、无进展生存期和无病生存期等

常用为患者的结局终点指标。其中,OS 是通常被视为“金标准”的主要临床终点,当患者的生存期能够被充分评估时,它通常作为首选终点。国内外很多已发表的高质量研究仅采用 OS 作为肿瘤预后预测的结局终点指标^[24-26]。例如,2021 年,约翰霍普金斯大学的研究团队在《美国医学会耳鼻咽喉头颈外科杂志》(*JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery*)发表的研究成果,基于 TCGA 数据库中 HNSCC 和宫颈部癌患者的数据,仅将 OS 作为预测预后的结局终点指标,探究肿瘤部位与 HPV 相关头颈癌和宫颈癌的预后和免疫基因组学的相关性^[24]。因此,本研究构建的 CRL 预后模型,选用 OS 作为患者的结局终点指标,其预测总数据集 HNSCC 患者的 1、3、5 年生存率的 AUC 分别为 0.680、0.705、0.643。近年来,基于 TCGA 数据库,很多研究构建的差异表达 lncRNA 模型对 HNSCC 患者的预后有良好的预测价值。例如,Bu 等^[27]构建的基底膜相关 lncRNA 模型,预测总数据集 HNSCC 患者的 1、3、5 年生存率的 AUC 分别为 0.650、0.688、0.647, Ren 等^[28]构建的焦亡相关 lncRNA 模型的预测 AUC 分别为 0.622、0.660、0.675, Chen 等^[29]构建的双硫死亡相关 lncRNA 模型的预测 AUC 分别为 0.660、0.680、0.627。本研究模型预测患者 1 年和 3 年生存率具有明显的优势,可以有效评估 HNSCC 患者的预后。

本研究最终确定了 9 种与预后相关的 CRL。其中 ECE1-AS1、AL031282.2、CDKN2A-DT、LINC01133 和 AC090587.1 是保护性 lncRNA,而 SNHG16、AL132800.1、FAM27E3 和 AL157932.1 是危险性 lncRNA。在这 9 种 lncRNA 中, LINC01133 和 SNHG 16 在肿瘤中研究较多。LINC01133 可以通过 GDF15 的反馈调节回路抑制口腔鳞状细胞癌转移^[30],而癌细胞中 GDF15 的表达受与铜死亡相关的 FDX1 的调控^[12,31]。SNHG16 被证明在 HNSCC 细胞系和癌组织中高表达,或可成为一种有前景的肿瘤生物标志物和治疗靶点^[32]。此外,CDKN2A-DT、AC090587.1、AL132800.1 和 FAM27E3 作为 CRL 被广泛用于癌症预测模型的构建^[19,21,33-39]。本研究鉴定的 9 个 CRL 不仅为评估患者的预后提供了指导,而且为研究铜死亡在肿瘤发生中的机制提供了多个潜在的调控靶点。

在本研究中,功能富集分析表明,低危组和高危组的 DEG 主要富集在 B 细胞受体信号通路、免疫应答和免疫球蛋白复合物等多种细胞功能和信号通路,与 Zhao 等构建的预后模型的功能富集结果类

似^[40]。B 细胞受体信号通路在实体瘤的微环境中发挥重要作用,靶向 B 细胞受体相关激酶可能具有抗癌作用^[41]。免疫细胞浸润分析也表明,B 细胞、T 细胞等多种免疫细胞在低危组中浸润水平较高,低危组患者的 7 个免疫功能评分也较高。既往研究表明,CD4+ T 细胞和 CD8+ T 细胞是参与免疫应答的主要细胞,在抗肿瘤应答中表现活跃,其高浸润性改善了肿瘤患者的预后^[42,43]。此外,B 细胞、肥大细胞和肿瘤浸润淋巴细胞也被证明可以改善 HNSCC 患者预后^[44-46]。本研究构建的模型有助于更精准评估 HNSCC 患者预后,并为今后研究 HNSCC 预后相关的病理机制提供一些参考。

HNSCC 具有高水平的体细胞突变^[47]。本研究发现,肿瘤抑制因子 TP53 和 FAT1 突变在高危组中更常见。研究表明,TP53 突变是 HNSCC 中最常见的体细胞基因突变。其通过野生型 p53 功能丧失或促进侵袭、转移、基因组不稳定和癌细胞增殖功能的获得,与 HNSCC 的临床不良反应和较差预后相关^[48]。FAT1 是 HNSCC 中仅次于 TP53 的第二大常见突变基因,FAT1 突变可以通过 Hippo/YAP1 和 EGFR 家族/MAPK/ERK 信号通路等影响 HNSCC 的肿瘤进展^[49]。并且,FAT1 突变与 HNSCC 患者对免疫治疗的耐药性有关^[50]。因此,靶向 TP53 或 FAT1 突变可能是 HNSCC 治疗的潜在研究方向,本研究筛选突变率更高的高危组患者,有助于个性化治疗方案的制定。

近年来,化疗在 HNSCC 治疗中的作用逐渐增加^[51]。本研究探讨了风险评分在评估 HNSCC 患者化疗反应中的作用。目前,顺铂已用于复发或转移性 HNSCC 患者的一线治疗^[52],但缺乏精准治疗标准。在本研究中,高危组患者对顺铂更敏感,可以为顺铂精准治疗方案制定提供依据。此外,依托泊苷、吉西他滨、丝裂霉素 C、索拉非尼和长春瑞滨联合放疗治疗 HNSCC 的基础研究或临床试验也在进行^[53-57],雷帕霉素、苯乙双胍治疗 HNSCC 的机制也在研究^[58-62]。本研究基于 CRL 模型得到的风险评分可以评估 HNSCC 患者的药物敏感性,为不同风险组患者提供用药指导。虽然有些药物尚未被国内外 HNSCC 治疗指南纳入,但可以为后续 HNSCC 药物治疗的相关研究提供参考。

本研究构建的 CRL 模型可以较好预测 HNSCC 患者预后,然而尚有一些局限性:①本研究仅基于 TCGA 数据库进行分析,患者大部分为白人,可能存在种族偏倚,仍然需要使用多中心数据集验证预后模型的性能;②构成预后模型的 9 个 CRL 的表达水

平及在 HNSCC 中的具体作用机制需要通过体外实验进一步验证;③药物敏感性分析只是基于数据库进行初步探索,旨在为后续研究提供参考,还需要进行严格的基础和临床试验验证才能应用于临床;最后,铜死亡相关机制在 HNSCC 发生发展中的作用还需要进一步探索。

4 结 论

本研究分析了 HNSCC 中的 CRL,并构建了一种新的预测 HNSCC 患者预后的模型。在训练集、验证集和总数据集中证明其与 OS 独立相关,可以有效预测 HNSCC 患者的预后。通过药物敏感性分析,该模型可以为后续 HNSCC 治疗相关研究提供参考。

参考文献:

- [1] Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 92. doi:10.1038/s41572-020-00224-3
- [2] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263. doi:10.3322/caac.21834
- [3] Gormley M, Creaney G, Schache A, et al. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors[J]. *Br Dent J*, 2022, 233(9): 780-786. doi:10.1038/s41415-022-5166-x
- [4] Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update[J]. *Eur Urol*, 2015, 67(5): 913-924. doi:10.1016/j.eururo.2015.01.005
- [5] Jiang YC, Huo ZY, Qi XL, et al. Copper-induced tumor cell death mechanisms and antitumor therapeutic applications of copper complexes[J]. *Nanomedicine*, 2022, 17(5): 303-324. doi:10.2217/nmm-2021-0374
- [6] Tang DL, Chen X, Kroemer G. Cuproptosis: a copper-triggered modality of mitochondrial cell death[J]. *Cell Res*, 2022, 32(5): 417-418. doi:10.1038/s41422-022-00653-7
- [7] Wang YQ, Zhang L, Zhou FF. Cuproptosis: a new form of programmed cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(8): 867-868. doi:10.1038/s41423-022-00866-1
- [8] Kahlson MA, Dixon SJ. Copper-induced cell death[J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1231-1232. doi:10.1126/science.abo3959
- [9] Jiang HY, Ma B, Xu WB, et al. A novel three-lncRNA signature predicts the overall survival of HNSCC patients[J]. *Ann Surg Oncol*, 2021, 28(6): 3396-3406. doi:10.1245/s10434-020-09210-1
- [10] Chen Y, Luo TQ, Xu SS, et al. An immune-related seven-lncRNA signature for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(7): 2268-2285. doi:10.1002/cam4.3756
- [11] Li QL, Wang J, Meng XY, et al. Identification of autophagy-related gene and lncRNA signatures in the prognosis of HNSCC[J]. *Oral Dis*, 2023, 29(1): 138-153. doi:10.1111/odi.13889
- [12] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-1261. doi:10.1126/science.abf0529
- [13] Zhou HY, Chen LH, Lei YJ, et al. Integrated analysis of tumor mutation burden and immune infiltrates in endometrial cancer[J]. *Curr Probl Cancer*, 2021, 45(2): 100660. doi:10.1016/j.cuprproblcancer.2020.100660
- [14] Geleher P, Cox N, Stephanie Huang R. pRRophetic: an R package for prediction of clinical chemotherapeutic response from tumor gene expression levels[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107468. doi:10.1371/journal.pone.0107468
- [15] Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L, et al. Mutations in Igalpha (CD79a) result in a complete block in B-cell development[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(8): 1115-1121. doi:10.1172/JCI7696
- [16] Tkachenko A, Kupcova K, Havranek O. B-cell receptor signaling and beyond: the role of iGα (CD79a)/iGβ (CD79b) in normal and malignant B cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 10. doi:10.3390/ijms25010010
- [17] Wang YY, Xu Y, Hua QQ, et al. Novel prognostic model based on immune signature for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 4725314. doi:10.1155/2020/4725314
- [18] Chow LQM. Head and neck cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(1): 60-72. doi:10.1056/nejmra1715715
- [19] Gong H, Liu ZL, Yuan CH, et al. Identification of cuproptosis-related lncRNAs with the significance in prognosis and immunotherapy of oral squamous cell carcinoma[J]. *Comput Biol Med*, 2024, 171: 108198. doi:10.1016/j.compbmed.2024.108198
- [20] Sun Q, Qin XM, Zhao J, et al. Cuproptosis-related LncRNA signatures as a prognostic model for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Apoptosis*, 2023, 28(1/2): 247-262. doi:10.1007/s10495-022-01790-5
- [21] Zheng XW, Zheng DF, Zhang CM, et al. A cuproptosis-related lncRNA signature predicts the prognosis and immune cell status in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1055717. doi:10.3389/fonc.2023.1055717
- [22] 姚天赐, 高鸿, 曹伟. 头颈部鳞状细胞癌铜死亡相关非编码长链 RNA 预后模型及药敏分析[J]. *中国临床*

- 药理学杂志, 2023, 39 (22): 3331-3335. doi: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.22.029
- YAO Tianci, GAO Hong, CAO Wei. Cuproptosis-long non-coding RNAs prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma and drug sensitivity analysis [J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2023, 39(22): 3331-3335. doi:10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.22.029
- [23] Li YQ. Copper homeostasis; Emerging target for cancer treatment[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(9): 1900-1908. doi:10.1002/iub.2341
- [24] Zhu GC, Amin N, Herberg ME, et al. Association of tumor site with the prognosis and immunogenomic landscape of human papillomavirus-related head and neck and cervical cancers [J]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2022, 148(1): 70-79. doi: 10.1001/jamaoto.2021.3228
- [25] 曹琳, 周梦娇, 丁一鸣, 等. GPR68 和 TIL 对中晚期下咽鳞癌 TPF 诱导化疗疗效及预后的价值[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2022, 57(2): 178-184. doi:10.3760/cma.j.cn115330-20211218-00806
- CAO Lin, ZHOU Mengjiao, DING Yiming, et al. Utility of GPR68 and TIL in TPF-induced chemotherapy and prognosis evaluation in middle-advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2022, 57(2): 178-184. doi:10.3760/cma.j.cn115330-20211218-00806
- [26] Shao F, Yang XY, Wang W, et al. Associations of PGK1 promoter hypomethylation and PGK1-mediated PDHK1 phosphorylation with cancer stage and prognosis: a TCGA pan-cancer analysis[J]. *Cancer Commun*, 2019, 39(1): 54. doi:10.1186/s40880-019-0401-9
- [27] Bu WC, Cao MG, Wu XR, et al. Prognosis prediction of head and neck squamous cell carcinoma through the basement membrane-related lncRNA risk model [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1421335. doi:10.3389/fmolb.2024.1421335
- [28] Ren JY, Yan BR, Wang XR, et al. A pyroptosis-related lncRNA risk model for the prediction of prognosis and immunotherapy response in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1478895. doi: 10.3389/fonc.2024.1478895
- [29] Chen Q, Shi X, Bao YY, et al. Deciphering disulfidptosis-linked lncRNA patterns as potential HNSCC biomarkers[J]. *Oral Dis*, 2025. doi:10.1111/odi.15283
- [30] Kong JL, Sun WJ, Zhu WY, et al. Long noncoding RNA LINC01133 inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis through a feedback regulation loop with GDF15[J]. *J Surg Oncol*, 2018, 118(8): 1326-1334. doi:10.1002/jso.25278
- [31] Dreishpoon MB, Bick NR, Petrova B, et al. FDX1 regulates cellular protein lipoylation through direct binding to LIAS [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(9): 105046. doi:10.1016/j.jbc.2023.105046
- [32] Han BA, Li S, Huang S, et al. Cuproptosis-related lncRNA SNHG16 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *PeerJ*, 2023, 11: e16197. doi: 10.7717/peerj.16197
- [33] Guo DF, Fan LW, Zeng HH, et al. Establishment and validation of a cuproptosis-related lncRNA signature that predicts prognosis and potential targeted therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2024, 40(2): 739-764. doi: 10.1080/02648725.2023.2190640
- [34] Zhang MZ, Xiao ZT, Xie YJ, et al. A cuproptosis-related lncRNA signature-based prognostic model featuring on metastasis and drug selection strategy for patients with lung adenocarcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1236655. doi:10.3389/fphar.2023.1236655
- [35] Liang S, Ji LT, Yu ZY, et al. Bioinformatic analysis and experimental validation of cuproptosis-related lncRNA as a novel biomarker for prognosis and immunotherapy of oral squamous cell carcinoma[J]. *Hereditas*, 2024, 161(1): 10. doi:10.1186/s41065-024-00311-5
- [36] Zhou LQ, Cheng Q, Hu Y, et al. Cuproptosis-related lncRNAs are potential prognostic and immune response markers for patients with HNSCC via the integration of bioinformatics analysis and experimental validation [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1030802. doi: 10.3389/fonc.2022.1030802
- [37] Liu XJ, Cheng WW, Li HQ, et al. Identification and validation of cuproptosis-related lncRNA signatures as a novel prognostic model for head and neck squamous cell cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 345. doi:10.1186/s12935-022-02762-0
- [38] Yang LQ, Yu JL, Tao L, et al. Cuproptosis-related lncRNAs are biomarkers of prognosis and immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 947551. doi: 10.3389/fgene.2022.947551
- [39] Li YJ, Li HY, Zhang Q, et al. The prognostic value and immune landscape of a cuproptosis-related lncRNA signature in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 942785. doi: 10.3389/fgene.2022.942785
- [40] Zhao Z, Li YL, Wu YQ, et al. Deep learning-based model for predicting progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27(1): 19-28. doi:10.3233/CBM-190380
- [41] Burger JA, Wiestner A. Targeting B cell receptor signaling in cancer: preclinical and clinical advances [J]. *Nat*

- Rev Cancer, 2018, 18(3): 148-167. doi:10.1038/nrc.2017.121
- [42] Schreibelt G, Bol KF, Aarntzen EH, et al. Importance of helper T-cell activation in dendritic cell-based anticancer immunotherapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(6): e24440. doi:10.4161/onci.24440
- [43] Cho Y, Miyamoto M, Kato K, et al. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1555-1559.
- [44] Kim SS, Shen S, Miyauchi S, et al. B cells improve overall survival in HPV-associated squamous cell carcinomas and are activated by radiation and PD-1 blockade [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(13): 3345-3359. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3211
- [45] Attramadal CG, Kumar S, Gao J, et al. Low mast cell density predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma and reduces survival in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10): 5499-5506. doi:10.21873/anticancer.11131
- [46] Rodrigo JP, Sánchez-Canteli M, López F, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in the tumor microenvironment of laryngeal squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(5): 486. doi:10.3390/biomedicines9050486
- [47] Farah CS. Molecular landscape of head and neck cancer and implications for therapy [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(10): 915. doi:10.21037/atm-20-6264
- [48] Nathan CA, Khandelwal AR, Wolf GT, et al. TP53 mutations in head and neck cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2022, 61(4): 385-391. doi:10.1002/mc.23385
- [49] Chen ZG, Saba NF, Teng Y. The diverse functions of FAT1 in cancer progression: good, bad, or ugly? [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 248. doi:10.1186/s13046-022-02461-8
- [50] Cao HT, Lan TJ, Kuang SJ, et al. FAT1 as a tumor mutation burden specific gene affects the immunotherapy effect in head and neck squamous cell cancer [J]. *Drug Resist Updat*, 2024, 76: 101095. doi:10.1016/j.drug.2024.101095
- [51] Kitamura N, Sento S, Yoshizawa Y, et al. Current trends and future prospects of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 240. doi:10.3390/ijms22010240
- [52] Guigay J, Aupérin A, Fayette J, et al. Cetuximab, docetaxel, and cisplatin versus platinum, fluorouracil, and cetuximab as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous-cell carcinoma (GORTEC 2014-01 TPExtreme): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(4): 463-475. doi:10.1016/S1470-2045(20)30755-5
- [53] Tao YG, Bardet E, Rosine D, et al. Phase I trial of oral etoposide in combination with radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma-GORTEC 2004-02 [J]. *Radiat Oncol*, 2013, 8: 40. doi:10.1186/1748-717X-8-40
- [54] Vanderveken OM, Szturcz P, Specenier P, et al. Gemcitabine-based chemoradiation in the treatment of locally advanced head and neck cancer: systematic review of literature and meta-analysis [J]. *Oncologist*, 2016, 21(1): 59-71. doi:10.1634/theoncologist.2015-0246
- [55] Haffty BG, Son YH, Sasaki CT, et al. Mitomycin C as an adjunct to postoperative radiation therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck: results from two randomized clinical trials [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1993, 27(2): 241-250. doi:10.1016/0360-3016(93)90234-m
- [56] Affolter A, Samosny G, Heimes AS, et al. Multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib as radiosensitizers in head and neck cancer cell lines [J]. *Head Neck*, 2017, 39(4): 623-632. doi:10.1002/hed.24557
- [57] Erjala K, Pulkkinen J, Kulmala J, et al. Concomitant vinorelbine and radiation in head and neck squamous cell carcinoma in vitro [J]. *Acta Oncol*, 2004, 43(2): 169-174. doi:10.1080/02841860310023110
- [58] Ren GX, Hu JZ, Wang RX, et al. Rapamycin inhibits Toll-like receptor 4-induced pro-oncogenic function in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(6): 2804-2810. doi:10.3892/or.2014.3134
- [59] Shen YQ, Guerra-Librero A, Fernandez-Gil BI, et al. Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation [J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(3). doi:10.1111/jpi.12461. doi:10.1111/jpi.12461
- [60] Day TA, Shirai K, O'Brien PE, et al. Inhibition of mTOR signaling and clinical activity of rapamycin in head and neck cancer in a window of opportunity trial [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(4): 1156-1164. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2024
- [61] Seo YS, Kim TH, Lim H, et al. Phenformin induces caspase-dependent apoptosis of FaDu head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(7): 3499-3506. doi:10.21873/anticancer.13496
- [62] Zhuang DX, Wang SS, Deng HT, et al. Phenformin activates ER stress to promote autophagic cell death via NIBAN1 and DDIT4 in oral squamous cell carcinoma independent of AMPK [J]. *Int J Oral Sci*, 2024, 16(1): 35. doi:10.1038/s41368-024-00297-w