

单细胞测序分析喉鳞状细胞癌细胞 RPN2 表达模式

吴彬, 周敬淳

暨南大学第二临床医学院 耳鼻咽喉科, 广东 深圳 518020

摘要: **目的** 探讨核糖体结合糖蛋白 II (ribophorin II, RPN2) 在喉鳞状细胞癌单细胞微环境中的表达模式。 **方法** 通过获取并预处理 GSE150321 的喉鳞癌单细胞数据集, 应用降维和分群算法对细胞类型进行分类和定义, 并对各细胞类型中的 RPN2 表达进行概览和分析。筛选出 RPN2 阳性和 RPN2 阴性肿瘤细胞的差异表达基因, 进行功能富集分析, 构建 RPN2 阳性和 RPN2 阴性肿瘤细胞的细胞互作网络。 **结果** 喉鳞状细胞癌细胞经单细胞测序后, 根据细胞的标记分子将细胞分为肿瘤细胞、免疫细胞、成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞等亚群。RPN2 在肿瘤细胞和免疫细胞中的表达水平相对较高, 而在内皮细胞、成纤维细胞和上皮细胞中的表达水平相对较低。差异表达分析筛选出与 RPN2 表达相关的基因, 功能富集分析结果显示 RPN2 阳性肿瘤细胞高表达基因主要富集在核糖核蛋白复合体的生物发生和胞质翻译等信号通路中。构建的细胞互作网络显示 RPN2 阳性肿瘤细胞与成纤维细胞、内皮细胞和免疫细胞之间存在较强的互作关系。 **结论** 本研究揭示了 RPN2 在喉鳞状细胞癌微环境中的表达模式, 以及 RPN2 阳性和 RPN2 阴性肿瘤细胞的特征及其与肿瘤发病、发展、预后之间的关联。这些发现为喉鳞状细胞癌的治疗和进一步研究提供了理论依据。

关键词: 喉鳞状细胞癌; 单细胞测序; 核糖体结合糖蛋白 II; 微环境; 细胞互作网络

中图分类号: R767.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3770(2024)03-0001-11

引用格式: 吴彬, 周敬淳. 单细胞测序分析喉鳞状细胞癌细胞 RPN2 表达模式[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2024, 38(3): 1-11.
WU Bin, ZHOU Jingchun. Single cell sequencing analysis of RPN2 expression pattern in laryngeal squamous cell carcinoma cells [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(3): 1-11.

Single cell sequencing analysis of RPN2 expression pattern in laryngeal squamous cell carcinoma cells

WU Bin, ZHOU Jingchun

Department of Otorhinolaryngology, the Second Clinical College of Jinan University, Shenzhen 518020, Guangdong, China

Abstract: Objective This study aims to explore the expression pattern of RPN2 in the microenvironment of laryngeal squamous cell carcinoma at the single-cell level. **Methods** By acquiring and preprocessing the GSE150321 dataset of laryngeal squamous cell carcinoma single-cell data, dimensionality reduction and clustering algorithms were applied to classify and define cell types, followed by an overview and analysis of RPN2 expression in each cell type. Differential expression genes between RPN2-positive and RPN2-negative tumor cells were screened and subjected to functional enrichment analysis. A cell-cell interaction network was constructed for RPN2-positive and RPN2-negative tumor cells. **Results** After single-cell sequencing of laryngeal squamous cell carcinoma cells, cells were classified into subgroups such as tumor cells, immune cells, fibroblasts, endothelial cells, and epithelial cells based on cell marker molecules. RPN2 showed relatively higher expression levels in tumor cells and immune cells, while lower expression levels were observed in endothelial cells, fibroblasts, and epithelial cells. Differential expression analysis identified genes associated with RPN2 expression, and functional enrichment analysis revealed that highly expressed genes in RPN2-positive tumor cells were mainly enriched in biological processes such as ribonucleoprotein complex biogenesis and cytoplasmic translation signaling pathways. The constructed cell-cell interaction network demonstrated strong interactions between RPN2-positive tumor cells and fibroblasts, endothelial cells, and immune cells. **Conclusion** This study reveals the expression pattern of RPN2 in the microenvironment of laryngeal squamous cell carcinoma and the characteristics of RPN2-positive and RPN2-negative tumor cells, as well as their associations with tumor occurrence, development, and prognosis. These findings provide a theoretical basis for the treatment and further research of laryngeal squamous cell carcinoma.

Key words: Laryngeal squamous cell carcinoma; Single-cell sequencing; Ribophorin II; Microenvironment; Cell interactome network

喉鳞状细胞癌作为头颈癌的一种重要类型,其发病率较高。据国际癌症研究机构的报告,全球范围内每年有大约 50 万喉癌病例,其中喉鳞状细胞癌占据相当比例^[1]。另外,喉鳞状细胞癌的预后较差,大部分患者在诊断时已处于晚期,这导致了治疗困难和预后不佳。因此,深入研究喉鳞状细胞癌的发病机制和寻找潜在的治疗靶点显得尤为重要。

近年来,单细胞测序技术发展为我们提供了观察肿瘤微环境的新视角。相较于传统的组织块测序,单细胞测序技术能够更精细地分析肿瘤细胞和微环境中非肿瘤细胞的异质性,揭示不同细胞类型的分子特征,从而更好地理解肿瘤的生物学特性,并为精准医疗提供支持^[2-3]。核糖体结合糖蛋白 II (ribophorin II, RPN2) 作为肿瘤研究中的重要研究对象,其在调控细胞内质网的功能方面发挥着重要作用,对于肿瘤细胞的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)具有显著的影响^[4]。而喉鳞癌细胞的 EMT 过程与肿瘤细胞的生长、侵袭、转移和药物耐药性等生物学行为密切相关^[5-9]。研究发现,喉鳞癌的耐药机制可能与 PI3k -AKT 途径以及肿瘤细胞迁移、转移或侵袭途径相关^[10-12]。因此,RPN2 成为了研究头颈癌,尤其是喉鳞状细胞癌的重要分子靶点。

在本研究中,我们利用公开可获得的 GSE150321 喉鳞状细胞癌单细胞数据集,结合单细胞测序技术,深入探讨了 RPN2 在喉鳞状细胞癌微环境中的表达模式。我们通过分析 RPN2 在不同细胞类型中的表达模式,揭示了其在肿瘤生物学中的角色。此外,我们还识别了 RPN2 阳性和阴性细胞之间的差异表达基因,并进行了功能富集分析,以进一步探究这些基因在肿瘤发展过程中的作用。同时,我们构建了细胞互作网络,量化和理解肿瘤细胞与微环境中其他细胞之间的相互作用。这些发现为头颈癌的治疗研发提供了新的方向,可能为未来的治疗策略提供新的思路,从而改善患者的预后和生活质量。

1 资料与方法

1.1 数据下载

从美国国立生物技术信息中心的 GEO 数据库下载喉鳞癌单细胞数据(GSE150321)并基于该数据集进行分析。

1.2 数据预处理

对下载的单细胞数据使用 Seurat 软件包对数据进行预处理和质量控制,包括去除低质量细胞、去除空白细胞、去除双核细胞等。

1.3 细胞分群

使用 Seurat 软件包对预处理后的单细胞数据进行细胞分群分析。采用 UMAP 算法对细胞进行降维,并参考文献提供的 Marker 基因对聚类后的细胞群进行注释定义。

1.4 差异表达基因分析

根据注释的肿瘤细胞中是否表达 RPN2 为基础,将肿瘤细胞分为 RPN2 阴性和 RPN2 阳性两组细胞,并使用 Seurat 包中 FindMarkers 函数进行差异表达分析,根据差异表达基因分析结果的平均差异倍数和 P 值进行筛选,选取显著差异表达的基因。

1.5 GO 和 KEGG 功能富集分析

对筛选出来的肿瘤细胞 RPN2 阴性和阳性两组细胞差异表达基因使用 clusterProfiler 包进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)功能富集分析,进一步了解差异表达基因在生物学过程和信号通路中的功能。

1.6 细胞通讯网络分析

以 RPN2 阴性和阳性两类肿瘤细胞为基础,联合其他细胞使用 CellChat 包进行细胞互作分析。重点检测 RPN2 阳性细胞与其他细胞的互作关系,并比较 RPN2 阳性和阴性两类肿瘤细胞与其他细胞互作的差异。

1.7 互作网络关键配体受体对基因分析

根据使用 CellChat 包的细胞互作分析结果,筛选 RPN2 阳性肿瘤细胞与其他细胞之间的显著配体受体基因。进一步比较筛选出的配体受体基因在各类细胞中的表达量,并使用头颈癌 TCGA 数据对这些基因进行生存预后分析,评估其对患者生存预后的影响。

2 结果

2.1 UMAP 分群结果

从 GEO(GSE150321)下载喉鳞癌单细胞数据,并进行降维、分群、定义,复现原文结果中不同细胞群的分布情况,见图 1。对喉鳞癌细胞单细胞测序数据质控后降维分群初始可分为 5 个类群,见图 1A。根据文献提供的细胞的标记基因包括 KRT5、PTPRC、CLU、COL3A1、COL1A2、AQP1 的表达信息,KRT5 为喉癌细胞的标记基因,PTPRC 为免疫细胞的标记基因,CLU 为上皮细胞的标记基因,COL3A1、COL1A2 为内皮细胞的标记基因,AQP1 为成纤维细胞的标记基因,图 1B 展示了不同细胞群中标记基因的表达量和表达细胞比例,根据标记基因的表达水平对各细胞群分群并注

释。细胞注释为喉鳞癌微环境中的细胞群:肿瘤细胞、免疫细胞、成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞,见图 1C。另外,我们对各个细胞群进行了数量和比例的统计分析。通过计算每个细胞群中细胞的数量,并将其与总细胞数进行比较,我们得到了

不同细胞群的数量,见图 1D。其中肿瘤细胞所占比例为 52% (5 057 个),免疫细胞所占比例为 38% (3 748 个),上皮细胞所占比例为 4% (459 个),成纤维细胞所占比例为 4% (343 个),内皮细胞所占比例为 2% (189 个)。

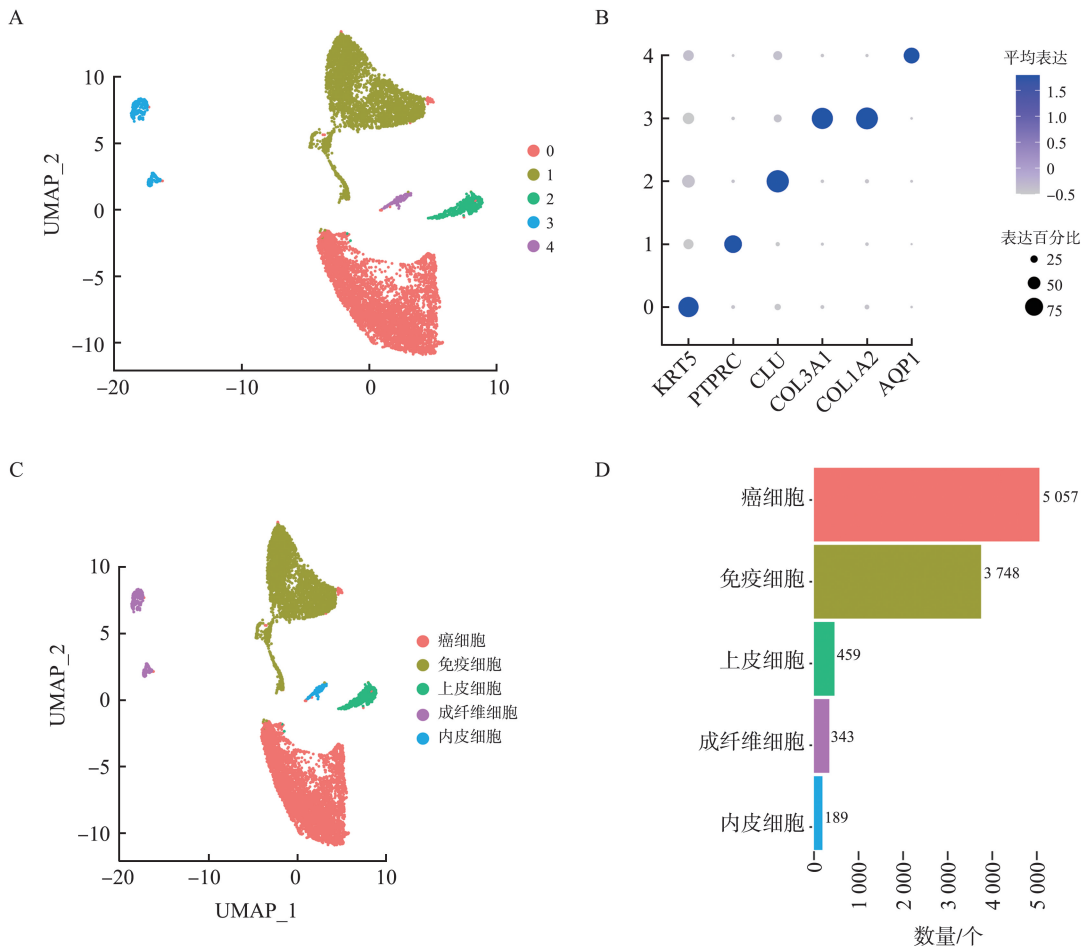


图 1 喉鳞癌细胞数据降维结果中不同细胞群的分布情况

A: 分群降维图; B: 根据文章提供的 Marker 检查在各个分群中的表达; C: 定义各个分群细胞; D: 统计各类细胞中的细胞数量

Figure 1 Distribution of different cell populations in the dimensionality reduction results of cell sequencing data of laryngeal squamous cell carcinoma

A: Clustering and dimensionality reduction plot; B: Expression of markers provided in the article across different clusters; C: Definition of each cluster of cells; D: Enumeration of cells in each cell type

2.2 RPN2 表达与肿瘤细胞发生和转移中的差异基因调控作用分析

我们对不同细胞群中 RPN2 的表达量进行分析,发现肿瘤细胞群和免疫细胞群中的 RPN2 表达水平相对较高,而内皮细胞群、成纤维细胞群和上皮细胞群中的 RPN2 表达水平相对较低,见图 2A。我们进一步将肿瘤细胞按是否表达 RPN2 分为阴性和阳性两类,筛选出上调和下调基因。差异表达分析结果显示,下调基因 Top 5 为线粒体基因,推测 RPN2 与能量代谢具有相关性,见图 2B。GO 和

KEGG 分析表明,RPN2 阳性肿瘤细胞高表达基因主要富集在细胞质翻译、核糖核蛋白复合体生物发生、肽酶活性调节、病毒生物学过程等生物学过程。KEGG 富集分析发现靶基因主要参与 RNA 相关信号通路,包括核糖体通路、多种神经变性疾病的信号通路(如帕金森病、渐冻症、阿尔茨海默病等),见图 2C。KEGG 富集分析发现靶基因主要参与 RNA 相关信号通路,这些结果表明,差异表达基因可能参与了 RPN2 在肿瘤细胞发生和转移过程中的调控作用,见图 2D。

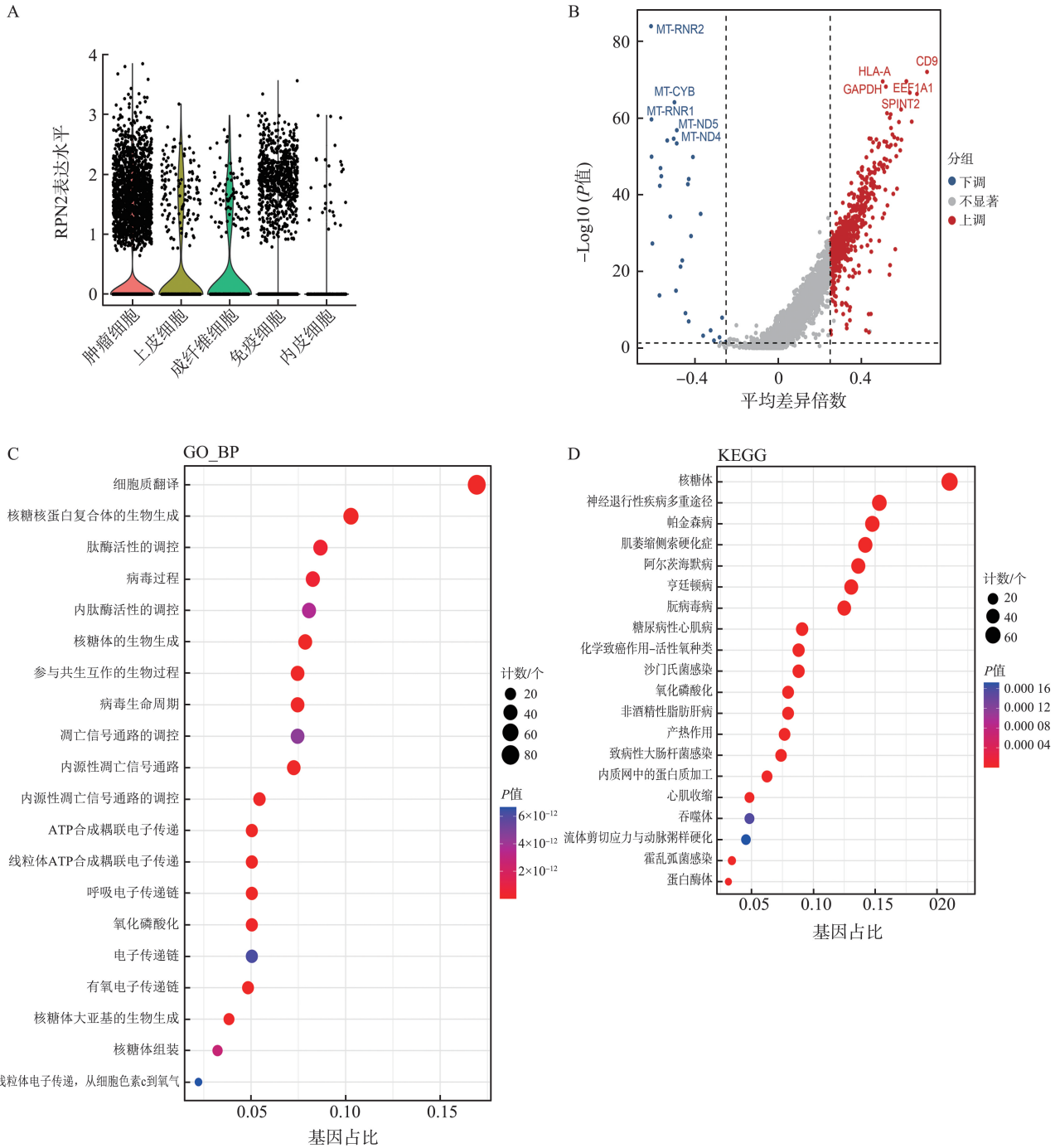


图 2 肿瘤细胞差异表达与功能分析

A: 不同细胞群中 RPN2 的表达量分析; B: 肿瘤细胞差异表达分析结果; C: RPN2 阳性肿瘤细胞高表达基因的 GO 功能富集展示; D: RPN2 阳性肿瘤细胞高表达基因的 KEGG 功能富集展示

Figure 2 Differential comparison analysis and functional analysis of the tumor cells

A: RPN2 exhibits expression in different tumor cells populations; B: The results of differential comparison analysis for the tumor cells; C: GO functional enrichment analysis of genes highly expressed in RPN2-positive tumor cells; D: KEGG functional enrichment analysis of genes highly expressed in RPN2-positive tumor cells

2.3 RPN2 阳性肿瘤细胞与其他细胞类型的互作关系分析

我们以 RPN2 阴性和阳性两类肿瘤细胞为基础, 与其他细胞进行细胞互作分析, 重点检测阳性细胞与其他细胞的互作关系及量化统计, 见图

3A、图 3B。其中 RPN2 阳性细胞群与成纤维细胞、内皮细胞及免疫细胞互作较强, 见图 3C。RPN2 阳性细胞群在各类细胞的互作网络关系中占比较大。见图 3D-图 3I。

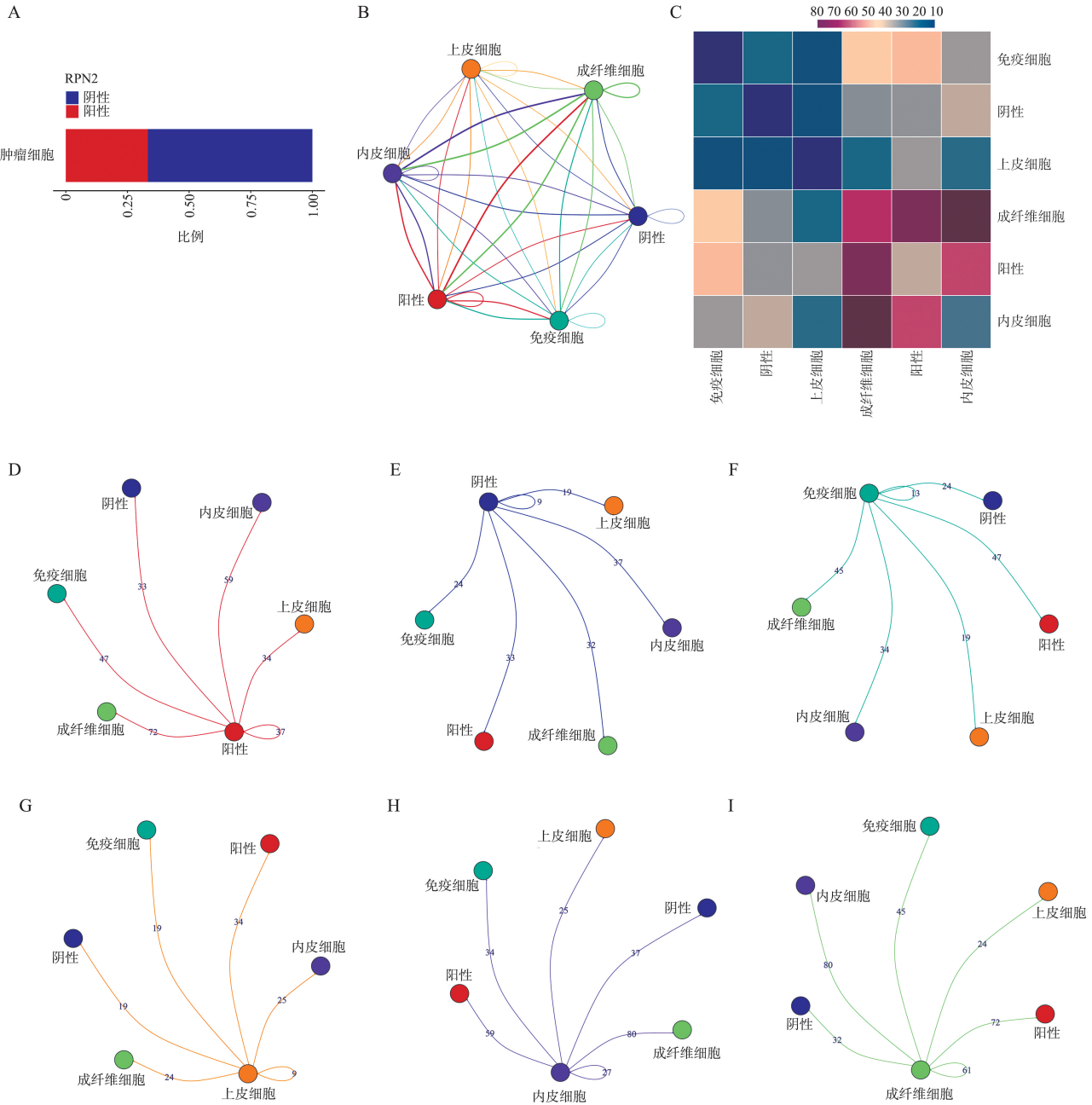


图 3 阳性细胞与其他细胞的互作关系及量化统计

A: RPN2 阴性、阳性肿瘤细胞的数量比例分布; B: RPN2 阴性、阳性肿瘤细胞与其他细胞的互作网络; C: RPN2 阴性、阳性肿瘤细胞与其他细胞的互作网络强度统计; D~I: 分别展示每类细胞与其他细胞的互作关系及强度

Figure 3 Analysis of intercellular interactions between RPN2-positive in conjunction with other cell types

A: Distribution of RPN2-negative and RPN2-positive tumor cells; B: Interactome network between RPN2-negative and RPN2-positive tumor cells and other cell types; C: Statistical analysis of interaction network strength between RPN2-negative and RPN2-positive tumor cells and other cell types; D-I: Display of interaction relationships and strengths between each cell type and other cell types

2.4 RPN2 阳性肿瘤细胞互作显著配体受体基因的筛选及其生存预后分析

我们筛选了 RPN2 阳性肿瘤细胞与其他细胞进行细胞互作的显著配体受体基因,发现 CD74-APP 配体受体对基因在阳性肿瘤细胞与其他细胞互作中与其他多种细胞类型都具有较强显著

性,见图 4A。进一步检测两个基因在各类细胞中的表达量,发现两个基因在肿瘤细胞和免疫细胞中都具有高表达量,见图 4B、4C。并使用 TCGA 数据库中的头颈癌数据对两个基因进行生存预后分析,发现两个基因对生存预后都具有显著性,见图 4D、4E。

互作网络。结果显示, RPN2 在喉鳞状细胞癌微环境中的表达具有重要意义, 并揭示了 RPN2 阳性和阴性肿瘤细胞的特征差异及其与肿瘤发病、发展、预后之间的关联。

通过对喉鳞癌细胞单细胞测序数据分析, 我们成功地将细胞分为不同的类型, 并确定了各细胞类型中 RPN2 的表达情况。我们发现 RPN2 在肿瘤细胞中的表达量最高。进一步根据 RPN2 在肿瘤细胞表达与否进行分组, 我们发现 RPN2 阳性肿瘤细胞高表达基因主要与线粒体功能、能量代谢以及肿瘤相关的通路等相关。这些结果提示 RPN2 在喉鳞状细胞癌发生和转移中可能具有重要的调控作用。

有研究显示白介素-17 通过激活 PI3K/AKT 并抑制 Fas/FasL 信号通路抑制喉癌细胞凋亡, 揭示了 RPN2 可能与这些通路相互作用, 为治疗提供新线索^[13]。此外, RPN2 与细胞周期调控和肿瘤侵袭性相关的 ACTL8 有类似联系^[14]。对喉鳞癌的非编码 RNA 研究也支持 RPN2 可能通过影响细胞分化和增殖的信号通路来作用^[15]。Vujanovic 等^[16] 研究揭示了 RPN2 不仅在细胞增殖和存活中起作用, 更可能通过调节与免疫逃逸相关的因子(如 PD-L1) 从而影响着肿瘤细胞的行为。这些研究成果加强了我们对 RPN2 在调节肿瘤微环境中的理解。研究还发现 RPN2 与 CrkII、VEGF 和 MMPs 可能参与同一信号通路, 影响着喉鳞癌的进展和预后^[17-18]。

我们通过单细胞测序技术发现, RPN2 在喉鳞癌微环境中可能起到关键调节作用, 尤其是在免疫细胞功能的调控上。这一发现与先前的研究相呼应^[19], 进一步揭示了肿瘤微环境如何差异性地调节免疫细胞, 例如巨噬细胞从 M1 向 M2 表型的转变, 强调了 RPN2 在维护或改变这种微环境中扮演的潜在角色。理解 RPN2 的这些作用对于揭示其在喉鳞状细胞癌发展中的具体意义至关重要。

此外, 在先前探讨 RPN2 在传统化疗和新兴分子靶向治疗响应中作用的研究也显示了其作为治疗靶点的潜力^[20-21]。随着治疗策略的不断进展, RPN2 的表达模式可能直接影响患者的治疗效果和预后。通过单细胞测序技术揭示的肿瘤细胞异质性不仅增加了对疾病复杂性的理解, 还为针对 RPN2 的治疗策略的设计提供了更为精细的靶点定位。综上所述, 本研究揭示了 RPN2 在喉鳞状细胞癌微环境中的表达模式及其在肿瘤发病、发展和预后中的潜在作用。我们的发现为喉鳞状细胞癌的治疗和进一步研究提供了理论依据, 并为未来探索 RPN2 相关的治疗策略提供了方向和思路。进一步的研究可以考

虑验证 RPN2 在喉鳞状细胞癌中的表达模式, 并探索其与其他关键基因或信号通路之间的相互作用, 以深入理解其在肿瘤发展和治疗中的潜在机制。

3.2 RPN2 阳性肿瘤细胞在细胞间相互作用中的特殊表现

通过单细胞测序分析喉鳞癌细胞的 RPN2 表达模式, 我们发现 RPN2 阳性肿瘤细胞在细胞间相互作用中展现出一些特殊的表现: ①与其他细胞的互作网络中, RPN2 阳性肿瘤细胞与成纤维细胞、内皮细胞以及免疫细胞之间的互作关系较为明显。这表明 RPN2 阳性肿瘤细胞在肿瘤的微环境中与这些细胞类型之间存在着密切的相互作用。②我们发现一些显著的配体受体基因对在 RPN2 阳性肿瘤细胞与其他细胞的互作中具有较显著的显著性, 例如 CD74-APP。进一步检测发现, CD74 和 APP 基因在不同细胞类型中的表达量也存在差异, 这进一步说明了这些基因在 RPN2 阳性肿瘤细胞与其他细胞的互作中的重要性。③生存预后分析显示这些显著配体受体基因与患者的生存预后具有显著相关性。这表明 RPN2 阳性肿瘤细胞与与之互作的其他细胞及其相关的基因在肿瘤的发展、预后等方面可能发挥着重要的作用。

先前的研究已经指出, SIRT6 和 EHD2 的表达在喉鳞状细胞癌组织中低于正常组织, 并且 EHD2 的表达与肿瘤的病理分级和淋巴结转移密切相关^[22]。此外, 与巨噬细胞移动抑制因子(migration inhibitory factor, MIF) 和糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 相关的研究也显示, 这些蛋白在喉癌组织中的表达显著高于癌旁组织, 且与肿瘤分化程度、TNM 分期及淋巴结转移密切相关^[23]。这些发现强调了这些分子在喉鳞状细胞癌发展中的重要作用, 并暗示它们可能与 RPN2 通过共同的信号通路或机制相互作用。进一步的研究可以探索 RPN2 阳性肿瘤细胞如何通过 SIRT6、EHD2、MIF 和 GSK-3 β 等已知肿瘤标志物的相互作用影响细胞间的相互作用和肿瘤微环境。我们的单细胞分析揭示了 RPN2 在不同细胞状态和微环境条件下的表达差异, 为理解其在喉鳞状细胞癌细胞中的独特作用提供了新的视角。

综上所述, RPN2 阳性肿瘤细胞在细胞间的相互作用中具有特殊的表现。它们与成纤维细胞、内皮细胞以及免疫细胞之间的互作关系较为密切, 并且展现出较强的互作强度。此外, 与其他细胞的互作中, 一些显著的配体受体基因对在 RPN2 阳性肿瘤细胞中具有较高的表达水平, 并与患者的生存预

后密切相关。这些研究结果为深入理解 RPN2 在喉鳞状细胞癌中的作用及相关的治疗策略提供了理论依据。进一步的研究可以探究 RPN2 在肿瘤发展过程中的具体机制,以及针对 RPN2 阳性肿瘤细胞的治疗方法的优劣,并将其与研究结果相结合,从而为喉鳞状细胞癌的治疗提供新的思路和策略。

3.3 RPN2 与能量代谢关联的推论及其基于单细胞数据分析的限制

根据前面的研究结果,我们发现 RPN2 在喉鳞状细胞癌单细胞微环境中的表达具有重要意义,并揭示了 RPN2 阳性和阴性肿瘤细胞的特征及其与肿瘤发病、发展、预后之间的关联。进一步的分析显示,RPN2 阳性肿瘤细胞与其他细胞之间存在着明显的互作网络,特别是在成纤维细胞、内皮细胞和免疫细胞之间的互作较强。

为了进一步探究 RPN2 阳性肿瘤细胞的功能和作用机制,我们筛选了与 RPN2 阳性肿瘤细胞进出互作显著的配体受体基因,并发现 CD74-APP 配体受体对基因在阳性肿瘤细胞与其他细胞的互作中具有较显著的显著性。进一步的实验结果显示,CD74-APP 配体受体对基因在各类细胞中的表达量差异较大,进一步支持了它们在 RPN2 阳性肿瘤细胞互作网络中的重要性。

最后,我们还使用头颈癌 TCGA 数据对 CD74-APP 配体受体对基因进行了生存预后分析,发现这两个基因对生存预后都具有显著性。这些结果表明,RPN2 阳性肿瘤细胞与 CD74-APP 配体受体对基因的互作在喉鳞状细胞癌的发病和发展中可能具有重要的调控作用。

但是,我们也要注意,这项研究还存在一些局限性。首先,我们的研究主要基于单细胞数据分析,尽管单细胞测序技术在研究肿瘤微环境中的细胞异质性方面具有独特优势,但其结果仍然受到样本数量、数据质量和算法选择等因素的限制。其次,我们在本研究中仅使用了单一的喉鳞癌单细胞数据集,并且没有与其他数据集的结果进行一致性验证。最后,虽然我们的研究揭示了 RPN2 与能量代谢的关联,但具体的调控机制还需要进一步的实验证实。

借鉴胃癌研究中的方法,我们参考了利用单细胞 RNA 测序技术分析间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)标记物,并据此建立预后风险模型的研究^[24]。这种基于单细胞数据构建的模型不仅凸显了单细胞分析在预测肿瘤患者预后中的重要性,而且揭示了肿瘤微环境调节因素,包括与能量代谢相关的标记物在内的重要作用。我们的分析进一

步揭示了 RPN2 与肿瘤微环境中的能量代谢过程可能存在关联。特别是 RPN2 与 MSC 标记物的相关性表明,RPN2 可能参与调控与肿瘤相关的能量代谢途径,如免疫应答、血管生成和基质组成的转化。这为 RPN2 在能量代谢中的作用提供了新的见解。单细胞测序技术在揭示这些关系时也面临一些限制。虽然单细胞分析能提供细胞异质性的深入理解,但数据的解读可能受到样本准备、测序深度和数据分析方法的限制。此外,单细胞数据的复杂性要求高级的统计处理和生物信息学支持,以确保从数据中提取出有意义的生物学信息。

近期研究中对其他分子标记物的探索,如朊蛋白和 CHD1L,也强调了 RPN2 可能在肿瘤细胞行为中的多方面作用,包括与 EMT 相关的信号通路^[25-26]。这些发现不仅丰富了我们对于 RPN2 在喉鳞状细胞癌中的作用的深入理解,也为未来针对能量代谢相关路径的治疗策略提供了潜在的新靶点。这对于开发针对特定代谢通路的治疗策略具有重要意义。

综上所述,我们的研究结果提供了 RPN2 在喉鳞状细胞癌微环境中的表达模式以及其与能量代谢的关联推论。这些研究结果对于喉鳞状细胞癌的治疗和进一步的研究具有重要意义,并为未来的研究方向提供了理论依据。然而,我们也要意识到本研究的局限性,需要进一步的验证和深入的研究来揭示 RPN2 在喉鳞状细胞癌中的生物学功能和潜在治疗策略。

3.4 RPN2 相关的潜在治疗策略及进一步研究的方向

RPN2 在喉鳞状细胞癌微环境中的表达具有重要意义,并揭示了 RPN2 阳性和阴性肿瘤细胞的特征以及与肿瘤发病、发展和预后之间的关联。基于这些发现,我们提出了以下 RPN2 相关的潜在治疗策略及进一步研究的方向。

首先,RPN2 在喉鳞状细胞癌中的表达模式具有重要的临床意义,可能成为喉鳞状细胞癌的新治疗靶点。因此,我们建议进一步研究 RPN2 的功能调控机制,探索其与喉鳞状细胞癌发展和转移的关系。此外,可以考虑通过调节 RPN2 的表达来抑制肿瘤细胞的增殖和转移能力,从而达到治疗喉鳞状细胞癌的目的。

其次,我们推测 RPN2 与能量代谢具有相关性,因为 RPN2 阳性肿瘤细胞中发现了下调的线粒体基因。因此,可以进一步研究 RPN2 在喉鳞状细胞癌中的代谢调控作用,探索其与肿瘤能量代谢的关系。这将有助于深入理解 RPN2 在喉鳞状细胞癌发展中

的作用机制,并为寻找以能量代谢为靶点的新治疗策略提供新方向。

此外,我们也提出了进一步研究 RPN2 阳性肿瘤细胞与其他细胞之间的相互作用关系的方向。前期研究中发现 RPN2 阳性肿瘤细胞与成纤维细胞、内皮细胞和免疫细胞之间的互作较强。因此,可以深入研究 RPN2 阳性肿瘤细胞与这些细胞之间的互作机制,解析其在肿瘤微环境中的功能和影响,筛选出显著的细胞互作关系中显著的配体受体对基因 CD74-APP,为喉鳞状细胞癌的治疗和免疫治疗提供新的启示。

基于我们的发现,RPN2 可能成为喉鳞状细胞癌治疗的一个重要靶点。特别是考虑到 RPN2 与炎症介质如 CXCL2,以及与肿瘤相关中性粒细胞的表达相关联,其在调节与肿瘤相关的炎症环境中可能扮演关键角色^[27]。因此,针对 RPN2 的治疗策略可以考虑开发特定的小分子抑制剂或单克隆抗体,用以抑制其在肿瘤中的功能,从而抑制肿瘤的增殖和侵袭能力。考虑到 RPN2 可能通过调节 MMP-2 和 MMP-9 的表达促进肿瘤细胞的 EMT 过程,针对这一通路的干预可能进一步阻断肿瘤的侵袭和转移^[28]。因此,联合针对 RPN2 和 MMPs 的治疗策略可能对于控制或逆转肿瘤的恶性进程特别有效。最近的研究发现,喉鳞状细胞癌组织及其邻近正常组织中多个 lncRNAs 与 miRNAs 和 mRNAs 的表达差异显著,构建的 ceRNA 网络揭示了它们在肿瘤发生中的潜在作用^[29],鉴于 RPN2 与 lncRNAs 如 ZNF561-AS1 和 SATB1-AS1 之间的相互作用可能影响肿瘤细胞的迁移和侵袭,针对这些分子之间的相互作用网络的深入研究可能揭示新的抗癌治疗靶点。未来的研究应聚焦于开发能够调节这些 ceRNA 网络的药物,以抑制肿瘤扩散。我们从非小细胞肺癌对 NY-ESO-1 表达和免疫调节因子间相互作用的研究中得到启发^[30],发现 RPN2 可能通过调节免疫调节因子如 Foxp3,在喉鳞状细胞癌中促进肿瘤免疫逃逸的过程。此外,DNM3OS 等 lncRNA 在喉鳞状细胞癌进展中的关键作用为非编码 RNA 的研究提供了新的视角。DNM3OS 通过调控 EMT 相关标记物的表达,影响肿瘤细胞的侵袭和转移^[31],从而凸显了 RPN2 与 lncRNAs 交互作用网络在肿瘤行为调控中的潜在重要性。考虑到 RPN2 在肿瘤代谢调控中的作用,尤其是其对糖酵解和谷氨酰胺代谢途径中关键基因的潜在影响^[32],我们认为 RPN2 不仅是理解喉鳞状细胞癌发展的关键,也为未来的治疗策略提供了重要靶点。

最后,我们建议结合其他无侵袭性检测方法,如血液或唾液样本,研究 RPN2 的生物标志物价值。通过这些无创性检测方法,可以对喉鳞状细胞癌患者的 RPN2 表达模式进行监测,为疾病的早期诊断和治疗提供依据。通过综合运用分子生物学、免疫学和代谢学的方法,未来的研究应旨在全面理解 RPN2 在喉鳞状细胞癌中的作用机制,从而为开发针对喉鳞状细胞癌的新治疗方法提供坚实的科学基础。这不仅有望改善喉鳞状细胞癌患者的治疗效果,也可能为其他类型肿瘤的研究和治疗提供重要启示。

3.5 小结

综上所述,本研究揭示了 RPN2 在喉鳞状细胞癌单细胞微环境中的表达模式,并提出了相应的潜在治疗策略及进一步研究的方向。这些研究结果将为喉鳞状细胞癌的治疗和进一步研究提供理论依据,为未来的临床实践和转化医学研究提供新的思路和方向。

参考文献:

- [1] 周一静, 邹建银, 易红良, 等. TGFBI 在头颈部鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2023, 37(5): 85-95. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.459
- ZHOU Yijing, ZOU Jianyin, YI Hongliang, et al. Expression of TGFBI in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2023, 37(5): 85-95. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.459
- [2] Song H, Lou C, Ma J, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals changes of tumor immune microenvironment in oral squamous cell carcinoma after chemotherapy [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 914120. doi:10.3389/fcell.2022.914120
- [3] Verga Samuel A. Comparative analysis of breast cancer stem-like cells and the bulk tumor through whole transcriptome sequencing and expression analysis [D]. Indiana: Indiana State University, 2016
- [4] Zhou JC, Zhang JJ, Zhang W, et al. Ribophorin II promotes the epithelial-mesenchymal transition and aerobic glycolysis of laryngeal squamous cell carcinoma via regulating reactive oxygen species-mediated phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase b activation [J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 5141-5151. doi:10.1080/21655979.2022.2036914
- [5] 李亚楠, 梁辉. 人乳头瘤病毒相关口咽鳞状细胞癌发生机制的研究进展[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2023, 37

- (3): 104-110. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.172
- LI Yanan, LIANG Hui. Study progress on the mechanism of human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2023, 37(3): 104-110. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.172
- [6] Li H, Pan LJ, Guo JY, et al. Integration of single-cell and bulk RNA sequencing to establish a prognostic signature based on tumor-associated macrophages in colorectal cancer[J]. BMC Gastroenterol, 2023, 23(1): 385. doi:10.1186/s12876-023-03035-4
- [7] 李智林, 郑洲, 安韡. 12例原发性甲状腺鳞状细胞癌的临床及生存分析[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2023, 37(1): 59-63. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.439
- LI Zhilin, ZHENG Zhou, AN Wei. Clinical and survival analysis of primary squamous cell carcinoma of the thyroid 12 cases[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2023, 37(1): 59-63. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.439
- [8] 刘玉东, 甄娟, 韩晓丽, 等. MTA2、HIF-1 α 和E-cadherin在喉鳞状细胞癌组织及转染MTA2 siRNA喉癌细胞中的表达观察[J]. 山东医药, 2020, 60(6): 40-44
- LIU Yudong, ZHEN Juan, HAN Xiaoli, et al. Expression of MTA2, HIF-1 α , and E-cadherin cadherin in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and laryngeal carcinoma cells transfected with MTA2 siRNA[J]. Shandong Medical Journal, 2020, 60(6): 40-44
- [9] 赵谦, 白艳霞, 张少强, 等. N-myc下游调控基因2蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及对喉表皮样癌细胞生物学特性的影响[J]. 安徽医药, 2020, 24(10): 1933-1937. doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.005
- ZHAO Qian, BAI Yanxia, ZHANG Shaoqiang, et al. Expression of NDRG2 in laryngeal squamous cell carcinoma and its effects on cellbiological character of Hep-2 cells[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2020, 24(10): 1933-1937. doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.005
- [10] 车娟, 张肖林, 徐舒舒, 等. 喉鳞癌组织中OPN、VEGF、MMP-9蛋白表达变化及意义[J]. 山东医药, 2019, 59(13): 11-14. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2019.13.003
- CHE Juan, ZHANG Xiaolin, XU Shushu, et al. Changes in expression of OPN, VEGF, and MMP-9 proteins in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Shandong Medical Journal, 2019, 59(13): 11-14. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2019.13.003
- [11] Yang L, Zhang XY, Hou Q, et al. Single-cell RNA-seq of esophageal squamous cell carcinoma cell line with fractionated irradiation reveals radioresistant gene expression patterns[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 611. doi:10.1186/s12864-019-5970-0
- [12] 姚兆旭. WAVE2在消化道喉鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义[J]. 现代消化及介入诊疗, 2018, 23(12): 1
- [13] 杨明, 宋杨, 张红健, 等. IL-17调控PI3K/AKT/FAS/FASL信号通路抑制Hep-2细胞凋亡[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(11): 1681-1684. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.006
- YANG Ming, SONG Yang, ZHANG Hongjian, et al. IL-17 inhibits apoptosis of Hep-2 cell lines through modulating PI3K/AKT/FAS/FASL signaling pathway[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2018, 53(11): 1681-1684. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.006
- [14] Wang LF, Xing XL, Tian H, et al. Actin-like protein 8, a member of cancer/testis antigens, supports the aggressive development of oral squamous cell carcinoma cells via activating cell cycle signaling[J]. Tissue Cell, 2022, 75: 101708. doi:10.1016/j.tice.2021.101708
- [15] 胡雪刚. 口腔鳞状细胞癌非编码RNA表达谱研究及潜在分子标志物筛选[D]. 福州: 福建医科大学, 2018
- [16] Vujanovic L, Kulkarni A, Cornelius Kürten, et al. Assessment of the immune checkpoint landscape in head and neck squamous cell carcinoma by single-cell RNA sequencing and multispectral imaging[J]. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2020. doi:10.1136/JITC-2020-SITC2020.0756
- [17] 姚芝芬, 于明, 朱颖, 等. 接头蛋白Crk II在喉鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义[J]. 重庆医学, 2018, 47(28): 3719-3720. doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.28.034
- [18] 王晓辉, 沙树奎, 闫嘉俊, 等. 血管内皮生长因子及基质金属蛋白酶在喉鳞状细胞癌病人临床诊断及预后判断中的意义分析[J]. 安徽医药, 2021, 25(4): 793-796
- WANG Xiaohui, SHA Shukui, YAN Jiajun, et al. The value of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the clinical diagnosis and prognosis of patients with laryngeal squamous carcinoma[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2021, 25(4): 793-796
- [19] Li L, Shi W, Liu M, et al. Single-cell secretion analysis in the engineered tumor microenvironment reveals differential modulation of macrophage immune responses[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(9): 4198-4207. doi:10.1021/acs.analchem.0c04604
- [20] 卫亚楠, 陈曦. 局部晚期头颈部鳞状细胞癌的化疗及靶向进展[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2021, 35(3): 118-124. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2020.276
- WEI Yanan, CHEN Xi. Progress in chemotherapy and targeted drug therapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma[J]. Journal of Otolaryngology

- and *Ophthalmology of Shandong University*, 2021, 35 (3): 118-124. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2020.276
- [21] Wu HJ, Yu JH, Kong D, et al. Population and single-cell transcriptome analyses reveal diverse transcriptional changes associated with radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55: 1237-1248. doi:10.3892/ijo.2019.4897
- [22] 瞿浩, 高阳. SIRT6 和 EHD2 因子在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *医药(中国科技期刊数据库)*, 2022(2): 9-13
QU Hao, GAO Yang. Expression of SIRT6 and EHD2 factors in laryngeal squamous cell carcinoma and their clinical significance [J]. *Medicine (China Science and Technology Journal Database)*, 2022(2): 9-13
- [23] 邹良玉, 李连贺, 岳文慧, 等. MIF/GSK-3 β 在喉鳞状细胞癌中表达的临床意义及相关性研究 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2019, 33(2): 76-80. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2018.423
ZOU Liangyu, LI Lianhe, YUE Wenhui, et al. Clinical significance and correlation between MIF and GSK-3 β expression in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2019, 33(2): 76-80. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2018.423
- [24] Shen KY, Chen BY, Gao WC. Integrated single-cell RNA sequencing analysis reveals a mesenchymal stem cell-associated signature for estimating prognosis and drug sensitivity in gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(13): 11829-11847. doi:10.1007/s00432-023-05058-6
- [25] 魏伟, 武月章, 陈冬冬, 等. 喉鳞状细胞癌组织中抗原蛋白分子特征的分析 [J]. *疾病监测*, 2022, 37(2): 176-179. doi:10.3784/jbjc.202105280296
WEI Wei, WU Yuezhong, CHEN Dongdong, et al. Prion protein molecular characteristics in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Disease Surveillance*, 2022, 37(2): 176-179. doi:10.3784/jbjc.202105280296
- [26] 刘勇, 袁存立, 曹慧, 等. CHD1L 通过 EMT 促进喉鳞状细胞癌细胞的增殖、侵袭和转移 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2022, 36(2): 32-39. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.119
LIU Yong, YUAN Cunli, CAO Hui, et al. CHD1L promotes proliferation, invasion and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma cells by EMT [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2022, 36(2): 32-39. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.119
- [27] Guo ZC, Jumatai S, Jing SL, et al. Bioinformatics and immunohistochemistry analyses of expression levels and clinical significance of CXCL2 and TANs in an oral squamous cell carcinoma tumor microenvironment of *Prophyromonas gingivalis* infection [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(3): 189. doi:10.3892/ol.2021.12450
- [28] 朱虹, 左文娜, 金爱燕, 等. 喉鳞状细胞癌患者血清及唾液中基质金属蛋白酶-2 基质金属蛋白酶-9 的水平与肿瘤恶性程度的相关性分析 [J]. *中国药物与临床*, 2021, 21(6): 945-947. doi:10.11655/zgywylc2021.06.019
- [29] Lyu KX, Li Y, Xu Y, et al. Using RNA sequencing to identify a putative lncRNA-associated ceRNA network in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *RNA Biol*, 2020, 17(7): 977-989. doi:10.1080/15476286.2020.1741282
- [30] Wang HS, Xia Y, Yu JM, et al. Expression of New York esophageal squamous cell carcinoma 1 and its association with Foxp3 and indoleamine-2, 3-dioxygenase in microenvironment of nonsmall cell lung cancer [J]. *HLA*, 2019, 94(1): 39-48. doi:10.1111/tan.13547
- [31] 王晶田, 赵岩, 刘胜辉, 等. lncRNA DN3OS 在喉鳞状细胞癌组织和细胞中的表达及其临床和生物学意义 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(12): 1160-1167. doi:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.002
WANG Jingtian, ZHAO Yan, LIU Shenghui, et al. Expression of lncRNA DN3OS in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and cells and its clinical and biological significance [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2021, 28(12): 1160-1167. doi:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.002
- [32] 徐翀, 王晓亭, 易红良. 单细胞测序分析喉癌及其微环境代谢相关靶基因 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2023, 37(2): 33-38. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.542
XU Chong, WANG Xiaoting, YI Hongliang. Single-cell sequencing analysis of laryngeal cancer and its microenvironmental metabolism-related target genes [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2023, 37(2): 33-38. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.542