

·论著·

胰岛素样生长因子2结合蛋白2预测口腔癌预后的生信分析研究

王祥柱¹ 马玥麟¹ 谢晓莉¹ 蒋海叶²

¹中南大学湘雅口腔医院,中南大学湘雅口腔医学院,口腔健康研究湖南省重点实验室,长沙 410008; ²湖南师范大学医学部,长沙 410013

通信作者:蒋海叶;Email:jianghaiye@hotmail.com

【摘要】目的 探讨N⁶-甲基腺苷(*m⁶A*)的重要效应因子胰岛素样生长因子2结合蛋白2(IGF2BP2)在口腔癌发生和进展过程中的作用。**方法** 从癌症基因组图谱(TCGA)和高通量基因表达(GEO)数据库中筛选并获取2012—2024年口腔癌相关的转录组数据和临床信息,利用R包对数据分别进行基因组富集分析(GSEA)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析、基因本体(GO)分析、相关性分析和Cox回归分析等。从中南大学湘雅口腔医院获取口腔癌组织病理切片,通过免疫组化和免疫荧光分析验证了IGF2BP2的表达水平,基于 t 检验对结果进行统计分析。**结果** *m⁶A*相关分子IGF2BP2表达越高,口腔癌患者总生存率越低($P < 0.05$)。IGF2BP2是口腔癌中上调最明显的*m⁶A*相关蛋白($P < 0.001$),ROC曲线显示IGF2BP2预测口腔癌的系数为0.839。免疫组化和免疫荧光分析表明,IGF2BP2在口腔癌中的表达明显高于正常口腔组织($P < 0.05$)。IGF2BP2高表达与口腔癌更高的分级($P < 0.05$)、分期($P < 0.05$)和肿瘤原发部位($P < 0.05$)呈正相关。单因素($P < 0.05$)和多因素($P = 0.074$)回归分析表明,IGF2BP2对口腔癌具有独立预后价值。GSEA、KEGG、GO和相关性分析表明,上调的IGF2BP2通过改变M0巨噬细胞和调节性T细胞的分布影响机体免疫,与免疫检查点基因相互作用,影响免疫治疗的效果。**结论** IGF2BP2上调与口腔癌更高的肿瘤分期和更差的预后正相关,IGF2BP2对口腔癌的发生、发展具有重要影响。

【关键词】 口腔癌; N⁶-甲基腺苷; 胰岛素样生长因子2结合蛋白2; 预后; 免疫治疗

基金项目:国家自然科学基金(8197071624);湖南省自然科学基金(2021JJ40906)

引用著录格式:王祥柱,马玥麟,谢晓莉,等.胰岛素样生长因子2结合蛋白2预测口腔癌预后的生信分析研究[J/OL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2025,19(2):84-95.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2025.02.002

Bioinformatics analysis of insulin-like growth factor 2-binding protein 2 in predicting prognosis of oral cancer

Wang Xiangzhu¹, Ma Yuelin¹, Xie Xiaoli¹, Jiang Haiye²

¹Xiangya Stomatological Hospital and Xiangya School of Stomatology, Central South University & Hunan Key Laboratory of Oral Health Research, Changsha 410008, China; ²Hunan Normal University Health Science Center, Changsha 410013, China

Corresponding author:Jiang Haiye, Email:jianghaiye@hotmail.com

【Abstract】Objective To investigate the role of insulin-like growth factor 2-binding protein 2 (IGF2BP2), an important effector of N⁶-methyladenosine (*m⁶A*), in the development and progression of oral cancer. **Methods** The transcriptome data and clinical information related to oral cancer were selected from the cancer genome atlas (TCGA) and gene expression omnibus (GEO) databases from 2012-2024. Genome enrichment analysis (GSEA), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis, gene ontology (GO) analysis, correlation analysis, and Cox regression analysis were performed on the data using the R package. Pathological sections of oral cancer were obtained from Xiangya Stomatology Hospital, Central South University. The expression level of IGF2BP2 was verified by immunohistochemistry and immunofluorescence analysis, and the results were statistically analyzed based on t test. **Results** The

dysregulation of m^6A -related protein played an important role in the development of tumors. It was found that the higher the expression of the m^6A -related molecule IGF2BP2, the lower the overall survival rate of patients with oral cancer ($P < 0.05$). IGF2BP2 was the most upregulated m^6A -related protein in oral cancer ($P < 0.001$), and the ROC curve showed that the coefficient of IGF2BP2 in predicting oral cancer was 0.839. Immunohistochemical and immunofluorescence analysis showed that the expression of IGF2BP2 in oral cancer was significantly higher than that in the normal oral tissues ($P < 0.05$). High expression of IGF2BP2 was positively correlated with high grade ($P < 0.05$), stage ($P < 0.05$), and primary site ($P < 0.05$) of oral cancer. Univariate ($P < 0.05$) and multivariate ($P = 0.074$) regression analysis showed that IGF2BP2 had independent prognostic value in oral cancer. GSEA, KEGG, GO, and correlation analysis further demonstrated that upregulated IGF2BP2 affected immunity by altering the distribution of macrophage M0 and regulatory T cells (Tregs) and interacting with immune checkpoint genes, thereby affecting the efficacy of immunotherapy. **Conclusions** Upregulated IGF2BP2 was positively correlated with higher tumor stage and poorer prognosis of oral cancer. IGF2BP2 played an important role in the occurrence and development of oral cancer.

【Key words】 Oral cancers; N^6 -methyladenosine; Insulin-like growth factor 2 binding protein 2; Prognosis; Immunotherapy

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (8197071624); Natural Science Foundation of Hunan Province (2021JJ40906)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2025.02.002

口腔癌(oral cancer, OC)是头颈部肿瘤(head and neck cancer, HNC)中最常见的癌症之一。口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是OC的主要类型,占OC病例90%以上^[1]。2022年,全球新增OC病例389 485例,新增OC导致的死亡病例188 230例^[2]。OC晚期患者通常预后较差,5年生存率仅为50%,改善OC患者的预后迫在眉睫^[3]。免疫疗法已经改变了癌症治疗的格局,并成为包括黑色素瘤、肺癌和结直肠癌(colorectal cancer, CRC)等癌症治疗的标准疗法^[4-5]。准确预测OC患者的预后对治疗意义重大,但是目前缺乏OC免疫疗法有效的靶点,也难以有效预测OC患者的预后^[6]。因此,亟须开发针对OC有效治疗靶点和判断预后的策略,以提高治疗效果,改善OC患者的预后。

研究发现,表观遗传学是人类疾病发展的关键因素,特别是在肿瘤发生和进展方面^[7]。 N^6 -甲基腺苷(N^6 -methyladenosine, m^6A)修饰是真核生物RNA中最常见的转录后修饰,涉及腺嘌呤第6个氮的可逆甲基化修饰^[8]。胰岛素样生长因子2结合蛋白2(insulin - like growth factor 2 - binding protein 2, IGF2BP2)是一种RNA结合蛋白(RNA binding proteins, RBP),被归类为 m^6A 结合蛋白,其主要功能是识别和调控经 m^6A 修饰的目标mRNA。 m^6A 甲基化的调控主要依赖3种功能酶: m^6A 甲基转移酶(writer)、去甲基化酶(eraser)和 m^6A 结合蛋白(reader)^[9]。通过影响RNA的转录、剪接、转运、转化和降解, m^6A 在

包括肿瘤发生在内的各种病理过程中发挥着重要作用^[10]。2021年,有研究强调了 m^6A 甲基化在多种癌症类型尤其是HNC中的重要作用^[11], m^6A 甲基化与OC的进展和预后密切相关^[12]。

IGF2BP2的失调与多种癌症的发生有关^[13-15],其表达增加会促进癌细胞的增殖和发展^[16]。此外,IGF2BP2失调与HNC的癌变和淋巴转移等预后不良相关^[17]。同时,IGF2BP2对胰腺癌和卵巢癌的免疫治疗具有调控作用^[18-20]。然而,IGF2BP2对OC患者预后及免疫治疗的确切作用尚不明确。

本研究基于OC相关的公共数据集采用总体生存分析、差异分析和相关性分析等生信分析方法,分析IGF2BP2的表达水平对OC的预后及免疫治疗的作用关系,研究IGF2BP2作为OC患者的预后预测、评估肿瘤分期和免疫治疗靶点的潜力。

材料与方法

一、数据选择

本研究从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)和基因表达总库(gene expression omnibus, GEO)数据库中筛选并下载了2012—2024年与OC相关的转录组序列和临床信息(表1)。从TCGA数据库中选择属于口腔特定区域的样本,如口腔、舌、颊黏膜、唇、牙槽嵴、硬腭和口底^[21]。其中包括320个OC组织样本和49个正常口腔组织样本。从GEO数据库下载了GSE34105和GSE37991

两个数据集,其中包括102个OC组织样本和56个正常组织样本。临床OC组织和癌旁组织来自中南大学湘雅口腔医院病理科。

表1 本研究数据库筛选样本的临床信息汇总表

临床特征	口腔癌组 (n=320)	正常对照组 (n=49)	检验值	P值
平均年龄(IQR)	62(53,71)	61(54,67)	$t=0.53$	0.60 ^a
性别[例(%)]			$\chi^2=0.21$	0.65 ^b
女性	107(33.43)	18(36.73)		
男性	213(66.57)	31(63.27)		
原发肿瘤灶[例(%)]			$F=11.01$	0.09 ^b
口腔	73(22.81)	16(32.65)		
舌头	133(41.56)	26(53.06)		
颊黏膜	23(7.19)	0		
唇	3(0.94)	0		
牙槽嵴	18(5.63)	0		
硬腭	7(2.19)	1(2.04)		
口底	63(19.69)	6(12.24)		
饮酒[例(%)]			$\chi^2=0.46$	0.50 ^b
是	206(63.70)	29(59.18)		
否	114(36.30)	20(40.82)		
肿瘤分级[例(%)]			-	-
T1	19(5.94)	-		
T2	101(31.56)	-		
T3	79(24.69)	-		
T4	113(35.31)	-		
TX	8(2.50)	-		
淋巴结状态[例(%)]			-	-
N0	166(51.88)	-		
N1~N3	142(44.37)	-		
NX	12(3.75)	-		
肿瘤分期[例(%)]			-	-
I	12(3.75)	-		
II	77(24.06)	-		
III	66(20.63)	-		
IV	157(49.06)	-		
X	8(2.50)	-		

注:X为无法评估或确定;^at检验;^b皮尔逊卡方检验/Fisher确切分析;IQR为四分位数间距;“-”为无数据(肿瘤分级、淋巴结状态和肿瘤分期由于正常对照者无数据,因此没有对应的检验值和P值)。

二、数据分析

本研究使用R软件包和基因表达谱分析交互式分析(GEPIA)网络工具(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)对数据进行生物信息学分析^[22],包括泛癌分析、差异表达分析。对两组样品间表达量的比值取以2为底的对数为log2倍改变(|log2foldchange|, |Log2FC|);Bonferroni校正是将实际显著性水平除以比较次数得到校正后的显著性水平,即校正P值(adjP)。本

研究对生信分析结果设定差异显著性的阈值为|Log2FC|>1和adjP<0.05。

三、免疫荧光分析

脱蜡至水化,将组织切片置于乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)抗原修复缓冲液中进行抗原修复,然后在3%过氧化氢(H₂O₂)溶液中室温避光孵育15 min,滴加BSA室温封闭30 min;画圈,在圈内滴加1:50稀释的IGF2BP2—抗[艾比玛特生物医药科技(上海)有限公司]4 °C孵育过夜;随后滴加羊抗兔来源的红色荧光二抗[艾比玛特生物医药科技(上海)有限公司]室温孵育60 min,再滴加620-TSA(MCE,美国)室温避光孵育10 min;然后滴加DAPI染液,室温避光孵育10 min;最后加入自发荧光淬灭剂孵育5 min,自来水冲洗10 min,滴加抗荧光淬灭封片剂封片;切片于荧光显微镜下观察并采集图像,结果使用Image J软件对每个组织的平均荧光强度进行分析,计算公式如下

$$\text{平均荧光强度 (Mean)} = \frac{\text{该区域荧光强度总和 (IntDen)}}{\text{该区域面积 (Area)}}。$$

四、临床样本收集

本研究通过了湖南中南大学湘雅口腔医院伦理委员会的批准(批准号:2024060605)。共招募了3例2023年于中南大学湘雅口腔医院接受手术治疗的OC患者,术前获得所有患者的知情同意。本研究获取的所有样本为OC患者术中切除的OC组织和癌旁组织,切除后立即置于4 °C保存,并于30 min内分装保存于4%多聚甲醛溶液(安徽白鲨生物科技有限公司)中,以备后续实验。

1. 纳入标准:(1)年龄18~60岁;(2)经手术及病理组织诊断确诊的初发OC癌患者;(3)未合并其他肿瘤或全身疾病;(4)病理、病史资料完整。

2. 排除标准:(1)早期抗癌治疗失败;(2)怀孕或哺乳期的女性;(3)临床实验室检查(如肝肾功能、血气分析)严重异常;(4)患有严重心理健康问题。

五、免疫组化染色

将组织切片脱蜡至水化,使用3% H₂O₂进行室温孵育5 min,然后在EDTA缓冲液(1 mmol/L, pH 8.0)中孵育,用高温微波法提取抗原。使用5%山羊血清(PBS稀释)封闭,室温孵育10 min。倾去血清,勿洗,切片滴加适当比例稀释的相对应的一抗在4 °C下孵育过夜。滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素(PBS稀释),37 °C孵育30 min;随后,使用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色液检测目标蛋白。

六、统计学处理方法

使用SPSS 25.0和Prism软件(GraphPad Software)进行统计学分析。在OC组和正常对照组的临床特征分析比较中,采用t检验和皮尔逊卡方检验进行分析;在针对IGF2BP2在OC组和对照组中表达量的差异表达比较中,数据采用配对t检验进行分析,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、泛癌和头颈部肿瘤中N⁶-甲基腺苷甲基化相关基因的表达谱

为了研究 m^6A 甲基化相关基因在癌症中是否以不受控制的方式表达,本研究分析了12个常见的

m^6A 甲基化调控因子(包括METTL3、METTL14、WTAP、ALKBH5、FTO、HNRNPA2B1、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、IGF2BP1、IGF2BP2和IGF2BP3)在泛癌中的差异表达。结果显示,多种恶性肿瘤中 m^6A 甲基化相关基因表达失调(图1)。除了研究 m^6A 甲基化相关基因在HNC中的表达谱,本研究还利用箱形图比较了12个 m^6A 甲基化相关基因在519例HNC组织和44例正常组织样本中的表达。结果显示,IGF2BP2($P < 0.05$)和IGF2BP3($P < 0.05$)在HNC中显著过表达(图2B)。

二、胰岛素样生长因子2结合蛋白2升高会导致口腔癌患者更差的预后和更高肿瘤分期

为了研究IGF2BP2和IGF2BP3对OC患者生存

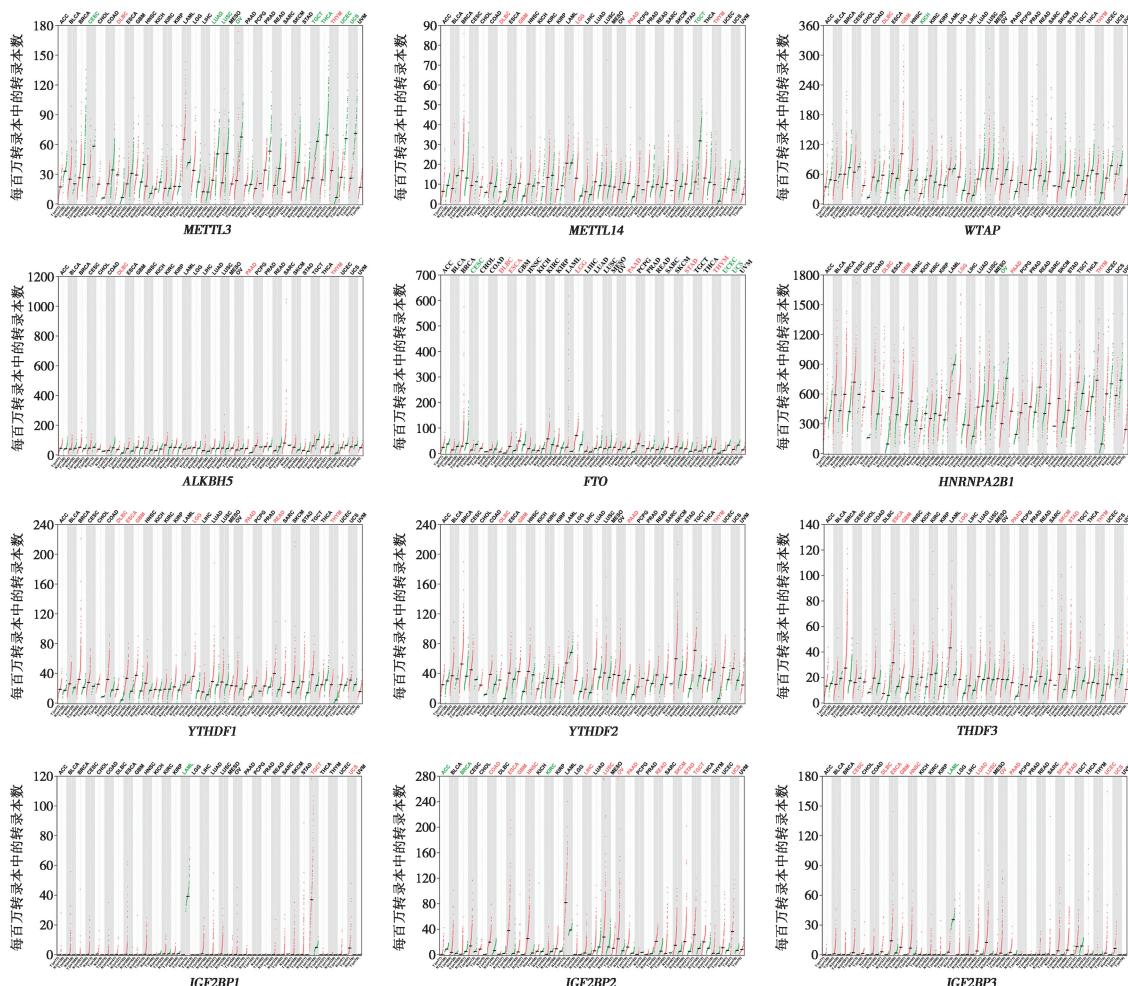


图1 泛癌中N6-甲基腺苷(m^6A)甲基化相关基因的表达谱 通过GEPIA网站,分别显示了33种不同肿瘤类型中12种 m^6A 甲基化调控因子的表达水平。图中每个点代表一个不同的样本,红色的点代表肿瘤样本,绿色的点代表正常样本。癌症名称的颜色表示所分析的基因在该癌症类型中是上调(红色)和(或)下调(绿色)。这些癌症包括急性髓性白血病(LAML)、肾上腺皮质癌(ACC)、胆管癌(CHOL)、膀胱癌(BLCA)、乳腺癌(BRCA)、宫颈癌(CESC)、结肠癌(COAD)、子宫内膜癌(UCEC)、食管癌(ESCA)、胶质母细胞瘤(GBM)、头颈癌(HNC)、肾色素细胞癌(KICH)、肾透明细胞癌(KIRC)、肾乳头状细胞癌(KIRP)、大B细胞淋巴瘤(DLBC)、肝癌(LIHC)、低级别胶质瘤(LGG)、肺腺癌(LUAD)、肺鳞癌(LUSC)、黑色素瘤(SKCM)、间皮瘤(MESO)、眼黑色素瘤(UVM)、卵巢癌(OV)、胰腺癌(PAAD)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(PCPG)、前列腺癌(PRAD)、直肠癌(READ)、肉瘤(SARC)、胃癌(STAD)、睾丸癌(TGCT)、胸腺癌(THYM)、甲状腺癌(THCA)和子宫肉瘤(UCS)。

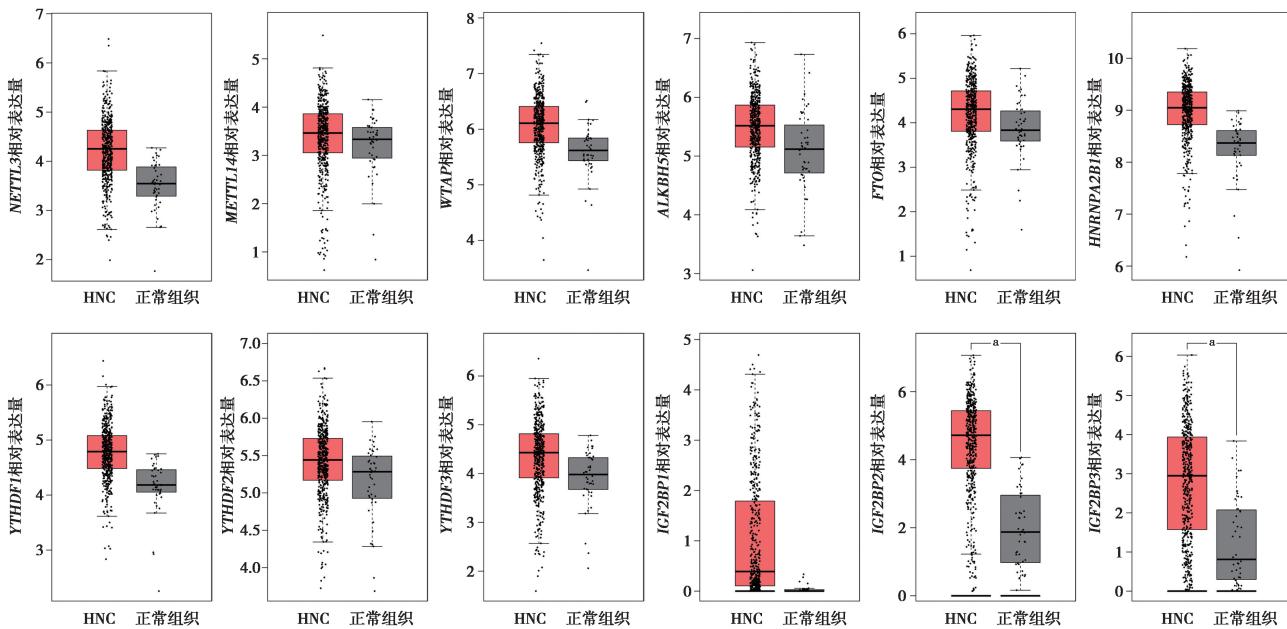


图2 519例头颈部肿瘤(HNC)组织和44例正常组织中12个N⁶-甲基腺苷(*m⁶A*)甲基化相关基因的相对表达水平 **P* < 0.05。

期的影响进行了总生存期分析,发现*IGF2BP2*表达水平较高的OC患者生存期显著缩短(*P* < 0.05,图3A),而*IGF2BP3*与OC患者的预后无明显相关性(*P* > 0.05,图3B)。基于*IGF2BP2*表达量预测OC患者生存率的受试者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)显示曲线下面积(area under the curve, AUC) > 0.6(图3C)。为了研究*IGF2BP2*在OC中的表达量,将TCGA数据库下载的OC RNA测序数据进行差异分析,结果显示与正常样本相比,OC样本中*IGF2BP2*的表达显著升高(*P* < 0.001,图3D)。基于GEO数据集,本研究发现与正常样本相比,OC样本中的*IGF2BP2*显著升高(*P* < 0.001,图3E)。利用ROC分析发现,*IGF2BP2*可以准确地预测OC发病(AUC = 0.839,图3F)。基于THPA(<https://www.proteinatlas.org>)蛋白质组学数据,本研究发现与正常口腔黏膜组织相比,*IGF2BP2*在人类OC组织中表达明显上调(图3G,3I)。此外,3对OC组织和癌旁组织的*IGF2BP2*蛋白水平免疫荧光染色结果表明,*IGF2BP2*在OC组织中显著过表达(*P* < 0.05,图3H)。

本研究对OC患者的*IGF2BP2*表达量与年龄、性别、肿瘤分级、肿瘤分期、原发肿瘤灶(T)和淋巴结转移(N)等临床特征进行了相关性分析。结果显示,*IGF2BP2*的表达与年龄和性别不相关,而与肿瘤分级(*P* < 0.05)、肿瘤分期(*P* < 0.05)和原发肿瘤灶(*P* < 0.05)相关(图4)。

三、胰岛素样生长因子2结合蛋白2可作为口腔癌患者的独立预后因素

同时,本研究绘制了列线图(图5A)和校准曲线图(图5B),以评估*IGF2BP2*表达量及临床特征对OC患者预后的预测价值。根据已知的*IGF2BP2*表达量和OC患者的临床特征,本研究可以利用列线图和校准曲线图预测OC患者在不同时间的总生存率(overall survival rate, OS)。为了研究*IGF2BP2*表达量和临床特征的独立预后价值,本研究对它们分别进行了单因素和多因素Cox回归分析,结果发现,在单因素(*P* < 0.05, OR = 1.213,图5C)和多因素Cox回归分析(*P* < 0.05, OR = 1.171,图5D)中,*IGF2BP2*表达的上调与OC患者不良预后显著正相关。这些结果表明,*IGF2BP2*可作为OC患者的一个独立预后因素。

四、胰岛素样生长因子2结合蛋白2的共表达基因在口腔癌中显著上调

本研究对*IGF2BP2*在OC中的共表达基因进行全面分析,发现*HMGA2*、*PHLDB2*和*CORO1C*3个基因与*IGF2BP2*的相关系数(*r*) > 0.6,并且均与*IGF2BP2*共表达(图6A)。通过差异表达分析和配对差异表达分析,本研究发现*HMGA2*、*PHLDB2*和*CORO1C*在OC组织中的表达明显高于正常组织(图6B~6D)。根据THPA蛋白组数据发现,*HMGA2*、*PHLDB2*和*CORO1C*在人OC组织中的表达明显高于正常口腔黏膜组织(图6E~6G)。

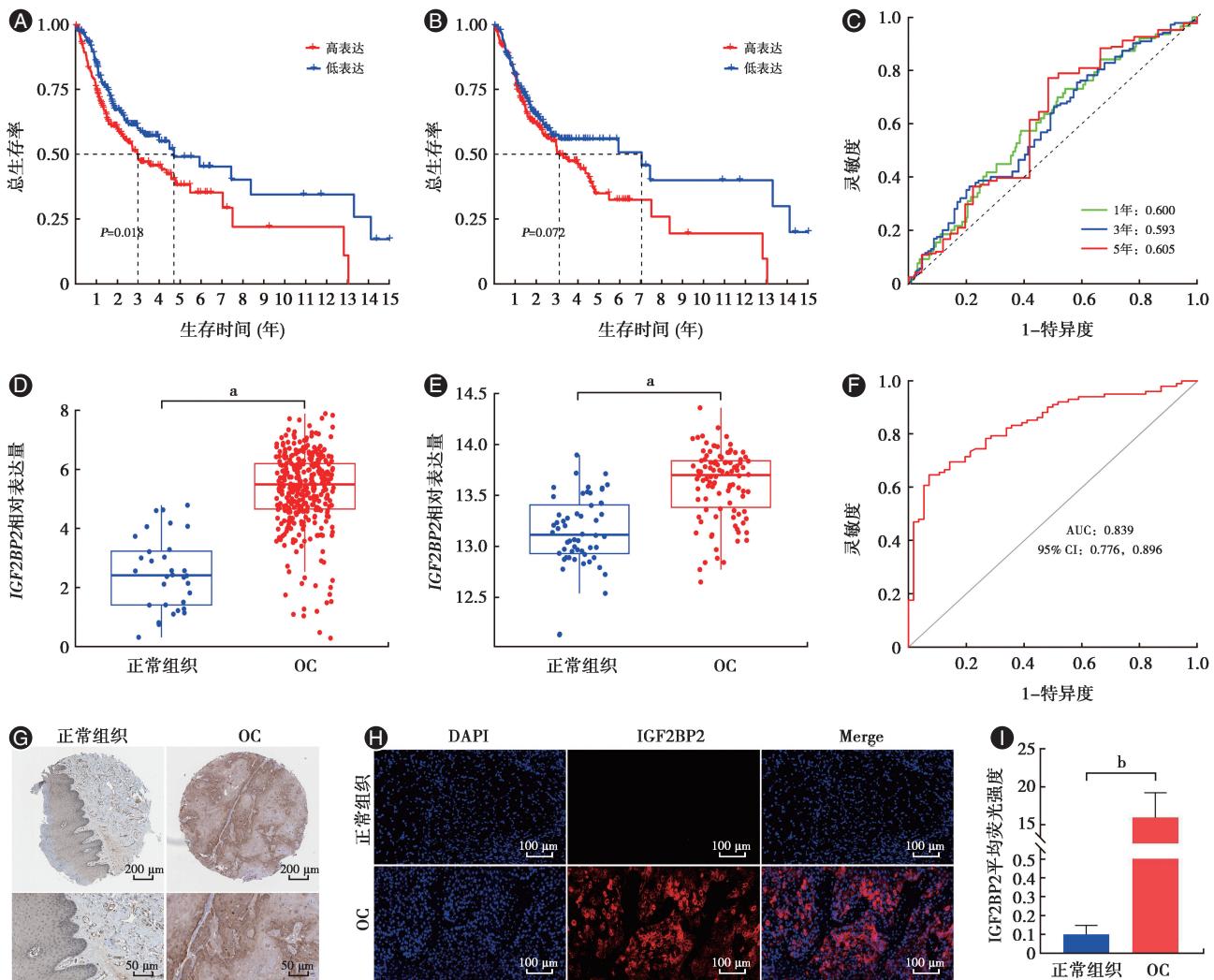


图3 胰岛素样生长因子2结合蛋白2(IGF2BP2)上调与口腔癌(OC)的不良预后相关 A、B: 分别为IGF2BP2、IGF2BP3高和低表达水平患者总生存期的Kaplan-Meier曲线;C: IGF2BP2对OC患者1、3和5年生存时间的预测价值的ROC曲线;D: 基于TCGA的IGF2BP2在OC样本中与正常组织样本差异表达的箱线图;E: 基于GEO数据集的IGF2BP2在OC样本中与正常组织样本差异表达的箱线图;F: 基于GEO数据集的IGF2BP2在OC样本中的ROC曲线;G: 与正常组织样本相比,OC样本中IGF2BP2的免疫组化分析,上图:整体扫描图,下图:局部放大图;H: 与正常组织样本相比,OC样本中IGF2BP2的免疫荧光分析;I: 与正常组织样本相比,OC样本中IGF2BP2的免疫荧光强度比较;^a $P < 0.001$,^b $P < 0.05$ 。

五、胰岛素样生长因子2结合蛋白2表达上调通过影响机体免疫促进口腔癌的发生

本研究根据IGF2BP2在所有OC样本里表达量的中位值作为截断值,将OC样本分为IGF2BP2高表达组和低表达组;通过比较IGF2BP2高表达组和低表达组获得了差异表达基因(differentially expressed gene, DEG),并以热图的形式呈现(图7A)。本研究对获得的DEG进行GO富集分析,发现在OC中与IGF2BP2相关的DEG的功能主要与免疫反应相关(图7B~7D)。利用KEGG富集分析揭示OC中与IGF2BP2相关的DEG的通路,发现其主要参与免疫相关的通路,如细胞因子-细胞因子受体相互作用、

原发性免疫缺陷和PI3K-Akt信号通路(图7E~7F)。

本研究进一步采用根据基因分布实际总体趋势进行的基因组富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)方法依次分析DEG功能,发现主要与机体的免疫功能有关,包括免疫应答、B细胞介导的免疫功能以及有丝分裂和核分裂(图7G);同时发现DEG通路与TGF-β信号通路和细胞周期有关(图7H)。

本研究对IGF2BP2表达量与肿瘤突变负荷(tumor mutation load, TMB)的相关性进行分析,结果显示IGF2BP2相对表达量与TMB正相关($P < 0.05$, $r = 0.14$,图8A)。本研究在IGF2BP2高表达组和低表达组之间进行了肿瘤微环境(tumor microenvironment,

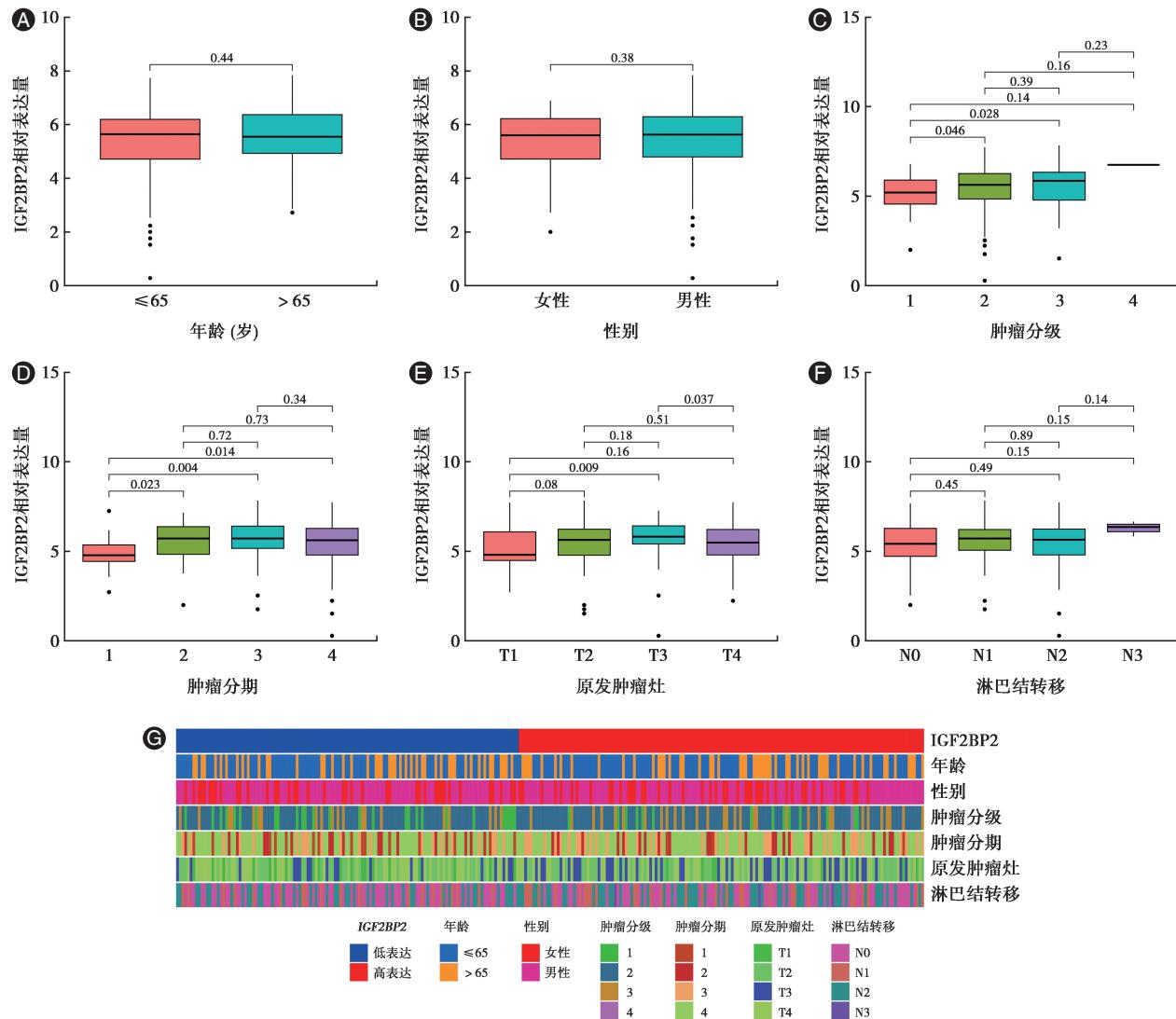


图4 胰岛素样生长因子2结合蛋白2(IGF2BP2)与口腔癌(OC)临床特征的相关性 A~F: 分别为IGF2BP2与OC患者年龄、性别、肿瘤分级、肿瘤分期、原发肿瘤灶(T)和淋巴结转移(N)的相关性分析; G: IGF2BP2高低表达组与临床特征的相关性热图。

TME)评分的差异分析,结果显示IGF2BP2的表达主要受免疫相关的Immune评分($P < 0.001$),以及免疫与肿瘤微环境联合相关的ESTIMATE评分($P < 0.001$)的影响(图8B)。本研究绘制了IGF2BP2高低表达组之间不同种类免疫细胞分布差异的箱线图,结果提示IGF2BP2的表达可能会影响不同种类免疫细胞的比例(图8C)。同时,对IGF2BP2的表达量与各种免疫细胞的相关性进行分析,发现IGF2BP2与CD4记忆静息T细胞($P < 0.05, r = 0.17$)、M0型巨噬细胞($P < 0.001, r = 0.25$)和静息NK细胞($P < 0.05, r = 0.15$)呈正相关(图8D~8H);而IGF2BP2与幼稚型B细胞($P < 0.05, r = -0.19$)、滤泡辅助型T细胞($P < 0.05, r = -0.22$)、调节型T细胞(Tregs)($P <$

$0.001, r = -0.33$)、浆细胞($P < 0.05, r = -0.15$)、CD8T细胞($P < 0.05, r = -0.21$)、静息树突状细胞($P < 0.05, r = -0.21$)和静息肥大细胞($P < 0.05, r = -0.2$)呈负相关(图8D~8M)。同时,利用棒棒糖图展示IGF2BP2的表达与不同免疫细胞之间的相关性(图8N)。为了检验免疫检查点基因在肿瘤免疫治疗中的重要作用,本研究分析了IGF2BP2与免疫检查点基因之间的关系,相关性结果见表2,相关性热图见图8O~8P;结果表明IGF2BP2与多种免疫检查点基因显著正相关,包括CD44($P < 0.001, r = 0.52$)和CD276($P < 0.001, r = 0.35$);并与多种免疫检查点基因呈负相关,如CD40LG($P < 0.001, r = -0.34$)和IDO2($P < 0.001, r = -0.32$)。

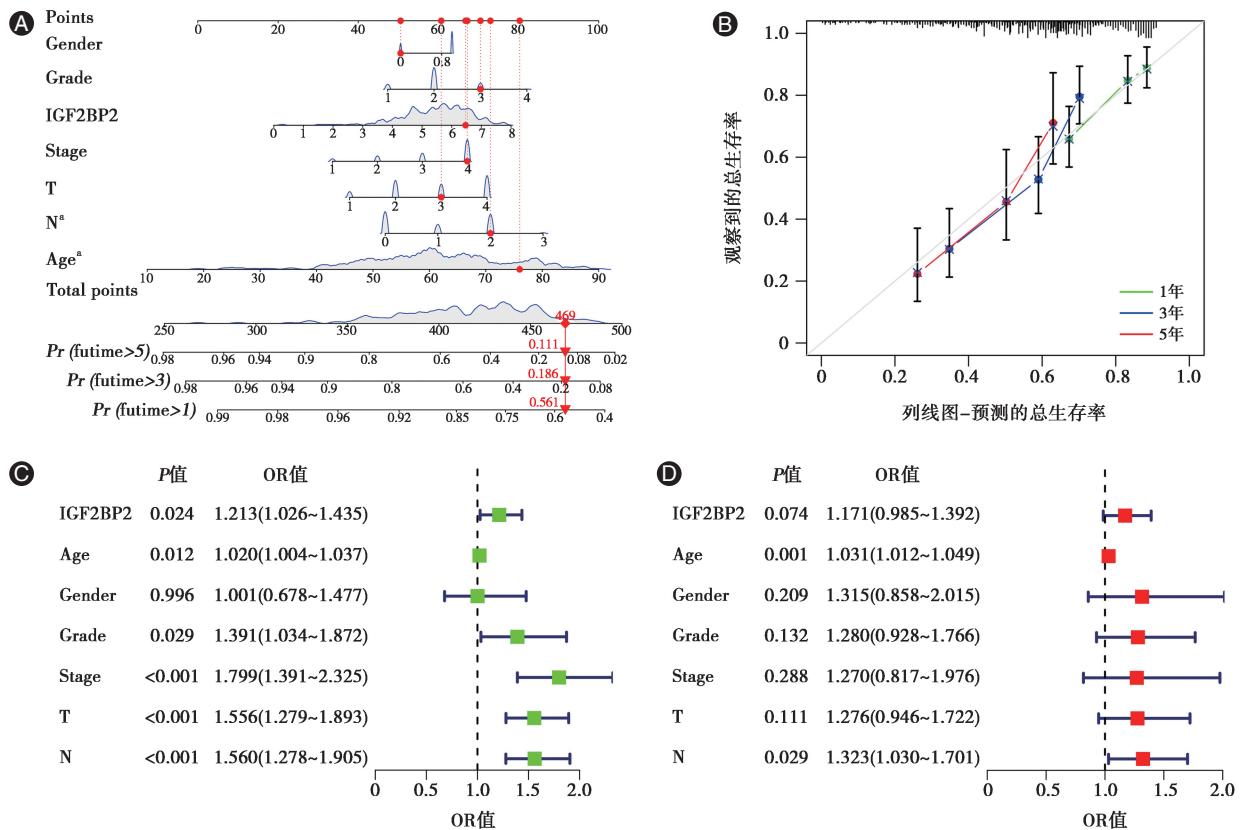


图5 胰岛素样生长因子2结合蛋白2(IGF2BP2)对口腔癌(OC)患者的预后预测潜力 A:基于临床特征和IGF2BP2预测患者不同时期生存率的列线图;B:基于列线图预测的不同时间点总生存率(OS)和观察到的OS校准曲线图;C:单变量因素的独立预后分析;D:多变量因素的独立预后分析;^a $P < 0.05$ 。

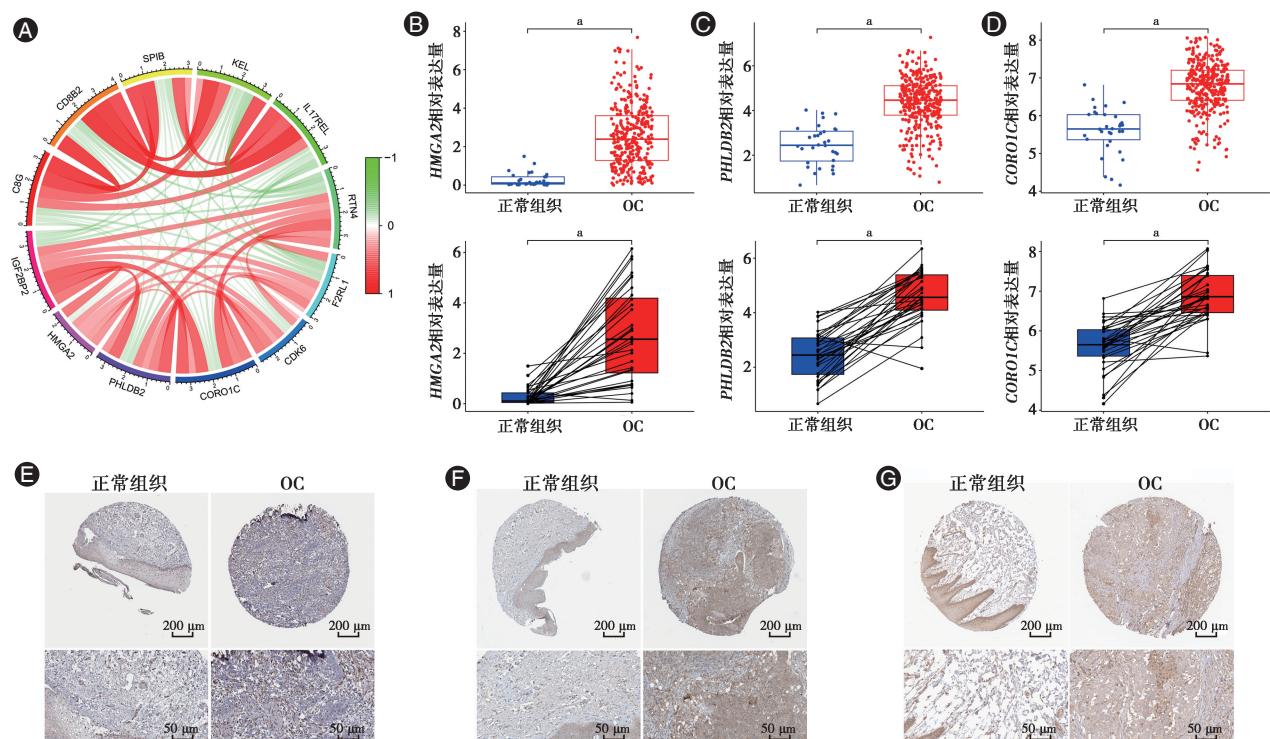


图6 胰岛素样生长因子2结合蛋白2(*IGF2BP2*)相关基因在口腔癌(OC)中的共表达分析 A:*IGF2BP2*在OC中的共表达圆图;B~D:分别为基于TCGA的*HMGA2*、*PHLDB2*和*CORO1C*在OC中与正常组织样本相比的差异表达箱线图,相对应的下方箱式图表示基于TCGA的(B) *HMGA2*、(C) *PHLDB2*和(D) *CORO1C*在OC中与相邻正常组织样本相比的成对差异表达箱线图,* $P < 0.05$;E~G分别是与正常组织相比,(E) *HMGA2*、(F) *PHLDB2*和(G) *CORO1C*在OC中的表达分析.上图:免疫组化整体扫描图.下图:局部放大图.

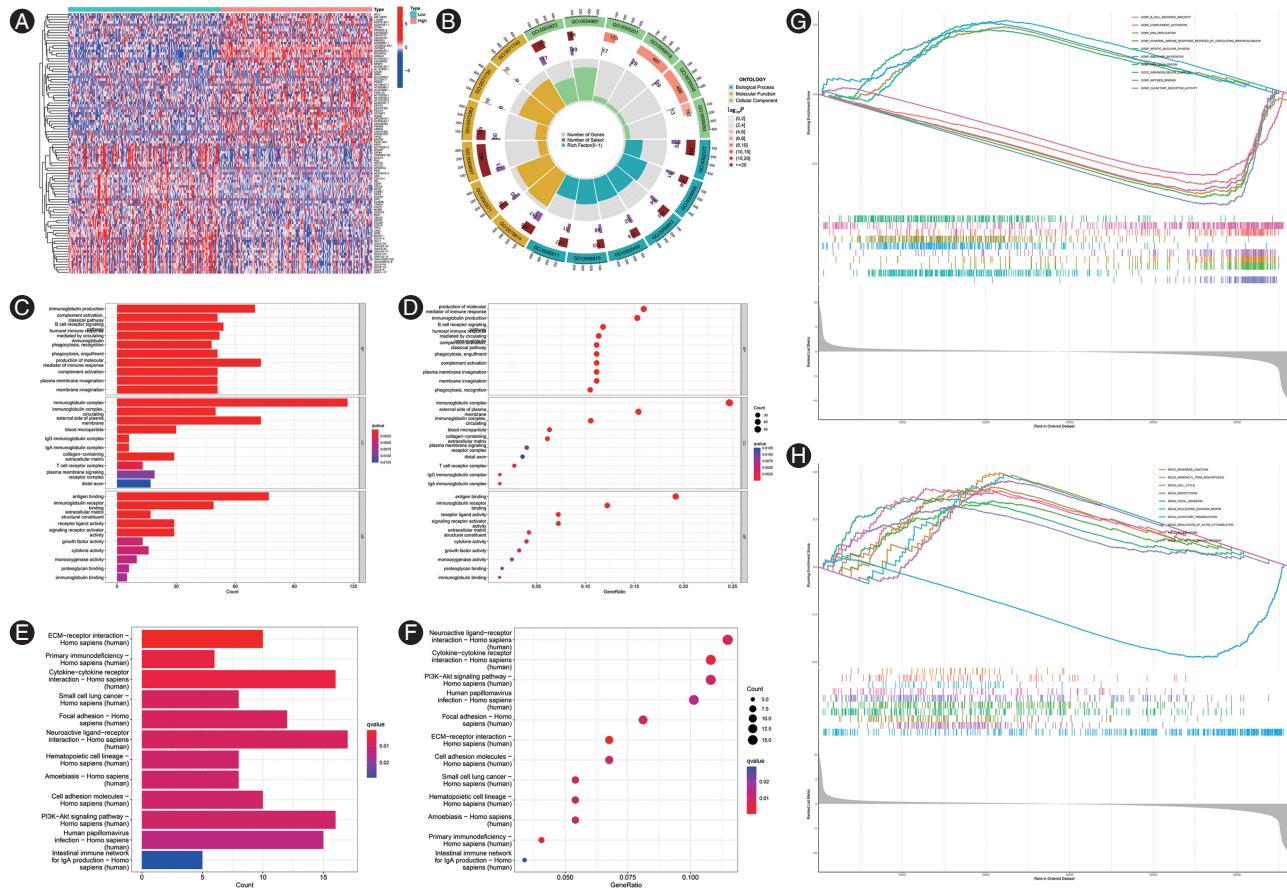


图7 口腔癌(OC)中胰岛素样生长因子2结合蛋白2(*IGF2BP2*)相关基因的GO、KEGG和基因组富集分析(GSEA) A:*IGF2BP2*高表达组和低表达组的差异表达基因(DEG)热图;B~D:分别为基于*IGF2BP2*高表达组和低表达组的DEG的GO分析圆图、柱状图和气泡图;E~F:基于*IGF2BP2*高表达组和低表达组DEG的KEGG分析柱状图和气泡图;G:*IGF2BP2*高和低表达组DEG功能的GSEA富集分析;H:*IGF2BP2*高和低表达组DEG不同通路的GSEA富集分析。

讨 论

一、胰岛素样生长因子2结合蛋白2可用于预测口腔癌的预后

基于本研究生信分析结果, *m⁶A*相关因子*IGF2BP2*与OC关系密切。首先, *m⁶A*修饰失调对OC发病具有重要影响。*m⁶A*修饰是哺乳动物中最常见的RNA修饰,在机体多种生物过程中起关键作用^[23]。*m⁶A*修饰功能失调对肿瘤的发生、发展和预后均有深远影响^[24]。有研究表明, *m⁶A*相关基因失调可促进HNC^[25]、胰腺癌^[26]和CRC^[27]生长和转移。OC是HNC中最常见的肿瘤之一,由于缺乏特异性临床症状而难以被早期诊断^[28],晚期OC远处转移和复发风险较高,5年总生存率仅约50%^[29]。据报道, *m⁶A*修饰参与了OC的发生、发展过程^[12]。本研究进一步发现*m⁶A*相关基因*IGF2BP2*的上调与OC的不良预后相关,*IGF2BP2*可作为预测OC预后的生物标志物。

二、胰岛素样生长因子2结合蛋白2可作为口腔癌的生物标志物

*IGF2BP2*是一种保守的原胚胎蛋白,可与RNA结合参与细胞增殖、分化、迁移和更新,在肿瘤发生、发展中具有关键作用^[30]。研究发现,胰腺癌中过表达的*IGF2BP2*与更高的病理分期和组织学分级正相关^[31]。*IGF2BP2*的高表达与CRC不良预后有关^[32]。此外,*IGF2BP2*与HNC的进展和淋巴转移也有关联,其高表达与HNC预后不良有关^[17, 20]。本研究发现,*IGF2BP2*对OC的诊断、分期和预后具有良好的预测价值。*IGF2BP2*的共表达基因在OC中均上调,包括*HMGA2*、*PHLDB2*和*CORO1C*。作为OC的传统诊断方法,病理检查具有耗时耗钱,并对检查人员的专业要求高等不足。*IGF2BP2*可联合其共表达基因(*HMGA2*、*PHLDB2*和*CORO1C*)作为生物标志物,用于初步鉴别OC,具有快速、简便的优点,适合人群筛查。作为生物标志物的优点包括:无需专业病理诊

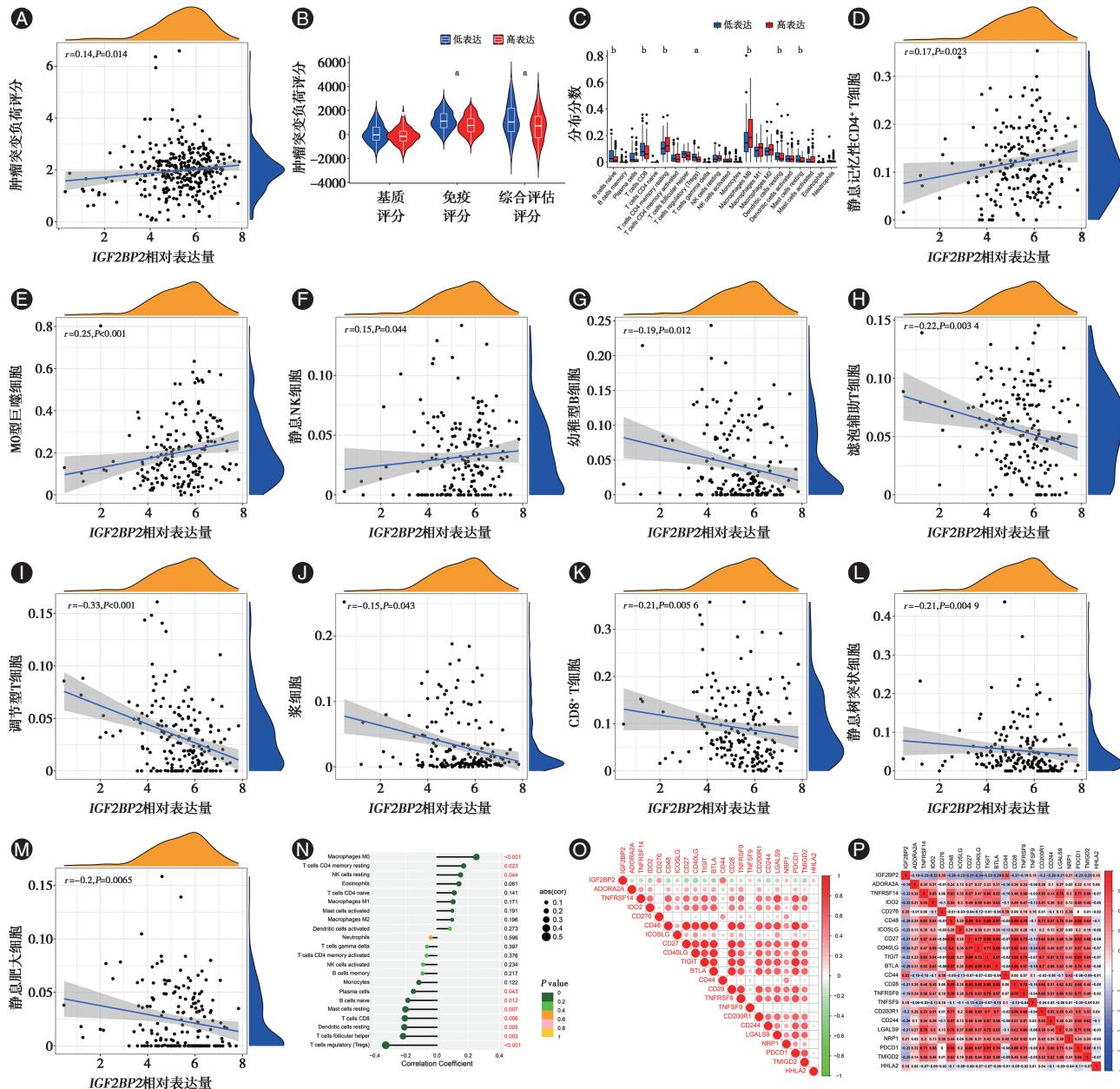


图8 胰岛素样生长因子2结合蛋白2(*IGF2BP2*)与免疫细胞和免疫检查点基因之间的相关性分析 A:口腔癌(OC)中肿瘤突变负荷与*IGF2BP2*表达的相关性分析;B:OC中*IGF2BP2*高表达组和低表达组的肿瘤微环境评分分析;C:OC中*IGF2BP2*高表达组和低表达组不同种类免疫细胞的差异分析箱线图;D~H:*IGF2BP2*分别与静息记忆性CD4⁺ T细胞、M0型巨噬细胞、静息NK细胞、初始B细胞和滤泡辅助型T细胞(Tfh)的相关性分析;I~M:*IGF2BP2*分别与调节型T细胞(Tregs)、浆细胞、CD8⁺ T细胞、静息树突状细胞和静息肥大细胞的相关性分析;N:*IGF2BP2*与不同免疫细胞之间的棒棒糖图;O:*IGF2BP2*与免疫检查点基因的相关性点图;P:*IGF2BP2*与免疫检查点基因的相关性分析热图;^a $P < 0.001$,^b $P < 0.05$ 。

断过程,通过测试 *IGF2BP2* 的水平判断肿瘤分期,还可方便计算 OC 患者在不同时间点的生存率。更早、更快地判断 OC 患者的肿瘤分期和预测预后,有助于临床医生为 OC 患者制定更科学的治疗方案。

三、胰岛素样生长因子2结合蛋白2有望成为口腔癌免疫治疗靶点

此外, *IGF2BP2* 有望成为 OC 患者免疫治疗的新

靶点。研究发现, *m⁶A* 相关基因可调节与肿瘤免疫原性和抗肿瘤反应相关的免疫细胞活动^[33]。失调的 *m⁶A* 修饰可改变肿瘤微环境中免疫细胞的工作方式^[34], 影响经典癌症免疫疗法的疗效, 因此, *m⁶A* 相关基因可作为癌症免疫疗法的新靶点^[35]。本研究发现, *IGF2BP2* 的上调通过抑制 OC 患者对免疫治疗的反应和不同种类免疫细胞的募集比例从而促进 OC

表2 胰岛素样生长因子2结合蛋白2(IGF2BP2)与免疫检查点基因的相关性分析结果

基因	免疫检查点基因	相关系数r值	P值	基因	免疫检查点基因	相关系数r值	P值
IGF2BP2	ADORA2A	-0.19	<0.001	IGF2BP2	CD28	-0.21	<0.001
IGF2BP2	TNFRSF14	-0.22	<0.001	IGF2BP2	TNFRSF9	-0.19	<0.001
IGF2BP2	IDO2	-0.32	<0.001	IGF2BP2	TNFSF9	0.18	<0.001
IGF2BP2	CD276	0.35	<0.001	IGF2BP2	CD200R1	-0.20	<0.001
IGF2BP2	CD48	-0.28	<0.001	IGF2BP2	CD244	-0.26	<0.001
IGF2BP2	ICOSLG	-0.22	<0.001	IGF2BP2	LGALS9	-0.21	<0.001
IGF2BP2	CD27	-0.31	<0.001	IGF2BP2	NRP1	0.21	<0.001
IGF2BP2	CD40LG	-0.34	<0.001	IGF2BP2	PDCD1	-0.22	<0.001
IGF2BP2	TIGIT	-0.22	<0.001	IGF2BP2	TMIGD2	-0.25	<0.001
IGF2BP2	BTLA	-0.29	<0.001	IGF2BP2	HHLA2	0.18	<0.001
IGF2BP2	CD44	0.52	<0.001				

的癌变。说明,IGF2BP2的表达水平与OC患者对免疫治疗的反应密切相关。在OC患者中,IGF2BP2的表达与免疫检查点基因CD44和CD276的表达呈显著正相关,而与免疫检查点基因CD40LG和IDO2的表达负相关,表明IGF2BP2在癌症免疫治疗中可能起到免疫检查点基因的作用,有望成为OC新的免疫检查点基因,从而作为免疫治疗新靶点,开发IGF2BP2抑制剂作为OC患者的新免疫治疗药物,辅助传统疗法,改善预后,提高治愈率。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王祥柱:收集病例、撰写手稿初稿、经费资助;马玥麟:收集数据;谢晓莉:修改手稿终稿;蒋海叶:设计研究方案、分析数据、实验验证

参考文献

- [1] Du M, Nair R, Jamieson L, et al. Incidence trends of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers: Global burden of disease 1990-2017 [J]. J Dent Res, 2020, 99 (2) : 143-151. DOI: 10.1177/0022034519894963.
- [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] Hasegawa T, Shibuya Y, Takeda D, et al. Prognosis of oral squamous cell carcinoma patients with level IV/V metastasis: An observational study [J]. J Craniomaxillofac Surg, 2017, 45 (1): 145-149. DOI: 10.1016/j.jcms.2016.10.011.
- [4] Carlino MS, Larkin J, Long GV. Immune checkpoint inhibitors in melanoma [J]. Lancet, 2021, 398 (10304) : 1002-1014. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01206-X.
- [5] Fan A, Wang B, Wang X, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: Current achievements and future perspective [J]. Int J Biol Sci, 2021, 17 (14) : 3837-3849. DOI: 10.7150/ijbs.64077.
- [6] Adeoye J, Tan JY, Choi SW, et al. Prediction models applying machine learning to oral cavity cancer outcomes: A systematic review [J]. Int J Med Inform, 2021, 154: 104557. DOI: 10.1016/j.ijmedinf.2021.104557.
- [7] Emfietzoglou R, Pachymanolis E, Piperi C. Impact of epigenetic alterations in the development of oral diseases [J]. Curr Med Chem, 2021, 28 (6) : 1091-1103. DOI: 10.2174/0929867327666200114114802.
- [8] Yi YC, Chen XY, Zhang J, et al. Novel insights into the interplay between m⁶A modification and noncoding RNAs in cancer [J]. Mol Cancer, 2020, 19 (1) : 121. DOI: 10.1186/s12943-020-01233-2.
- [9] Meyer KD, Jaffrey SR. Rethinking m⁶A readers, writers, and erasers [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2017, 33: 319-342. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060758.
- [10] Jiang X, Liu B, Nie Z, et al. The role of m⁶A modification in the biological functions and diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6 (1) : 74. DOI: 10.1038/s41392-020-00450-x.
- [11] Wang X, Tian L, Li Y, et al. RBM15 facilitates laryngeal squamous cell carcinoma progression by regulating TMBIM6 stability through IGF2BP3 dependent [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40 (1) : 80. DOI: 10.1186/s13046-021-01871-4.
- [12] Liu H, Wang Y, Xue T, et al. Roles of m⁶A modification in oral cancer (Review) [J]. Int J Oncol, 2023, 62 (1) : 5. DOI: 10.3892/ijo.2022.5453.
- [13] Liu HB, Muhammad T, Guo Y, et al. RNA - binding protein IGF2BP2/IMP2 is a critical maternal activator in early zygotic genome activation [J]. Adv Sci (Weinh), 2019, 6 (15) : 1900295. DOI: 10.1002/advs.201900295.
- [14] Huang H, Weng H, Sun W, et al. Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20 (3) : 285-295. DOI: 10.1038/s41556-018-0045-z.
- [15] Wang J, Chen L, Qiang P. The role of IGF2BP2, an m⁶A reader gene, in human metabolic diseases and cancers [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21 (1) : 99. DOI: 10.1186/s12935-021-01799-x.
- [16] Dai N, Ji F, Wright J, et al. IGF2 mRNA binding protein-2 is a

- tumor promoter that drives cancer proliferation through its client mRNAs IGF2 and HMGA1 [J]. *Elife*, 2017, 6: e27155. DOI: 10.7554/eLife.27155.
- [17] Cao J, Mu Q, Huang H. The roles of insulin-like growth factor 2 mRNA - binding protein 2 in cancer and cancer stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 4217259. DOI: 10.1155/2018/4217259.
- [18] Deng H, Yao H, Zhou S, et al. Pancancer analysis uncovers an immunological role and prognostic value of the m⁶A reader IGF2BP2 in pancreatic cancer [J]. *Mol Cell Probes*, 2024, 73: 101948. DOI: 10.1016/j.mcp.2023.101948.
- [19] Yuan J, Li X, Wang F, et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 is a therapeutic target in ovarian cancer [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248 (23): 2198-2209. DOI: 10.1177/15353702231214268.
- [20] Yu D, Pan M, Li Y, et al. RNA N⁶-methyladenosine reader IGF2BP2 promotes lymphatic metastasis and epithelial - mesenchymal transition of head and neck squamous carcinoma cells via stabilizing slug mRNA in an m⁶A-dependent manner [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41 (1): 6. DOI: 10.1186/s13046-021-02212-1.
- [21] Shen S, Wang G, Shi Q, et al. Seven - CpG - based prognostic signature coupled with gene expression predicts survival of oral squamous cell carcinoma [J]. *Clin Epigenetics*, 2017, 9: 88. DOI: 10.1186/s13148-017-0392-9.
- [22] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (W1): W98-W102. DOI: 10.1093/nar/gkx247.
- [23] Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15 (5): 293-306. DOI: 10.1038/nrg3724.
- [24] Uddin MB, Wang Z, Yang C. The m⁶A RNA methylation regulates oncogenic signaling pathways driving cell malignant transformation and carcinogenesis [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20 (1): 61. DOI: 10.1186/s12943-021-01356-0.
- [25] Chen J, Lu T, Zhong F, et al. A signature of N⁶-methyladenosine regulator-related genes predicts prognoses and immune responses for head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 809872. DOI: 10.3389/fimmu.2022.809872.
- [26] Guo X, Li K, Jiang W, et al. RNA demethylase ALKBH5 prevents pancreatic cancer progression by posttranscriptional activation of PER1 in an m⁶A - YTHDF2-dependent manner [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19 (1): 91. DOI: 10.1186/s12943-020-01158-w.
- [27] Yang X, Zhang S, He C, et al. METTL14 suppresses proliferation and metastasis of colorectal cancer by down-regulating oncogenic long non-coding RNA XIST [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19 (1): 46. DOI: 10.1186/s12943-020-1146-4.
- [28] Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma: An update [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65 (5): 401-421. DOI: 10.3322/caac.21293.
- [29] Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global epidemiology of head and neck cancers: A continuing challenge [J]. *Oncology*, 2016, 91 (1): 13-23. DOI: 10.1159/000446117.
- [30] Zhou L, Li H, Cai H, et al. Upregulation of IGF2BP2 promotes oral squamous cell carcinoma progression that is related to cell proliferation, metastasis and tumor-infiltrating immune cells [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 809589. DOI: 10.3389/fonc.2022.809589.
- [31] Wang L, Zhang S, Li H, et al. Quantification of m⁶A RNA methylation modulators pattern was a potential biomarker for prognosis and associated with tumor immune microenvironment of pancreatic adenocarcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21 (1): 876. DOI: 10.1186/s12885-021-08550-9.
- [32] Wang Y, Lu JH, Wu QN, et al. LncRNA LINRIS stabilizes IGF2BP2 and promotes the aerobic glycolysis in colorectal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18 (1): 174. DOI: 10.1186/s12943-019-1105-0.
- [33] Li X, Ma S, Deng Y, et al. Targeting the RNA m⁶A modification for cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21 (1): 76. DOI: 10.1186/s12943-022-01558-0.
- [34] Gan L, Zhao Y, Fu Y, et al. The potential role of m⁶A modifications on immune cells and immunotherapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114343. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114343.
- [35] Quan C, Belaydi O, Hu J, et al. N⁶-methyladenosine in cancer immunotherapy: An undervalued therapeutic target [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 697026. DOI: 10.3389/fimmu.2021.697026.

(收稿日期:2024-06-06)

(本文编辑:王嫚)