

分类号_____

学校代码 10487

学号 D201781112

密级_____

华中科技大学 博士学位论文

(学术型☒ 专业型☐ 临床医学八年制☐)

基于机器学习识别甲状腺未分化癌 色氨酸代谢重编程的研究

学位申请人：樊逸仙

学科专业：基础医学

指导教师：何西淼 教授

答辩日期：2024年5月23日

答辩委员会

	姓名	职称	单位
主席	孙书国	教授	华中科技大学
委员	王军	教授	湖北工业大学
	宋光	研究员	华中师范大学
	吕义晟	教授	华中科技大学
	张斌	教授	华中科技大学

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfilment of The Requirements
for The Degree of Doctor of Medicine**

**Machine Learning Identifies Tryptophan Metabolism
Reprogramming in Anaplastic Thyroid Cancer**

Candidate : FAN Yixian
Major : Basic Medicine
Supervisor : Prof. HE Ximiao

Huazhong University of Science and Technology
Wuhan 430074, P. R. China
May, 2024

目 录

1 引言.....	1
1.1 甲状腺未分化癌治疗现状	1
1.2 去分化过程与肿瘤微环境的相互作用	2
1.3 代谢重编程与肿瘤分化状态的关联	3
1.4 机器学习在肿瘤研究中的应用	5
1.5 本课题研究目的及意义.....	7
2 材料与方法.....	9
2.1 实验仪器、耗材与试剂.....	9
2.2 实验方法.....	11
2.3 数据处理.....	25
3 结果.....	32
3.1 利用机器学习量化甲状腺癌去分化程度	32
3.2 去分化程度评分的稳健性	39
3.3 甲状腺癌去分化伴随高度抑制性免疫微环境	50
3.4 色氨酸代谢活性与去分化程度显著正相关	54
3.5 甲状腺未分化癌细胞中色氨酸代谢活性上调	63
3.6 MYC 调控色氨酸转运蛋白 SLC1A5、SLC7A5 和代谢酶 AFMID 表达	69
3.7 抑制 SLC1A5 导致肿瘤细胞增殖减弱和 MYC 表达下调.....	75
4 讨论.....	80
4.1 去分化程度评分评估甲状腺癌去分化程度的优势	80
4.2 甲状腺癌去分化伴随高度抑制性免疫微环境和代谢重编程 ...	81
4.3 色氨酸代谢与 MYC 之间的正反馈环路	83
4.4 本研究存在的不足及对未来的展望	85
5 结论.....	87
6 创新性.....	88
7 参考文献.....	89
8 综述 色氨酸代谢在疾病中的研究进展	109
8.1 色氨酸代谢主要途径.....	109
8.2 疾病中的色氨酸代谢.....	111
8.3 总结与展望.....	120
8.4 参考文献.....	120
附录 2 其它数据图表或程序	138

中英文缩写对照表

缩略词	英文名称（中文名称）
AFMID	arylformamidase（芳犬尿氨酸甲酰胺酶）
ATC	anaplastic thyroid carcinoma（甲状腺未分化癌）
AUC	area under curve（曲线下面积）
CSC	cancer stem cell（肿瘤干细胞）
CTL	cytotoxic T lymphocyte（细胞毒性 T 细胞）
CUT&Tag	cleavage under targets and tagmentation（靶向切割和标记策略）
DDScore	dedifferentiation degree score（去分化程度评分）
DTC	differentiated thyroid carcinoma（分化型甲状腺癌）
EMT	epithelial-mesenchymal transition（上皮间质转化）
FTC	follicular thyroid carcinoma（甲状腺滤泡状癌）
GSEA	gene set enrichment analysis（基因集富集分析）
HR	hazard ratio（风险比率）
ICB	immune checkpoint blockade（免疫检查点阻断）
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1（吲哚胺 2,3-双加氧酶 1）
KIRC	kidney renal clear cell carcinoma（肾透明细胞癌）
KIRP	kidney renal papillary cell carcinoma（肾乳头状细胞癌）
KYAT1	kynurenine aminotransferase 1（犬尿氨酸氨基转移酶 1）
Kyn	kynurenine（犬尿氨酸）
KYNA	kynurenic acid（犬尿喹啉酸）
LGG	lower grade glioma（低级别胶质瘤）
LOOCV	leave-one-out cross-validation（留一法交叉验证）
LUAD	lung adenocarcinoma（肺腺癌）
LUSC	lung squamous cell carcinoma（肺鳞状细胞癌）

MDSC	myeloid-derived suppressor cell（髓源性抑制细胞）
MTC	medullary thyroid carcinoma（甲状腺髓样癌）
OXPHOS	oxidative phosphorylation（氧化磷酸化）
PCA	principal component analysis（主成分分析）
PDTC	poorly differentiated thyroid carcinoma（甲状腺低分化癌）
PPP	pentose phosphate pathway（磷酸戊糖途径）
PRAD	prostate adenocarcinoma（前列腺腺癌）
PTC	papillary thyroid carcinoma（甲状腺乳头状癌）
RF	random forest（随机森林）
RNA-seq	RNA sequencing（转录组测序）
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative real-time PCR（逆转录-实时荧光定量 PCR）
shRNA	short hairpin RNA（短发夹 RNA）
SLC1A5	solute carrier family 1 member 5（溶质载体家族 1 成员 5）
SLC7A5	solute carrier family 7 member 5（溶质载体家族 7 成员 5）
SNP	single nucleotide polymorphism（单核苷酸多态性）
ssGSEA	single sample gene set enrichment analysis（单样本基因集富集分析）
superPC	supervised principal components（有监督主成分）
SKCM	skin cutaneous melanoma（皮肤黑色素瘤）
TAM	tumor-associated macrophage（肿瘤相关巨噬细胞）
TC	thyroid carcinoma（甲状腺癌）
TCA	tricarboxylic acid cycle（三羧酸循环）
TCGA	The Cancer Genome Atlas（癌症基因组图谱）
Teff	effector T cell（效应 T 细胞）
TF	transcription factor（转录因子）
TILs	tumor-infiltrating lymphocytes（肿瘤浸润淋巴细胞）

华中科技大学博士学位论文

TME	tumor microenvironment (肿瘤微环境)
T _{reg}	regulatory T cell (调节性 T 细胞)
Trp	tryptophan (色氨酸)
WGCNA	weighted gene co-expression network analysis (加权基因共表达网络分析)

摘要^{*}

背景与目的:

甲状腺癌是最常见的内分泌肿瘤，且发病率逐年上升。随着甲状腺癌分化程度的降低，疾病的复杂性及治疗难度也相应增加。其中最具侵袭性的甲状腺未分化癌（anaplastic thyroid carcinoma, ATC）五年生存率仅为 7%，目前尚无有效治疗手段，因此亟需开发新的治疗策略以提高治疗效果并改善患者的生存质量。代谢重编程与肿瘤去分化过程中的基因表达、细胞分化和肿瘤微环境密切相关，进而影响肿瘤的免疫反应和治疗效果，但关于 ATC 的代谢状态及其与去分化的关系尚未得到充分阐释。本研究旨在通过探索 ATC 的代谢特征，明确致癌去分化相关的代谢激活途径，为 ATC 的诊断和治疗提供理论基础和潜在靶点。

方法:

运用加权基因共表达网络分析结合多种机器学习算法，筛选与甲状腺癌分化状态有关的免疫及代谢特征基因，基于特征基因量化甲状腺癌的去分化程度。进一步使用通量平衡分析工具 Compass 探索与去分化程度密切相关的代谢途径，并通过整合转录组学、代谢组学和表观基因组学等方法，分析并明确 ATC 细胞 BHT-101 中的关键代谢途径及其调控因子。通过色氨酸剥夺及阻断色氨酸转运蛋白的细胞模型，研究色氨酸代谢途径的活性变化对 ATC 功能的影响。

结果:

(1) 确定基于免疫和代谢特征基因的最优模型组合 SVM 与 SuperPC，据此计算得出可准确评估甲状腺癌分化状态的去分化程度评分，进一步发现包括甲状腺癌在内的多种肿瘤的转移样本具有较高的去分化程度评分。

(2) 分化程度较低的甲状腺癌具有高度抑制性的免疫微环境和干细胞样特征，同时糖酵解和磷酸戊糖等代谢途径活性上调。

(3) 色氨酸代谢活性与甲状腺癌的去分化程度呈正相关。除犬尿氨酸外，BHT-101

^{*} 本文的研究工作得到的中央高校基本科研业务费专项资金资助项目的资助 (NO. 2021GCRC073)。

中色氨酸代谢产物含量下调，色氨酸代谢酶活性上调。色氨酸剥夺导致 BHT-101 增殖显著下降，凋亡率显著增加。

(4) 在分化程度低的甲状腺癌中，MYC 活性显著增强，且 BHT-101 中 MYC 与色氨酸转运蛋白 SLC1A5 以及代谢酶 AFMID 启动子区的结合增强。敲降 MYC 导致 *SLC1A5*、*SLC7A5* 和 *AFMID* 表达下调，而缺乏色氨酸时 MYC 半衰期缩短，表达下调。

结论与意义：

本研究利用构建的机器学习模型对甲状腺癌的去分化程度进行量化，并在多个数据集中验证了去分化程度评分的稳健性。进一步结合转录组学、代谢组学和表观基因组学等多组学技术，发现并鉴定了 ATC 中异常活跃的色氨酸代谢途径及其上游转录因子 MYC。通过细胞模型发现 MYC 与色氨酸代谢之间的正反馈环路，即 MYC 作为转录因子调控色氨酸转运蛋白 *SLC1A5*、*SLC7A5* 和代谢酶 *AFMID* 的表达，进而影响色氨酸代谢活性；而色氨酸剥夺导致 MYC 下调。靶向干预色氨酸转运可有效抑制 ATC 细胞增殖并诱导其凋亡。本研究提供的数据和分析模型为开发基于代谢特性的诊断工具和治疗策略提供了理论基础。

关键词：机器学习；色氨酸；甲状腺癌；去分化；生物信息学

Abstract*

Background and Objective:

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, with an increasing incidence in recent years. As the differentiation of thyroid cancer decreases, its complexity and treatment difficulty increase. Anaplastic thyroid carcinoma (ATC), the most aggressive thyroid cancer, has a five-year survival rate of only 7%, and lacks effective treatments. Hence, there is an urgent need to develop new therapeutic strategies to enhance treatment efficacy and improve patient quality of life. Metabolic reprogramming is closely related to gene expression, cell differentiation, and the tumor microenvironment during the dedifferentiation process of tumors, subsequently affecting the immune response and therapeutic effects. However, the metabolic state of ATC and its relationship with dedifferentiation have not been fully studied. This study aims to investigate the metabolic properties of ATC, identify the metabolic pathways associated with oncogenic dedifferentiation, and provide theoretical foundations and potential targets for the diagnosis and treatment of ATC.

Methods:

This study utilized weighted gene co-expression network analysis combined with various machine learning algorithms to identify immune and metabolic feature genes associated with the differentiation status of thyroid cancer. Further, this study quantified the dedifferentiation degree of thyroid cancer using these identified genes. Additionally, the flux balance analysis tool Compass was used to explore metabolic pathways closely associated with dedifferentiation. The study integrated transcriptomics, metabolomics, and epigenomics to identify key metabolic pathways and their regulatory factors in the ATC cell line BHT-101. By employing a cellular model that was deprived of tryptophan and blocked tryptophan transport proteins, the study investigated the impact of alterations in tryptophan metabolic pathway activity on the functionality of ATC.

* This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (NO. 2021GCRC073).

Results:

1. The optimal model combination of SVM and SuperPC was determined based on immune and metabolic feature genes. This combination provided accurate assessments of the dedifferentiation degree scores, which reflect the differentiation status of thyroid cancer. Further analysis revealed that metastatic samples, including those from thyroid cancer, exhibited higher dedifferentiation degree scores.
2. Thyroid cancers with lower differentiation displayed highly suppressive immune microenvironments and stem-cell-like features, with upregulated activities in metabolic pathways such as glycolysis and the pentose phosphate pathway.
3. Tryptophan metabolic activity positively correlated with the dedifferentiation degree of thyroid cancer. Excluding kynurenine, the concentration of tryptophan metabolites was decreased in BHT-101, while the activity of tryptophan metabolic enzymes was increased. Tryptophan deprivation significantly suppressed proliferation and increased apoptosis rates in BHT-101.
4. The activity of MYC was significantly upregulated in thyroid cancers with lower degrees of differentiation. The binding of MYC to the promoters of the tryptophan transporter SLC1A5 and metabolic enzyme AFMID in BHT-101 was increased. Knockdown of MYC resulted in reduced expression of SLC1A5, SLC7A5 and AFMID, while the half-life of MYC was shortened and its expression was downregulated in the absence of tryptophan.

Conclusion:

The study quantified the dedifferentiation degree of thyroid cancer using the constructed machine learning model and verified the robustness of the dedifferentiation degree score across multiple datasets and platforms. Further combining transcriptomics, metabolomics, and epigenomics, the study found and identified the highly active tryptophan metabolic pathway and its upstream transcription factor MYC in ATC. The cell model revealed a positive feedback loop between MYC and tryptophan metabolism, where MYC, as a transcription factor, regulated the expression of the tryptophan transporter SLC1A5, SLC7A5 and metabolic enzyme AFMID, thereby affecting tryptophan metabolic activity; tryptophan deprivation led to MYC downregulation. Targeted intervention in tryptophan transport effectively inhibited ATC cell proliferation and induced apoptosis. The data and analysis models provided by this study offer a theoretical foundation for developing

华中科技大学博士学位论文

diagnostic tools and therapeutic strategies based on metabolic characteristics.

Keywords: Machine Learning, Tryptophan, Thyroid Cancer, Dedifferentiation, Bioinformatics

1 引言

1.1 甲状腺未分化癌治疗现状

甲状腺癌 (thyroid carcinoma, TC) 是起源于甲状腺组织的恶性肿瘤, 根据其起源和分化差异, 可分为: 甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC)、甲状腺滤泡状癌 (follicular thyroid carcinoma, FTC)、甲状腺髓样癌 (medullary thyroid carcinoma, MTC)、甲状腺低分化癌 (poorly differentiated thyroid carcinoma, PDTC) 以及甲状腺未分化癌 (anaplastic thyroid carcinoma, ATC) [1]。其中, PTC 是最常见的 TC 类型, 约占所有 TC 的 80%, 通常生长缓慢且预后良好。FTC 约占 TC 的 10—15%, 其侵袭性低, 预后通常较好, PTC 和 FTC 又被称为分化型甲状腺癌 (differentiated thyroid carcinoma, DTC)。PDTC 的形态和生物学行为介于 DTC 和 ATC 之间, 约占所有 TC 的 2%。ATC 也称间变性甲状腺癌, 是由未分化的甲状腺滤泡细胞构成的高度侵袭性恶性肿瘤。ATC 仅占有所有 TC 的 1—2%, 但其死亡人数却占 TC 的 20—50% [2], 患者中位生存期仅 6 个月, 且均为 IV 期 [3, 4]。

ATC 与 DTC 的诊治理念截然不同。DTC 可通过对可疑甲状腺结节进行细针穿刺后确诊 [5]。DTC 患者能够合成并释放甲状腺激素合成的前体蛋白——甲状腺球蛋白 (thyroglobulin, Tg)。DTC 启动 Tg 的合成、胞饮、运输及存储和释放甲状腺激素的过程均依赖于促甲状腺激素 (thyroid-stimulating hormone, TSH) 的刺激作用 [6]。DTC 患者的治疗以手术切除为主, 辅以术后 ^{131}I 治疗及 TSH 抑制治疗, 规范治疗后患者 5 年生存率约为 90% [7, 8], 并可通过检测血清 Tg 为判断患者是否有肿瘤残余、复发或转移提供重要信息 [9]。ATC 病程进展迅速, 而由于 ATC 的细胞组成复杂性, 细胞病理学诊断仍存在漏诊、误诊的情况 [10-12]。对于未发生远处转移的 ATC 患者可采取手术治疗, 但大多数患者就诊时颈部肿块已较大, 并伴随压迫引起的吞咽困难、声音嘶哑和气管阻塞等症状, 手术难度较大 [5, 13]。ATC 患者不表达 TSH 受体和 Tg 蛋白, 其生长不依赖于 TSH, 因此监测 ATC 患者的疾病状态不宜使用 Tg 检测, 并且 ATC 患者对左旋甲状腺素治疗无反应 [14]。此外, 不同于 DTC 患者能正常摄取并浓缩碘的情况, ATC 患者缺乏必要的钠/碘同向转运体以及其他碘摄取所需基因的表达,

导致放射性碘治疗无效^[15]。

虽然手术、放疗和化疗的联合治疗可能对部分 ATC 患者的预后产生积极影响，但该策略未能普遍提高患者的生存期，其整体效益仍然有限^[16, 17]。近年来，免疫治疗在抗肿瘤治疗方面取得了令人瞩目的成果。对于部分高表达 PD-L1 的 ATC 患者，可能从 PD-1/PD-L1 抑制剂的免疫治疗中获益^[18]。而在一项针对局部晚期和/或转移性 ATC 患者的 II 期临床试验中^[19]，42 例 ATC 患者接受了抗 PD-1 单克隆抗体治疗。该研究中 ATC 患者的总体缓解率为 19%，但患者中位无进展生存期和总生存期仅为 1.7 个月和 5.9 个月，表明单药治疗 ATC 的疗效有限。另一项针对 ATC 患者的免疫治疗联合放化疗的研究中，3 名患者均在治疗开始后 6 个月内死亡，其中 1 例死于肺转移，2 例死于放疗后的肺部并发症^[20]。因此，针对 ATC 的治疗策略研究仍须进一步积累更多的病例，探索潜在的耐药机制和不良反应，以寻找更有效的治疗方式。

1.2 去分化过程与肿瘤微环境的相互作用

已有多项研究表明，通过特定的分子事件可以触发分化程度高的 DTC 去分化并最终进展为 ATC^[21-23]。肿瘤细胞的分化状态改变导致其侵袭性增强和耐药性产生，同时这种变化与周围的微环境密切相关^[24, 25]。肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）包括免疫细胞、基质细胞、细胞外基质、细胞分泌分子以及淋巴管和血管网络^[26, 27]，这些因素共同驱动肿瘤细胞的异质性和可塑性。

去分化过程中，肿瘤细胞获得干细胞样特征并主动重塑 TME 以形成一个有利于肿瘤生长的“黑土地”^[28]。Laughney 等人在单细胞水平上对原发性和转移性肺腺癌的细胞群体进行研究，发现肿瘤细胞表现出与肺部不同发育阶段相对应的分化状态和异质性^[29]。不同的分化状态与肿瘤细胞对免疫系统监视的敏感度以及其转移潜力有关。研究指出，去分化的肿瘤细胞可通过调控 PD-L1^[30]或 NKG2D^[31]的异常表达来逃避免疫系统的监视。肿瘤细胞去分化过程中还可通过影响 TME 来抵抗和逃避细胞毒性 T 细胞（cytotoxic T cell, CTL）识别。在鳞状细胞癌中，去分化的肿瘤细胞获得干细胞样特性，并表达免疫共刺激分子 CD80^[32]。CD80 与高表达免疫检查点 CTLA-4 的 CTL 相结合，进而抑制 CTL 的细胞毒性作用。其他研究也强调了分化程度较低

的肿瘤干细胞（cancer stem cell, CSC）在塑造肿瘤免疫微环境中的作用^[33]。上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）作为细胞分化状态改变的另一种形式，可通过上调免疫抑制分子的表达和减少抗原呈递过程等分子机制促进免疫逃逸^[34-36]。

去分化过程与 TME 的相互作用影响肿瘤治疗效果。针对黑色素瘤的研究显示，在临床前小鼠模型和患者的过继性 T 细胞转移治疗（adoptive T cell transfer therapy, ACT）过程中，去分化的肿瘤细胞可逃避免疫系统的识别，从而产生耐药性^[37]。该现象可能是由于分化相关抗原的丢失或是去分化相关的基因表达变化，引起髓系来源免疫抑制细胞（myeloid-derived suppressor cell, MDSC）的募集^[38]。此外，TME 中巨噬细胞和 T 细胞产生的肿瘤坏死因子 α 可诱导黑色素瘤细胞在分化和去分化状态之间互相转换^[39]，这种炎症诱导的细胞可塑性使肿瘤细胞能够逃避免疫监视，并可能导致 ACT 治疗失败。同时，另一项针对黑色素瘤的研究表明，肿瘤细胞去分化与免疫检查点阻断（immune checkpoint blockade, ICB）耐药性有关^[40]。ATC 中肿瘤细胞具有干细胞样特性，如自我更新和 EMT 等^[41, 42]，这些特性与接受 ICB 治疗的 ATC 患者的免疫应答失败和不良预后相关^[19, 43]。总之，低/未分化的肿瘤细胞通过多种分子机制促进免疫逃避，表现出更高的侵袭性、免疫逃避能力和耐药性^[44]。深入理解 TC 分化状态的转变过程，靶向和重塑 ATC 的 TME，对进一步研究潜在的治疗靶点具有重要意义。

1.3 代谢重编程与肿瘤分化状态的关联

TME 以低氧、酸化和营养缺乏为特征，对肿瘤细胞的生物学行为具有深远影响^[45]。为适应 TME 中的恶劣环境，肿瘤细胞通过代谢重编程调整其能量产生和营养物质的利用策略以维持生存^[46]。

自 20 世纪 50 年代末有氧糖酵解被提出以来，已有多项研究表明肿瘤代谢在支持肿瘤细胞表型多样性方面的贡献^[47]。随后的研究表明，肿瘤细胞的代谢特征不仅仅局限于糖酵解活性的增强，还涉及对能量、氨基酸、脂质和核苷酸代谢途径的全面调控^[48]。代谢重编程被认为是肿瘤的十大标志性特征之一^[49]，深入探究肿瘤细胞的

代谢特性，对于制定有效的治疗策略具有至关重要的意义。

肿瘤细胞的代谢重编程与其分化状态密切相关^[45]。Otto Warburg 提出，肿瘤细胞即使在氧气充足的条件下，也倾向于通过糖酵解来产生能量，这一低效的能量转换过程使得细胞发生去分化，成为“疯狂生长的肿瘤细胞”^[47]。研究表明，糖酵解酶（GLUT1、HK-1 和 PDK-1）的表达上调和糖酵解通路的激活，是细胞永生化的必要条件之一^[50]。氧化途径的抑制在维持诱导性多能干细胞和胚胎干细胞的功能多样性中发挥重要作用^[51]。在体细胞重编程为多能性状态的过程中，细胞从依赖氧化作用转变为依赖糖酵解的代谢方式。

进一步的研究揭示，丙酮酸通量从生成乙酰辅酶 A 转向生成乳酸是 Warburg 效应驱动神经母细胞瘤去分化的关键机制之一^[52]。缺氧环境促使肿瘤细胞下调乙酰辅酶 A 水平，导致组蛋白乙酰化水平和染色质可及性降低，进而抑制细胞分化。在肝癌中，转录因子 TEAD2 和 E2A 抑制乙酰辅酶 A 的合成，导致非组蛋白的乙酰化水平下降并促进肿瘤细胞的去分化和干性^[53]。

线粒体解偶联可逆转 Warburg 效应并诱导神经母细胞瘤分化^[54]。而线粒体体积的增加会诱导乳腺癌细胞的干细胞样特征，增加其转移潜力及耐药性^[55]。同时，缺氧环境促进干细胞样表型的持续存在^[56]。导管乳腺癌细胞在缺氧条件下去分化并表现出干细胞样表型^[57]。在缺氧条件下，缺氧诱导因子 1 α （hypoxia inducible factor 1, HIF-1 α ）的过度表达会促进多种糖酵解蛋白的上调和活性增强，如转运蛋白 GLUT1 和 GLUT3^[58]。HIF-1 α 上调丙酮酸脱氢酶激酶 1 水平，从而促进缺氧条件下乳腺癌干细胞的糖酵解^[59]。

此外，脂质代谢和氨基酸代谢也与肿瘤细胞的分化状态和干性密切相关。多不饱和脂肪酸在去分化的多形性脂肪瘤中增加^[60]；抑制蛋氨酸循环上的关键酶，可限制肿瘤干细胞的生长和肿瘤的形成^[61]；与分化良好的非致瘤细胞 HepG2 相比，致瘤肝癌细胞中支链氨基酸的分解代谢活性下调^[62]；组氨酸代谢影响神经肿瘤的去分化过程^[63]。

代谢重编程使得肿瘤细胞可适应由化疗等治疗引起的 TME 的剧烈变化，进而增强其耐药性^[49]。代谢重编程通过增强磷酸戊糖途径和有氧糖酵解，抑制肿瘤细胞凋

亡^[64]。异常表达的 MYC 可调控结直肠癌葡萄糖代谢重编程,并激活多条信号途径,进而加强肿瘤细胞在化疗和放疗中的生存能力^[65]。葡萄糖摄取增强和有氧糖酵解活性上升使得胃癌细胞对化疗药物顺铂产生耐药性^[66]。糖酵解的异常激活导致乳酸水平升高,导致宫颈癌细胞中组蛋白脱乙酰酶失活,促进其对顺铂的耐药性^[67]。高含量的乳酸还会通过促进酸中毒、充当肿瘤细胞代谢燃料并导致免疫抑制微环境,促进肿瘤的增殖、侵袭、迁移和耐药^[68]。此外,相对于非转移性细胞系,在高度转移性乳腺癌细胞系中还观察到糖酵解和氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)途径同时增强^[69, 70]。肉瘤细胞对糖酵解竞争性抑制剂、线粒体 ATP 合成酶抑制剂或二甲双胍(OXPHOS 和糖酵解双重抑制)的敏感性显著高于正常细胞^[71]。

肿瘤细胞通过其代谢重编程导致免疫抑制性 TME,进一步抑制了多种抗肿瘤免疫反应,削弱免疫治疗的效果^[72, 73]。异常的葡萄糖、氨基酸、脂质和核苷酸代谢导致细胞毒性代谢物的产生和积累,引起肿瘤浸润免疫细胞的功能障碍和凋亡,从而促进免疫逃逸^[73, 74]。例如,乳酸可上调肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)中 PD-L1 的表达,并直接损害 CD8⁺效应 T 细胞(effector T cell, Teff)的增殖和活性,增强免疫耐受性^[75, 76]。犬尿氨酸作为色氨酸代谢物,不仅可促使 CD4⁺ T 细胞分化为调节性 T 细胞(regulatory T cell, T_{reg}),还能增强 CD8⁺ T 细胞中 PD-1 的表达^[77, 78]。脂质代谢产生的前列腺素 E2 通过影响 T 细胞、MDSC 和树突状细胞(dendritic cell, DC)的功能,在推动肿瘤细胞免疫逃逸中扮演了关键角色^[79]。三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水解产生的腺苷可激活免疫抑制腺苷受体信号传导,最终抑制 T 细胞和 B 细胞的激活、增殖和存活^[80]。

除产生免疫抑制代谢物外,代谢活跃的肿瘤细胞竞争性地剥夺 TME 中葡萄糖、各种氨基酸和脂质等营养物质,导致肿瘤浸润免疫细胞所需的关键营养物质缺乏,从而严重损害免疫细胞的抗肿瘤功能^[81, 82]。目前,结合代谢干预和基于 ICB 的免疫疗法的策略已经进入临床试验^[83]。

1.4 机器学习在肿瘤研究中的应用

随着高通量测序技术的快速发展,科学研究已进入大数据时代。机器学习作为一

种强大的工具，被广泛应用于从庞杂的生物信息学数据中提取有用信息，为肿瘤研究带来新的视角和方法。

了解肿瘤内不同细胞类型的组成对于癌症的预后评估极为重要，有助于深入了解肿瘤的起源、分化状态和分期等信息。目前，多种机器学习技术已被应用于解析组织水平的转录组数据，旨在预测组织中不同细胞类型的比例。例如，CIBERSORT 利用支持向量机对 RNA-seq 数据进行反卷积处理，有效评估肿瘤中的细胞类型组成^[84]。CIBERSORTx^[85]和 CODEFACS^[86]对 CIBERSORT 方法进行了扩展，使用非支持向量回归分析对数据进行反卷积处理，并能预测特定细胞类型的基因表达。此外，quanTIseq^[87]和 EPIC^[88]使用约束最小二乘回归算法，而 TIMER^[89]使用线性最小二乘回归算法来估计肿瘤样品中免疫细胞的含量。

多种机器学习技术已被应用于液体活检，如线性模型、支持向量机、决策树和深度学习模型。Tao 等人开发了一种改进的随机森林算法，该算法使用全基因组测序数据来诊断肝癌，其受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线的曲线下面积（area under curve, AUC）达到 0.92^[90]。Lung-CLiP（Cancer Likelihood in Plasma）利用集成机器学习方法（包括最近邻分类器、朴素贝叶斯、逻辑回归和决策树），对血浆样本中的肺癌循环肿瘤 DNA 进行分析^[91]。Maros 等人则是对不同的机器学习分类器（随机森林、弹性网络、支持向量机和提升树）进行比较，发现在基于甲基化数据的癌症检测和分类中，弹性网络表现最为出色^[92]。此外，已有研究表明，包括 SNP 突变、DNA 甲基化和转录组异常在内的多组学数据可以有效预测脑膜瘤的发展^[93]。这些研究凸显了机器学习在肿瘤早筛领域中处理和分析大规模数据方面的潜力。

肿瘤分子分型的概念强调了基于全面的分子检测和分析手段准确区分肿瘤样本亚型的重要性。肿瘤分子分型将肿瘤分类的基础从病理特征转移到分子特征，有助于研究者更深入地了解肿瘤在分子层面的异质性，从而为不同亚型的肿瘤提供精准治疗方案^[94,95]。多种机器学习方法已被应用于肿瘤分子亚型的分类。例如，Markus 等人利用随机森林算法，结合基因表达和 DNA 甲基化数据，成功建立了乳腺癌的分子亚型^[96]。在一项涉及 156 名低级别胶质母细胞瘤患者的研究中，研究人员利用 mRNA

芯片、microRNA 测序和 DNA 甲基化芯片数据对癌症亚型进行数据分析，并通过无监督聚类对肿瘤进行分类，成功鉴别出具有显著组织学、遗传和临床特征差异的三种患者亚型^[97]。Franco 等人运用深度学习模型分析了癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas Program, TCGA）^[98]的 DNA 甲基化、RNA 和 miRNA 数据，预测出三种不同的胶质母细胞瘤亚型，这些亚型在与神经突触功能和囊泡介导的运输相关的基因表达方面具有明显差异^[99]。

许多新型治疗方法已在临床应用中展现出了显著的疗效。但由于肿瘤的高度异质性，很多患者仍然未能从这些治疗中受益。鉴于治疗相关的高昂成本和潜在的严重不良反应，运用大规模多组学数据和先进机器学习算法进行肿瘤检测和诊断、亚型分类、治疗的优化和新的治疗靶点识别，已成为一种成本低效益高的策略^[100]。随着对肿瘤细胞分子机制研究的深入，通过多基因检测从分子层面认识 ATC 的发病机制，并及时精准地鉴别 ATC，将进一步优化治疗策略、改善患者的预后和生存率。

1.5 本课题研究目的及意义

在过去三十年里，ATC 的生存率未有显著提升^[101]。该疾病的稀有性及诊断标准的差异限制了对它的深入研究，对 ATC 特性的不精确和不完整的描述也阻碍了对该疾病的全面理解。细胞可塑性赋予肿瘤细胞在分化和未分化状态之间转换的能力，这种状态的波动可能涉及到不同类型癌症中的特定基因变异。虽然 PI3K、PTEN、RAS 和 TP53 等关键细胞代谢调控因子发生突变^[102]，但对于 ATC 中介导代谢重编程的代谢相关基因的表达模式，以及 ATC 如何协调基因调控来激活特定的代谢途径在很大程度上仍然未知。近十年来，随着公共数据资源如 TCGA 和基因表达图谱（Gene Expression Profile, GEO）^[103]的发展，利用生物信息学方法鉴别关键特征基因的方法逐渐完善。但目前尚无对 ATC 的充分的整合分析，仍需更多深入的研究来了解其特性。

为填补 ATC 中的代谢特征及其分子机制这一研究空白，本研究整合多个 TC 数据集，开发了一个通用的分析流程。通过所构建的多种机器学习算法的综合分析框架，本研究量化了 TC 的去分化程度，并在多个数据集上验证了模型的稳定性。在此

基础上,本研究利用 Compass^[104]算法深入探究了与 TC 去分化程度密切相关的代谢途径,揭示分化程度较低的 TC 的代谢特征,并利用 viper 算法探究了不同分化状态的 TC 的转录因子活性。结合代谢组学、RNA-seq、CUT&Tag 技术和细胞模型,本研究验证了 ATC 细胞中异常活跃的色氨酸代谢途径及其上游转录因子的调控模式。这些研究成果不仅加深了对 ATC 代谢调控复杂性的理解,也为开发新的治疗方法提供了科学依据。针对性地干预 ATC 中关键的代谢途径,可为 ATC 患者开辟治疗的新途径,进而提升治疗效果和改善患者预后。

2 材料与方法

2.1 实验仪器、耗材与试剂

2.1.1 实验仪器

表 2-1 主要实验仪器

仪器名称	生产商
细胞培养箱	美国 Thermo Fisher 公司
双人单面超净工作台	中国 苏州净化设备有限公司
生物安全柜	中国 海尔集团公司
4℃冰箱	中国 安徽中科都菱家用电器股份有限公司
-20℃冰箱	中国 安徽中科都菱家用电器股份有限公司
-80℃超低温冰箱	中国 安徽中科都菱家用电器股份有限公司
低温高速离心机	中国 大龙兴创实验仪器（北京）股份公司
WB 蛋白电转仪和转膜仪	中国 上海雅酶生物医药科技有限公司
恒温摇床	中国上海精其仪器有限公司
超纯水机	中国 上海康雷分析仪器有限公司
压力蒸汽灭菌器	中国 上海三申器械公司
qPCR 仪	中国 酷博科技有限公司
PCR 仪	德国 Eppendorf 公司
数显恒温水浴锅	中国 上海旌派仪器有限公司
荧光倒置显微镜	德国 Carl Zeiss 公司
NanoDrop 微量分光光度计	美国 Thermo Fisher 公司
凝胶成像分析仪	中国 北京东胜创新生物科技有限公司
一体式超声波细胞破碎仪	中国 拓赫机电科技（上海）有限公司
电动吸引器	中国 江苏鱼跃医疗设备股份有限公司

光学显微镜	日本 Olympus 公司
加热磁力搅拌器	中国 常德华普达公司
制冰机	中国 上海雪科公司

2.1.2 耗材与试剂

表 2-2 主要耗材与试剂

耗材/试剂名称	公司
DMEM 培养基	中国 武汉博士德生物工程有限公司
无色氨酸 DMEM 培养基	中国 武汉博士德生物工程有限公司
4% 多聚甲醛	中国 北京兰杰柯科技有限公司
磷酸盐缓冲液溶液	中国 武汉普诺赛生命科技有限公司
胎牛血清	中国 北京兰杰柯科技有限公司
0.25% EDTA 胰酶细胞消化液	中国 上海碧云天生物科技股份有限公司
无水乙醇	中国 北京国药集团化学试剂有限公司
无血清细胞冻存液	中国 苏州新赛美生物科技有限公司
青霉素-链霉素溶液	中国 上海生工生物工程股份有限公司
6 孔细胞培养板	中国 上海生工生物工程股份有限公司
LB Broth 培养基	中国 上海碧云天生物科技股份有限公司
嘌呤霉素	中国 北京兰杰柯科技有限公司
氨苄青霉素	中国 北京兰杰柯科技有限公司
无内毒素质粒小提中量试剂盒	中国 天根生化科技（北京）有限公司
Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	中国 翌圣生物科技（上海）股份有限公司
QuickShuttle 转染试剂	中国 苏州博奥龙科技有限公司
聚凝胺	中国 翌圣生物科技（上海）股份有限公司
Stbl3 感受态细胞	中国 天根生化科技（北京）有限公司
RNA 抽提试剂盒	中国 上海飞捷生物技术有限公司

Hyperactive Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina	中国 南京诺唯赞生物科技股份有限公司
Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	中国 南京诺唯赞生物科技股份有限公司
HiScript III All-in-one RT SuperMix	中国 南京诺唯赞生物科技股份有限公司
RIPA Lysis Buffer	中国 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	中国 上海碧云天生物技术股份有限公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
异丙醇	中国 北京国药集团化学试剂有限公司
ECL Enhanced Kit	中国 武汉爱博泰克生物科技有限公司
引物	中国 奥科（武汉）生物科技有限公司
预染蛋白 Marker	美国 Thermo Fisher 公司
PMSF 蛋白酶抑制剂	中国 上海碧云天生物技术股份有限公司
无内毒素质粒提取试剂盒	中国 天根生化科技（北京）有限公司
培养皿	中国 北京兰杰柯科技有限公司
甘油	中国 广州赛国生物科技有限公司

表 2-3 主要抗体

抗体	类型	货号	应用	用量/稀释比例	来源
Anti-MYC	兔单抗	R22809	WB	1:500	Zenbio
Anti-Beta Actin	鼠单抗	66009-1-Ig	WB	1:20000	proteintech
Anti-SLC1A5	兔多抗	20350-1-AP	WB	1:12000	proteintech
Anti-Mouse IgG	鼠二抗	SA00001-1	WB	1:2000	proteintech
Anti-Rabbit IgG	兔二抗	SA00001-2	WB	1:5000	proteintech

2.2 实验方法

2.2.1 细胞系来源

本次研究中所使用的 BHT-101（人甲状腺未分化癌细胞）和 KTC-1（人甲状腺乳头状癌细胞）细胞系均购买自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。根据中国

科学院提供的指导方针，在实验室条件下对细胞进行培养。实验过程中定期检查细胞的生长情况、形态和纯度等，以确保数据的准确性和实验的可复制性。同时，实施了严格的无菌技术和细胞保存方法以维持细胞活力和防止污染。所有的实验活动都在设定的实验室条件下，严格按照生物安全和伦理规范执行。

2.2.2 细胞培养

细胞复苏：确保无菌操作环境，将所需培养基预热至 37°C。将存放在液氮容器中的冻存管快速转移到 37°C 水浴中复温 1-2 分钟（minute, min）以充分解冻。解冻后使用无菌吸头吸取细胞悬液，将其缓慢加入到含有 10 mL 预热培养基的离心管中。将含有细胞的离心管在室温下以 300× 离心力（g）的速度离心 5 min。沉淀细胞后，小心操作，弃去上清。加入 1 mL 完全培养基重悬细胞后，转移至培养皿，并添加适量完全培养基，37°C、5% CO₂ 细胞培养箱培养。

细胞传代：当细胞生长至 70-80% 密度时进行传代。弃旧培养基，PBS 冲洗细胞 1-2 次，加入适量的胰蛋白酶溶液，37°C 细胞培养箱静置 2 min 后，立即加入 2-3 倍体积的完全培养基，300×g 离心 5 min，弃上清。加入新鲜的培养基重悬细胞。根据需要将细胞按照 1:3 或 1:4 分配到新的培养瓶中，37°C、5% CO₂ 细胞培养箱培养。定期观察细胞的贴壁、生长和形态变化，确保细胞健康生长。

细胞冻存：在进行冻存前，确保细胞生长良好。选择在细胞生长到 70-80% 密度时进行冻存。与细胞传代过程类似，首先移除培养瓶中的旧培养基，并用 PBS 清洗以除去残留的培养基。继而在培养瓶中加入适量胰蛋白酶溶液进行消化。待消化完全后，300×g 离心 5 min，弃上清。加入 1 mL 无血清细胞冻存液，混匀，转移至细胞冻存管中，-80°C 超低温冰箱中保存。

2.2.3 质粒转化

- （1）质粒制备：准备所需质粒 DNA，确保其具有高纯度和适宜的浓度。
- （2）添加质粒 DNA：从 -80°C 冰箱中取 100 μL Stbl3 感受态细胞悬液，置于冰上融化。将质粒 DNA 加入到感受态细菌中，轻轻混匀。
- （3）热激处理：将含 DNA 的感受态细菌短暂置于 42°C 的水浴中进行热激处理 45

秒 (second, s), 然后立即在冰上冷却 2 min。

(4) 恢复培养: 在离心管中加入 1 mL LB 液体培养基, 混匀后置于 37°C 摇床上 $0.6 \times g$ 培养 1 h。

(5) 筛选培养: 将恢复后的大肠杆菌涂布到含有特定抗生素的 LB 琼脂平板上, 37°C 培养箱倒置过夜培养。

(6) 阳性克隆挑选和确认: 挑选生长的菌落, 并通过测序确认质粒序列无误。

2.2.4 质粒抽提

(1) 首先将携带目标质粒的 Stbl3 感受态细胞株接种到含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 于 37°C 的摇床上以 $0.6 \times g$ 的速度过夜培养。

(2) 将菌液以 $2500 \times g$ 的速度离心 10 min, 尽量倒掉上清, 留下细菌沉淀。

(3) 将 500 μL 的 BL 平衡液加至 CP4 吸附柱 (已放置于收集管中)。 $13000 \times g$ 离心 1 min 后弃废液。

(4) 向含有细菌沉淀的离心管中加入 500 μL 的 P1 溶液, 使用移液枪或涡旋器使细菌完全重悬, 然后将混合液转移到新的 2 mL 的无菌离心管中。

(5) 轻轻向其中加入 500 μL 的 P2 溶液, 轻柔地翻转离心管 6 至 8 次, 确保细菌充分裂解, 注意过程中避免剧烈震动以免污染。

(6) 当溶液变清时, 加入 500 μL 的 P4 溶液, 再次轻轻翻转 6 至 8 次确保混合均匀。此时, 会见到白色沉淀产生, 室温静置 10 min 后, 以 $13000 \times g$ 速度离心 10 min。

(7) 将过滤柱套入收集管中, 将步骤 (6) 的上清分次加入 CS 过滤柱, $13000 \times g$ 离心 2 min, 收集过滤液至 2 mL 离心管。

(8) 加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇, 充分混匀, 分次加入 CP4 吸附柱, $13000 \times g$ 离心 1 min, 弃废液。

(9) 在 CP4 吸附柱中加入 500 μL PD 去蛋白液, $13000 \times g$ 离心 1 min, 弃废液,。

(10) 将 600 μL 的 PW 漂洗液加至吸附柱中, $13000 \times g$ 离心 1 min 后弃废液, 重复此步骤。

(11) $13000 \times g$ 离心 2 min。

(13) 向吸附柱的吸附膜中央滴加 100 μL 的 TB 洗脱液, 室温放置 2 min, $13000 \times$

g 离心 1 min。

(14) 将收集的质粒溶液通过吸附柱洗脱三次，测定质粒 DNA 浓度，并将其保存于 -20℃ 的冰箱中备用。

2.2.5 稳转细胞系构建

2.2.5.1 慢病毒载体构建

本研究所使用的质粒由擎科生物构建完成，所用载体骨架为 PTSB-U6-PGK-Fluor-2A-ARGs。构建的质粒经测序鉴定无误，可用于后续慢病毒包装。设计的 shRNA 序列如下表：

表 2-4 shRNA 靶向序列

Gene Name	shRNA 序列
sh-SLC1A5 #1	5'-CCGGGCTGCTTATCCGCTTCTTCAACTCGAGTTGAAGAAGCGGATAAGCAGCTTTTTG-3'
sh-SLC1A5 #2	5'-CCGGCTGGATTATGAGGAATGGATACTCGAGTATCCATTCCTCATAATCCAGTTTTTG-3'
sh-MYC #1	5'-CCTGAGACAGATCAGCAACAATTCAAGAGATTGTTGCTGATCTGTC TCAGGTTTTTT-3'
sh-MYC #2	5'-CAGTTGAAACACAACTTGAATTCAAGAGATTCAAGTTTGTGTTTCAACTGTTTTTT-3'

2.2.5.2 慢病毒包装

(1) 转染前 18—24 小时在细胞培养皿中种植 HEK-293T 细胞，在细胞密度为 75% 时准备转染。转染前更换新鲜的培养基。

(2) 准备质粒：向离心管内加入 400 μ L 无菌 PBS 溶液，然后将 12 μ g shRNA 质粒、9 μ g psPAX2 质粒、6 μ g pMD2.G 质粒加入混匀备用。

(3) 准备转染试剂：向离心管内加入 400 μ L 无菌 PBS 溶液，将 60 μ L 转染试剂加入并混匀。

(4) 将准备好的质粒溶液和转染试剂混合均匀。

(6) 将上一步混合液点状均匀的加入细胞培养基中，轻轻晃动培养皿混匀。

(5) 转染 48 h 后收集含有病毒液的培养基，放入 50 mL 离心管内，置于 4℃ 冰箱保存。再向培养皿中加入新鲜的培养基。

(6) 收集转染 72 h 后的含有病毒的培养基, 收集到上一步的 50 mL 离心管内。

(7) 将收集的含病毒溶液在 4°C 离心机中 $300\times g$ 离心 15 min, 然后用 15 mL 注射器吸取上清接上 0.22 μm 无菌滤器进行过滤即得到纯净的病毒, 将过滤后的病毒液收集与 50 mL 离心管内, 分装与 5 mL 离心管中冻存于 -80°C 冰箱中备用。

2.2.5.3 目标细胞感染

(1) 在进行慢病毒感染前, 先对嘌呤霉素的有效浓度进行测试。将预定感染的细胞种植于六孔板中, 并以不同浓度 (0.5、1、2、3、4、5 $\mu\text{g/mL}$) 的嘌呤霉素培养细胞。选取导致细胞在三天内全部死亡的最低嘌呤霉素浓度作为后续筛选的浓度。

(2) 在六孔板中接种待感染细胞, 待细胞生长到 30% 密度时, 即可开始慢病毒感染。

(3) 从 -80°C 冰箱取出慢病毒, 并在冰上缓慢解冻。

(4) 在无菌的 EP 管中准备每孔所需的试剂: 每孔加入 1 mL 慢病毒、200 μL 完全培养基和 1.2 μL 浓度为 10 mg/mL 的 Polybrene 溶液, 充分混合后加入到六孔板的每个孔中, 同时预留一个孔作为未感染对照。

(5) 慢病毒感染进行 8 至 12 h 后, 去除含病毒的培养基, 并加入 2 mL 新鲜的完全培养基, 继续培养 48 h。在此期间, 使用荧光显微镜检查荧光强度。

(6) 培养 48 h 后加入含适宜浓度嘌呤霉素的培养基进行培养, 每 24 h 更换一次培养基。

(7) 当未感染对照孔内的细胞完全死亡时停止筛选, 然后用 1/2 浓度的嘌呤霉素培养基扩大培养一周。

(8) 将扩大培养的细胞冻存, 以便后续实验使用。

2.2.6 RNA 提取

(1) 首先, 离心收集细胞并去除所有上清, 只保留细胞沉淀。经过充分振动使细胞完全分散后, 添加 100 μL 的 RA1 缓冲液, 迅速振荡几秒以充分混合, 然后进行短暂离心, 将 100 μL 的上清转移到 1.5 mL 的离心管中。

(2) 加入 500 μL RA2, 混匀, 静置 1 min。

(3) 将样本裂解物全部转移至套有吸附柱的套管中, $13000\times g$ 离心 1 min。

- (4) 弃外套管液体，加入 500 μL 漂洗液， $13000\times g$ 离心 1 min。重复该步骤。
- (5) 弃外套管液体， $13000\times g$ 空转离心 1 min。
- (6) 向吸附柱的吸附膜中央滴加 25 μL 的洗脱缓冲液。
- (7) 室温静置 1 min， $13000\times g$ 离心 1 min。随后测定 RNA 浓度，并将其储存于 -80°C 的冰箱中以供未来使用。

2.2.7 荧光定量 PCR

(1) cDNA 合成

逆转录反应体系配置如下：

组分	体积
5 $\times$ All-in-one qRT SuperMix	4 μL
Enzyme Mix	1 μL
模板 RNA	1 μg
RNase-free ddH ₂ O	to 20 μL

用移液器轻轻吹打 8—10 次至充分混匀，短暂离心收集至管底。

反应程序如下：

温度	时间
50 $^{\circ}\text{C}$	15 min
85 $^{\circ}\text{C}$	5 sec

逆转录产物置于 $-30\sim-15^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 配置反应混合物

荧光定量 PCR 反应体系配置如下：

组分	体积
2× Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	5 μL
Primer1 (10 μM)	0.2 μL
Primer2 (10 μM)	0.2 μL
Template cDNA	1 μL
ddH ₂ O	3.6 μL

(3) 设置 qPCR 反应程序:

	温度	时间	循环次数
预变性	95°C	30 sec	1
循环反应	95°C	10 sec	40
	60°C	30 sec	
熔解曲线	60°C	60 sec	1
	95°C	15 sec	

2.2.8 免疫印迹

2.2.8.1 蛋白样品制备

当细胞达到适合的生长密度时,用 PBS 洗涤细胞,以去除培养基中的血清和非细胞物质。之后使用胰蛋白酶处理细胞数分钟,使细胞从培养皿底部脱落。停止胰蛋白酶作用后,收集细胞悬液。将收集的细胞悬液在低温下 $300\times g$ 离心 5 min,以沉淀细胞。弃去上清液,添加预冷的细胞裂解缓冲液 RIPA (每毫升 RIPA 裂解液加入 10 μL 蛋白酶抑制剂)。裂解缓冲液的体积根据细胞数量和所需蛋白浓度调整。轻轻重悬细胞沉淀,并在冰上放置 30 min,每 10 min 轻轻振荡或翻转离心管以促进细胞裂解。将裂解的细胞混合物在 4°C 下 $13000\times g$ 离心 20 min。小心地转移含有蛋白的上清液到新的离心管中。此时的上清液即为细胞蛋白提取物。

2.2.8.2 蛋白浓度测定

(1) 蛋白标准品的准备

①向包含 30 mg BSA 的离心管中添加 1.2 mL 蛋白标准配制液，混合至完全溶解，制得 25 mg/mL 的 BSA 标准溶液。

②将 25 mg/mL 的 BSA 标准溶液稀释至 0.5 mg/mL。例如，将 20 μ L 的 25 mg/mL BSA 标准溶液加入 980 μ L 的稀释液中，即可得到 0.5 mg/mL 的蛋白标准品。稀释液使用与蛋白样本相同的溶剂进行稀释。

(2) BCA 工作液配制。5 mL 的 BCA 试剂 A 中加入 100 μ L 的 BCA 试剂 B，制备得到 5.1 mL 的 BCA 工作液。

(3) 蛋白浓度测定

①在 96 孔板中，分别加入 0、1、2、4、8、12、16、20 μ L 的标准品，并使用稀释液将每个孔的总体积调整至 20 μ L。最终，标准品的浓度分别对应于 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL。

②向样品孔中样品，稀释液补足至 20 μ L。

③向每个孔中添加 200 μ L 的 BCA 工作溶液，37°C 下孵育 30 min。

④使用酶标仪在 562 nm 波长处测定吸光度值。

⑤利用所建立的标准曲线及实际加入的样品体积来计算样品的蛋白质浓度。在完成蛋白浓度测定后，选取最低蛋白浓度的样本作为基线，通过向浓度较高的样本中加入 RIPA 缓冲液进行适当稀释，以确保所有样本达到统一的蛋白浓度水平。

⑥随后，根据所需计算加入适当体积的 5 $\times$ Loading Buffer，混匀后在 95°C 下加热 10 min，接着置于冰上冷却 2 min，最后分装样品，置于-80°C 保存。

2.2.8.3 凝胶电泳

(1) 准备凝胶。根据下表配方配制分离胶。配制好分离胶后，将胶溶液用移液枪加到制胶器中，之后在胶溶液上层加双蒸水，室温水平放置 30 min。分离胶凝固后，将制胶器中的双蒸水倒出，残余的水滴用滤纸吸干。再按照浓缩胶配方按顺序加入试剂，配制浓缩胶。将制备好的胶溶液缓慢加至制胶器中，样品梳沿玻璃板的一端插至胶溶液中，室温，水平放置半小时。

分离胶配方如下：

浓度	7.5%	10%	12.5%	15%
H ₂ O	2.4 mL	2.0 mL	1.55 mL	1.15 mL
1.5M Tris (pH8.8)	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
30%丙烯酰胺	1.25 mL	1.65 mL	2.1 mL	2.5 mL
10% SDS	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
10% AP	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L
TEMED	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L

浓缩胶配方如下：

组分	体积
H ₂ O	1.438 mL
0.5 M Tris (pH 6.8)	624 μ L
30%丙烯酰胺	405 μ L
10% SDS	25 μ L
10% AP	37.5 μ L
TEMED	4 μ L

(2) 上样。在凝胶固化并且样品准备完成后，将凝胶置于电泳槽中，倒入适量的电泳缓冲液至电泳槽中，并拔除凝胶的梳子。使用移液枪将等量的蛋白样品和分子量标志物按顺序加至凝胶孔中。

(3) 电泳。连接电源，设置适当的电压。电泳在恒定电压下进行，蛋白样品在浓缩胶中时将电压设置为 80 V，电泳 30 min。当蛋白电泳至分离胶时，将电压改为 120 V。

(4) 转膜。配置转膜缓冲液，并置于 4℃预冷。取出电泳完成后的凝胶，根据凝胶大小裁剪 PVDF 膜。按照转膜夹板负极板、多孔海绵垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、多孔海绵垫、转膜夹板正极板的顺序进行放置。并使用玻璃棒排除夹层中的气泡，将组装好的“三明治”结构放入转膜槽中，加入预冷的转膜液。进行恒流转膜，电流设定为 350 mA，转膜时间设定为 70~120 min。

(5) 封闭。转膜完成后, 将 PVDF 膜移至抗体盒中, 用 $1\times$ TBST 溶液冲洗三次, 每次 5 min。随后, 用封闭液在室温下孵育 30 min 进行封闭。封闭后, 再次用 $1\times$ TBST 溶液冲洗膜三次, 每次 5 min。

(6) 一抗孵育。去除封闭液后, 添加稀释好的一抗, 4°C 摇床孵育过夜。一抗孵育结束后, 加入 $1\times$ TBST 在摇床上缓慢摇动清洗 5 min。去除 $1\times$ TBST 后, 重新加入 $1\times$ TBST 进行第二次清洗, 时长同样为 5 min, 总共重复清洗三次。

(7) 二抗孵育。去除 TBST 后, 立刻加入稀释好的二抗, 并在室温下通过侧摆摇床轻柔孵育 1 h。

(8) 显色。按 1:1 的比例将 ECL 发光剂中 A 液和 B 液混匀, 在 PVDF 膜上滴加 ECL 发光液, 室温下反应 2 min, 吸干 ECL 发光液, 暗室内曝光、显影、定影。

2.2.9 平板克隆形成实验

(1) 制备细胞悬液: 细胞生长至对数生长期后, 用胰蛋白酶消化并离心收集细胞, 用 PBS 洗涤后重新悬浮于完全培养基中。通过计数确定细胞密度。

(2) 接种细胞: 以每孔 1000 个细胞的密度接种到六孔板中, 置于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 1—2 周, 期间需定期检查培养基水平, 必要时更换新鲜培养基。

(3) 固定与染色: 当克隆形成可见时 (多数克隆达到 50 个细胞), 移除培养基并用 PBS 洗涤细胞。用甲醛固定液轻轻固定细胞 15—20 min。用 0.1% 结晶紫染色剂染色 5—10 min, 再用清水冲洗去除多余染料。

(4) 数据处理: 计算每个处理组中克隆的平均数量, 并进行统计学分析。

2.2.10 CCK-8 细胞增殖功能检测

(1) 准备细胞悬液并进行细胞计数。

(2) 将细胞悬液接种至 96 孔板中, 每孔 100 μL , 每个实验样本设五个重复孔, 并在培养板的外围孔中 100 μL 加入 PBS 溶液。

(3) 将培养板放置于培养箱中过夜培养。

(4) 向每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液, 并轻轻晃动培养板以确保充分混合。

(5) 再次将培养板放入培养箱中, 孵育 1 h。

(6) 使用酶标仪测定每孔在 450 纳米波长处的吸光度 (OD 值)。

(7) 计算细胞增殖率, 公式为: (实验孔 OD 值-空白孔 OD 值) / (阴性对照孔 OD 值-空白孔 OD 值) $\times 100\%$ 。

2.2.11 细胞凋亡检测

(1) 胰酶消化处理细胞, 收集细胞悬液, $300\times g$ 室温离心 2 min。

(2) 使用预冷 PBS 清洗细胞, $300\times g$ 室温离心 2 min, $100\mu\text{L}$ $1\times$ Binding Buffer 重新悬浮细胞;

(3) 加入 $5\mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $10\mu\text{L}$ PI 染色溶液, 混匀。

(4) 避光室温孵育 10-15 min。

(5) 加入 $400\mu\text{L}$ $1\times$ Binding Buffer, 混匀后使用 BD C6 流式细胞仪进行检测。

2.2.12 RNA-seq 文库构建

使用总 RNA 构建文库。首先, 采用 Oligo (dT) 磁珠技术从总 RNA 中分离出具有 polyA 尾巴的 mRNA。所提取的 mRNA 在 Fragmentation Buffer 中经过二价阳离子处理, 随后被随机切割。之后, 使用这些被切割的 mRNA 作为模板, 并结合随机引物, 借助 M-MuLV 逆转录酶合成 cDNA 的第一链。接下来, 使用 RNase H 去除 RNA 模板, 并在 DNA polymerase I 作用下合成 cDNA 的第二链。随后进行末端修复、加 ployA 尾并连接测序接头, 利用 AMPure XP 珠子挑选出 370~420 bp 的 cDNA 片段。经 PCR 扩增和 AMPure XP 珠子纯化后, 完成文库的最终构建。

通过 Qubit 2.0 Fluorometer 对构建好的文库进行初步定量, 调整文库浓度至 $1.5\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。随后使用 Agilent 2100 bioanalyzer 测量文库插入片段的大小, 确保其达到预期要求。最终, 采用 gRT-PCR 准确测定文库的有效浓度, 保证其超过 2 nM 。

2.2.13 CUT&Tag 文库构建

(1) 按照诺唯赞试剂盒 Hyperactive Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina 说明书分别配置 Binding Buffer、Wash Buffer、Antibody Buffer、Dig-wash Buffer、Dig-300 Buffer 以及 $1\times$ B&W Buffer。

(2) ConA Beads Pro 处理。向 8 联管中加入 $100\mu\text{L}$ Binding Buffer 及 $10\mu\text{L}$ ConA Beads

Pro。静置约 2 min，去除上清。每管加入 100 μ L Binding Buffer，混匀，静置 2 min，再次去除上清，加入 10 μ L 的 Binding Buffer 重悬 ConA Beads Pro。

(3) 细胞收集。取适量细胞，300 $\times$ g 离心 5 min，弃上清后加入 500 μ L Wash Buffer，重悬细胞。300 $\times$ g 离心 5 min，弃上清。加入 100 μ L Wash Buffer。

(4) 细胞与 ConA Beads Pro 孵育。将 100 μ L 细胞悬液转移到含有已活化 ConA Beads Pro 的 8 联管中，混匀，室温下孵育 10 min。瞬时低速离心，静置，去上清。

(5) 一抗孵育。加入 50 μ L 预冷的 Antibody Buffer，根据抗体说明书推荐的浓度，向 8 联管中加入适量的一抗。混匀，瞬时离心，4 $^{\circ}$ C 静置过夜。

(6) 二抗孵育。将一抗孵育后的 8 联管取出，瞬时离心，静置，弃上清。加入 50 μ L 用 Dig-wash Buffer 按 1:100 稀释的二抗，混匀，室温旋转孵育 30 至 60 min。瞬时离心，静置，弃上清。加入 200 μ L Dig-wash Buffer，混匀。

(7) pA/G-Tnp Pro 孵育。二抗孵育后瞬时离心，静置 30 s 至 2 min，弃上清液。取 2 μ L 的 pA/G-Tnp Pro，加入 98 μ L 的 Dig-300 Buffer 混合。每孔加入 100 μ L 混合液。上下颠倒混匀。室温旋转孵育 1 h，瞬时离心，静置 30 s 至 2 min，弃上清。加入 200 μ L Dig-300 Buffer，上下颠倒。

(8) 片段化。取 40 μ L Dig-300 Buffer，加入 10 μ L 5 $\times$ TTBL 混匀。将 pA/G-Tnp Pro 孵育后的 8 联管瞬时离心，静置，待溶液变澄清后，弃上清。向每个样本中加入 50 μ L 稀释后的 TTBL 溶液，混匀。37 $^{\circ}$ C 下孵育 8 联管 60 min，瞬时离心，加入 2 μ L 10% SDS。上下颠倒混合后 55 $^{\circ}$ C 孵育 10 min，瞬时离心，静置约 2 至 3 min。转移上清至 8 联管中，丢弃磁珠。

(9) DNA Extract Beads Pro 处理。取 200 μ L 的 1 $\times$ B&W Buffer 加入 25 μ L DNA Extract Beads Pro，吹打混匀。静置 2 min，弃上清。加入 200 μ L 的 1 $\times$ B&W Buffer，吹打混匀，静置后弃上清。加入 50 μ L 2 $\times$ B&W Buffer，重悬 DNA Extract Beads Pro。

(10) DNA 提取。将步骤 (9) 得到的 DNA Extract Beads Pro 加入步骤 (8) 中转移的上清，混匀。室温下孵育 20 min。瞬时离心，静置 2 至 3 min 后，弃上清。向每管加入 200 μ L 1 $\times$ B&W Buffer。室温孵育 30 s，弃上清。室温晾置 2 至 5 min，加入 15 μ L 的 ddH₂O 重悬 DNA Extract Beads Pro。

（11）文库扩增

① 在灭菌 PCR 管中配制以下组分：

组分	体积
重悬的 DNA Extract Beads Pro	15 μ L
2 $\times$ CAM	25 μ L
N5XX	5 μ L
N7XX	5 μ L
总体积	50 μ L

② 使用移液器轻轻吹打混匀，在 PCR 仪中进行如下反应：

温度	时间	循环数
72 $^{\circ}$ C	3 min	1 cycle
95 $^{\circ}$ C	5 min	1 cycle
98 $^{\circ}$ C	10 sec	9-20 cycles
60 $^{\circ}$ C	5 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min	1 cycle
4 $^{\circ}$ C	Hold	1 cycle

（12）PCR 产物纯化。将 100 μ L 涡旋振荡后的 VAHTS DNA Clean Beads 加入每个 PCR 产物中，混匀，室温孵育 5 min。瞬时离心，静置 5 min，弃上清。向每管加入 200 μ L 80%乙醇，室温孵育 30 s，弃上清。开盖干燥 3-5 min，加入 22 μ L ddH₂O 洗脱，室温孵育 5 min。瞬时离心，静置约 5 min，取上清。

2.2.14 靶向色氨酸代谢组学流程

本研究采用靶向代谢组学的技术平台（UPLC-TQMS）定量检测生物样本中的色氨酸代谢物（Metabo-Profile, Shanghai, P. R. China）。

（1）标准曲线。将目标物标准品用 50%甲醇配制成 5.0 mg/mL 浓度的母液，并稀释得到不同浓度的标准样品，以用于生成标准曲线。

(2) 样品准备。为降低样品降解，首先在冰浴中解冻样本。称取 10 mg 组织样本放入 1.5 mL 离心管，加入氧化锆珠和 45 μ L 水，使用匀浆机匀浆 3 min。随后加入 300 μ L 含内标的提取液，组织样品再次匀浆 3 min。样品在 -20 $^{\circ}$ C 下进行 30 min 低温提取，之后在 4 $^{\circ}$ C、18000 g 条件下使用离心 20 min。转移 300 μ L 上清到新离心管中，在 4 $^{\circ}$ C 下离心干燥。向干燥样品中加入 100 μ L 0.1% 甲酸水溶液，以 300 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 条件振荡 10 min 后，再次在相同条件下离心 10 min。取 90 μ L 上清液转移到新的 96 孔板中，密封后准备进行 LC-MS 分析。

(3) 仪器设置。超高效液相色谱-串联质谱联用仪具体参数如下：

设置	参数
柱温 ($^{\circ}$ C)	40
样品管理器温度	10
流动相	A = 0.1% 甲酸水；B = 0.1% 甲酸乙腈
洗脱条件	0.1 min (1% B)，1-2 min (1-10% B)，2-4 min (10-30% B)，4-7 min (30-70% B)，7-7.8 min (70-99% B)，7.8-8.8 min (99-99% B)，8.8-9 min (99-1% B)，9-10 min (1% B)
流速 (mL/min)	0.40
注射体积 (μ L)	10.0
毛细管电压 (Kv)	3 (ESI+)，2.0 (ESI-)
源温 ($^{\circ}$ C)	150
脱溶剂温度 ($^{\circ}$ C)	550
脱溶剂气流 (L/Hr)	1000

(4) 质量控制。每批样本均包括试剂空白和混合质控样本，并同时处理。

(5) 样本检测顺序。为减少上样顺序可能导致的分析误差，待测样本将根据组别信息随机化处理，并在整体样本中交错穿插质控样本和空白样本以进行检测。

2.3 数据处理

2.3.1 转录组数据收集与预处理

通过美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 对人类 TC 的转录水平数据检索, 确定并收集了 GSE111455^[105], GSE29265^[106], GSE33630^[107], GSE53072^[108], GSE53157^[109], GSE65144^[110], GSE76039^[15], GSE82208^[111], GSE126698^[112]等 9 个 TC 相关数据集, 包括 67 例 ATC、22 例 PDTC、40 例 FTC 和 82 例 PTC。芯片数据的基因表达数据及样本信息通过 GEOquery 工具下载。利用 limma 软件^[113]对芯片的基因表达数据进行分位数标准化和 $\log_2$ 转换, 并使用 removeBatchEffect 函数进一步去除批次效应导致的数据偏差, 去批次后的数据被用于整合分析。RNA-seq 数据集的 FASTQ 文件从 NCBI 的 SRA 数据库下载。XenaBrowser 浏览器用于从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 中获取泛癌的标准基因表达的公开数据。

2.3.2 加权基因共表达网络分析

本研究从 ImmPort 数据库^[114]下载了免疫相关的基因集, 其包含抗原处理与呈递、趋化因子受体、趋化因子、细胞因子受体、细胞因子、TNF 家族受体等 17 种不同的免疫相关分子。代谢基因集下载自 KEGG 数据库, 共包括 95 条代谢通路。基于收集的免疫和代谢基因集对去除批次后的数据进行加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 分析。首先, 使用 Pearson 相关系数方法计算基因对之间的相关性 r 构建相似性矩阵:

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}},$$

其中, x_i 和 y_i 是两个基因在不同样本中的表达水平, $\bar{x}$ 和 $\bar{y}$ 是两个基因的平均表达水平。采用合适的软阈值将相关性转换为邻接矩阵, 邻接度 a_{ij} 计算公式为:

$$a_{ij} = |r_{ij}|^\beta,$$

其中, $|r_{ij}|$ 是基因 i 和 j 之间的绝对 Pearson 相关系数, β 是软阈值参数, 用于强调强相关并较少噪声。通过计算基因对之间的拓扑重叠度, 进一步强化模块内基因间的关联, 将邻接矩阵转换为拓扑重叠矩阵 (topological overlap matrix, TOM)。拓扑重

叠度 TOM_{ij} 的计算通常由以下公式给出：

$$TOM_{ij} = \frac{l_{ij} + a_{ij}}{\min(k_i, k_j) + 1 - a_{ij}},$$

其中， l_{ij} 是基因*i*和*j*的邻接基因的连接总和， k_i 和 k_j 是基因*i*和*j*的邻接基因的度（即连接数）。基于 TOM 使用层次聚类识别共表达模块。根据主成分分析，选择每个模块的第一主成分用于代表该模块的表达，分析模块与表型特征之间的相关性，确定与生物学特征显著相关的模块。

2.3.3 机器学习数据分割

选择样本量最大的 GSE33630 作为训练集，使用 GSE53157、GSE29265、GSE12669 以及整合后的 GSE111455、GSE53072、GSE65144、GSE76039、GSE82208 作为验证集。对每个数据进行缩放和标准化处理，保证训练集和验证集之间的一致性以及不同数据集之间的可比性。

2.3.4 特征筛选和模型构建

特征筛选方面，利用 WGCNA 选定的模块作为基础，通过 caret (<https://CRAN.R-project.org/package=caret>) 软件的 findCorrelation 函数评估变量之间的相关性，筛选具有高相关性系数的变量并删除，减少特征冗余。为开发具有高精度和稳定性的模型，本研究基于留一法交叉验证（leave-one-out cross-validation, LOOCV）框架，对 6 种不同的机器学习算法，共 15 种组合模型进行评估。特征选择采用最小绝对收缩和选择算子（least absolute shrinkage and selection operator, LASSO）、随机森林（randomforest, RF）和支持向量机（support vector machine, SVM）的递归特征消除（recursive feature elimination, RFE）方法进行特征选择。随后的模型构建中，整合 LASSO、RF、SVM、有监督的主成分分析（supervised principal components, SuperPC）、梯度提升机（gradient boosting machine, GBM）、弹性网络（elastic network, Enet）多种算法。特征选择过程和模型构建通过 caret 包实现。在训练集和验证集中采用受试者工作特征曲线下面积（area under curve, AUC）作为评估指标，以衡量模型的诊断效能，选择最佳组合，建立最终模型。最后，通过 RF 筛选得到的 167 个特征基因被应用于 superPC 算法，得到表征样本分化状态的去分化程度评分（dedifferentiation

degree score, DDScore)。

2.3.5 基因表达差异分析

针对 RNA-seq 数据,使用 DESeq2^[115]进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)分析。DESeq2 基于负二项分布,通过估计基因表达的方差和均值间的关系,获得差异表达的基因。芯片数据使用 limma 包^[113]进行差异分析。Limma 是一个广泛用于芯片数据分析的工具,通过拟合线性模型和经验贝叶斯方法来鉴定差异表达的基因。DEGs 筛选标准为 $|\log_2 \text{fold change}|$ 大于等于 1 且 P 值小于 0.05。

2.3.6 富集分析

使用 R 包 clusterProfiler (v4.6.2)^[116]进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析,识别与特定基因表达变化相关的生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)。基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)根据在不同生物学条件下的表达变化对所有基因排序,确定特定基因集在排序表中是否统计显著地富集在排名靠前(或靠后)的基因中。GSEA 考虑所有基因的表达变化,无需依赖于任何基因表达阈值,有助于揭示特定条件或表型下调控的生物过程或通路。单样本 GSEA(single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)是 GSEA 的扩展。ssGSEA 通过计算富集得分,在单个样本中量化特定基因集的活性或表达水平,本研究通过 ssGSEA 以评估不同类型样本的功能差异。

2.3.7 生存分析

采用 Kaplan-Meier 方法探究不同分组的生存概率随时间的变化趋势。采用 Log-rank 检验比较不同组之间的生存曲线,判断各组生存时间的整体分布是否存在显著差异。基于 R survival 软件的单因素和多因素 COX 回归被用于分析变量对生存的影响。计算每个肿瘤类型的风险比率(hazard ratio, HR)及 95%置信区间和 P 值,用于识别与生存期显著相关的因素。

2.3.8 免疫浸润水平分析

应用软件 xCell^[117]工具, 利用一组经验性确定的基因集, 对种不同的免疫细胞类型进行鉴定, 得到包含每种细胞类型相对丰度的评分。xCell 免疫浸润分析方法是一种依赖基因表达模式来评估组织中免疫细胞浸润的方法, 广泛应用于从 RNA-seq 或芯片数据中分析肿瘤微环境。xCell 计算得到的评分反映免疫细胞浸润的程度及其在肿瘤微环境中的相对比例。TCGA 的 H&E 图像数据下载自近期的文献报道^[118]。

2.3.9 拟时序分析

为从静态的 RNA-seq 数据中推断细胞状态的动态变化, 本研究在芯片数据中使用 monocle2 进行拟时序分析。对芯片数据进行标准化处理, 去除技术噪声和非生物学变异。使用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 等方法降低数据维度, 以便更有效地识别和可视化细胞状态。根据样本的转录特征对样本进行排序, 模拟它们在生物过程中的时间顺序。最后根据排序结果, 推断样本状态转换的可能路径和分支。

2.3.10 Compass 分析

Compass^[104]基于单细胞 RNA 测序和通量平衡分析 (Flux Balance Analysis, FBA) 的算法来表征细胞的代谢状态。Compass 通过收集和分析大量的 RNA-seq 数据, 将 scRNA-seq 数据与先验的代谢网络知识相结合, 模拟代谢网络中的代谢物流动, 进而推断细胞在不同条件下的代谢状态。本研究使用 Compass 软件结合 Recon2 数据库探索 TC 的代谢状态。Recon2 数据库包括 1733 个基因、5063 个代谢物共 14880 个反应, 涵盖多个代谢过程。Compass 计算步骤如下: 首先, 独立于基因表达数据, Compass 计算每一个反应 r 所能承载的最大通量: v_r^{opt} 。通过分配与催化该反应的酶相关的 mRNA 表达成反比的惩罚值, Compass 对每个样本中的每个反应分配一个“惩罚分数”, 表示该反应不太可能发生的程度。对于每个样本和每个反应, Compass 都会找到一种通量分布, 最大限度地减少总体罚分, 同时保持通量至少为 $\omega \cdot v_r^{opt}$, 最后得到对每个样本代谢状态的定量分析, 即 Compass 的分数矩阵。通过对分数矩阵进行缩放以及取相反数, 将反应惩罚分数转换为反应活性分数, 最终得到的分数越大, 表

明其潜在活性越大。

2.3.11 核心代谢反应和元反应

根据 Recon2 的置信度评分和催化反应酶的酶学委员会 (Enzyme Commission, EC) 编号, 将 Recon2 的反应分为核心代谢反应和非核心代谢反应。Recon2 中的置信度为 0 或 4 且被注释有 EC 编号的反应被定义为核心代谢反应, 并过滤掉柠檬酸循环系统中位于线粒体之外的反应。相似的代谢反应通过无监督的层次聚类被合并为元反应 (meta-reactions), 包含至少一个核心代谢反应的元反应定义为核心代谢。元反应被用于 Compass 下游的差异代谢通路分析及表型的相关性分析。

2.3.12 差异代谢通路分析

使用未配对的 *wilcoxon* 检验, 对每组样本的每个综合反应计算 Compass 评分的秩和。进一步使用 Cohen's *d* 评估效应大小, Cohen's *d* 定义为两组样本均值之差除以总样本标准差:

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s},$$
$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}},$$

其中, n_1 、 x_1 、 s_1 分别为分组 1 中的观测值, 以及在给定综合反应中分数的样本均值和标准差。用 Benjamini-Hochberg (BH) 校正方法校正所得 *P* 值 (P_{adj})。如果 P_{adj} 小于 0.1, 则被认为是具有活性差异的反应。

2.3.13 转录因子活性分析

为鉴定样本中的关键调控因子, 本研究选取 DoRothEA^[119]收集的人类转录因子-靶基因数据, 并筛选靶基因超过 20 个基因的转录因子, 进一步通过 *viper* (Virtual Inference of Protein activity by Enriched Regulon)^[120]推断其蛋白质活性。*viper* 专注于由特定蛋白直接调控的基因表达, 如转录因子 (transcription factor, TF) 等。使用 TF 调控的基因作为准确推断 TF 活性的依据。*viper* 算法通过分析给定的表达数据和调控网络获得转录因子活性评分。TF-靶基因调控网络由基于 Java 平台的 ARACNe 构建。

2.3.14 调控元件特异性评分计算

基于熵的策略来量化每组样本中转录因子的特异性^[121]。首先，使用 $P^R = (P_1^R, \dots, P_n^R)$ 来表示在样本群体中调控元件活性评分（Regulon Activity Score, RAS）的分布（其中 n 是样本总数）。对 RAS 进行归一化处理，使得 $\sum_{i=1}^n P_i^R = 1$ 。使用向量 $P^C = (P_1^C, \dots, P_n^C)$ 来表示是否属于特定的样本类型（若 $P_i^C = 1$ ，则属于；若 $P_i^C = 0$ ，则不属于）。 P^C 同样进行归一化处理，以确保 $\sum_{i=1}^n P_i^C = 1$ 。最后通过改进的詹森-香农发散（Jensen-Shannon Divergence, JSD）来计算两个概率分布之间差异的指标，JSD 定义为：

$$JSD(P^R, P^C) = H\left(\frac{P^R + P^C}{2}\right) - \frac{H(P^R) + H(P^C)}{2}$$

$H(P) = \sum P_i \log(P_i)$ 表示概率分布 P 的香农熵。JSD 值的范围在 0 到 1 之间，0 表示分布相同，1 表示极端差异。最后，调控元件的特异性评分（Regulon Specificity Score, RSS）通过将 JSD 转换为相似性评分来定义：

$$RSS(R, C) = 1 - \sqrt{JSD(P^R, P^C)}$$

对 RSS 排序，得到每组样本特异性的转录因子。

2.3.15 RNA-seq 数据比对

高通量测序仪生成的图像数据通过 CASAVA 软件进行碱基的识别和转换，从而得到序列数据（即 reads）。数据以 FASTQ 格式存储，包括了测序片段的序列及其相应的质量评分信息。使用 FastQC（<https://github.com/s-andrews/FastQC>）进行质量控制，Trim Galore（https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/）用以过滤低质量的读段并去除可能的接头序列。使用参数为 Trim Galore 默认参数。经过预处理的高质量 reads 随后使用 STAR（spliced transcripts alignment to a reference）^[122] 比对器进行比对。参考基因组下载 GeneCards^[123]。STAR 是一种高效的比对工具，能够精准地将 RNA-seq 数据比对到人类参考基因组 hg38 上。具体参数为 `--quantMode TranscriptomeSAM --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --outFilterType BySJout --outFilterMultimapNmax 20 --alignSJoverhangMin 8 --alignSJDBoverhangMin 1 --outFilterMismatchNmax 999 --outFilterMismatchNoverLmax 0.04 --alignIntronMin 20 --`

alignIntronMax 1000000 --alignMatesGapMax 1000000 --chimSegmentMin 20。使用 RSEM^[124]通过计算每百万转录本数目（Transcripts Per Million, TPM）标准化值来量化基因和转录本的表达水平。

2.3.16 CUT&Tag 数据分析

①数据预处理：使用 FastQC 进行对测序数据进行质量控制，确保 reads 的质量达到分析要求。使用 Trim Galore 工具进行序列剪切，去除低质量的 reads 和接头序列。②reads 对齐：使用 Bowtie2^[125]将处理后的 reads 对齐到参考基因组（hg38）。对齐参数设置为默认值，确保高质量的比对结果。对齐后生成 BAM 文件，并使用 Samtools^[126]对 BAM 文件进行排序和索引，同时去除非特异性映射、重复映射的读段。③reads 数量标准化：使用 DeepTools 中的 bamCoverage 工具，将 BAM 文件转换为 bigWig 格式，以便进行覆盖率的计算和可视化。选择 RPKM、标准化以确保不同样本之间的可比性。使用 DeepTools 中的 computeMatrix 工具计算基因组特定区域的覆盖率。④peak calling：使用 MACS2 进行 peak calling，以识别基因组中的显著富集区域。设置合适的 q 值（0.01）作为阈值，以确保 peak 的显著性。MACS2 生成的 narrowPeak 文件被用于后续分析。

3 结果

3.1 利用机器学习量化甲状腺癌去分化程度

免疫调控和代谢重编程在 TC 的进展中发挥着关键作用^[127, 128]，但关于这些生物学途径如何影响 TC 分化状态的研究仍相对有限。鉴于此，本研究探讨了不同分化状态下 TC 样本中免疫和代谢基因的表达模式。

3.1.1 WGCNA 筛选与去分化高度相关的模块

本研究首先从 GEO 数据库中收集了 TC 的基因表达数据。鉴于 ATC 样本的稀缺性，本研究在进行尽可能全面的搜索后，纳入以下 8 个 TC 的芯片数据集进行整合分析（表 3-1）。

表 3-1 本研究纳入的甲状腺癌芯片数据集

GSE Number	Platform	Species	Used in This Study	Ref
GSE111455	GPL23126	Homo sapiens	3 FTC	[105]
GSE29265	GPL570	Homo sapiens	9 ATC, 20 PTC	[106]
GSE33630	GPL570	Homo sapiens	11 ATC, 49 PTC	[107]
GSE53072	GPL6244	Homo sapiens	5 ATC	[108]
GSE53157	GPL570	Homo sapiens	5 PDTC, 7 PTC, 4 FTC	[109]
GSE65144	GPL570	Homo sapiens	12 ATC	[110]
GSE76039	GPL570	Homo sapiens	17 PDTC, 20 ATC	[15]
GSE82208	GPL570	Homo sapiens	27 FTC	[111]

* FTC：甲状腺滤泡状癌，ATC：甲状腺未分化癌，PTC：甲状腺乳头状癌，PDTC：甲状腺低分化癌

为确保在整合多个芯片数据集时能够准确识别样本间的真实生物学差异，本研究使用主成分分析（principal component analysis, PCA）方法检查各数据集之间是否受到批次效应的干扰。结果显示，样品依照数据集而非样本类型聚集在一起，存在明显的批次效应（图 3-1 A）。因此，在保留组间差异的同时，本研究对上述 8 个芯片

数据进行了批次效应的校正（图 3-1 B）。经过校正处理后，数据集之间无明显的批次效应，确保了后续综合分析的可靠性。

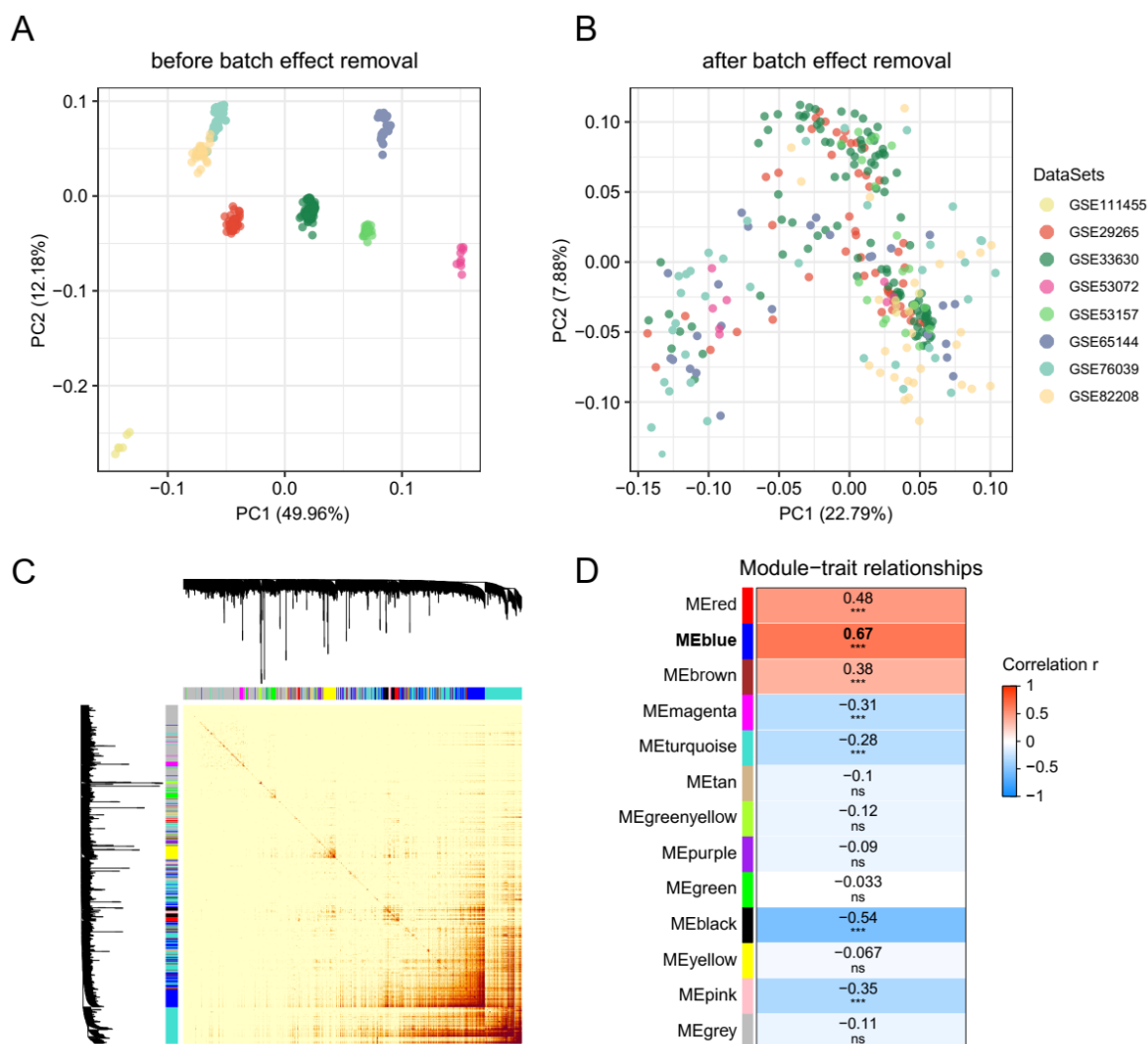


图 3-1 甲状腺癌数据集整合和 WGCNA 模块识别

（A）TC 芯片数据集 PCA 降维结果。图中点代表样本，不同颜色代表不同数据集。横轴（PC1）和纵轴（PC2）分别代表对样本差异贡献最大的前两个主成分，坐标值表示样本在这两个主成分上的投影值，百分比表示该主成分对总体方差解释的百分比。（B）去除批次效应后的 PCA 降维结果，与（A）图类似。（C）拓扑重叠矩阵热图展示共表达网络中每对节点之间的相似性或连接强度。热图颜色越深表示拓扑重叠程度越高，深色区域形成明显的模块。聚类树表示节点间的层级关系。（D）不同模块与 TC 分化状态相关热图。其中，每个单元格表示一个特定模块与 TC 分化状态的相关性，颜色代表皮尔逊（Pearson）相关系数 r 的大小，数值为具体的 r 值。Pearson 相

关性检验, P 值经 Benjamini–Hochberg (BH) 校正 ($\text{adjust } P, P_{\text{adj}}$), ns: $P_{\text{adj}} \geq 0.05$, *** $P_{\text{adj}} < 0.001$ 。

考虑到免疫和代谢途径在肿瘤进展中的重要性, 本研究从 ImmPort^[114]和 KEGG^[129]数据库中收集了免疫和代谢相关基因集。基于上述基因集, 对去批次后的数据进行加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA), 以探究与 TC 去分化相关的免疫和代谢基因。通过 WGCNA 构建的基因共表达网络, 可将免疫和代谢相关基因聚类为 13 个不同的模块 (图 3-1 C), 每个模块由功能上相互关联的免疫和代谢基因组成。进一步分析发现, 蓝色模块 (MEblue) 与分化状态密切相关 (皮尔逊相关系数 $r=0.67$, $P_{\text{adj}} < 0.001$) (图 3-1 D), 最后从该模块得到 418 个与分化状态相关的免疫和代谢基因。

3.1.2 筛选最优机器学习模型

随着测序技术的快速发展, 开发用于识别和量化肿瘤去分化程度的计算工具对准确描绘肿瘤的特征至关重要。因此, 本研究提出一种量化 TC 去分化程度的策略。该策略以 WGCNA 所识别的 418 个基因为基础, 结合多种特征筛选和模型训练方法, 通过评估不同机器学习模型组合在区分低/未分化型 (PDTC 和 ATC) 与分化型 (PTC 和 FTC) TC 方面的性能, 选择最优的模型组合并为每个样本定义去分化程度评分 (dedifferentiation degree score, DDScore)。整体流程如图 3-2 所示。

首先, 本研究对所收集的数据集进行分割。使用包含不同分化状态的 TC 数据集 GSE33630 (11 ATC, 49 PTC) 作为训练集, 并将 GSE53157 和 GSE29265 作为测试集 1 和测试集 2。合并仅含有分化型 TC 或低/未分化型 TC 的数据集, 作为测试集 3 (图 3-2 A)。

随后, 本研究使用递归特征消除 (recursive feature elimination, RFE) 方法, 结合随机森林 (random forest, RF)、最小绝对收缩和选择算子 (least absolute shrinkage and selection operator, LASSO) 以及支持向量机 (support vector machines, SVM) 算法进行特征筛选 (图 3-2 B)。RFE 使用所有特征进行模型训练, 并在评估每个特征的重要性后, 去除权重最小的特征。之后使用剩余特征重复模型训练和特征移除过程, 直到达到预定的特征数量, 从而有效地识别出最为关键的特征子集, 用于后续分析。

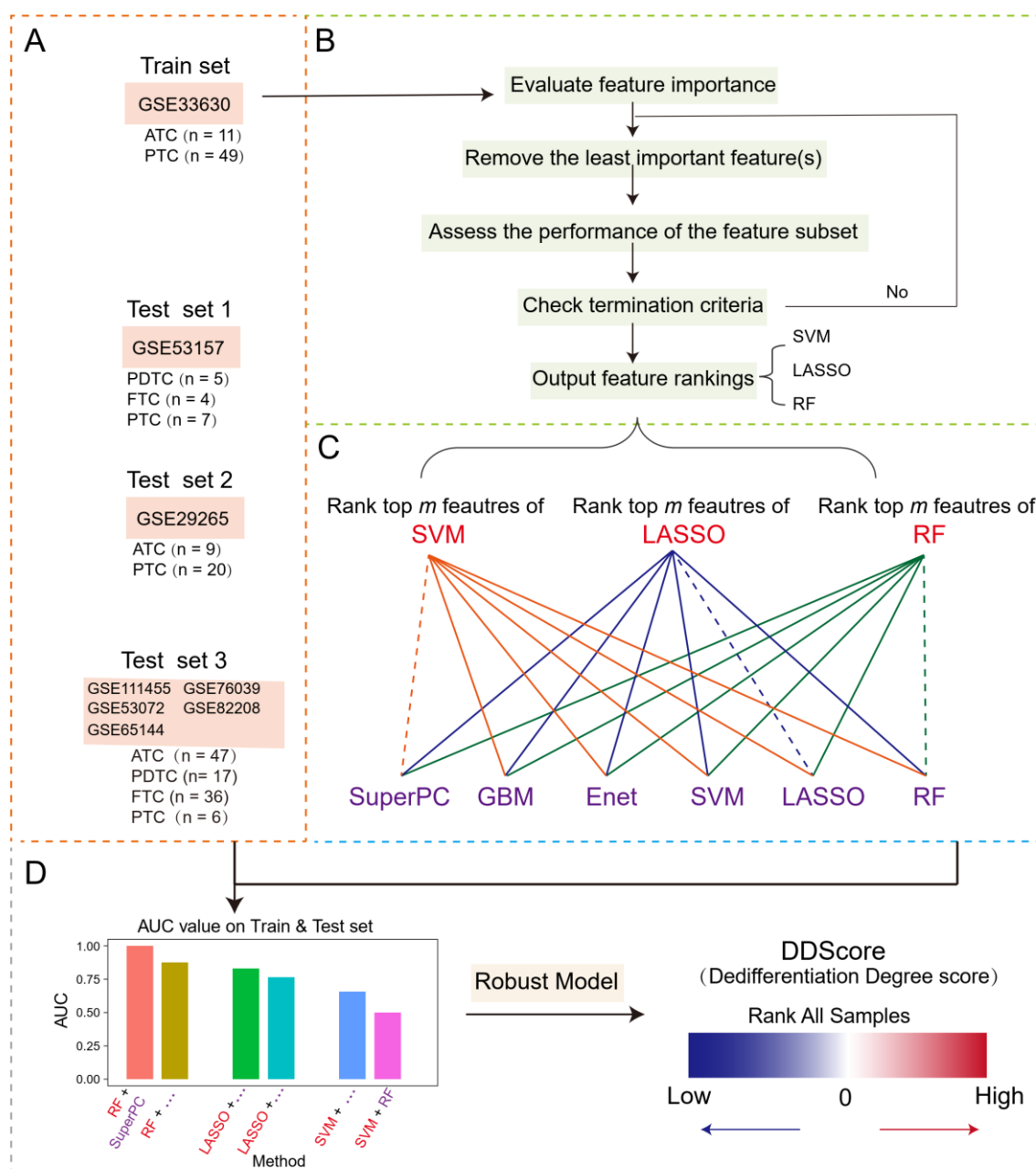


图 3-2 机器学习流程图

(A) 机器学习数据分割、(B) 特征筛选、(C) 模型训练以及 (D) 最优模型选择流程图。RFE: recursive feature elimination, 递归特征消除; RF: random forest, 随机森林; LASSO: least absolute shrinkage and selection operator, 最小绝对收缩和选择算子; SVM: support vector machines, 支持向量机; Enet: elastic net, 弹性网络; GBM: gradient boosting machine, 梯度提升机; superPC: supervised principal component, 监督主成分。

基于筛选得到的特征基因，本研究使用 RF、LASSO、SVM、梯度提升机 (gradient boosting machine, GBM) 以及监督主成分 (supervised principal component, superPC) 等 5 种机器学习算法构建模型 (图 3-2 C)，通过将不同的特征筛选算法与上述算法相结合，获得 15 种不同的算法组合。

最后，本研究利用留一法交叉验证 (leave-one-out:cross-validation, LOOCV) 策略，对模型的泛化能力进行评估。通过比较训练集及测试集中各模型的曲线下面积 (area under curve, AUC)，确定最优的特征筛选和模型训练组合 (图 3-2 D)，并成功构建表征样本去分化程度的 DDScore。通过设定 0 为截断值，样本被分为高 DDScore ($\text{DDScore} \geq 0$ ，分化程度低) 和低 DDScore ($\text{DDScore} < 0$ ，分化程度高) 组。

结果表明，多个模型均展现出良好的预测效果 (图 3-3)。其中，RF 和 superPC 的组合性能最佳，其 AUC 在各数据集中均超过 0.85。因此，通过 RF 筛选获得的 167 个特征基因 (附表 1)，结合 superPC 的组合被确定为最优模型。

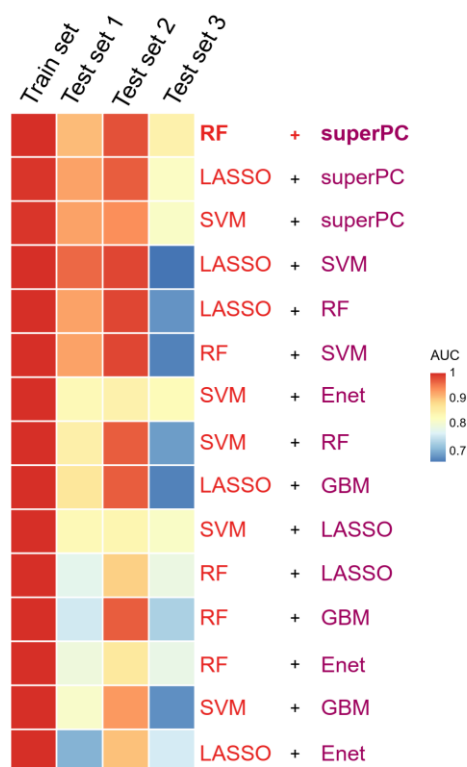


图 3-3 不同机器学习模型组合性能比较

不同的特征筛选（红色字体）及模型训练（紫色字体）组合在训练集和测试集上的 AUC 值，并按照每种组合在训练集和测试集中的 AUC 均值大小进行排序。

为深入了解 167 个特征基因的生物学功能，本研究对其进行 GO 富集分析（图 3-4 A）。GO 富集结果表明，RF 特征筛选得到的基因参与多种代谢过程，如脂肪酸、糖类和氨基酸的代谢等。同时还涉及免疫反应的调节过程（如 T 细胞的凋亡）。定位在内质网和高尔基体区域的特征基因可能与肿瘤内蛋白质的分泌和加工有关，这一过程对于细胞外基质的重塑和 TME 的调节至关重要。此外，特征基因中的唾液酸转移酶 *ST3GAL1*，可使细胞膜上糖蛋白发生唾液酸化，从而影响细胞间的相互作用和信号传递^[130]。

根据 RF 得到的重要性分数对特征基因进行排序，并计算其参与的 GO 类别的比例。结果显示，特征基因主要涉及与细胞生物学功能相关的过程（图 3-4 B），排名前 20 的特征基因和肿瘤进展存在密切联系（图 3-4 C）。例如，相关性分析结果表明 *AKI* 与 DDScore 负相关（ $r = -0.6$, $P_{adj} < 0.001$ ）。而此前有研究指出，在小鼠胚胎成纤维细胞向肿瘤细胞转化的过程中，*AKI* 的表达显著下降^[131]。这一发现说明 *AKI* 可能在正常细胞的状态和功能维持中起重要作用，其表达的减少与正常细胞向恶性状态的转变有关。糖基转移酶 *ST3GAL1* 与 DDScore 呈现负相关性（ $r = -0.52$, $P_{adj} < 0.001$ ）。已有研究报道 *ST3GAL1* 下调与 TC 的低分化状态有关^[132]。与之相反，*PDHX*（ $r = 0.35$, $P_{adj} < 0.001$ ）、*SQLE*（ $r = 0.64$, $P_{adj} < 0.001$ ）、*DNMT1*（ $r = 0.57$, $P_{adj} < 0.001$ ）与 DDScore 呈显著正相关。在食管鳞状细胞癌中，*PDHX* 的表达对于维持丙酮酸脱氢酶活性和 ATP 的生产至关重要，其在肿瘤干细胞增殖和肿瘤生长过程中起抑制作用^[133]。*SQLE* 作为胆固醇合成的关键酶，在胰腺癌^[134]和肝癌^[135]中显著上调，与患者的不良预后和转移密切相关。另外，有研究表明 *DNMT1* 主要在未分化的细胞中富集，去除 *DNMT1* 会导致细胞分化并脱离祖细胞状态，提示 *DNMT1* 在肿瘤细胞保持其干细胞样特性和抑制其分化过程中发挥着关键作用^[136]。

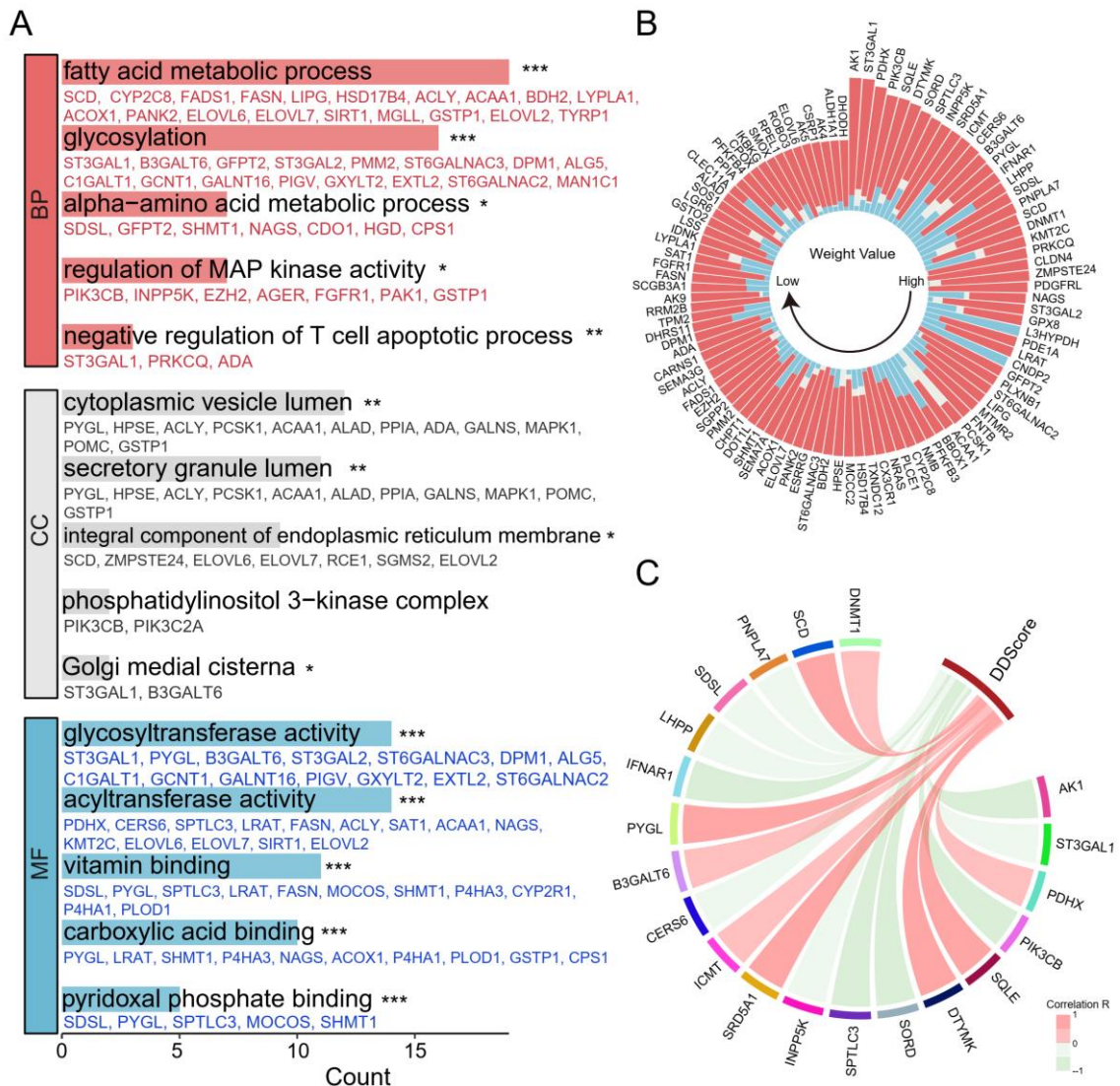


图 3-4 免疫、代谢特征基因功能分析

(A) 167 个特征基因的 GO 富集分析结果，包括生物过程（biological process, BP）、细胞组分（cellular component, CC）和分子功能（molecular function, MF）三个类别。横轴代表富集到每个通路的基因数目，并详细列出了每个通路中涉及的特征基因。(B) 展示了基于随机森林模型特征重要性得分排名前 100 的基因，以及这些基因在 GO 富集分析的三个类别中的出现频率。红色代表 BP 通路，灰色代表 CC 通路，蓝色代表 MF 通路，其中基因根据其特性重要性得分进行排序。(C) 基于随机森林模型特征重要性得分排名前 20 的基因与 DDScore 之间相关性的环形图。图中弦的颜色代表皮尔逊相关系数，绿色为负相关，红色为正相关。

3.2 去分化程度评分的稳健性

3.2.1 去分化程度评分在不同技术平台甲状腺癌数据中的稳健性

上述结果表明,本研究所开发的模型在多个芯片数据集上展现出优越的性能。而随着新一代高通量测序技术的快速发展, RNA-seq 已成为研究基因表达的重要手段。因此,本研究进一步利用所构建的模型对 TC 的 RNA-seq 数据 GSE126698^[112]进行评估。通过比较高、低 DDScore 组的特征基因表达模式,本研究发现,无论在芯片还是 RNA-seq 数据中,高 DDScore 与低 DDScore 的样本在免疫和代谢特征基因的表达模式上均存在明显差别,且高 DDScore 组主要包含未分化的 ATC 样本(图 3-5),提示本研究所建立的模型在不同技术平台上具有较高的一致性。

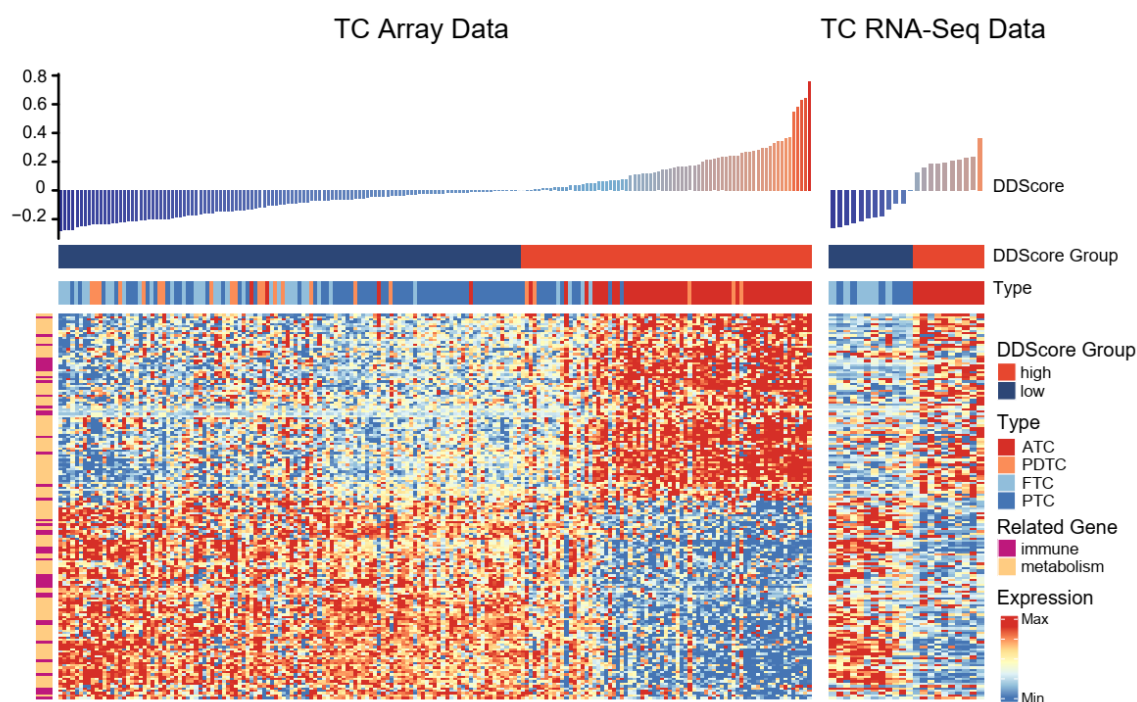


图 3-5 芯片和 RNA-seq 数据中特征基因表达模式一致性

条形图为每个样本的 DDScore。热图展示 TC 的芯片和 RNA-seq 数据中特征基因的表达水平,红色代表高表达,蓝色代表低表达。并对每个样本所属的 DDScore 分组以及 TC 的具体类型进行注释。基因按其功能类型进行了标注,紫色为免疫相关基因,黄色为代谢相关基因。

在芯片和 RNA-Seq 数据的研究基础上,本研究进一步整合来自 ATC 和 PTC 的单细胞 RNA 测序数据 GSE148673^[137]和 GSE184362^[138],以探究 DDScore 在单细胞

数据中的应用情况。通过计算每个样本内所有细胞的 DDScore 并计算其均值以代表该样本的 DDScore, 本研究评估了 DDScore 在区分 ATC 与 PTC 上的效果(图 3-6)。受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析结果显示, DDScore 在单细胞数据中可准确区分 ATC 和 PTC 样本(AUC=0.824), 进一步提示 DDScore 可作为评估 TC 去分化程度的可靠指标。

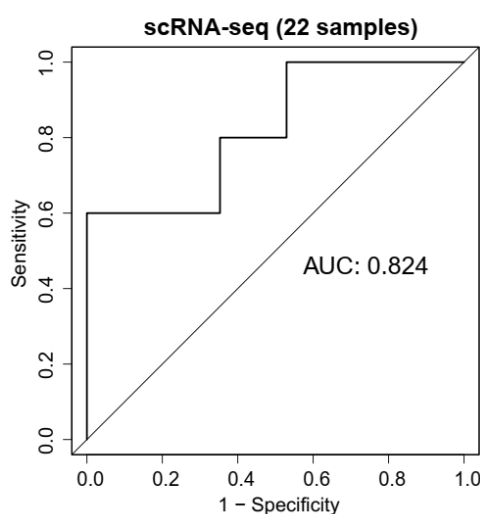


图 3-6 DDScore 在单细胞数据中的性能

ROC 曲线展示了 DDScore 在单细胞数据集中区分 ATC 样本($n=5$)和 PTC 样本($n=17$)的性能。根据曲线位置将图划分成两部分, 曲线下方的面积即为 AUC, 表示预测准确性, AUC 值越高, 预测准确率越高。横轴为 1-特异性, 也称假阳性率, 横轴越接近零, 准确率越高; 纵轴为敏感度, 也称为真阳性率, 纵轴值越大代表准确率越高。

此前研究指出, 约 70%具有远处转移的分化型 TC 中, 肿瘤细胞表现出形态和功能上的退行性改变, 丧失摄碘能力, 并失去其分化表型^[139, 140]。基于这一发现, 本研究收集了 PTC 原发肿瘤及其相关转移样本的数据(表 3-2)。

表 3-2 PTC 原发肿瘤和转移样本数据集

GSE Number	Platform	Species	Used in This Study	Ref
GSE66463	GPL6244	Homo sapiens	6 PTC, 2 PTC brain metastasis	[141]
GSE202413	RNA-seq	Homo sapiens	3 PTC, 3 lymph node metastases	[142]
GSE151179	GPL23159	Homo sapiens	17 PTC, 22 lymph node metastases	[143]
GSE129879	GPL15207	Homo sapiens	3 PTC, 3 PTC with metastasis	[144]
GSE60542	GPL570	Homo sapiens	11 PTC, 17 nodal metastases	[145]
TCGA	RNA-seq	Homo sapiens	258 N0 PTC, 254 N1 PTC	[98]

通过计算所收集数据集的 DDScore, 本研究观察到脑转移和淋巴结转移样本的 DDScore 普遍高于原发肿瘤样本 (GSE66436 $P < 0.001$, GSE202413 $P < 0.05$, GSE60542 $P < 0.01$, 图 3-7 A)。该结果与以往研究相吻合^[139, 140], 即转移的分化型 TC 去分化程度更高, 显示 DDScore 作为评估肿瘤去分化程度的可靠性。需要指出的是, 尽管在 GSE151179 和 GSE129879 数据集中, 样本间的差异并不显著 ($P > 0.05$), 但转移样本仍展现出 DDScore 高于原发肿瘤的趋势。此外, 对 TCGA 中分化型 TC 样本的分析结果表明, 与无淋巴结转移(N0)的样本相比, 存在区域淋巴结转移(N1)的样本具有更高的 DDScore ($P < 0.05$, 图 3-7 B)。这些结果进一步展示了 DDScore 在评估 TC 去分化过程中的价值。

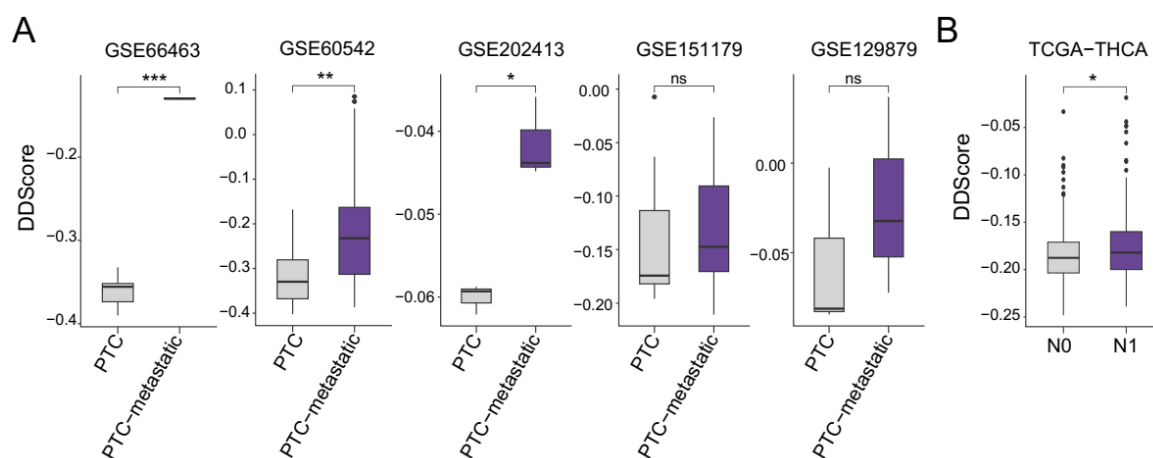


图 3-7 高分化甲状腺癌原发与转移样本的 DDScore 差异

(A) 5 个独立数据集中 PTC 原发肿瘤样本与转移样本的 DDScore 比较。离群点以单独的点标

示。(B) TCGA 中分化型 TC 原发肿瘤与转移样本的 DDScore 比较。 t 检验, ns: $P \geq 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

已有研究根据 16 个关键的甲状腺代谢及功能基因的表达水平, 构建了甲状腺分化打分 (thyroid differentiation score, TDS), 用以量化 TC 的分化状态^[146]。同时, 昼夜节律相关基因 (circadian rhythm genes, CRGs) 也被视为 ATC 恶性进展的动态标志^[147], 而基于 68 个免疫相关基因 (immune-related genes, IRGs) 的风险评分模型可用于确认 TC 的分化状态^[148]。此外, 多项研究探讨了单个基因 (如 *IGF2BP1*^[112] 和 *E2F7*^[149]) 在识别 ATC 中的应用潜力。因此, 本研究比较了 DDScore 与上述已发表研究中的指标在区分低/未分化 TC 与分化型 TC 中的性能。结果显示, 在 RNA-seq 和芯片数据集中, DDScore 展现出最为卓越的性能, 其 AUC 在所有数据中均大于 0.8, 而其他指标未能达到此效果 (图 3-8), 该结果表明 DDScore 作为衡量 TC 去分化程度的工具的优越性。

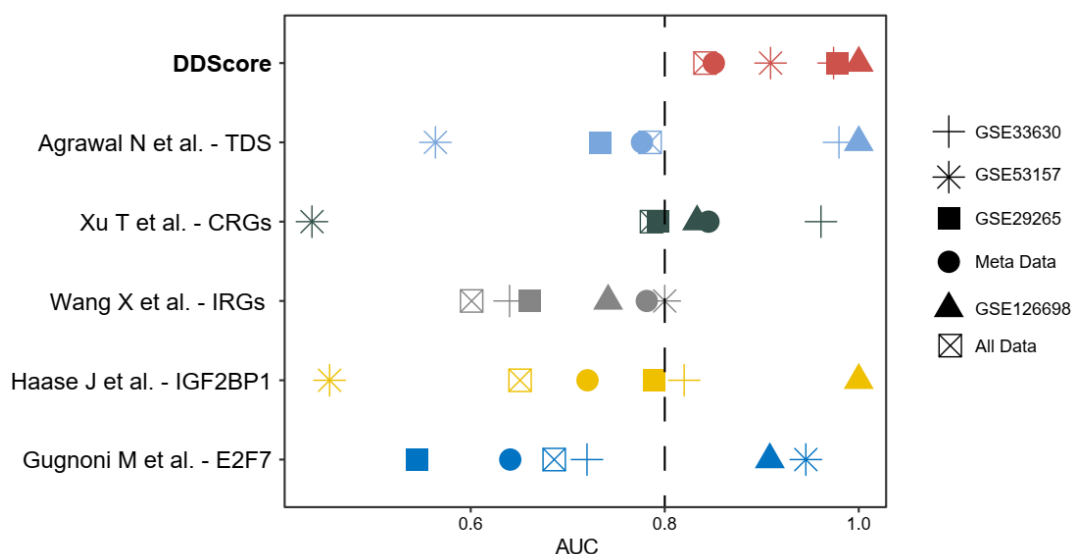


图 3-8 DDScore 与其他甲状腺癌分化指标的性能比较

通过 AUC 值比较不同指标在鉴别低/未分化型 TC 和分化型 TC 中的性能。纵轴为来自不同研究的指标, 横轴表示 AUC 值, 形状代表不同的数据集, 颜色代表不同的指标。其中 meta data 为合并了 GSE82208、GSE76039、GSE65144、GSE53072、GSE111455 后的数据集。meta data 中的各数据集仅含有低/未分化型 TC 或分化型 TC。all data 为包括芯片和 RNA-seq 在内的所有数据集, GSE126698 为 RNA-seq 数据集, 其余为芯片数据集。

本研究进一步探讨了 TCGA 数据中 DDScore 与患者预后之间的关系。由于 TCGA 中未包含 ATC 患者的样本，且 PTC 患者的生存期普遍较长，使得难以将患者总生存时间作为终点指标，因此本研究选择无病生存期（disease-free survival, DFS）进行分析。分析结果表明，较高的 DDScore 与较差的 DFS 有关（ $P=0.034$ ，图 3-9），表明基于 DDScore 的样本分层在预测 PTC 患者无病生存期方面的价值。

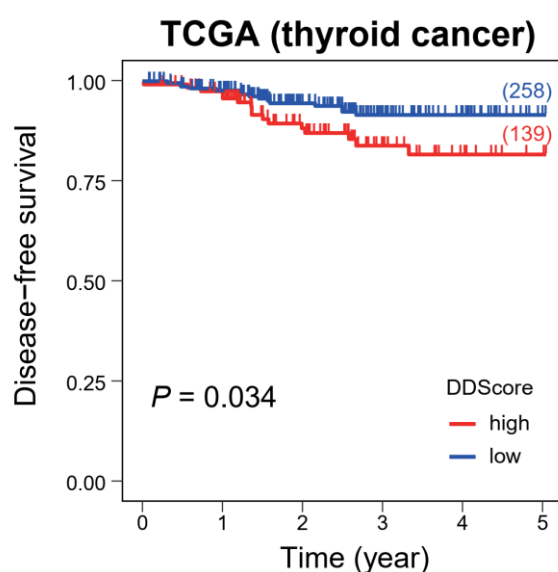


图 3-9 DDScore 在 TCGA 甲状腺癌数据中的预后价值

Kaplan-Meier(KM)曲线展示了将患者分为高、低 DDScore 两组后的无病生存期 DFS 对比情况，其中红色曲线为高 DDScore 组（139 个患者），蓝色曲线为低 DDScore 组（258 个患者）。横轴为观察时间，纵轴为生存率。左下角展示了基于对数秩检验（log-rank）得到的 P 值。

3.2.2 去分化过程伴随干细胞样特征

由于分化表型的丧失往往与祖细胞样或干细胞样特征相伴随，因此有研究将干性指数作为衡量肿瘤分化程度的指标^[150]。同时，既往研究将干细胞样基因表达特征与侵袭性肿瘤的低分化状态进行关联分析^[151]。基于此，本研究使用 GSEA 方法，分析了既往研究中鉴定的 15 个干性相关基因集在 TC 中的富集情况^[151-158]。结果显示，干性特征基因集在分化程度低的高 DDScore 组样本中显著富集（ $NES > 1$, $P_{adj} < 0.01$ ，图 3-10）。高 DDScore 组中多条癌症标志通路也显著上调，其中包括与肿瘤免疫逃逸和代谢密切相关的 MYC 靶标和糖酵解通路^[159]（ $NES > 1$, $P_{adj} < 0.01$ ）。

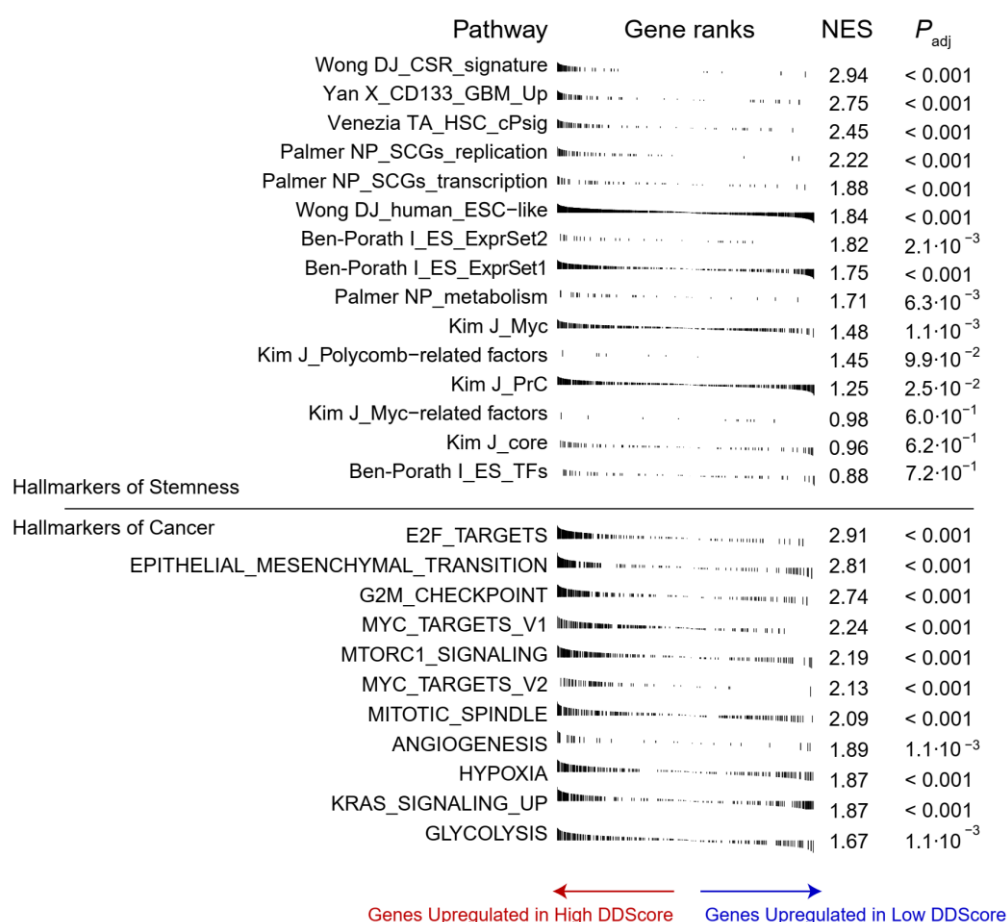


图 3-10 干性和肿瘤标志通路 GSEA 分析

GSEA 分析结果显示干性指标和肿瘤 hallmarks 通路在 TC 中的富集情况。横轴为按照 $\log_2$ 的差异倍数 ($\log_2$ fold change) 排序后的基因，左侧线段表示基因在高 DDScore 组上调，右侧为下调。标准化富集得分 (normalized enrichment score, NES) 用于衡量基因集在基因表达数据中的富集程度。 $|NES| > 1$, $P_{adj} < 0.1$ 的通路被认为是显著富集的通路。

拟时序分析可重建细胞沿着分化或其他生物学过程变化的“轨迹”。本研究将单细胞的拟时序分析方法应用于 TC 的芯片数据，观察 TC 去分化过程中的动态变化。拟时序分析的结果揭示，从低向高 DDScore 转变的过程中，干细胞标志基因 *MYC* 和 *POU5F1* 的表达水平呈现出逐渐上升的趋势 (图 3-11 A-C)。

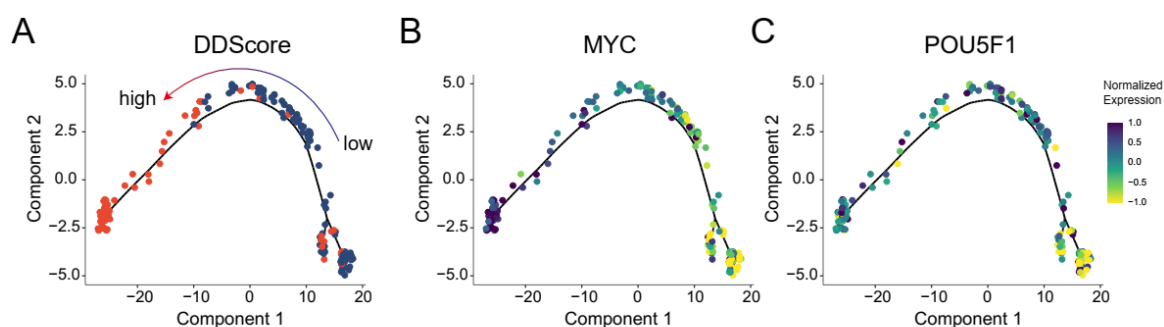


图 3-11 甲状腺癌去分化轨迹

(A) 使用拟时序分析得到的 TC 去分化路径。不同颜色的点代表了不同的分组，其中蓝色为低 DDScore 样本，红色为高 DDScore 样本。(B)、(C) 分别代表 *MYC*、*POU5F1* 在 TC 去分化过程中基因表达的动态变化。颜色代表经 z-score 标准化后的基因表达量。箭头方向指向去分化的方向。横轴和纵轴分别对应于降维的第一主成分和第二主成分。

3.2.3 去分化程度评分在泛癌中的应用

不同的肿瘤与相应起源的正常组织之间均展现出不同程度的差异，而这种差异程度通常反映了肿瘤的分化水平^[160, 161]。基于此，本研究从 TCGA 数据库中提取了 33 种肿瘤类型的约 10,000 个样本的基因表达数据，并计算每个样本的 DDScore，以探究 DDScore 在泛癌中的应用潜力。通过对比分析，本研究发现对照组织的 DDScore 显著低于肿瘤样本的 DDScore ($P < 0.001$ ，图 3-12 A)。这一显著差异与肿瘤和正常组织在分化水平上的差异相符合。进一步对 TCGA 数据进行分析的结果表明，随着肿瘤的进展，患者的 DDScore 呈上升趋势 ($P < 0.001$ ，图 3-12 B)。这些研究结果提示 DDScore 可在泛癌中准确反映样本的分化水平。

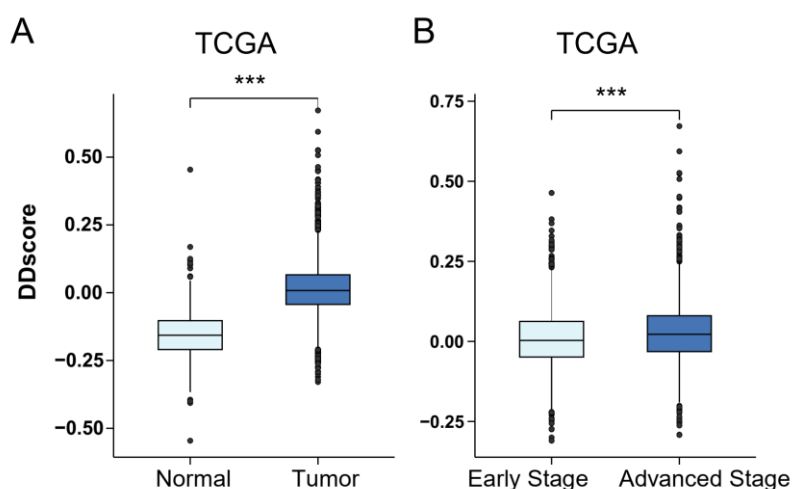


图 3-12 DDScore 在 TCGA 数据中的应用

(A) TCGA 33 种肿瘤的对照组织与肿瘤样本的 DDScore 比较。(B) TCGA 不同分期之间的 DDScore 比较。 t 检验, $***P < 0.001$ 。

随后, 本研究使用 DDScore 对已知分化状态的数据进行分析, 以进一步验证其在不同肿瘤类型中的应用潜力。为此, 本研究收集了含有分化状态信息的乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌等多个数据集 (表 3-3)。

表 3-3 本研究纳入的含 TNM 和分化信息的泛癌数据集

GSE Number	Platform	Species	Used in This Study	Ref
GSE4922	GPL96	Homo sapiens	249 breast cancer	[162]
GSE43580	GPL570	Homo sapiens	150 non-small cell lung cancer	[163]
GSE12630	GPL96	Homo sapiens	9 pan cancer	[164]
GSE22780	GPL570	Homo sapiens	8 pancreatic cancer	[165]
GSE45216	GPL4133	Homo sapiens	30 cutaneous squamous cell carcinoma	[166]

基于 ROC 曲线的分析结果显示, 本研究构建的模型在不同的肿瘤类型中仍具有一定的预测能力 (图 3-13 A)。特别是在区分高度恶性的低/未分化肿瘤和分化良好的肿瘤方面, DDScore 表现出了卓越的性能 (GSE4922 AUC = 0.934; GSE43580 AUC = 0.952)。然而, 在样本量较小的数据集上验证模型性能时, DDScore 的表现略显不足。同时, 通过对比多个数据集中不同分化程度样本的 DDScore, 本研究发现低/未

分化肿瘤样本的 DDScore 普遍高于高分化样本（图 3-13 B）。上述结果与本研究在 TC 中的发现相吻合，进一步提示 DDScore 在表征样本去分化程度方面的可靠性。

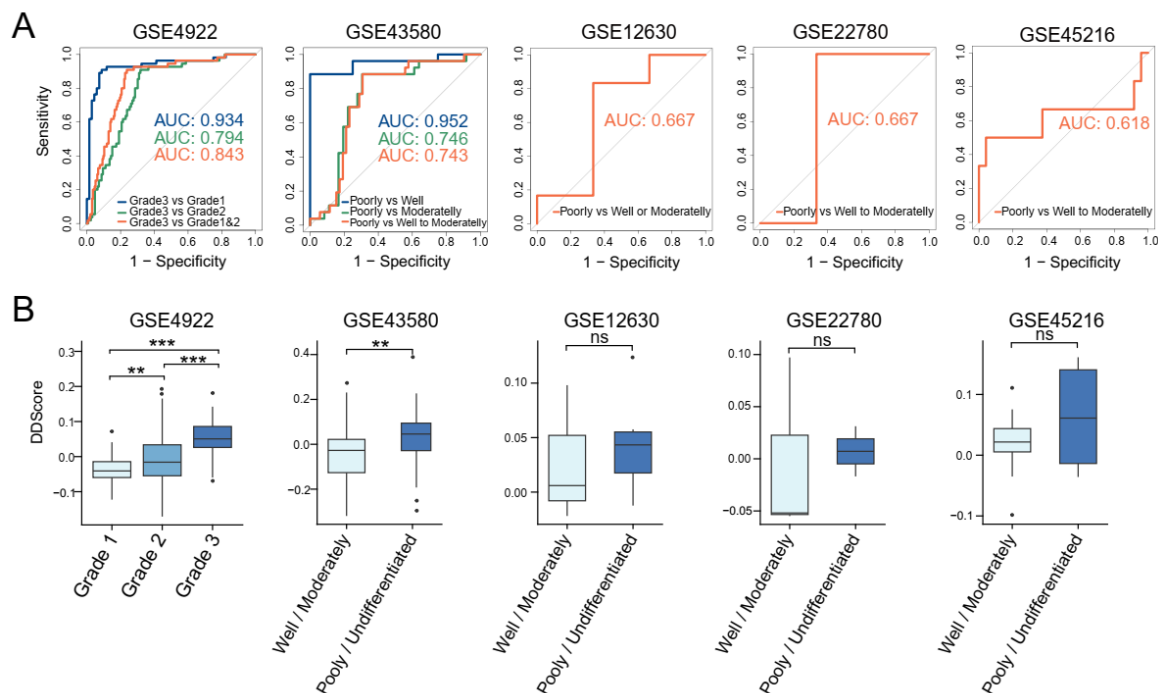


图 3-13 DDScore 表征肿瘤去分化程度的性能验证

(A) ROC 曲线展示 DDScore 在乳腺癌(GSE4922)、非小细胞肺癌(GSE43580)、泛癌(GSE12630)、胰腺癌 (GSE22780) 以及鳞状细胞癌 (GSE45216) 数据中的性能。不同颜色的 ROC 曲线代表 DDScore 在区分低分化样本与不同分化水平样本间的性能。(B) 多种肿瘤不同分级或分化程度之间的 DDScore 比较。 t 检验, ns: $P \geq 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

同时，考虑到去分化对患者预后的影响，本研究选取 TCGA 数据库中包含临床信息的样本进行生存分析，探索 DDScore 对患者生存的预测能力。结果显示，相较于低 DDScore 的患者，具有高 DDScore 的患者预后明显较差 ($P < 0.001$, 图 3-14 A)。进一步对不同肿瘤类型的分析结果显示, DDScore 在包括肾嫌色细胞癌(KICH)、肾上腺皮质癌 (ACC)、乳腺癌 (BRCA) 等多种肿瘤类型中均可作为预后生物标志物 ($HR > 1$, 图 3-14 B)。

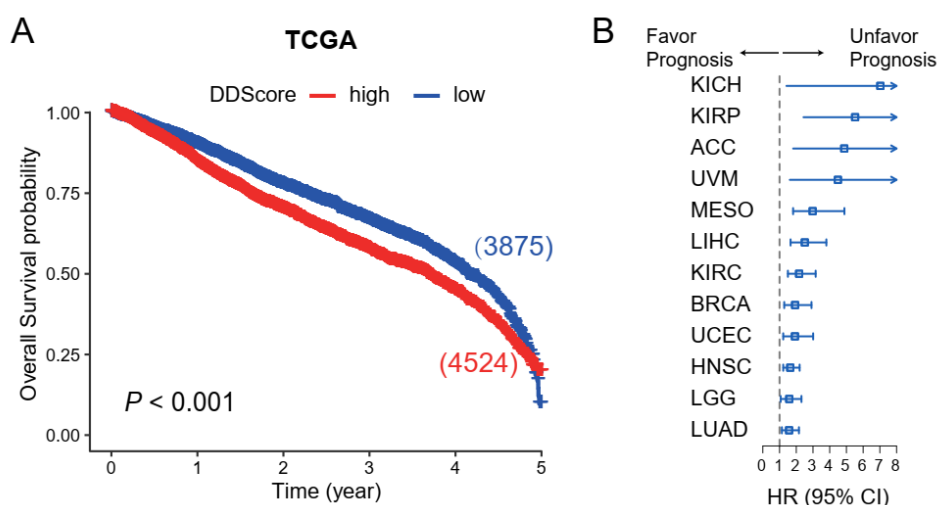


图 3-14 DDScore 在泛癌中的预后价值

(A) KM 曲线比较了 TCGA 33 种肿瘤类型中高、低 DDScore 两组患者的总生存期(overall survival, OS)。其中,红色曲线为高 DDScore 组(4524 个患者),蓝色曲线为低 DDScore 组(3875 个患者)。左下角为通过 log-rank 检验得到的 P 值。横轴为观测时间,纵轴为生存率。(B) 森林图展示多种肿瘤中基于高、低 DDScore 分组的患者生存分析比较结果。仅展示 TCGA 33 种肿瘤类型中 HR 大于 1 的肿瘤类型。每一行显示了一种肿瘤类型中高 DDScore 组与低 DDScore 组的风险比(hazard ratio, HR)及 95%置信区间(confidence Interval, CI),分别用方块和线段表示,箭头表示 CI 值超出图示范围。垂直虚线表示 $HR = 1$,代表无显著影响。 $HR > 1$ 代表相对于低 DDScore 组,高 DDScore 组的死亡风险增加。

TC 为研究肿瘤去分化提供了有价值的模型,然而,不同肿瘤类型间去分化程度的差异仍未得到充分探讨。本研究利用 DDScore 对不同肿瘤类型的去分化程度进行综合评估。通过计算 TCGA 中来自同一类型的肿瘤样本的 DDScore 均值,本研究观察到不同组织来源的肿瘤表现出不同的分化水平(图 3-15):来源于肾组织的肾透明细胞癌(KIRC)和肾乳头状细胞癌(KIRP),以及来源于肺组织的肺鳞状细胞癌(LUSC)、肺腺癌(LUAD)等,显示出较高的 DDScore;而前列腺癌(PRAD)、低级别胶质瘤(LGG)和黑色素瘤(SKCM)等,则显示出较低的 DDScore。

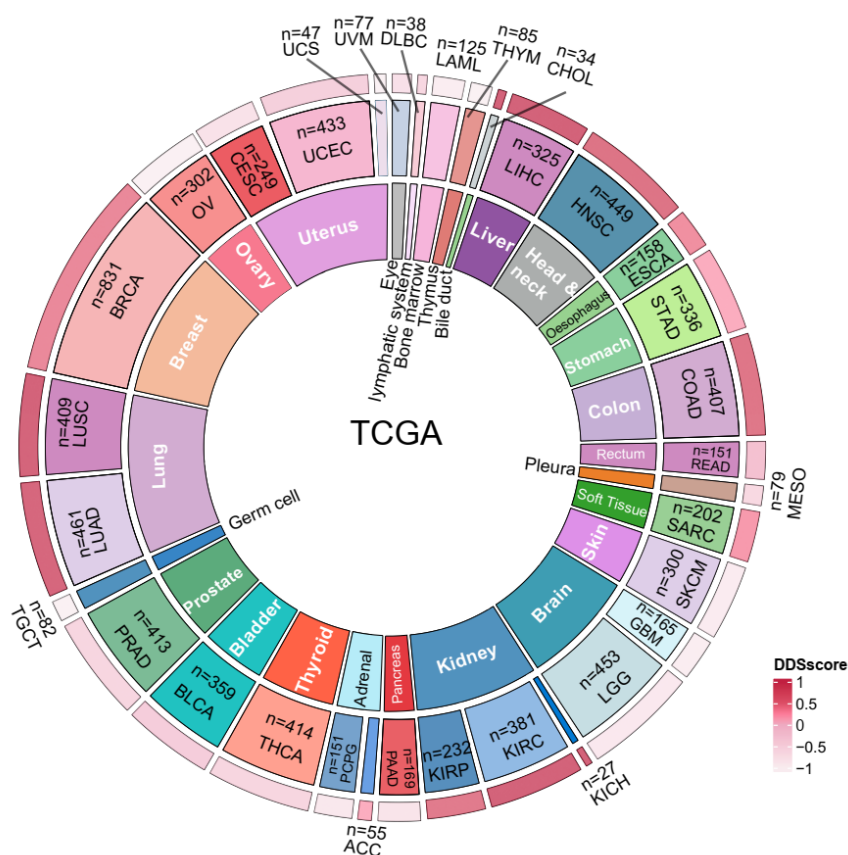


图 3-15 TCGA 33 种不同肿瘤类型的 DDScore

从内环向外环依次显示了肿瘤主要起源、肿瘤类型及各肿瘤对应的平均 DDScore。肿瘤按其起源进行分类。最外圈颜色越深表示 DDScore 越高。各肿瘤类型在圆环上的占比与样本数量呈正相关，即样本越多，相应的圆环弧度越宽。ACC：肾上腺皮质癌，BLCA：膀胱尿路上皮癌，BRCA：乳腺癌，CESC：宫颈鳞状细胞癌和宫颈内腺癌，CHOL：胆管癌，COAD：结肠腺癌，DLBC：弥漫大 B 细胞淋巴瘤，ESCA：食管癌，GBM：胶质母细胞瘤，HNSC：头颈部鳞状细胞癌，KICH：肾嫌色细胞癌，KIRC：肾透明细胞癌，KIRP：肾乳头状细胞癌，LAML：急性髓系白血病，LGG：低级别胶质瘤，LIHC：肝细胞癌，LUAD：肺腺癌，LUSC：肺鳞状细胞癌，MESO：间皮瘤，OV：卵巢浆液性囊腺癌，PAAD：胰腺癌，PCPG：嗜铬细胞瘤和副神经节瘤，PRAD：前列腺癌，READ：直肠腺癌，SARC：肉瘤，SKCM：皮肤黑色素瘤，STAD：胃腺癌，TGCT：睾丸生殖细胞肿瘤，THCA：甲状腺癌，THYM：胸腺瘤，UCEC：子宫内膜癌，UCS：子宫癌肉瘤，UVM：葡萄膜黑色素瘤。

3.3 甲状腺癌去分化伴随高度抑制性免疫微环境

TC 去分化过程中,免疫微环境的作用不容忽视。免疫微环境由多种免疫细胞构成,在肿瘤的发生发展以及治疗响应中起着至关重要的作用^[167]。深入了解免疫微环境与 TC 分化状态之间的关系将为揭示疾病的复杂机制提供新的视角。

3.3.1 分化程度低的样本中耗竭 T 细胞浸润程度更高

为了解去分化过程与免疫微环境的联系,本研究利用 xCell 计算 TC 中的免疫细胞浸润情况。结果显示,低 DDScore 组中未激活(naïve)的 CD8⁺ T 细胞显著富集,而高 DDScore 组中则存在较多的具有免疫抑制作用的 Th2、巨噬细胞以及中性粒细胞等(图 3-16)。Th2 细胞通过产生 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 等细胞因子,促进 TME 的免疫抑制状态,帮助肿瘤细胞逃避免疫系统的监控^[168, 169]; M2 型巨噬细胞可通过促进血管生成和抑制免疫反应,支持肿瘤细胞的生存和增殖,增强肿瘤的免疫逃逸能力^[170]; N2 型中性粒细胞可能通过促进肿瘤转移^[171]和阻碍 TME 中的抗肿瘤免疫反应来发挥作用^[172]。

同时,具有免疫监视作用的 NK 细胞也在分化程度低的样本中富集^[173]。有研究指出,TME 中存在多种能够抑制 NK 细胞活性的因素,如缺氧、IDO1 介导色氨酸代谢生成的犬尿氨酸、有限的葡萄糖可用性等^[174]。这些因素可能使得低/未分化肿瘤中的 NK 细胞难以有效执行其对肿瘤细胞的杀伤功能。TC 的分化状态影响免疫细胞在 TME 中的分布和活性,低/未分化的肿瘤能逃脱免疫系统的监控,进而影响临床治疗反应。

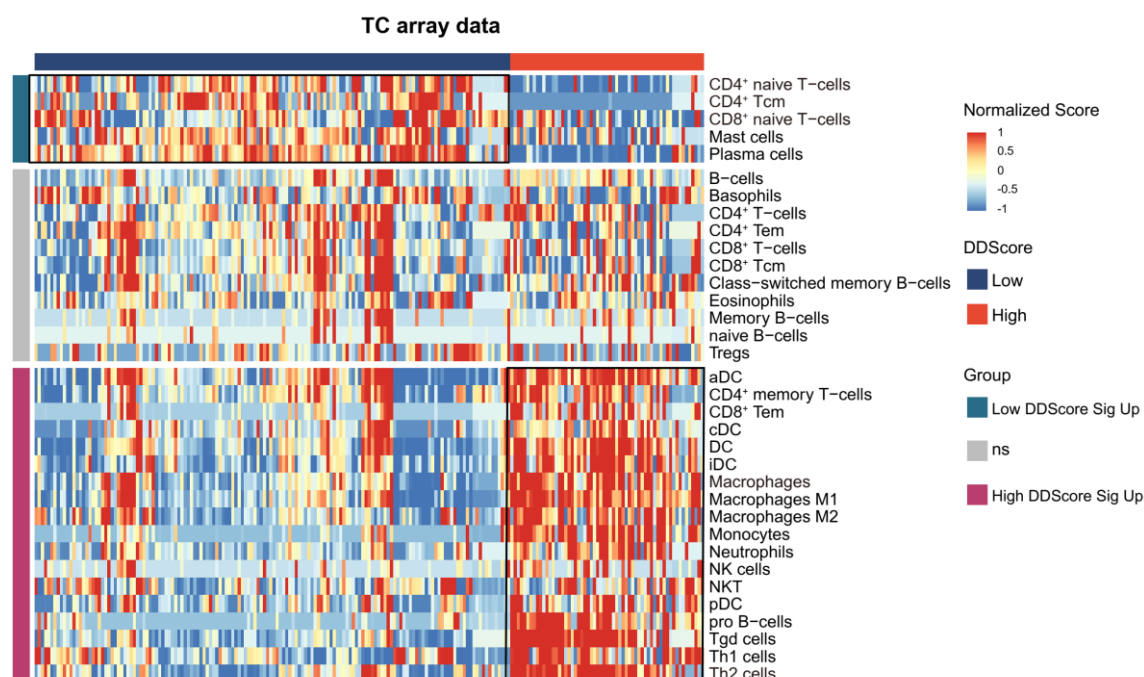


图 3-16 高、低 DDScore 组的免疫微环境分析

通过 xCell 计算 TC 样本中的免疫浸润情况。热图为经过 z-score 标准化后的免疫细胞浸润丰度。根据免疫细胞在高、低 DDScore 组的差异将细胞分为 3 类：低 DDScore 组中显著上调（绿色）；高 DDScore 组中显著上调（紫色）；两组无明显差别（灰色）。

本研究进一步基于耗竭 T 细胞的标志基因^[175]计算了 TC 样本的耗竭评分。分析结果表明，具有较高 DDScore 的样本组耗竭评分显著增加，且 DDScore 与耗竭评分之间显著正相关（图 3-17 A-B）。

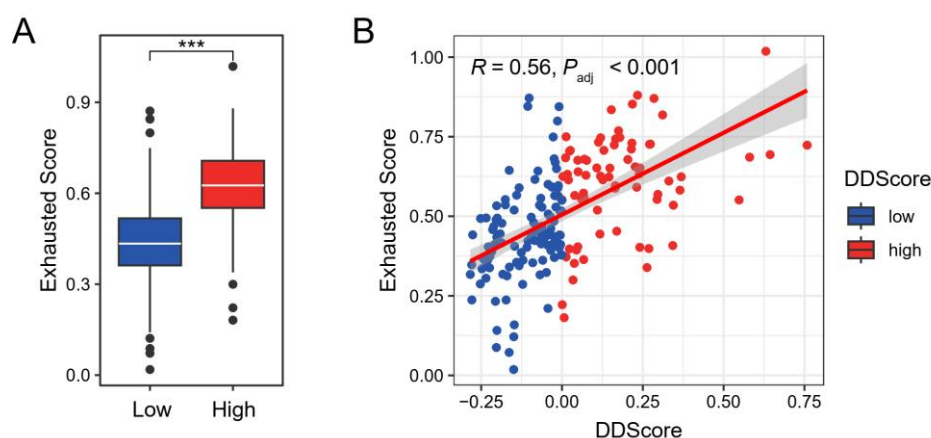


图 3-17 DDScore 与 T 细胞耗竭评分相关性分析

(A) 箱线图展现了高、低 DDScore 中耗竭评分的分布， t 检验，*** $P < 0.001$ 。(B) 每个样本

的 DDScore 与其 T 细胞耗竭评分之间的相关性散点图。其中每个点代表单个样本，横轴表示 DDScore，纵轴表示 T 细胞耗竭评分。红色线段为线性回归模型的拟合线，阴影区域表示置信区间。Pearson 相关性检验， P 值经 BH 校正。

免疫检查点的表达失调也可导致 TME 中免疫细胞不能行使正常的免疫监视功能。高 DDScore 组中可观察到一系列免疫检查点相关基因的上调 ($P < 0.01$ ，图 3-18 A)。同时，多个免疫检查点相关基因的表达与 DDScore 高度相关 ($P_{\text{adj}} < 0.001$ ，图 3-18 B)。免疫抑制受体 PD-1 和 CTLA4 能与 T 细胞表面的配体结合来降低 T 细胞的活性，进而抑制免疫反应。HAVCR2 和 LAG3 是重要的免疫调节相关受体，在 T 细胞耗竭和肿瘤免疫抑制中起关键作用。这些基因的上调表明高 DDScore 组具有更强的逃避免疫监视的能力。

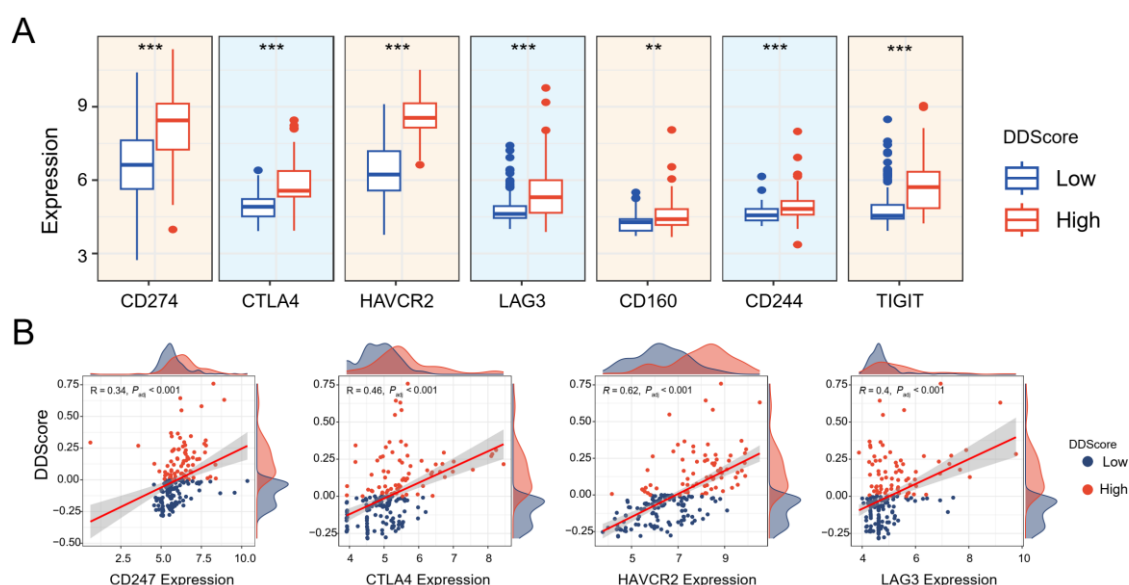


图 3-18 DDScore 与免疫检查点基因的相关性

(A) 免疫检查点在高 DDScore 和低 DDScore 组的表达情况。 t 检验，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

(B) 免疫检查点基因表达与 DDScore 的相关性散点图以及密度曲线图。密度图展示了 DDScore 和基因表达量在不同区域的密集程度，通过曲线的高低展现数据密度，曲线越高表明该区域的数据点越集中。点和密度图的不同颜色代表不同的分组，红色为高 DDScore 组，蓝色为低 DDScore 组。Pearson 相关性检验， P 值经 BH 校正。

3.3.2 去分化过程中 TILs 浸润减少

肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) 是免疫浸润的一个重要组成部分。相关研究表明, TILs 的空间分布与肿瘤细胞异质性有关, 对肿瘤预后评估具有重要参考意义^[176]。近期一项研究从 TCGA 的 H&E 数字化图像中提取了 TILs 的成像数据。该研究使用卷积神经网络算法, 对来自 TCGA 13 种不同类型、约 5000 例肿瘤的数字化全切片诊断组织图像进行分析, 量化了样本的 TILs 空间分布特征^[177]。对此, 本研究分析了由 Saltz 等人^[177]绘制的 TILs 映射及空间分布模式 (图 3-19 A), 以比较高、低 DDScore 组 TILs 空间分布及密度的差异。

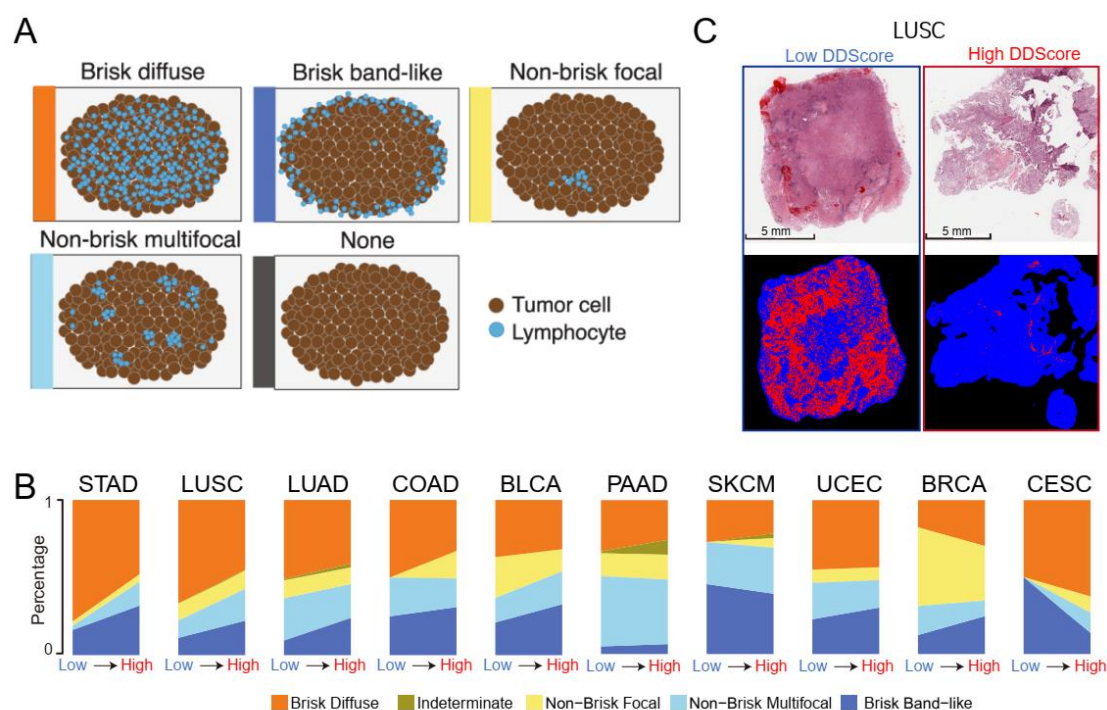


图 3-19 TCGA 中高、低 DDScore 组的 TILs 空间分布模式

(A) Saltz 等人定义的肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 空间分布类型模式图。(B) 根据 DDScore 高低分组分析 TCGA 数据集中 TILs 空间分布模式的变化。纵轴表示不同浸润模式在不同 DDScore 组别的相对比例。每个柱状图从左至右的变动反映了从低 DDScore 组到高 DDScore 组不同浸润模式的转变情况。(C) TCGA 中具有代表性的 LUSC TILs 图像。上半部分为 H&E (苏木精-伊红) 图像, 下半部分为 TIL 映射图。映射图中, 红色代表有 TILs 存在的区域, 蓝色代表没有 TILs 斑块的组织区域, 黑色代表没有组织的区域。

结果显示,与低 DDScore 组肿瘤相比,高 DDScore 组肿瘤显示出更低的 TILs 密度,即较少的 TILs 浸润(图 3-19 B)。特别是在 STAD 和 LUSC 中,高 DDScore 组肿瘤中表现为“活跃、弥散型”(brisk diffuse)结构模式(至少 30%的肿瘤区域分布有 TILs)的比例有所下降(图 3-19 C)。相反,“非活跃、多灶性”(non-brisk multifocal)模式,即 TILs 松散分布在超过 5%、小于 30%的肿瘤区域中的比例有所增加。这种高、低 DDScore 组中 TILs 的空间分布差异,提示肿瘤去分化过程与其免疫环境之间存在相互调节的作用。

3.4 色氨酸代谢活性与去分化程度显著正相关

肿瘤微环境中紊乱的代谢反应及其调控通路是影响肿瘤进展以及抗肿瘤免疫反应的关键因素^[178]。而肿瘤细胞去分化过程中的代谢变化仍是一个未被充分探索的领域。本研究通过对不同分化水平的样本代谢特征进行分析,探讨去分化过程中的代谢模式变化。

3.4.1 不同分化状态甲状腺癌的代谢特征

此前已有多项研究使用转录组数据,在单细胞或组织水平上模拟并推断出代谢物的变化模式。其中,基于拓扑代谢模块的通量平衡分析 Compass^[104]在单细胞数据上探索单细胞水平的代谢反应活性,并取得了较为优异的预测效果。本研究将此方法应用扩展到芯片数据中,用以计算 TC 样本中具体代谢反应的活性。通过代谢酶的基因表达连接基因表达、代谢反应通量或酶活性与肿瘤的代谢状态,本研究在组织水平上探究了 TC 的代谢重编程。

利用 Compass 工具可得到 Recon2 数据库中 14880 个生化反应步骤的反应活性(即 Compass 得分)。通过分析高、低 DDScore 组的 2598 个核心反应活性差异,发现与低 DDScore 组相比,高 DDScore 组的整体代谢活性呈现更为活跃的状态(图 3-20)。在高 DDScore 组中,丙氨酸和天门冬氨酸通路(alanine and aspartate metabolism)的多个代谢反应活性上调。丙氨酸在转氨酶催化下脱氨生成丙酮酸,从而进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA),为肿瘤提供能量以及合成其他所需养分。天冬氨酸是核苷酸合成的前体物质,与高活性的核苷酸代谢(nucleotide interconversion、

pyrimidine synthesis、pyrimidine catabolism、purine catabolism) 有关, 且在肿瘤的生长、增殖、转移、免疫逃逸等过程中起重要作用。此外, 肿瘤细胞可上调 *KRAS*、*PI3K* 和 *MYC* 等基因促进核苷酸代谢的关键酶表达, 间接支持核苷酸合成, 进而满足其异常增殖的需求^[179]。同时, 高 DDScore 组中糖代谢 (glycolysis/gluconeogenesis)、鞘脂代谢 (sphingolipid metabolism)、甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism) 多个反应活性都有所增加。这些代谢途径的活性增强通常与细胞增殖、分化、衰老和凋亡等过程密切相关。

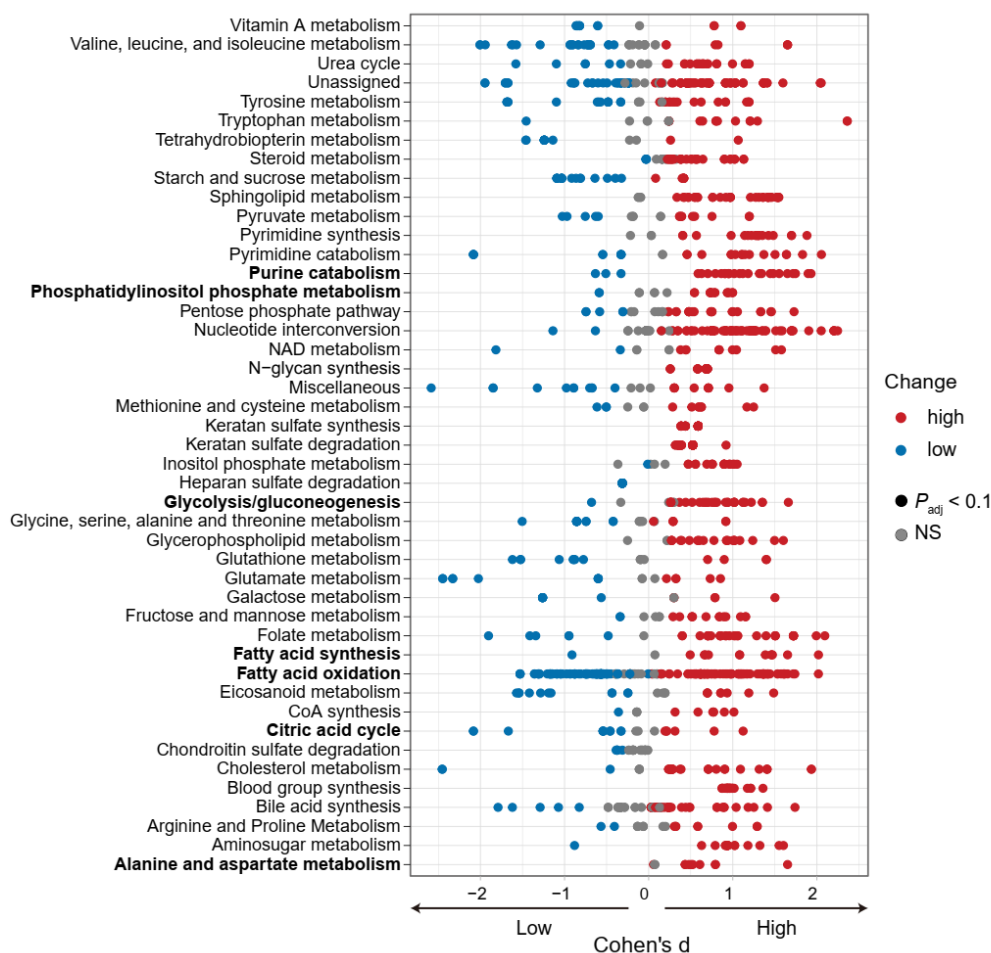


图 3-20 高、低 DDScore 组核心代谢反应活性差异

将 Compass 的惩罚矩阵进行取负和标准化处理后, 得到用于评估代谢反应活性的 Compass 分数。随后通过应用秩和检验和 Cohen's d 算法分析高、低 DDScore 组中代谢反应活性的差异。Cohen's d 量化高 DDScore 组与低 DDScore 组的差异大小。Cohen's $d > 0$ 且 $P_{adj} < 0.1$, 表明该反应在高 DDScore 组活性更高, Cohen's $d < 0$ 且 $P_{adj} < 0.1$ 则表示该反应在低 DDScore 组活性更高。图中

红色点代表在高 DDScore 组中代谢反应活性增强，蓝色点表示在低 DDScore 组增强，而灰色点则表示两组之间无显著差异。*Wilcox* 检验，经 BH 校正。

在揭示了整体代谢差异的基础上，本研究进一步探讨了核心代谢途径在 TC 中的活性。糖酵解过程在肿瘤细胞能量供应中发挥关键作用。在分化程度低的样本中，可观察到糖酵解通路的活性增强（图 3-21 A），与恶性肿瘤中有氧糖酵解异常活跃的研究结果一致。TCA 是能量代谢的中心环节，该代谢途径中的关键酶-异柠檬酸脱氢酶 IDH2 所催化的异柠檬酸氧化脱羧成 α -酮戊二酸的反应，在分化程度低的样本中也更为活跃（图 3-21 B）。此外，氨基酸代谢对蛋白质合成和分解至关重要。Compass 预测结果显示，在氨基酸代谢中，参与色氨酸代谢的酶 KYAT1 及其所催化的反应在高 DDScore 组活性更高，提示该路径的代谢通量的增加可能与细胞去分化过程相关。同时，负责脂肪酸氧化的核心限速酶肉碱棕榈酰转移酶 CPT 所催化的反应也显著上调（图 3-21 C）。而甲状腺过氧化物酶 TPO 及其反应则在低 DDScore 组中更活跃（图 3-21 D）。综上结果表明，高、低 DDScore 组样本具有截然不同的代谢特征。

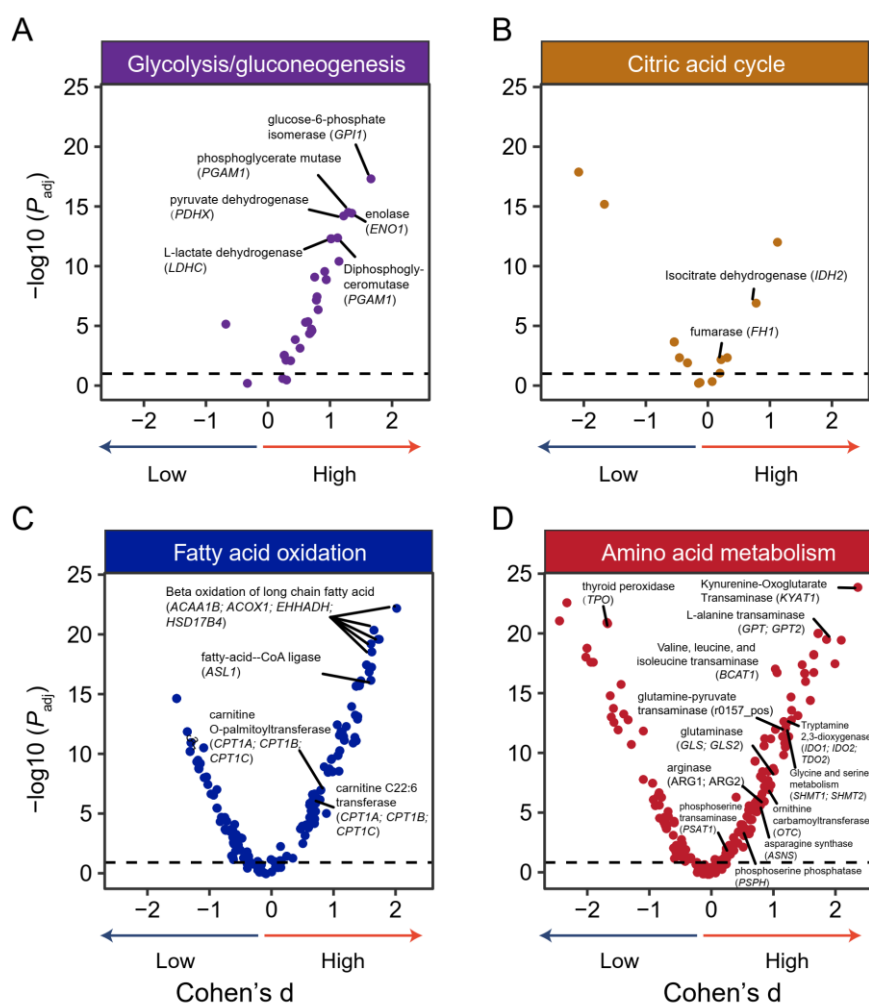


图 3-21 高、低 DDScore 组关键代谢途径反应活性差异

(A) 糖酵解/糖原合成 (B) 三羧酸循环 (C) 脂肪酸氧化 (D) 氨基酸代谢途径。横轴为高 DDScore 组与低 DDScore 组的差异大小。纵轴为经 BH 校正后的 P 值。虚线表示 $P_{adj} < 0.1$ 。Cohen's d 大于 0 且 P_{adj} 小于 0.1 代表高 DDScore 组的代谢通路活性高于低 DDScore 组，Cohen's d 小于 0 且 P_{adj} 小于 0.1 则表示该通路在低 DDScore 组的活性更高。关键代谢反应及催化该反应的酶对应的基因在图中被标出。

依据上述研究结果，本研究探究了糖酵解 (glycolysis)、磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway, PPP) 以及 TCA 途径的代谢活性和酶的表达情况。

虽然肿瘤细胞普遍采用糖酵解作为供能方式，但肿瘤间该代谢路径的活性表现出异质性。高 DDScore 组中多步糖酵解反应均表现出活性增强，同时相应酶的表达

上调（图 3-22）。其中，糖酵解关键酶己糖激酶 HK2、丙酮酸激酶 PKM 的表达及其催化的反应均表现出显著的活性增强（HK2 $P_{\text{adj}} < 0.05$ ；PKM $P_{\text{adj}} < 0.001$ ）。该结果提示，分化程度低的肿瘤严重依赖糖酵解来产生能量和适应环境。

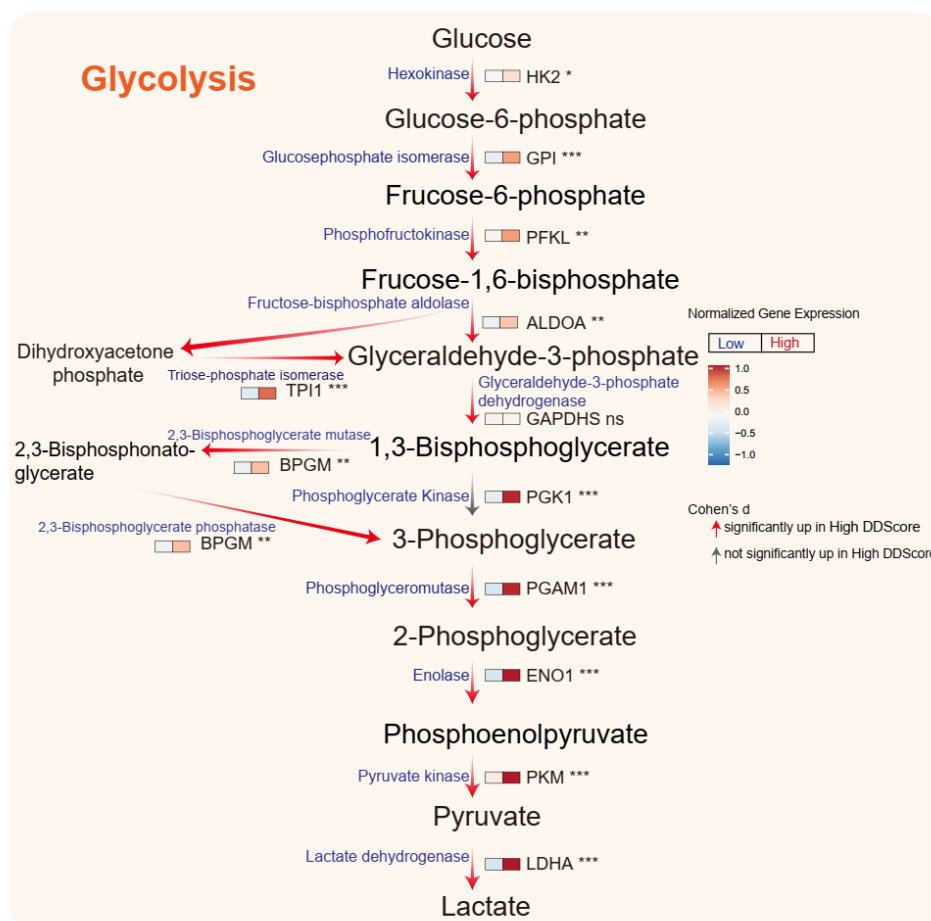


图 3-22 糖酵解代谢途径的活性与酶的基因表达差异分析

糖酵解途径的分解代谢反应。箭头的方向表示代谢反应的方向，颜色表示根据 Compass 所计算的代谢活性在高、低 DDScore 组之间的差异，红色箭头表示在高 DDScore 组中该反应显著增强，而灰色箭头表示该反应在高 DDScore 组中没有显著上调。蓝色字体为催化相应反应的酶。热图表示催化每一步反应的酶所对应基因的表达量均值，左、右位置分别为低 DDScore 组和高 DDScore 组的表达量均值。limma moderated t 检验，经 BH 校正，ns: $P_{\text{adj}} \geq 0.05$, * $P_{\text{adj}} < 0.05$, ** $P_{\text{adj}} < 0.01$, *** $P_{\text{adj}} < 0.001$ 。

PPP 与糖酵解相互关联，两者共享中间产物葡萄糖-6-磷酸。在高 DDScore 组中，PPP 多个反应活性增加（图 3-23）。值得注意的是，相较于 PPP 的氧化分支，核糖-

5-磷酸（ribose-5-phosphate）合成相关的多个酶在高 DDScore 组样本中表现出更为显著的上调表达。这提示高 DDScore 组中恶性肿瘤细胞可能通过增强 PPP 活性，提供必要的核苷酸原料，进而满足其分裂与增殖需求。

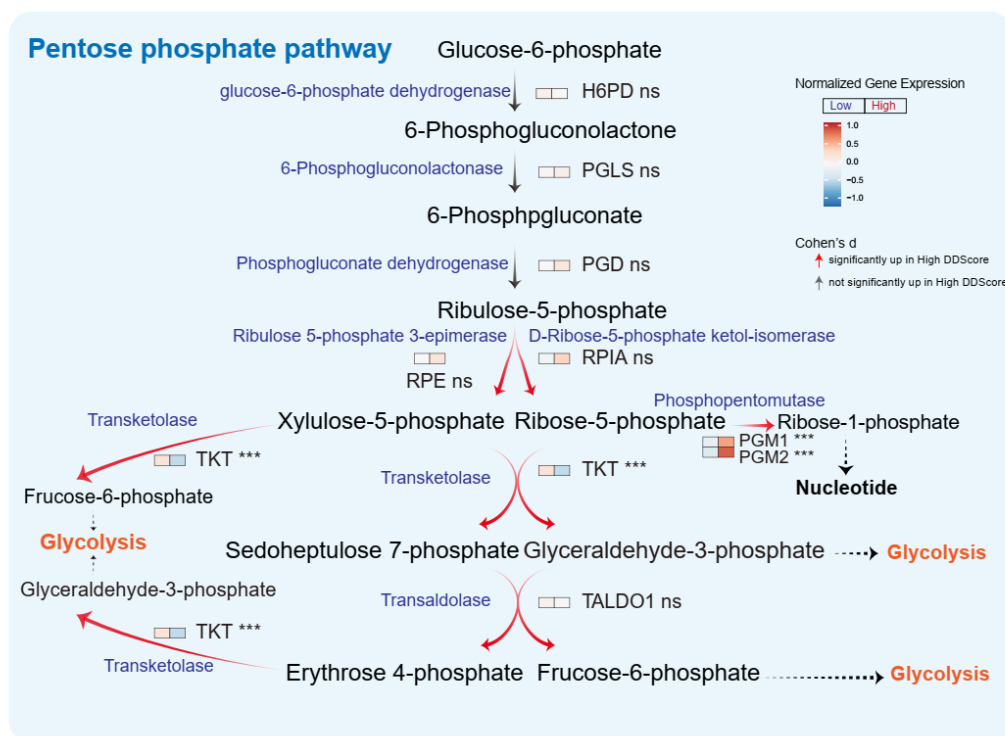


图 3-23 磷酸戊糖途径的活性与酶的基因表达差异分析

磷酸戊糖途径代谢路径。箭头指示代谢反应方向，颜色为高、低 DDScore 组间的代谢活性差异，红色箭头表示在高 DDScore 组中该反应显著增强，而灰色箭头表示该反应在高 DDScore 组中没有显著上调。蓝色字体为催化相应反应的酶。热图表示催化每一步反应的酶所对应基因的表达量均值，左、右位置分别为低 DDScore 组和高 DDScore 组的表达量均值。limma moderated t 检验，经 BH 校正，ns: $P_{adj} \geq 0.05$, * $P_{adj} < 0.05$, ** $P_{adj} < 0.01$, *** $P_{adj} < 0.001$ 。

糖酵解和 TCA 循环通过复杂的代谢交互作用相互补充，共同构成了肿瘤细胞能量产生和生物合成的关键框架。丙酮酸是 TCA 循环的关键前体物质，为 TCA 循环提供能量和合成所需的中间体。本研究发现，高 DDScore 组中经糖酵解生成丙酮酸的反应活性显著增强。同时，乙酰 CoA 生成反应在高 DDScore 组中上调，乙酰 CoA 随后与草酰乙酸结合形成柠檬酸（图 3-24），支持细胞功能和生长。此外，既往研究表明乙酰 CoA 可通过激活钙/钙调蛋白依赖性激酶促进 ATC 的转移^[180]。

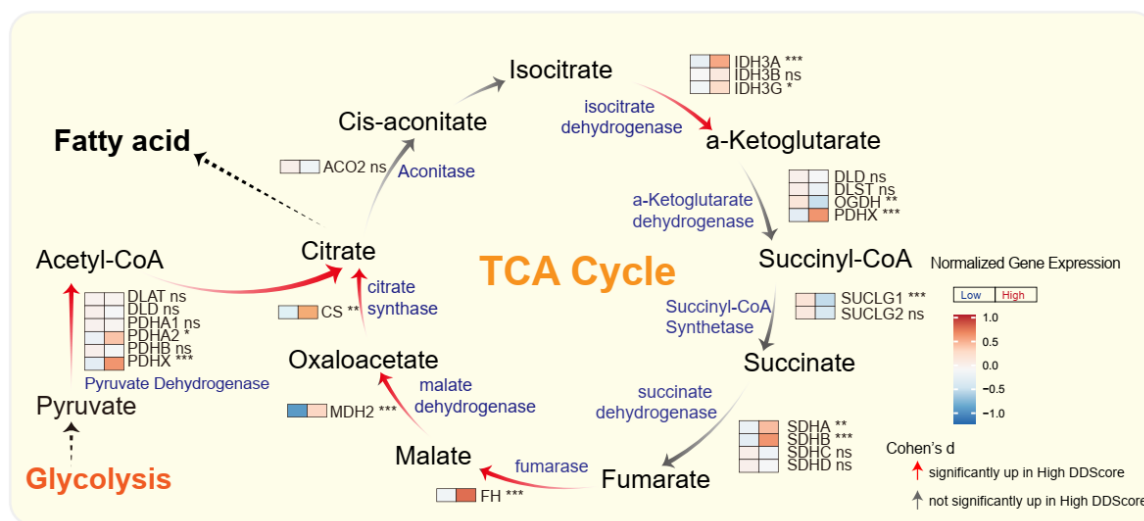


图 3-24 三羧酸循环的反应活性与酶的基因表达差异分析

TCA 代谢路径。箭头指示代谢反应方向，颜色为高、低 DDScore 组间的代谢活性差异，红色箭头表示在高 DDScore 组中该反应显著增强，而灰色箭头表示该反应在高 DDScore 组中没有显著上调。图中未标出可逆反应。蓝色字体为催化相应反应的酶。热图表示催化每一步反应的酶所对应基因的表达量均值，左、右位置分别为低 DDScore 组和高 DDScore 组的表达量均值。limma moderated t 检验，经 BH 校正，ns: $P_{\text{adj}} \geq 0.05$, * $P_{\text{adj}} < 0.05$, ** $P_{\text{adj}} < 0.01$, *** $P_{\text{adj}} < 0.001$ 。

3.4.2 色氨酸代谢活性与去分化程度正相关

为寻找与 TC 分化状态最相关的核心代谢反应，本研究首先将高度相关的代谢反应（Spearman 相关性不低于 0.98）合并为元反应，每个元反应的活性由其包含的多个反应的活性的中位数代表。随后，本研究对元反应与 DDScore 进行相关性分析。结果显示，色氨酸代谢（tryptophan metabolism）和物质转运（transport, extracellular）途径与 DDScore 相关性较高（ $r = 0.76$, $P_{\text{adj}} < 0.001$; $r = 0.74$, $P_{\text{adj}} < 0.001$ ），而酪氨酸代谢（tyrosine metabolism）则与 DDScore 呈负相关（ $r = -0.59$, $P_{\text{adj}} < 0.001$ ，图 3-25 A）。物质转运途径主要由溶质转运蛋白（solute carriers, SLC）超家族介导。作为最重要的膜转运蛋白家族之一，SLC 超家族参与多种底物的跨膜运输，在细胞的营养物质摄取、代谢、离子平衡和信号转导中发挥着关键作用^[181]。高 DDScore 组中物质转运途径的高活性与其恶性增殖对营养物质的高需求一致。然而，尽管色氨酸代谢活性与分化状态紧密相关，GSEA 分析结果却显示该通路活性在高、低 DDScore 组

间无显著差异 ($NES = -0.98$, $P_{adj} = 0.5$, 图 3-25 B)。进一步的分析结果表明, 色氨酸的主要代谢途径——犬尿氨酸途径在高 DDScore 组显著提升 ($NES = 1.54$, $P_{adj} = 0.06$, 图 3-25 C)。而与分化状态负相关的酪氨酸代谢在高 DDScore 组活性显著下调 ($NES = -1.43$, $P_{adj} = 0.08$, 图 3-25 D)。

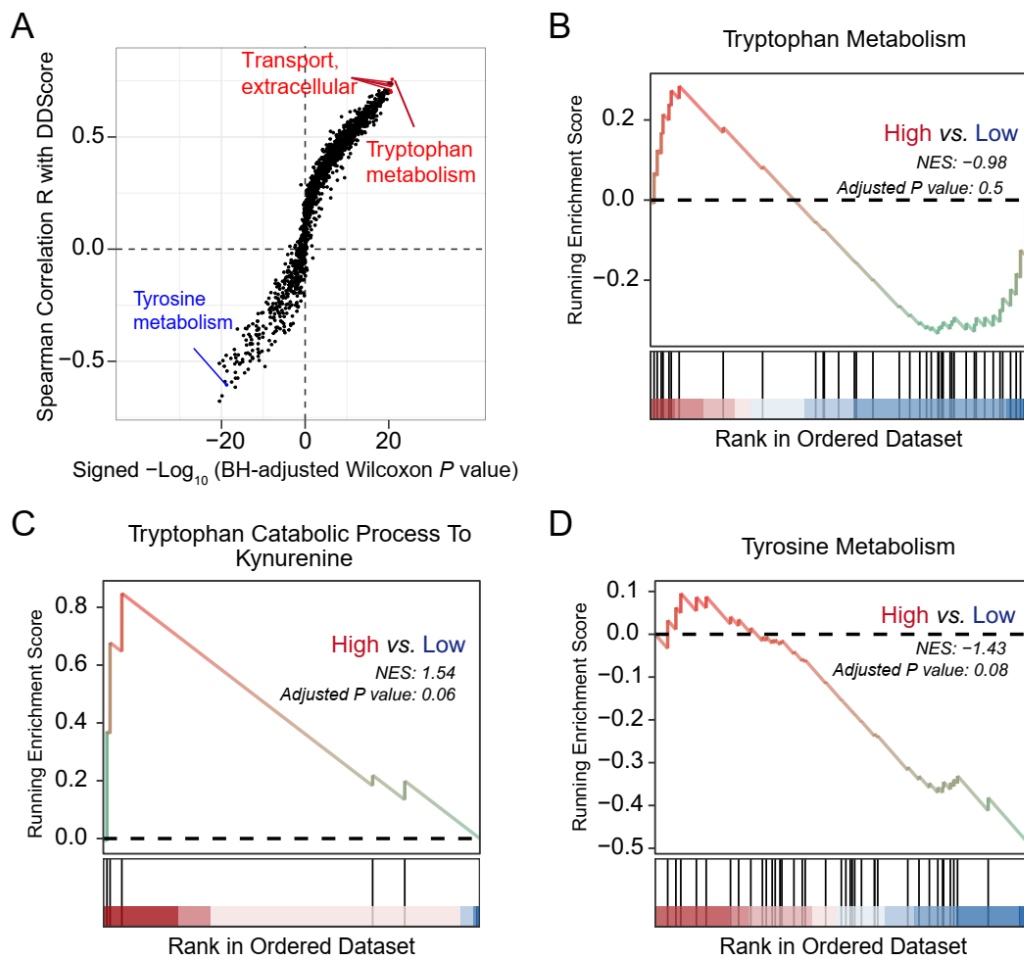


图 3-25 代谢途径活性与去分化程度相关性分析

(A) 元反应与 DDScore 的相关散点图。横轴表示高、低 DDScore 组元反应活性差异分析的 P_{adj} 值, 纵轴表示 Compass 得分与 DDScore 之间的 Spearman 相关系数。图中每个点代表一个元反应。(B) 色氨酸代谢、(C) 色氨酸-犬尿氨酸代谢以及 (D) 酪氨酸代谢通路的 GSEA 富集分析结果。其中, 折线图反映富集得分 (enrichment score, ES) 随基因排名的变化情况。横轴为按表达差异排序后的全部基因列表, 纵轴代表 ES。峰值为最大 ES, 正值峰表示通路在高 DDScore 组中活性上调, 负值峰则表示通路在高 DDScore 组中活性下调。条形码图中垂直线表示目的通路中基因在全部基因列表中的位置。热图代表基因表达的变化情况, 红色表示在高 DDScore 组别

中表达上调的基因，蓝色则表示在低 DDScore 组别中表达上调的基因。将每个基因的 ES 标准化处理后得到基因集的标准化富集分数 NES，并对每个基因集的 NES 计算了经 BH 校正后的 P_{adj} 值，用以评估每个基因集的富集结果的可靠性。 $|NES| > 1$ ， $P_{adj} < 0.1$ 的通路被认为是显著富集的通路。

根据前述发现，本研究推测在低/未分化肿瘤的进展过程中，色氨酸可能扮演着重要角色。因此，本研究进一步描绘了高、低 DDScore 组中色氨酸分解代谢途径中每个反应的活性差异。与上述 GSEA 分析结果相符，色氨酸-犬尿氨酸代谢途径的活性在高 DDScore 组显著上调，同时 *IDO1* 和 *TDO2* 表达升高（图 3-26 A）。*IDO1* 作为色氨酸代谢过程中的关键酶，其活性增强可影响肿瘤微环境和免疫逃逸^[182]。另一方面，与犬尿氨酸途径的高活性相反，五羟色胺途径的代谢活性在两组间无显著差异（图 3-26 B）。这一发现提示，在去分化的过程中，肿瘤细胞可能选择性地调节色氨酸代谢途径中的特定分支，以适应其生长和发展过程中的需求。

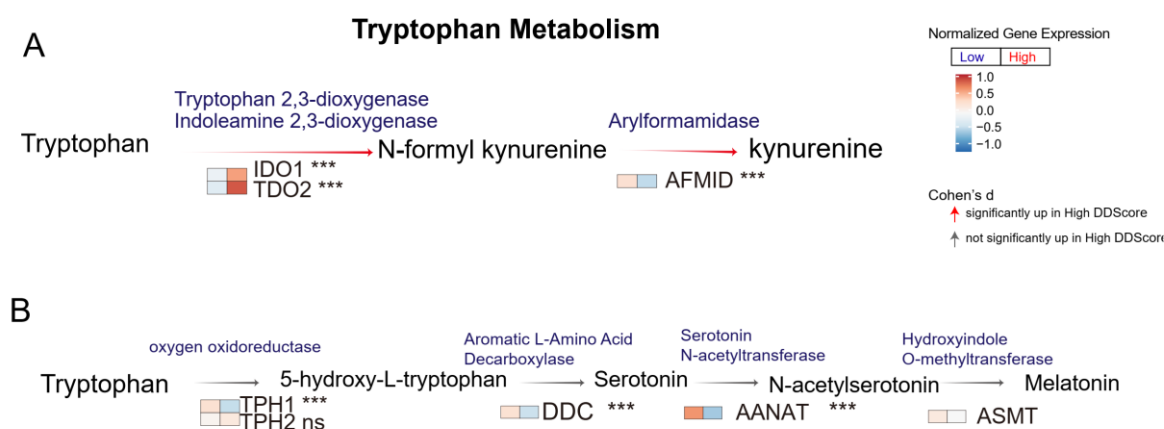


图 3-26 色氨酸代谢的反应活性与酶的基因表达差异分析

(A) 色氨酸-犬尿氨酸代谢途径。(B) 色氨酸-五羟色胺代谢途径。箭头指示代谢反应方向，颜色为高、低 DDScore 组间的代谢活性差异，红色箭头表示在高 DDScore 组中该反应显著增强，而灰色箭头表示该反应在高 DDScore 组中没有显著上调。图中未标出可逆反应。蓝色字体为催化相应反应的酶。热图表示催化每一步反应所对应的酶的基因表达量均值，左、右位置分别为低 DDScore 组和高 DDScore 组的表达量均值，同时标注了基因表达差异分析的 P 值。limma moderated t 检验，经 BH 校正，ns: $P_{adj} \geq 0.05$ ，*** $P_{adj} < 0.001$ 。

而与去分化程度负相关的酪氨酸代谢途径则在高 DDScore 组中活性显著降低

(图 3-27), 可能与促进酪氨酸转化为甲状腺激素的酶——甲状腺过氧化物酶 (thyroid peroxidase, TPO) 的表达下调有关。酪氨酸既是合成蛋白质所必需的一种关键氨基酸, 也是生成甲状腺激素的关键前体。甲状腺激素的生产依赖于充足的碘以及正常运作的酪氨酸代谢过程^[183]。因此, 酪氨酸代谢的异常可能与分化程度低的 TC 中甲状腺激素水平有关。

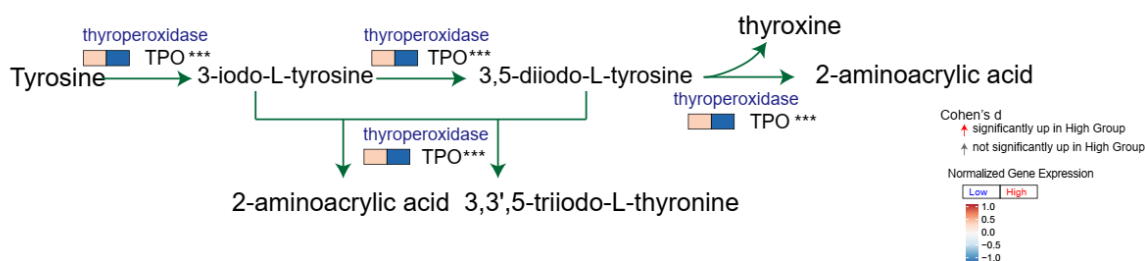


图 3-27 酪氨酸-甲状腺激素代谢途径的反应活性与酶的基因表达差异分析

酪氨酸-甲状腺激素代谢路径具体反应步骤。箭头指示代谢反应方向, 颜色为高、低 DDScore 组间的代谢活性差异, 红色箭头表示在高 DDScore 组中该反应显著增强, 而灰色箭头表示该反应在高 DDScore 组中没有显著上调。图中未标出可逆反应。蓝色字体为催化相应反应的酶。热图表示催化每一步反应所对应的酶的基因表达量均值, 左、右位置分别为低 DDScore 组和高 DDScore 组的表达量均值。limma moderated t 检验, 经 BH 校正, $*** P_{\text{adj}} < 0.001$ 。

3.5 甲状腺未分化癌细胞中色氨酸代谢活性上调

结果 3.4 中, 本研究利用 Compass 软件预测 TC 组织的代谢活性, 并发现在分化程度较低的 TC 样本中, 多个代谢路径的活性发生了变化。肿瘤组织不仅包括肿瘤细胞本身, 还包含免疫细胞等多种细胞类型, 因此, 组织水平的预测结果与肿瘤细胞的真实代谢水平之间可能会存在一定的差异。为探究不同分化水平的肿瘤细胞中色氨酸代谢的活性, 本研究对未分化的 ATC 细胞 BHT-101 和高分化的 PTC 细胞 KTC-1 进行转录组学和代谢组学分析。

3.5.1 转录组学分析揭示甲状腺未分化癌细胞色氨酸代谢相关基因表达上调

RNA-seq 分析结果揭示 KTC-1 和 BHT-101 在转录层面上的显著差异。在 BHT-101 细胞中, 共有 2094 个基因的表达水平显著上调, 2893 个基因表达下调 (图 3-28 A)。进一步对上调的差异基因进行致癌特征基因集 (Oncogenic signature gene sets)

富集分析,结果显示,BHT-101 中上调的差异基因显著富集与 MYC 过表达有关的通路 (MYC_UP)。KEGG 代谢通路的富集分析表明上调的差异基因在色氨酸代谢 (tryptophan metabolism) 通路中显著富集。该富集结果与 Compass 预测的结果一致,进一步证实了色氨酸代谢在分化程度较低的 TC 中的活跃性 (图 3-28 B)。

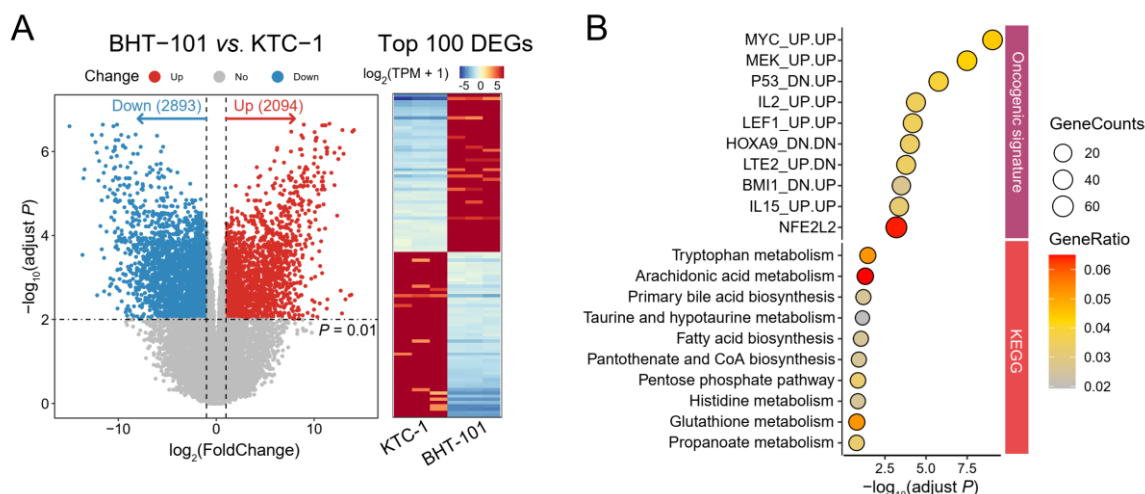


图 3-28 BHT-101 和 KTC-1 细胞系的基因表达差异分析

(A) BHT-101 与 KTC-1 基因差异分析火山图及差异基因表达热图。左侧火山图横轴代表基 $\log_2$ 的差异倍数 ($\log_2 \text{fold change}$), 纵轴表示 $-\log_{10}$ 转化后的 P_{adj} 值。红色点代表在 BHT-101 中显著上调的基因, 蓝色点为 KTC-1 中显著上调的基因, 灰色为无差异的基因。差异基因定义为 $P_{\text{adj}} < 0.01$, 且 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 。右侧热图为差异最大的 100 个基因在 BHT-101 和 KTC-1 中的表达量, $n = 3$ 。(B) BHT-101 中显著上调的差异基因功能富集分析结果。仅展示了分别在致癌特征基因集和 KEGG 代谢路径中显著富集的前 10 条通路。横轴为 $-\log_{10}$ 转换后的 P_{adj} 值, 点的大小代表富集到该通路的差异基因数量, 颜色代表富集到该通路的差异基因占通路总基因的比例。

同时, 色氨酸代谢酶的转录本水平在 BHT-101 细胞中也显著上调 (图 3-29)。与 GEO 数据中 TC 组织水平的结果不同的是, BHT-101 中未发现 IDO1 高表达, 但 *TDO2* 表达水平上调。

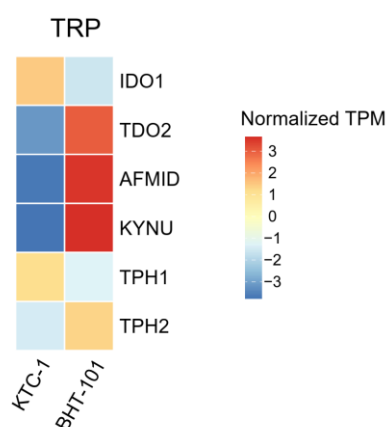


图 3-29 KTC-1 和 BHT-101 中色氨酸代谢酶表达水平

热图表示 KTC-1 和 BHT-101 中色氨酸（TRP）代谢相关酶经过 z-score 均一化后的表达量均值， $n = 3$ 。

此外，本研究对比了 BHT-101 与 KTC-1 细胞在糖酵解、PPP、TCA、酪氨酸代谢及色氨酸代谢途径中关键代谢酶和转运蛋白的表达差异。在 BHT-101 细胞中，上述通路的多个代谢酶基因表达显著增强，与 Compass 预测得到的结果高度一致（图 3-30）。

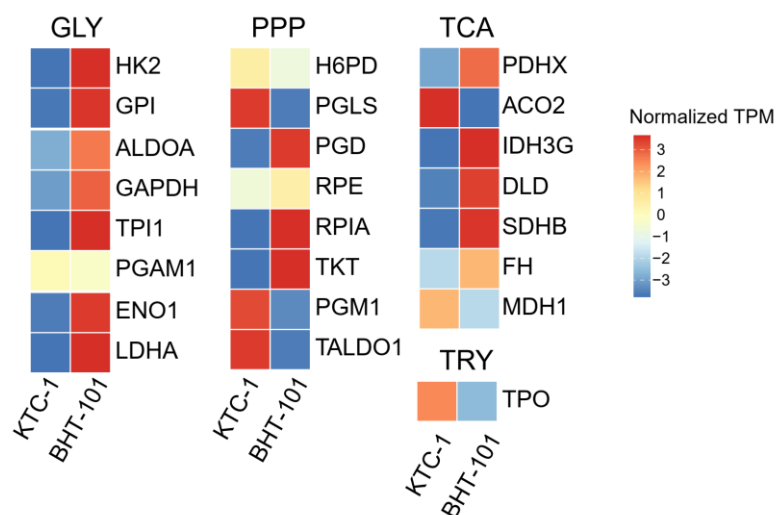


图 3-30 不同代谢途径中代谢酶对应的基因表达水平

热图展示经过 z-score 标准化处理后，KTC-1 和 BHT-101 中糖酵解（GLY）、磷酸戊糖途径（PPP）、三羧酸循环（TCA）及酪氨酸（TRY）代谢途径相关酶的表达量均值， $n = 3$ 。

3.5.2 代谢组学分析表明甲状腺未分化癌细胞中色氨酸及其代谢产物含量下调

代谢物可反映生物体的真实生理状态，是研究细胞代谢状态及疾病进展的关键。本研究使用针对色氨酸及其代谢产物的靶向色氨酸代谢组学，以确定 BHT-101 和 KTC-1 细胞中的色氨酸代谢活性（图 3-31 A-B）。

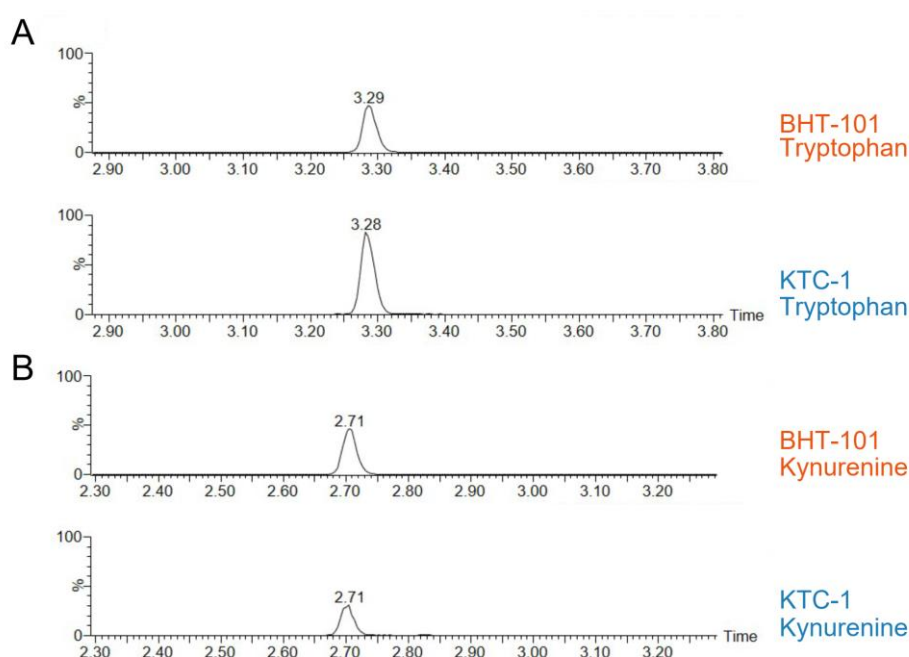


图 3-31 色氨酸代谢物含量测定示意图

（A）色氨酸及（B）犬尿氨酸含量测定示意图。峰值对应的时间为保留时间，即目标代谢物从进样开始到柱后出现该组分浓度极大值时的时间，纵轴对应代谢物的峰强度值。

结果表明，在 BHT-101 细胞中，色氨酸-犬尿氨酸途径的多个代谢物含量出现明显下降（ $P < 0.01$ ，图 3-32 A-E），这一结果与前文研究中低/未分化的样本中色氨酸代谢活跃以及代谢酶的高表达的特点一致。不过，值得注意的是，尽管其他代谢物浓度变化显著，犬尿氨酸的浓度在 BHT-101 和 KTC-1 之间却无明显改变（ $P > 0.05$ ，图 3-32 C）。

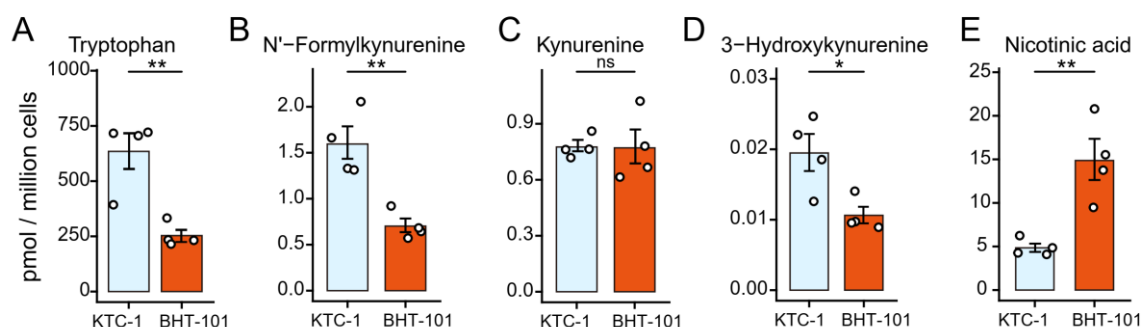


图 3-32 色氨酸-犬尿氨酸代谢途径代谢物含量

(A) 色氨酸、(B) N-甲酰基犬尿氨酸、(C) 犬尿氨酸、(D) 3-羟基犬尿氨酸以及 (E) 烟酸在 KTC-1 和 BHT-101 细胞中的含量。纵轴表示每百万细胞中的代谢物含量 (以 pmol 计)。误差线显示每个分组的平均值 $\pm$ 标准误。 t 检验, ns: $P \geq 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $n = 4$ 。

此外,代谢组学分析结果表明, BHT-101 中色氨酸-五羟色胺途径的产物显著下调 (图 3-33)。代谢组学在代谢物层面验证了 Compass 算法的预测结果,并与 RNA-seq 的分析结果相互补充。

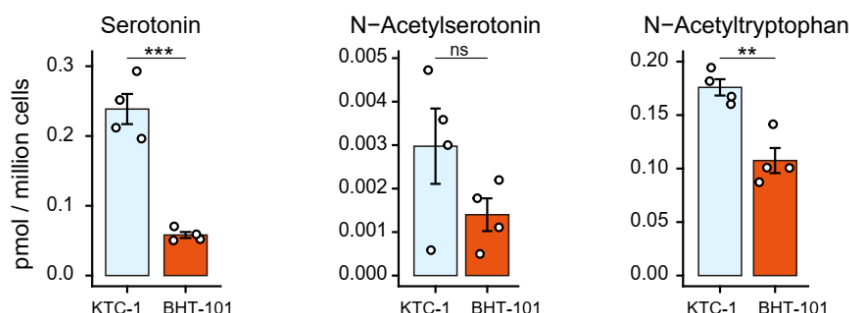


图 3-33 色氨酸-五羟色胺途径代谢物含量

色氨酸-五羟色胺途径中血清素 (Serotonin)、N-乙酰血清素 (N-Acetylserotonin) 以及 N-乙酰色氨酸 (N-Acetyltryptophan) 含量。纵轴代表每百万细胞中代谢物的含量 (pmol)。误差线显示每个分组的平均值 $\pm$ 标准误。 t 检验, ns: $P \geq 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $n = 4$ 。

3.5.3 色氨酸剥夺抑制甲状腺癌未分化细胞增殖并诱导肿瘤细胞凋亡

本研究通过转录组学和代谢组学分析,发现未分化的 BHT-101 细胞中色氨酸代谢活跃。肿瘤细胞通过消耗周围环境中的色氨酸,所导致的色氨酸匮乏的环境及其代谢产物在 TME 中的累积已被证明能够干扰 T 细胞的正常功能。然而,关于色氨酸在 TC 进展中作用的研究仍十分有限。

为深入了解色氨酸对肿瘤细胞的具体影响，本研究利用色氨酸剥夺定制培养基培养未分化的 BHT-101 细胞。结果表明，色氨酸剥夺导致多个色氨酸转运蛋白和代谢酶的表达水平出现了显著下降（图 3-34）。

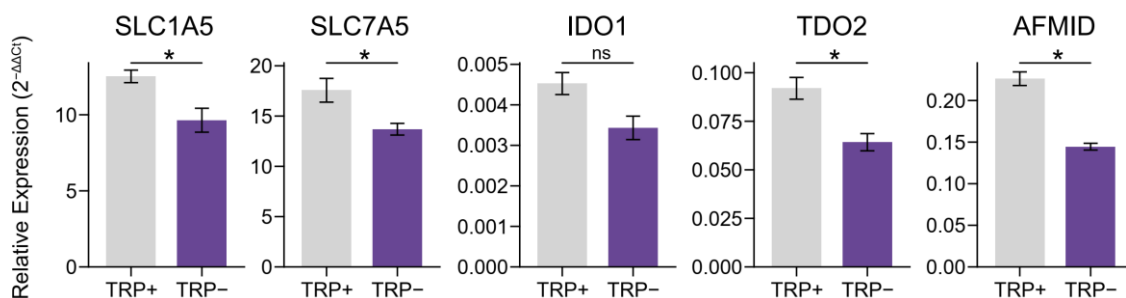


图 3-34 色氨酸剥夺对色氨酸转运和代谢相关基因表达的影响

完全培养基（TRP+）及色氨酸剥夺培养基（TRP-）培养 48h 后，RT-qPCR 检测 BHT-101 细胞中色氨酸转运及代谢相关基因表达情况。*t* 检验，ns: $P \geq 0.05$, $*P < 0.05$, $n = 3$ 。

同时，通过 CCK-8 细胞增殖实验，本研究发现在缺乏色氨酸时，BHT-101 细胞的增殖能力显著减弱（图 3-35 A）。进一步通过全光谱流式细胞仪器检测细胞的凋亡情况，结果显示，色氨酸剥夺显著促进了 BHT-101 细胞的凋亡过程（ $P < 0.05$, 图 3-35 B-C）。上述实验结果提示了色氨酸及其代谢产物在支持肿瘤细胞生存和增殖中的关键作用。

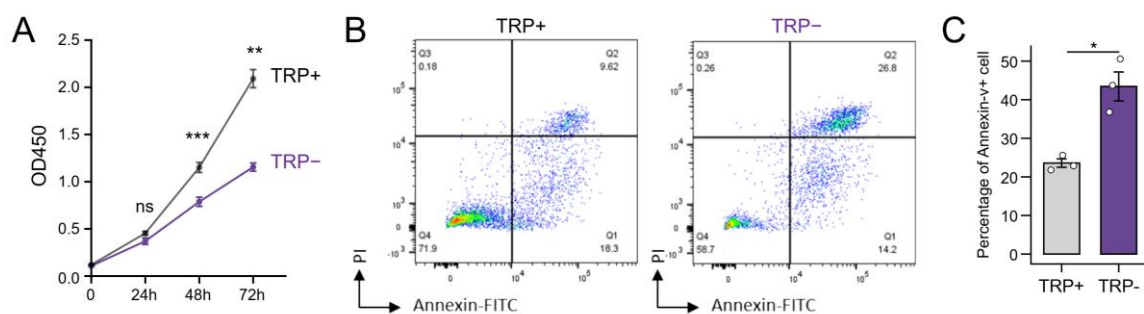


图 3-35 色氨酸剥夺影响 BHT-101 增殖和凋亡

（A）BHT-101 细胞在色氨酸充足（TRP+）和色氨酸剥夺（TRP-）条件下的增殖能力对比。纵轴为特定时间点的吸光度（OD450）。（B）细胞凋亡检测代表图。（C）细胞凋亡检测统计分析结果。统计数值表示为平均值±标准误。*t* 检验，ns: $P \geq 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $n = 3$ 。

3.6 MYC 调控色氨酸转运蛋白 SLC1A5、SLC7A5 和代谢酶 AFMID 表达

代谢途径的变化往往与细胞内转录水平的改变密切相关,而转录水平受上游转录因子(transcription factor, TF)的调控。TF 能够响应细胞内外的信号,如分化状态的变化等,进而启动或抑制特定基因的转录。因此,识别与色氨酸代谢重塑相关的关键 TF,可更全面地理解去分化过程的调节机制。

3.6.1 MYC 在分化程度低的样本中活性上调

本研究利用 viper 软件对高、低 DDScore 组进行 TF 活性分析,以探索在不同分化程度 TC 中的特异性转录因子。viper 通过评估 TF 所调控的基因集(regulon, 调控子)的表达模式,可准确推断出样本中约 300 个 TF 的活性状态。分析结果显示,高、低 DDScore 组之间 TF 的活性表现出明显的差别(图 3-36 A-B)。低 DDScore 组中, HHEX 具有最高的活性(图 3-36 A)。此前有报道称 HHEX 可调控钠/碘共转运体的表达,有助于促进 TC 的分化^[184]。

与低 DDScore 组不同,高 DDScore 组中具有较高活性的 TF 中,多个转录因子均与肿瘤的进展有关(图 3-36 B)。FOXM1 在超过 20 种人类肿瘤中过表达,在肿瘤细胞增殖与代谢过程之间发挥信使作用^[185]; MYBL2 与较高的肿瘤分级分期呈正相关^[186]; MYC 与代谢重编程和免疫逃逸等过程有关^[187]; TWIST 则在包括卵巢癌、前列腺癌和胰腺癌在内的多种恶性肿瘤的侵袭与转移中起到促进作用^[188]。

TF 的调控对于肿瘤的分化起重要作用。为探究在细胞去分化过程中最为关键的 TF,本研究分析了高 DDScore 组中较高活性的 TF 对细胞生存能力的影响。利用 DeepMap 数据库提供的 CERES 评分作为指标,本研究发现 MYC 对 TC 的细胞生存影响最大(CERES 分数<-1, 图 3-36 C)。

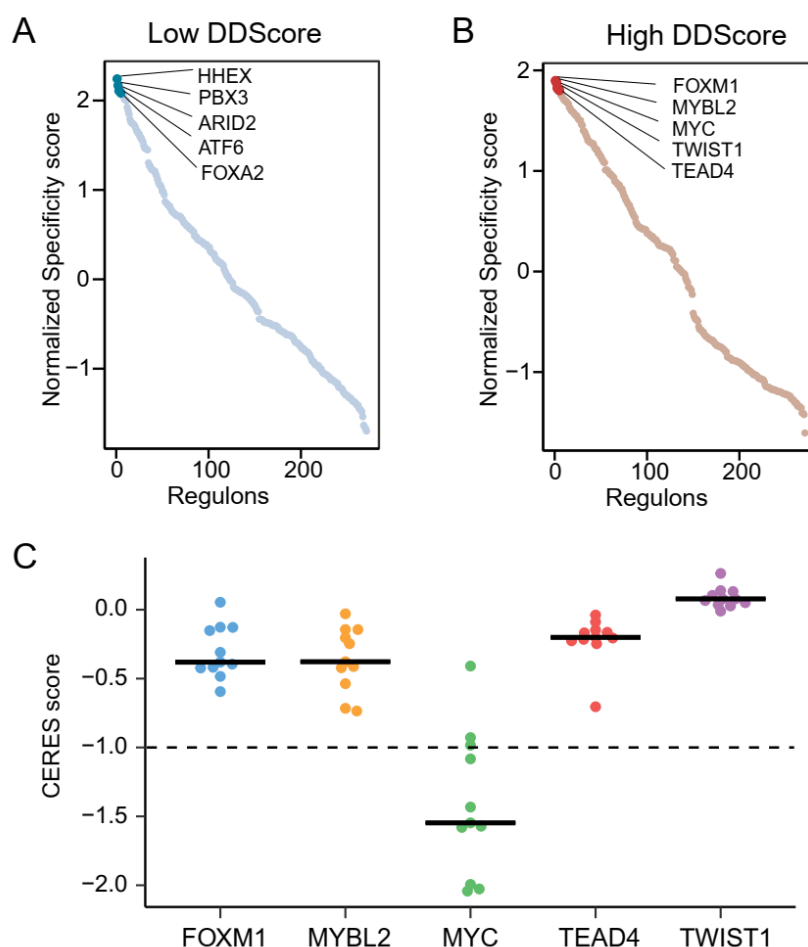


图 3-36 高、低 DDScore 组中的转录因子活性

(A) 低 DDScore 组和 (B) 高 DDScore 组中的转录因子 (TF) 活性分析。纵轴表示标准化后的调控元件特异性评分 (regulon specificity score, RSS), 横轴代表根据 RSS 对各组样本中的转录因子调控的 regulons 排序, 并对各组中活性最高的 5 个转录因子进行了标注。(C) TF 在 TC 细胞系中的 CERES 打分。CERES 越低表示敲除该基因对细胞的影响更大。

3.6.2 MYC 与色氨酸转运和代谢基因有关

结果 3.5 部分对甲状腺癌细胞系的转录组学分析结果指出, 与 KTC-1 相比, BHT-101 中上调的基因显著富集在色氨酸代谢和 MYC 相关的通路中。已有研究表明 MYC 胞代谢过程中发挥重要作用^[189], 这一结果促使本研究进一步探索 MYC 与色氨酸转运和代谢之间可能存在的相互作用。本研究利用 SEEK 数据库进行了相关性分析, 以探索色氨酸代谢相关基因与 MYC 表达之间的关系。分析结果表明, MYC 与色氨

酸代谢中的转运蛋白 *SLC7A5*、*SLC1A5* 和代谢酶 *TDO2* 等显著相关（图 3-37）。此外，*MYC* 与酪氨酸-甲状腺激素代谢中的酶 *TPO* 呈负相关。

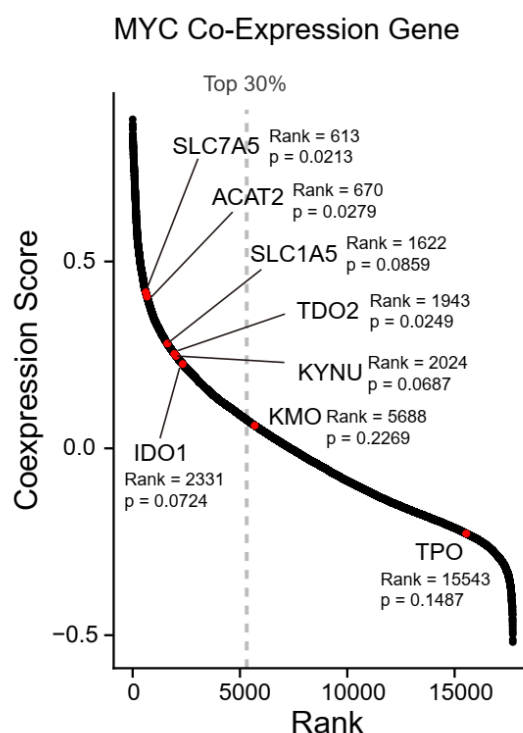


图 3-37 *MYC* 与色氨酸转运和代谢有关基因表达相关性

SEEK 数据库中 *MYC* 与其他基因共表达情况的散点图。纵轴为基因与 *MYC* 之间的共表达分数（Coexpression score），横轴代表根据基因与 *MYC* 共表达分数进行排序后的基因顺序。共表达分数越高，该基因与 *MYC* 之间的相关性越强。同时标注了色氨酸代谢相关基因的排序（Rank）及相关性 *P* 值。

本研究进一步收集了 9 个敲降/敲除 *MYC* 的基因表达数据，以研究 *MYC* 表达下调后对色氨酸代谢相关基因的影响（表 3-4）。

表 3-4 本研究纳入的 *MYC* 敲除/敲降数据集

Dataset	GSE Number	Data Type	Type	Number CTRs / Cases	Ref
Data 1	GSE106869	Array	Daudi cells	3 Ctrl / 3 sh-MYC	[190]
Data 2	GSE68219	RNA-seq	Colon carcinoma cell	4 Ctrl / 4 si-MYC	[191]
Data 3	GSE196323	RNA-seq	SUM159PT cell	2 Ctrl / 4 si-MYC	[192]
Data 4	GSE196323	RNA-seq	4T1 cell	3 Ctrl / 6 si-Myc	[192]

Data 5	GSE106312	RNA-seq	MDA231-BrM cell	2 Ctrl / 2 sh-MYC	[193]
Data 6	GSE143517	RNA-seq	HeLa cell	3 Ctrl / 3 si-MYC	[194]
Data 7	GSE124909	RNA-seq	NUGC3 cell	2 Ctrl / 2 MYC knockdown	[195]
Data 8	GSE196323	RNA-seq	MDA-MB-436 cell	2 Ctrl / 4 si-MYC	[192]
Data 9	GSE39218	Array	IMR32 cell	3 Ctrl / 3 sh-MYC	[196]
Data 10	GSE143254	Array	Osteosarcoma cell	3 Ctrl / 3 si-Myc	[197]
Data 11	GSE87693	Array	HCT116 cell	4 Ctrl / 8 si-MYC	[65]

对敲降/敲除 MYC 的数据集分析结果表明, MYC 表达下调后, 与色氨酸代谢相关的转运蛋白 *SLC1A5*、*SLC7A5* 以及代谢酶 *AFMID*、*KYAT1* 表达也呈现下调的趋势 (图 3-38)。

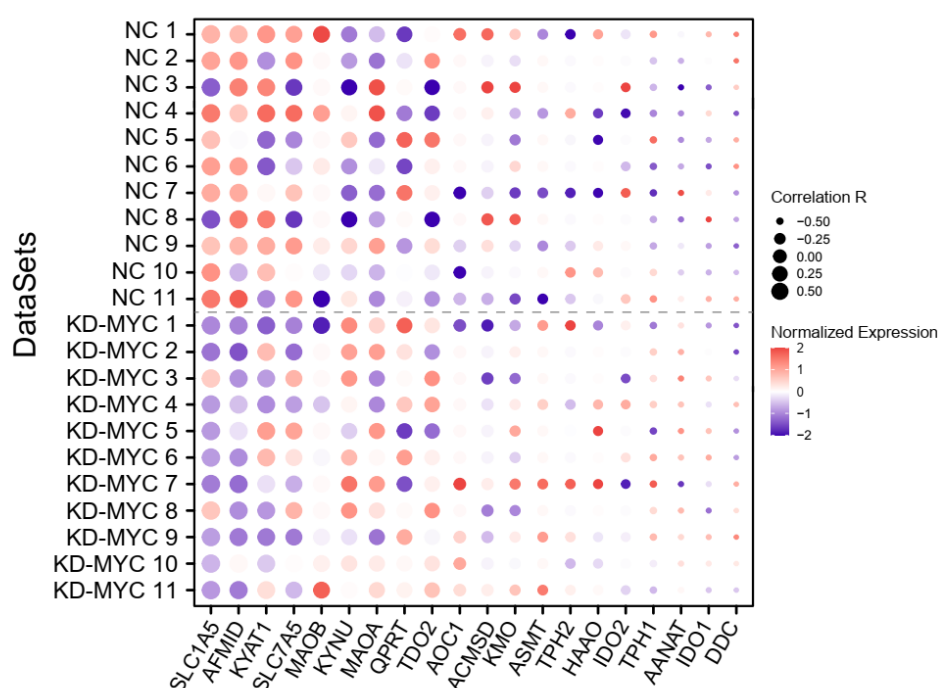


图 3-38 MYC 表达下调对色氨酸转运及代谢相关基因表达的影响

MYC 敲降/敲除数据集中色氨酸代谢相关基因的表达及其与 MYC 的相关性。点的大小表示 MYC 与相应基因之间表达相关性的 r 值大小, 颜色代表经过 z-score 标准化处理后, 相应基因的表达量。

3.6.3 MYC 与色氨酸转运蛋白 SLC1A5、SLC7A5 及代谢酶 AFMID 启动子区结合信号增强

上述分析已表明 *MYC* 与色氨酸转运和代谢酶之间的相关性，但 *MYC* 对色氨酸代谢的具体调控机制尚未明确。为了探究 *MYC* 是否直接调控色氨酸代谢相关基因，本研究利用 CUT&Tag 技术分析 *MYC* 在 BHT-101 和 KTC-1 细胞中与色氨酸代谢相关基因的结合情况。分析结果显示，BHT-101 和 KTC-1 之间的差异峰主要定位于基因的启动子区域（图 3-39 A）。相比 KTC-1，*MYC* 与未分化的 BHT-101 细胞的启动子区结合明显增强（图 3-39 B），与前文中本研究通过 *viper* 所预测的 *MYC* 转录因子高活性的结果一致。

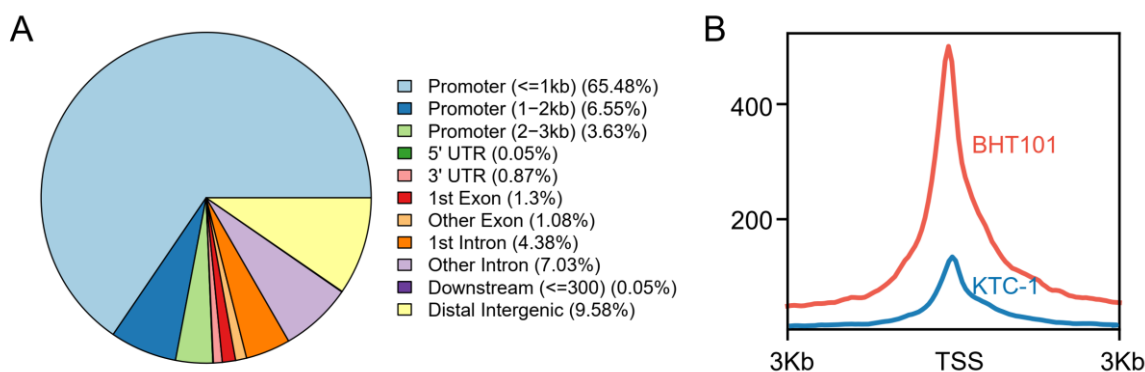


图 3-39 BHT-101 和 KTC-1 之间的 *MYC* 调控活性差异

(A) 根据 BHT-101 和 KTC-1 中的差异峰与基因组上各基因功能元件的距离关系，对差异峰进行注释，并统计差异峰的分布比例。不同颜色的扇形代表不同的功能元件。(B) KTC-1 与 BHT-101 细胞中，*MYC* 在启动子区域（转录起始位点 TSS $\pm$ 3kb 范围内）的 Reads 密度分布。数据通过 RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) 进行归一化， $n = 2$ 。

随后，本研究查看了 *MYC* 与色氨酸代谢相关基因的结合情况。结果显示，在未分化的 BHT-101 细胞中，*MYC* 与色氨酸转运蛋白 *SLC1A5*、*SLC7A5* 和代谢酶 *AFMID* 启动子区的结合显著增强（图 3-40），而色氨酸代谢的关键酶 *IDO1* 和 *TDO2* 启动子区则与 *MYC* 无明显结合。因此，*MYC* 可通过控制色氨酸的运输或通过调控色氨酸代谢酶表达来影响色氨酸的代谢过程。

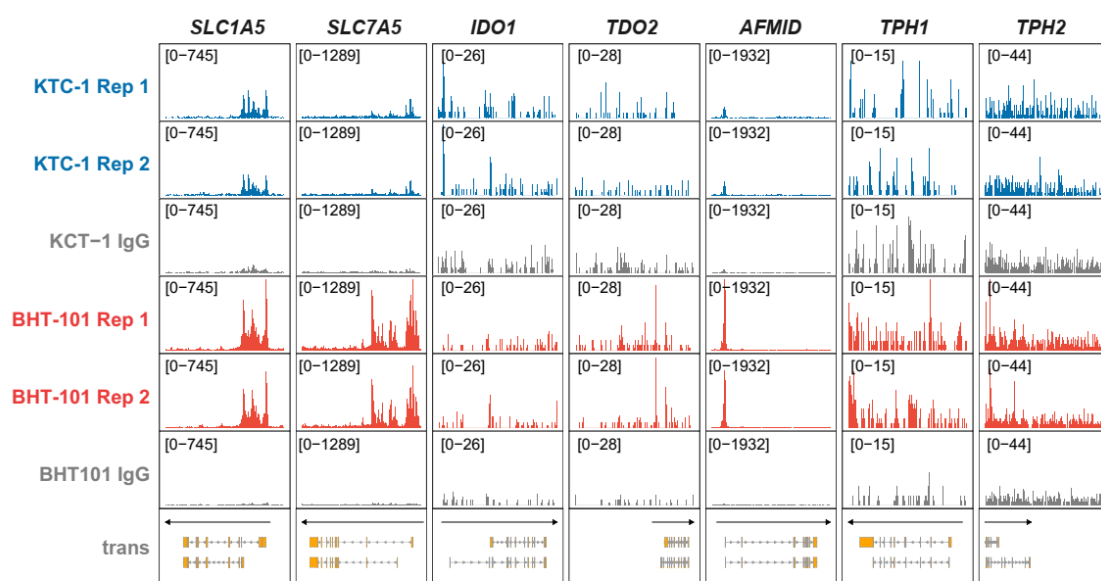


图 3-40 MYC 与色氨酸转运和代谢相关基因启动子区结合情况

图中左上角数字代表每个信号峰的强度值范围，trans 代表对应基因的转录模式图。峰的高度代表 MYC 与对应基因的結合信号。每组各有 2 个生物重复，IgG 为阴性对照。

本研究进一步构建了敲降 MYC 的稳转细胞系。结果发现，MYC 表达下调后，BHT-101 中 *SLC1A5*、*SLC7A5* 和 *AFMID* 的表达发生下调（图 3-41 A-D）。

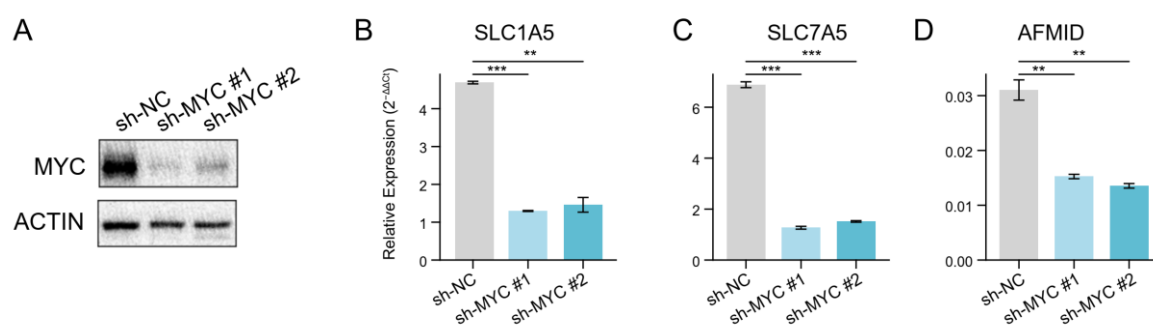


图 3-41 敲降 MYC 后对色氨酸转运蛋白和代谢酶的影响

(A) Western Blot 检测敲降 MYC 后 MYC 的蛋白相对丰度。RT-qPCR 检测敲降 MYC 后 (B) *SLC1A5*、(C) *SLC7A5* 以及 (D) *AFMID* 的 mRNA 水平。 t 检验，ns: $P \geq 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $n = 3$ 。

3.7 抑制 SLC1A5 导致肿瘤细胞增殖减弱和 MYC 表达下调

MYC 的不可成药性一直是肿瘤治疗中的重大挑战^[198]。当前研究正在探索通过干扰由过度活跃的 MYC 调控的代谢途径，进而发现新的治疗靶点的可能性^[199, 200]。色氨酸作为必需氨基酸之一，其代谢活性受 MYC 调控。然而，针对色氨酸代谢途径中的关键酶 IDO1 的抑制剂在临床上的表现并不理想^[201]。鉴于此，本研究提出通过干预色氨酸转运蛋白影响肿瘤进展的新策略。

3.7.1 敲降 SLC1A5 表达导致色氨酸代谢产物下调

本研究首先探究色氨酸有关基因在 KTC-1 和 BHT-101 细胞中的表达情况。通过 RT-qPCR 分析表明，与 KTC-1 相比，BHT-101 细胞中 *SLC1A5* 上调最为显著 ($P < 0.01$ ，图 3-42)。

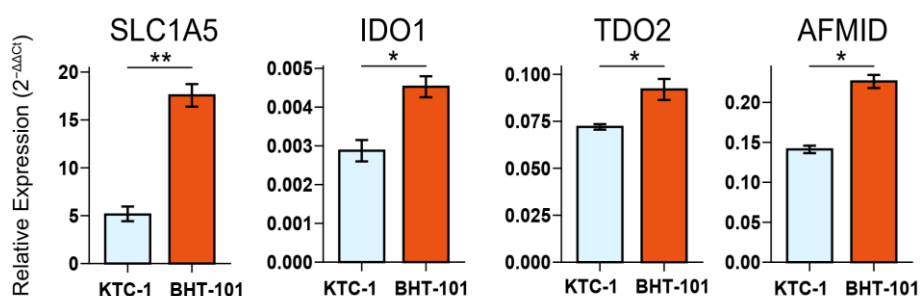


图 3-42 不同分化程度的甲状腺癌细胞中色氨酸转运和代谢基因表达情况

RT-qPCR 比较 BHT-101 和 KTC-1 中色氨酸相关蛋白的转录水平。 t 检验，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ， $n = 3$ 。

因此，本研究构建了敲降 SLC1A5 的 BHT-101 稳转细胞系。敲降 SLC1A5 的 BHT-101 稳转细胞系中 SLC1A5 的转录水平显著下调（图 3-43）。

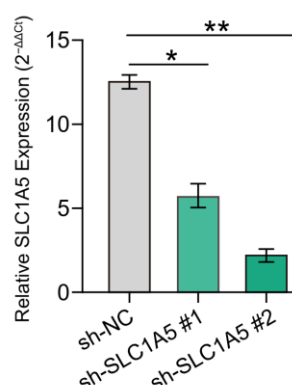


图 3-43 敲降 SLC1A5 的 BHT-101 稳转细胞系构建

RT-qPCR 检测敲降 SLC1A5 后 *SLC1A5* 的转录水平。*t* 检验, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

为验证下调 SLC1A5 表达后对色氨酸代谢活性的影响, 本研究选取敲降效果最佳的 sh-SLC1A5 #2 及其对照组进行靶向色氨酸代谢组学分析。结果表明, 下调 SLC1A5 后, 色氨酸-犬尿氨酸及五羟色胺途径代谢产物含量均下降(图 3-44 A-B)。

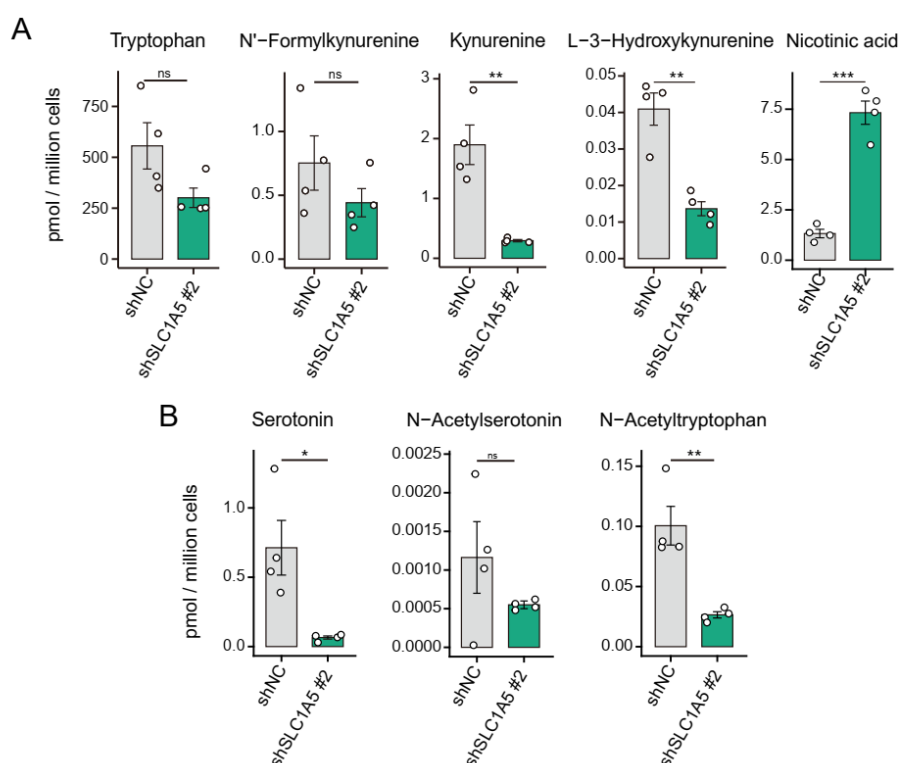


图 3-44 下调 SLC1A5 对 BHT-101 中色氨酸代谢的影响

(A) 色氨酸-犬尿氨酸、(B) 色氨酸-五羟色胺途径代谢产物含量。纵轴代表代谢物的绝对含量，单位为 pmol/每百万细胞。误差线显示了每个分组的平均值±标准误。*t* 检验，ns: $P \geq 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $n = 4$ 。

3.7.2 SLC1A5 抑制剂导致肿瘤细胞增殖减弱并促进细胞凋亡

小分子药物可精确靶向肿瘤细胞中特定的生物分子和信号传导途径。因此，本研究使用 SLC1A5 抑制剂 V-9302 进一步探究了抑制 SLC1A5 表达对 BHT-101 的影响。与对照组相比，V-9302 使得 BHT-101 细胞的克隆数目下降 ($P < 0.001$, 图 3-45 A)，凋亡率上升 ($P < 0.05$, 图 3-45 B)。

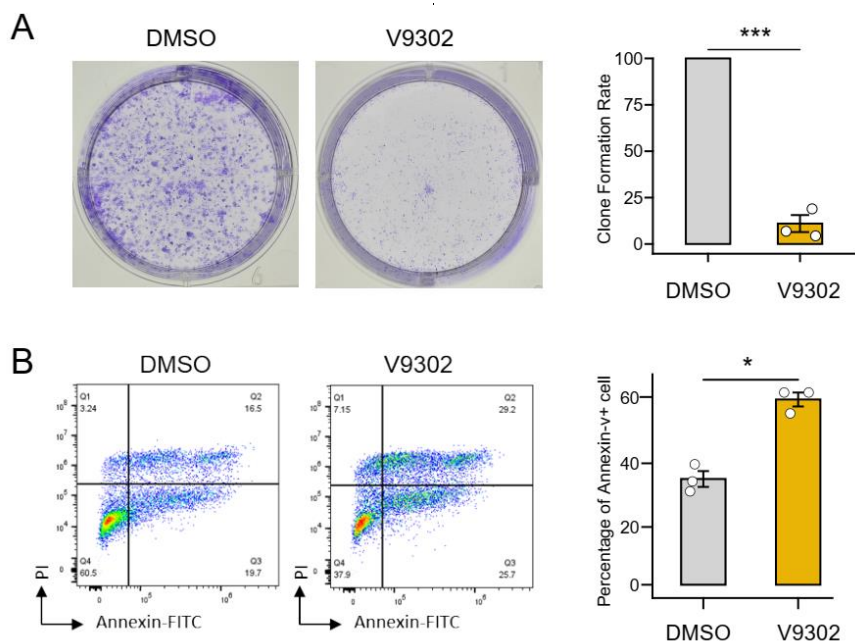


图 3-45 SLC1A5 抑制剂 V-9302 影响 BHT-101 细胞增殖和凋亡

(A) 克隆形成实验检测 V-9302 抑制剂 (15 μM) 对 BHT-101 的增殖影响。(B) 细胞凋亡检测 V9302 抑制剂对 BHT-101 凋亡影响。*t* 检验， $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, $n = 3$ 。

3.7.3 色氨酸代谢与 MYC 之间的正反馈调节

作为必需氨基酸，色氨酸及其下游产物的减少，会导致细胞的代谢环路受到影响，随之会引起一系列基因表达的变化。因此，本研究分别对色氨酸剥夺条件下和敲降 SLC1A5 的 BHT-101 进行了转录组学分析。RNA-seq 结果显示，分别有 612 和

1332 个基因在色氨酸剥夺和 shSLC1A5 的细胞中上调, 799 和 623 个基因在色氨酸剥夺和 shSLC1A5 的 BHT-101 中下调 (图 3-46 A-B)。除 *SLC1A5* 在色氨酸剥夺组和敲降 SLC1A5 组表达下调外, *SLC7A5* 也发生了下调 (图 3-46 C-D)。而令人意外的是, 在色氨酸剥夺以及 SLC1A5 表达下调时, *MYC* 的表达也下调 (图 3-46 E-F)。

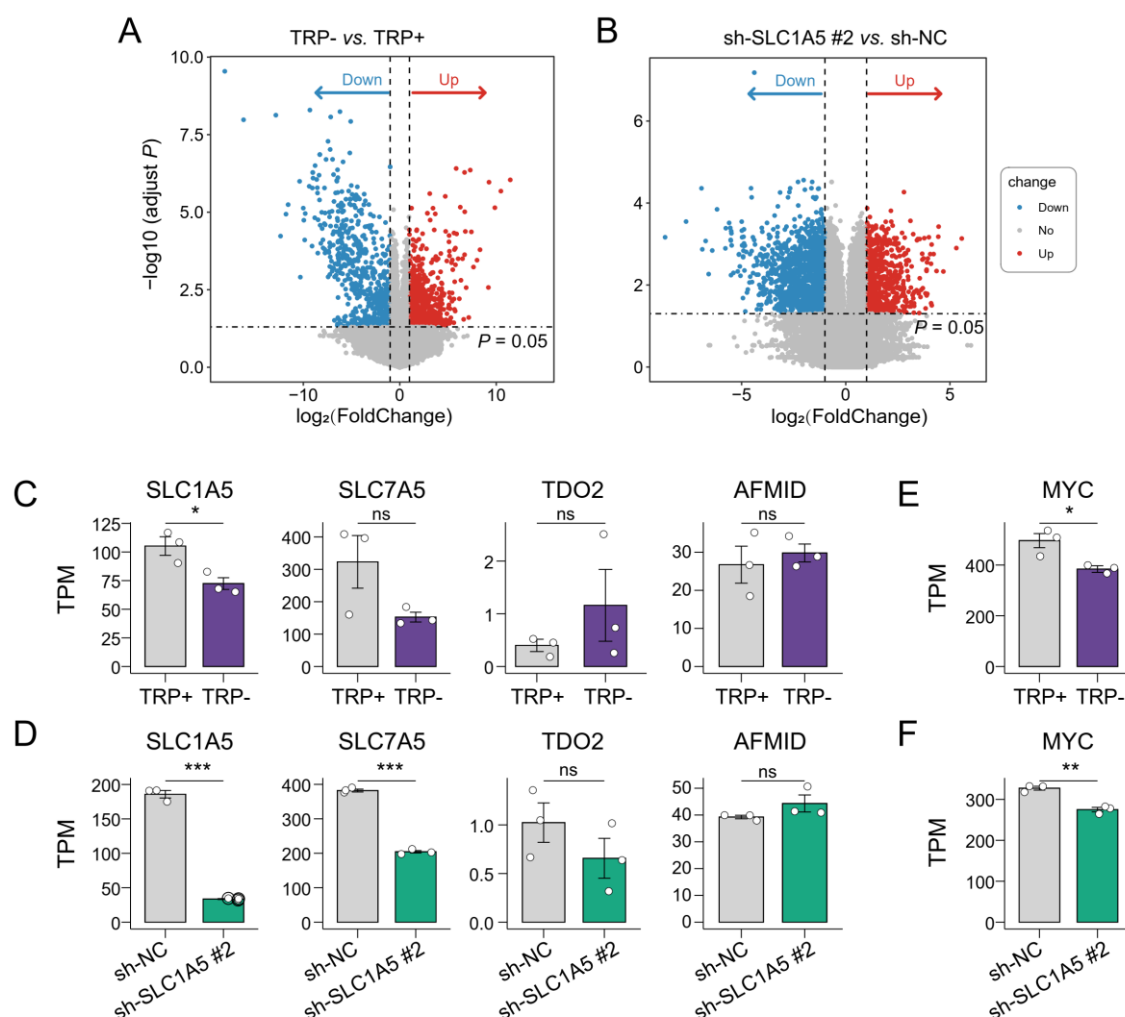


图 3-46 色氨酸剥夺和 SLC1A5 表达下调组的基因表达差异分析

(A) 色氨酸剥夺 (TRP-) 与色氨酸充足 (TRP+) 条件下的 BHT-101 基因表达差异分析火山图。
(B) 敲降 SLC1A5 与对照的 BHT-101 基因表达差异分析火山图。横轴代表 $\log_2\text{fold change}$, 纵轴表示 $-\log_{10}$ 转化后的 P_{adj} 值。(C) 色氨酸剥夺和 (D) 敲降 SLC1A5 后 BHT-101 中色氨酸转运和代谢相关基因表达情况。(E) 色氨酸剥夺和 (F) 敲降 SLC1A5 后 *MYC* 表达情况。TPM: Transcripts Per Million, 每百万转录本数。t 检验, ns: $P \geq 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $n = 3$ 。

本研究进一步探究了色氨酸剥夺后对 MYC 的影响，以了解色氨酸代谢和 MYC 之间的关联。结果表明，色氨酸剥夺后 MYC 表达下调（图 3-47 A）。同时，下调 SLC1A5 后，MYC 表达也发生下调（图 3-47 B）。放线菌酮（CHX）追踪实验表明，色氨酸剥夺条件下 MYC 蛋白的半衰期缩短（图 3-47 C）。

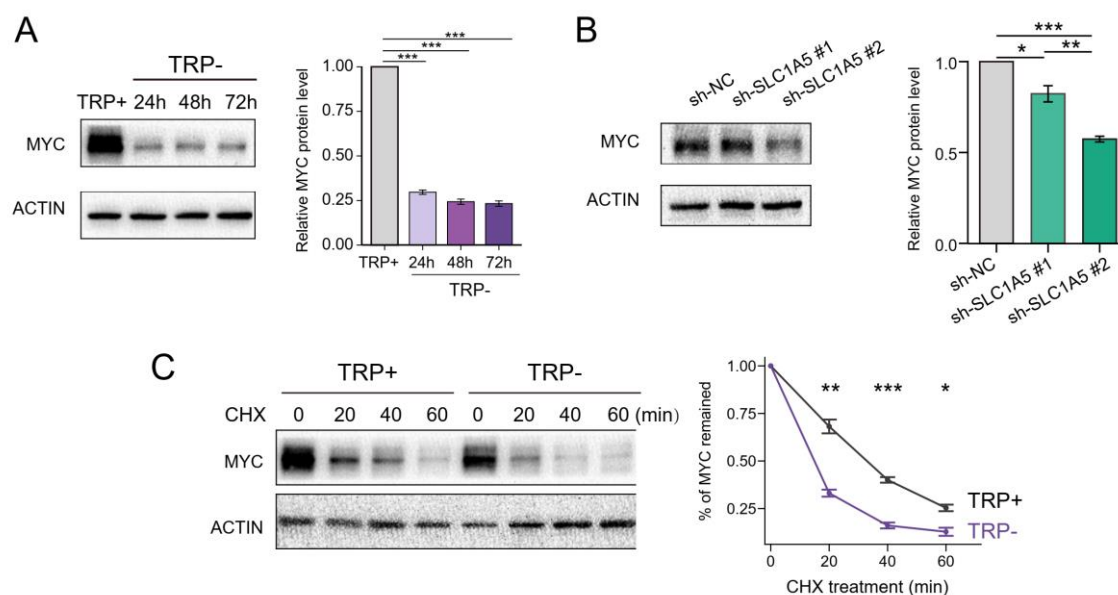


图 3-47 色氨酸剥夺与 MYC 表达的关系

（A）色氨酸剥夺条件下 BHT-101 中 MYC 的蛋白相对丰度。（B）下调 SLC1A5 后 BHT-101 细胞中 MYC 的蛋白相对丰度统计结果。（C）使用放线菌酮（50 $\mu\text{g/mL}$ ）处理完全培养基（TRP+）和色氨酸剥夺培养基（TRP-）培养的 BHT-101 细胞，并在不同的放线菌酮处理时间后检测 MYC 的蛋白相对丰度及统计结果。

4 讨论

ATC 作为一种极具侵袭性的肿瘤，可由高分化的 PTC 去分化发展而来。然而，当前缺乏能够合适地量化去分化程度的评估方法。同时，由于样本量有限，ATC 相关特征的全面评估仍然是一个未被充分探索的领域。本研究通过量化 TC 去分化程度，结合多组学整合分析和体外细胞模型，探究了 ATC 的分子特征和代谢通路及其对 ATC 的影响。

4.1 去分化程度评分评估甲状腺癌去分化程度的优势

ATC 是一种高度去分化的恶性肿瘤，在细胞特征上可能保留了部分非癌性甲状腺细胞的特点，因此 ATC 的诊断具有一定的挑战性。而 ATC 进展迅速，预后极差，快速诊断和基因分型对于患者的管理及其临床试验至关重要。

目前，细针抽吸是 ATC 诊断的首选检查方式，但其效果在不同情况下有较大差异，仍有将近 40% 的患者面临诊断不明确的问题^[202]。其他多项诊断指标也无法完整并特异地反映 TC 组织的分化状态^[203]。相比之下，本研究通过机器学习方法开发的去分化程度评分 DDScore 表现出多个优势：

（1）高特异性：免疫、代谢基因的表达与分化状态的变化密切相关。通过结合 WGCNA 和多种机器学习方法，本研究鉴定出 167 个与去分化相关的免疫和代谢特征基因。经过多数据集和多平台的验证，本研究所鉴定的特征基因可稳定地揭示 ATC 转录组水平的普遍变化。与其他分化有关标志物或基因集相比，利用 167 个特征基因构建的 DDScore 能更精确地描绘分化与去分化组织之间的差异，并可更为准确地定义甲状腺癌的去分化程度。

（2）跨平台兼容性：本研究整合了来自芯片数据、批量转录组测序及单细胞转录组测序在内的多种数据平台，并与其他指标进行了性能对比。与其他指标相比，DDScore 在不同数据平台上显示了卓越的稳定性和一致性，克服了以往研究中分化有关标志物在跨平台验证上的局限性。

（3）定量：与传统的实验室方法如染色或免疫荧光等相比，DDScore 提供了一

种准确定量的工具，便于度量和分析。

(4) 普适性：对 DDScore 在泛癌中的应用分析表明 DDScore 在多种癌症类型中也可准确表征肿瘤分化状态，凸显了不同肿瘤在去分化过程中免疫和代谢有关基因的相似变化，加深了对肿瘤去分化机制的理解。

4.2 甲状腺癌去分化伴随高度抑制性免疫微环境和代谢重编程

4.2.1 分化程度低的甲状腺癌具有高度抑制性的免疫微环境

实体肿瘤与各种类型的免疫细胞共存于复杂的 TME 中。基于所建立的去分化程度评分，本研究观察到分化程度低的 TC 样本中存在更高的耗竭 T 细胞浸润和多个免疫抑制基因的表达。而随着 TC 去分化程度评分的增加，其干细胞样特性和 MYC 表达水平亦逐渐上升。既往研究已表明，干细胞样的肿瘤细胞通过过表达 PD-L1 等免疫抑制性分子，与 T 细胞表面的 PD-1 受体相互作用，可有效阻止细胞毒性 T 细胞的激活，从而促进免疫抑制微环境的形成^[204, 205]。本研究的结果表明，TC 分化表型的丢失及其所伴随的干细胞样特征与免疫抑制微环境之间存在密切联系。

同时，在高分化的 TC 样本中可观察到较多的 naïve T 细胞浸润。当抗原提呈细胞特异性地提呈抗原给 naïve CD8⁺ T 时，其能迅速被激活，快速增殖并分化成具有细胞毒性的效应性 T 细胞，进而提供有效的免疫应答^[206]。而在分化程度低的样本中，本研究发现了较多的 CD8⁺ Tem 浸润。研究表明，肿瘤内部可能发生 CD8⁺ Tem 从活化状态向耗竭状态的动态转变^[207]，这可能是分化程度较低的样本中高 CD8⁺ Tem 浸润的原因。此外，对 TCGA 的泛癌分析结果显示，在分化程度较低的样本中，肿瘤浸润淋巴细胞的数量显著减少，说明肿瘤的去分化可导致高度抑制性的免疫微环境。

4.2.2 甲状腺癌去分化过程中多条代谢通路活性上调

在肿瘤的增殖和转移过程中，肿瘤细胞必须快速调整其代谢活性以满足持续增长的需求。近期的多项研究探讨了肿瘤细胞与 TME 之间的代谢交流如何影响治疗策略，突出了理解肿瘤的代谢特性对开发新的治疗方法的重要性^[208]。

通过应用 Compass 软件分析 TC 的芯片数据，本研究预测了不同分化状态下 TC

的代谢反应活性。在分化程度较低的样本中,本研究观察到糖酵解及其相关酶的活性显著上调。既往研究对甲状腺癌的代谢组学分析揭示了甲状腺正常组织和甲状腺肿瘤组织以及不同甲状腺病变之间在能量代谢上的显著差异^[209]。在正常甲状腺细胞中,能量主要来自线粒体的氧化磷酸化过程,而在 ATC 中,由于癌基因的激活与抑癌基因的失活,可观察到包括糖酵解途径在内的多种代谢活性变化。除糖酵解外,本研究发现 ATC 中 TCA 循环和磷酸戊糖途径的活性也有所增强。TCA 循环不仅是细胞代谢的关键环节,也是多条代谢途径的交汇点。尽管传统研究主要关注糖酵解对肿瘤生长的促进作用,并普遍认为肿瘤细胞倾向于利用有氧糖酵解而绕过 TCA 循环,但最新研究表明,某些肿瘤类型严重依赖 TCA 循环以产生能量和合成生物大分子^[210]。磷酸戊糖途径的活性上升则可满足恶性肿瘤细胞的分裂与增殖需求,特别是提供必要的核苷酸原料。有研究表明针对 PPP 途径的靶向干预可显著提高 TC 的细胞活性氧水平并诱导内质网应激和细胞凋亡^[211]。糖酵解、TCA 和磷酸戊糖途径三个代谢途径共享中间产物并相互调节,共同维持了低/未分化 TC 的能量产生和生物合成需求。

此外,在分化程度较低的样本中,除糖酵解、TCA 循环和磷酸戊糖途径的代谢活性变化外,本研究同时观察到脂质代谢和氨基酸代谢活性的显著变化。脂质代谢通过增强脂质合成、储存和分解代谢来维持肿瘤发生、进展以及治疗抵抗^[212]。研究表明异常的脂质代谢产生的部分产物与 TC 的生长和进展有关^[110, 213, 214]。本研究发现,在分化程度低的样本中,脂肪酸 β -氧化通路的限速酶——肉碱棕榈酰转移酶 CPT 所催化的反应活性显著上调。CPT 作为脂肪酸平衡的调节因子,对于处在恶劣的 TME 条件下的肿瘤细胞生物能量代谢具有调控作用^[215, 216]。同时,在低/未分化 TC 中,丙氨酸氨基转移酶及其催化的丙氨酸和 α -酮戊二酸之间的可逆反应活性显著增强。已有研究成果表明,相较于健康组织或良性甲状腺结节,恶性甲状腺病变的一个显著特征是乳酸水平的增加,且通常伴随丙氨酸水平的增加^[217-219]。丙酮酸作为一个代谢节点,不仅连接糖酵解和谷氨酰胺分解的代谢通路,还可促使谷氨酸的碳原子进入三羧酸循环。总的来说,为满足其快速增殖和高能量需求,ATC 中多个关键代谢通路活性发生变化。

4.3 色氨酸代谢与 MYC 之间的正反馈环路

4.3.1 MYC 调控色氨酸转运蛋白和代谢酶影响色氨酸代谢活性

Compass 预测结果表明, TC 的去分化程度与色氨酸代谢活性之间显著正相关。进一步的代谢组学结果显示, 相比高分化的 KTC-1 细胞, 未分化的 BHT-101 中色氨酸及其多个下游产物的含量下调, 而犬尿氨酸的含量在 BHT-101 和 KTC-1 间却无显著差异。犬尿氨酸可通过与芳香烃受体相互作用, 激活调节性 T 细胞和髓源抑制细胞, 抑制效应 T 细胞和天然杀伤细胞的活性^[220, 221]。此外, 犬尿氨酸还可以通过 SLC7A11 抑制铁死亡, 从而促进肿瘤细胞的生存^[222]。BHT-101 中犬尿氨酸的积累反映了去分化过程中肿瘤细胞在色氨酸代谢途径上的资源分配, 以满足其对于免疫逃逸和生长相关物质的需求。

同时, 转录组学分析结果表明, 涉及色氨酸代谢的多个酶如 *TDO2* 和 *AFMID* 的表达显著增加。既往研究表明多种类型的肿瘤细胞中 *IDO1* 或 *TDO2* 表达上调^[223]。*IDO1* 和 *TDO2* 可通过催化色氨酸的分解代谢及其代谢产物犬尿氨酸的生成, 损害免疫细胞功能, 介导免疫逃逸。例如, NK 细胞的功能可能受到 *IDO1* 介导的色氨酸代谢所生成的犬尿氨酸的影响^[174]。此前已有多种 *IDO1* 抑制剂进入临床试验。然而, *IDO1* 抑制剂在临床试验中的表现并不理想^[224]。本研究发现, BHT-101 中 *TDO2* 的表达显著上调, 说明 ATC 可依赖 *TDO2* 进行色氨酸的代谢。这一发现可能解释了在其他肿瘤中单一靶向 *IDO1* 疗效不佳的原因。因此, 在未来的研究和治疗策略中, 针对 *IDO1* 和 *TDO2* 的双重抑制剂可能会提供更有效的治疗选择。

作为代谢活动的关键调节因素, 酶的表达及代谢通路的活性受到转录因子的调控。本研究通过 *viper* 软件预测发现, 在分化程度低的样本中, 转录因子 MYC 活性显著上调, 进一步通过 CUT&Tag 方法证实, MYC 与 BHT-101 细胞中的启动子区域结合显著增强。异常活化的 MYC 促进肿瘤的代谢重编程, 从而导致肿瘤细胞持续增殖^[225, 226]。随后, 本研究发现 MYC 与多个色氨酸代谢有关蛋白具有相关性, 并在 CUT&Tag 的分析结果中发现, MYC 可调控色氨酸转运蛋白 *SLC1A5*、*SLC7A5* 以及代谢酶 *AFMID* 的表达, 进而调控色氨酸代谢活性。敲降 MYC 可导致色氨酸转运蛋

白 *SLC1A5*、*SLC7A5* 以及代谢酶 *AFMID* 表达下调。此前有研究报道,MYC 对 *SLC7A5* 的调控可能具有细胞特异性^[227]。因此,不同细胞类型中敲降 MYC 后 *SLC7A5* 表达的变化仍需进一步探索。

4.3.2 色氨酸剥夺下调 MYC 表达

MYC 在多种类型的肿瘤发生发展中扮演关键角色,已有多项研究尝试开发针对 MYC 的抑制剂^[228, 229]。然而,由于 MYC 蛋白的结构特性使其“不可成药”^[230]。因此,新的治疗策略提出直接干预由高活性 MYC 驱动的代谢途径。本研究发现 MYC 通过调控色氨酸转运蛋白和代谢酶影响色氨酸代谢活性,进而影响肿瘤的生存。基于此,本研究提出通过阻断色氨酸转运来抑制肿瘤中色氨酸代谢活性,进而抑制肿瘤恶性表型的可能性。

通过体外细胞实验,本研究观察到色氨酸剥夺可显著降低 BHT-101 细胞的增殖能力,并诱导 BHT-101 凋亡。同时,下调色氨酸转运蛋白 *SLC1A5* 表达,可导致色氨酸代谢产物减少、BHT-101 细胞的增殖能力下降以及凋亡率上升。此外,本研究发现,不论是在色氨酸剥夺还是 *SLC1A5* 表达下调的情况下,MYC 的表达均发生了下调(图 4-1)。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 是细胞营养感应和生长的中心调控信号,谷氨酰胺是激活 mTORC1 的关键因子^[231, 232]。谷氨酰胺的缺乏抑制 mTORC1 活性,而 mTORC1 的活性降低可通过抑制蛋白合成和促进蛋白降解来下调 MYC^[233, 234]。因此,可能与谷氨酰胺类似,在缺乏色氨酸时,肿瘤细胞下调 mTORC1 活性进而导致 MYC 降解来适应营养缺乏的环境。肿瘤细胞在饥饿条件下生长停滞,从而减少能量消耗以维持细胞存活,这一发现为开发基于代谢干预的治疗策略提供了理论基础。

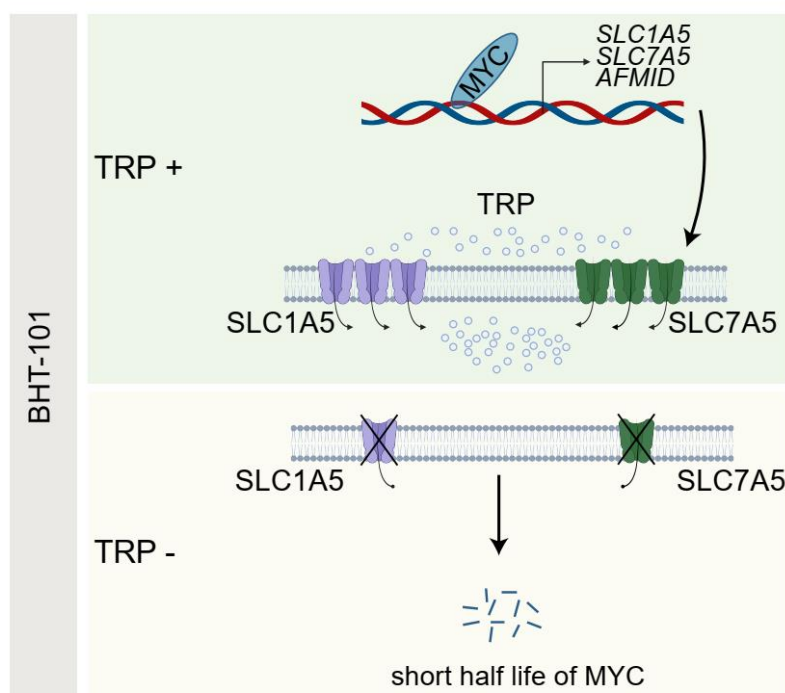


图 4-1 MYC 与色氨酸代谢、SLC1A5 之间的调控关系

4.4 本研究存在的不足及对未来的展望

本研究仍存在局限性。首先，由于 ATC 的罕见性，收集大量样本存在困难，导致研究结果的统计效力和普遍适用性受限。其次，尽管 DDScore 在不同的平台和数据中表现优越，但其应用也存在一些局限。例如，DDScore 尚未在临床中得到广泛验证，且其应用依赖于芯片或转录组测序技术，可能受限于样本质量和成本效益，限制了 DDScore 在资源有限的环境中的应用。因此，虽然 DDScore 提供了一种有前景的方法来评估肿瘤的去分化程度，但其在实际临床中的广泛应用仍需克服这些挑战。此外，本研究未进行体内实验和临床效果验证，影响了对 ATC 在生理环境中的行为及其对治疗的响应的全面理解。同时，由于缺少适合构建动物模型的鼠源的甲状腺癌细胞系，未能对甲状腺癌去分化过程中的免疫反应进行充分研究。

考虑到这些局限，未来的研究将致力于与其他医疗机构和研究中心合作，以获取更多样本，进一步验证本研究所建立的模型的效果。本研究计划开展体内实验，使用动物模型来模拟疾病的进展和治疗反应，以更全面地理解甲状腺未分化癌的发展机

制。本研究将对细胞模型进行补充，建立 PTC 细胞系 KTC-1 的色氨酸缺乏和 MYC 敲减模型，以深入研究 MYC 在色氨酸代谢中的调控作用及其对肿瘤行为的影响。此外，本研究计划研究具体的色氨酸代谢产物在 ATC 发展中的角色以及它们如何影响肿瘤微环境和治疗效果，以提供更深入的生物学洞察和识别新的潜在治疗靶点。

5 结论

1. 基于免疫及代谢特征基因建立的去分化程度评分可准确表征甲状腺癌的去分化程度，且去分化程度评分具有普适性，不同肿瘤的转移样本具有较高的去分化程度评分。
2. 甲状腺癌去分化过程伴随增强的免疫抑制性微环境和干细胞样特征，同时糖酵解、氧化磷酸化等多条代谢通路的活性上调。
3. 色氨酸代谢对甲状腺未分化癌的恶性进展至关重要，色氨酸剥夺可显著抑制甲状腺未分化癌细胞增殖并促进其凋亡。
4. 甲状腺未分化癌中 MYC 与色氨酸代谢之间存在正反馈环路。转录因子 MYC 调控色氨酸转运蛋白 SLC1A5 和代谢酶 AFMID 的表达促进色氨酸转运和代谢，敲降 MYC 导致 *SLC1A5*、*SLC7A5* 和 *AFMID* 表达下调；而下调 SLC1A5 或色氨酸剥夺可导致甲状腺未分化癌中 MYC 表达下调，色氨酸转运可作为甲状腺未分化癌的潜在治疗靶点。

6 创新性

- 1.本研究开发了基于免疫及代谢特征基因的去分化程度指标 **DDScore**,可更为准确地评估甲状腺癌的分化状态,突破了以往研究中分化有关标志物未能全面和跨平台评估甲状腺癌去分化程度的局限。
- 2.本研究填补了关于甲状腺未分化癌代谢特征的研究空白。通过生物信息学预测、转录组学和代谢组学验证,本研究发现甲状腺未分化癌中色氨酸代谢途径异常活跃,这一途径的高度活化促进了肿瘤细胞的恶性增殖。
- 3.本研究揭示了甲状腺未分化癌中 **MYC** 与色氨酸代谢之间的正反馈环路。

7 参考文献

- [1] E. Chmielik, D. Rusinek, M. Oczko-Wojciechowska et al. Heterogeneity of Thyroid Cancer. *Pathobiology*, 2018, 85(1-2):117-129
- [2] A. V. Chintakuntlawar, R. L. Foote, J. L. Kasperbauer et al. Diagnosis and Management of Anaplastic Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2019, 48(1):269-284
- [3] J. A. Fagin, S. A. Wells, Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med*, 2016, 375(11):1054-1067
- [4] G. Nagaiah, A. Hossain, C. J. Mooney et al. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Oncol*, 2011, 2011:542358
- [5] R. I. Haddad, W. M. Lydiatt, D. W. Ball et al. Anaplastic Thyroid Carcinoma, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw*, 2015, 13(9):1140-1150
- [6] A. C. Xavier, R. M. Maciel, J. G. Vieira et al. Insights into the posttranslational structural heterogeneity of thyroglobulin and its role in the development, diagnosis, and management of benign and malignant thyroid diseases. *Arch Endocrinol Metab*, 2016, 60(1):66-75
- [7] B. R. Haugen, E. K. Alexander, K. C. Bible et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, 2016, 26(1):1-133
- [8] G. Diaz-Soto, P. Fernandez-Velasco, B. Torres Torres et al. Evolution of suppressing TSH therapy at diagnosis and in the long-term follow-up in a cohort of differentiated thyroid cancer. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*, 2022, 69(10):844-851
- [9] A. N. Peiris, D. Medlock, M. Gavin. Thyroglobulin for Monitoring for Thyroid Cancer Recurrence. *JAMA*, 2019, 321(12):1228
- [10] Y. Zhu, Y. Song, G. Xu et al. Causes of misdiagnoses by thyroid fine-needle aspiration cytology (FNAC): our experience and a systematic review. *Diagn Pathol*, 2020, 15(1):1

- [11] M. Jin, J. Jakowski, P. E. Wakely, Jr. Undifferentiated (anaplastic) thyroid carcinoma and its mimics: a report of 59 cases. *J Am Soc Cytopathol*, 2016, 5(2):107-115
- [12] W. S. Mneimneh, S. L. Asa. Divergent Lineage Markers in Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2024, 48(2):230-237
- [13] X. M. Keutgen, S. M. Sadowski, E. Kebebew. Management of anaplastic thyroid cancer. *Gland Surg*, 2015, 4(1):44-51
- [14] K. T. Hsu, X. M. Yu, A. W. Audhya et al. Novel approaches in anaplastic thyroid cancer therapy. *Oncologist*, 2014, 19(11):1148-1155
- [15] I. Landa, T. Ibrahimipasic, L. Boucai et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*, 2016, 126(3):1052-1066
- [16] S. L. Kojic, S. S. Strugnell, S. M. Wiseman. Anaplastic thyroid cancer: a comprehensive review of novel therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(3):387-402
- [17] R. C. Smallridge, J. A. Copland. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2010, 22(6):486-497
- [18] M. Ma, B. Lin, M. Wang et al. Immunotherapy in anaplastic thyroid cancer. *Am J Transl Res*, 2020, 12(3):974-988
- [19] J. Capdevila, L. J. Wirth, T. Ernst et al. PD-1 Blockade in Anaplastic Thyroid Carcinoma. *J Clin Oncol*, 2020, 38(23):2620-2627
- [20] A. V. Chintakuntlawar, J. Yin, R. L. Foote et al. A Phase 2 Study of Pembrolizumab Combined with Chemoradiotherapy as Initial Treatment for Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid*, 2019, 29(11):1615-1622
- [21] H. Luo, X. Xia, G. D. Kim et al. Characterizing dedifferentiation of thyroid cancer by integrated analysis. *Sci Adv*, 2021, 7(31)
- [22] F. Moretti, A. Farsetti, S. Soddu et al. p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. *Oncogene*, 1997, 14(6):729-740
- [23] S. M. Shiller, K. Konduri, L. K. Harshman et al. Recurrent thyroid cancer with changing histologic features. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2010, 23(3):304-310
- [24] M. Holzel, A. Bovier, T. Tuting. Plasticity of tumour and immune cells: a source of

- heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(5):365-376
- [25] S. Boumahdi, F. J. de Sauvage. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(1):39-56
- [26] R. R. Langley, I. J. Fidler. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*, 2011, 128(11):2527-2535
- [27] D. F. Quail, J. A. Joyce. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 2013, 19(11):1423-1437
- [28] Y. Yamada, H. Haga, Y. Yamada. Concise review: dedifferentiation meets cancer development: proof of concept for epigenetic cancer. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(10):1182-1187
- [29] A. M. Laughney, J. Hu, N. R. Campbell et al. Regenerative lineages and immune-mediated pruning in lung cancer metastasis. *Nat Med*, 2020, 26(2):259-269
- [30] L. Castagnoli, V. Cancila, S. L. Cordoba-Romero et al. WNT signaling modulates PD-L1 expression in the stem cell compartment of triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 2019, 38(21):4047-4060
- [31] A. M. Paczulla, K. Rothfelder, S. Raffel et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature*, 2019, 572(7768):254-259
- [32] Y. Miao, H. Yang, J. Levorse et al. Adaptive Immune Resistance Emerges from Tumor-Initiating Stem Cells. *Cell*, 2019, 177(5):1172-1186 e1114
- [33] B. C. Prager, Q. Xie, S. Bao et al. Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1):41-53
- [34] S. Yuan, R. J. Norgard, B. Z. Stanger. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov*, 2019, 9(7):837-851
- [35] S. C. Tripathi, H. L. Peters, A. Taguchi et al. Immunoproteasome deficiency is a feature of non-small cell lung cancer with a mesenchymal phenotype and is associated with a poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(11):E1555-1564
- [36] M. P. Mak, P. Tong, L. Diao et al. A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature

- Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3):609-620
- [37] A. Mehta, Y. J. Kim, L. Robert et al. Immunotherapy Resistance by Inflammation-Induced Dedifferentiation. *Cancer Discov*, 2018, 8(8):935-943
- [38] S. Riesenberger, A. Groetjen, R. Siddaway et al. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat Commun*, 2015, 6:8755
- [39] J. Landsberg, J. Kohlmeyer, M. Renn et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*, 2012, 490(7420):412-416
- [40] E. Perez-Guijarro, H. H. Yang, R. E. Araya et al. Multimodel preclinical platform predicts clinical response of melanoma to immunotherapy. *Nat Med*, 2020, 26(5):781-791
- [41] H. Hardin, R. Zhang, H. Helein et al. The evolving concept of cancer stem-like cells in thyroid cancer and other solid tumors. *Lab Invest*, 2017, 97(10):1142-1151
- [42] V. Veschi, F. Verona, M. Lo Iacono et al. Cancer Stem Cells in Thyroid Tumors: From the Origin to Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11:566
- [43] A. M. Lim, B. J. Solomon. Immunotherapy for Anaplastic Thyroid Carcinoma. *J Clin Oncol*, 2020, 38(23):2603-2604
- [44] D. Friedmann-Morvinski, I. M. Verma. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO Rep*, 2014, 15(3):244-253
- [45] W. A. Flavahan, Q. Wu, M. Hitomi et al. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci*, 2013, 16(10):1373-1382
- [46] C. Lehoude, F. Dupuy, R. Rabinovitch et al. Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res*, 2016, 76(18):5201-5208
- [47] O. Warburg. On the origin of cancer cells. *Science*, 1956, 123(3191):309-314
- [48] N. N. Pavlova, C. B. Thompson. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 2016, 23(1):27-47
- [49] G. J. Yoshida. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34:111

- [50] H. Kondoh, M. E. Lleonart, J. Gil et al. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res*, 2005, 65(1):177-185
- [51] A. D. Panopoulos, O. Yanes, S. Ruiz et al. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res*, 2012, 22(1):168-177
- [52] Y. Li, J. J. Gruber, U. M. Litzenburger et al. Acetate supplementation restores chromatin accessibility and promotes tumor cell differentiation under hypoxia. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2):102
- [53] S. Park, D. Mossmann, Q. Chen et al. Transcription factors TEAD2 and E2A globally repress acetyl-CoA synthesis to promote tumorigenesis. *Mol Cell*, 2022, 82(22):4246-4261 e4211
- [54] H. Jiang, R. L. Greathouse, S. J. Tiche et al. Mitochondrial Uncoupling Induces Epigenome Remodeling and Promotes Differentiation in Neuroblastoma. *Cancer Res*, 2023, 83(2):181-194
- [55] G. Farnie, F. Sotgia, M. P. Lisanti. High mitochondrial mass identifies a subpopulation of stem-like cancer cells that are chemo-resistant. *Oncotarget*, 2015, 6(31):30472-30486
- [56] D. F. Quail, M. J. Taylor, L. M. Postovit. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2012, 7(3):197-216
- [57] H. Axelson, E. Fredlund, M. Ovenberger et al. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16(4-5):554-563
- [58] B. Keith, M. C. Simon. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, 2007, 129(3):465-472
- [59] F. Peng, J. H. Wang, W. J. Fan et al. Glycolysis gatekeeper PDK1 reprograms breast cancer stem cells under hypoxia. *Oncogene*, 2018, 37(8):1062-1074
- [60] S. Singer, K. Millis, K. Souza et al. Correlation of lipid content and composition with liposarcoma histology and grade. *Ann Surg Oncol*, 1997, 4(7):557-563
- [61] Z. Wang, L. Y. Yip, J. H. J. Lee et al. Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. *Nat Med*, 2019, 25(5):825-837
- [62] R. E. Ericksen, S. L. Lim, E. McDonnell et al. Loss of BCAA Catabolism during

- Carcinogenesis Enhances mTORC1 Activity and Promotes Tumor Development and Progression. *Cell Metab*, 2019, 29(5):1151-1165 e1156
- [63] F. Froidi, P. Pachnis, M. Szuperak et al. Histidine is selectively required for the growth of Myc-dependent dedifferentiation tumours in the *Drosophila* CNS. *EMBO J*, 2019, 38(7)
- [64] L. Ippolito, A. Morandi, M. L. Taddei et al. Cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer malignancy via metabolic rewiring and mitochondrial transfer. *Oncogene*, 2019, 38(27):5339-5355
- [65] K. Satoh, S. Yachida, M. Sugimoto et al. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(37):E7697-E7706
- [66] W. Xu, S. Wang, Q. Chen et al. TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer. *Cell Death Dis*, 2014, 5(2):e1055
- [67] W. Wagner, W. M. Ciszewski, K. D. Kania. L- and D-lactate enhance DNA repair and modulate the resistance of cervical carcinoma cells to anticancer drugs via histone deacetylase inhibition and hydroxycarboxylic acid receptor 1 activation. *Cell Commun Signal*, 2015, 13:36
- [68] G. Wang, J. J. Wang, P. H. Yin et al. New strategies for targeting glucose metabolism-mediated acidosis for colorectal cancer therapy. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1):348-368
- [69] X. Q. Ye, Q. Li, G. H. Wang et al. Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int J Cancer*, 2011, 129(4):820-831
- [70] F. Dupuy, S. Tabaries, S. Andrzejewski et al. PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab*, 2015, 22(4):577-589
- [71] S. H. Issaq, B. A. Teicher, A. Monks. Bioenergetic properties of human sarcoma cells help define sensitivity to metabolic inhibitors. *Cell Cycle*, 2014, 13(7):1152-1161
- [72] T. Cascone, J. A. McKenzie, R. M. Mbofung et al. Increased Tumor Glycolysis Characterizes Immune Resistance to Adoptive T Cell Therapy. *Cell Metab*, 2018,

27(5):977-987 e974

- [73] I. Elia, M. C. Haigis. Metabolites and the tumour microenvironment: from cellular mechanisms to systemic metabolism. *Nat Metab*, 2021, 3(1):21-32
- [74] S. Kouidhi, F. Ben Ayed, A. Benammar Elgaaied. Targeting Tumor Metabolism: A New Challenge to Improve Immunotherapy. *Front Immunol*, 2018, 9:353
- [75] K. Fischer, P. Hoffmann, S. Voelkl et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 2007, 109(9):3812-3819
- [76] S. M. Morrissey, F. Zhang, C. Ding et al. Tumor-derived exosomes drive immunosuppressive macrophages in a pre-metastatic niche through glycolytic dominant metabolic reprogramming. *Cell Metab*, 2021, 33(10):2040-2058 e2010
- [77] Y. Liu, X. Liang, W. Dong et al. Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8(+) T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation. *Cancer Cell*, 2018, 33(3):480-494 e487
- [78] C. A. Opitz, U. M. Litzenburger, F. Sahm et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 2011, 478(7368):197-203
- [79] K. Jin, C. Qian, J. Lin et al. Cyclooxygenase-2-Prostaglandin E2 pathway: A key player in tumor-associated immune cells. *Front Oncol*, 2023, 13:1099811
- [80] B. Allard, D. Allard, L. Buisseret et al. The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(10):611-629
- [81] J. Afonso, L. L. Santos, A. Longatto-Filho et al. Competitive glucose metabolism as a target to boost bladder cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol*, 2020, 17(2):77-106
- [82] H. Lv, G. Lv, C. Chen et al. NAD(+) Metabolism Maintains Inducible PD-L1 Expression to Drive Tumor Immune Evasion. *Cell Metab*, 2021, 33(1):110-127 e115
- [83] Y. Wang, Y. Wang, Y. Ren et al. Metabolic modulation of immune checkpoints and novel therapeutic strategies in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 3):542-565
- [84] B. Chen, M. S. Khodadoust, C. L. Liu et al. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. *Methods Mol Biol*, 2018, 1711:243-259
- [85] A. M. Newman, C. B. Steen, C. L. Liu et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7):773-782
- [86] K. Wang, S. Patkar, J. S. Lee et al. Deconvolving Clinically Relevant Cellular

- Immune Cross-talk from Bulk Gene Expression Using CODEFACS and LIRICS Stratifies Patients with Melanoma to Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Discov*, 2022, 12(4):1088-1105
- [87] F. Finotello, C. Mayer, C. Plattner et al. Molecular and pharmacological modulators of the tumor immune contexture revealed by deconvolution of RNA-seq data. *Genome Med*, 2019, 11(1):34
- [88] J. Racle, K. de Jonge, P. Baumgaertner et al. Simultaneous enumeration of cancer and immune cell types from bulk tumor gene expression data. *Elife*, 2017, 6
- [89] B. Li, E. Severson, J. C. Pignon et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol*, 2016, 17(1):174
- [90] K. Tao, Z. Bian, Q. Zhang et al. Machine learning-based genome-wide interrogation of somatic copy number aberrations in circulating tumor DNA for early detection of hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine*, 2020, 56:102811
- [91] J. J. Chabon, E. G. Hamilton, D. M. Kurtz et al. Integrating genomic features for non-invasive early lung cancer detection. *Nature*, 2020, 580(7802):245-251
- [92] M. E. Maros, D. Capper, D. T. W. Jones et al. Machine learning workflows to estimate class probabilities for precision cancer diagnostics on DNA methylation microarray data. *Nat Protoc*, 2020, 15(2):479-512
- [93] J. Liu, C. Xia, G. Wang. Multi-Omics Analysis in Initiation and Progression of Meningiomas: From Pathogenesis to Diagnosis. *Front Oncol*, 2020, 10:1491
- [94] L. Zhao, V. H. F. Lee, M. K. Ng et al. Molecular subtyping of cancer: current status and moving toward clinical applications. *Brief Bioinform*, 2019, 20(2):572-584
- [95] Y. Z. Jiang, Y. Liu, Y. Xiao et al. Molecular subtyping and genomic profiling expand precision medicine in refractory metastatic triple-negative breast cancer: the FUTURE trial. *Cell Res*, 2021, 31(2):178-186
- [96] M. List, A. C. Hauschild, Q. Tan et al. Classification of breast cancer subtypes by combining gene expression and DNA methylation data. *J Integr Bioinform*, 2014, 11(2):236
- [97] A. Kamoun, A. Idhah, C. Dehais et al. Integrated multi-omics analysis of oligodendroglial tumours identifies three subgroups of 1p/19q co-deleted gliomas. *Nat Commun*, 2016, 7:11263
-

- [98] N. Cancer Genome Atlas Research, J. N. Weinstein, E. A. Collisson et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet*, 2013, 45(10):1113-1120
- [99] E. F. Franco, P. Rana, A. Cruz et al. Performance Comparison of Deep Learning Autoencoders for Cancer Subtype Detection Using Multi-Omics Data. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(9)
- [100] O. Elemento, C. Leslie, J. Lundin et al. Artificial intelligence in cancer research, diagnosis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(12):747-752
- [101] B. Lin, H. Ma, M. Ma et al. The incidence and survival analysis for anaplastic thyroid cancer: a SEER database analysis. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9):5888-5896
- [102] I. Landa, M. E. Cabanillas. Genomic alterations in thyroid cancer: biological and clinical insights. *Nat Rev Endocrinol*, 2024, 20(2):93-110
- [103] R. Edgar, M. Domrachev, A. E. Lash. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1):207-210
- [104] A. Wagner, C. Wang, J. Fessler et al. Metabolic modeling of single Th17 cells reveals regulators of autoimmunity. *Cell*, 2021, 184(16):4168-4185 e4121
- [105] T. Jikuzono, T. Ishikawa, M. Hirokawa et al. Microarray analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded follicular thyroid carcinoma samples from patients who developed postoperative distant metastasis. *BMC Res Notes*, 2020, 13(1):241
- [106] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE29265>
- [107] G. Dom, M. Tarabichi, K. Unger et al. A gene expression signature distinguishes normal tissues of sporadic and radiation-induced papillary thyroid carcinomas. *Br J Cancer*, 2012, 107(6):994-1000
- [108] J. M. Pita, I. F. Figueiredo, M. M. Moura et al. Cell cycle deregulation and TP53 and RAS mutations are major events in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(3):E497-507
- [109] J. M. Pita, A. Banito, B. M. Cavaco et al. Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. *Br J Cancer*, 2009, 101(10):1782-1791
- [110] C. A. von Roemeling, L. A. Marlow, A. B. Pinkerton et al. Aberrant lipid metabolism in anaplastic thyroid carcinoma reveals stearoyl CoA desaturase 1 as a novel

- therapeutic target. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(5):E697-709
- [111] B. Wojtas, A. Pfeifer, M. Oczko-Wojciechowska et al. Gene Expression (mRNA) Markers for Differentiating between Malignant and Benign Follicular Thyroid Tumours. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6)
- [112] J. Haase, D. Misiak, M. Bauer et al. IGF2BP1 is the first positive marker for anaplastic thyroid carcinoma diagnosis. *Mod Pathol*, 2021, 34(1):32-41
- [113] M. E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7):e47
- [114] S. Bhattacharya, P. Dunn, C. G. Thomas et al. ImmPort, toward repurposing of open access immunological assay data for translational and clinical research. *Sci Data*, 2018, 5:180015
- [115] M. I. Love, W. Huber, S. Anders. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 2014, 15(12):550
- [116] T. Wu, E. Hu, S. Xu et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)*, 2021, 2(3):100141
- [117] D. Aran, Z. Hu, A. J. Butte. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol*, 2017, 18(1):220
- [118] V. Thorsson, D. L. Gibbs, S. D. Brown et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*, 2018, 48(4):812-830 e814
- [119] L. Garcia-Alonso, C. H. Holland, M. M. Ibrahim et al. Corrigendum: Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities. *Genome Res*, 2021, 31(4):745
- [120] M. J. Alvarez, Y. Shen, F. M. Giorgi et al. Functional characterization of somatic mutations in cancer using network-based inference of protein activity. *Nat Genet*, 2016, 48(8):838-847
- [121] S. Suo, Q. Zhu, A. Saadatpour et al. Revealing the Critical Regulators of Cell Identity in the Mouse Cell Atlas. *Cell Rep*, 2018, 25(6):1436-1445 e1433
- [122] A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 2013, 29(1):15-21
- [123] M. Rebhan, V. Chalifa-Caspi, J. Prilusky et al. GeneCards: a novel functional

- genomics compendium with automated data mining and query reformulation support. *Bioinformatics*, 1998, 14(8):656-664
- [124] B. Li, C. N. Dewey. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12:323
- [125] B. Langmead, S. L. Salzberg. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 2012, 9(4):357-359
- [126] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 2009, 25(16):2078-2079
- [127] L. L. Cunha, L. S. Ward. Translating the immune microenvironment of thyroid cancer into clinical practice. *Endocr Relat Cancer*, 2022, 29(6):R67-R83
- [128] L. Bao, T. Xu, X. Lu et al. Metabolic Reprogramming of Thyroid Cancer Cells and Crosstalk in Their Microenvironment. *Front Oncol*, 2021, 11:773028
- [129] M. Kanehisa, M. Furumichi, M. Tanabe et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):D353-D361
- [130] C. Xu, S. Wang, Y. Wu et al. Recent advances in understanding the roles of sialyltransferases in tumor angiogenesis and metastasis. *Glycoconj J*, 2021, 38(1):119-127
- [131] S. Vasseur, C. Malicet, E. L. Calvo et al. Gene expression profiling of tumours derived from rasV12/E1A-transformed mouse embryonic fibroblasts to identify genes required for tumour development. *Mol Cancer*, 2005, 4(1):4
- [132] B. Ma, H. Jiang, D. Wen et al. Transcriptome Analyses Identify a Metabolic Gene Signature Indicative of Dedifferentiation of Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(9):3713-3725
- [133] J. Inoue, M. Kishikawa, H. Tsuda et al. Identification of PDHX as a metabolic target for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 2021, 112(7):2792-2802
- [134] R. Xu, J. Song, R. Ruze et al. SQLE promotes pancreatic cancer growth by attenuating ER stress and activating lipid rafts-regulated Src/PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death Dis*, 2023, 14(8):497
- [135] Z. Zhang, W. Wu, H. Jiao et al. Squalene epoxidase promotes hepatocellular carcinoma development by activating STRAP transcription and TGF-beta/SMAD signalling. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(12):1562-1581

- [136] R. Pathania, S. Ramachandran, S. Elangovan et al. DNMT1 is essential for mammary and cancer stem cell maintenance and tumorigenesis. *Nat Commun*, 2015, 6:6910
- [137] R. Gao, S. Bai, Y. C. Henderson et al. Delineating copy number and clonal substructure in human tumors from single-cell transcriptomes. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(5):599-608
- [138] W. Pu, X. Shi, P. Yu et al. Single-cell transcriptomic analysis of the tumor ecosystems underlying initiation and progression of papillary thyroid carcinoma. *Nat Commun*, 2021, 12(1):6058
- [139] M. Rivera, R. A. Ghossein, H. Schoder et al. Histopathologic characterization of radioactive iodine-refractory fluorodeoxyglucose-positron emission tomography-positive thyroid carcinoma. *Cancer*, 2008, 113(1):48-56
- [140] M. S. Brose, C. M. Nutting, B. Jarzab et al. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*, 2014, 384(9940):319-328
- [141] H. J. Schulten, D. Hussein, F. Al-Adwani et al. Microarray expression profiling identifies genes, including cytokines, and biofunctions, as diapodesis, associated with a brain metastasis from a papillary thyroid carcinoma. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(10):2140-2161
- [142] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE202413>
- [143] C. Colombo, E. Minna, C. Gargiuli et al. The molecular and gene/miRNA expression profiles of radioiodine resistant papillary thyroid cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):245
- [144] O. Z. Akyay, E. Gov, H. Kenar et al. Mapping the Molecular Basis and Markers of Papillary Thyroid Carcinoma Progression and Metastasis Using Global Transcriptome and microRNA Profiling. *OMICS*, 2020, 24(3):148-159
- [145] M. Tarabichi, M. Saiselet, C. Tresallet et al. Revisiting the transcriptional analysis of primary tumours and associated nodal metastases with enhanced biological and statistical controls: application to thyroid cancer. *Br J Cancer*, 2015, 112(10):1665-1674
- [146] N. Cancer Genome Atlas Research. Integrated genomic characterization of papillary

- thyroid carcinoma. *Cell*, 2014, 159(3):676-690
- [147] T. Xu, T. Jin, X. Lu et al. A signature of circadian rhythm genes in driving anaplastic thyroid carcinoma malignant progression. *Cell Signal*, 2022, 95:110332
- [148] X. Wang, W. Peng, C. Li et al. Identification of an immune-related signature indicating the dedifferentiation of thyroid cells. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):231
- [149] M. Gugnoni, E. Lorenzini, I. Faria do Valle et al. Adding pieces to the puzzle of differentiated-to-anaplastic thyroid cancer evolution: the oncogene E2F7. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2):99
- [150] T. M. Malta, A. Sokolov, A. J. Gentles et al. Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation. *Cell*, 2018, 173(2):338-354 e315
- [151] I. Ben-Porath, M. W. Thomson, V. J. Carey et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*, 2008, 40(5):499-507
- [152] I. Shats, M. L. Gatz, J. T. Chang et al. Using a stem cell-based signature to guide therapeutic selection in cancer. *Cancer Res*, 2011, 71(5):1772-1780
- [153] X. Yan, L. Ma, D. Yi et al. A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(4):1591-1596
- [154] T. A. Venezia, A. A. Merchant, C. A. Ramos et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*, 2004, 2(10):e301
- [155] N. P. Palmer, P. R. Schmid, B. Berger et al. A gene expression profile of stem cell pluripotentiality and differentiation is conserved across diverse solid and hematopoietic cancers. *Genome Biol*, 2012, 13(8):R71
- [156] D. J. Wong, H. Liu, T. W. Ridky et al. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(4):333-344
- [157] J. Kim, A. J. Woo, J. Chu et al. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell*, 2010, 143(2):313-324
- [158] J. Kim, S. H. Orkin. Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. *Genome Med*, 2011,

3(11):75

- [159] D. Hanahan, R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5):646-674
- [160] J. W. Kotei, J. P. Neijt, B. A. Zonnenberg et al. The difference between benign and malignant tumours explained with the 4-mutation paradigm for carcinogenesis. *Anticancer Res*, 1993, 13(4):1179-1182
- [161] D. Hanahan. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 2022, 12(1):31-46
- [162] A. V. Ivshina, J. George, O. Senko et al. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res*, 2006, 66(21):10292-10301
- [163] A. L. Tarca, M. Lauria, M. Unger et al. Strengths and limitations of microarray-based phenotype prediction: lessons learned from the IMPROVER Diagnostic Signature Challenge. *Bioinformatics*, 2013, 29(22):2892-2899
- [164] F. A. Monzon, M. Lyons-Weiler, L. J. Buturovic et al. Multicenter validation of a 1,550-gene expression profile for identification of tumor tissue of origin. *J Clin Oncol*, 2009, 27(15):2503-2508
- [165] S. Balasenthil, N. Chen, S. T. Lott et al. A migration signature and plasma biomarker panel for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(1):137-149
- [166] S. R. Lambert, N. Mladkova, A. Gulati et al. Key differences identified between actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma by transcriptome profiling. *Br J Cancer*, 2014, 110(2):520-529
- [167] M. Binnewies, E. W. Roberts, K. Kersten et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*, 2018, 24(5):541-550
- [168] T. Nakayama, K. Hirahara, A. Onodera et al. Th2 Cells in Health and Disease. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35:53-84
- [169] J. Zhu. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 2015, 75(1):14-24
- [170] A. Christofides, L. Strauss, A. Yeo et al. The complex role of tumor-infiltrating macrophages. *Nat Immunol*, 2022, 23(8):1148-1156

- [171] S. B. Coffelt, K. Kersten, C. W. Doornebal et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*, 2015, 522(7556):345-348
- [172] M. Siwicki, M. J. Pittet. Versatile neutrophil functions in cancer. *Semin Immunol*, 2021, 57:101538
- [173] N. K. Wolf, D. U. Kissiov, D. H. Raulet. Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(2):90-105
- [174] N. A. Maskalenko, D. Zhigarev, K. S. Campbell. Harnessing natural killer cells for cancer immunotherapy: dispatching the first responders. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(8):559-577
- [175] C. Zhang, Q. Sheng, X. Zhang et al. Prioritizing exhausted T cell marker genes highlights immune subtypes in pan-cancer. *iScience*, 2023, 26(4):106484
- [176] W. H. Fridman, F. Pages, C. Sautès-Fridman et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4):298-306
- [177] J. Saltz, R. Gupta, L. Hou et al. Spatial Organization and Molecular Correlation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Using Deep Learning on Pathology Images. *Cell Rep*, 2018, 23(1):181-193 e187
- [178] X. Lian, K. Yang, R. Li et al. Immunometabolic rewiring in tumorigenesis and anti-tumor immunotherapy. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):27
- [179] E. S. Ali, I. Ben-Sahra. Regulation of nucleotide metabolism in cancers and immune disorders. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(11):950-966
- [180] G. Yu, C. J. Cheng, S. C. Lin et al. Organelle-Derived Acetyl-CoA Promotes Prostate Cancer Cell Survival, Migration, and Metastasis via Activation of Calmodulin Kinase II. *Cancer Res*, 2018, 78(10):2490-2502
- [181] A. Cesar-Razquin, B. Snijder, T. Frappier-Brinton et al. A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell*, 2015, 162(3):478-487
- [182] F. Li, R. Zhang, S. Li et al. IDO1: An important immunotherapy target in cancer treatment. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47:70-77
- [183] N. Marechal, B. P. Serrano, X. Zhang et al. Formation of thyroid hormone revealed by a cryo-EM structure of native bovine thyroglobulin. *Nat Commun*, 2022, 13(1):2380

- [184] Z. Xu, Y. Feng, Y. Yan et al. HHEX suppresses advanced thyroid cancer by interacting with TLE3. *Mol Cell Endocrinol*, 2023, 574:111988
- [185] A. Kobiita, P. N. Silva, M. W. Schmid et al. FoxM1 coordinates cell division, protein synthesis, and mitochondrial activity in a subset of beta cells during acute metabolic stress. *Cell Rep*, 2023, 42(8):112986
- [186] F. Ren, L. Wang, X. Shen et al. MYBL2 is an independent prognostic marker that has tumor-promoting functions in colorectal cancer. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(4):1542-1552
- [187] J. van Riggelen, A. Yetil, D. W. Felsher. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(4):301-309
- [188] Q. Q. Zhu, C. Ma, Q. Wang et al. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol*, 2016, 37(1):185-197
- [189] Y. Dong, R. Tu, H. Liu et al. Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):124
- [190] M. Yue, J. Jiang, P. Gao et al. Oncogenic MYC Activates a Feedforward Regulatory Loop Promoting Essential Amino Acid Metabolism and Tumorigenesis. *Cell Rep*, 2017, 21(13):3819-3832
- [191] C. Topham, A. Tighe, P. Ly et al. MYC Is a Major Determinant of Mitotic Cell Fate. *Cancer Cell*, 2015, 28(1):129-140
- [192] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE196323>
- [193] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE106312>
- [194] X. Qiao, Y. Liu, M. L. Prada et al. UBR5 Is Coamplified with MYC in Breast Tumors and Encodes an Ubiquitin Ligase That Limits MYC-Dependent Apoptosis. *Cancer Res*, 2020, 80(7):1414-1427
- [195] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE124909>
- [196] L. J. Valentijn, J. Koster, F. Haneveld et al. Functional MYCN signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of MYCN amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(47):19190-19195
- [197] D. K. Sullivan, A. Deutzmann, J. Yarbrough et al. MYC oncogene elicits tumorigenesis associated with embryonic, ribosomal biogenesis, and tissue-lineage dedifferentiation gene expression changes. *Oncogene*, 2022, 41(45):4960-4970

- [198] C. V. Dang, E. P. Reddy, K. M. Shokat et al. Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(8):502-508
- [199] D. R. Wise, R. J. DeBerardinis, A. Mancuso et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(48):18782-18787
- [200] M. Yuneva, N. Zamboni, P. Oefner et al. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol*, 2007, 178(1):93-105
- [201] Y. Fujiwara, S. Kato, M. K. Nesline et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors and cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev*, 2022, 110:102461
- [202] A. Silver Karcioğlu, A. J. Iwata, M. Pusztaszeri et al. The American Thyroid Association (ATA) integrates molecular testing into its framework for managing patients with anaplastic thyroid carcinoma (ATC): Update on the 2021 ATA ATC guidelines. *Cancer Cytopathol*, 2022, 130(3):174-180
- [203] P. Podany, R. Abi-Raad, A. Barbieri et al. Anaplastic Thyroid Carcinoma: Cytomorphologic Features on Fine-Needle Aspiration and Associated Diagnostic Challenges. *Am J Clin Pathol*, 2022, 157(4):608-619
- [204] A. Jogi, M. Vaapil, M. Johansson et al. Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Ups J Med Sci*, 2012, 117(2):217-224
- [205] M. Sultan, K. M. Coyle, D. Vidovic et al. Hide-and-seek: the interplay between cancer stem cells and the immune system. *Carcinogenesis*, 2017, 38(2):107-118
- [206] E. D. Thompson, H. L. Enriquez, Y. X. Fu et al. Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors. *J Exp Med*, 2010, 207(8):1791-1804
- [207] L. Zhang, X. Yu, L. Zheng et al. Lineage tracking reveals dynamic relationships of T cells in colorectal cancer. *Nature*, 2018, 564(7735):268-272
- [208] F. Li, M. C. Simon. Cancer Cells Don't Live Alone: Metabolic Communication within Tumor Microenvironments. *Dev Cell*, 2020, 54(2):183-195
- [209] D. Ciavardelli, M. Bellomo, A. Consalvo et al. Metabolic Alterations of Thyroid Cancer as Potential Therapeutic Targets. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:2545031
- [210] Y. Zhang, M. Zhao, H. Gao et al. MAPK signalling-induced phosphorylation and subcellular translocation of PDH ϵ 1 α promotes tumour immune evasion. *Nat*

- Metab, 2022, 4(3):374-388
- [211] C. L. Liu, Y. C. Hsu, J. J. Lee et al. Targeting the pentose phosphate pathway increases reactive oxygen species and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 499:110595
- [212] A. J. Hoy, S. R. Nagarajan, L. M. Butler. Tumour fatty acid metabolism in the context of therapy resistance and obesity. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(12):753-766
- [213] A. Ashtekar, D. Huk, A. Magner et al. Alterations in Sod2-Induced Oxidative Stress Affect Endocrine Cancer Progression. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(11):4135-4145
- [214] J. M. Cazarin, R. G. Coelho, F. Hecht et al. 5'-AMP-Activated Protein Kinase Regulates Papillary (TPC-1 and BCPAP) Thyroid Cancer Cell Survival, Migration, Invasion, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Thyroid*, 2016, 26(7):933-942
- [215] K. Zaugg, Y. Yao, P. T. Reilly et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev*, 2011, 25(10):1041-1051
- [216] N. Sanchez-Macedo, J. Feng, B. Faubert et al. Depletion of the novel p53-target gene carnitine palmitoyltransferase 1C delays tumor growth in the neurofibromatosis type I tumor model. *Cell Death Differ*, 2013, 20(4):659-668
- [217] L. Torregrossa, L. Shintu, J. Nambiath Chandran et al. Toward the reliable diagnosis of indeterminate thyroid lesions: a HRMAS NMR-based metabolomics case of study. *J Proteome Res*, 2012, 11(6):3317-3325
- [218] I. Ryoo, H. Kwon, S. C. Kim et al. Metabolomic analysis of percutaneous fine-needle aspiration specimens of thyroid nodules: Potential application for the preoperative diagnosis of thyroid cancer. *Sci Rep*, 2016, 6:30075
- [219] S. J. Parker, C. R. Amendola, K. E. R. Hollinshead et al. Selective Alanine Transporter Utilization Creates a Targetable Metabolic Niche in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov*, 2020, 10(7):1018-1037
- [220] R. B. Holmgaard, D. Zamarin, Y. Li et al. Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. *Cell Rep*, 2015, 13(2):412-424
- [221] T. W. Stone, N. Stoy, L. G. Darlington. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(2):136-143

- [222] A. Fiore, L. Zeitler, M. Russier et al. Kynurenine importation by SLC7A11 propagates anti-ferroptotic signaling. *Mol Cell*, 2022, 82(5):920-932 e927
- [223] J. E. Cheong, L. Sun. Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(3):307-325
- [224] C. A. Opitz, L. F. Somarribas Patterson, S. R. Mohapatra et al. The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer. *Br J Cancer*, 2020, 122(1):30-44
- [225] G. M. Brodeur, R. C. Seeger, M. Schwab et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, 1984, 224(4653):1121-1124
- [226] W. Liu, A. Le, C. Hancock et al. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(23):8983-8988
- [227] N. Venkateswaran, M. C. Lafita-Navarro, Y. H. Hao et al. MYC promotes tryptophan uptake and metabolism by the kynurenine pathway in colon cancer. *Genes Dev*, 2019, 33(17-18):1236-1251
- [228] M. M. Nau, B. J. Brooks, J. Battey et al. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature*, 1985, 318(6041):69-73
- [229] R. Beroukhim, C. H. Mermel, D. Porter et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 2010, 463(7283):899-905
- [230] M. R. McKeown, J. E. Bradner. Therapeutic strategies to inhibit MYC. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(10)
- [231] D. Meng, Q. Yang, H. Wang et al. Glutamine and asparagine activate mTORC1 independently of Rag GTPases. *J Biol Chem*, 2020, 295(10):2890-2899
- [232] T. Schmelzle, M. N. Hall. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 2000, 103(2):253-262
- [233] A. Efeyan, R. Zoncu, D. M. Sabatini. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends Mol Med*, 2012, 18(9):524-533
- [234] B. J. Leibowitz, G. Zhao, W. Xia et al. mTOR inhibition suppresses Myc-driven

polyposis by inducing immunogenic cell death. *Oncogene*, 2023, 42(24):2007-2016

8 综述

色氨酸代谢在疾病中的研究进展

色氨酸($C_{11}H_{12}N_2O_2$, Trp) 是人体必需氨基酸之一, 其代谢产物调节多种生理功能。Trp 的代谢异常与多种疾病存在关联, 包括肿瘤、抑郁症、睡眠障碍、肠道稳态以及心血管疾病等。作为一种关键的限制性氨基酸, Trp 及其代谢产物受到了广泛关注。

8.1 色氨酸代谢主要途径

Trp 代谢包括 3 条途径 (图 1): (1) 犬尿氨酸 (kynurenine, Kyn) 途径^[1]; (2) 血清素/5-羟色胺 (serotonin/5-hydroxytryptamine, 5-HT) 途径^[2]; (3) 吲哚途径^[3]。

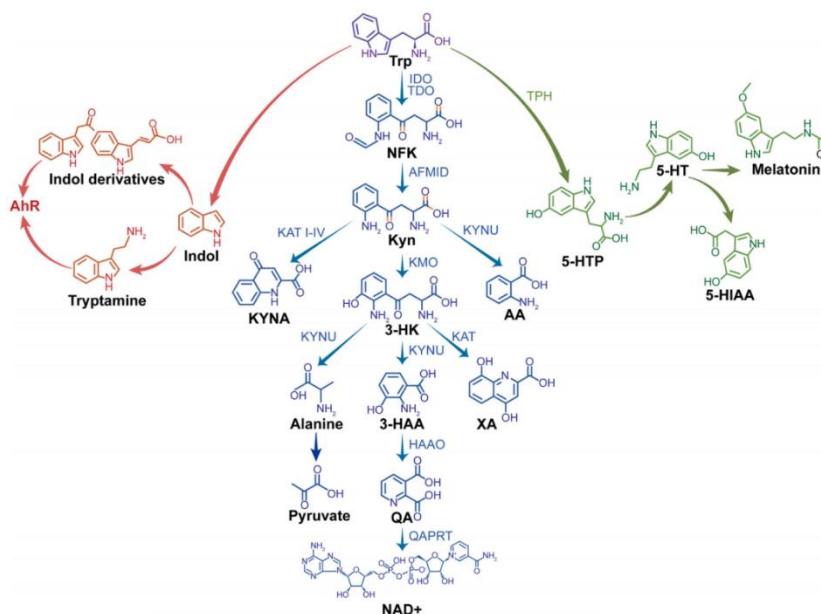


图 1 色氨酸代谢途径^[4]

Trp 代谢的 Kyn (蓝色箭头)、血清素 (绿色箭头) 以及吲哚 (Indol, 红色箭头) 途径。NFK: N-formyl-L-kynurenine, N-甲酰犬尿氨酸; KYNA: kynurenic acid, 犬尿喹啉酸; 3-HK: 3-hydroxykynurenine, 3-羟基犬尿氨酸; AA: anthranilic acid, 邻氨基苯甲酸; alanine: 丙氨酸; 3-HAA: 3-hydroxyanthranilic acid, 3-羟基邻氨基苯甲酸; XA: xanthurenic acid, 黄尿酸; pyruvate: 丙酮酸; QA: quinolinic acid, 喹啉酸; NAD^+ : nicotinamide adenine dinucleotide, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; 5-HTP: 5-hydroxytryptophan, 5-羟色氨酸; 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid,

5-羟基吲哚乙酸; melatonin: 褪黑素; indol derivatives: 吲哚衍生物; tryptamine: 色胺。

8.1.1 犬尿氨酸途径

通过 Kyn 通路的 Trp 分解代谢占 Trp 代谢通量的 95%左右,形成的最终产物主要为 NAD^{+} ^[5]。Trp 首先被转化为 NFK。该反应是 Trp-Kyn 代谢途径的限制步骤,可由三种限速酶催化: 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1)、吲哚胺 2,3-双加氧酶 2 (indoleamine 2,3-dioxygenase 2, IDO2) 以及色氨酸 2,3-双加氧酶 (tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO2)^[6-8]。上述三种代谢酶均含有血红素作为辅基,可催化 Trp 吲哚环氧化裂解。IDO1、IDO2 和 TDO2 在多种组织中表达。IDO1 广泛存在于全身各个器官中,可分解代谢大部分 Trp^[6,7]。IDO1 在免疫调节中具有关键作用,受到多种物质的诱导和调节,例如 IFN- γ 和 TNF- α 等细胞因子和促炎因子的分泌^[9,10]。TDO2 主要存在于肝脏和大脑中,并受 Trp 水平和糖皮质激素的调节^[6,11]。NFK 随后经 AFMID 基因编码的芳基甲酰胺酶水解为 Kyn。Kyn 可通过犬尿氨酸转氨酶 (kynurenine aminotransferase, KAT) 产生 KYNA,也可通过犬尿氨酸-3-单加氧酶 (kynurenine 3-monooxygenase, KMO) 生成 3-HK,或通过犬尿氨酸酶 (kynureninase, KYNU) 转化为 AA。3-HK 可通过犬尿氨酸转氨酶转化为 XA;也可在 3-羟基邻氨基苯甲酸 3,4-双加氧酶 (3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase, 3-HAAO) 的催化下,分解为 3-HAA。3-HAA 可转化为 QA,QA 进一步被喹啉磷酸核糖基转移酶代谢为 NAD^{+} 。通过 Kyn 途径,Trp 可完全降解为丙酮酸或 NAD^{+} 等生物活性化合物^[12,13]。

8.1.2 血清素途径

血清素是一种重要的神经递质,主要储存在三种细胞类型中: 中枢神经系统和肠肌间神经丛中的神经元、肠粘膜中的肠嗜铬细胞,以及血小板中^[14-16]。Trp 是合成血清素的唯一前体物质,大约不到 5%的 Trp 会转化为血清素^[17,18]。Trp 首先被色氨酸羟化酶 (tryptophan hydroxylase, TPH) 催化转化为 5-HTP。TPH 是这一过程的限速酶,对整个血清素合成过程至关重要^[19,20]。随后,5-HTP 在芳香族氨基酸脱羧酶的作用下发生脱羧反应,转化为血清素。生成的血清素可以与大脑中的血清素受体结

合,发挥其神经递质作用^[21-23],随后通过线粒体外膜上的单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)的作用被代谢为 5-HIAA。此外,血清素是松果体细胞中褪黑素合成的前体物质。在松果体中,血清素被转化为产生 N-乙酰-5-羟色胺。这一步由 N-乙酰转移酶催化,是褪黑素合成的限速步骤。进一步在羟基吲哚-O-甲基转移酶的作用下,甲基从 S-腺苷甲硫氨酸转移到 N-乙酰-5-羟色胺的 5-羟基,生成褪黑素^[24,25]。褪黑激素随后被释放到血液中调节生物节律。

8.1.3 吲哚途径

吲哚途径主要发生在肠道微生物中。Trp 在肠道微生物的作用下,经过色氨酸酶催化,将 Trp 脱羧并释放出氨基,生成吲哚。迄今为止有 85 种细菌已被证明可以产生吲哚^[26]。大肠杆菌是最广泛研究的肠道产吲哚细菌之一。在大肠杆菌中,色氨酸酶的表达受 TRP 操纵子控制,该操纵子包括两个结构基因 TnaA 和 TnaB。TnaB 负责将胞外 Trp 转运进入细胞内,TnaA 则催化 Trp 生成吲哚、丙酮酸和氨^[27,28]。由于真核生物不能编码 TnaA,所以这个反应只发生在细菌中。少量 Trp 通过细菌作用转化为吲哚酸衍生物。梭状芽孢杆菌将 Trp 催化成色胺和吲哚丙酮酸,然后转化为吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、吲哚丙酸(indole-3-propionic acid, IPA)和吲哚乳酸(indole-3-lactic acid, ILA)^[29-31];拟杆菌属以及巴特氏梭菌可产生 ILA 和 IAA^[32];乳酸杆菌属通过芳香族氨基转移酶(aromatic amino acid aminotransferase, ARAT)和吲哚乳酸脱氢酶(indolelactate dehydrogenase, ILDH)将 Trp 转化为吲哚醛(indole-3-aldehyde, IAld)和 ILA^[33]。

8.2 疾病中的色氨酸代谢

8.2.1 肿瘤与色氨酸代谢

Trp 代谢在肿瘤的发展中发挥着重要作用,通过调控抗肿瘤的免疫反应以及肿瘤细胞的恶性增长影响肿瘤的进展。

8.2.1.1 肿瘤免疫逃逸

Trp-Kyn 途径在肿瘤的免疫逃逸中扮演着重要角色。作为 Trp-Kyn 途径的限速

酶, IDO 和 TDO2 具有相似的功能以及截然不同的生化特性。单体形式的 IDO 底物特异性低, 能作用于包括 L-Trp、D-Trp、色胺、血清素和 5-HTP 在内的多种底物。相比之下, 四聚体形式的 TDO2 特异性较强, 只能代谢 L-Trp^[34]。在 IDO 的两个亚型中, IDO2 的表达水平普遍低于 IDO1。由于 IDO1 显示出较高的催化活性, 目前的研究重点更倾向于关注 IDO1。

IDO1 在约 58% 的人类肿瘤中表达, 包括黑色素瘤、妇科肿瘤、结肠癌和血液学恶性肿瘤中, 其高表达与临床预后不良相关^[35,36]。IDO1 可通过降低 Trp 水平促进免疫抑制状态。正常情况下, 人体中的 IDO1 表达较低, 但多种炎症因子如 IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β 、IL-10 等能够诱导 IDO1 的表达^[37]。肿瘤生长过程中, 肿瘤细胞高活性的 IDO1 导致肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中的 Trp 浓度下调, 使得 T 细胞生长受阻, 从而弱化免疫系统对肿瘤细胞的反应^[38]。小鼠 T 细胞体外培养实验证明, 在缺乏 Trp 的情况下, T 细胞无法有效增殖或分化为成熟的毒性 T 细胞, 引起 T 细胞的失活和凋亡的发生^[39,40]。

同时, 低 Trp 浓度导致细胞内不带电荷的 Trp 转移核糖核酸累积, 激活一般性调控阻遏蛋白激酶 2 (general control non-derepressible 2, GCN2), 抑制效应 T 细胞的增殖及抗原提呈细胞的功能^[41-43]。有研究表明 GCN2 缺陷的小鼠 CD4⁺ T 细胞无法分化为 T_{reg}^[44], 因此, 激活的 GCN2 可促进 T_{reg} 的分化, 有助于形成免疫抑制微环境的形成^[45]。Trp 含量下降影响哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 信号通路^[46]。mTORC1 被激活时可以促进蛋白质合成, 抑制细胞自噬。当 mTORC1 因 Trp 缺乏被抑制时, CD8⁺ T 细胞的活性降低, 毒性 T 细胞和辅助 T 细胞数量减少, 免疫抑制性 T_{reg} 细胞数量增加。

Trp 代谢异常改变肿瘤微环境并促进免疫耐受形成的另一个机制是 Trp 分解代谢物的积累。肿瘤生长过程中, 肿瘤细胞释放大量的代谢产物 Kyn。Kyn 通过与芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 相互作用激活 T_{reg} 和 MDSC, 抑制效应 T 细胞和 NK 细胞的活性^[47,48]。AhR 是一种配体激活的转录调控因子。AhR 激活后, 进入细胞核内并与芳香烃受体核转位因子 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) 形成二聚体, 与相应靶基因启动子区域的调控元件结合。AhR-ARNT 异二聚

体可促进多种转录因子的转录,包括 DC 和 NK 细胞中的 IL10^[49, 50]以及肿瘤细胞和巨噬细胞中的 IL6^[51, 52]。IL-6 被认为是促血管生成细胞因子,可增强 IDO1 的活性,从而放大 Kyn 和 AhR 的信号传导。IL-6 缺失导致 IFN- γ 依赖性新生血管形成减少,并增加对转移的抵抗力^[53]。AhR 与转录因子 c-Maf 协同作用,调控 IL-10 的表达^[54]。IL-10 可促进 FOXP⁺ T_{reg} 细胞的分化和增殖,从而损害 CD8⁺ T 细胞的成熟和细胞毒性。IL-10 还可促进耐受性 DC、肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAM) 和 MDSC 的发育和增殖,这些细胞浸润在 TME 中,从而支持肿瘤的血管生成和免疫逃逸^[55-57]。在 Th17 细胞中, AhR 激活促进下游 IL-22 的产生和分化^[58]。

最近的一项研究表明, TME 中杀伤性 T 细胞分泌的 IFN- γ 促使肿瘤干细胞上调 Trp 转运蛋白以及 IDO1 表达,使得 Trp 大量进入肿瘤干细胞进而释放高浓度的 Kyn^[59]。释放的 Kyn 被临近的 CD8⁺ T 细胞通过转运蛋白 SLC7A8 和 PAT4 转运进入细胞内,激活 AhR 信号并促进 PD-1 的表达升高。此外,有证据表明 NAD⁺通过 Trp 从头合成途径在肿瘤中发挥作用。在小鼠中, Trp 缺乏导致肝脏新生 NAD⁺合成受阻,从而通过 DNA 损伤促进肝癌的发生^[60]。在胶质瘤中, Trp 代谢产生的 NAD⁺能够增强对放射化疗引起的氧化应激的抵抗作用^[61]。另有研究发现二甲双胍可以通过降低 MYC 基因的表达,抑制结直肠癌细胞对 Trp 的摄取。这一作用有助于 CD8⁺ T 细胞从 TME 中抢夺更多的 Trp,改变肠癌的免疫微环境,增加 CD8⁺ T 细胞的数量并提升其细胞毒性,最终加强抗肿瘤免疫反应^[62]。

Trp 代谢产物 3-HK、3-HAA、QA 和吡啶甲酸等,可作为免疫调节剂影响机体的免疫功能。例如,研究发现 3-HAA 能够通过激活 caspase-8 来诱导凋亡,抑制 T 细胞的增殖,并导致小鼠 Th1 细胞的选择性凋亡,从而使 Th1/Th2 平衡失衡^[63, 64]。此外,3-HAA 通过抑制丙酮酸脱氢酶和 NF- κ B 的激活,诱导细胞凋亡,抑制 T 细胞增殖^[65]。3-HAA 还能阻断 TCR 介导的 Ca²⁺信号传导^[66],抑制 T 细胞激活,同时刺激 TGF- β 的产生并促进 T_{reg} 细胞的形成^[67]。另一方面,3-HK 被认为能减少 CD8⁺ T 细胞的增殖和幼稚 T 细胞成熟为 CD8⁺ T 细胞^[68]。

8.2.1.2 肿瘤恶性进展

Trp 代谢的异常影响肿瘤的进展。对非小细胞肺癌^[69]和食管鳞状细胞癌^[70]的研

究发现, IDO1 的上调与 TNM 分期和淋巴结转移显著相关。结直肠癌中 IDO1 的高表达与肝转移频率显著相关^[71]; 肝癌患者中 IDO1 过表达与远处转移的发生有关^[72]; 子宫内膜癌中, IDO1 的表达与淋巴结转移呈正相关^[73]。

与 IDO1 相似, TDO2 在肿瘤常被激活, 特别是在 IDO1 未激活的情况下^[74]。TDO2 在肺成纤维细胞中产生的 Kyn 会加速肿瘤长和迁移, 给予 TDO2 抑制剂会显著减少小鼠的肿瘤转移^[75]。体外研究表明, TDO2 过表达促进了胶质母细胞瘤^[74]或乳腺癌细胞^[76]的迁移和侵袭。三阴乳腺癌的临床样本中 TDO2 表达升高与疾病分级增加和总生存期缩短相关^[77]。抑制 TDO2 或 AhR 的活性, 增强了肿瘤细胞对失巢凋亡的敏感性, 减少三阴乳腺癌的肺转移。

同时, Kyn 和 QA 的外源性给药导致 β -catenin 的激活和人结肠癌细胞的增殖, 并促进小鼠的肿瘤生长^[78]。血清中 Kyn/Trp 比值和 Kyn 水平是成人 T 细胞白血病/淋巴瘤的独立预测因子^[79]。3-HK 和 KYNA 与更具侵袭性的乳腺癌和胶质母细胞瘤形式相关^[80, 81]。

血清素途径的 Trp 分解代谢物同样是影响肿瘤迁移的重要因素^[82, 83]。当与不同的受体相互作用时, 血清素以浓度依赖性方式对多种肿瘤的生长起到促进作用。相比之下, 低剂量的血清素可减少肿瘤的血液供应并抑制肿瘤生长^[84, 85]。血清素刺激可导致参与糖酵解、磷酸戊糖途径和己糖胺生物合成途径的代谢酶水平显著增加, 有助于促进胰腺肿瘤生长^[86]。在细胞水平上, 血清素受体与致癌信号的激活相关, 抑制血清素受体使肿瘤细胞活力降低^[87]。

8.2.2 神经系统疾病与色氨酸代谢

8.2.2.1 抑郁症

Trp 代谢产物与焦虑和抑郁的发病机制密切相关。血清素假说是最早的抑郁症生物学理论之一^[88]。大量研究表明, 血清素途径的关键酶 TPH1 与抑郁症或抑郁症患者对抗抑郁药物的反应有关^[89-94]。TPH1 功能障碍导致大脑血清素水平不足, 引起 5-HT 能神经元功能减退, 或许是导致患重型抑郁症的原因之一。抑郁症患者和自杀行为倾向者中也存在 TPH2 异常, 可能是对 TPH1 功能障碍引起的大脑血清素缺乏的代偿效应^[95, 96]。抗抑郁药物, 包括选择性血清素再摄取抑制剂 (SSRI) 以及血清素和

去甲肾上腺素再摄取抑制剂 (SNRI) [97-100], 能有效地提升患者的血清素水平, 缓解由神经递质失调引起的抑郁症状。此外, Kyn 途径也与抑郁症有关。该通路在抑郁症患者中被强烈活化, 产生具有神经毒性的代谢产物 3-HK [101]。同时, 抑郁症患者中过量产生的促炎细胞因子 (如 $\text{TNF-}\alpha$) 会诱导 IDO1 的表达, 过度激活 Kyn 通路, 使 Trp 代谢更多地转向 Kyn 途径而不是血清素途径, 导致血清素的减少, 加重抑郁症状 [102, 103]。富含 Trp 的饮食也可对抑郁症状的缓解和情绪的改善具有积极作用, 而低 Trp 含量的饮食可能导致个体的焦虑情绪 [104, 105]。

8.2.2.2 精神分裂症

有研究认为, 精神分裂症患者大脑皮质中由于血清素过载破坏谷氨酸信号传导, 导致神经元的动作电位紊乱和代谢减退, 继而引起一系列精神症状 [106]。血清素浓度改变及 TPH1、TPH2 基因的多态性增加了精神分裂症的易感性, 且与自杀倾向存在关联 [107]。此外, 也有研究称 Trp 可通过增加中枢神经系统中血清素的可用性抑制攻击性行为 [108]。另一项研究发现, 精神分裂症患者血液中涉及 Kyn 途径的代谢物与健康人群存在明显差异, 提示 Kyn 途径的异常可能是引发精神分裂症的原因之一 [109, 110]。精神分裂症患者前额叶皮质中 Trp 向 Kyn 的转化增加, 并与患者的注意力障碍有显著联系 [111]。在精神分裂症患者大脑和脑脊液中还观察到 N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂 KYNA 的水平升高 [112-114]。KYNA 的水平升高可能会影响神经递质的释放和传递, 从而导致认知功能损伤 [115]。

8.2.2.3 神经退行性疾病

Trp 代谢与多种神经退行性疾病有关, 包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、亨廷顿病 (Huntington's disease, HD) 和肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等。

AD 是最常见的人类神经退行性疾病。血清素信号系统失调及 IDO1 活性的增加被认为与 AD 的发病机制有关 [116, 117]。血清素与 α -分泌酶的上调有关, α -分泌酶可竞争性的抑制 β - γ -分泌酶, 减少 $\text{A}\beta$ 的产生 [118, 119]; 血清素下游产物 5-HIAA 诱导神经元脑啡肽酶表达, 抵消 $\text{A}\beta$ 诱导的神经毒性 [116]; 使用 SSRI 药物能有效降低 AD 模型小鼠大脑中 $\text{A}\beta$ 的生成 [120]。相对于血清素水平的降低, Kyn 途径在 AD 患者中处于

激活状态^[121]。IDO 活性增强导致脑脊液中 Kyn/Trp 比例升高, 加强 Trp 向 Kyn 的转化^[122]。随着 Kyn 浓度的上升, KMO 的催化活性也得到了加强, 加速具有神经毒性的 3-HK 和具有神经保护作用的 KYNA 的生成。在 AD 患者中, 3-HK 与 KYNA 之间的平衡被打破, 导致神经毒性代谢物 3-HK 占据主导地位^[122, 123]。与 3-HK 有关的下游代谢物(如具有神经毒性的 QA)也相应增多^[124]。从产生神经保护性物质转变为产生神经毒性代谢物可能是导致 AD 进展的一个因素。此外, 有研究表明肠道微生物群衍生的吲哚可调节 AD 的神经炎症, 改善 AD 患者的认知障碍^[125, 126]。

HD 是一种常染色体显性遗传性疾病, 由位于 4 号染色体上的 HTT 基因 1 号外显子的 CAG 重复序列异常扩增所致^[127]。多项证据表明, Kyn 途径与 HD 密切相关。在 HD 的早期阶段, 患者的新纹状体和皮质中 3-HK 和 QA 水平升高^[128], KYNA 水平和 KAT 活性显著下降^[129-131]。同时, 在 HD 患者的血清中观察到 Trp 水平降低、Kyn 水平升高^[132]。同样, 在 HD 小鼠模型的大脑中也检测到了 3-HK 和 QA 水平的上升^[133]。高浓度的 3-HK 可产生自由基, 导致细胞死亡^[134, 135]。3-HK/QA 途径的流量增加可能是导致 HD 疾病进展的关键因素之一。

PD 是另一种常见的神经退行性疾病。与 AD 和 HD 类似, PD 患者血清和脑脊液中的 Kyn/Trp 比值高于对照组^[136]; PD 患者的壳核、前额皮质和黑质致密部中 3-HK 水平升高^[137, 138]。ALS 是一种进展性的神经退行性疾病, 患者表现出包括抑郁和焦虑在内的多种症状^[139, 140]。ALS 患者运动皮层和脊髓中, 神经元和小胶质细胞的 IDO1 活性和 QA 水平增加, 血清中 3-HK/XA 的比率降低^[141]。这些变化表明 Trp 代谢物在中枢神经系统中的积累与神经细胞损伤和神经炎症密切相关。

8.2.3 肠道稳态与色氨酸代谢

肠道菌群、宿主黏膜屏障、营养及代谢产物等相互作用构成了一个动态平衡状态, 即肠道稳态。作为肠道稳态的重要组成部分, 紊乱的肠道菌群会导致多种疾病的发生, 包括炎症性肠病、肠易激综合征以及糖尿病等^[142-145]。而最近的多项研究报道了 Trp 代谢的改变与肠道微生物的潜在联系。

8.2.3.1 肠粘膜屏障

Trp 代谢物是人体和肠道微生物之间重要的通讯介质之一，与肠道黏膜屏障的维持有着密切的联系^[146, 147]。既往研究通过代谢组学检测小鼠血浆中代谢物水平发现，与正常对照小鼠相比，无菌小鼠的血清素水平显著降低^[30]。小鼠和人类肠道菌群可促进肠嗜铬细胞的血清素合成，同时为粘膜、管腔和循环血小板提供血清素，进而调节胃肠蠕动和血小板功能^[148]。对无菌或人源化（接种人类肠道微生物群的无菌鼠）小鼠的研究发现，血清素缩短了无菌和人源化小鼠结肠的收缩持续时间，同时结肠中 TPH1 表达上调^[149]，提示肠道菌群对于肠道血清素稳态的重要作用。此外，无菌小鼠中 Kyn 通路活性被抑制，补充肠道菌群后 Trp-Kyn 途径代谢活性显著增强^[150, 151]。

同时，肠道微生物的 Trp 代谢产物吲哚和 IPA 通过激活孕烷 X 受体（pregnane X receptor, PXR）和调控 Toll 样受体 4（toll-like receptor 4, TLR4），影响肠上皮细胞的 TNF- α 表达，从而维持黏膜屏障功能^[152-154]。IPA 可诱导肠上皮细胞中 IL-10 受体的表达，从而稳定肠道黏膜屏障功能^[155]。吲哚衍生物是 AhR 的强效激活剂，可调节局部 IL-22 的产生，影响人体免疫反应和肠道稳态^[156]。

8.2.3.2 炎症性肠病

炎症性肠病（inflammatory bowel disease, IBD）与 Trp 代谢异常有关^[157, 158]。相较于健康个体，IBD 患者的粪便样本中 Trp 和 IAA 水平降低，而 IDO1 表达和 Kyn 水平升高^[156, 159]，说明在 IBD 患者中 Trp-Kyn 途径的 Trp 分解代谢活性上调。而在溃疡性结肠炎和克罗恩病的缓解期，Trp-Kyn 途径的另一产物 KYNA 水平低于复发期^[160]。补充 KYNA 可促进肠道上皮细胞的存活和增殖，降低 IBD 的严重程度^[161]。KYNA 可通过与 AhR 或 G 蛋白偶联受体相互作用，从而减轻 IBD 的细胞毒性和炎症反应。

Trp 代谢物通过调节免疫系统，影响 IBD 的进展。例如，吲哚代谢物和 Kyn 与 AhR 相互作用，这不仅诱导了 T 调节细胞的分化，还限制了 Th17 和 Th1 反应，并促进了抗炎介质的产生^[162]。在动物模型研究中，双歧杆菌能够增加 AhR 配体如 IAA 和 IPA 的水平，并通过激活 AhR 及 T_{reg} 的功能来抑制肠道炎症^[163]。此外，抑制血清素的合成或 TPH1 的缺失，可调节免疫细胞的功能并降低促炎因子的水平，从而有助

于缓解 IBD 的症状^[164]。

8.2.3.3 肠易激综合征

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一种功能性胃肠道疾病, 其特征是慢性复发性腹痛和排便习惯改变^[165]。研究指出 IBS 与 Trp 代谢物, 尤其是 Kyn 和血清素之间存在密切相关性。IBS 患者血浆中的 KYNA 和血清素水平显著升高, 但在肠粘膜内的水平则有所降低^[166]。同时, IBS 患者的 Kyn 水平和血浆中 Kyn 与 Trp 的比率均有所增加, 这表明在 IBS 患者中 Kyn 途径的活性增强^[167]。

血清素在调节胃肠道蠕动中发挥重要作用。研究显示, IBS 患者的 5-HT 合成和运输功能出现失调, 结直肠活检结果显示 TPH1 和 SERT (血清素的转运蛋白) 表达降低^[168]。值得注意的是, 血清素水平在 IBS 间也表现出差异: 在便秘型 IBS 患者的大肠中降低, 在腹泻型 IBS 患者中则增加^[169]。此外, 研究还表明 IBS 患者中血清素受体的变化, 进一步支持了 IBS 进展中血清素的重要角色^[168]。

8.2.3.4 糖尿病

肠道菌群通过调节色氨酸代谢产物可影响葡萄糖稳态和胰岛素敏感性^[170]。高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 在刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素、抑制食欲和减慢胃排空方面起着关键作用^[171]。在原代和永生化小鼠结肠 L 细胞中, 肠道微生物产生的吲哚可通过抑制电压门控 K^+ 通道来延长 L 细胞动作电位的时间, 从而增强 Ca^{2+} 内流, 刺激胰 GLP-1 的短时分泌^[172]。而另一方面, 吲哚通过阻断 NADH 脱氢酶, 减缓 ATP 的产生, 从而导致长期的 GLP-1 分泌减少。同时, 肠道产生的 Trp 代谢产物诱导释放的神经递质血清素对肠道功能也有显著影响。血清素可以作用于肠神经系统, 刺激肠蠕动、上皮分泌和血管舒张, 进一步调节肠道活动和反应^[173]。此外, 肠道菌群产生的 Trp 代谢物也可通过调节免疫细胞功能维持肠道和全身稳态。例如, 色胺和多个吲哚衍生物可通过 AhR 影响免疫应答^[33, 174]。

8.2.4 心血管疾病与色氨酸代谢

人体 Trp 代谢的紊乱同时与多种血管并发症和心血管疾病有关, 如动脉粥样硬化和腹主动脉瘤等。

8.2.4.1 动脉粥样硬化

与健康对照相比,患有动脉粥样硬化斑块的患者血清中 Trp 水平较低^[175]。芬兰的一项研究表明,IDO 活性与多个动脉粥样硬化危险因素相关^[176]。IDO 介导的 Trp 分解反应产生的下游产物会形成一个反馈回路,控制动脉粥样硬化炎症和动脉粥样硬化形成^[177]。在 ApoE 基因敲除的小鼠中,抑制 IDO1 会增加血管炎症和动脉粥样硬化,外源性使用 3-HAA 可以逆转由于 IDO 抑制引起的动脉粥样硬化^[178]。血浆中血清素浓度的增加可能会促进动脉粥样硬化的发展。研究发现,血清素可通过 5-HT_{2A} 受体/G 蛋白/c-Src/PKC/MAPK 途径上调胆固醇酰基转移酶 1 ACAT-1 表达,在巨噬细胞源性泡沫细胞形成中发挥关键作用,促进动脉粥样硬化斑块的进展^[179]。使用 5-HT_{2A} 受体拮抗剂能显著降低糖尿病患者的冠状动脉斑块体积,间接表明血清素与冠状动脉粥样硬化之间的相关性^[180]。

此外,动脉粥样硬化病变中的 KYNA 水平升高与不稳定的斑块表型相关,血液 KYNA 水平可预测冠状动脉疾病患者的死亡^[181]; 3-HAA 可以降低高胆固醇血症小鼠的血浆脂质并减少动脉粥样硬化^[182]; QA 积累可能促进动脉粥样硬化的进展^[183]。

8.2.4.2 腹主动脉瘤

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)是心血管发病和死亡的主要原因之一,其主要由血管紧张素 II(AngII)介导^[184]。在 AngII 诱导的 AAA 小鼠模型及患者中,源自 T 细胞的细胞因子 IFN- γ 水平提升,而 IFN- γ 显著地刺激人体血管平滑肌细胞中 IDO1 的表达^[185]。因此,AngII 显著提升了 IDO1 的表达,IDO1 缺失可防止 AngII 诱导的 AAA 形成^[186],说明激活的 Trp-Kyn 途径可能在 AAA 的发生与发展中扮演重要角色。

基质金属蛋白酶(MMPs)在 AAA 的形成与进展中扮演了核心角色。Kyn 能通过 MEK-ERK1/2 信号通路或激活 AHR 上调 MMP-1 和 MMP-3 的表达^[187, 188],提示 Kyn 对 AAA 进展的影响。同时,血压的控制对 AAA 的临床病程有重大影响。有研究表明内皮细胞通过表达 IDO 将 Trp 代谢为 Kyn,促进动脉血管松弛和血压控制^[189]。而另一项研究则表明 Kyn 可通过增加内皮细胞中 NAD(P)H 介导的超氧化物的产生,加速细胞凋亡,导致内皮功能障碍^[185]。因此,关于 Trp 代谢及其代谢物在 AAA

中的作用及其机制仍需进一步探索。

此外，在冠心病患者中，IDO 活性增加，Kyn/Trp 比值明显升高^[190]；血清素被发现有部分作为血管收缩剂的作用^[191]；携带 KYN^U Arg188Gln (G/A) 突变型患者的收缩压、舒张压及平均动脉压显著高于非突变者^[192]；卒中后观察到 IDO 的激活和 Kyn 代谢物浓度升高^[193]，说明探索色氨酸代谢在心血管疾病进展中扮演了重要角色。

8.3 总结与展望

Trp 代谢在多个生理和病理过程中发挥着关键作用。在肿瘤领域，Trp 代谢异常改变肿瘤微环境通过 AhR 途径和 IL-6 等因子的激活影响调节性 T 细胞、抑制性巨噬细胞等免疫细胞的功能，促进免疫耐受形成。此外，Trp 代谢产物，如 3-HK 和 QA，对 T 细胞增殖和活性产生抑制作用，进一步影响肿瘤的免疫调节。在神经系统疾病方面，血清素途径与抑郁症和精神分裂症等疾病的发病机制密切相关，而 Kyn 途径在这些疾病中也扮演着重要角色。神经退行性疾病，如阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病，与 Trp 代谢的紊乱密切相关，影响其发生和进展。在心血管疾病方面，IDO 活性和多种 Trp 代谢产物与动脉粥样硬化等疾病的发展相关，影响心血管疾病的进程。总体而言，Trp 代谢在多种疾病的发病机制和进程中都扮演着复杂而重要的调控角色。未来的研究将有望揭示更多关于 Trp 代谢与这些疾病之间相互关系的细节，为相关疾病的治疗提供新的理论基础。

8.4 参考文献

- [1] L. Vecsei, L. Szalardy, F. Fulop et al. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(1):64-82
- [2] E. H. Turner, J. M. Loftis, A. D. Blackwell. Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol Ther*, 2006, 109(3):325-338
- [3] J. Zhang, S. Zhu, N. Ma et al. Metabolites of microbiota response to tryptophan and intestinal mucosal immunity: A therapeutic target to control intestinal inflammation. *Med Res Rev*, 2021, 41(2):1061-1088

- [4] C. Xue, G. Li, Q. Zheng et al. Tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Metab*, 2023, 35(8):1304-1326
- [5] A. A. Badawy. Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements. *Neuropharmacology*, 2017, 112(Pt B):248-263
- [6] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter et al. Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev*, 1996, 96(7):2841-2888
- [7] O. Takikawa. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(1):12-19
- [8] R. Metz, J. B. Duhadaway, U. Kamasani et al. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res*, 2007, 67(15):7082-7087
- [9] C. M. Robinson, P. T. Hale, J. M. Carlin. The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res*, 2005, 25(1):20-30
- [10] E. R. Werner, G. Bitterlich, D. Fuchs et al. Human macrophages degrade tryptophan upon induction by interferon-gamma. *Life Sci*, 1987, 41(3):273-280
- [11] B. Meng, D. Wu, J. Gu et al. Structural and functional analyses of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proteins*, 2014, 82(11):3210-3216
- [12] R. Schwarcz, J. P. Bruno, P. J. Muchowski et al. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13(7):465-477
- [13] I. Cervenka, L. Z. Agudelo, J. L. Ruas. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*, 2017, 357(6349)
- [14] D. J. Walther, M. Bader. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(9):1673-1680
- [15] W. Ni, S. W. Watts. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(7):575-583
- [16] D. Keszthelyi, F. J. Troost, A. A. Masclee. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil*, 2009,

- 21(12):1239-1249
- [17] D. A. Bender. Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Mol Aspects Med*, 1983, 6(2):101-197
- [18] X. Zhang, J. M. Beaulieu, T. D. Sotnikova et al. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*, 2004, 305(5681):217
- [19] C. M. Coleman, W. S. Neckameyer. Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2005, 59(1):12-31
- [20] X. Zhang, J. M. Beaulieu, R. R. Gainetdinov et al. Functional polymorphisms of the brain serotonin synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase-2. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(1):6-11
- [21] G. Mengod, M. T. Vilaro, A. Raurich et al. 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem J*, 1996, 28(11):747-758
- [22] R. Araneda, R. Andrade. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience*, 1991, 40(2):399-412
- [23] B. L. Roth, S. M. Hanizavareh, A. E. Blum. Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, 2004, 174(1):17-24
- [24] H. Tricoire, M. Moller, P. Chemineau et al. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl*, 2003, 61:311-321
- [25] D. X. Tan, L. C. Manchester, R. Hardeland et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*, 2003, 34(1):75-78
- [26] J. H. Lee, J. Lee. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34(4):426-444
- [27] C. Yanofsky, V. Horn, P. Gollnick. Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991, 173(19):6009-6017
- [28] P. Konopelski, M. Ufnal. Indoles - Gut Bacteria Metabolites of Tryptophan with

- Pharmacotherapeutic Potential. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(10):883-890
- [29] S. R. Elsdon, M. G. Hilton, J. M. Waller. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by *Clostridia*. *Arch Microbiol*, 1976, 107(3):283-288
- [30] W. R. Wikoff, A. T. Anfora, J. Liu et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(10):3698-3703
- [31] D. Dodd, M. H. Spitzer, W. Van Treuren et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature*, 2017, 551(7682):648-652
- [32] W. R. Russell, S. H. Duncan, L. Scobbie et al. Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(3):523-535
- [33] T. Zelante, R. G. Iannitti, C. Cunha et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 2013, 39(2):372-385
- [34] Z. Ye, L. Yue, J. Shi et al. Role of IDO and TDO in Cancers and Related Diseases and the Therapeutic Implications. *J Cancer*, 2019, 10(12):2771-2782
- [35] I. Theate, N. van Baren, L. Pilotte et al. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(2):161-172
- [36] M. Platten, E. A. A. Nollen, U. F. Rohrig et al. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5):379-401
- [37] D. H. Munn, A. L. Mellor. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol*, 2013, 34(3):137-143
- [38] L. Zhai, S. Spranger, D. C. Binder et al. Molecular Pathways: Targeting IDO1 and Other Tryptophan Dioxygenases for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(24):5427-5433
- [39] F. Fallarino, U. Grohmann, C. Vacca et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ*, 2002, 9(10):1069-1077
- [40] G. K. Lee, H. J. Park, M. Macleod et al. Tryptophan deprivation sensitizes activated

- T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*, 2002, 107(4):452-460
- [41] T. Eleftheriadis, G. Pissas, G. Antoniadis et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase depletes tryptophan, activates general control non-derepressible 2 kinase and down-regulates key enzymes involved in fatty acid synthesis in primary human CD4⁺ T cells. *Immunology*, 2015, 146(2):292-300
- [42] D. H. Munn, A. L. Mellor. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol*, 2016, 37(3):193-207
- [43] D. H. Munn, M. D. Sharma, B. Baban et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*, 2005, 22(5):633-642
- [44] J. K. Sonner, K. Deumelandt, M. Ott et al. The stress kinase GCN2 does not mediate suppression of antitumor T cell responses by tryptophan catabolism in experimental melanomas. *Oncoimmunology*, 2016, 5(12):e1240858
- [45] F. Fallarino, U. Grohmann, S. You et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol*, 2006, 176(11):6752-6761
- [46] Y. W. Moon, J. Hajjar, P. Hwu et al. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer*, 2015, 3:51
- [47] R. B. Holmgaard, D. Zamarin, Y. Li et al. Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. *Cell Rep*, 2015, 13(2):412-424
- [48] T. W. Stone, N. Stoy, L. G. Darlington. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(2):136-143
- [49] C. Wang, Z. Ye, A. Kijlstra et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor affects activation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 2014, 177(2):521-530
- [50] S. Wagage, B. John, B. L. Krock et al. The aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 production by NK cells. *J Immunol*, 2014, 192(4):1661-1670
- [51] U. M. Litzenburger, C. A. Opitz, F. Sahm et al. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget*, 2014, 5(4):1038-1051
- [52] A. Kimura, T. Naka, T. Nakahama et al. Aryl hydrocarbon receptor in combination

- with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med*, 2009, 206(9):2027-2035
- [53] A. Mondal, C. Smith, J. B. DuHadaway et al. IDO1 is an Integral Mediator of Inflammatory Neovascularization. *EBioMedicine*, 2016, 14:74-82
- [54] L. Apetoh, F. J. Quintana, C. Pot et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol*, 2010, 11(9):854-861
- [55] A. Tanaka, S. Sakaguchi. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*, 2017, 27(1):109-118
- [56] V. Kumar, S. Patel, E. Tcyganov et al. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*, 2016, 37(3):208-220
- [57] L. Yang, Y. Zhang. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):58
- [58] C. Esser, A. Rannug, B. Stockinger. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol*, 2009, 30(9):447-454
- [59] Y. Liu, X. Liang, W. Dong et al. Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8(+) T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation. *Cancer Cell*, 2018, 33(3):480-494 e487
- [60] K. S. Tummala, A. L. Gomes, M. Yilmaz et al. Inhibition of de novo NAD(+) synthesis by oncogenic URI causes liver tumorigenesis through DNA damage. *Cancer Cell*, 2014, 26(6):826-839
- [61] F. Sahm, I. Oezen, C. A. Opitz et al. The endogenous tryptophan metabolite and NAD⁺ precursor quinolinic acid confers resistance of gliomas to oxidative stress. *Cancer Res*, 2013, 73(11):3225-3234
- [62] S. Wabitsch, J. D. McCallen, O. Kamenyeva et al. Metformin treatment rescues CD8(+) T-cell response to immune checkpoint inhibitor therapy in mice with NAFLD. *J Hepatol*, 2022, 77(3):748-760
- [63] P. Terness, T. M. Bauer, L. Rose et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*, 2002, 196(4):447-457
- [64] D. H. Munn, E. Shafizadeh, J. T. Attwood et al. Inhibition of T cell proliferation by

- macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*, 1999, 189(9):1363-1372
- [65] H. Lemos, L. Huang, G. C. Prendergast et al. Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(3):162-175
- [66] K. Iken, K. Liu, H. Liu et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and metabolites protect murine lung allografts and impair the calcium mobilization of T cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(4):405-416
- [67] J. F. Fahrmann, J. V. Vykoukal, E. J. Ostrin. Amino Acid Oncometabolism and Immunomodulation of the Tumor Microenvironment in Lung Cancer. *Front Oncol*, 2020, 10:276
- [68] C. C. Clement, A. D'Alessandro, S. Thangaswamy et al. 3-hydroxy-L-kynurenamine is an immunomodulatory biogenic amine. *Nat Commun*, 2021, 12(1):4447
- [69] D. Tang, L. Yue, R. Yao et al. P53 prevent tumor invasion and metastasis by down-regulating IDO in lung cancer. *Oncotarget*, 2017, 8(33):54548-54557
- [70] Y. Jia, H. Wang, Y. Wang et al. Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients. *Int J Cancer*, 2015, 137(5):1095-1106
- [71] G. Brandacher, A. Perathoner, R. Ladurner et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(4):1144-1151
- [72] K. Pan, H. Wang, M. S. Chen et al. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(11):1247-1253
- [73] K. Ino, E. Yamamoto, K. Shibata et al. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(8):2310-2317
- [74] C. A. Opitz, U. M. Litzenburger, F. Sahm et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 2011, 478(7368):197-203
- [75] Y. L. Hsu, J. Y. Hung, S. Y. Chiang et al. Lung cancer-derived galectin-1 contributes to cancer associated fibroblast-mediated cancer progression and immune suppression through TDO2/kynurenine axis. *Oncotarget*, 2016, 7(19):27584-27598

- [76] O. Novikov, Z. Wang, E. A. Stanford et al. An Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Amplification Loop That Enforces Cell Migration in ER-/PR-/Her2- Human Breast Cancer Cells. *Mol Pharmacol*, 2016, 90(5):674-688
- [77] N. C. D'Amato, T. J. Rogers, M. A. Gordon et al. A TDO2-AhR signaling axis facilitates anoikis resistance and metastasis in triple-negative breast cancer. *Cancer Res*, 2015, 75(21):4651-4664
- [78] A. I. Thaker, M. S. Rao, K. S. Bishnupuri et al. IDO1 metabolites activate beta-catenin signaling to promote cancer cell proliferation and colon tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*, 2013, 145(2):416-425 e411-414
- [79] A. Masaki, T. Ishida, Y. Maeda et al. Prognostic Significance of Tryptophan Catabolism in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(12):2830-2839
- [80] P. P. Sordillo, L. A. Sordillo, L. Helson. The Kynurenine Pathway: A Primary Resistance Mechanism in Patients with Glioblastoma. *Anticancer Res*, 2017, 37(5):2159-2171
- [81] B. Heng, C. K. Lim, D. B. Lovejoy et al. Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. *Oncotarget*, 2016, 7(6):6506-6520
- [82] D. Sarrouilhe, J. Clarhaut, N. Defamie et al. Serotonin and cancer: what is the link? *Curr Mol Med*, 2015, 15(1):62-77
- [83] D. Sarrouilhe, M. Mesnil. Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie*, 2019, 161:46-50
- [84] E. J. Siddiqui, M. Shabbir, D. P. Mikhailidis et al. The role of serotonin (5-hydroxytryptamine1A and 1B) receptors in prostate cancer cell proliferation. *J Urol*, 2006, 176(4 Pt 1):1648-1653
- [85] E. J. Siddiqui, M. A. Shabbir, D. P. Mikhailidis et al. The effect of serotonin and serotonin antagonists on bladder cancer cell proliferation. *BJU Int*, 2006, 97(3):634-639
- [86] S. H. Jiang, J. Li, F. Y. Dong et al. Increased Serotonin Signaling Contributes to the Warburg Effect in Pancreatic Tumor Cells Under Metabolic Stress and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice. *Gastroenterology*, 2017, 153(1):277-291 e219

- [87] Y. Ballou, A. Rivas, A. Belmont et al. 5-HT serotonin receptors modulate mitogenic signaling and impact tumor cell viability. *Mol Clin Oncol*, 2018, 9(3):243-254
- [88] A. Coppen. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*, 1967, 113(504):1237-1264
- [89] H. Grasberger, L. Chang, W. Shih et al. Identification of a functional TPH1 polymorphism associated with irritable bowel syndrome bowel habit subtypes. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(11):1766-1774
- [90] B. Arias, C. Fabbri, F. Gressier et al. TPH1, MAOA, serotonin receptor 2A and 2C genes in citalopram response: possible effect in melancholic and psychotic depression. *Neuropsychobiology*, 2013, 67(1):41-47
- [91] K. B. Koh, C. H. Kim, E. H. Choi et al. Effect of tryptophan hydroxylase gene polymorphism on aggression in major depressive disorder and undifferentiated somatoform disorder. *J Clin Psychiatry*, 2012, 73(5):e574-579
- [92] D. Chen, F. Liu, C. Yang et al. Association between the TPH1 A218C polymorphism and risk of mood disorders and alcohol dependence: evidence from the current studies. *J Affect Disord*, 2012, 138(1-2):27-33
- [93] M. Viikki, O. Kampman, A. Illi et al. TPH1 218A/C polymorphism is associated with major depressive disorder and its treatment response. *Neurosci Lett*, 2010, 468(1):80-84
- [94] K. Andre, O. Kampman, M. Viikki et al. TPH1 A218C polymorphism and temperament in major depression. *BMC Psychiatry*, 2013, 13:118
- [95] H. Bach-Mizrachi, M. D. Underwood, A. Tin et al. Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. *Mol Psychiatry*, 2008, 13(5):507-513, 465
- [96] H. Bach-Mizrachi, M. D. Underwood, S. A. Kassir et al. Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31(4):814-824
- [97] F. Artigas, A. Bortolozzi, P. Celada. Can we increase speed and efficacy of antidepressant treatments? Part I: General aspects and monoamine-based strategies. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2018, 28(4):445-456
- [98] P. J. Cowen, M. Browning. What has serotonin to do with depression? *World*

- Psychiatry, 2015, 14(2):158-160
- [99] S. Reid, C. Barbui. Long term treatment of depression with selective serotonin reuptake inhibitors and newer antidepressants. *BMJ*, 2010, 340:c1468
- [100] P. Magalhaes, G. Alves, L. L. A et al. Clinical drug-drug interactions: focus on venlafaxine. *Drug Metab Pers Ther*, 2015, 30(1):3-17
- [101] Y. Qin, N. Wang, X. Zhang et al. IDO and TDO as a potential therapeutic target in different types of depression. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(6):1787-1800
- [102] F. Moroni. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur J Pharmacol*, 1999, 375(1-3):87-100
- [103] H. Miura, N. Ozaki, M. Sawada et al. A link between stress and depression: shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. *Stress*, 2008, 11(3):198-209
- [104] G. Lindseth, B. Helland, J. Caspers. The effects of dietary tryptophan on affective disorders. *Arch Psychiatr Nurs*, 2015, 29(2):102-107
- [105] L. A. Jans, W. J. Riedel, C. R. Markus et al. Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. *Mol Psychiatry*, 2007, 12(6):522-543
- [106] A. E. Eggers. A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Med Hypotheses*, 2013, 80(6):791-794
- [107] D. Li, L. He. Meta-analysis shows association between the tryptophan hydroxylase (TPH) gene and schizophrenia. *Hum Genet*, 2006, 120(1):22-30
- [108] D. M. Marsh, D. M. Dougherty, F. G. Moeller et al. Laboratory-measured aggressive behavior of women: acute tryptophan depletion and augmentation. *Neuropsychopharmacology*, 2002, 26(5):660-671
- [109] N. E. Steen, I. Dieset, S. Hope et al. Metabolic dysfunctions in the kynurenine pathway, noradrenergic and purine metabolism in schizophrenia and bipolar disorders. *Psychol Med*, 2020, 50(4):595-606
- [110] H. P. G. Joaquim, A. C. Costa, W. F. Gattaz et al. Kynurenine is correlated with IL-1beta in plasma of schizophrenia patients. *J Neural Transm (Vienna)*, 2018, 125(5):869-873

- [111] J. Kindler, C. K. Lim, C. S. Weickert et al. Dysregulation of kynurenine metabolism is related to proinflammatory cytokines, attention, and prefrontal cortex volume in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(11):2860-2872
- [112] C. L. Miller, I. C. Llenos, J. R. Dulay et al. Upregulation of the initiating step of the kynurenine pathway in postmortem anterior cingulate cortex from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Res*, 2006, 1073-1074:25-37
- [113] G. Anderson. Neuronal-immune interactions in mediating stress effects in the etiology and course of schizophrenia: role of the amygdala in developmental co-ordination. *Med Hypotheses*, 2011, 76(1):54-60
- [114] H. Fujigaki, A. Mouri, Y. Yamamoto et al. Linking phencyclidine intoxication to the tryptophan-kynurenine pathway: Therapeutic implications for schizophrenia. *Neurochem Int*, 2019, 125:1-6
- [115] J. Banerjee, M. Alkondon, E. F. Pereira et al. Regulation of GABAergic inputs to CA1 pyramidal neurons by nicotinic receptors and kynurenic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(2):500-509
- [116] J. J. Rodriguez, H. N. Noristani, A. Verkhatsky. The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 2012, 99(1):15-41
- [117] L. Whiley, K. E. Chappell, E. D'Hondt et al. Metabolic phenotyping reveals a reduction in the bioavailability of serotonin and kynurenine pathway metabolites in both the urine and serum of individuals living with Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 2021, 13(1):20
- [118] S. J. Robert, J. L. Zugaza, R. Fischmeister et al. The human serotonin 5-HT₄ receptor regulates secretion of non-amyloidogenic precursor protein. *J Biol Chem*, 2001, 276(48):44881-44888
- [119] A. A. Pimenova, A. Thathiah, B. De Strooper et al. Regulation of amyloid precursor protein processing by serotonin signaling. *PLoS One*, 2014, 9(1):e87014
- [120] J. R. Cirrito, B. M. Disabato, J. L. Restivo et al. Serotonin signaling is associated with lower amyloid-beta levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(36):14968-14973
- [121] G. J. Guillemin, G. A. Smythe, L. A. Veas et al. A beta 1-42 induces production of quinolinic acid by human macrophages and microglia. *Neuroreport*, 2003,

- 14(18):2311-2315
- [122] B. Widner, F. Leblhuber, J. Walli et al. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 2000, 107(3):343-353
- [123] M. J. Schwarz, G. J. Guillemin, S. J. Teipel et al. Increased 3-hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer's disease patients from controls. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2013, 263(4):345-352
- [124] Y. Wu, N. Mai, X. Zhong et al. Kynurenine pathway changes in late-life depression with memory deficit. *Psychiatry Res*, 2018, 269:45-49
- [125] L. Wu, Y. Han, Z. Zheng et al. Altered Gut Microbial Metabolites in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Signals in Host-Microbe Interplay. *Nutrients*, 2021, 13(1)
- [126] J. Sun, Y. Zhang, Y. Kong et al. Microbiota-derived metabolite Indoles induced aryl hydrocarbon receptor activation and inhibited neuroinflammation in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun*, 2022, 106:76-88
- [127] A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 1993, 72(6):971-983
- [128] P. Guidetti, R. E. Luthi-Carter, S. J. Augood et al. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 2004, 17(3):455-461
- [129] D. Jauch, E. M. Urbanska, P. Guidetti et al. Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases. *J Neurol Sci*, 1995, 130(1):39-47
- [130] M. P. Heyes, K. Saito, J. S. Crowley et al. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain*, 1992, 115 (Pt 5):1249-1273
- [131] M. F. Beal, W. R. Matson, K. J. Swartz et al. Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid. *J Neurochem*, 1990, 55(4):1327-1339
- [132] C. M. Forrest, G. M. Mackay, N. Stoy et al. Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's

- disease. *J Neurochem*, 2010, 112(1):112-122
- [133] P. Guidetti, G. P. Bates, R. K. Graham et al. Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. *Neurobiol Dis*, 2006, 23(1):190-197
- [134] S. J. Pearson, A. Meldrum, G. P. Reynolds. An investigation of the activities of 3-hydroxykynureninase and kynurenine aminotransferase in the brain in Huntington's disease. *J Neural Transm Gen Sect*, 1995, 102(1):67-73
- [135] N. Stoy, G. M. Mackay, C. M. Forrest et al. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem*, 2005, 93(3):611-623
- [136] B. Widner, F. Leblhuber, D. Fuchs. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 2002, 109(2):181-189
- [137] T. Ogawa, W. R. Matson, M. F. Beal et al. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology*, 1992, 42(9):1702-1706
- [138] T. Behl, I. Kaur, A. Sehgal et al. The Footprint of Kynurenine Pathway in Neurodegeneration: Janus-Faced Role in Parkinson's Disorder and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13)
- [139] T. Fang, F. Jozsa, A. Al-Chalabi. Nonmotor Symptoms in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review. *Int Rev Neurobiol*, 2017, 134:1409-1441
- [140] T. L. Carvalho, L. M. de Almeida, C. M. Lorega et al. Depression and anxiety in individuals with amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Trends Psychiatry Psychother*, 2016, 38(1):1-5
- [141] Y. Chen, R. Stankovic, K. M. Cullen et al. The kynurenine pathway and inflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotox Res*, 2010, 18(2):132-142
- [142] W. M. de Vos, E. A. de Vos. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr Rev*, 2012, 70 Suppl 1:S45-56
- [143] R. J. Xavier, D. K. Podolsky. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2007, 448(7152):427-434
- [144] J. Qin, Y. Li, Z. Cai et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 2012, 490(7418):55-60
- [145] A. Agus, J. Planchais, H. Sokol. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan

- Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(6):716-724
- [146] E. Blacher, M. Levy, E. Tatirovsky et al. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *J Immunol*, 2017, 198(2):572-580
- [147] T. Bansal, R. C. Alaniz, T. K. Wood et al. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(1):228-233
- [148] J. M. Yano, K. Yu, G. P. Donaldson et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, 2015, 161(2):264-276
- [149] C. S. Reigstad, C. E. Salmonson, J. F. Rainey, 3rd et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J*, 2015, 29(4):1395-1403
- [150] G. Clarke, S. Grenham, P. Scully et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry*, 2013, 18(6):666-673
- [151] K. Gao, C. L. Mu, A. Farzi et al. Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. *Adv Nutr*, 2020, 11(3):709-723
- [152] P. Illes, K. Krasulova, B. Vyhldalova et al. Indole microbial intestinal metabolites expand the repertoire of ligands and agonists of the human pregnane X receptor. *Toxicol Lett*, 2020, 334:87-93
- [153] M. Venkatesh, S. Mukherjee, H. Wang et al. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity*, 2014, 41(2):296-310
- [154] R. Mahanonda, N. Sa-Ard-Iam, P. Montreekachon et al. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol*, 2007, 178(2):1151-1157
- [155] E. E. Alexeev, J. M. Lanis, D. J. Kao et al. Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *Am J Pathol*, 2018, 188(5):1183-1194
- [156] B. Lamas, M. L. Richard, V. Leducq et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med*, 2016, 22(6):598-605
- [157] K. Matsuoka, T. Kanai. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin*

- Immunopathol, 2015, 37(1):47-55
- [158] B. Lamas, M. L. Richard, H. Sokol. Caspase recruitment domain 9, microbiota, and tryptophan metabolism: dangerous liaisons in inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2017, 20(4):243-247
- [159] M. A. Sofia, M. A. Ciorba, K. Meckel et al. Tryptophan Metabolism through the Kynurenine Pathway is Associated with Endoscopic Inflammation in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(7):1471-1480
- [160] E. Dudzinska, K. Szymona, R. Kloc et al. Increased expression of kynurenine aminotransferases mRNA in lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol*, 2019, 12:1756284819881304
- [161] C. Michaudel, C. Danne, A. Agus et al. Rewiring the altered tryptophan metabolism as a novel therapeutic strategy in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 2023, 72(7):1296-1307
- [162] M. Ala. Tryptophan metabolites modulate inflammatory bowel disease and colorectal cancer by affecting immune system. *Int Rev Immunol*, 2022, 41(3):326-345
- [163] K. Li, Z. Hao, J. Du et al. Bacteroides thetaiotaomicron relieves colon inflammation by activating aryl hydrocarbon receptor and modulating CD4(+)T cell homeostasis. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90:107183
- [164] J. E. Ghia, N. Li, H. Wang et al. Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology*, 2009, 137(5):1649-1660
- [165] D. A. Drossman. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV. *Gastroenterology*, 2016
- [166] D. Keszthelyi, F. J. Troost, D. M. Jonkers et al. Decreased levels of kynurenic acid in the intestinal mucosa of IBS patients: relation to serotonin and psychological state. *J Psychosom Res*, 2013, 74(6):501-504
- [167] G. Clarke, D. P. McKernan, G. Gaszner et al. A Distinct Profile of Tryptophan Metabolism along the Kynurenine Pathway Downstream of Toll-Like Receptor Activation in Irritable Bowel Syndrome. *Front Pharmacol*, 2012, 3:90
- [168] A. P. Kerckhoffs, J. J. ter Linde, L. M. Akkermans et al. SERT and TPH-1 mRNA expression are reduced in irritable bowel syndrome patients regardless of visceral

- sensitivity state in large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(9):G1053-1060
- [169] M. Manocha, W. I. Khan. Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies. *Clin Transl Gastroenterol*, 2012, 3(4):e13
- [170] Y. Liu, Y. Wang, Y. Ni et al. Gut Microbiome Fermentation Determines the Efficacy of Exercise for Diabetes Prevention. *Cell Metab*, 2020, 31(1):77-91 e75
- [171] J. J. Holst. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*, 2007, 87(4):1409-1439
- [172] C. Chimere, E. Emery, D. K. Summers et al. Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. *Cell Rep*, 2014, 9(4):1202-1208
- [173] G. M. Mawe, J. M. Hoffman. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(8):473-486
- [174] L. Cervantes-Barragan, J. N. Chai, M. D. Tianero et al. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4(+)CD8alphaalpha(+) T cells. *Science*, 2017, 357(6353):806-810
- [175] G. Baldo-Enzi, M. R. Baiocchi, A. Bertazzo et al. Tryptophan and atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 398:429-432
- [176] M. Pertovaara, A. Raitala, M. Juonala et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme activity correlates with risk factors for atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Exp Immunol*, 2007, 148(1):106-111
- [177] J. E. Cole, N. Astola, A. P. Cribbs et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 is protective in atherosclerosis and its metabolites provide new opportunities for drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(42):13033-13038
- [178] K. A. Polyzos, O. Ovchinnikova, M. Berg et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes vascular inflammation and increases atherosclerosis in Apoe^{-/-} mice. *Cardiovasc Res*, 2015, 106(2):295-302
- [179] T. Suguro, T. Watanabe, T. Kanome et al. Serotonin acts as an up-regulator of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 in human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis*, 2006, 186(2):275-281

- [180] D. H. Lee, E. J. Chun, J. H. Hur et al. Effect of sarpogrelate, a selective 5-HT(2A) receptor antagonist, on characteristics of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 2017, 257:47-54
- [181] S. Metghalchi, P. Ponnuswamy, T. Simon et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Fine-Tunes Immune Homeostasis in Atherosclerosis and Colitis through Repression of Interleukin-10 Production. *Cell Metab*, 2015, 22(3):460-471
- [182] L. Zhang, O. Ovchinnikova, A. Jonsson et al. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid lowers plasma lipids and decreases atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice. *Eur Heart J*, 2012, 33(16):2025-2034
- [183] K. Pawlak, M. Mysliwiec, D. Pawlak. Kynurenine pathway - a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Adv Med Sci*, 2010, 55(2):196-203
- [184] N. J. Melhem, S. Taleb. Tryptophan: From Diet to Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18)
- [185] Q. Wang, M. Zhang, Y. Ding et al. Activation of NAD(P)H oxidase by tryptophan-derived 3-hydroxykynurenine accelerates endothelial apoptosis and dysfunction in vivo. *Circ Res*, 2014, 114(3):480-492
- [186] Q. Wang, Y. Ding, P. Song et al. Tryptophan-Derived 3-Hydroxyanthranilic Acid Contributes to Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice In Vivo. *Circulation*, 2017, 136(23):2271-2283
- [187] Y. Li, R. T. Kilani, E. Rahmani-Neishaboor et al. Kynurenine increases matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in cultured dermal fibroblasts and improves scarring in vivo. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(3):643-650
- [188] M. S. Poormasjedi-Meibod, S. Salimi Elizei, V. Leung et al. Kynurenine Modulates MMP-1 and Type-I Collagen Expression Via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Dermal Fibroblasts. *J Cell Physiol*, 2016, 231(12):2749-2760
- [189] Y. Wang, H. Liu, G. McKenzie et al. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med*, 2010, 16(3):279-285
- [190] B. Wirleitner, V. Rudzite, G. Neurauter et al. Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(7):550-554
- [191] W. Ni, J. M. Thompson, C. A. Northcott et al. The serotonin transporter is present

- and functional in peripheral arterial smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 43(6):770-781
- [192] Y. Zhang, J. Shen, X. He et al. A rare variant at the KYNU gene is associated with kynureninase activity and essential hypertension in the Han Chinese population. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4(6):687-694
- [193] A. B. Gold, N. Herrmann, W. Swardfager et al. The relationship between indoleamine 2,3-dioxygenase activity and post-stroke cognitive impairment. *J Neuroinflammation*, 2011, 8:17

附录 2 其它数据图表或程序

附表 1 167 个免疫及代谢特征基因

Symbol	Ensembl ID	Description
ST3GAL1	ENSG00000008513	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1
AK1	ENSG00000106992	adenylate kinase 1
SQLE	ENSG00000104549	squalene epoxidase
SCD	ENSG00000099194	stearoyl-CoA desaturase
PIK3CB	ENSG00000051382	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta
DTYMK	ENSG00000168393	deoxythymidylate kinase
ICMT	ENSG00000116237	isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
SDSL	ENSG00000139410	serine dehydratase like
PNPLA7	ENSG00000130653	patatin like phospholipase domain containing 7
PYGL	ENSG00000100504	glycogen phosphorylase L
SRD5A1	ENSG00000145545	steroid 5 alpha-reductase 1
B3GALT6	ENSG00000176022	beta-1,3-galactosyltransferase 6
PDHX	ENSG00000110435	pyruvate dehydrogenase complex component X
CNDP2	ENSG00000133313	carnosine dipeptidase 2
INPP5K	ENSG00000132376	inositol polyphosphate-5-phosphatase K
CERS6	ENSG00000172292	ceramide synthase 6
LHPP	ENSG00000107902	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase
SORD	ENSG00000140263	sorbitol dehydrogenase
DNMT1	ENSG00000130816	DNA methyltransferase 1
SPTLC3	ENSG00000172296	serine palmitoyltransferase long chain base subunit 3
GPX8	ENSG00000164294	glutathione peroxidase 8 (putative)
PDGFRL	ENSG00000104213	platelet derived growth factor receptor like

PRKCQ	ENSG00000065675	protein kinase C theta
IFNAR1	ENSG00000142166	interferon alpha and beta receptor subunit 1
LRAT	ENSG00000121207	lecithin retinol acyltransferase
ANGPTL2	ENSG00000136859	angiopoietin like 2
ZMPSTE24	ENSG00000084073	zinc metalloproteinase STE24
FNTB	ENSG00000257365	farnesyltransferase, CAAX box, beta
L3HYPDH	ENSG00000126790	trans-L-3-hydroxyproline dehydratase
EZH2	ENSG00000106462	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
NMB	ENSG00000291631	neuromedin B
GFPT2	ENSG00000131459	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2
NRAS	ENSG00000213281	NRAS proto-oncogene, GTPase
PDE1A	ENSG00000115252	phosphodiesterase 1A
ST3GAL2	ENSG00000157350	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2
LSS	ENSG00000160285	lanosterol synthase
HPSE	ENSG00000173083	heparanase
CYP2C8	ENSG00000138115	cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8
PMM2	ENSG00000140650	phosphomannomutase 2
ST6GALNAC3	ENSG00000184005	ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3
IDI1	ENSG00000067064	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1
TXNDC12	ENSG00000117862	thioredoxin domain containing 12
FADS1	ENSG00000149485	fatty acid desaturase 1
ROBO3	ENSG00000154134	roundabout guidance receptor 3
AK9	ENSG00000155085	adenylate kinase 9
PFKFB3	ENSG00000170525	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
FASN	ENSG00000169710	fatty acid synthase
LIPG	ENSG00000101670	lipase G, endothelial type

MTMR2	ENSG00000087053	myotubularin related protein 2
DOT1L	ENSG00000104885	DOT1 like histone lysine methyltransferase
PLCG1	ENSG00000124181	phospholipase C gamma 1
PLCE1	ENSG00000138193	phospholipase C epsilon 1
MOCOS	ENSG00000075643	molybdenum cofactor sulfurase
HSD17B4	ENSG00000133835	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4
ACLY	ENSG00000131473	ATP citrate lyase
ESRRG	ENSG00000196482	estrogen related receptor gamma
DPM1	ENSG00000000419	dolichyl-phosphate mannosyltransferase subunit 1, catalytic
ENTPD6	ENSG00000197586	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6
MCCC2	ENSG00000281742	methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit 2
PCSK1	ENSG00000175426	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1
SHMT1	ENSG00000284320	serine hydroxymethyltransferase 1
SAT1	ENSG00000130066	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
RPEL1	ENSG00000235376	ribulose-5-phosphate-3-epimerase like 1
ATP6V0D2	ENSG00000147614	ATPase H ⁺ transporting V0 subunit d2
P4HA3	ENSG00000149380	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3
ACAA1	ENSG00000060971	acetyl-CoA acyltransferase 1
TPM2	ENSG00000198467	tropomyosin 2
BDH2	ENSG00000164039	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2
ALAD	ENSG00000148218	aminolevulinate dehydratase
ISG20L2	ENSG00000143319	interferon stimulated exonuclease gene 20 like 2
PPIA	ENSG00000196262	peptidylprolyl isomerase A
NAGS	ENSG00000161653	N-acetylglutamate synthase
ADA	ENSG00000196839	adenosine deaminase
LYPLA1	ENSG00000120992	lysophospholipase 1

ACOX1	ENSG00000161533	acyl-CoA oxidase 1
CHPT1	ENSG00000111666	choline phosphotransferase 1
LGR6	ENSG00000133067	leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 6
SETD1B	ENSG00000139718	SET domain containing 1B, histone lysine methyltransferase
CYP2R1	ENSG00000186104	cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1
GSTO2	ENSG00000065621	glutathione S-transferase omega 2
CX3CR1	ENSG00000168329	C-X3-C motif chemokine receptor 1
PANK2	ENSG00000125779	pantothenate kinase 2
IKBKG	ENSG00000269335	inhibitor of nuclear factor kappa B kinase regulatory subunit gamma
AGER	ENSG00000229058	advanced glycosylation end-product specific receptor
AK5	ENSG00000154027	adenylate kinase 5
IL20RB	ENSG00000174564	interleukin 20 receptor subunit beta
KMT2C	ENSG00000055609	lysine methyltransferase 2C
SDC2	ENSG00000169439	syndecan 2
CARNS1	ENSG00000172508	carnosine synthase 1
CPOX	ENSG00000080819	coproporphyrinogen oxidase
CDO1	ENSG00000129596	cysteine dioxygenase type 1
PIK3C2A	ENSG00000011405	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha
PFKFB4	ENSG00000114268	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4
IDNK	ENSG00000148057	IDNK gluconokinase
ALG5	ENSG00000120697	ALG5 dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase
GALNS	ENSG00000141012	galactosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
FGFR1	ENSG00000077782	fibroblast growth factor receptor 1
PFKFB1	ENSG00000158571	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1
SEMA3G	ENSG00000010319	semaphorin 3G

NPR3	ENSG00000113389	natriuretic peptide receptor 3
ELOVL6	ENSG00000170522	ELOVL fatty acid elongase 6
CLDN4	ENSG00000189143	claudin 4
ELOVL7	ENSG00000164181	ELOVL fatty acid elongase 7
PLXNB1	ENSG00000164050	plexin B1
HGD	ENSG00000113924	homogentisate 1,2-dioxygenase
CMTM8	ENSG00000170293	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 8
RCE1	ENSG00000173653	Ras converting CAAX endopeptidase 1
ACSS3	ENSG00000111058	acyl-CoA synthetase short chain family member 3
ALDH1A1	ENSG00000165092	aldehyde dehydrogenase 1 family member A1
BCL10	ENSG00000142867	BCL10 immune signaling adaptor
AMPD2	ENSG00000116337	adenosine monophosphate deaminase 2
DHODH	ENSG00000102967	dihydroorotate dehydrogenase (quinone)
TPH1	ENSG00000129167	tryptophan hydroxylase 1
MAPK1	ENSG00000100030	mitogen-activated protein kinase 1
PAFAH1B1	ENSG00000007168	platelet activating factor acetylhydrolase 1b regulatory subunit 1
C1GALT1	ENSG00000106392	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1
ECD	ENSG00000122882	ecdysoneless cell cycle regulator
ITPKA	ENSG00000137825	inositol-trisphosphate 3-kinase A
P4HA1	ENSG00000122884	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1
RFK	ENSG00000135002	riboflavin kinase
AK4	ENSG00000162433	adenylate kinase 4
SEMA7A	ENSG00000288455	semaphorin 7A (John Milton Hagen blood group)
MAT2B	ENSG00000038274	methionine adenosyltransferase 2 non-catalytic beta subunit
POMC	ENSG00000115138	proopiomelanocortin

PLOD1	ENSG00000083444	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
SIRT1	ENSG00000096717	sirtuin 1
EDNRB	ENSG00000136160	endothelin receptor type B
SEMA3A	ENSG00000075213	semaphorin 3A
DHRS11	ENSG00000275397	dehydrogenase/reductase 11
TPT1	ENSG00000133112	tumor protein, translationally-controlled 1
GCNT1	ENSG00000187210	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1
SMOX	ENSG00000088826	spermine oxidase
AMDHD2	ENSG00000162066	amidohydrolase domain containing 2
SEMA4F	ENSG00000135622	ssemaphorin 4F
GALNT16	ENSG00000100626	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 16
IPPK	ENSG00000127080	inositol-pentakisphosphate 2-kinase
VKORC1	ENSG00000167397	vitamin K epoxide reductase complex subunit 1
PIGV	ENSG00000060642	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class V
PAK1	ENSG00000149269	p21 (RAC1) activated kinase 1
SOS1	ENSG00000115904	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1
CTF1	ENSG00000150281	cardiotrophin 1
NUDT5	ENSG00000165609	nudix hydrolase 5
MGLL	ENSG00000074416	monoglyceride lipase
BBOX1	ENSG00000129151	gamma-butyrobetaine hydroxylase 1
GSTP1	ENSG00000084207	glutathione S-transferase pi 1
CLEC11A	ENSG00000105472	C-type lectin domain containing 11A
TNFRSF19	ENSG00000127863	TNF receptor superfamily member 19
GXYLT2	ENSG00000172986	glucoside xylosyltransferase 2
PLCB4	ENSG00000101333	phospholipase C beta 4
CHAC1	ENSG00000128965	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1

华中科技大学博士学位论文

SOS2	ENSG00000100485	SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2
HDDC2	ENSG00000111906	HD domain containing 2
SGPP2	ENSG00000163082	sphingosine-1-phosphate phosphatase 2
SGMS2	ENSG00000164023	sphingomyelin synthase 2
ELOVL2	ENSG00000197977	ELOVL fatty acid elongase 2
CPS1	ENSG00000021826	carbamoyl-phosphate synthase 1
RRM2B	ENSG00000048392	ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B
EXTL2	ENSG00000162694	exostosin like glycosyltransferase 2
ST6GALNAC2	ENSG00000070731	ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2
CYP39A1	ENSG00000146233	cytochrome P450 family 39 subfamily A member 1
OXTR	ENSG00000180914	oxytocin receptor
SCGB3A1	ENSG00000161055	secretoglobin family 3A member 1
TYRP1	ENSG00000107165	tyrosinase related protein 1
MAN1C1	ENSG00000117643	mannosidase alpha class 1C member 1
PDE9A	ENSG00000160191	phosphodiesterase 9A
NUDT2	ENSG00000164978	nudix hydrolase 2
CSRP1	ENSG00000159176	cysteine and glycine rich protein 1
