

• 论 著 •

与坏死性凋亡相关的 lncRNA 模型预测肾透明
细胞癌患者预后及区分肿瘤的研究*

蒋奕斌¹, 张梦翊¹, 王朋佳¹, 胡 泉¹, 苗 叶¹, 钱 晶^{1,2△}
(1. 湖州师范学院医学院, 浙江 湖州 313000; 2. 浙江省媒介生物学与
病原控制重点实验室, 浙江 湖州 313000)

[摘 要] **目的** 通过建立坏死性凋亡相关的长非编码 RNA (NR lncRNA) 模型, 预测肾透明细胞癌 (KIRC) 患者预后及区分冷、热肿瘤。**方法** 从 TCGA 数据库中下载 KIRC 患者基因表达谱及临床信息。通过共表达分析和单变量 Cox 风险回归分析确定与 KIRC 预后相关的 NR lncRNA。使用 Lasso 回归分析构建 NR lncRNA 模型。应用 χ^2 检验和 Kaplan-Meier 生存分析对 NR lncRNA 模型进行验证和分析。通过 R 语言中 “ConsensusClusterPlus” 包应用 NR lncRNA 模型区分冷、热肿瘤。**结果** 确定了 3 种与 KIRC 患者预后相关的 NR lncRNA, 并由此构建了 NR lncRNA 模型。高风险组较低风险组具有不良的预后。KIRC 被分为 2 个亚型。与亚型 2 比较, 亚型 1 具有免疫抑制性 (即冷肿瘤)。**结论** 建立了一个 NR lncRNA 模型, 可预测 KIRC 患者预后, 并为临床试验提供了理论基础。

[关键词] 坏死性凋亡; 长非编码 RNA; 肾透明细胞癌; 预后; 冷肿瘤; 热肿瘤

DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-5519. 2023. 21. 006 **中图法分类号:** R737. 11

文章编号: 1009-5519(2023)21-3626-06 **文献标识码:** A

Research of a necroptosis-related lncRNA model for predicting prognosis and
distinguishing tumors in patients with kidney renal clear cell carcinoma*

JIANG Yibin¹, ZHANG Mengyi¹, WANG Pengjia¹, HU Quan¹, MIAO Ye¹, QIAN Jing^{1,2△}
(1. Huzhou University Schools of Nursing and Medicine, Huzhou University, Huzhou,
Zhejiang 313000, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Vector Biology and
Pathogen Control, Huzhou, Zhejiang 313000, China)

[Abstract] **Objective** To predict the prognosis of patients with kidney renal clear cell carcinoma (KIRC), and to distinguish between cold and hot tumors by establishing a model of necroptosis-related long non-coding RNA (NR lncRNA). **Methods** The gene expression profile and its clinical information of KIRC patients were downloaded from TCGA database. The KIRC prognostic related NR lncRNA was determined by co-expression analysis and univariate Cox risk regression analysis. Using the Lasso regression analysis to construct a NR lncRNA model. The χ^2 test and Kaplan-Meier survival analysis were used to verify and analyze the NR lncRNA model. The NR lncRNA model was applied to distinguish cold and hot tumors using the “ConsensusClusterPlus” package in R language. **Results** Three kinds of NR lncRNA related to the prognosis of KIRC patients were identified, and the NR lncRNA model was constructed. The high-risk group had a worse prognosis than the low-risk group. KIRC was divided into two subtypes, and subtype 1 was immunosuppressive (that was, cold tumor) compared with subtype 2. **Conclusion** A model of NR lncRNA is established, which can predict the prognosis of KIRC patients and provide a theoretical basis for clinical trials.

[Key words] Necroptosis; Long non-coding RNA; Kidney renal clear cell carcinoma; Prognosis; Cold tumor; Hot tumor

* 基金项目: 教育部国家级大学生创新创业训练计划项目 (202210347012)。
作者简介: 蒋奕斌 (2001—), 本科, 主要从事分子生物学和纳米材料方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: 02300@zjhu.edu.cn。

肾透明细胞癌(KIRC)是肾细胞癌中的最常见亚型,是一种源自肾小管上皮细胞的恶性肿瘤,占肾恶性肿瘤发病率的近 90%,占成人恶性肿瘤发病率的近 3%^[1]。KIRC 患者是所有肾细胞癌患者中预后最差者,具有高侵袭性和高转移性^[2]。由于 KIRC 缺乏有效的早期诊断方法,大约 30% 的患者在诊断时已为晚期,由于 KIRC 对放、化疗的天然抵抗力,预后非常差。目前,对 KIRC 患者进行手术切除仍是最有效的治疗方法^[3]。因此,全面了解 KIRC 的分子机制并开发有效的早期检测方法具有重要意义。

在生物体内细胞凋亡是细胞程序性死亡的最常见原因。近年来,基于对细胞死亡机制的大量研究,最近提出了新的细胞死亡机制——坏死性凋亡。由于大多数肿瘤固有的抗凋亡作用,诱导其他细胞死亡,其越来越被认为是一种有前途的治疗策略^[4]。坏死性凋亡是一种独立于细胞凋亡的特殊受调控细胞坏死,可通过激活肿瘤微环境(TME)中的 RIPK1、3 提高 CD8⁺ 白细胞介导的抗肿瘤免疫力。同时,一种坏死性凋亡癌细胞模拟的纳米疫苗可通过刺激 NKG2D⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞增殖提高小鼠的抗肿瘤免疫力^[2]。有研究表明,坏死性凋亡与肾细胞癌、卵巢癌、乳腺癌等恶性肿瘤的发生及发展相关^[5]。因此,寻找更多参与坏死性凋亡的生物标志物,以理解涉及 KIRC 坏死性凋亡的相互作用尤为重要。

目前,长非编码 RNA(lncRNA)被认为是关键的调节因子,并参与多种生物学过程,包括表观遗传重塑、染色质结构调节、RNA 稳定性调节,以及作为微小 RNA 海绵的功能等^[5]。然而,目前关于坏死性凋亡相关(NR)的 lncRNA 的文献报道很少见,并且 NR lncRNA 在 KIRC 预后中的作用仍未知。本研究旨在揭示 KIRC 与 NR lncRNA 的关系,并构建一个具有预后意义的与 KIRC 预后相关的 NR lncRNA 模型。

1 资料与方法

1.1 资料来源 从 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)中下载 539 个 KIRC 肿瘤样本和 72 个正常样本的转录组数据和临床数据。同时,剔除临床数据缺失或不完整的样本。

1.2 方法

1.2.1 筛选 NR lncRNA 使用 R 语言(4.1.2 版)中的“DESeq2”包进行差异分析,筛选出在肿瘤样本和正常样本中表达有差异的 lncRNA。筛选标准为 $|\log_2\text{fold change(FC)}| > 1.0$ 和 $P < 0.05$ 。 P 值经假阳

性发生率校正。另外,将 67 个基因作为 NR 基因,包括坏死性凋亡基因集 M24779、GMT 和基因组富集分析(<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>)获得的 8 个坏死性凋亡基因。随后,使用 67 个坏死性凋亡基因和差异表达的 lncRNA 进行共表达分析,筛选得到 KIRC 患者 NR lncRNA。筛选标准为 Pearson 相关系数大于 0.8 和 $P < 0.001$ 。

1.2.2 建立和验证 NR lncRNA 模型 依据 TCGA 数据库中 KIRC 患者的临床数据,使用单变量 Cox 风险回归分析筛选与 KIRC 患者预后相关的 NR lncRNA($P < 0.05$)。同时,进行 Lasso 回归分析,10 折交叉验证,将 $P < 0.05$ 作为筛选标准得到风险建模型。使用公式 $[\text{risk score} = \sum_{k=1}^n \text{coef}(\text{lncRNA}^k) * \text{expr}(\text{lncRNA}^k)]$ 确定风险评分,其中 $\text{coef}(\text{lncRNA})$ 是与预后相关的 NR lncRNA 系数的缩写, $\text{expr}(\text{lncRNA})$ 是 lncRNA 表达量。根据风险评分的中位值将 KIRC 患者分为低风险组和高风险组^[6]。

1.2.3 分析 MYSOLID、LINC02362、MANCR 与 KIRC 患者预后的关系 在 TCGA 的 Gene Expression Profiling Interactive Analysis(GEPIA)数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)中设定检索条件:(1)Single Gene Analysis 选项,Enter gene name 输入基因名 CLEC16A、LINC02362 和 MANCR;(2)Dataset 选择 KIRC;(3)在 Survival 栏中选择 Overall Survival;(4)在 Datasets Selection(Cancer name)栏中选择 KIRC 点击 Plot。

1.2.4 基于 3 个 NR lncRNA 的肿瘤分群 使用“clusterplus”R 软件包,依据风险模型中 lncRNA 的表达水平确定潜在 KIRC 的集群,同时,检验 KIRC 对免疫治疗的反应^[7]。应用“RTSNE”R 包进行主成分分析(PCA)、T 分布随机邻域嵌入(t-SNE)和 Kaplan-Meier 生存分析。另外,使用“GSVA Base”进行免疫检查点分析和计算不同集群 KIRC 的免疫细胞浸润。并区分冷、热肿瘤。

1.3 统计学处理 应用 R 语言(4.1.2 版)和 GEPIA 数据库进行数据分析,采用 χ^2 检验和 Kaplan-Meier 生存分析检验 NR lncRNA 模型,以评估 NR lncRNA 模型的预后价值。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

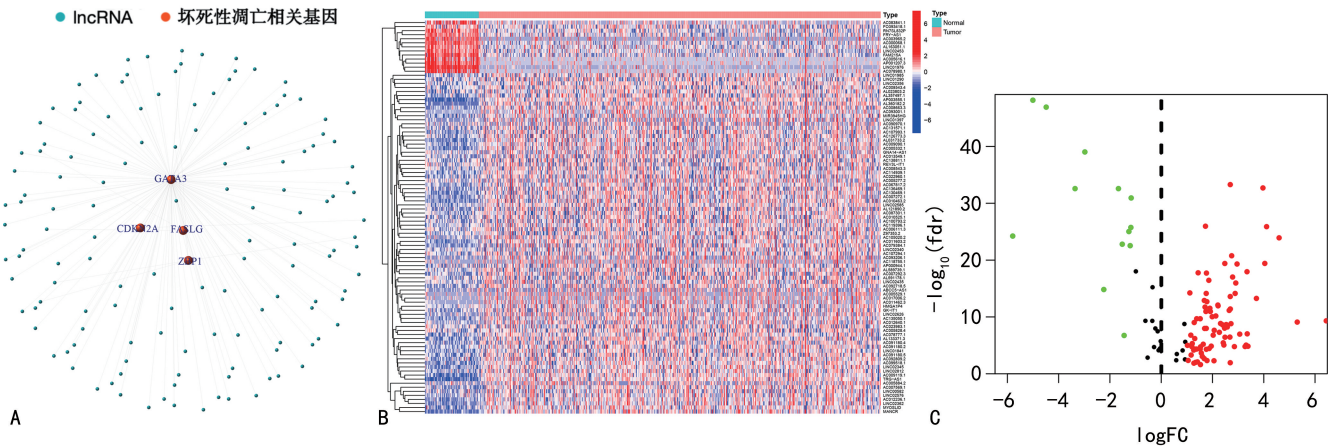
2 结果

2.1 KIRC 患者中差异表达的 NR lncRNA 基于 67 个 NR 基因得到 97 个差异表达的 lncRNA,其中 13 个上调,84 个下调。NR 基因(如 GATA3 和

CDKN2A)与 lncRNA 之间的网络关系见图 1。

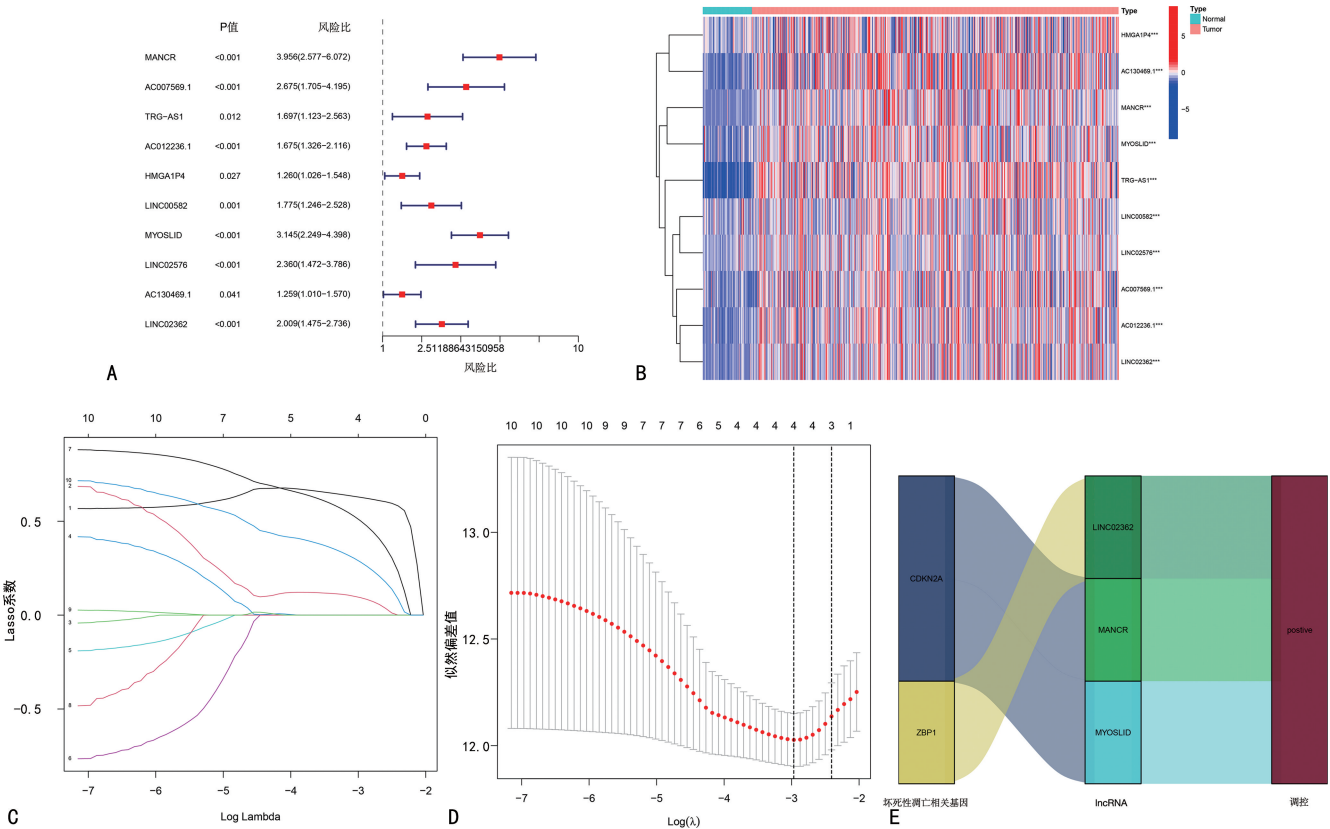
2.2 模型的构建与检验 10 个 NR lncRNA 与 KIRC 患者总生存率相关($P<0.05$)。见图 2A、B。3 个与 KIRC 预后相关的 NR lncRNA。见图 2C、D。桑基图发现 3 个 lncRNA 均被下调。见图 2E。高风险组有着不良的预后。见图 3。

2.3 MYSOLID、LINC02362、MANCR 与 KIRC 患者预后的关系 MYSOLID、LINC02362、MANCR 低表达组患者总生存率均明显高于高表达组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。低表达组患者相较于高表达组具有更高的生存率。见图 4。



注:A. KIRC NR lncRNA 的共表达网络(相关系数大于 0.8, $P<0.001$);B、C. 97 个差异表达的 NR lncRNA 的热图和火山图。

图 1 KIRC NR lncRNA 的鉴别及共表达分析和差异分析



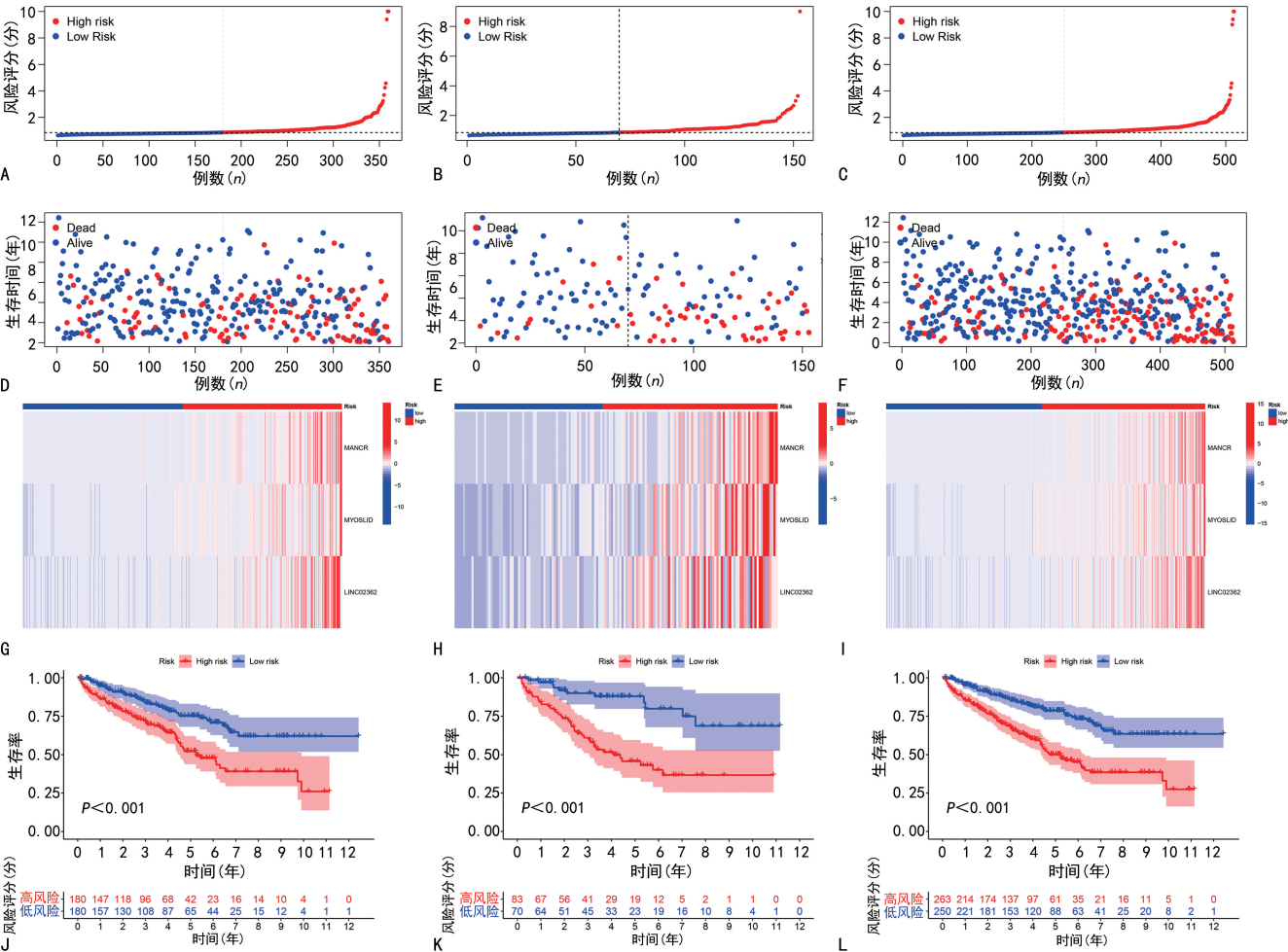
注:A. 通过单变量 Cox 回归分析筛选的预后 NR lncRNA;B. 10 个预后 NR lncRNA 的表达热图;C. 10 折交叉验证 Lasso 模型;D. 3 个预后 NR lncRNA 的 Lasso 系数图;E. 坏死凋亡相关基因和 lncRNA 关系的桑基图。

图 2 在 KIRC 中筛选的 NR lncRNA 的预后特征

2.4 区分冷、热肿瘤 KIRC 患者重新分组为 2 个亚型。见图 5A。t-SNE 显示 2 个亚型可以清楚地地区

分。见图 5C。此外,获得风险组和亚型的 PCA 图。见图 5E、F。亚型 1 患者总生存率高于亚型 2,提示预后较好。见图 5B。亚型 1 与低风险组和高风险组均相关,而亚型 2 几乎与高风险组相关。见图 5D。亚型 2 较亚型 1 具有更高的基质、免疫评分。见图

5G~I。亚型 2 具有更高水平的免疫细胞浸润。见图 5J。几乎所有的免疫检查点均在亚型 2 中表现出更多的活性,如 IDO1、PDCD1 和 CD44。见图 5K。因此,将亚型 2 视为热肿瘤,亚型 1 视为冷肿瘤。



注:A~C. 低风险组与高风险组患者的风险评分;D~F. KIRC 患者风险评分与生存状态的关系;G~I. 低风险组与高风险组患者 3 种 lncRNA 的表达水平热图;J~K. 低风险组与高风险组 KIRC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线。

图 3 风险模型预后价值分析

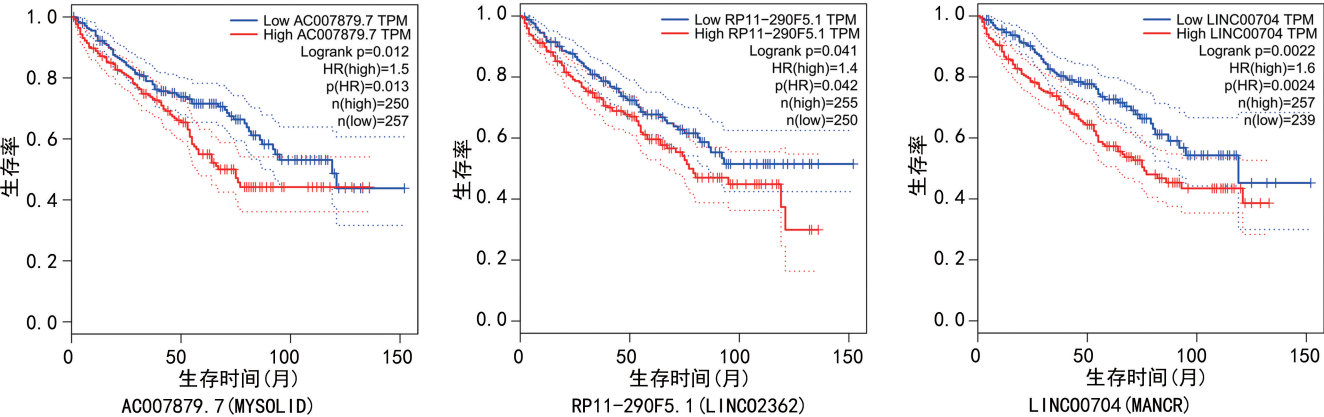
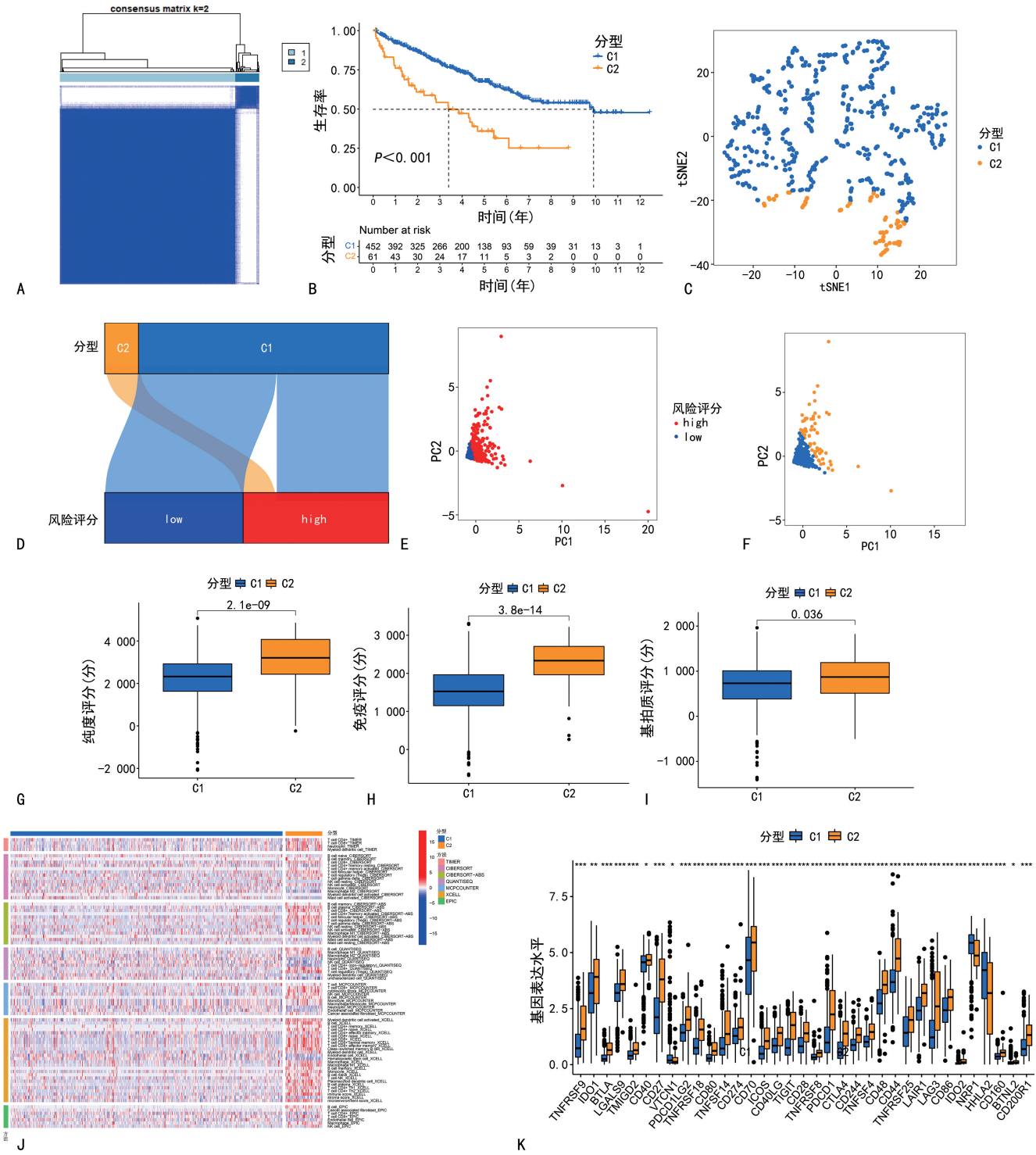


图 4 MYSOLID、LINC02362、MANCR 与 KIRC 患者预后的关系



注: A. KIRC 患者被“ConsensusClusterPlus”R 包分为 2 个亚型; B. Kaplan-Meier 生存率分析 2 个亚型之间的总体生存率; C. 2 个亚型的 t-SNE; D. 风险评分和亚型关系的桑基图; E、F. KIRC 患者风险评分和亚型的 PCA; G~I. TME 分析; J. 亚型 1、2 免疫细胞浸润的热图; K. 36 个基因检查点在亚型 1、2 中的表达水平。

图 5 KIRC 分型和免疫治疗预测

3 讨 论

免疫疗法可改善肿瘤患者的预后,但其只对部分肿瘤有效^[7-8]。由于免疫抑制 TME,免疫治疗对一些患者无效。GALON 等^[9]提出了冷、热肿瘤的概念以增强免疫治疗。其是基于免疫的肿瘤分类,而不是传统的基于癌症分类,具有高免疫评分的肿瘤通常被称为“热”,而具有低免疫评分的非侵入性肿瘤被称为

“冷”。可通过 T 淋巴细胞靶向免疫疗法、微生物组调节或其他免疫药物治疗热肿瘤。然而,因 T 淋巴细胞预先存在的免疫力无法释放,这对冷肿瘤来说就很复杂。CD8⁺ T 淋巴细胞可通过释放 PRF1、GNLY 或 GZM 等细胞因子杀死癌细胞,并作为一种预先存在的免疫反应打破耐受性和通过 PD-1/PD-L1 免疫抑制轴增强免疫治疗。因此,临床治疗中谨慎的做法是

将冷肿瘤转化为热肿瘤,而不是简单地进行其他治疗^[2]。

本研究确定了 3 种与 KIRC 患者预后相关的 NR lncRNA,并由此构建了 NR lncRNA 模型,对患者进行风险评分,试图区分冷、热肿瘤。通过风险模型,患者被重新分组为低风险组和高风险组,并进行了多项分析,包括 Kaplan-Meier 生存分析和 χ^2 检验。有研究表明,分子亚型又称为集群,与肿瘤免疫抑制和微环境有关^[10-11]。不同的亚型具有不同的免疫效应和 TME 评分,进而亚型间具有不同的预后和免疫治疗反应^[12-14]。因此,根据 NR lncRNA 模型中 lncRNA 的表达将患者分为 2 个亚型,其具有不同的免疫微环境。亚型 1 具有免疫抑制性,相比之下,亚型 2 具有更密集的 CD8⁺ T 淋巴细胞浸润,更活跃的促炎功能,更高的免疫评分及 TIM3、LAG3、PD-L1 活性。因此,亚型 1 可归类为冷肿瘤,亚型 2 可归类为热肿瘤。

此外,本研究在桑基图中发现了一些 NR lncRNA,如 ZBP1。MANCR、MYOSLID 均与 CDKN2A 相关。CDKN2A 表达水平与许多肿瘤中的肿瘤突变负荷及许多肿瘤中的微卫星不稳定性显著相关^[15]。指导癌症和其他疾病治疗策略的 ZBP 与 LINC02362 相关,后者也与细胞凋亡有关,可克服免疫治疗失败,并保持持久的抗肿瘤反应^[16]。近年来,发现 MANCR 在癌细胞的迁移和侵袭能力中发挥重要作用^[17],其体外过度表达在一些研究与肿瘤发生有关^[18]。RAB13 可能促进骨肉瘤的发生,而 MYOSLID 刺激微小 RNA-1286 以增加 RAB13 表达^[19]。

本研究与既往利用体外实验技术分析研究肿瘤发生及发展模式不同,通过在线数据库的数据挖掘分析,减小由于样本量不足导致的结果误差,相关结果可作为临床试验的前瞻研究与重要补充、指导。但本研究缺乏实验基础,MYOSLID、LINC02362、MANCR 在 KIRC 发生及发展中发挥的机制和作用仍需进一步验证。

参考文献

[1] MENG J, LU X, ZHOU Y, et al. Tumor immune microenvironment-based classifications of bladder cancer for enhancing the response rate of immunotherapy[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 20: 410-421.

[2] ZHAO Z, LIU H, ZHOU X, et al. Necroptosis-related lncRNAs: predicting prognosis and the distinction between the cold and hot tumors in gastric cancer[J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 6718443.

[3] MAKHOV P, JOSHI S, GHATALIA P, et al. Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and manage-

ment strategies[J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17 (7): 1355-1364.

[4] TANG R, XU J, ZHANG B, et al. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity[J]. *J hematol Oncol*, 2020, 13(1): 110.

[5] GU J, HE Z, HUANG Y, et al. Clinicopathological and prognostic value of necroptosis-associated lncRNA model in patients with kidney renal clear cell carcinoma[J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 5204831.

[6] MENG T, HUANG R, ZENG Z, et al. Identification of prognostic and metastatic alternative splicing signatures in kidney renal clear cell carcinoma [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 270.

[7] YANG Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3335-3337.

[8] KORMAN A J, GARRETT-THOMSON S C, LONBERG N. The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(7): 509-528.

[9] GALON J, BRUNI D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 197-218.

[10] SEILER R, ASHAB H A D, ERHO N, et al. Impact of molecular subtypes in muscle-invasive bladder cancer on predicting response and survival after neoadjuvant chemotherapy [J]. *Eur Urol*, 2017, 72(4): 544-554.

[11] SINGH M P, RAI S, PANDEY A, et al. Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine[J]. *Genes Dis*, 2021, 8(2): 133-145.

[12] ZHANG W, YAO S, HUANG H, et al. Molecular subtypes based on ferroptosis-related genes and tumor microenvironment infiltration characterization in lung adenocarcinoma [J]. *Oncoimmunology*, 2021, 10(1): 1959977.

[13] LIN Y, PAN X, ZHAO L, et al. Immune cell infiltration signatures identified molecular subtypes and underlying mechanisms in gastric cancer[J]. *N P J Genom Med*, 2021, 6(1): 83.

[14] HU J, QIU D, YU A, et al. YTHDF1 is a potential pan-cancer biomarker for prognosis and immunotherapy [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 607224.

(下转第 3636 页)

ture for elinieal practice and clinical trials[J]. Stroke, 2011, 42(2): 427-432.

[10] 朱娟, 钮金圆, 张文通. 计时起立行走和最大步行速度评估脑卒中患者功能的对比分析[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(9): 1026-1029.

[11] 孟丽君, 高正玉, 陈玮, 等. 脑卒中患者运动功能恢复预测的研究进展[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2022, 44(3): 269-272.

[12] 王连, 张松, 郭铁成. 脑卒中后运动功能障碍患者感觉运动整合的研究进展[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2022, 44(5): 463-466.

[13] PINHEIRO D R, CABELEIRA M E P, DA CAMPO L A, et al. Effects of aerobic cycling training on mobility and functionality of acute stroke subjects: A randomized clinical trial[J]. NeuroRehabilitation, 2021, 48(1): 39-47.

[14] 段好阳, 刘福迁, 闫兆红, 等. 四肢联动功能训练对脑卒中患者躯干控制能力及平衡功能的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2015, 37(10): 747-749.

[15] SHARIFIFAR S, SHUSTER J J, BISHOP M D. Adding electrical stimulation during standard rehabilitation after stroke to improve motor function. A systematic review and meta-analysis[J]. Ann Phys Rehabil Med, 2018, 61(5): 339-344.

[16] 苏彬, 黄桂兰, 房辉, 等. 功能性电刺激治疗脑卒中后步行功能障碍的临床应用及相关机制研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2021, 36(1): 119-123.

[17] 陈培荣, 李奎, 吴丹丽, 等. 多通路功能性电刺激四肢联动对于脑卒中患者下肢功能恢复的影响[J]. 中国康复, 2017, 32(6): 476-478.

[18] SHARIAT A, NAKHOSTIN ANSARI N, HONARPISHE R, et al. Effect of cycling and functional electrical stimulation with linear and interval patterns of timing on gait parameters in patients after stroke: A randomized clinical trial[J]. Disabil Rehabil, 2021, 43(13): 1890-1896.

[19] 吴晓燕, 吕君玲, 金荣疆. 脑卒中后痉挛的反射性介导与非反射性介导机制[J]. 中国康复医学杂志, 2021, 36(1): 124-127.

[20] 徐泉, 马迪, 潘钰, 等. 功能性电刺激下踏车训练对亚急性期脑卒中患者运动功能和心肺适能的效果[J]. 中国康复理论与实践, 2020, 26(9): 1005-1009.

[21] 王欣欣, 王强, 吴玉斌, 等. 多通道功能性电刺激对脑卒中偏瘫患者下肢功能的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2018, 40(5): 345-347.

[22] 王中莉, 傅建明, 姚云海, 等. 脑卒中患者躯干核心肌群等速定量测定与步态参数的相关性研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2017, 39(10): 738-741.

[23] GAMBLE K, CHIU A, PEIRIS C. Core stability exercises in addition to usual care physiotherapy improve stability and balance after stroke: A systematic review and meta-analysis[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2021, 102(4): 762-775.

[24] LURA D J, VENGLAR M C, VAN DUIJN A J, et al. Body weight supported treadmill vs. overground gait training for acute stroke gait rehabilitation[J]. Int J Rehabil Res, 2019, 42(3): 270-274.

[25] MOUCHEBOEUF G, GRIFFIER R, GASQ D, et al. Effects of robotic gait training after stroke: A meta-analysis[J]. Ann Phys Rehabil Med, 2020, 63(6): 518-534.

(收稿日期: 2023-02-09 修回日期: 2023-09-16)

(上接第 3631 页)

[15] CHEN Z, GUO Y, ZHAO D, et al. Comprehensive analysis revealed that CDKN2A is a biomarker for immune infiltrates in multiple cancers[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 808208.

[16] JIAO H, WACHSMUTH L, KUMARI S, et al. Z-nucleic-acid sensing triggers ZBP1-dependent necroptosis and inflammation[J]. Nature, 2020, 580(7803): 391-395.

[17] NAGASAWA M, TOMIMATSU K, TERADA K, et al. Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(1): 128-134.

[18] KARKI R, SUNDARAM B, SHARMA B R, et al. ADAR1 restricts ZBP1-mediated immune response and PANoptosis to promote tumorigenesis[J]. Cell Rep, 2021, 37(3): 109858.

[19] YANG S, CHEN M, LIN C. A novel lncRNA MYOSLID/miR-1286/RAB13 axis plays a critical role in osteosarcoma progression[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 10345-10351.

(收稿日期: 2023-02-27 修回日期: 2023-09-11)