膀胱尿路上皮癌自噬相关 LncRNA 预后风险模型的建立与分析*

瞿根义[1] 向茂林[1] 徐勇[1] 阳光[1] 楚舟[2]

［摘要］ **目的**：本研究探讨自噬相关长非编码 RNA(LncRNA)在膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma，BLCA)中的预后作用，并建立 BLCA 自噬相关 LncRNA 预后风险模型。**方法**：从 TCGA 数据库下载 BLCA 转录组数据和临床资料，从 HADb 数据库下载自噬基因列表，以 Person 相关性分析筛选 BLCA 自噬相关 LncRNA，采用单因素 Cox 回归分析筛选具有预后意义的 LncRNA，纳入多因素 Cox 回归分析和 Kaplan-Meier 法筛选具有独立预后的自噬相关 LncRNA，并绘制生存曲线，同时在此基础上建立预后风险模型。计算患者的风险评分并将其分为低风险组和高风险组，比较两组患者的生存差异，采用 ROC 曲线评价模型的特异性和灵敏度，Cox 回归分析风险评分与 BLCA 临床病理特征及预后的关系。**结果**：共筛选 BLCA 自噬相关 LncRNA 377 个(相关系数 $|r|>0.5$，$P<0.001$)，通过单因素和多因素 Cox 回归分析筛选出 7 个具有独立预后意义的自噬相关 LncRNA 建立预后风险模型，高风险组患者生存期显著低于低风险组患者，差异有统计学意义($P<0.01$)，预测模型 ROC 曲线下面积 AUC 为 0.704，预后模型的风险评分是 BLCA 的独立预测因子，风险评分与肿瘤分级、病理分期、淋巴结转移显著相关($P<0.05$)。**结论**：基于自噬相关 LncRNA 建立的预后风险模型对 BLCA 具有预后判断价值，有助于指导 BLCA 患者个体化治疗。

［关键词］ 膀胱尿路上皮癌；自噬；长非编码 RNA；预后；模型
DOI：10.13201/j.issn.1001-1420.2021.07.004
［中图分类号］ R737.14 ［文献标志码］ A

Establishment and analysis of prognostic risk model of autophagy-related LncRNA in bladder urothelial carcinoma

QU Genyi[1] *XIANG Maolin*[1] *XU Yong*[1] *YANG Guang*[1] *CHU Zhou*[2]
([1]Department of Urology, Affiliated Zhuzhou Hospital, XiangYa Medical College CSU, Zhuzhou, Hunan, 412007, China; [2]Department of Scientific Research, Affiliated Zhuzhou Hospital, XiangYa Medical College CSU)
Corresponding author: CHU Zhou, E-mail: xiaozhou321@126. com

Abstract **Objective**: To investigate the prognostic role of autophagy-related LncRNA in bladder urothelial carcinoma (BLCA), and establish a BLCA autophagy-related LncRNA prognostic risk model. **Methods**: We downloaded BLCA transcriptome data and clinical data from the TCGA database, downloaded the autophagy gene list from the HADb database, screened BLCA autophagy-related LncRNAs by Person correlation analysis, and used single-factor Cox regression analysis to screen LncRNAs with prognostic significance. Factor Cox regression analysis and Kaplan-Meier method were used to screen autophagy-related LncRNAs with independent prognosis, and to draw survival curves. At the same time, a prognostic risk model was established on this basis. The risk scores were calculated, then patients were divide into low-risk group and high-risk group. The difference in survival between the two groups was compared, and ROC curve was used to evaluate the specificity and sensitivity of the model. Cox regression was used to analyse the relationship between risk scores and clinicopathological characteristics, prognosis of BLCA. **Results**: A total of 377 BLCA autophagy-related LncRNAs were screened (correlation coefficient $|r|>0.5$, $P<0.001$), and 7 autophagy-related LncRNAs with independent prognostic significance were screened through univariate and multivariate Cox regression analysis to establish prognostic risk model. The survival time of patients in the high-risk group was significantly lower than that in the low-risk group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The area under the ROC curve of the prediction model AUC was 0.704. The risk score of the prognosis model is an independent predictor of BLCA. The score was significantly related to tumor grade, pathological stage and lymph node metastasis ($P<0.05$). **Conclusion**: The prognostic risk model established based on autophagy-related LncRNA has prognostic value for BLCA and helps guide individualized treatment of BLCA patients.

*基金项目：株洲市科技计划项目(No:2019-001)
[1]中南大学湘雅医学院附属株洲医院泌尿外科(湖南株洲，412007)
[2]中南大学湘雅医学院附属株洲医院科研科
通信作者：楚舟，E-mail：xiaozhou321@126.com

Key words bladder urothelial carcinoma; autophagy; long noncoding RNA; prognosis; model

膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma,BLCA)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,2018 年全球新发病例约 55 万例,死亡约 20 万例[1]。BLCA 是膀胱癌最常见的病理类型,约占其 90%[2]。尽管在 BLCA 的治疗中放化疗、外科手术以及靶向治疗较前取得明显的进展,但 BCLA 患者的生存预后仍然很差,其中约 30%的患者在初诊时即为肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer,MIBC),而 MIBC 复发率高,预后差,5 年生存率<50%[3]。因此有效的预后风险模型有助于指导 BLCA 患者个体化治疗以改善其预后。

自噬通过降解不需要的细胞质成分和受损的细胞器从而调节细胞内环境的稳态,同时过度自噬可以促进肿瘤细胞的自噬死亡,类似于细胞凋亡[4]。长非编码 RNA(Long noncoding RNA,LncRNA)是一类大于 200 个碱基对的非编码 RNA,它们通过与其他生物分子相互作用来参与人类的生理和病理过程[5]。在自噬过程中,LncRNA 充当分子海绵并吸收 miRNA,避免 miRNA 对 mRNA 翻译的抑制作用并调节自噬相关基因的表达[6]。此外,LncRNA 可以直接靶向自噬相关基因的启动子区域或募集其他分子来促进基因转录,从而调节细胞自噬[7]。最近,研究发现大量异常表达的 LncRNA 是膀胱癌早期诊断和预后的生物标志物[8]。Wu 等[9]研究发现 LncRNA UCA1 通过 ATG7 介导的自噬抑制作用降低 miR-582-5p 表达并促进膀胱癌的进展和耐药性。此外,研究发现自噬相关的 LncRNA 参与了膀胱癌的发生发展,并可以作为其诊断性分子标志物[10]。然而,目前尚无关于自噬相关 LncRNA 作为膀胱癌预后指标的研究。在本研究中,我们系统地分析了 TCGA 数据库中 409 例 BLCA 患者自噬相关 LncRNA 的表达与临床病理特征之间的关系。并基于 7 个自噬相关的 LncRNA 建立 BLCA 预后风险模型,并评估其独立准确地预测 BLCA 患者预后的能力。

1 资料与方法

1.1 临床资料

从癌症基因组图谱(TCGA)数据库(https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research)下载 BLCA 原始 RNA 测序数据和临床资料,临床资料包括生存时间、生存状态、年龄、性别、肿瘤分级、病理分期和 TNM 分期。排除生存期少于 30 d 和临床资料不完整的患者,共纳入 167 例,数据下载截止日期 2020.11.20。

1.2 提取 BLCA 自噬相关 LncRNA

从自噬基因数据库(HADb,http://www.autophagy.lu/index.html)下载最新的 232 个人类自噬相关基因列表。采用 Pearson 相关性分析以确定 LncRNA 的表达与相应自噬相关基因之间的相关性,以相关系数 $|r|>0.5$ 和 $P<0.001$ 提取 BLCA 自噬相关的 LncRNA。

1.3 构建 BLCA 自噬相关 LncRNA 预后风险模型

使用 R 软件中“survival”包进行单因素 Cox 回归分析评估自噬相关 LncRNA 在 BLCA 中的预后价值,筛选 $P<0.05$ 与 BLCA 预后显著相关 LncRNA,进一步纳入多因素 Cox 回归分析和 Kaplan-Meier 法筛选具有独立预后的自噬相关 LncRNA,根据赤池信息量准则(Akaike Information Criterion,AIC)确定最佳 LncRNA 建立 BLCA 预后风险模型,并绘制每个 LncRNA 的生存曲线。计算每个患者的风险评分(risk score),risk score $=\mathrm{coef}_{基因1}\times\mathrm{expr}_{基因1}+\mathrm{coef}_{基因2}\times\mathrm{expr}_{基因2}+\cdots+\mathrm{coef}_{基因n}\times\mathrm{expr}_{基因n}$(coef 为多因素 Cox 回归系数,expr 为 LncRNA 表达水平)。根据中位风险评分将 BLCA 患者分为低风险组和高风险组。

1.4 预后风险模型分析

使用 R 软件中的“survival”包比较高低风险组患者的生存差异,并绘制生存曲线。绘制预后风险模型 ROC 曲线,通过曲线下面积 AUC 评估模型的特异性和灵敏度。利用单因素和多因素 Cox 回归分析风险评分与临床病理特征及 BLCA 患者总生存期之间关系,同时筛选 BLCA 预后独立预测因子,并绘制森林图。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BLCA 自噬相关 LncRNA 的筛选

从 TCGA 数据库中下载 BLCA 原始 RNA 测序数据提取 LncRNA 表达矩阵,从自噬基因数据库下载最新的 232 个人类自噬相关基因。通过 Pearson 相关性分析以相关系数 $|r|>0.5$ 和 $P<0.001$ 提取 BLCA 自噬相关 LncRNA 377 个。

2.2 BLCA 预后相关自噬 LncRNA 筛选

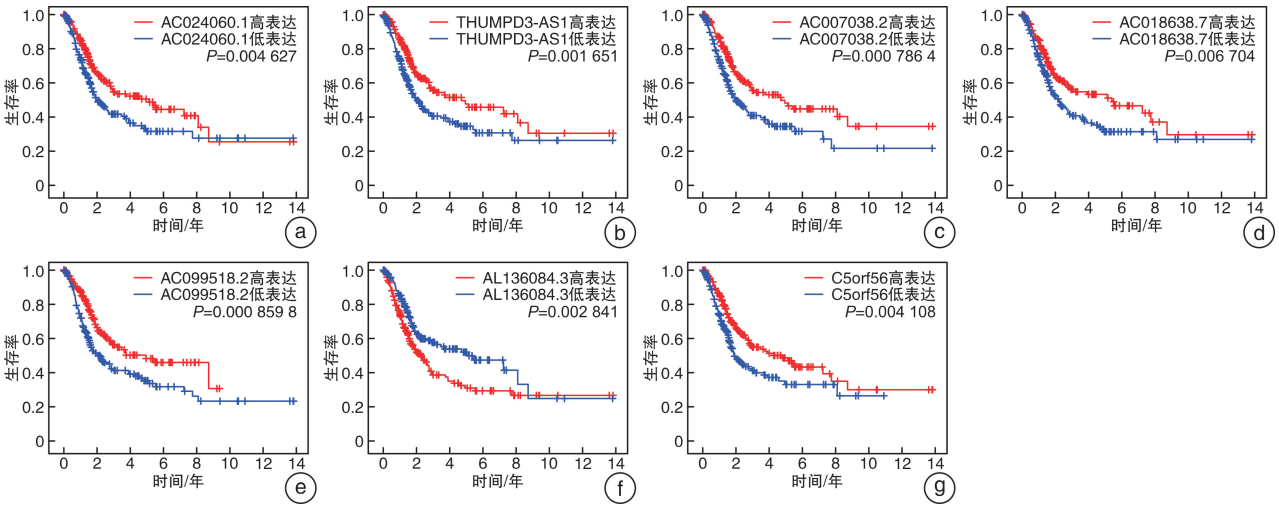
使用 R 软件中“survival”包进行单因素 Cox 回归分析评估 377 个自噬相关 LncRNA 在 BLCA 中的预后价值,共有 30 个 LncRNA 与 BLCA 预后显著相关($P<0.05$)。进一步纳入多因素 Cox 回归分析和 Kaplan-Meier 法筛选具有独立预后的自噬相关 LncRNA,根据最优 AIC 值确定 7 个 LncRNA 建立 BLCA 预后风险模型(表 1),并绘制 7 个 LncRNA 的生存曲线(图 1),同时绘制 7 个自噬相关 LncRNA 和自噬相关基因对 BLCA 总生存期关系的桑基图(图 2)。

表 1　BLCA 预后风险模型中 7 个自噬相关 LncRNA

LncRNA	*coef*	*HR*	95%*CI*	*P*
AC024060.1	−0.06	0.89	0.85～0.94	<0.001
THUMPD3-AS1	−0.11	0.90	0.77～0.94	0.001
AC007038.2	0.24	1.27	1.01～0.52	0.007
AC018638.7	−0.27	0.76	0.44～0.79	<0.001
AC099518.2	−0.28	0.75	0.55～0.86	<0.001
AL136084.3	0.24	1.27	1.11～1.50	<0.001
C5orf56	−0.71	0.49	0.46～0.86	0.003

2.3　BLCA 自噬相关 LncRNA 预后风险模型的建立和验证

基于以上 7 个自噬相关 LncRNA 建立预后风险模型，根据风险评分公式计算每位患者的风险评分，并按中位风险值将患者分为低风险和高风险组，使用 R 软件中的“survival”包比较两组的患者的生存差异，并绘制生存状态图、风险评分曲线和 7 个自噬相关 LncRNA 基因热图（图 3）。结果显示，高风险组患者死亡率显著高于低风险组患者，风险评分越高患者死亡率越高，高风险组患者总体生存期时间更短（图 4）。绘制风险模型 ROC 曲线下面积为 0.704，显示该模型具有良好的特异性和灵敏度（图 5）。此外通过单因素和多因素 Cox 回归分析筛选 BLCA 预后独立预测因子，结果显示综合临床病理特征仅风险评分为 BLCA 独立预测因子（$HR = 2.161$，95% CI：1.531 ～ 3.050，$P < 0.001$）。见图 6。



a：AC024060.1；b：THUMPD3-AS1；c：AC007038.2；d：AC018638.7；e：AC099518.2；f：AL136084.3；g：C5orf56。

图 1　BLCA 预后风险模型中 7 个自噬相关 LncRNA 的生存曲线

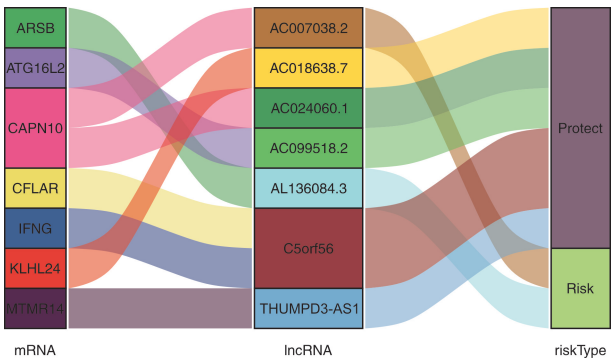


图 2　7 个自噬相关 LncRNA 与自噬基因关系及对 BLCA 预后的影响

2.4　预后风险模型与 BLCA 患者临床病理特征的关系

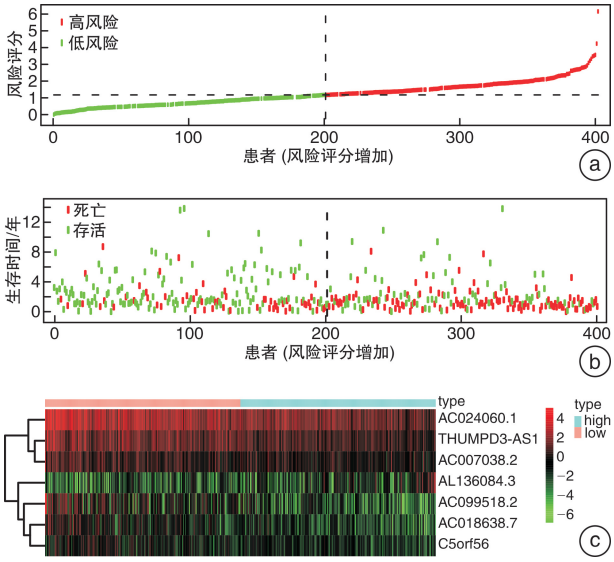
分析 BLCA 自噬相关 LncRNA 预后风险模型评分在年龄、性别、肿瘤分级、病理分期、淋巴转移和远处转移等方面的价值，结果显示，肿瘤分级、病理分期和淋巴转移与 BLCA 患者风险评分显著相关（$P<0.05$），而与年龄和性别差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2，提示预后风险模型与 BLCA 进展相关。

3　讨论

BLCA 是泌尿系统最常见的恶性肿瘤，其发病率在世界范围呈逐年递增[1-2]。大约 30% 的膀胱癌患者会发展为 MIBC，而 MIBC 具有转移和复发率高的特征，且 5 年总生存率<50%[3]。因此，对 BLCA 进行危险分层和预测 BLCA 预后对其治疗具有十分重要的作用。在本研究中，我们探索 BLCA 自噬相关 LncRNA 的预后风险模型，结果显示该模型具有出色的预测性能。

LncRNA 是一类新的非编码 RNA 分子，可调节肿瘤发生发展[7]。因此，它们是预测肿瘤风险和生存预后的潜在生物标志物。自噬是一种高度保守的细胞内分解代谢过程，通过溶酶体途径吞噬和降解异常细胞器、蛋白质和病原体[11]。自噬在肿

瘤中既可以发挥抑癌作用也可以发挥致癌作用，在肿瘤发展的早期阶段，自噬相关的细胞死亡可以抑制肿瘤的进展，自噬失调也可引起基因组不稳定和坏死性炎症，从而促进肿瘤生长[4]。相反，自噬在肿瘤微环境中营养缺乏的条件下可以维持肿瘤的代谢、生长和存活，并在肿瘤转移过程中促进耐药性的发生[12]。LncRNA 可能以多种方式调控自噬，既往研究表明自噬相关的 LncRNA 与肿瘤的预后相关，其中 Huang 等[13]研究发现 LncRNA PVT1 通过抑制细胞保护性自噬并促进胰腺导管腺癌的发展，而高 PVT1 表达预示患者预后不良。陈圣等[11]在肝细胞癌中建立基于 12 个自噬相关 LncRNA 的预后模型，并且证实该模型可以准确地预测患者的预后。然而，在膀胱癌中目前尚无自噬相关 LncRNA 预后模型的研究。



a：BLCA 患者风险评分，b：高低风险组患者生存状态，c：7 个自噬相关 LncRNA 基因热图。

图 3　BLCA 预后风险模型

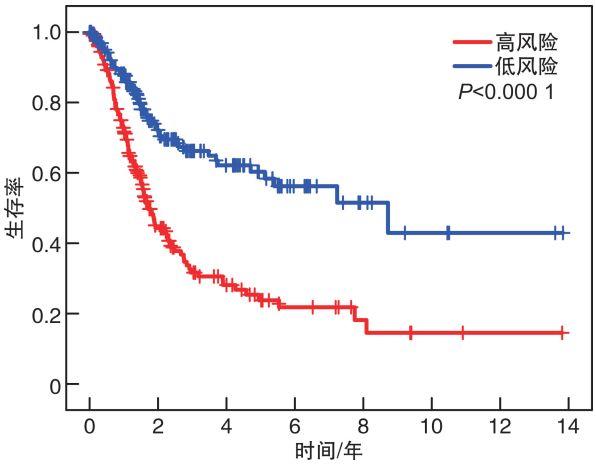


图 4　高低风险组 BLCA 患者生存曲线

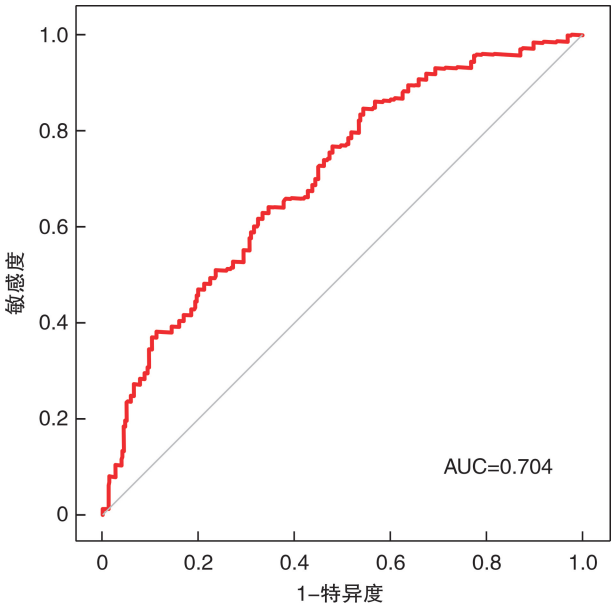
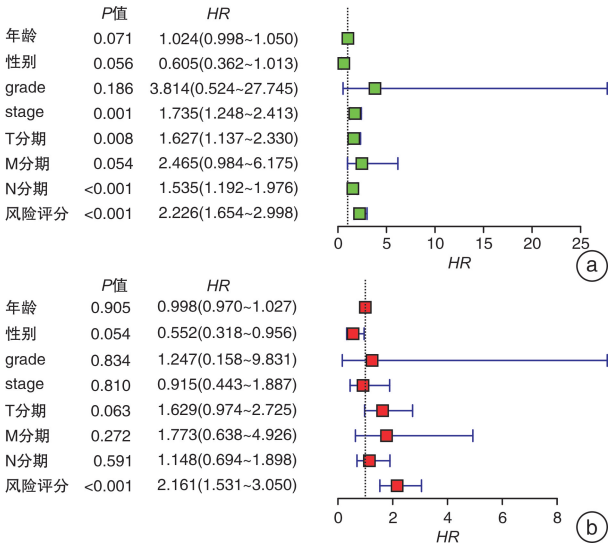


图 5　预后风险模型的 ROC 曲线



a：单因素 Cox 分析；b：多因素 Cox 分析。

图 6　BLCA 患者临床病理参数和风险评分 Cox 回归分析森林图

在本研究中，我们建立了基于 7 个自噬相关 LncRNA 的预后风险模型，并且研究发现该模型可以预测 BLCA 患者的预后，绘制模型的 ROC 曲线下面积为 0.704，显示该模型具有良好的特异性和灵敏度。此外根据模型对 BLCA 患者进行风险评分，发现低风险组患者的总生存期较高风险组患者更长。同时综合临床病理特征进行多因素 Cox 回归分析，发现风险评分为 BLCA 独立预测因子。7 个自噬相关 LncRNA 中，AC024060.1、THUMPD3-AS1、AC018638.7、AC099518.2、和 C5orf56 与 BLCA 患者的总生存期呈负相关，而 AC007038.2 和 AL136084.3 与 BLCA 患者总生存期呈正相关。LncRNA 作为肿瘤的潜在预后标志物已受到研究者的广泛关注。在 7 个自噬相关 LncRNA 中，其

中 Wang 等[14]研究发现 AC024060.1 高表达预示着膀胱癌患者的生存期越短。此外研究发现 THUMPD3-AS1 通过调节 miR-543 和 ONECUT2 的表达来调节非小细胞肺癌细胞增殖，并且可以作为非小细胞肺癌的生物标志物[15]。而另外 5 个 LncRNA 为首次研究报道，目前尚无相关研究。同时我们实验室已计划进行细胞功能实验，以进一步研究这些 LncRNA 的功能。

表 2　预后风险模型与 BLCA 患者临床病理特征的关系

$\bar{x}\pm s$

因素	例数	数值	t	P
年龄			−0.55	0.615
≤65 岁	68	1.29±0.65		
>65 岁	99	1.38±0.76		
性别			0.30	0.763
女	36	1.24±0.75		
男	131	1.20±0.74		
肿瘤分级			5.70	<0.001
低级别	17	0.63±0.39		
高级别	150	1.27±0.75		
病理分期			−3.22	0.002
Ⅰ～Ⅱ	52	0.97±0.57		
Ⅲ～Ⅳ	115	1.31±0.79		
T 分期			−1.91	0.059
$T_{1\sim2}$	57	1.06±0.69		
$T_{3\sim4}$	110	1.28±0.76		
淋巴转移			−3.32	0.001
无	160	1.07±0.67		
有	7	1.51±0.81		
远处转移			−0.58	0.582
无	116	1.20±0.74		
有	51	1.39±0.87		

综上所述，本研究表明，基于自噬相关 LncRNA 建立的预后风险模型能够准确预测 BCLA 患者的生存预后，为 BLCA 的独立预后因子，根据模型可以将 BLCA 患者分为高风险和低风险人群，有利于指导 BLCA 的个体化治疗。本研究还表明，这 7 个自噬相关 LncRNA 是 BLCA 潜在的预后和诊断生物标志物，也是 BCLA 潜在的治疗靶标。同时本研究也有一定的局限性，首先，这是一项回顾性研究，使用了来自 TCGA 数据库的数据，该数据缺乏有关吸烟史和治疗的信息。其次研究基于可公开获取的 TCGA 数据库中 409 例患者，临床数据有效从而限制了模型的预测性能。

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 陈晓榕，左毅刚. 40 岁以下青年人膀胱癌的临床特征及预后[J]. 临床泌尿外科杂志，2019，34(12)：999-1002.

[3] Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines[J]. Eur Urol, 2020. 29(20): 30302-30230.

[4] Li YJ, Lei YH, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1): 52-55.

[5] 王海玲，李东霞. LncRNA 与恶性肿瘤侵袭转移研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2018，26(13)：2114-2117.

[6] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. Nature, 2014, 505(7483): 344-352.

[7] Li L, Chen H, Gao Y, et al. Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Aggressive Pancreatic Cancer Proliferation and Metastasis via the Stimulation of Autophagy[J]. Mol Cancer Ther, 2016, 15(9): 2232-2243.

[8] Quan J, Pan X, Zhao L, et al. LncRNA as a diagnostic and prognostic biomarker in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11(4): 6415-6424.

[9] Wu J, Li W, Ning J, et al. Long noncoding RNA UCA1 targets miR-582-5p and contributes to the progression and drug resistance of bladder cancer cells through ATG7-mediated autophagy inhibition[J]. Onco Targets Ther, 2019, 9(12)495-508.

[10] Eissa S, Safwat M, Matboli M, et al. Measurement of Urinary Level of a Specific Competing endogenous RNA network(FOS and RCAN mRNA/ miR-324-5p, miR-4738-3p,/lncRNA miR-497-HG) Enables Diagnosis of Bladder Cancer[J]. Urol Oncol, 2019, 37(4): 219-292.

[11] 陈圣，赵继森，李靖华，等. 肝细胞癌自噬相关长链非编码 RNA 预后模型的建立与分析[J]. 中国普通外科杂志，2020，29(7)：839-848.

[12] 陈亦龙，李维，苏雪萍，等. 抑制自噬通过促进 Caspase 依赖性细胞凋亡逆转鼻咽癌紫杉醇耐药性的研究[J]. 中国肿瘤，2018，27(8)：626-633.

[13] Huang F, Chen W, Peng J, et al. LncRNA PVT1 triggers Cyto-protective autophagy and promotes pancreatic ductal adenocarcinoma development via the miR-20a-5p/ULK1 Axis[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 98-105.

[14] Wang J, Shen C, Dong D, et al. Identification and verification of an immune-related lncRNA signature for predicting the prsis ognoof patients with bladder cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 11(11): 107146-107155.

[15] Hu J, Chen Y, Li X, et al. THUMPD3-AS1 Is Correlated With Non-Small Cell Lung Cancer And Regulates Self-Renewal Through miR-543 And ONECUT2[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 9849-9860.

（收稿日期：2020-12-30）