

# 免疫相关 LncRNA 与肾透明细胞癌预后关系分析及预测评分模型建立\*

向茂林<sup>1</sup> 徐勇<sup>1</sup> 瞿根义<sup>1</sup> 阳光<sup>1</sup> 黄文琳<sup>1</sup> 汤乘<sup>1</sup> 王佳威<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)中免疫相关 LncRNA 表达与肿瘤预后的关系,并构建预后相关的预测评分模型。方法:从 TCGA 数据中下载 537 例 ccRCC 转录组测序数据及相应的临床预后信息,采用 R 软件和 Perl 软件利用生物信息学方法提取 ccRCC 免疫相关 LncRNA,使用单因素和多因素 Cox 回归分析预后相关 LncRNA,并构建预测模型,采用 Kaplan-Meier 分析预测模型与肿瘤预后相关性并绘制生存曲线,同时使用 ROC 曲线评估预测模型的准确性。结果:通过单因素和多因素 Cox 回归分析确定 7 个免疫预后相关 LncRNA,并构建预测评分模型,根据患者预后评分将患者分为高风险组和低风险组,生存曲线显示两组患者预后差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),预测评分模型 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.8,多因素 Cox 回归分析风险评分为 ccRCC 预后的独立危险因素。结论:ccRCC 中 7 个免疫相关的 LncRNA 与预后显著相关,基于其构建的预测评分模型可以有效预测 ccRCC 的预后,可作为其独立预后生物标志物。

**[关键词]** 肾透明细胞癌;LncRNA;免疫;预后;预测模型

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2022.01.011

[中图分类号] R737.11 [文献标志码] A

## Analysis of relationship between immune-related LncRNA and prognosis of clear cell renal cell carcinoma and establishment of predictive scoring model

XIANG Maolin XU Yong QU Genyi YANG Guang HUANG Wenlin  
TANG Cheng WANG Jiarwei

(Department of Urology, Affiliated Zhuzhou Hospital, XiangYa Medical College CSU, Zhuzhou, Hunan, 412007, China)

Corresponding author: QU Genyi, E-mail: qugenyi@126.com

**Abstract Objective:** To investigate the relationship between immune-related LncRNA expression and tumor prognosis in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), and construct a prognostic-related predictive scoring model. **Methods:** The transcriptome sequencing data of 537 cases of ccRCC and the corresponding clinical prognosis information were downloaded from the TCGA data, and R software and Perl software were used to extract the immune-related LncRNAs of renal clear cell carcinoma using bioinformatics methods. Single factor and multiple factors Cox regression analysis were used to analyse prognostic-related LncRNA, and construct a prediction model. Kaplan-Meier was used to analyze the correlation between the prediction model and tumor prognosis and the survival curve was drawn, and the ROC curve was used to evaluate the accuracy of the prediction model. **Results:** Seven immune prognosis-related LncRNAs were determined through univariate and multivariate Cox regression analysis, and a predictive scoring model was constructed. Patients were divided into high-risk groups and low-risk groups based on patient prognosis scores. The survival curve showed that the prognosis of the two groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ), the area under the ROC curve of the predictive scoring model AUC was 0.8, and the multivariate Cox regression analysis risk score was an independent risk factor for the prognosis of ccRCC. **Conclusion:** Seven immune-related LncRNAs in ccRCC are significantly related to the prognosis. The prediction scoring model constructed based on them can effectively predict the prognosis of ccRCC and can be used as its independent prognostic biomarkers.

**Key words** renal clear cell carcinoma; LncRNA; immunity; prognosis; prediction model

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)简称肾癌,是泌尿系统常见的恶性肿瘤,其发病率呈逐年上升趋势,每年增长 2%~4%,在中国人群中肾癌

的发病率为 3.35/10 万<sup>[1-2]</sup>。肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是肾癌最常见的类型<sup>[1]</sup>,对于 ccRCC 目前最主要的治疗方式是手术切除,早期患者手术可以取得良好的效果,但对于复发和转移的晚期 ccRCC 患者来说,手术难度大、复发率高,传统的放化疗不敏感,通常预后极差<sup>[3-4]</sup>。随着人们对于分子生物学方向的不断摸

\*基金项目:株洲市科技计划项目(No:2019-001)

<sup>1</sup>中南大学湘雅医学院附属株洲医院泌尿外科(湖南株洲, 412007)

通信作者:瞿根义, E-mail: qugenyi@126.com

索,免疫检查点阻断疗法被认为是很有潜力的治疗策略,能够提高晚期 ccRCC 患者的预后<sup>[5]</sup>。免疫治疗强调肿瘤微环境的作用,近年来已经成为改善 ccRCC 患者生存结局的重要方法<sup>[6]</sup>。某些免疫检查点分子(如程序性死亡因子-1,PD-1)是免疫治疗的热门靶点,研究显示免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors,ICIs)主要是抑制免疫细胞功能,使机体无法产生有效的抗肿瘤免疫应答,形成免疫逃逸<sup>[7]</sup>。有研究显示,免疫相关基因不但对免疫治疗的反应有关,而且与 ccRCC 患者的预后有关<sup>[8]</sup>。Chen 等<sup>[9]</sup>发现 HHLA2 在 ccRCC 组织中显著表达,参与了 ccRCC 的进程,且与不良预后有关。Iacovelli 等<sup>[10]</sup>发现 KIRC 组织中高表达的 PD-L1 患者较无 PD-L1 表达的患者预后差。因此,结合免疫相关因素对 ccRCC 患者进行风险分层有助于判断患者预后及治疗效果。探索 ccRCC 发生发展机制是近年的研究热点。

长链非编码 RNA(long noncoding RNA,LncRNA)是指长度大于 200 bp 并且不具备蛋白编码功能的 RNA,它在免疫细胞浸润、抗原识别、抗原暴露、肿瘤清除等免疫应答过程中发挥着重要的调控作用<sup>[11]</sup>。并且既往研究表明多种 LncRNA 如 SNHG1、LUCAT1、NONHSAT113026 等能促进 ccRCC 侵袭及迁移,是其潜在的治疗靶点<sup>[12-14]</sup>。然而,目前免疫相关 LncRNA 与 ccRCC 预后的相关性尚不明确,本研究通过下载 TCGA 数据中 ccRCC 转录组测序数据及相应的临床预后信息,探讨 ccRCC 中免疫相关 LncRNA 表达与肿瘤预后的关系,并构建预后相关的预测评分模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从 TCGA 数据库 (<https://cancergenome.nih.gov/>)GDC Data Portal 使用 GDC-client 下载公开的 537 例 ccRCC 转录组数据及相应的临床数据。排除生存期 <30 d 以及预后信息和临床分期不明确的患者。数据下载截止到 2020 年 10 月 10 日 TCGA 收录的 ccRCC 转录组数据。

### 1.2 提取免疫相关 LncRNA

从 GSEA 数据库 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>)下载免疫相关基因集(Immune system process M13664,Immune response M19817),分析获取免疫相关基因,进一步通过共表达方法提取并鉴定免疫相关 LncRNA<sup>[15]</sup>。

### 1.3 获取预后相关 LncRNA 构建预测评分模型

使用 R 软件中的 survival 包通过单因素和多因素 Cox 回归分析确定免疫预后相关的 LncRNA,根据赤池信息量准则(Akaike Information Criterion,AIC)确定最佳的预测评分模型。每例患者的风险评分基于免疫预后相关 LncRNA 基因表

达量乘以多因素 Cox 回归系数之和,根据风险评分中位数值将 ccRCC 患者分为低危组和高危组。

## 1.4 统计学方法

采用 log-rank 法对两个亚组预后差异进行检验,并通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,同时绘制生存预测的 ROC 曲线,并计算曲线下面积 AUC 值。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 病例特征

本研究共纳入 537 例 ccRCC 患者,其中男 346 例,女 191 例;年龄 26~90 岁,平均 60.59 岁,年龄 <60 岁 247 例,≥60 岁 290 例;病理分级:G<sub>1</sub>14 例,G<sub>2</sub>230 例,G<sub>3</sub>207 例,G<sub>4</sub>78 例,不确定 8 例;肿瘤分期:I 期 269 例,II 期 57 例,III 期 125 例,IV 期 83 例,不确定 3 例;T 分期:T<sub>1</sub> 期 275 例,T<sub>2</sub> 期 69 例,T<sub>3</sub> 期 182 例,T<sub>4</sub> 期 11 例;M 分期:M<sub>0</sub> 期 426 例,M<sub>1</sub> 期 79 例,M<sub>x</sub> 期 30 例,不确定 2 例;N 分期:N<sub>0</sub> 期 240 例,N<sub>1</sub> 期 17 例,N<sub>x</sub> 期 280 例。

### 2.2 免疫相关 LncRNA 与 ccRCC 患者预后关系

从 GSEA 数据库下载免疫相关基因集 M13664 和 M19817,提取免疫相关基因 331 个,进一步通过共表达方法提取并鉴定免疫相关 LncRNA 332 个(相关系数  $Cor > 0.7$ , $P < 0.001$ ),使用 R 软件中的 survival 包通过单因素 Cox 回归分析确定 11 个免疫预后相关的 LncRNA 和 ccRCC 预后相关(表 1)。

表 1 单因素 Cox 回归分析筛选 ccRCC 免疫预后相关 LncRNA

LncRNA	HR	95%CI	P 值
LINC01963	0.57	0.41~0.80	<0.01
AC092119.2	2.19	1.64~2.91	<0.01
LINC00886	0.51	0.34~0.76	<0.01
AL139351.1	1.88	1.52~2.32	<0.01
LINC01788	0.50	0.34~0.73	<0.01
LENG8-AS1	1.47	1.21~1.79	<0.01
AC024060.1	2.13	1.71~2.65	<0.01
AL139089.1	2.00	1.50~2.68	<0.01
ZNF503-AS1	0.29	0.18~0.48	<0.01
AC008906.1	1.86	1.35~2.57	<0.01
FOXD2-AS1	2.68	1.92~3.76	<0.01

### 2.3 预测评分模型的构建和评价

对单因素 Cox 回归分析确定的 11 个预后相关 LncRNA 进行多因素 Cox 回归分析,根据最佳 AIC 值最终确定 7 个 LncRNA 纳入预测评分模型(表 2),并绘制 7 个 LncRNA 的生存曲线(图 1),基于每个 LncRNA 基因表达量乘以多因素 Cox 回归系数之和计算每个患者的风险评分,根据风险评分

中位数值将 ccRCC 患者分为低危组和高危组(图 2)。log-rank 检验对两组患者进行生存预后分析,并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,两组生存预后比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。ROC 曲线下面积 AUC 值评估预测评分模型的效能(图 4),结果显示 AUC 为 0.80,提示该模型对 ccRCC 患者生存状态具有良好的预测能力。

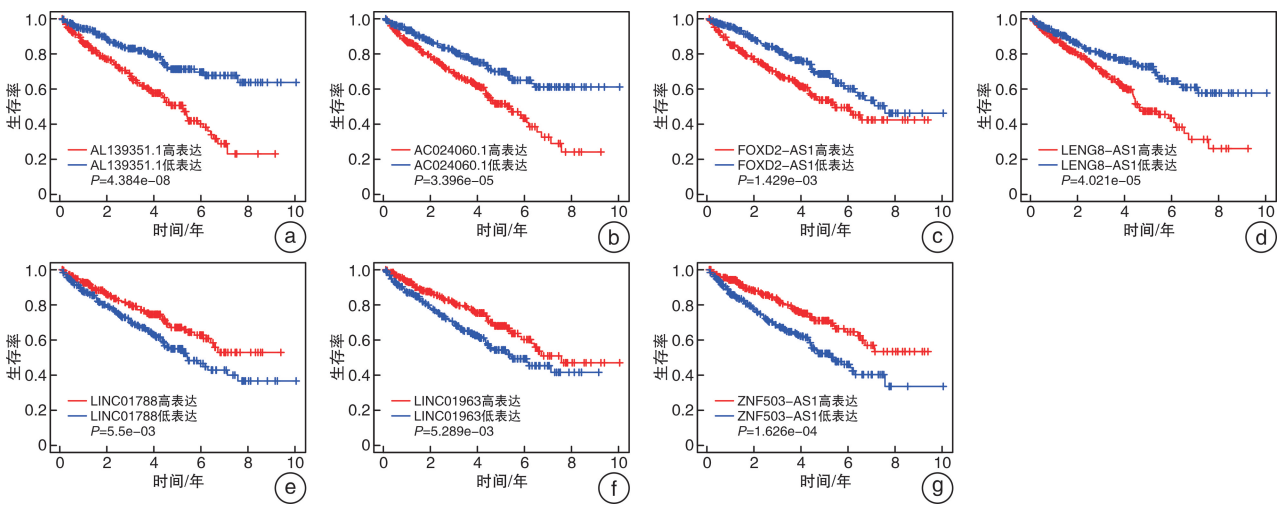
### 2.4 预测评分模型的临床应用

进一步验证该评分预测模型在 ccRCC 中应用,结合患者的临床病理信息和患者的风险评分进行多因素 Cox 回归分析,并绘制列线图,结果显示患者年龄和患者的风险评分为 ccRCC 预后的独立

危险因素( $P < 0.05$ )。见图 5。

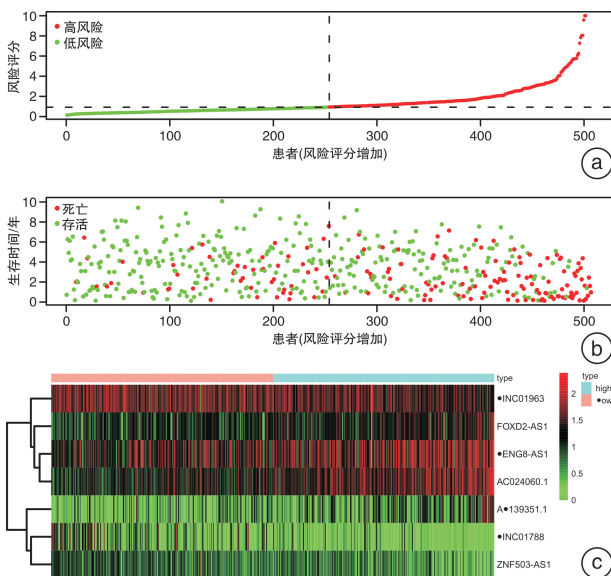
表 2 多因素 Cox 回归分析筛选 ccRCC 构建预测评分模型的免疫相关 LncRNA

LncRNA	$\beta$	HR	95%CI	P 值
LINC01963	-0.37	0.69	0.48~0.98	0.04
AL139351.1	0.29	1.34	1.05~1.71	0.02
LINC01788	-0.41	0.67	0.46~0.96	0.03
LENG8-AS1	-0.40	0.68	0.46~0.99	0.04
AC024060.1	0.52	1.68	1.13~2.50	0.01
ZNF503-AS1	-0.95	0.39	0.23~0.66	<0.05
FOXD2-AS1	0.63	1.88	1.21~2.91	<0.05



a:AL139351.1;b:AC024060.1;c:FOXD2-AS1;d:LENG8-AS1;e:LINC01788;f:LINC01963;g:ZNF503-AS1。

图 1 ccRCC 预后风险模型中 7 个免疫相关 LncRNA 生存曲线



a:纳入患者低分险组和高风险组的风险评分;b:随访终点低分险组和高风险组患者生存状态;c:纳入评分模型中的 7 个免疫相关 LncRNA 基因表达与风险等级。

图 2 ccRCC 预测评分模型

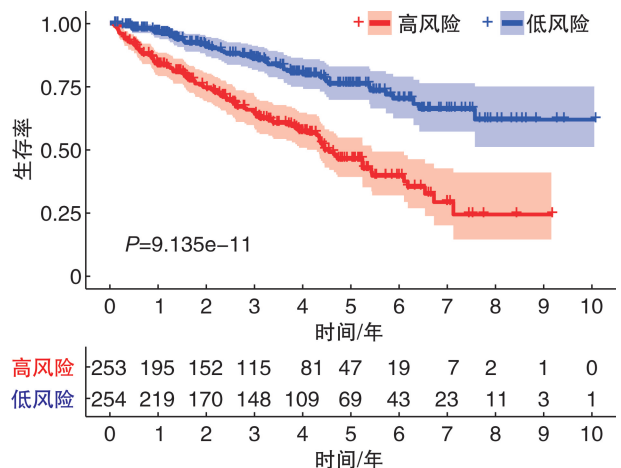


图 3 ccRCC 预测评分模型 Kaplan-Meier 生存曲线

### 3 讨论

RCC 是成人中最普遍的泌尿系统肿瘤之一,占成人恶性肿瘤的 2%~3%<sup>[3]</sup>,ccRCC 是 RCC 最主要的病理类型。目前肾癌最主要的治疗手段是手术治疗,然而由于 RCC 发病隐匿,早期缺乏特异的临床症状,导致 20%~30% 的患者就诊时已发

生转移,且 40% 的局限性 RCC 患者经过手术治疗也会发生转移<sup>[16]</sup>。而目前晚期转移性 RCC 对于化疗和放疗疗效均较差,主要的治疗方案为靶向治疗,随着对 RCC 研究的深入,研究发现免疫治疗可以显著改善患者的预后<sup>[17]</sup>。并且免疫系统具有识别和消灭肿瘤细胞的功能,免疫应答和肿瘤的发生发展密切相关<sup>[18]</sup>。目前研究发现 LncRNA 在调节免疫细胞分化发育、自噬、炎症和细胞因子等免疫应答中发挥着重要的调控作用,并且研究发现免疫相关 LncRNA 与多种肿瘤生存预后显著相关,是肿瘤的潜在治疗靶点<sup>[19-21]</sup>。最近,研究也发现 LncRNA 在 ccRCC 的发生、发展和转移中起着重要的调控作用<sup>[22]</sup>。

本研究中我们系统地分析了 TCGA 数据中 537 例 ccRCC 基因组数据,通过生存分析筛选出 11 个免疫相关 LncRNA 与 ccRCC 患者预后相关,并根据最佳 AIC 值确定 7 个 LncRNA 构建一个有效的预测评分模型作为预测预后的指标。根据预测评分模型将患者分为低危组和高危组,两组患者的生存率差异有统计学意义,同时结合临床病理信息进行多因素 Cox 分析显示预测评分模型是患者的独立预后因子。危险评分越高,患者预后越差,其预测评分模型 ROC 曲线下面积 AUC 为 0.800,证实其可以有效预测 ccRCC 患者的预后。其中 7 个 LncRNA 中 AL139351.1、AC024060.1 和 FOXD2-AS1 为危险基因,LINC01963、LINC01788、LENG8-AS1 和 ZNF503-AS1 为保护基因。既往研究显示 FOXD2-AS1 在多种恶性肿瘤中呈现异常表达,并且对肿瘤的发生发展和侵袭转移发挥重要调控作用,其表达水平与患者预后密切相关<sup>[23]</sup>。研究表明 FOXD2-AS1 的高表达水平与抗原提呈细胞的

减少有关,表明 FOXD2-AS1 可能通过抑制抗原提呈细胞的功能和增殖来抑制适应性免疫和杀伤性 T 细胞功能<sup>[24]</sup>。同样在胰腺癌中研究发现 LINC01963 呈低表达,为胰腺癌的保护基因,研究显示在胰腺癌中上调 lncRNA LINC01963 表达可以抑制胰腺癌细胞的增殖和侵袭,LINC01963 可以通过靶向 miR-641/TMEFF2 抑制胰腺癌的进展<sup>[25]</sup>。He 等<sup>[26]</sup>在膀胱癌中也研究发现 ZNF503-AS1 呈低表达,为膀胱癌的保护基因,过表达 ZNF503-AS1 可以抑制膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移,并且促进膀胱癌细胞的凋亡。而其他 4 个 LncRNA 目前尚无相关研究报道,它们在 ccRCC 中的作用机制也尚不明确,有待进一步研究。

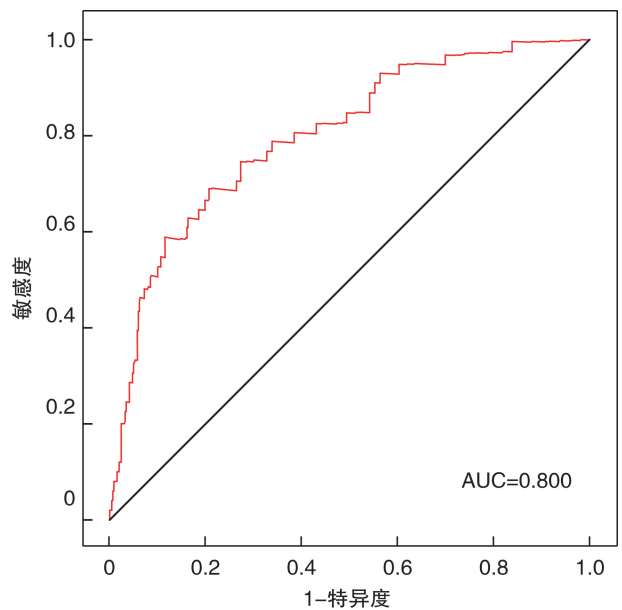
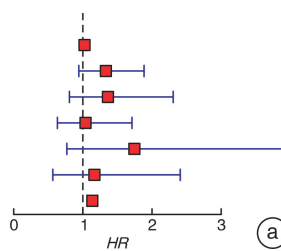
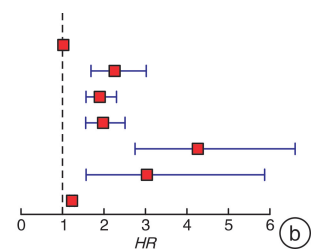


图 4 ccRCC 预测评分模型的 ROC 曲线

	P值	HR
年龄	0.012	1.024(1.005~1.043)
grade	0.105	1.333(0.942~1.885)
stage	0.248	1.363(0.806~2.306)
T分期	0.879	1.039(0.632~1.710)
M分期	0.183	1.745(0.769~3.963)
N分期	0.676	1.167(0.566~2.408)
风险评分	<0.001	1.137(1.072~1.206)



	P值	HR
年龄	0.031	1.020(1.002~1.038)
grade	<0.001	2.257(1.687~3.019)
stage	<0.001	1.899(1.567~2.302)
T分期	<0.001	1.978(1.559~2.508)
M分期	<0.001	4.262(2.749~6.608)
N分期	<0.001	3.035(1.569~5.873)
风险评分	<0.001	1.230(1.168~1.296)



a: 单因素 Cox 分析; b: 多因素 Cox 分析。

图 5 ccRCC 临床病理参数 Cox 回归森林图

综上所述,基于 TCGA 数据库,我们分析了免疫相关 LncRNA 与 ccRCC 患者预后的关系,最终确定了 7 个 LncRNA 用于构建预测评分模型来预测 ccRCC 患者的预后,研究结果显示,预测评分模型为其独立预后影响因素,可作为其独立预后生物标志物。可为临床医师评估 ccRCC 患者选择免疫治疗提供参考指标。并且预测评分模型中的 7 个

LncRNA 可能为我们探索 ccRCC 的免疫治疗提供新的治疗靶点,然而 7 个 LncRNA 在 ccRCC 中的分子作用机制和相关信号通路尚不清楚,仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer[J]. Lancet,



- 2016,387(10021):894-906.
- [2] Pang C, Guan Y, Li H, et al. Urologic cancer in China [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2016, 46(6):497-501.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1):7-34.
- [4] 董良, 王伟英. 晚期肾透明细胞癌药物治疗进展[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2020, 35(9):758-763.
- [5] Miao D, Margolis CA, Gao W, et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Science*, 2018, 359(6377):801-806.
- [6] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Five-Year Survival and Correlates Among Patients With Advanced Melanoma, Renal Cell Carcinoma, or Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Nivolumab [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(10):1411-1420.
- [7] Goleva E, Lyubchenko T, Kraehenbuehl L, et al. Our current understanding of checkpoint inhibitor therapy in cancer immunotherapy [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2021, 126(6):630-638.
- [8] Ueda K, Suekane S, Kurose H, et al. Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma [J]. *Urol Oncol*, 2018, 36(11):499. e9-499. e16.
- [9] Chen L, Zhu D, Feng J, et al. Overexpression of HH-LA2 in human clear cell renal cell carcinoma is significantly associated with poor survival of the patients [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:101.
- [10] Iacovelli R, Nolè F, Verri E, et al. Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *Target Oncol*, 2016, 11(2):143-148.
- [11] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1):47-62.
- [12] 林其玲, 陈畅. lncRNA LUCAT1 通过靶向调控 miR-199a-5p/HIF-1 $\alpha$  促进肾透明细胞癌 786-O 细胞的增殖和迁移 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(3):273-281.
- [13] 仙淑丽, 罗清琼. LncRNA SNHG1 通过吸附 miR-199a-3p 促进肾透明细胞癌细胞迁移和侵袭 [J]. *解剖学研究*, 2019, 41(3):222-225.
- [14] 张萌萌, 田孟真, 宋建忠, 等. lncRNANONHSAT113026 在肾透明细胞癌中的表达及功能 [J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(16):2894-2899.
- [15] Carlevaro-Fita J, Liu L, Zhou Y, et al. LnCompare: gene set feature analysis for human long non-coding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 ( W1 ): W523-W529.
- [16] Hahn AW, Klaassen Z, Agarwal N, et al. First-line Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Network Meta-analysis [J]. *Eur Urol Oncol*, 2019, 2(6):708-715.
- [17] 江卫星, 寿建忠. 转移性肾细胞癌免疫治疗的现状与进展 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2017, 38(7):555-558.
- [18] Wang ZL, Wang Z, Li GZ, et al. Immune Cytolytic Activity Is Associated With Genetic and Clinical Properties of Glioma [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:1756.
- [19] Atianand MK, Caffrey DR, Fitzgerald KA. Immunobiology of Long Noncoding RNAs [J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35:177-198.
- [20] 王尧, 周旻, 柳子川, 等. 免疫相关 LncRNA 与膀胱癌预后关系分析及预测模型建立 [J]. *遵义医科大学学报*, 2020, 43(1):76-80.
- [21] Xing L, Zhang X, Chen A. Prognostic 4-lncRNA-based risk model predicts survival time of patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3):3304-3316.
- [22] Qu L, Wang ZL, Chen Q, et al. Prognostic Value of a Long Non-coding RNA Signature in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2018, 74(6):756-763.
- [23] 胡增涛, 关沧海, 赵俞乔. FOXD2-AS1 在肿瘤中的功能与调控机制的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(11):1207-1211.
- [24] Liu Z, Zhou W, Lin C, et al. Dysregulation of FOXD2-AS1 promotes cell proliferation and migration and predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma: a study based on TCGA data [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2):2379-2396.
- [25] Li K, Han H, Gu W, et al. Long non-coding RNA LINC01963 inhibits progression of pancreatic carcinoma by targeting miR-641/TMEFF2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129:110346.
- [26] He H, Wu S, Ai K, et al. LncRNA ZNF503-AS1 acts as a tumor suppressor in bladder cancer by up-regulating Ca<sup>2+</sup> concentration via transcription factor GATA6 [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020.

(收稿日期:2021-03-23)