

肾透明细胞癌微环境中关键基因鉴定及 预后列线图模型建立*

周玉贺¹ 张龙¹ 黄珍林¹ 贾占奎¹ 杨锦建¹

[摘要] 目的:筛选肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)微环境中的关键基因,并建立预后预测模型。方法:从 TCGA 数据库中下载 ccRCC RNA-seq FPKM 数据及临床数据。基于 ESTIMATE 算法对肿瘤微环境中免疫细胞、基质细胞进行评分,以免疫细胞、基质细胞评分中位值为界把样品各自分组,组间进行差异表达基因(DEGs)分析,并用 wilcoxon 检验进行验证,对得到的 DEGs 取交集获得肿瘤微环境中的关键基因。对获得的关键基因进行功能富集。把样品按照 1:1 的比例分为训练组和验证组。利用 Cox-LASSO 法从训练组中的关键基因中筛选出建模基因。多因素 Cox 回归建立风险评估模型,将风险评估模型与临床指标进行单因素和多因素 Cox 回归筛选患者预后的独立影响因素。联合各项患者预后独立相关的因素绘制列线图。结果:免疫细胞评分组共获得 DEGs 658 个,而利用基质细胞评分共获得 DEGs 411 个,取交集后共得到 95 个关键基因。随机分组后,训练组与验证组性别、年龄、肿瘤分期及分级的构成比较均差异无统计学意义。训练组中 34 个基因与患者预后相关,进而通过 LASSO 回归获得 15 个特征基因。经多因素 Cox 分析得到由 9 个基因(HMGCS2、FREMI、CASP5、SLN、SPIC、SPIB、RORB、CPN1、F7)构成的最优模型。生存分析表明训练组与验证组高低风险组间生存率的差异有统计学意义($P < 0.001$),且各组对于 1、3、5 年生存率的评估有着较高的灵敏度与特异度。经单因素和多因素 Cox 回归分析发现患者年龄、肿瘤分期、分级、风险评分为患者预后的独立影响因素(均 $P < 0.001$)。联合患者临床因素如年龄、肿瘤分期和肿瘤分级及风险评分构建了预后评估的列线图模型。结论:由 9 个基因构成的风险评分模型可对 ccRCC 风险做出准确判断;风险评分、年龄、肿瘤分期、肿瘤分级为 ccRCC 独立预后影响因素,由其构成的列线图模型可精准预测患者生存率。

[关键词] 肾透明细胞癌;肿瘤微环境;列线图

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2023.08.002

[中图分类号] R737.11 **[文献标志码]** A

Identification of key genes in the tumor microenvironment of renal clear cell carcinoma and establishment of a nomogram

ZHOU Yuhe ZHANG Long HUANG Zhenlin JIA Zhankui YANG Jinjian

(Department of Urology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052, China)

Corresponding author: YANG Jinjian, E-mail: yangjinjian2011@126.com

Abstract Objective: To construct a risk prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and create a nomogram for survival prediction. **Methods:** RNA-seq FPKM data and clinical data of ccRCC were downloaded from TCGA database. Based on the ESTIMATE algorithm, immune cells and stromal cells in the tumor microenvironment were scored; The samples were grouped by the median value of immune cells and stromal cells, and the differentially expressed genes(DEGs) were analyzed between groups and validated by wilcoxon test. Functional enrichment was performed on the obtained key genes. The samples were divided into a training group and a validation group in a 1:1 ratio. Modeling genes were screened from the key genes in the training group using the Cox-LASSO method. Multi-factor Cox regression was used to establish risk assessment models, and univariate and multi-factor Cox regressions were performed to screen independent influences on patient prognosis with clinical indicators. The factors independently associated with each patient prognosis were combined to draw a nomogram. **Results:** A total of 658 DEGs were obtained according to the immune cell scoring

*基金项目:河南省科技攻关项目(No:212102310116)

¹郑州大学第一附属医院泌尿外科(郑州,450052)

通信作者:杨锦建, E-mail: yangjinjian2011@126.com

group, while a total of 411 DEGs were obtained using stromal cell scoring, and a total of 95 key genes were obtained after taking the intersection. After randomization, there were no significant differences in the composition of gender, age, tumor stage or grade between the training and validation groups. Of these, 34 genes were associated with patient prognosis, and then 15 signature genes were obtained by LASSO regression. The optimal model consisting of 9 genes (*HMGCS2*, *FREMI*, *CASP5*, *SLN*, *SPIC*, *SPIB*, *RORB*, *CPN1*, *F7*) was obtained by multifactorial Cox analysis. Survival analysis showed significant differences in survival between the high and low risk groups in the training and validation groups ($P < 0.001$), and the groups had high sensitivity and specificity for the assessment of survival at 1, 3 and 5 years. Univariate and multifactorial Cox regression analysis revealed patients' age, tumor stage, grade and risk score as independent influences on patients' prognosis (all $P < 0.001$). Nomogram models were constructed by combining patient clinical factors such as age, tumor grade and tumor stage and risk score. **Conclusion:** The risk score model composed by 9 genes can accurately evaluate the risk of ccRCC; the risk score, age, tumor stage, and tumor grade are independent prognostic factors for ccRCC, and the nomogram composed by them can accurately predict the survival rate of the patients.

Key words clear cell renal cell carcinoma; tumor microenvironment; nomogram

肾细胞癌是泌尿系统中常见的肿瘤之一,其中肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是其主要亚型,约占所有肾细胞癌的70%^[1]。尽管近年来分子靶向药物在晚期肾细胞癌治疗中取得一定进展,但提高患者总体生存率仍面临挑战^[2],因此提高对疾病预测能力就变得尤为重要。现存的临床预后模型,如美国癌症联合会(American Joint Committee on cancer, AJCC)分期系统、梅奥临床分期有着一定的预后预测能力,但由于ccRCC的复杂发病机制及异质性^[3],以上模型往往不足以预测患者预后。

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是肿瘤细胞所处的细胞环境,其组成包括细胞外基质、可溶性分子和肿瘤基质细胞,其中免疫细胞及基质细胞是主要的非肿瘤成分^[4]。免疫细胞与TME趋化作用有关,而基质细胞已被证明与肿瘤血管生成以及细胞外基质重塑有关^[5]。免疫微环境在肿瘤的发生、侵袭、免疫治疗、免疫逃逸中扮演重要角色^[6]。

本研究应用生物信息学方法寻找ccRCC TME中的关键基因,由此建立评估患者风险的模型函数,并联合临床指标构建预测患者生存率的列线图。

1 资料与方法

1.1 数据及软件准备

从TCGA数据库下载ccRCC的RNA-seq FPKM数据,整理得到539例肿瘤样品;同时下载相应的临床数据,去除缺失值后共获得526例患者临床信息,其中包括患者年龄、性别、肿瘤分级和分期等资料。本研究所应用的R包均基于R 4.1.0平台。

1.2 肿瘤微环境中的关键基因鉴定

基于“ESTIMATE”算法对ccRCC肿瘤样品进行免疫细胞、基质细胞评分。根据免疫细胞评分的中位值,把样品分为免疫细胞高水平组和低水平组,利用“limma”包对分组后的样品行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)分析,并

用wilcoxon检验进行验证,我们对DEGs的定义为:差异倍数(fold change, FC) > 2且校正 $P < 0.05$ 。以同样的方法对基质细胞评分,并获得DEGs。最后把两者获得的DEGs用“venn”包取交集得到ccRCC微环境中的关键基因。

1.3 关键基因的富集分析

应用“clusterProfiler”包,对ccRCC微环境中的关键基因分别行基因本体论(gene ontology, GO),京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG),疾病富集(disease ontology, DO)分析,当富集结果为 q 值 < 0.05时富集结果有统计学意义。

1.4 筛选风险评估模型基因

将所有样品按照1:1的比例随机分为训练组和验证组。利用 χ^2 检验分别统计2组患者性别、年龄、肿瘤分级及分期构成是否差异有统计学意义。将训练组患者生存数据和关键基因表达量数据合并,载入“survival”包对关键基因逐一进行单因素Cox回归运算,筛选出预后相关基因($P < 0.05$)。采用“glmnet”包利用套索算法(LASSO)进一步从中选择特征基因,采用10倍交叉验证法,获取误差最小点时的基因。

1.5 风险评估模型建立与验证

利用多因素Cox回归构建风险评估模型,采用“step”算法对模型优化,并获得最优模型各变量系数。基于训练组构建的模型对所有样品进行风险评分,以风险评分中位值为界限,把样品分为高风险组和低风险组。载入“survival”包绘制高低风险组的Kaplan-Meier生存曲线,采用Log-Rank检验。模型的灵敏度与特异度通过SurvivalROC”包绘制的时间受试者工作曲线(time-dependent receiver operating characteristic curve, timeROC)进行验证。为验证模型效果,对验证组数据同样绘制生存曲线及timeROC图形。

1.6 列线图模型建立

将风险评分、年龄、性别、肿瘤的分级和分期分

别进行单因素和多因素 Cox 回归,当指标在单因素和多因素回归中均满足 $P < 0.05$ 时被认为是患者预后独立影响因素。联合各个独立预后影响因素通过“regplot”包绘制出列线图,用于评估患者的 1、3、5 年生存率。

2 结果

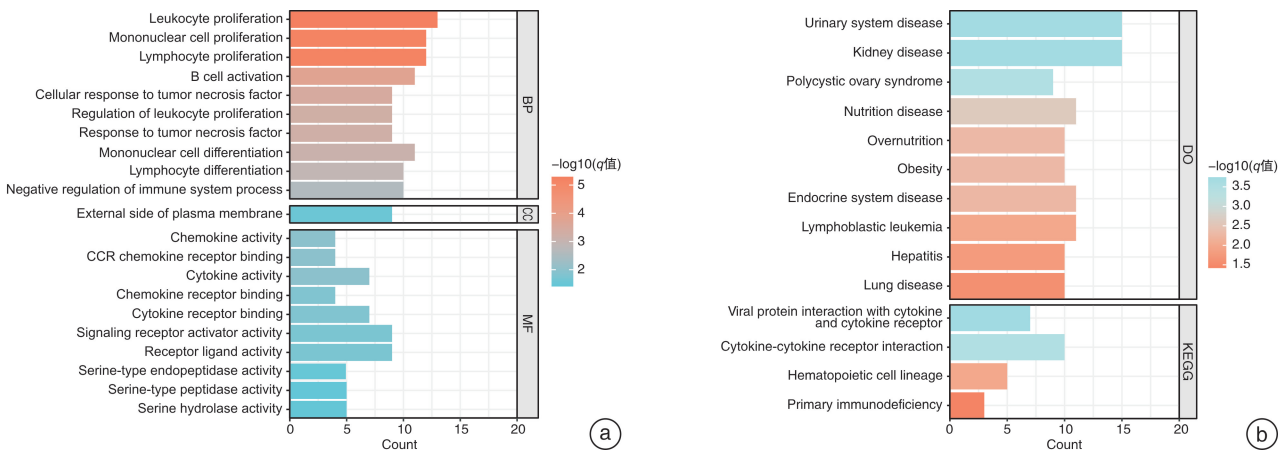
2.1 鉴定关键基因

根据免疫细胞评分组共获得 DEGs 658 个,其中上调基因 512 个,下调基因 146 个,而利用基质细胞评分共获得 DEGs 411 个,其中上调基因 259 个,下调基因 152 个。对他们取交集后共得到 95 个交集基因。

2.2 关键基因的富集分析

GO 富集分析的生物学过程 (biological process, BP) 模块提示关键基因在白细胞、淋巴细

胞、单核细胞增殖, B 细胞激活及单核细胞、淋巴细胞分化等生物学过程中明显富集;在细胞学组分 (cellular components, CC) 模块中关键基因主要富集于浆膜外侧的细胞学组分;而关键基因在分子生物学功能 (molecular function, MF) 中主要富集在受体配体活性、信号受体激活剂的活性、细胞因子活性、细胞因子受体结合等分子生物学功能上,见图 1a。KEGG 富集分析发现大多数关键基因和病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、细胞因子-细胞因子受体的相互作用、造血细胞谱系、原发性免疫缺陷等相关的信号通路相关。DO 分析发现交集基因主要在肾脏疾病、泌尿系统疾病、营养性疾病、内分泌系统疾病、淋巴细胞白血病等疾病中富集显著,见图 1b。



a:GO 富集分析结果;b:KEGG 及 DO 富集结果。

图 1 关键基因的富集分析

2.3 模型基因的筛选

对样品随机分组后,训练组及验证组均获得 263 例数据。统计分析发现 2 组年龄、性别、肿瘤分级及肿瘤分期构成比较均差异无统计学意义,见表 1。训练组数据经单因素 Cox 回归分析发现 34 个与总生存期 (overall survival, OS) 有关的基因,经 LASSO 回归分析筛选得到 15 个特征基因,见图 2。

2.4 风险模型建立

经多因素 Cox 分析得到了由 9 个基因 (*HMGCS2*、*FREM1*、*CASP5*、*SLN*、*SPIC*、*SPIB*、*RORB*、*CPN1*、*F7*) 变量构成的最优模型,并获得了相关系数。由此我们得到的风险模型为: 风险评分 = $(-0.11) \times HMGCS2 + (-0.88) \times FREM1 + (0.66) \times CASP5 + (0.16) \times SLN + (-1.49) \times SPIC + (0.52) \times RORB + (0.46) \times CPN1 + (1.92) \times F7 + (0.44) \times SPIB$ 。其中 *FREM1* ($P = 0.008$)、*RORB* ($P = 0.04$)、*CASP5* ($P = 0.03$)、*SLN* ($P = 0.03$)、*CPN1* ($P = 0.05$)、

SPIC ($P = 0.02$)、*F7* ($P < 0.001$) 基因是患者预后的独立影响因素。同时我们获取了模型 C-指数: 0.71。生存分析发现训练组中高低风险组间生存率差异有统计学意义 ($P < 0.001$), timeROC 可见 1、3、5 年曲线下面积 (AUC) 分别为 0.740、0.733、0.783,表明该风险模型的预测能力较强,见图 3。同样我们在验证组及全部数据中得到相同的结论,即模型函数评估出的高低风险组之间生存率差异有统计学意义,且对患者 1、3、5 年生存率评估的灵敏度及特异度均处于较高水平。

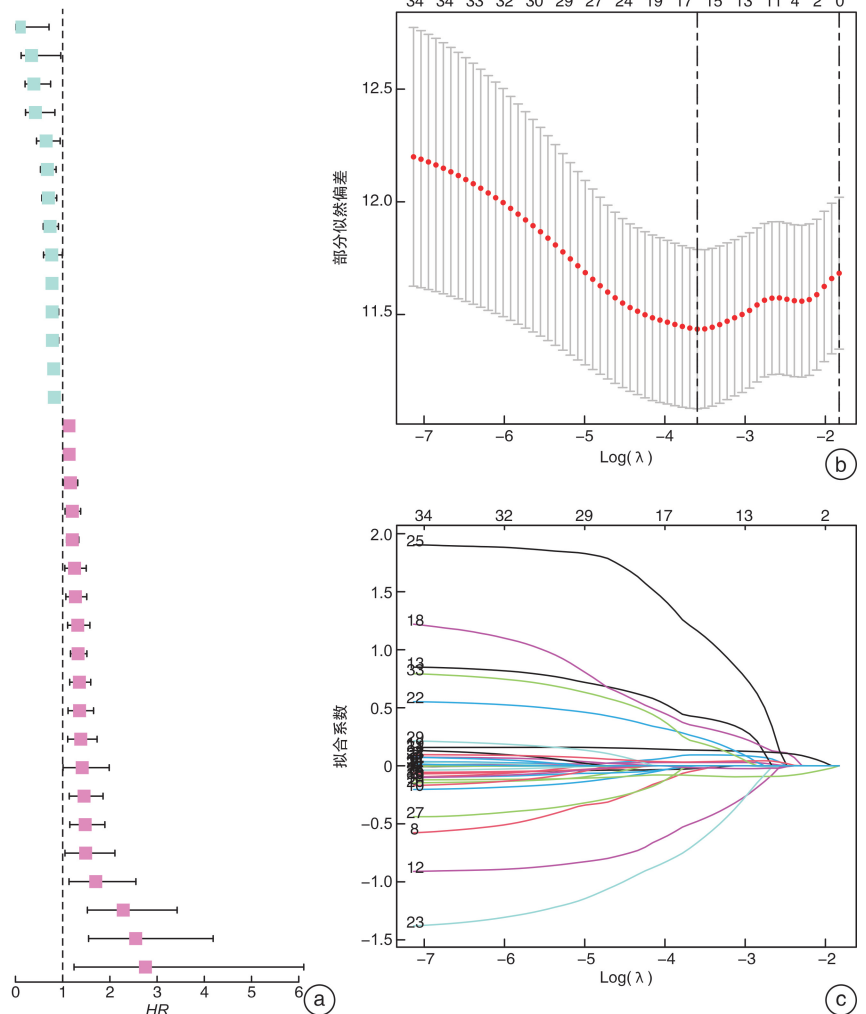
2.5 列线图模型建立

经单因素和多因素 Cox 分析发现患者年龄、肿瘤分期、分级、风险评分为患者预后的独立影响因素 (均 $P < 0.001$),再次表明该模型对患者风险评估的效果良好,见图 4a、b。联合患者临床因素如年龄、肿瘤分期、肿瘤分期及风险评分构建列线图模型,用于对患者预后进行评估。抽取第 200 例患者进行研究,该患者总评分为 157 分,其 1、3、5 年生存率分别为 96.9%、91.3%、85.3%,见图 4c、d。

表 1 训练组及验证组数据分布

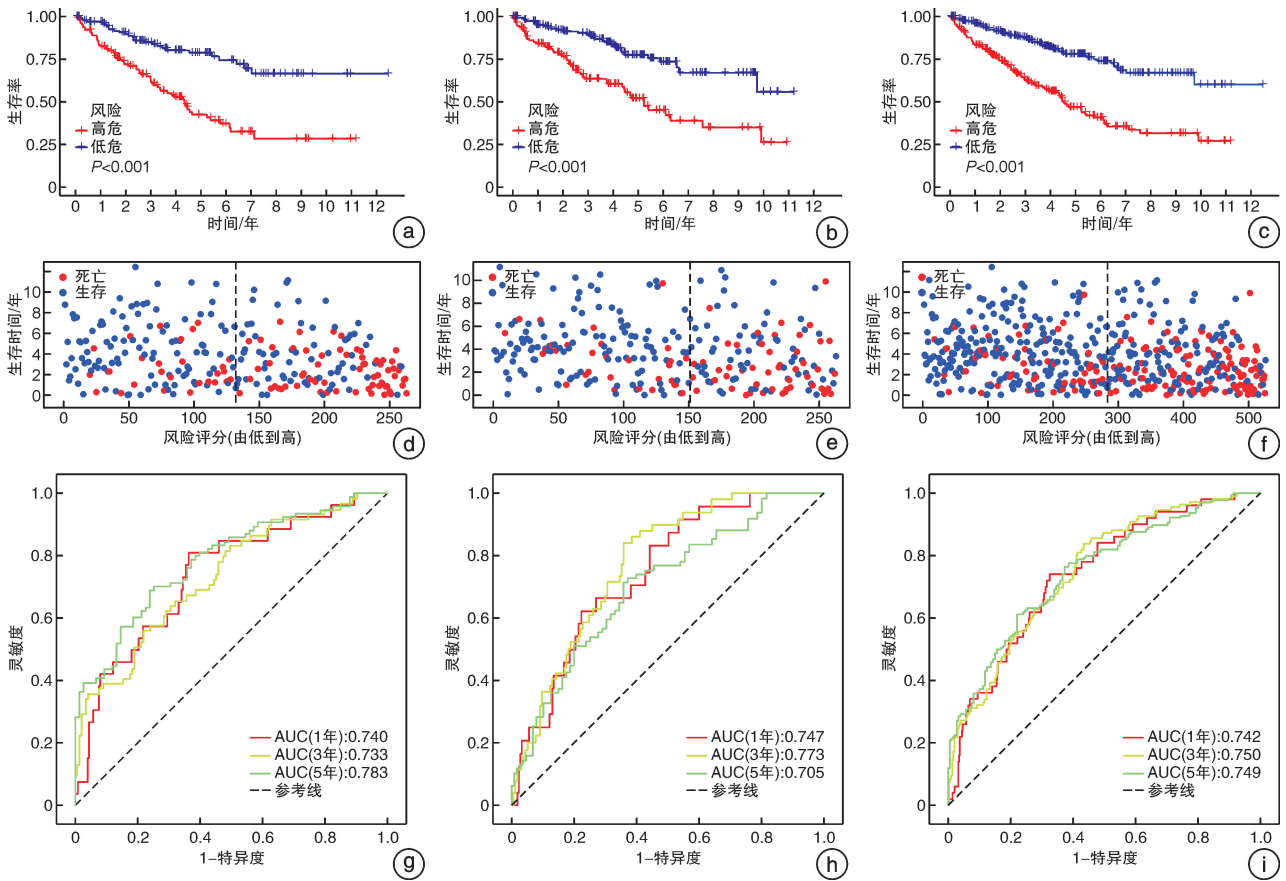
变量	总计(526 例)	训练组(263 例)	验证组(263 例)	P 值
年龄/岁				0.462
≤65	347(65.97)	178(67.68)	169(64.26)	
>65	179(34.03)	85(32.32)	94(35.74)	
性别				1.000
女	183(34.79)	92(34.98)	91(34.60)	
男	343(65.21)	171(65.02)	172(65.40)	
肿瘤分级				0.476
G ₁	13(2.47)	7(2.66)	6(2.28)	
G ₂	226(42.97)	113(42.97)	113(42.97)	
G ₃	205(38.97)	95(36.12)	110(41.83)	
G ₄	74(14.07)	42(15.97)	32(12.17)	
未知	8(1.52)	6(2.28)	2(0.76)	
肿瘤分期				0.336
I	261(49.62)	141(53.61)	120(45.63)	
II	57(10.84)	25(9.51)	32(12.17)	
III	123(23.38)	58(22.05)	65(24.71)	
IV	82(15.59)	38(14.45)	44(16.73)	
未知	3(0.57)	1(0.38)	2(0.76)	

	P值	HR
ADGRV1	0.023	0.082(0.009-0.711)
SPIC	0.042	0.340(0.120-0.960)
FREM1	0.004	0.390(0.204-0.745)
SLC22A8	0.013	0.423(0.214-0.835)
GGT6	0.025	0.650(0.446-0.947)
PPARGC1A	0.002	0.676(0.530-0.861)
GPAT3	0.002	0.698(0.558-0.874)
LDHD	0.005	0.733(0.589-0.911)
STUM	0.044	0.769(0.595-0.993)
SLC22A6	<0.001	0.774(0.686-0.874)
HSD11B2	0.002	0.778(0.661-0.915)
OGDHL	0.002	0.783(0.671-0.915)
SLC22A12	<0.001	0.810(0.722-0.908)
HMGCS2	0.001	0.823(0.732-0.925)
PAEP	0.011	1.133(1.029-1.248)
IPLL5	0.011	1.137(1.030-1.255)
MZB1	0.016	1.165(1.029-1.319)
AQP9	0.008	1.205(1.051-1.381)
FDCSP	<0.001	1.205(1.082-1.341)
VSIG4	0.014	1.252(1.046-1.499)
CPA4	0.007	1.270(1.068-1.510)
HSD11B1	0.002	1.320(1.105-1.577)
SLN	<0.001	1.327(1.165-1.513)
APCDD1L	<0.001	1.354(1.149-1.595)
IL2RA	0.002	1.358(1.114-1.655)
TNFSF13B	0.004	1.383(1.107-1.729)
CD19	0.045	1.414(1.008-1.986)
ZPLD1	0.003	1.453(1.139-1.855)
CCL13	0.002	1.477(1.151-1.894)
CPN1	0.026	1.487(1.049-2.107)
SPIB	0.010	1.701(1.135-2.551)
RORB	<0.001	2.283(1.523-3.424)
CASP5	<0.001	2.547(1.549-4.187)
F7	0.013	2.753(1.241-6.107)



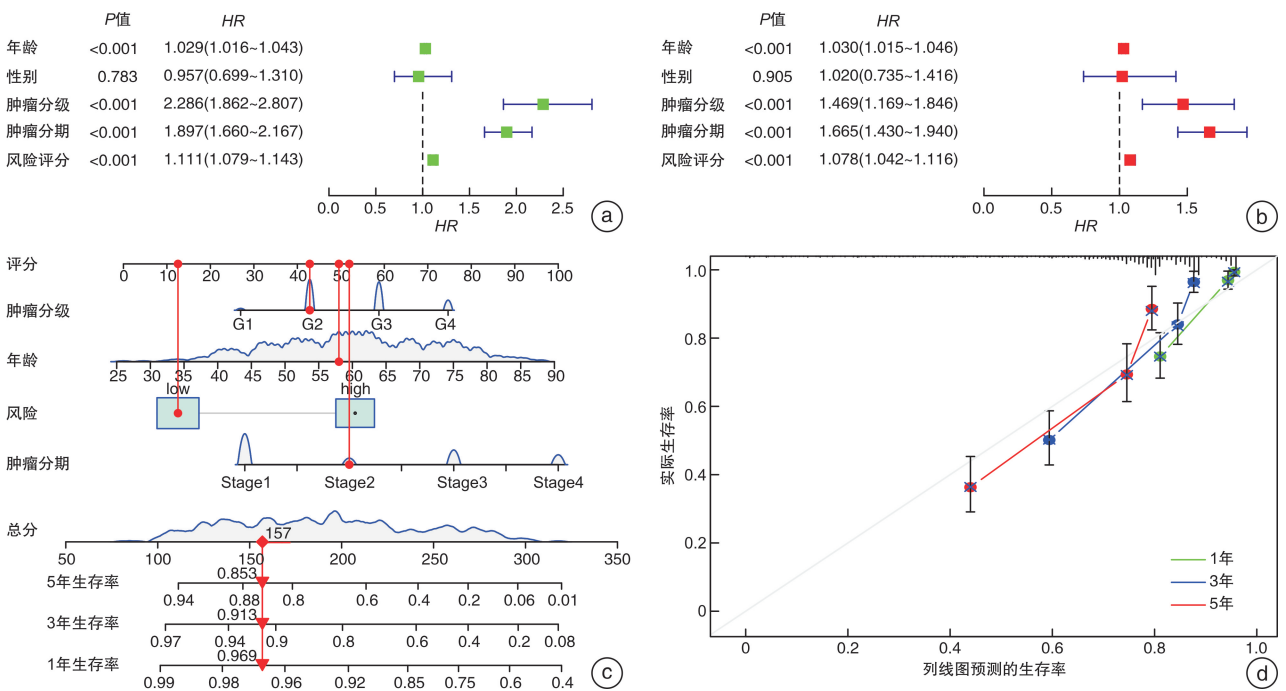
a: 与患者预后相关基因; b, c: 应用 LASSO 回归筛选建模基因过程。

图 2 建模基因的筛选



a~c: 训练组、验证组及全部数据的生存曲线; d~f: 训练组、验证组及全部数据中各个样本风险评分对应的生存时间和生存状态散点图分布, 其中风险评分超过虚线部分为高风险, 反之为低风险; g~i: 训练组、验证组及全部数据的 timeR-OC 曲线, 其中 AUC 值越高, 说明该模型预测能力越强。

图 3 模型预测效能验证



a, b: 分别为单因素和多因素 Cox 回归; c: 评估患者预后的列线图模型; d: 该模型的校准曲线, 横坐标为预测的事件发生率, 纵坐标为观察到的实际事件发生率。

图 4 列线图模型建立

3 讨论

肾癌是全球死亡率最高的前十位肿瘤之一,其发病率占全球所有肿瘤的 2%,且发病率逐年升高^[7]。肾癌发病机制复杂,其中 *VHL* 基因的突变最为常见,*VHL* 通过调节缺氧诱导因子(HIF)1 α 和 2 α 的稳定性来促进血管内皮生长因子(VEGF)对血管生成和肿瘤增殖的作用^[8]。而 PI3K/mTOR 通路相关基因如 *MTOR*、*PTEN* 和 *PIK3C* 也与肾癌发生相关^[9]。因此,一些以 VEGF 或 mTOR 为靶点的小分子靶向药物被开发出来用于 ccRCC 的治疗,如舒尼替尼、阿西替尼、依维莫司和西罗莫司等。本研究共筛选出 95 个 TME 中关键基因,其表达量在肿瘤与正常组织中差异有统计学意义,进行功能及通路富集分析发现,这些基因在免疫细胞激活、分化和细胞因子活性等方面富集明显;疾病富集发现关键基因在肾脏疾病、泌尿系统疾病及淋巴细胞白血病等疾病富集明显。本研究推测关键基因可能在 ccRCC 的发生发展中也发挥重要作用。

如之前所述,TME 不仅与肿瘤增殖转移有关,还与治疗效果密切相关^[10-11]。尽管免疫药物在各种癌症中取得了前所未有的良好效果,但由于原发性、适应性或获得性耐药,大多数接受免疫治疗方案的患者仍然不能获得长期的阳性反应率^[12]。研究发现,免疫治疗耐药的肿瘤细胞外在机制与免疫抑制性 TME 内的各种免疫细胞密切相关,这些免疫细胞可能向循环中释放抑制抗肿瘤免疫的因子,以刺激免疫检查点和耗尽细胞毒性 T 细胞(CTLs)^[10]。且 ccRCC 具有高度异质性,不同的患者 TME 内肿瘤细胞和其他细胞组成方面表现出显著差异,从而影响肿瘤治疗效果和预后^[11]。本研究从关键基因中发现了 34 个与患者 OS 有关的基因,其中 14 个基因对患者预后($HR < 1$)起保护作用,其余 20 个基因为患者预后的危险因素。而在多因素 Cox 回归分析建立的风险评估模型基因中,*SPIC*($HR = 0.22$)、*FREM1*($HR = 0.41$)被证实为良好预后的独立影响因素,而 *CASP5*($HR = 1.93$)、*SLN*($HR = 1.18$)、*RORB*($HR = 1.69$)、*CPN1*($HR = 1.59$)、*F7*($HR = 6.82$)是患者不良预后的独立危险因素。

SPIC 是一种红细胞特异度转化(erythroblast transformation-specific,ETS)转录因子,其家族成员已被证明与基因表达、染色质重塑、细胞周期调控和分化有关^[13]。据报道 *SPIC* 在 B 淋巴细胞发育过程中表达,并作为 B 淋巴细胞分化的正向和负向转录调节因子^[13]。也有研究发现 NF- κ B 和 STAT 信号传导对 *SPIC* 的反调节可控制巨噬细胞的炎症反应和铁代谢^[14]。然而其在肾癌方面的作用机制鲜有研究。*SPIB* 作为 ETS 家族成员之一,

在肺癌中可通过抑制 *CLDN2* 核转录来增强早期间充质侵袭和上皮细胞转移,并与结直肠癌的发病风险相关^[15],但有关其在肾癌中的作用相关报道较少。

半胱天冬酶 5(*CASP5*)与半胱天冬酶 1(*CASP1*)、半胱天冬酶 4(*CASP4*)一起在细胞焦亡中发挥作用并显著促进免疫反应^[16]。*CASP5* 基因突变与多种癌症有关,如白血病、子宫内膜癌、肺癌、胃肠道癌和结直肠癌^[17],一项经过实验验证的生物信息研究报道了 *CASP5*、*AIM2*、*NOD2*、*GZMB* 等细胞焦亡相关基因与 ccRCC 较差预后相关^[18],本研究中得出了相似的结论,即 *CASP5* 基因是患者预后的危险因素($HR = 1.93$, $P = 0.03$)。*HMGCS2* 即 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 2,是调节酮体生成的关键酶,在 ccRCC 中 *HMGCS2* 基因启动子区域的高度甲基化导致其转录水平下降,肿瘤组织中的表达量低于正常组织,进一步研究发现 *HMGCS2* 可作为 ccRCC 患者诊断及预后的分子标志物^[19]。本研究中 *HMGCS2* 为 TME 中的关键基因,生存分析发现 *HMGCS2* ($HR = 0.82$, $P = 0.001$)与患者预后相关。

Fras 相关细胞外基质 1(*FREM1*)属于 *FRAS1*/*FREM* 细胞外基质蛋白家族,*FREM1* 及其剪接变体 *TILRR* 在以往的研究中被证实与人类免疫缺陷病毒 1(HIV-1)的感染相关,且 *FREM1* mRNA 在与黏膜 HIV-1 感染相关的组织中高表达,包括宫颈上皮组织^[20]。而在 ccRCC 中 *FRAS1*、*FREM* 和 *FREM2* 基因和蛋白表达水平在肿瘤组织中比在正常组织中显著降低,其表达降低的患者表现出高转移倾向和不良预后^[21]。*SLN* 为肌脂蛋白基因,可能与小鼠体温维持有关,有关其在人类癌症方面的研究较少。*RORB*、*CPN1*、*F7* 基因在文献报道中相对较少,在我们的研究中均为不良预后的独立危险因素。

本研究主要根据公共数据库中的数据进行分析的,缺少实验验证,且免疫治疗在晚期 ccRCC 治疗中发挥着越来越重要的作用,本文并未进一步探索。在今后的研究中,我们会对得到的结论进行实验验证并且深入探讨不同风险组间免疫检查点相关基因差异水平及他们对患者预后的影响。

综上所述,本研究应用生物信息学方法筛选到 ccRCC 微环境的关键基因,其主要在免疫细胞激活分化、细胞因子活性等方面富集明显。建立的风险评估函数,能准确评估患者风险水平,同时结合患者年龄、肿瘤分期、肿瘤分级等相关临床指标绘出的生存率预后列线图模型准确度较高,可应用于 ccRCC 患者风险及预后评估。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell

- carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*,2017,3:17009.
- [2] Liu D, Shu GF, Jin FY, et al. ROS-responsive chitosan-SS31 prodrug for AKI therapy via rapid distribution in the kidney and long-term retention in the renal tubule[J]. *Sci Adv*,2020,6(41):eabb7422.
- [3] Jonasch E, Walker CL, Rathmell WK. Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality [J]. *Nat Rev Nephrol*,2021,17(4):245-261.
- [4] Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment [J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18 (1):84.
- [5] Tian CX, Huang Y, Clauser KR, et al. Suppression of pancreatic ductal adenocarcinoma growth and metastasis by fibrillar collagens produced selectively by tumor cells[J]. *Nat Commun*,2021,12(1):2328.
- [6] Li XY, Wenes M, Romero P, et al. Navigating metabolic pathways to enhance antitumour immunity and immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2019,16(7):425-441.
- [7] Turajlic S, Swanton C, Boshoff C. Kidney cancer: the next decade [J]. *J Exp Med*, 2018, 215 (10): 2477-2479.
- [8] Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2012,33(1):9-16.
- [9] Chen FJ, Zhang YQ, Şenbabaoglu Y, et al. Multilevel genomics-based taxonomy of renal cell carcinoma[J]. *Cell Rep*,2016,14(10):2476-2489.
- [10] Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, et al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018,15(5):325-340.
- [11] Massari F, Rizzo A, Mollica V, et al. Immune-based combinations for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a meta-analysis of randomised clinical trials[J]. *Eur J Cancer*,2021,154:120-127.
- [12] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy[J]. *Cell*,2017,168(4):707-723.
- [13] Carlsson R, Persson C, Leanderson T. SPI-C, a PU-box binding ETS protein expressed temporarily during B-cell development and in macrophages, contains an acidic transactivation domain located to the N-terminus[J]. *Mol Immunol*,2003,39(16):1035-1043.
- [14] Alam Z, Devalaraja S, Li MH, et al. Counter regulation of spic by NF- κ B and STAT signaling controls inflammation and iron metabolism in macrophages [J]. *Cell Rep*,2020,31(13):107825.
- [15] Du W, Xu X, Niu Q, et al. Spi-B-mediated silencing of claudin-2 promotes early dissemination of lung cancer cells from primary tumors [J]. *Cancer Res*, 2017, 77 (18):4809-4822.
- [16] Martinon F, Tschopp J. [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(1):10-22.
- [17] Soung YH, Jeong EG, Ahn CH, et al. Mutational analysis of caspase 1, 4, and 5 genes in common human cancers[J]. *Hum Pathol*,2008,39(6):895-900.
- [18] Zhang Y, Chen XW, Fu QH, et al. Comprehensive analysis of pyroptosis regulators and tumor immune microenvironment in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*,2021,21(1):667.
- [19] Han PP, Wang YF, Luo WQ, et al. Epigenetic inactivation of hydroxymethylglutaryl CoA synthase reduces ketogenesis and facilitates tumor cell motility in clear cell renal carcinoma [J]. *Pathol Res Pract*,2021, 227:153622.
- [20] Kashem MA, Li HZ, Liu LR, et al. The potential role of FREM1 and its isoform TILRR in HIV-1 acquisition through mediating inflammation [J]. *Int J Mol Sci*,2021,22(15):7825.
- [21] Wang GG, Wang Z, Lu HQ, et al. Comprehensive analysis of FRAS1/FREM family as potential biomarkers and therapeutic targets in renal clear cell carcinoma [J]. *Front Pharmacol*,2022,13:972934.

(收稿日期:2022-10-07)