

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.008

· 临床研究 ·

基于生物信息学分析铁死亡相关 lncRNA 对肾透明细胞癌组织免疫浸润和患者预后评估的意义

扈星^{1a}, 扈亮², 余亭³, 王茜^{1b}, 张志红^{1a} (1. 西南医科大学附属医院 a. 全科医学科, b. 老年医学科, 四川 泸州 646000; 2. 西部战区总医院 心血管外科, 四川 成都 610000; 3. 西南医科大学 临床医学系 2019 级, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:** 采用生物信息学方法探索与肾透明细胞癌(ccRCC)组织中铁死亡相关的 lncRNA, 并探讨其与免疫细胞浸润及患者预后的相关性, 为 ccRCC 患者提供新的分子靶点。 **方法:** 从癌症基因组图谱(TCGA)数据库下载 ccRCC 的转录本数据和临床数据, 利用单样本基因集富集分析(ssGSEA)及相关性分析获得与铁死亡相关的 lncRNA; 通过单因素和多因素回归分析构建与铁死亡相关的 lncRNA 特征图, 分析其与预后的关系; 利用 R 软件分析铁死亡相关 lncRNA 与肿瘤免疫细胞浸润和药物敏感性之间的关系。构建铁死亡相关 RNA 网络, 并通过 qPCR 验证中国人 ccRCC 组织和癌旁组织(取自 2019 年 12 月至 2021 年 03 月间在西南医科大学附属医院手术切除 8 例标本)中关键 lncRNA 的表达。 **结果:** Kaplan-Meier 分析表明, 铁死亡评分高的患者总 OS 率低于铁死亡评分低的患者。单因素和多因素回归分析确定 11 个 ccRCC 铁死亡相关 lncRNA 可评估患者预后, 并构建 ccRCC 患者 1、3、5 年预后预测列线图。免疫细胞浸润分析表明, 铁死亡相关 lncRNA 与 ccRCC 免疫细胞浸润密切相关, 其中 LINC01871、PRKAR1B-AS1 和 CYTOR 是调节肿瘤免疫细胞浸润的关键 lncRNA。化疗药物敏感性分析表明, 高风险患者对甲氨蝶呤、紫杉醇、顺铂和多柔比星更为敏感。构建的包含 3 个 lncRNA、15 个 miRNA 和 15 个 mRNA 的 RNA 网络中, 验证实验显示 LINC01871、LINC00472 和 CYTOR 在 ccRCC 组织中显著上调。 **结论:** 通过生物信息学方法获得 11 个与铁死亡相关的 lncRNA, 证明其与 ccRCC 组织免疫细胞浸润、化疗药物敏感性和患者预后相关, 为探索 ccRCC 铁死亡相关 lncRNA 标志物提供重要参考。

[关键词] 肾透明细胞癌; 铁死亡; lncRNA; 标志物; 预后; 免疫浸润

[中图分类号] R37.11; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)03-0237-12

Clinical significance of ferroptosis-related lncRNAs in prognosis and immune infiltration in clear cell renal cell carcinoma based on bioinformatics analysis

HU Xing^{1a}, HU Liang², YU Ting³, WANG Qian^{1b}, ZHANG Zhihong^{1a} (1a. Department of General Practice, 1b. Department of Geriatrics, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China; 2. Department of Cardiovascular Surgery, Western War Zone General Hospital, Chengdu 61000, Sichuan, China; 3. Class of 2019, Department of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To screen lncRNAs related to ferroptosis in renal clear cell carcinoma (ccRCC) by bioinformatics methods, and to explore their correlation with clinical prognosis and immune cell infiltration, in order to provide new targets for the treatment of ccRCC patients. **Methods:** Transcript data and clinical data of ccRCC were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and ferroptosis-related lncRNAs were obtained using single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) and correlation analysis. Through univariate and multivariate regression analyses, the characteristics of lncRNAs related to ferroptosis were constructed, and their prognostic value was further analyzed. R software was used to analyze the relationship between the characteristics of ferroptosis-related lncRNAs and tumor immune infiltration and drug sensitivity. A ferroptosis-related ceRNA network was constructed, and the expression of key lncRNAs in Chinese ccRCC tissues and paraneoplastic tissues (samples from 8 cases surgically resected at the Affiliated Hospital of Southwest Medical University between Dec 2019 and Mar 2021) was verified by qPCR. **Results:** Kaplan-Meier analysis showed that patients with high ferroptosis scores had lower overall survival (OS) than patients with low ferroptosis scores. Univariate and multivariate regression analyses identified 11 ccRCC ferroptosis-related prognostic lncRNAs, and the nomograms for predicting the prognosis of ccRCC patients at 1, 3, and 5 years were constructed. Immune infiltration analysis showed

[基金项目] 四川省科研项目(No. LY-105); 西南医科大学青年基金(No. 2018-ZRQN-142)

[作者简介] 扈星(1989—), 女, 硕士生, 主要从事泌尿系统肿瘤内科治疗的研究, E-mail: huxing181024@126.com

[通信作者] 张志红, E-mail: zhihonglily@126.com

that the characteristics of ferroptosis-related lncRNAs were closely related to ccRCC immune infiltration, among which LINC01871, PRKAR1B-AS1 and CYTOR were the key lncRNAs regulating tumor immune infiltration. Chemotherapy drug sensitivity analysis showed that high-risk patients were more sensitive to methotrexate, paclitaxel, cisplatin, and doxorubicin. Finally, A ceRNA network containing 3 lncRNAs, 15 miRNAs and 15 mRNAs was constructed. qPCR indicated that LINC01871, LINC00472 and CYTOR were significantly up-regulated in ccRCC tissues. **Conclusion:** Eleven ferroptosis-related lncRNAs were obtained by bioinformatics methods, and they were proved to be related to ccRCC prognosis, immune infiltration and chemotherapeutic drug sensitivity, providing an important reference for exploring ferroptosis-related lncRNA markers in ccRCC.

[Key words] clear cell renal cell carcinoma (ccRCC); ferroptosis; lncRNA; marker; prognosis; immune infiltration

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(3): 237-248. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.008]

肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 占肾细胞癌的 75%~80%, 是肾细胞癌最常见的亚型^[1]。由于 ccRCC 缺乏早期症状和临床表现的多样性, 25%~30% 的患者在确诊时已发现转移^[2]。对于晚期或转移的 ccRCC 患者, 目前尚无有效的治疗策略, 5 年生存率约为 12%^[3]。目前, ccRCC 的发病率呈逐年上升趋势, 平均年发病率为 2%。约 20%~30% 的 ccRCC 患者在术后 3 年内出现复发或转移^[4]。因此, 研究对 ccRCC 患者生存和预后有意义的生物标志物尤为重要。

铁死亡 (ferroptosis) 是一种由脂质过氧化驱动的铁依赖性调节性细胞死亡形式, 在机制和形态上不同于细胞凋亡和其他类型的调节性细胞死亡^[5]。越来越多的证据表明, 铁死亡与人类各种疾病有关, 包括肿瘤发生^[6]。值得注意的是, 多种铁死亡相关基因的表达水平与 ccRCC 患者预后显著相关^[7]。在大多数 ccRCC 中, 肿瘤抑制基因 von Hippel-Lindau (VHL) 的失活, 使 ccRCC 发生铁死亡^[8]。随着研究的不断深入, 越来越多的证据表明, 铁死亡在 ccRCC 的发生发展中起着促进或抑制肿瘤的双重作用^[9-10]。然而, 目前仍缺乏对 ccRCC 铁死亡一致的认识, 包括铁死亡调节因子和肿瘤免疫微环境之间的相互作用等。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一种长度超过 200 bp 的 RNA 分子, 不具备蛋白质编码能力^[11]。lncRNA 的异常表达与 ccRCC 的临床病理特征和预后相关, 提示 lncRNA 可能作为诊断或预后的生物标志物^[12]。最近, 许多研究通过探索基于 lncRNA 的预后标志物来预测 ccRCC 患者的预后。MA 等^[13]发现, 12 个 N⁶-甲基腺嘌呤 (N⁶-methyadenosine, m⁶A) 相关的 lncRNA 标志物与 ccRCC 患者的预后和免疫治疗效果相关。MA 等^[14]发现, 7 个糖酵解相关的 lncRNA 标志物能是 ccRCC 治疗的潜在靶点。CHEN 等^[15]发现, 4 个低氧相关的 lncRNA 标志物可以可靠地预测 ccRCC 患者的预后。XUAN 等^[16]发现, 7 个自噬相关的 lncRNA 标志物对 ccRCC 进展的预测是有价值的。然而, 很少有研究构建一个与铁死亡相关的 lncRNA 网络来寻找 ccRCC 患者的标志物。本研究通过分析

癌症基因组图谱 (TCGA) ccRCC 中 lncRNA 的表达数据, 确定与铁死亡相关的 lncRNA 标志物。然后验证 lncRNA 标志物对 ccRCC 患者预后的预测作用, 同时分析 lncRNA 与 ccRCC 免疫浸润之间的相关性; 此外, 还用 R 软件预测化疗药物敏感性。本研究旨在为 ccRCC 的诊断、治疗和预后提供新的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 通过 TCGA 数据库收集 ccRCC 相关数据并通过 R 软件分析其差异表达基因

从 TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) 数据库门户使用 R 包 TCGAbiolinks 下载 ccRCC 转录组数据 (HTSeq FPKM 和 HTSeq counts) 和患者的临床信息 (包括生存时间、生存状态、年龄、性别和 TNM 分期)。从 FerrDb 数据库 (<http://www.zhounan.org/ferrdb>) 中提取铁死亡标志物基因, 并提取铁死亡相关基因的表达数据。通过 R 软件中 limma 包分析 72 个正常肾组织和 539 个 ccRCC 组织的基因差异表达。具有 $|\log_2 \text{fold change}| > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 的 mRNA 或 lncRNA 被认为是差异表达基因 (differential expression gene, DEG) 或差异表达 lncRNA (differential expression lncRNA, DEL)。

1.2 单样本基因集富集分析 ccRCC 样本的铁死亡相关基因评分

根据给定的基因表达谱, 应用单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 并通过经验累积分布函数计算富集分数。该分数代表每个样本中某一基因集的绝对富集程度。利用基因集变异分析 (gene set variation analysis, GSVA) 对 TCGA 中 539 份 ccRCC 样本进行铁死亡 ssGSEA 评分。

1.3 采用 R 软件分析 lncRNA 与铁死亡评分的相关性

采用 R 软件中 plyr、tidyr 和 dplyr 包分析 lncRNA 与铁死亡评分的相关性, 并采用 Spearman 进行相关系数分析。然后用 R 软件中 ggplot2 和 dplyr 绘制铁死亡相关 lncRNA 与免疫细胞浸润之间的相关性热图。

1.4 TCGA 数据库中 ccRCC 组织中铁死亡相关 lncRNA 特征的分析

采用 R 软件中 Survival、Survminer 和 Forestplot 包进行单因素 COX 回归分析,筛选具有显著预后价值($P<0.05$)的铁死亡相关 lncRNA。然后采用多因素 COX 回归分析,利用每个 lncRNA 的回归系数建立基因表达水平的线性联合风险评分。根据 11 个与铁死亡相关的 lncRNA 预后评分,采用以下公式计算每个样本的风险评分:风险评分=(0.273×PRKAR1B-AS1 表达)+(0.101×CYTOR 表达)+(-0.070×AC107021.2 表达)+(0.049×LINC01871 表达)+(0.366×AC156455.1 表达)+(0.027×AL353801.1 表达)+(-0.211×RTCA-AS1 表达)+(0.207×LINC00472 表达)+(-0.101×COMETT 表达)+(0.115×LHFPL3-AS2 表达)+(-0.373×EMX2OS 表达)。然后根据风险评分的中位数(训练集中位数为-0.043 247,测试集中位数为-0.002 252),将样本分为高风险组和低风险组,用于生存分析。使用风险评分和临床特征的 Survival 包构建多变量 COX 模型, $P<0.05$ 作为截止值,并使用 Regplot 包绘制列线图。

1.5 由网站工具分析 ccRCC 组织中的免疫细胞浸润丰度和 DEG 功能富集分析

免疫浸润分析由网站工具 ImmuCellAI(<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/ImmuCellAI/#/>)进行。ImmuCellAI 可以通过基于基因集签名的方法预测样本中 24 种免疫细胞类型的丰度,并分析不同组间免疫细胞浸润的差异。利用 R 软件聚类算法对 DEG 进行 GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 分析,预测其潜在功能。 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

1.6 利用数据库筛选 ccRCC 化疗敏感的潜在药物

来自癌症药物敏感性基因组学(Cancer Drug Sensitivity Genomics, CDSG)数据库(<https://www.cancerrxgene.org/>)的数据集用于筛选治疗 ccRCC 的潜在化疗药物。使用 R 软件 pRRophetic 包估算这些药物的半数有效抑制浓度(IC_{50})。

1.7 采用 qPCR 验证中国人 ccRCC 组织中 LINC01871、LINC00472 和 CYTOR 的表达

选取 2019 年 12 月至 2021 年 03 月西南医科大学附属医院手术切除的 8 例 ccRCC 患者的癌组织和相应癌旁组织,所有肿瘤组织均经 2 名以上病理医师确诊为 ccRCC。所有组织离体后迅速置于液氮中,-80 °C 保存。所有患者均被告知并签署知情同意书。本研究方案征得所在医院医学伦理委员会的批准(批准号:No. K20170989)。

使用 TRIzol 试剂抽提 ccRCC 组织及相应癌旁组

织中的总 RNA,用 TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反反转录为 cDNA。采用 SYBRGreen 系统进行 qPCR 实验。qPCR 采用两步法,反应条件:95 °C 2 min, 95 °C 15 s、60 °C 30 s,共计 40 个循环。引物序列:LINC01871 上游为 GCAACTACAGTCATTTGTT CTC,下游为 AACTGGTAAGTCATATATGCAAG; LINC00472 上游为 GATGGCAGCTGTCTCTCTCC、下游为 GGGCCTCTCTGACCGTATCT;CYTOR 上游为 TCTTCACAGCACAGTTCCTGG,下游为 AGG TAGAGGTGCTGGAGGG; GAPDH 上游为 AAC TTTGGCATTGTGGAAGGA,下游为 AACATCATC CCTGCTTCCAC。以 GAPDH 作为内参照基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量。

1.8 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。采用 SPSS21.0 统计学软件和 R 软件分析数据。所有数据均属于计量资料且均符合正态分布,故以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高水平的铁死亡相关基因评分与 ccRCC 患者的预后不良相关

从 FerrDb 数据库中提取 103 个铁死亡相关基因。基于 TCGA-ccRCC 数据库,热图显示了 103 个铁死亡相关基因在 72 个正常肾组织和 539 个 ccRCC 组织中的表达(图 1A)。对 103 个铁死亡相关基因进行 ssGSEA,获得每个 ccRCC 组织的铁死亡相关基因富集评分。最终 Kaplan-Meier 分析表明,铁死亡评分高的患者 OS 率明显低于铁死亡相关基因评分低的患者(图 1B, $P<0.01$)。

2.2 ccRCC 组织中差异表达铁死亡相关 lncRNA 的筛选

从 TCGA-ccRCC 数据库中获得 153 个 DEL,包括 114 个上调和 39 个下调的 lncRNA(图 2A)。进一步通过 Spearman 相关分析评估 lncRNA 与铁死亡的相关性,结果(图 2B)显示,36 个 lncRNA 与铁死亡呈正相关($r>0.2$, $P<0.05$),224 个 lncRNA 与铁死亡呈负相关($r<-0.2$, $P<0.05$)。最后,用 Venn 分析获得 16 个上调的 lncRNA 与铁死亡呈正相关,16 个下调的 lncRNA 与铁死亡呈负相关(图 2C)。热图(图 2D)显示了 32 个铁死亡相关 DEL 的表达情况。

2.3 铁死亡患者预后相关 lncRNA 的鉴定

Kaplan-Meier 生存分析和 COX 比例风险回归分析(图 3)显示,本实验发现 9 种保护性的 lncRNA(EMX2OS, SPINT1-AS1、AC104794.5、LINC00472、COMETT、RTCA-AS1、AL353801.1、LHFPL3-AS2 和 AL031429.2)

(图 3A) 和 10 种风险 lncRNA (PRKAR1B-AS1、AC156455.1、CYTOR、AC107021.2、LINC01871、AC099850.3、HK2-DT、AC016405.3、PELATON 和 LINC01426)(图 3B)。然后, 使用 Kaplan-Meier Plotter 数据库 (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=background>) 进行生存分析, 结果(图 3C)显示, 9 个保护

性 lncRNA 中有 6 个 (EMX2OS、LINC00472、COMETT、RTCA-AS1、AL353801.1 和 LHFPL3-AS2) 与较好的 OS 率相关; 10 个危险 lncRNA 中有 5 个 (PRKAR1B-AS1、AC156455.1、CYTOR、AC107021.2 和 LINC01871) 与较差的 OS 率相关。这 11 个 lncRNA 被确定为与 ccRCC 铁死亡死亡相关的关键 lncRNA。

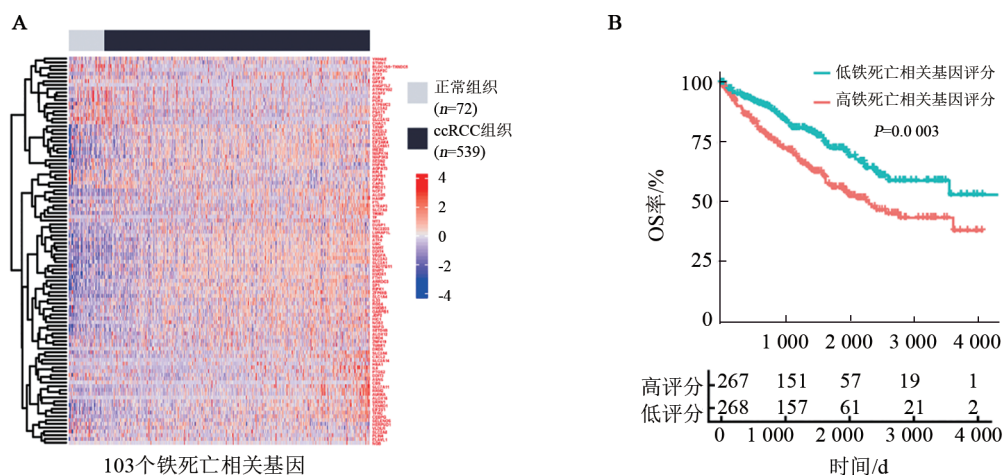
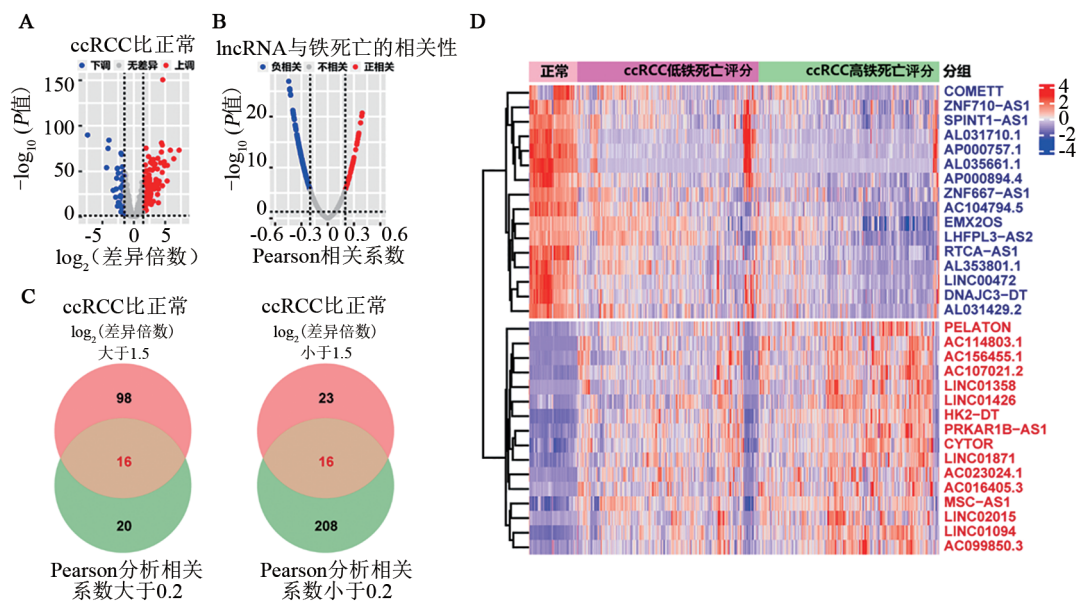


图 1 ccRCC 组织中铁死亡相关基因的表达(A)及铁死亡相关基因评分与患者预后的关系(B)



A:TCGA-ccRCC 数据库中 DEL; B:Spearman 相关分析 lncRNA

与铁死亡的相关性;C:Pearson 分析 DEL 与铁死亡的相关性;D:铁死亡相关 lncRNA 热图

图 2 ccRCC 组织中差异表达铁死亡相关 lncRNA 的鉴定

2.4 铁死亡相关 lncRNA 风险预测模型的构建

TCGA 数据库中 ccRCC 患者被随机分为训练数据集 (60%) 和测试数据集 (40%)。以中位风险评分 (训练集中位数: -0.0432 47; 测试集中位数: -0.002 252) 为分界点, 训练组分为高风险组和低风险组。生存状态的散点图(图 4A)显示, 高风险组 ccRCC 患者比低风险组患者的生存时间短。热图

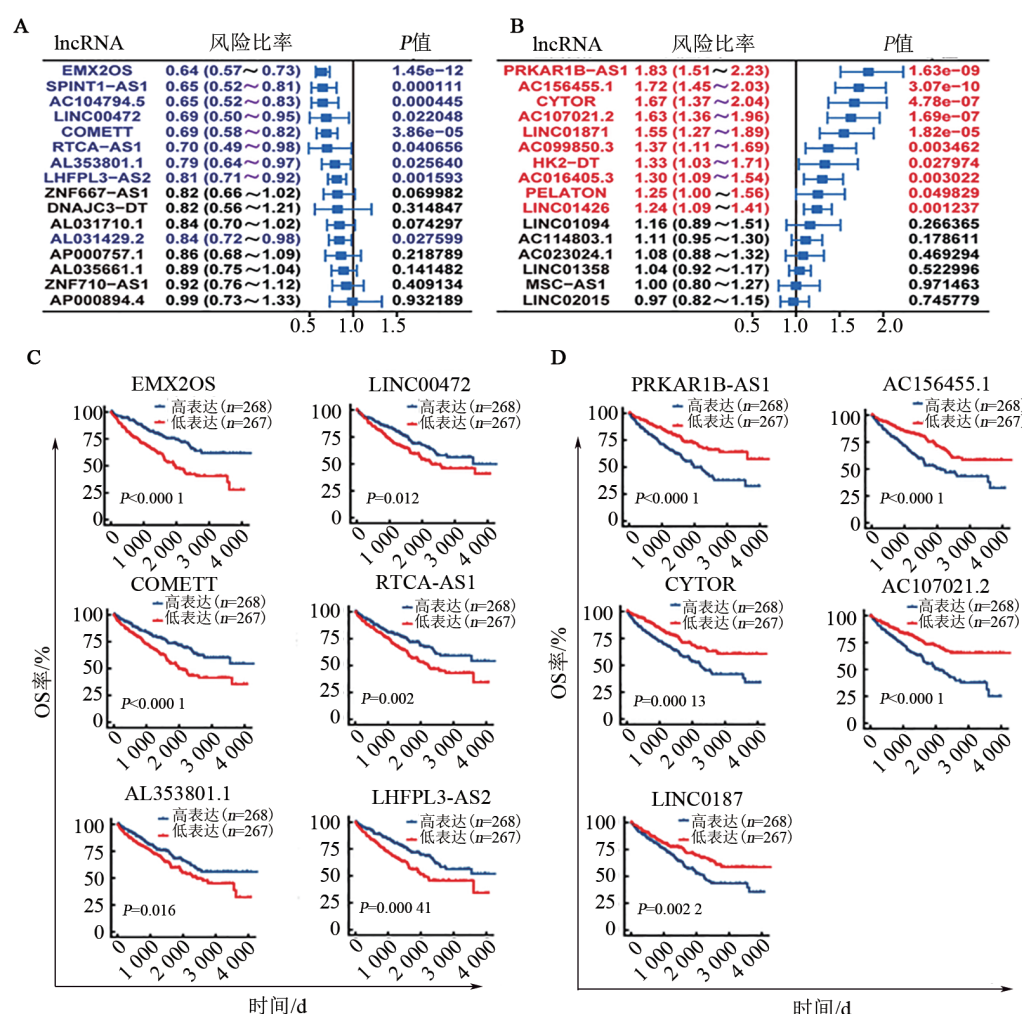
(图 4B、C) 分析显示, 低风险评分的 ccRCC 患者表达较高水平的保护性 lncRNA, 而那些高风险评分的患者表达较高水平的危险 lncRNA。此外, Kaplan-Meier 生存分析表明, 与低风险组相比, 高风险组 ccRCC 患者的 OS 率显著降低。对测试集的样本采用相同的分组和计算方法, 得到了与训练集一致的结果(图 4D、E 和 F)。最后, 根据风险评分、年龄、病

理分期和T分期构建列线图,用以预测ccRCC患者的1.3和5年OS率(图4G)。

2.5 铁死亡相关lncRNA的功能富集分析

为了解铁死亡相关lncRNA特征影响ccRCC预后的机制,本研究基于高/低风险评分将lncRNA进行GO和KEGG富集分析。GO分析表明三羧酸循环、胶原三聚体复合物和脂肪酰CoA结合是生物过程、细胞组分和分子功能中最丰富的术语(图5A)。为进一步探索铁死亡相关lncRNA特征参与ccRCC发生发展的机制及潜在信号通路,本研究通过使用

GSEA进行KEGG富集分析。结果显示多条通路与铁死亡相关lncRNA特征相关(图5B)。其中柠檬酸循环、PPAR信号通路、脂肪酸代谢、过氧化物酶体、胰岛素抵抗和钙信号通路与营养和能量调节相关。FoxO、JAK-STAT、cGMP-PKG信号和紧密连接通路可参与癌症发生发展,这些途径在ccRCC的发生发展中起着至关重要的作用,表明铁死亡相关lncRNA特征中最有可能的是通过营养和能量调节方式参与ccRCC发生发展。



A: 9种保护性lncRNA; B: 10种风险lncRNA; C: 保护性lncRNA生存分析; D: 风险lncRNA生存分析

图3 与铁死亡患者预后相关的DEL的鉴定

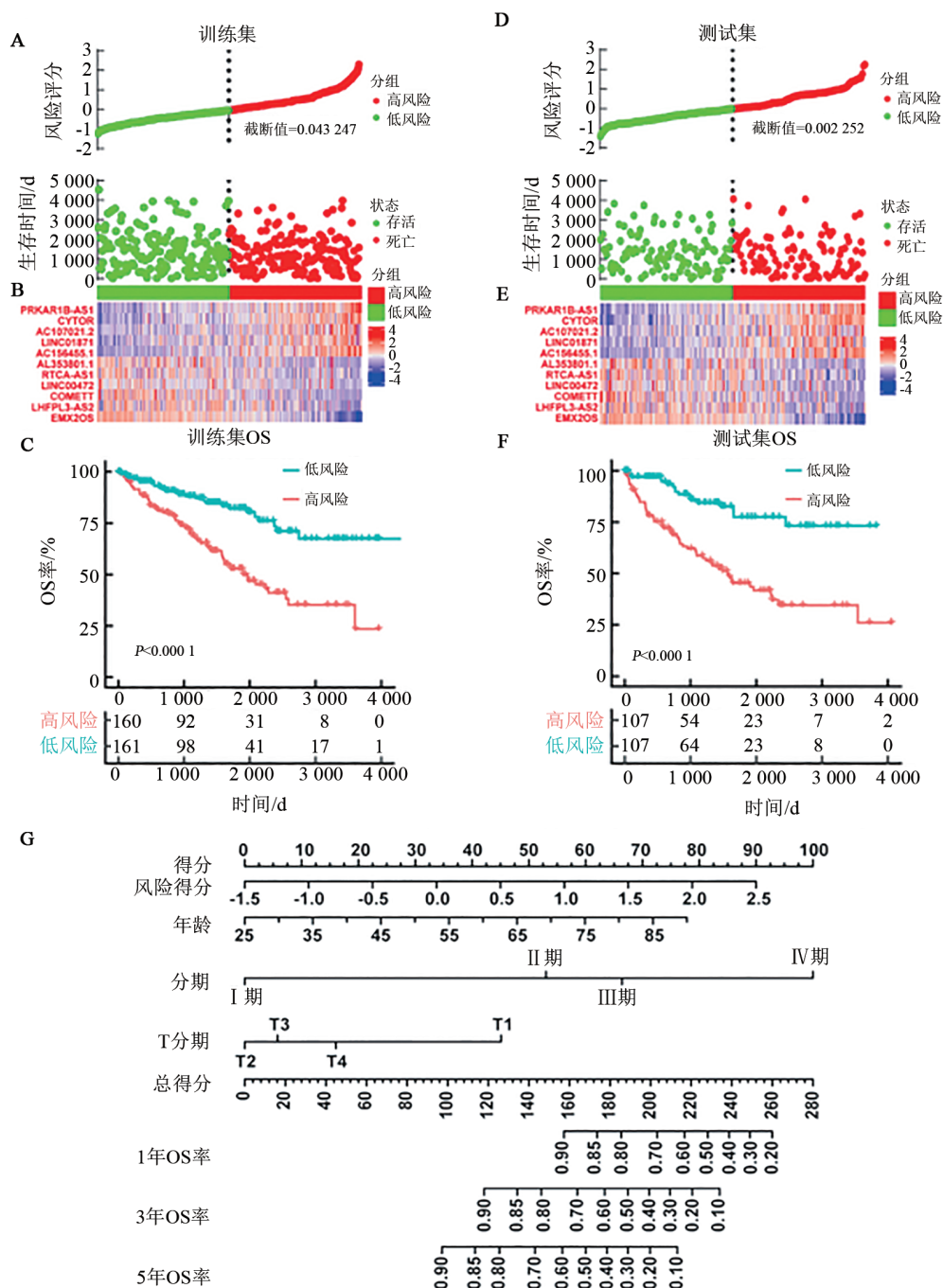
2.6 铁死亡相关的lncRNA与免疫细胞浸润的相关性

为证实铁死亡相关lncRNA在调节ccRCC免疫细胞浸润中的作用,本研究用ImmuCellAI软件分析了高/低风险人群中浸润免疫细胞的丰度差异。结果显示,与低风险组患者相比,高风险组患者有更高的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)、耗竭性T淋巴细胞(exhausted T lymphocyte, ETL)、自然调节性T细胞(natural regulatory T cell, nTreg)、

诱导型调节性T细胞(induced regulatory T cell, iTreg)、滤泡辅助性T细胞(follicular helper T cell, Tfh)、黏膜相关恒定T细胞(mucosal-associated invariant T cell, MAIT)、DC、单核细胞、NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞(gamma delta T cell, $\gamma\delta$ T)、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的浸润,以及更低的Th1细胞、Th17细胞、中央记忆型T细胞(central memory T cell, CMT)、B细胞和中性粒细胞的浸润(图6)。铁死亡相关的lncRNA

和浸润免疫细胞的 Spearman 相关性热图表明, 3 种风险 lncRNA (LINC01871、PRKAR1B-AS1 和 CYTOR) 与 CD4 T、NK、ETL、DC、iTreg、nTreg、Tfh、 $\gamma\delta$ T、CD8 T、

CTL 和 MAIT 细胞浸润呈显著正相关, 与 B 细胞、CD4 naive、Th1、CMT、Th17 和中性粒细胞浸润呈显著负相关(图7)。



A、B、C: 训练数据集的生存状态散点图、热图和OS; D、E、F: 测试数据集的生存状态散点图、热图和OS;

G: 预测ccRCC患者OS的列线图

图4 铁死亡患者预后相关lncRNA的预后风险评分分析

2.7 铁死亡相关的lncRNA与化疗药物敏感性相关

为了探索针对高风险ccRCC患者可能敏感的化疗药物, 本研究基于CDSG数据库通过R软件包pRRophetic算法确定11化疗药物的 IC_{50} , 并进行药物敏感性分析(图8)。结果发现, 与低铁死亡评分组相比, 高铁死亡评分组甲氨蝶呤(methotrexate)、紫杉

醇(paclitaxel)、顺铂(cisplatin)和多柔比星(doxorubicin)的 IC_{50} 值显著降低, 但5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、吉西他滨(gemcitabine)、多西他赛(docetaxel)、长春碱(vinblastine)和长春瑞滨(vinorelbine)的 IC_{50} 值在两组间无显著差异。这些结果表明, 甲氨蝶呤、紫杉醇、顺铂和多柔比星可能是

具有强有力实验证据支持的 miRNA-mRNA 相互作用对,共发现 1 565 对 miRNA-mRNA,包括 58 个 miRNA 和 1 014 个 mRNA。最后,根据 lncRNA-miRNA 和 miRNA-mRNA 的相互作用,构建了一个由 3 个 lncRNA、15 个 miRNA 和 15 个 mRNA 构成的 ceRNA 网络(图 9B)。最后基于来自患者的 8 个配对 ccRCC 组织及癌旁组织,通过 qPCR 验证了 3 个 lncRNA 的表达水平。与癌旁组织相比,ccRCC 组织中 CYTOR 和 LINC01871 的表达明显增加($P<0.01$),而 LINC00472 的表达明显减少($P<0.01$),与先前差异分析及预后分析的结果是一致的(图 9C)。

具有强有力实验证据支持的 miRNA-mRNA 相互作用对,共发现 1 565 对 miRNA-mRNA,包括 58 个 miRNA 和 1 014 个 mRNA。最后,根据 lncRNA-miRNA 和 miRNA-mRNA 的相互作用,构建了一个由 3 个 lncRNA、15 个 miRNA 和 15 个 mRNA 构成的 ceRNA 网络(图 9B)。最后基于来自患者的 8 个配对 ccRCC 组织及癌旁组织,通过 qPCR 验证了 3 个 lncRNA 的表达水平。与癌旁组织相比,ccRCC 组织中 CYTOR 和 LINC01871 的表达明显增加($P<0.01$),而 LINC00472 的表达明显减少($P<0.01$),与先前差异分析及预后分析的结果是一致的(图 9C)。

具有强有力实验证据支持的 miRNA-mRNA 相互作用对,共发现 1 565 对 miRNA-mRNA,包括 58 个 miRNA 和 1 014 个 mRNA。最后,根据 lncRNA-miRNA 和 miRNA-mRNA 的相互作用,构建了一个由 3 个 lncRNA、15 个 miRNA 和 15 个 mRNA 构成的 ceRNA 网络(图 9B)。最后基于来自患者的 8 个配对 ccRCC 组织及癌旁组织,通过 qPCR 验证了 3 个 lncRNA 的表达水平。与癌旁组织相比,ccRCC 组织中 CYTOR 和 LINC01871 的表达明显增加($P<0.01$),而 LINC00472 的表达明显减少($P<0.01$),与先前差异分析及预后分析的结果是一致的(图 9C)。



图5 ccRCC组织中铁死亡相关lncRNA的GO(A)和KEGG(B)功能富集分析

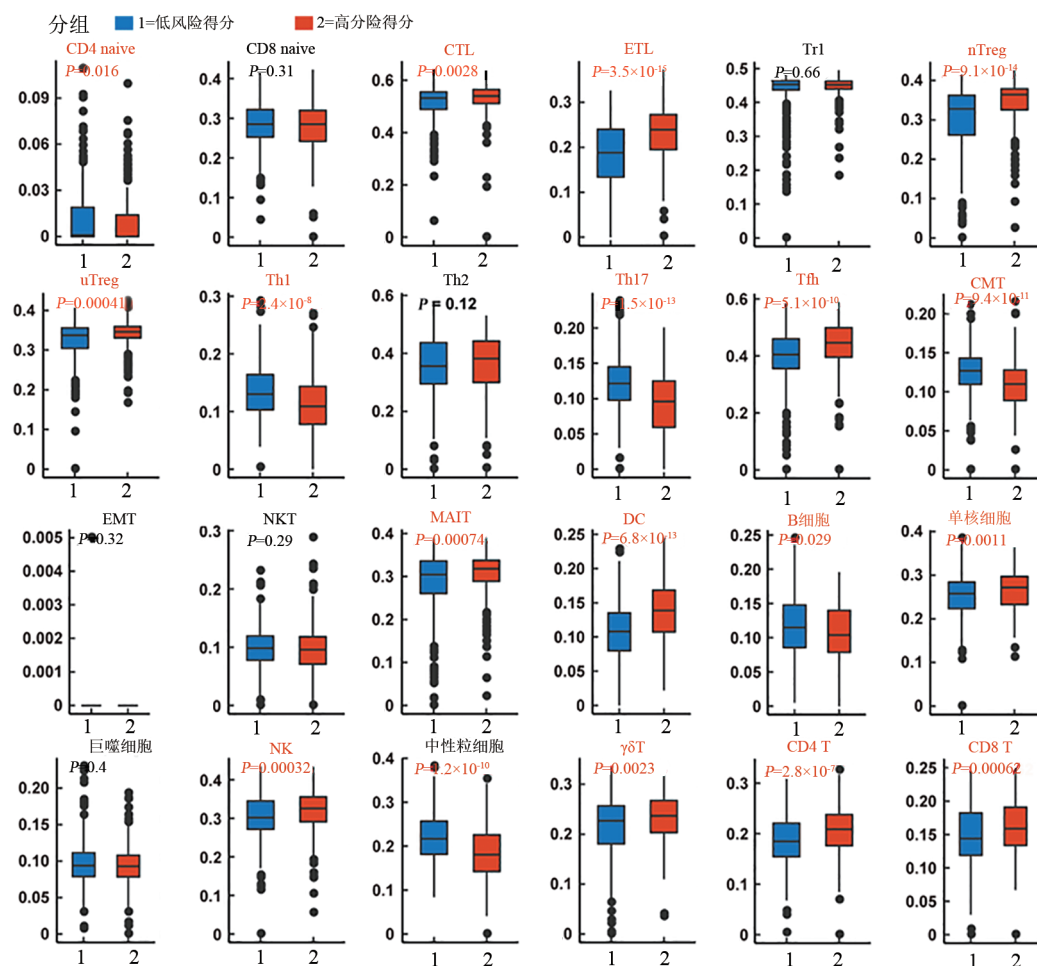


图6 不同风险组中24种免疫细胞类型丰度的差异

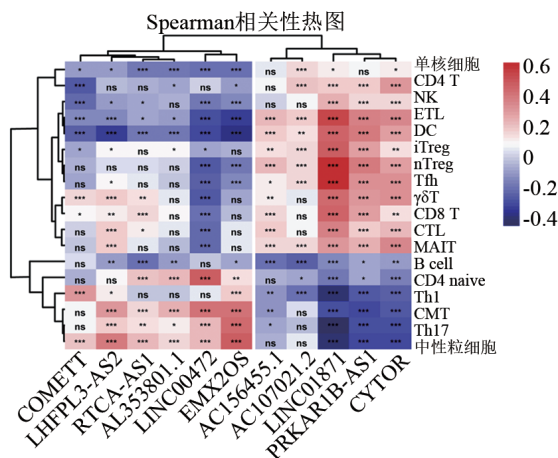


图7 11个铁死亡相关的lncRNAs与免疫细胞浸润水平之间的相关性热图

3 讨论

ccRCC是成人肾最常见的癌症类型。大多数ccRCC患者在诊断时已经处于晚期,目前尚无早期诊断或治疗ccRCC的生物标志物,导致ccRCC预后相对较差^[17]。最近的研究^[18]报道了lncRNA可作为预测癌症预后的生物标志物。本研究中首先通过差异

表达和相关性分析获得了铁死亡相关的lncRNA,进一步建立风险评估模型,分析铁死亡相关lncRNA预测ccRCC预后的可行性。最后,分析铁死亡相关的lncRNA特征与免疫细胞浸润的相关性。

铁死亡作为一种氧化和铁依赖的细胞死亡调节途径,在肿瘤中的功能受到了广泛的关注^[19]。目前,基于铁死亡相关基因的肿瘤预后模型的构建已成为人类癌症风险评估领域的研究热点。LI等^[20]成功构建了一种新的铁死亡相关的lncRNA特征模型,其有助于改善非小细胞肺癌患者的预后预测和免疫治疗反应评估。FEI等^[21]确定了肺腺癌铁死亡相关的预后lncRNA,并构建了一个预后标志物,为肺腺癌患者的预后评估提供了一个新的策略。XING等^[22]确定了3个与铁死亡相关的DEL(DUXAP8、LINC02609和LUCAT1),可作为预测ccRCC患者预后的标志物。在上述研究中,研究者们通过相关分析将lncRNA表达水平与一个或多个铁死亡基因显著相关的lncRNA定义为铁死亡相关的lncRNA。然而,他们没有将铁死亡作为一个重要的调节信号通路,系统地分析其在肿瘤中的功能。在本研究中,采用ssGSEA算法来评估ccRCC组织中铁死亡水平的变化,并将lncRNA

表达水平与铁死亡评分显著相关的lncRNA定义为铁死亡相关lncRNA。进一步通过相关分析、差异表达分析、COX比例风险回归和Kaplan-Meier生存分析,最终获得11个铁死亡相关且可预测患者预后的lncRNA。在本研究中,首次确定了lncRNA特征的铁死亡

相关基因(EMX2OS、LINC00472、COMETT、RTCA-AS1、AL353801.1、LHFPL3-AS2、PRKAR1B-AS1、AC156455.1、CYTOR、AC107021.2和LINC01871)能够预测ccRCC患者的预后,其中有7个lncRNA(EMX2OS、LINC00472、COMETT、RTCA-AS1、

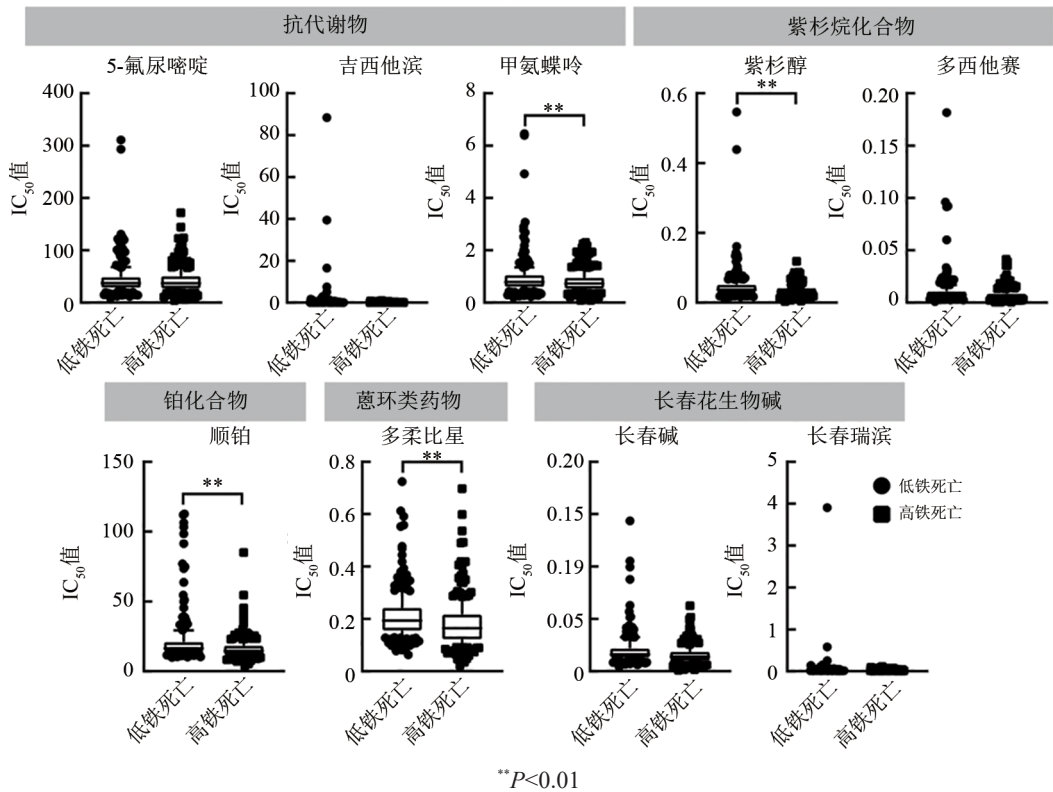
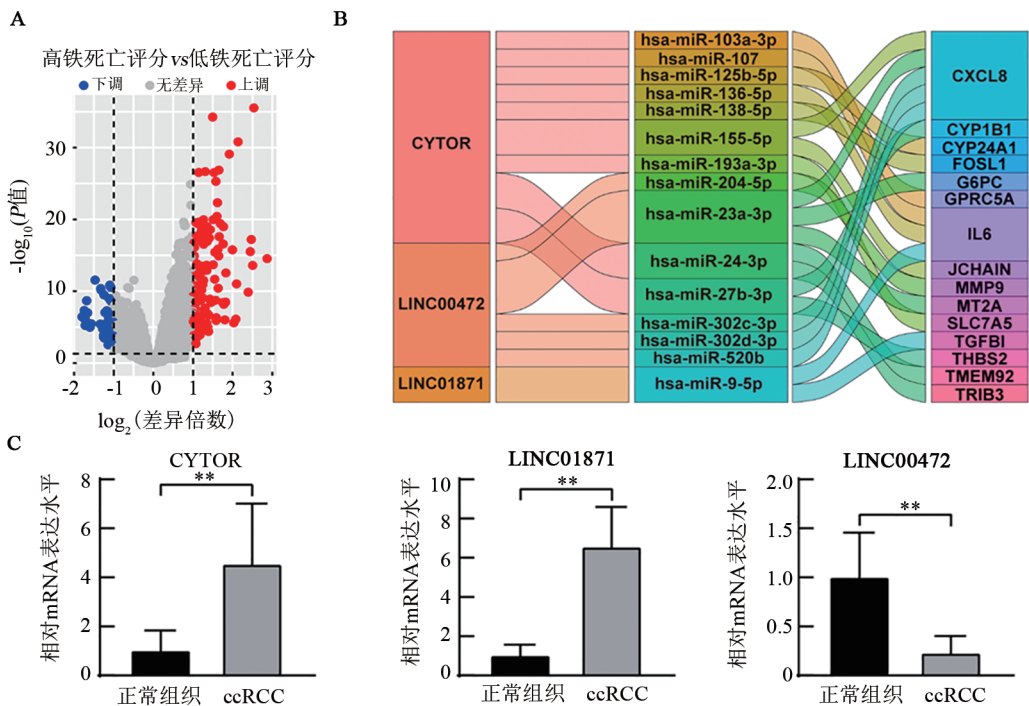


图8 铁死亡评分与化疗药物的敏感性分析



A: 高、低铁死亡评分组 DEG; B: lncRNA 和 miRNA 和 mRNA 相互作用网络; C: 中国人 ccRCC 组织中 DEL 的验证

图9 基于铁死亡相关的lncRNA特征的ceRNA网络构建和验证

AC156455.1、CYTOR 和 LINC01871)与多种类型的肿瘤预后相关。CHEN 等^[15]发现, EMX2OS 和 COMETT 可以作为缺氧相关的 lncRNA 参与 ccRCC 的预后预测。EMX2OS 通过靶向 miR-654-3p 减缓了肾母细胞瘤的进展^[23]。在前列腺癌中, EMX2OS 受 TCF12 调控, 通过与 FUS 相互作用, 激活 cGMP-PKG 信号通路抑制细胞的增殖、迁移和侵袭^[24]。XIANG 等^[25]发现, LINC00472 是与 ccRCC 免疫相关的潜在预后生物标志物。LINC00472 可与乙酰转移酶 P300 相互作用, 影响细胞中 H3K27 位点的乙酰化水平, 增强细胞间黏附, 抑制 ccRCC 细胞增殖^[26]。同时 LINC00472 通过与 YBX1 结合抑制了细胞 EMT 过程, 并影响细胞的力学性能, 最终抑制肺腺癌细胞侵袭和转移^[27]。YANG 等^[28]发现, AC156455.1 是一种基因组不稳定性衍生的 lncRNA, 可作为 ccRCC 患者预后的预测指标。JIANG 等^[29]发现, RTCA-AS1 作为一种自噬相关的 lncRNA 是口腔和口咽鳞状细胞癌患者的独立预后风险指标。TIAN 等^[30]发现, 在肝细胞癌中 CYTOR 通过 miR-125b/SEMA4C 轴促进细胞增殖和肿瘤生长, 同时, CYTOR 与 HNRNPC 相互作用, 通过抑制 HNRNPC 的非降解泛素化导致 ZEB1 mRNA 的稳定, 促进口腔鳞状细胞癌中的异常糖酵解和线粒体呼吸^[31]。XU 等^[32]发现, LINC01871 是一种与铁死亡相关的 lncRNA, 可作为预测乳腺癌预后的新的生物标志物。LHFPL3-AS2 通过与 SFPQ 相互作用调节 TXNIP 表达来抑制非小细胞肺癌的转移^[33]。然而, 目前还没有关于其他 3 种 lncRNA (AL353801.1、PRKAR1B-AS1 和 AC107021.2) 功能的研究报道。本研究可能为 ccRCC 患者的预后预测提供一种新的有效的生物标志物。

ccRCC 是一种高度免疫细胞浸润的肿瘤, 肿瘤免疫浸润与 ccRCC 患者的预后和免疫治疗反应密切相关^[34]。多项研究已证明 ccRCC 免疫细胞浸润与预后不良呈正相关, 提示免疫细胞浸润导致 ccRCC 预后不佳^[35]。ccRCC 浸润免疫细胞类型的百分比差异主要集中于 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞和巨噬细胞^[36]。ccRCC 浸润的 CD8⁺ T 细胞中 NF- κ B 显著激活, 诱导促凋亡程序, 引起更差的总体预后^[37]。有证据表明 miR-29b 和 miR-198 在 ccRCC 患者的 CD8⁺ T 细胞中过表达, 通过下调 JAK3 和 MCL-1 导致 ccRCC 免疫功能障碍^[38]。浸润的 CD4⁺ T 细胞可通过调节 TGF β 1/YBX1/HIF2 α 信号通路来促进 ccRCC 的增殖^[39]。高度浸润的单核细胞在肿瘤微环境中可分化为 M2 型巨噬细胞, 并诱导 CD4⁺ T 细胞表达抑制性分子 PD-1, 分泌免疫抑制细胞因子 IL-10 和 TGF- β , 导致 ccRCC 病死率增加^[40]。研究^[41]表明, M2 型巨噬细胞可通过

分泌 CXCL13 促进 ccRCC 细胞迁移和侵袭。同时缺氧肿瘤相关巨噬细胞来源的外泌体 miR-155-5p 通过 IGF1R/AKT/PI3K 途径促进 ccRCC 进展, 与 ccRCC 患者预后不良有关^[42]。本研究发现, 高铁死亡相关 lncRNA 风险评分的患者有更高的 CTL、ETL、nTreg、iTreg、Tfh、MAIT、DC、单核细胞、NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞浸润, 以及更低的 Th1、Th17、CMT、B 细胞和中性粒细胞细胞的浸润。提示在 ccRCC 中高铁死亡评分的患者有更高程度的免疫细胞浸润, 这可能是 ccRCC 高铁死亡评分患者预后不良的主要原因。进一步的研究发现, 3 种危险的 lncRNA (LINC01871, PRKAR1B-AS1 和 CYTOR) 是调节肿瘤免疫浸润的关键 lncRNA。XU^[32]等和 MAO 等^[43]证明 LINC01871 和 CYTOR 分别与乳腺癌和膀胱尿路上皮癌的免疫浸润有关。本研究可为将来 ccRCC 的靶向治疗提供重要的指导意义。

总之, 本研究建立了一种新的铁死亡相关 lncRNA 模型, 被证明可以进行 ccRCC 患者 OS 的独立预后预测。通过免疫细胞浸润和药物敏感性分析, 证明铁死亡相关 lncRNA 标志物与免疫细胞浸润和化疗药物敏感性密切相关。本研究构建的铁死亡相关 lncRNA 风险预测模型可作为预测 ccRCC 患者能否从免疫治疗及化疗中获益的重要方法。

[参考文献]

- [1] JONASCH E, WALKER C L, RATHMELL W K. Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(4): 245-261. DOI: 10.1038/s41581-020-00359-2.
- [2] RINI B I, CAMPBELL S C, ESCUDIER B. Renal cell carcinoma [J]. *Lancet*, 2009, 373(9669): 1119-1132. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60229-4.
- [3] ATKINS M B, TANNIR N M. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma [J/OL]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 70: 127-137[2022-09-10]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737218301282?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.07.009.
- [4] JIANG T, DIAO X L, DING M L, *et al.* SR-B1 and CD10 combined immunoprofile for differential diagnosis of metastatic clear cell renal cell carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary[J]. *J Mol Histol*, 2021, 52(3): 539-544. DOI: 10.1007/s10735-021-09963-3.
- [5] WU Y Q, ZHANG S W, GONG X X, *et al.* The epigenetic regulators and metabolic changes in ferroptosis-associated cancer progression[J/OL]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 39[2022-09-10]. <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-020-01157-x>. DOI: 10.1186/s12943-020-01157-x.
- [6] LU B, CHEN X B, YING M D, *et al.* The role of ferroptosis in cancer development and treatment response[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 992[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29375387/>. DOI: 10.3389/fphar.2017.00992.
- [7] ZHANG S, CHANG W, WU H, *et al.* Pan-cancer analysis of iron

- metabolic landscape across the Cancer Genome Atlas[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 1013-1024. DOI: 10.1002/jcp.29017.
- [8] MIESS H, DANKWORTH B, GOUW A M, *et al*. The glutathione redox system is essential to prevent ferroptosis caused by impaired lipid metabolism in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2018, 37(40): 5435-5450. DOI: 10.1038/s41388-018-0315-z.
- [9] LIU Y N, DUAN C Y, DAI R Y, *et al*. Ferroptosis-mediated crosstalk in the tumor microenvironment implicated in cancer progression and therapy[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 739392[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34796174/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.739392.
- [10] HU Z W, WEN Y H, MA R Q, *et al*. Ferroptosis driver SOCS1 and suppressor FTH1 independently correlate with M1 and M2 macrophage infiltration in head and neck squamous cell carcinoma[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 727762[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34527677/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.727762.
- [11] NECSULEA A, SOUMILLON M, WARNEFORS M, *et al*. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods [J]. *Nature*, 2014, 505(7485): 635-640. DOI: 10.1038/nature12943.
- [12] ZHAI W, ZHU R J, MA J J, *et al*. A positive feed-forward loop between lncRNA-URRCC and EGFL7/P-AKT/FOXO3 signaling promotes proliferation and metastasis of clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 81[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30953521/>. DOI: 10.1186/s12943-019-0998-y.
- [13] MA T M, WANG X N, WANG J W, *et al*. N6-methyladenosine-related long non-coding RNA signature associated with prognosis and immunotherapeutic efficacy of clear-cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Front Genet*, 2021, 12: 726369[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34721523/>. DOI: 10.3389/fgene.2021.726369.
- [14] MA W, ZHONG M L, LIU X W. Identification of a glycolysis-related lncRNA prognostic signature for clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Biosci Rep*, 2021, 41(8): BSR20211451[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34402862/>. DOI: 10.1042/BSR20211451.
- [15] CHEN H L, PAN Y, JIN X X, *et al*. Identification of a four hypoxia-associated long non-coding RNA signature and establishment of a nomogram predicting prognosis of clear cell renal cell carcinoma [J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 713346[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34386428/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.713346.
- [16] XUAN Y D, CHEN W H, LIU K, *et al*. A risk signature with autophagy-related long noncoding RNAs for predicting the prognosis of clear cell renal cell carcinoma: based on the TCGA database and bioinformatics[J/OL]. *Dis Markers*, 2021, 2021: 8849977[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34040677/>. DOI: 10.1155/2021/8849977.
- [17] DE MEERLEER G, KHOO V, ESCUDIER B, *et al*. Radiotherapy for renal-cell carcinoma[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(4): e170-e177[2022-09-10]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204513705692>. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70569-2.
- [18] MA E S, HOU S, WANG Y, *et al*. Identification and validation of an immune-related lncRNA signature to facilitate survival prediction in gastric cancer[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 666064[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34760687/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.666064.
- [19] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, *et al*. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [20] LI M, ZHANG Y P, FAN M, *et al*. Identification of the ferroptosis-related long non-coding RNAs signature to improve the prognosis prediction and immunotherapy response in patients with NSCLC [J/OL]. *BMC Med Genomics*, 2021, 14(1): 286[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34861872/>. DOI: 10.1186/s12920-021-01133-4.
- [21] FEI X, HU C L, WANG X Y, *et al*. Construction of a ferroptosis-related long non-coding RNA prognostic signature and competing endogenous RNA network in lung adenocarcinoma[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 751490[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34820377/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.751490.
- [22] XING X L, YAO Z Y, OU J L, *et al*. Development and validation of ferroptosis-related lncRNAs prognosis signatures in kidney renal clear cell carcinoma[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 591[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34736453/>. DOI: 10.1186/s12935-021-02284-1.
- [23] CHEN Z H, CUI M Y, ZHANG H M. EMX2OS delays Wilms' Tumor progression via targeting miR-654-3p[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2022, 52(1): 12-20.
- [24] WANG Z Q, ZHANG C W, CHANG J K, *et al*. lncRNA EMX2OS, regulated by TCF12, interacts with FUS to regulate the proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells through the cGMP-PKG signaling pathway[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 7045-7056[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32801740/>. DOI: 10.2147/OTT.S243552.
- [25] XIANG Z F, SHEN E D, LI M Y, *et al*. Potential prognostic biomarkers related to immunity in clear cell renal cell carcinoma using bioinformatic strategy[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 1773-1790. DOI: 10.1080/21655979.2021.1924546.
- [26] WANG S M, LUO C, LI B, *et al*. LINC00472 inhibits cell migration by enhancing intercellular adhesion and regulates H3K27ac level via interacting with P300 in renal clear cell carcinoma[J/OL]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 454[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36371410/>. DOI: 10.1038/s41420-022-01243-7.
- [27] DENG X Y, XIONG W, JIANG X J, *et al*. lncRNA LINC00472 regulates cell stiffness and inhibits the migration and invasion of lung adenocarcinoma by binding to YBX1[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 945[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33144579/>. DOI: 10.1038/s41419-020-03147-9.
- [28] YANG H Y, XIONG X L, LI H. Development and interpretation of a genomic instability derived lncRNAs based risk signature as a predictor of prognosis for clear cell renal cell carcinoma patients[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 678253[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34094983/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.678253.
- [29] JIANG Q K, XUE D F, SHI F Z, *et al*. Prognostic significance of an autophagy-related long non-coding RNA signature in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1): 29[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33240435/>. DOI: 10.3892/ol.2020.12290.
- [30] TIAN Q, YAN X D, YANG L, *et al*. lncRNA CYTOR promotes cell proliferation and tumor growth via miR-125b/SEMA4C axis in

- hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2021, 22(5): 796[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34584571/>. DOI: 10.3892/ol.2021.13057.
- [31] ZHU W W, WANG J, LIU X, *et al.* lncRNA CYTOR promotes aberrant glycolysis and mitochondrial respiration *via* HNRNPC-mediated ZEB1 stabilization in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8): 703[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35963855/>. DOI: 10.1038/s41419-022-05157-1.
- [32] XU Z J, JIANG S X, MA J, *et al.* Comprehensive analysis of ferroptosis-related lncRNAs in breast cancer patients reveals prognostic value and relationship with tumor immune microenvironment[J/OL]. *Front Surg*, 2021, 8: 742360[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34671639/>. DOI: 10.3389/fsurg.2021.742360.
- [33] CHENG Z A, LU C L, WANG H, *et al.* Long noncoding RNA LHFPL3-AS2 suppresses metastasis of non-small cell lung cancer by interacting with SFPQ to regulate TXNIP expression[J/OL]. *Cancer Lett*, 2022, 531: 1-13[2022-09-10]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383522000477?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.canlet.2022.01.031.
- [34] LI Z, YANG W P, QIU J H, *et al.* Decreased interferon regulatory factor 6 expression due to DNA hypermethylation predicts an unfavorable prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2021, 12(22): 6640-6655. DOI: 10.7150/jca.62394.
- [35] GAO S, YAN L, ZHANG H, *et al.* Identification of a metastasis-associated gene signature of clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Front Genet*, 2020, 11: 603455[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33613617/>. DOI: 10.3389/fgene.2020.603455.
- [36] SU S, AKBARINEJAD S, SHAHRIYARI L. Immune classification of clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 4338[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33619294/>. DOI: 10.1038/s41598-021-83767-z.
- [37] KOURTIS N, WANG Q Q, WANG B, *et al.* A single-cell map of dynamic chromatin landscapes of immune cells in renal cell carcinoma[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(7): 885-898. DOI: 10.1038/s43018-022-00391-0.
- [38] GIGANTE M, PONTRELLI P, HERR W, *et al.* MiR-29b and miR-198 overexpression in CD8⁺ T cells of renal cell carcinoma patients down-modulates JAK3 and MCL-1 leading to immune dysfunction[J/OL]. *J Transl Med*, 2016, 14: 84[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27063186/>. DOI: 10.1186/s12967-016-0841-9.
- [39] WANG Y, WANG Y T, XU L, *et al.* CD4⁺ T cells promote renal cell carcinoma proliferation *via* modulating YBX1[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(1): 95-101. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.12.026.
- [40] MACFARLANE A W 4th, JILLAB M, PLIMACK E R, *et al.* PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(4): 320-331. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0133.
- [41] XIE Y W, CHEN Z L, ZHONG Q Y, *et al.* M2 macrophages secrete CXCL13 to promote renal cell carcinoma migration, invasion, and EMT[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 677[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34922542/>. DOI: 10.1186/s12935-021-02381-1.
- [42] GU W Y, GONG L J, WU X, *et al.* Hypoxic TAM-derived exosomal miR-155-5p promotes RCC progression through HuR-dependent IGF1R/AKT/PI3K pathway[J/OL]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 147[2022-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34131104/>. DOI: 10.1038/s41420-021-00525-w.
- [43] MAO X D, CHEN S H, LI G H. Identification of a ten-long noncoding RNA signature for predicting the survival and immune status of patients with bladder urothelial carcinoma based on the GEO database: a superior machine learning model[J]. *Aging*, 2021, 13(5): 6957-6981. DOI: 10.18632/aging.202553.

[收稿日期] 2022-12-15

[修回日期] 2023-02-17

[本文编辑] 向正华,沈志超