

构建 lncRNA 模型探索膀胱癌的免疫治疗进展

赵琪¹ 郭峰¹ 熊鹰²

1 长江大学医学部; 2 荆州市第一人民医院科教科, 中国·湖北 荆州 434000

【摘要】由免疫相关的长非编码核糖核酸(irlncRNAs)组成的信号标记对预测膀胱癌患者预后具有一定的价值。本研究,检索了癌症基因组图谱(TCGA)的原始转录组数据,通过差异分析和共表达分析鉴定了具有差异表达的irlncRNA,并通过多变量分析鉴定了配对irlncRNA。然后比较曲线下面积,计算受试者工作特征曲线的AIC值,确定分界点,建立膀胱癌高、低危人群的最优判别模型。共鉴定出36对irlncRNA,其中10对纳入Cox回归模型。按分界点重新分组后,根据患者的不良生存结局、侵袭性临床病理特征、特定的肿瘤免疫浸润状态、化疗敏感性低和免疫抑制标志物的表达,可以更有效地区分它们。通过配对irlncRNA所建立的特征模型显示出良好的临床预测价值。

【关键词】长链非编码RNA; 生物标志物; 膀胱癌; 免疫微环境

1 介绍

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率近年来呈上升趋势^[1]。早期膀胱癌预后较好,但易复发发展为肌肉浸润性膀胱癌(MIBC)。并且MIBC侵袭转移能力强,预后差,5年生存率不足50%^[2]。因此,迫切需要寻找新的生物标志物来更准确地评估膀胱癌患者的临床预后。

随着对免疫检查点机制的认识和利用抗体阻断检查点治疗某些癌症的成功,免疫治疗已成为癌症研究的热点之一,有望获得持久的治疗效果^[3]。多项试验已经解决了检查点抑制剂在晚期膀胱癌中的作用,包括阿维鲁单抗(针对PD1/PD-L1通路)^[4]。虽然这些试验与现有疗法相比具有更好的结果和改善,但只有不到一半的晚期疾病患者能从检查点抑制剂疗法中获得临床益处^[5]。目前还没有成熟有效的膀胱免疫治疗方法。显然,为了降低膀胱癌的死亡率,需要更多的肿瘤免疫的潜在机制来提高疗效,增加治疗的耐受性,并识别基于免疫的新疗法^[6]。

长的非编码RNA(lncRNA)是一种被广泛定义为大于200nt的转录本,几乎没有编码蛋白质的潜力^[7]。一些lncRNA的异常表达可能影响肿瘤细胞的增殖、进展或转移^[8]。随着生物信息学技术的发展,人们可以大规模研究lncRNA在肿瘤和正常组织中的表达谱,发现在各种肿瘤中都有大量的lncRNA异常表达,但这些lncRNA的功能尚不清楚^[9]。最近的证据表明lncRNA通过引导免疫细胞活化相关基因的表达,从而导致肿瘤免疫细胞浸润^[10]。lncRNA聚焦于肿瘤免疫浸润的标志物在癌症的诊断、评估和治疗中显示出良好的预测和预后价值^[11,12]。

当前,就癌症诊断模型的准确性而言,配对组合的生物标记物优于单个标记物^[13]。当前没有模型研究过配对免疫相关lncRNA在膀胱癌的作用。我们使用了一种新的建模算法,即配对和迭代来构建irlncRNA签名,该签名不需要任何特定的

lncRNA表达水平。然后,我们评估了它在膀胱癌患者中的预测价值,以及它的诊断效果、化疗效果和肿瘤免疫浸润。

2 材料和方法

2.1 转录组数据的检索和计算分析

从肿瘤基因组图谱数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)收集膀胱癌患者的临床特征、RNA-seq表达数据和体细胞突变信息。共收集RNA-seq表达数据样本433份,其中正常样本19份,肿瘤样本414份。从Ensembl(<http://asia.ensembl.org>)数据库中下载用于注释的GTF文件,以区分mRNA和lncRNA。从ImmPort(<http://www.immport.org>)数据库下载识别免疫相关基因列表,并通过共表达分析筛选免疫相关lncRNA,免疫基因相关系数大于0.4,P值小于0.001的视为免疫相关lncRNA(irlncRNA)。我们使用R软件Limma包对irlncRNA之间的差异表达进行了分析。阈值设定为log fold change(FC)>1.5,FDR<0.05。

2.2 配对差异表达的irlncRNA

将差异表达的irlncRNA循环单对配对,假设 $X=lncRNAa+lncRNAb$,并构造0-或-1矩阵;如果lncRNAa的表达水平高于lncRNAb,则X定义为1,否则为0。然后,对构建的0-或-1矩阵进行进一步筛选。当lncRNA配对表达量为0或1时,则不考虑配对与预后的关系,因为没有一定等级的配对不能正确预测患者的生存结局。当表达量为0或1的lncRNA对的数量占总配对的20%以上时,被认为是有效匹配。

2.3 建立风险模型

首先进行单因素分析,然后进行Lasso回归,10倍交叉验证,P值为0.05。Lasso回归测试进行1000个周期,每一个周期,随机计算设置1000次。然后记录每一对在重复1000次的Lasso回归模型中出现的频率,选择频率超过100次的配对lncRNA进行Cox比例风险回归分析,并构建模型。计算各模型的AUC值并绘制

成曲线。曲线达到最高点，即AUC值最大，则终止计算过程，将模型作为最优候选模型。绘制模型的1、2、3年ROC曲线。根据构建的风险模型计算所有临床病例的风险评分公式为：风险评分 = $\sum_{i=1}^n \alpha_i * Si$ (α 为配对基因系数，S为配对基因的风险值)。通过评估ROC曲线各点的AIC值，找出最大拐点，以此作为判别风险模型高低风险的分界点。

2.4 对构建的风险模型进行验证

为了验证这个分界点，我们进行Kaplan-Meier分析，显示高、低危组患者的生存差异，并使用生存曲线进行可视化。模型中每个样本的具体风险评分值也通过R工具可视化。在这些步骤中使用的R包包括survival、glmnet、pbapply、survivalROC、survminer和pHeatmap。

为了验证所构建模型的临床应用价值，我们采用卡方检验分析模型与临床病理特征的关系。条形图用于显示，标记为： $<0.001=***$ ， $<0.01=**$ ， $<0.05=*$ 。采用Wilcoxon signed-rank检验计算这些临床病理特征在不同组间的风险评分差异。采用箱形图显示分析结果。为了确认该模型是否可以作为独立的临床预后预测因子，我们在风险评分和临床病理特征之间进行了单因素和多因素Cox回归分析，由森林图对结果可视化。在这些操作中使用的R包是survival、pHeatmap，和ggpubr。

2.5 肿瘤浸润免疫细胞的研究

为了分析风险模型和免疫细胞特征之间的关系，我们考虑了目前公认的免疫细胞浸润状态的算法，包括TIMER、CIBERSORT、XCELL、QUANTISEQ、MCPcounter，和EPIC。采用Wilcoxon signed-rank检验，分析上述方法所构建模型中免疫浸润细胞含量在高、低风险组间的差异；结果显示在一个箱形图中。采用Spearman相关性分析，分析RiskScore值与免疫浸润细胞的关系。结果的相关系数用棒图表示。显著性阈值设置为 $P<0.05$ 。该过程使用R ggplot2包执行。

2.6 探讨风险模型在临床治疗中的意义

为了评估我们的风险模型在临床中用于膀胱癌的治疗，我们计算了常用化疗药物的IC50与风险模型的相关性。临床上常用的化疗药物主要有比卡鲁胺、硼替佐米、顺铂、达沙替尼、伊马替尼和紫杉醇等。通过Wilcoxon signed-rank检验比较高、低风险组与常用化疗药物的IC50的差异，使用箱线图对结果可视化。

3 结果

3.1 差异表达lincRNAs(DeirlincRNAs)的鉴定

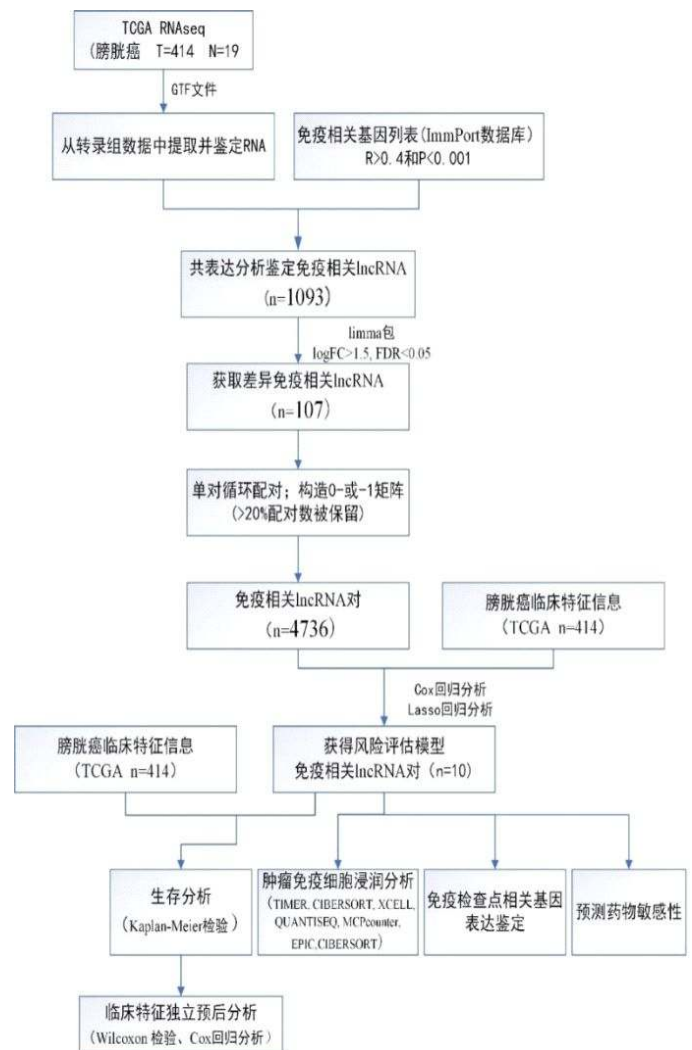


图1 流程

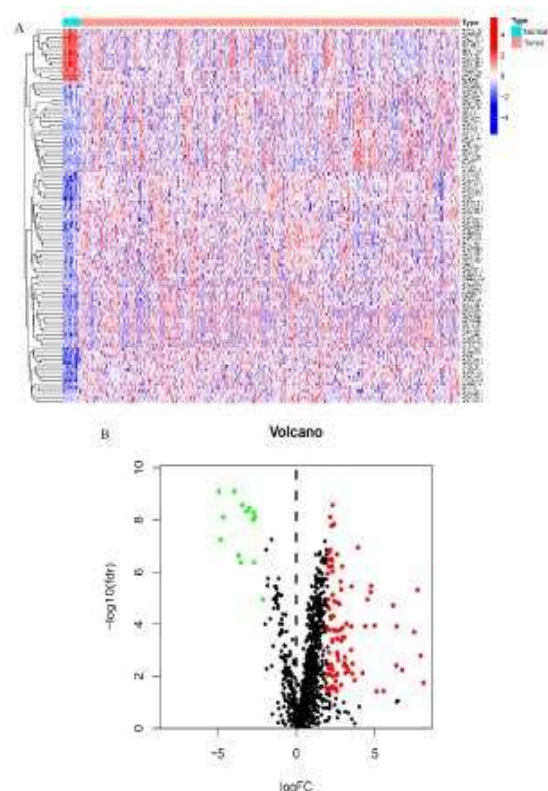


图2 A.差异lincRNAs; B.92个上调和15个下调

本研究的流程如图1所示。从TCGA数据库检索膀胱癌的转录组数据,根据Ensembl的基因转换格式文件(GTF)对数据进行注释,并在已知的免疫相关基因和lncRNA之间进行共表达分析。总共鉴定出1093个irlncRNA,107个被区分为DEirlncRNAs,其中92个上调,15个下调(图2A,B)。

3.2 irlncRNA对的建立及风险评估模型

通过迭代循环和0-或-1矩阵筛选,从107个差异表达的irlncRNAs中鉴定出4736个有效的irlncRNA对。对上述irlncRNA对通过单因素Cox分析(显著性过滤条件: pFilter=0.001)获得36个irlncRNAs对,最后基于这36个irlncRNAs对进行修正Lasso回归分析和多因素Cox分析获得10对irlncRNA对的Cox比例风险模型(图2C)。接下来,我们计算模型(ROC)曲线下面积(AUCs),

从而确定最理想的irlncRNA对具有最大的AUC值,AUC=0.793(图3A)。为了验证最佳性,我们不仅绘制了1年、2年和3年的ROC曲线(图3B),而且还将我们的风险评估模型的ROC曲线与其他临床特征(Age,Gender,Grade,Stage)进行了比较(图3C)。我们还使用Akaike信息标准(AIC)值识别了风险评估模型的ROC曲线最大截止点(Cutoff=1.346,图3D)。

3.3 风险评估模型在临床评价中的应用

我们使用确定的截断点重新区分队列中的高、低风险组进行验证。将163例归入高危人群,240例归入低危人群。每个病例的风险评分和存活率如图4A和图4B所示。这些数字表明,低风险组患者的临床结果优于高风险组。Kaplan-Meier分析显示,低风险组患者的生存时间明显长于高风险组(图4C)。然后,我们进行了一系列的卡方检验来研究膀胱癌的风险与临床病理特征之间的关系。经Wilcoxon test得到的条形图(图5A)和散点图显示,我们发现T分期(图5B)、N分期、M期、肿瘤分级、临床分期和年龄分组与风险显著相关。单因素COX回归分析显示, Age(P<0.001, HR=1.038, 95%CI[1.021-1.056])、Stage(P<0.001, HR=1.802, 95%CI[1.461-2.222])和 RiskScore(P<0.001, HR=1.379, 95%CI [1.308-1.454])有统计学意义(图5B)。多变量COX回归分析结果与单因素COX回归分析结果是一致的 Age、Stage、riskScore均可作为膀胱癌独立的预后危险因素(图5C)。

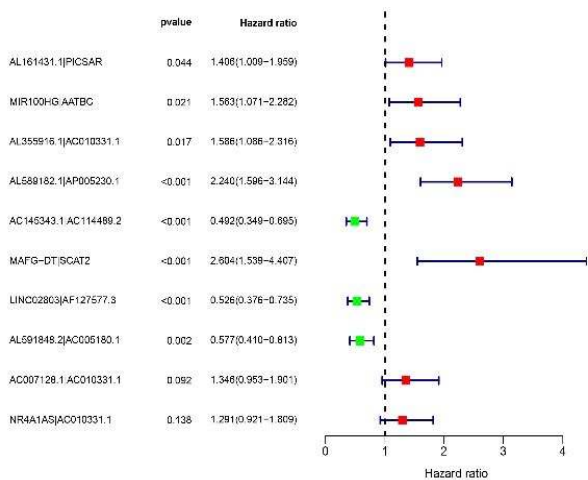


图2 C.10对irlncRNA对的Cox比例风险模型

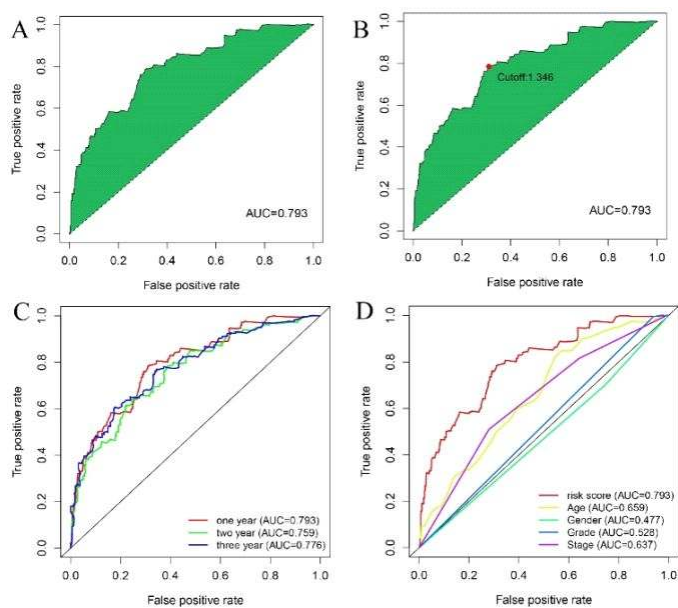
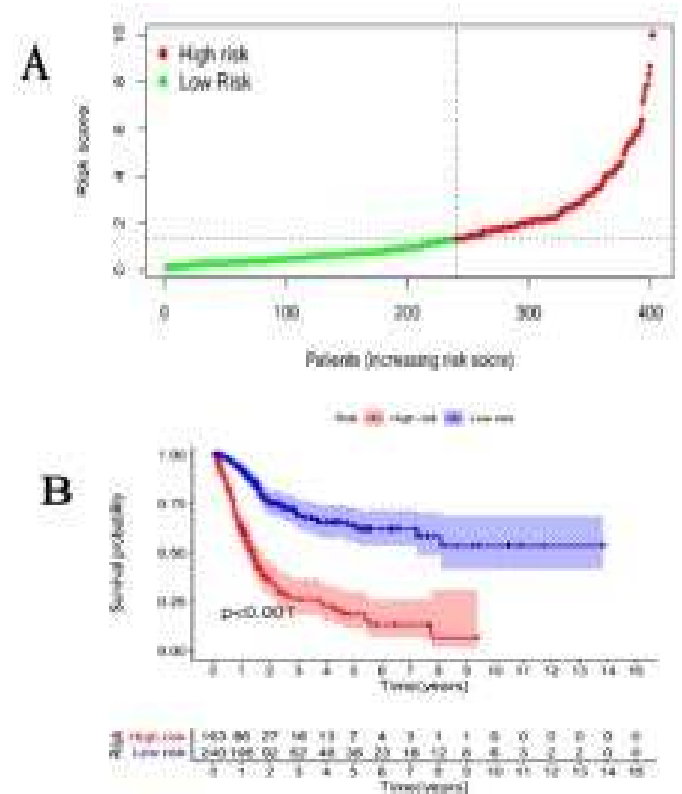


图3 A.最大的AUC值;B.1年、2年和3年的ROC曲线;C.模型与其他临床特征比较;D.模型的ROC曲线最大截止点



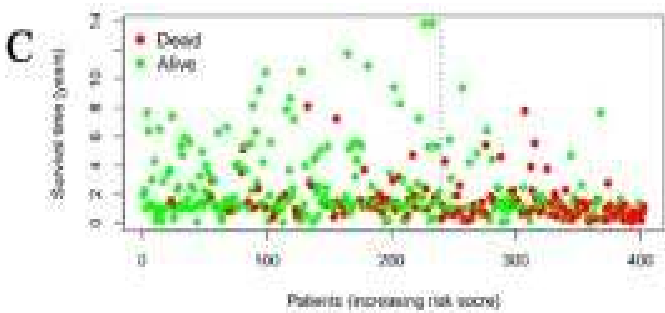


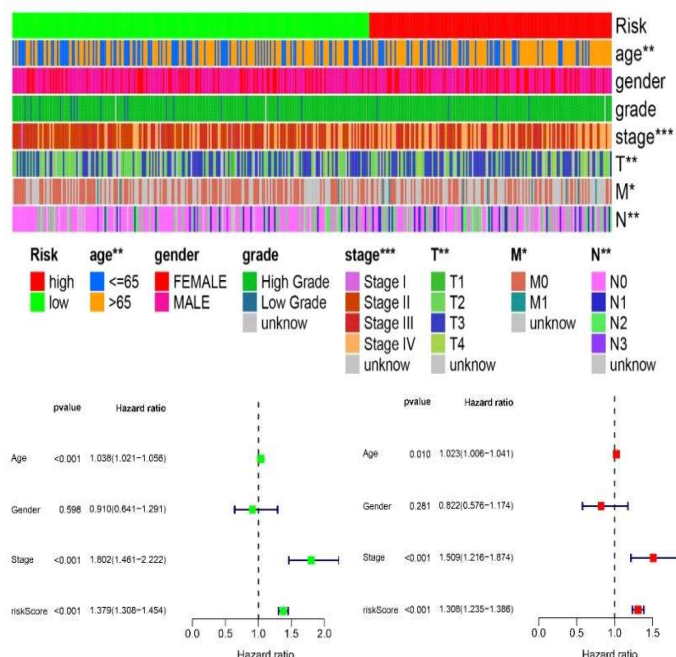
图4 A.风险评分;B.存活率;C.生存时间对比

图5 A.各临床特征与风险模型的条形图;

图5 B. H.RiskScore(P<0.001, HR=1.379, 95%CI[1.308-1.454]);C.独立的预后危险因素

3.4用风险评估模型估计肿瘤浸润性免疫细胞和免疫生物学分子

为研究风险模型是否与肿瘤免疫微环境有关。我们发现风险模型高危组与肿瘤浸润性免疫细胞如 Cancer associated fibroblast、Macrophage M1、Macrophage M2、Macrophage、Monocyte、Myeloid dendritic cell activated、和 T cell CD4+ 呈正相关，而与 T cell CD8+ 呈负相关，经 Wilcoxon 检验证实。进行了详细的 Spearman 相关分析，结果图显示为如图 6A 所示。Lima 等人基于一组独立的生物学标记物评价了卡介苗免疫治疗结果的预测价值^[14]，Hoft 等人发现卡介苗与 CD4+ 的聚集密切相关^[15]，因此我们评估了该生物学标记物与我们的风险模型的相关性，结果发现白细胞介素 2 受体 α (IL2RA; P<0.001,图 6B),CD4+(P<0.05,图 6C)与高危评分组正相关性；成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 基因长期以来与膀胱癌的发生有关，其与抗肿瘤免疫反应的反向关系，在



免疫治疗中变得尤为重要^[16]，我们发现FGFR3(P<0.01,图6D)与高危评分组负相关性。此外，我们发现免疫检查点抑制剂在膀胱癌的免疫治疗中具有重要的作用^[15]，因此我们探讨 ICI 相关的生物标志物，发现高危评分组与 HAVCR2(P<0.001,图 6E)的高表达呈正相关，与 CEACAM1(P<0.01,图 6F)、LGALS9(P<0.01,图 6G)呈负相关性。

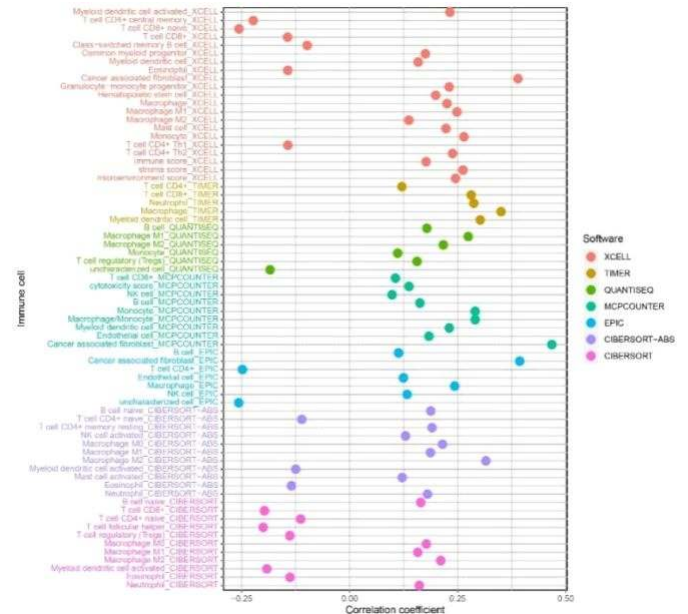
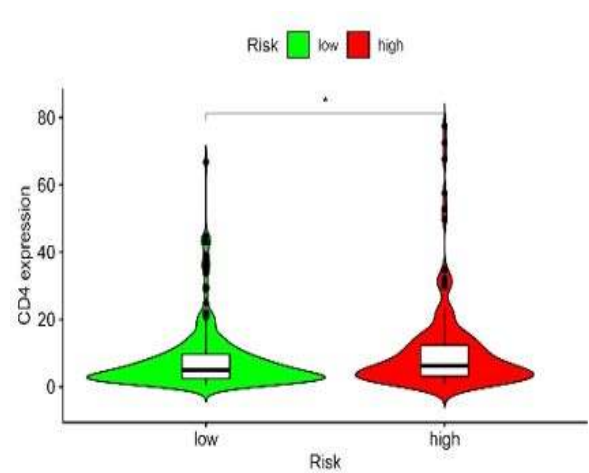
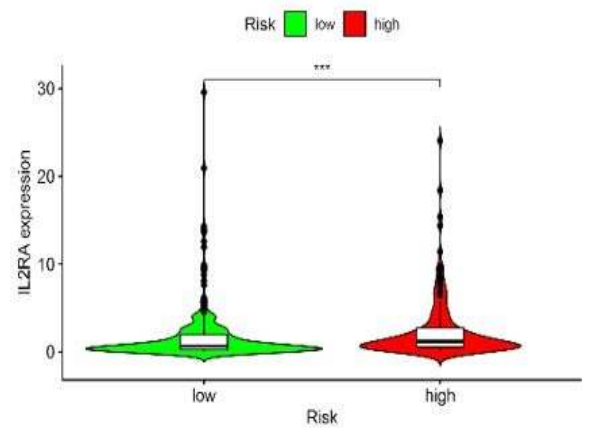


图6 A.Spearman相关分析



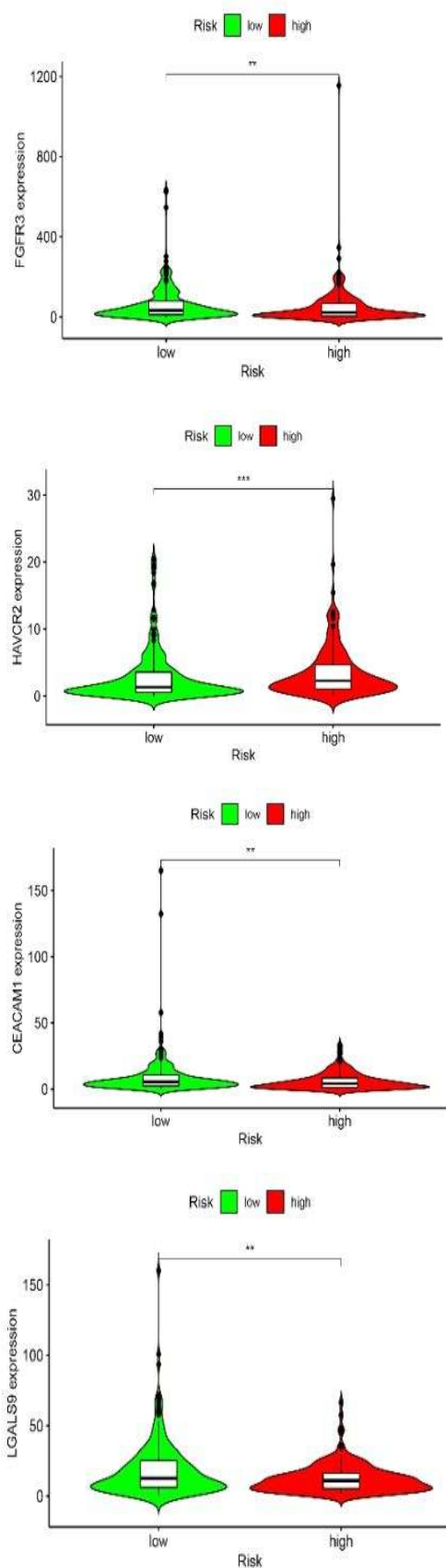


图6 B.IL2RA,P<0.001;C.CD4+,P<0.05;D.FGFR3,P<0.01;E.HAVCR2,
P<0.001;F.CEACAM1,P<0.01;G.LGALS9,P<0.01

3.5 风险模型与化疗药物的相关性分析

在膀胱癌非手术治疗中除了使用卡介苗,免疫检查点抑制等免疫治疗的方法,我们经常结合一些化疗药物进行辅助治疗,因此,我们探讨了我们的风险模型对一些常见的化疗药物治疗膀胱癌的风险和疗效之间的关联。我们发现高风险评分组与化疗药物如蓓萨罗丁、比卡鲁胺、硼替佐米、顺铂、环巴胺、达沙替尼、Epothilone.B、伊马替尼、米喋妥林和紫杉醇的较低半数抑制浓度(IC50)相关,而与吉非替尼、来那度胺的较高IC50相关。这表明该模型可作为化疗敏感性的潜在预测因子(图7)。

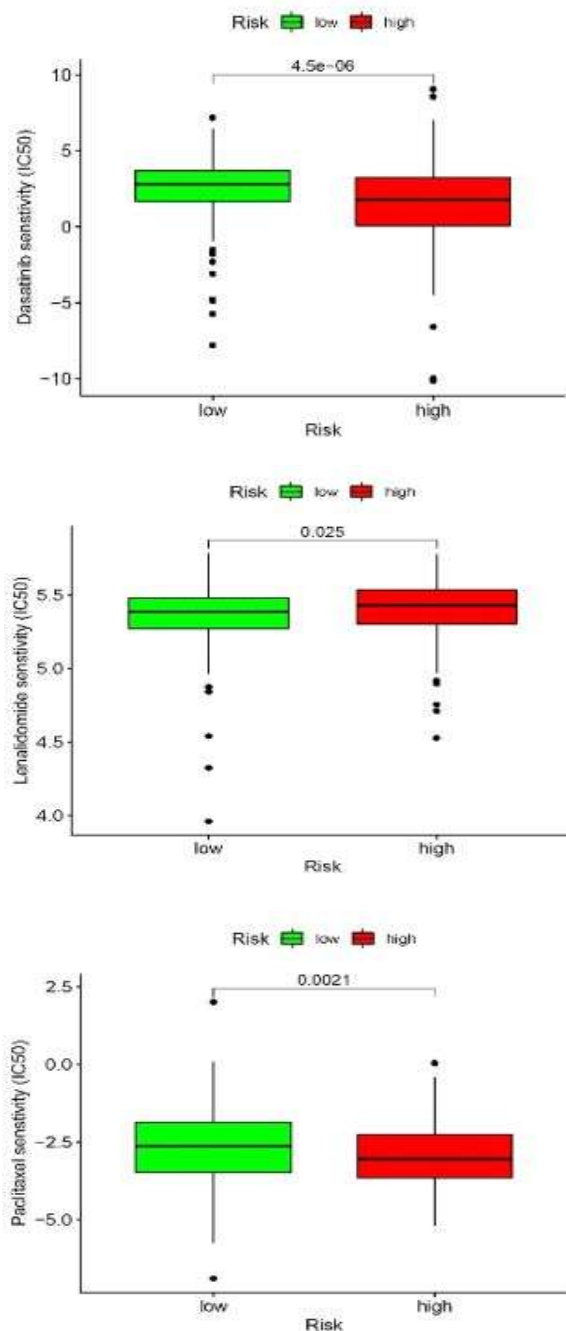


图7 化疗药物与低IC50相关A.比卡鲁胺;B.硼替佐米;C.顺铂;D.达沙替
尼;E.伊马替尼;F.紫杉醇

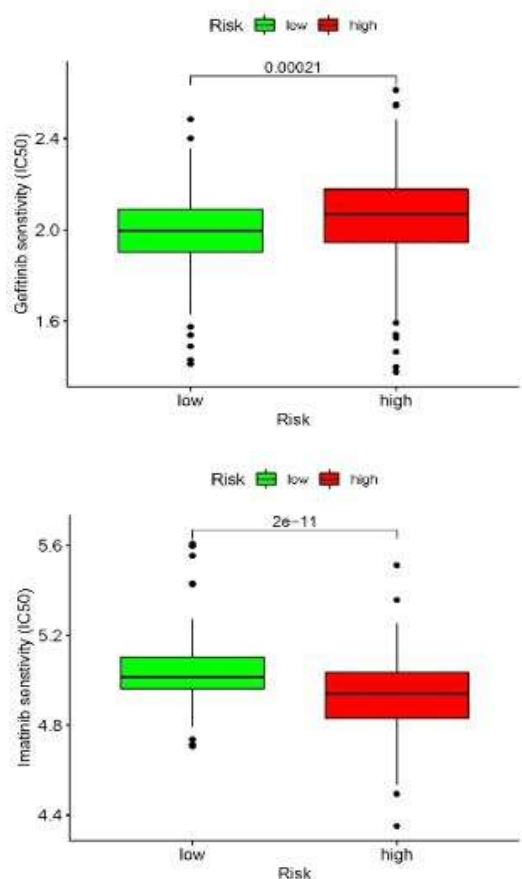


图7 化疗药物与IC50高相关G.吉非替尼;H.来那度胺

4 讨论

膀胱癌是泌尿生殖系统最重要的恶性肿瘤之一，其发病率和死亡率都很高。现在更多的研究发现肿瘤中免疫调节对癌细胞的增殖、侵袭具有深远的影响^[17]。肿瘤样本的全基因组研究已经确定了大量与各种类型癌症相关的lncRNAs。因此，lncRNAs作为肿瘤的新生物标志物和治疗靶点具有很强的应用前景^[18]。

越来越多的证据表明，配对基因产物在触发免疫时具有重要的作用，通过考虑基因对之间的关系，可以提高免疫检测的认识和预测能力^[19]。在本研究中，我们将免疫相关的lncRNA组合来构建一个风险预后模型，评估其在免疫治疗中的有效性。并区分膀胱癌患者的高危组和低危组。最后，我们在包括生存率、临床病理特征、肿瘤浸润性免疫细胞、化疗和检查点相关生物标志物在内的各种临床环境下对该新模型进行了评估。

通过算法表明，该模型具有较强的临床实用性，较前人研究的通过一系列lncRNA构建的模型更具有可靠性。可用于区分临床样本的高风险或低风险。此外，我们构建的模型中一些lncRNA已被证实在多种肿瘤的发生发展中具有重要的作用，如在皮肤鳞状细胞癌中被证实 PICSAR 基因敲除通过调节 miR-125b/YAP1 轴抑制 CSCC 细胞增殖和侵袭，促进细胞凋亡^[20]。黄等人证实了

LncRNA MIR100HG通过下调miR-204-5p促进喉鳞癌中癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[21]。已有研究证实MAFG-DT与膀胱癌浸润性B淋巴细胞的浸润密切相关，可作为免疫治疗反应潜在的预测生物标志物^[22]。因此，我们所提出的模型所鉴定的生物标志物具有高度的可靠性，为膀胱癌的新的生物标记物的研究提供了理论基础。

为了提高风险预测的准确性和有效性，我们采用了 Sveen 等人^[23]提出的修正的Lasso penalized建模方法，将影响因素在重复过程中的发生频度纳入Cox回归模型。并根据AUC及AIC值进一步改进了建模过程。我们再次评估了生存结果，进行了临床病理特征的单因素和多因素分析，并分析了有关化疗药物对膀胱癌治疗、肿瘤免疫浸润和与检查点抑制剂相关的生物标志物的疗效，结果表明该建模算法效果良好。

肿瘤间浸润的免疫细胞影响抗检查点阻断的反应。有研究证实高级别浆液性卵巢癌的肿瘤免疫微环境本质上是异质性的，化疗诱导局部免疫激活，提示化疗可以增强免疫排斥HGSOc肿瘤的免疫原性^[24]。这些证据表明了探究免疫细胞在肿瘤中的浸润给我们的研究带来了新的思路。本研究探讨了风险评分与肿瘤浸润免疫细胞之间的关系，我们使用了七种常见的有效的算法来估计免疫浸润细胞。由于这些算法的复杂性和缺陷，前人在使用的过程中各算法所分析出的结果很少进行互比较，因此，通过我们的整合分析发现 DEirLncRNA 对与 Cancer associated fibroblast、Macrophage M0、Macrophage M1、Macrophage M2、Macrophage、Monocyte、Myeloid dendritic cell activated、T cell CD4+、T cell CD8+等肿瘤浸润性免疫细胞有着强烈的相关性。虽然癌症化疗被认为具有免疫抑制作用，但最近免疫检查点抑制剂的成功重新引起了人们对免疫疗法的兴趣，并将其与化疗结合起来，通过体内平衡机制增强持续的免疫反应^[25]，以实现附加或协同的临床活性^[26]。我们的免疫相关的配对lncRNA模型表明高风险评分与化疗药物如蓓萨罗丁、比卡鲁胺、硼替佐米、顺铂、环巴胺、达沙替尼、Epothilone.B、伊马替尼、米喹妥林和紫杉醇的较低半数抑制浓度(IC50)相关，而与吉非替尼、来那度胺的较高IC50相关。因此，这些化疗药物可能与免疫治疗具有协调作用。

总之，这项研究表明，由irLncRNAs构建的不需要评估lncRNA表达水平的新标记物可以预测膀胱癌患者的预后，并可能有助于区分哪些人可以从抗肿瘤免疫治疗中受益。

参考文献:

- [1] Banerjee, S. and J. Southgate, Bladder organoids: a step towards personalised cancer therapy? *Transl Androl Urol*, 2019. 8(Suppl 3): p. S300–S302.
- [2] Tse, J., et al., Current advances in BCG-unresponsive non-muscle invasive bladder cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019. 28(9): p. 757–770.
- [3] Song, D., et al., Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches. *J Pathol*, 2019. 249(2): p. 151–165.
- [4] Zhou, T. C., et al., A review of the PD-1/PD-L1 checkpoint in bladder cancer: From mediator of immune escape to target for treatment. *Urol Oncol*, 2017. 35(1): p. 14–20.
- [5] Singh, P. and P. Black, Emerging role of checkpoint inhibition in localized bladder cancer. *Urol Oncol*, 2016. 34(12): p. 548–555.
- [6] Crispin, P. L. and S. Kusmartsev, Mechanisms of immune evasion in bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2020. 69(1): p. 3–14.
- [7] Choudhari, R., et al., Long noncoding RNAs in cancer: From discovery to therapeutic targets. *Adv Clin Chem*, 2020. 95: p. 105–147.
- [8] Sun, W., N. M. Shen, and S. L. Fu, Involvement of lncRNA-mediated signaling pathway in the development of cervical cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019. 23(9): p. 3672–3687.
- [9] Chakraborty, S., et al., Harnessing the tissue and plasma lncRNA-peptidome to discover peptide-based cancer biomarkers. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 12322.
- [10] Atianand, M. K., D. R. Caffrey, and K. A. Fitzgerald, Immunobiology of Long Noncoding RNAs. *Annu Rev Immunol*, 2017. 35: p. 177–198.
- [11] Lopes, N., et al., Cracking the Breast Cancer Glyco-Code through Glycan-Lectin Interactions: Targeting Immunosuppressive Macrophages. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(4).
- [12] Fridlender, Z. G., et al., Using macrophage activation to augment immunotherapy of established tumours. *Br J Cancer*, 2013. 108(6): p. 1288–97.
- [13] Hong, W., et al., Immune-Related lncRNA to Construct Novel Signature and Predict the Immune Landscape of Human Hepatocellular Carcinoma. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020. 22: p. 937–947.
- [14] Lima, L., et al., The role of functional polymorphisms in immune response genes as biomarkers of bacille Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy outcome in bladder cancer: establishment of a predictive profile in a Southern Europe population. *BJU Int*, 2015. 116(5): p. 753–63.
- [15] Hofst, D. F., et al., PO and ID BCG vaccination in humans induce distinct mucosal and systemic immune responses and CD4(+) T cell transcriptomal molecular signatures. *Mucosal Immunol*, 2018. 11(2): p. 486–495.
- [16] Kacew, A. and R. F. Sweis, FGFR3 Alterations in the Era of Immunotherapy for Urothelial Bladder Cancer. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 575258.
- [17] Butt, S. U. and L. Malik, Role of immunotherapy in bladder cancer: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018. 81(4): p. 629–645.
- [18] Han, A., M. Soleimani, and S. S. Mandal, Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res*, 2017. 77(15): p. 3965–3981.
- [19] van Wersch, S. and X. Li, Stronger When Together: Clustering of Plant NLR Disease resistance Genes. *Trends Plant Sci*, 2019. 24(8): p. 688–699.
- [20] Lu, X., et al., Long non-coding RNA PICRAR knockdown inhibits the progression of cutaneous squamous cell carcinoma by regulating miR-125b/YAP1 axis. *Life Sci*, 2021. 274: p. 118303.
- [21] Huang, Y., C. Zhang, and Y. Zhou, lncRNA MIR100HG promotes cancer cell proliferation, migration and invasion in laryngeal squamous cell carcinoma through the downregulation of miR-204-5p. *Onco Targets Ther*, 2019. 12: p. 2967–2973.
- [22] Zhou, M., et al., Computational recognition of lncRNA signature of tumor-infiltrating B lymphocytes with potential implications in prognosis and immunotherapy of bladder cancer. *Brief Bioinform*, 2020.
- [23] Sveen, A., et al., ColoGuidePro: a prognostic 7-gene expression signature for stage III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(21): p. 6001–10.
- [24] Jiménez-Sánchez, A., et al., Unraveling tumor-immune heterogeneity in advanced ovarian cancer uncovers immunogenic effect of chemotherapy. *Nat Genet*, 2020. 52(6): p. 582–593.
- [25] Kim, J., M. P. Manspecker, and S. N. Thomas, Augmenting the synergies of chemotherapy and immunotherapy through drug delivery. *Acta Biomater*, 2019. 88: p. 1–14.
- [26] Emens, L. A. and G. Middleton, The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res*, 2015. 3(5): p. 436–43.

作者简介:

赵琪 (1995.01—), 男, 汉族, 湖北黄冈, 长江大学在读硕士研究生, 研究方向: 泌尿系肿瘤。

郭峰 (1998.05—), 男, 汉族, 湖北省仙桃市, 硕士研究生在读, 长江大学医学部研究生院, 研究方向: 泌尿系统肿瘤。

通讯作者:

熊鹰 (1988—), 男, 汉族, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 泌尿系统肿瘤、前列腺疾病。