



·论著·

胶质母细胞瘤患者自噬相关 mRNA 与 lncRNA 的预后判断价值

牛晓辰¹, 姚诗琪², 王春红^{1,3}, 成睿^{1,3}, 吉宏明^{1,3}

1. 山西医科大学第五临床医学院, 山西 太原 030012

2. 山西医科大学第一临床医学院, 山西 太原 030001

3. 山西省人民医院, 山西 太原 030012

摘要:目的 分别构建由自噬相关基因(ATG)与自噬相关lncRNA(ATL)构成的预后模型,预测胶质母细胞瘤(GBM)患者的预后情况,为其个性化诊疗与基础研究提供依据。**方法** 利用TCGA数据库中GBM的测序与临床数据,通过单因素Cox回归分析筛选差异表达且具备预后价值的ATG与ATL,之后通过多因素Cox回归分析分别构建预后模型,根据模型计算患者风险值并验证其有效性。**结果** GBM组织相较于正常组织共筛选到72个差异表达的ATG(上调53个,下调19个)和170个ATL(上调102个;下调68个),单因素Cox回归分析筛选到16个与患者预后相关的ATG和22个ATL,多因素Cox回归分析分别纳入3个ATG与8个ATL构建预后模型。生存曲线显示在2个模型中高风险组生存率远低于低风险组,受试者工作特性曲线证明2个模型均具有较好的预测能力。**结论** 所构建的2个预后模型可有效预测患者生存情况,并提供个性化诊疗与基础研究参考。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(4): 359-365.]

关键词: 胶质母细胞瘤; 自噬; 预后模型; TCGA数据库

中图分类号: R739.41

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.04.008

Prognostic role of autophagy-related mRNA and long non-coding RNA in patients with glioblastoma multiforme

NIU Xiao-Chen¹, YAO Shi-Qi², WANG Chun-Hong^{1,3}, CHENG Rui^{1,3}, JI Hong-Ming^{1,3*}

1. ShanXi Medical University, Taiyuan, ShanXi 030012, China

2. The First Clinical College of ShanXi Medical University, Taiyuan, ShanXi 030001, China

3. Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan, ShanXi 030012, China

Corresponding author: JI Hong-Ming, Email: hongmingj@sina.com

Abstract: Objective Two prognostic models consisting of autophagy-related gene (ATG) or autophagy-related lncRNA (ATL) were constructed to predict the prognosis of patients with glioblastoma multiforme (GBM) and provide the basis for personalized diagnosis and treatment. **Methods** The RNA sequencing and clinical data of GBM in TCGA database were used to screen the differentially expressed ATG and ATL with prognostic value by univariate Cox regression analysis. Then, the prognostic models were constructed by multivariate Cox regression analysis, the risk values of patients were calculated according to the models and their effectiveness was verified. **Results** Compared with normal tissues, 72 differentially expressed ATG (up-regulated 53, down-regulated 19) and 170 differentially expressed ATL (up-regulated 102; down-regulated 68) were obtained. 16 ATG and 22 ATL were identified by univariate Cox regression analysis and multivariate Cox regression analysis included 3 ATG and 8 ATL, respectively, to construct the prognosis model. The survival curves of the two models showed that the survival rate of the high-risk group was much lower than that of the low-risk group, and the receiver operating characteristic curves proved that both models had good predictive ability. **Conclusions** The two prognostic mod-

收稿日期: 2020-12-25; 修回日期: 2021-08-24

作者简介: 牛晓辰, 男, 在读研究生, 研究方向: 颅脑肿瘤与生物治疗. Email: niu19970423@126.com。

通信作者: 吉宏明, 男, 主任医师, 研究方向: 颅脑肿瘤与神经外科. Email: hongmingj@sina.com。

els can effectively predict the survival of GBM patients, and provide reference for personalized diagnosis and treatment.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(4): 359–365.]

Keywords: glioblastoma multiforme; autophagy; prognostic model; TCGA database

胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是恶性程度最高、最具侵袭性的中枢神经系统肿瘤,约占颅内肿瘤的15%~20%^[1]。GBM的预后较差,中位总生存期(overall survival, OS)为9~15个月,患者5年存活率低于5%^[2]。目前对GBM的治疗多以手术为主,结合放疗、化疗、靶向治疗与支持治疗等,但由于肿瘤本身侵袭力强且呈浸润生长,化疗容易产生耐药等,导致多种治疗方案的效果均不理想。因此,寻找新的生物标志物来指导治疗,并为相关研究提供靶点具有重要意义。

自噬是细胞在自噬相关基因(autophagy related gene, ATG)的调控下利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,对实现细胞代谢需要、更新某些细胞器并维持细胞内稳态有较重要的作用^[3]。研究表明,自噬对GBM的发生发展具有双重调节作用,在肿瘤发生的早期阶段,自噬抑制细胞增殖,从而延缓肿瘤的进展;当肿瘤体积增大,能量供应不足以维持其生长时,自噬可促进营养缺乏肿瘤区域内肿瘤细胞的存活^[4]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一种转录长度介于200 nt~100 kb之间没有编码蛋白潜能的非编码RNA,其亦可参与GBM的恶性进展。目前,多个lncRNA已被证实在调控GBM增殖、迁移与侵袭等恶性表型中发挥重要作用^[5]。相关研究表明,MIR155HG通过MIR155HG/miR-155信号轴可以促进胶质瘤的侵袭和转移;LINC00460能竞争性吸附miR-320a,在GBM的发展中充当促癌因子^[6]。因此,深入探究lncRNA参与GBM发生与发展的机制,可为相关研究与治疗提供重要参考。

前期发现,一些lncRNA与ATG具有共表达关系并参与其转录与表达调控,称之为自噬相关lncRNA(autophagy related lncRNA, ATL)。ATL可通过参与自噬调节影响肿瘤的进程:LIU等^[7]研究发现,lncRNA-SNHG15含有一个保守的miR-141位点,可以通过与miR-141的相互作用调节ATG5的表达,从而促进骨肉瘤细胞的自噬;WU等^[8]研究发现lncRNA-UCA1在膀胱癌中过表达,通过lncRNA-UCA1/miR-582-5p/ATG7轴来促进膀胱癌细胞的增殖^[9]。深入阐明ATG与ATL在自噬调控网络中的重要作用,并筛选出与GBM进展相关的ATG与ATL,对GBM的临床诊疗具有重要意义^[10]。

1 材料与方法

1.1 数据下载与处理

通过癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载GBM经标准化后的RNA测序与临床数据,包括169例GBM患者的肿瘤组

织测序与5例正常脑组织测序信息。利用perl语言(perl 5.30.2, <http://www.perl.org/>)分别提取mRNA与lncRNA表达文件。从人类自噬基因数据库(Human Autophagy Database, HADb, <http://www.autophagy.lu/>)下载232个ATG,将mRNA表达矩阵中的基因与232个ATG取交集。由于本研究所用数据来源于TCGA数据库,故不需要相关伦理学审核与批准。

1.2 ATL筛选与差异分析

将lncRNA与ATG的表达文件进行Pearson相关性分析,筛选具有共表达关系的ATL,设置阈值:相关性系数 $|R| > 0.6$, $P_{adj} < 0.001$ 。利用R(R 3.6.3, <https://www.r-project.org/>)语言中的“limma”包,对ATG与ATL的表达进行差异分析,筛选标准为:错误发现率(false discovery rate, FDR)BH法矫正后的阈值 $P_{adj} < 0.05$,对数差异表达倍数变化绝对值 $|\log_2 FCI| > 1$,利用“pheatmap”包进行层次聚类分析。

1.3 预后相关的ATG与ATL筛选

将差异表达的ATG与ATL表达量分别同生存时间进行合并,剔除临床信息不完整以及OS<30 d的样本。利用“survival”包对差异表达的ATG与ATL分别进行单因素Cox回归分析,设置阈值为 $P_{adj} < 0.05$,明确表达量和患者生存时间的关系。之后进行多因素Cox回归分析,分别构建可预测患者生存情况的预后模型。模型计算公式为:风险值(risk score) = $\sum_{i=1}^n coef_i * x_i$ (coef为风险基因回归系数, x 为基因表达量)。

1.4 预后模型评价

基于2个预后模型计算患者的风险值,从高到低排序后依据中位数将患者分为高低风险组。使用“survival”包和“survminer”包进行Kaplan-Meier (K-M)生存分析。下载“pheatmap”包绘制高低风险组的风险曲线、生存状态图和风险基因热图。整合各组患者的生存时间、生存状态、年龄、性别和risk score,进行单多因素独立预后分析。使用“survival ROC”包绘制各项预后指标的ROC曲线,评估其预测能力。

1.5 基因集富集分析

对GBM患者的基因组广泛表达谱进行基因集富集分析(Gene set enrichment analysis, GSEA, <http://www.broadinstitute.org/gsea>),采用c2.cp.kegg.v7.0.symbols.gmt数据集,以确定所构建的2个模型中高低风险组间的差异基因所参与的主要通路。按照缺省参数设置进行富集分析,设定随机组合次数为1 000次,分别使用500和15个基因的最大和最小基因集大小进行过滤。富集时,标准

化富集分数(NES)绝对值 ≥ 1.0 , 标准化显著性水平(NOM P-val) ≤ 0.05 , 校正多重假设检验(FDR Q-val) ≤ 0.25 通常被认为是具有意义的基因集合。

2 结果

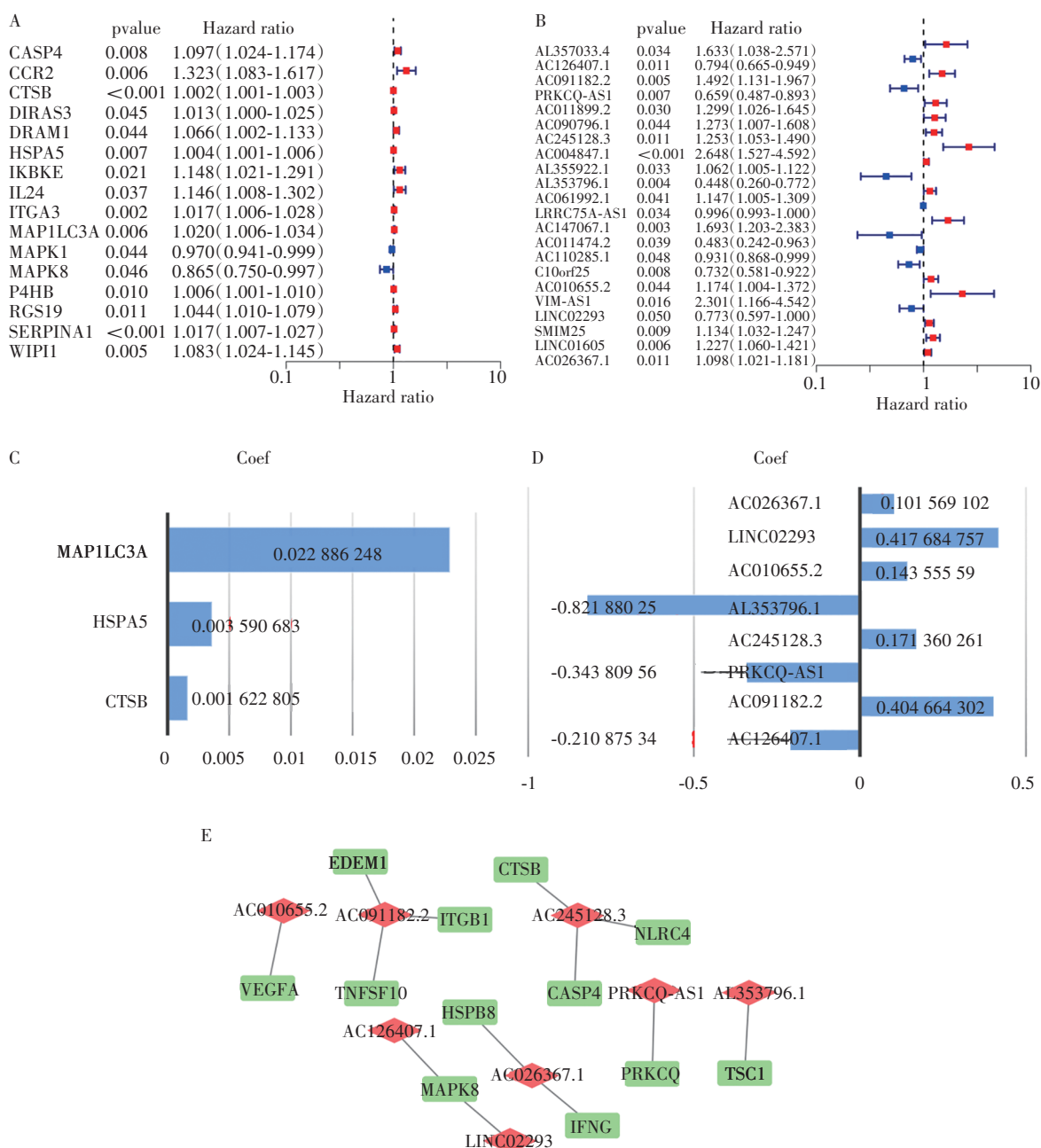
2.1 ATL筛选与差异分析

通过TCGA数据库下载到169例GBM与5例正常脑组织样本的19 658条mRNA与14 142条lncRNA的表达数据, 与ATG取交集得到210条mRNA, 共表达分析共得到1187对lncRNA-mRNA共表达关系对。差异分析得到

72个ATG(上调:53个;下调:19个), 170个ATL(上调:102个;下调:68个)。

2.2 预后模型构建

对差异表达的ATG与ATL分别进行单因素Cox回归分析, 共有16个ATG与22个ATL同患者的预后相关(图1A, B), 多因素Cox回归纳入3个ATG与8个ATL构建预后模型, 相应的coef值分别见图1C, D。纳入模型的ATL与ATG的共表达关系如图1E。



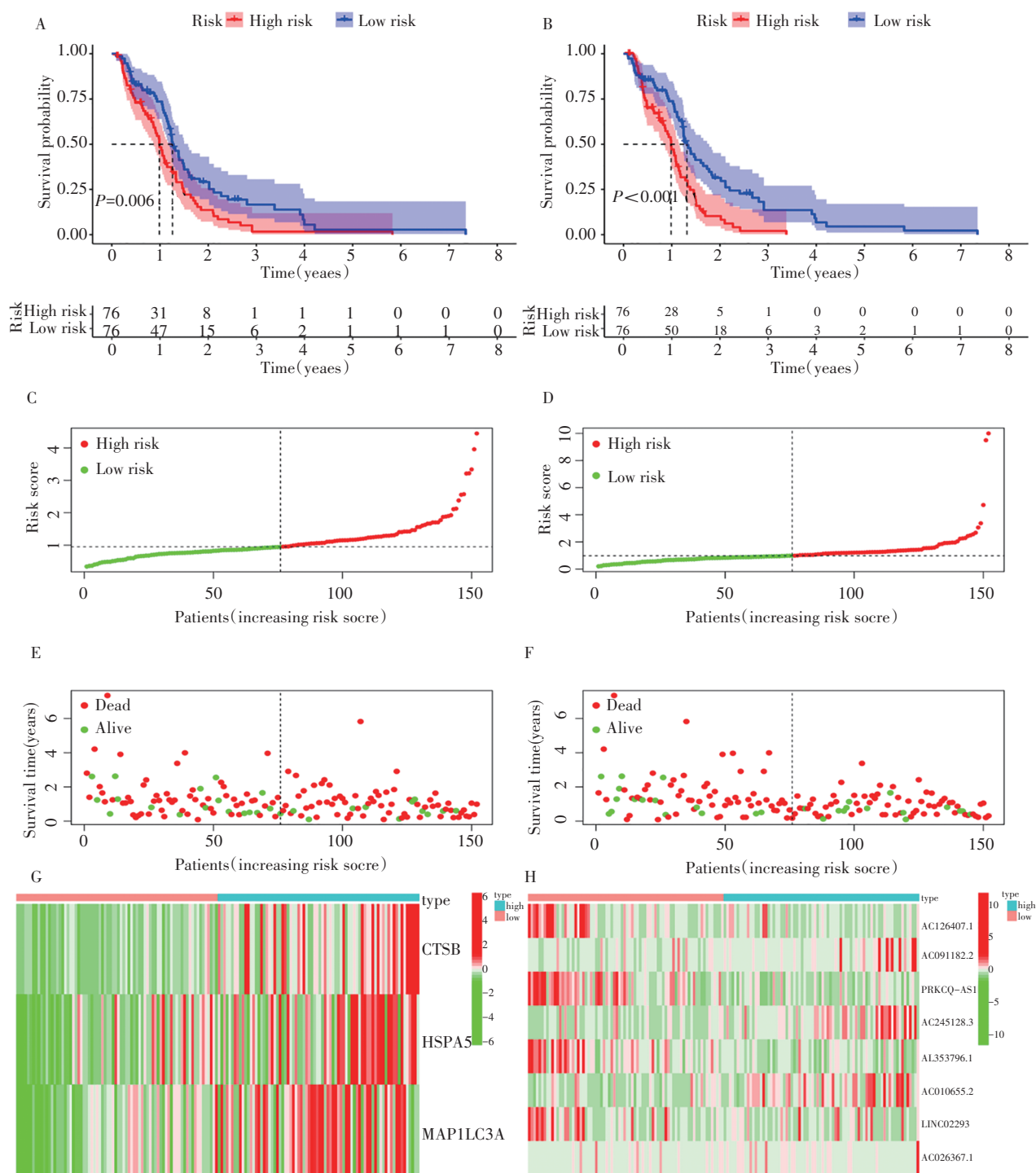
A, B: ATG 与 ATL 的单因素 Cox 回归分析; C, D: ATG 与 ATL 预后模型; E: lncRNA 与 mRNA 的共表达关系。

图1 预后模型构建

2.3 预后模型评价

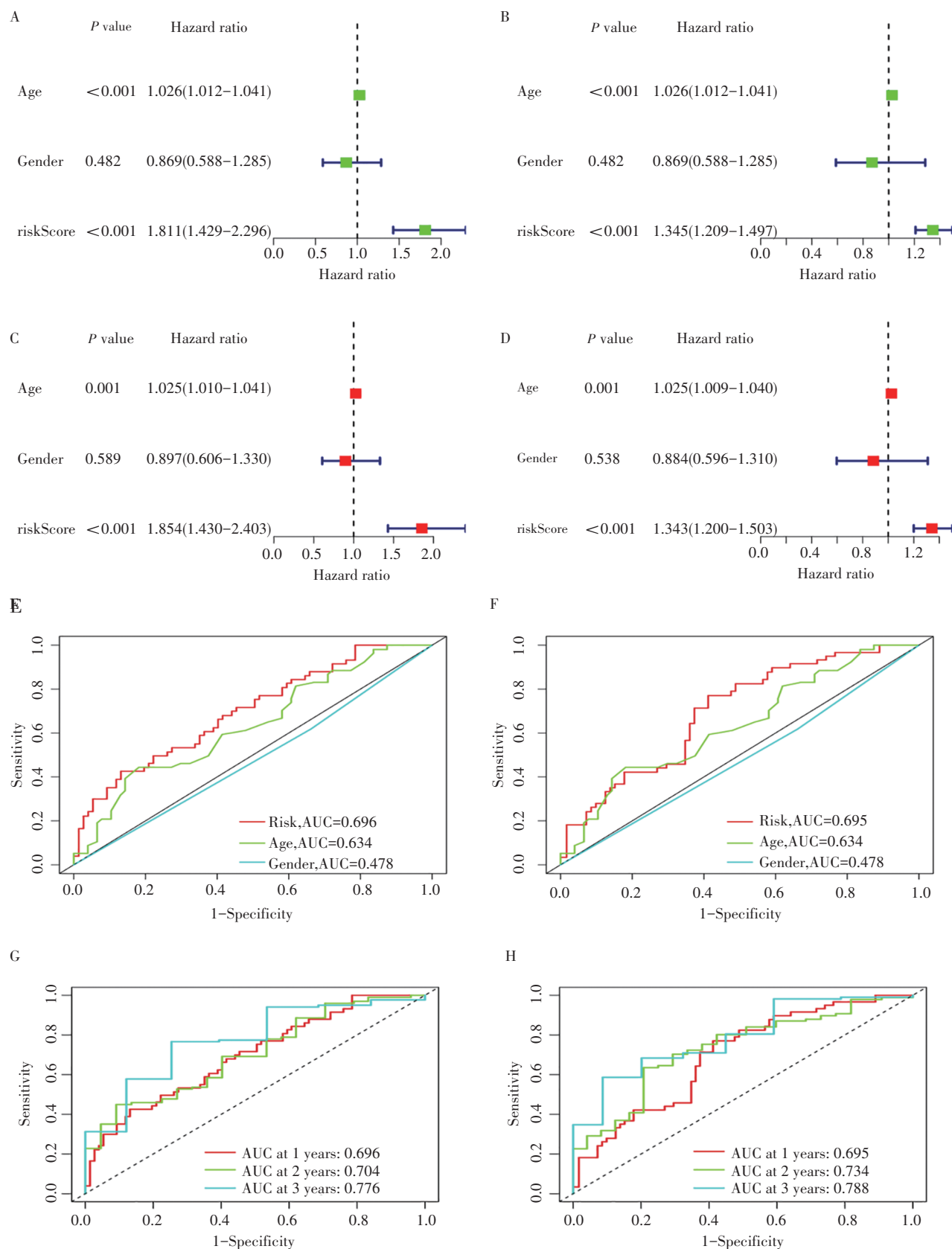
通过2个预后模型分别计算患者的风险值,K-M生存分析显示(图2A,B),在2个模型中高风险组的患者生存率均低于低风险组(ATG: $P=0.006$;ATL: $P<0.001$)。风险曲线(图2C,D)与生存状态图(图2E,F)表明,随着risk score的升高,死亡个体数逐渐增多。风险基因热图显示

(图2G,H),在高风险组高表达的基因,coef值均为负,反之则为正。单因素(图3A,B)与多因素(图3C,D)预后分析显示,年龄与risk score是患者的预后因素。ROC曲线(图3E,F)与时间依赖的ROC曲线(图3G,H)均显示,在2个模型中,risk score均是GBM患者更优的预测指标。



A, B: ATG与ATL预后模型的生存曲线; C, D: 模型的风险曲线; E, F: 模型的生存状态图; G, H: 模型的风险基因热图。

图2 预后模型的评价



A, B: 模型的单因素预后分析; C, D: 模型的多因素预后分析; E, F: ROC 曲线; G, H: 时间依赖的 ROC 曲线。

图3 预后模型的预后分析

2.4 GSEA 富集分析

GSEA 富集分析结果显示(图4),在 ATG 模型中,高风险组富集到的通路有溶酶体,细胞因子受体相互作用与氨基糖/核苷酸糖的代谢等;低风险组富集到的通路有细胞周期, RNA 降解与 WNT 信号通路等。ATL 模型中,高风险组富集到的通路有细胞因子受体相互作用, NOD

样受体信号通路与氨基糖/核苷酸糖的代谢等;低风险组富集到的通路有核糖核酸聚合酶, Hedgehog 信号通路与 WNT 信号通路等。GSEA 富集分析结果在 2 个模型中具有高度一致性,提示所筛选的 lncRNA 主要与自噬过程相关,所得 GSEA 富集结果可为后续研究提供参考。

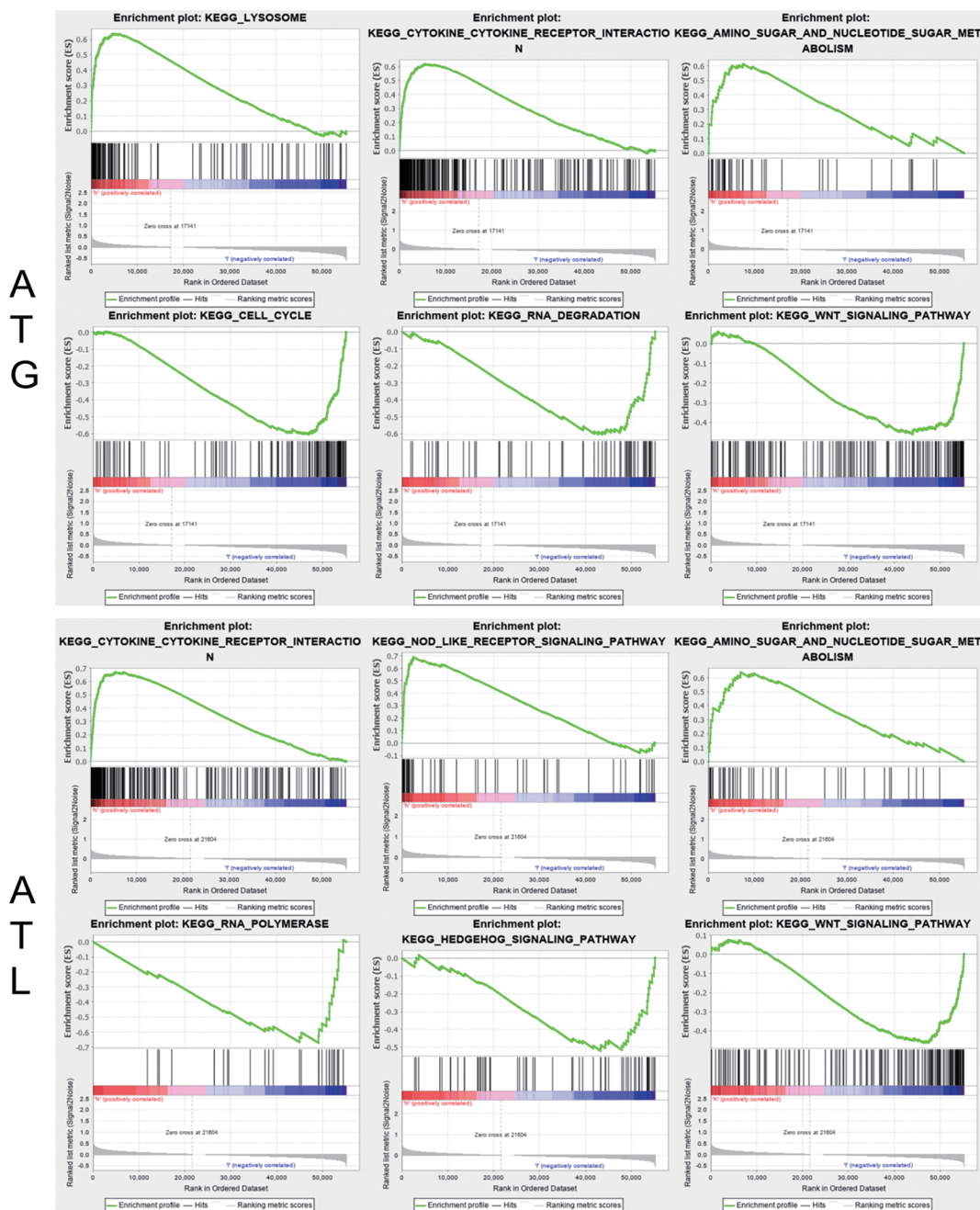


图4 GSEA富集分析结果

3 讨论

GBM作为恶性程度最高的一类颅内肿瘤,患者预后极差,平均中位生存期约15个月,但能用于评价患者生存预后情况的肿瘤标志物较少。因此,寻找GBM特异性的

标志物,对患者的预后情况进行评估,进而指导临床诊疗具有重要意义。自噬作为一种细胞死亡的方式,对肿瘤的恶性进展具有重要调控作用,由于既往研究都是从单个因素的角度考虑ATG在GBM中发挥的作用,而肿瘤的

发生发展是一个多基因联合作用的结果,因此本研究构建多基因模型来预测GBM患者的预后情况,为该类肿瘤的精准治疗提供理论依据。

本研究基于ATG与ATL共构建了2个预后模型,纳入模型的ATG有组织蛋白酶B(cathepsin B,CTSB),热休克蛋白家族A成员5(heat shock protein family A (Hsp70) member 5, HSPA5)与微管相关蛋白1轻链3 α (microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha, MAP1LC3A)。纳入模型的ATL有AC126407.1, AC091182.2, PRKCQ-AS1, AC245128.3, AL353796.1, AC010655.2, LINC02293与AC026367.1。

研究表明,CTSB是细胞溶酶体中一种半胱氨酸蛋白酶,在正常细胞中少量存在于溶酶体,肿瘤细胞中被异常分泌在细胞外,通过降解基底膜和细胞外基质,如IV型胶原、纤维结合素及层粘连蛋白等,进而参与肿瘤细胞的侵袭与转移,与患者预后密切相关。咖啡因通过下调CTSB和MAPK信号通路抑制GBM的进展^[11];miR-140通过靶向调控CTSB,抑制GBM肿瘤细胞的间充质转化,增强了该肿瘤对替莫唑胺的敏感性^[12]。HSPA5是内质网上的钙结合蛋白,应激情况下可直接抑制前凋亡组织成分的激活以及转移折叠蛋白,促使细胞蛋白质继续合成而维持肿瘤内环境稳定,在多种肿瘤组织细胞中均呈现高表达^[13],而GBM细胞中HSPA5的上调,可维持或恢复细胞微环境的稳态,并在各种治疗中导致GBM耐药^[14]。文献报道MAP1LC3A是自噬体膜在形成过程中必不可少的基因,联合其下游产物MAP1LC3B的含量可共同作为衡量自噬的标记物,后者与自噬发生程度呈正相关^[15];而MAP1LC3A的上调与自噬活性受损有关,这可能促进GBM的癌变^[16]。

本研究聚焦细胞自噬所建立的2个预后模型相比传统的危险指标准确性更高,可以更合理评价患者的预后情况,而针对高风险组患者应给予更加积极的治疗和密切的随访,阻止病情进展。有趣的是,我们发现两个模型中的CTSB与AC245128.3具有显著的共表达关系,二者之间的相互作用,或可成为GBM的有效治疗靶点。本研究的不足之处在于,没有对筛选到的风险基因进行细胞水平和动物水平的验证,没有对基因所涉及的底层机制进行研究,所得到的预后模型仍需多中心大规模的临床试验进行评估,这些将在后续的相关研究中得到进一步探索。

参 考 文 献

- [1] CLOUGHESY TF, MOCHIZUKI AY, ORPILLA JR, et al. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma[J]. *Nat Med*, 2019, 25(3): 477-486.
- [2] TAKASHIMA YS, KAWAGUCHI A, YAMANAKA R. Promising prognosis marker candidates on the status of epithelial-mesenchymal transition and glioma stem cells in glioblastoma[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1312.
- [3] 桂子玮,李艳,王昕苑,等.肝细胞癌患者自噬相关基因的预后作用[J]. *生物信息学*: 1-14. (2020-09-01).
- [4] 赵海杞,赵世光,石长滨,等.自噬在胶质母细胞瘤中的研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(16): 3212-3215.
- [5] 胡宇辰,尹恬恬,李倩,等.长链非编码RNA HULC对胶质母细胞瘤原位移植瘤模型肿瘤生长的促进作用[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2020, 41(1): 60-68.
- [6] 赵亮,章佳跃,刘志远,等.基于多个lncRNA表达量的风险模型预测胶质母细胞瘤患者预后的研究[J]. *临床神经外科杂志*, 2020, 17(2): 164-170.
- [7] LIU K, HOU Y, LIU YK, et al. LncRNA SNHG15 contributes to proliferation, invasion and autophagy in osteosarcoma cells by sponging miR-141[J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 46.
- [8] WU JF, LI W, NING JZ, 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, 12: 495-508.
- [9] 史颖颖,涂会林,郑颖成,等. LncRNA:一种新型调控细胞自噬的分子[J]. *生命科学*, 2017, 29(8): 745-752.
- [10] MORGAN ER, NORMAN A, LAING K, et al. Treatment and outcomes for glioblastoma in elderly compared with non-elderly patients: a population-based study[J]. *Curr Oncol*, 2017, 24(2): e92-e98.
- [11] HO KH, CHENG CH, CHOU CM, et al. miR-140 targeting CTSB signaling suppresses the mesenchymal transition and enhances temozolomide cytotoxicity in glioblastoma multiforme[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104390.
- [12] LAI K, KILLINGSWORTH M, YONG J, et al. Specific localization of LC3B in autophagosome: a correlative labelling study with nanoparticle in oral squamous cell carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(3): 422-427.
- [13] Wang Y, Peng X, Zhang M M, et al. Revisiting Tumors and the Cardiovascular System: Mechanistic Intersections and Divergences in Ferroptosis[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020(3):1-13.
- [14] ZHU H, CAO X, CAI X, et al. Pifithrin- μ incorporated in gold nanoparticle amplifies pro-apoptotic unfolded protein response cascades to potentiate synergistic glioblastoma therapy[J]. *Biomaterials*. 2020, 232:119677.
- [15] GIATROMANOLAKI A, SIVRIDIS E, MITRAKAS A, et al. Autophagy and lysosomal related protein expression patterns in human glioblastoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(11): 1468-1478.
- [16] JIAO Y, LI YQ, LIU SY, et al. ITGA3 serves as a diagnostic and prognostic biomarker for pancreatic cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4141-4152.

责任编辑:王荣兵