

作为弥漫性大B细胞淋巴瘤患者潜在生物标志物的 铁死亡相关lncRNAs特征

张皓玥 王渊文 邵燕萍 张鑫 胡敏利(通讯作者)

浙江省台州市恩泽医疗中心血液肿瘤内科 浙江 台州 318050

【摘要】背景：弥漫性B细胞淋巴瘤(DLBCL)是成人患者中最常见的非霍奇金淋巴瘤亚型，全球年发病率为25.0%至40.0%。尽管如此，该疾病的预后仍然很差。目的：迫切需要新的、可靠的用于预后预测的生物标志物。方法：利用基因表达Omnibus数据集中的449个DLBCL样本，检测了与嗜铁相关的长链非编码RNA(lncRNAs)之间的关系。在应用单变量Cox分析排除与预后相关的lncRNAs之前，我们使用Pearson相关分析筛选了大量与铁死亡相关的lncRNAs。结果：为了预测DLBCL的预后，对11个与铁死亡相关的lncRNAs进行了选择算子Cox回归和最小绝对收缩。此外，研究表明，6种与铁衰相关的lncRNAs在建立预测风险模型方面最有效。DLBCL患者根据他们的中位风险评分被分为高风险组和低风险组。分层分析表明，采用11种与铁死亡相关的lncRNAs构建的模型具有更高的预后评估能力。在高危患者中观察到肿瘤相关通路的显著富集。年龄、世界卫生组织分级以及与铁死亡相关的lncRNA预后因素在创建nomogram时被考虑在内。结论：总而言之，生成的nomogram可以准确预测两个队列中DLBCL患者的总生存期。

【关键词】弥漫性大B细胞淋巴瘤；预后因素；RNA；铁死亡

DOI:10.12417/2982-3838.25.03.009

1 简介

B细胞淋巴瘤包括各种类型的淋巴瘤，包括套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、伯基特淋巴瘤(BL)和原发性积液淋巴瘤。(1)成人DLBCL在所有非霍奇金淋巴瘤亚型中发病率最高。全球每年报告的新发DLBCL病例为25.0%至40.0%。(2)无论何种亚型，DLBCL患者的主要治疗方案为长春新碱、盐酸阿霉素、利妥昔单抗、环磷酰胺、强的松等主要化疗方案。(3)然而，这些治疗方法并没有改善预后。为了提高DLBCL的诊断和治疗，需要发现新的生物标志物。

铁死亡最早于2012年被描述。(4)它的特点是严重脂质过氧化产物的增加，被称为计划性细胞死亡。随着时间的推移，对恶性肿瘤中的铁死亡进行了进一步的研究。(6)过多的活性氧导致脂膜分解和过氧化，导致坏死。脂质、铁和半胱氨酸代谢与铁死亡有关。(12)在某些情况下，铁死亡可以刺激癌细胞更快地增殖。lncRNAs(17-19)是长度超过200个核苷酸的功能性RNA。(20)它们可能与多种疾病的病理生理和正常发展有关，例如许多人类肿瘤的进展。(23)然而，没有一项研究调查了DLBCL如何受到铁死亡相关lncRNA特征的影响。

在这里，通过对DLBCL患者资料进行广泛的生物信息学分析和数据统计，确定了几个与铁死亡相关的lncRNA生物标志物。本研究的结果可以帮助完善DLBCL的治疗方案，并确定与疾病预后相关的生物标志物。

2 材料与技术

2.1 数据收集和相关性分析

在当前研究期间产生和分析的数据集可在GEO数据库

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中找到。(24)GSE11318和GSE10846数据集分别包含137和312个具有生存数据的DLBCL患者样本。基因水平模式使用“limma”R包的标度方法进行归一化。表S1显示了患者的主要临床和组织学特征。

2.2 非负值的矩阵分解一致聚类

使用“ConsensusClusterPlus”程序(50次迭代，采样率为80.0%)，使用与铁死亡相关的lncRNA水平将患者分为两个亚组。为了根据聚类过程找到理想的聚类数，除了验证技术外，还采用了12种聚类分析组合的共识。

2.3 分析统计学

使用R软件进行所有统计分析(<https://www.r-project.org/>)。统计检验采用log-rank(Mantel-Cox)检验，Kaplan-Meier生存曲线分析采用Kruskal-Wallis方法。采用Fisher精确检验或卡方检验来评估统计显著性。p值小于0.05表示具有统计学显著性。

3 结果

3.1 DLBCL患者lncRNA鉴定(与铁死亡相关)

采用GSE10846提取DLBCL中60个铁死亡相关基因的水平基质。如果lncRNA的水平与上述60个基因中的一个或多个相关，则认为它与铁死亡有关。共发现63个与铁死亡相关的lncRNA[Pearson R>0.5;和P<0.001，绝对相关系数:>0.3,P<0.05]。使用加权基因共水平网络分析(WGCNA)兼容R程序(v.1.63)来开发共水平网络。

3.2 利用共识聚类来区分展示不同结果的分组

基于GSE10846中与铁衰相关的lncRNA水平，采用单变量Cox回归分析，结合R包中的coxph函数，检验这60种与

铁衰相关的 lncRNA 在 DLBCL 中的预测价值。在这些 lncRNAs 中, 24 个与铁死亡相关的 lncrna 与 OS 有实质性的关系。

通过 ConsensusClusterPlus 程序将所有肿瘤样本划分为 k 亚型(k 值范围为 2~9), 确定与嗜铁相关的 lncRNA 水平的临床意义。已经生成了一个图来显示经验累积分布函数, 并且大多数确定了确保样本分布最稳定的 k 的合适值。根据共识矩阵的结果, $k=2$ 是 GSE10846 DLBCL 队列的最佳分类亚型。与簇 2 相比, 簇 1 参与者的 OS 显著降低。

使用 limma(3.40.6)工具, 随后确定不同亚型之间的差异表达基因。GSE10846 序列包含 1377 个差异表达基因 [$|\log_2(\text{FDR} < 0.05, 1 \text{ 倍变化})| > 1.5$], 其中 837 个 lncRNAs 上调, 990 个显著下调。为了生成聚类热图, 我们选择了上调和下调最多的 100 个 lncRNAs。肿瘤的发生和发展依赖于 PD-L1。因此, 我们检查了两个亚组的 PD-L1 水平, 发现第 1 组的 PD-L1 水平更高。Spearman 相关性用于评估 DLBCL 中这些预后基因与 PD-L1 之间的联系。结果发现 FAM87A、FAM87B、GAS5、LINC00092、LINC01089、NEAT1 和 THUMPD3-AS1 基因的表达水平之间存在很强的相关性。大多数基因与 PD-L1 水平有显著相关性, 但 SNHG19 与 PD-L1 无相关性。

3.3 基因水平和预后影响信号通路和生物学过程

我们使用 KEGG 和 GO 富集来研究 DLBCL 信号通路和生物学过程中的预后基因。使用 R 中的“GOplot”和“ggplot2”包来说明使用 clusterProfiler 进行的 KEGG 和 GO 分析的结果。阴离子跨膜转运、钾离子转运、u2 型质体前体、染色体组织的阳性控制以及主要的跨膜转运蛋白活性是 GO 途径中关键的富集活性。KEGG 通路富集分析显示, 肿瘤中 RIG-I 样受体信号通路、PD-L1 水平、PD-1 检查点、MAPK 信号系统和脂肪细胞因子信号通路是差异表达基因增强的关键通路。根据这些发现, lncRNAs 的生物学后果可能会得到更好的理解。

4 讨论

铁死亡是一种独特的由脂质过氧化引起的铁依赖性细胞死亡, 与包括癌症在内的几种临床疾病有关。铁死亡, 在某些

情况下, 有利于清除坏死细胞和防止癌细胞抵抗化疗。(25 - 28)研究表明, 与铁死亡相关的 lncRNAs 与多种恶性肿瘤有关, 包括 DLBCL。因此, 更多的研究和寻找新的与铁细胞凋亡相关的 lncRNA 标记物将有助于我们了解 DLBCL 的发生和机制。(29)

利用 GSE10846 数据集, 本研究筛选出了几个与铁死亡相关的 lncRNAs。24 种与铁死亡相关的 lncRNAs 被认为与其中较好的预后相关。接下来, 基于与铁死亡相关的基因水平, 检测 DLBCL 亚型。根据与铁死亡相关的 lncRNAs 水平, 创建了两个患者亚组。PD-L1 的水平可能会受到 24 种与铁凋亡相关的 lncRNAs 水平的显著影响。它还与导致 DLBCL 恶性发展的细胞通路有关。

铁死亡与癌症病理生理有关。然而, 铁死亡和 lncRNA 水平在 DLBCL 进展过程中的相互关系尚不清楚。目前的研究发现了铁死亡信号系统的潜在指标和治疗靶点。SNHG3 通过 miR-1343-3p/NFIX 轴促进癌细胞的生长和扩散, 从而促进非小细胞肺癌的发展。(30)(31)有研究表明, SNHG19 在癌组织中表达水平升高。(32)同样, 甲状腺恶性肿瘤患者血清 LOC284454 水平明显升高。(36)然而, 缺乏对 DLBCL 铁死亡相关的 lncRNA 特征的全面研究。发现 6 个与铁死亡相关的 lncrna - snhg3、SNHG19、LOC284454、LOC102724532、LINC01184 和 dancr - 与 DLBCL 的预后有很大关系。

这些发现提出了这些基因在 DLBCL 的发展中起关键作用的可能性。我们的研究结果可能有助于寻找新的 DLBCL 生物标志物, 并为临床有效的 DLBCL 治疗提供建议。

5 结论

深入研究了与铁死亡相关的 lncRNAs, 并检测了其在 DLBCL 中的表达水平和预后。通过筛选 6 种可能独立确认 DLBCL 的铁凋亡相关 lncRNAs, 建立了预后风险模型。本研究为未来对这些 lncRNAs 的研究奠定了基础, 并为 DLBCL 中与铁凋亡相关的 lncRNAs 提供了一个新的范式, 为 DLBCL 的治疗方法提供了新的视角。

参考文献:

- [1] Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* 2015;15:172-84.
- [2] Sabattini E, Bacci F, Sagramoso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica* 2010;102:83-7.
- [3] Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-47.
- [4] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149:1060-72.
- [5] Alkhaffaf B, Glenny AM, Blazeby JM, Williamson P, Bruce IA. Standardising the reporting of outcomes in gastric cancer surgery trials:

protocol for the development of a core outcome set and accompanying outcome measurement instrument set (the GASTROS study). Trials 2017;18:370.

[6] Huang L, McClatchy DB, Maher P, Liang Z, Diedrich JK, Soriano-Castell D, et al. Intracellular amyloid toxicity induces oxytosis/ferroptosis regulated cell death. Cell Death Dis 2020;11:828.

[7] Bibli SI, Hu J, Leisegang MS, Wittig J, Zukunft S, Kapasakalidi A, et al. Shear stress regulates cystathionine γ lyase level to preserve endothelial redox balance and reduce membrane lipid peroxidation. Redox Biol 2020;28:101379.