

论 著

(基础研究)

长链非编码 RNA ReCAL 作为肾透明细胞癌预后标志物和靶向治疗反应预测因子的研究

钟 科, 唐富豪, 潘 鑫, 张征宇

【摘要】 目的 分析肾透明细胞癌(ccRCC)患者队列转录组数据,寻找一种可靠的长链非编码 RNA(lncRNA)作为预测 ccRCC 患者预后的生物标记物,对患者个体化治疗方案的有效制订和改善预后提供参考。**方法** 开发一种综合数据挖掘策略来识别 3 个筛选队列中的预测候选 lncRNA。在 2004 年至 2012 年间收集的多中心的 1908 例 ccRCC 患者中,对所选 lncRNA 的预后价值进行验证,中位随访时间为 96 个月(IQR 46-105)。对 98 例接受舒尼替尼或索拉非尼治疗的患者进行 lncRNA 表达与临床预后的关系分析。主要临床终点是总生存期(OS)。采用单变量和多变量 Cox 回归、Kaplan-Meier 曲线评估 lncRNA 表达与临床终点的相关性。**结果** ReCAL(与肾癌相关的 lncRNA)被认为是研究队列中与 OS 相关最显著的 lncRNA。多中心队列验证证实 ReCAL 的预后价值。在多变量模型中,较高的 ReCAL 表达与低 OS 相关(长海队列:HR:3.391;95%CI:2.741~4.386; $P=1.344E-14$ 。长征队列:HR:2.473;95%CI:1.062~3.251; $P=0.044$ 。东总队列:HR:2.409;95%CI:1.097~3.210; $P=0.037$)。ReCAL 在低危 Mayo Clinic SSIGN 评分肿瘤患者中尤其具有预后价值。低表达 ReCAL 的肾癌患者表现出对舒尼替尼(HR:0.157;95%CI:0.033~0.744; $P=0.020$)或索拉非尼(HR:0.470;95%CI:0.229~0.646; $P=0.031$)靶向治疗较好的反应性。**结论** 高表达 ReCAL 是 ccRCC 患者预后不良的独立生物标志物,也是靶向治疗反应不良的预测性生物标志物。

【关键词】 肾癌;长链非编码 RNA;预后;生物标志物;靶向治疗

【中图分类号】 R737.11

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-271X(2021)04-0337-08

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.04.001

LncRNA ReCAL as a prognostic biomarker and targeted-therapy response predictor in clear cell renal cell carcinoma

ZHONG Ke¹, TANG Fu-hao², PAN Xin², ZHANG Zheng-yu²

(1. Graduate School, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China; 2. Department of Urology, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To analyze the transcriptome data of patients with renal clear cell carcinoma (ccRCC) and to identify a robust long noncoding RNA (lncRNA) biomarker to predict the prognosis of patients with ccRCC, and to provide a reference for the effective formulation of individualized treatment and improvement of prognosis. **Methods** An integrative data-mining strategy was developed to identify prognostic candidate lncRNA in three discovery cohorts. The prognostic value of selected lncRNA was validated in 1908 ccRCC patients from multi-institutional cohorts collected between 2004 and 2012, with median follow-up of 96 months (IQR 46-105). A total of 98 patients who underwent sunitinib or sorafenib treatment with matched patients were analyzed for the relationship between lncRNA expression and clinical outcomes. The primary clinical endpoint was overall survival (OS). Univariable and multivariable Cox regression, Kaplan-Meier curves and Harrell's C-index were used to evaluate the association of lncRNA expression with these end-

points. **Results** Renal Cancer Associated LncRNA (ReCAL) was identified as the most significant lncRNA associated with OS in discovery cohorts. Validation in multi-institutional cohorts confirmed the prognostic value of

作者单位:233000 蚌埠,蚌埠医学院研究生院(钟 科);210002 南京,东部战区总医院(原南京军区南京总医院)泌尿外科(唐富豪、潘 鑫、张征宇)

通信作者:张征宇, E-mail: zhangzyph@aliyun.com

ReCAL. In multivariable models, higher ReCAL expression was associated with poor OS (Changhai, HR, 3.391; 95% CI, 2.741-4.386; $P=1.344E-14$; Changzheng, HR, 2.473; 95% CI, 1.062-3.251; $P=0.044$; Nanjing, HR, 2.409; 95% CI, 1.097-3.210; $P=0.037$). ReCAL was particularly prognostic among patients with low-risk Mayo Clinic SSIGN score tumors. Patients with low ReCAL expression showed improved response after sunitinib (HR, 0.157; 95% CI, 0.033-0.744; $P=0.020$) or sorafenib (HR, 0.470; 95% CI, 0.229-0.646; $P=0.031$) treatment. **Conclusion** High ReCAL is an independent prognostic biomarker for poor outcome and a predictive biomarker for poor targeted therapy response in ccRCC patients.

[Key words] renal cell carcinoma; long noncoding RNA; prognosis; biomarker; targeted therapy

0 引言

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是最常见的肾癌,2017 年在美国确诊近 63 990 例,其中死亡人数高达 14 400^[1]。肾细胞癌 70% 以上为肾透明细胞癌(clear cell RCC, ccRCC),大部分病例为散发性^[2]。虽然大多数局限性肾癌患者肿瘤生长缓慢,呈非致死性,但是大约四分之一的患者在部分或根治性肾切除术后发生了疾病进展和转移^[3-4]。为了区分惰性肿瘤和侵袭性肿瘤,目前临床指南主要以肿瘤的大小、分期和分级作为依据,这些都不包含任何分子生物标记物^[5-6]。然而,即使是根据这些临床指南所定义的低风险的患者也可能会发生疾病进展和肿瘤复发^[7]。一些研究报告了某些特定分子有助于 ccRCC 的风险分层,如 ClearCode34 和复发评分^[8-9],但其临床应用可能太昂贵和复杂。因此,有必要寻找一种可以准确有效地对 ccRCC 患者预后进行分层的新的预后生物标记物。

长链非编码 RNA(long noncoding RNAs, lncRNAs)已被证实具有在肿瘤发展中具有重要作用^[10-12]。我们以前对 lncRNAs 的功能进行了广泛的研究,特别是在 ccRCC 进展和靶向治疗抵抗方面^[13-15]。近年来,随着 RNA 测序的进展,已经发现了大量 lncRNAs 可以作为一类新的预后生物标记物^[16-17]。基于 ccRCC 的这些临床需要和 lncRNAs 作为肿瘤生物标记物的潜在优势^[18],本研究对来自 3 个独立 ccRCC 队列的转录组数据进行分析,以确定与患者预后相关的 lncRNAs,随后在多个独立的 ccRCC 队列中进行验证。

1 材料与方法

1.1 研究设计 本研究遵循肿瘤标志物预后研究(REMARK)标准^[19]的报告建议,并得到了所有机构审查委员会的批准。肿瘤样本和临床数据是在长海医院、长征医院、东部战区总医院伦理委员会批准和患者知情同意下获得^[13-15, 20-22]。本研究在 3 个有可用

RNA 测序数据和临床注释的 ccRCC 患者队列中进行:①来自 TCGA(癌症基因组图谱)数据库(美国队列)的 530 个原发肿瘤和 72 个匹配的相邻正常组织^[22],②来自 EGA(欧洲基因组表型档案)数据库(日本队列)的 100 个原发肿瘤^[21],③来自 ICGC(国际癌症基因组联盟)数据库(欧洲队列)的 91 个原发肿瘤和 45 个匹配的邻近正常组织^[20],具体流程见图 1。验证研究在多中心队列中进行,包括来自长海医院的 1326 例 ccRCC 患者、来自长征医院的 353 例 ccRCC 患者和来自东部战区总医院的 229 例 ccRCC 患者。在验证队列中连续采集了从 2004 年到 2012 年的组织样本。这些队列包括有临床病理特征和随访资料的患者,中位随访时间为 96 个月。

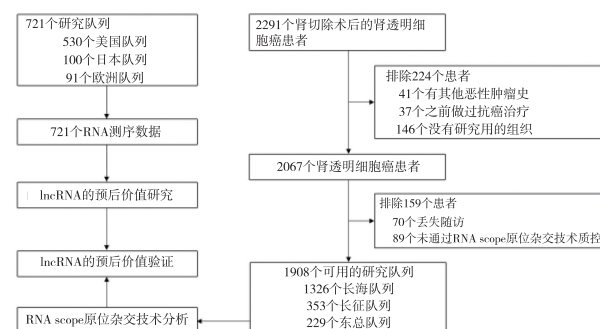


图 1 肾透明细胞癌患者队列的研究流程图

1.2 方法 开发一种综合数据挖掘策略来识别 3 个筛选队列中的预测候选 lncRNA;为了确定 ccRCC 中高度可靠的预后 lncRNA,对 3 个研究队列[①来自 TCGA 数据库(美国队列,中位随访 40 个月),②来自 EGA 数据库(EGAS0001000509,日本队列,中位随访 50.5 个月),③来自 ICGC 数据库(欧洲队列,中位随访 58.9 个月)]进行研究,获得准确的 lncRNA 注释集,筛选出基因组定位中与蛋白质编码基因重叠的 lncRNAs(Gencode 版本 19 注释),并对 7070 个 lncRNAs 进行分析。然后,考虑在每个队列中至少 80% 的样本中表达值大于零的 lncRNAs 用于下游分析。对所选 lncRNA 的预后价值进行验证;为了验证

ReCAL 评估患者预后的能力,使用 RNA 原位杂交技术(RNA scope)检测长海队列($n=1326$)、长征队列($n=353$)和东总队列($n=229$)三家独立医院 1908 例 ccRCC 患者 ReCAL 的表达。进一步评估在用 Mayo Clinic SSIGN 评分分层的患者中 ReCAL 的评估预后能力。对 98 例接受舒尼替尼或索拉非尼治疗的患者进行 lncRNA 表达与临床预后的关系分析。主要临床终点是总生存期(overall survival, OS)。采用单变量和多变量 Cox 回归、Kaplan-Meier 曲线评估 lncRNA 表达与临床终点的相关性。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件(SPSS Inc., USA)进行统计分析。以频率和百分比描述患者的临床病理特征。用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验估计 ReCAL 表达水平与临床变量的相关性。 t 检验用于检验两组间的 ReCAL 表达差异。用 Kaplan-Meier 方法估计事件发生的时间,用 log-rank 检验评估患者特征之间的比较。应用多变量 Cox 比例风险模型来评估有意义和无意义的预测协变量对总生存期(overall survival, OS)的影响,并在 Cox 模型中报告风险比(hazard ratios, HR)^[23-26]。使用 Kaplan-Meier 生存曲线来评估 Cox 回归模型中风险的占比。所有统计检验均为双侧,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 多数据集分析证实长链非编码 RNA ReCAL 是 ccRCC 的预后生物标志物 每个数据集中得到大约 1695 个 lncRNAs。在研究队列中,单变量 Cox 回归分析显示,29 个 lncRNA 的表达与 3 个队列的生存率显著相关($P < 0.05$)。接下来,分别以 29 个 lncRNA 的表达中值作为界值将患者分为高表达组 and 低表达组,并评估 2 组总体生存期差异。确定了一个独特的 lncRNA,该基因在 RefSeq 参考序列数据库中被注释为 LINC01410(集成基因注释 ENSG0000238113),它显示了 3 个队列和集合队列中高表达组和低表达组之间最显著的差异生存率,见图 2a-2d。根据其 with ccRCC 预后的关系,将该基因命名为“与肾癌相关的 lncRNA”(renal cancer associated lncRNA, ReCAL)。多变量 Cox 回归分析表明,高表达 ReCAL 是 ccRCC 患者预后不良的独立预测因素(美国队列:HR:1.420, 95% CI:1.040 ~ 1.939, $P = 0.027$; 日本队列:HR:3.658, 95% CI:

1.457 ~ 9.181; $P = 0.006$; 欧洲队列:HR:1.630, 95% CI:0.732 ~ 3.630; $P = 0.232$),见表 1。此外,探讨连续的 ReCAL 表达与 OS 的关系发现,在所有 3 个队列中,随着 ReCAL 表达的增加,低 OS 的风险呈线性增长(美国队列:HR:1.736; 95% CI:1.416 ~ 2.129; $P = 1.141E-7$; 日本队列:HR:1.711; 95% CI:1.161 ~ 2.522; $P = 0.007$; 欧洲队列:HR:2.257; 95% CI:1.105 ~ 4.609; $P = 0.025$),见表 1。

2.2 通过多队列研究验证了 ReCAL 评估患者预后的能力 ccRCC 肿瘤中 ReCAL 的代表性染色见图 3a,通过 RNA scope 和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)结果的比较,证实了 ReCAL 探针的特异性,见图 3b。以中位数为界将 ReCAL 的表达分为高表达组和低表达组。在所有 3 个验证队列和集合队列中,与低表达组的患者相比,ReCAL 高表达组的患者预后较差,见图 2e-2h。多变量 Cox 回归分析显示,在这些队列中高 ReCAL 表达与较短 OS 独立相关(长海队列:HR:2.180, 95% CI:1.775 ~ 2.678, $P = 1.111E-13$; 长征队列:HR:2.735, 95% CI:1.747 ~ 4.280, $P = 1.076E-5$; 东总队列:HR:2.113, 95% CI:1.270 ~ 3.514, $P = 0.004$),见表 1。此外,当建模为连续变量时,发现随着 ReCAL 表达增加,低 OS 风险呈线性增长(长海队列:HR:3.391, 95% CI:2.741 ~ 4.386, $P = 1.344E-14$; 长征队列:HR:2.473, 95% CI:1.062 ~ 3.251, $P = 0.044$; 东总队列:HR:2.409, 95% CI:1.097 ~ 3.210, $P = 0.037$),见表 1。

2.3 ReCAL 在低危 Mayo Clinic SSIGN 评分肾透明细胞癌患者中尤其具有预后价值 ReCAL 评估预后的能力在低风险患者(SSIGN 评分 0 ~ 3)中最为明显,在中等风险患者(SSIGN 评分 4 ~ 7)中则较小,而在高风险患者(SSIGN 评分 > 8)中最小,见图 4。长海、长征和东总队列中高 ReCAL 表达的低风险患者发生 ccRCC 特异性死亡的可能性分别为低 ReCAL 表达组的 5.854 倍、8.15 倍和 3.091 倍(95% CI:3.799 ~ 9.020, $P = 1.142E-15$; 95% CI:2.420 ~ 27.450, $P = 0.001$; 95% CI:1.458 ~ 6.555, $P = 0.003$),见表 2。中等风险患者中,长海队列 ReCAL 高表达的患者发生 ccRCC 特异性死亡的可能性是低 ReCAL 表达组的 1.408 倍(95% CI:1.055 ~ 1.879, $P = 0.02$),而在其他两个队列中无显著相关性。在高风险患者中 ReCAL 的表达与 ccRCC 特异性死亡无显著相关性。

表 1 研究队列和验证队列中肾透明细胞癌患者总体生存率相关因素的单变量和多变量分析

队列	单变量		多变量(二分类)		多变量(连续)	
	HR(95%CI)	P 值	HR(95%CI)	P 值	HR(95%CI)	P 值
美国队列(<i>n</i> =530)						
二分法 ReCAL 表达(高 <i>vs</i> 低)	1.494(1.105~2.019)	0.009	1.420(1.040~1.939)	0.027		
连续的 ReCAL 表达	2.046(1.638~2.555)	2.773E-10			1.736(1.416~2.129)	1.141E-7
性别(男 <i>vs</i> 女)	0.953(0.699~1.299)	0.759				
年龄	1.811(1.330~2.466)	1.644E-4	1.031(1.016~1.046)	2.447E-5	1.032(1.017~1.046)	1.910E-5
肿瘤大小(> 7 <i>vs</i> ≤ 7 cm)	2.810(2.022~3.904)	7.403E-10	0.403(0.221~0.736)	0.003	0.405(0.221~0.743)	0.003
分级	2.251(1.838~2.757)	4.329E-15	1.457(1.159~1.832)	0.001	1.514(1.205~1.904)	3.768E-4
TNM 分期	1.868(1.638~2.131)	1.101E-20	2.215(1.746~2.810)	5.738E-11	2.160(1.702~2.743)	2.521E-10
转移(是 <i>vs</i> 否)	4.273(3.123~5.847)	1.094E-19	1.089(0.584~2.029)	0.789	1.033(0.554~1.925)	0.920
日本队列(<i>n</i> =100)						
二分法 ReCAL 表达(高 <i>vs</i> 低)	2.413(0.992~5.868)	0.052	3.658(1.457~9.181)	0.006		
连续的 ReCAL 表达	1.787(1.231~2.595)	0.002			1.711(1.161~2.522)	0.007
性别(男 <i>vs</i> 女)	2.274(0.675~7.659)	0.185				
年龄	1.044(1.002~1.087)	0.040	1.037(0.989~1.088)	0.128	1.016(0.972~1.062)	0.488
肿瘤大小(> 7 <i>vs</i> ≤ 7 cm)	5.365(2.261~12.733)	1.391E-4	1.342(0.261~6.906)	0.725	2.068(0.419~10.221)	0.373
分级	2.929(1.645~5.213)	2.597E-4	2.210(1.190~4.107)	0.012	2.171(1.163~4.051)	0.015
TNM 分期	2.293(1.652~3.183)	7.001E-7	2.270(1.582~3.259)	8.660E-6	2.024(1.444~2.839)	4.352E-5
转移(是 <i>vs</i> 否)	6.152(2.587~14.632)	3.960E-5	1.060(0.148~7.609)	0.953	1.570(0.205~12.006)	0.664
欧洲队列(<i>n</i> =91)						
二分法 ReCAL 表达(高 <i>vs</i> 低)	2.213(1.051~4.661)	0.037	1.630(0.732~3.630)	0.232		
连续的 ReCAL 表达	2.346(1.147~4.800)	0.020			2.257(1.105~4.609)	0.025
性别(男 <i>vs</i> 女)	1.141(0.554~2.349)	0.721				
年龄	1.031(0.993~1.071)	0.108	2.102(0.970~4.555)	0.060	1.692(0.757~3.784)	0.200
肿瘤大小	1.023(1.012~1.034)	4.589E-5	3.650(1.702~7.830)	0.001	3.228(1.521~6.850)	0.002
分级	1.857(1.255~2.748)	0.002	1.608(0.486~5.325)	0.437	1.555(0.455~5.312)	0.482
TNM 分期	2.134(1.511~3.012)	1.663E-5	1.476(0.506~4.309)	0.476	1.410(0.490~4.056)	0.524
长海队列(<i>n</i> =1326)						
二分法 ReCAL 表达(高 <i>vs</i> 低)	2.313(1.887~2.834)	6.628E-16	2.180(1.775~2.678)	1.111E-13		
连续的 ReCAL 表达	3.681(2.747~5.612)	4.626E-16			3.391(2.741~4.386)	1.344E-14
性别(男 <i>vs</i> 女)	1.020(0.837~1.243)	0.844				
年龄	1.104(0.910~1.339)	0.316	1.055(0.869~1.281)	0.585	1.109(0.914~1.346)	0.295
肿瘤大小	1.756(1.395~2.212)	1.670E-6	1.273(1.001~1.618)	0.049	1.210(0.949~1.543)	0.124
分级	1.063(0.864~1.307)	0.563	1.008(0.819~1.241)	0.939	0.993(0.807~1.223)	0.950
TNM 分期	1.771(1.462~2.145)	5.126E-9	1.340(1.066~1.684)	0.012	1.349(1.073~1.696)	0.010
转移(是 <i>vs</i> 否)	2.640(2.101~3.317)	7.631E-17	1.369(1.000~1.873)	0.050	1.331(0.972~1.822)	0.075
SSIGN 评分	2.539(2.084~3.094)	2.529E-20	1.734(1.337~2.249)	3.291E-5	1.847(1.432~2.384)	2.367E-6
长征队列(<i>n</i> =353)						
二分法 ReCAL 表达(高 <i>vs</i> 低)	2.368(1.519~3.691)	1.407E-4	2.735(1.747~4.280)	1.076E-5		
连续的 ReCAL 表达	1.886(0.892~3.559)	0.012			2.473(1.062~3.251)	0.044
性别(男 <i>vs</i> 女)	0.865(0.555~1.348)	0.522				
年龄	0.926(0.596~1.437)	0.730	1.136(0.730~1.769)	0.571	1.045(0.670~1.630)	0.846
肿瘤大小	2.361(1.539~3.623)	8.383E-5	1.555(0.949~2.548)	0.080	1.432(0.877~2.339)	0.151
分级	1.441(0.925~2.244)	0.107	0.963(0.591~1.570)	0.880	0.897(0.551~1.460)	0.663
TNM 分期	2.351(1.551~3.564)	5.623E-5	1.164(0.665~2.040)	0.595	1.175(0.676~2.043)	0.567
转移(是 <i>vs</i> 否)	3.302(2.066~5.278)	5.917E-7	1.701(0.970~2.985)	0.064	1.447(0.766~2.733)	0.254
SSIGN 评分	3.520(2.318~5.344)	3.500E-9	2.500(1.426~4.384)	0.001	3.396(2.233~5.165)	1.099E-8
东总队列(<i>n</i> =229)						
二分法 ReCAL 表达(高 <i>vs</i> 低)	2.546(1.563~4.147)	1.728E-4	2.113(1.270~3.514)	0.004		
连续的 ReCAL 表达	2.180(1.584~3.543)	0.006			2.409(1.097~3.210)	0.037
性别(男 <i>vs</i> 女)	0.813(0.506~1.305)	0.391				
年龄	1.007(0.986~1.027)	0.519	1.274(0.774~2.094)	0.339	1.020(0.999~1.042)	0.067
肿瘤大小	1.118(1.042~1.200)	0.002	0.858(0.449~1.641)	0.643	0.958(0.845~1.085)	0.500
分级	1.492(0.917~2.428)	0.107	1.034(0.610~1.754)	0.901	0.797(0.448~1.418)	0.440
TNM 分期	1.762(1.110~2.797)	0.016	1.430(0.812~2.518)	0.216	1.317(0.753~2.303)	0.335
转移(是 <i>vs</i> 否)	1.844(0.994~3.424)	0.052	0.907(0.415~1.979)	0.806	0.388(0.146~1.032)	0.058
SSIGN 评分	2.534(1.595~4.023)	8.154E-5	2.023(1.249~3.276)	0.004	2.293(1.425~3.690)	1.117E-5

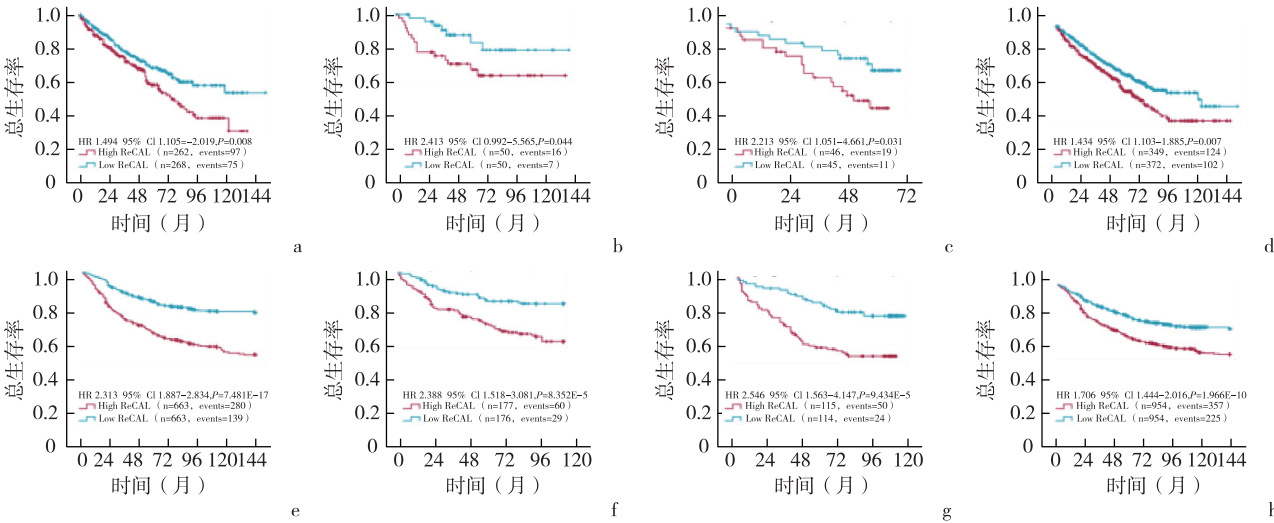


图 2 长链非编码 RNARECAL 在肾透明细胞癌中的表达对 3 个研究队列和 3 个验证队列总生存率的生存曲线

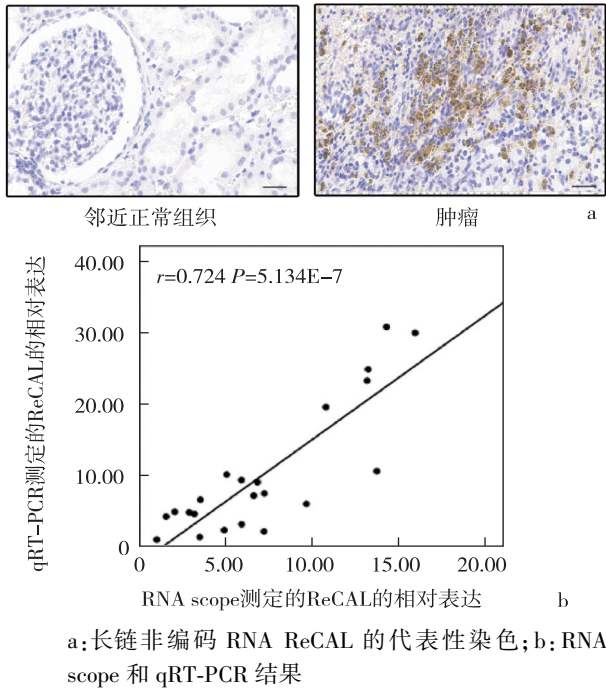
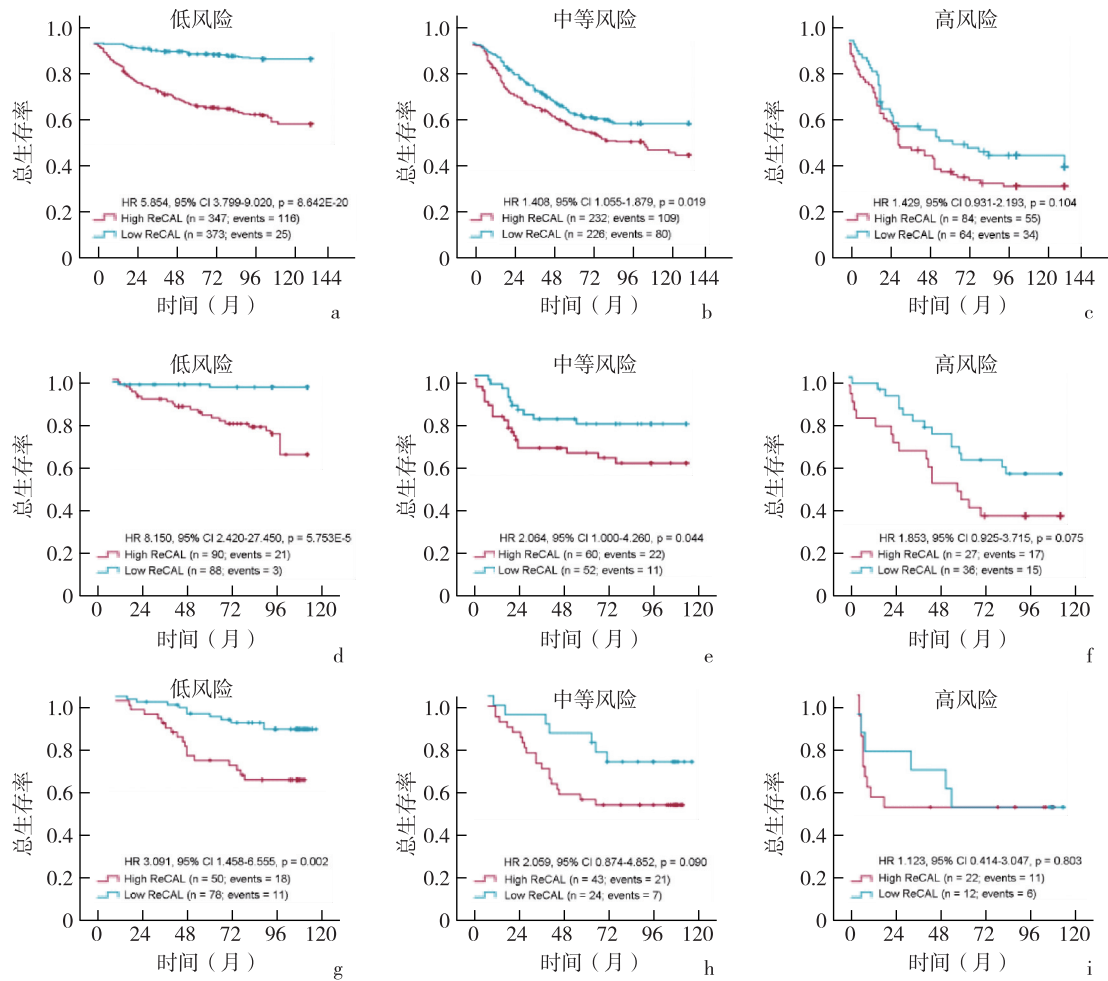


图 3 肾透明细胞癌患者肿瘤中长链非编码 RNA ReCAL 的表达

2.4 长链非编码 RNA ReCAL 表达与靶向治疗反应呈负相关 与匹配的邻近正常组织相比, ReCAL 在肿瘤中的表达显著上调, 见图 5。此外, 与原发性肿瘤相比, ReCAL 在复发转移肿瘤中的表达较高 ($P=0.048$), 见图 6a。探讨 ReCAL 是否可以作为评估靶向治疗反应的生物标记物时发现, 与对新辅助舒尼替尼治疗有良好反应的患者相比, ReCAL 在舒尼替尼治疗后复发的肾癌组织中富集 ($P=0.034$), 见图 6b。为了确定接受靶向治疗的 ccRCC 患者的 ReCAL 表达与患者预后的关系, 对先前报道的两组患者^[13-15]进行评估发现, 舒尼替尼或索拉非尼治疗对所有 ccRCC 患者无进展生存期的改善能力有限, 而与对照组相比, 低 ReCAL 表达的患者在接受靶向治疗后预后较好, 高 ReCAL 表达的患者对靶向治疗反应不佳, 见图 7。这些结果提示 ReCAL 可以作为 ccRCC 患者评估靶向治疗反应的生物标志物。

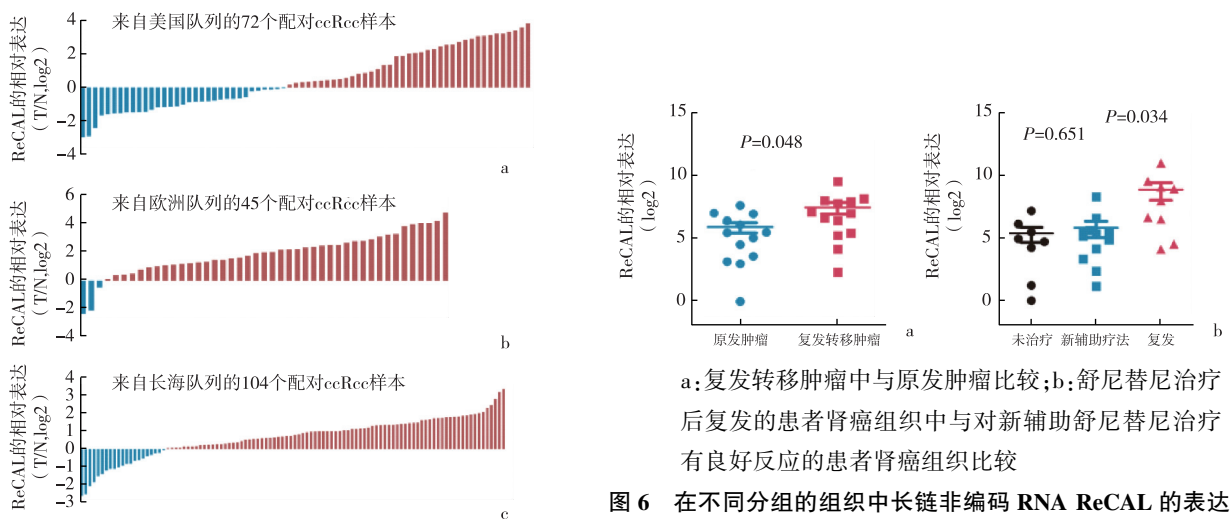
表 2 不同 Mayo Clinic SSIGN 评分患者的 ReCAL 表达对总生存期 (OS) 和无进展生存期 (PFS) 的分析

验证队列	低风险患者 (SSIGN 0~3)		中等风险患者 (SSIGN 4~7)		高风险患者 (SSIGN ≥8)	
	HR (95%CI)	P 值	HR (95%CI)	P 值	HR (95%CI)	P 值
长海队列						
OS [二分法 ReCAL 表达 (高 vs 低)]	5.854 (3.799~9.020)	1.142E-15	1.408 (1.055~1.879)	0.020	1.429 (0.931~2.193)	0.102
PFS [二分法 ReCAL 表达 (高 vs 低)]	4.724 (3.357~6.647)	5.032E-19	1.405 (1.086~1.818)	0.010	1.522 (1.019~2.274)	0.040
长征队列						
OS [二分法 ReCAL 表达 (高 vs 低)]	8.150 (2.420~27.450)	0.001	2.064 (1.000~4.260)	0.050	1.853 (0.925~3.715)	0.082
PFS [二分法 ReCAL 表达 (高 vs 低)]	6.257 (2.781~14.080)	9.357E-6	2.452 (1.210~4.971)	0.013	1.744 (0.906~3.355)	0.096
东总队列						
OS [二分法 ReCAL 表达 (高 vs 低)]	3.091 (1.458~6.555)	0.003	2.059 (0.874~4.852)	0.099	1.123 (0.414~3.047)	0.820



a, b, c: 长海队列; d, e, f: 长征队列; g, h, i: 东总队列

图 4 3 个验证队列不同 Mayo Clinic SSIGN(分期、大小、分级和坏死) 评分患者的 ReCAL 表达对总体生存率的生存曲线

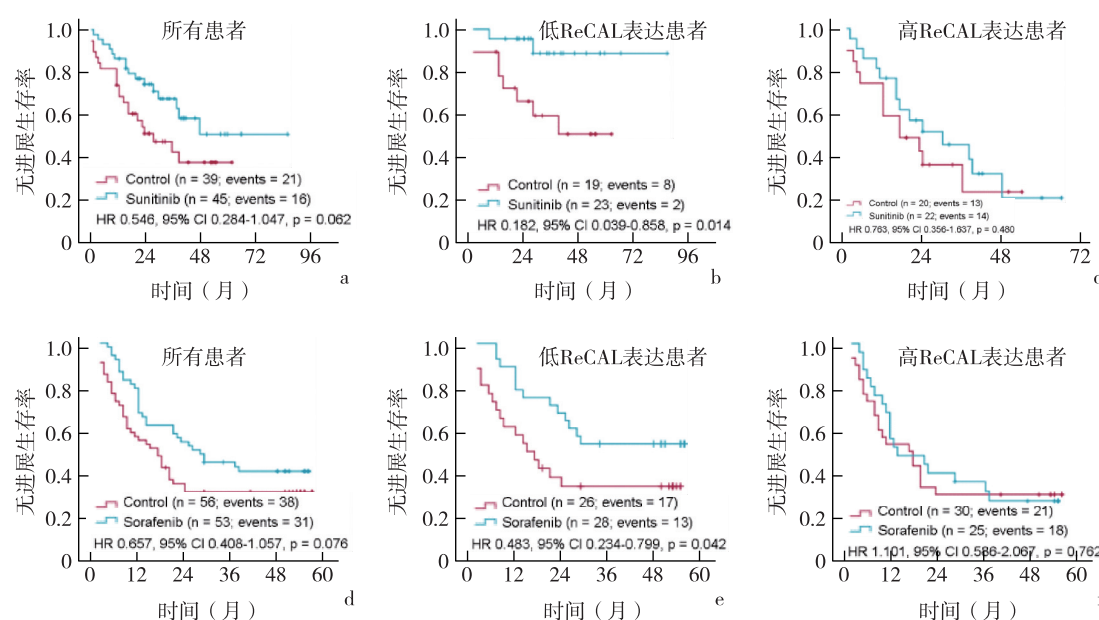


a: 美国队列; b: 欧洲队列; c: 长海队列

图 5 ReCAL 表达在肿瘤中与匹配的邻近正常组织比较

a: 复发转移肿瘤中与原发肿瘤比较; b: 舒尼替尼治疗后复发的患者肾癌组织中与对新辅助舒尼替尼治疗有良好反应的患者肾癌组织比较

图 6 在不同分组的组织中长链非编码 RNA ReCAL 的表达



a、b、c:有或无舒尼替尼治疗的 ccRCC 患者无进展生存期的生存曲线;d、e、f:有或无索拉非尼治疗的 ccRCC 患者无进展生存期的生存曲线

图 7 肾透明细胞癌患者中长链非编码 RNA ReCAL 表达与靶向治疗反应的关系

3 讨 论

本研究证实了一种之前未报道的 lncRNA, 命名为 ReCAL, 其高表达与 ccRCC 患者的不良预后相关。值得注意的是, ReCAL 评估预后的能力在低风险患者 (SSIGN 评分 0~3) 中最为明显。此外, 本研究还发现 ReCAL 可以作为靶向治疗反应的独立预测因子。虽然以往的研究已经推荐了几种用于 ccRCC 风险分层的分子生物标记物, 以及传统的临床病理参数, 但是这些作为检测预后的可靠生物标记物的能力不足, 并且这些研究大多集中于晚期 ccRCC^[27]。本研究确定并验证了 lncRNARECAL, 它在 6 个独立的 ccRCC 患者队列中显示出显著的预后价值, 表明了 ReCAL 在临床应用中的重要作用。

对于 ccRCC 患者的分层, ReCAL 比经典的肿瘤分期和分级指标更能反映 ccRCC 复发风险。患者常常对术后可能发生转移性疾病感到不安, 即使术后发生转移的风险很低。然而, 大多数患者由于缺乏任何可以有效降低复发风险并最终保持健康的指导方针而恶化, 例如早期发现复发性疾病的生物标志物和有效的治疗方案。在本研究分层分析中, ReCAL 主要在根据标准临床病理指标 SSIGN 评分被归类为低风险的患者中表现出对评估预后的高效率。

三分之一被诊断为区域性或远处转移的 ccRCC 患者需要强化治疗, 如靶向治疗^[28]。血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂或雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路是晚期 ccRCC 患者的标准治疗方案^[29]。然而, 10%~20% 的晚期 ccRCC 患者天生对靶向治疗不敏感, 其余大多数患者在治疗 6~15 个月后出现耐药性和肿瘤进展, 导致靶向治疗未能有效延长 ccRCC 患者的生存期^[30-31]。由于在选择治疗反应性患者时缺乏生物标记物, 靶向治疗可能对一部分 ccRCC 患者有未实现的临床益处^[32]。本研究发现, 治疗前 ccRCC 肿瘤中 ReCAL 的高表达与舒尼替尼和索拉非尼治疗反应不良显著相关, 而治疗后 ReCAL 低表达的患者预后显著改善。因此, 在决定一个疗程之前, 最好评估 ccRCC 肿瘤中 ReCAL 的表达, 以确定可能受益于靶向治疗的患者类型。

总的来说, 本研究提供了可靠的证据, 证明 ccRCC 组织中 ReCAL 高表达与恶化临床结局的风险增加相关, 并且独立于多个独立队列中其他已知的病理预测因子。此外, 这种联系在低风险 ccRCC 患者中更为明显。本研究的发现揭示了 ReCAL 可以作为 ccRCC 评估预后的生物标记物, 可能有助于个性化治疗方案的有效制订, 改善患者的治疗和预后。

【参考文献】

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA

- Cancer J Clin 2017,67(1):7-30.
- [2] Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, *et al.* Renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17009. doi: 10.1038/nrdp.2017.9.
 - [3] Campbell S, Uzzo RG, Allaf ME, *et al.* Renal Mass and Localized Renal Cancer: AUA Guideline[J]. *J Urol*, 2017,198(3): 520-529.
 - [4] Finelli A, Ismaili N, Bro B, *et al.* Management of small renal masses: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline[J]. *J Clin Oncol*, 2017,35(6):668-680.
 - [5] Zigeuner R, Hutterer G, Chromecki T, *et al.* External validation of the Mayo Clinic stage, size, grade, and necrosis (SSIGN) score for clear-cell renal cell carcinoma in a single European centre applying routine pathology [J]. *Eur Urol*, 2010, 57(1): 102-109.
 - [6] 刘国安,赖江琼,梁礼平,等.彩色多普勒超声检查对肾癌诊断及分期的临床价值[J]. *东南国防医药*, 2015, 17(6): 613-615.
 - [7] Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, *et al.* EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update[J]. *Eur Urol*, 2015,67(5): 913-924.
 - [8] Brooks SA, Brannon AR, Parker JS, *et al.* ClearCode34: A prognostic risk predictor for localized clear cell renal cell carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2014,66(1):77-84.
 - [9] Rini B, Goddard A, Knezevic D, *et al.* A 16-gene assay to predict recurrence after surgery in localised renal cell carcinoma: development and validation studies [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(6):676-685.
 - [10] Evans JR, Feng FY, Chinnaiyan AM. The bright side of dark matter: lncRNAs in cancer [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 2775-2282.
 - [11] 张国华,徐颖,邹晨,等.长链非编码 RNA DGCR5 在胃癌中的表达及临床意义[J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(1): 33-38.
 - [12] 韩艳玲,周梦良,王汉东.长链非编码 RNA MTHFD2 基因在胶质母细胞瘤的表达及生物学功能[J]. *医学研究生学报*, 2019,32(4):369-373.
 - [13] Xu Z, Yang F, Wei D, *et al.* Long noncoding RNA-SRLR elicits intrinsic sorafenib resistance via evoking IL-6/STAT3 axis in renal cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2017,36(14):1965-1977.
 - [14] Qu L, Wu Z, Li Y, *et al.* A feed-forward loop between lncARSR and YAP activity promotes expansion of renal tumour-initiating cells [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12692. doi: 10.1038/ncomms12692.
 - [15] Qu L, Ding J, Chen C, *et al.* Exosome-transmitted lncARSR promotes sunitinib resistance in renal cancer by acting as a competing endogenous RNA [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(5): 653-668.
 - [16] Yan X, Hu Z, Feng Y, *et al.* Comprehensive genomic characterization of long non-coding RNAs across human cancers [J]. *Cancer Cell*, 2015,28(4):529-540.
 - [17] Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, *et al.* The landscape of long non-coding RNAs in the human transcriptome [J]. *Nat Genet*, 2015, 47(3):199-208.
 - [18] Du Z, Fei T, Verhaak RG, *et al.* Integrative genomic analyses reveal clinically relevant long noncoding RNAs in human cancer [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013,20(7):908-913.
 - [19] McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, *et al.* Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK) [J]. *J Natl CancerInst*, 2005,97(16):1180-1184.
 - [20] Scelo G, Riazalhosseini Y, Greger L, *et al.* Variation in genomic landscape of clear cell renal cell carcinoma across Europe [J]. *Nat Commun*, 2014,5:5135.
 - [21] Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, *et al.* Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(8):860-867.
 - [22] Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Nature*, 2013,499(7456): 43-49.
 - [23] Copas JB. Using regression models for prediction: shrinkage and regression to the mean [J]. *Stat Methods Med Res*, 1997,6(2): 167-183.
 - [24] Hess KR. Graphical methods for assessing violations of the proportional hazards assumption in Cox regression [J]. *Stat Med*, 1995,14(15):1707-1723.
 - [25] Peduzzi P, Concato J, Feinstein AR, *et al.* Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates [J]. *J Clin Epidemiol*, 1995,48(12):1503-1510.
 - [26] 陈贤明,黄少华,杨帆,等.影响鼻咽癌预后的相关因素分析[J]. *东南国防医药*, 2014,16(6):584-586.
 - [27] Maroto P, Rini B. Molecular Biomarkers in Advanced Renal Cell Carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2014,20(8):2060-2071.
 - [28] Choueiri TK, Motzer RJ. Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2017,376(4):354-666.
 - [29] Posadas EM, Limvorasak S, Figlin RA. Targeted therapies for renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017,13(8):496-511.
 - [30] Molina A, Lin X, Korytowsky B, *et al.* Sunitinib objective response in metastatic renal cell carcinoma: analysis of 1059 patients treated on clinical trials [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(2):351-358.
 - [31] Heng DY, Xie W, Regan MM, *et al.* Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor - targeted agents: results from a large, multicenter study [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(34):5794-5799.
 - [32] Albiges L, Choueiri T, Escudier B, *et al.* A systematic review of sequencing and combinations of systemic therapy in metastatic renal cancer [J]. *Eur Urol*, 2015,67(1):100-110.

(收稿日期:2020-07-21; 修回日期:2020-10-06)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)