

基于生信分析构建泌尿系肿瘤铁死亡预后模型

沈忠杰,张俊勇,葛成国

(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

摘要 **目的** 通过生物信息学方法构建并验证泌尿系肿瘤铁死亡相关的预后模型。**方法** 分析 TCGA 中的膀胱癌 (BLCA) 和肾透明细胞癌 (KIRC) 数据集的 RNA-seq 及临床数据,建立预后模型,并使用 ICGC 和 GEO 数据进行验证。通过单变量 Cox、LASSO-Cox 和多变量 Cox 回归分析确定铁死亡相关预后基因。利用共表达和蛋白-蛋白互作网络分析基因间的关系,以及通过免疫浸润分析探讨基因与免疫微环境的关联。对 BLCA 和 KIRC 预后模型高低风险组的差异表达基因进行功能富集分析,探讨铁死亡相关基因调控这两种癌症预后的潜在机制。**结果** 在 BLCA 和 KIRC 中鉴定出与预后显著相关的铁死亡基因,包括 BLCA 的 EGR1、ZEB1、P4HB、WWTR1、JUN、CDO1、SCD、SREBF1、CAV1、GALNT14 等;KIRC 的 ASMTL-AS1、CHAC1、MT1G、RRM2、TIMP1、DPEP1、GLRX5、NDRG1 等。此外,筛选出与两种癌症预后相关的铁死亡相关 miRNA。基于这些基因和 miRNA 构建的风险模型预测了 TCGA-BLCA 和 KIRC 患者的预后,其中低危组的总生存期显著高于高危组 ($P < 0.05$),模型的风险比范围为 2.54 (95% CI: 1.73 ~ 3.74) 至 4.74 (95% CI: 3.47 ~ 6.47),AUC 均在 0.60 以上。共表达分析和蛋白-蛋白互作网络显示 BLCA 中 JUN 与 EGR1 表达水平相关性高,SCD 与 SREBF1 之间也存在相关性。免疫浸润相关性分析显示 BLCA 中 EGR1、CAV1、JUN 基因表达与免疫评分呈正相关,SREBF1 与免疫评分呈负相关。**结论** 基于铁死亡相关基因的预后模型在预测 BLCA 和 KIRC 患者预后方面表现出良好的性能,可为靶向铁死亡评估 BLCA 和 KIRC 患者预后提供参考。

关键词 膀胱尿路上皮癌;肾透明细胞癌;铁死亡;预后模型;miRNAs;免疫浸润

中图分类号 R 737.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)11-2012-12

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.017

2024-09-24 接收

基金项目:重庆市自然科学基金(编号:CSTB2022NSCQ-MSX0879)

作者简介:沈忠杰,男,硕士研究生;

葛成国,男,博士,主任医师,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:geg2022@hospital.cqmu.edu.cn

泌尿系统肿瘤包括膀胱癌、肾癌等,其中膀胱癌为泌尿生殖系统中第二大常见癌症,且为全球十大最常见恶性肿瘤。随着人口老龄化,这些肿瘤的发病率逐年增加^[1]。早期泌尿系统肿瘤主要通过手术切除治疗,但晚期患者由于对化疗和放疗的抗

the CCK-8 assay was used to detect the proliferation of the cells under different culture models and the drug sensitivity to doxorubicin; flow cytometry was used to compare the differences in apoptosis during the proliferation process; and the differences in the migratory and invasive abilities of the cells were assessed by scratch assay and Transwell assay; the expression of epithelial-mesenchymal transition-related proteins was detected by Western blot. **Results** Breast cancer cells grew well in hydrogel nucleus-shell microcapsules; cell proliferation assays showed that 3D culture and 3D co-culture cells proliferated at a significantly lower rate than 2D culture; 3D culture and 3D co-culture cells had enhanced migration and invasion ability and showed higher expression of EMT-related proteins compared to 2D culture; 3D culture and 3D co-culture cells were significantly less sensitive to chemotherapeutic drugs compared to 2D culture. The sensitivity of 3D and 3D co-cultured cells to chemotherapeutic drugs was significantly reduced compared to 2D culture. **Conclusion** 3D cultures show similar morphology and biology to in vivo tumours and are more resistant to chemotherapeutic agents.

Key words 3D culture; co-culture; core-shell microcapsules; tumor microenvironment; chemoresistance

Fund programs National Natural Science Foundation of China(No. 81972472); Basic and Clinical Cooperative Research Promotion Program of Anhui Medical University(No. 2020xkjT012)

Corresponding authors Liu Xiaoli, E-mail: lxl_8512@163.com; Wu Zhengsheng, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn

性,预后通常较差^[2]。铁死亡,一种铁离子依赖的程序性细胞死亡方式,与泌尿系统肿瘤密切相关。通过细胞内活性氧积累引发的脂质过氧化作用触发,其调控机制涉及多种 mRNA 和 miRNA^[3]。该研究针对肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)和膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BLCA)的铁死亡相关基因进行分析,旨在构建预测 KIRC 和 BLCA 患者预后的多基因模型,并探讨这些基因的相互作用及其在肿瘤中的作用机制,以期治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 数据收集 本研究从 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>)、GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 和 ICGC 数据库下载 KIRC 和 BLCA 的 RNA 测序数据(包括转录组和 miRNA 测序)和患者的临床数据。总生存时间(overall survival, OS)超过 30 d 的患者用于生存分析。从 FerrDb 数据库中下载了 484 个铁死亡相关基因,包括驱动基因、抑制基因和标记基因^[4]。

1.2 方法

1.2.1 差异表达的铁死亡相关基因和 miRNAs 的鉴定 首先去除 NA 值比例大于 50% 的行(基因)和 NA 值比例大于 50% 的列(样本),利用 R 软件包 impute 的 impute.knn 函数进行缺失值补全,设置 Number of neighbors 为 K 以补全数据缺失,然后对数据进行 $\log_2(\text{TPM} + 1)$ 标准化。使用 R 软件包 limma (version 3.40.6) 进行差异分析,以获得肿瘤与对照组间的差异基因 [$|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 和 $P < 0.05$]。差异表达 mRNA (DEmRNAs) 和 484 个铁死亡相关基因之间的交集为差异表达铁死亡相关基因(DEFGRs)。基于 Pearson 相关分析,构建了 DEFGRs 和差异表达 miRNAs (DEmiRNAs) 的共表达网络,以鉴定差异表达的铁死亡相关 miRNAs 以及 DEFR miRNAs。

1.2.2 DEFR 基因和 miRNAs 预后模型的构建 首先使用 R 软件包 survival,整合生存时间、生存状态和基因表达数据,利用单变量 Cox 回归分析评估每个基因的预后显著性,以确定与 OS 具有预后相关性的 DEFGRs 和 DEFR miRNAs。统计学显著值设定为 $P < 0.05$ 。此外,使用 R 软件包 glmnet,整合生存时间、生存状态和基因表达数据,利用 Lasso-Cox 方法进行回归分析来避免过拟合,并建立可靠和稳健的模型。接下来,使用多变量 Cox 回归分析验证

筛选的 DEFGRs 和 DEFR miRNAs,并获得与 BLCA 和 KIRC 预后相关的 DEFGRs 和 DEFR miRNAs。最后,为每个患者构建预后风险评分(risk score, RS)模型。

1.2.3 预后模型的验证 通过 Kaplan-Meier 生存分析和 ROC 曲线评估预后模型的预测能力。为了检验构建的预后模型的稳健性,利用 GEO 和 ICGC 数据库中 KIRC 和 BLCA 患者数据验证预后模型的可靠性。

1.2.4 预后相关的铁死亡基因与免疫浸润的相关性分析 利用 R 软件包 ESTIMATE (version 1.0.13) 计算患者的免疫浸润评分(stromal, immune 和 ESTIMATE 评分)。使用 R 软件包 psych (version 2.1.6) 的 corr.test 函数计算基因与免疫浸润评分的 Pearson 相关系数,以确定显著相关的免疫浸润评分,研究预后相关基因与免疫浸润之间的关系。

1.3 统计学处理 本研究所有统计分析均采用 R 软件进行。进行单变量 Cox 回归分析、LASSO-Cox 回归分析和多变量 Cox 分析,以确定与患者预后相关的 DEFR 基因和 miRNAs。采用 Kaplan - Meier 生存分析和对数秩检验进行生存分析。R 软件包 timeROC 用于绘制受试者工作特性(receiver operating characteristic, ROC)曲线并量化曲线下面积(area under curve, AUC)值。

2 结果

2.1 BLCA 和 KIRC 差异表达铁死亡相关基因和 miRNAs 的鉴别 本研究差异表达分析显示,在 TCGA-BLCA 中,1 688 个 mRNA 和 726 个 miRNA 在肿瘤组和对照组之间差异表达,火山图见图 1A 和图 1B。在 TCGA-KIRC 中,2 278 个 mRNA 和 471 个 miRNA 在肿瘤组和对照组之间差异表达,火山图见图 1C 和图 1D。

此外,分别用 TCGA-BLCA 和 TCGA-KIRC 的差异表达基因与 484 个铁死亡相关基因取交集后,分别获得 53 个和 67 个 DEFGRs(图 2A 和 4A)。使用共表达分析构建共表达网络,筛选与铁死亡相关的 miRNA 基因集,鉴定了 428 个 BLCA_FRmiRNAs 和 382 个 KIRC_FRmiRNAs,然后分别用 TCGA-BLCA 和 TCGA-KIRC 的差异表达 miRNAs 与对应的 FRmiRNAs 取交集后,得到 217 个 BLCA_DEFR miRNAs 和 98 个 KIRC_FR miRNAs,如图 3A 和 5A 所示。

2.2 选预后相关的铁死亡相关基因和 miRNAs

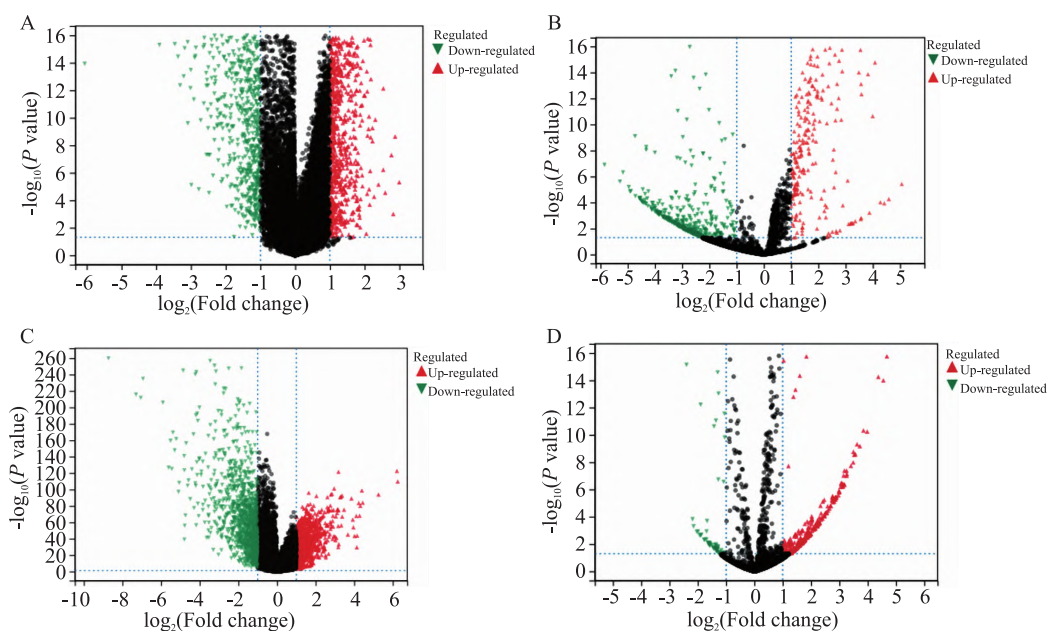


图1 BLCA 和 KIRC 差异表达基因和 miRNAs 的鉴别

Fig.1 Identification of differentially expressed genes and miRNAs in BLCA and KIRC

A:TCGA-BLCA Tumor vs Normal;B:TCGA-BLCA miRNA Tumor vs Normal;C:TCGA-KIRC Tumor vs Normal;D:TCGA-KIRC miRNA Tumor vs Normal.

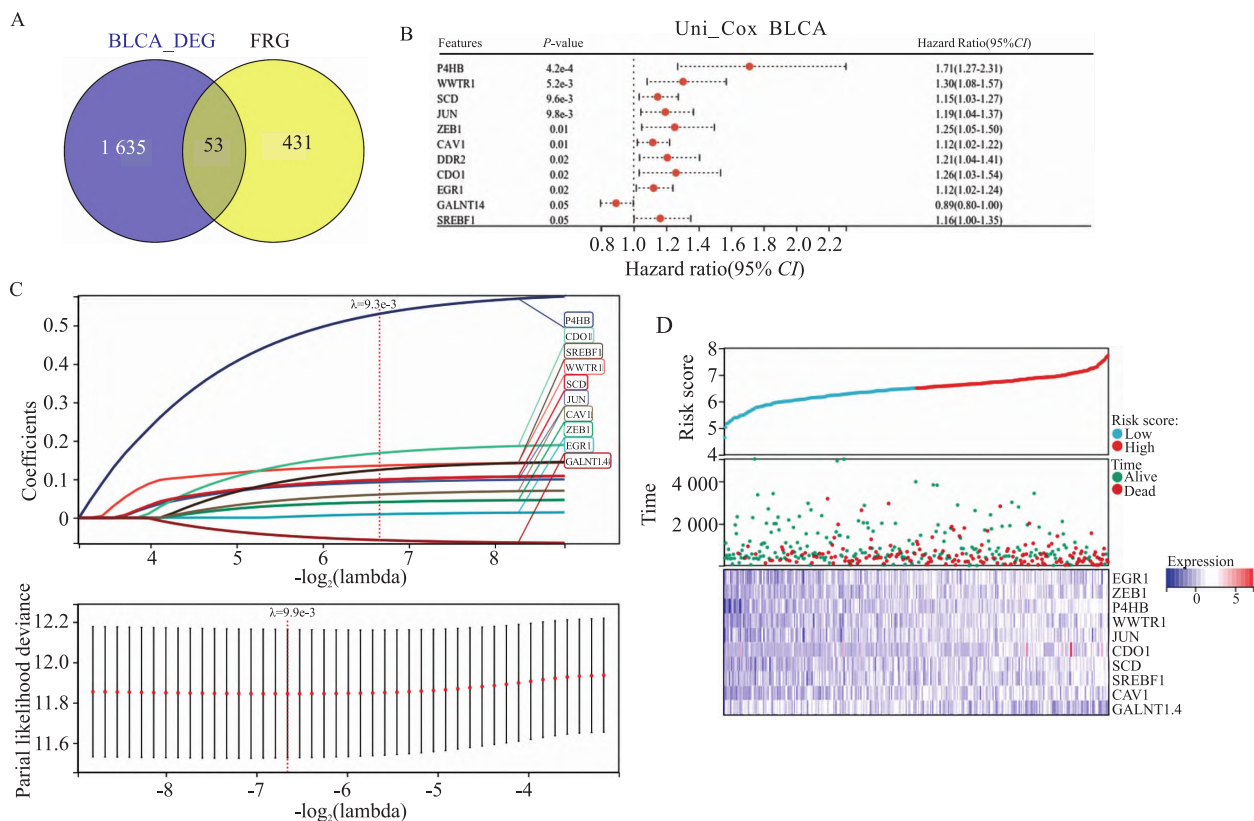


图2 BLCA 预后 DEFR 基因的鉴定

Fig.2 Identification of prognostic DEFR genes in BLCA

A:Identification of differentially expressed ferroptosis-related genes in BLCA;B:Forest plot of 11 DEFR genes identified by univariate Cox regression analysis;C:LASSO-Cox analysis identified 10 DEFR genes;D:The relationship between the expression of the identified 10 DEFRs and patient prognosis.

对于 BLCA,通过单因素 Cox 回归分析,获得 11 个差异表达铁死亡相关基因 DEFRGs 与 BLCA 患者的 OS 显著相关,如图 2B;单因素 Cox 回归分析获得 51 个差异表达铁死亡相关 DEFR miRNAs 与 BLCA 患者的 OS 显著相关,如图 3A。通过 LASSO-Cox 回归分析,消除预后相关的假阳性,进一步筛选了 10 个 DEFRGs 和 24 个 DEFR miRNAs,如图 2C 和图 3B。通过多因素 Cox 回归分析最后鉴定出具有独立预后价值的 11 个 FRmiRNAs (图 3C),应用于建立预后风险模型。

在 KIRC 中,单因素 Cox 回归分析获得 37 个 DEFRGs 和 43 个 DEFR miRNAs (图 4B 和图 5B); LASSO-Cox 回归分析进一步筛选了 13 个 DEFRGs 和 16 个 DEFR miRNAs ,如图 4C 和图 5C。通过多

因素 Cox 回归分析鉴定出 8 个预后相关的 FRGs 和 10 个 FRmiRNAs (图 4D 和图 5D)。

2.3 构建铁死亡相关基因和 miRNAs 的预后模型

通过 LASSO-Cox 回归分析构建了从选定的 FRGs 或 FRmiRNAs 中提取的预后模型。对于 BLCA, 10 个预后相关 FRGs 中, GALNT14 为低风险基因, 其余为高风险基因。表 1 中, 11 个 FRmiRNAs 与 BLCA 的预后有关, 5 个 FRmiRNAs: hsa-miR-133a-3p、hsa-miR-17-3p、hsa-miR-1976、hsa-miR-590-3p 和 hsa-miR-99a-5p 为低风险 miRNAs (表 2)。在 KIRC 中, LASSO-Cox 回归分析构建了从 8 种选定的 FGs 中提取的预后风险模型。两种肿瘤各自对应的基因与 miRNAs 相关的风险预后模型如表 3、4 所示。

此外,本研究分析了不同风险分数与患者的

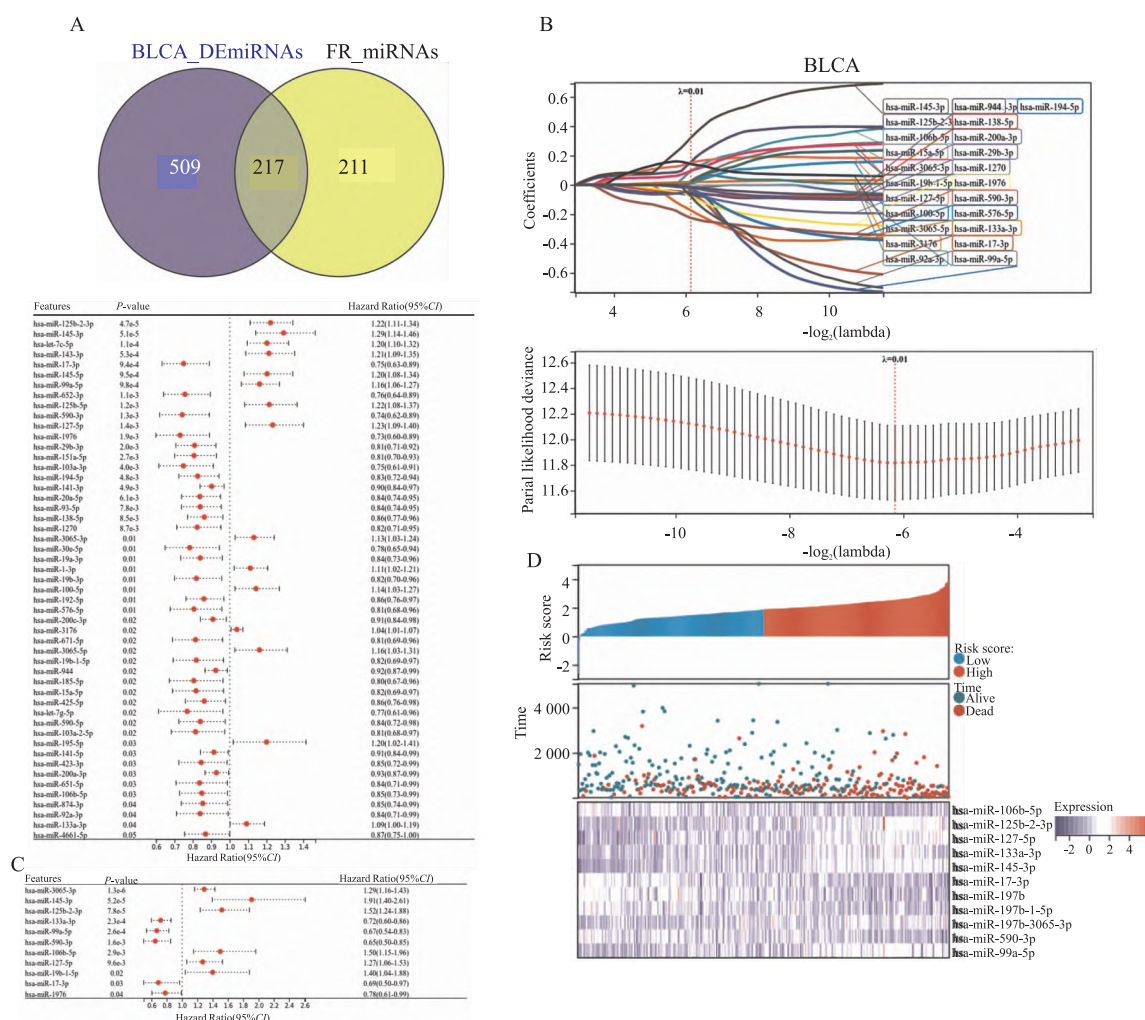


图3 BLCA 预后 DEFR miRNAs 的鉴定

Fig.3 Identification of prognostic DEFR miRNAs in BLCA

A: Venn diagram showing differentially expressed ferroptosis-related miRNAs in BLCA, and forest plot of DEFR miRNAs identified by univariate Cox regression analysis; B: LASSO-Cox analysis identified 34 DEFR miRNAs; C: Forest plot of 11 DEFR miRNAs identified by multivariate Cox regression analysis; D: The relationship between the expression of the identified 11 DEFR miRNAs and patient prognosis.

表1 BLCA 铁死亡相关基因风险预后模型

Tab 1 Risk prognostic model of ferroptosis-related genes in BLCA

Genes	Coefficient	Risk
EGR1	0.009 068	High
ZEB1	0.040 667	High
P4HB	0.530 804	High
WWTR1	0.135 543	High
JUN	0.092 308	High
CDO1	0.168 378	High
SCD	0.098 788	High
SREBF1	0.124 797	High
CAV1	0.060 377	High
GALNT14	-0.058 24	Low

OS、事件及各个基因的表达变化的关系,可以观察到随着风险分数的增加,患者的生存率明显下降(图6A、6C、6E、6G),低风险基因,随着风险分数的

增加表达呈现下调趋势,而高风险基因,随着风险分数的增加表达呈现上调趋势(图2D、3D、4E、5E)。

表2 BLCA 铁死亡相关 miRNAs 风险预后模型

Tab 2 Risk prognostic model of ferroptosis-related miRNAs in BLCA

miRNA	Coefficient	Risk
hsa-miR-106b-5p	0.204 13	High
hsa-miR-125b-2-3p	0.391 548	High
hsa-miR-127-5p	0.199 446	High
hsa-miR-133a-3p	-0.330 49	Low
hsa-miR-145-3p	0.696 987	High
hsa-miR-17-3p	-0.330 8	Low
hsa-miR-1976	-0.196 65	Low
hsa-miR-19b-1-5p	0.269 868	High
hsa-miR-3065-3p	0.215 901	High
hsa-miR-590-3p	-0.389 01	Low
hsa-miR-99a-5p	-0.284 1	Low

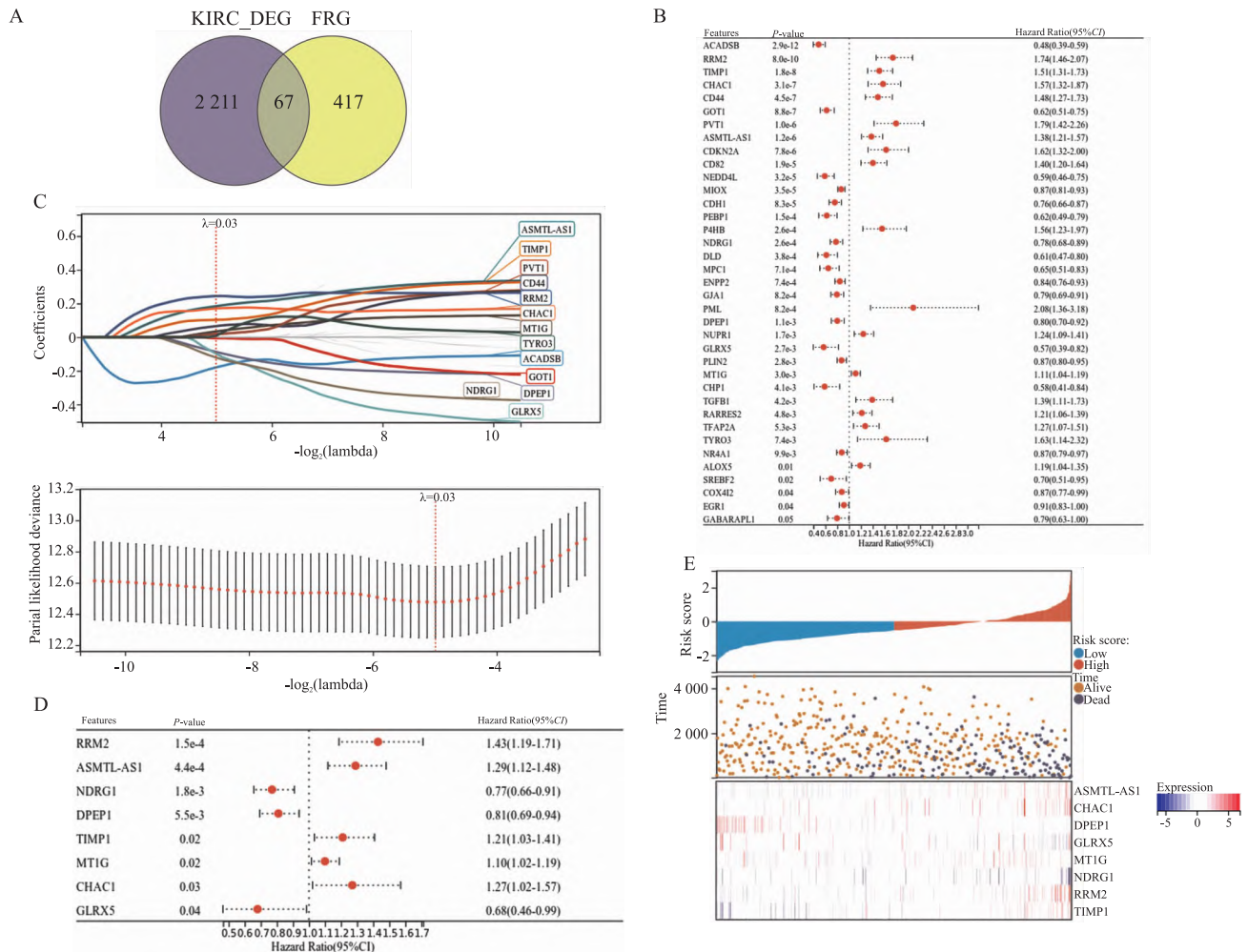


图4 KIRC 预后 DEFR 基因的鉴定

Fig.4 Identification of DEFR Genes for Prognosis in KIRC

A: Venn diagram showing differentially expressed ferroptosis-related genes in KIRC; B: Forest plot of 37 DEFRGs identified by univariate Cox regression analysis; C: LASSO-Cox analysis identified 13 DEFRGs; D: Forest plot of 8 DEFRGs identified by multivariate Cox regression analysis; E: Relationship between the expression of 8 identified DEFRGs and the prognosis of KIRC patients.

表3 KIRC 铁死亡相关基因风险预后模型

Tab 3 Risk prognostic model of ferroptosis-related genes in KIRC

Genes	Coefficient	Risk
ASMTL-AS1	0.246 314	High
CHAC1	0.232 976	High
DPEP1	-0.196 49	Low
GLRX5	-0.356 78	Low
MT1G	0.087 034	High
NDRG1	-0.241 12	Low
RRM2	0.345 564	High
TIMP1	0.186 514	High

2.4 验证预后模型的准确性 Kaplan-Meier 生存

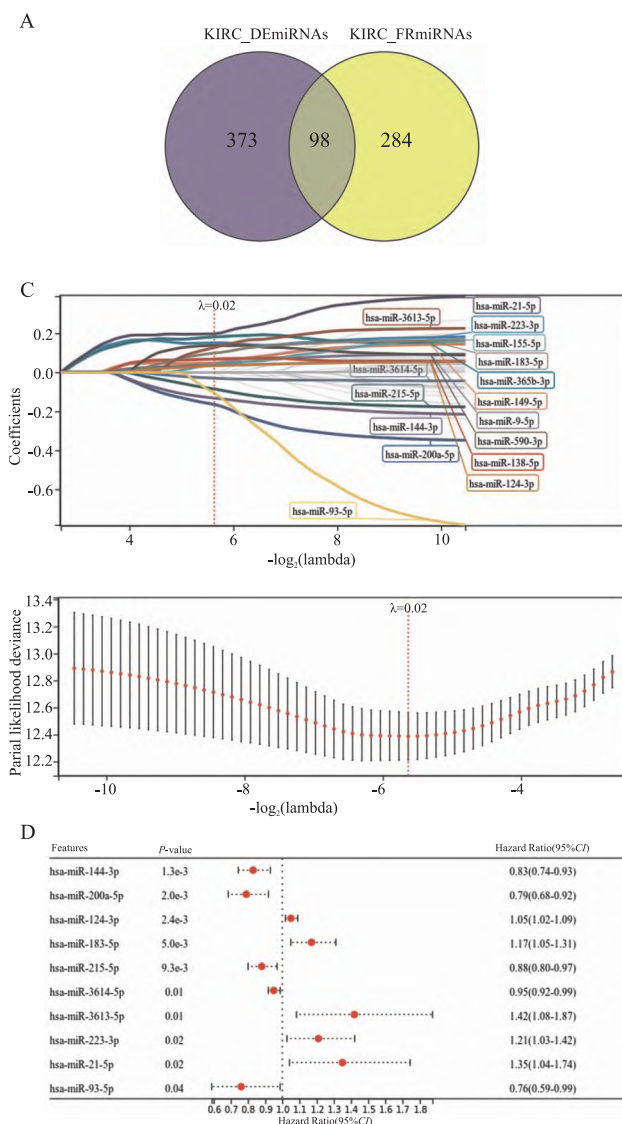


图5 KIRC 预后 DEFR miRNAs 的鉴定

Fig. 5 Identification of DEFR miRNAs for Prognosis in KIRC

A: Venn diagram showing differentially expressed ferroptosis-related miRNAs in KIRC; B: Forest plot of 43 DEFR miRNAs identified by univariate Cox regression analysis; C: LASSO-Cox analysis identified 16 DEFR miRNAs; D: Forest plot of 10 DEFR miRNAs identified by multivariate Cox regression analysis; E: Relationship between the expression of 10 identified DEFR miRNAs and the prognosis of KIRC patients.

分析显示,高风险组患者的中位数 OS 比低风险组的患者短 ($P < 0.001$; 图 6A、6C、6E、6G)。在 TC-GA-BLCA 中,ROC 曲线的 1 年、3 年和 5 年 AUC 值见图 6B 和 6D。TCGA-KIRC ROC 曲线的相应 1 年、3 年和 5 年 AUC 值见图 6F 和图 6H。这些数据共同说明了选定的铁死亡相关基因或 miRNAs 用于 BLCA 和 KIRC 预后的风险模型的准确性。

2.5 铁死亡预后基因与 BLCA 肿瘤微环境的关系

由于肿瘤微环境与预后密切相关,本研究分析了预后相关铁死亡基因表达与肿瘤微环境和免疫浸润

表4 KIRC 铁死亡相关 miRNAs 风险预后模型

Tab 4 Risk prognostic model of ferroptosis-related

miRNAs in KIRC

miRNA	Coefficient	Risk
hsa-miR-223-3p	0.176 860	High
hsa-miR-21-5p	0.395 489	High
hsa-miR-183-5p	0.185 869	High
hsa-miR-3613-5p	0.402 641	High
hsa-miR-200a-5p	-0.275 780	Low
hsa-miR-124-3p	0.042 197 0	High
hsa-miR-215-5p	-0.110 790	Low
hsa-miR-144-3p	-0.172 230	Low
hsa-miR-3614-5p	-0.047 470	Low
hsa-miR-93-5p	-0.137 590	Low

的相关性,结果如图7所示,EGR1、CAV1和JUN基因表达与基质评分呈正相关,SREBF1与基质评分呈负相关。EGR1、CAV1和JUN基因表达与免疫评分呈正相关,SREBF1与免疫评分呈负相关。

2.6 BLCA 预后相关 FRGs 和 FRmiRNAs 表达相关性 为了探讨预后相关铁死亡基因或 miRNAs 的作用模式,本研究对 BLCA 预后相关基因进行了共表达分析。如图8所示,EGR1与JUN表达呈显著正相关,ZEB1与WWTR1在BLCA中的表达也呈现正相关,SCD与SREBF1呈现正相关。

在 BLCA 预后相关 FRGs 和 FRmiRNAs 之间,hsa-miR-106b-5p与CAV1表达呈负相关($r = -0.1$, $P < 0.05$),而 hsa-miR-1976与SREBF1表达呈正相关($r = 0.11$, $P < 0.05$)。利用 STRING 数据库的蛋白-蛋白互作网络和共表达分析,结果如图9所示,

JUN和EGR1的表达水平相关性高,SCD和SREBF1之间也存在相关性。在调控 BLCA 预后方面,JUN和EGR1可能协同作用。

2.7 突变分析 基因突变可能会导致基因表达水平的改变。为了探讨 BLCA 高风险组和低风险组患者之间预后相关的铁死亡基因突变是否具有差异,本研究分析了 BLCA 预后相关铁死亡基因在 TCGA-BLCA 高风险组和低风险组患者中的突变景观,并使用卡方检验评估了每一组样本中基因突变频次的差异,结果如图10所示。JUN、WWTR1和GALNT14在TCGA-BLCA高风险组和低风险组患者之间突变频次存在差异,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.8 铁死亡相关基因调控 BLCA 和 KIRC 预后的潜在通路分析 为了探讨铁死亡相关基因调控 BLCA 和 KIRC 预后的潜在机制及通路,本研究鉴别了 BLCA 和 KIRC 高风险组和低风险组患者间差异表达基因,并分析了其富集的生物学过程和通路。如图11所示,BLCA 高低风险组与 KIRC 高低风险组富集在完全不同的通路或生物学过程。

3 讨论

本研究在 TCGA-BLCA 患者中筛选出10个与铁死亡相关的预后基因:EGR1、ZEB1、P4HB、WWTR1、JUN、CDO1、SCD、SREBF1、CAV1和GALNT14,其中GALNT14为低风险基因,其余9个为高风险基因。共表达分析显示JUN、EGR1、CAV1

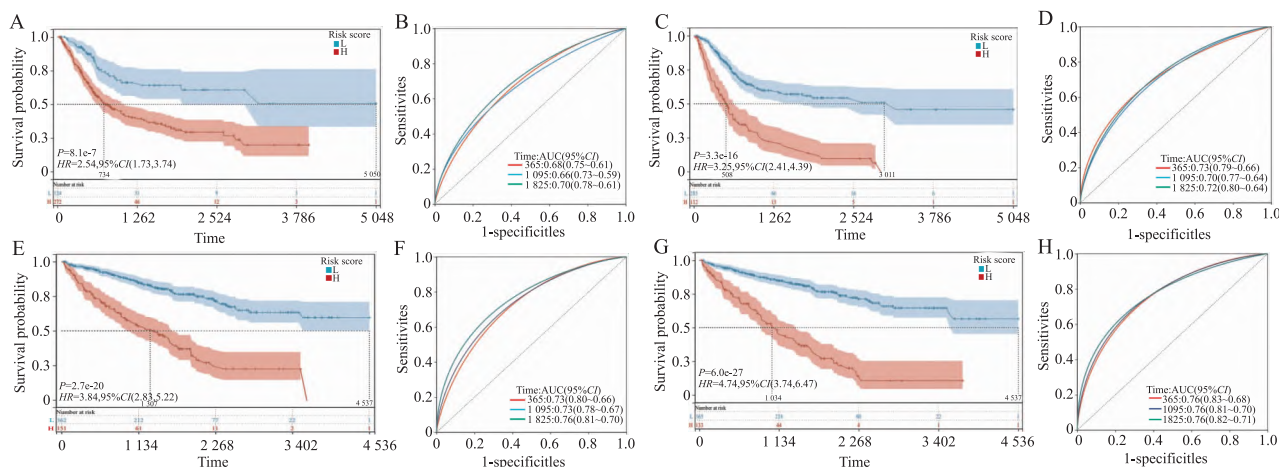


图6 预后模型的KM曲线和ROC曲线

Fig. 6 KM curves and ROC curves of the prognostic model

A, B: Construction of a prognostic model based on BLCA DEFRGs; C, D: Construction of a prognostic model based on BLCA DEFR miRNAs; E, F: Construction of a prognostic model based on KIRC DEFRGs; G, H: Construction of a prognostic model based on KIRC DEFR miRNAs.

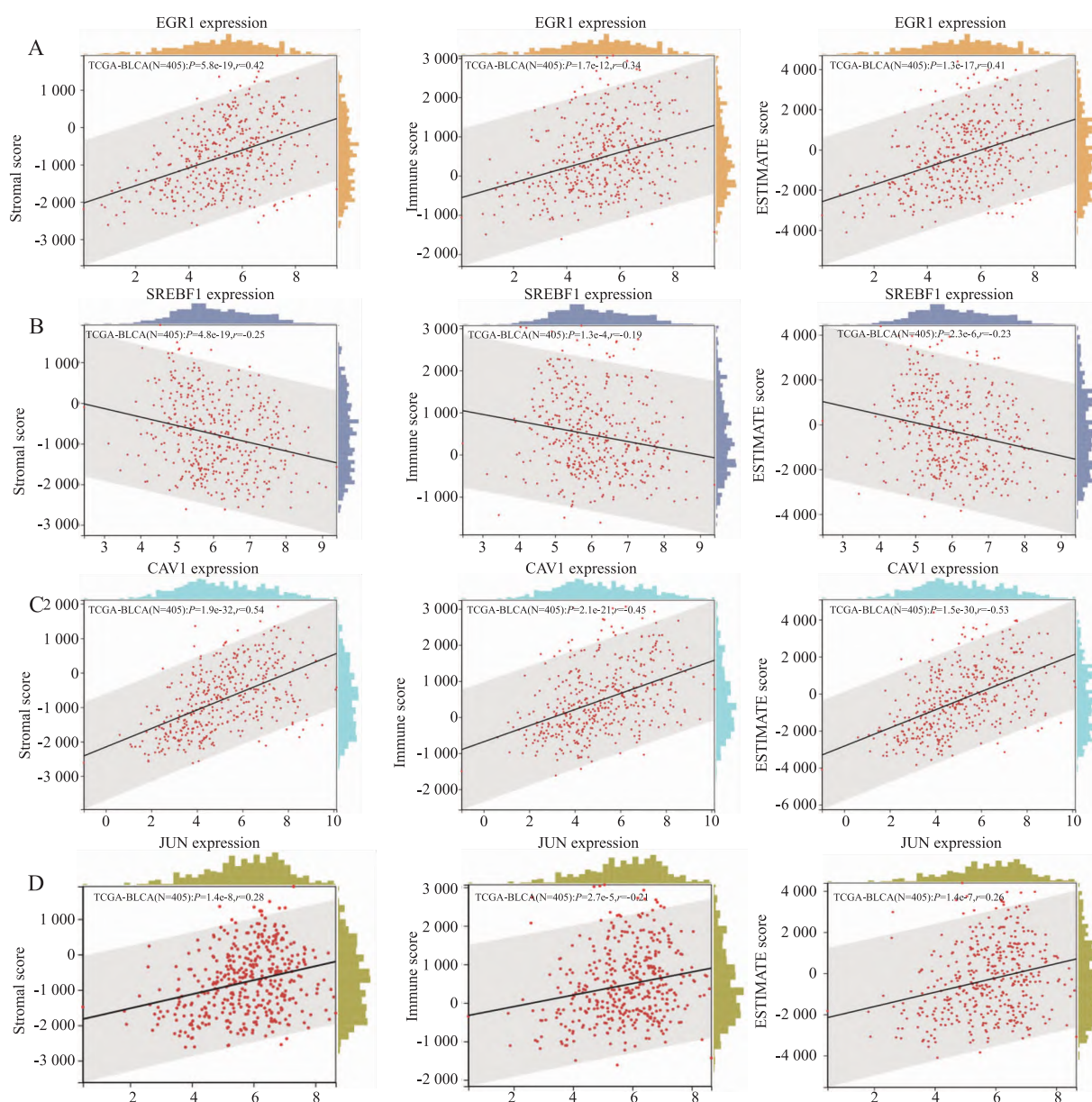


图7 BLCA 预后 FRGs 的免疫浸润分析

Fig. 7 Immune infiltration analysis of prognostic FRGs in BLCA

A: Relationship between EGR1 gene expression and stromal and immune infiltration scores; B: Relationship between SREBF1 gene expression and stromal and immune infiltration scores; C: Relationship between CAV1 gene expression and stromal and immune infiltration scores; D: Relationship between JUN gene expression and stromal and immune infiltration scores.

和 SREBF1 在膀胱癌中可能发挥核心作用。研究^[5]表明 JUN 在多种疾病的铁死亡过程中广泛参与,并与疾病预后密切相关。例如,天然产物 T4O 可通过 JUN/GPX4 依赖性铁死亡抑制神经胶质瘤细胞增殖。JUN 在阿尔茨海默病、骨关节炎、肾移植缺血再灌注损伤和缺血性中风的铁死亡过程中也显示出重要作用^[6-9]。

早期生长反应因子 1 (early growth response pro-

tein 1, EGR1) 在癌症进展中扮演关键角色,如 EGR1/TGF- β 1/Smad 途径参与肝癌细胞的增殖^[10]。在脑炎病毒 VEEV 感染的人星形细胞瘤细胞中 EGR1 显著上调,与 JUN 共表达^[11]。对乳腺癌的研究^[12]显示,EGR1 表达与 DUSP1、FOS、FOSB、CYR61 和 JUN mRNA 表达呈高度正相关,可作为预后标志物。本研究中,EGR1 和 JUN 在 BLCA 中表达呈高度正相关,为与预后独立相关的铁死亡基因。

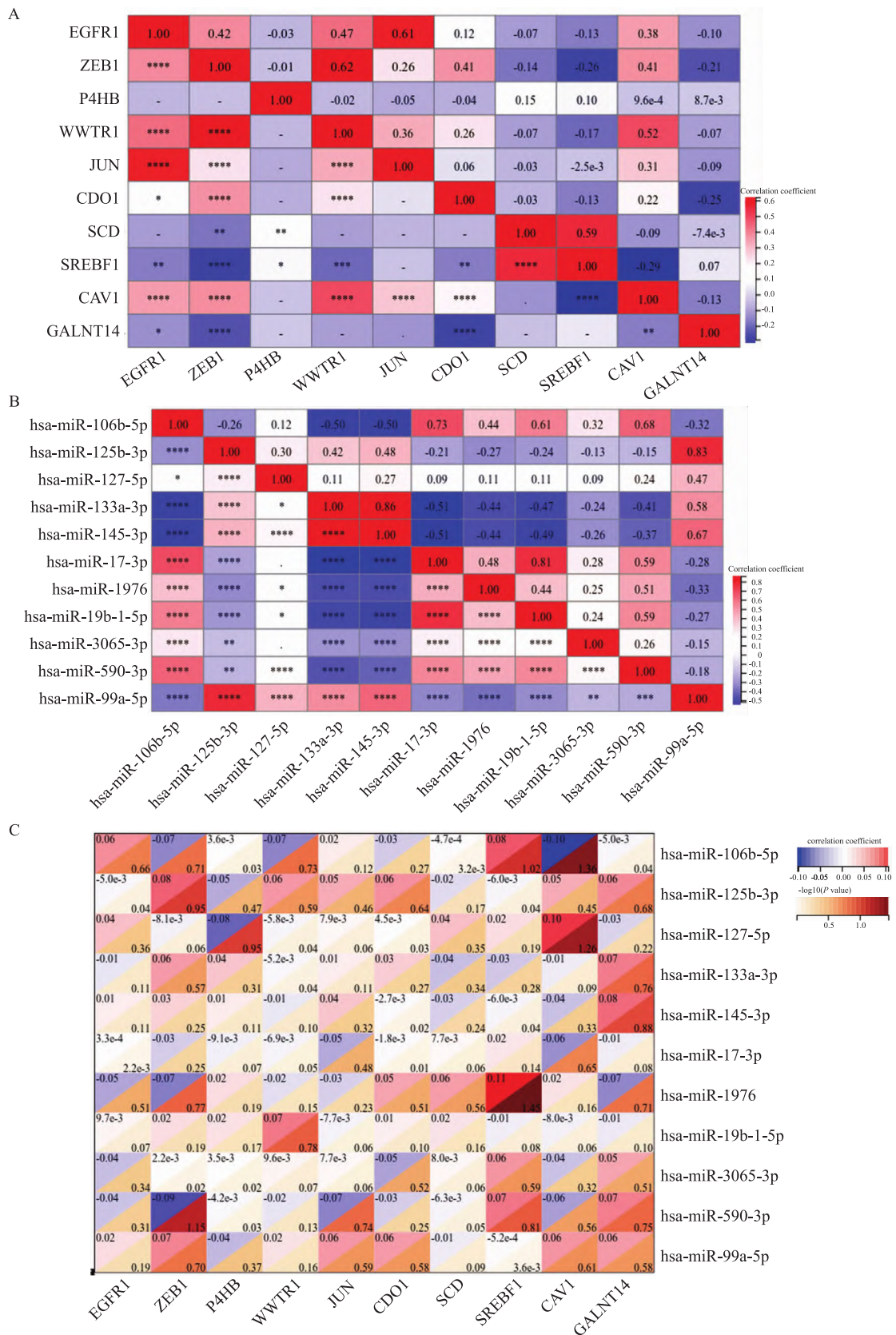


图8 BLCA 预后相关 FRGs 和 FRmiRNAs 表达相关性

Fig.8 Correlation analysis of expression of BLCA Prognosis-related FRGs and FRmiRNAs

A: Co-expression analysis of BLCA DEFRGs; B: Co-expression analysis of BLCA DEFR miRNAs; C: Correlation analysis of co-expression between BLCA DEFRGs and BLCA DEFR miRNAs.

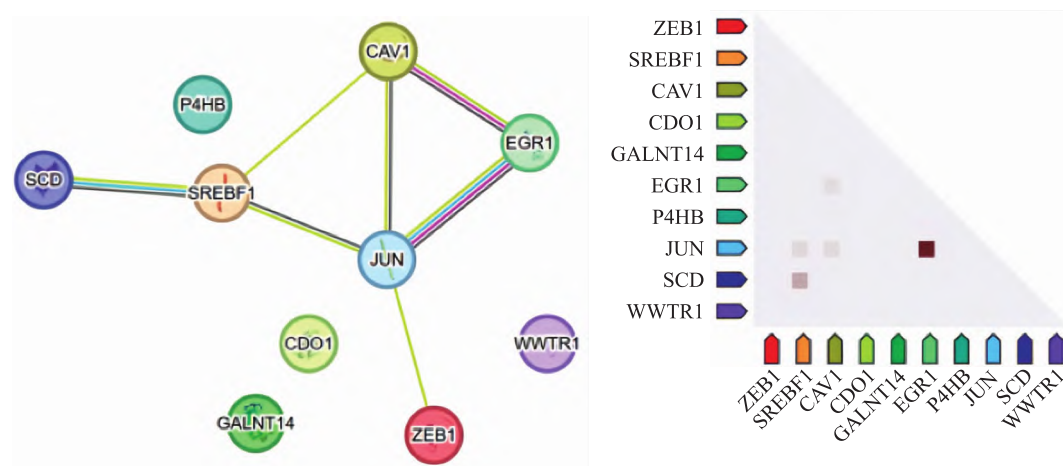


图9 BLCA 预后相关 FRGs 蛋白互动网络和共表达

Fig. 9 Protein-protein interaction network and co-expression of BLCA prognosis-related

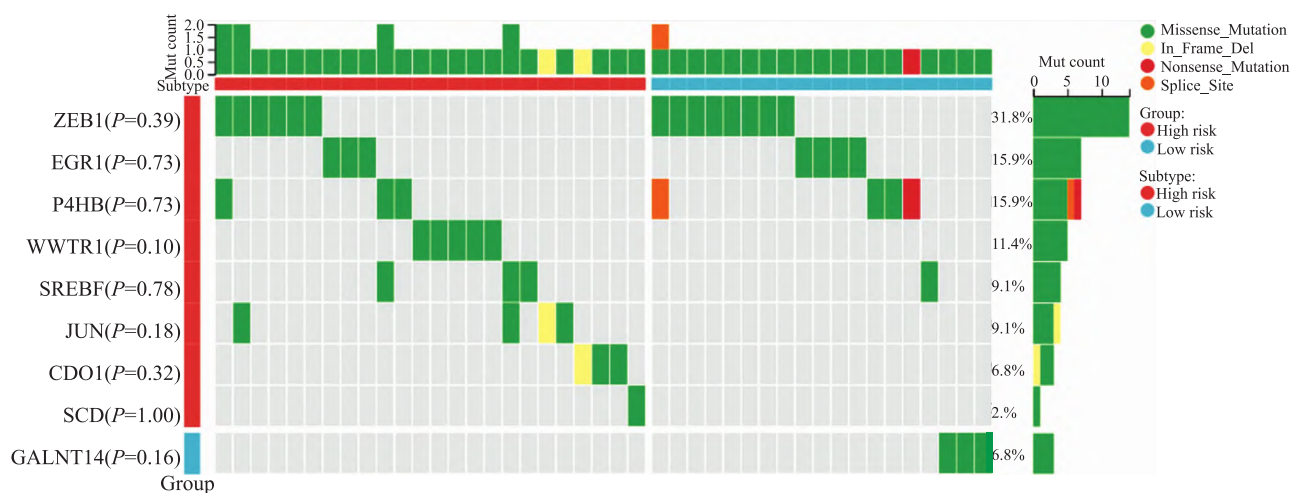


图10 BLCA 预后相关铁死亡基因在 TCGA-BLCA 高低风险患者中的突变景观

Fig. 10 Mutation landscape of BLCA prognosis-related ferroptosis genes in high- and low-risk patients in TCGA-BLCA

本研究还鉴定了与 BLCA 预后相关的 11 个铁死亡相关 miRNAs, 其中 5 个为低风险, 6 个为高风险 miRNAs。此外, 分析了与 KIRC 预后显著相关的 8 种铁死亡基因, 如 ASMTL-AS1、CHAC1、MT1G、RRM2 和 TIMP1 为高风险基因, 而 DPEP1、GLRX5 和 NDRG1 为低风险基因。CHAC1 通过诱导内质网应激和铁死亡抑制前列腺癌细胞活力, 其表达与 KIRC 不良预后呈正相关, 展示了不同肿瘤中 CHAC1 的多样性作用^[13]。

肿瘤微环境中免疫细胞和基质细胞的比例显著影响预后^[14]。本研究基于 ESTIMATE 算法分析了铁死亡基因表达与免疫浸润的相关性, 发现 EGR1、CAV1 和 JUN 基因表达与免疫评分和基质评分呈正

相关, 而 SREBF1 呈负相关。

本研究存在一定局限性, 包括未构建基因与 miRNA 的关联模型, 以及使用的 TCGA 数据主要来源于北美人群, 缺乏中国人群的验证。未来研究将关注泌尿系肿瘤铁死亡调控基因的互作关系及其在中国人群中的验证。

综上所述, 本研究通过筛选了与肾癌、膀胱癌两种癌症铁死亡过程相关的差异基因和 miRNA, 成功构建了两种癌症铁死亡相关风险预测模型, 为临床诊疗中风险预测与患者分层提供了重要参考价值, 并且本研究显示铁死亡相关基因同膀胱肿瘤免疫浸润过程存在重要关联。未来需要进一步探索铁死亡在泌尿系肿瘤生物学过程中所起的作用。

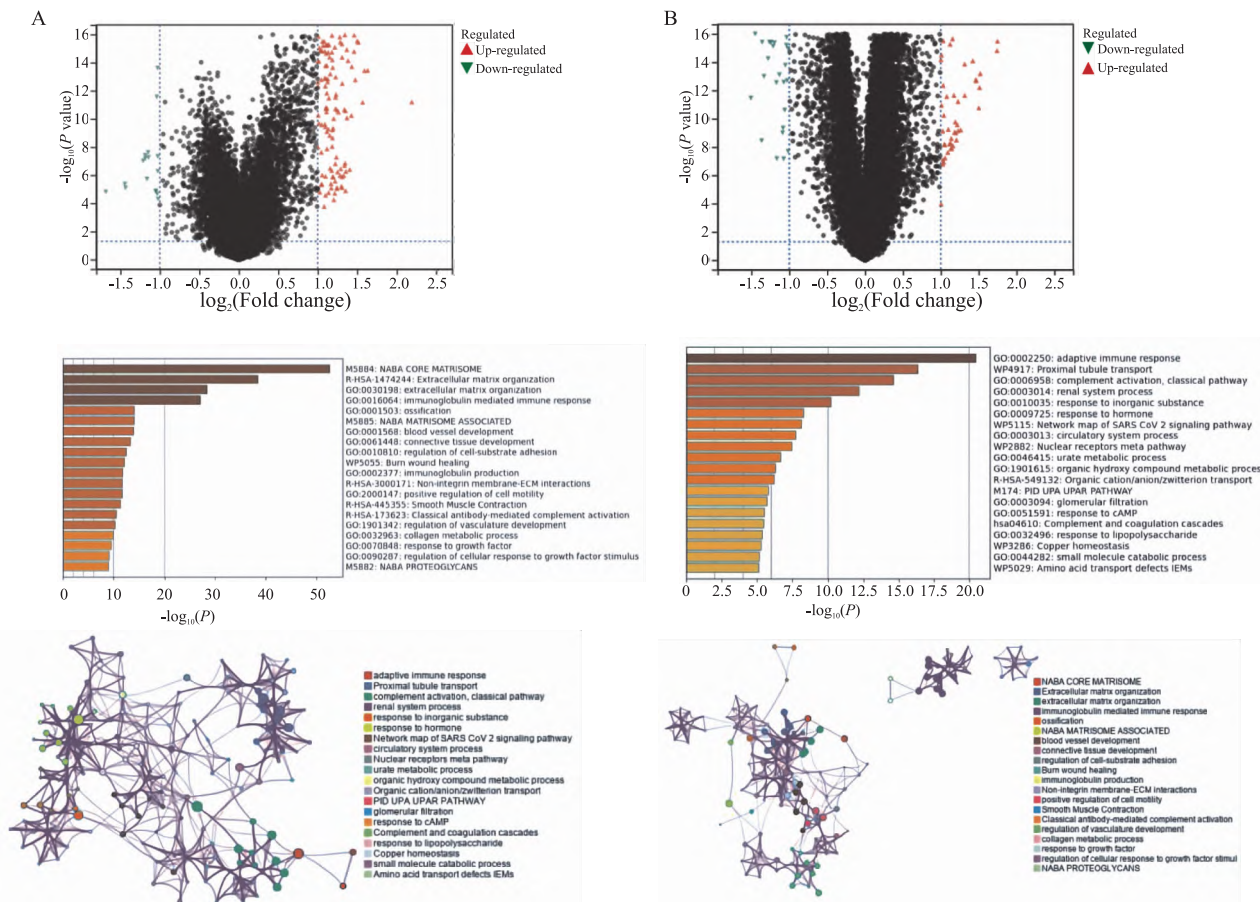


图 11 BLCA 和 KIRC 高低风险组间差异表达基因富集的生物学过程和通路

Fig. 11 Biological processes and pathways enriched in differentially expressed genes between high- and low-risk groups in BLCA and KIRC

A: High-risk group *vs* low-risk group of ferroptosis-related genes in BLCA; B: High-risk group *vs* low-risk group of ferroptosis-related genes in KIRC.

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209–49. doi:10.3322/caac.21660.
- [2] Teoh J Y C. Epidemiology and screening for urologic cancers[J]. World J Urol, 2023, 41 (4): 897–8. doi:10.1007/s00345-023-04405-z.
- [3] Xie Y, Zhou Y, Wang J, et al. Ferroptosis, autophagy, tumor and immunity[J]. Heliyon, 2023, 9 (9): e19799. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e19799.
- [4] Zhou N, Yuan X, Du Q, et al. FerrDb V2: update of the manually curated database of ferroptosis regulators and ferroptosis-disease associations[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51 (D1): D571–82. doi:10.1093/nar/gkac935.
- [5] Cao W, Li Y, Zeng Z, et al. Terpinen-4-ol induces ferroptosis of glioma cells *via* downregulating JUN proto-oncogene[J]. Molecules, 2023, 28(12): 4643. doi:10.3390/molecules28124643.
- [6] Wang Y, Chen G, Shao W. Identification of ferroptosis-related genes in Alzheimer's disease based on bioinformatic analysis[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 823741. doi:10.3389/fnins.2022.823741.
- [7] Sun K, Hou L, Guo Z, et al. JNK-JUN-NCOA4 axis contributes to chondrocyte ferroptosis and aggravates osteoarthritis *via* ferritinophagy[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 200: 87–101. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.008.
- [8] Tang Q, Li J, Wang Y, et al. Identification and verification of hub genes associated with ferroptosis in ischemia and reperfusion injury during renal transplantation[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 120: 110393. doi:10.1016/j.intimp.2023.110393.
- [9] Fan J, Chen M, Cao S, et al. Identification of a ferroptosis-related gene pair biomarker with immune infiltration landscapes in ischemic stroke: a bioinformatics-based comprehensive study[J]. BMC Genomics, 2022, 23 (1): 59. doi:10.1186/s12864-022-08295-0.
- [10] Bi J G, Zheng J F, Li Q, et al. MicroRNA-181a-5p suppresses cell proliferation by targeting Egr1 and inhibiting Egr1/TGF- β /Smad pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2019, 106: 107–16. doi:10.1016/j.biocel.2018.11.011.
- [11] Lehman C W, Smith A, Kelly J, et al. EGR1 upregulation during encephalitic viral infections contributes to inflammation and cell death[J]. Viruses, 2022, 14 (6): 1210. doi:10.3390/v14061210.

- [12] Saha S K, Islam S M R, Saha T, et al. Prognostic role of EGR1 in breast cancer: a systematic review [J]. *BMB Rep*, 2021, 54 (10): 497–504. doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.10.087.
- [13] He S, Zhang M, Ye Y, et al. ChaC glutathione specific γ -glutamylcyclotransferase 1 inhibits cell viability and increases the sensitivity of prostate cancer cells to docetaxel by inducing endoplasmic reticulum stress and ferroptosis [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(3): 997. doi:10.3892/etm.2021.10429.
- [14] Ahn B, Chae Y, Kim C H, et al. Tumor microenvironmental factors have prognostic significances in advanced gastric cancer [J]. *APMIS*, 2018, 126(10): 814–21. doi: 10.1111/apm.12889.

A ferroptosis prognosis model constructed for urological tumors based on bioinformatics analysis

Shen Zhongjie, Zhang Junyong, Ge Chengguo

(Dept of Urology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010)

Abstract **Objective** To construct and validate a prognosis model related to ferroptosis in urinary tract tumors using bioinformatics methods. **Methods** RNA-seq and clinical data from TCGA's BLCA and KIRC datasets were analyzed to establish the prognostic model, and then were validated using ICGC and GEO data. Prognostic genes associated with ferroptosis were identified through univariate Cox, LASSO-Cox, and multivariate Cox regression analyses. Co-expression and protein-protein interaction (PPI) network analyses determined the relationships among these genes. Immune infiltration analysis explored the association between ferroptosis-related prognostic genes and the immune microenvironment. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes between high and low-risk groups in BLCA and KIRC prognostic models was conducted to investigate potential mechanisms by which ferroptosis-related genes regulate BLCA and KIRC prognosis. **Results** Significant prognostic gene signatures associated with ferroptosis were identified in BLCA and KIRC. For BLCA, the genes EGR1, ZEB1, P4HB, WWTR1, JUN, CD01, SCD, SREBF1, CAV1, and GALNT14 were significant. For KIRC, the genes ASMTL-AS1, CHAC1, MT1G, RRM2, TIMP1, DPEP1, GLRX5, and NDRG1 were significant. Ferroptosis-related miRNAs linked to the prognosis of both cancers were also identified. The constructed risk models based on these genes and miRNAs predicted patient prognosis in TCGA-BLCA and KIRC, with low-risk groups showing significantly higher overall survival ($P < 0.05$). The hazard ratios for these models ranged from 2.54 (95% CI: 1.73–3.74) to 4.74 (95% CI: 3.47–6.47), with AUC values above 0.60. Co-expression analysis and PPI networks revealed high correlation levels between JUN and EGR1 in BLCA and between SCD and SREBF1. Immune infiltration analysis indicated positive correlations between EGR1, CAV1, JUN, and immune scores, while SREBF1 showed a negative correlation. **Conclusion** The prognosis model based on ferroptosis-related genes effectively predicts patient outcomes in BLCA and KIRC. This model can serve as a reference for targeting ferroptosis to assess the prognosis of BLCA and KIRC patients.

Key words bladder urothelial carcinoma; renal clear cell carcinoma; iron death; prognostic model; miRNAs; immune infiltration

Fund program Chongqing Natural Science Foundation (No. CSTB2022NSCQ–MSX0879)

Corresponding author Ge Chengguo, E-mail: gcg2022@hospital.cqmu.edu.cn