

# 肝细胞癌三级淋巴结构相关的LncRNA预后指标的建立和验证

石文<sup>1\*</sup>, 贾思琪<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>西安医学院研究生处, 陕西 西安

<sup>2</sup>郑州东方医院妇科, 河南 郑州

收稿日期: 2023年9月6日; 录用日期: 2023年10月1日; 发布日期: 2023年10月9日

## 摘要

**背景:** 三级淋巴样结构(Tertiary lymphoid structure, TLS)是影响肝癌患者预后和免疫治疗的异位淋巴样聚集体, 是肿瘤免疫治疗的新方向。长链非编码RNA (Long non-coding RNA, lncRNA)通过影响细胞生物学功能, 在肝细胞癌的发生发展中起决定性作用。然而, TLS相关lncRNA在肝细胞癌调控中的作用尚不清楚。**方法:** 本研究分析了该模型在肝癌预后中的作用, 首先从癌症基因组图谱(TCGA)下载测序数据、突变数据和临床相关数据。然后, 将数据随机分为训练组和验证组, 使用训练组训练模型, 使用验证组和TCGA全队列进行验证。接着, 本研究采用生物信息学方法构建HCC患者TLS相关预后模型。最后, 对该预后模型进行免疫相关分析、GSEA富集分析、肿瘤突变负担、TIDE预测和化疗药物预测。**结果:** 本研究建立了HCC患者的TLS相关预后特征(PSMB8-AS1、AL365361.1、LINC01011、AC026356.1), 分析了高风险评分组、低风险评分组间的差异, 并证实其影响患者预后。**结论:** 在HCC中, TLS相关的lncRNA预后模型可以预测HCC患者的临床结局, 指导后续治疗。

## 关键词

肝细胞癌, 长链非编码RNA, 三级淋巴结构, 临床预后, 免疫微环境

# Establishment and Validation of LncRNA Prognostic Indicators Related to Tertiary Lymphoid Structure in Hepatocellular Carcinoma

Wen Shi<sup>1\*</sup>, Siqi Jia<sup>2#</sup>

\*第一作者。

#通讯作者。

<sup>1</sup>Graduate School of Xi'an Medical University, Xi'an Shaanxi

<sup>2</sup>Department of Gynecology, Zhengzhou Oriental Hospital, Zhengzhou Henan

Received: Sep. 6<sup>th</sup>, 2023; accepted: Oct. 1<sup>st</sup>, 2023; published: Oct. 9<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

**Background:** Tertiary lymphoid structure (TLS) is an ectopic lymphoid aggregate that affects the prognosis and immunotherapy of patients with liver cancer, and is a new direction of tumor immunotherapy. Long non-coding RNA (lncRNA) plays a decisive role in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma by influencing cell biological functions. However, the role of TLS-associated lncRNA in the regulation of hepatocellular carcinoma remains unclear. **Methods:** This study analyzed the role of this model in liver cancer prognosis by first downloading sequencing, mutation, and clinically relevant data from the Cancer Genome Atlas (TCGA). Then, the data was randomly divided into a training group and a validation group, the training group was used to train the model, and the validation group and the TCGA full cohort were used for validation. Then, bioinformatics was used to construct TLS-related prognostic models for HCC patients. Finally, immune correlation analysis, GSEA enrichment analysis, tumor mutation burden, TIDE prediction and chemotherapy drug prediction were performed for the prognostic model. **Results:** In this study, TLS-related prognostic characteristics of HCC patients (PSMB8-AS1, AL365361.1, LINC01011, AC026356.1) were established, and the differences between high-risk and low-risk groups were analyzed, and the influence of TLS on patient prognosis was confirmed. **Conclusion:** In HCC, TLS-related lncRNA prognostic model can predict the clinical outcome of HCC patients and guide subsequent treatment.

## Keywords

Hepatocellular Carcinoma (HCC), Long Non-Coding RNA (lncRNA), Tertiary Lymphoid Structure (TLS), Clinical Prognosis, Immune Microenvironment

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 介绍

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝脏肿瘤的主要病因, 占总数的90%以上, 其发病率居世界第六位, 死亡率居世界第三位[1] [2]。HCC具有病死率高、恶性程度高、早期诊断率低、转移复发率高的特点[3]。近年来, 从单药靶向治疗(索拉非尼或乐伐替尼), 到免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI)联合靶向治疗(阿替利珠单抗 + 贝伐珠单抗), 再到包括分子靶向单药治疗(如多纳非尼), 包括免疫肿瘤单药治疗(如德瓦鲁单抗)和联合治疗(如德瓦鲁单抗 + 曲美木单抗)在内的新的全身疗法, 靶向治疗和ICI治疗在HCC的治疗中取得了重大进展[4] [5]。然而, 由于HCC的高度异质性, 仍有相当比例的HCC患者生存率较低且缺乏有效的治疗[6]。因此, 探索新的预后标志物从而提高HCC预后的预测的准确性具有重要意义。

三级淋巴样结构(tertiary lymphoid structures, TLS)是存在于慢性炎症(包括肿瘤)部位的异位淋巴样聚集体, 主要由B细胞、T细胞和树突状细胞组成。TLS的存在与肿瘤患者生存率的提高和肿瘤免疫治疗

的临床效果密切相关,是一种潜在的预后分子标志物[7] [8] [9]。在 HCC 中, TLS 的作用是有争议的。肿瘤内 TLS (intratumoral TLS, iTLS) 多与患者预后良好相关, 而肿瘤周围 TLS (peritumoral TLS, pTLS) 多与患者预后不良相关[10] [11] [12]。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一种长度超过 200 个核苷酸的自转录非编码 RNA, 可以影响细胞的生物学功能[13]。研究表明, 不同的 lncRNA 在细胞代谢中发挥着不同的作用, 常见的有促进肿瘤生长、抑制肿瘤生长、调节免疫反应、增强肿瘤浸润淋巴细胞等[14]。在 HCC 中, lncRNA 在肿瘤免疫微环境(tumor immune microenvironment, TME)、血管生成、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)、侵袭、转移、代谢等肿瘤发展和治疗的重要因素中发挥着不可或缺的作用[15]。然而, TLS 相关 lncRNA 与 HCC 患者预后的相关性尚不充分。

本研究在 HCC 患者中建立了与 TLS 相关的 lncRNA 预后特征, 并将其纳入现有的临床病理特征和分期体系中。同时探讨该预后模型与肿瘤免疫侵袭、肿瘤突变、药物敏感性的关系。综上所述, 本研究探索的预后模型对 HCC 患者具有潜在的预后价值, 可以指导其个体化治疗。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 数据收集和 TLS 相关 lncRNA 鉴定

本研究中涉及 HCC 患者的转录组、临床和突变数据皆来自癌症基因组图谱(TCGA, <https://www.cancer.gov/>)。将临床病理类型定义为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, NOS), 排除生存期小于 3 天或生存期不确定的 HCC 患者后, 共纳入 348 例 TCGA-LIHC 患者进行后续分析。由于本研究使用的 TCGA 数据均为公开数据, 故不需要伦理委员会的批准。

本研究根据已发表的文献, 鉴定出 12 个与 TLS 相关的趋化因子[16]。然后, 基于 RNA 表达水平, 采用斯皮尔曼等级相关系数进行共表达分析, 本研究设置绝对值 > 0.3, P 值 < 0.001, 鉴定出 12 种趋化因子相关的 lncRNA。

### 2.2. TLS 相关预后模型的构建与验证

本研究采用 R 包 “caret”, 将 348 例来自 TCGA 网站的 HCC 患者按 5:5 的比例随机分为训练组(n = 174)和验证组(n = 174), 同时将所有 348 例 HCC 患者均视为 TCGA 全队列。本研究采用训练组构建预后模型, 并采用验证组和 TCGA 全队列验证模型的稳定性。

本研究首先采用单变量 COX 回归分析筛选与 HCC 患者总生存期(overall survival, OS)相关的 lncRNA, 并进一步采用最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)进行降维。最后, 采用多变量 COX 法获取与 HCC 患者独立预后相关的 lncRNA, 并根据其表达谱构建模型。得到 HCC 患者 TLS 相关预后模型的风险评分公式如下:

$$\text{风险评分} = \sum_{i=1}^n \text{coef}_i * x_i$$

在本列式中,  $\text{Coef}_i$  和  $x_i$  分别表示多变量 COX 回归分析的估计系数和对应的 lncRNA 表达水平。然后使用训练组的中位风险评分将所有患者分为高风险评分组和低风险评分组。

本研究将采用以下方法对训练组、验证组和 TCGA 全队列进行验证。采用卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier, KM)曲线比较两组患者的生存时间, 采用多指标受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线验证模型预测预后的能力。最后, 研究通过风险曲线、生存状态分布图和风险基因表达谱热图进一步验证预后模型的可靠性。

### 2.3. TLS 相关预后模型的临床病理参数分析

本研究通过单因素 COX 和多因素 COX 回归分析, 结合年龄、性别、肿瘤组织学分级、病理分期、甲胎蛋白(AFP)等临床病理因素, 探讨 TLS 相关预后模型是否为 HCC 的独立预后指标。采用 R 包“rms”、“replot”绘制与 TLS 相关预后模型的临床病理图, 并绘制校正曲线, 验证图预测与识别结果的相关性[17]。

### 2.4. TLS 相关预后模型的富集分析

本研究通过对高风险评分组和低风险评分组进行差异分析, 并利用 R 包“clusterprofiler”对差异表达基因进行富集分析, 探讨了高风险评分组和低风险评分组之间的信号通路及其生物学作用[18]。

### 2.5. TLS 相关预后模型的突变分析及生存分析

本研究采用 R 包“maftools”评价和比较高风险评分组和低风险评分组 HCC 患者的肿瘤突变负担(tumor mutation burden, TMB)评分, 采用 R 包“ggpubr”和“limma”分析和比较两组患者的预后和肿瘤突变[19]。

### 2.6. TLS 相关预后模型的免疫浸润分析

本研究探讨了 TLS 相关的 lncRNA 预后模型对 TME 的影响。首先, 使用 ESTIMATE 算法计算 HCC 患者的基质评分、免疫评分和 ESTIMATE 评分[20]。计算高风险评分组与低风险评分组之间的差异, 并采用 CIBERSORT 算法研究高风险评分组与低风险评分组之间 22 种肿瘤浸润免疫细胞的浸润差异[21]。

### 2.7. TLS 相关预后模型的 TIDE 预测及化疗

本研究使用肿瘤免疫功能障碍和排斥(TIDE, <http://tide.dfci.harvard.edu>)应用来预测对治疗的免疫反应[22], 并利用肿瘤药物敏感性基因组学(GDSC, <https://www.cancerxgene.org/>)数据预测化疗 HCC 患者, 并采用半最大抑制浓度指数(IC50)反应评价[23] [24]。

### 2.8. 统计分析

本研究所有数据均使用 R 软件(V.4.2.2, <http://www.R-project.org>)获取。做一个分析。KM 曲线用于比较不同组间的生存差异, 曼 - 惠特尼 U 检验用于比较得分差异。所有 P 值均为双尾。在本研究中, 无特殊解释, 默认  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 3. 结果

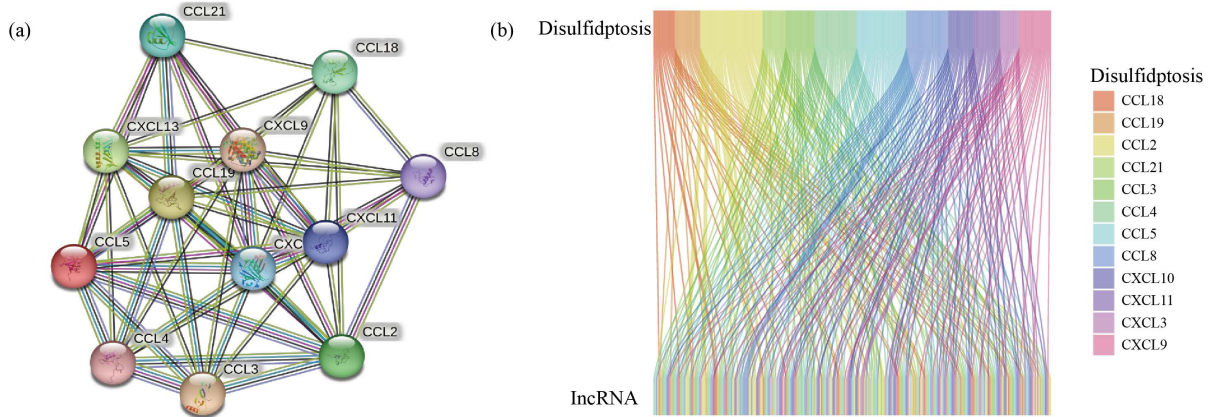
### 3.1. HCC 患者中 TLS 相关 lncRNA 的鉴定

本研究从已发表的文献中获得了 12 个与 TLS 相关的趋化因子。使用 STRING 数据库(<http://cn.string-db.org>)中的蛋白质 - 蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络分析探索了 12 种趋化因子之间的关联(图 1(a))。通过共表达分析, 本研究共获得了 128 个与 12 个趋化因子相关的 lncRNA (图 1(b))。

### 3.2. TLS 相关 lncRNA 预后模型的构建与验证

首先, 将 348 例患者随机分为训练集( $n = 174$ )和测试集( $n = 174$ )。然后, 通过单因素 COX 回归分析, 获得 11 个与 HCC 患者 OS 相关的 lncRNA, 通过 LASSO 分析进行降维, 纳入 4 个与 TLS 相关的 lncRNA (图 2(a), 图 2(b))。最后通过多变量 COX 回归分析, 获得 4 个与独立预后相关的 lncRNA, 并根据其表达谱构建 HCC 患者预后模型。模型公式如下:

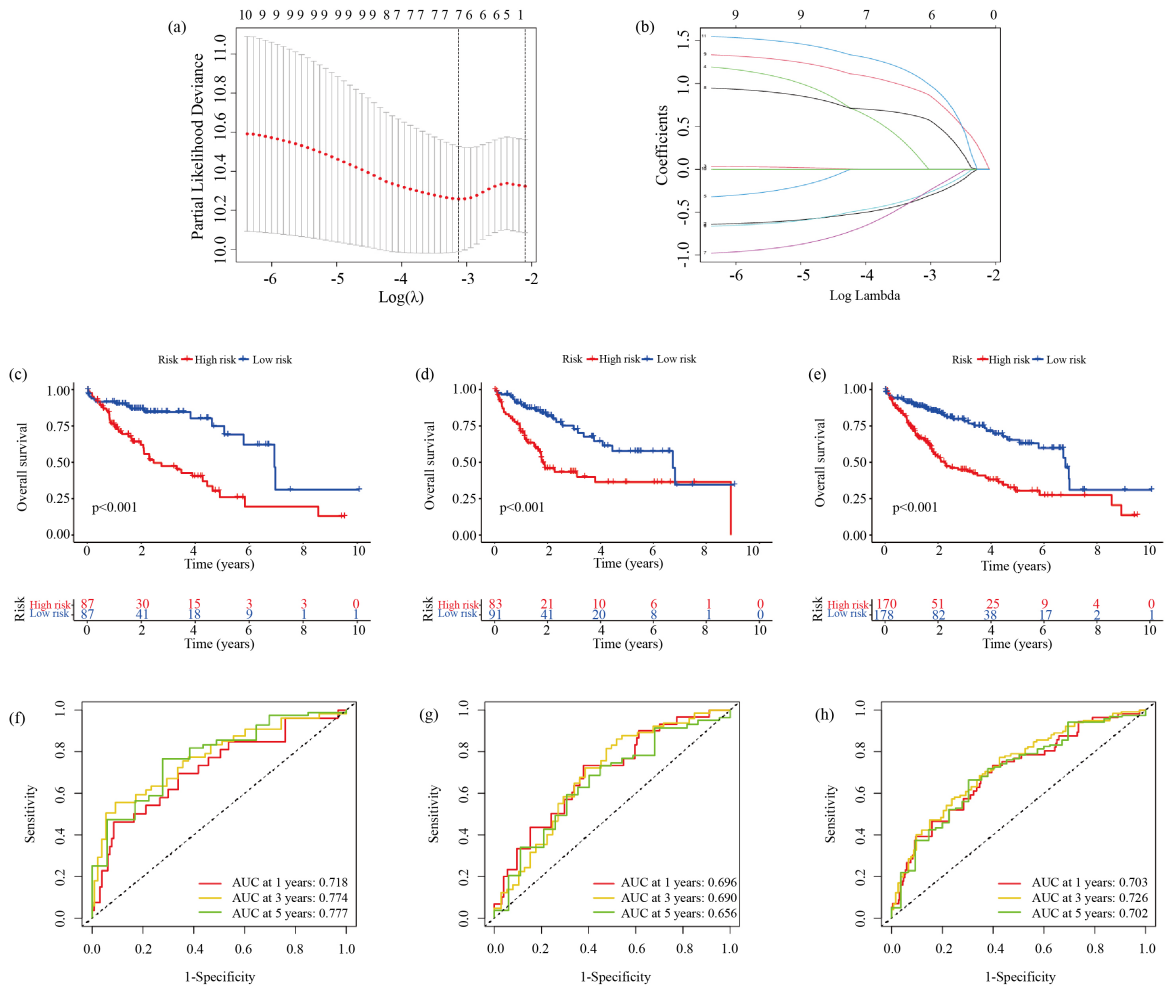
$$\text{风险评分} = \text{PSMB8} - \text{AS1} * (-0.6454) + \text{AL365361.1} * (-1.2503) \\ + \text{LINC01011} * 0.9100 + \text{AC026356.1} * 1.7499$$

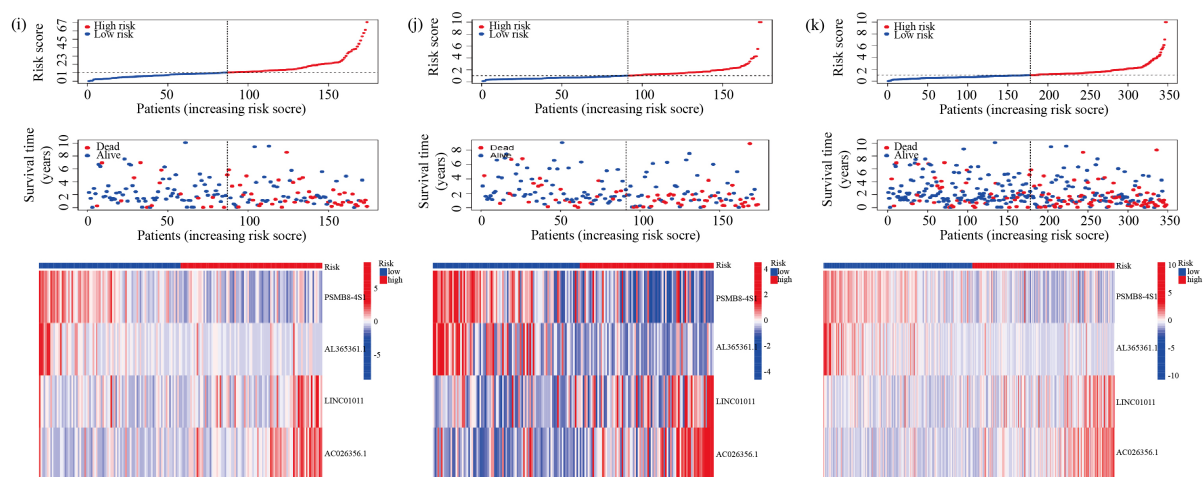


(a) 与 TLS 相关的 12 种趋化因子之间的蛋白相互作用; (b) TLS 相关 lncRNA 共表达分析。

**Figure 1.** The 12 chemokines and related lncRNA associated with TLS were obtained

**图 1.** 获取 TLS 相关的 12 种趋化因子及相关 lncRNA





(a) 通过十倍交叉验证选择最优车削参数( $\log \lambda$ )。(b) 在十倍交叉验证选择的值处绘制 OS 相关 lncRNA 的 Lasso 系数分布图和虚垂直线。(c)~(e) 采用风险评分对训练组、验证组和 TCGA 全队列患者 OS 的 KM 生存曲线进行排序。(f)~(h) 训练组、验证组和 TCGA 全队列 1、3、5 年生存率预测的曲线下面积(Area Under Curve, AUC)。(i)~(k) 高、低风险评分组在训练组、验证组及 TCGA 全队列中 4 种 lncRNA 的风险评分、生存状况及热图。

**Figure 2.** Prognostic characteristics of four TLS-associated lncRNA in TCGA training group, validation group, and TCGA full cohort

**图 2.** TCGA 训练组、验证组和 TCGA 全队列中 4 个 TLS 相关 lncRNA 风险评分分析的预后特征

根据训练组的中位风险评分将患者分为高风险评分组和低风险评分组。KM 生存曲线结果显示, 低风险评分组总生存时间更长(图 2(c)~(e))。风险评分和生存时间分布由风险曲线、生存状态分布图和风险基因表达谱热图表示(图 2(f)~(h))。此外, 在时间 ROC 中, 1 年(AUC = 0.718)、3 年(AUC = 0.774)和 5 年(AUC = 0.777)特征是更强的生存预测因子(图 2(i)~(k))。验证组和 TCGA 全队列的结果验证了我们的模型具有较高的应用价值和可靠性。

### 3.3. TLS 相关预后模型的临床病理参数分析

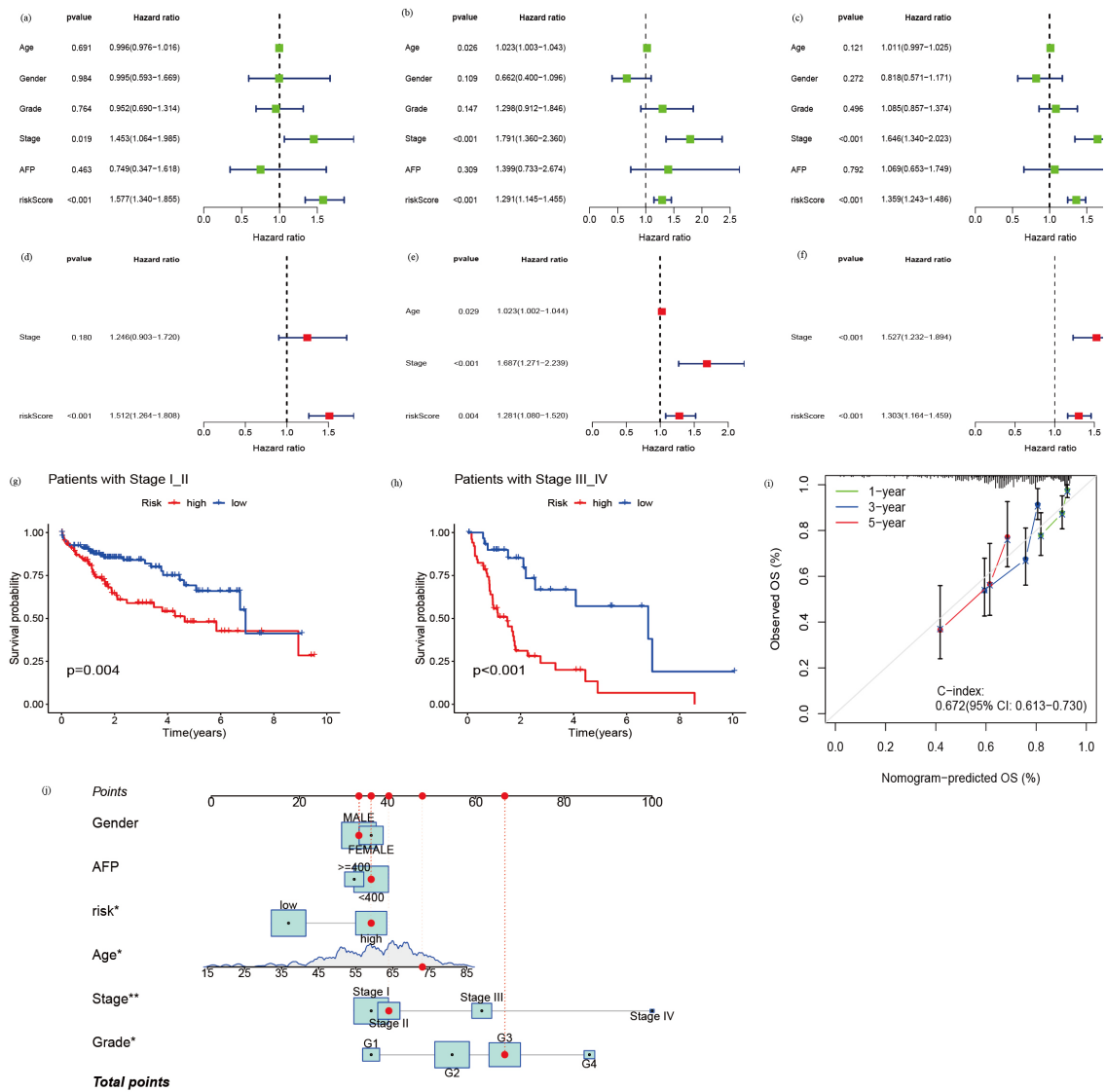
在本研究中, 单因素和多因素 COX 回归分析显示, 无论在训练组、验证组还是 TCGA 全队列中, TLS 风险评分和分期都是 HCC 患者的独立预后因素(图 3(a)~(f))。在 TCGA 全队列中, 高风险评分组和低风险评分组在早期和晚期的生存时间不同(图 3(g), 图 3(h)), 进而实现 HCC 患者预后的个性化预测。通过对标定图的生存描述, 结果表明所构建的列线图具有较好的预测效果(图 3(i), 图 3(j))。

### 3.4. TLS 相关预后模型的富集分析

本研究中, GSEA 富集分析结果显示, GO 中“染色体组织”、“消化”、“外包结构”、“微管\_细胞骨架组织”、“细胞器裂变”显著富集(图 4(a)), KEGG 中“细胞 ECM 受体相互作用、神经活性配体受体相互作用”、“癌症途径”和“核糖体”显著富集(图 4(b))。综上所述, 肿瘤免疫微环境对 HCC 至关重要, TLS 相关风险评分可能与肿瘤免疫微环境密切相关。

### 3.5. TLS 相关预后模型的突变分析及生存分析

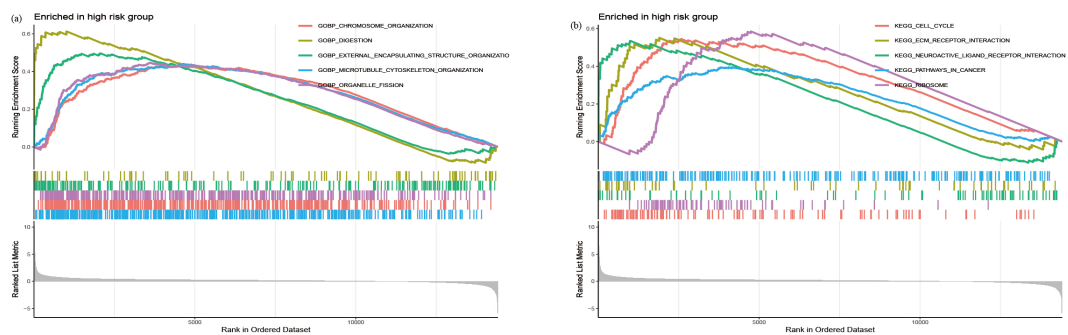
本研究对 TCGA 全队列进行了探讨。瀑布图显示, 高风险评分组 TP53 和 CRNNB1 突变数量高于低风险评分组(图 5(a), 图 5(b))。然后, 高风险评分组和低风险评分组 TMB 评价结果显示, 高风险评分组与低风险评分组的 TMB 无显著差异( $P = 0.84$ ) (图 5(c))。相反, 高突变负荷组与低突变负荷组患者生存率差异有统计学意义( $P = 0.043$ )。低突变载量组预后较好(图 5(d))。接下来, 将肿瘤突变负担和样本风险分



(a)~(f) 森林图对应的单因素 COX 回归分析和多因素 COX 回归分析在训练、测试和 TCGA 全集中的 P 值; (g)~(h) 早期和晚期患者生存曲线; (j) 预测 1 年、2 年和 3 年 OS 的列线图; (i) 标定图。

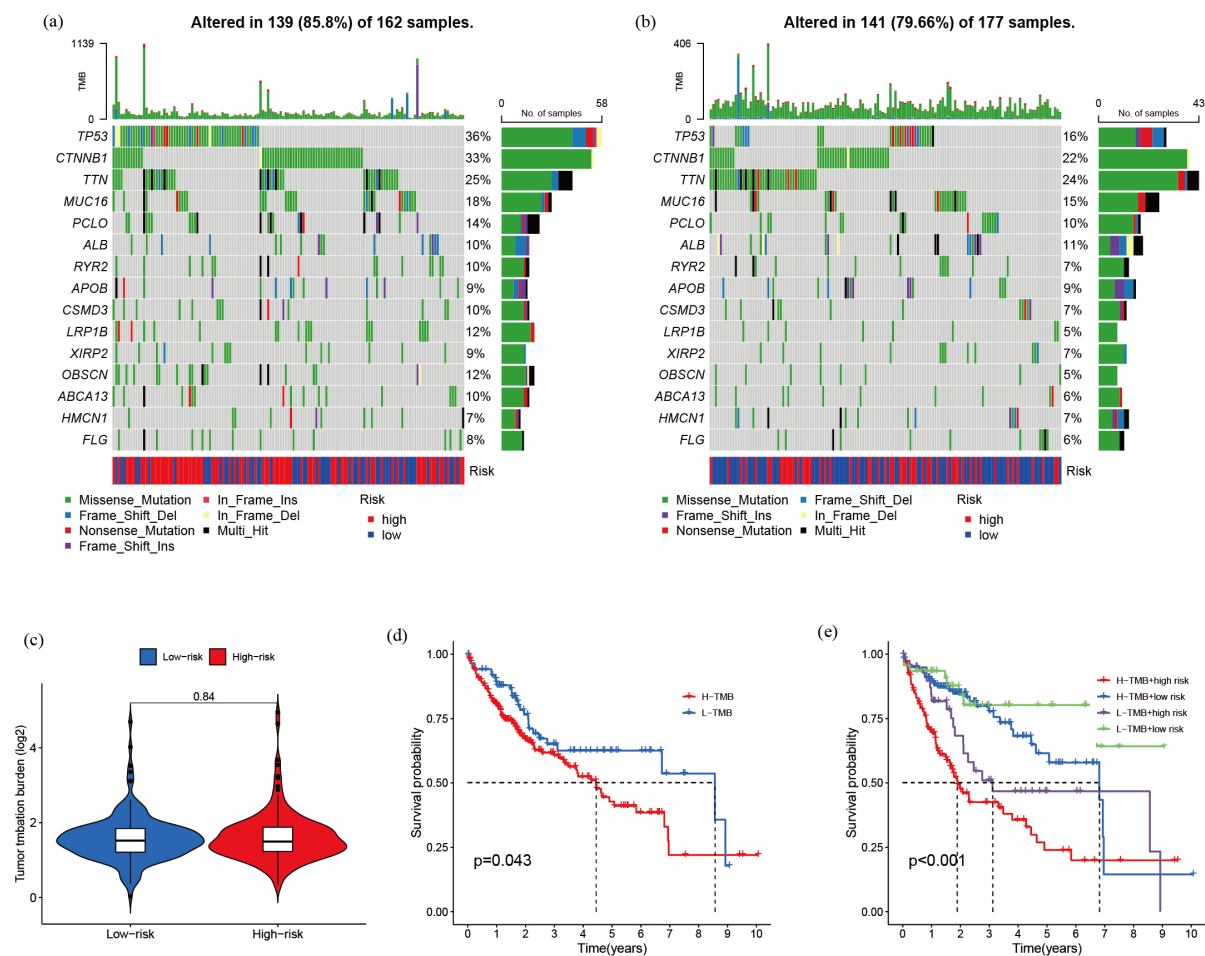
**Figure 3.** Independent prognostic value of TCGA whole-cohort risk model and nomogram construction

**图 3.** TCGA 全队列风险模型及列线图构建的独立预后价值



**Figure 4.** TCGA enrichment analysis. Significantly enriched GSEA terms

**图 4.** TCGA 富集分析。显著富集的 GSEA 项



(a) 瀑布图显示了高危评分组中突变频率最高的前 15 个基因。(b) 瀑布图显示了低风险评分组中突变频率最高的前 15 个基因。(c) 条形图显示了高风险评分组和低风险评分组之间的 TMB。(d) Kaplan-Meier 曲线分析显示根据 TMB 和危险组分类的患者的生存差异。(e) TMB 与患者风险的联合生存分析；每一列代表单个患者，上面的条形图显示 TMB，右边的数字表示每个基因的突变频率，右边的柱状图表示每种变异类型的比例。

**Figure 5.** Somatic mutations and TMB risk characteristics in a full cohort of TCGA patients  
**图 5.** TCGA 全队列患者的体细胞突变和 TMB 风险特征

组进行联合生存分析，结果显示四组患者的生存差异( $P < 0.001$ ) (图 5(e))。

### 3.6. 与 TLS 相关的预后模型相关的免疫分析

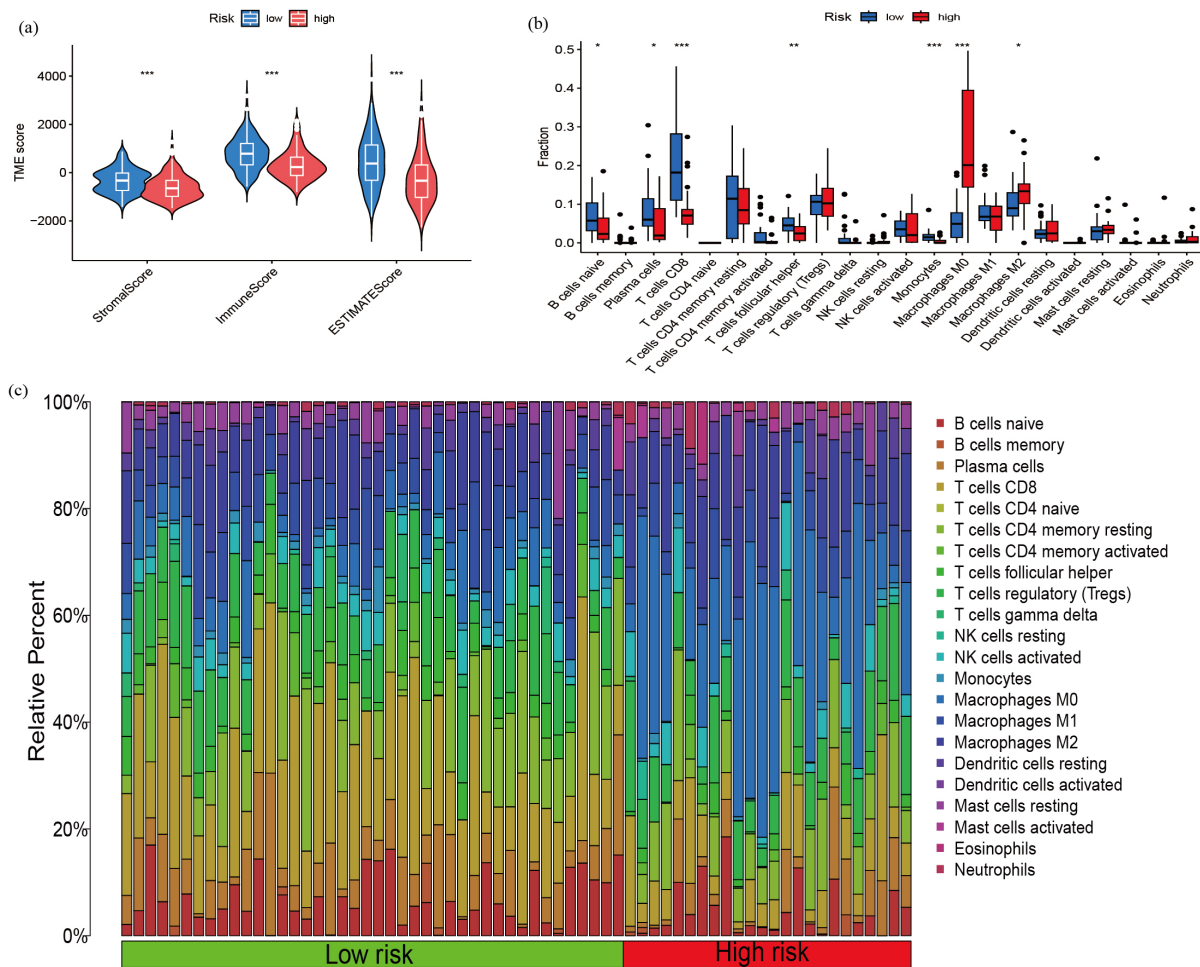
本研究探讨了 TLS 相关风险模型的免疫方面。ESTIMATE 算法分析显示，免疫评分、基质评分和 ESTIMATE 评分与风险评分呈负相关(图 6(a))。CIBERSORT 算法分析显示，在幼稚 B 细胞、浆细胞、CD8T 细胞、T 滤泡辅助细胞和单核细胞中，低风险评分组丰度高于高风险评分组，相反，在 M0 和 M2 巨噬细胞中，高风险评分组丰度高于低风险评分组(图 6(b)，图 6(c))。

### 3.7. 风险特征与药物敏感性的关系

TIDE 网站在本研究中用于预测 HCC 患者的治疗结果。结果显示，高风险评分组与低风险评分组差异有统计学意义，高风险评分患者免疫逃避潜力高，免疫治疗效果差(图 7(a))。其次，药敏结果显示，5-氟尿嘧啶、吉非替尼、索拉非尼、雷帕霉素、吉西他滨等 HCC 常用化疗药物在高危组和低危组间差异有

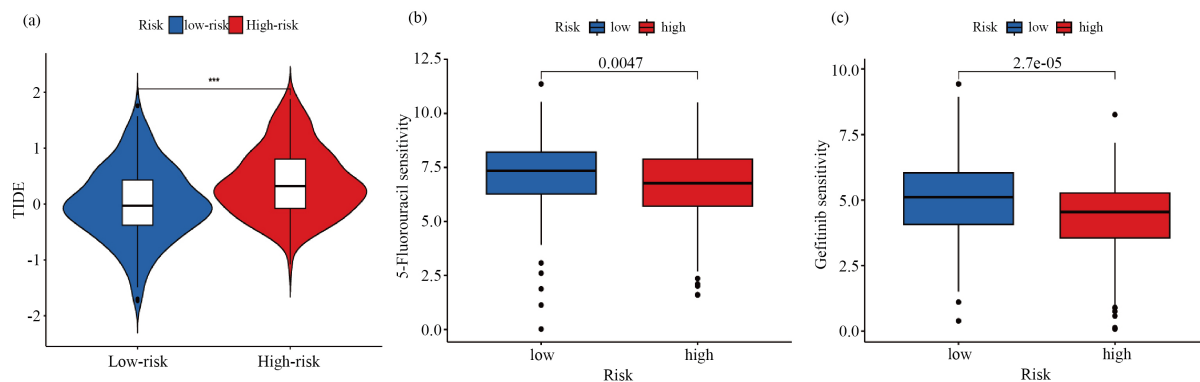


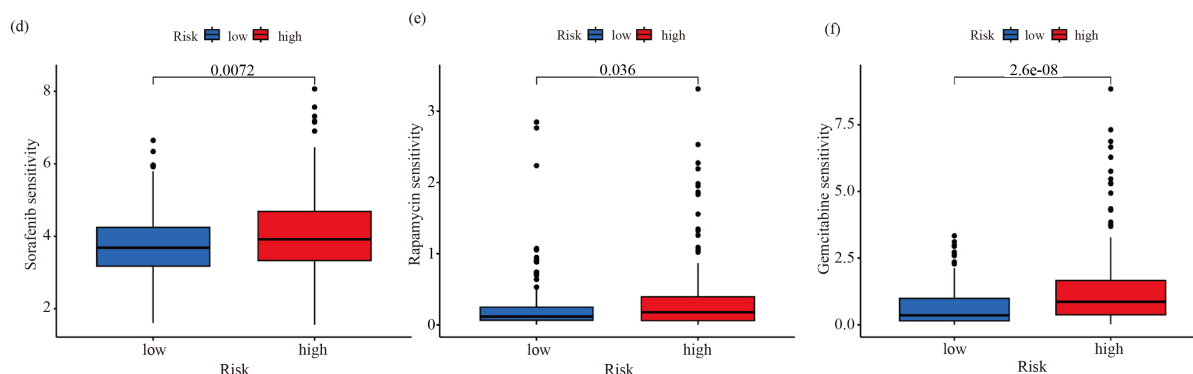
统计学意义。索拉非尼、雷帕霉素和吉西他滨对高危 HCC 患者更有效, 5-氟尿嘧啶和吉非替尼对低风险评分组 HCC 患者更有效(图 7(b)~(f))。



(a) ESTIMATE 算法显示免疫浸润在高风险评分组和低风险评分组的差异。(b) CIBERSORT 算法显示免疫浸润在高风险评分组和低风险评分组的差异。(c) CIBERSORT 直方图显示了不同免疫细胞在高风险评分组和低风险评分组中的比例。

Figure 6. Immune exploration of the whole TCGA cohort  
图 6. TCGA 全队列的免疫探索





(a) TCGA 数据集的 TIDE 评价相关性分析。筛选 HCC 的潜在药物。两组药物敏感性差异较大的 5 种药物: 5-氟尿嘧啶(b)、吉非替尼(c)、索拉非尼(d)、雷帕霉素(e)、吉西他滨(f)。

**Figure 7.** Drug sensitivity analysis of the whole TCGA cohort

**图 7.** TCGA 全队列的药物敏感性分析

## 4. 讨论

HCC 是最常见的原发性肝脏肿瘤类型[1]。由于肝脏位于右上腹部深部, 早期 HCC 患者多无明显症状, 多在入院后才发现, 出现晚期症状。然而, 手术切除、肝移植、射频消融等治疗方法大多不适用于晚期 HCC 患者[25] [26]。近年来, 免疫疗法在癌症的治疗中逐渐兴起, 在肝癌的治疗中也取得了新的发展和突破。然而, HCC 患者的生存时间并没有明显改善, 现有的研究对控制免疫反应和免疫逃避的分子基础仍缺乏了解[27]。目前, 在临床上常见的 HCC 生物标志物, 如甲胎蛋白, 大多用于诊断, 而不是用于治疗或预后[28]。因此, 在临床实践中仍然缺乏一种能够同时用于诊断、治疗和预后的有效生物标志物。文献表明, 与单一生物标志物相比, 将多个生物标志物组合成一个共同的模型可以显著提高其准确性[29]。

TME 是肿瘤存在的细胞环境, 由内皮细胞、免疫细胞和与肿瘤细胞相互作用的基质细胞组成。TME 的存在对肿瘤的发生发展有着巨大的影响, 肿瘤的发展和治理也会引起 TME 的变化[30]。TLS 存在于 TME 中, 是 TME 的重要组成部分, 在肿瘤的诊断和治理中起着举足轻重的作用[31] [32]。在 HCC 中, TLS 的存在具有不同的作用。对于 iTLS, Calderaro 等人发现 iTLS 与肝细胞癌手术切除后早期复发的风险相关[10]。同时, Finkin 等研究表明 pTLS 与晚期 HCC 复发风险相关, 与 HCC 患者肝切除术后预后呈负相关[33]。目前, 关于 TLS 对 HCC 作用的研究多局限于细胞水平, 缺乏基因水平的相关探索。文献表明 lncRNA 在 TME 中起着非常重要的作用。如 Huang 等人发现 lncRNA 可作为生物标志物刺激 T 调节性细胞分化, 从而促进 HCC 细胞的免疫逃逸[34]。就现有研究来讲, lncRNA 在 TLS 中的研究还比较缺乏。

本研究通过分析 HCC 预后相关的 TLS 相关的 12 种趋化因子的表达, 获得了 TLS 相关的 lncRNA, 并在此基础上构建了 HCC 预后模型。多因素 Cox 分析显示, TLS 相关的 lncRNA 预后模型是 HCC 的独立预后因素。然后, 为了提高预后模型的临床应用, 本研究将预后模型分组并结合临床因素构建列线图。结果表明, 该模型具有较好的预测能力。

癌症在遗传上是不稳定的, 基因突变导致癌症的发生和发展[35]。在本研究中, 我们发现两个基因 TP53 和 CTNNB1 在高分样本中有更多的突变。TP53 是 HCC 中最常见的突变基因之一, 影响细胞凋亡和细胞周期[36]。文献显示, TP53 突变是导致肿瘤进展的主要基因之一, TP53 突变与 HCC 患者较差的生存率相关[37]。CTNNB1 也是一种致癌基因, 其突变激活致癌 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路, 因此在 HCC 的代谢调节中起关键作用[38]。

本研究对 TLS 相关 lncRNA 预后模型的免疫学方面进行了探讨, 结果显示, 与高风险评分组相比, 低风险评分组 TME 评分较高, 肿瘤纯度较低, 同时低风险评分组在大多数免疫细胞中丰度较高, 提示该

预后模型在肿瘤免疫治疗中的潜力。然后, 本研究采用 TIDE 算法探讨 TLS 相关 lncRNA 预后模型与免疫治疗反应的相关性。TIDE 评分越高, T 细胞功能障碍越严重, 免疫治疗反应越低[39]。

在这项研究中, 低风险评分组比高风险评分组有更多潜在的免疫治疗应答。结果显示, 与高风险评分组相比, 低风险评分组有更多潜在的免疫治疗应答者。在化疗药物方面, 索拉非尼、雷帕霉素、吉西他滨在低风险评分组的抑制浓度(IC50)较低, 说明这些药物对高风险评分组患者更敏感。5-氟尿嘧啶和吉非替尼的抑制浓度(IC50)较低, 说明这些药物对低风险评分组患者更敏感。总体而言, TLS 相关 lncRNA 标记物具有预测免疫治疗反应和靶向药物敏感性的潜力。

本研究有一定的局限性。由于只使用了 TCGA 数据, 因此缺乏另一个具有匹配 lncRNA 的外部公共数据集进行验证。同时, 本研究也证明了生物信息学中预后模型对免疫治疗反应的潜在预测能力, 需要进一步的临床试验来验证其性能。

## 5. 结论

综上所述, 本研究建立了一种针对 HCC 有效的 TLS 相关 lncRNA 预后模型, 具有良好的敏感性和特异性, 可以预测 HCC 患者的生存状态。同时, 本研究揭示了该模型在分子水平上的功能。结果表明, 与 TLS 相关的预后模型可以为 HCC 患者的个性化治疗提供指导, 并有助于评估 HCC 患者靶向治疗和免疫治疗的有效性。

## 声 明

伦理批准并同意参与本研究数据下载自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA) (<https://www.cancer.gov/>), 作为公共数据库, 无需情感许可或伦理批准。

## 发表同意书

公开信息来自癌症基因组图谱(TCGA) (<https://www.cancer.gov/>)。

## 利益竞争

该研究的作者已经证实, 不存在被认为具有潜在竞争利益的财务或商业关系。

## 作者贡献

石文设计研究, 分析数据并撰写手稿。贾思琪监督研究, 检查数据, 并检查手稿。所有作者阅读并批准了最终提交的稿件。

## 参考文献

- [1] Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. and Donato, F. (2004) Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors. *Gastroenterology*, **127**, S35-S50. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.09.014>
- [2] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [3] Forner, A., Reig, M. and Bruix, J. (2018) Hepatocellular Carcinoma. *The Lancet*, **391**, 1301-1314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2)
- [4] Yang, C., Zhang, H., Zhang, L., Zhu, A.X., Bernards, R., Qin, W., *et al.* (2023) Evolving Therapeutic Landscape of Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **20**, 203-222. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00704-9>
- [5] Nault, J.C. and Villanueva, A. (2021) Biomarkers for Hepatobiliary Cancers. *Hepatology*, **73**, 115-127. <https://doi.org/10.1002/hep.31175>

- [6] Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P.B. and Sarkar, D. (2021) Hepatocellular Carcinoma (HCC): Epidemiology, Etiology and Molecular Classification. *Advances in Cancer Research*, **149**, 1-61. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.10.001>
- [7] Schumacher, T.N. and Thommen, D.S. (2022) Tertiary Lymphoid Structures in Cancer. *Science*, **375**, eabf9419. <https://doi.org/10.1126/science.abf9419>
- [8] Feng, H., Yang, F., Qiao, L., Zhou, K., Wang, J., Zhang, J., et al. (2021) Prognostic Significance of Gene Signature of Tertiary Lymphoid Structures in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article ID: 693234. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.693234>
- [9] Zhang, C., Wang, X.Y., Zuo, J.L., Wang, X.F., Feng, X.W., Zhang, B., et al. (2023) Localization and Density of Tertiary Lymphoid Structures Associate with Molecular Subtype and Clinical Outcome in Colorectal Cancer Liver Metastases. *The Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **11**, e006425. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-006425>
- [10] Calderaro, J., Petitprez, F., Becht, E., Laurent, A., Hirsch, T.Z., Rousseau, B., et al. (2019) Intra-Tumoral Tertiary Lymphoid Structures Are Associated with a Low Risk of Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **70**, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.003>
- [11] Li, J., Nie, Y., Jia, W., Wu, W., Song, W. and Li, Y. (2022) Effect of Tertiary Lymphoid Structures on Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma and Preliminary Exploration of Its Formation Mechanism. *Cancers (Basel)*, **14**, Article No. 5157. <https://doi.org/10.3390/cancers14205157>
- [12] Zhang, T., Lei, X., Jia, W., Li, J., Nie, Y., Mao, Z., et al. (2023) Peritumor Tertiary Lymphoid Structures Are Associated with Infiltrating Neutrophils and Inferior Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Medicine*, **12**, 3068-3078. <https://doi.org/10.1002/cam4.5227>
- [13] Chi, Y., Wang, D., Wang, J., Yu, W. and Yang, J. (2019) Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. *Cells*, **8**, Article No. 1015. <https://doi.org/10.3390/cells8091015>
- [14] Chen, Y.G., Satpathy, A.T. and Chang, H.Y. (2017) Gene Regulation in the Immune System by Long Noncoding RNAs. *Nature Immunology*, **18**, 962-972. <https://doi.org/10.1038/ni.3771>
- [15] Han, Q., Wang, M., Dong, X., Wei, F., Luo, Y. and Sun, X. (2022) Non-Coding RNAs in Hepatocellular Carcinoma: Insights into Regulatory Mechanisms, Clinical Significance, and Therapeutic Potential. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article ID: 985815. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.985815>
- [16] Xu, W., Ma, C., Liu, W., Anwaier, A., Tian, X., Shi, G., et al. (2022) Prognostic Value, DNA Variation and Immunologic Features of a Tertiary Lymphoid Structure-Related Chemokine Signature in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **71**, 1923-1935. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03123-y>
- [17] Zhang, Z. and Kattan, M.W. (2017) Drawing Nomograms with R: Applications to Categorical Outcome and Survival Data. *Annals of Translational Medicine*, **5**, Article No. 211. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.04.01>
- [18] Yu, G., Wang, L.G., Han, Y. and He, Q.Y. (2012) clusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene Clusters. *OmicS*, **16**, 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- [19] Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., et al. (2015) Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Research*, **43**, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- [20] Becht, E., Giraldo, N.A., Lacroix, L., Buttard, B., Elarouci, N., Petitprez, F., et al. (2016) Estimating the Population Abundance of Tissue-Infiltrating Immune and Stromal Cell Populations Using Gene Expression. *Genome Biology*, **17**, Article No. 218. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1070-5>
- [21] Chen, B., Khodadoust, M.S., Liu, C.L., Newman, A.M. and Alizadeh, A.A. (2018) Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. *Methods in Molecular Biology*, **1711**, 243-259. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1_12)
- [22] Fu, J., Li, K., Zhang, W., Wan, C., Zhang, J., Jiang, P., et al. (2020) Large-Scale Public Data Reuse to Model Immunotherapy Response and Resistance. *Genome Medicine*, **12**, Article No. 21. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-0721-z>
- [23] Maeser, D., Gruener, R.F. and Huang, R.S. (2021) oncoPredict: An R Package for Predicting *in Vivo* or Cancer Patient Drug Response and Biomarkers from Cell Line Screening Data. *Briefings in Bioinformatics*, **22**, bbab260. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab260>
- [24] Geeleher, P., Cox, N. and Huang, R.S. (2014) pRRophetic: An R Package for Prediction of Clinical Chemotherapeutic Response from Tumor Gene Expression Levels. *PLOS ONE*, **9**, e107468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107468>
- [25] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [26] Jemal, A., Ward, E.M., Johnson, C.J., Cronin, K.A., Ma, J., Ryerson, B., et al. (2017) Annual Report to the Nation on

- the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **109**, dx030. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx030>
- [27] Llovet, J.M., Castet, F., Heikenwalder, M., Maini, M.K., Mazzaferro, V., Pinato, D.J., *et al.* (2022) Immunotherapies for Hepatocellular Carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **19**, 151-172. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00573-2>
- [28] Zhang, J.S., Wang, Z.H., Guo, X.G., Zhang, J. and Ni, J.S. (2022) A Nomogram for Predicting the Risk of Postoperative Recurrence of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in Patients with High Preoperative Serum Glutamyl Transpeptidase. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, **13**, 298-310. <https://doi.org/10.21037/jgo-21-450>
- [29] Guo, Y., Qu, Z., Li, D., Bai, F., Xing, J., Ding, Q., *et al.* (2021) Identification of a Prognostic Ferroptosis-Related lncRNA Signature in the Tumor Microenvironment of Lung Adenocarcinoma. *Cell Death Discovery*, **7**, Article No. 190. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00576-z>
- [30] Quail, D.F. and Joyce, J.A. (2013) Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis. *Nature Medicine*, **19**, 1423-1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
- [31] Gupta, Y.H., Khanom, A. and Acton, S.E. (2022) Control of Dendritic Cell Function within the Tumour Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article ID: 733800. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.733800>
- [32] Tokunaga, R., Naseem, M., Lo, J.H., Battaglin, F., Soni, S., Puccini, A., *et al.* (2019) B Cell and B Cell-Related Pathways for Novel Cancer Treatments. *Cancer Treatment Reviews*, **73**, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.12.001>
- [33] Finkin, S., Yuan, D., Stein, I., Taniguchi, K., Weber, A., Unger, K., *et al.* (2015) Ectopic Lymphoid Structures Function as Microniches for Tumor Progenitor Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Nature Immunology*, **16**, 1235-1244. <https://doi.org/10.1038/ni.3290>
- [34] Huang, Z., Zhou, J.K., Peng, Y., He, W. and Huang, C. (2020) The Role of Long Noncoding RNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Cancer*, **19**, Article No. 77. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01188-4>
- [35] Negrini, S., Gorgoulis, V.G. and Halazonetis, T.D. (2010) Genomic Instability—An Evolving Hallmark of Cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**, 220-228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- [36] Lai, P.B.S., Chi, T.Y. and Chen, G.G. (2007) Different Levels of p53 Induced Either Apoptosis or Cell Cycle Arrest in a Doxycycline-Regulated Hepatocellular Carcinoma Cell Line *In Vitro*. *Apoptosis*, **12**, 387-393. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0571-1>
- [37] Liu, J., Ma, Q., Zhang, M., Wang, X., Zhang, D., Li, W., *et al.* (2012) Alterations of TP53 Are Associated with a Poor Outcome for Patients with Hepatocellular Carcinoma: Evidence from a Systematic Review and Meta-Analysis. *European Journal of Cancer*, **48**, 2328-2338. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.03.001>
- [38] Huo, J., Wu, L. and Zang, Y. (2021) Development and Validation of a CTNNB1-Associated Metabolic Prognostic Model for Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **25**, 1151-1165. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16181>
- [39] Akman, M., Belisario, D.C., Salaroglio, I.C., Kopecka, J., Donadelli, M., De Smaele, E., *et al.* (2021) Hypoxia, Endoplasmic Reticulum Stress and Chemoresistance: Dangerous Liaisons. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **40**, Article No. 28. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01824-3>