

生物信息分析

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002520

横纹肌肉瘤相关差异 miRNAs 和靶基因的生物信息学分析

王晓萌, 孟 莲, 李春森, 徐贵璇, 刘春霞

(石河子大学医学院病理系, 石河子 832002)

【摘要】目的:运用生物信息学分析人正常横纹肌和横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma,RMS)差异 miRNAs 和靶基因,为研究 RMS 提供新思路。**方法:**GEO2R 分析 RMS 组织的差异 miRNAs,利用 Sangerbox 绘制火山图。TargetScan、miRDB、miRwalk 预测靶基因并利用 Veen 分析交集靶基因。Enrichr 分析靶基因的 GO 富集分析和 KEGG 信号通路。Cytoscape 结合生存分析筛选 hub 基因及 miRNAs 与 hub 基因的分子调控网络。**结果:**GEO2R 分析发现 2 549 个差异 miRNAs,上调和下调 miRNAs 分别有 1 318 个和 1 231 个,根据 $|\log_2FC|>1.5$, $P<0.05$ 筛选出 6 个差异 miRNAs(上调:miR-410-3p、miR-381-3p、miR-483-3p 和 miR-376a-3p,下调:miR-29c-3p 和 miR-145-5p);TargetScan、miRDB、miRwalk 分别预测 6 个差异 miRNAs 的靶基因后 Veen 图取交集的靶基因共计 1 262 个;GO 富集和 KEGG 信号通路分析靶基因富集于 RNA 聚合酶 II 的调控、调节干细胞多能性的信号通路、Hippo 信号通路等过程;Cytoscape 筛选出 top10 hub 基因后结合生存曲线分析显示 FBXL3 高表达,SPSB4、VHL、SMAD4、NRAS、KRAS 低表达时患者预后较好。**结论:**利用生物信息学分析正常横纹肌和横纹肌肉瘤组织的差异 miRNAs-靶基因,筛选出 miR-145-5p (SPSB4、FBXL3、SMAD4、NRAS)、miR-29c-3p (VHL)、miR-381-3p (KRAS),可为横纹肌肉瘤的研究提供潜在的分子靶点。

【关键词】横纹肌肉瘤;miRNAs;生物信息学;生存分析**【中图分类号】**R738.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-12-23

Bioinformatics analysis of differential miRNAs and target genes in rhabdomyosarcoma

Wang Xiaomeng, Meng Lian, Li Chunsen, Xu Guixuan, Liu Chunxia

(Department of Pathology, School of Medicine, Shihezi University)

【Abstract】Objective:To analyze the differential miRNAs and target genes of normal striated muscle and rhabdomyosarcoma(RMS) tissues by using bioinformatics methods,so as to provide new ideas for RMS study. **Methods:**GEO2R was used to analyze the differential miRNAs of RMS. Sangerbox was used to draw volcanic maps. TargetScan,miRDB and miRwalk were used to predict the intersection of target genes. Enrichr was used to analyze GO enrichment analysis and KEGG signaling pathway of target genes. Cytoscape combined survival analysis was used to screen the hub gene and its molecular regulatory network with miRNAs. **Results:** According to GEO2R analysis,2 549 differential miRNAs were obtained,of which 1 318 and 1 231 miRNAs were up-regulated and down-regulated,respectively. According to $|\log_2FC|>1.5$ and $P<0.05$,six differential miRNAs(up-regulated:miR-410-3p,miR-381-3p,miR-483-3p and miR-376a-3p;down-regulated:miR-29c-3p and miR-145-5p) were screened. TargetScan,miRDB and miRwalk predicted the target genes of the six differential miRNAs,and a total of 1 262 target genes were obtained from the Veen plot. GO enrichment and KEGG signal pathway analysis of differential miRNAs-target genes revealed that enrichment was in the regulation of RNA polymerase II and regulated the signal pathway of stem cell pluripotency and the Hippo signaling pathway. After cytoscape analysis screening top10 hub genes,it combined with survival curve analysis showed that high expression of FBXL3 and low expression of SPSB4,VHL,SMAD4,NRAS and KRAS had a better prognosis. **Conclusion:**Utilizing bioinformatics to analyze differential miRNAs-target genes of normal striated muscle and RMS,miR-145-5p (SPSB4,FBXL3,SMAD4,NRAS),miR-29c-3p (VHL) and miR-381-3p

(KRAS) are screened,which can provide potential molecular targets for the study of RMS.

【Key words】rhabdomyosarcoma;miRNAs;bioinformatics;survival analysis

作者介绍:王晓萌,Email:1521195038@qq.com,

研究方向:软组织肿瘤。

通信作者:刘春霞,Email:liuliu2239@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81660441,81960485)。

优先出版:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200610.1652.008.html

(2020-06-11)

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma,RMS)为常见的恶性软组织肉瘤,好发于儿童及青少年,约占儿童所有恶性肿瘤的3%^[1]。RMS恶性程度高,预后差^[2]。目前临床上RMS治疗方法为放疗和化疗,无明确的靶向药物^[3],但RMS的发病机制尚不完全明确,因此深入研究RMS的分子机制及信号通路尤为重要。

miRNAs作为一种单链非编码RNA,不仅参与生物的正常生长和发育,在肿瘤的发生发展中同样发挥重要作用。尤因肉瘤中miR-193b表达下调,可靶向抑制ErbB4癌基因,抑制癌症的发生发展^[4]。RMS中,过表达miR-203抑制p63的表达,可以降低癌细胞的增殖和迁移^[5]。miR-27a在RMS中过表达,可以抑制RARA和RXRA的表达,促进癌细胞的侵袭和转移^[6]。

RMS中miRNAs-靶基因研究相对较少。利用GEO数据库分析RMS差异miRNAs及靶基因,可为后续的分子机制研究提供依据。本研究利用GEO数据库中miRNAs芯片表达谱,结合生物信息学分析正常横纹肌和RMS组织,筛选出miR-145-5p(SPSB4、FBXL3、SMAD4、NRAS)、miR-29c-3p(VHL)和miR-381-3p(KRAS),为后续研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)^[7]选取GSE135518数据集的miRNAs芯片表达谱,其中正常横纹肌组织15例,RMS组织49例,来源为人类。

1.2 方法

1.2.1 RMS差异miRNAs的筛选 利用在线软件GEO2R分析正常横纹肌组织与RMS组织的差异miRNAs。 $|\log_2FC| > 1.5$, $P < 0.05$ 为筛选差异miRNAs的阈值,利用Sangerbox(<http://sangerbox.com>)软件绘制火山图。

1.2.2 RMS靶基因的筛选 根据 $|\log_2FC| > 1.5$, $P < 0.05$ 筛选差异miRNAs后,利用Targetscan^[7]、miRwalk^[8]、miRDB^[9]预测靶基因,并利用在线软件Veen分析靶基因的交集,以此提高靶基因的准确率,降低靶基因的假阳性率。将筛选的差异miRNAs和靶基因用于后续分析。

1.2.3 GO和KEGG分析 在线软件Enrichr(<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>)^[10]对差异miRNAs靶基因进行GO和KEGG信号通路富集分析。 $P < 0.05$ 设定为差异有统计学意义的阈值条件。 P 值从小到大排列。

1.2.4 PPI网络及hub基因 STRING(<https://string-db.org>)^[11]分析靶基因的蛋白相互作用网络。STRING分析得到PPI网

络中TSV文件。结合Cytoscape软件^[12]插件cytohubba,根据degree节点分析top10关键基因。利用Cytoscape分析关键基因与预测靶基因的miRNAs的调控网络图。

1.2.5 生存分析 利用Kaplan-Meier Plotter(<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=background>)^[13]分析top10 hub基因与患者总体生存率的相关性,选取所有肉瘤患者(共计259名)。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 RMS中差异miRNAs分析

根据GEO2R分析正常横纹肌组织和RMS组织共计得到2549个差异miRNAs,在RMS中上调miRNAs有1318个、下调miRNAs有1231个。Sangerbox分析差异miRNAs,结果显示上调miRNAs(红色)有4个,下调miRNAs(绿色)有1个(图1)。根据 $|\log_2FC| > 1.5$, $P < 0.05$ 筛选差异miRNAs,在RMS中上调miRNAs为miR-410-3p、miR-381-3p、miR-483-3p和miR-376a-3p,下调miRNAs为miR-29c-3p和miR-145-5p(表1)。有研究表明,miR-381、miR-29、miR-145参与多种肿瘤的发生发展。

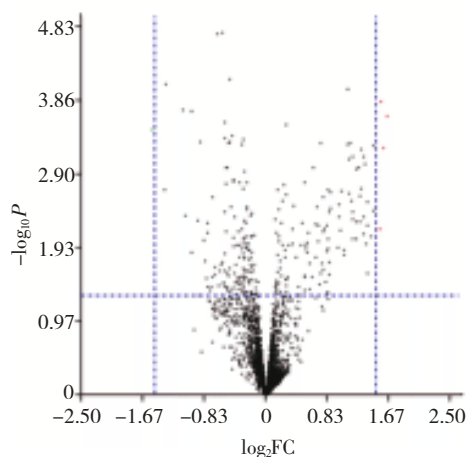


图1 火山图分析差异miRNAs

表1 筛选的差异miRNAs

miRNA_ID	P值	log ₂ FC
hsa-miR-410-3p	0.000 218	1.633 68
hsa-miR-381-3p	0.000 562	1.583 589
hsa-miR-483-3p	0.000 140	1.558 337
hsa-miR-376a-3p	0.006 659	1.542 052
hsa-miR-29c-3p	0.000 323	-1.548 45
hsa-miR-145-5p	1.47E-05	-1.791 7

2.2 预测差异miRNAs的靶基因

利用TargetScan、miRDB、miRwalk分别预测上调miRNAs miR-410-3p、miR-381-3p、miR-483-3p、miR-376a-3p和下调miRNAs miR-29c-3p和miR-145-5p的靶基因,利用Veen图对预测出的靶基因取交集(表2)。结果显示,miR-410-3p

在 3 个预测软件分析交集靶基因共计 112 个、miR-381-3p 交集靶基因 324 个、miR-483-3p 交集靶基因 50 个、miR-376a-3p 交集靶基因 26 个、miR-29c-3p 交集靶基因 330 个、miR-145-5p 交集靶基因 420 个(表 2),共计 1 262 个靶基因。

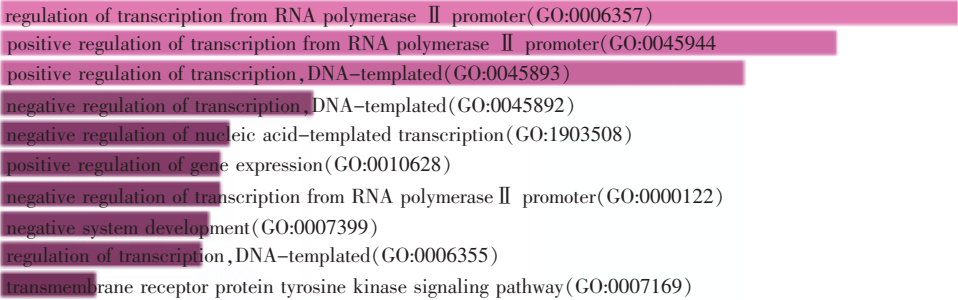
2.3 差异 miRNAs 预测靶基因的 GO 和 KEGG 通路

差异 miRNAs 预测靶基因的 GO 富集于 RNA 聚合酶 II 启动子转录的调控、DNA 模板转录的正向和负向调控、神经系统发育等生物功能(图 2A);富集于染色质、黏着斑、细胞骨架、细胞质等细胞组成成分(图 2B);富集于 RNA 聚合酶 II、DNA 结合、转录因子活性、泛素蛋白转移酶活性等分子功能。KEGG 显示参与信号通路为调节干细胞多能性的信

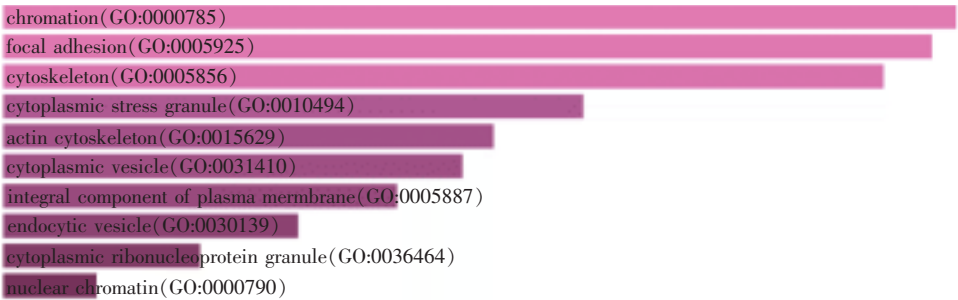
号通路(图 2C)、蛋白质消化吸收、黏着斑、Hippo 信号通路(图 2D)。

表 2 差异 miRNAs 预测交集靶基因

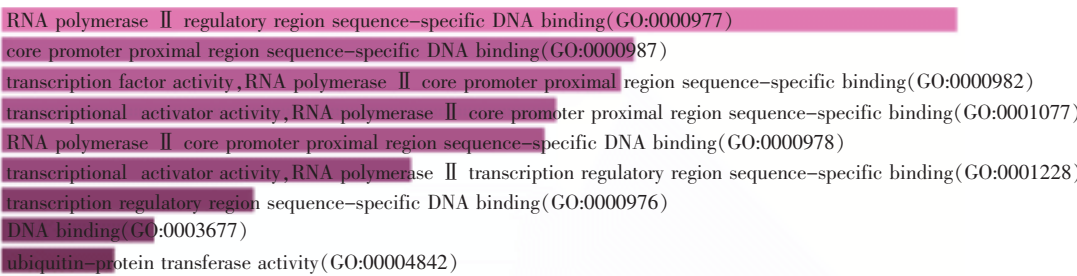
miRNAs	预测靶基因交集数 (数据库≥3)
hsa-miR-410-3p	112
hsa-miR-381-3p	324
hsa-miR-483-3p	50
hsa-miR-376a-3p	26
hsa-miR-29c-3p	330
hsa-miR-145-5p	420



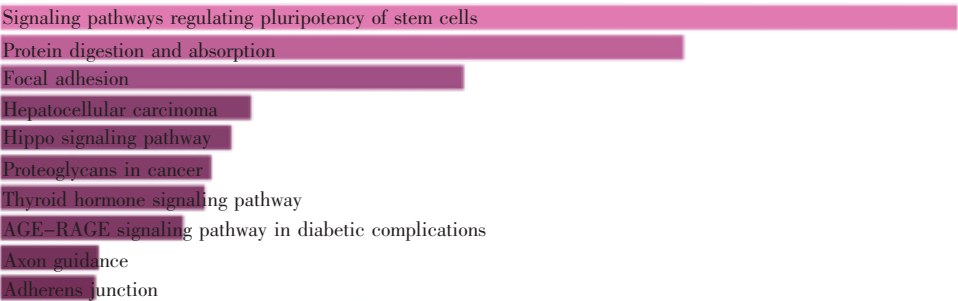
A. 生物学过程



B. 细胞组成



C. 分子功能



D. KEGG 信号通路

图 2 GO 富集和 KEGG 信号通路分析靶基因

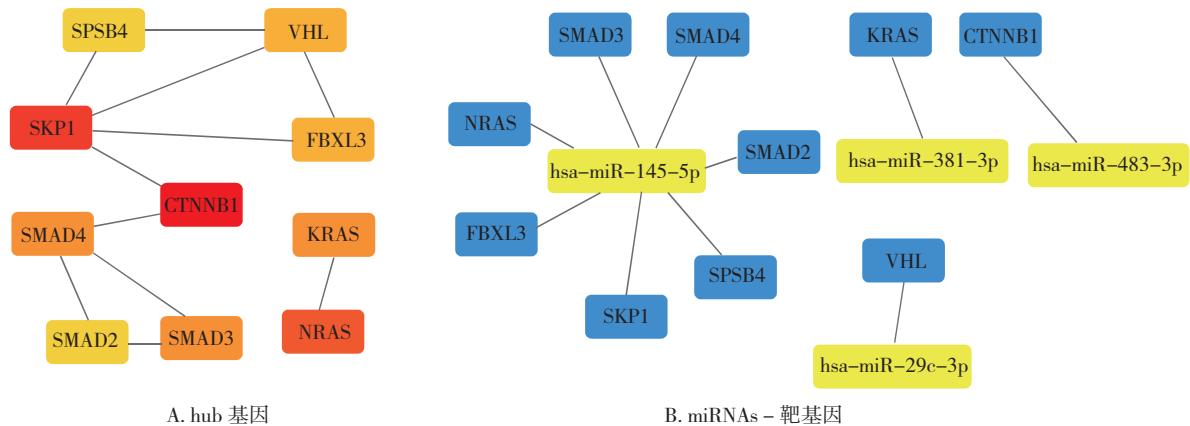


图3 Top10 hub 基因和 miRNAs-mRNA 分子调控网络

2.4 差异 miRNAs 预测靶基因的 hub 基因分析

STRING 分析靶基因结合 Cytoscape 中 Cytohubba 插件得到 top10 hub 基因为 SPSB4、VHL、SKP1、FBXL3、CTNNB1、SMAD4、SMAD2、SMAD3、NRAS、KRAS(图 3A)。根据 hub 基因查询前述预测靶基因的 miRNAs,将 hub 基因联合 miRNAs 得到 miRNAs-靶基因的分子调控网络(图 3B),黄色节点代表 miRNA,蓝色节点代表靶基因,表明同一个 miRNA 可以靶向调节多个靶基因。

2.5 hub 基因结合生存分析曲线分析

将筛选的 hub 基因 SPSB4、VHL、SKP1、FBXL3、CTNNB1、SMAD4、SMAD2、SMAD3、NRAS、KRAS 结合患者生存曲线,分析 hub 基因对患者总体生存率的影响。结果显示, $P>0.05$ 的 SKP1、CTNNB1、SMAD2、SMAD3,无论表达高低,对患者总体生存率无明显影响(图 4G、H、I、J),无统计学意义; $P<0.05$ 的 SPSB4、VHL、FBXL3、SMAD4、NRAS、KRAS 具有统计学意义,其中 FBXL3 高表达,SPSB4、VHL、SMAD4、NRAS、KRAS 低表达显示患者预后较好(图 4A、B、C、D、E、F)。在 RMS 中,FBXL3、SPSB4、VHL、SMAD4、NRAS、KRAS 可能作为潜在的分子研究靶点。

3 讨论

RMS 作为儿童常见的恶性软组织肿瘤,恶性程度高,患者生存率低,发病机制尚不完全明确^[1]。深入探索 RMS 的分子机制,对靶向药物的研究极为重要。本研究利用生物信息学分析正常横纹肌组织和 RMS 组织,筛选差异 miRNAs 预测靶基因。GO 富集和 KEGG 分析靶基因,结果显示参与 RNA 聚合酶 II 启动子转录调控 DNA 模板转录的调控、染色质、黏着斑、DNA 结合、转录因子活性及调节干细胞多能性的信号通路、蛋白质消化吸收等过程,hub 基因结合生存分析确定 miR-145-5p(SPSB4、FBXL3、SMAD4、NRAS)、miR-29c-3p(VHL)和 miR-381-3p(KRAS)可为 RMS 的研究提供参考。

已发现 miRNAs 参与多种肿瘤的增殖、侵袭等生物学过程。miR-145-5p 在不同肿瘤中发挥重要作用,在食管癌中下调 lncRNA PVT 1 可抑制 FSCN 1 进而促进 miR-145-5p 表达,从而抑制食管癌细胞迁移、侵袭和促进细胞凋亡^[14]。lncRNA BRE-AS1 与 miR-145-5p 结合,调节前列腺癌的凋亡与增殖,具有早期诊断价值^[15]。在黑色素瘤中,miR-145-5p 靶向调节 NRAS 可以抑制肿瘤的增殖、侵袭与迁移^[16]。MiR-145-5p 与 SPSB4、FBXL3、SMAD4 靶基因的相关研究尚未见明确的报道。研究表明,SPSB4 下调可增强 EphB2 介导的细胞排斥反应,而 EphB2 在肿瘤细胞的侵袭活动中发挥重要作用,其在肿瘤中的其他作用可做进一步研究^[17]。c-MYC 在肿瘤细胞的增殖中起重要作用^[18],FBXL3 在昼夜节律中发挥重要作用^[19]。研究显示,miR-181d 在大肠癌中高表达,可直接靶向调节 CRY2 和 FBXL3 结合抑制 c-MYC 降解,促进癌细胞的生长和转移^[20]。miR-574-3p 在骨肉瘤中表达下调,过表达 miR-574-3p 可以抑制 SMAD4 表达,抑制癌细胞生长,促进凋亡^[21]。在 RMS 的 RD 细胞中,Smad4 的 mRNA 和蛋白表达明显高于正常横纹肌细胞^[22],可结合 miR-145-5p 进一步分析。

已在多种肿瘤中发现 miR-29 作为抑癌因子影响肿瘤的发展^[23]。通过微阵列分析恶性周围神经鞘瘤发现,miRNA-29c 在肿瘤中表达下调,过表达 miR-29c 可抑制癌细胞侵袭迁移^[24]。miR-29 家族在骨肉瘤中明显下调,转染 miR-29abc 模拟物可降低甲氨蝶呤耐药性,增加癌细胞凋亡^[25]。过表达 miRNA-29c 可靶向抑制整联蛋白 $\beta 1$ 和基质金属蛋白酶 2 的表达,并抑制肺癌细胞对细胞外基质的粘附,降低癌细胞的转移^[26]。miR-29 在 RMS 中发挥抑癌作用,过表达 miR-29 可抑制 NF- κ B-YY1 途径,抑制

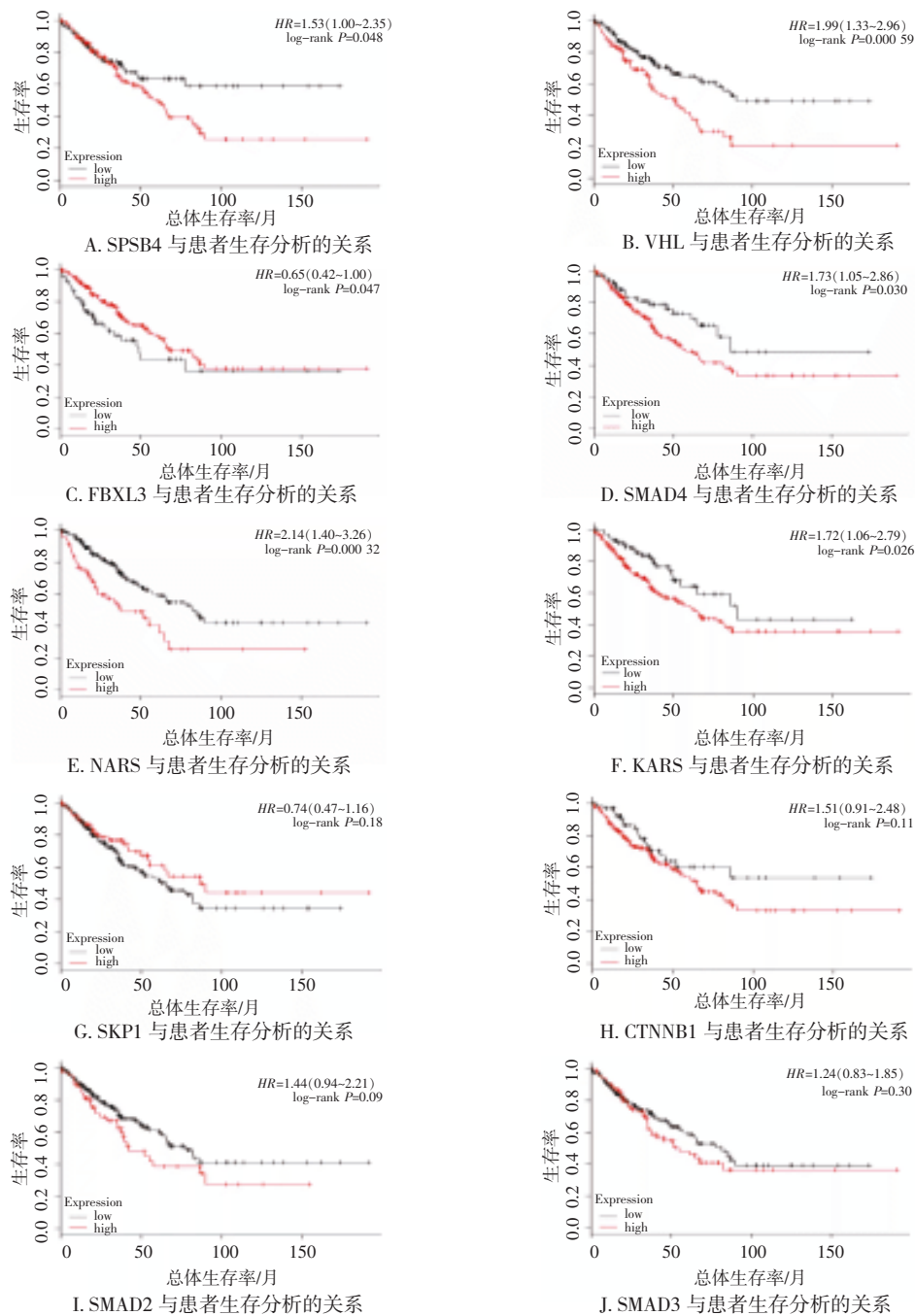


图4 Top10 hub 基因的表达与患者总体生存率的关系

肿瘤生长^[27]。VHL 作为抑癌基因,在肾细胞癌中研究较多,GLS1 抑制剂可以诱导核苷消耗和 ROS 增强导致 DNA 复制无法激活,抑制 VHL^{-/-} RCC 细胞的生长^[28]。Daam2 在神经胶质细胞发育中发挥重要作用,Daam2 通过抑制 VHL 表达促进神经胶质瘤的发生发展^[29]。RMS 尚未在报道中明确发现 miR-29c-3p 靶向调控 VHL 的研究,可做进一步分析。

SETDB1 作为 miR-381-3p 的直接靶标,过表达 miR-381-3p 可以抑制 SETDB1 的表达,抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和促进凋亡^[30]。KRAS 作为致癌基

因,已在乳腺癌、胰腺癌、肺癌等多种癌症中发现其突变促进肿瘤的发生^[31]。在未分化的多形性肉瘤案例中,利用高通量基因测序分析显示 KRAS 存在突变^[32]。在肺腺癌中,KRAS 突变可通过 p-ERK 信号诱导 PD-L1 表达,PD-L1 阻断可能为 KRAS 突变的一种治疗方法^[33]。

综上所述,正常横纹肌组织和 RMS 组织的差异 miRNAs-靶基因可能会影响 RMS 的发生发展,为横纹肌肉瘤的研究提供新的思路,为后续的实验提供参考。

参 考 文 献

- [1] Parham DM, Barr FG. Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis[J]. *Adv Anat Pathol*, 2013, 20(6):387-397.
- [2] Sun X, Guo W, Shen JK, et al. Rhabdomyosarcoma: advances in molecular and cellular biology[J]. *Sarcoma*, 2015, 2015:1-14.
- [3] Raney B, Huh W, Hawkins D, et al. Outcome of patients with localized orbital sarcoma who relapsed following treatment on Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG) Protocols-III and -IV, 1984-1997: a report from the children's oncology group[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2013, 60(3):371-376.
- [4] Moore C, Parrish JK, Jedlicka P. MiR-193b, downregulated in Ewing Sarcoma, targets the ErbB4 oncogene to inhibit anchorage-independent growth[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0178028.
- [5] Diao Y, Guo X, Jiang L, et al. miR-203, a tumor suppressor frequently down-regulated by promoter hypermethylation in rhabdomyosarcoma[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(1):529-539.
- [6] Tombolan L, Zampini M, Casara S, et al. microRNA-27a contributes to rhabdomyosarcoma cell proliferation by suppressing RARA and RXRA[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0125171.
- [7] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1):15-20.
- [8] Zhang Y, Verbeek FJ. Comparison and integration of target prediction algorithms for microRNA studies[J]. *J Integr Bioinform*, 2010, 7(3):169-181.
- [9] Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43:D146-D152.
- [10] Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(W1):90-97.
- [11] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):362-368.
- [12] Demchak B, Hull T, Reich M, et al. Cytoscape: the network visualization tool for GenomeSpace workflows[J]. *F1000Res*, 2014, 3:151.
- [13] Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123(3):725-731.
- [14] Shen SN, Li K, Liu Y, et al. Down-regulation of long noncoding RNA PVT1 inhibits esophageal carcinoma cell migration and invasion and promotes cell apoptosis via microRNA-145-mediated inhibition of FSCN1[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(2):2554-2573.
- [15] Chen C, Zhen M, Zhou J. LncRNA BRE-AS1 interacts with miR-145-5p to regulate cancer cell proliferation and apoptosis in prostate carcinoma and has early diagnostic values[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(3):BSR20182097.
- [16] Liu S, Gao G, Yan D, et al. Effects of miR-145-5p through NRAS on the cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion in melanoma by inhibiting MAPK and PI3K/Akt pathways[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(4):819-833.
- [17] Okumura F, Joo-Okumura A, Obara K, et al. Ubiquitin ligase SPSB4 diminishes cell repulsive responses mediated by EphB2[J]. *Mol Biol Cell*, 2017, 28(24):3532-3541.
- [18] Farrell AS, Sears RC. MYC degradation[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(3):a014365.
- [19] Godinho SI, Maywood ES, Shaw L, et al. The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period[J]. *Science*, 2007, 316(5826):897-900.
- [20] Guo X, Zhu Y, Hong X, et al. miR-181d and c-myc-mediated inhibition of CRY2 and FBXL3 reprograms metabolism in colorectal cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7):e2958.
- [21] Xu H, Liu X, Zhou J, et al. miR-574-3p acts as a tumor promoter in osteosarcoma by targeting SMAD4 signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):5247-5253.
- [22] Wang H, Yang GH, Bu H, et al. Systematic analysis of the TGF-beta/Smad signalling pathway in the rhabdomyosarcoma cell line RD[J]. *Int J Exp Pathol*, 2003, 84(3):153-163.
- [23] Cushing L, Kuang PP, Qian J, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(2):287-294.
- [24] Presneau N, Eskandarpour M, Shemais T, et al. MicroRNA profiling of peripheral nerve sheath tumours identifies miR-29c as a tumour suppressor gene involved in tumour progression[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(4):964-972.
- [25] Xu W, Li Z, Zhu X, et al. miR-29 family inhibits resistance to methotrexate and promotes cell apoptosis by targeting COL3A1 and MCL1 in osteosarcoma[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:8812-8821.
- [26] Wang H, Zhu Y, Zhao M, et al. miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin beta1 and matrix metalloproteinase2 (MMP2)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e70192.
- [27] Wang H, Garzon R, Sun H, et al. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma[J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(5):369-381.
- [28] Okazaki A, Gameiro PA, Christodoulou D, et al. Glutaminase and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors suppress pyrimidine synthesis and VHL-deficient renal cancers[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(5):1631-1645.
- [29] Zhu W, Saritha K, Cristina G, et al. Daam2 driven degradation of VHL promotes gliomagenesis[J]. *eLife*, 2017, 6:e31926.
- [30] Wu M, Fan B, Guo Q, et al. Knockdown of SETDB1 inhibits breast cancer progression by miR-381-3p-related regulation[J]. *Biol Res*, 2018, 51(1):39.
- [31] Saliani M, Jalal R, Ahmadian MR. From basic researches to new achievements in therapeutic strategies of KRAS-driven cancers[J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(3):435-461.
- [32] Li B, Li L, Li X, et al. Undifferentiated pleomorphic sarcoma with co-existence of KRAS/PIK3CA mutations[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(7):8563-8567.
- [33] Chen N, Fang W, Lin Z, et al. KRAS mutation-induced upregulation of PD-L1 mediates immune escape in human lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(9):1175-1187.

(责任编辑:唐秋姗)