

铁死亡相关基因 *GLS2* 在泛癌中的预后及免疫价值

潘月眉^{1,2}, 孙之³, 赵倩倩¹, 胡雪雪^{2,4}, 王传奎^{1,2,4}

Role of Ferroptosis-related Gene *GLS2* in Pan-cancer Prognosis and Immunity

PAN Yuemei^{1,2}, SUN Zhi³, ZHAO Qianqian¹, HU Xuexue^{2,4}, WANG Chuanxi^{1,2,4}

1. Shandong University, Ji'nan 250021, China; 2. Department of Radiology Oncology, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250021, China; 3. Department of Radiology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Ji'nan 250021, China; 4. Department of Radiation Oncology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Ji'nan 250021, China

Corresponding Author: WANG Chuanxi, E-mail: chuanxiwang@126.com

Abstract: Objective To assess the role of the ferroptosis-associated gene *GLS2* in the prognosis of pan-cancer and immunity using bioinformatics methods. **Methods** *GLS2* expression levels in pan-cancer were profiled using publicly available databases: The Cancer Genome Atlas, GTEx, Cancer Cell Line Encyclopedia and the International Cancer Genome Consortium. The aim was to explore the role of *GLS2* gene expression, gene variation survival analysis, immune infiltration, immune checkpoint related genes, TMB, and MSI in different tumors. **Results** Difference in *GLS2* expression levels between cancer and paraneoplastic tissues was statistically significant in most cancer types, and the expression level was correlated with survival in these cancer types. A positive correlation was found between *GLS2* expression and immune cell infiltration in multiple cancer types, and *GLS2* expression level was positively correlated with TMB, MSI, and methylation, and its expression is an indicator for potential therapeutic response. **Conclusion** Pan-cancer analysis shows that the ferroptosis-related gene *GLS2* can be used as a diagnostic and prognostic marker of clear cell carcinoma of kidney, adrenocortical carcinoma, lung adenocarcinoma, and pancreatic cancer.

Key words: Ferroptosis; *GLS2*; Pan-cancer; Prognosis; Immune

Funding: Natural Science Foundation of China (No. 82172672); Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2021MH379)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 基于生物信息学方法评估铁死亡相关基因 *GLS2* 在泛癌中对预后及免疫的相关作用。**方法** 采用癌症基因组图谱 (TCGA)、GTEx、癌症细胞系百科全书 (CCLE) 及国际癌症基因组联盟 (ICGC) 等在线数据库进行 *GLS2* 基因泛癌分析, 从基因表达、基因突变、生存分析、免疫浸润、免疫检查点相关基因和 TMB 及 MSI 等多个方面挖掘 *GLS2* 基因在不同肿瘤中的作用。**结果** *GLS2* 在大多数癌组织与癌旁组织的表达具有显著差异, 并且该表达与这些癌症的预后相关。在多种癌症中, *GLS2* 的表达与免疫细胞浸润之间存在正相关关系, 并与免疫检查点相关基因有关。*GLS2* 还与 TMB、MSI 和甲基化呈正相关, 其表达与可能的治疗反应具有一定关系。**结论** 通过对铁死亡相关基因 *GLS2* 的泛癌分析表明, *GLS2* 的表达可能作为肾透明细胞癌、肾上腺皮质癌、肺腺癌、胰腺癌诊断及预后的重要标志物。

关键词: 铁死亡; *GLS2*; 泛癌; 预后; 免疫

中图分类号: R730

开放科学(资源服务)

标识码(OSID):



收稿日期: 2023-09-13; 修回日期: 2023-12-10
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82172672); 山东省自然科学基金(ZR2021MH379)

作者单位: 1. 250021 济南, 山东大学; 2. 250021 济南, 山东省立医院肿瘤放疗科; 3. 250021 济南, 山东第一医科大学附属省立医院医学影像科; 4. 250021 济南, 山东第一医科大学附属省立医院肿瘤放疗科

通信作者: 王传奎 (1977-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事肺癌放疗抵抗及免疫治疗研究, E-mail: chuanxiwang@126.com, ORCID: 0000-0003-4356-3623

作者简介: 潘月眉 (1998-), 女, 硕士在读, 主要从事肺癌放疗抵抗及免疫治疗研究, ORCID: 0009-0008-8843-0713

0 引言

铁死亡是一种铁离子依赖的脂质过氧化物累积而导致的非凋亡形式的新型细胞死亡方式, 2012年由Brent R. Stockwell提出^[1], 研究人员发现, 小分子化合物Erastin可以特异性诱导Ras突变细胞发

生铁离子依赖的、非凋亡性的细胞死亡，将这一过程称为铁死亡^[2]。铁死亡的形态特征包括线粒体体积缩小、膜密度增高、线粒体嵴减少或消失^[3]；其生化特点表现为细胞内铁和活性氧（reactive oxygen species, ROS）的大量积累，产生过度的氧化应激以及脂质过氧化^[4]。研究发现铁死亡与肿瘤放射治疗增敏、免疫治疗及耐药性方面密切相关^[5-6]。TCGA数据分析发现高表达铁死亡相关转运体-SLC7A11的神经胶质瘤的患者，在接受放射治疗后肿瘤复发时间和总体生存期更短，提示铁死亡与神经胶质瘤患者放疗预后不良有关^[7]。对传统疗法有抵抗力或具有高转移倾向的癌细胞可能特别容易发生铁死亡敏感，铁死亡诱导剂还可以与更传统的药物（如顺铂）协同作用，抑制肿瘤生长^[8]。

前期研究中，我们构建与分析了肺腺癌（lung adenocarcinoma, LUAD）中与铁死亡有关的四个基因，其中肝型谷氨酰胺酶（*GLS2*）是LUAD预后的保护性因素，促进铁死亡。*GLS2*是谷氨酰胺酶的成员，它的活性在一些癌细胞中明显失调，*GLS2*是抑癌基因或癌基因取决于肿瘤的类型^[9-10]。在乳腺癌中，*GLS2*与增强的体外细胞迁移和侵袭、间充质标志物和体内肺转移有关^[11]。在胶质母细胞瘤中，*GLS2*可以抑制胶质母细胞瘤的生长^[12]。*GLS2*介导的治疗在大规模临床环境中的应用仍处于初级阶段，其作为人类癌症的治疗及疾病进展标志仍存在争议。

本研究运用多个在线生物信息学平台和工具，评估了铁死亡相关基因*GLS2*在不同癌组织中的表达及其与癌症的可能联系，全面研究了*GLS2*在泛癌中的表达情况、预后和功能，分析*GLS2*是否可能成为癌症治疗及疾病进展的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 数据收集和处理

收集癌症基因组图谱（TCGA）数据库和广泛研究所癌症细胞系百科全书（CCLE）数据库的泛癌测序数据（Illumina平台），以及国际癌症基因组联盟（ICGC）数据库中的数据，所有数据均通过其门户网站进行分析。使用R包中的RMA功能（R studio版本：1.2.1335，R版本：3.6.1），过滤整个数据集，删除缺失和重复的结果，并通过 $\log_2(\text{TPM}+1)$ 转换。通过门户网站提取相应的临床信息，包括患者的年龄、性别、肿瘤分期和临床分期。此外，仅从TCGA数据库下载肿瘤突变负荷（tumor mutational burden, TMB）和微卫星不稳定性（microsatellite instability, MSI）等信息。TMB

计算为每百万碱基对的总突变发生率，MSI计算为基因重复序列中发生的插入或缺失事件数。

1.2 Cox回归分析和生存分析

Cox回归分析用于从R环境中的ICGC和TCGA数据库中检测*GLS2*的表达与每种癌症类型患者的总体生存率（overall survival, OS）、疾病特异性生存率（disease-specific survival, DSS）和无进展间隔期（progression-free interval, PFI）之间的相关性。根据最佳分离方法将患者分为高和低*GLS2*表达组后，采用Kaplan-Meier方法构建每种癌症类型患者的生存曲线。通过在R软件包（rdocumentation.org/packages/survival）中的survival ROC和survival分析，探究了生存的特异性和时间依赖性敏感性。使用对数秩检验检验曲线之间的差异， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.3 免疫细胞浸润富集

肿瘤免疫评估资源数据库（TIMER）是一个用于免疫细胞浸润计算的数据库，可用于分析包括B细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞的六种常见类型免疫细胞的浸润分数。TCGA数据库中泛癌数据的免疫细胞浸润分数用于分析其与*GLS2*表达的相关性。

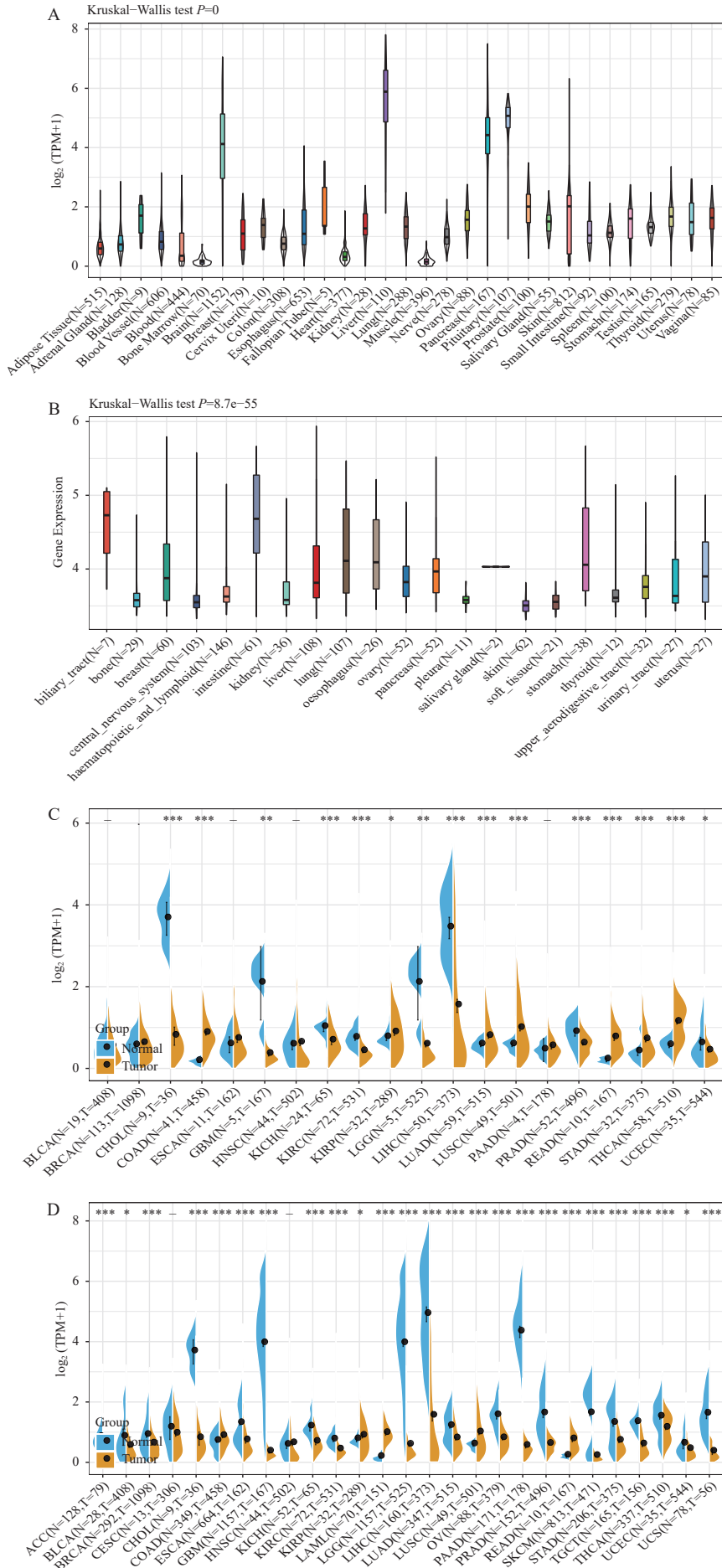
1.4 统计学方法

Spearman相关检验用于评估*GLS2*表达与相关目标之间的相关性，包括免疫细胞浸润分数、TMB、MSI、错配修复（mismatch repair, MMR）基因和甲基化转移酶基因。根据样本是否配对，采用配对测试或T检验对各组之间或肿瘤与正常组织之间的*GLS2*表达水平进行比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。所有图通过ggplot2和forestplot的R包生成。

2 结果

2.1 *GLS2*基因在正常组织和癌组织中的表达

利用GTEx数据库分析*GLS2*基因在各个正常组织中的表达水平，结果显示：*GLS2*在31个正常组织中的表达水平均相似，见图1A。从CCLE数据库下载各个肿瘤细胞系的数据，发现不仅*GLS2*表达水平相较于正常组织普遍升高，而且与正常组织中的表达范围相比，*GLS2*的表达范围更窄，见图1B。进一步从TCGA数据库获取*GLS2*在各个肿瘤样本中癌与癌旁的差异，发现*GLS2*在大多数癌与癌旁组织中表达差异具有统计学意义（均 $P < 0.05$ ），见图1C，结合TCGA及GTEx的数据，发现27种癌症中，*GLS2*在25种癌组织和癌旁组织的表达差异存在统计学意义（均 $P < 0.05$ ），见图1D。



A: normal mRNA expression levels of *GLS2* in different tissues from GTEx database; B: mRNA expression levels of *GLS2* in various tumor cell lines from CCLE database; C: mRNA expression difference of *GLS2* between tumor and peri-tumor samples from TCGA database; D: mRNA expression difference of *GLS2* between normal, peri-tumor and tumor samples, combining data from TCGA and GTEx databases; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$.

图1 不同组织和肿瘤中 *GLS2* 的 mRNA 表达水平
Figure 1 mRNA expression levels of *GLS2* in different tissue and tumors

2.2 *GLS2*基因表达水平与泛癌患者预后的相关性分析

我们利用TCGA数据库的数据评估了*GLS2*在不同癌症类型中与OS的相关性，其中*GLS2*在肾上腺皮质癌（ACC）中的风险效应最高（ $HR=4.37$ ， $P=0.0052$ ），见图2。使用患者数据对每种癌症类型的中位表达值采用二分类进行生存率分析，结果显示高表达的*GLS2*不利于ACC患者预后（ $P<0.05$ ），

而在肾透明细胞癌（KIRC）、肺腺癌（LUAD）及胰腺癌（PAAD）中，高表达的*GLS2*与较好的预后相关（ $P<0.05$ ），见图3。因此，*GLS2*可能作为ACC、KIRC、LUAD及PAAD患者预后的候选标志物。

考虑到随访期间，OS可能会受到非癌症相关死亡的影响，我们采用单变量Cox回归重新分析不同癌种中DSS和*GLS2*表达水平之间的相关性，分析

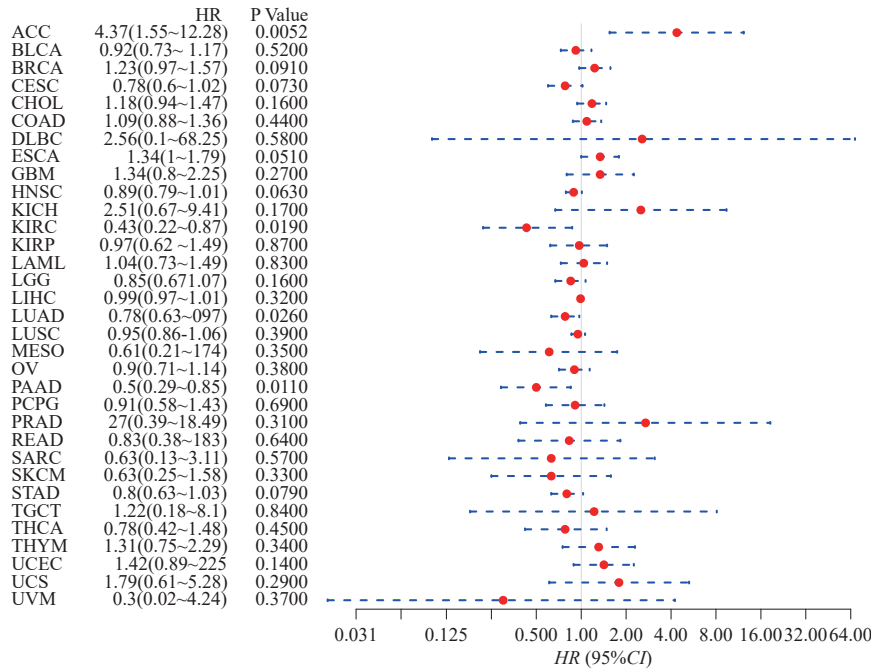


图2 TCGA数据库中*GLS2*和OS在多种肿瘤中mRNA表达水平的相关性
Figure 2 Association between mRNA expression levels of *GLS2* and OS in multiple tumors from TCGA database

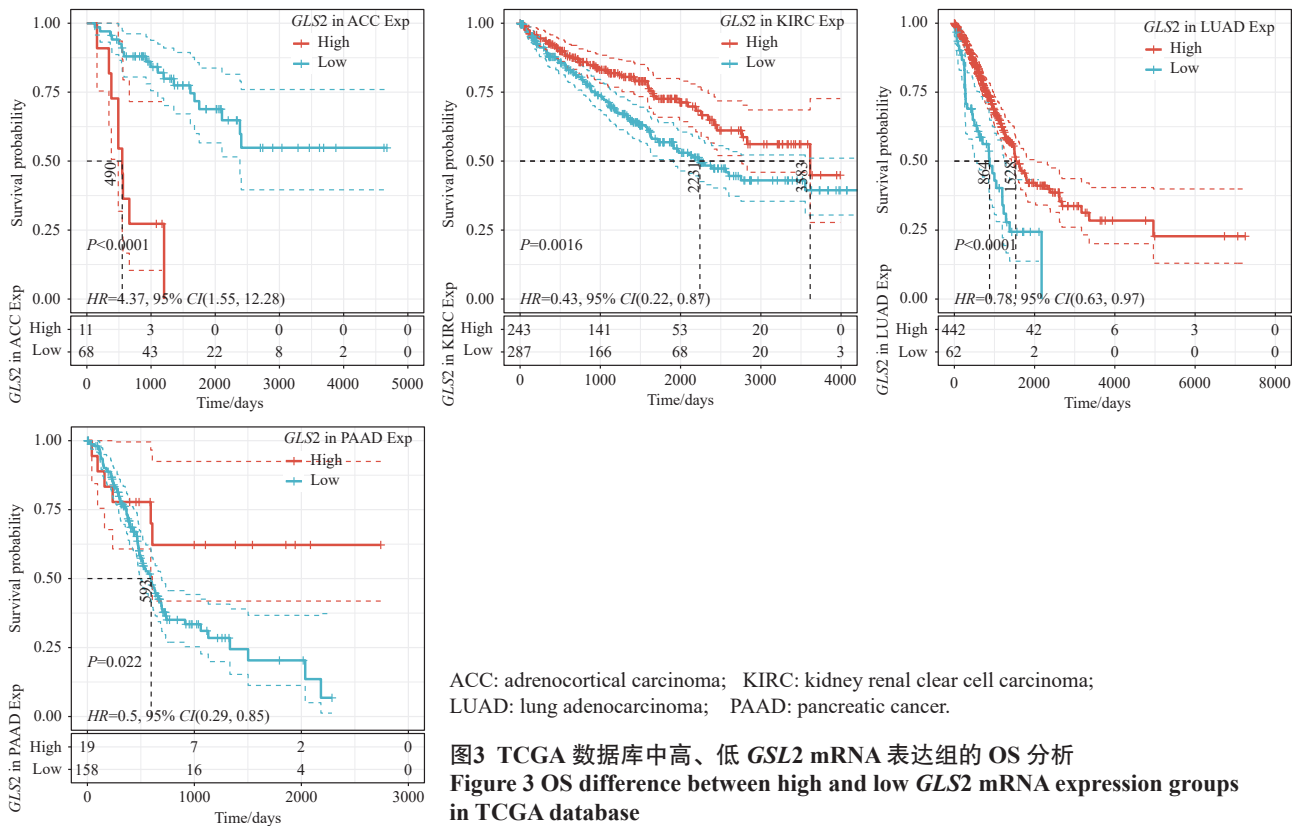


图3 TCGA 数据库中高、低 *GLS2* mRNA 表达组的 OS 分析
Figure 3 OS difference between high and low *GLS2* mRNA expression groups in TCGA database

结果与OS相关的结果相似，*GLS2*在ACC中的风险效应最高 ($HR=4.75, P=0.0013$)，见图4。在生存分析中，*GLS2*高表达在ACC中再次表现出更差的预后，见图5。最后，通过Cox回归分析*GLS2*表达和PFI之间的相关性（图略，请扫描OSID码），结果与上述OS及DSS分析结果相同。上述数据表明，*GLS2*的表达高低与不同肿瘤预后之间存在相关性。

2.3 *GLS2*基因可能通过影响不同癌种中的免疫细胞浸润来调节肿瘤微环境

为了研究*GLS2*基因表达与肿瘤微环境（TME）之间的关系，我们利用来自TCGA的TIMER数据库中6种免疫细胞类型（B细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞）的浸润分数进行分析，结果发现在多种肿瘤中该基因表

达与免疫细胞浸润水平存在显著相关性，其中排名前三位的肿瘤队列是低级别胶质瘤（LGG）、前列腺癌（PRAD）和肉瘤（SARC）。在LGG中，*GLS2*表达水平与CD8⁺T细胞浸润分数呈正相关，与B细胞、CD4⁺T细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞浸润分数呈负相关。在PRAD中，*GLS2*表达水平与B细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞浸润水平呈正相关，而在SARC中，*GLS2*表达水平与上述免疫细胞浸润水平呈负相关。上述结果表明，*GLS2*表达与LGG、PARP及SARC中免疫细胞的浸润水平有关，见图6。

2.4 *GLS2*表达与不同癌种的免疫检查点基因表达的相关性

通过mRNA序列数据库，我们评估了*GLS2*的表达与免疫检查点基因的表达关系。研究表明，

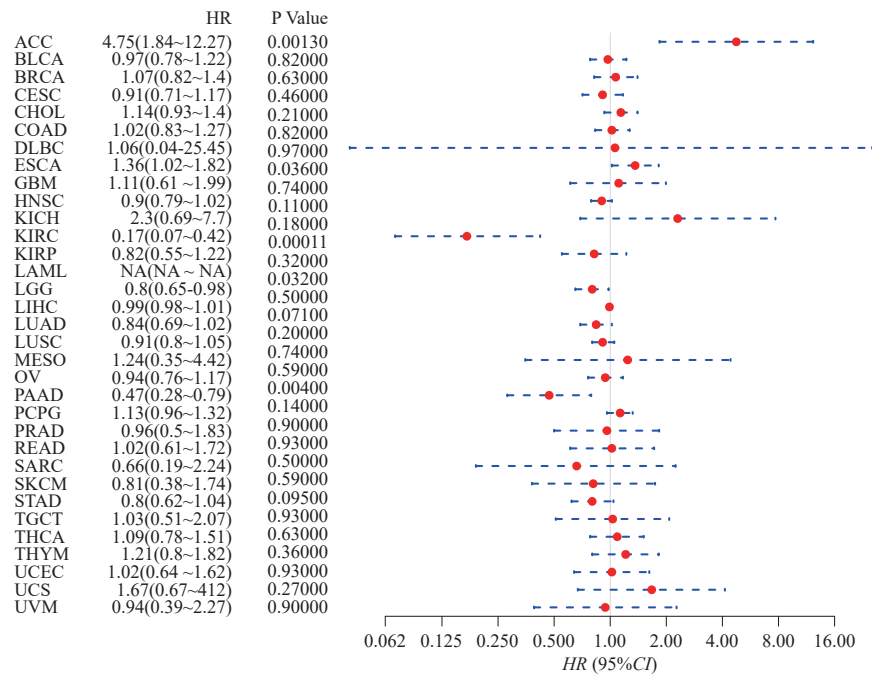
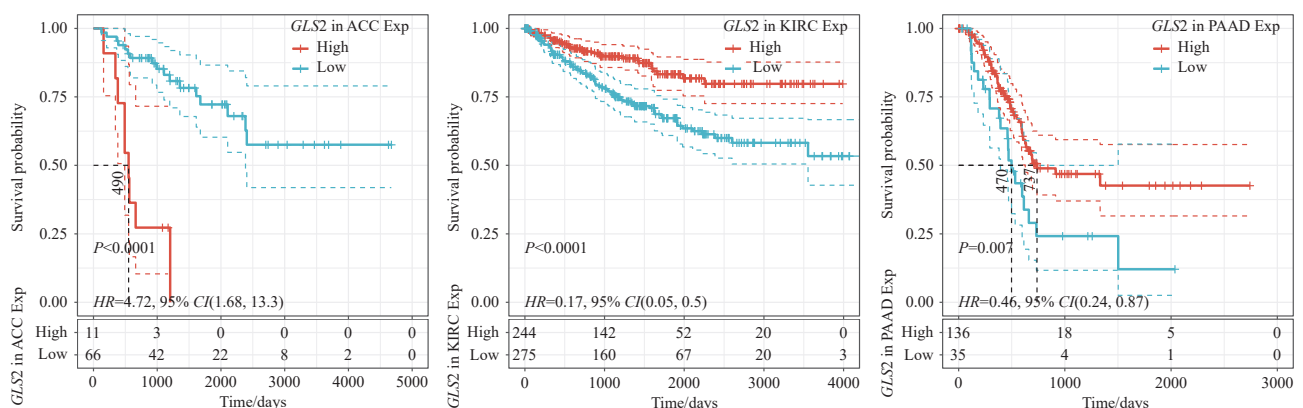


图4 TCGA数据库中*GLS2* mRNA表达水平与多发肿瘤DSS的相关性
Figure 4 Association between *GLS2* mRNA expression levels and DSS in multiple tumors from the TCGA database



DSS: disease specific survival.

图5 TCGA数据库中高、低*GLS2* mRNA表达组的DSS分析

Figure 5 DSS difference between high and low *GLS2* mRNA expression groups from the TCGA database

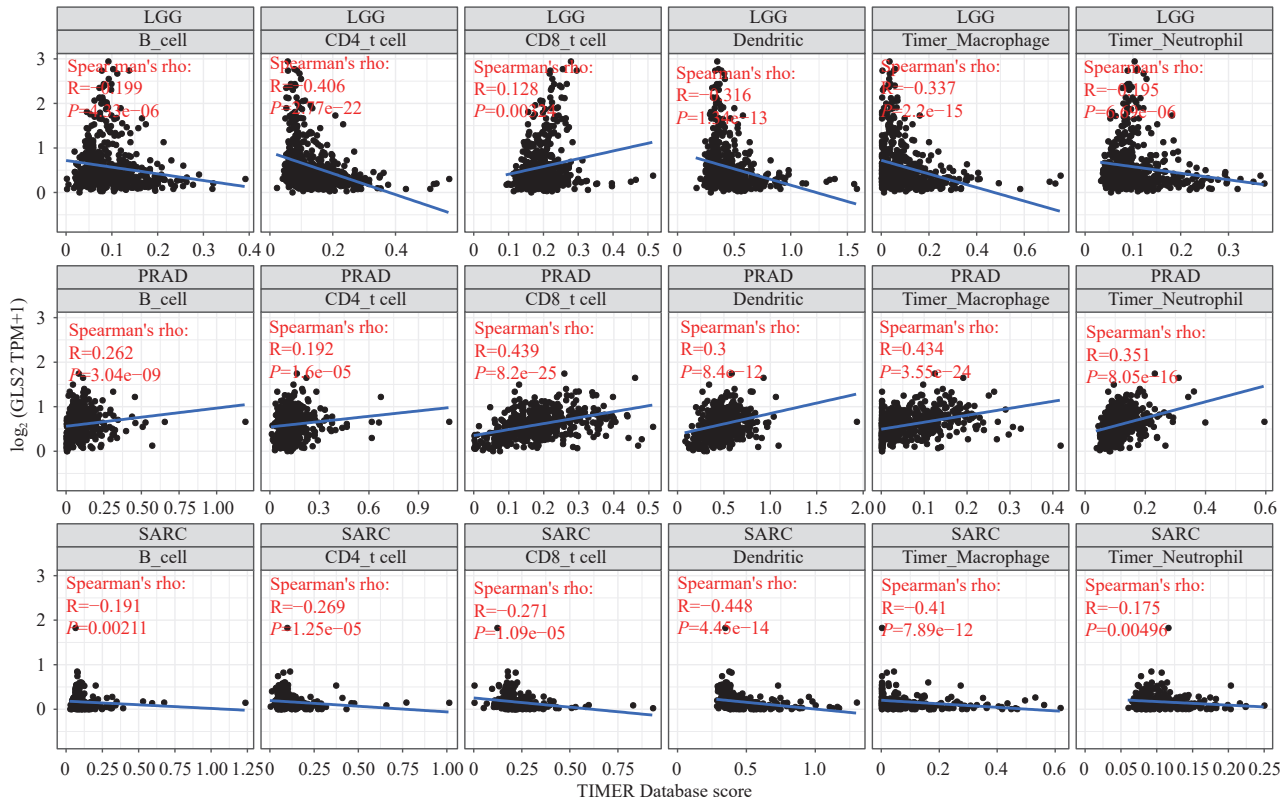


图6 通过TCGA数据库中的TIMER计算GLS2 mRNA表达水平与六种常见类型免疫细胞浸润分数之间的相关性

Figure 6 Correlation between GLS2 mRNA expression level and infiltration scores of six common-type immune cells, calculated by TIMER from TCGA database

在大部分肿瘤中，GLS2与多种免疫检查点相关基因高度相关 ($P < 0.05$)，见图7。

2.5 GLS2的表达与某些癌症TMB和MSI相关

在32种癌症类型中，GLS2的表达与TMB之间的相关性在12种中具有显著性 ($P < 0.05$)，见图8A，6种中监测到GLS2的表达与MSI具有相关性 ($P < 0.05$)，见图8B。

2.6 GLS2表达与不同癌症中的MMR缺陷密切相关，并可能干扰转录后的甲基化

我们分析了GLS2表达与一些成熟的MMR基因 (MLH1、MSH2、MSH6、PMS2和EPCAM) 之间的关系。结果表明，在泛癌中，GLS2的表达与MMR基因的表达显著且高度相关，见图9。关于GLS2的表达与四种甲基化转移酶 (DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B) 表达的相关性，结果与上述结果一致，在特定癌症类型中存在共表达 (图略，请扫描OSID码)。

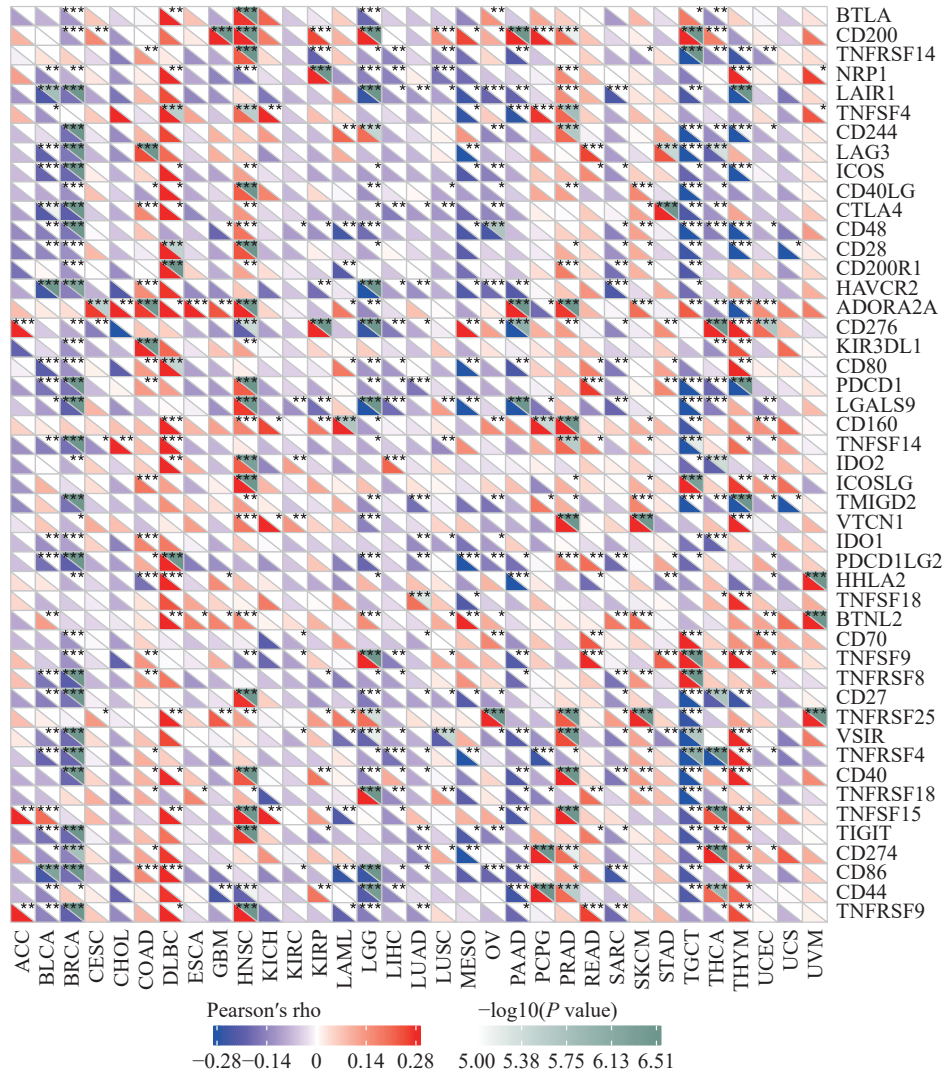
3 讨论

GLS2是谷氨酰胺酶家族成员，研究发现，谷氨酰胺酶家族有助于各种人类癌症的生长。此外，许多研究表明谷氨酰胺酶家族介导的靶向治疗是希望抑制癌症发展的分子药物^[13]。我们之前的研究

中，GLS2被证实为与肺腺癌生存有关的铁死亡基因。然而，GLS2对多种癌症进展的影响仍不清楚。为了系统地了解GLS2在其他癌症进展中的作用，我们对基因表达数据集进行了比较数据挖掘。

基于肿瘤的表达分析，发现GLS2在不同组织中广泛表达，在癌症组织与正常组织中的表达存在差异，其表达程度也因组织类型而异，并且该表达与这些癌症类型中的生存相关，其中ACC的OS、DSS、PFI的HR值最高，生存曲线也显示高GLS2表达患者具有较差预后。GLS2在不同类型的肿瘤中表现出不同的表达模式和功能，并根据特定的肿瘤类型抑制或促进肿瘤的发展^[14]。这与我们的研究结果相似，这里发现的GLS2表达与各种组织中的癌症之间的相关性，包括与癌症生存和预后的联系，使其成为癌症监测和进一步研究的潜在生物标志物。

TME在肿瘤生长、迁徙过程中起着多方面的作用，它可以产生免疫激活或抑制效应^[15-16]。为了探究GLS2与TMB的相关性，我们测试了GLS2的表达与每种癌症类型的免疫细胞浸润水平之间的相关性，发现GLS2在多种癌症 (如BLCA、BRCA等) 中与免疫检查点mRNA表达之间具有相关性。在



The lower triangle in each tile indicates coefficients calculated by Pearson's correlation test, and the upper triangle indicates log10 transformed P value. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

图 7 来自TCGA数据库的多个肿瘤中GLS2 mRNA表达水平与免疫检查点mRNA表达之间的相关性

Figure 7 Correlation between *GLS2* mRNA expression levels and immune checkpoints' mRNA expression in multiple tumors from the TCGA database

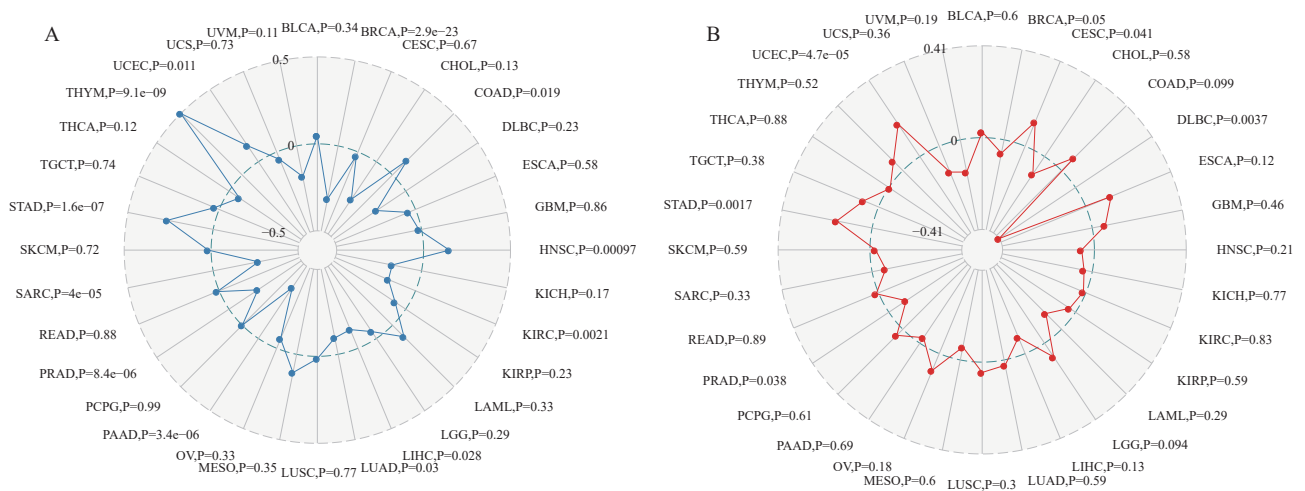
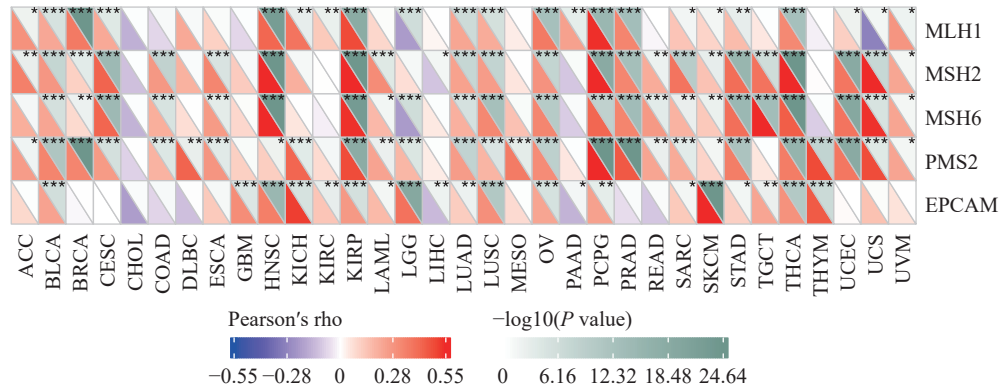


图 8 TCGA数据库中不同肿瘤中TMB(A)、MSI(B)和GLS2 mRNA表达水平之间的关系

Figure 8 Relation between TMB(A), MSI(B), and *GLS2* mRNA expression levels in various tumors in the TCGA database



The lower triangle in each tile indicates coefficients calculated by Pearson's correlation test. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

图9 TCGA数据库预测GLS2 mRNA表达与五个重要MMR基因突变水平之间的相关性

Figure 9 Correlation between *GLS2* mRNA expression and mutation levels of five significant MMR genes in the TCGA database

Qian之前的研究中, *GLS2*与LUAD的预后和免疫治疗相关^[17]。Zou的研究发现, 谷氨酰胺酶家族在多种癌症中与肿瘤的发展和TME有关^[18]。本研究与上述研究结果一致。

TMB和MSI是多种肿瘤有效的预后生物标志物和免疫治疗反应指标^[19-21]。MMR为细胞内的错配修复机制, 该机制的关键基因功能丧失会导致DNA复制错误无法被修复, 进而导致较高的体细胞突变的产生, MMR缺陷的肿瘤对免疫治疗有较好的反应^[22]。甲基化为DNA化学修饰的一种形式, 能够在不改变DNA序列的前提下, 改变遗传表现, 控制基因表达^[23]。我们研究证明了*GLS2*的表达与某些癌症类型的TMB和MSI之间存在联系, 并且某些肿瘤也表现出*GLS2*与主要MMR基因和甲基化转移酶的共同表达。先前的研究将TMB和MSI与患者的药物反应相关联, 尤其是针对免疫检查点抑制剂的药物, 如TGF- β 拮抗剂和PD-1抑制剂^[24-25]。提示*GLS2*可以用于癌症患者给药后免疫治疗评估, 可能是潜在的药物反应良好指标。

本研究中, 我们使用不同的在线生物信息学平台和工具, 系统分析了*GLS2*在各种癌症中的表达水平及其与免疫细胞浸润、TMB、MSI、MMR基因和甲基化转移酶的关系。我们的分析显示*GLS2*在癌症发展中发挥着不同的作用, 并对癌症的临床结果进行了不同的调节。*GLS2*可作为肾上腺皮质癌、肾透明细胞癌和胰腺癌患者的癌症治疗靶点及预后标志物。总之, 本研究结果为不同类型癌症的分子和临床特征提供了一些见解, 因此可以用来帮助将基因组知识转化为癌症治疗。

然而, 完全依赖于开放存取数据库中可用的信息, 没有经过实验的确认, 可能出现过度拟

合和欠拟合, 此外, *GLS2*在不同癌症中的具体作用分子机制和信号通路尚不清晰, 因此, 这项研究需要更多的理论、实验和临床研究来验证和进一步挖掘。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [2] Chen X, Kang R, Kroemer G, *et al.* Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-296.
- [3] Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, *et al.* Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(34): E4966-E4975.
- [4] Santana-Codina N, Mancias JD. The Role of NCOA4-Mediated Ferritinophagy in Health and Disease[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2018, 11(4): 114.
- [5] Lei G, Zhang Y, Koppula P, *et al.* The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression[J]. *Cell Res*, 2020, 30(2): 146-162.
- [6] Lei G, Mao C, Yan Y, *et al.* Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(11): 836-857.
- [7] Ye LF, Chaudhary KR, Zandkarimi F, *et al.* Radiation-Induced Lipid Peroxidation Triggers Ferroptosis and Synergizes with Ferroptosis Inducers[J]. *ACS Chem Biol*, 2020, 15(2): 469-484.
- [8] Lei G, Zhuang L, Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7): 381-396
- [9] Masisi BK, El Ansari R, Alfarsi L, *et al.* The role of glutaminase in cancer[J]. *Histopathology*, 2020, 76(4): 498-508.
- [10] Ferreira IM, Quesñay JEN, Bastos AC, *et al.* Structure and activation mechanism of the human liver-type glutaminase

- GLS2[J]. *Biochimie*, 2021, 185: 96-104.
- [11] Dias MM, Adamoski D, Dos Reis LM, *et al.* GLS2 is protumorigenic in breast cancers[J]. *Oncogene*, 2020, 39(3): 690-702.
- [12] Szeliga M, Bogacińska-Karaś M, Kuźmicz K, *et al.* Downregulation of GLS2 in glioblastoma cells is related to DNA hypermethylation but not to the p53 status[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(9): 1309-1316.
- [13] Liu H, Kiseleva AA, Golemis EA. Ciliary signalling in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(8): 511-524.
- [14] Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 3678-3684.
- [15] Triplett TA, Garrison KC, Marshall N, *et al.* Reversal of indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated cancer immune suppression by systemic kynurenine depletion with a therapeutic enzyme[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 758-764.
- [16] 张尊, 孙圣荣. CD73调控肥胖相关乳腺癌肿瘤免疫微环境[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2022, 43(5): 748-754. [Zhang Z, Sun S R. CD73 regulates tumor immune microenvironment in obesity-related breast cancer[J]. *Wuhan Da Xue Xue Bao(Yi Xue Ban)*, 2022, 43(5): 748-754.]
- [17] Qian L, Wang F, Lu SM, *et al.* A Comprehensive Prognostic and Immune Analysis of Ferroptosis-Related Genes Identifies SLC7A-11 as a Novel Prognostic Biomarker in Lung Adenocarcinoma[J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 1951620.
- [18] Zou J, Du K, Li S, *et al.* Glutamine Metabolism Regulators Associated with Cancer Development and the Tumor Microenvironment: A Pan-Cancer Multi-Omics Analysis[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(9): 1305.
- [19] Vega DM, Yee LM, McShane LM, *et al.* Aligning tumor mutational burden (TMB) quantification across diagnostic platforms: phase II of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(12): 1626-1636.
- [20] Sung MT, Wang YH, Li CF. Open the Technical Black Box of Tumor Mutational Burden (TMB): Factors Affecting Harmonization and Standardization of Panel-Based TMB[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 5097.
- [21] Joshi SS, Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 264-279.
- [22] Germano G, Amirouchene-Angelozzi N, Rospo G, *et al.* The Clinical Impact of the Genomic Landscape of Mismatch Repair-Deficient Cancers[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(12): 1518-1528.
- [23] Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 590-607.
- [24] Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, *et al.* Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(1): 44-56.
- [25] Fridman WH, Miller I, Sautès-Fridman C, *et al.* Therapeutic Targeting of the Colorectal Tumor Stroma[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(2): 303-321.

[编辑: 刘红武; 校对: 邱颖慧]

作者贡献:

潘月眉: 研究设计、选题、数据分析及论文撰写

孙之、赵倩倩、胡雪雪: 文献检索及整理

王传玺: 论文指导及修改