

DOI:10.12113/202203018

基于机器学习识别干燥综合征发病相关长链非编码 RNA

肖剑伟,蔡旭,郭粉莲,陈新鹏,洪易炜,叶志中*

(深圳市福田区风湿病专科医院 广东 深圳 518000)

摘要:通过机器学习筛选干燥综合征(SS)患者唇腺组织及全血中潜在发病相关长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)以及 lncRNA 与唇腺组织中免疫细胞浸润的相关性。通过 GEO 数据库获取 SS 唇腺组织及全血的表达数据,将唇腺组织表达数据归一化处理后,差异分析得到 lncRNA 表达谱,通过 2 种机器学习方法筛选并取交集得到共同的 lncRNA。基于 CIBER-SORT 软件计算唇腺组织中 22 种免疫细胞浸润情况并分析关键 lncRNA 与免疫细胞浸润的相关性;分析全血中关键 lncRNA 与临床性状的相关性并绘制 ROC 曲线;分析关键 lncRNA 共表达编码蛋白基因,并进行 KEGG 信号通路分析。共筛选出 SS 关键 lncRNA 1 个(HCP5),在唇腺组织及全血中 HCP5 表达上调。免疫浸润分析显示,在 SS 唇腺组织中, $\gamma\delta$ T 细胞、巨噬细胞、CD4⁺记忆 T 细胞比例明显升高,而浆细胞的比例在 SS 唇腺组织中比例减少。HCP5 的表达与 γ/δ T 细胞、CD4⁺记忆 T 细胞在唇腺中的浸润程度呈正相关。在全血中,HCP5 与 ANA、IgG、抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体、ESSDAI 具有明显相关性。不同数据集中 ROC 诊断曲线结果显示 HCP5 的 AUC 为 0.833 和 0.877;KEGG 信号通路分析显示,唇腺与 HCP5 共表达的蛋白功能集中于抗原加工和呈递、B 细胞受体信号通路等信号通路,全血中与 HCP5 共表达的蛋白功能集中于代谢途径细胞、凋亡等信号通路。HCP5 可能通过影响 SS 患者唇腺组织免疫细胞的浸润从而影响 SS 疾病的发病与进展,为 SS 潜在的诊断及治疗靶点。

关键词:干燥综合征;HCP5;免疫浸润;机器学习;长链非编码 RNA

中图分类号:Q344⁺.11 文献标志码:A 文章编号:1672-5565(2023)02-146-09

Identifying long non-coding RNAs related to the onset of Sjogren's syndrome based on machine learning

XIAO Jianwei, CAI Xu, GUO Fenlian, CHEN Xinpeng, HONG Yiwei, YE Zhizhong*

(Shenzhen Futian Hospital for Rheumatic Diseases, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

Abstract: Machine learning was used for identifying possible pathogenesis-related long non-coding RNAs (lncRNAs) in labial gland tissue and whole blood of Sjogren's syndrome (SS) patients, and investigating the correlation between the lncRNA with immune cell infiltration in labial gland tissue. The expression data of SS labial gland tissue and whole blood were obtained from the GEO database, and the data were normalized and processed for differential analysis to obtain lncRNA expression profiles. Common lncRNAs were screened and intersected by two machine learning methods. Based on CIBER-SORT software, 22 immune cell infiltration situations in labial gland tissues were calculated, and the correlation between key lncRNAs and immune cell infiltration was analyzed. The correlation between key lncRNAs and clinical traits in whole blood was analyzed and ROC curves were plotted. Key lncRNA co-expression encoding protein genes were analyzed and KEGG signaling pathway analysis was performed. One SS key lncRNA (HCP5) was identified, and HCP5 was upregulated in labial gland tissue and whole blood. Immuno-infiltration analysis showed that the proportion of $\gamma\delta$ T cells, macrophages, and CD4⁺ memory T cells increased in SS labial gland tissue, while the proportion of plasma cells decreased in SS labial gland tissue. The expression of HCP5 was positively correlated with the infiltration of γ/δ T cells and CD4⁺ memory T cells. In whole blood, HCP5 significantly correlated with ANA, IgG, anti-SSA antibodies, anti-SSB antibodies, and ESSDAI. The

收稿日期:2022-03-29;修回日期:2022-09-15;网络首发日期:2022-09-28.

网络首发地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1513.Q.20220928.1057.002.html>

基金项目:广东省中医药管理局中医药科研项目(No.20221342);深圳市福田区卫生公益性科研项目(No.FTWS2021026, FTWS2021063, FTWS2021064).

*通信作者:叶志中,男,广东,主任医师,研究方向:风湿免疫学.E-mail: yezhizhong0823@163.com.

ROC diagnostic curve results in different datasets showed that the AUCs of HCP5 were 0.833 and 0.877. KEGG analysis showed that the function of proteins co-expressed with HCP5 in the labial gland was focused on signaling pathways such as antigen processing and presentation and B cell receptor signaling pathway, while the proteins co-expressed with HCP5 in whole blood functioned in signaling pathways such as metabolic pathways and apoptosis. HCP5 may affect the pathogenesis and progression of the disease by regulating the infiltration of immune cells in the labial gland tissue, and may be a potential diagnostic and therapeutic target for SS.

Keywords: Sjogren's syndrome; HCP5; Immune infiltration; Machine learning; Long non-coding RNA

干燥综合征 (Sjogren's syndrome, SS) 是一种自身免疫性疾病,临床表现为腺体的功能障碍,出现唾液腺和泪腺分泌减少。在一般人群中,它的患病率在 0.01%~0.1% 之间,女性患病率则更高^[1-2]。尽管目前认为遗传和环境因素等多种因素与 SS 有关,但 SS 的具体发病机制尚未完全阐明。

异常激活的炎症过程是自身免疫性疾病的基础,因此,炎症信号通路需要在转录和转录后水平进行严格的调控。最近的研究表明,长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) 能够在转录及转录后的水平调控炎症。lncRNA 由 200 多个核苷酸组成,它们不会被翻译成蛋白质。lncRNA 影响细胞和器官系统中的各种生物过程。多个研究揭示了 lncRNA 参与了免疫反应的调节^[3-4],表明 lncRNA 在正常免疫系统中起着关键作用。而越来越多的证据也表明 lncRNA 的失调在自身免疫性疾病中起着重要作用,例如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎^[5-6]。

在病理学上,SS 患者腺体通常显示大量免疫细胞细胞浸润,产生多种自身抗体和细胞因子。虽然 B 细胞和 T 细胞等免疫细胞因其主要存在于外分泌腺体而历来最受关注,但越来越多的证据表明 SS 中的免疫系统功能障碍也包含其他免疫系统的细胞的参与^[7-11]。然而,迄今为止,lncRNA 和 SS 腺体免疫细胞浸润之间的相关性对 SS 发病的影响还没有得到很好的研究。

本研究基于机器学习的方式,识别 SS 患者唇腺中的关键 lncRNA 以及其与唇腺组织中免疫细胞浸润的关系,并在 SS 患者全血中验证关键 lncRNA 表达情况及 lncRNA 与临床现状的相关性,为进一步深入了解 SS 的发病机制及 SS 的诊断和治疗提供新的方向。

1 资料与方法

1.1 资料获取

从 GEO 数据库中以“Sjogren's syndrome”作为关键词检索,得到 5 个微阵列 (Microarray) 及 3 个高通量测序 (RNA-seq) 唇腺组织数据集,其中

Microarray 正常唇腺样本总数为 33 例,SS 唇腺样本总数为 43 例;RNA-seq 正常唇腺样本总数为 36 例,SS 唇腺样本 58 例。得到 2 个 SS 患者全血数据集,其中 GSE84844 数据集包含了 SS 患者抗核抗体 (Antinuclear antibody, ANA)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG)、SSA (Sjogren syndrome A antibody)、SSB (Sjogren syndrome B antibody)、疾病活动度指数 (EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index, ESSDAI) 等临床信息 (见表 1)。

表 1 GEO 数据库 SS 患者数据谱

Table 1 Data of SS patients in GEO database

数据集	检测平台	对照组	SS 组	组织
GSE127952	GPL20995	6	8	唇腺
GSE23117	GPL570	4	11	唇腺
GSE40568	GPL570	3	5	唇腺
GSE40611	GPL570	18	17	唇腺
GSE80805	GPL13667	2	2	唇腺
GSE159574	GPL20301	13	16	唇腺
GSE164885	GPL24676	4	4	唇腺
GSE173808	GPL16791	19	38	唇腺
GSE84844	GPL570	30	30	全血
GSE66795	GPL10558	29	131	全血

1.2 数据合并、校正

基于 RStudio (V 1.4.1106) 软件,通过 Limma 包,SVA 包对 5 个 Microarray 唇腺组织数据集及 3 个 RNA-seq 进行合并和批次校正 (以下分别简称为数据集 A 和数据集 B),SVA 包主要通过识别和估计实验中未知变异来源的替代变量以及使用 ComBat 函数直接去除已知的批处理效应。在 Ensembl 数据库中下载 GTF 文件,通过 Perl (V 5.34) 软件对合并后的数据,与 GTF 文件进行比对,根据比对结果对基因类型重注释以区分编码及长链非编码 RNA,并提取 lncRNA 的表达谱。

1.3 差异 lncRNA 分析

使用 limma 包对 1.2 步骤得到的两个数据集的 lncRNA 表达谱进行差异分析,取 LogFC 绝对值大于 0.3,adjust $P < 0.05$,得到两个数据集的差异表达 lncRNA 的表达谱并绘制热图。

1.4 关键 lncRNA 的获取

对 1.3 步骤得到的两个差异表达的 lncRNA 表

达谱分别采用机器学习方法来进一步筛选关键基因。将数据分为测试集及训练集(1 : 2)。使用 R 中的 glmnet 包,通过 LASSO 算法采取 10 折交叉验证对 lncRNA 表达谱进行筛选。然后,基于 R 的 randomForest 包,使用随机森林(RF)方法,其中 ntree 设置为 1 000, Mtry 设置为 3,取 MeanDecreaseGini 排名前 5 的基因作为核心基因。将上述 2 种方法计算的结果取交集,得出共同交叉基因。通过 UCSC Genome Browser 获取基因结构。最后,在合并后的两个数据集中验证交叉基因在对照组和 RA 组中的差异表达情况,选择 $P < 0.05$ 的核心基因进一步分析。

1.5 lncRNA 在全血中表达及临床性状相关性分析

基于 RStudio(V 1.4.1106)软件,通过 Limma 包分析 1.4 步骤得到的 lncRNA 在两个 SS 全血数据集中差异表达情况。并采用斯皮尔曼相关性分析计算 GSE84844 数据集中 lncRNA 与 ANA、SSA、SSB、ESSDAI 等临床性状的相关性,以 $P < 0.05$ 具有统计学差异,并通过 ROCR 包绘制 lncRNA 的 ROC 诊断曲线。

1.6 唇腺组织免疫浸润分析

采用 CIBERSORT 软件^[12]分析数据集 A 唇腺组织免疫细胞浸润的情况。CIBERSORT 软件是通过对 22 个预先定义的不同免疫细胞表达谱进行训练,用以区分不同的免疫细胞在组织免疫细胞中所占的百分比。使用 Wilcoxon(秩和检验)计算 SS

组和正常之间不同免疫细胞浸润情况。以 $P < 0.05$ 具有统计学差异。

1.7 免疫浸润细胞与 lncRNA 相关性分析

对 1.5 步骤得到的 lncRNA 及唇腺组织免疫细胞浸润情况,采用斯皮尔曼相关性分析计算两者的相关性。以相关性绝对值大于 0.4, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

1.8 lncRNA 与编码蛋白基因共表达及 KEGG 信号通路分析

根据 1.6 步骤得到的与唇腺组织免疫细胞浸润具有相关性的 lncRNA,通过 R 软件 limma 包,采用斯皮尔曼相关性分析计算与 lncRNA 在唇腺及全血中共表达的蛋白编码基因,以相关性绝对值大于 0.4, $P < 0.05$ 具有统计学差异。随后,将目标 lncRNA 共表达的蛋白编码基因,通过 kobas 网站^[13]进行 KEGG 信号通路分析,以 $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 数据合并及校正结果

对数据集 A 和数据集 B 分别进行了合并以及批次校正。主成分分析显示,校正前数据集样本之间差异较大,对基因表达原始数据背景进行了矫正以及归一化处理后,数据处于随机分布状态,提示批次校正效果明显(见图 1)。

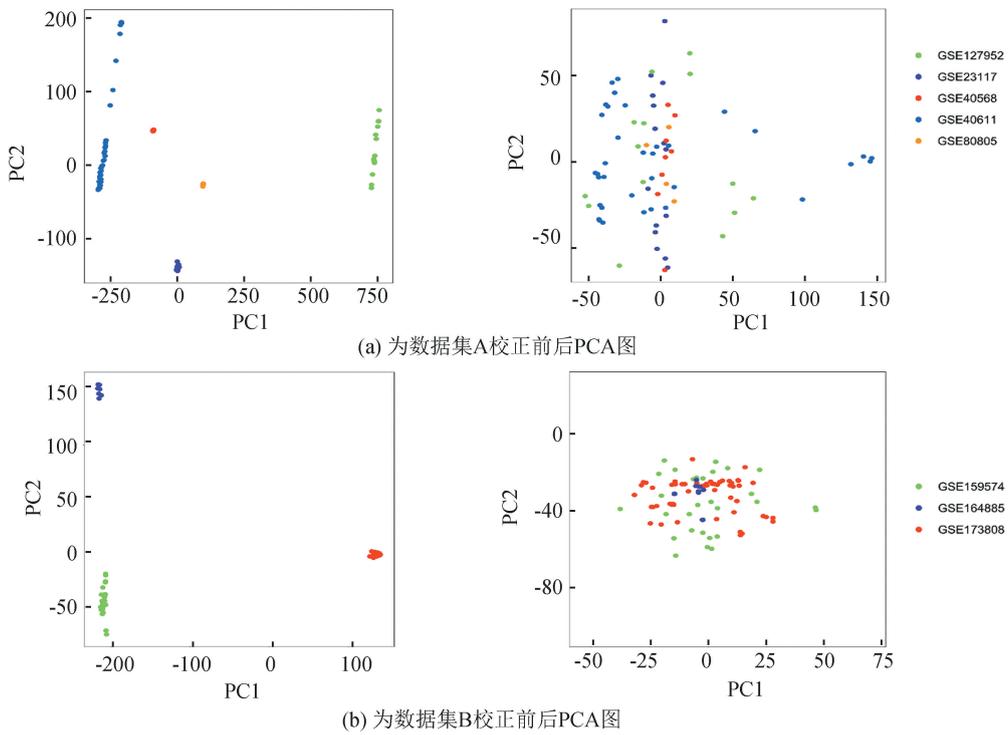


图 1 数据校正 PCA 图(左侧为校正前,右侧为校正后)

Fig.1 Data correction PCA plot (left: before correction, right: after correction)

2.2 lncRNA 差异分析结果

差异分析结果显示,以 LogFC 绝对值大于 0.3, adjust $P < 0.05$ 为条件,数据集 A 和数据集 B 均有 7 个差异表达 lncRNA(见图 2)。

2.3 机器学习筛选关键 lncRNA

RF、LASSO 2 种算法在数据集 A 分别筛选得到 5 个及 4 个关键 lncRNA,将结果取交集共得到 4 个 lncRNA(见图 3a);数据集 B 两种算法筛选得到关键

lncRNA 均为 5 个(见图 3b)。根据上述结果取交集共得到关键 lncRNA HCP5。HCP5 是一种人类物种特异性基因,定位于染色体 6p21.33(31,463,170-31,478,936),长度为 9 239,位于主要组织相容性复合体(MHC) I 类区域内的 MICA 和 MICB 基因之间。该基因有 7 个剪接变体和 1 个基因等位基因(见图 4)。在数据集 A 和 B 中计算 HCP5 表达情况,结果提示 HCP5 在 SS 唇腺组织中表达上调,差异具有统计学意义(见图 5)。

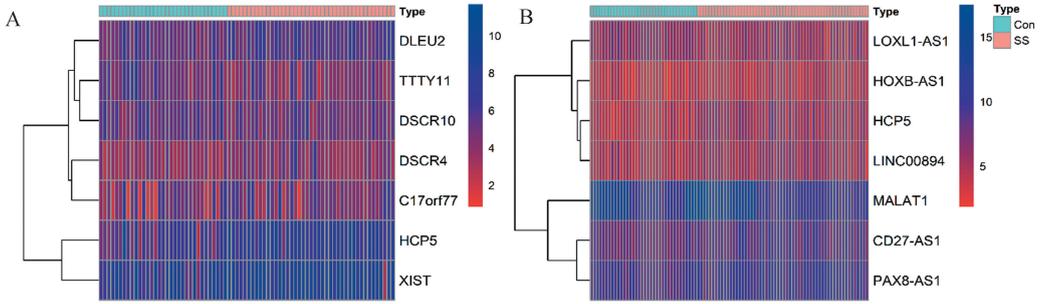
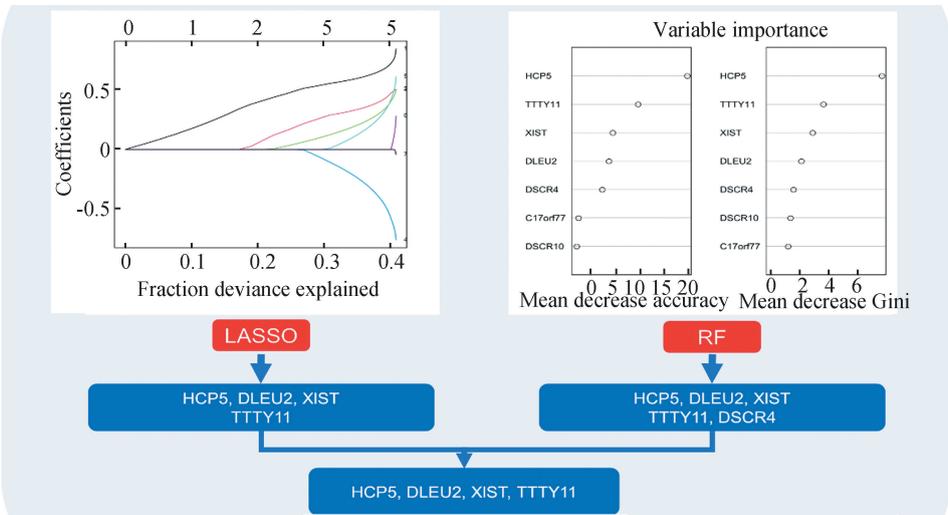
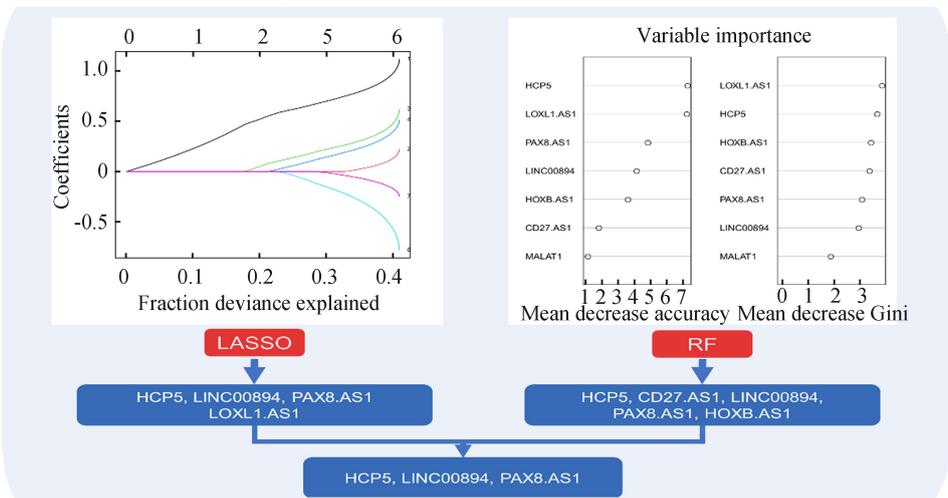


图 2 健康对照组和 SS 组之间差异 lncRNA 热图

Fig.2 Heatmap of differential lncRNA between healthy control and SS groups



(a) 2种算法在数据集A中筛选关键基因



(b) 2种算法在数据集B中筛选关键基因

图 3 RF、LASSO2 种算法筛查关键基因

Fig.3 Identifying key genes by RF and LASSO algorithms

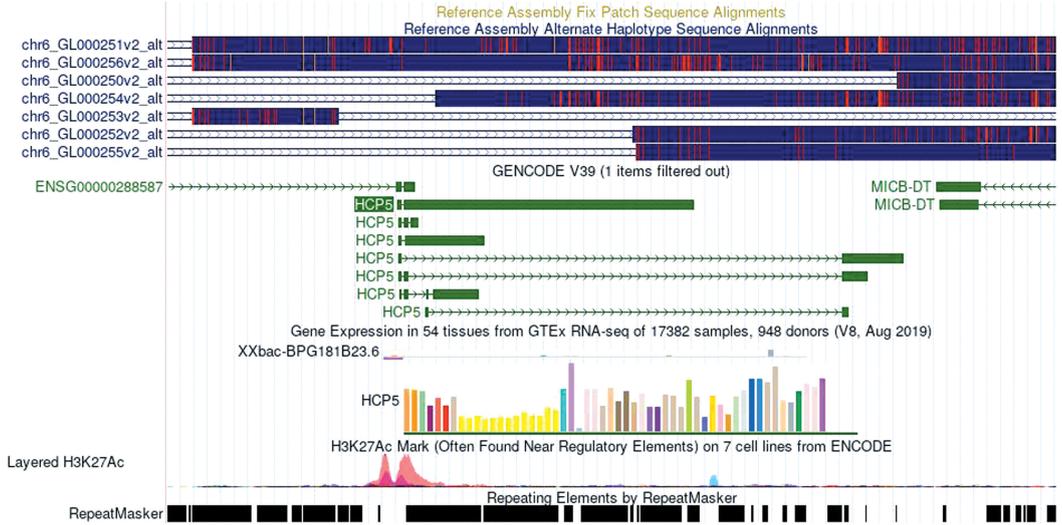


图 4 HCP5 在染色体的位置

Fig.4 Location of the HCP5 gene

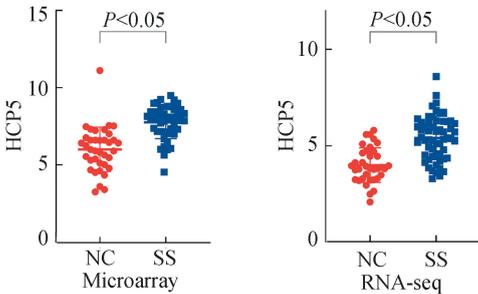


图 5 lncRNA 在正常唇腺组织与 SS 唇腺组织中差异表达情况

Fig.5 Differential expression of lncRNA in normal and SS labial gland tissues

2.4 lncRNA HCP5 在全血中表达情况及与临床特征相关性

HCP5 在 SS 全血不同数据集中表达均上调, (见图 6)。进一步分析显示, HCP 5 与 ANA、IgG、

SSA、SSB、ESSDAI 具有明显相关性(见图 7)。ROC 诊断曲线结果显示 HCP5 在不同数据集的 AUC 分别位为 0.833(95%CI,0.715 - 0.917) 和 0.877(95% CI,0.805 - 0.949), P 均小于 0.001(见图 8)。

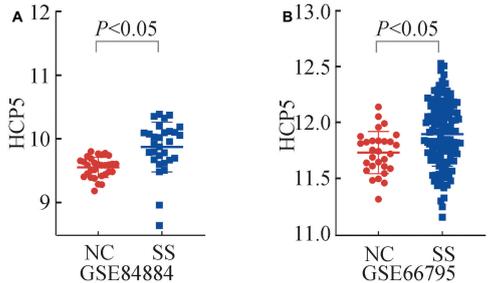


图 6 HCP5 在对照组与 SS 组全血中差异表达情况

Fig.6 Differential expression of HCP5 in whole blood of control and SS groups

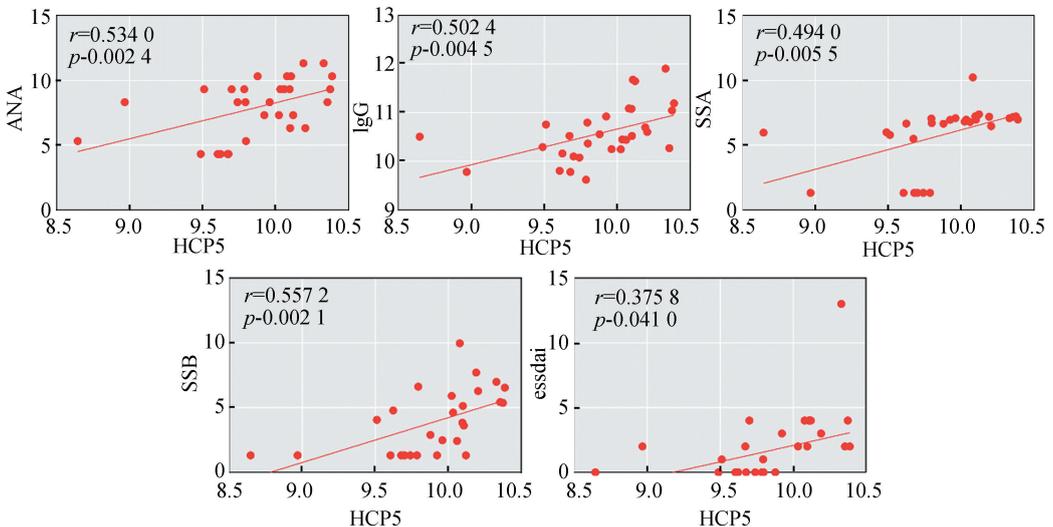


图 7 HCP5 与 ANA、IgG、SSA、SSB、ESSDAI 的相关性分析

Fig. 7 Correlation analysis of HCP5 with ANA, IgG, SSA, SSB, and ESSDAI

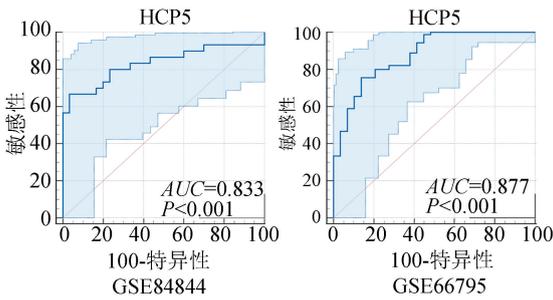


图 8 ROC 诊断曲线

Fig. 8 ROC diagnostic curves

2.5 唇腺组织免疫细胞浸润结果

唇腺组织免疫细胞浸润结果显示,在 SS 唇腺组织中, $\gamma\delta$ T 细胞、巨噬细胞、 $CD4^+$ 记忆 T 细胞比例明显升高,相反,浆细胞的比例在 SS 唇腺组织中比例减少(见图 9)。

2.6 lncRNA HCP5 与唇腺组织免疫细胞浸润相关性

HCP5 与免疫细胞浸润的相关性分析显示, HCP5 的表达与 $\gamma\delta$ T 细胞、 $CD4^+$ 记忆 T 细胞在唇腺中的浸润程度呈正相关(见图 10)。

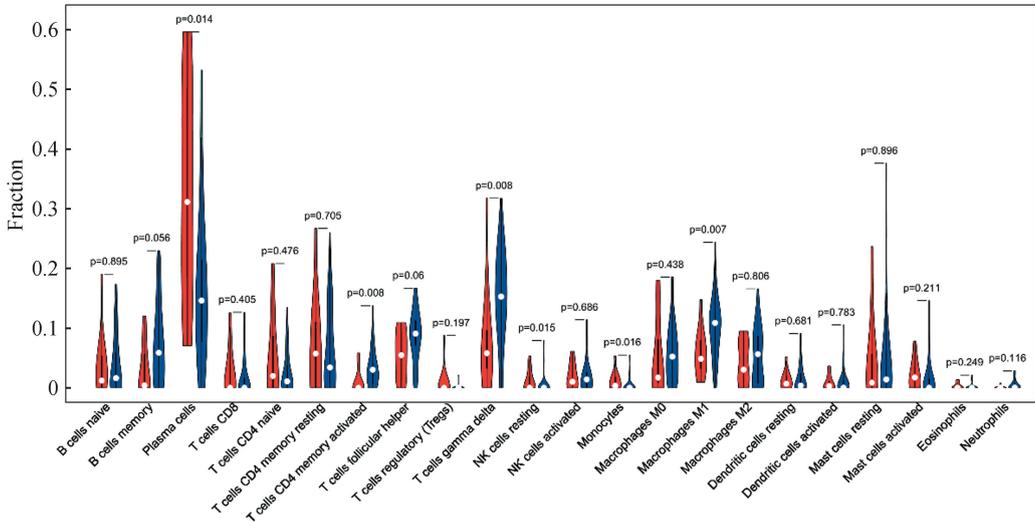


图 9 SS 唇腺组织中免疫细胞浸润结果

Fig.9 Results of immune infiltration in SS labial gland tissue

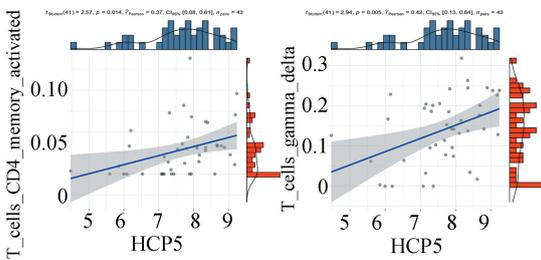


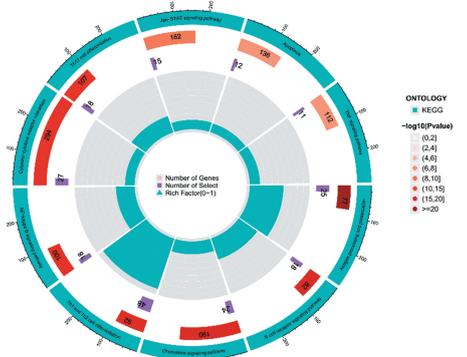
图 10 HCP5 表达与免疫细胞浸润相关性

Fig.10 Correlation between HCP5 expression and immune cell infiltration

2.7 GO 富集分析及 KEGG 信号通路分析

lncRNA 与编码蛋白基因共表达分析显示,在唇腺组织中,与 HCP5 共表达的编码蛋白基因为 556 个;在全血中,与 HCP5 共表达的编码蛋白基因为 355 个。KEGG 分析结果显示,唇腺组织中与 HCP5 共表达的蛋白功能集中于抗原加工和呈递、B 细胞受体信号通路、趋化因子信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化、NF- κ B 信号通路、Th17 细胞分化等信号通路(见图 11a),而全血中与 HCP5 表达的蛋白功能集中于代谢途径 NOD 样受体信号通路、糖酵解/糖异生、细胞凋亡、MAPK 信号通路、p53 信号通路等信号通路(见图 11b)。

(a)唇腺组织中HCP5共表达编码蛋白基因KEGG信号通路分析



(b)全血中HCP5共表达编码蛋白基因KEGG信号通路分析

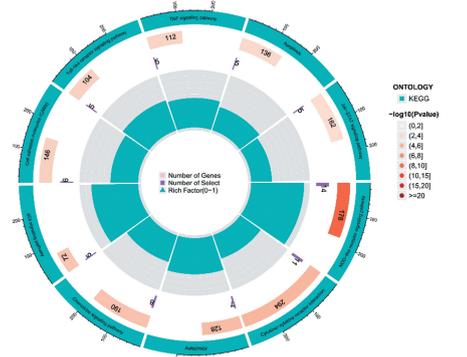


图 11 KEGG 信号通路分析

Fig.11 Analysis of KEGG signaling pathway

3 讨论

机器学习目前在医学上已经得到了广泛的应用,大量研究表明,机器学习在疾病的生物标志物筛选、诊断、预后中均发挥着重要作用^[14-16]。本研究在机器学习的基础上,结合免疫浸润分析了干燥综合征患者唇腺组织 lncRNA 表达及局部免疫细胞浸润情况,并发现了两者之间存在相关性,这可能有助于对 SS 发病机制的理解。

SS 是一种自身免疫性疾病,其特点是全身性 B 细胞激活和腺体内自身抗体的产生。免疫介导的炎症细胞浸润与淋巴趋化因子的异位产生、T/B 细胞分离的形成以及淋巴细胞浸润有关。SS 中唾液腺的组织病变特别令人感兴趣,因为一些生物学和免疫学异常经常导致患者腺体组织中发生的变化^[17-18]。通过研究唇腺在 SS 中的变化,可以增加对疾病发病机制的理解。

免疫细胞浸润结果显示, γ/δ T 细胞、CD4⁺记忆 T 细胞、巨噬细胞在 SS 患者唇腺组织中明显升高。一项研究显示,在 SS 患者中, γ/δ T 细胞数量显著增加^[19]。另一项研究显示,pSS 患者的 γ/δ T 细胞产生更高的白介素-17,从而影响 SS 疾病的进程^[20]。这说明 γ/δ T 细胞可能在 SS 中病理免疫反应中起作用。然而,到目前为止,这种 T 细胞亚群参与的确凿证据还很少,在未来的研究中, $\gamma-\delta$ T 细胞在 SS 中的实验验证将是非常有意义的,因为我们对其在 SS 发病机制中的作用的理 解仍然很少。CD4⁺记忆 T 细胞与自身免疫性疾病高度相关,它们的寿命长,对抗原的反应效率高,而且具有重复介导自身免疫反应的特殊潜力^[21]。然而,关于 CD4⁺记忆 T 细胞对自身免疫性疾病的影响仍有许多关键问题仍未得到解答。Michelle 研究发现,SS 患者唾液腺中 CD4⁺记忆 T 细胞数量与正常组对比明显升高,并与唾液腺纤维化程度、病灶评分、角膜损伤和血清 Ro 抗体滴度呈正相关,提示 CD4⁺记忆 T 细胞在 SS 发病中发挥着重要^[22]。确定 CD4⁺记忆 T 细胞在 SS 发病及病情进展中的作用,对于开发针对 CD4⁺记忆 T 细胞驱动的自身免疫性疾病的靶向疗法至关重要。此外,SS 患者巨噬细胞的浸润程度与病变严重程度及 IL-18 表达呈正相关^[23],表明在腺体的浸润中存在巨噬细胞活化^[24]。巨噬细胞相关的蛋白酶基因,包括组织蛋白酶、基质金属蛋白酶和羧肽酶,在 SS 患者高度发炎的腺体活检中被发现上调,表明巨噬细胞在 SS 腺体协调组织破坏和异常修复过程中发挥着作用^[25]。在 SS 的小鼠模型中观察到,在 B 细胞和 T

细胞到来腺体之前,巨噬细胞已经在疾病的早期浸润腺体^[26]。对 SS 患者单核细胞的分析显示其吞噬功能受损,并且在启动免疫抑制信号时存在相应缺陷^[27]。对 SS 单核细胞衍生的巨噬细胞的进一步研究显示,SS 患者巨噬细胞的吞噬能力明显降低^[28],表明巨噬细胞参与了 SS 的发病。

本研究发现,HCP5 在 SS 唇腺组织及全血中均表达上调,在全血中,HCP5 的表达水平与 ANA、IgG、SSA、SSB 均有明显相关性。所有这些结果都表明,HCP5 与 SS 的典型表现密切相关。ESSDAI 评分是 SS 疾病活动的评价指标之一,其分数越高,表明疾病具有更高的活动度。研究结果显示 HCP5 与 ESSDAI 评分呈正相关,表明 HCP5 与 SS 的疾病活动性也存在相关,可能参与了 SS 病情进展,具有促炎作用。同时,为进一步评价 HCP5 在 SS 诊断中的诊断价值,在不同数据集中进行了 ROC 曲线分析,其 AUC 值为 0.833 和 0.877,表明 HCP5 可以作为诊断 SS 的潜在生物标志物。

HCP5 主要在免疫系统细胞中表达,参与适应性和先天免疫反应^[29]。目前对 HCP5 的研究多集中于肿瘤,如 YU 等发现,HCP5 通过抑制 miR-15a 调节 MACC1 以促进宫颈癌的发展^[30]。另一项研究显示,敲低 HCP5 后能够通过调节 AKT 信号激活增强了食管癌的放射敏感性^[31]。而 HCP5 在干燥综合征中尚未见相关的报道。在研究免疫浸润模式时,我们发现 lncRNAs 明显参与了 SS 腺体的浸润。HCP5 在腺体中的表达与 γ/δ T 细胞、CD4⁺记忆 T 细胞在腺体中的浸润程度呈正相关。KEGG 富集分析结果显示,在唇腺中,与 HCP5 共表达的蛋白功能集中于 Th1 和 Th2 细胞分化、B 细胞受体信号通路、Th17 细胞分化、自噬等信号通路,而全血中与 HCP5 共表达的蛋白功能集中于 NOD 样受体信号通路、细胞凋亡、p53 信号通路、自噬等,这些信号通路均参与了干燥综合征发病^[32-39],且唇腺组织与全血中与 HCP5 共表达的蛋白富集的信号通路具有相似性。鉴于这些途径与 SS 的发病机制高度相关,推测 HCP5 可能参与了 SS 的发病及疾病的进展。

本研究预测了免疫浸润模式和相关 lncRNA,揭示了 SS 潜在的免疫发病机制,确定了与免疫浸润有关的基本机制,并为靶向特定的免疫细胞和基因,改善该疾病的免疫治疗提供了线索。然而本研究也存在局限性,如总体研究样本量仍偏少,HCP5 在 SS 发病机制中的详细作用仍有待通过对分子机制的体内和体外深入研究来验证。

4 结 论

1)机器学习在分析、预测、筛选疾病的生物标志物中发挥着重要作用。

2)在SS患者中,LncRNA HCP5表达越高,其疾病活动度越高。

3)HCP5表达水平与唇腺组织免疫细胞浸润密切相关。

4)HCP5有望成为SS潜在的诊断、预后标志物以及免疫治疗的靶点。

参考文献(References)

- [1] MALDINI C, SEROR R, FAIN O, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in a French multiracial/multi-ethnic area[J]. *Arthritis Care & Research*, 2014, 66(3): 454-463. DOI: 10.1002/acr.22115.
- [2] MARIETTE X, CRISWELL L. Primary Sjögren's syndrome [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 378(10): 931-939. DOI: 10.1056/NEJMcP1702514.
- [3] FITZGERALD K, CAFFREY D. Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2014, 26: 140-146. DOI: 10.1016/j.coi.2013.12.001.
- [4] HEWARD J, LINDSAY M. Long non-coding RNAs in the regulation of the immune response [J]. *Trends in Immunology*, 2014, 35(9): 408-419. DOI: 10.1016/j.it.2014.07.005.
- [5] CHEN X, CHENG Q, WU H, et al. Long non-coding RNAs in systemic lupus erythematosus: New insights into disease pathogenesis and diagnosis [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2022, 95(6): e13167. DOI: 10.1111/sji.13167.
- [6] YAMANAKA H. TNF as a target of inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 2015, 15(2): 129-134. DOI: 10.2174/1871530315666150316121808
- [7] AINOLA M, POROLA P, TAKAKUBO Y, et al. Activation of plasmacytoid dendritic cells by apoptotic particles-mechanism for the loss of immunological tolerance in Sjögren's syndrome [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2018, 191(3): 301-310. DOI: 10.1111/cei.13077.
- [8] HILLEN M R, VERVERS F A, KRUIZE A A, et al. Dendritic cells, T-cells and epithelial cells: A crucial interplay in immunopathology of primary Sjögren's syndrome [J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2014, 10(4): 521-531. DOI: 10.1586/1744666X.2014.878650.
- [9] DU Wenhan, HAN Man, ZHU Xiaoxia, et al. The multiple roles of b cells in the pathogenesis of sjögren's syndrome [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 684999. DOI: 10.3389/fimmu.2021.684999.
- [10] ZHOU Huimin, YANG Jun, TIAN Jie, et al. CD8+ T Lymphocytes: Crucial players in Sjögren's syndrome [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 602823. DOI: 10.3389/fimmu.2020.602823.
- [11] KIRIPOLSKY J, MCCABE L G, KRAMER J M. Innate immunity in Sjögren's syndrome [J]. *Clinical Immunology*, 2017, 182: 4-13. DOI: 10.1016/j.clim.2017.04.003.
- [12] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(5): 453-457. DOI: 10.1038/nmeth.3337.
- [13] BU Dechao, LUO Haitao, HUO Peipei, et al. KOBAS-i: Intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W317-W325. DOI: 10.1093/nar/gkab447.
- [14] HU Ying, GUO Geyang, LI Junjun, et al. Screening key lncRNAs with diagnostic and prognostic value for head and neck squamous cell carcinoma based on machine learning and mRNA-lncRNA co-expression network analysis [J]. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 2020, 27(2): 195-206. DOI: 10.3233/CBM-190694.
- [15] MELLO A C, FREITAS M, COUTINHO L, et al. Machine learning supports long noncoding RNAs as expression markers for endometrial carcinoma [J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 3968279. DOI: 10.1155/2020/3968279.
- [16] XIAO Jianwei, WANG Rongsheng, CAI Xu, et al. Coupling of co-expression network analysis and machine learning validation unearthed potential key genes involved in rheumatoid arthritis [J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 604714. DOI: 10.3389/fgene.2021.604714.
- [17] LEE K E, KANG J H, YIM Y R, et al. The significance of ectopic germinal centers in the minor salivary gland of patients with Sjögren's syndrome [J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2016, 31(2): 190-195. DOI: 10.3346/jkms.2016.31.2.190.
- [18] GOULES A V, ARGYROPOULOU O D, PEZOULAS V C, et al. Primary Sjögren's syndrome of early and late onset: Distinct clinical phenotypes and lymphoma development [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 594096. DOI: 10.3389/fimmu.2020.594096.
- [19] GERLI R, AGEA E, BERTOTTO A, et al. Analysis of T cells bearing different isotypic forms of the gamma/delta T cell receptor in patients with systemic autoimmune diseases [J]. *The Journal of Rheumatology*, 1991, 18(10): 1504-1510. DOI: 10.1002/art.1780341023.
- [20] CICCIA F, ACCARDO-PALUMBO A, ALESSANDRO R, et al. Interleukin-36 α axis is modulated in patients with

- primary Sjögren's syndrome[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2015, 181(2):230–238.DOI: 10.1111/cei.12644.
- [21] RAPHAEL I, JOERN R R, FORSTHUBER T G. Memory CD4(+) T cells in immunity and autoimmune diseases [J]. *Cells*, 2020,9(3):531.DOI: 10.3390/cells9030531.
- [22] JOACHIMS M L, LEEHAN K M, DOZMOROV M G, et al. Sjögren's syndrome minor salivary gland CD4⁺ memory T cells associate with glandular disease features and have a germinal center T follicular helper transcriptional profile [J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020,9(7):2164.DOI: 10.3390/jcm9072164.
- [23] CHRISTODOULOU M I, KAPSOGEOURGOU E K, MOUTSOPOULOS H M. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2010, 34(4): 400 - 407. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.10.004.
- [24] MANOUSSAKIS M N, BOIU S, KORKOLOPOULOU, et al. Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjögren's syndrome; Correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 56(12): 3977 - 3988. DOI: 10.1002/art.23073.
- [25] GREENWELL-W, ILD T, MOUTSOPOULOS N M, GLIOZZI M, et al. Chitinases in the salivary glands and circulation of patients with Sjögren's syndrome; Macrophage harbingers of disease severity [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2011, 63(10): 3103–3115. DOI:10.1002/art.30465.
- [26] ROESCHER N, LODDE B M, VOSTERS J L, et al. Temporal changes in salivary glands of non-obese diabetic mice as a model for Sjögren's syndrome [J]. *Oral Diseases*, 2012, 18(1): 96–106. DOI:10.1111/j.1601-0825.2011.01852.x.
- [27] HAUK V, FRACCAROLI L, GRASSO E, et al. Monocytes from Sjögren's syndrome patients display increased vasoactive intestinal peptide receptor 2 expression and impaired apoptotic cell phagocytosis[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2014, 177(3), 662 - 670.DOI:10.1111/cei.12378.
- [28] MANOUSSAKIS M N, FRAGOULIS G E, VAKRAKOU A G, et al. Impaired clearance of early apoptotic cells mediated by inhibitory IgG antibodies in patients with primary Sjögren's syndrome [J]. *PloS One*, 2014, 9(11): e112100. DOI:10.1371/journal.pone.0112100.
- [29] KULSKI J K. Long noncoding RNA HCP5, a hybrid HLA class I endogenous retroviral gene: Structure, expression, and disease associations [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 480. DOI: 10.3390/cells8050480.
- [30] YU Y, SHEN H M, FANG D M, et al. LncRNA HCP5 promotes the development of cervical cancer by regulating MACC1 via suppression of microRNA-15a[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(15): 4812 - 4819. DOI: 10.26355/eurrev_201808_15616.
- [31] GUO Yue, WANG Lan, YANG Hui, et al. Knockdown long non-coding RNA HCP5 enhances the radiosensitivity of esophageal carcinoma by modulating AKT signaling activation[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 884–893.DOI: 10.1080/21655979.2021.2014386.
- [32] PSIANOU K, PANAGOULIAS I, PAPANASTASIOU A D, et al. Clinical and immunological parameters of Sjögren's syndrome[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2018, 17(10): 1053–1064.DOI:10.1016/j.autrev.2018.05.005.
- [33] CARRILLO-BALLESTEROS F, PALAFOX-SÁNCHEZ C, FRANCO-TOPETE R. et al. Expression of BAFF and BAFF receptors in primary Sjögren's syndrome patients with ectopic germinal center-like structures [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2020, 20(4): 615 - 626.DOI: 10.1007/s10238-020-00637-0.
- [34] LUO Jing, MING Bingxia, ZHANG Cai, et al. IL-2 inhibition of Th17 generation rather than induction of Treg cells is impaired in primary Sjögren's syndrome patients [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 13(9):1755. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01755.
- [35] KIM Y H, LI Zhengri, CUI Lian, et al. Expression of nod-like receptors and clinical correlations in patients with dry eye disease [J]. *American Journal of Ophthalmology*, 2019, 200:150–160.DOI: 10.1016/j.ajo.2019.01.002.
- [36] FU Jiayao, SHI Huan, WANG Baoli, et al. LncRNA PVT1 links Myc to glycolytic metabolism upon CD4⁺ T cell activation and Sjögren's syndrome-like autoimmune response[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2020, 107:102358. DOI:10.1016/j.jaut.2019.102358.
- [37] LI Zhe, GUO Jialong, BI Liqi. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130:110542. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110542.
- [38] YE Lei, SHI Huan, YU Chuangqi, et al. LncRNA Neat1 positively regulates MAPK signaling and is involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 88:106992.DOI:10.1016/j.intimp.2020.106992.
- [39] MARIETTE X, SIBILIA J, ROUX S, et al. A new defensive mechanism to prevent apoptosis in salivary ductal cells from patients with Sjögren's syndrome; over-expression of p53 and p21[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41(1): 96–99.DOI: 10.1093/rheumatology/41.1.96.