

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.01.0056

论著

# 基于失巢凋亡相关标志物预测膀胱癌患者预后

朱亮,陈业刚  
(天津医科大学第二医院泌尿外科,天津 300211)

**摘要** **目的:**探讨失巢凋亡相关基因在膀胱癌中的作用和预后价值。**方法:**从 Genecards 数据库和 Harmonizome 数据库获取失巢凋亡相关基因。*Cox* 和 *LASSO* 回归用来得到具有预后价值的基因并构建风险预后模型。列线图、校准图、累积危险曲线和决策曲线用来验证模型准确性。研究不同风险组间在生存预后及免疫景观上的差异。采用实时定量 PCR 测定人正常膀胱细胞 SV-HUV-1、T24、J82、5637 膀胱癌细胞系中 F10 表达水平,将构建的含有全长的 pcDNA3.1 质粒及阴性对照质粒瞬时转染 T24 细胞;采用 CCK-8、集落刺激实验检测 F10 高表达对细胞增殖能力的影响;利用 Transwell 实验检测 PCA3 高表达对细胞侵袭能力的影响。**结果:**获得 9 个失巢凋亡相关基因(*DNMT1*、*F10*、*FASN*、*PDGFRA*、*SATB1*、*MSLN*、*MYC*、*CALR*、*CSPG4*)用来构建预后模型。列线图、校准图、累积危险曲线和决策曲线显示,模型能较好的评估膀胱癌患者的预后。根据风险评分分组,低危组患者的总生存期(OS)明显长于高危组。免疫微环境中,CD8<sup>+</sup>T 细胞( $P=0.015$ )、M0 巨噬细胞( $P=0.005$ )、M2 巨噬细胞( $P=0.05$ )和中性粒细胞( $P=0.009$ )呈现出较大差异。高危组与低危组间免疫评分具有统计学意义( $P<0.001$ )。经外部验证证实失巢凋亡基因与膀胱癌的预后相关。以 F10 为例,RT-qPCR 结果表明 T24 细胞系相对表达水平低于正常膀胱癌上皮( $t=3.031$ ,  $P<0.05$ );CCK-8 实验中,高表达 F10 组 24、48、72 h 增殖活性低于对照组( $t=2.578$ 、 $5.528$ 、 $19.25$ , 均  $P<0.001$ );集落刺激形成实验表明高表达 F10 组细胞克隆形成数低于对照组( $t=10.570$ ,  $P<0.001$ );Transwell 迁移侵袭实验中,高表达 F10 组细胞迁移及侵袭数目均低于对照组( $t=8.115$ ,  $P<0.005$ )。**结论:**共获得 9 个失巢凋亡相关基因,其可以作为潜在的治疗靶点应用于临床。

**关键词** 失巢凋亡;膀胱癌;肿瘤微环境;预后模型;免疫疗法

中图分类号 R694+7 文献标志码 A 文章编号 1006-8147(2024)01-0056-09

## Prognosis of patients with bladder cancer predicted by biomarker associated with anoikis

ZHU Liang, CHEN Yegang

(Department of Urology, Tianjin Institute of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

**Abstract** **Objective:** To explore the role and prognostic value of anoikis-related genes (ARGs) in bladder cancer. **Methods:** ARGs were obtained from the Genecards and Harmonizome databases. *Cox* and *LASSO* regressions were used to obtain genes with prognostic value and to construct risk prognostic models. The accuracy of the model was validated using nomogram, calibration plots, cumulative hazard curves and decision curve analysis. Further, we explored differences in survival prognosis and immune landscapes among different risk groups. Finally, real-time quantitative PCR was used to determine the expression level of F10 in normal human bladder cells SV-HUV-1 and T24, J82, 5637 bladder cancer cell lines, and the constructed plasmid containing full length pcDNA3.1 and the negative control plasmids were transiently transfected into T24 cells; CCK-8 and colony formation assay were applied to evaluate the influence of high F10 expression on cell proliferation. Transwell assay was used to test the effect of PCA3 on cell migration. **Results:** Nine ARGs (*DNMT1*, *F10*, *FASN*, *PDGFRA*, *SATB1*, *MSLN*, *MYC*, *CALR*, *CSPG4*) were obtained for use in constructing prognostic models. The nomogram, calibration plots, cumulative hazard curves, and decision curves showed that the model was able to evaluate the prognosis of patients with bladder cancer reasonably well. By grouping patients based on risk scores, patients in the low-risk group had significantly longer overall survival (OS) than those in the high-risk group. In addition, CD8<sup>+</sup>T cells ( $P=0.015$ ), M0 macrophages ( $P=0.005$ ), M2 macrophages ( $P=0.05$ ), and neutrophils ( $P=0.009$ ) showed large differences in the immune microenvironment. The immune scores were statistically significant between the high-risk and low-risk groups ( $P<0.001$ ). At last, the association of ARGs with the prognosis of bladder cancer was further confirmed by external validation. Taking F10 as an example, RT-qPCR results showed that the relative expression level of T24 cell line was lower than that of normal bladder cancer epithelium cells ( $t=3.031$ ,  $P<0.05$ ). In the CCK-8 assay, the proliferative activities at 24, 48, and 72 h in the high F10-expressing group were lower than those in the control group ( $t=2.578$ ,  $5.528$ ,  $19.25$ , all  $P<0.001$ ); the colony-forming assays showed that the number of cell clone formations in the high F10-expressing group was lower than that in the control group ( $t=10.570$ ,  $P<0.001$ ); and in the transwell migration and invasion assay, the number of cell migration and invasion in the high F10-expressing group was also lower than that in the control group ( $t=8.115$ ,  $P<0.005$ ). **Conclusion:** A total of 9 ARGs are obtained, which are available for clinical application as potential therapeutic targets.

**Key words** anoikis; bladder cancer; tumor microenvironment; prognostic model; immunotherapy

基金项目 天津市卫健委一般项目(2021171)

作者简介 朱亮(1998-),男,硕士在读,研究方向:泌尿外科;通信作者:陈业刚, E-mail: yegangchen@tmu.edu.cn.

膀胱癌是最普遍的泌尿系统恶性肿瘤之一,也是世界上最常见的十大癌症之一。根据《2020 年全球癌症统计》,膀胱癌在全球范围内造成约 212 000 人死亡,而且这一死亡人数随着时间的推移在不断增加<sup>[1]</sup>。根据临床病理特征,膀胱癌可分为非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌<sup>[2]</sup>。大多数膀胱癌患者(75%)表现为非肌层浸润性膀胱癌,但其中超过 60%的患者有复发可能,超过 20%的患者最终进展为肌层浸润性膀胱癌,患者 5 年生存率从 90%急剧下降到 50%以下<sup>[3-5]</sup>。尽管目前膀胱癌的治疗方案越来越多,如手术、放疗、化疗、靶向治疗、免疫治疗和新辅助治疗等,但仍有相当一部分人没有从中受益<sup>[6]</sup>。因此,鉴定膀胱癌的生物标志物和基因靶点以抑制癌症浸润进展具有重要的临床意义。

失巢凋亡是由正常的细胞-细胞或细胞-细胞外基质附着失败而诱发的一种程序性细胞死亡<sup>[7]</sup>。与经典的细胞凋亡类似,失巢凋亡通过线粒体途径或细胞表面死亡受体途径在人体内发挥作用<sup>[8]</sup>。失巢凋亡可以防止脱落的细胞黏附在异常部位<sup>[9-10]</sup>。然而,越来越多的研究表明,侵袭性肿瘤细胞产生失巢凋亡抵抗是肿瘤进展的关键因素<sup>[11]</sup>。失巢凋亡抗性日益成为肿瘤进展的有力标志。但是目前很少有研究探讨膀胱癌中失巢凋亡与肿瘤细胞浸润和远处转移之间的联系。

因此本研究探讨了失巢凋亡与膀胱癌之间的预后关系,并建立一个预后评分模型。此外,将肿瘤微环境、药物敏感性和失巢凋亡相关基因结合起来,进一步探讨该风险评分与肿瘤微环境的相关性,为膀胱癌患者的预后评估提供了坚实的基础。

## 1 材料与方法

**1.1 数据收集** 2023 年 3 月 10 日从 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 中收集了有关膀胱癌的基因转录组数据和临床数据,其中包含 19 个正常样本和 412 个肿瘤样本。进一步从 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载了 GSE-3507 数据集的相关信息。使用 Perl 和 WinRAR 软件对 GEO 基因表达数据和 TCGA 表达数据进行提取、解压、清理和合并。转录组数据使用的是每千基数的片段 (FPKM)。所有的失巢凋亡相关基因都是通过 genecards (<https://www.genecards.org/>) 数据库<sup>[12]</sup>和 harmonizome (<https://maayanlab.cloud/Harmonizome/>) 数据库<sup>[13]</sup>获得。在去除重复的数值后,得到 516 个失巢凋亡相关基因。为尽量减少数据偏差,从临床数据中剔除了缺失总生存期 (overall survival, OS) 和总

生存期低于 30 d 的样本 (表 1)。最后,从 UCSC Xena 服务器 (<https://xena.ucsc.edu/>) 上的 GDC TCGA 膀胱癌项目中获得膀胱癌患者的拷贝数变异数据。

表 1 基于 TCGA 及 GEO 膀胱癌患者临床特征分布

Tab.1 Distribution of clinical characteristics of bladder cancer patients based on TCGA and GEO

临床特征	TCGA (n=400)	GSE13507 (n=165)
年龄 (岁)		
≤ 65	158	74
> 65	242	91
性别		
男性	294	135
女性	106	30
分级		
低等级	20	17
高等级	277	148
未知	3	0
T 分期		
T0	1	0
Ta	0	24
T1	3	80
T2	117	31
T3	189	19
T4	57	11
未知	33	0
分期		
N0	234	149
N1	47	8
N2	71	6
N3	7	1
未知	41	1
生存状态		
存活	224	96
死亡	176	69

**1.2 建立与预后相关的失巢凋亡相关基因风险评分** 从 TCGA 数据库中筛选出上述 516 个基因表达数据,并使用 Wilcoxon 秩和检验进行差异分析。随后,进行单因素 Cox 回归分析以筛选与生存相关的基因,使用 R 包“glmnet”进行最小绝对收缩和选择算子 (LASSO) 回归分析。多因素 Cox 回归被用来提取风险模型构建的核心基因并计算其对应系数 (coef)。所有样本的风险得分按以下公式计算: 风险分数 =  $\sum_{i=1}^n \exp(X_i) * \text{coef}(X_i)$ , 其中  $\exp(X_i)$  和  $\text{coef}(X_i)$  分别代表基因表达水平和对应风险系数。然后,将所有符合标准的样本按 1:1 的比例分成训练组和测试组。以训练组中风险分数中位数值为分界点,将所有样本分为高风险组和低风险组。最后,对所有样本、测试样本和训练样本中的高、低风险组进行 Kaplan-Meier (K-M) 分析和受试者工作特征 (ROC) 曲线分析,以评估模型的预测价值。

1.3 列线图模型的构建与验证 根据患者的临床特征和失巢凋亡相关基因评分,使用 R 包的“rms”与“survival”包创建列线图来预测样本 1、3 和 5 年的生存期。校准图、累积危险曲线和决策曲线分析以验证列线图模型的预测能力。

1.4 免疫浸润与肿瘤微环境分析 采用 CIBERSORT 软件包获得所有样本中 22 种免疫细胞的表达谱。然后,预估高风险组和低风险组之间 22 种免疫细胞浸润肿瘤的比例,并以柱状图和小提琴图的形式呈现。同时,探索各种免疫细胞之间的相关性。此外,将得到的核心预后失巢凋亡基因,风险得分与 22 种免疫细胞进行相关性分析。最后,通过 ESTIMATE 算法比较高危组和低危组的纯度、基质和免疫评分。

1.5 药物敏感性分析 通过使用 R 包“pRR-ophetic”,测量了不同药品的 50%最大抑制浓度( $IC_{50}$ ),并比较不同风险组间的敏感性差异( $P<0.001$ )

1.6 细胞培养及转染 将人正常膀胱细胞 SV-HUV-1 及膀胱癌细胞系 T24、J82、5637(中国科学院上海细胞库)接种于含 10%胎牛血清的 DMEM(日本 Takara 公司)中培养,并放置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  细胞培养箱中,待细胞生长至 80%~90%培养皿时,予胰蛋白酶进行消化、传代。

1.7 RT-qPCR 实验检测基因 mRNA 表达量 按照 TRIzol 试剂[天根生化科技(北京)公司]说明书所述,提取细胞密度达 80%左右时的正常膀胱细胞、T24、J82、5637 膀胱癌细胞系中的总 RNA,使用反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)合成 cDNA,应用 qRT-PCR 的方法对 F10,内参 GAPDH 进行扩增,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法对 F10,内参 GAPDH 表达水平定量分析,设置 qRT-PCR 反应条件:  $92^{\circ}\text{C}$  40 s,  $58^{\circ}\text{C}$  28 s,  $72^{\circ}\text{C}$  28 s,循环 36 次,每组 6 个重复,每个重复 3 个平行。其中所选择的引物序列如下:F10 上游引物:5'-TCAAGGTGAGGCTAGGGGAC-3',下游引物:5'-GGAAGGTGATGGGGTCTTG-3';GAPDH 上游引物:5'-GAAAGCCTGCCGCTGACTAA-3',下游引物:5'-GCCCAATACGACCAATCAGAG-3'。

1.8 细胞转染 取对数生长期的膀胱 T24 细胞进行转染,按照 LipofectamineTM3000 说明书(美国 Invitrogen 公司)的方法操作,分别转染阴性对照质粒(NC 组)和 F10 过表达质粒(OE-F10 组),以 pcDNA3.1 为质粒载体。收集转染完全的对数生长期 T24 细胞进行后续研究。

1.9 CCK-8、集落刺激实验检测细胞增殖能力 消化、收集对数生长期的 NC 组、OE-F10 组细胞,制成

单细胞悬液,将转染后的各组细胞置于 96 孔板中进行培养,每组 3 个复孔,每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培育至 0、24、48、72 h 时,加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液(日本 Takara 公司),继续避光孵育 2 h,使用酶标仪记录此刻 450 nm 波长对应的吸光度,即 OD 值,绘制细胞生长曲线。

同样,取对数生长期的 NC 组、OE-F10 组细胞以每孔 1 000 个的密度接种于六孔板上,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  细胞培养箱中孵育 2 周,4%多聚甲醛固定细胞 20 min 后,使用 0.5%结晶紫(美国 Sigma 公司)进行染色,PBS 冲洗、晾干、拍照。

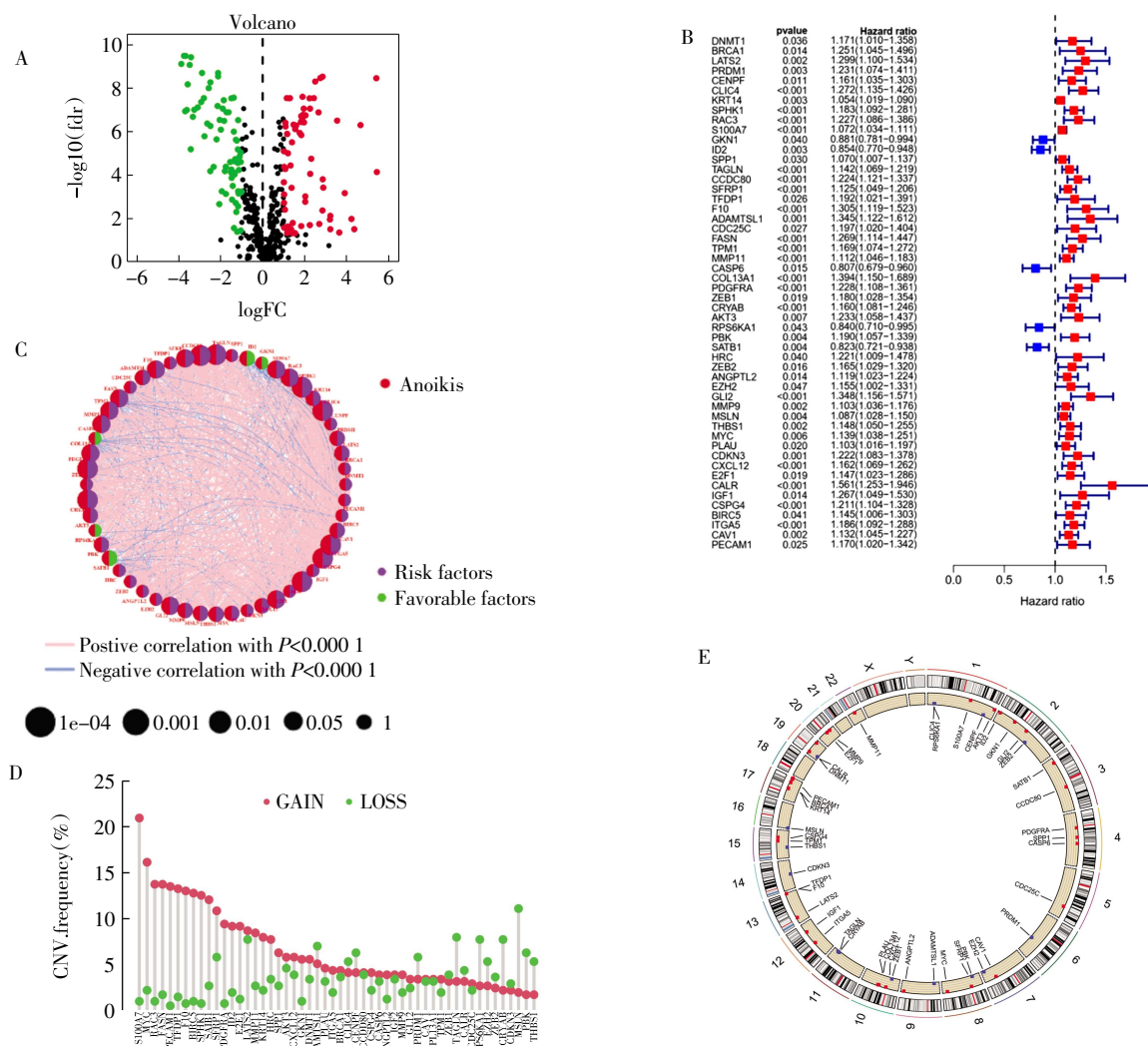
1.10 Transwell 检测细胞侵袭能力 细胞转染后,取对数生长期的 NC 组、OE-F10 组细胞制备无血清的单细胞悬液,按  $1\times 10^5$  细胞数/孔(200  $\mu\text{L}$ )加入 transwell 上室,下室加入 600  $\mu\text{L}$  含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  细胞培养箱中 24 h,棉签轻拭去未侵袭的细胞,多聚甲醛固定 20 min,PBS 清洗 3 次,并采用 0.1%结晶紫染料(美国 Sigma 公司)染色 20 min,再次 PBS 清洗,晾干,于显微镜下选取合适的视野计数。

1.11 统计学处理 在这项研究中,使用单因素 Cox 分析、LASSO 和多因素 Cox 回归分析来获得膀胱癌的预后基因。ROC 曲线和 K-M 生存分析用于预测模型的准确性。所有的数据处理都是基于 R(4.1.3 版)和 Perl。相关 R 包包括 ggplot2、ggpubr、survival、survminer 等均从 Bio Conductor 包或 R 包中下载。qPCR、CCK-8、transwell、集落等实验均重复 3 次,利用 graphpad prism 9.1 进行统计学分析及可视化处理,正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间均数比较采用  $t$  检验。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 失巢凋亡相关基因遗传变异和表达 共发现 516 个失巢凋亡相关基因。与癌旁组织相比,获取到 136 个差异失巢凋亡基因(67 个上调,69 个下调)(图 1A)。单因素 Cox 回归分析( $P<0.05$ )显示 136 个差异失巢凋亡基因中有 52 个与生存预后相关(图 1B, $P<0.001$ )。52 个失巢凋亡相关基因与预后的相关性表明,GKN1、ID2、CASP6、RPS6KA1 和 SATB1 是膀胱癌的保护性因素,而其他基因属于危险因素(图 1C)。拷贝数变异分析显示了所有与预后相关的失巢凋亡相关基因的拷贝频率变化(图 1D)。其中,S100A7 在所有样本中拷贝频率呈增加趋势,而 MSLN 的拷贝频率则呈降低趋势。52 个与预后相关的失巢凋亡相关基因在染色体上的位置见图 1E。

2.2 失巢凋亡相关基因风险预后模型建立 对 52



注:A:失巢凋亡相关基因差异分析火山图;B:单因素分析差异基因森林图;C:膀胱癌患者中 52 个失巢凋亡相关基因互作网络图(绿色:生存保护因素;紫色:生存高危因素);D:失巢凋亡相关基因拷贝频率;E:染色体上 52 个失巢凋亡相关基因拷贝数变异位点(红色表示拷贝频率增加,蓝色表示拷贝频率减少)

图 1 基于 TCGA 膀胱癌患者失巢凋亡相关基因变异与表达

Fig.1 Genetic variations and expression of ARGs based on TCGA in bladder cancer patients

个失巢凋亡相关基因进行降维,得到 16 个基因(图 2A、B)。进一步多因素 *Cox* 分析选出 9 个失巢凋亡相关风险基因(*DNMT1*、*F10*、*FASN*、*PDGFRA*、*SATB1*、*MSLN*、*MYC*、*CALR*、*CSPG4*)。9 个失巢凋亡相关风险基因的表达水平与相关系数见表 2。将所有符合标准的样本按 1:1 的比例分为训练组( $n=280$ )和测试组( $n=279$ )。以训练组中风险评分的中位数值为截断点,将所有样本分为高、低风险组。*K-M* 分析显示低风险组整体样本、测试样本和训练样本的生存生存预后均好于高风险组(图 2C~E)。两组 1、3、5 年生存预后的 AUC 值都大于 0.6,训练组数值高于 0.7(图 2F~H)。

**2.3 列线图创建与验证** 将膀胱癌患者的临床特征和风险评分结合,构建一个列线图来预测患者在 1、3 和 5 年的生存状况,显示该列线图的良好预测

表 2 多因素 *Cox* 分析鉴别 9 个失巢凋亡相关基因

Tab.2 Nine genes identified by multivariate *Cox* regression analysis

基因	相关系数
<i>DNMT1</i>	-0.467 120 903
<i>F10</i>	0.261 958 255
<i>FASN</i>	0.459 986 279
<i>PDGFRA</i>	0.170 611 282
<i>SATB1</i>	-0.335 859 840
<i>MSLN</i>	0.076 410 110
<i>MYC</i>	0.149 633 259
<i>CALR</i>	0.407 193 104
<i>CSPG4</i>	0.157 259 466

性(图 3A、3B)。累积危险曲线显示风险评分高的膀胱癌患者 OS 逐渐增加(图 3C)。决策曲线分析结果显示列线图在预测患者预后方面的表现优于其他临床相关特征(图 3D~3F)。

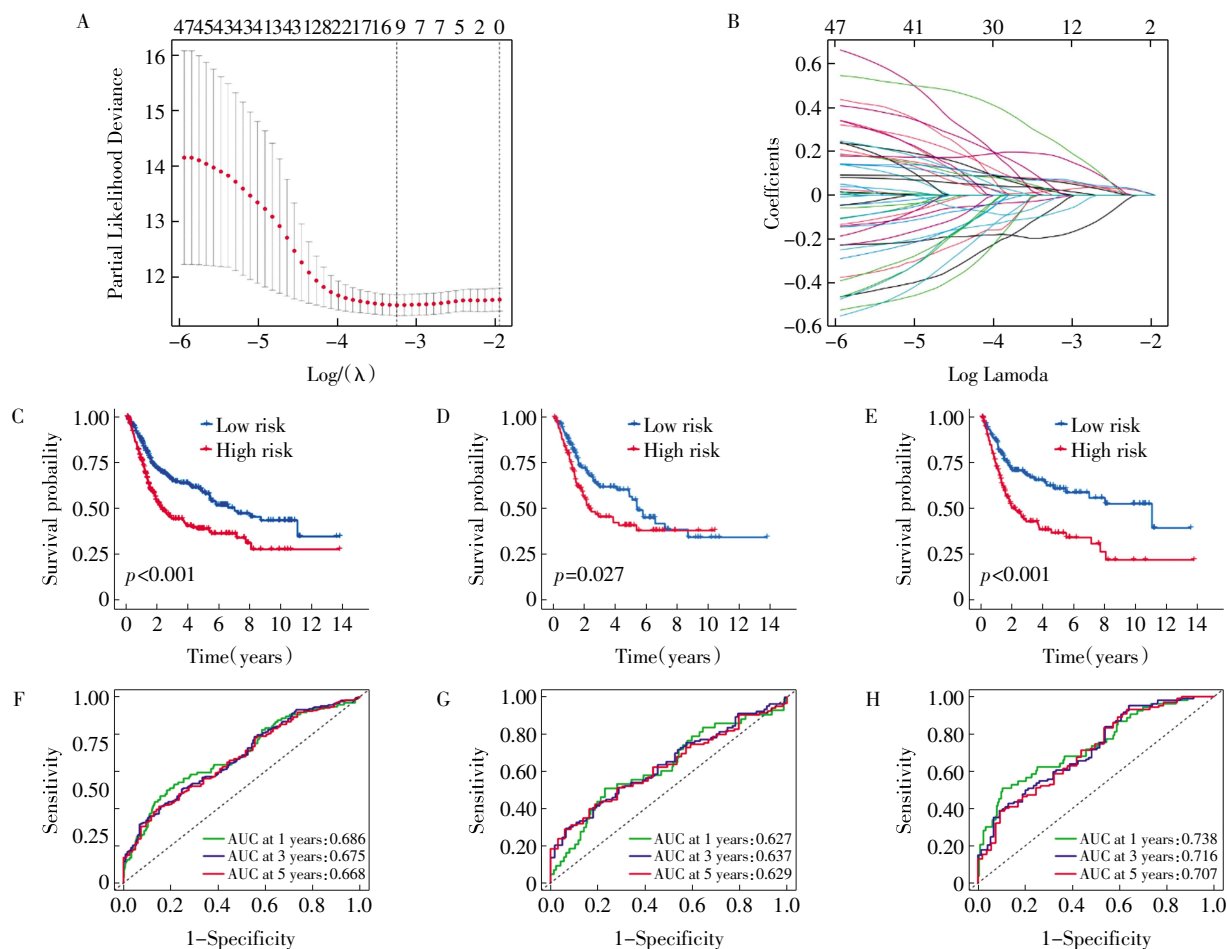


图2 基于 TCGA 及 GSE13507 数据集建立风险预后模型

Fig.2 Establishing prognostic risk model based on the TCGA and GSE13507 cohort

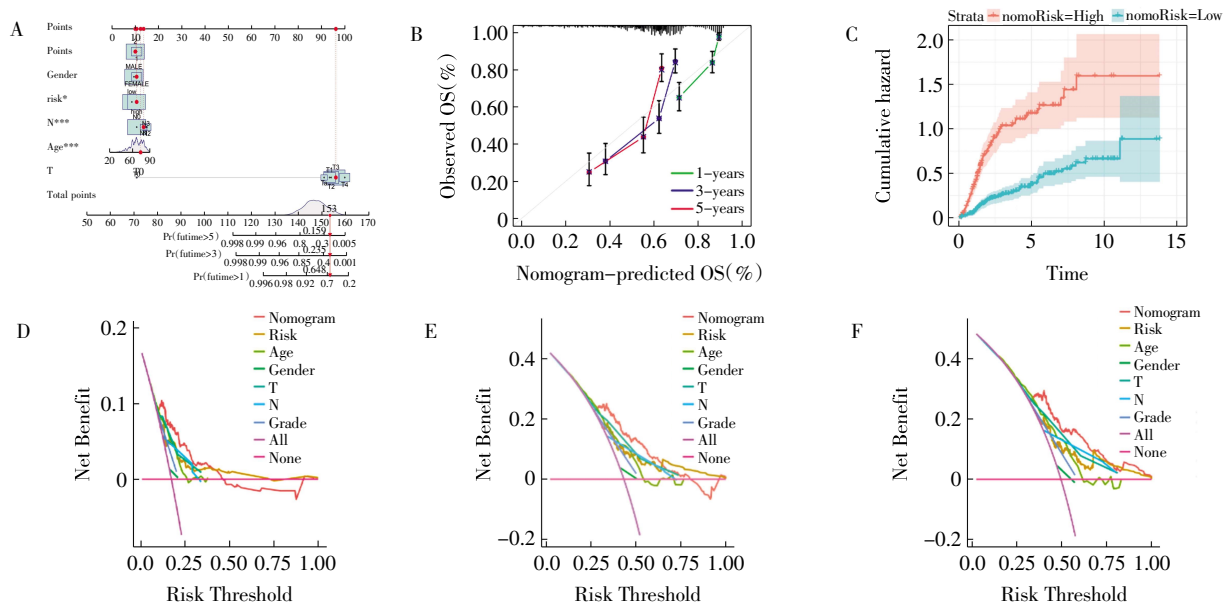


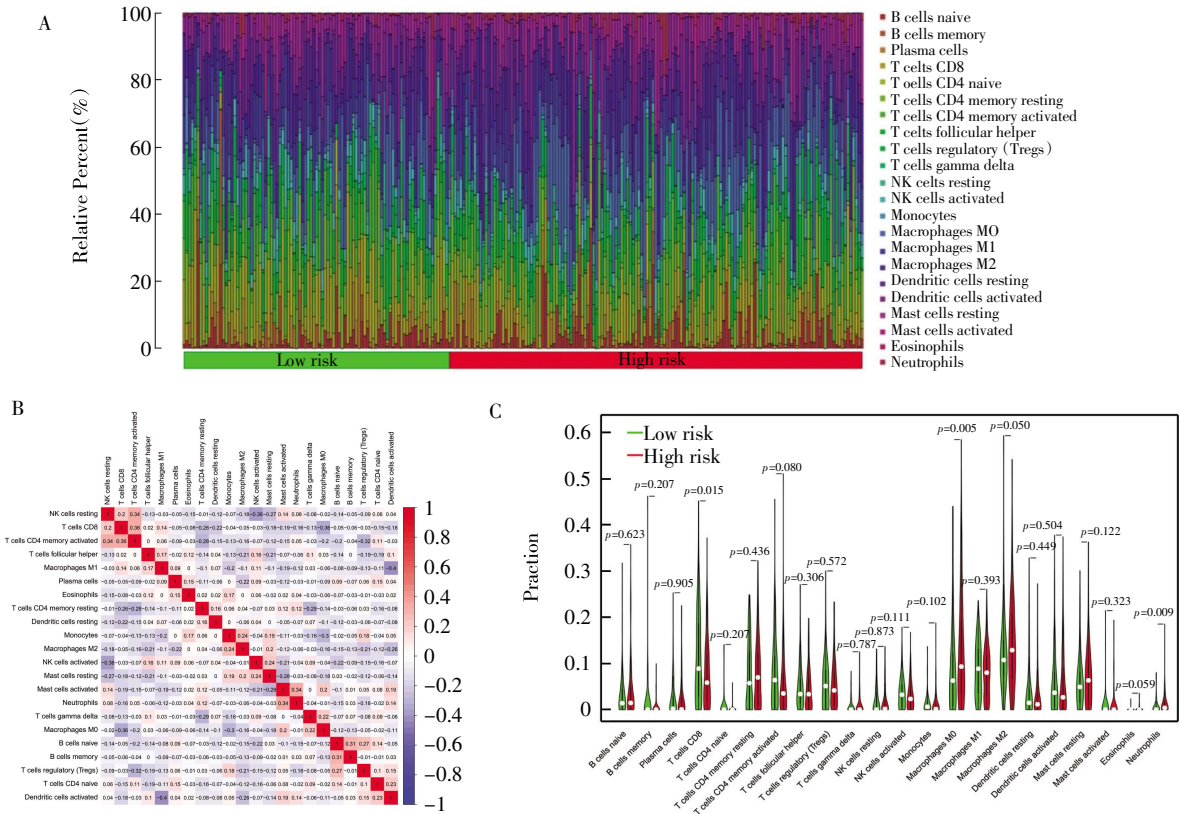
图3 列线图构建与验证

Fig.3 Construction and validation of nomogram



2.4 失巢凋亡相关基因免疫浸润、免疫检查点和肿瘤微环境分析 高风险组和低风险组之间 CD8<sup>+</sup>T 细胞( $P=0.015$ )、M0 巨噬细胞( $P=0.005$ )、M2 巨噬细胞( $P=0.05$ )和中性粒细胞( $P=0.009$ )的表达有明显差异(图 4A~C)。用于构建风险模型的 9 个失巢凋

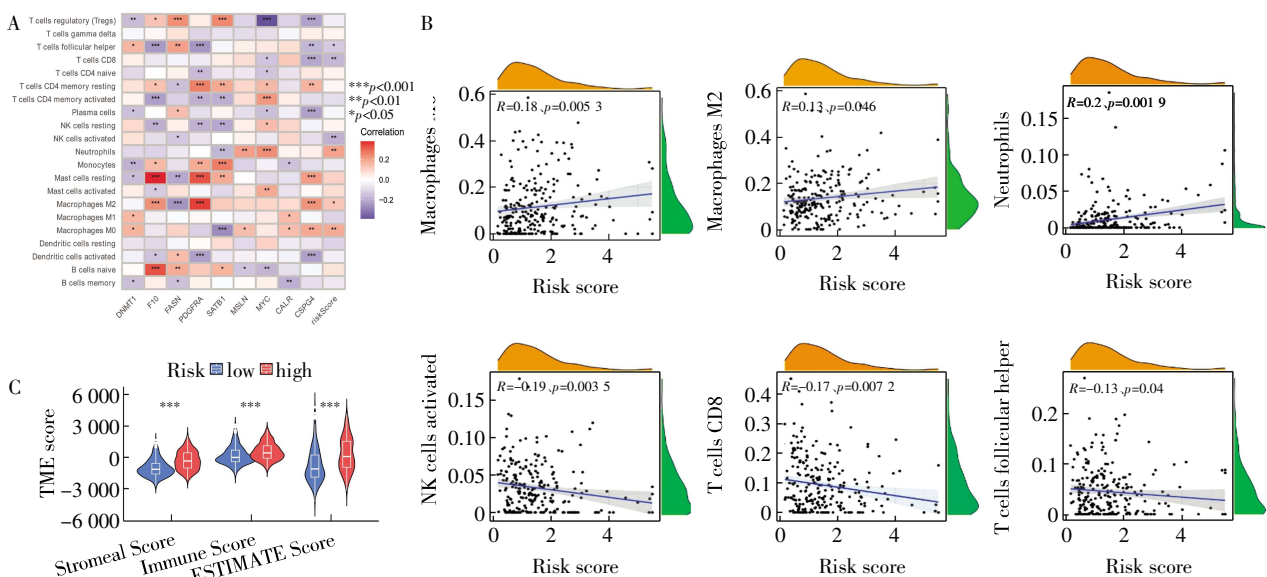
亡相关基因与众多的免疫细胞有较强的关联性(图 5A)。失巢凋亡风险评分与 M0 巨噬细胞、M2 巨噬细胞和中性粒细胞呈正相关,而与滤泡辅助 T 细胞、CD8T 细胞和活化 NK 细胞呈负相关(图 5B)。高危组基质和免疫评分高于低危组(图 5C)。



注:A:膀胱癌患者免疫细胞分布直方图;B:免疫细胞相关性热图;C:高危组和低危组免疫细胞相对含量的小提琴图

图 4 免疫细胞浸润分析

Fig.4 Analysis of immune cell infiltration



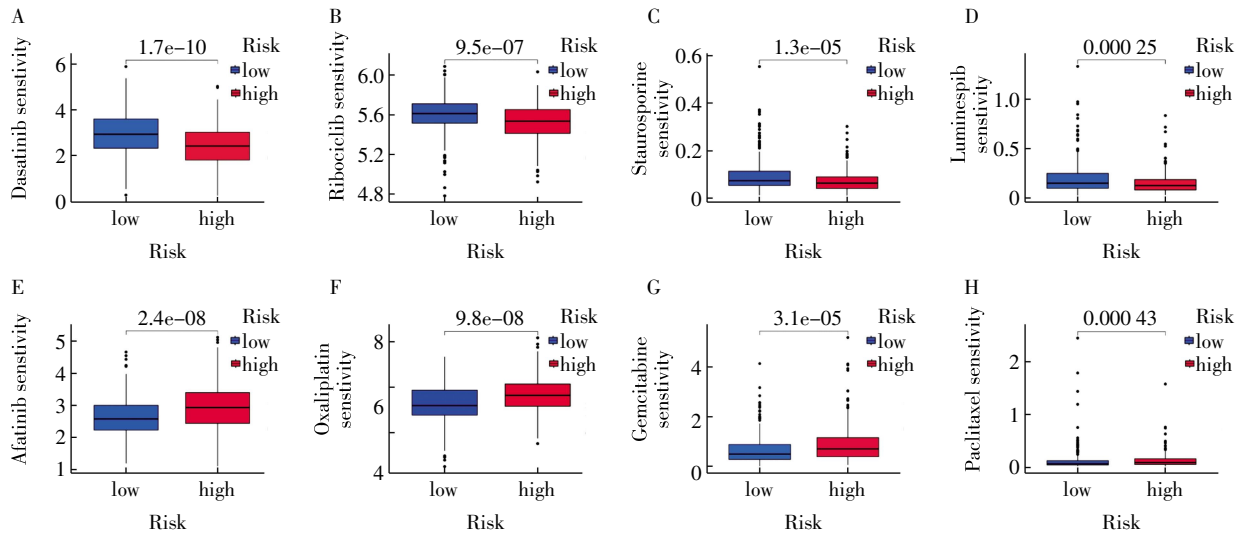
注:A:预后基因、风险评分与免疫细胞相关性分析;B:失巢凋亡相关基因风险得分与免疫细胞类型间的相关性;C:高危组和低危组的纯度评分、基质评分和免疫浸润评分比较; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

图 5 失巢凋亡预后基因免疫检查点及免疫微环境评估

Fig.5 Evaluation of the immune checkpoint genes and immune microenvironment for anoikis-apoptotic prognostic genes

2.5 药物敏感性分析 共得到 65 种符合条件的药物( $P<0.001$ )。其中,低危人群对 Dasatinib、Ribociclib、Staurosporine、Luminespib 等药物具有敏感

性(图 6A~6D),而高危人群则对 Afatinib、Oxaliplatin、Gemcitabine、Paclitaxel 等药物更为敏感(图 6E~6H)。



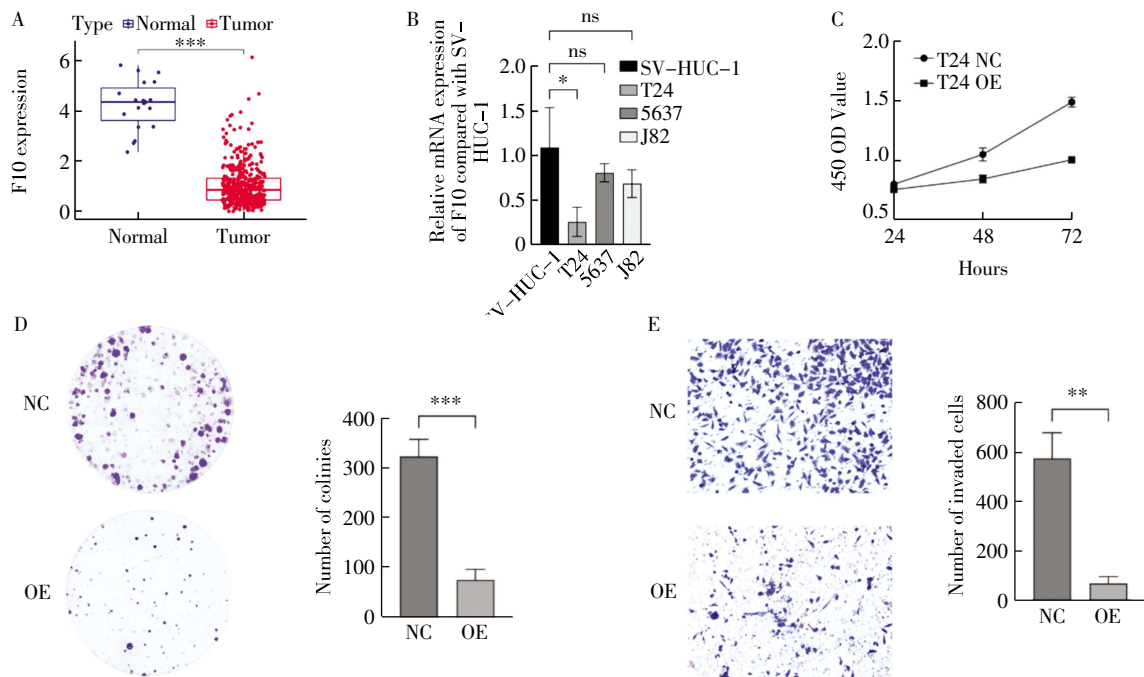
注: A: Dasatinib; B: Ribociclib; C: Staurosporine; D: Luminespib; E: Afatinib; F: Oxaliplatin; G: Gemcitabine; H: Paclitaxel

图6 预测膀胱癌患者高低失巢凋亡评分组的免疫治疗反应

Fig.6 Prediction of immunotherapy response in high- and low-ARG scores groups in bladder cancer patients

2.6 F10 对膀胱癌细胞增殖、分化、侵袭能力的影响 生物信息学分析显示,F10 在癌组织中呈低表达状态( $P<0.001$ ,图 7A)。qPCR 显示 F10 基因表达在 T24 膀胱癌细胞系中具有差异,于 T24 细胞系中呈低表达( $t=3.031$ , $P<0.05$ ,图 7B)。CCK-8 实验显示,OE-F10 组 24、48、72h 细胞活力低于 NC 组( $0.75 \pm$

$0.02$  比  $0.80 \pm 0.02$ ,  $0.85 \pm 0.03$  比  $1.05 \pm 0.06$ ,  $1.01 \pm 0.02$  比  $1.49 \pm 0.04$ ,  $t=2.578, 5.528, 19.25$ , 均  $P<0.001$ ,图 7C)。集落刺激实验及 transwell 实验显示,OE-F10 组侵袭、增殖能力低于 NC 组 ( $79.67 \pm 21.55$  比  $329.67 \pm 34.84$ ,  $69.67 \pm 28.54$  比  $575.33 \pm 104.08$ ;  $t=10.570$ ,  $P<0.001$ ;  $t=8.115$ ,  $P<0.005$ ,图 7D、7E)。



注: A: F10 于膀胱癌及正常组织比较; B: RT-qPCR 检测 F10 表达水平; C: CCK-8 检测细胞增殖; D: 克隆形成实验检测细胞增殖; E: Transwell 检测细胞侵袭;  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$

图7 F10 抑制 T24 细胞的增殖和侵袭

Fig.7 F10 inhibits the proliferation and invasion of T24 cells

### 3 讨论

膀胱癌被公认为是全世界最具侵袭性的肿瘤之一<sup>[14]</sup>。即使在最初被诊断为非肌层浸润性膀胱癌的患者中,5年内也有40%~50%复发,而在高危人群中高达80%<sup>[15]</sup>。肌层浸润性膀胱癌是一种更致命的形式,复发的几率和远处转移的风险更高<sup>[16]</sup>。一旦发生转移,膀胱癌患者能够被治愈的可能性就会进一步降低,5年的OS仅有6%<sup>[17]</sup>。作为生物体自身防御机制的一部分,一旦正常细胞脱离了细胞外基质,失巢凋亡的作用是防止这些细胞在不适合的地方种植和生长<sup>[18]</sup>。然而,研究发现,癌细胞可以通过各种途径产生失巢凋亡抗性,如分泌性生长因子激活途径、整合素表达模式的改变、活性氧对细胞因子受体的激活以及上皮-间充质转化<sup>[19]</sup>。失巢凋亡抵抗已成为癌细胞浸润和进展的标志。因此,膀胱癌作为高侵袭性癌症的代表,迫切需要发现更多预后标志物,从而为潜在的药物治疗奠定基础。

本研究构建了风险预后模型,其中的基因包括 *DNMT1*、*F10*、*FASN*、*PDGFRA*、*SATB1*、*MSLN*、*MYC*、*CALR* 和 *CSPG4*。*DNMT1* 是催化DNA甲基化的关键酶之一,可引起异常的高甲基化,导致肿瘤浸润和生长<sup>[20-21]</sup>。*DNMT* 还可促进上皮-间充质转化,诱导细胞自噬,并增强肿瘤干细胞的增殖,进而使肿瘤细胞可能发生失巢凋亡抗性<sup>[22]</sup>。*F10* 常见于妇科恶性肿瘤转移,具体作用机制可能是加速细胞外基质的降解,增强肿瘤细胞的侵袭性<sup>[23]</sup>。*FASN* 通过脂肪酸代谢合成途径参与骨肉瘤细胞的转移与生长,尤其在出现肺部转移时,肿瘤细胞出现失巢凋亡抗性<sup>[24]</sup>。*PDGFRA* 在结直肠癌细胞转移、血管生成、化疗抵抗中发挥了重要作用<sup>[25]</sup>。*Qi* 等<sup>[26]</sup>发现,*SATB1* 引起前列腺癌上皮-间充质转化,并加速肿瘤细胞的耐药性和转移。*MSLN* 则在超过70%的恶性肿瘤组织中表达。虽然没有发现 *MSLN* 的其他功能,但学者们认为其可能参与了细胞黏附的过程,最终诱发癌细胞的远处转移<sup>[27]</sup>。*MYC* 作为一个原癌基因,参与调控细胞生长、凋亡、代谢、肿瘤发生和其他生命活动<sup>[28]</sup>。研究人员发现 *MYC* 可能与 *ATF4* 的启动子区域结合,触发失巢凋亡抵抗、促进骨肉瘤细胞转移与浸润<sup>[29]</sup>。*Gao* 等<sup>[30]</sup>证明 *CALR* 可以诱导核因子- $\kappa$ B 信号通路,促进肺癌细胞增殖。*CSPG4* 参与了细胞黏附、运动和侵袭,在恶性细胞的快速浸润和转移中发挥了至关重要的作用<sup>[31]</sup>。

本研究根据获得的9个失巢凋亡相关基因建立了风险预后模型,将这些预后基因同肿瘤微环境相联系,发现肿瘤微环境对肿瘤细胞的发生、发展、

转移和治疗反应有巨大的影响。本研究分析了不同风险组中22种免疫细胞的比例,高风险组中巨噬细胞(M0和M2)和肥大细胞的比例较高,低风险组中CD8<sup>+</sup>T细胞的比例较高。免疫细胞浸润影响膀胱癌患者的OS,以往的研究发现,巨噬细胞是实体瘤免疫浸润的重要组成部分,伴随着恶化潜能,往往带来不良预后<sup>[33]</sup>。另外,也有证据表明,高CD8<sup>+</sup>T细胞浸润往往有更好的OS<sup>[34]</sup>。*Li* 等<sup>[35]</sup>证明,膀胱癌患者中CD8<sup>+</sup>T细胞高表达和M0巨噬细胞低表达与良好的临床预后相关。与本研究得到的结果一致。此外,构建预后模型的9个失巢凋亡相关基因中,*PDGFRA* 与巨噬细胞和肥大细胞呈正相关,表明 *PDGFRA* 可能在巨噬细胞相关的途径下促进肿瘤细胞的增殖。

研究证实,*F10* 基因不仅在葡萄胎、侵蚀性葡萄胎和绒毛膜癌中呈阳性表达,且在多种腺癌中表达阳性,包括卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、肝癌和胃癌等<sup>[36-37]</sup>。*A549* 肺癌细胞系中 *F10* 可通过上调 *BCL-2* 的表达增强肿瘤细胞在裸鼠体内的成瘤能力<sup>[38]</sup>,胶质瘤中 *F10* 启动子的高甲基化可增加肿瘤的侵袭性<sup>[39]</sup>。本研究中 *F10* 在膀胱癌细胞中表达下调,过表达 *F10* 的膀胱癌细胞的增殖及侵袭能力显著受到抑制,提示 *F10* 可能对膀胱癌的发生、发展起重要作用。

综上所述,本研究在膀胱癌患者中发现了新的失巢凋亡靶点。这些靶点可以作为治疗靶点,改善患者的生存结果。构建预后风险模型,将风险评分与肿瘤微环境结合起来,可评估膀胱癌患者的免疫状态和免疫治疗反应,有助于了解失巢凋亡相关基因的潜在病理机制,为膀胱癌患者的治疗方案带来新的选择。

#### 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): 209-249.
- [2] BERDIK C. Unlocking bladder cancer[J]. Nature, 2017, 551(7679): S34-S35.
- [3] CUMBERBATCH MGK, JUBBER I, BLACK P C, et al. Epidemiology of bladder cancer: a systematic review and contemporary update of risk factors in 2018[J]. Eur Urol, 2018, 74(6): 784-795.
- [4] LENIS A T, LEC P M, CHAMIE K, et al. Bladder cancer: a review [J]. JAMA, 2020, 324(19): 1980.
- [5] PATEL V G, OH W K, GALSKEY M D. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(5): 404-423.
- [6] WITJES J A, BRUINS H M, CATHOMAS R, et al. European association of urology guidelines on muscle-invasive and metastatic



- bladder cancer: summary of the 2020 guidelines[J]. *Eur Urol*, 2021, 79(1): 82–104.
- [7] CHIARUGI P, GIANNONI E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11): 1352–1364.
- [8] FRISCH S M, RUOSLAHTI E. Integrins and anoikis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(5): 701–706.
- [9] PAOLI P, GIANNONI E, CHIARUGI P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3481–3498.
- [10] ADESHAKIN F O, ADESHAKIN A O, AFOLABI L O, et al. Mechanisms for modulating anoikis resistance in cancer and the relevance of metabolic reprogramming[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 626 577.
- [11] HAN H JUN, SUNG J Y, KIM S H, et al. Fibronectin regulates anoikis resistance via cell aggregate formation[J]. *Cancer Lett*, 2021, 508: 59–72.
- [12] REBHAN M, CHALIFA-CASPI V, PRILUSKY J, et al. GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases[J]. *Trends Genet*, 1997, 13(4): 163.
- [13] ROUILLARD A D, GUNDERSEN G W, FERNANDEZ N F, et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins[J]. *Database*, 2016, 2016: baw100.
- [14] BROOKS N A, O'DONNELL M A. Combination intravesical therapy[J]. *Urol Clin North Am*, 2020, 47(1): 83–91.
- [15] JIANG D M, GUPTA S, KITCHLU A, et al. Defining cisplatin eligibility in patients with muscle-invasive bladder cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2021, 18(2): 104–114.
- [16] LIU D, QIU X, XIONG X, et al. Current updates on the role of reactive oxygen species in bladder cancer pathogenesis and therapeutics[J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(10): 1687–1697.
- [17] PAOLI P, GIANNONI E, CHIARUGI P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3481–3498.
- [18] SU H, SI X Y, TANG W R, et al. The regulation of anoikis in tumor invasion and metastasis: the regulation of anoikis in tumor invasion and metastasis[J]. *Yi Chuan*, 2013, 35(1): 10–16.
- [19] ANTONI S, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends[J]. *Eur Urol*, 2017, 71(1): 96–108.
- [20] WONG K K. DNMT1 as a therapeutic target in pancreatic cancer: mechanisms and clinical implications[J]. *Cell Oncol*, 2020, 43(5): 779–792.
- [21] LIU H, SONG Y, QIU H, et al. Downregulation of FOXO3a by DNMT1 promotes breast cancer stem cell properties and tumorigenesis[J]. *Cell Death Different*, 2020, 27(3): 966–983.
- [22] WONG K K. DNMT1: a key drug target in triple-negative breast cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 72: 198–213.
- [23] 张梦竹, 庞战军. F10 基因在宫颈癌组织中的表达[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(6): 792–796.
- [24] SUN T, ZHONG X, SONG H, et al. Anoikis resistant mediated by FASN promoted growth and metastasis of osteosarcoma[J]. *Cell Death Disease*, 2019, 10(4): 298.
- [25] KIM T W, HONG H K, LEE C, et al. The role of PDGFRA as a therapeutic target in young colorectal cancer patients[J]. *J Translat Med*, 2021, 19(1): 446.
- [26] QI H, FU X, LI Y, et al. SATB1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in prostate cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2577–2582.
- [27] RAMÍREZ-SALAZAR E G, SALINAS-SILVA L C, VÁZQUEZ-MANRÍQUEZ M E, et al. Analysis of microRNA expression signatures in malignant pleural mesothelioma, pleural inflammation, and atypical mesothelial hyperplasia reveals common predictive tumorigenesis-related targets[J]. *Exper Mol Pathol*, 2014, 97(3): 375–385.
- [28] LIU Y, ZHU C, TANG L, et al. MYC dysfunction modulates stemness and tumorigenesis in breast cancer[J]. *Internat J Biol Sci*, 2021, 17(1): 178–187.
- [29] MO H, GUAN J, MO L, et al. ATF4 regulated by MYC has an important function in anoikis resistance in human osteosarcoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 3658–3666.
- [30] GAO F, MU X, WU H, et al. Calreticulin(CALR)-induced activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway boosts lung cancer cell proliferation[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 6856–6865.
- [31] WANG X, WANG Y, YU L, et al. CSPG4 in cancer: multiple roles[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(4): 419–429.
- [32] XIAO Y, YU D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 221: 107753.
- [33] RUBIO C, MUNERA-MARAVILLA E, LODEWIJK I, et al. Macrophage polarization as a novel weapon in conditioning tumor microenvironment for bladder cancer: can we turn demons into gods?[J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 21(4): 391–403.
- [34] CHEN Z, LIU G, LIU G, et al. Defining muscle-invasive bladder cancer immunotypes by introducing tumor mutation burden, CD8<sup>+</sup> T cells, and molecular subtypes[J]. *Hereditas*, 2021, 158(1): 1.
- [35] 李炜, 曾静媛, 罗波, 等. 膀胱癌患者高表达活化的 CD4<sup>+</sup> 记忆性 T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞和低表达 M0 巨噬细胞与临床预后佳有关[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(2): 97–103.
- [36] 周瑾, 陈士岭, 邢福祺, 等. 葡萄胎发病新基因 F10 与滋养细胞肿瘤侵袭相关性研究[J]. *南方医科大学学报*, 2005, 25(2): 171–173.
- [37] 周瑾, 梁卫华, 李冰, 等. 葡萄胎发病新基因 F10 在不同肿瘤组织的表达[J]. *广东医学*, 2005, 26(5): 596–597.
- [38] SONG Y L, ZHANG G, PANG Z J, et al. Effects of gene F10 overexpression on the tumorigenicity of A549 cells[J]. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2012, 37: 676–680.
- [39] LIU X, TANG H, WANG Z, et al. F10 gene hypomethylation, a putative biomarker for glioma prognosis[J]. *J Neurooncol*, 2012, 107(3): 479–485.

(2023-07-17 收稿)