

• 论 著 •

膀胱尿路上皮癌中 KDM6A 突变与预后和免疫微环境的分析*

王咸钟, 王 忠, 何大鹏[△], 孙祖刚, 谢习颂, 安文亚, 赖亚明, 辜福贤, 唐 宏

(广元市中心医院泌尿外科, 四川 广元 628000)

[摘要] **目的** 通过生物信息学分析结合临床样本检测, 寻找膀胱尿路上皮癌(BLCA)中关键基因的突变和机制探讨。**方法** 下载 TCGA(406 例肿瘤组织和 19 例癌旁组织)和 GTEx(21 例癌旁组织)数据库中全部 BLCA 病例数据集的基因突变数据、转录组数据和临床数据。收集 BLCA 手术临床样本共 32 例, 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测基因表达。**结果** 91.42% 的患者存在突变, 其中错义突变、单核苷酸变异和 C>T 突变为主要突变类型, 突变排在前 5 位的基因分别为 TP53(47%)、TTN(45%)、KMT2D(29%)、MUC16(28%)、KDM6A(26%)。TCGA 和临床样本中, KDM6A 突变型表达水平均显著高于野生型($P=0.008, 0.007$)。KDM6A 野生型的总体生存期(OS)和无进展生存期(PFS)均大于突变型($P=0.028, 0.035$)。进一步研究发现, KDM6A 的表达与 CD8⁺T 细胞($r=0.22, P=0.039$)、巨噬细胞($r=0.31, P=0.032$)和内皮细胞($r=0.26, P=0.002$)水平均呈显著正相关。**结论** BLCA 中 KDM6A 的突变与预后和免疫微环境密切相关, KDM6A 突变可能是 BLCA 的潜在治疗靶标。

[关键词] 膀胱尿路上皮癌; 突变; KDM6A; 生存分析; 免疫微环境

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.20.002

中图法分类号:R735.7

文章编号:1009-5519(2024)20-3426-06

文献标识码:A

Analysis of KDM6A mutation, prognosis and immune microenvironment
in bladder urothelial carcinoma*

WANG Xianzhong, WANG Zhong, HE Dapeng[△], SUN Zugang, XIE Xisong,

AN Wenya, LAI Yaming, GU Fuxian, TANG Hong

(Department of Urology, Guangyuan Central Hospital, Guangyuan, Sichuan 628000, China)

[Abstract] **Objective** To identify key gene mutations and explore their mechanisms in bladder urothelial carcinoma(BLCA) through bioinformatics analysis combined with clinical sample testing. **Methods** Gene mutation data, transcriptome data, and clinical data for all BLCA cases were downloaded from the TCGA database(406 tumor tissues and 19 adjacent non-cancer tissues) and GTEx database(21 adjacent non-cancer tissues). A total of 32 clinical samples from BLCA surgeries were collected, and gene expression was measured using real-time quantitative polymerase chain reaction(PCR). **Results** Mutations were found in 91.42% of the patients, with missense mutations, single nucleotide variants, and C>T transitions being the predominant types. The top five mutated genes were TP53(47%), TTN(45%), KMT2D(29%), MUC16(28%), and KDM6A(26%). In both TCGA and clinical samples, the expression levels of mutant KDM6A were significantly higher than those of the wild type($P=0.008, 0.007$). The patients with wild-type KDM6A had a longer overall survival(OS) and progression-free survival(PFS) than those with the mutation($P=0.028, 0.035$). Further studies revealed that the expression of KDM6A was significantly positively correlated with the levels of CD8⁺T cells($r=0.22, P=0.039$), macrophages($r=0.31, P=0.032$), and endothelial cells($r=0.26, P=0.002$). **Conclusion** Mutations in KDM6A are closely associated with prognosis and the immune microenvironment in BLCA, suggesting that KDM6A mutations may serve as potential therapeutic targets for BLCA.

[Key words] Bladder Urothelial Carcinoma; Mutation; KDM6A; Survival analysis; Immune mi-

* 基金项目:2020 年度广元市市级科技项目(20ZDYF0021)。

作者简介:王咸钟(1983—), 硕士研究生, 主治医师, 主要从事泌尿外科工作。 [△] 通信作者, E-mail:519057713@qq.com。

膀胱尿路上皮癌(BLCA)是最常见的泌尿系统恶性肿瘤^[1]。根据最新的流行病学数据显示,BLCA 在我国的发生率为 6.61/10 万,男性高于女性^[2]。2020 年,全球报告了 573 278 例新增病例和 212 536 例相关死亡病例^[3]。此外,一旦癌细胞出现转移,BLCA 患者的 5 年生存率仅为 12%^[4]。因此寻找关键标志物和靶点对于 BLCA 的早期诊断和治疗具有重要意义。

基因突变与肿瘤的发生密切相关^[5]。然而,学术界对产生这些突变的生物学过程的认识有限。但是由于独立研究中个体差异及样本量较少,结果通常存在不确定性。但是生物信息学方法成为解决这些缺陷的创新方法^[6]。本研究通过生物信息学分析,并结合临床手术样本试验检测,筛选 BLCA 中关键基因的突变与预后,以及与免疫微环境的关系。本研究对了解 BLCA 的发病机制、预防和治疗有潜在意义。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 数据收集 下载 TCGA 数据库(portal.gdc.cancer.gov/)中全部 406 例肿瘤组织和 19 例癌旁组织样本信息,以及 GTEx 数据库中的 21 例癌旁组织样本信息,所有数据均为人源,基因表达采用 R4.1.1 软件的 wilcox-tests 法分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.1.2 病例样本 病例组织样本来源于 2022—2023 年在广元市中心医院确诊为 BLCA 的患者。所有患者经影像学检查、血液检查和病理学检查明确诊断为 BLCA,共 32 例病例。所有患者均知情同意。

1.1.3 试剂 提取组织 RNA 采用 Trizol 试剂,BCA Protein Assay 试剂盒购自 Takara 公司。FastKing 一步法反转录荧光定量试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 体细胞基因突变景观分析 采用 R4.1.1 软件中的 maftools 软件包可视化 BLCA 患者的体细胞突变信息^[7],生成体细胞突变景观图。突变景观图中显示了每个样品中每个基因的突变信息,其中基因按突变频率排序,样本按疾病组织学排序,侧栏显示了 MutSigCV 估计的 $\log_{10}$ 转换 Q 值。免疫评分采用 TIMER 法分析,使用 R4.1.1 软件中的 Immunedeconv 软件包。

1.2.2 生存分析 生存分析指标为总体生存期(OS)、无进展生存期(PFS),log rank 用于检验

Kaplan-Meier 生存分析比较 2 组之间的生存差异^[8], $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR) 采用 Trizol 法提取癌组织和癌旁组织总 RNA,采用 Fast-King 一步法反转录荧光定量试剂盒检测癌组织和癌旁组织 KDM6A 的表达。内参为 β -actin。KDM6A 引物,正向:5'-TTCCTCGGAAGGTGCTATTCA-3',反向:5'-GAGGCTGGTTGCAGGATTCA-3'; β -actin 引物,正向:5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3',反向:5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'。

1.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot) 提取组织总蛋白并定量后,将蛋白样品添加到样品孔中,通过 5%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。使用脱脂奶粉常温封闭 1 h。将膜与一抗 4℃ 孵育 12 h,然后与辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育 1 h。将增强化学发光法(ECL)发光液体 A 和 B 按 1:1 混合并滴到薄膜上。使用凝胶成像仪观察蛋白条带。 β -actin 被用作参考蛋白。

1.3 统计学处理 应用 SPSS27.0 软件和 R4.1.1 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用参数检验。采用 R4.1.1 软件 Immunedeconv 进行免疫评分评估,采用 Spearman 分析对免疫评分和表达量数据进行相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

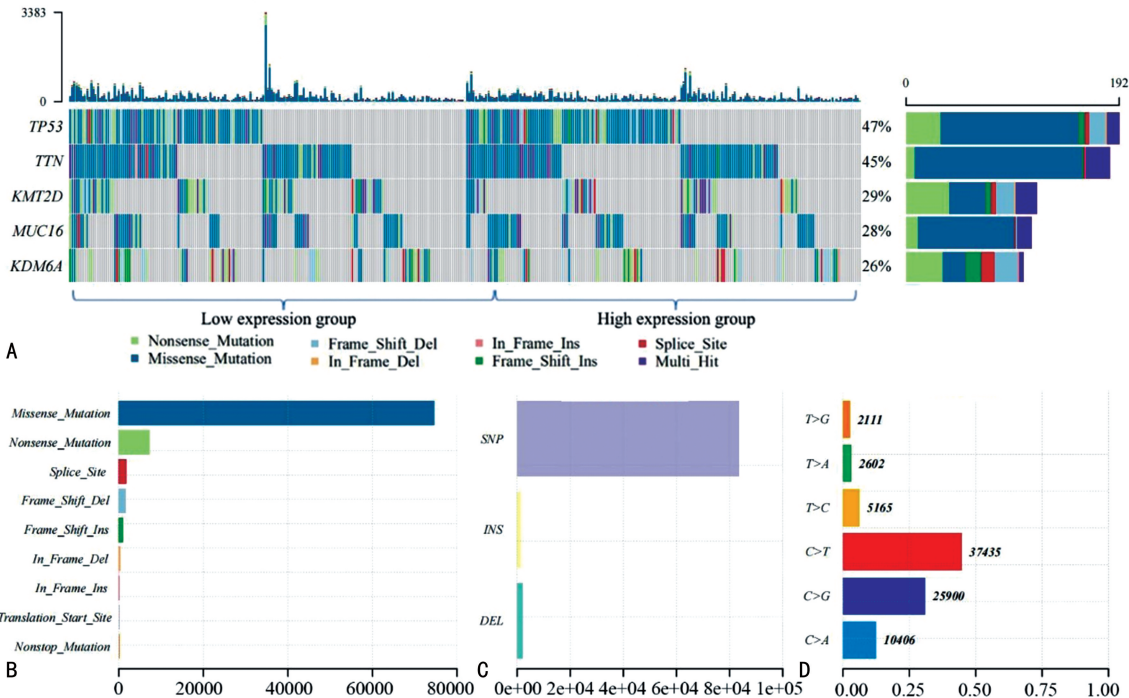
2 结果

2.1 BLCA 队列的体细胞突变 基因按突变频率排序。91.42% 的患者存在突变(图 1A),其中错义突变(图 2B)、单核苷酸变异(图 2C)和 C>T 突变(图 2D)为主要突变类型,突变排在前 5 位的基因分别为 TP53(47%)、TTN(45%)、KMT2D(29%)、MUC16(28%)、KDM6A(26%)。

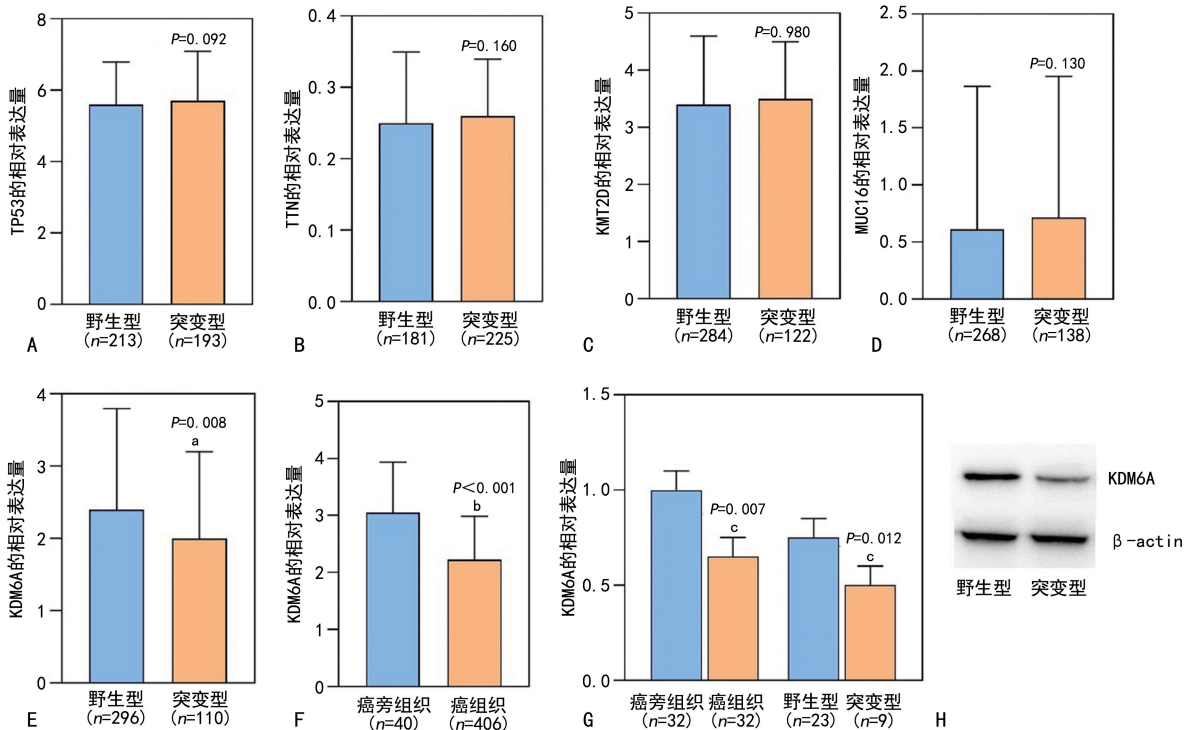
2.2 突变基因的表达情况 表达分析结果显示,TP53、TTN、KMT2D、MUC16 的野生型和突变型差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 2A~D。KDM6A 野生型表达高于突变型,且癌旁组织的 KDM6A 表达高于癌组织(图 2E、F)。为了进一步验证以上结果,通过直接测序法进行 SNP 分析,32 例 BLCA 手术样本中 23 例为野生型,9 例为突变型,突变率为 28.16%。癌组织中 KDM6A 表达低于癌旁组织($P=0.007$),KDM6A 突变型表达显著低于野生型($P=0.012$),见图 2G、H。

2.3 KDM6A 突变与预后 TVGA 数据库中的 406 例患者的表达和生存数据显示,KDM6A 野生型的

OS 和 PFS 均大于突变型,差异有统计学意义($HR = 1.532, 3.485, P = 0.028, 0.035$)。见图 3。



A. BLCA 前 5 位突变基因及突变谱;B. 突变种类;C. 突变类型;D. 单核苷酸变异分类。
图 1 BLCA 的体细胞突变图

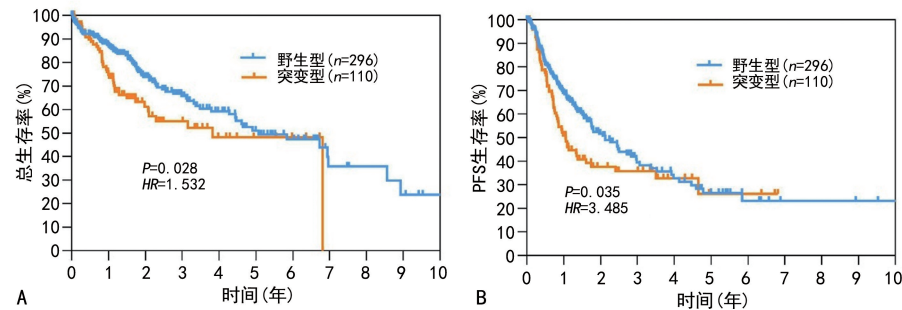


注:A~F 为 TCGA 中 TP53、TTN、KMT2D、MUC16 和 KDM6A 的表达;G. 临床样本中 KDM6A 的基因表达;H. 临床样本中 KDM6A 的蛋白表达;a、b、c 为有统计学差异。

图 2 突变基因的表达分析

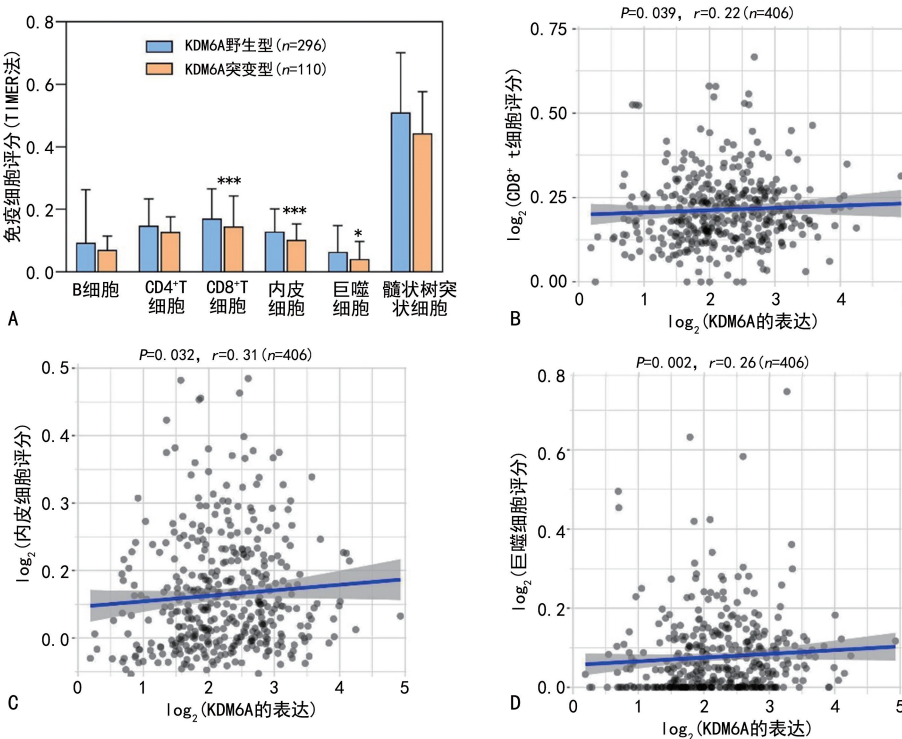
2.4 KDM6A 突变与免疫微环境相关性 在 TCGA 中,相对于野生型,突变型的 CD8⁺T 细胞、巨噬细胞和内皮细胞水平降低。进一步分析发现,KDM6A 的

表达与 CD8⁺T 细胞、巨噬细胞和内皮细胞水平均呈正相关($r = 0.22, 0.31, 0.26, P = 0.039, 0.032, 0.002$),见图 4A~D。



注:A. OS 率;B. PFS 率。

图 3 KDM6A 突变型与野生型的生存分析



注:A. BLCA 组织中 KDM6A 野生型和突变型的免疫细胞评分;B~D. KDM6A 的表达与 CD8⁺ T 细胞、巨噬细胞和内皮细胞的相关性。

图 4 KDM6A 突变与免疫微环境相关性

3 讨 论

关于 BLCA 的形成和发展研究越来越多。然而,肿瘤的发生分子机制是一个复杂的过程,很难全面了解 BLCA 的遗传因素。本研究整合了 TCGA 和 GTEx 中所有 BLCA 的数据集,使用生物信息学方法分析了这些数据集,并通过收集手术临床样本进行了验证,筛选出了最重要的突变基因 KDM6A,并分析了其突变与生存的关系。

组蛋白的翻译后修饰被认为是调控基因转录的重要机制。组蛋白异常修饰在多种疾病的发病机制中有着广泛意义,已被证明是潜在的诊断生物标志物或治疗靶点。KDM6A 也称为 X 染色体上的泛转录四三肽重复序列,属于 JmjC 结构域中的一个家族,该家族含有介导 H3K27me2/3 去甲基化的酶,因此导致转录激活^[9]。KDM6A 在胚胎发育过程中起着重要作用,以往研究表明,KDM6A 的新发突变与 Kabu-

ki 综合征相关^[10]。尽管 KDM6A 突变已在多种癌症中被鉴定,但突变的频率非常不同。KDM6A 是否抑制或促进肿瘤发生和发展取决于癌症类型及其相互作用的转录因子。例如,KDM6A 是 T 细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)的肿瘤抑制因子,但由 TAL-bHLH 转录因子 1(TAL1)驱动的 T-ALL 除外^[11]。KDM6A 已被证明在体外抑制 BLCA 细胞增殖和锚定非依赖性生长,并且 KDM6A 的尿路上皮特异性缺失增加了体内雌性小鼠的 BLCA 风险^[12]。本研究中,在生物信息学分析和临床样本验证中均发现 BLCA 的 KDM6A 突变型表达低于野生型,说明 BLCA 的发生发展与 KDM6A 突变密切相关。本研究证实了 BLCA 中 KDM6A 突变状态患者预后的关系。KDM6A 野生型的 OS 和 PFS 均大于突变型,说明 KDM6A 突变型的低表达是 BLCA 的重要预后生物标志物。KDM6A 已被证明通过去甲基酶依赖性

和去甲基酶非依赖性机制调节基因转录。有研究表明, KDM6A 在膀胱癌细胞中作为组蛋白甲基转移酶反式激活 ARHGDI B 启动子^[13]。

肿瘤免疫逃逸是指肿瘤细胞通过多种机制逃避机体免疫系统识别和攻击, 从而得以在体内生存和增殖。T 细胞活性的抑制在肿瘤免疫逃逸中起着重要作用^[14-16]。巨噬细胞, 尤其是巨噬细胞的 M2 亚群, 被认为是促进肿瘤细胞生长和诱导肿瘤免疫抑制的最重要的免疫细胞^[17-19]。肿瘤微环境(TME)是一个由肿瘤细胞、免疫细胞、基质细胞和细胞因子组成的复杂系统^[20]。免疫抑制性 TME 是癌症免疫治疗成功的关键障碍, 而重塑 TME 已成为免疫治疗的关键因素。肿瘤组织中免疫检查点分子的失调可抑制 T 细胞的活化和增殖, 导致免疫抑制性 TME 的形成, 使肿瘤细胞逃避机体免疫监测和杀伤^[21-22]。有研究发现, 胰腺癌细胞中 KDM6A 的缺失能够通过上调募集中性粒细胞的趋化因子 CXCL1, 增加中性粒细胞在肿瘤中的浸润, 从而影响免疫微环境^[23]。还有研究发现, 在 BLCA 中, KDM6A 突变抑制了细胞黏附分子、ECM 受体相互作用和黏着斑痣的信号通路。KDM6A 缺失可激活趋化因子和细胞因子途径, 增加 M2 巨噬细胞极化, 增加肿瘤干细胞丰度^[24]。本研究揭示了 KDM6A 在 BLCA 免疫微环境的调节中起关键作用, 为研究调节抗肿瘤免疫反应的潜在机制提供了新的视角, 这可能有助于开发新的治疗策略, 需要进一步的研究来阐明详细的潜在机制。

本研究从生物信息学和临床样本层面筛选出了 BLCA 中重要的突变基因 KDM6A, 并对 KDM6A 的突变与生存和免疫微环境的关联进行了研究, 但仍存在一些局限性。首先, 需要更多的临床样本来对 KDM6A 突变与免疫微环境的关系进行验证。其次, BLCA 的动物和细胞模型可以更进一步地对调控机制进行深层次探讨。

综上所述, 本研究发现了 BLCA 中 KDM6A 突变和生存密切相关, KDM6A 突变和免疫微环境密切相关。这些研究可以大大提高对 BLCA 的原因和潜在分子机制的理解, 相关的信号通路可能是 BLCA 的治疗靶标。

参考文献

[1] KNOWLES M, DYRSKJOT L, HEATH E I, et al. Metastatic urothelial carcinoma[J]. Cancer Cell, 2021, 39(5):583-585.

[2] SHI Z D, HAO L, HAN X X, et al. Targeting HNRNPU to overcome cisplatin resistance in bladder cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1):37.

[3] HYUNA S, JACQUES F, REBECCA L S, 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.

[4] POWLES T, PARK S H, CASERTA C, et al. Avelumab First-Line maintenance for advanced urothelial carcinoma: results from the JAVELIN bladder 100 trial aft. r ≥2 years of follow-up[J]. J Clin Oncol, 2023, 41(19):3486-3492.

[5] MITTAL P, ROBERTS C W M. The SWI/SNF complex in cancer-biology, biomarkers and therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(7):435-448.

[6] SANTESMASSES D, MARIOTTI M, GLADY-SHEV V N. Bioinformatics of selenoproteins[J]. Antioxid Redox Signal, 2020, 33(7):525-536.

[7] WANG H, YAN C, YE H. Overexpression of MUC16 predicts favourable prognosis in MUC16-mutant cervical cancer related to immune response[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(2):1725-1733.

[8] ZHANG Z D, LIN E Y, ZHUANG H K, et al. Construction of a novel gene-based model for prognosis prediction of clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20:27.

[9] DUPLAQUET L, LI Y X, BOOKER M A, et al. KDM6A epigenetically regulates subtype plasticity in small cell lung cancer[J]. Nat Cell Biol, 2023, 25(9):1346-1358.

[10] TRAN N, BROUN A, GE K. Lysine demethylase KDM6A in differentiation, development, and cancer[J]. Mol Cell Biol, 2020, 40(20):e00341-20.

[11] BENYUCEF A, PALII C G, WANG C C, et al. UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Genes Dev, 2016, 30(5):508-521.

[12] KANEKO S, LI X. X chromosome protects against bladder cancer in females via a KDM6A-dependent epigenetic mechanism[J]. Sci Adv, 2018, 4(6):eaar5598.

[13] LIU L, CUI J F, ZHAO Y J, et al. KDM6A-ARHGDI B axis blocks metastasis of bladder

cancer by inhibiting Rac1 [J]. Mol Cancer, 2021,20(1):77.

[14] GUILLEREY C. NK cells in the tumor microenvironment[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1273:69-90.

[15] ARNETH B. Tumor microenvironment [J]. Medicina(Kaunas),2019,56(1):15.

[16] BECKER P S A,SUCK G,NOWAKOWSKA P,et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy[J]. Cancer Immunol Immunother, 2016, 65 (4): 477-484.

[17] MANTOVANI A,SOZZANI S,LOCATI M,et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes[J]. Trends Immunol, 2002,23(11):549-555.

[18] LI X L,LIU R,SU X,et al. Harnessing tumor-associated macrophages as aids for cancer immunotherapy [J]. Mol Cancer, 2019, 18 (1): 177.

[19] WU T,DAI Y. Tumor microenvironment and therapeutic response [J]. Cancer Lett, 2017, 387:61-68.

[20] ELHANANI O,BEN-URI R,KEREN L. Spatial profiling technologies illuminate the tumor microenvironment [J]. Cancer Cell, 2023, 41 (3):404-420.

[21] STURM G,FINOTELLO F,PETITPREZ F, et al. Comprehensive evaluation of transcriptome-based cell-type quantification methods for immuno-oncology[J]. Bioinformatics,2019, 35(14):i436-i445.

[22] LI B,SEVERSON E,PIGNON J C,et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy[J]. Genome Biol,2016,17(1):174.

[23] YANG J,JIN L,KIM H S,et al. KDM6A loss recruits tumor-associated neutrophils and promotes neutrophil extracellular trap formation in pancreatic cancer [J]. Cancer Res, 2022, 82 (22):4247-4260.

[24] CHEN X X,LIN X H,PANG G F,et al. Significance of KDM6A mutation in bladder cancer immune escape[J]. BMC Cancer,2021,21(1): 635.

(收稿日期:2023-11-26 修回日期:2024-02-23)

(上接第 3425 页)

[31] NIEBLAS-BEDOLLA E,NAYYAR N,SINGH M, et al. Emerging immunotherapies in the treatment of brain metastases[J]. Oncologist, 2021,26(3):231-241.

[32] OSER M G,MACPHERSON D,OLIVER T G,et al. Genetically-engineered mouse models of small cell lung cancer: the next generation [J]. Oncogene,2024,43(7):457-469.

[33] TAYLOR M A,HUGHES A M,WALTON J, et al. Longitudinal immune characterization of syngeneic tumor models to enable model selection for immune oncology drug discovery[J]. J Immunother Cancer,2019,7(1):328.

[34] BEANE J E,MAZZILLI S A,CAMPBELL J D,et al. Molecular subtyping reveals immune alterations associated with progression of bronchial premalignant lesions[J]. Nat Commun,2019,10(1):1856.

[35] MERVAI Z,EGEDI K,KOVALSZKY I,et al. Diethylnitrosamine induces lung adenocarcinoma in FVB/N mouse[J]. BMC Cancer,2018,18 (1):157.

[36] BOIRE A,BRASTIANOS P K,GARZIA L,et al. Brain metastasis[J]. Nat Rev Cancer,2020, 20(1):4-11.

[37] SUH J H,KOTECHA R,CHAO S T, et al. Current approaches to the management of brain metastases [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020,17(5):279-299.

[38] PHADKE M,OZGUN A,EROGLU Z, et al. Melanoma brain metastases: biological basis and novel therapeutic strategies[J]. Exp Dermatol,2022,31(1):31-42.

[39] DORON H,AMER M,ERSHAID N,et al. Inflammatory activation of astrocytes facilitates melanoma brain tropism via the CXCL10-CXCR3 signaling axis[J]. Cell Rep,2019,28(7): 1785-1798.

(收稿日期:2024-03-19 修回日期:2024-07-17)