

PDLIM2 对前列腺癌预后影响的生物信息学分析

朴松哲 郑兰 王鑫 何浩辉 柯莽

【摘要】目的 应用生物信息学技术分析 PDLIM2 对前列腺癌(PCa)预后的影响,并深度挖掘其基因功能。**方法** 利用 UCSC Xena 数据库下载癌症基因组图谱 PCa 数据,分析并验证 PCa 组织与癌旁正常组织中 PDLIM2 表达差异,比较 PDLIM 高、低表达组患者总生存期(OS)和无进展生存期(PFS)。利用 Linked Omics 数据库对 PDLIM2 共表达基因进行基因本体富集分析,利用相关数据库基因模块分析 PDLIM2 与肿瘤免疫细胞浸润程度、肿瘤突变负荷(TMB)、微卫星不稳定性(MSI)、免疫检查点(ICP)基因表达及肿瘤干性评分的相关性。**结果** 与癌旁正常组织相比,PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平较低($P<0.05$),而 PDLIM2 启动子区域甲基化水平较高($P<0.05$);且 PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平与 Gleason 评分、分子分型均有关(均 $P<0.05$)。生存分析显示,PDLIM2 高表达者 PFS 明显短于 PDLIM2 低表达者($P<0.05$);而 PDLIM2 高、低表达者 OS 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。PDLIM2 mRNA 表达与 TSPAN4、LGALS1、GAS6、GYPC、LYL1 等 12 198 个基因均呈正相关(均 $P<0.05$),与 SMARCC1、HOOK1、ZNF24、DNAJC16、FOXA1 等 7 852 个基因均呈负相关(均 $P<0.05$)。与 PDLIM2 相关的基因主要富集在胶原代谢过程、整合素介导的信号通路、体液免疫反应、白细胞迁移、IFN- γ 产生、急性炎症反应、血管生成等生物学过程。PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平与肿瘤免疫细胞浸润程度、TMB、MSI、38 个 ICP 基因表达及肿瘤干性评分均呈正相关(均 $P<0.05$)。**结论** PDLIM2 可能成为评估 PCa 预后的生物学标志物和肿瘤免疫治疗的新靶点。

【关键词】 PDLIM2 前列腺癌 生物信息学 免疫浸润

Bioinformatic analysis of PDLIM2 expression on prognosis of prostate cancer

PIAO Songzhe, ZHENG Lan, WANG Xin, HE Haohui, KE Mang

First-author's address: Department of Urology, Taizhou Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Taizhou 317000, China

Corresponding author: KE Mang, E-mail: kem@enzemed.com

【Abstract】Objective To analyze the correlation between PDLIM2 expression and prognosis in prostate cancer(PCa) based on bioinformatics, and to explore their functions. **Methods** The RNA-seq data for PCa was downloaded from UCSC Xena database. The PDLIM2 mRNA expression levels were assessed in PCa cancer and adjacent normal tissues. The overall survival(OS) and progress free survival(PFS) were compared between PCa patients with high and low PDLIM2 expression. Gene ontology enrichment analysis of genes coexpressed with PDLIM2 was conducted via Linked Omics. Meanwhile, the correlations between PDLIM2 expression and immune cell infiltration patterns, tumor mutation burden(TMB), microsatellite instability(MSI), immune checkpoint(ICP) molecules, and tumor stemness were explored. **Results** PDLIM2 mRNA expression was downregulated in PCa tissues compared with the adjacent normal tissues($P<0.05$). Higher PDLIM2 promoter methylation levels in PCa were observed compared to the adjacent normal tissues($P<0.05$). Increased PDLIM2 mRNA expression correlated with high Gleason score and molecular subtypes of PCa. The PFS was significantly shorter in PCa patients with PDLIM2-high expression than in patients with PDLIM2-low expression($P<0.05$). However, there was no statistically difference in OS($P>0.05$). The results showed that PDLIM2 mRNA expression was positively correlated with 12 198 genes(such as TSPAN4, LGALS1, GAS6, GYPC, LYL1, et al.) and negatively correlated with 7 852 genes(such as SMARCC1, HOOK1, ZNF24, DNAJC16, FOXA1, et al.). Gene functional enrichment analyses of biological process showed that collagen metabolic process,

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2022.44.9.2021-3887

基金项目:吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20170469KJ)

作者单位:317000 温州医科大学附属台州医院泌尿外科(朴松哲、王鑫、何浩辉、柯莽,朴松哲原在延边大学附属医院泌尿外科工作),妇产科(郑兰)

通信作者:柯莽, E-mail: kem@enzemed.com

humoral immune response, leukocyte migration, acute inflammatory response, regulation of cell activation, interferon- γ production, and angiogenesis were significantly enriched. The analysis on PDLIM2 functions in PCa suggested that the expression level of PDLIM2 mRNA was correlated with immune cells infiltration, TMB, MSI, ICP genes, and the tumor stemness in PCa tissues. **Conclusion** PDLIM2 may be a biomarker for evaluating the prognosis of PCa and a new target for tumor immunotherapy.

【Key words】 PDLIM2 Prostate cancer Bioinformatics Immune infiltration

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性常见的恶性肿瘤之一。据 2021 年全球统计数据报告,PCa 发病率居男性恶性肿瘤的第一位^[1]。尽管 PCa 早期患者的治愈率有所提高,但转移或复发 PCa,特别是去势抵抗性 PCa(castration resistant prostate cancer, CRPC)患者的预后仍较差。目前,免疫疗法在癌症治疗中被广泛应用。研究发现,PCa 的肿瘤微环境表现为免疫抑制,因此免疫疗法在转移性 PCa 中的临床获益有限^[2]。除派姆单抗被美国 FDA 批准用于高微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)和高肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)晚期实体瘤治疗外,Sipuleucel-T 疗法仍是美国 FDA 批准的唯一用于转移性 PCa 的免疫疗法。因此,探索一种能预测肿瘤免疫治疗反应性的生物标志物和新的免疫治疗靶点是该领域的研究热点。PDLIM2 基因位于人 8 号染色体(8p21.2)上,是辅肌动蛋白相关 LIM 蛋白超家族成员之一,参与细胞增殖、细胞迁移、细胞极化、细胞间连接的调节以及上皮间质转化、免疫细胞识别等过程^[3]。近来研究发现,PDLIM2 参与免疫调节过程,在肿瘤发生、发展过程中起重要作用^[4]。相关研究报道,下调 PDLIM2 表达能明显抑制 CRPC 样癌细胞生长和侵袭能力^[4-6]。然而,目前关于 PDLIM2 在 PCa 中的表达及其与临床病理特征、预后的关系尚不清楚。因此,本文利用生物信息学技术分析 PDLIM2 对 PCa 预后的影响,并深度挖掘其基因功能,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 数据获取 利用 UCSC Xena 数据库(<http://www.xenabrowser.net>)下载癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)PCa 的 3 级 RNA 序列数据、突变数据、临床病理参数和生存期数据。

1.2 表达差异分析 利用 R 软件(V4.0.3)limma、ggplot2 程序包分析 PCa 组织与癌旁正常组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平的差异。

1.3 表达验证 利用 UALCAN 数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/>)中的 TCGA 模块比较 PCa 组织与癌旁正

常组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平及其启动子区域甲基化水平,并进一步根据患者 Gleason 评分、分子亚型进行分层分析。TCGA 将 PCa 分为 7 个分子亚型,包括 ERG 融合、ETV1 融合、ETV4 融合、FLI1 融合、SPOP 突变、FOXA1 突变、IDH1 突变。利用 HPA 数据库(<https://www.proteinatlas.org>)比较不同级别 PCa 组织中 PDLIM2 蛋白表达水平的差异,分析 PDLIM2 在细胞内的定位。

1.4 生存分析 对 TCGA 的 PCa RNA-seq 数据进行单因素 Cox 回归分析,比较 PDLIM 高、低表达(以 PDLIM2 mRNA 表达水平的中位数为界值)组患者总生存期(overall survival, OS)和无进展生存期(progression free survival, PFS)。

1.5 PDLIM2 共表达基因富集分析 使用 Linked Omics 数据库(<http://www.linkedomics.org/login.php>)的 Link Finder 模块分析 PCa 队列(479 例)中与 PDLIM2 相关的差异表达基因,采用 Spearman 秩相关分析方法。使用 Linked Omics 数据库的 Link Interpreter 模块对差异表达基因进行通路和网络分析,采用基因本体富集分析法。

1.6 PDLIM2 与肿瘤免疫细胞浸润程度、TMB、MSI、免疫检查点(immune checkpoint, ICP)基因表达及肿瘤干性评分的相关性分析 利用 Sanger Box 数据库查询“PDLIM2”,采用 TIMER 算法分析 PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平。利用基因模块分析 PDLIM2 mRNA 表达水平与肿瘤免疫细胞(包括 B 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞)浸润程度、TMB、MSI、ICP 基因表达及肿瘤干性评分之间的相关性,采用 Pearson 相关分析法。

2 结果

2.1 PCa 组织与癌旁正常组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平的差异 利用 TCGA 数据分析发现,PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平明显低于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 PDLIM2 表达验证和相关分析 利用 UCLCAN 数据库验证发现,与癌旁正常组织相比,PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平较低($P < 0.05$),见图 1a(插

页);而 PDLIM2 启动子区域甲基化水平较高($P<0.05$),见图 1b(插页)。基于 TCGA 数据库分析 PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平与 Gleason 评分、分子分型的关系,结果显示 Gleason 评分 9 分者 PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平明显高于 6、7 分者(均 $P<0.05$),见图 1c(插页);与癌旁正常组织比较,ERG 融合、ETV1 融合、SPOP 突变者 PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平明显下调(均 $P<0.05$),其中 SPOP 突变者较 ERG 融合者 PDLIM2 mRNA 表达水平明显上调($P<0.05$),见图 1d(插页)。HPA 数据库分析发现细胞中 PDLIM2 主要定位于细胞肌动蛋白丝,黏附位点,见图 1e(插页)。免疫组化结果显示,随 PCa 组织级别的升高,PDLIM2 的染色强度明显增强,见图 1f(插页)。

2.3 生存分析 利用 TCGA 数据分析发现,在 PCa 患者中,PDLIM2 高表达者 PFS 明显短于 PDLIM2 低表达者,差异有统计学意义($P<0.05$);而 PDLIM2 高、低表达者 OS 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 PDLIM2 共表达基因富集分析 使用 Linked Omics 的功能模块分析 479 例 PCa 患者在 TCGA 中的 mRNA 测序数据,结果显示 PDLIM2 与 12 198 个基因呈正相关,与 7 852 个基因呈负相关,见图 2a(插页);热图分析显示,PDLIM2 mRNA 表达与 TSPAN4、LGALS1、GAS6、GYPC、LYL1 基因均呈正相关($r_s=0.76, 0.74, 0.73, 0.73, 0.73$, 均 $P<0.05$),与 SMARCC1、HOOK1、ZNF24、DNAJC16、FOXA1 基因均呈负相关($r_s=-0.65, -0.62, -0.62, -0.61, -0.61$, 均 $P<0.05$),见图 2b-c(插页)。与 PDLIM2 相关的基因主要富集在胶原代谢过程、整合素介导的信号通路、体液免疫反应、白细胞迁移、IFN- γ 产生、血管生成、急性炎症反应等生物学过程。

2.5 PDLIM2 与肿瘤免疫细胞浸润程度、TMB、MSI、ICP 基因表达及肿瘤干性评分的相关性 PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 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、树突状细胞浸润程度均呈正相关($r=0.24, 0.39, 0.12, 0.29, 0.49, 0.44$, 均 $P<0.05$);与 TMB、MSI 均呈正相关(均 $r>0$, 均 $P<0.05$);与 38 个 ICP 基因表达均呈正相关(均 $r>0, P<0.05$);与肿瘤干性评分呈正相关($r=0.16, P<0.05$)。

3 讨论

目前关于 PDLIM2 在肿瘤中的作用仍存在争议。有文献报道 PDLIM2 能够调节乳腺上皮细胞极性,是抑制乳腺癌发生、发展的关键机制^[7]。体外和体内实验证实,上调 PDLIM2 表达可抑制乳腺癌细胞非锚定生

长^[8]。Sun 等^[9]报道了 PDLIM2 在肺癌中受表观遗传抑制,并与程序性死亡受体 1 抑制剂治疗的耐药性和不良预后有关。而维生素 D 可直接上调 PDLIM2 表达,从而诱导乳腺浸润癌细胞中 PDLIM2 启动子区域的去甲基化^[10]。以上结果均提示 PDLIM2 具有抑癌作用。然而,在雄激素非依赖性 PCa 细胞株 DU145 中 PDLIM2 表达明显上调,而抑制 PDLIM2 表达可抑制肿瘤细胞侵袭能力。此外,雄激素敏感的 PCa 细胞与 CRPC 样癌细胞中的 PDLIM2 表达水平存在明显差异。在雄激素敏感的 PCa 细胞中,PDLIM2 过表达能抑制肿瘤细胞的增殖能力;在 CRPC 样癌细胞中,PDLIM2 高表达能促进细胞增殖、恶性转化和上皮间质转化过程^[7]。以上研究结果说明 PDLIM2 同时具有促癌和抑癌作用,其作用可能与肿瘤类型和细胞环境等因素有关。此外,PDLIM2 可能是 PCa 潜在的治疗靶点。

本研究利用 TCGA 数据分析显示,PDLIM2 在 PCa 组织中呈低表达,且 PCa 组织中 PDLIM2 启动子区域甲基化水平高于癌旁正常组织;生存分析结果显示,PDLIM2 高表达的 PCa 患者 PFS 更短。Song 等^[11]报道 PDLIM2 启动子甲基化可下调 PDLIM2 mRNA 表达水平,与本研究结果一致。本研究结果发现,PDLIM2 mRNA 表达水平随 Gleason 评分增高而升高,与 Gleason 6、7 分患者比较,Gleason 9 分患者 PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平明显较高。HPA 数据库的免疫组化分析结果显示,PDLIM2 主要定位于细胞肌动蛋白丝,黏附位点;且随着 PCa 组织级别的升高,PDLIM2 蛋白染色强度明显增强。这说明 PDLIM2 mRNA 表达水平与 PCa 组织分级有关,可能参与 PCa 发生、发展过程。本研究还分析了 PCa 中与 PDLIM2 共表达基因的生物学功能,结果显示 PDLIM2 共表达基因主要富集在胶原代谢过程、整合素介导的信号通路、体液免疫反应、白细胞迁移、IFN- γ 产生、血管生成、急性炎症反应等生物学过程。研究发现,PDLIM2 作为肿瘤抑制因子,通过抑制肿瘤相关基因,增加参与抗原呈递和 T 细胞启动,说明 PDLIM2 在 PCa 中可能参与免疫微环境调节^[12]。

TIMER 数据库结果显示,PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平与 B 细胞、CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞等免疫细胞浸润程度均呈正相关。从理论上分析,具有高 TMB、MSI 的肿瘤患者对 ICP 抑制剂具有更高的敏感性。此外,ICP 基因的高表达被广泛作为免疫治疗反应的预测因子。本研究发现,PCa 组织中 PDLIM2 mRNA 表达水平与 TMB、MSI 和 ICP 基因表达均呈正相关,说明 PDLIM2 可能

是肿瘤免疫治疗效果的潜在预测因子。2021 年美国国家综合癌症网络指南在 M₁ 期 CRPC 全身治疗中考虑新增 TMB 检测, 并提出帕博利珠单抗用于高 MSI 或错配修复缺陷 (different mismatch repair, dMMR) 或 TMB ≥ 10 mut/Mb 的 M₁ 期 CRPC 患者。但目前关于 TMB 在 PCa 免疫治疗中的预测价值结果并不一致, 可能与 TMB 算法不同有关^[13]。Abida 等^[14]发现在 1 033 例转移性 CRPC 患者中, 有 32 例表现为高 MSI, 其中 11 例接受基于 ICP 抑制剂的治疗, 近半数患者前列腺特异抗原水平下降幅度 $>50\%$ 。Schweizer 等^[15]基于小样本研究发现, 10 例 PCa 导管内癌患者中有 4 例为 dMMR, 其中 3 例患者具有高 MSI 特征; 值得注意的是, 其中 1 例 dMMR/高 MSI 患者在使用派姆单抗治疗期间, 前列腺特异抗原水平明显降低。以上结果说明 PDLIM2 高表达的 PCa 患者可能对免疫疗法更加敏感, 可能从免疫治疗中获益, 但仍需作进一步研究证实。此外, PCa 组织中 PDLIM2 表达水平与肿瘤干性评分呈正相关, 说明 PDLIM2 可能促进 PCa 肿瘤干性特征的表达, 促进肿瘤发展。Dai 等^[16]研究发现, PCa 的 TME 与其干细胞性呈负相关。Miranda 等^[17]研究发现, 肿瘤细胞干细胞可影响 TME 的免疫应答, 从而导致肿瘤异质性。以上结果提示在 PCa 中, PDLIM2 可能通过免疫调节来影响肿瘤细胞干性。

综上所述, PDLIM2 可能成为评估 PCa 预后的生物标志物和肿瘤免疫治疗的新靶点。但本研究结果是基于生物信息学技术分析的, 仍需进一步动物实验和临床试验进行验证。

4 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1):7–33. DOI:10.3322/caac.21654.
- [2] Vitkin N, Nersesian S, Siemens DR, et al. The tumor immune contexture of prostate cancer[J]. Front Immunol, 2019, 10:603. DOI:10.3389/fimmu.2019.00603.
- [3] Guo ZS, Qu Z. PDLIM2: signaling pathways and functions in cancer suppression and host immunity[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876(2):188630. DOI:10.1016/j.bbcan.2021.188630.
- [4] Loughran G, Huigsloot M, Kiely PA, et al. Gene expression profiles in cells transformed by overexpression of the IGF-I receptor[J]. Oncogene, 2005, 24(40):6185–6193. DOI:10.1038/sj.onc.1208772.
- [5] Bowe RA, Cox OT, Aylón V, et al. PDLIM2 regulates transcription factor activity in epithelial-to-mesenchymal transition via the COP9 signalosome[J]. Mol Biol Cell, 2014, 25(1):184–195. DOI:10.1091/mbc.E13-06-0306.
- [6] Kang M, Lee KH, Lee HS, et al. PDLIM2 suppression efficiently reduces tumor growth and invasiveness of human castration-resistant prostate cancer-like cells[J]. Prostate, 2016, 76(3):273–285. DOI:10.1002/pros.23118.
- [7] Deevi R, Cox O, O'Connor RJN. Essential function for PDLIM2 in cell polarization in three-dimensional cultures by feedback regulation of the $\beta 1$ -integrin-RhoA signaling axis[J]. Neoplasia, 2014, 16(5):422–431. DOI:10.1016/j.neo.2014.04.006.
- [8] Qu Z, Fu J, Yan P, et al. Epigenetic repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2: implications for the biology and treatment of breast cancer[J]. J Biol Chem, 2010, 285(16):11786–11792. DOI:10.1074/jbc.M109.086561.
- [9] Sun F, Li L, Yan P, et al. Causative role of PDLIM2 epigenetic repression in lung cancer and therapeutic resistance[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):5324. DOI:10.1038/s41467-019-13331-x.
- [10] Vanorbeek E, Eelen G, Verlinden L, et al. PDLIM2 expression is driven by vitamin D and is involved in the pro-adhesion, and anti-migration and -invasion activity of vitamin D[J]. Oncogene, 2014, 33(15):1904–1911. DOI:10.1038/ncr.2013.123.
- [11] Song G, Xu J, He L, et al. Systematic profiling identifies PDLIM2 as a novel prognostic predictor for oesophageal squamous cell carcinoma (ESCC)[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8):5751–5761. DOI:10.1111/jcmm.14491.
- [12] Sun F, Xiao Y, Qu Z. Oncovirus Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV) represses tumor suppressor PDLIM2 to persistently activate nuclear factor κB (NF- κB) and STAT3 transcription factors for tumorigenesis and tumor maintenance[J]. J Biol Chem, 2015, 290(12):7362–7368. DOI:10.1074/jbc.C115.637918.
- [13] Antoniotti C, Korn WM, Marmorino F, et al. Pulmonary sarcomatoid carcinomas commonly harbor either potentially targetable genomic alterations or high tumor mutational burden as observed by comprehensive genomic profiling[J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(6):932–942. DOI:10.1016/j.jtho.2017.03.005.
- [14] Abida W, Cheng ML, Armenia J, et al. Analysis of the prevalence of microsatellite instability in prostate cancer and response to immune checkpoint blockade[J]. JAMA Oncol, 2019, 5(4):471–478. DOI:10.1001/jamaoncol.2018.5801.
- [15] Schweizer MT, Cheng HH, Tretiakova MS, et al. Mismatch repair deficiency may be common in ductal adenocarcinoma of the prostate[J]. Oncotarget, 2016, 7(50):82504–82510. DOI:10.18632/oncotarget.12697.
- [16] Dai Z, Liu P. High copy number variations, particular transcription factors, and low immunity contribute to the stemness of prostate cancer cells[J]. J Transl Med, 2021, 19(1):206. DOI:10.1186/s12967-021-02870-x.
- [17] Miranda A, Hamilton PT, Zhang AW, et al. Cancer stemness, intratumoral heterogeneity, and immune response across cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(18):9020–9029. DOI:10.1073/pnas.1818210116.

(收稿日期:2021-12-30)

(本文编辑:陈丹)