

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003429

MTAP 在前列腺癌中的表达及对免疫细胞的影响初探

秦梓榛¹, 刘清源¹, 武雨琦², 苏 帅¹, 张金栋¹, 李 月³, 王德林¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016; 2. 深圳大学附属华南医院泌尿外科, 深圳 518055;

3. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探究甲硫腺苷磷酸化酶(methylthioadenosine phosphorylase, MTAP)在前列腺癌不同临床阶段的表达差异及其对免疫细胞的影响。**方法:**从TCGA和GTEx数据库中获取MTAP的表达谱数据,利用生物信息学方法进行泛癌分析。免疫组化验证上述结论并探究MTAP与临床病理指标之间的关联。RT-qPCR和Western blot检测MTAP在不同前列腺癌细胞系中的表达水平,分析MTAP与肿瘤恶性程度之间的关联。生物信息学方法分析前列腺癌中MTAP与免疫细胞的关联并进行免疫组化验证。**结果:**在前列腺癌中,MTAP的表达在肿瘤发生早期升高后逐渐降低,与T分期和Gleason评分呈负相关($r_s=-0.576, P=0.000, r_s=-0.284, P=0.020$)。MTAP与多种免疫细胞存在相关关系,其中MTAP与CD4⁺T细胞呈正相关($r=0.643, P=0.000$),与NK CD56^{bright}细胞呈负相关($r=-0.570, P=0.000$)。**结论:**前列腺癌中,MTAP的表达呈现早期升高后逐渐下降的趋势,与T分期和Gleason评分呈负相关。MTAP对免疫细胞的浸润和细胞功能的发挥有调节作用,是一种潜在的生物学标志物和免疫治疗靶点。

【关键词】甲硫腺苷磷酸化酶;前列腺癌;生物信息学;免疫细胞;CD4;CD56**【中图分类号】**R737.25**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-10-15

The expression of MTAP in prostate cancer and its effect on immune cells

Qin Zizhen¹, Liu Qingyuan¹, Wu Yuqi², Su Shuai¹, Zhang Jindong¹, Li Yue³, Wang Delin¹

(1. Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Urology, South China Hospital Affiliated to Shenzhen University;

3. Molecular Medicine and Tumor Research Center of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the expression of Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) in different clinical stages of prostate cancer and its correlation with immune cells. **Methods:** The expression profile of MTAP was obtained from TCGA and GTEx databases, and pan-carcinoma was analyzed by bioinformatics method. Immunohistochemistry verified the conclusions above and explored the correlation between MTAP and clinicopathological features. The expression levels of MTAP in different prostate cancer cell lines were detected by RT-qPCR and Western blot, and the correlation between MTAP and the degree of malignancy was analyzed. The correlation between MTAP and immune cells in prostate cancer was analyzed by bioinformatics and verified by immunohistochemistry. **Results:** In prostate cancer, the expression of MTAP increased at early stage and then decreased gradually, and was negatively correlated with T stage and Gleason score ($r_s=-0.576, P=0.000, r_s=-0.284, P=0.020$). MTAP was correlated with a variety of immune cells, among which MTAP was positively correlated with CD4⁺T cells ($r=0.643, P=0.000$), was significantly negatively correlated with NK CD56^{bright} cells ($r=-0.570, P=0.000$). **Conclusion:** In prostate cancer, the expression of MTAP increased at the early stage and then decreased gradually, which was negatively correlated with T stage and Gleason score. MTAP can regulate the infiltration and function of immune cells, and is a potential biomarker and immunotherapy target.

【Key words】methylthioadenosine phosphorylase; prostate cancer; bioinformatics; immune cells; CD4; CD56

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性的第二

大常见肿瘤,也是全球肿瘤的第五大死亡原因^[1]。研究表明,不同国家前列腺癌的发病率和死亡率差异很大,这可能与民族、种族背景、经济水平等原因有关^[2]。然而,在世界范围内,晚期前列腺癌的治疗选择都是十分有限的。有研究表明,虽然雄激素剥夺治疗对大多数早期患者是有效的,但几乎所有患

作者介绍:秦梓榛,Email:2020110226@stu.cqmu.edu.cn,

研究方向:泌尿系统肿瘤。

通信作者:王德林,Email:wandelin@hospital.cqmu.edu.cn。

优先出版:https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240206.1104.022

(2024-02-09)

者都逐渐进展为去势抵抗性前列腺癌,并且大多数患者在之后的几年内死亡^[3-4]。紫杉醇类药物的应用可提高前列腺癌患者的总生存率^[5],然而,随之而来的耐药也给临床医生带来了新的问题。免疫疗法的出现为前列腺癌的治疗提供了一种新的选择。但免疫检查点阻断治疗在PCa临床治疗中的效果尚不理想^[6]。因此,寻找新的免疫治疗靶点对PCa的治疗非常重要。

甲基硫代腺苷磷酸化酶(methylthioadenosine phosphylase, MTAP)基因位于染色体9p21上^[7],是多胺代谢途径中的关键酶,其功能的发挥也对细胞的增殖和生长发育至关重要^[8]。MTAP的主要功能是回收多胺代谢途径中产生的5'-甲基硫代腺苷(5'-methylthioadenosine, MTA),产生三磷酸腺苷和甲硫氨酸^[9]。然而,大量研究表明MTAP在多种肿瘤中存在异常表达(包含过表达,低表达或基因缺失),例如:胰腺腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等^[10-12]。一项前列腺癌的相关研究指出,靶向MTAP抑制多胺的产生可能是治疗PCa的有效策略^[13]。然而,MTAP在PCa中的研究十分有限,在不同临床阶段的PCa中MTAP的表达水平尚不明确,对免疫细胞的作用也有待探究。

本研究对MTAP在PCa各临床阶段的表达模式进行探究,明确了MTAP在不同临床阶段PCa中的表达水平及其与临床病理指标的相关性。然后,对PCa中,MTAP与免疫细胞的关联进行分析,探究MTAP在免疫调控中的重要作用和临床诊疗中的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本 筛选2015年1月至2022年12月就诊于重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,经病理科确诊为PCa或良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)的患者。获取病理科用于病理诊断的剩余石蜡包埋组织并进行切片。

PCa样本纳入标准如下:①经病理诊断,确诊为PCa或BPH的患者;②首次于本院确诊且术前未接受过任何形式的治疗的患者;③患者临床资料完整。PCa样本排除标准如下:①术前存在任何形式感染的患者;②患者并发其他肿瘤或免疫相关疾病;③患者术前曾接受内分泌治疗、化疗或者其他治疗;④神经内分泌肿瘤的患者^[14]。BPH样本纳入标准如下:①经病理诊断,确诊为BPH的患者;②首次就诊于我院并行手术治疗的患者;③患者临床资料完整。BPH样本排除标准如下:①患者合并其他免疫性疾病;②患者存在任何形式的感染未完全纠正。

经筛选,共纳入68例PCa患者和16例BPH患者,其石蜡切片用于后续实验。本研究经重庆医科大学附属第一医院(中国重庆)机构伦理委员会批(批号:2022-K234)。所有实验符合《赫尔辛基宣言》。在本研究中,每位患者的隐私都得到了很好的保护。

1.1.2 前列腺癌细胞株 PCa细胞株22RV1、LNCaP、DU145和PC3,购自中国科学院细胞库(中国上海),PC3-PR获取自重庆新桥医院泌尿外科^[15]。以上所有细胞均储存于重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心,液氮低温冷冻保存<1年。

1.1.3 试剂 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DAB试剂购自广州Biosharp生物技术有限公司。苏木素染色液购自上海碧云天生物技术有限公司。培养基F12-K、MEM、RPMI-1640, PBS缓冲液,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自美国Gibco公司。Easstep®总RNA提取试剂盒购自美国Promega公司。PrimeScript™ RT试剂盒购自日本Takara公司, Chamq Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。RT-qPCR中使用引物购自北京擎科生物有限公司。SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。MTAP、CD4、CD56兔抗及对应的羊抗兔二抗均购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 MTAP在泛癌中的表达分析 TCGA数据库(<https://www.cancer.gov/aboutnci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>)和GTEx数据库(<https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Genotype-Tissue-Expression-Project>)下载MTAP的表达谱数据,通过泛癌分析,探究MTAP在泛癌中的表达情况。再利用HPA数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)验证MTAP在6种腺癌及其邻近组织样本中的表达水平。

1.2.2 免疫组化 石蜡切片置于烘箱中,60℃烘片2h,将切片浸没在二甲苯中,室温脱蜡,1h。按照乙醇梯度顺序(100%, 95%, 80%, 70%),立即将切片依次浸没于乙醇溶液中进行水化,每个梯度5min。应用柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)进行抗原修复。将切片浸没在预先煮沸的柠檬酸盐缓冲液中,加热维持溶液温度在95℃以上15min。自然冷却至室温, PBS溶液室温摇床震荡清洗3次,每次3min。使用免疫组化试剂盒,根据说明书进行免疫组化实验。一抗在使用前,用PBS缓冲液稀释至1:200,滴加于切片组织上,4℃下孵育过夜。使用DAB试剂免疫染色,苏木素复染,自来水洗涤15min后封片。显微镜拍照后,采用ImageJ软件(NIH,美国)检测各切片的平均光密度(integrated optical density, IOD)。

1.2.3 细胞培养 22RV1和LNCaP细胞使用含有10%FBS的RPMI-1640培养基培养。PC3和PC3-PR细胞使用含有10%FBS的F-12k培养基培养。DU145细胞系使用含有10%FBS的MEM培养基培养。培养环境为37℃,含5%CO₂的细胞培养孵箱。所有细胞均待生长至对数生长期再行后续实验。

1.2.4 总RNA提取及RT-qPCR 按照说明书,使用Easstep®

总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。取 1 μg 总 RNA 使用 Prime-ScriptTM RT 试剂盒 (Takara, 中国大连) 的将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使用 Chamq Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR。反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s。以 GAPDH 作为内参进行对照。引物序列如下: MTAP-forward, 5'-TTCCAGAGGTGGTTCTTGCT-3'; MTAP-reverse, 5'-CTGACCATTCTGTGGACCCT-3'; GAPDH-forward, 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCA-3'; GAPDH-reverse, 5'-GTCATGAGTCCTTCCACGATACC-3'。每个样本做 4 个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法来计算相对 mRNA 的含量, $\Delta\text{CT}=\text{CT}(\text{目的基因})-\text{CT}(\text{管家基因 GAPDH})$, $\Delta\Delta\text{CT}=\Delta\text{CT}(\text{实验组})-\Delta\text{CT}(\text{对照组})$, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示实验组目的基因 mRNA 的含量相对于对照组所改变的倍数。

1.2.5 Western blot 实验 使用 RIPA 试剂和 PMSF 试剂的混合溶液 (RIPA:PMSF=100:1) 作为裂解液, 冰上摇床震荡裂解 6 孔板中的待测细胞 30 min, 细胞刮收集细胞和裂解液于 EP 管中, 12 000 r/min $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 吸取上清液即提取蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。5 \times 蛋白上样缓冲液与蛋白以 1:4 比例混合后, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。使用 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒制胶并进行蛋白上样和电泳 (100 V 恒压电泳 100 min)。将电泳后的蛋白转移到 PVDF 膜上 (冰盒内转膜, 210 mA 恒流转膜 40 min)。使用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液室温封闭抗体 1 h。一抗 (1:1 000 TBST 稀释) 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。用山羊抗兔 IgG 二抗 (1:10 000 TBST 稀释) 室温孵育 1 h。使用超敏 ECL 化学发光液对膜进行处理后进行图像采集。以 GAPDH 作为内参进行对照。

1.2.6 免疫细胞浸润分析 为了探究 MTAP 的表达水平与肿瘤微环境中各免疫细胞的相关性, 应用 R 语言 (4.0.1 版本) 的 ssGSEA (R/GSVA 包, 3.6 版本), 分析前列腺癌在 TCGA 数据中的免疫浸润情况, 探究 MTAP 在前列腺癌中与 24 种免疫细胞的相关性。

1.3 统计学方法

统计分析使用软件 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 26.0。泛癌分析采用 R 语言 (4.0.1 版本) R 包: stats[4.2.1], car[3.1-0]) 分析, ggplot2[3.3.6] 对数据进行可视化。免疫分析分析采用 ssGSEA (R/GSVA 包, 3.6 版本), 上述生信分析采用 Welch t -test 检验 (双尾)。临床病理特征与 MTAP 表达水平的相关性使用 Spearman's 相关性分析。文中得到的数值以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。多样本均数比较采用单因素方差分析, 其两两比较采用 LSD- t 法。MTAP 表达水平与 CD4、CD56 的相关性采用 Pearson 检验进行相关性分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

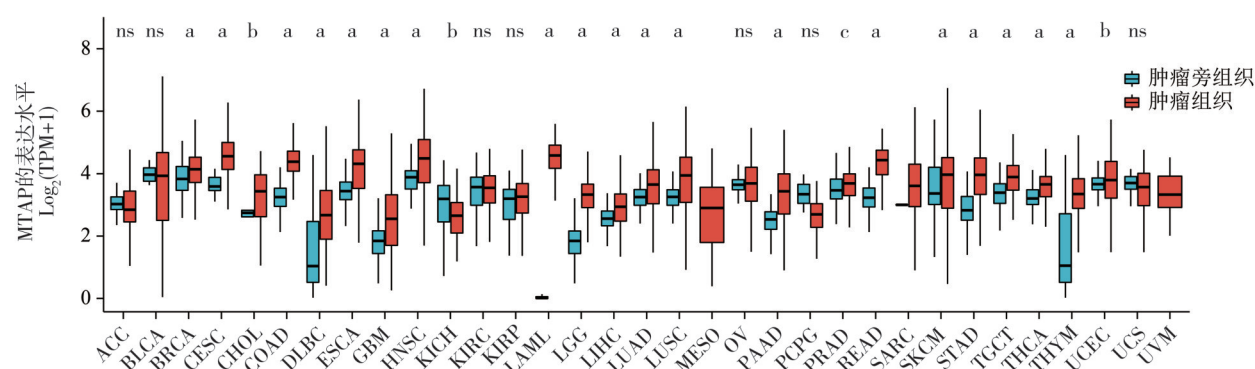
2.1 MTAP 在多种肿瘤中呈现过表达

从 TCGA 和 GTEx 下载数据, 分析 MTAP 在 33 种肿瘤中的表达水平。结果显示, 相比于肿瘤旁组织, MTAP 在 BRCA

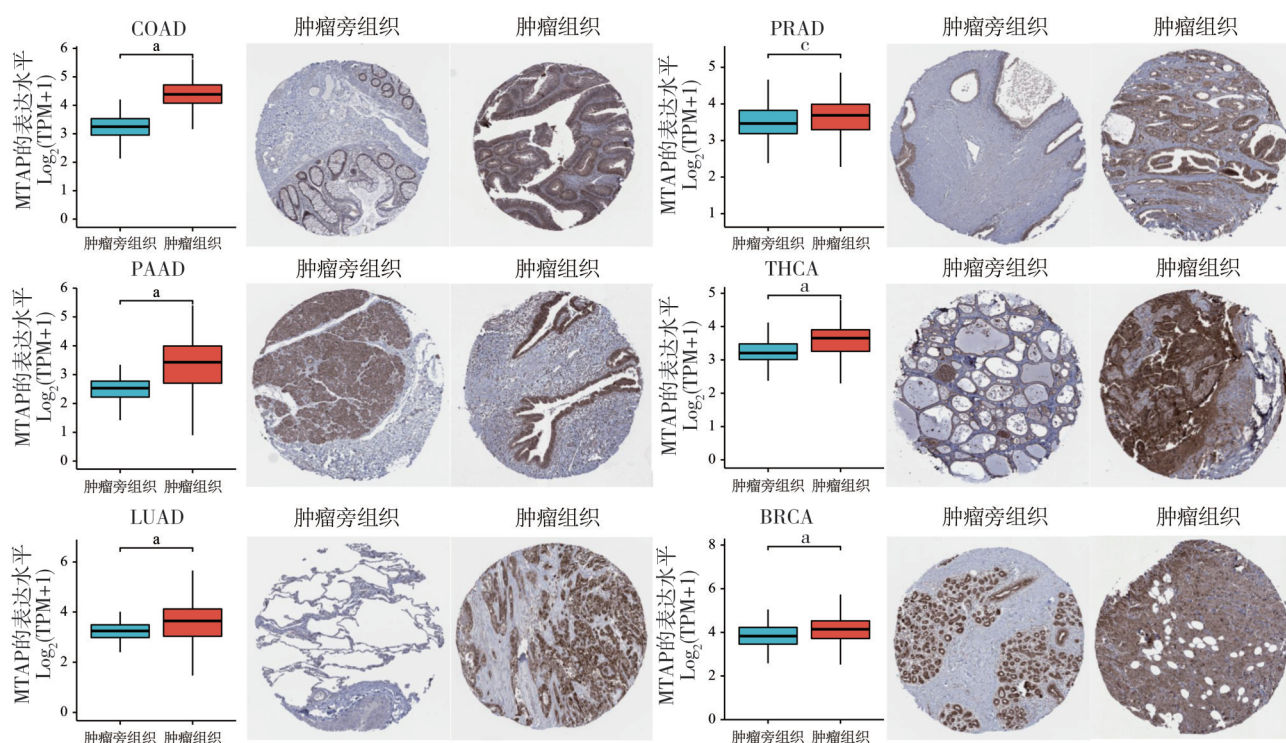
(3.82 ± 0.65 vs. 4.34 ± 0.71 , $t=6.097$, $P=0.000$)、CESC (3.38 ± 0.47 vs. 4.67 ± 0.75 , $t=6.262$, $P=0.000$)、CHOL (2.75 ± 0.28 vs. 3.35 ± 1.24 , $t=4.279$, $P<0.05$)、COAD (3.22 ± 0.48 vs. 4.25 ± 0.55 , $t=6.227$, $P=0.000$)、DLBC (1.78 ± 1.56 vs. 2.56 ± 1.16 , $t=5.548$, $P=0.000$)、ESCA (3.54 ± 0.46 vs. 4.38 ± 0.88 , $t=6.294$, $P=0.000$)、GBM (1.89 ± 0.84 vs. 2.75 ± 1.12 , $t=6.337$, $P=0.000$)、HNSC (3.96 ± 0.52 vs. 4.41 ± 1.05 , $t=6.010$, $P=0.000$)、LAML (0.27 ± 0.11 vs. 4.66 ± 0.84 , $t=8.948$, $P=0.000$)、LGG (1.78 ± 0.69 vs. 3.89 ± 0.61 , $t=8.525$, $P=0.000$)、LIHC (2.15 ± 0.42 vs. 2.67 ± 0.69 , $t=5.992$, $P=0.000$)、LUAD (3.41 ± 0.45 vs. 3.86 ± 0.55 , $t=5.915$, $P=0.000$)、LUSC (3.48 ± 0.49 vs. 4.25 ± 0.87 , $t=5.533$, $P=0.000$)、PAAD (2.39 ± 0.47 vs. 3.90 ± 0.97 , $t=7.936$, $P=0.000$)、PRAD (3.55 ± 0.48 vs. 3.89 ± 0.52 , $t=5.845$, $P<0.01$)、READ (3.37 ± 0.47 vs. 4.19 ± 0.58 , $t=5.291$, $P=0.000$)、SKCM (3.54 ± 0.87 vs. 3.95 ± 1.21 , $t=6.095$, $P=0.000$)、STAD (2.39 ± 0.51 vs. 4.05 ± 0.79 , $t=7.722$, $P=0.000$)、TGCT (3.22 ± 0.39 vs. 3.86 ± 0.53 , $t=6.264$, $P=0.000$)、THCA (2.81 ± 0.37 vs. 3.63 ± 0.45 , $t=5.922$, $P=0.000$)、THYM (1.65 ± 1.35 vs. 2.36 ± 0.59 , $t=6.340$, $P=0.000$) (乳腺浸润癌、宫颈鳞癌和腺癌、胆管癌、结肠癌、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、食管癌、多形成性胶质细胞瘤、头颈鳞状细胞癌、急性髓细胞样白血病、脑低级别胶质瘤、肝细胞肝癌、肺腺癌、肺鳞癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠腺癌、皮肤黑色素瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、胸腺癌) 中均显示过表达, 而在 KICH (肾嫌色细胞癌, $P<0.05$) 中呈现低表达, 其余肿瘤差异无统计学意义 (图 1A)。HPA 数据库中的免疫组化数据显示, 相比于肿瘤旁组织, MTAP 在 COAD (3.42 ± 0.53 vs. 4.46 ± 0.58 , $t=5.106$, $P=0.000$)、PAAD (2.39 ± 0.45 vs. 3.38 ± 0.96 , $t=6.917$, $P=0.000$)、LUAD (3.14 ± 0.32 vs. 3.98 ± 0.64 , $t=5.705$, $P=0.000$)、THCA (3.17 ± 0.49 vs. 3.96 ± 0.58 , $t=5.724$, $P=0.000$)、BRCA (3.82 ± 0.76 vs. 4.32 ± 0.87 , $t=5.212$, $P=0.000$)、PRAD (3.27 ± 0.44 vs. 3.84 ± 0.52 , $t=4.717$, $P<0.01$) (结肠癌、前列腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肺腺癌、乳腺浸润癌) 6 种肿瘤中呈现过表达, 与上述分析结果相同 (图 1B)。

2.2 PCa 中 MTAP 的表达水平在早期升高后逐渐降低

为了进一步评估 MTAP 在不同临床阶段前列腺组织中的表达水平, 对 84 例前列腺组织进行了免疫组化实验, 其中包括 68 例 PCa 和 16 例 BPH 样本。实验结果显示: PCa 样本中, 仅有 T₁ 和 T₂ 期 MTAP 的平均 IOD 明显高于 BPH 患者。随着肿瘤的进展, MTAP 的平均 IOD 逐渐下降至低于正常组织。Spearman's 相关性分析结果显示: MTAP 的表达水平与 T 分期呈负相关 ($r_s=-0.575\ 9$, $P=0.000$, 图 2A、C、D, 表 1)。此外, 根据 Gleason 评分将样本分为 5 个等级组, 包括 Grade 1 (Gleason 评分 ≤ 6), Grade 2 (Gleason 评分 $3+4=7$), Grade 3 (Gleason 评分 $4+3=7$), Grade 4 (Gleason 评分 $4+4=8$, $5+3=8$, 或 $3+5=8$), 和 Grade 5 (Gleason 评分 ≥ 9)^[16]。Spearman's 相关性分析结果显示: Gleason 评分与 MTAP 表达水平也呈负相关 ($r_s=-0.284\ 3$, $P=0.02$), 见图 2B、E, 表 1。



A. TCGA和GTEx数据库, MTAP在泛癌中的表达



B. HPA数据库, MTAP在泛癌中的表达

注: a, $P=0.000$; b, $P<0.05$; c, $P<0.01$ 。ACC, 肾上腺皮质癌; BLCA, 膀胱尿路上皮癌; BRCA, 乳腺浸润癌; CESC, 宫颈鳞癌和腺癌; CHOL, 胆管癌; COAD, 结肠癌; DLBC, 弥漫性大B细胞淋巴瘤; ESCA, 食管癌; GBM, 多形性胶质母细胞瘤; GBMLGG, 胶质瘤; HNSC, 头颈鳞状细胞癌; KICH, 肾嫌色细胞癌; KIRC, 肾透明细胞癌; KIRP, 肾乳头状细胞癌; LAML, 急性髓细胞样白血病; LGG, 脑低级别胶质瘤; LIHC, 肝细胞肝癌; LUAD, 肺腺癌; LUSC, 肺鳞癌; MESO, 间皮瘤; OV, 卵巢浆液性囊腺癌; PAAD, 胰腺癌; PCPG, 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤; PRAD, 前列腺癌; READ, 直肠癌; SARC, 肉瘤; SKCM, 皮肤黑色素瘤; STAD, 胃癌; TGCT, 睾丸癌; THCA, 甲状腺癌; THYM, 胸腺癌; UCEC, 子宫内膜癌; UCS, 子宫肉瘤; UVM, 葡萄膜黑色素瘤

图1 MTAP在泛癌中的表达水平

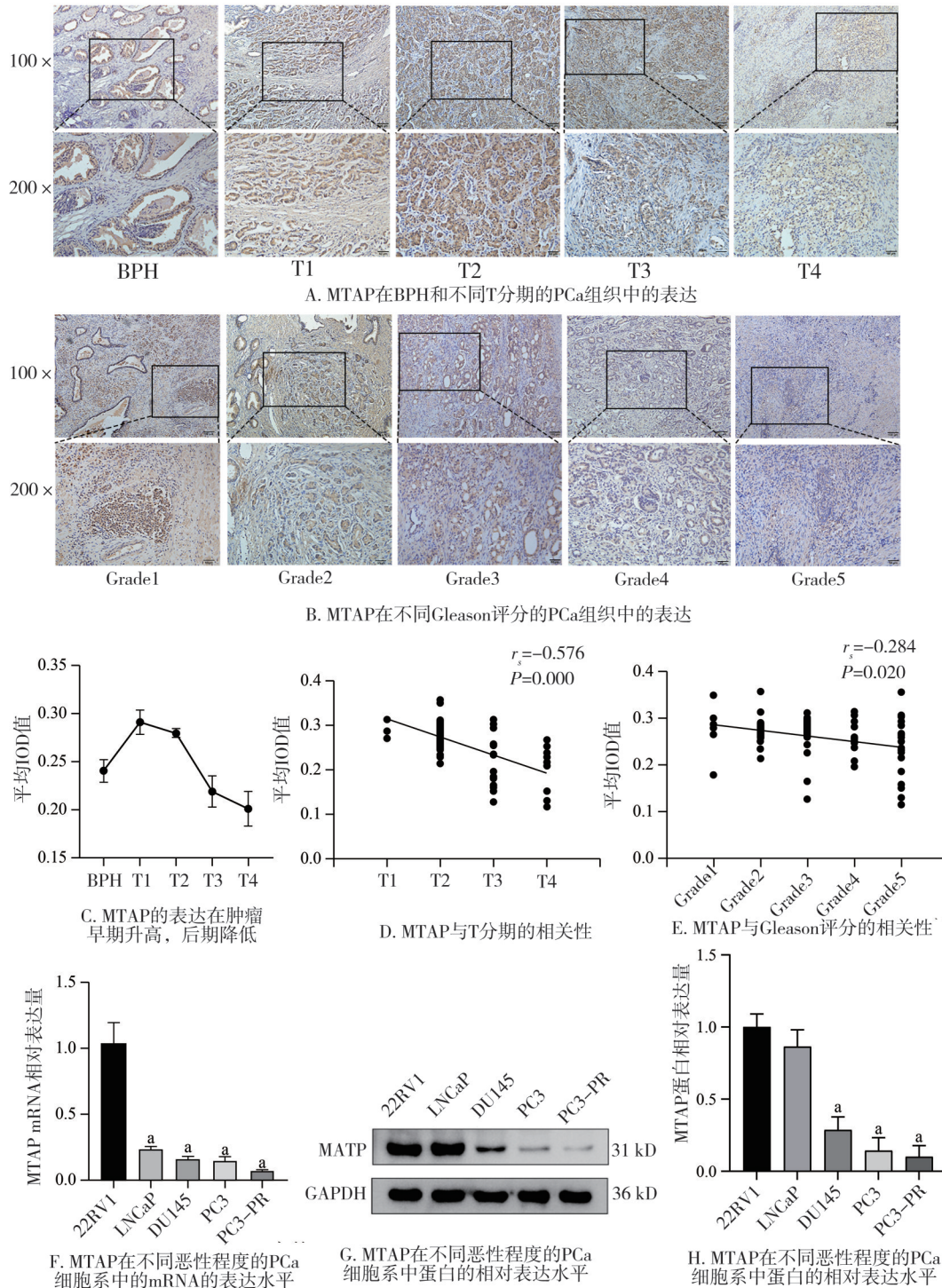
随后, 利用5种不同转移和耐药程度的PCa细胞系, 进一步探究MTAP表达水平与PCa恶性程度的关联。其中包括22RV1(异种移植原发PCa, 雄激素敏感)、LNCaP(淋巴转移性PCa, 雄激素敏感)、DU145(脑转移性PCa, 雄激素抵抗)、PC3(骨转移性PCa, 雄激素抵抗)和PC3-PR(骨转移性PCa, 雄激素抵抗并紫杉醇耐药), 上述细胞转移和耐药性依次升高, 恶性程度依次增加^[17]。对这些PCa细胞系进行了RT-qPCR检测: 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法来比较MTAP mRNA水平定量检测

测结果, 以22RV1的mRNA水平为对照(100%), LNCaP、DU145、PC3、PC3-PR组的表达量为22RV1组的 $(23.66 \pm 3.76)\%$ 、 $(16.54 \pm 3.13)\%$ 、 $(15.01 \pm 5.97)\%$ 及 $(7.3 \pm 1.21)\%$ 。方差分析5组的MTAP mRNA表达水平差异有统计学意义($F=28.77$; $P=0.000$), 两两比较结果显示LNCaP、DU145、PC3、PC3-PR组的表达量均低于22RV1组(LNCaP vs. 22RV1: $t=4.927$; $P=0.000$; DU145 vs. 22RV1: $t=5.378$; $P=0.000$; PC3 vs. 22RV1: $t=5.406$; $P=0.000$; PC3-PR vs. 22RV1: $t=5.973$; $P=$

0.000,图2F)。

Western blot实验结果显示:以蛋白Marker为参照,各组均在 31 kD 处显示条带,说明各组均有 MTAP 的表达, GAPDH 表达位于 36 kD 处,以 GAPDH 为内参,采用 Image Lab 6.1 软件定量分析各组中 MTAP 的蛋白表达水平。将 22RV1 组作为对照(表达量为 1),MTAP 在 LNCaP、DU145、PC3、PC3-PR 的相对表达量为 0.864 ± 0.117 、 0.287 ± 0.090 、

0.143 ± 0.089 和 0.101 ± 0.077 。方差分析 5 组的 MTAP 表达水平,差异有统计学意义($F=60.85, P<0.001$)。两两比较结果显示,相比于 22RV1,MTAP 在 DU145、PC3、PC3-PR 中的表达均降低(DU145 vs. 22RV1: $t=9.696, P=0.000$; PC3 vs. 22RV1: $t=11.650, P=0.000$; PC3-PR vs. 22RV1: $t=13.100, P=0.000$,图 2G、H)。该结果表明,低恶性的 PCa 细胞系中, MTAP 表达水平显著高于恶性度较高的 PCa 细胞系。



注:a,与22RV1细胞系比较, $P=0.000$

图2 前列腺癌组织中MTAP的表达水平与临床病理指标的相关性

表 1 前列腺癌组织中 MTAP 表达水平与临床病理指标的相关性($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	MTAP 表达	<i>t/F</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r_s</i> 值
年龄(岁)			0.566 ^a	0.574	
<60	11	0.26 ± 0.06			
≥60	57	0.26 ± 0.05			
T 分期			37.750 ^b	0.000	-0.576
T ₁	3	0.29 ± 0.02			
T ₂	42	0.28 ± 0.03			
T ₃	14	0.22 ± 0.06			
T ₄	9	0.20 ± 0.05			
N 分期			2.151 ^b	0.065	-0.193
N ₀	58	0.26 ± 0.05			
N ₁	9	0.22 ± 0.07			
N ₂	1	0.29			
M 分期			1.816 ^a	0.074	
M ₀	60	0.26 ± 0.05			
M ₁	8	0.23 ± 0.06			
Gleason 评分			16.443 ^b	0.020	-0.284
Grade 1: ≤6	6	0.28 ± 0.05			
Grade 2: 3+4=7	12	0.28 ± 0.04			
Grade 3: 4+3=7	17	0.26 ± 0.05			
Grade 4: 4+4=8, 5+3=8, 3+5=8	13	0.26 ± 0.03			
Grade 5: ≥9	20	0.23 ± 0.06			

注:a, *t* 值;b, *F* 值

2.3 在 PCa 中, MTAP 的表达水平与多种免疫细胞相关

肿瘤的进展通常伴随着免疫细胞的浸润。因此,使用 R 语言(4.0.1 版本)的 ssGSEA(R/GSVA 包, 3.6 版本),探究 PCa 组织细胞中 MTAP 的表达与 PCa 中 24 种免疫细胞浸润数量的相关性。结果显示 MTAP 与 Tcm、辅助性 T 细胞、Th2 细胞、TFH、Tem、巨噬细胞、Th17 细胞、T 细胞、aDC 等多种免疫细胞呈正相关(图 3A)。其中, MTAP 与细胞毒性细胞($r=-0.147, P=0.001$), NK CD56^{bright} 细胞($r=-0.371, P<0.001$), 和 NK 细胞($r=-0.158, P<0.001$)呈负相关(图 3B)。

为了验证上述生物信息学分析结论,进行了免疫组化染色实验,以进一步确定 PCa 组织中 MTAP 与 CD4⁺T 细胞和 NK CD56^{bright} 细胞的相关性。选取了 41 例 PCa 组织进行 CD4 染色; 68 例 PCa 样本进行 MTAP 和 CD56 染色。结果显示 CD4 的平均 IOD 与 MTAP 呈正相关($r=0.643, P<0.001$), 而 CD56 与 MTAP 呈负相关($r=-0.570, P<0.001$, 图 4)。

3 讨 论

有研究表明, MTAP 在多种肿瘤中均可出现缺失,而这也通常与患者更低的总体生存率相关^[18-21]。然而,在 PCa 中, MTAP 的缺失却是罕见的,但 MTAP 表达水平的降低通常是预后不良的一个重要标

志^[22]。多胺是前列腺液的重要成分。有研究证实,前列腺产生的多胺是其他组织或器官的 10 倍以上^[23-25]。前列腺上皮细胞可向前列腺腔内分泌大量乙酰化多胺,而 MTAP 是缓解前列腺代谢负荷的关键酶^[26]。有文献指出,靶向 MTAP 并能够增强这种代谢依赖性的药物可能是治疗 PCa 的一种有效选择^[13]。

本研究首先通过 TCGA 和 GTEx 公共数据库的大量肿瘤样本数据进行了泛癌分析,结果表明: MTAP 在 33 种肿瘤中, 21 种出现了过表达现象, 仅 1 种肿瘤呈现低表达(其余肿瘤差异无统计学意义)。然而,这些结果仅描述了 MTAP 在肿瘤和正常组织之间表达水平的差异, MTAP 在 PCa 不同病理阶段的具体表达水平仍有待进一步明确。所以,选择通过免疫组化实验对 MTAP 在 PCa 组织中的表达水平进行探究。结果令人惊奇的是, MTAP 仅在早期 PCa 组织中出现过表达,随着肿瘤的进展, MTAP 的表达水平逐渐降低。其表达与 T 分期、Gleason 评分呈明显负相关。随后,通过对临床资料的整理和分析,为这种现象作出了合理的解释:在实际临床工作中,治疗方案的选择对实验结果产生的影响不容忽视。根据《CSCO 前列腺癌诊疗指南》,早中期肿

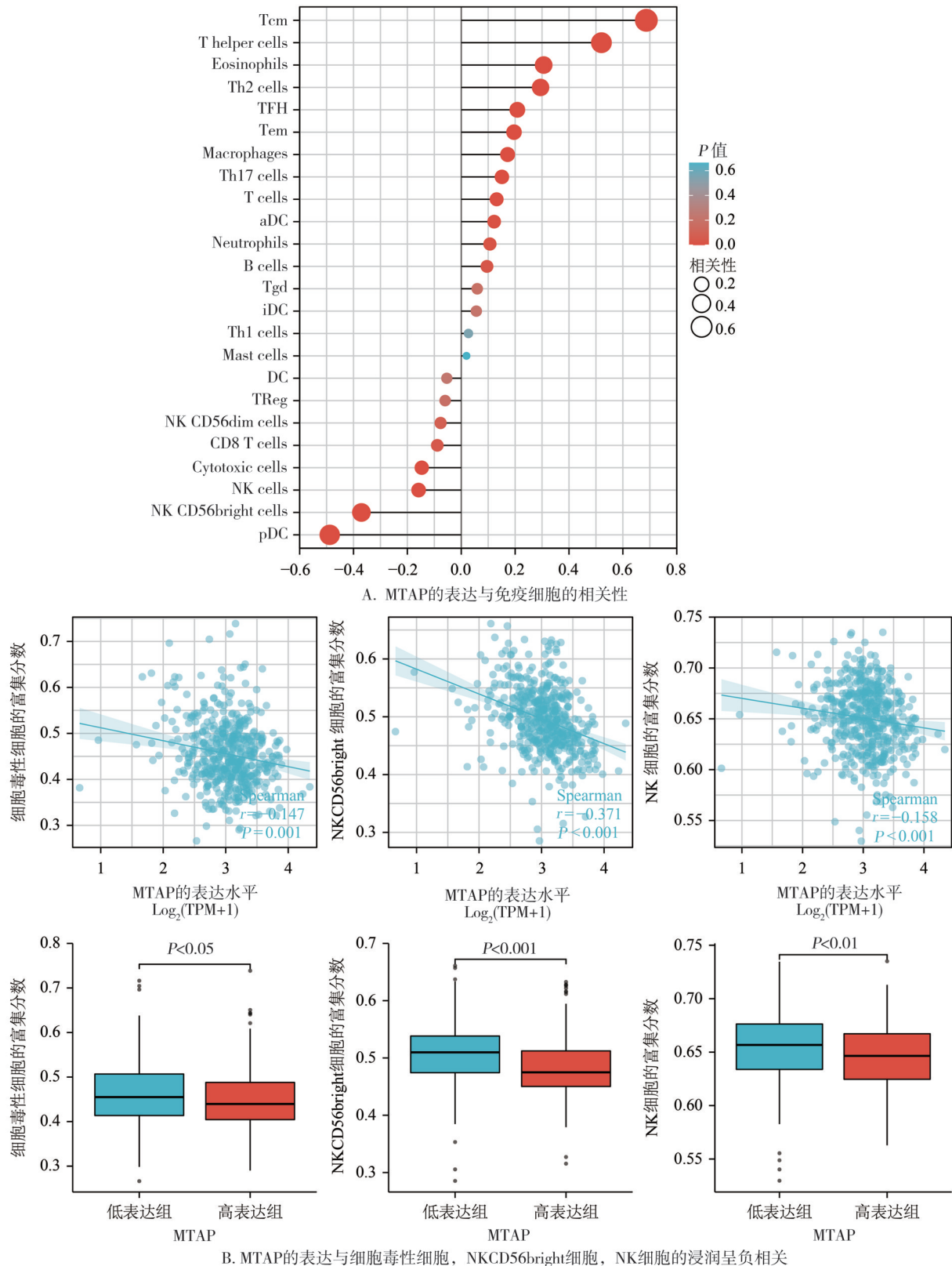


图3 MTAP 表达水平与免疫细胞的相关性

瘤的患者多应用手术治疗方案,而在晚期肿瘤及转移瘤患者中,保守治疗则较常应用^[27]。这就造成了公共数据库中,晚期肿瘤组织样本数量稀少,其数

量占比远低于早中期肿瘤样本。这也导致了样本的总体特征更接近于早、中期肿瘤的特征。公共数据库中的数据多因此,本实验的生物信息学分析

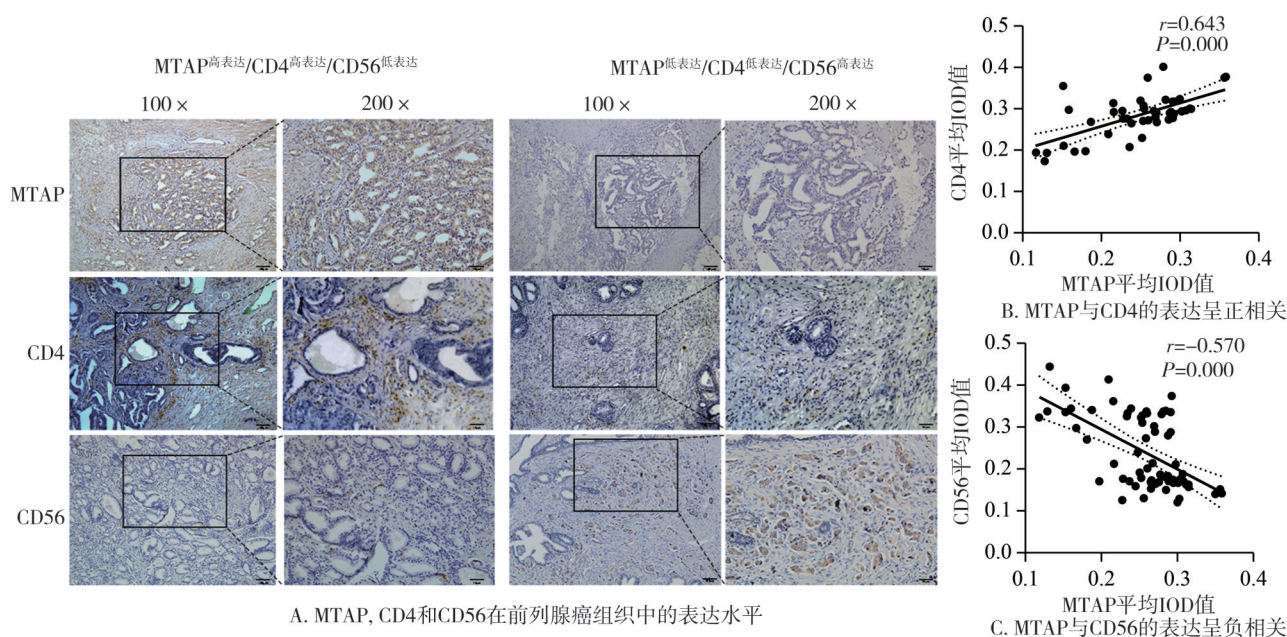


图4 前列腺癌中,MTAP的表达与CD4、CD56的相关性

中,肿瘤样本 MTAP 表达水平呈现出高于正常组织的过表达现象。

在本研究的样本中,本研究也发现了这种相似的分布现象。在筛选后随机抽取的 68 例 PCa 组织蜡块样本中, T_1 期患者最少, 仅 3 例, 占总数的 4.41%。 T_2 患者最多, 42 例, 占总数的 61.76%; T_3 和 T_4 患者分别为 14 例和 9 例, 占总数的 20.58% 和 13.24%。在实验过程中, 根据患者的 T 分期和 Gleason 评分对肿瘤组织样本进行了细化分组并分别进行数据处理, 才得以发现 MTAP 在前列腺癌不同临床阶段的表达水平差异。

近年来, 肿瘤免疫研究逐渐引起了人们的关注。这些研究有助于了解肿瘤和免疫细胞之间的相互作用, 并辅助判断预后^[28-29]。有文献显示, 肿瘤中缺乏 MTAP 可导致底物 MTA 的积累, 从而抑制 T 细胞的增殖、活化、分化和效应功能^[30]。此外, 主要由活化 T 细胞分泌的 IL-12 等细胞因子在非特异性免疫中也发挥了重要作用。NK CD56^{bright} 细胞是 NK 细胞的前体细胞, 其细胞毒作用仅在 IL-12 刺激下才能获得增强^[31], 继而成为具有杀伤作用的成熟 NK 细胞。MTAP 的表达水平升高将间接导致机体的特异性免疫和非特异性免疫功能双重障碍, 促进肿瘤进展。本研究发现, PCa 中 MTAP 与多种免疫细胞存在关联, 这种关联在 CD4⁺T 细胞和 NK CD56^{bright} 细胞中尤为明显。这表明 PCa 中, MTAP 对免疫细胞

的浸润及其免疫功能的发挥起到了重要作用, 是一种潜在的免疫治疗靶点。

本研究中, 新鲜的晚期肿瘤组织样本缺乏极大地限制了实验项目的推进。在 PCa 中, MTAP 呈现出这种特殊的表达模式的机制有待进一步探究。免疫调控过程中是否存在免疫细胞间的相互作用仍需体内实验验证。在后续的实验, MTAP 在 PCa 中的机制相关研究和动物实验将是本研究的重点。

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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] Li J, Xu CL, Lee HJ, et al. A genomic and epigenomic atlas of prostate cancer in Asian populations[J]. Nature, 2020, 580(7801): 93-99.
- [3] Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941[J]. J Urol, 2002, 168(1): 9-12.
- [4] Crawford ED, Higano CS, Shore ND, et al. Treating patients with metastatic castration resistant prostate cancer: a comprehensive review of available therapies[J]. J Urol, 2015, 194(6): 1537-1547.
- [5] James ND, Sydes MR, Clarke NW, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial[J]. Lancet, 2016, 387(10024): 1163-1177.

- [6] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26):2443-2454.
- [7] Nobori T, Takabayashi K, Tran P, et al. Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(12):6203-6208.
- [8] Lubin M, Lubin A. Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: a novel strategy[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5):e5735.
- [9] Williams-Ashman HG, Seidenfeld J, Galletti P. Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine[J]. *Biochem Pharmacol*, 1982, 31(3):277-288.
- [10] Christopher SA, Diegelman P, Porter CW, et al. Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6639-6644.
- [11] Hustinx SR, Hruban RH, Leoni LM, et al. Homozygous deletion of the *MTAP* gene in invasive adenocarcinoma of the pancreas and in periampullary cancer: a potential new target for therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(1):83-86.
- [12] Su CY, Chang YC, Chan YC, et al. *MTAP* is an independent prognosis marker and the concordant loss of *MTAP* and p16 expression predicts short survival in non-small cell lung cancer patients[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2014, 40(9):1143-1150.
- [13] Affronti HC, Rowsam AM, Pellerite AJ, et al. Pharmacological polyamine catabolism upregulation with methionine salvage pathway inhibition as an effective prostate cancer therapy[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):52.
- [14] Montironi R, Cimadamore A, Lopez-Beltran A, et al. Morphologic, molecular and clinical features of aggressive variant prostate cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(5):1073.
- [15] Wu YQ, Liu XB, Qin ZZ, et al. Low-frequency ultrasound enhances chemotherapy sensitivity and induces autophagy in PTX-resistant PC-3 cells via the endoplasmic reticulum stress-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:5621-5630.
- [16] Humphrey PA. Histopathology of prostate cancer[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7(10):a030411.
- [17] Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, et al. Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells[J]. *Cells*, 2019, 8(1):74.
- [18] Bertino JR, Waud WR, Parker WB, et al. Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (*MTAP*) activity: current strategies[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(7):627-632.
- [19] Marcé S, Balagué O, Colomo L, et al. Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(12):3754-3761.
- [20] Krasinskas AM, Bartlett DL, Cieply K, et al. *CDKN2A* and *MTAP* deletions in peritoneal mesotheliomas are correlated with loss of p16 protein expression and poor survival[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(4):531-538.
- [21] Huang HY, Li SH, Yu SC, et al. Homozygous deletion of *MTAP* gene as a poor prognosticator in gastrointestinal stromal tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(22):6963-6972.
- [22] Collins CC, Volik SV, Lapuk AV, et al. Next generation sequencing of prostate cancer from a patient identifies a deficiency of methylthioadenosine phosphorylase, an exploitable tumor target[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(3):775-783.
- [23] Williams-Ashman HG, Canellakis ZN. Polyamines in mammalian biology and medicine[J]. *Perspect Biol Med*, 1979, 22(3):421-453.
- [24] Harrison GA. The approximate determination of spermine in single human organs[J]. *Biochem J*, 1933, 27(4):1152-1156.
- [25] Pegg AE, Lockwood DH, Williams-Ashman HG. Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth[J]. *Biochem J*, 1970, 117(1):17-31.
- [26] Kirovski G, Stevens AP, Czech B, et al. Down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (*MTAP*) induces progression of hepatocellular carcinoma via accumulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (*MTA*) [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(3):1145-1152.
- [27] 顾伟杰, 朱 耀. 2022 版《CSCO 前列腺癌诊疗指南》更新要点解读[J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2022, 14(3):224-232.
- Gu WJ, Zhu Y. Update and interpretation of the 2022 guidelines for the diagnosis and treatment of prostate cancer by Chinese society of clinical oncology (CSCO)[J]. *Chin J Surg Oncol*, 2022, 14(3):224-232.
- [28] Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(3):133-150.
- [29] Kruger S, Ilmer M, Kobold S, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019—latest trends[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):268.
- [30] Henrich FC, Singer K, Poller K, et al. Suppressive effects of tumor cell-derived 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine on human T cells[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(8):e1184802.
- [31] Poli A, Michel T, Thérésine M, et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset[J]. *Immunology*, 2009, 126(4):458-465.

(责任编辑:李青颖)