

PRELP 在消化道恶性肿瘤中的表达及与预后的相关性

王盈盈¹, 耿建磊², 刘文博¹, 张明明³, 宋步云¹, 王冰雨¹, 贾楠¹, 檀碧波¹

(1. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050011; 2. 河北省儿童医院, 河北 石家庄 050011; 3. 河北省人民医院, 河北 石家庄 050051)

摘要: [目的] 观察脯氨酸/富亮氨酸末端富亮氨酸重复序列蛋白 (purine-arginine-rich and leucine-rich protein, PRELP) 在消化道恶性肿瘤中的表达及与预后的相关性, 并探讨其在肿瘤微环境中与免疫浸润、免疫调节的关系。[方法] 从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库和 GTEx 数据库获取 PRELP 在 4 种消化道肿瘤 (食管癌、胃腺癌、结肠腺癌和直肠腺癌) 中的 RNA 表达数据, 并分析 PRELP 差异表达情况。分析 PRELP 与肿瘤预后的相关性并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。使用 STRING 数据库进行蛋白互作分析。对差异基因进行功能富集分析, 探索生物功能和潜在通路。使用 CIBERSORT 计算 4 种癌症免疫细胞丰度, 并对其与 PRELP 表达进行相关性分析。应用皮尔森相关性检验计算 PRELP 基因表达与免疫检查点基因表达相关性。通过 qRT-PCR 验证 PRELP 在不同消化道肿瘤临床样本中癌组织与癌旁组织的差异表达。[结果] PRELP 在 4 种消化道肿瘤中的表达均低于正常组织 ($P < 0.001$)。PRELP 高表达与胃腺癌、结肠腺癌、直肠腺癌的不良预后有关 (P 均 < 0.05), 而其低表达则与食管癌的不良预后有关 ($P < 0.05$)。PRELP 水平与肿瘤免疫功能、免疫细胞丰度及免疫检查点表达水平相关。此外, qRT-PCR 证实 PRELP 在癌组织与癌旁组织间的表达存在显著差异。[结论] PRELP 与消化道恶性肿瘤临床预后相关, 并在肿瘤微环境中与免疫浸润、免疫检查点表达呈显著相关性, PRELP 可能作为多种消化道肿瘤潜在的新的生物标志物和治疗靶点。
关键词: 脯氨酸/富亮氨酸末端富亮氨酸重复序列蛋白; 消化道肿瘤; 预后
中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2024)10-0840-07
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2024.10.B007

Expression of Purine-Arginine-Rich and Leucine-Rich Protein in Gastrointestinal Malignant Tumors and Its Correlation with Prognosis Based on Bioinformatic Analysis

WANG Yingying¹, GENG Jianlei², LIU Wenbo¹, ZHANG Mingming³, SONG Buyun¹, WANG Bingyu¹, JIA Nan¹, TAN Bibo¹

(1. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Hebei Children's Hospital, Shijiazhuang 050011, China; 3. Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of purine-arginine-rich and leucine-rich protein (PRELP) in gastrointestinal malignant tumors and explore its correlation with prognosis of patients. [Methods] The RNA expression data of PRELP in four gastrointestinal malignant tumors (esophageal cancer, stomach adenocarcinoma, colon adenocarcinoma and rectal adenocarcinoma) were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and GTEx database, and then the differential expression of PRELP were analyzed. The correlation between PRELP expression and tumor prognosis was analyzed with Kaplan-Meier survival curve. Protein-protein interaction analysis was performed using the STRING database. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes was conducted to explore biological function and potential pathways. Immune cell abundance was calculated for four tumors by CIBERSORT and the association with PRELP expression was performed. Pearson correlation test was applied to analyze the correlation between PRELP and immune checkpoint gene expression. The differential expression of PRELP in cancer and adjacent tissues in different gastrointestinal malignant tumors was verified by qRT-PCR. [Results] The ex-

基金项目: 河北省科技厅重点研发计划 (22377701D); 河北医科大学“十四五”临床医学创新研究团队支持计划 (2022LCTD-A13); 河北省 2022 年政府资助省级医学优秀人才项目 (冀财预复[2022] 180 号); 河北省 2023 年度医学科学研究课题 (20230123); 2022 年度河北省医学适用技术跟踪项目 (GZ2022044)

通信作者: 檀碧波, E-mail: tanbibibo@hebm.edu.cn

收稿日期: 2024-03-14; **修回日期:** 2024-06-16

pression of PRELP was significantly lower in four gastrointestinal malignant tumors than that in normal tissues ($P<0.001$), and high PRELP expression was associated with poor prognosis in stomach adenocarcinoma, colon adenocarcinoma and rectal adenocarcinoma (all $P<0.05$), whereas low PRELP expression was associated with poor prognosis in esophageal cancer ($P<0.05$). PRELP expression was associated with tumor immune function, immune cell abundance, and immune checkpoint expression. In addition, the difference of PRELP expression between cancerous and paracancerous tissues was confirmed by qRT-PCR results. [Conclusion] PRELP is related to clinical prognosis of gastrointestinal malignant tumors and shows a significant correlation with immune infiltration and immune checkpoint expression in the tumor microenvironment. PRELP may serve as a potential biomarker and therapeutic target for various gastrointestinal malignant tumors.

Subject words: purine-arginine-rich and leucine-rich protein; gastrointestinal neoplasms; prognosis

脯氨酸/富亮氨酸末端富亮氨酸重复序列蛋白(purine-arginine-rich and leucine-rich protein,PRELP)是细胞外基质(extracellular matrix,ECM)中存在的外分泌蛋白-小的富含亮氨酸蛋白聚糖(small leucine rich proteoglycan,SLRP)家族的成员。最初,SLRP 通过与各种胶原结合,被认为是构成和维持ECM 组织结构的重要分子;事实上,PRELP 是在细胞外基质成分和基底膜之间的分子锚。先前的研究发现,PRELP 通过调控硫酸软骨素和膜联蛋白 2 抑制破骨细胞进入融合前破骨细胞,并降低核因子- κ B 转录因子的活性,可作为破骨细胞拮抗剂参与骨骼系统的发育^[1]。不仅如此,近年研究发现 SLRP 可与配体、受体、细胞因子结合从而调控包括 Wnt/转化生长因子- β 和表皮生长因子受体在内的多种信号通路^[2];N-末端结构域的 PRELP 与整合素蛋白结合可诱导成纤维细胞黏着斑形成,促进成纤维细胞黏附^[3];此外,多项研究发现 PRELP 的转录表达水平在许多类型的癌症中下调,被视为肿瘤细胞生长的抑制分子^[4],并在视母细胞瘤^[5]、膀胱癌^[6]中发现 PRELP 表达与细胞间黏附和上皮间质转化有关;Hong 等^[7]对 PRELP 在肝癌中的作用进行研究,结果发现过表达 PRELP 与较好的预后有关,并且可抑制肝癌细胞的增殖和迁移,但在肝癌中 PRELP 多处于低表达状态。消化道恶性肿瘤包括食管癌、胃癌、结直肠癌等在胃肠道内的癌种,其起病隐匿,早期难以发现,发现时多已经丧失根治性手术机会,是全球常见的癌症死亡原因之一^[8]。因此寻找与消化道肿瘤诊断与预后相关的新的预测性生物标志物仍值得深入研究。在消化道肿瘤中,PRELP 的作用和相关分子机制尚未完全阐明。本研究探讨 PRELP 在消化道

恶性肿瘤中的表达,并分析 PRELP 与消化道恶性肿瘤的预后、免疫细胞浸润、免疫调节的关系,以期为消化道恶性肿瘤的早期诊断和治疗提供新的生物标志物和靶点。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究纳入了 2023 年 1—6 月在河北医科大学第四医院普通外科接受根治性手术的 4 种消化道恶性肿瘤[结肠腺癌(colon adenocarcinoma,COAD)、食管癌(esophageal carcinoma,ESCA)、胃腺癌(stomach adenocarcinoma,STAD)、直肠腺癌(rectal adenocarcinoma,READ)]患者各 16 例。所有癌种的诊断经术后病理证实;无一例患者接受术前化疗、放疗、免疫治疗或中药治疗,或发生第二次肿瘤。从每例患者术后标本中取出相同大小的肿瘤组织和相应的癌旁组织,在液氮中快速冷冻,并储存在 -80°C 冰箱中。本研究经河北医科大学第四医院医学伦理委员会批准(批件号:2019ME0039)。

1.2 表达数据获取与差异表达分析

数据收集和分析癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)(<http://cancergenome.nih.gov/>)和基因型组织表达(GTEX)(<https://gtexportal.org/home/>)临床泛癌数据下载来自加州大学圣克鲁斯分校(UCSC) Xena 数据库(<https://xenabrowser.net/datapages/>),数据包括 COAD、ESCA、STAD 和 READ。为了评估 PRELP 表达,肿瘤组织取自 TCGA 数据库,正常组织来自 TCGA 和 GTEx 数据库。采用 R 包

“limma”识别差异表达基因,校正后 $P < 0.05$ 。

1.3 生存分析

使用 R 包“survival”和“survminer”进行生存分析。对 PRELP 的基因表达识别最佳切割点,并通过 Kaplan-Meier 生存曲线比较这两个子集之间的生存差异。使用 Log-rank 检验评估统计差异。

1.4 PRELP 相关蛋白互作网络及功能富集分析

使用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 筛选与 PRELP 基因相关蛋白并绘制蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络图; 使用 Metascape (<https://metascape.org/>) 进行基因本体论 (GO) 及反应途径 (Reactome) 的分析。应用 PRELP 表达值中位数将 4 种消化道恶性肿瘤的肿瘤样本分为高低表达两组, 识别差异表达基因 ($FDR < 0.01$, $|\log \text{Fold-Change}| > 2$), 应用 Metascape 对差异基因进行功能富集分析。

1.5 PRELP 与免疫微环境相关

PRELP 与免疫细胞丰度相关性: 为了评估免疫浸润细胞的相对丰度, CIBERSORT (<https://cibersort.stanford.edu/>) 利用线性支持向量回归原理对免疫细胞亚型表达矩阵进行去卷积, 其将归一化的基因表达矩阵转换为浸润免疫细胞的丰度。我们过滤出 CIBERSORT 输出 $P > 0.05$ 的样本, 以准确预测免疫细胞组成。应用 Spearman 相关性分析探索 PRELP 表达与浸润免疫细胞的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

PRELP 与免疫检查点基因表达相关性: 免疫检查点是免疫细胞表面激活和抑制信号通路的调节分子, 既往多项研究表明免疫检查点相关基因在肿瘤的免疫逃逸中发挥关键作用, 免疫检查点抑制剂在免疫治疗中有重要作用^[9-10]。应用 Pearson 相关性检验 ($P < 0.05$) 计算 PRELP 基因表达与免疫检查点基因表达相关性。

1.6 qRT-PCR

使用 Trizol 一步法从临床样本组织或细胞中提取总 RNA; 采用分光光度法测量提取的 RNA 的纯度和浓度。将总 RNA (2 μg) 逆转录合成模板 cDNA (逆转录反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min)。然后进行 qPCR 反应, qPCR 反应体系包括 Genesee® qPCR SYBR® Green Master Mix (10 μL), Forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$) (0.5 μL), Reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$)

(0.5 μL), 50 $\times$ ROX Reference Dye 2 (0.5 μL), 模板 DNA (2 μL), 灭菌蒸馏水 (6.5 μL), 总体系 20 μL 。进行 qRT-PCR 反应。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算目标基因, GAPDH 作为内部参考基因。检测 4 种消化道恶性肿瘤组织与相应癌旁组织中的 PRELP mRNA 表达水平。

1.7 统计学处理

使用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行数据分析。PRELP 在临床样本组织中表达的吸光度值数据均不符合正态分布, 以中位数和四分位距表示, 两样本间比较采用 Man-Whitney U 非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PRELP 在消化道恶性肿瘤组织与正常组织中表达差异分析

评估来自 TCGA 和 GTEx 泛癌数据中 PRELP 在消化道恶性肿瘤的表达, 结果显示 PRELP 在 COAD、ESCA、STAD 和 READ 肿瘤组织与正常组织中存在差异表达, 且在肿瘤组织中呈现出低表达状态 ($P < 0.001$) (Figure 1)。

2.2 PRELP 表达与消化道恶性肿瘤患者预后的关系

在 TCGA 队列中分析 PRELP 表达与总生存时间 (overall survival, OS) 的关系。结果显示 PRELP 高表达在 ESCA ($P = 0.01$) 中有更好的 OS。然而, 在 COAD、STAD 和 READ 中, PRELP 高表达均与较差的 OS 相关 (P 均 < 0.05) (Figure 2)。PRELP 表达有可能成为各种消化道恶性肿瘤的预后生物标志物。

2.3 PRELP 相关蛋白互作网络及功能富集分析

为研究 PRELP 基因在肿瘤发生及进展中的分子机制, 使用 STRING 数据库筛选已知的 PRELP 相互作用蛋白, 得到 PRELP 与相互作用蛋白的网络图 (Figure 3A); 并对 PRELP 相互作用蛋白进行富集分析, 结果发现其与细胞外基质降解、非整合素膜-ECM 相互作用、整合素细胞表面相互作用等显著相关 (Figure 3B)。PRELP 功能富集分析结果显示, PRELP 与细胞外基质组成、炎症反应、细胞对生长因子刺激反应的调节明显相关 (Figure 3C)。

2.4 PRELP 与肿瘤免疫微环境相关

PRELP 与细胞丰度相关: 通过 cibersort 计算得出 4 种癌症中肥大细胞与树突状细胞丰度较高, 进

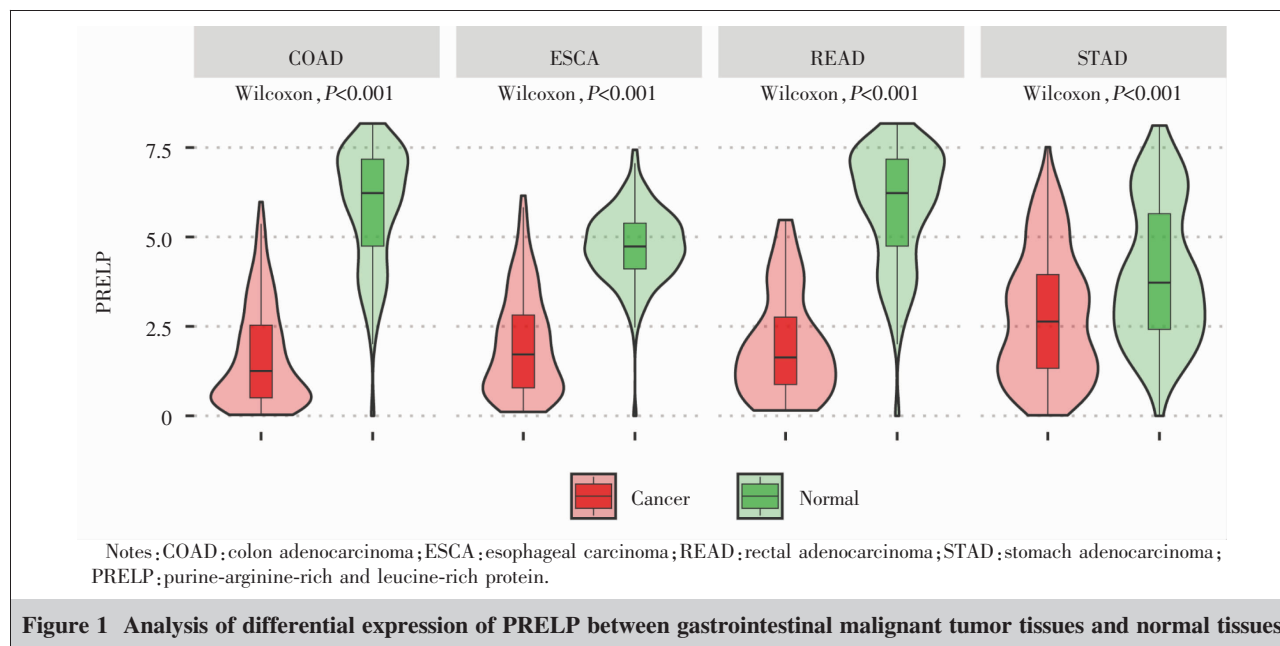


Figure 1 Analysis of differential expression of PRELP between gastrointestinal malignant tumor tissues and normal tissues

一步应用 Spearman 相关性分析两种免疫细胞与 PRELP 表达的相关性, 结果表明 PRELP 表达与肥大细胞和树突状细胞的活化均呈正相关 ($P < 0.001$) (Figure 4A)。

PRELP 与免疫检查点基因相关: 在筛选出的 31 个免疫检查点基因 (包括抗原呈递、细胞黏附、共刺激分子、免疫相关配体受体等) 中, PRELP 与这些免疫检查点基因在 4 种消化道恶性肿瘤中均表现出较强的相关性 (P 均 < 0.05) (Figure 4B)。

2.5 qPCR 验证 PRELP 在 4 种消化道恶性肿瘤中的表达

在 4 种消化道恶性肿瘤中, 与癌旁组织相比, PRELP 表达均呈下降趋势 ($P < 0.001$) (Table 1, Figure 5), 与 2.1 结果一致。

3 讨论

PRELP 在消化道恶性肿瘤中的表达及预后价值仍不清楚, 其具体发挥功能的机制也有待

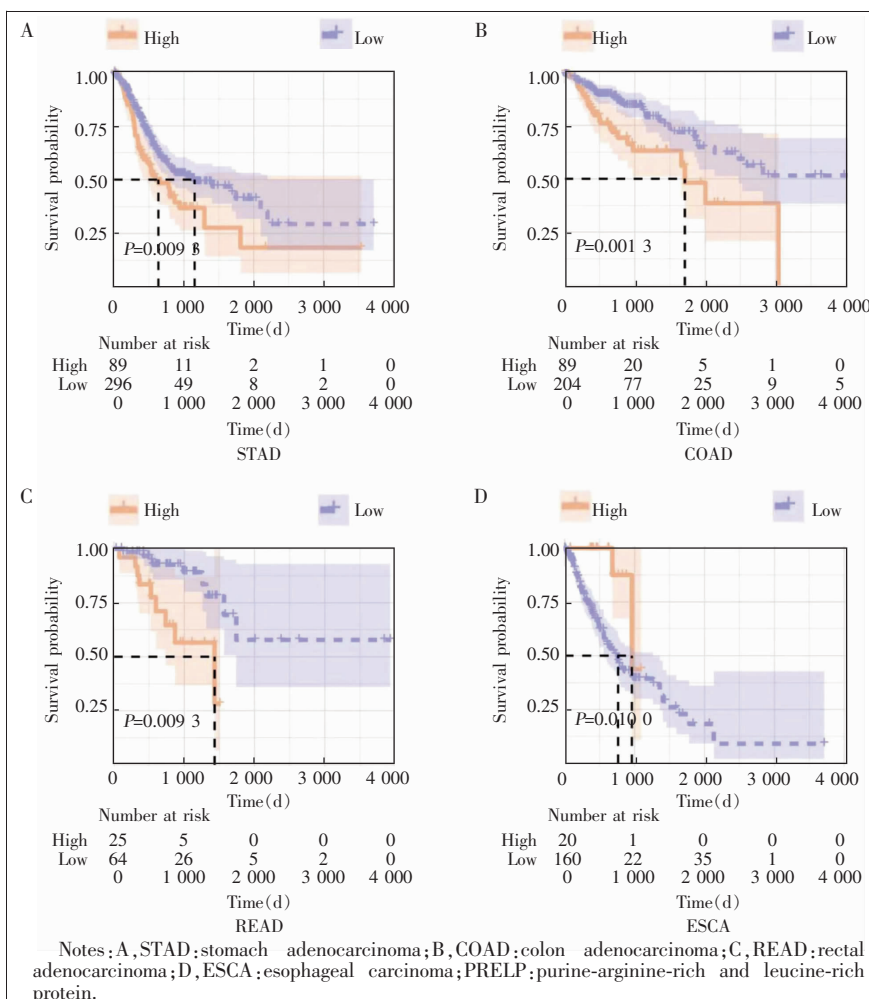
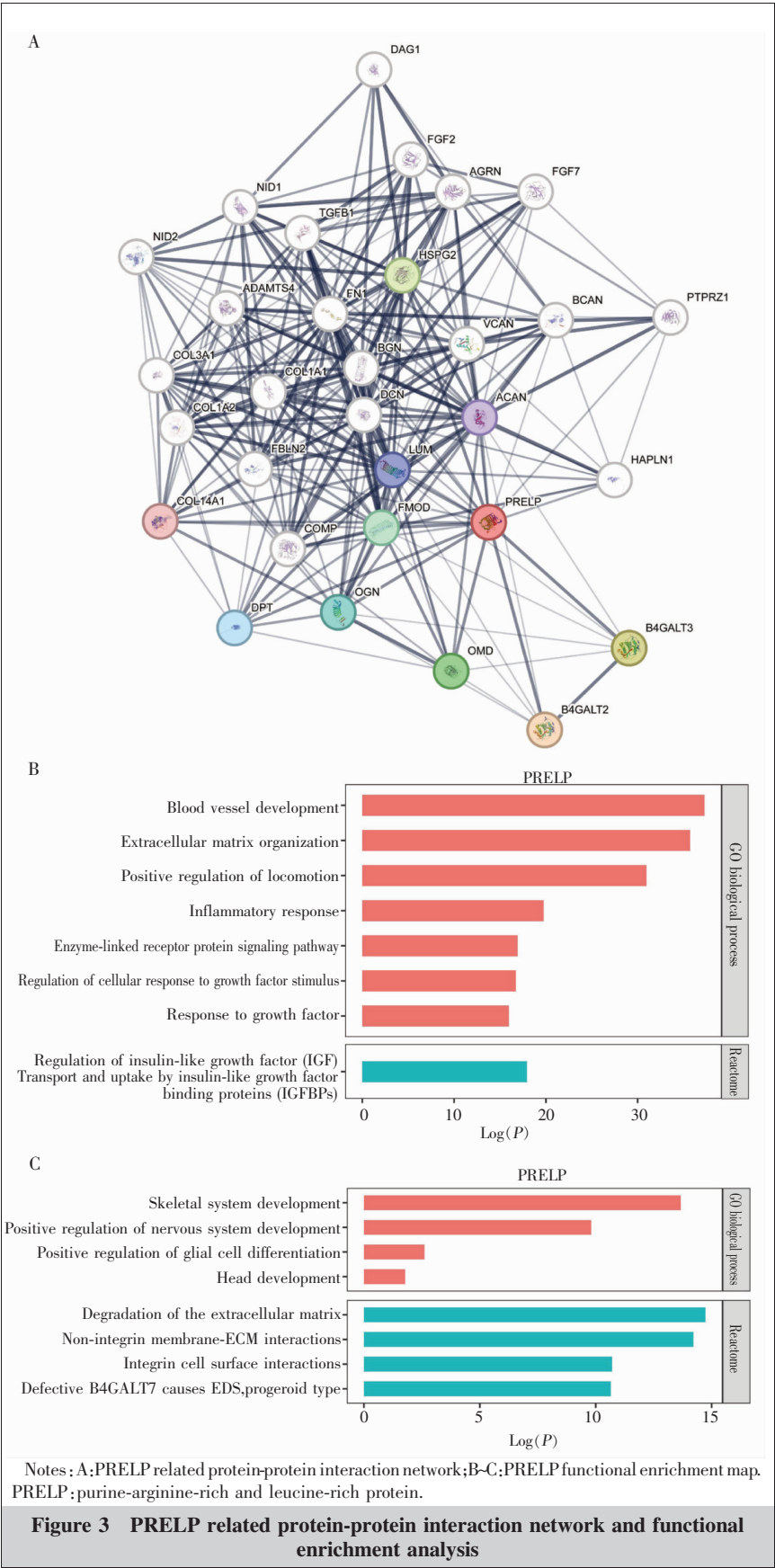


Figure 2 Correlation between PRELP and survival rate of gastrointestinal malignant tumor patients

明确。以往研究表明 PRELP 可抑制肿瘤的发生及进展,其基因在多种类型癌症中呈抑制状态(如视母细胞瘤^[5]、膀胱癌^[6,11]、肝细胞癌等),转录表达水平下调。研究发过表达 PRELP 通过抑制上皮间质转化和癌症相关基因及通路表达从而抑制视母细胞瘤的进展;在膀胱癌中,PRELP 通过同时抑制 TGF-β 和 EGF 两种信号通路抑制上皮间质转化的发生^[6]。此外,PRELP 与细胞膜蛋白胰岛素样生长因子 1 受体和低亲和力神经生长因子受体结合,在体外实验中可抑制肺癌细胞生长及形态^[12]。上述研究表明,PRELP 作为一种肿瘤抑制分子发挥作用,并可作为肿瘤预后的标志物。

本研究首先从数据库获得泛癌 TCGA 和 GTEx 数据,研究 PRELP 的表达水平及其预后价值。结果显示,与正常组织比较,PRELP 在 4 种消化道恶性肿瘤中均呈低表达。进一步生存分析显示,PRELP 的低表达与 ESCA 的较差 OS 相关,而在 COAD、STAD 和 READ 中,PRELP 的高表达与较差的 OS 相关。这可能反映了不同癌症中 PRELP 的不同潜在功能和机制,同时可能由于 COAD、STAD 和 READ 几种癌症预后影响因素较多,PRELP 能否作为单一预后标志物仍存在争议。Kosuge 等^[12]的研究结果表明,PRELP 可与细胞膜表面蛋白结合从而发挥作用,本研究中的富集分析也证明了这一结果,并且 PRELP 相关蛋白与细胞外基质降解、非整合素膜-ECM 相互作用、整合素细胞表面相互作用等明显相关,具体的作用点还



需进一步研究;同时 PRELP 与细胞外基质组成、炎症反应、细胞对生长因子刺激反应的调节明显相关,表明 PRELP 可能与免疫功能调控有关。进一步进行免疫细胞浸润分析,发现 PRELP 表达与肥大细胞和树突状细胞的活化呈正相关,提示 PRELP 可能

通过影响这些免疫细胞浸润对免疫细胞功能产生影响,使得肿瘤免疫微环境发生变化,从而作用于肿瘤的发生及进展。本研究结果表明,PRELP 表达与患者预后、肿瘤免疫相关特征和肿瘤微环境中免疫细胞浸润均存在显著相关性,是癌症早期诊断和

治疗新的生物标志物。

但本研究仍存在不足与局限性。首先,研究中纳入的临床样本有限;其次本研究仅初步表明 PRELP 在 4 种消化道恶性肿瘤中的潜在功能,具体作用机制及其与免疫细胞功能调控间的关系仍需进一步实验验证,深入研究其中相关通路机制可能是未来的研究方向;再者,关于 PRELP 在 4 种消化道恶性肿瘤中发挥抑癌或促癌作用并未在文中深入探讨。

总之,PRELP 与消化道恶性肿瘤临床预后相关,并在肿瘤微环境中与免疫浸润、免疫检查点表达呈显著相关性,可能可作为多种消化道恶性肿瘤潜在的预后标志物以及治疗靶点。

参考文献:

[1] RUCCI N,CAPULLI M, VENTURA L,et al. Proline/ a rginine-rich end leucine-rich repeat protein N-terminus is a novel osteoclast antagonist that counteracts bone loss [J]. J Bone Miner Res,2013,28(9):1912-1924.

[2] DELLETT M,HU W,PA-PADAKI V,et al. Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and main-

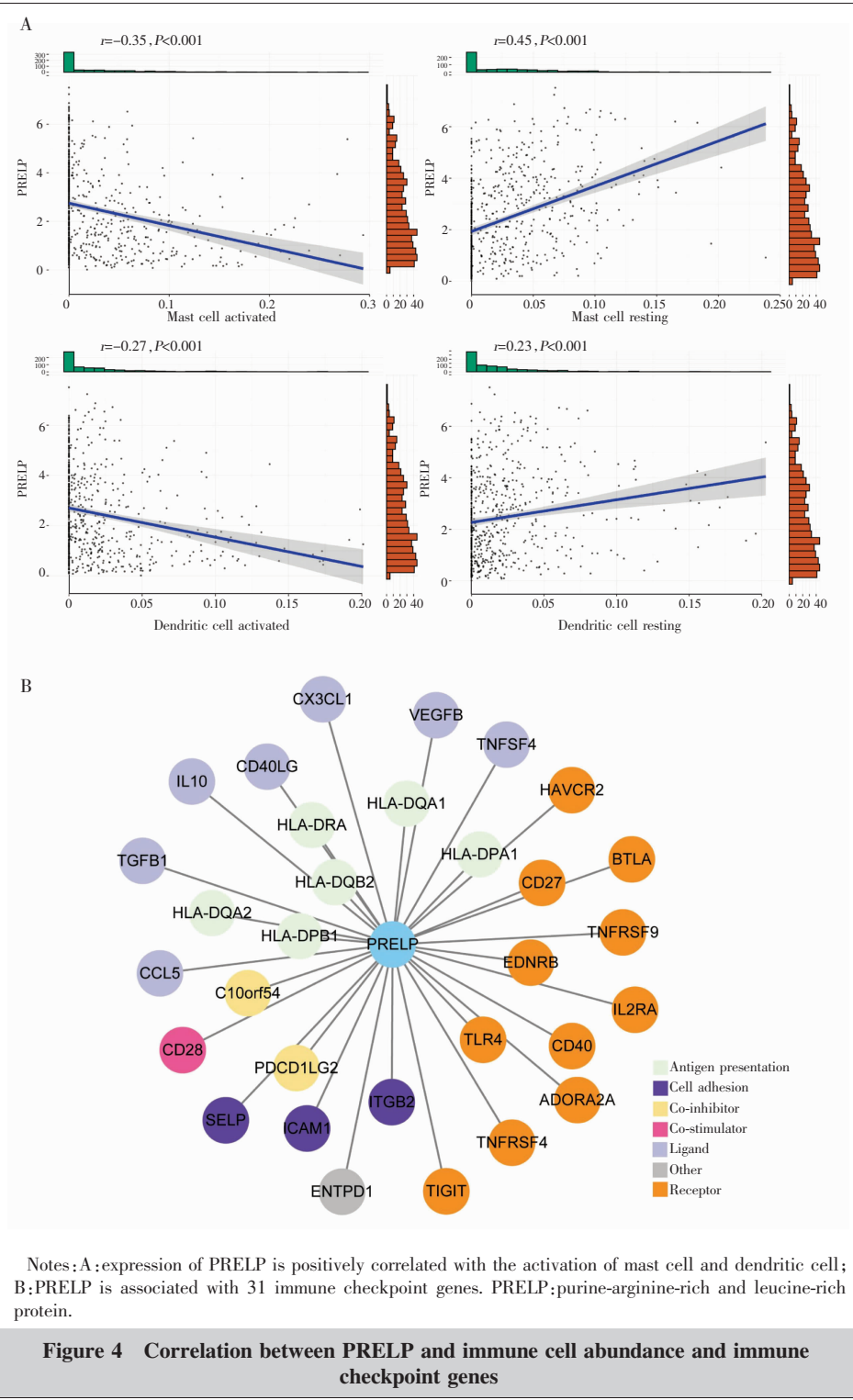
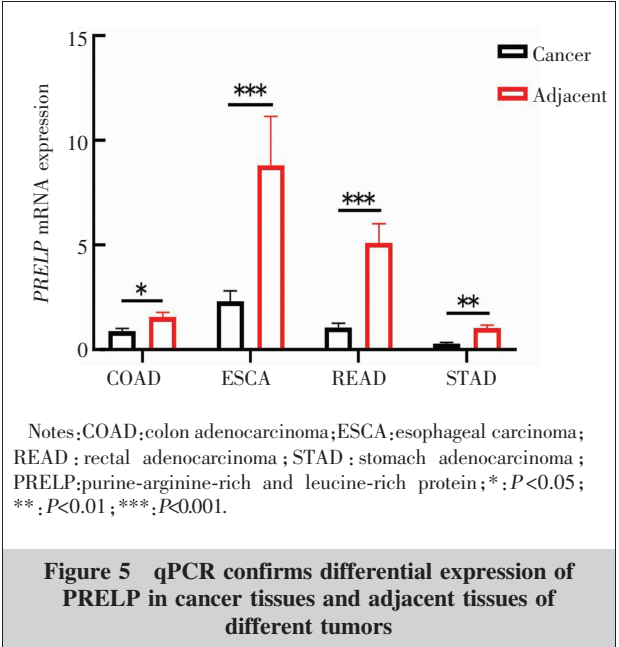


Table 1 Differential expression of PRELP in cancer tissues and adjacent tissues of different tumors

Group	PRELP[M(IQR)]	Z	P
COAD			
Cancer	0.87(0.57)	2.356	0.018
Adjacent	1.52(0.93)		
ESCA			
Cancer	1.52(1.61)	3.223	0.001
Adjacent	5.77(7.25)		
READ			
Cancer	0.90(0.86)	3.494	<0.001
Adjacent	4.00(4.57)		
STAD			
Cancer	0.86(0.46)	2.583	0.010
Adjacent	0.24(0.79)		

Notes: COAD: colon adenocarcinoma; ESCA: esophageal carcinoma; READ: rectal adenocarcinoma; STAD: stomach adenocarcinoma; PRELP: purine-arginine-rich and leucine-rich protein; M (IQR): median (interquartile range).



tenance[J]. Dev Growth Differ, 2012, 54(3): 327-340.

[3] BENGTSOON E, LINDBLOM K, TILLGREN V, et al. The leucine-rich repeat protein PRELP binds fibroblast cell-surface proteoglycans and enhances focal adhesion formation[J]. Biochem J, 2016, 473(9): 1153-1164.

[4] DOZEN A, SHOZU K, SHINKAI N, et al. Tumor suppressive role of the PRELP gene in ovarian clear cell carcinoma[J]. J Pers Med, 2022, 12(12): 1999.

[5] HOPKINS J, ASADA K, LEUNG A, et al. PRELP regulates cell-cell adhesion and EMT and inhibits retinoblastoma progression[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(19): 4926.

[6] PAPADAKI V, ASADA K, WATSON J K, et al. Two secreted proteoglycans, activators of urothelial cell-cell adhesion, negatively contribute to bladder cancer initiation and progression[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(11): 3362.

[7] HONG R, GU J, NIU G, et al. PRELP has prognostic value and regulates cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer, 2020, 11(21): 6376-6389.

[8] MIZRAHI J, PANT S. Immunotherapy in gastrointestinal malignancies[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1244: 93-106.

[9] ZHAO Y, BAI Y, SHEN M, et al. Therapeutic strategies for gastric cancer targeting immune cells: future directions[J]. Front Immunol, 2022, 13: 992762.

[10] CHU X, TIAN W, WANG Z, et al. Co-inhibition of TIGIT and PD-1/PD-L1 in cancer immunotherapy: mechanisms and clinical trials[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 93.

[11] SHOZU K, KANEKO S, SHINKAI N, et al. Repression of the PRELP gene is relieved by histone deacetylase inhibitors through acetylation of histone H2B lysine 5 in bladder cancer[J]. Clin Epigenetics, 2022, 14(1): 147.

[12] KOSUGE H, NAKAKIDO M, NAGATOISHI S, et al. Proteomic identification and validation of novel interactions of the putative tumor suppressor PRELP with membrane proteins including IGF1-R and p75NTR[J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100278.