

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.22.011

文章编号: 1005-8982 (2022) 22-0053-10

实验研究·论著

HAPLN3基因在肾透明细胞癌中的表达 及其与预后、免疫的关系*

张畅¹, 宋具昆², 袁东波², 陈伟明², 何虎¹, 钱城¹, 杨萌¹, 朱建国¹

(1. 贵州医科大学 研究生院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院 泌尿外科, 贵州 贵阳 550002)

摘要: **目的** 探讨透明质酸和蛋白多糖链接蛋白家族基因成员3(HAPLN3)在肾透明细胞癌(ccRCC)中的表达及其与预后、免疫的关系。**方法** 利用多个公共数据库分析HAPLN3在ccRCC中的差异表达、预后价值, 以及与肿瘤微环境、免疫细胞浸润、免疫检查点及免疫检查点阻断反应评分(TIDE)等的相关性, 并行富集分析HAPLN3在ccRCC中的潜在作用机制。通过免疫组织化学法检测HAPLN3蛋白在癌组织和癌旁组织中的表达, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和Western blotting检测ccRCC细胞株(OS-RC-2、ACHN)HAPLN3 mRNA和蛋白的表达。细胞转染siRNA沉默HAPLN3, 用qRT-PCR检测不同ccRCC细胞株中HAPLN3基因沉默的有效性。采用CCK-8法检测HAPLN3基因表达降低对不同ccRCC细胞株增殖的影响。**结果** 生物信息学分析结果表明, ccRCC中HAPLN3 mRNA相对表达量高于正常肾脏组织($P < 0.05$), 在不同WHO/ISUP分级的ccRCC中发现G4组HAPLN3 mRNA相对表达量高于G3组($P < 0.05$)。生存分析结果表明, HAPLN3高表达组总体生存率(OS)低于低表达组($P < 0.05$), 且G4组OS也低于G3组($P < 0.05$)。单因素Cox回归分析结果表明, HAPLN3高表达[HR=1.548 (95% CI: 1.325, 1.801)]、高龄[HR=1.029 (95% CI: 1.016, 1.042)]、高pT分期[HR=1.923 (95% CI: 1.632, 2.265)]、高pN分期[HR=3.425 (95% CI: 1.818, 6.456)]、高pTNM分期[HR=1.867 (95% CI: 1.638, 2.121)]、高Grade分级[HR=2.291 (95% CI: 1.870, 2.806)]是ccRCC患者不良预后的影响因素($P < 0.05$); 多因素Cox回归分析结果表明, HAPLN3高表达[HR=1.430 (95% CI: 1.144, 1.789)]、高龄[HR=1.006 (95% CI: 1.006, 1.043)]、高pTNM分期[HR=1.661 (95% CI: 1.205, 2.289)]、高Grade分级[HR=1.486 (95% CI: 1.070, 2.065)]是ccRCC患者不良预后的独立影响因素($P < 0.05$)。HAPLN3 mRNA相对表达量与B淋巴细胞、CD4⁺ T淋巴细胞、CD8⁺ T淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞浸润呈正相关($r_s = 0.284, 0.532, 0.584, 0.617, 0.323$ 和 0.620 , 均 $P = 0.000$)。G4组CTLA4、LAG3、PDCD1、TIGIT mRNA相对表达量和TIDE评分高于G3组($P < 0.05$)。GESA富集分析结果表明, HAPLN3在ccRCC中与多条免疫及肿瘤通路相关。癌组织HAPLN3阳性表达率高于癌旁组织($P < 0.05$)。OS-RC-2、ACHN细胞HAPLN3 mRNA和蛋白相对表达量高于HK-2细胞($P < 0.05$)。si-NC组、si-HAPLN3组不同时间点OS-RC-2、ACHN细胞的OD值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点OS-RC-2、ACHN细胞的OD值有差异($F = 481.158$ 和 292.321 , 均 $P = 0.000$); ②两组OS-RC-2、ACHN细胞的OD值有差异($F = 27.471$ 和 255.219 , 均 $P = 0.002$); ③两组OS-RC-2、ACHN细胞的OD值变化趋势有差异($F = 20.799$ 和 11.301 , $P = 0.017$ 和 0.040)。 **结论** HAPLN3在ccRCC中表达上调, 并与肿瘤细胞增殖相关, 可能是ccRCC患者的独立预后标志物, 并有作为免疫治疗靶点的潜在价值。

关键词: 肾透明细胞癌; HAPLN3; 差异表达; 免疫浸润细胞; 生物信息学分析

中图分类号: R737.11

文献标识码: A

Expression of HAPLN3 gene in clear cell renal cell carcinoma and

收稿日期: 2022-04-16

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 82160551); 贵州省科技计划项目(No: 黔科合基础[2019]1203号); 贵州省高层次创新型人才项目(No: 黔科合平台人才[2018]5639); 贵阳市科技计划项目(No: 筑科合同[2019]2-15号)

[通信作者] 朱建国, E-mail: doctorzhujianguo@163.com; Tel: 18984123435

its prognostic and immunological implications*

Chang Zhang¹, Ju-kun Song², Dong-bo Yuan², Wei-ming Chen², Hu He¹,
Cheng Qian¹, Meng Yang¹, Jian-guo Zhu¹

(1. Graduate School of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of Urology, People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and prognostic value of hyaluronan and proteoglycan link protein 3 (HAPLN3) in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). **Methods** Multiple public databases were used to analyze the expression and prognostic value of HAPLN3 in ccRCC, to explore the correlations of HAPLN3 expression with tumor microenvironment, immune cell infiltration and Tumor Immune Dysfunction and Exclusion (TIDE) score, and to determine the potential pathogenic mechanisms of HAPLN3 in ccRCC via enrichment analysis. The expressions of HAPLN3 in ccRCC tissues and adjacent tissues were detected by immunohistochemistry, and the mRNA and protein expressions of HAPLN3 in different ccRCC cell lines (OS-RC-2 and ACHN) were detected by qRT-PCR and Western blotting. The cell lines were transfected with specific small interfering RNA to silence the expression of HAPLN3, and the effectiveness of HAPLN3 gene silencing in different ccRCC cell lines was detected by qRT-PCR. In addition, CCK-8 assay was performed to determine the effects of HAPLN3 gene silencing on the proliferation of different ccRCC cell lines. **Results** The bioinformatic analysis showed that the mRNA expression of HAPLN3 in ccRCC was significantly higher than that in normal kidney tissues ($P < 0.05$). In ccRCC with different WHO/ISUP grades, it was found that the expression of HAPLN3 in G4 group was significantly higher than that in G3 group ($P < 0.05$). Kaplan-Meier survival curve exhibited that high expression of HAPLN3 significantly shortened overall survival (OS) ($P < 0.05$), and that the OS of the G4 group was significantly shorter than that of the G3 group ($P < 0.05$). Univariate regression analysis showed that high HAPLN3 expression [$\hat{HR} = 1.548$ (95% CI: 1.325, 1.801)], advanced age [$\hat{HR} = 1.029$ (95% CI: 1.016, 1.042)], high pT stage [$\hat{HR} = 1.923$ (95% CI: 1.632, 2.265)], high pN stage [$\hat{HR} = 3.425$ (95% CI: 1.818, 6.456)], high pTNM stage [$\hat{HR} = 1.867$ (95% CI: 1.638, 12.12)], and high tumor grade [$\hat{HR} = 2.29$ (95% CI: 1.870, 2.806)] were risk factors for poor prognosis of ccRCC patients ($P < 0.05$). The multivariable regression analysis demonstrated that high HAPLN3 expression [$\hat{HR} = 1.430$ (95% CI: 1.144, 1.789)], advanced age [$\hat{HR} = 1.006$ (95% CI: 1.006, 1.043)], high pTNM stage [$\hat{HR} = 1.661$ (95% CI: 1.205, 2.289)], and high tumor grade [$\hat{HR} = 1.486$ (95% CI: 1.070, 2.065)] were independent poor prognostic factors ($P < 0.05$). The mRNA expression of HAPLN3 was positively correlated to the infiltration of B cells, CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, neutrophils, macrophages, and dendritic cells ($r_s = 0.284, 0.532, 0.584, 0.617, 0.323$ and 0.620 , all $P = 0.000$). The mRNA expressions of CTLA4, LAG3, PDCD1, and TIGIT in the G4 group were higher than those in the G3 group ($P < 0.05$). The TIDE score of the G4 group was also higher than that of the G3 group ($P < 0.05$). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showed that HAPLN3 was associated with multiple immune and tumor pathways in ccRCC. Immunohistochemistry showed that HAPLN3 was highly expressed in ccRCC tissues compared with adjacent tissues ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of HAPLN3 in ccRCC cell lines OS-RC-2 and ACHN were higher than those in HK-2 cells ($P < 0.05$). As demonstrated by the CCK-8 assay, the OD values of OS-RC-2 and ACHN cells from si-NC group and si-HAPLN3 group among distinct time points were compared via the repeated measures ANOVA, which revealed that the OD values of OS-RC-2 and ACHN cells were different among the time points ($F = 481.158$ and 292.321 , both $P = 0.000$) and between the two groups ($F = 27.471$ and 255.219 , both $P = 0.002$), and that the change trends of OD values of OS-RC-2 and ACHN cells were different between the two groups ($F = 20.799$ and 11.301 , $P = 0.017$ and 0.040). **Conclusions** HAPLN3 is upregulated in ccRCC and correlated with tumor proliferation. It may be an independent prognostic marker for ccRCC patients and a potential target for immunotherapy.

Keywords: clear cell renal cell carcinoma; HAPLN3; differential expression; immune infiltrating cells; bioinformatic analysis

肾癌起源于肾小管上皮细胞,占成人恶性肿瘤的2%~3%,其发病率以每年约2.5%的速度上升,

2021 年美国新发 7 万多例肾癌病例和 2 万多例死亡病例^[1]。肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 是最常见的组织学类型,占肾癌的 80%~90%^[2]。不同时期 ccRCC 患者生存率差异较大,其中分化差或已有转移的 ccRCC 患者总体生存率普遍较低^[3]。多项研究报道,1/3 的局限性 ccRCC 患者出现术后复发或转移,单纯手术治疗、放疗及化疗效果均不佳^[4-5]。欧洲泌尿外科协会临床指南将免疫检查点抑制剂作为晚期转移性 ccRCC 的一线治疗^[6]。ccRCC 免疫检查点抑制剂主要通过程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4), 维护 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤力^[7]。

透明质酸和蛋白多糖链接蛋白家族基因成员 3 (hyaluronan and proteoglycan link protein 3, HAPLN3) 分子量为 40 894 Da,其编码的蛋白是透明质酸和蛋白多糖链接蛋白基因家族成员,包含 360 个氨基酸,在人体各组织中广泛表达,主要存在于细胞外基质。该蛋白具有促进癌细胞迁移、诱导血管化、促进肿瘤生长的作用。而由透明质酸与蛋白多糖组成的细胞外基质,对肿瘤细胞的黏附、迁移、增殖、分化和存活等方面均有影响^[8]。

既往研究表明,细胞外基质透明质酸和蛋白多糖在 ccRCC 的发展中起重要作用^[9]。HAPLN3 作为透明质酸与蛋白多糖的链接蛋白在肾癌中的作用显得尤为重要,然而 HAPLN3 与 ccRCC 的相关性未见报道。本文通过多个数据库进行分析,探讨 HAPLN3 在 ccRCC 中的差异表达、预后价值及免疫特征,分析 HAPLN3 在 ccRCC 中免疫及肿瘤相关通路的富集情况,以及 HAPLN3 基因表达降低对肾癌细胞株增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 组织标本

癌症基因组图谱分析 (the cancer genome atlas, TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 数据库下载时间为 2021 年 5 月,获取 530 个 ccRCC 患者及 72 个癌旁组织标本的 RNA 数据和相应的临床信息。由于 TCGA 数据库癌旁组织较少,将基因型-组织表达 (Genotype-Tissue Expression, GTEx) 数据库的正常组

组织标本加入对照。使用 GTEx 数据库 (<https://gtexportal.org/home/datasets>) V8 版本,下载 89 个正常肾脏组织的 RNA 数据。mRNA 相对表达量均为标准化处理后的数据,将 ccRCC 患者标本设为肿瘤组 (530 例)。以 HAPLN3 mRNA 中位数为截断点,将标本分为高表达组 (265 例)、低表达组 (265 例)。按 WHO/ISUP 分级系统中的 G3 级、G4 级,分为 G3 组 (206 例)、G4 组 (75 例)。最后将癌旁组织标本和正常组织标本作为正常组 (161 例)。临床资料不完整的患者,如 pMx 期不能使用,则作为缺失病例处理。

1.2 细胞培养

人肾近曲小管上皮细胞系 HK-2、肾透明细胞癌细胞系 OS-RC-2、ACHN 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。90% 基础培养基+10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)+1% 双抗配制成完全培养基,进行培养、传代,将细胞置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养。

1.3 主要试剂及仪器

基础培养基、FBS、双抗 (美国 Gibco 公司),BCA 蛋白定量试剂盒、SP 检测试剂盒 (北京索莱宝有限公司),放射免疫分析 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司),兔抗人 HAPLN3 多抗 (北京博奥森生物技术有限公司), β -tubulin 抗体 (美国 Affinity Biosciences 公司),山羊抗兔 IgG-HRP (美国 Abcam 公司),实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) Mix 试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司),RNA 试剂盒 (上海奕杉生物科技有限公司),Lipofectamine™ 2000 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司),CCK-8 (日本同仁化学研究所),快速封闭液 (英国 Genefist 公司),含干扰序列 si-HAPLN3 和 si-NC 质粒 (上海吉凯基因公司)。

二氧化碳细胞培养箱 (中国上海力申科学仪器有限公司),凝胶成像系统、qRT-PCR 仪、电泳槽、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司),酶标仪 (美国 Bio Tek Instruments 公司)。

1.4 方法

1.4.1 差异表达、生存分析及预后模型构建 使用 R 软件分析 HAPLN3 在肿瘤组与正常组中的 mRNA 差异表达,并进一步分析在 G3 组、G4 组及正常组中 mRNA 差异表达,“ggplot2”R 软件绘制箱线图。

“survival”“survminer”R软件绘制生存曲线,研究不同表达量HAPLN3对ccRCC生存率的影响,以及G4组、G3组不同亚组间生存差异。采用单变量和多变量Cox回归分析评估HAPLN3与5个主要因素的关系,包括年龄、pT分期、pN分期、pTNM分期、WHO分级。通过“forestplot”R软件绘制森林图,显示每个变量的HR、95% CI和P值。使用“rms”R软件构建列线图,预测1年、3年和5年总体生存率(overall survival, OS),计算出一致性指数(concordance index, C-index),绘制出校正曲线。采用Bootstrap法自抽样200次(B=200)验证,C指数越大,预测价值越高,校正曲线越接近45°斜线,说明预测值与观察值越接近。

1.4.2 免疫细胞浸润及免疫检查点分析 采用肿瘤免疫浸润数据库(Tumor Immune Estimation Resource, TIMER) 2.0 (<https://cistrome.shinyapps.io/TIMER2.0/>)分析HAPLN3与肿瘤浸润性免疫细胞(tumor-infiltrating immune cells, TIIC)的相关性。采用“immunedeconv”R软件中的TIMER 2.0算法分析ccRCC中HAPLN3与6种常见免疫细胞亚型浸润水平的相关性,使用XCELL算法评估免疫评分、基质评分及肿瘤微环境。使用“ggplot2”“pheatmap”和“immuneconv”R软件评估免疫检查点相关基因在G3组、G4组的mRNA相对表达量,以及HAPLN3与免疫检查点相关基因的共表达情况。使用JIANG等^[10]开发的肿瘤免疫功能障碍和排除(tumor immune dysfunction and exclusion, TIDE)算法预测免疫检查点阻断(immune checkpoint blockade, ICB)疗效,若TIDE评分高代表接受ICB治疗后生存期短。

1.4.3 基因富集分析 寻找ccRCC中潜在的HAPLN3相关信号通路。HAPLN3表达高表达组和低表达组使用基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) v3.0 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/downloads.jsp>)。本研究中 $P < 0.05$ 和 $FDR < 5\%$ 为差异有统计学意义。

1.4.4 免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)法检测HAPLN3的表达 选取2020年1月—2021年8月在贵州省人民医院泌尿外科行根治性肾切除的50例患者的癌组织和对应的癌旁组织标本。本研究获得医院伦理委员会批准并经患者同意后签署知情同意书。标本进行常规石蜡包埋,切片厚度约4 μm ,脱蜡,脱水,抗原修复,封闭,HAPLN3一抗(1:2 000)孵育过夜,羊抗兔IgG二抗(1:200)37℃孵育

30 min, DAB显色,苏木精复染,脱水,透明封片。显微镜下随机选取5个视野,由2位病理科医师独立进行评价。染色强度:无着色为0分,淡黄色为1分,黄褐色为2分,深褐色为3分。阳性细胞比例:<5%为0分;5%~25%为1分;>25%~50%为2分;>50%~75%为3分;>75%为4分。相乘得出最终结果,0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为阳性(++),9~12分为强阳性(+++)。根据IHC染色结果分为阴性表达(阴性和弱阳性)和阳性表达(阳性和强阳性)。

1.4.5 Western blotting检测HAPLN3蛋白的表达 取培养好的细胞,RIPA裂解,离心后收集上清液。根据BCA蛋白定量试剂盒说明书进行操作测定蛋白浓度。配置5%浓缩胶、10%分离胶进行上样电泳和转膜,快速封闭液封闭10 min,稀释 β -tubulin、HAPLN3后4℃孵育过夜。TBST洗涤3次,稀释二抗,室温孵育1 h, TBST洗涤3次,显影,采用Image J软件计算蛋白条带灰度值,进行半定量分析。目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/内参条带灰度值。

1.4.6 qRT-PCR检测HAPLN3 mRNA的表达 采用RNA试剂盒提取细胞RNA,然后在260 nm波长处测定吸光度值和RNA浓度,将RNA逆转录成cDNA。按照qRT-PCR Mix试剂盒说明书配置20 μL 反应体系:2 $\times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL ,正反向引物各0.5 μL ,模板DNA 1 μL ,补充ddH₂O至20 μL 。反应条件:95℃预变性30 s,95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环,熔解曲线按仪器默认条件。以 β -actin为内参,计算HAPLN3 mRNA相对表达量。HAPLN3正向引物:5'-AGGAGACCCTGTTCACCTACC-3',反向引物:5'-ACAGCTTCCACCATTTGACAC-3',引物长度111 bp; β -actin正向引物:5'-TCCTCTCCCAAGTCCACACA-3',反向引物:5'-GCACGAAGGCTCATCATTCA-3',引物长度129 bp。引物序列由上海生工生物工程有限公司设计合成。

1.4.7 细胞转染及CCK-8细胞增殖实验 取对数生长期OS-RC-2、ACHN细胞,根据Lipofectamine™ 2000试剂盒说明书,分别转染si-HAPLN3和si-NC。转染完成后qRT-PCR检测siRNA沉默效率。将构建成功的细胞胰酶消化后计数,等密度均匀接种于96孔板,100 μL /孔,细胞4 000个/孔,每组设置4个复

孔,分别于 0 h、24 h、48 h、72 h 加入 CCK-8 试剂,孵育 2 h 后用酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD),计算各组细胞存活率。

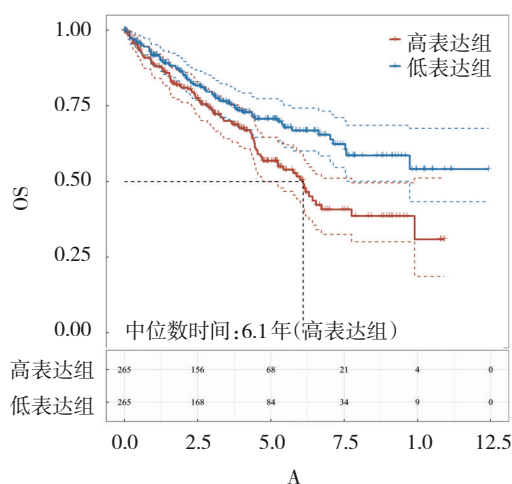
1.5 统计学方法

数据分析采用 Rv 4.0.3 和 GraphPad Prism v8.02 统计软件。计数资料以率(%)表示,比较用 χ^2 检验;正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 t 检验或方差分析,进一步两两比较用 LSD- t 检验;非正态分布的计量资料以中位数和四分位数 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,比较用秩和检验,进一步两两比较用 Dunn's t 检验;采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,比较用 Log-rank χ^2 检验;相关性分析用 Spearman 法;影响因素的分析用单因素和多因素 Cox 风险比例模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HAPLN3 mRNA 相对表达量比较及生存分析

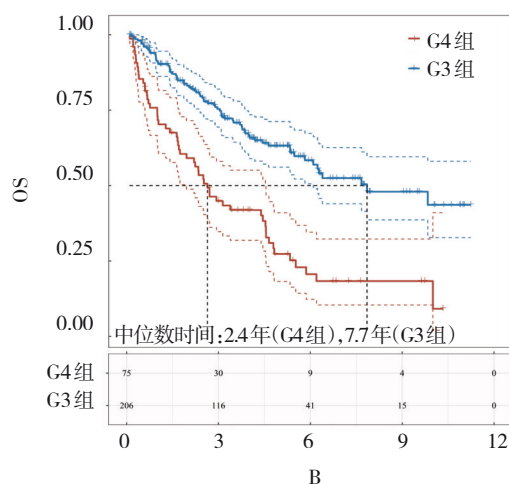
肿瘤组与正常组 HAPLN3 mRNA 相对表达量分



别为 3.138 (2.541, 3.748) 和 1.565 (1.137, 2.400), 经秩和检验,差异有统计学意义 ($H = 14153.000$, $P = 0.000$),肿瘤组高于正常组。

G4 组、G3 组、正常组 HAPLN3 mRNA 相对表达量分别为 4.081 (3.281, 4.755)、3.591 (2.923, 4.182) 和 1.565 (1.137, 2.400), 经秩和检验,差异有统计学意义 ($H = 208.342$, $P = 0.000$)。进一步两两比较结果: G4 组 HAPLN3 mRNA 相对表达量高于 G3 组、正常组 ($P < 0.05$), G3 组 HAPLN3 mRNA 相对表达量高于正常组 ($P < 0.05$)。

生存曲线结果显示, HAPLN3 高表达组与低表达组 OS 比较, 经 Log-rank χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.673$, $P = 0.003$), HAPLN3 高表达组 OS 低于低表达组, 提示 HAPLN3 基因高表达与 ccRCC 患者预后不良有关。G4 组与 G3 组 OS 比较, 经 Log-rank χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 33.063$, $P = 0.000$), G4 组 OS 组低于 G3 组, 提示高级别 ccRCC 可能预后更差。见图 1。



A: HAPLN3 高、低表达组生存曲线, $\hat{H}R(H)$ 为相对低表达组的风险系数; B: G4、G3 组生存曲线, $\hat{H}R(G4)$ 为相对 G3 组的风险系数。

图 1 各组 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线

2.2 临床特征的单因素和多因素分析

预后模型构建以 TCGA 数据库下载的肾癌患者年龄、临床分期、病理分级及 HAPLN3 表达为自变量, 总生存情况为因变量, 通过单因素及多因素 Cox 回归分析筛选肾癌预后的独立危险因素。单因素 Cox 回归分析结果表明, HAPLN3 高表达 [$\hat{H}R = 1.548$ (95% CI: 1.325, 1.801)], 高龄 [$\hat{H}R = 1.029$ (95% CI: 1.016, 1.042)], 高 pT 分期 [$\hat{H}R = 1.923$ (95% CI: 1.632, 2.265)],

高 pN 分期 [$\hat{H}R = 3.425$ (95% CI: 1.818, 6.456)], 高 pTNM 分期 [$\hat{H}R = 1.867$ (95% CI: 1.638, 12.12)], 高 Grade 分级 [$\hat{H}R = 2.291$ (95% CI: 1.870, 2.806)] 是 ccRCC 患者不良预后的影响因素 (均 $P = 0.000$)。

多因素 Cox 回归分析结果表明, HAPLN3 高表达 [$\hat{H}R = 1.430$ (95% CI: 1.144, 1.789), $P = 0.002$], 高龄 [$\hat{H}R = 1.006$ (95% CI: 1.006, 1.043), $P = 0.009$], 高 pTNM 分期 [$\hat{H}R = 1.661$ (95% CI: 1.205, 2.289), $P = 0.002$], 高

Grade 分级 [$\hat{HR}=1.486$ (95% CI: 1.070, 2.065), $P=0.018$] 是 ccRCC 患者不良预后的独立影响因素。

列线图结果表明, 用 HAPLN3 表达量、年龄、pTNM 分期、Grade 分级构建的预后模型可以较好地预测 ccRCC 患者的 1 年、3 年、5 年 OS, C 指数为 0.779 (95% CI: 0.729, 1.000) ($P=0.000$)。见图 2。

2.3 HAPLN3 mRNA 相对表达量与免疫细胞亚型

浸润水平的相关性

HAPLN3 mRNA 相对表达量与 B 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞浸润呈正相关 ($r_s=0.284, 0.532, 0.584, 0.617, 0.323$ 和 0.620 , 均 $P=0.000$) , 提示 HAPLN3 可能参与多种 ccRCC 免疫细胞浸润调节。见图 3。

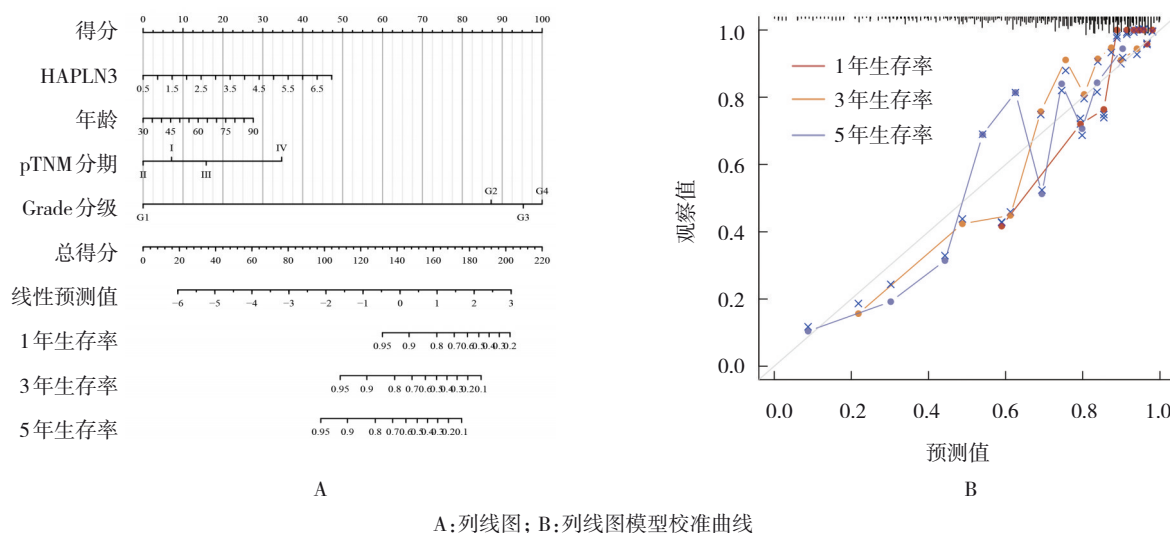


图 2 HAPLN3 联合相关临床特征构建的列线图及校正曲线

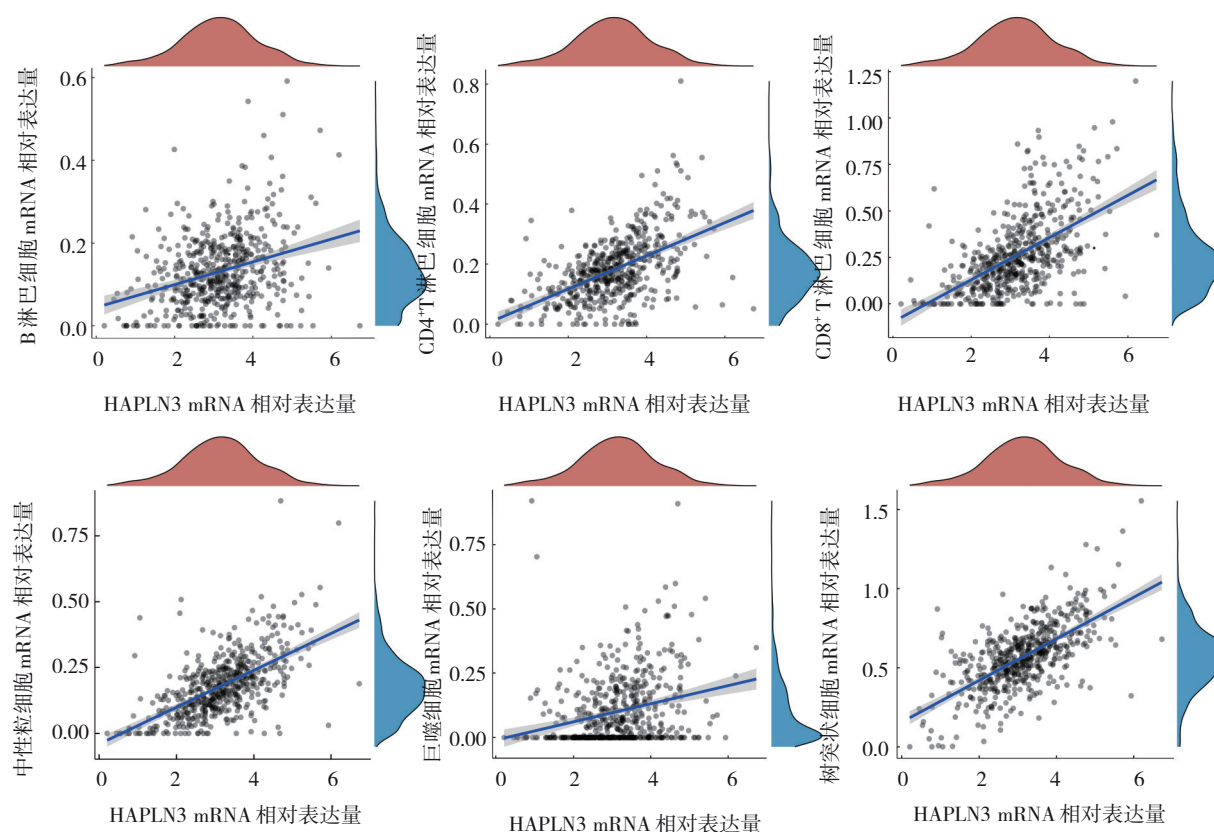


图 3 HAPLN3 mRNA 相对表达量与免疫细胞亚型浸润水平的相关性

2.4 *HAPLN3* 与免疫相关基因共表达分析及 ccRCC 免疫检查点分析

G4 组与 G3 组 CD274、HAVCR2、PDCD1LG2、SIGLEC15 mRNA 相对表达量比较,经 Wilcoxon 检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。G4 组与 G3 组 CTLA4、LAG3、PDCD1、TIGIT mRNA 相对表达量比较,差异有统计学意义($P<0.05$),G4 组高于 G3 组,提示高级别 ccRCC 更易形成免疫逃逸。见图 4、5 和表 1。

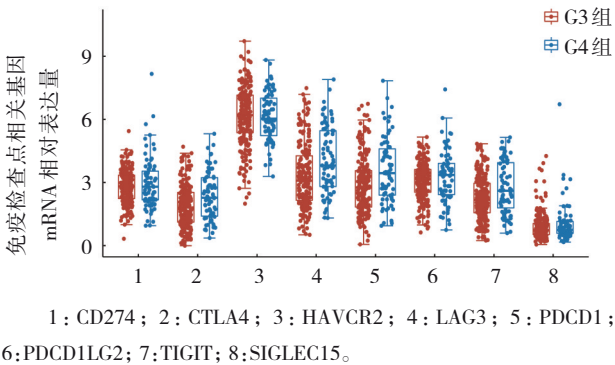


图 4 两组免疫检查点相关基因 mRNA 相对表达量比较

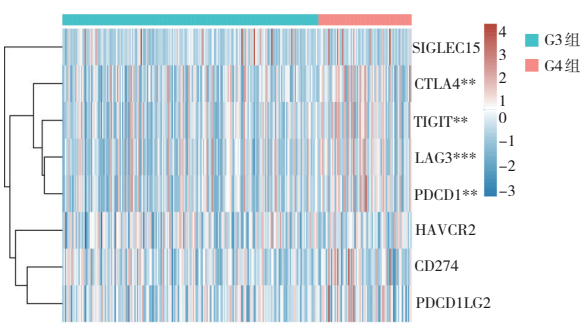


图 5 两组免疫检查点分析及免疫检查点 ICB 治疗 TIDE 评分

通过 TIDE 算法得出 G4 组、G3 组 TIDE 评分分别为 0.805(−0.148, 1.385)分和 0.260(−0.495, 1.170)分,经 Wilcoxon 检验,差异有统计学意义($Z=-2.482, P=0.013$),G4 组高于 G3 组,提示高级别 ccRCC 患者行 ICB 治疗效果更差。免疫抑制基因共表达分析结果表明,几乎所有免疫抑制基因也都与 *HAPLN3* 阳性共表达,上述结果提示 *HAPLN3* 可能是 G4 组 ccRCC 潜在的免疫治疗靶点。见图 6。

表 1 两组免疫检查点相关基因 mRNA 相对表达量比较 [M(P₂₅,P₇₅)]

组别	CD274 mRNA	CTLA4 mRNA	HAVCR2 mRNA	LAG3 mRNA
G4 组	2.802(2.172, 3.609)	2.267(1.383, 3.237)	6.004(5.353, 7.156)	3.796(2.801, 5.465)
G3 组	2.820(2.238, 3.366)	1.814(1.114, 2.532)	6.201(5.353, 7.156)	3.085(2.159, 4.283)
Z 值	−0.140	−2.786	−0.737	−3.314
P 值	0.889	0.005	0.461	0.001

组别	PDCD1 mRNA	PDCD1LG2 mRNA	TIGIT mRNA	SIGLEC15 mRNA
G4 组	3.440(2.313, 4.641)	3.345(2.379, 3.918)	2.567(1.652, 3.951)	0.684(0.501, 1.226)
G3 组	2.765(1.829, 3.573)	3.165(2.530, 3.629)	2.182(1.563, 2.974)	0.675(0.439, 1.080)
Z 值	−2.964	−1.024	−2.701	−0.441
P 值	0.003	0.306	0.007	0.659

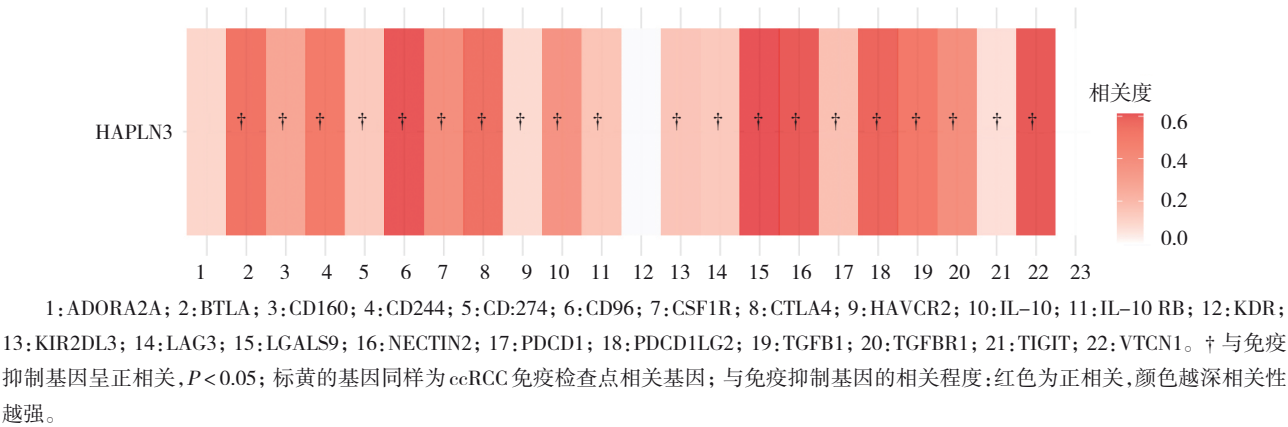


图 6 *HAPLN3* 与免疫抑制基因共表达情况

2.5 基于GSEA数据库完善ccRCC中HAPLN3通路富集分析

HAPLN3 高表达在多个免疫相关通路富集,包括细胞因子受体相互作用,NK 细胞介导的细胞毒性通路、趋化因子信号通路、JAK-STAT 信号通路、黏附分子 Cam、T 细胞受体(T cell receptor, TCR)信号通

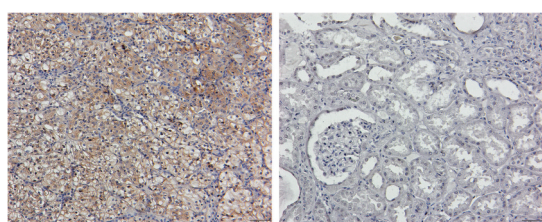
路、B 细胞受体(B cell receptor, BCR)信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)信号通路、Notch 信号通路、Wnt 信号通路等。这些信号通路的发现表明 HAPLN3 可能参与 ccRCC 的免疫相关通路,而 TCR 信号通路尤其值得关注。见表 2。

表 2 HAPLN3 在 ccRCC 相关通路富集分析

信号通路	基因数	P 值	假阳性率 Q 值	归一化富集评分
细胞因子受体相互作用信号通路	264	0.000	0.000	2.711
NK 细胞介导的细胞毒性通路	132	0.000	0.000	2.605
趋化因子信号通路	188	0.000	0.000	2.51
JAK-STAT 信号通路	155	0.000	0.001	2.449
黏附分子 Cam 信号通路	131	0.000	0.001	2.437
T 细胞受体信号通路	108	0.000	0.002	2.341
B 细胞受体信号通路	75	0.000	0.003	2.139
MAPK 信号通路	267	0.000	0.003	2.125
TOLL 样受体信号通路	102	0.002	0.002	2.178
Notch 信号通路	47	0.002	0.004	2.061
Wnt 信号通路等	151	0.024	0.045	1.688

2.6 癌组织与癌旁组织 HAPLN3 蛋白的表达

HAPLN3 主要定位于细胞质,呈棕黄色(见图 7)。癌组织、癌旁组织 HAPLN3 阳性表达率分别为 58% (29/50)和 36% (18/50),经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=4.857$, $P=0.028$),癌组织 HAPLN3 阳性表达率高于癌旁组织。



癌组织 癌旁组织

图 7 癌组织、癌旁组织 HAPLN3 蛋白的表达 ($\times 20$)

2.7 HK-2、OSRC-2、ACHN 细胞 HAPLN3 mRNA 和蛋白相对表达量比较

HK-2、OSRC-2、ACHN 细胞 HAPLN3 mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.11) 、 (1.30 ± 0.08) 和 (1.75 ± 0.13) ,经方差分析,差异有统计学意义($F=33.930$, $P=0.000$); OSRC-2、ACHN 细胞 HAPLN3 mRNA 相对表达量高于 HK-2 细胞($P<0.05$)。

HK-2、OSRC-2、ACHN 细胞 HAPLN3 蛋白相对表达量为 (1.00 ± 0.18) 、 (2.84 ± 0.11) 和 (4.02 ± 0.21) ,经方差分析,差异有统计学意义($F=235.3$, $P=0.000$); OSRC-2、ACHN 细胞 HAPLN 蛋白相对表达量高于 HK-2 细胞($P<0.05$)。见图 8。

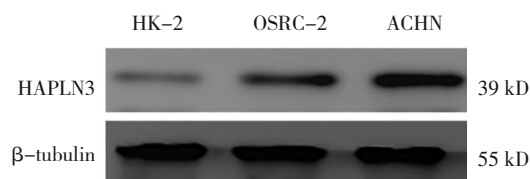


图 8 HK-2、OSRC-2、ACHN 细胞 HAPLN3 蛋白的表达

2.8 沉默 HAPLN3 对肾透明细胞癌增殖的影响

si-NC 组、si-HAPLN3 组 OS-RC-2 细胞 HAPLN3 mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.12) 和 (0.42 ± 0.09) ,经 t 检验,差异有统计学意义($t=6.601$, $P=0.002$), si-HAPLN3 组低于 si-NC 组,说明细胞转染成功。

si-NC 组、si-HAPLN3 组 ACHN 细胞 HAPLN3 mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.14) 和 (0.44 ± 0.08) ,经 t 检验,差异有统计学意义($t=5.847$, $P=0.004$), si-HAPLN3 组低于 si-NC 组,说明细胞转染成功。

si-NC 组、si-*HAPLN3* 组不同时间点 OS-RC-2、ACHN 细胞的 OD 值比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点 OS-RC-2、ACHN 细胞的 OD 值有差异($F=481.158$ 和 292.321 , 均 $P=0.000$);

②两组 OS-RC-2、ACHN 细胞的 OD 值有差异($F=27.471$ 和 255.219 , 均 $P=0.002$);③两组 OS-RC-2、ACHN 细胞的 OD 值变化趋势有差异($F=20.799$ 和 11.301 , $P=0.017$ 和 0.040)。见表 3。

表 3 两组不同时间点 OS-RC-2、ACHN 细胞的 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OS-RC-2 细胞			ACHN 细胞		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
si-NC 组	0.462 ± 0.050	0.704 ± 0.041	1.232 ± 0.069	0.466 ± 0.039	0.717 ± 0.050	1.157 ± 0.060
si- <i>HAPLN3</i> 组	0.434 ± 0.045	$0.613 \pm 0.040^\dagger$	$0.940 \pm 0.071^\dagger$	0.400 ± 0.014	$0.566 \pm 0.044^\dagger$	$0.867 \pm 0.065^\dagger$

注: † 与 si-NC 组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

HAPLN3 作为透明质酸和蛋白多糖链接蛋白基因家族成员,是乳腺癌、前列腺癌及黑色素瘤等多种肿瘤的预后标志物^[11-13]。尽管目前还没有研究报道 *HAPLN3* 表达与 ccRCC 的相关性,但多项文献证实透明质酸和蛋白多糖在不同程度上影响 ccRCC 的进展、转移及预后^[14],所以 *HAPLN3* 在 ccRCC 中的表达及其作用值得探究。

基于 TCGA 数据库,笔者发现 *HAPLN3* 在 ccRCC 中的表达高于正常肾脏。其结果在组织水平经 IHC 染色验证,在细胞水平经 qRT-PCR 和 Western blotting 实验验证,并通过 CCK-8 法进一步验证沉默 *HAPLN3* 的 ccRCC 细胞增殖能力下降,提示该基因可能与 ccRCC 增殖有关。随后笔者通过 TCGA 数据库分析 *HAPLN3* 在不同 WHO 分级亚组的表达,发现 WHO 分级 G4 组高于 G3 组,提示 *HAPLN3* 表达上调可能导致 ccRCC 向更差的组织学分级进展,遗憾的是本实验未收集到 G4 组标本,后期需加大病例数验证不同组织学分级间 *HAPLN3* 的表达。生存分析结果表明, *HAPLN3* 高表达较低表达 ccRCC 患者的 OS 低,提示 *HAPLN3* 可能与 ccRCC 患者预后不良有关。通过单因素和多因素 Cox 回归分析发现 *HAPLN3*、年龄、pTNM、Grade 分级是 ccRCC 患者不良预后的独立影响因素。

免疫靶向治疗逐渐成为晚期肾癌新的治疗方式^[15],且细胞外基质与免疫微环境关系密切^[16],故选用 TIMER 2.0 数据库来研究 *HAPLN3* 表达与免疫细胞的相关性,结果表明 *HAPLN3* mRNA 相对表达量与 B 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、

中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞浸润呈正相关,提示 *HAPLN3* 可能参与 ccRCC 免疫细胞浸润调节。进一步分析发现 *HAPLN3* 与多种免疫检查点呈阳性共表达,包括 CTLA4、LAG3、PDCD1 和 TIGIT,这些免疫检查点在近年来是晚期 ccRCC 的新兴治疗研究热点^[17],故后续探究 *HAPLN3* 与明星免疫检查点的关系很有意义。结合 *HAPLN3* 在 ccRCC 不同 WHO 分级中的差异表达、免疫检查点分析及 TIDE 评分,笔者猜测 *HAPLN3* 表达上调影响免疫抑制基因的功能,从而造成组织学分级较差的 ccRCC 不能在 ICB 治疗中获得较好的疗效,提示 *HAPLN3* 可能成为高级别 ccRCC 潜在的免疫治疗靶点,以及成为 ICB 治疗的预测指标。

GSEA 数据库分析结果显示, *HAPLN3* 在 ccRCC 中与 TCR 信号通路、BCR 信号通路、NK 细胞介导的细胞毒性通路、TLR 信号通路等免疫相关信号通路富集。KRISHNA 等^[18]单细胞测序 TCR 轨迹分析结果表明, ICB 治疗在有反应与耐药患者之间存在不同的 T 淋巴细胞分化途径,然而暂无 BCR 与肾癌进展的相关研究。有研究表明, ccRCC 中有 NK 细胞浸润,但是随着肿瘤进展,可能出现功能障碍^[19]。TLR 是连接非特异性免疫与特异性免疫的桥梁。MORIKAWA 等^[20]研究表明, TLR3 在 ccRCC 中过表达, TLR3 通路可能代表 CCRCC 新的治疗靶点。另外本研究结果表明, *HAPLN3* 基因在细胞因子受体相互作用信号通路、趋化因子信号通路、JAK-STAT 信号通路、黏附分子 Cam 信号通路、MAPK 信号通路、Notch 信号通路、Wnt 信号通路等癌症相关通路富集。

本研究结果表明, *HAPLN3* 基因在 ccRCC 细胞

中高表达,且与肿瘤细胞增殖有关,通过该基因构建的临床预后模型可较好地预测患者 1 年、3 年和 5 年总生存率。*HAPLN3* 基因在 ccRCC 中与免疫细胞浸润、免疫相关检查点存在相关性,并且可能通过多种肿瘤免疫机制促进 ccRCC 的发生、发展。*HAPLN3* 有作为 ccRCC 免疫治疗靶点的潜在价值。

参 考 文 献 :

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] ZHANG Q, HUANG R, HU H Q, et al. Integrative analysis of hypoxia-associated signature in pan-cancer[J]. *iScience*, 2020, 23(9): 101460.
- [3] SHAO Y X, XIONG S C, SUN G X, et al. Prognostic analysis of postoperative clinically nonmetastatic renal cell carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(3): 959-970.
- [4] SHEN C, BEROUKHIM R, SCHUMACHER S E, et al. Genetic and functional studies implicate HIF1 α as a 14q kidney cancer suppressor gene[J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(3): 222-235.
- [5] CAO C C, MA Q, HUANG X B, et al. Targeted demethylation of the PLOD2 mRNA inhibits the proliferation and migration of renal cell carcinoma[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 675683.
- [6] ANGULO J C, SHAPIRO O. The changing therapeutic landscape of metastatic renal cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1227.
- [7] KAWASHIMA A, KANAZAWA T, KIDANI Y, et al. Tumour grade significantly correlates with total dysfunction of tumour tissue-infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6220.
- [8] KAUR A, ECKER B L, DOUGLASS S M, et al. Remodeling of the collagen matrix in aging skin promotes melanoma metastasis and affects immune cell motility[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(1): 64-81.
- [9] PELTANOVA B, RAUDENSKA M, MASARIK M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 63.
- [10] JIANG P, GU S Q, PAN D, et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response[J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1550-1558.
- [11] BAI H Y, WANG Y L, LIU H M, et al. Development of a four-mRNA expression-based prognostic signature for cutaneous melanoma[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 680617.
- [12] ASANO K, NELSON C M, NANDADASA S, et al. Stromal versican regulates tumor growth by promoting angiogenesis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17225.
- [13] MEI Y, CHEN M J M, LIANG H, et al. A four-gene signature predicts survival and anti-CTLA4 immunotherapeutic responses based on immune classification of melanoma[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 383.
- [14] JOKELAINEN O, PASONEN-SEPPÄNEN S, TAMMI M, et al. Cellular hyaluronan is associated with a poor prognosis in renal cell carcinoma[J]. *Urol Oncol*, 2020, 38(8): 686.e11-686.e22.
- [15] BOI S K, ORLANDELLA R M, GIBSON J T, et al. Obesity diminishes response to PD-1-based immunotherapies in renal cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000725.
- [16] ZHANG H P, SHI Q, YANG Z H, et al. An extracellular matrix-based signature associated with immune microenvironment predicts the prognosis and therapeutic responses of patients with oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 598427.
- [17] DAI S Y, ZENG H, LIU Z P, et al. Intratumoral CXCL13⁺ CD8⁺ T cell infiltration determines poor clinical outcomes and immunoevasive contexture in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(2): e001823.
- [18] KRISHNA C, DINATALE R G, KUO F S, et al. Single-cell sequencing links multiregional immune landscapes and tissue-resident T cells in ccRCC to tumor topology and therapy efficacy[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(5): 662-677.e6.
- [19] ZIBLAT A, IRAOLAGOITIA X L R, NUÑEZ S Y, et al. Circulating and tumor-infiltrating NK cells from clear cell renal cell carcinoma patients exhibit a predominantly inhibitory phenotype characterized by overexpression of CD85j, CD45, CD48 and PD-1[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 681615.
- [20] MORIKAWA T, SUGIYAMA A, KUME H, et al. Identification of toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(19): 5703-5709.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 张畅, 宋具昆, 袁东波, 等. *HAPLN3* 基因在肾透明细胞癌中的表达及其与预后、免疫的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(22): 53-62.

Cite this article as: ZHANG C, SONG J K, YUAN D B, et al. Expression of *HAPLN3* gene in clear cell renal cell carcinoma and its prognostic and immunological implications[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(22): 53-62.