

SETD2 在肾透明细胞癌中的表达及对患者预后的影响

胡庆庆,刘浩然,王建忠

摘要 目的 探究组蛋白甲基化转移酶(SETD2)在肾透明细胞癌(ccRCC)中的表达及其对患者预后的影响,讨论其可能的调控机制。方法 从肿瘤基因组计划数据库(TCGA)中下载 ccRCC 患者的基因突变数据、转录组数据和临床数据,使用 R 软件 v 4.0.3 对基因表达差异进行统计分析,用 Kaplan-Meier 绘图仪研究并比较不同免疫浸润情况及对应 SETD2 表达情况与患者总生存期(OS)、无进展生存期(PFS)、无病生存期(DFS)等方面预后的关系,结合临床数据进行验证,揭示 SETD2 突变调控 ccRCC 进展的潜在机制。结果 TIMER2 分析结果显示,SETD2 表达在 ccRCC 中显著下调且与免疫浸润相关,ccRCC 基因突变景观图显示 SETD2 突变频率达 12.5%,位列体细胞突变频率第 4。ccRCC 患者中,SETD2 高表达组较低表达组预后更佳,高免疫浸润组患者较低免疫浸润组患者预后更佳。结论 SETD2 高表达可增加 ccRCC 患者中免疫细胞的浸润及其对肿瘤的杀伤作用,从而对患者预后发挥积极作用。

关键词 SETD2;肾透明细胞癌;预后

中图分类号 R 737.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)06-0925-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.015

2022-04-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81500521)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022

作者简介:胡庆庆,女,硕士研究生;

王建忠,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:
wangjz1905@126.com

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)为泌尿系第 2 大恶性肿瘤,发生率仅次于膀胱癌;肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)作为 RCC 中的最常见亚型^[1],占有 RCC 病理类型的 70%~80%。ccRCC 早期较难发现,且对放化疗不敏感,对于晚期患者,多依赖于免疫治疗。然而,由于肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)存在高度异质性且适应性极强,常出现耐药现象,治疗效果不尽理想^[2]。TME 及其免疫细胞浸润情况对肿瘤进展影响极大^[3-4]。组蛋白甲基化转移酶(histone methyltransferase, SETD2)在多种人类肿瘤中存在突变,其表达缺失可能与患者预后差显著相关;然而作为经典的免疫相关调节分子,SETD2 表达缺失在 ccRCC 肿瘤组织免疫浸润方面的调节及进一步对患者预后的影响有待研究。

1 材料与方法

1.1 数据资料 利用肿瘤基因组计划数据库(the cancer genome atlas, TCGA)中 ccRCC 数据集分析基因表达、基因突变数据。从基因组数据共享(genomic data commons, GDC)数据门户网站下载肿瘤 RNA-seq 数据(<https://portal.gdc.cancer.gov/>),系统性地获取 33 种类型肿瘤的 SETD2 表达谱 mRNA 表达数据。此外,该研究从 TCGA 数据库中下载

mRNA. The content of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells in peripheral blood was detected by flow cytometry. **Results** The serum level of miR-34a mRNA in model mice was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, the total behavioral score of mice after miR-34a inhibitor intervention was significantly reduced ($P < 0.05$). The concentration of ovalbumin-specific IgE was significantly reduced ($P < 0.05$), while IL-6, IL-8, IL-10, MMP-2, MMP-9 and VCAM-1 mRNA were significantly reduced ($P < 0.05$), IL-35 increased significantly ($P < 0.05$), and CD3⁺, CD4⁺/CD8⁺ increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the levels of IL-2 and IFN- γ in the model group decreased ($P < 0.05$); compared with the model group, the levels of IL-2 and IFN- γ in the miR-34a inhibitor group and NC group increased ($P < 0.05$); those indexes of miR-34a inhibitor group and NC group were compared, and there were statistically significant differences ($P < 0.05$); there was no difference between the model group and NC group. **Conclusion** miR-34a is highly expressed in mice with allergic rhinitis. Inhibition of miR-34a expression can significantly reduce the symptoms and inflammation of model mice, and improve immune function.

Key words allergic rhinitis; miR-34a; inhibitors; inflammatory factors; T cells

了 336 例 ccRCC 患者的基因突变数据、转录组数据和临床数据,并利用 R 软件中的 maftools 软件包下载并可视化了 ccRCC 患者的体细胞突变。收集安徽医科大学第一附属医院 2015—2017 年 50 例接受根治性或部分肾切除术后病理确诊为 ccRCC 患者病理组织及其完整预后信息资料。

1.2 方法

1.2.1 SETD2 mRNA 检测及 CD8⁺ T 细胞的测定

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法进行 SETD2 mRNA 检测。使用 TRIzol 提取肾癌组织的总 RNA。逆转录合成为 cDNA, -80 °C 保存。ABI7300 定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增反应,反应体系:20 μl (SYBR Green 核酸染料 10 μl, ROX 0.4 μl, 上、下游引物各 0.8 μl, 模板 cDNA 2 μl, 去离子水 6 μl)。PCR 循环条件:95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、31 s, 共 40 个循环。内参基因 GAPDH 上游引物序列:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游引物序列:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'; 目的基因 SETD2 上游引物序列:5'-TCCAACAGTCTATGGTGTGA-3', 下游引物序列:5'-TGAGCTGTGAAAATCTGTG-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。

1.2.2 免疫荧光检测 SETD2、CD8⁺ 表达 肿瘤组织石蜡切片利用梯度乙醇脱蜡后行抗原修复, 0.01 mol/L PBST 漂洗后行 2% BSA 封闭 30 min, 而后在各标本上滴加 SETD2 和 CD8⁺ 一抗孵育 4 °C 过夜, PBST 漂洗 3 次后再行荧光二抗显色。肿瘤组织切片免疫荧光染色后行共聚焦显微镜观察, 比较在 SETD2 高、低表达两组样本中 CD8⁺ 肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocyte, TIL) 的浸润差异。

1.3 数据分析 为了进行可靠的免疫评分评估, 该研究使用了 R 软件包 immune deconv, 其中集成了 6 种最新算法, 包括 TIMER、xCell、MCP-counter、CIBERSORT、EPIC 及 quanTIseq, 结果通过 R 软件 v 4.0.3 中的 ggplot2 和 pheatmap 进行呈现。用 Kaplan-Meier 分析及 log-rank 测试研究并比较了不同免疫浸润情况及对应 SETD2 突变与否与患者总生存期 (overall survival, OS)、无进展生存期 (progression free survival, PFS)、无病生存期 (disease free survival, DFS) 预后的关系。

1.4 统计学处理 基因差异表达使用 R 软件 v 4.0.3 进行统计分析。对每种肿瘤类型及其配对的正常样本之间 SETD2 的差异表达数据进行 log₂ 转换。χ² 检验检测不同人口学特征及临床特征组 ccRCC 患者的 SETD2 表达是否有差别, P < 0.05 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SETD2 在 ccRCC 中的表达与免疫细胞浸润的关联 利用 TIMER2 对 TCGA 中 33 种肿瘤类型基因表达谱进行 SETD2 的表达分析, 并绘制肿瘤组织和正常组织中 SETD2 基因的表达分布图, 其中横轴代表不同肿瘤组织, 纵轴代表该基因表达分布情况。与对照组相比, SETD2 表达在 ccRCC 癌患者肿瘤组织中表达显著下调 (图 1A)。该实验利用 TIMER2 分析了 SETD2 在泛癌中对免疫浸润的影响, 并绘制了 SETD2 在泛癌中的免疫相关性热图。结果显示 SETD2 表达水平与 ccRCC 肿瘤组织中的 CD4⁺、CD8⁺、中性粒细胞、髓系树突状细胞、巨噬细胞及 B 细胞浸润呈显著正相关 (图 1B)。

2.2 SETD2 基因突变分布及 ccRCC 中各免疫功能类基因的突变 为进一步明确 SETD2 基因在 ccRCC 组织中的突变情况, 该实验从 TCGA 数据库 530 例 ccRCC 患者中, 挑选了含有基因突变数据的 336 例 ccRCC 患者的基因表达谱, 并绘制了其基因突变景观图, 结果显示有 266 例 ccRCC 患者存在基因突变, 位列前 10 的高频突变基因有 VHL、PBRM1、TTN、SETD2、BAP1、MUC16、MTOR、KDM5C、HMCN1、DNAH9, 其中 SETD2 突变频率达 12.5%, 位列体细胞突变频率第 4 (图 2)。

2.3 肿瘤组织免疫浸润程度对 ccRCC 患者预后的影响 为了评估 TCGA 中 ccRCC 患者肿瘤组织免疫浸润程度, 该实验首先利用 ssGSEA 结合 162 个免疫示例基因进行共识聚类并行亚组分析, 得到高免疫浸润组 (Group1, 395 例) 和低免疫浸润组 (Group2, 135 例) (图 3A), 而后通过 TIMER 分析两组队列中肿瘤组织免疫细胞浸润程度, 结果显示 B 细胞、CD8⁺ T 细胞、中性粒细胞、髓系树突状细胞、CD4⁺ T 细胞、巨噬细胞均可较好地地区分两组队列, 再次验证队列的免疫浸润程度 (图 3B)。随后, 分析比较高、低免疫浸润组 ccRCC 患者预后, 发现在总体生存率、无病生存率、无进展生存率方面, 高免疫浸润组患者的预后均优于低免疫浸润组 (图 3C ~ E)。

2.4 SETD2 突变与 ccRCC 肿瘤组织免疫细胞浸润的相关性 该研究通过基因突变景观分析了 SETD2 分别在高免疫浸润、低免疫浸润两组中的突变频率, 在低免疫浸润患者中, SETD2 基因突变频率高达 10%, 而在高免疫浸润样本中, SETD2 基因突变频率达 2%, 即 SETD2 基因突变频率两组中存

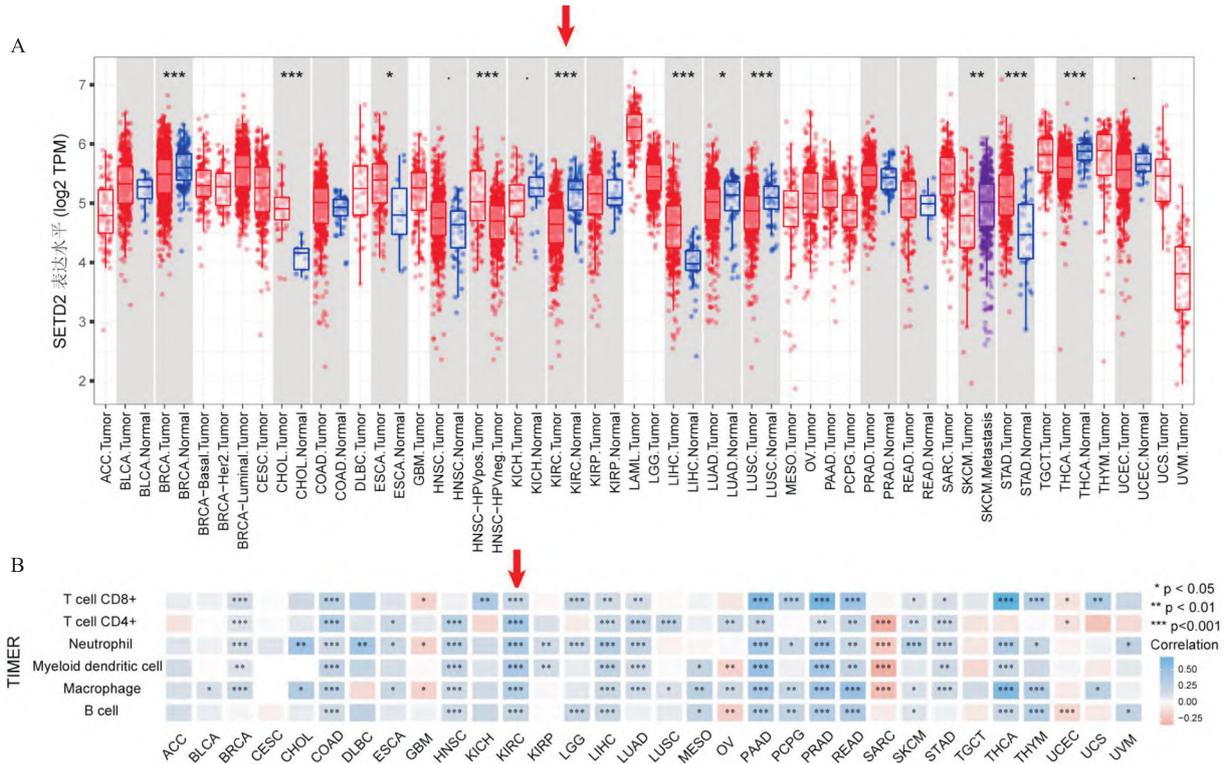


图1 SETD2在泛癌中的表达及与免疫细胞浸润的相关性

A: SETD2在泛癌中的表达水平; B: 热图显示在泛癌中受SETD2调控的免疫细胞浸润情况; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

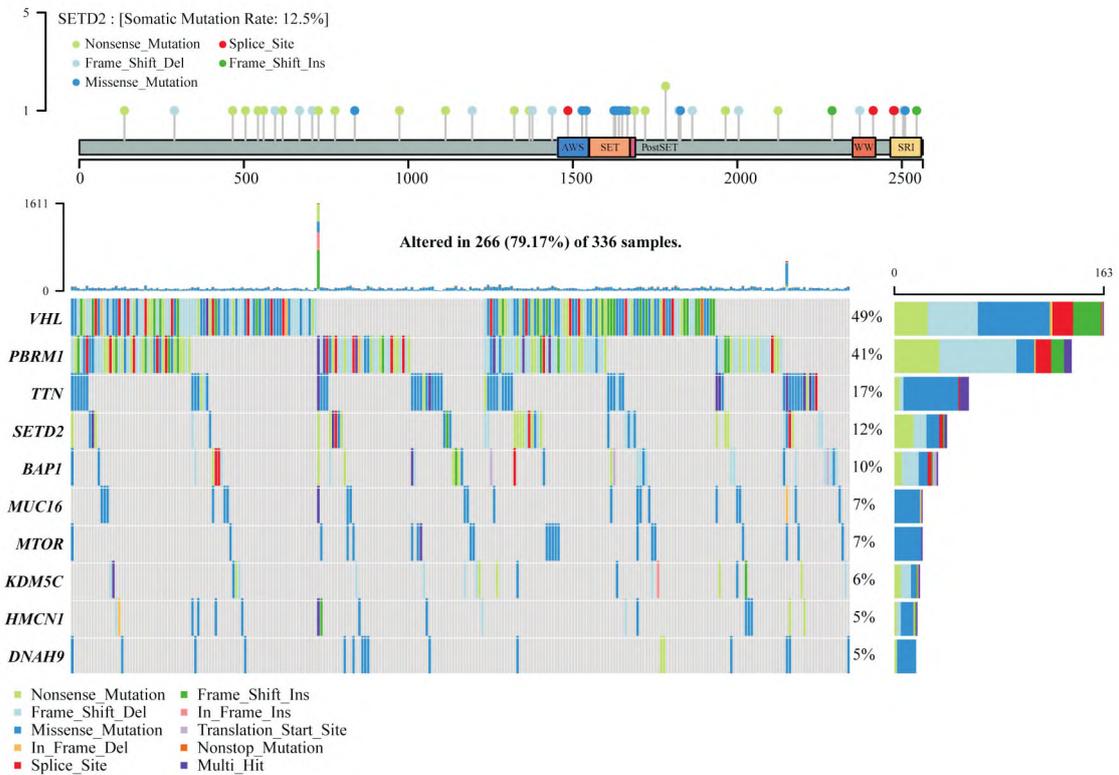


图2 ccRCC肿瘤队列体细胞景观显示各基因突变频率及SETD2基因突变分布

在明显差异,低免疫浸润(10%) vs 高免疫浸润(2%),提示 SETD2 可能在 ccRCC 患者中起调控免疫浸润的作用(图 4)。

2.5 SETD2 突变对免疫浸润的影响及患者预后

上述结果表明 SETD2 的表达与 ccRCC 的免疫浸润相关,并且 SETD2 的表达也与肿瘤的良好预后有关。该研究进一步在高、低免疫浸润组内将患者分为 SETD2 突变型 (Mut) 组、野生型 (WT) 组,利用

TIMER2 分析 4 组免疫浸润评分。结果显示在高、低免疫浸润组内比较,SETD2 突变组中各免疫细胞浸润程度均比野生型组低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);此外,CD8⁺ T 细胞在 SETD2 突变组与野生型组的浸润程度差异最明显,且在高免疫浸润 SETD2 WT 组中免疫评分最高(图 5A、B)。进一步分析比较 4 组患者的预后,发现高免疫浸润 SETD2 WT 组患者预后最好,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)(图 5C)。

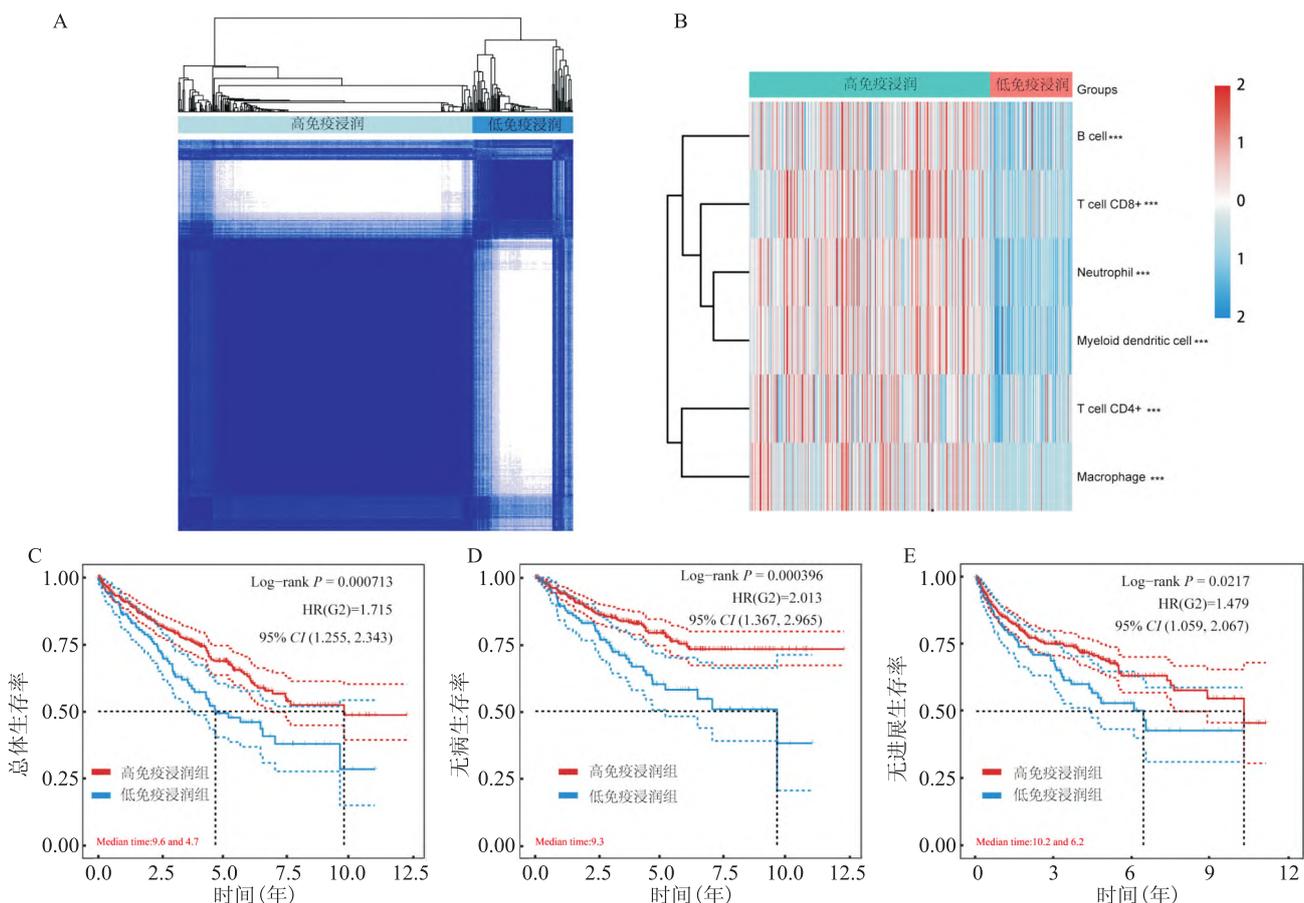


图 3 肿瘤组织免疫浸润程度对 ccRCC 患者预后的影响

A: ccRCC 患者根据免疫示例基因进行聚类亚组分型; B: 每个样本肿瘤浸润免疫细胞的百分比丰度,横坐标代表样本,纵坐标代表单个样本中免疫细胞含量百分比; C ~ E: ccRCC 高、低免疫浸润组的总体生存曲线,无病生存曲线,无进展生存曲线

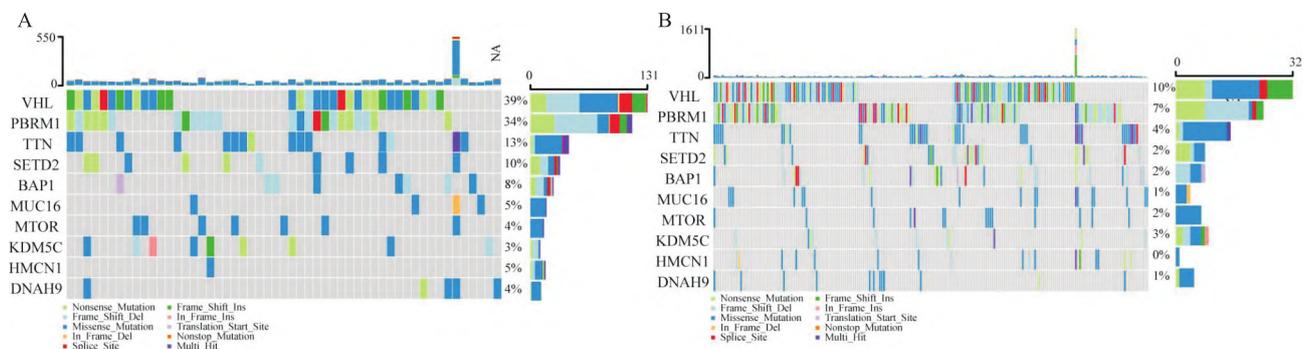


图 4 ccRCC 不同免疫浸润程度患者各基因突变频率及 SETD2 基因突变分布

A: 低免疫浸润组; B: 高免疫浸润组

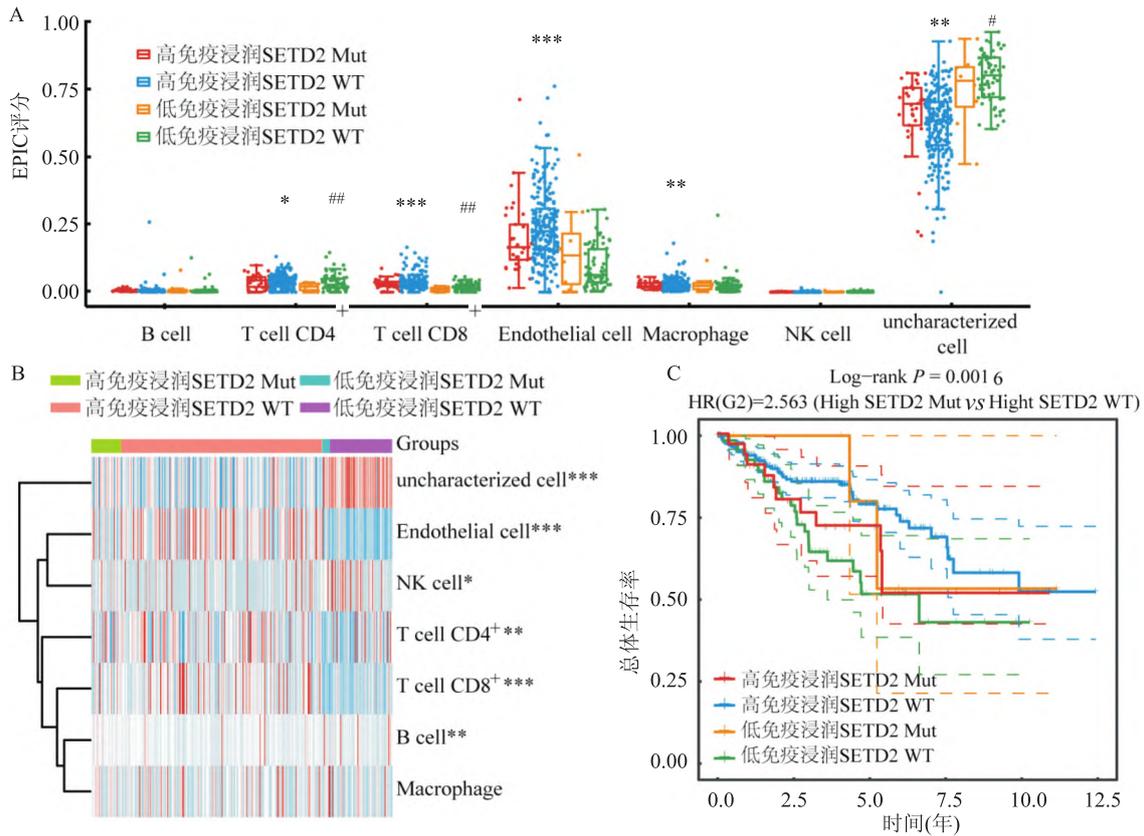


图5 ccRCC患者高、低免疫浸润组中SETD2突变组及野生型组免疫浸润评分及患者预后

A: 利用TIMER2分析SETD2 Mut/WT在高、低免疫浸润ccRCC中各类免疫细胞评分; B: EPIC分析SETD2 Mut/WT在高、低免疫浸润肿瘤组织中各类免疫细胞浸润热图; C: Kaplan-Meier分析SETD2 Mut/WT在高、低免疫浸润ccRCC患者总体生存情况; 与高免疫浸润SETD2 WT组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与低免疫浸润SETD2 WT组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.6 SETD2对ccRCC预后及免疫浸润的影响

分别对该院50例ccRCC患者性别、年龄、Fuhrman分级及TMN分期进行统计,根据SETD2 mRNA表达中位水平,将患者分为SETD2高、低表达两组。结果表明SETD2表达水平与患者性别、年龄不相关,而与Fuhrman分级及TMN分期有显著相关,SETD2低表达组分级及分期级别更高(表1)。此外,

表1 SETD2表达水平与患者性别、年龄、Fuhrman分级、TMN分期的相关性

项目	n	SETD2 表达		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
性别				1.28	0.25
男性	25	15	10		
女性	25	11	14		
年龄(岁)				0.32	0.57
≤60	24	11	13		
>60	26	14	12		
Fuhrman 分级				11.68	<0.01
I ~ II	25	20	5		
III ~ IV	25	8	17		
TNM 分期				5.12	<0.05
I ~ II	25	16	9		
III ~ IV	25	8	17		

比较两组患者预后,OS生存曲线显示,SETD2高表达组患者的总生存曲线相较于SETD2低表达组患者更佳(图6)。

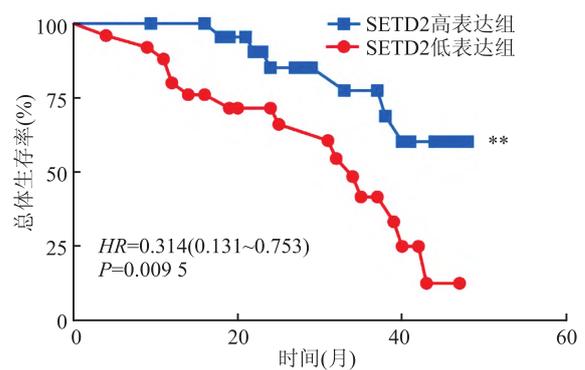


图6 SETD2高、低表达组患者OS生存曲线与SETD2低表达组比较: ** $P < 0.01$

为了进一步验证数据库数据分析所得结果,SETD2突变可能降低ccRCC肿瘤组织免疫细胞浸润(以CD8⁺TIL最显著)从而使患者预后差,该研究利用免疫荧光检测患者ccRCC组织SETD2、CD8⁺

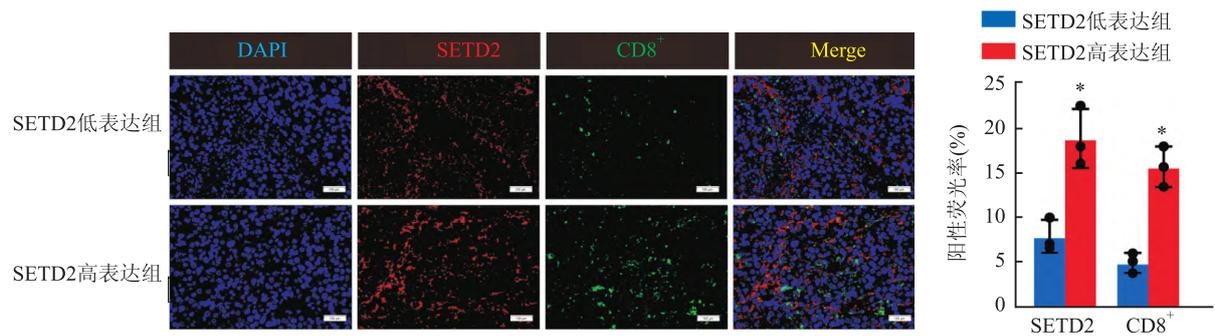


图7 ccRCC 组织中 SETD2、CD8⁺ 免疫荧光表达与 SETD2 低表达组比较: * $P < 0.05$

表达位置及其强度。结果显示 SETD2 高表达组织中 CD8⁺ 表达也显著增高(图7),提示 SETD2 可能促进肿瘤组织中 CD8⁺ TIL 细胞浸润,从而缓解患者预后。

3 讨论

SETD2 是包含核受体 SET 域 (NSD) 家族的关键成员,是迄今在人体组织中发现的唯一参与 H3K36me3 形成过程的分子^[5-6],相关学者在多种人类恶性肿瘤中曾检测到 SETD2 发生突变或功能丧失,导致相应肿瘤组织蛋白甲基化、去甲基化和表观突变失衡,从而致使肿瘤发生及恶化^[7-8]。在 ccRCC 中,有研究^[9]表明 SETD2 在肿瘤组织突变率较高,且可能与患者的不良预后相关。然而,既往的报道^[10]关于 SETD2 突变频率的高低不尽一致,SETD2 突变影响 ccRCC 患者预后的具体调控机制也并不明确。该研究在 ccRCC 中针对 SETD2 突变对肿瘤组织免疫细胞浸润的调控最终影响患者预后的机制进行了初步探究。

对于晚期肾癌,由于化疗药物疗效差,免疫疗法已成为治疗的重要手段。然而近年来随着在临床的广泛应用,免疫治疗也出现了耐药现象,仅 40% 的患者对免疫治疗反应敏感。对于肾癌免疫微环境的探索仍有待突破。既往有研究^[11-12]表明,肿瘤浸润免疫细胞 (tumor-infiltrating immune cells, TIICs) 是 RCC 预后的重要决定因素,肿瘤免疫浸润与临床预后密切相关。该研究表明在高免疫浸润组 ccRCC 患者中,SETD2 的表达水平更高,且患者预后更好。验证了 TIICs 与 ccRCC 患者预后的相关性,且 SETD2 可能在此过程中发挥作用。为了探明 SETD2 对 ccRCC 免疫浸润的影响,分别将高、低免疫浸润组 ccRCC 患者分为 SETD2 野生型及突变型

组,分析显示 SETD2 突变组中各免疫细胞浸润程度均比野生型组低,高免疫浸润 SETD2 WT 组患者预后最好;其中,CD8⁺ T 细胞在 SETD2 突变组与野生型组的浸润程度差异最明显,且在高免疫浸润 SETD2 WT 组中免疫评分最高。

传统观点认为在多数恶性肿瘤中,CD8⁺ T 细胞高浸润患者预后更好。然而,CD8⁺ T 细胞在 ccRCC 肿瘤组织中的浸润程度对患者预后的影响仍有争议。有研究^[13]认为 CD8⁺ TIL 高浸润 ccRCC 患者预后更好,也有观点^[14]认为 CD8⁺ TIL 高浸润患者预后更差。结合该院 ccRCC 患者资料,研究表明 SETD2 高表达提示更好的患者预后,且与 CD8⁺ TIL 高浸润相关,与通过 TCGA 数据库分析所得结论相互佐证。而报道称 CD8⁺ TIL 高浸润 ccRCC 患者预后更差的相关学者研究^[14]表明,ccRCC 肿瘤组织中浸润的部分 CD8⁺ T 细胞会出现 CXCL13 这一趋化因子的表达,若 CXCL13 与 CD8⁺ 蛋白双阳性 T 细胞这一亚群高表达,即会出现免疫逃逸,从而导致 CD8⁺ TIL 高浸润 ccRCC 患者预后反而更差。

综上所述,该研究结果揭示了 ccRCC 中 SETD2 高表达及肿瘤组织 CD8⁺ T 细胞高浸润均是患者的良好预后的指标,且 SETD2 高表达时,CD8⁺ TIL 高浸润对患者预后产生的积极作用更明显。然而,SETD2 高表达是通过何种下游分子来促进 CD8⁺ T 细胞发挥肿瘤杀伤作用,如何与 CD8⁺ T 细胞表面免疫检查点相互作用来达到对 ccRCC 发展更好的控制作用的具体通路仍有待进一步探究。

参考文献

- [1] Zhou L, Liu S, Li X, et al. Diagnostic and prognostic value of CEP55 in clear cell renal cell carcinoma as determined by bioinformatics analysis[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5):3485-96.

- [2] Beksac A T, Paulucci D J, Blum K A, et al. Heterogeneity in renal cell carcinoma[J]. *Urol Oncol*, 2017, 35(8):507-15.
- [3] Mlecnik B, Bindea G, Angell H K, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability[J]. *Immunity*, 2016, 44(3):698-711.
- [4] Malka D, Lievre A, Andre T, et al. Immune scores in colorectal cancer; where are we[J]. *Eur J Cancer*, 2020, 140:105-18.
- [5] Wagner E J, Carpenter P B. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2):115-26.
- [6] Xu Q, Xiang Y, Wang Q, et al. SETD2 regulates the maternal epigenome, genomic imprinting and embryonic development[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(5):844-56.
- [7] Kandath C, McLellan M D, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types[J]. *Nature*, 2013, 502(7471):333-9.
- [8] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(5):401-4.
- [9] Dalgliesh G L, Furge K, Greenman C, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes[J]. *Nature*, 2010, 463(7279):360-3.
- [10] Duns G, van den Berg E, van Duivenbode I, et al. Histone methyltransferase gene SETD2 is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11):4287-91.
- [11] Zhang S, Zhang E, Long J, et al. Immune infiltration in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5):1564-72.
- [12] Mami-Chouaib F, Blanc C, Corgnac S, et al. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology[J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1):87.
- [13] Davis D, Tretiakova M S, Kizzar C, et al. Abundant CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes and beta-2-microglobulin are associated with better outcome and response to interleukin-2 therapy in advanced stage clear cell renal cell carcinoma [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2020, 47:151537.
- [14] Dai S, Zeng H, Liu Z, 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.

The expression of SETD2 in ccRCC and its effect on prognosis of patients

Hu Qingqing, Liu Haoran, Wang Jianzhong

(Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the expression of histone methyltransferase (SETD2) in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and the influence on prognosis of patients, and to study the possible regulatory mechanism of it.

Methods Gene mutation data, transcriptome data and clinical data of patients with ccRCC were downloaded from cancer genome project database (TCGA), and the R software V 4.0.3 was used for statistical analysis of gene expression differences. Kaplan-Meier plotter was used to study the different prognosis of patients with different SETD2 expression and immune infiltration conditions and to reveal the potential mechanism by which SETD2 mutation regulated the progression of ccRCC, meanwhile clinical data were used for verification. **Results** TIMER2 analysis showed that the expression of SETD2 was significantly down-regulated in ccRCC and related to immune infiltration. The mutation landscape of ccRCC gene showed that the frequency of SETD2 mutation was 12.5%, ranking fourth in somatic mutation frequency. Among patients with ccRCC, the prognosis in the SETD2 high expression group was better than that in the SETD2 low expression group, and the prognosis of patients in the high immune infiltration group was better than that in the low immune infiltration group. **Conclusion** High expression of SETD2 can increase the infiltration of immune cells and its killing effect on tumor in ccRCC patients, thus playing a positive role in the prognosis of patients.

Key words SETD2; clear cell renal cell carcinoma; prognosis