

# Y 染色体基因 *KDM5D* 抑制 男性膀胱癌恶性进展的作用机制研究

冉越非<sup>1,2,3,4</sup>, 姚旭东<sup>1,2,3,4</sup><sup>1</sup>安徽医科大学上海临床学院, 上海 200072; <sup>2</sup>安徽医科大学第五临床医学院, 合肥 230032;<sup>3</sup>上海第十人民医院泌尿外科, 上海 200072; <sup>4</sup>同济大学医学院泌尿科癌症研究所, 上海 200072)

**摘要** 目的 观察 Y 染色体基因赖氨酸特异性脱甲基酶 5D (*KDM5D*) 在男性膀胱癌中的表达及其对膀胱癌进展的影响, 从而说明膀胱癌性别相关的预后差异。方法 通过生信分析确定在 TCGA 数据库中膀胱癌的差异表达且具有预后意义的 Y 染色体基因 *KDM5D*, 然后对 *KDM5D* 在膀胱癌细胞系、收集的临床膀胱癌组织和邻近的正常上皮组织中的表达进行实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹、免疫荧光、肿瘤微环境分析、生物信息学通路分析, 并通过细胞实验验证敲低和过表达 *KDM5D* 后对膀胱癌细胞增殖和迁移的影响, 同时对膀胱癌组织芯片的 *KDM5D* 表达与转移或复发的临床数据进行统计分析。结果 *KDM5D* 在男性膀胱癌中呈总体低表达, 但在不同膀胱癌细胞系和是否复发的膀胱癌中表达不同, 过表达 *KDM5D* 后抑制膀胱肿瘤细胞的增殖和迁移, *KDM5D* 低表达与更高的复发率和转移率相关。生物信息学分析表明, *KDM5D* 可能通过影响免疫细胞聚集和上皮-间质转化影响肿瘤的转移或复发。结论 *KDM5D* 是男性膀胱癌独有的保护基因, 可能与男性膀胱癌预后好于女性相关。

**关键词** *KDM5D*; Y 染色体基因; 性别; 膀胱癌; 预后差异; EMT

**中图分类号** R 737.14

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2204-11

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.020

2022 年数据显示膀胱癌在全球癌症中发病率排第 9, 病死率排第 13<sup>[1]</sup>。然而, 与多数其他恶性肿瘤不同, 膀胱癌在男性和女性之间表现出显著的性别差异。无论是在欧美国家还是在中国, 男性患者发病率显著高于女性, 但是对于 TNM 分期相同的膀胱癌, 男性患者的预后显著好于女性患者<sup>[2]</sup>。关于膀胱癌性别相关的预后差异现象, 过往研究重点主要在解剖结构、生活习惯、性激素和代谢上<sup>[3-6]</sup>。近年来, 研究人员开始关注男性独有的 Y 染色体, 尤其是 Y 染色体基因的作用。Y 染色体在男性中特有, 其基因可能在性别相关的疾病和生理过程中发挥关键作用。已有相关研究<sup>[7]</sup>报道, 含普遍转录的四肽重复, Y 连接 (ubiquitously transcribed tetratripeptide repeat containing, Y-linked, Uty) 可通过下调 CXC 基序趋化因子配体 (C-X-C Motif Chemokine Ligand, CXCL)9 和 CXCL10 防止肺动脉高压, 导致男女性发病率的差异, *KDM5D* 可通过破坏癌细胞粘

附特性和肿瘤免疫力导致结肠癌预后的性别差异<sup>[8]</sup>, 可见, Y 染色体基因在性别差异或肿瘤预后方面的研究已经相当成熟, 尤其是 *KDM5D*。然而, 对于 *KDM5D* 在膀胱癌中的具体作用及其与性别差异的关系尚不清楚。该研究聚焦于探究 Y 染色体基因 *KDM5D* 在膀胱癌中的表达及功能。结合实验及生信数据和临床样本分析, 探索 *KDM5D* 的表达水平与膀胱癌预后的关系, 以期对膀胱癌性别差异的可能分子机制提供证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病例数据** 从 TCGA 数据库里获取 300 例男性膀胱癌以及 20 例邻近正常黏膜的 RNAseq 数据。在同济大学上海第十人民医院收集了 2018 年 1 月至 2020 年 12 月 30 例男性膀胱癌组织芯片 ( $n=30$ )。这些患者术前未接受任何治疗。新鲜组织标本立即在液氮中快速冷冻, 并在  $-80^{\circ}\text{C}$  保存直到进一步使用。本研究经同济大学第十人民医院伦理委员会批准 (批准号: SHSY-IEC-4.1/19-120/01), 并获得所有患者或其亲属的知情同意, 本研究严格按照世界医学协会的伦理准则 (《赫尔辛基宣言》) 进

2024-10-21 接收

基金项目: 上海市科技计划项目 (编号: 22140903800)

作者简介: 冉越非, 男, 硕士研究生;

姚旭东, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: yaoxudong1967@163.com

行。

**1.1.2 细胞** 4个男性源性膀胱癌细胞系(RT4、UM-UC-3、J82和5637)以及永生化人正常尿路上皮细胞系SV(SV-HUC-1)和1个女性源性膀胱癌细胞系(T24)来自美国ATCC,RT4用McCoy's 5A改良培养基(美国赛默飞世尔科学公司)培养,UM-UC-3、J82、5637和T24用RPMI 1640培养基(美国赛默飞世尔科学公司)培养,SV-HUC-1用Ham's F-12K(Kaighn's)培养基(美国默克公司)培养。所有细胞系在37℃、含5%二氧化碳的加湿培养箱中培养。所有细胞培养基中均添加10%胎牛血清(美国赛默飞世尔科学公司)和1%青霉素/链霉素(美国GE医疗保健生命科学公司)。

**1.1.3 试剂和仪器** TRIzol试剂(美国Invitrogen公司),cDNA合成试剂盒(日本Takara公司),SYBR Green PCR试剂盒、EDU试剂盒(中国翌圣生物科技有限公司),小干扰RNA(中国和元生物),脂质体3000(美国赛默飞世尔科学公司),KDM5D抗体(英国Abcam公司),ABI Prism 7500序列检测系统(美国应用生物系统公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫荧光** 对膀胱癌组织切片进行样本制备,使用PBS进行洗涤以去除残留物,接着使用4%多聚甲醛固定液进行固定。将固定的组织样品用石蜡包埋,切成4 μm厚的切片。在常规脱水、抗原提取和阻断程序后,切片与KDM5D抗体(1:500)在4℃下孵育过夜。将切片置于常温,复温15 min,去除抗体工作液,用缓冲液TBST洗涤1次,5 min;用缓冲液TBS洗涤2次,每次5 min。在切片上滴加与一抗种属对应的荧光二抗工作液(1:100),样本需完全覆盖,避光,37℃,孵育1 h;去除二抗工作液,用缓冲液TBST洗涤3次,每次5 min,在样本上滴加1 μg/ml DAPI工作液,使用0.01 mol pH 7.2 TBS缓冲液配制,DAPI溶液:TBS缓冲液体积比1:1000,避光,室温孵育30 min;去除DAPI工作液,用缓冲液TBST洗涤3次,每次5 min,细胞孔板直接加入抗荧光衰减封片剂后,于荧光显微镜下观察并采集图像;通过将染色强度和染色面积分为0、1、2、3,以两者相加总分4分为界,将KDM5D的表达分为高低表达组,即高表达组染色强度和染色面积总分大于等于4,低表达组总分小于4。

**1.2.2 RNA提取和实时荧光定量PCR(qPCR)** 使用TRIzol试剂从培养细胞中提取总RNA,使用cDNA合成试剂盒生成cDNA的第一条链。qRT-

PCR采用SYBR Green PCR试剂盒和ABI Prism 7500序列检测系统进行。所用引物如下:KDM5D正向引物:5'-ACAAAGTCTCACTGTGTTGAC-3';反向:5'-ATACTCCTGTAATCCCAACAC-3'。相对定量的PCR参数为:在95℃下5 min循环1次进行预变性,然后在95℃下10 s和在60℃下30 s的40个循环进行变性和退火。KDM5D mRNA水平归一化至GAPDH水平。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析KDM5D的相对表达水平。试验重复3次。

**1.2.3 Western blot分析** 在Western blot实验中,首先收集细胞,并用PBS洗涤以去除残留物。随后使用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解缓冲液进行裂解,并收集上清液中的总蛋白。接下来,准备7.5%~10.0%聚丙烯酰胺凝胶,并使用堆栈凝胶电泳系统将蛋白样本加入凝胶孔中,同时加入分子量标记物。进行SDS-PAGE电泳,直至标记物达到底部。然后使用湿式电转印设备,将分离的蛋白从凝胶迁移到NC膜上,迁移缓冲液中含有甲醇和Tris-Glycine缓冲液,以确保有效迁移。在膜上进行1 h的阻断,使用TBST缓冲液含有5%脱脂奶粉或3%牛血清蛋白阻断非特异性结合。接着使用适当的KDM5D抗体(1:1000,英国Abcam公司)在4℃的条件下孵育膜过夜。之后,使用TBST缓冲液洗涤膜,每次10 min,共3次。使用荧光标记的二抗抗体在室温下孵育膜1 h。最后,使用化学发光(ECL)显影剂,将膜暴露于X光胶片上,在显影仪中获取图像,以分析并定量目标蛋白的表达。

**1.2.4 瞬转 si-KDM5D** 序列分别为5'-CAGUUU-AUUGACUCAUAUAUUTT-3'(正义链)和5'-AAUAUAUGAGUCAUAUAACUGTT-3'(反义链)。si-NC序列分别为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'(正义链)和5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(反义链)。转染48 h后提取总RNA或蛋白。

**1.2.5 过表达** 过表达基因采用转染方法进行,将包含目标基因KDM5D的过表达载体(CMV-KDM5D质粒,实验室构建,质粒序列参考addgene网站)转染至UM-UC-3细胞系中,收集蛋白后通过Western blot实验验证KDM5D是否成功过表达。

**1.2.6 CCK-8实验** ①在J82细胞转染siRNA及对照片段,在UM-UC-3细胞中转染过表达质粒,培养48 h后,做进一步实验。②当细胞生长达到其对数生长期后,将其进行胰酶消化后离心,1000 r/min,5 min,并将其重新悬浮。接下来,使用细胞计数板计算细胞数量,将细胞悬液稀释为5000个/ml

的浓度,接种于 96 孔板中。每孔接种 1 000 个细胞,分别接种 3 个复合孔,重复 3 组作 5 个时间段检测。在 96 孔板的所有四周边缘孔中加入 200  $\mu\text{l}$  的 1  $\times$  PBS 缓冲液,以防止培养基挥发导致的结果差异。随后将 96 孔板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱中进行培养。③ 细胞增殖检测:在 24 h 后,实验组和对照组分别选择 3 个位置对称的复合孔,吸除培养基。在避光条件下,向每个孔中分别加入 90  $\mu\text{l}$  的空白培养基和 10  $\mu\text{l}$  的 CCK-8 试剂制成的工作液。随后,将板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 1.5 h。最后,使用酶标仪检测每个孔在 450 nm 处的吸光值。④ 在 24、48、72、96 和 120 h 时,重复第 4 步操作,以检测不同样品在 450 nm 处的吸光值。

**1.2.7 平板克隆实验** ① 细胞收集和消化:显微镜观察细胞生长至对数生长期,用 0.25% 胰蛋白酶消化 4~7 min,使其分散成单个细胞。全培终止消化,1 000 r/min,5 min 离心后弃去废液,用 1 ml 培养基重悬,充分混匀后进行细胞计数。② 接种在 6 孔板中每个实验组接种 500 个细胞/孔,补加该细胞的完全培养基至 4 ml,充分吹打混匀。③ 将处理好的 6 孔板静置于细胞培养箱中培养 1~2 周左右,当出现肉眼即可清晰可见的克隆团块时,停止培养。④ 固定染色:弃去上清液,用 PBS 小心清洗 2~3 次。每孔加入 4% 多聚甲醛用于固定细胞,时间 15~20 min;移除固定液,PBS 洗涤 1 次,加 1 ml 结晶紫溶液染色 15 min;用 PBS 清洗细胞 2~3 次,晾干后置于正置显微镜下拍照。

**1.2.8 细胞迁移实验** 选择 J82 和 UC3 细胞系,并在含有 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养基中培养细胞,保持在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中,直到细胞达到 70%~80% 融合。将 Transwell 小室放入 24 孔培养板中。膜的上面为细胞种植面,下面为收集面。在 Transwell 小室的上层室中加入预处理的细胞悬液。细胞密度通常为  $3 \times 10^5$  个/ml。用无菌 PBS 清洗掉多余的细胞培养基,防止污染。在下室(收集室)添加含 10% 血清的 RPMI-1640 培养基。上室(细胞层面)则添加不含血清的培养基,确保迁移是由底部的刺激物诱导。细胞在刺激物的作用下开始迁移,经过 Transwell 膜上的孔进入下室。培养时间为 24 h。在这段时间内,细胞将在膜的下侧(下室)定向迁移。迁移完成后,用 PBS 冲洗 Transwell 小室,去除未迁移的细胞。将细胞用 4% 多聚甲醛溶液固定 10~15 min。用结晶紫溶液(0.1% 结晶紫,甲醇中溶解)染色 10~15 min。用 PBS 彻

底洗去未吸附的结晶紫,以去除背景干扰。在显微镜下观察并拍摄迁移细胞,对显微镜图像(选择 3 个不同的视野)中的迁移细胞进行计数。

**1.2.9 EdU 实验** 根据实验分组在 96 孔板各孔中接种 1 000 个细胞,待细胞贴壁后,加入含有 10  $\mu\text{mol/L}$  EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Sigma-Aldrich)的培养基,培养时间为 2 h,使增殖中的细胞在 DNA 合成期掺入 EdU。EdU 孵育结束后,弃去培养基,用 PBS 轻柔洗涤细胞。随后,用 4% 多聚甲醛(PFA)溶液在室温下固定细胞 10~15 min。固定后,使用 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)在室温下透化细胞 5~10 min,以便染料能够进入细胞核。EdU 通过点击化学反应与 Alexa Fluor 488 染料 (Invitrogen) 标记结合。将点击反应缓冲液新鲜配制,按 1 ml 反应缓冲液(860  $\mu\text{l}$  1  $\times$  EdU reaction buffer,40  $\mu\text{l}$   $\text{CuSO}_4$ ,1  $\mu\text{l}$  Cy3 Azide,100  $\mu\text{l}$  1  $\times$  EdU buffer additive)进行按需配置,每孔加入 500  $\mu\text{l}$  Click 反应液并在避光条件下孵育 30 min,使 EdU 与荧光染料发生共价结合。此步骤染色后的细胞核将带有荧光信号。染色完成后,用 PBS 充分洗涤细胞 3 次,去除未结合的荧光染料。使用荧光显微镜观察,用 DAPI 对细胞核进行复染,便于定位和对比。在显微镜下观察时,随机选取视野并计数带有荧光信号的细胞比例,以评估细胞增殖情况。

**1.2.10 ImageJ 荧光强度测量** 使用 ImageJ 测量收集的临床膀胱癌组织和正常膀胱上皮的荧光强度,以下为详细方法:打开 ImageJ 软件,打开需测量的荧光图像。点击 Image,选择 Color,选择 Split Channels,分割通道。将红色通道荧光图像转换为 8 bit 黑白图像。在一定阈值下,测量平均灰度值,以此代表平均荧光强度。

**1.2.11 生信分析** 从癌症基因组图谱(TCGA)数据库(<https://portal.gdc.com>)获得了 300 例男性膀胱肿瘤和 20 例正常癌旁组织的 RNAseq 数据和相应的临床信息,以  $|\log(\text{FoldChange})| > 2$ , adjusted  $P$  value  $< 0.05$  为标准,使用 R 包“ggplot2”,生成热图,共鉴定出 10 个差异表达的 RNA,Kaplan-Meier 曲线被用于估计高低差异基因表达水平组的生存率,通过 Log-rank 检验评估其差异的统计显著性,确定具有预后意义的基因 *KDM5D* 为目标基因。从 CCLE 数据集([https://depmap.org/portal/data\\_page/?tab=allData](https://depmap.org/portal/data_page/?tab=allData))获得了膀胱肿瘤的细胞系基因表达矩阵;收集相关通路中包含的基因集合<sup>[9]</sup>,根据 ssGSEA 算法,依次计算每条通路上每个样品的富集分数,从

而得到样本和通路之间的联系,通过计算基因表达与通路得分的相关性,获得该基因与通路关系。同时,使用了R包“immunedeconv”基于EPIC算法进行免疫评分评估。结果通过R软件包“ggplot2”进行呈现。以上所有分析方法和R软件包均使用v4.0.3版R软件执行。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

**1.3 统计学处理** SPSS(版本25)用于分析结果数据。采用student  $t$  检验评估膀胱正常上皮和膀胱癌组间 *KDM5D* 表达差异,采用Fisher确切概率法检验评估临床病理特征与 *KDM5D* 表达之间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 *KDM5D* 是膀胱癌中具有预后意义的Y染色体基因** 通过文献<sup>[10]</sup>检索发现Y染色体编码基因共43个(表1)。随后基于TCGA数据库BLCA队列(包含300名男性膀胱癌与20例正常膀胱组织)的RNAseq数据,利用差异分析筛选得到10个差异最为显著的基因(图1A)。挑选前3个基因进行生存分析,结果表明仅 *KDM5D* 与患者预后相关( $P < 0.05$ )(图1B)。因此,后续将 *KDM5D* 作为目标基因。

**2.2 *KDM5D* 在膀胱癌细胞系中的表达水平较低**

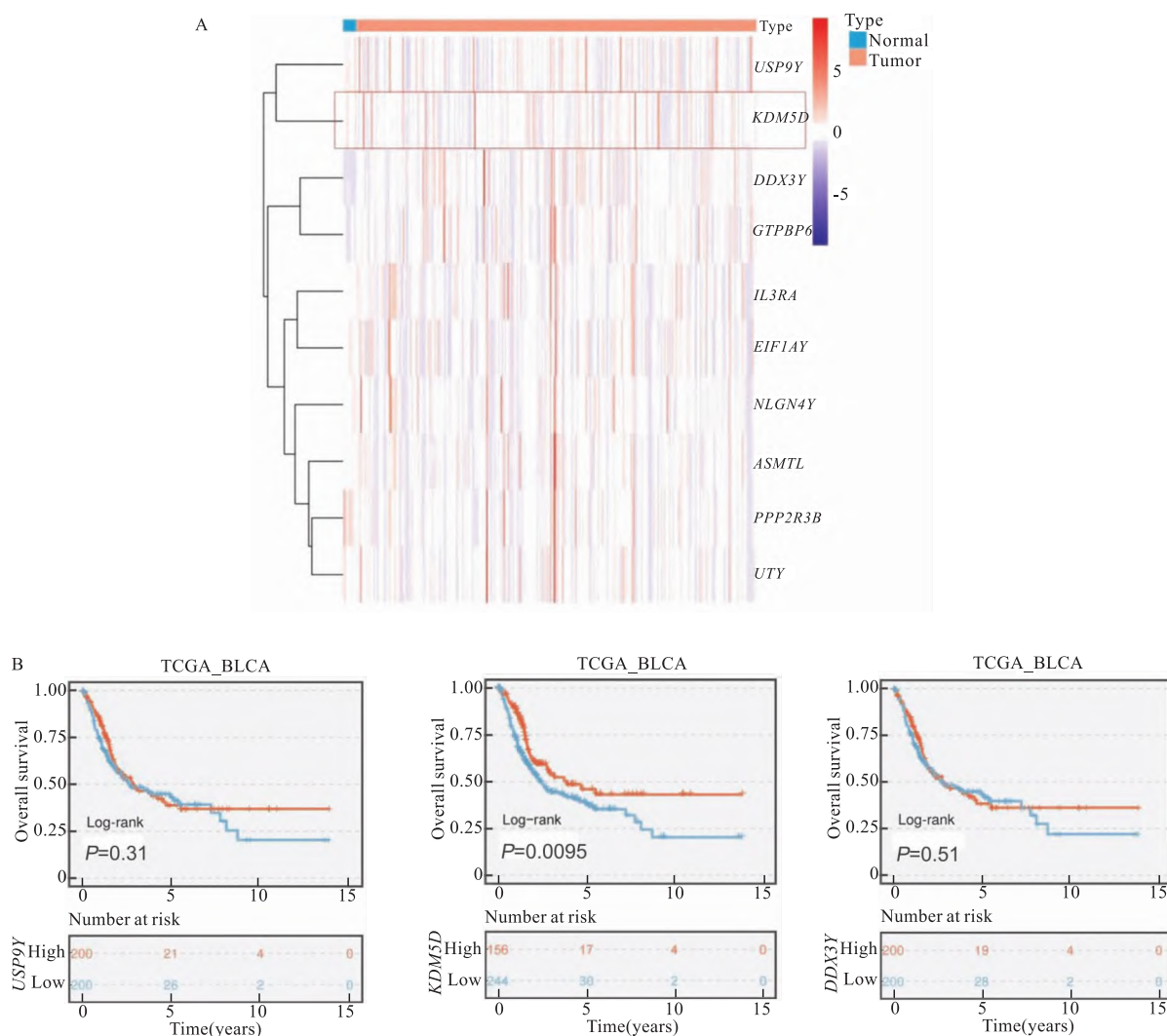


图1 Y染色体差异基因热图及前3基因生存曲线

Fig. 1 Heatmap of Y chromosome differential genes and survival curves for the top three genes

A: The heatmap shows the top 10 differentially expressed Y chromosome genes in bladder cancer; B: Survival curves for *USP9Y*, *KDM5D* and *DDX3Y*.

表 1 Y 染色体上的蛋白编码基因

Tab.1 Protein-coding genes on the Y chromosome

PAR1 zone	PAR2 zone	MSY zone
ASMT, ASMTL, CD99, CRLF2, CSF2RA, SFRS17A, GTPBP6, IL3RA, P2RY8, XG, DHRSXY, PLCXD1, PPP2R3B, SHOX, SLC25A6, ZBED1	SPRY3, SYBL1, IL9R, CXYorf1	AMELY, BPY2, CDY, DAZ, DDX3Y, EIF1AY, HSFY, KDM5D, NLGN4Y, PCDH11Y, PRY, RBMY, RPS4Y, SRY, TBL1Y, TGIF2LY, TMSB4Y, TSPY, USP9Y, UTY, VCY, XKRY, ZFY

基于 CCLE 数据集 (<https://portals.broadinstitute.org/ccle/>) 获得男性膀胱肿瘤细胞系的基因表达矩阵后明确 *KDM5D* 在不同膀胱癌细胞系中的表达水平。结果显示, *KDM5D* 在男性源性膀胱癌细胞系 (RT4、HT-1197、647-V、J82、5637、UM-UC-3/U3 等) 中表达存在显著差异, 在常用的膀胱癌细胞系中, *KDM5D* 在 RT4 和 J82 中表达最高, 而在 UM-UC-3 中几乎不表达 (图 2A)。qPCR 实验发现, *KDM5D* 在 4 种常用男性膀胱癌细胞系 (RT4、J82、5637、UM-

UC-3/U3) 中的表达与生物信息学结果相匹配, 且始终低于其在永生化人正常尿路上皮细胞系 (SV) 中的表达 (图 2B)。Western blot 验证结果与生物信息学分析结果一致, 且 *KDM5D* 在女性源性膀胱癌细胞系 T24 中没有表达 (图 2C)。

### 2.3 *KDM5D* 低表达时膀胱癌更易复发和转移

对膀胱癌正常上皮组织中的 *KDM5D* 进行了免疫荧光染色 (图 3A)。使用 student *t* 检验定量分析膀胱正常上皮和膀胱癌组织间 *KDM5D* 的表达差异, 结

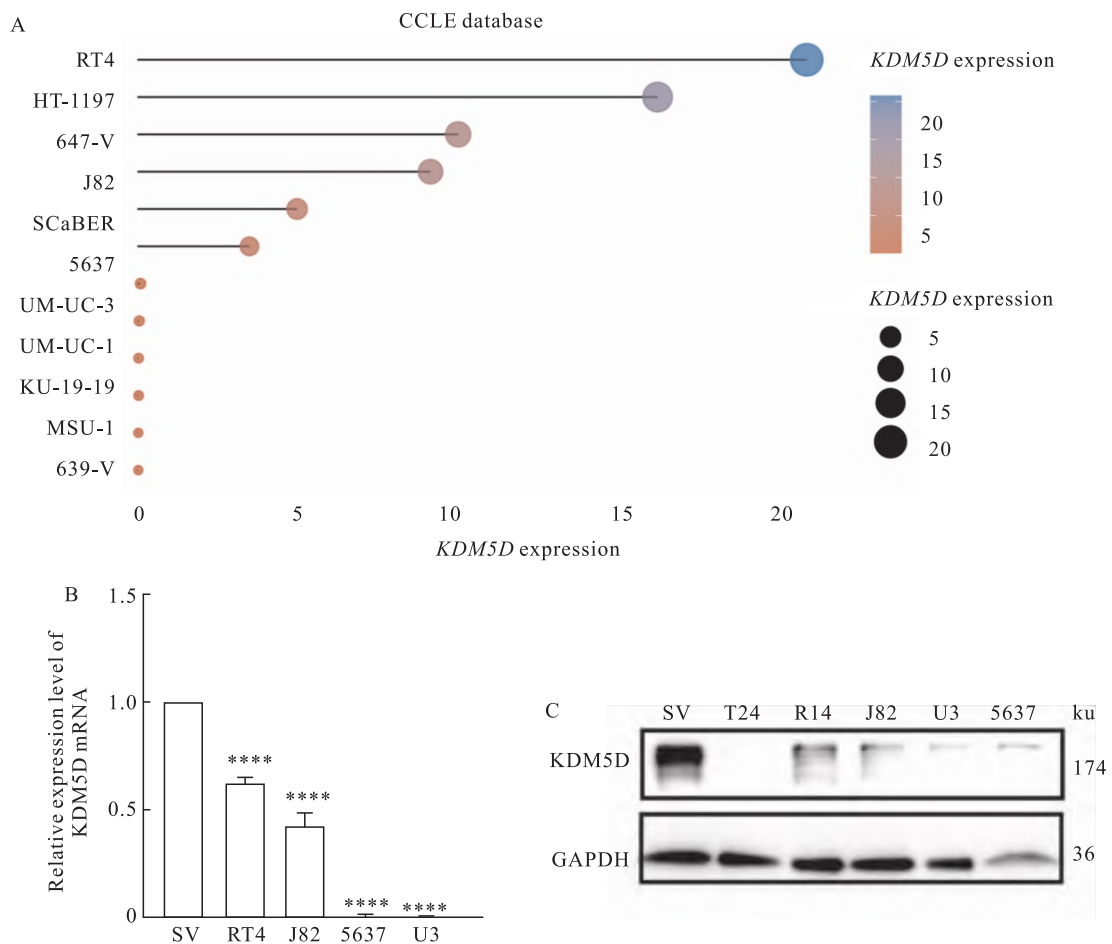


图 2 *KDM5D* 在永生化人正常尿路上皮细胞系和各膀胱癌细胞系中的表达图

Fig. 2 The expression of *KDM5D* in immortalized human normal urothelial cell lines and various bladder cancer cell lines

A: Expression of *KDM5D* in various male-derived bladder cancer cell lines based on the CCLE database; B: RNA expression of *KDM5D* in SV, RT4, J82, 5637, and U3 cell lines; C: Protein expression of *KDM5D* in SV, RT4, J82, U3, 5637 and T24 cell lines; UM-UC-3 = U3; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs SV.

果显示 *KDM5D* 在膀胱癌组织中的表达低于正常膀胱上皮组织 ( $t = 4.821, P < 0.05$ ) (图 3B)。组织芯片荧光 ( $n = 30$ ) 染色结果显示, *KDM5D* 在男性膀胱肿瘤组织中的荧光亮度和荧光面积均有差异 ( $t = 4.821, P < 0.05$ ) (图 3C)。以荧光染色强度和面积总分 4 分为界, 分为高低表达, 统计结果显示, 30 例男性膀胱组织中, 21 例相对低表达, 9 例相对高表达 (图 3D)。对比无复发或转移的膀胱癌组织与有复发或转移的膀胱癌组织中的 *KDM5D* 荧光强度, 发现 *KDM5D* 在无复发或转移的膀胱癌组织相对高表

达, 而在有复发或转移的膀胱癌组织中则无表达 (图 4), Fisher 精确检验显示 *KDM5D* 相对低表达与更高的癌症复发和转移倾向相关 (表 2)。

**2.4 敲低 *KDM5D* 显著促进膀胱肿瘤细胞的增殖和迁移, 过表达 *KDM5D* 则显著抑制膀胱肿瘤细胞的增殖和迁移** 由于 RT4 细胞聚团生长不利于后续实验。选定在 J82 细胞系中敲低 *KDM5D*, 在 UM-UC-3 细胞系中过表达 *KDM5D*。成功构建 *KDM5D* 敲低表达株 (Si2) (图 5A) 和 *KDM5D* 过表达株 (图 6A) 后, 分别进行 CCK-8 实验, 细胞迁移实验, 平板

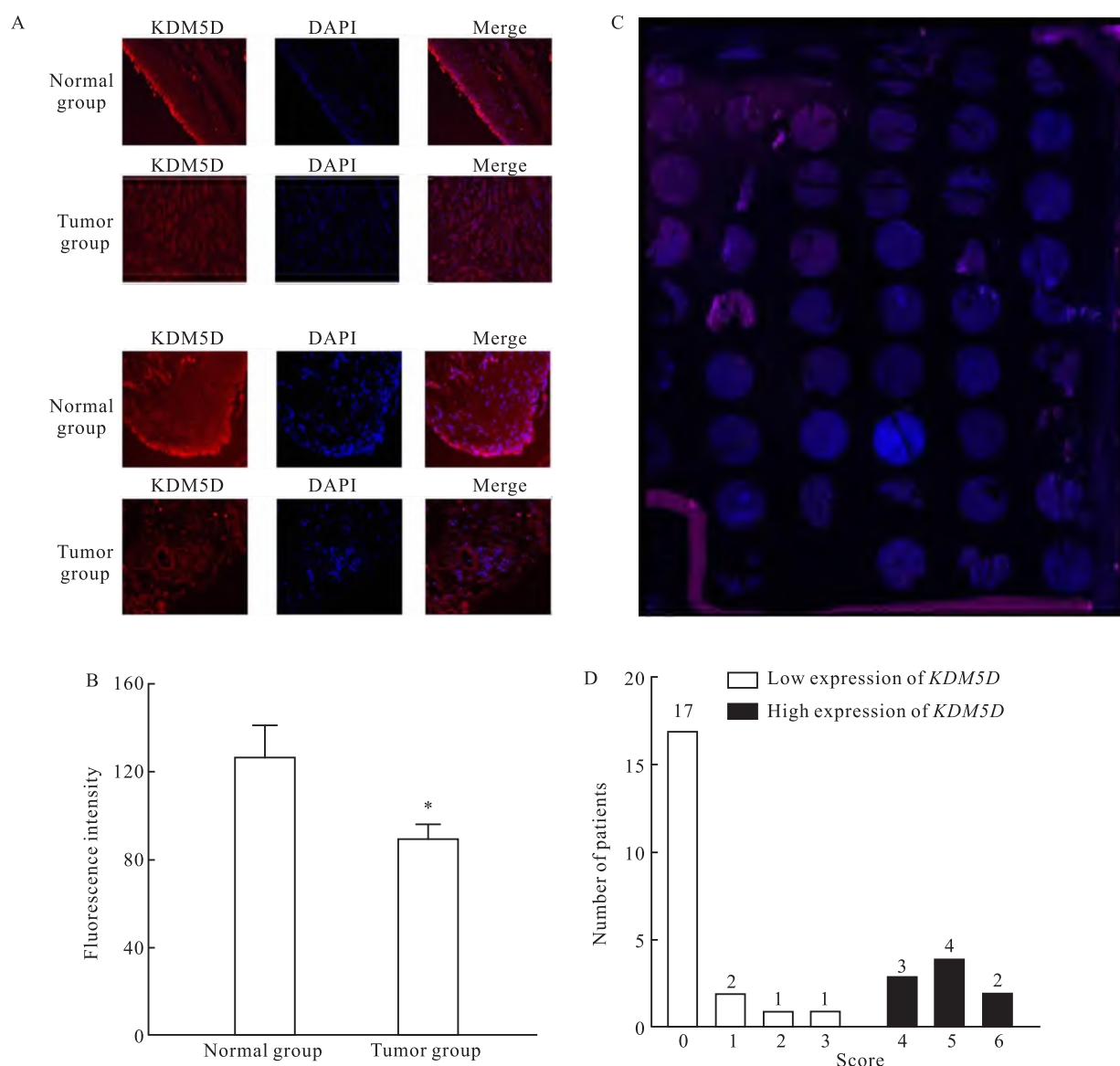


图 3 *KDM5D* 在膀胱癌组织及正常癌旁上皮组织中的表达

Fig. 3 The expression of *KDM5D* in bladder cancer tissues and adjacent normal epithelial tissues

A: Fluorescent expression of *KDM5D* in bladder tumor and adjacent normal epithelial tissues; B: Comparison of *KDM5D* expression between normal bladder epithelium and bladder cancer groups; C: Fluorescent expression of *KDM5D* in bladder cancer tissue microarray ( $n = 30$ ); D: Summary of expression scores for *KDM5D* on the tissue microarray; \*  $P < 0.05$  vs Normal group.

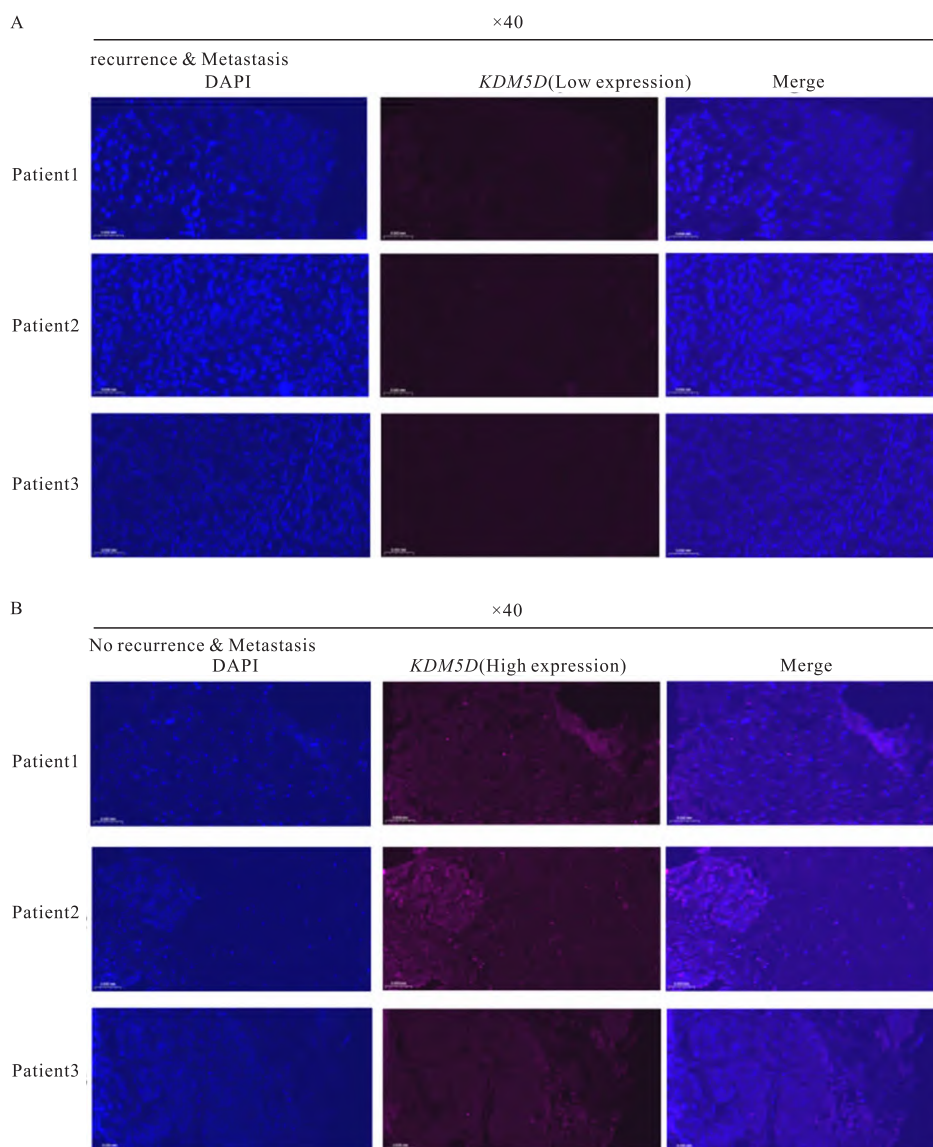


图 4 膀胱癌中 *KDM5D* 表达的免疫荧光图

Fig. 4 Immunofluorescence images of *KDM5D* expression in bladder cancer

A: Immunofluorescence images of *KDM5D* expression in metastatic or recurrent bladder cancer; B: Immunofluorescence images of *KDM5D* expression in non-metastatic or non-recurrent bladder cancer.

克隆实验和 Edu 等细胞功能实验,结果显示敲低 *KDM5D* 能够明显增强膀胱癌的增殖和迁移能力(图 5B - 5E),过表达 *KDM5D* 能够明显抑制膀胱癌的增殖和迁移能力(图 6B - 6E)。

### 2.5 *KDM5D* 的表达与转移和免疫通路密切相关

通过基因集合通路富集分析,共有 39 条通路与 *KDM5D* 的表达相关。这 39 种途径与代谢、缺氧反应、炎症、侵袭和转移等过程相关(图 7A)。本研究重点关注炎症反应和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT, EMT)通路,因为 EMT

是上皮细胞失去其形态和功能逐渐转化为间质样细胞的过程,与肿瘤复发和转移密切相关,同时因为男女尿路感染的显著差异,炎症反应也被密切关注。使用 R 包“immunedeconv”基于 EPIC 算法进行免疫评分评估。结果显示,*KDM5D* 的高表达与 T 细胞的高表达相关,特别是 CD8<sup>+</sup> T 细胞( $t = 6.038, P < 0.001$ )(图 7B)。同时通过在 J82 细胞系中敲低 *KDM5D* 后和在 UM-UC-3 细胞中过表达 *KDM5D* 进行 Western blot 实验对 EMT 相关蛋白进行测定,发现 *KDM5D* 低表达时 Vimentin 蛋白表达增加(图

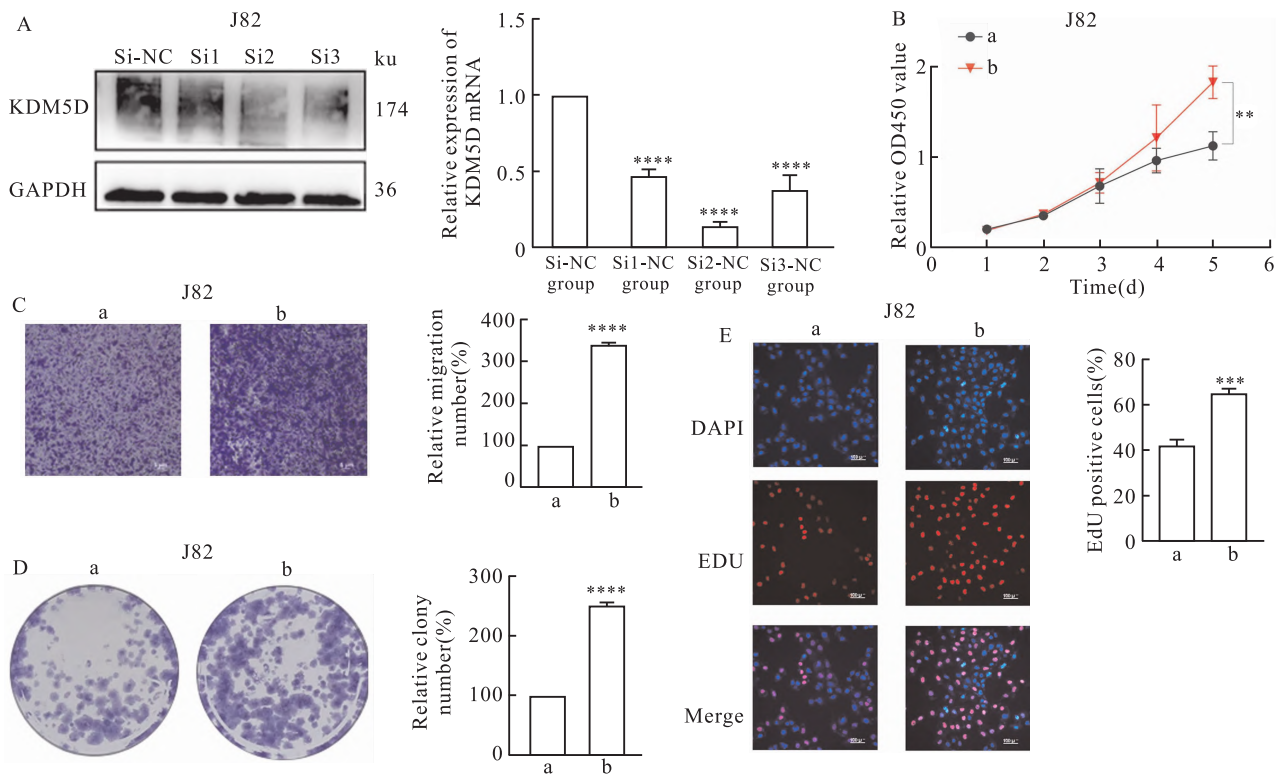


图5 *KDM5D* 敲低后细胞功能实验结果

Fig. 5 The results of cell function assays after *KDM5D* knockdown

A: Knockdown efficiency of *KDM5D* in the J82 cell line; B - E: Results of cell function assays after *KDM5D* knockdown, including CCK-8 assay, migration assay, colony formation assay, and EDU assay; a: Si-NC group (negative control); b: Si-*KDM5D* group (*KDM5D* knockdown); \* \*  $P < 0.01$ , \* \* \*  $P < 0.001$ , \* \* \* \*  $P < 0.0001$  vs Si-NC group (negative control).

表2 *KDM5D* 表达高低与膀胱癌临床特征的关系 [n(%)]

Tab. 2 Relationship between *KDM5D* expression and clinical features of bladder cancer [n(%)]

	Low expression	High expression	P value
Age( years)			
≤60	6 (20.00)	3 (10.00)	1.00
> 60	15 (50.00)	6 (20.00)	
BMI			
<24	9 (30.00)	4 (13.33)	1.00
≥24	12 (40.00)	5 (16.67)	
Tumour size(cm)			
≤3	12 (40.00)	6 (20.00)	0.94
>3	9 (30.00)	3 (10.00)	
T stage			
Ta + T1	10 (33.33)	4 (13.33)	1.00
T2 + T3 + T4	11 (36.67)	5 (16.67)	
Tumour grade			
Low	5 (16.67)	4 (13.33)	1.00
High	16 (53.33)	5 (16.67)	
Metastasis			
No	11 (36.67)	9 (30.00)	0.01
Yes	10 (33.33)	0 (0)	
Recurrence			
No	10 (33.33)	9 (30.00)	0.01
Yes	11 (36.67)	0 (0)	

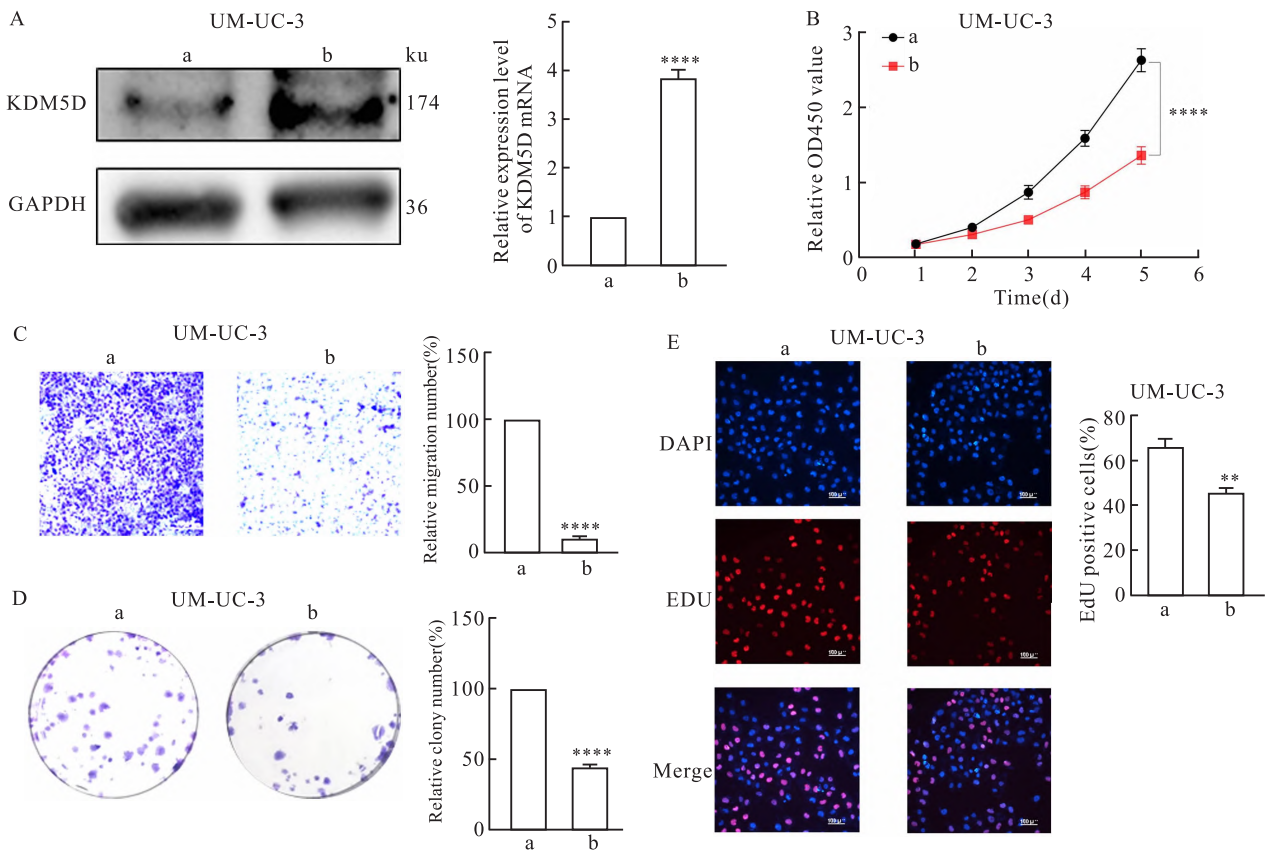
7C),过表达 *KDM5D* 后 Vimentin 蛋白表达降低(图 7D)。

### 3 讨论

本研究主要探究 *KDM5D* 在男性膀胱癌中的表达及其与预后的关系,并潜在探讨了影响男性膀胱癌预后的可能机制。

*KDM5D* 编码赖氨酸脱甲基酶,这是一类修饰组蛋白、对抗赖氨酸功能的组蛋白去甲基化酶<sup>[11]</sup>。这些赖氨酸脱甲基酶具有重要的非催化作用,包括将其他表观遗传修饰剂和转录因子招募到染色质上的特定位点<sup>[12]</sup>。*KDM5D* 和其同类的 *KDM6A*、*KDM5C* 在几种类型的癌症中具有显著的肿瘤抑制活性<sup>[13-14]</sup>。目前的研究<sup>[15-16]</sup>认为,随着年龄的增长,男性会出现 Y 染色体丢失(loss of Y Chromosome, LOY)或基因表达极度下调(extreme down-regulation of chromosome Y gene expression, EDY),LOY 和 EDY 已成为男性癌症风险的标志。在本研究中,无论是正常男性还是男性膀胱癌患者,*KDM5D*的表达均与



图6 *KDM5D* 过表达后细胞功能实验结果Fig. 6 The results of cell function assays after *KDM5D* overexpression

A: Successful overexpression of *KDM5D* in the UM-UC-3 cell line; B – E: Results of cell function assays after *KDM5D* overexpression, including CCK-8 assay, migration assay, colony formation assay, and EdU assay; a: Vector group (control); b: OE-*KDM5D* group (*KDM5D* overexpression); \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs Vector group (control).

年龄无关,说明 *KDM5D* 在男性膀胱癌里的 LOY 或者 EDY 待由其他因素解释。

本研究通过膀胱癌组织芯片荧光染色发现, *KDM5D* 在膀胱癌中的表达低于正常膀胱上皮组织,且 *KDM5D* 低表达时膀胱癌更易复发和转移,说明 *KDM5D* 表达的高低影响着膀胱肿瘤的转移和复发,同时细胞功能实验也证明敲低 *KDM5D* 促进膀胱癌细胞的增殖和迁移能力,提示 *KDM5D* 是膀胱癌的保护基因。本研究结果显示,女性膀胱癌中是无 *KDM5D* 表达的,而男性膀胱癌中则有着不同情况的表达,说明 *KDM5D* 是男性膀胱癌患者独有的一个保护基因,这可能是男性膀胱癌预后好于女性的原因之一。

本研究生信分析发现 *KDM5D* 的表达与代谢、缺氧反应、炎症、侵袭和转移等过程相关。本研究进一步生信分析显示 *KDM5D* 高表达会增加 T 细胞尤其是  $CD8^+$  T 细胞的浸润。此外,本研究通过 West-

ern blot 实验证实 *KDM5D* 的表达将会影响 EMT 相关蛋白 Vimentin 的表达,*KDM5D* 低表达时 Vimentin 表达明显升高。通过以上实验可以推测 *KDM5D* 可以直接或间接影响 EMT 或影响免疫细胞浸润从而影响膀胱肿瘤的迁移,具体机制尚待进一步研究。

总之,本研究从 Y 染色体基因出发探讨膀胱癌预后差异,发现 Y 染色体基因 *KDM5D* 在男性膀胱癌中呈总体低表达,且较低表达时膀胱癌更易转移和复发,而相对高表达时膀胱癌则不易转移和复发,其机制可能与影响 EMT 和免疫细胞浸润有关,具体的调控还需要进一步探索研究。本研究已经初步证明 Y 染色体基因在膀胱癌生物学性别差异上起到了相当大的作用,为分子蛋白层面的精准医疗打下坚实基础。本研究具有较大的临床意义,在男性膀胱癌中,可以通过寻找增加 *KDM5D* 表达的机制或方法,或者抑制 *KDM5D* 表达降低的程度,降低膀胱癌的复发和转移,从而改善男性膀胱癌的预后。

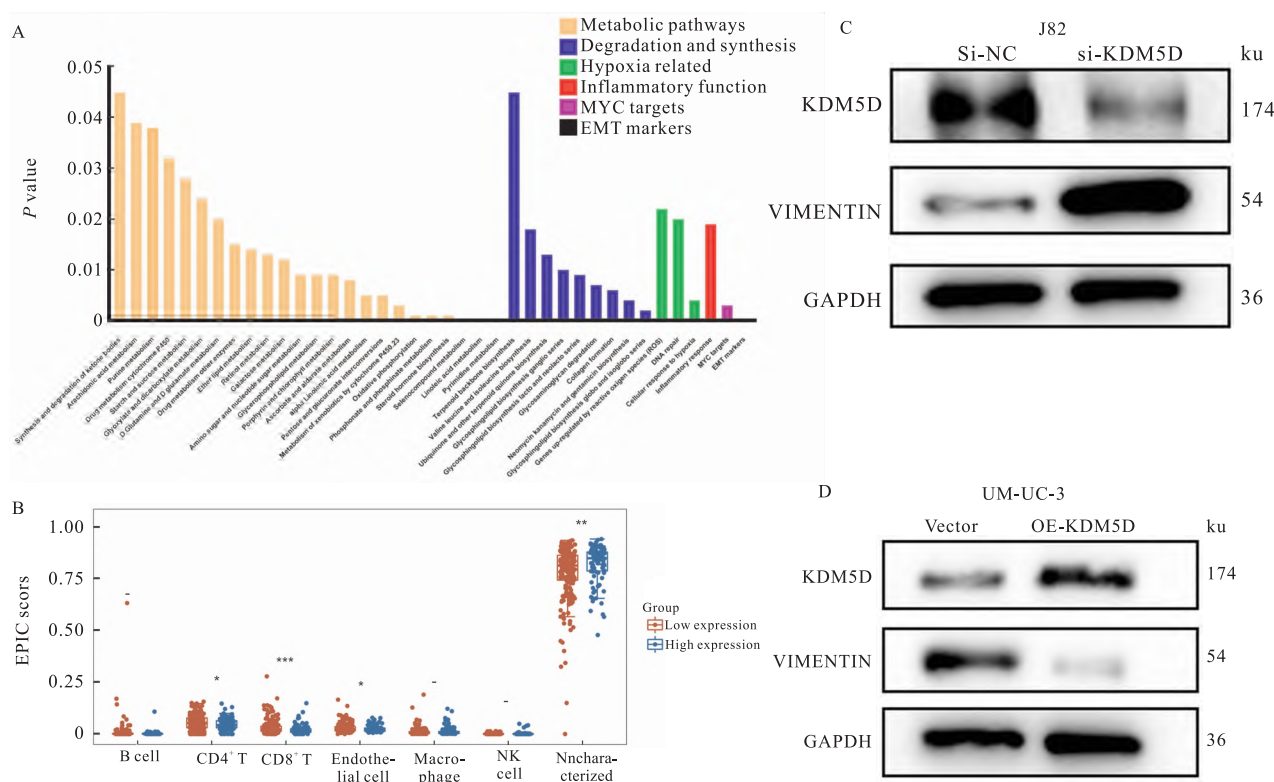


图7 *KDM5D* 表达与下游通路关系图

Fig. 7 Diagram showing the relationship between *KDM5D* expression and downstream pathways

A: 39 metabolic pathways related to the expression of *KDM5D* in gene set pathway enrichment analysis; B: Expression of immune cells under different *KDM5D* expression levels; C: Vimentin expression after *KDM5D* knockdown in the J82 cell line; D: Vimentin expression after *KDM5D* overexpression in the UM-UC-3 cell line; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs High expression of *KDM5D*.

本研究不足之处是对 *KDM5D* 的下游调控机制研究不够深入, 仅从生信分析和简单的 Western blot 实验验证推断出 *KDM5D* 可以直接或间接影响 EMT 或影响免疫细胞的聚集从而影响膀胱肿瘤的迁移, 后续需要进行深入的机制探讨。

参考文献

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-63. doi:10.3322/caac.21834.

[2] Mohamad Al-Ali B, Madersbacher S, Zielonke N, et al. Impact of gender on tumor stage and survival of upper urinary tract urothelial cancer: a population-based study[J]. Wien Klin Wochenschr, 2017, 129(11-12): 385-90. doi:10.1007/s00508-016-1088-4.

[3] Martínez-Rojo E, Berumen L C, García-Alcocer G, et al. The role of androgens and androgen receptor in human bladder cancer[J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 594. doi:10.3390/biom11040594.

[4] Toren P, Wilkins A, Patel K, et al. The sex gap in bladder cancer survival - a missing link in bladder cancer care? [J]. Nat Rev

Urol, 2024, 21(3): 181-92. doi:10.1038/s41585-023-00806-2.

[5] Lobo N, Afferi L, Moschini M, et al. Epidemiology, screening, and prevention of bladder cancer[J]. Eur Urol Oncol, 2022, 5(6): 628-39. doi:10.1016/j.euo.2022.10.003.

[6] Doshi B, Athans S R, Woloszyńska A. Biological differences underlying sex and gender disparities in bladder cancer: current synopsis and future directions[J]. Oncogenesis, 2023, 12(1): 44. doi:10.1038/s41389-023-00489-9.

[7] Cunningham C M, Li M, Ruffenach G, et al. Y-chromosome gene, Uty, protects against pulmonary hypertension by reducing proinflammatory chemokines[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 206(2): 186-96. doi:10.1164/rccm.202110-2309OC.

[8] Li J, Lan Z, Liao W, et al. Histone demethylase *KDM5D* upregulation drives sex differences in colon cancer[J]. Nature, 2023, 619(7970): 632-9. doi:10.1038/s41586-023-06254-7.

[9] Wei J, Huang K, Chen Z, et al. Characterization of glycolysis-associated molecules in the tumor microenvironment revealed by pan-cancer tissues and lung cancer single cell data[J]. Cancers, 2020, 12(7): 1788. doi:10.3390/cancers12071788.

[10] Kido T, Lau Y F. Roles of the Y chromosome genes in human

- cancers[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(3): 373–80. doi:10.4103/1008-682X.150842.
- [11] Song Y Q, Yang G J, Ma D L, et al. The role and prospect of lysine-specific demethylases in cancer chemoresistance [J]. *Med Res Rev*, 2023, 43(5): 1438–69. doi:10.1002/med.21955.
- [12] Aubert Y, Egolf S, Capell B C. The unexpected noncatalytic roles of histone modifiers in development and disease[J]. *Trends Genet*, 2019, 35(9): 645–57. doi:10.1016/j.tig.2019.06.004.
- [13] Shen X, Hu K, Cheng G, et al. KDM5D inhibit epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer through demethylation in the promoter of *Cul4A* in male[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12247–58. doi:10.1002/jcb.27308.
- [14] Ntziachristos P, Tsigos A, Welstead G G, et al. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Nature*, 2014, 514(7523): 513–7. doi:10.1038/nature13605.
- [15] Cáceres A, Jene A, Esko T, et al. Extreme downregulation of chromosome Y and cancer risk in men[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2020, 112(9): 913–20. doi:10.1093/jnci/djz232.
- [16] Guo X, Li J, Xue J, et al. Loss of Y chromosome: an emerging next-generation biomarker for disease prediction and early detection? [J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2021, 788: 108389. doi:10.1016/j.mrrev.2021.108389.

## Research on the mechanism by which the Y chromosome gene *KDM5D* inhibits the malignant progression of male bladder cancer

Ran Yuefei<sup>1,2,3,4</sup>, Yao Xudong<sup>1,2,3,4</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Clinical College, Anhui Medical University, Shanghai 200072; <sup>2</sup>The Fifth Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>3</sup>Dept of Urology, Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200072; <sup>4</sup>The Urological Cancer Institution Affiliated to Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072)

**Abstract Objective** To investigate the expression of the Y chromosome gene lysine-specific demethylase 5D (*KDM5D*) in male bladder cancer and its effects on cancer progression, thereby explaining gender-related prognostic differences in bladder cancer. **Methods** Bioinformatics analysis was conducted to identify *KDM5D* as a differentially expressed Y chromosome gene with prognostic significance in bladder cancer based on data from the TCGA database. The expression of *KDM5D* in bladder cancer cell lines, collected clinical bladder cancer tissues, and adjacent normal epithelial tissues were examined using quantitative Real-time PCR (qPCR), Western blot, immunofluorescence, tumor microenvironment analysis, and bioinformatics pathway analysis. The effects of *KDM5D* on bladder cancer cell proliferation and migration were validated through cell experiments following *KDM5D* knockdown and overexpression. Additionally, clinical data on *KDM5D* expression in bladder cancer tissue arrays were statistically analyzed in relation to metastasis and recurrence. **Results** *KDM5D* was generally downregulated in male bladder cancer but exhibited variable expression in different bladder cancer cell lines and between recurrent and non-recurrent bladder cancers. Overexpression of *KDM5D* inhibited tumor cell proliferation and migration, and lower *KDM5D* expression was associated with higher recurrence and metastasis rates. Bioinformatics analysis suggested that *KDM5D* might influence tumor metastasis or recurrence by affecting immune cell aggregation and epithelial-mesenchymal transition. **Conclusion** *KDM5D* is a protective gene specific to male bladder cancer and may be associated with the generally better prognosis observed in male compared to female bladder cancer patients.

**Key words** *KDM5D*; Y chromosome gene; gender; bladder cancer; prognostic differences; EMT

**Fund program** Science and Technology Plan Project of Shanghai(No. 22140903800)

**Corresponding Author** Yao Xudong, E-mail: yaoxudong1967@163.com