DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.1007
文章编号 1671-8852(2025)12-1590-10

SPRR1B分子在膀胱癌中的促癌作用研究

周峻汀 杨 桂 胡 鑫
武汉大学中南医院检验科 湖北 武汉 430071

摘要 目的：通过生物信息学方法综合分析富含脯氨酸小蛋白（SPRR）基因家族在膀胱癌中的表达情况和临床意义，并初步分析关键分子SPRR1B的作用机制。方法：首先进行SPRR家族在膀胱癌中的表达及上下游调控分析，随后探究SPRR家族表达及与膀胱癌临床病理特征之间的相关性。最后利用膀胱癌组织标本验证了SPRR1B的表达水平，并开展细胞实验验证了SPRR1B对膀胱癌细胞表型的影响。结果：SPRR1B/2D/2E/2G在膀胱癌组织中的表达水平显著高于正常组织。SPRR1A/1B/2A/2D/2F/2G/3/4的DNA甲基化水平均低于癌旁正常组织。对SPRR家族及其共表达基因所构建的蛋白互作网络的功能富集分析结果表明，富集到的通路包括胞间连接、程序性细胞死亡、细胞黏附等。SPRR1B/2A/2D/2E/2F/2G/3在组织学分级恶性程度较高的肿瘤中显著高表达。在两个数据库的分析结果中，SPRR1B/2A/2B/2E/2G的高表达都与患者预后不良相关。膀胱癌可能存在两个潜在的SPRR家族基因相关分子亚型，这两个亚型的患者之间存在预后差异。SPRR1B在膀胱癌患者组织中表达显著升高，且敲低SPRR1B能够抑制膀胱癌5637细胞增殖和迁移。结论：SPRR家族成员可能通过多种机制参与膀胱癌的发生发展，膀胱癌组织中SPRR1B表达明显升高，SPRR1B能促进膀胱癌5637细胞增殖和迁移。

关键词 膀胱癌；SPRR家族；生物信息学；SPRR1B
中图分类号 R737.14
文献标识码 A
开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

Exploration of the cancer promoting effect of SPRR1B in bladder cancer

ZHOU Junting, YANG Gui, HU Xin
Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To analyze the expression and clinical significance of the small proline rich protein (SPRR) gene family in bladder cancer by bioinformatics methods and explore the preliminary mechanism of the key molecule SPRR1B. **Methods:** Firstly, the expression and regulatory networks of the SPRR family in bladder cancer were analyzed. Then, the correlation between SPRR family expression and the clinicopathological features of bladder cancer was explored. The expression level of SPRR1B in bladder cancer tissues was verified, and cell experiments confirmed the effect of SPRR1B on the phenotypic traits of bladder cancer cells. **Results:** The expression levels of SPRR1B/2D/2E/2G in bladder cancer tissues were significantly higher than those in normal tissues. The DNA methylation levels of SPRR1A/1B/2A/2D/2F/2G/3/4 were lower than those in adjacent normal tissues. Functional enrichment analysis of the protein—protein interaction network constructed by the SPRR family and their co—expressed genes showed that the enriched pathways included intercellular junc-

课题来源：武汉大学中南医院医学科技创新平台建设支撑项目资助项目（编号：PTXM2022022）
作者简介：周峻汀，女，1998—，医学硕士生，主要从事肿瘤分子与数据科学研究，E-mail：z15927016277@163.com
通信作者：杨桂，女，1971—，副主任技师，主要从事免疫学检验的临床研究，E-mail:2932485805@qq.com；胡鑫，男，1994—，医学博士生，主要从事肿瘤分子与数据科学研究，E-mail: tmu2018huxin@163.com

tion, programmed cell death, cell adhesion, and related pathways. SPRR1B/2A/2D/2E/2F/2G/3 were highly expressed in tumors with higher histological grades. High expression of SPRR1B/2A/2B/2E/2G was associated with poor prognosis in two databases. There may be two potential molecular subtypes of bladder cancer related to SPRR family genes, and there exists a difference in prognosis between these two subtypes. The expression of SPRR1B is significantly increased in bladder cancer tissues, and SPRR1B knockdown can inhibit the proliferation and migration of bladder cancer 5637 cells. **Conclusion:** SPRR family members may be involved in the development of bladder cancer through multiple mechanisms. SPRR1B expression was significantly increased in bladder cancer tissues, and SPRR1B promoted the proliferation and migration of the 5637 cells.

Key Words　Bladder Cancer; SPRR Family; Bioinformatics; SPRR1B

膀胱癌是常见的泌尿系统恶性肿瘤。高龄、男性、吸烟都是膀胱癌的重要危险因素。流行病学研究也证明了遗传因素在膀胱癌的发生发展中起着重要作用[1]。膀胱癌目前是全球第10大常见的恶性肿瘤，每年约有新发病例57.3万，死亡病例21.3万。在中国，2022年确诊膀胱癌的患者已经达到9.15万，患者人数的增速约为4%。但在过去的30年里，膀胱癌的临床治疗未能取得突破性的重大进展，能从新兴的化疗或免疫治疗手段中获益的膀胱癌患者仍然比较有限。造成这种局面的重要原因之一是膀胱癌的确切机制至今尚未完全阐明。人们对膀胱癌在分子生物学层面的认识还亟待进一步完善，下游的临床应用的研究也仍然处于起步阶段，尚缺乏乳腺癌那样较为统一的共识和成熟的临床处理方法。因此，仍需进一步深入探索膀胱癌的分子病理机制，以开发对化疗和免疫治疗的疗效进行预测的标志物和新型疗法[2]。

在一项探索PI3K抑制剂和免疫检查点阻断剂联合治疗膀胱癌效果的研究[3]中，SPRR基因家族多个成员在PI3K抑制剂和免疫检查点阻断剂联合治疗的耐药肿瘤中出现上调，提示有必要进一步研究该家族基因在膀胱癌中的作用。富含脯氨酸小蛋白(small proline rich protein，SPRR)是在上皮细胞中发现的一组蛋白质，在角化细胞包膜的生成过程中发挥作用[4]。SPRR基因家族包括11个成员：2个SPRR1(SPRR1A，SPRR1B)，6个SPRR2(SPRR2A-SPRR2F，其中SPRR2C是假基因)，以及SPRR3和SPRR4，除SPRR2C外，其余各成员均编码蛋白。以往已有多项研究[5-6]证明，SPRR家族与多种恶性肿瘤的发生和转移相关，可调控肿瘤细胞的生物学行为。但目前尚未有研究全面分析SPRR家族在膀胱癌中的生物学作用与临床应用价值。因此，本研究拟使用多个数据库综合分析SPRR家族中具有蛋白编码功能的10个成员在膀胱癌中的表达及临床意义，并进一步利用基因互作网络中的样本特异性边缘扰动来探索SPRR家族在膀胱癌中的作用。

1　材料与方法

1.1　SPRR基因家族在膀胱癌中的生物信息学分析

1.1.1　基因表达及相关性分析　本研究通过TCGA官方下载工具GDC(https://portal.gdc.cancer.gov/)下载数据，使用R3.6.3软件分析和可视化TCGA库中的膀胱癌数据，共纳入418例膀胱癌组织和19例正常组织，分析膀胱样本与正常组织中SPRR家族成员的mRNA表达水平差异及各成员之间的相关性。采用Mann-Whitney U检验进行差异表达分析，$P<0.05$时视为差异有统计学意义。采用Spearman相关分析计算各基因之间的相关性。

1.1.2　甲基化分析　本研究使用UALCAN数据库(http://ualcan.path.uab.edu/)分析SPRR家族成员在膀胱癌中的DNA启动子甲基化水平，以及SPRR家族成员在膀胱癌不同分子亚型中的表达情况。采用t检验分析各组间基因表达水平差异的显著性，使用Perl脚本“Statistics::Ttest”执行分析。

1.1.3　共表达基因的蛋白互作分析及功能富集分析　本研究使用Linkedomics数据库(http://www.linkedomics.org/)[7]获取SPRR家族各成员在膀胱癌中的前50位共表达基因，使用STRING数据库(http://string-db.org/)构建SPRR基因家族与共表达基因的蛋白-蛋白相互作用网络，并对该网络进行基因本体论(GO)功能富集分析和Reactome信号通路富集分析，富集分析的结果以$P<0.05$为差异有统计学意义，并使用R3.6.3绘制图片进行展示。

1.1.4　临床病理特征分析　本研究使用R3.6.3分析TCGA数据库中收集的膀胱癌患者的临床资料，针

对组织学分级和病理分期指标开展分析,并对结果进行可视化,探究SPRR家族表达水平与这些临床病理特征是否具有相关性。采用Mann-Whitney U检验分析,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

1.1.5 生存分析 使用Kaplan-Meier plotter数据库(http://kmplot.com/analysis/)和PrognoScan数据库(http://www.PrognoScan.org/)分析SPRR家族表达水平与膀胱癌患者总生存期(overall survival,OS)间的关系。生存分析均采用Log-rank检验,$P<0.05$时视为差异有统计学意义。

1.1.6 基因扰动网络算法确定聚类分组及后续分析 基因扰动网络算法由以下几个步骤完成。

1.1.6.1 背景网络的获取与整合 本研究从Reactome Pathway Database中获取人类蛋白质功能相互作用网络,使用ReactomeFIPlugIn应用程序访问Reactome功能相互作用网络。准备好的相互作用网络由两部分构成:①包含10个SPRR家族基因在内的基因互作网络;②SPRR家族基因与其他基因之间的互作关系网络,这些互作关系被称为边。

1.1.6.2 测量个体样本水平上背景网络的扰动 在得到上述的基因和互作关系后,分别计算GTEx数据库和TCGA数据库中的正常膀胱样本的基因排序矩阵和膀胱癌患者的基因排序矩阵(Matrix1)。随后,将SPRR家族相关基因与两个矩阵取交集,得到只保留SPRR家族相关基因的基因排序秩矩阵(Matrix2)。得到Matrix2后,参考互作网络中的关系进行减法运算得到扰动关系矩阵(Matrix3),例如,基因A与基因B扰动关系记为B基因排序和A基因排序的差值。为了消除正常样本的基因互作关系的扰动,本研究将扰动关系矩阵(Matrix3)减去GTEX数据库得到的基因排序矩阵(Matrix1),最终得到了膀胱癌中的SPRR家族相关基因互作扰动矩阵(Final Matrix)。

1.1.6.3 无监督聚类分析 计算得到TCGA膀胱癌队列中的SPRR家族相关基因互作扰动矩阵后,使用无监督聚类(Consensus Cluster)的方法对所有样本进行聚类分析。用于聚类的表达矩阵的格式为:行为发生基因扰动的边的名称,列为样本的名称。本研究使用R包ConsensusClusterPlus进行无监督聚类计算,并在计算过程中重复迭代100次,以获得稳定的聚类效果,聚类方法为K-Means算法。此外,本研究还使用Consensus CDF和Delta area方法确定最优的聚类分组数目。

1.2 组织样本验证 本研究所用的组织标本来自2020年9月至2022年9月期间就诊于武汉大学中南医院、武汉大学人民医院、湖北省肿瘤医院并开展膀胱癌切除手术的患者。与肿瘤组织配对的癌旁组织来源于同一患者膀胱癌肿瘤组织边缘2.5 cm处的正常组织。所有患者的病理诊断均明确为膀胱癌。本研究利用TRIzol法提取样本的RNA,使用NanoDrop2000进行RNA浓度及纯度的检测。采用东洋纺生物科技公司的逆转录试剂盒设计逆转录反应体系。所有样本同时对目的基因SPRR1B以及内参基因GAPDH进行检测,均设置3个复孔。PCR仪器反应程序为:预变性阶段95 ℃ 5 min,3步法扩增阶段95 ℃、10 s,60 ℃、20 s,72 ℃、20 s,进行40个循环。反应结束后,对3个重复孔取平均值得到基因在各个样本中的Ct值,利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法表达肿瘤与相邻正常组织各基因相对表达水平,并以此计算两组样本基因表达是否有显著性差异。采用Mann-Whitney U检验进行分析,$P<0.05$时视为差异有统计学意义。

1.3 细胞实验 人类膀胱癌细胞株5637和人胚肾细胞株293T均受赠于武汉大学中南医院检验科。本研究利用慢病毒转染技术构建稳定敲降SPRR1B的5637细胞株,并利用该细胞株进行后续实验。

1.3.1 Transwell实验 对细胞进行24 h饥饿培养后,使用胰酶消化细胞,加入不含血清的RPMI 1640培养基,轻轻吹打至完全混匀,制成初始细胞悬液,控制细胞悬液密度为3×10^5 •mL^{-1}。将300 μL的细胞悬液加入至小室孔内,并在小室下层加入含有20%血清的RPMI 1640培养基600 μL,将24孔板放入细胞培养箱内,培养条件同上。培养48 h后弃去培养基,用PBS溶液洗涤一次,用无菌棉签擦掉小室中多余的细胞并再次用PBS溶液洗涤一次,每孔加入500 μL的4%多聚甲醛溶液固定15 min,小心弃掉后加入0.1%结晶紫溶液500 μL染色5 min。完成后用双蒸水清洗小室,用无菌棉签擦拭小室内部未迁移的细胞,放置于室温进行干燥,待其完全干燥后,于显微镜下观察细胞迁移情况并拍照记录。使用Image J软件进行细胞计数,并进行统计分析。

1.3.2 克隆形成实验 收集转染后的细胞,使用胰酶消化后,1 000 r•min^{-1}离心5 min,吸弃上清,加入PBS缓冲液清洗细胞。随后重复离心和吸弃上清的过程,得到细胞沉淀。加入适量含10%血清的RPMI 1640培养基重悬细胞,对细胞悬液进行计数后,按每孔800~1 000个细胞的密度将细胞铺至6孔板中。轻轻摇晃6孔板使细胞均匀分散于孔内,置于培养箱中培养。每隔2 d更换新鲜培养基,培

养7～14 d,在此期间持续使用显微镜观察细胞是否聚集生长。待细胞形成簇状聚集后,弃去培养基,使用PBS清洗2遍,加入4%多聚甲醛进行时长至少1 h的细胞固定。固定结束后弃去甲醛,加入结晶紫溶液染色,观察细胞增殖的具体情况。使用Image J软件进行细胞计数,并进行统计分析。

2　结果

2.1　SPRR基因家族在膀胱癌中的生物信息学分析

2.1.1　SPRR基因家族在膀胱癌中的表达水平和表达相关性分析　本研究使用R3.6.3软件对TCGA数据库中的BLCA样本进行分析,以确定SPRR家族成员在BLCA患者中的mRNA表达水平,共纳入418例BLCA组织和19例正常组织。如图1A所示,与正常组织相比,SPRR1B、SPRR2D、SPRR2E和SPRR2G在膀胱癌组织中的表达水平显著升高。其余SPRR家族成员的表达差异无统计学意义。Spearman相关分析检验SPRR成员之间的表达相关性,结果发现SPRR家族的所有成员之间均存在显著的正相关(图1B)。

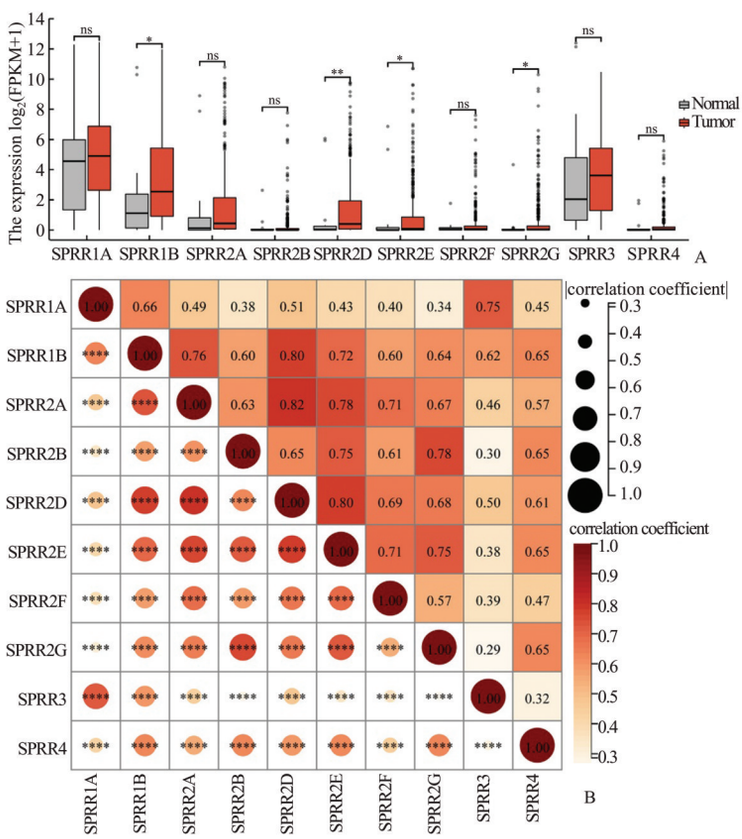


图1　SPRR基因家族在膀胱癌中的表达水平与表达相关性

A. TCGA数据库中,SPRR1B、SPRR2D、SPRR2E和SPRR2G在膀胱癌组织中的表达水平显著升高;B. TCGA数据库中SPRR家族所有成员的表达情况之间均存在显著的正相关;$^{ns}P>0.05$,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$,$^{****}P<0.000\,1$。

2.1.2　SPRR基因家族在膀胱癌中的启动子DNA甲基化情况分析　为了探究SPRR基因家族在膀胱癌中表达水平发生改变是否受到启动子DNA甲基化情况的影响,本研究使用UALCAN数据库分析了膀胱癌和癌旁正常组织中SPRR家族DNA启动子甲基化的差异,结果如图2所示。BLCA组织中SPRR1A、SPRR1B、SPRR2A、SPRR2D、SPRR2F、SPRR2G、SPRR3和SPRR4的DNA甲基化水平低于癌旁正常组织,SPRR2B和SPRR2E的DNA甲基化水平高于癌旁正常组织。因此,膀胱癌中SPRR家族mRNA表达的异常升高可能受到DNA启动子甲基化水平降低的影响。

2.1.3　SPRR基因家族与共表达基因的蛋白互作情况　为探讨膀胱癌中SPRR家族基因共表达基因之间的相互作用,本研究通过LinkedOmics数据库获得了膀胱癌中SPRR家族成员表达Spearman相关性前50位的共表达基因,共获得500个基因。然后,使用STRING数据库对这500个基因进行了蛋

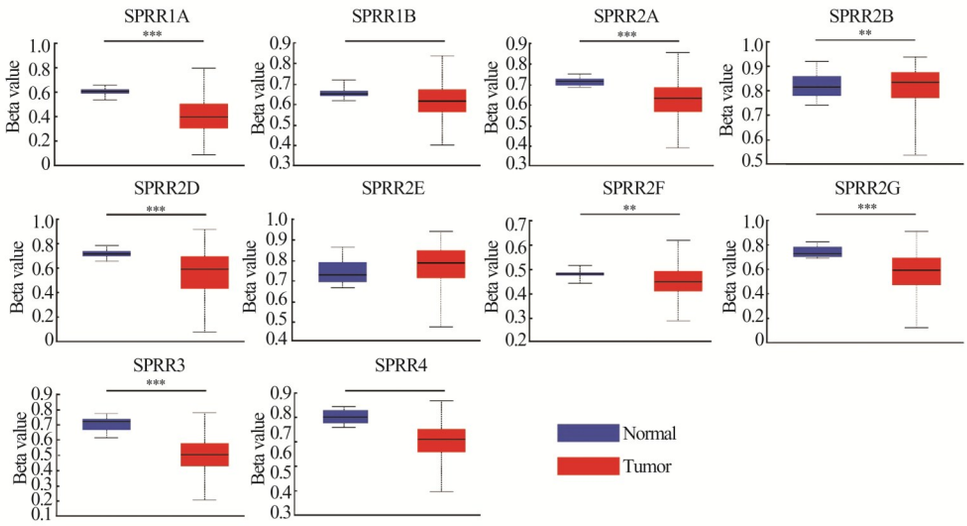


图2 UALCAN数据库中SPRR基因家族在膀胱癌样本与正常样本中的DNA启动子甲基化情况分析

$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

白互作情况分析,构建了蛋白互作网络。STRING数据库对该蛋白互作网络进行GO富集分析和Reactome通路富集分析的结果见图3。GO分析结果显示,富集的BP术语包括“细胞死亡”“细胞黏附”“程序性细胞死亡”等。富集的CC术语包括“胞间连接”“细胞外围”“细胞桥粒”等。富集到的MF术语主要包括“IL-1受体结合”“RAGE受体结合”等。Reactome通路富集分析显示,显著富集的通路主要包括“细胞连接”“细胞黏附蛋白的凋亡裂解”等。

2.2 SPRR基因家族与膀胱癌临床特征的相关性

2.2.1 SPRR基因家族与膀胱癌临床病理特征的相关性分析 为分析SPRR家族成员的基因表达水平与临床病理特征之间的相关性,本研究利用TCGA数据库中膀胱癌患者的临床资料,分析了SPRR基因家族在不同组织学分级和病理分期中的表达水平。如图4所示,SPRR1B/2A/2D/2E/2F的高表达和恶性程度较高的组织学分级显著相关。以上结果表明,SPRR家族有多个成员可能增加膀胱癌的恶性程度,导致不良的预后,进一步提示SPRR家族成员可能是膀胱癌的癌基因。

2.2.2 SPRR基因家族表达水平在膀胱癌中的预后价值分析 为评估SPRR基因家族在膀胱癌中的预后价值,本研究使用Kaplan-Meier plotter数据库和Prognoscan数据库评估了SPRR基因家族成员与膀胱癌患者生存期的相关性。在Kaplan-Meier plotter数据库中进行分析的结果如图5所示,表明SPRR1B、SPRR2A、SPRR2B、SPRR2D、SPRR2E、SPRR2F、SPRR2G和SPRR3的表达水平与患者OS相关,高表达水平患者的OS比低表达水平更差。Prognoscan数据库的分析结果如表1所示,SPRR1A、SPRR1B、SPRR2A、SPRR2B、SPRR2E和SPRR2G的表达水平与患者OS相关,高表达患者预后更差。在两个数据库的分析结果中,SPRR1B/2A/2B/2E/2G高表达都与患者预后不良相关。以上结果表明,SPRR基因家族中多个成员的表达水平与膀胱癌患者的预后密切相关,可能是膀胱癌预后不良的重要因素。

2.3 SPRR相关基因串扰网络识别膀胱癌中的分子亚型 本研究使用基因扰动网络算法计算得到了膀胱癌中的SPRR家族相关基因边缘扰动矩阵,算法流程图如图6所示,具体计算原理见方法部分。得到了该边缘扰动矩阵后,本研究根据无监督聚类算法对膀胱癌样本进行分组,并计算了当聚类个数分别为2~6时的聚类稳定性情况,结果显示,当聚类个数为2时,Delta area等评估模型稳定性的参数都能获得最优值,聚类效果最好,表明膀胱癌可能存在2个潜在的SPRR家族基因相关分子亚型。至此,根据膀胱癌中的SPRR家族基因扰动情况将膀胱癌样本分为二组:C1组($N=262$)和C2组($N=138$)。PCA分析显示了分组的有效性。生存分析发现,C1、C2间存在预后差异($P<0.05$)。

2.4 SPRR1B的促癌作用研究 综合上述结果,本研究发现SPRR1B在膀胱癌中发挥的作用相对显著,SPRR1B在膀胱癌组织中高表达,表达水平与恶性程度较高的组织学分级相关,且高表达的患者预后水平更差。因此针对SPRR1B开展后续实验。

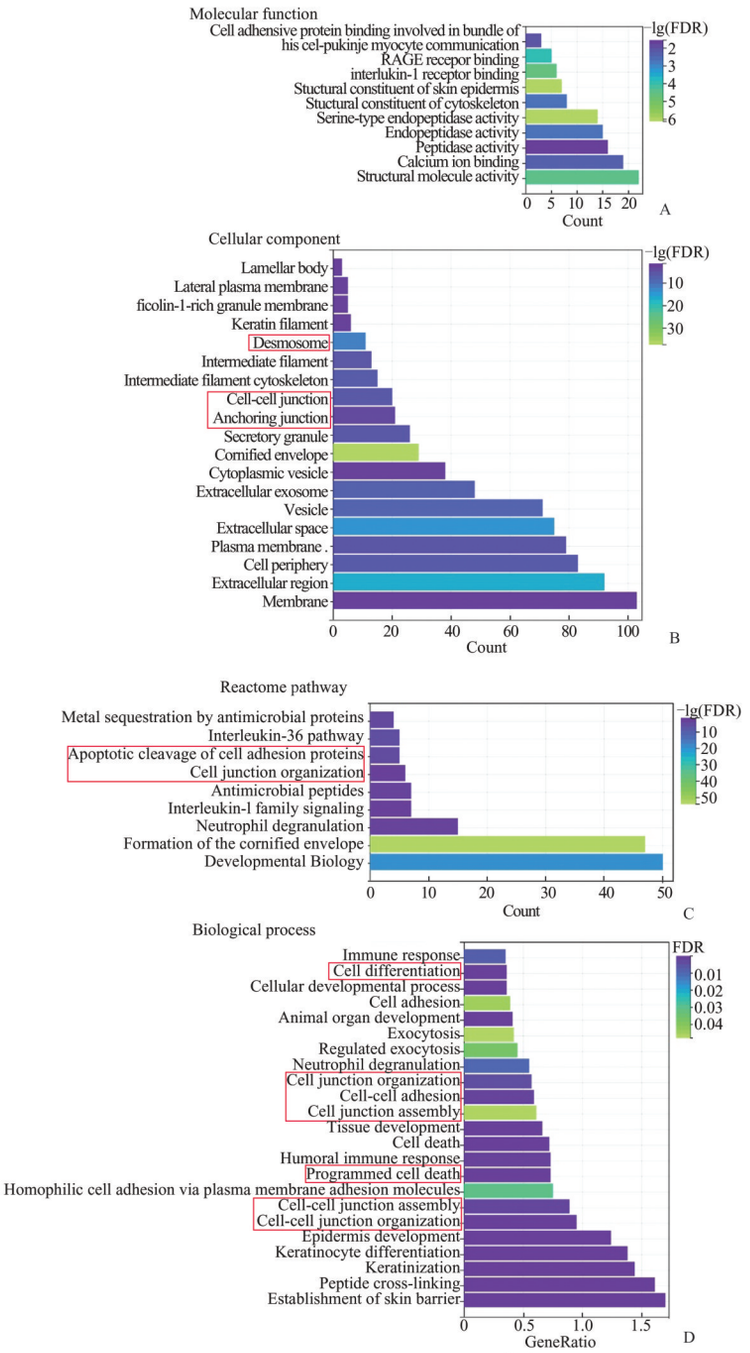


图 3　SPRR 基因家族与其共表达基因的 PPI 网络的功能富集分析

A.GO 富集分析得到的分子生物学功能(Molecular Function,MF)相关条目;B. GO 富集分析得到的细胞组分(Cellular Components,CC)相关条目;C. Reactome 信号通路富集分析得到的通路;D. GO 富集分析得到的生物学过程(Biological Process,BP)相关条目。

2.4.1　SPRR1B 在膀胱癌组织样本中的表达水平　为进一步验证 SPRR1B 在膀胱癌中的表达水平,本研究收集了来自 14 位膀胱癌患者的 14 对肿瘤组织和配对的癌旁组织。提取组织中的 RNA 对 SPRR1B 的表达水平进行检测。RT-qPCR 实验结果如图 7 所示,显示 SPRR1B 在肿瘤组织中的表达水平显著高于癌旁组织,与 TCGA 数据库中的分析结果一致。

2.4.2　SPRR1B 在膀胱癌细胞系中的作用研究　本研究利用慢病毒转染技术构建了敲低 SPRR1B 的 5637 细胞系,随后对转染 shRNA 质粒以及未作处理的 5637 细胞进行培养。当细胞生长稳定,处于对数生长期时,分别提取 RNA 进行荧光定量 PCR 检测 SPRR1B 基因表达水平。实验结果如图 8 所示,显示转染 shRNA 质粒的细胞中 SPRR1B 的表达

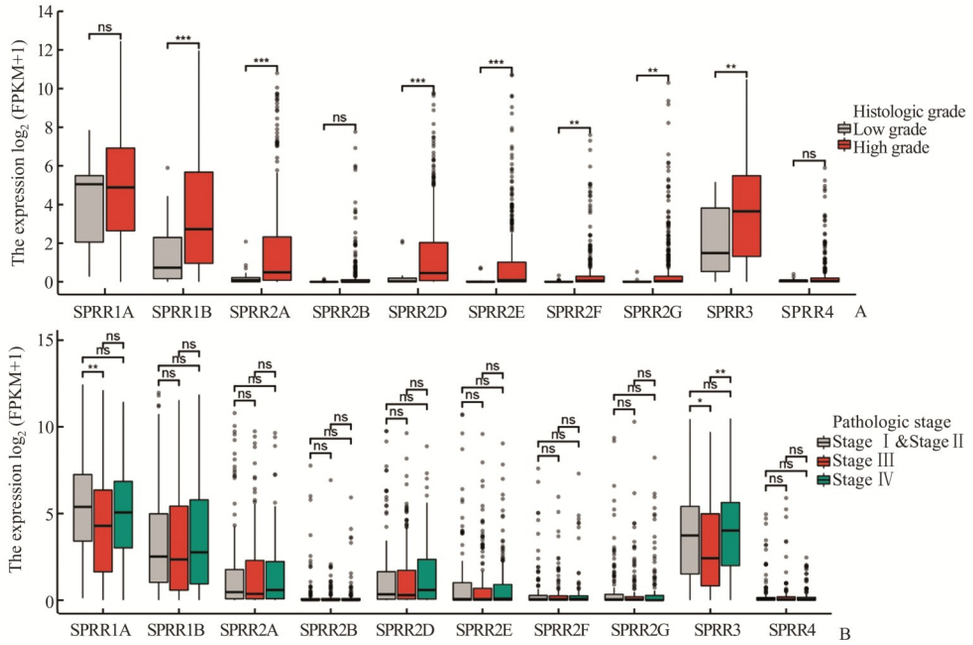


图4 TCGA数据库中SPRR基因家族在不同组织学分级和病理分期的膀胱癌样本中的mRNA表达水平分析

A. SPRR基因家族在不同组织学分级中的mRNA表达水平分析，SPRR1B/2A/2D/2E/2F的高表达和恶性程度较高的组织学分级显著相关；B. SPRR基因家族在不同病理分期中的mRNA表达水平分析；$^{ns}P>0.05$，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

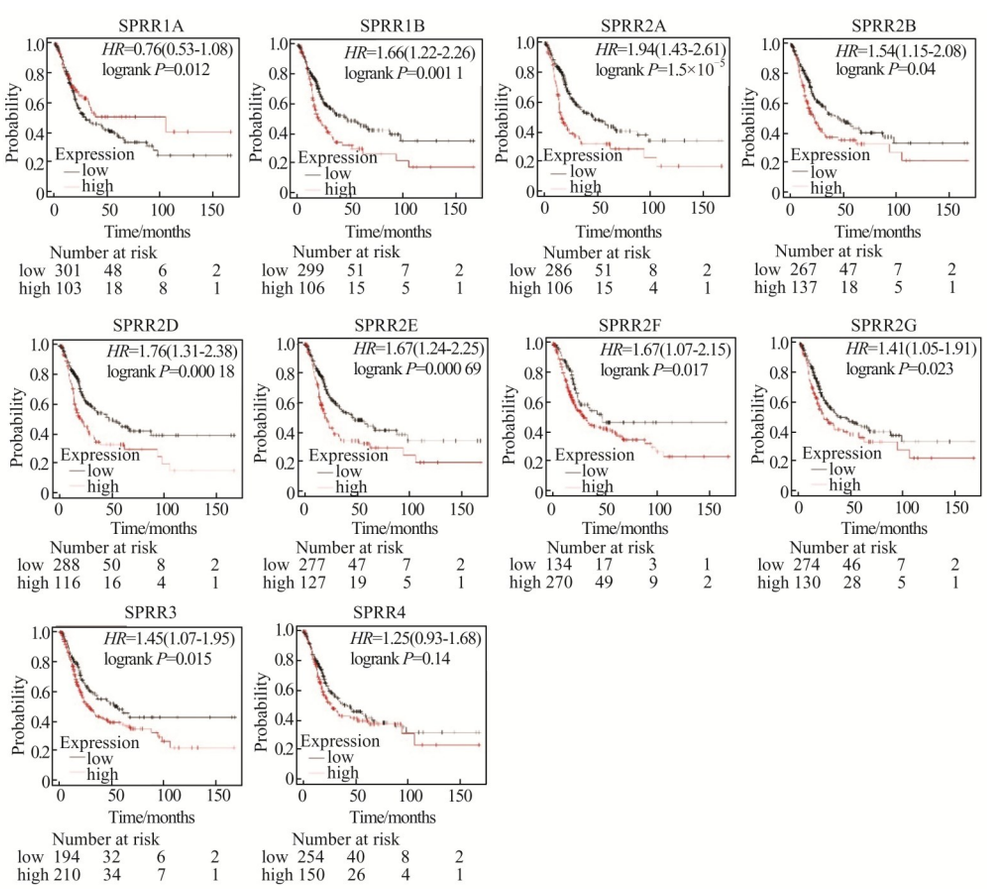


图5 SPRR基因家族在Kaplan-Meier plotter数据库中的预后价值分析

SPRR1B、SPRR2A、SPRR2B、SPRR2D、SPRR2E、SPRR2F、SPRR2G和SPRR3的表达水平与患者OS相关，高表达以上基因的患者预后水平更差。

表 1　SPRR 基因家族在 Prognoscan 数据库中的预后价值分析

基因	数据集	癌种	终点	Cox *P*	*HR*	95%*CI*
SPRR1A	GSE13507	BLCA	OS	0.041	1.16	1.01～1.34
SPRR1B	GSE13507	BLCA	OS	0.001	1.30	1.11～1.53
SPRR2A	GSE13507	BLCA	OS	0.002	1.37	1.12～1.67
SPRR2B	GSE13507	BLCA	OS	0.033	1.55	1.04～2.33
SPRR2E	GSE13507	BLCA	OS	0.015	1.32	1.06～1.66
SPRR2G	GSE13507	BLCA	OS	0.003	1.43	1.13～1.82

水平显著低于正常对照细胞。

2. 4. 2. 1　敲降 SPRR1B 抑制膀胱癌细胞增殖能力　利用克隆形成实验检验敲低 SPRR1B 对膀胱癌细胞增殖能力的影响。结果发现，敲低 SPRR1B 的实验组，细胞群落数目比正常组明显减少，说明敲低 SPRR1B 能够抑制膀胱癌细胞的增殖能力（图 9）。

2. 4. 2. 2　敲降 SPRR1B 抑制膀胱癌细胞迁移能力　采用 Transwell 实验检测敲降 SPRR1B 对 5637 细胞迁移能力的作用。结果发现，转染了 shRNA 质粒的 5637 细胞迁移出 Transwell 小室的细胞数量明显比未作处理的细胞更少。表明下调 SPRR1B 的表达水平会使 5637 细胞的迁移能力下降（图 10）。

3　讨论

近年来，人们对 SPRR 家族在癌症中的作用有了更深入的了解，已有多项研究[8-9]逐步揭示 SPRR 家族在多种恶性肿瘤中的生物学功能。SPRR 家族在临床诊疗中也具有一定的应用价值[10-11]，尚未有研究针对 SPRR 家族在膀胱癌发生发展中的作用开展具体的生物信息学分析。本研究首次对 SPRR 家族在膀胱癌中的表达水平、临床价值及潜在的作用机制进行了系统的生物信息学分析。

本研究通过对 TCGA 数据库中的膀胱癌和泛癌数据进行分析发现，SPRR1B、SPRR2D、SPRR2E 和 SPRR2G 在膀胱癌中的 mRNA 表达水平明显高于癌旁组织，且各个基因的表达水平均存在明显的正相关。DNA 甲基化调控机制的破坏会导致包括癌症在内的多种疾病。目前的研究[12]已经发现肿瘤中的异常 DNA 甲基化可通过多种机制促进肿瘤的发生发展。本研究发现膀胱癌组织中 SPRR1A/1B/2A/2C/2D/2F/2G/3/4 的 DNA 甲基化水平均低于癌旁正常组织，说明膀胱癌中 SPRR 家族 mRNA 表达水平的异常升高可能是 DNA 甲基化水平降低与其他因素共同作用的结果。为进一步阐明 SPRR 家族在膀胱癌中可能的作用机制，本研究收集了 SPRR 家族在膀胱癌中的共表达基因，利用这些基因构建了蛋白互作网络，并对该网络进行功能富集分析。富集到的生物学功能和通路包括细胞黏附和胞间连接相关功能。此前已有研究[13]报道 SPRR 家族成员能够影响恶性肿瘤的上皮间充质转化（EMT）过程，在 EMT 发展的进程中，细胞会出现紧密连接，黏附连接和细胞桥粒的丢失，从而导致细胞骨架变化，促进细胞迁移[8,14]。恶性肿瘤细胞发生 EMT 有利于其转移并扩散到机体的各个器官和组织，从而导致不良预后[15]。因此，本研究推测 SPRR 家族可能通过影响细胞连接和细胞黏附的方式影响恶性肿瘤的生物学表型。

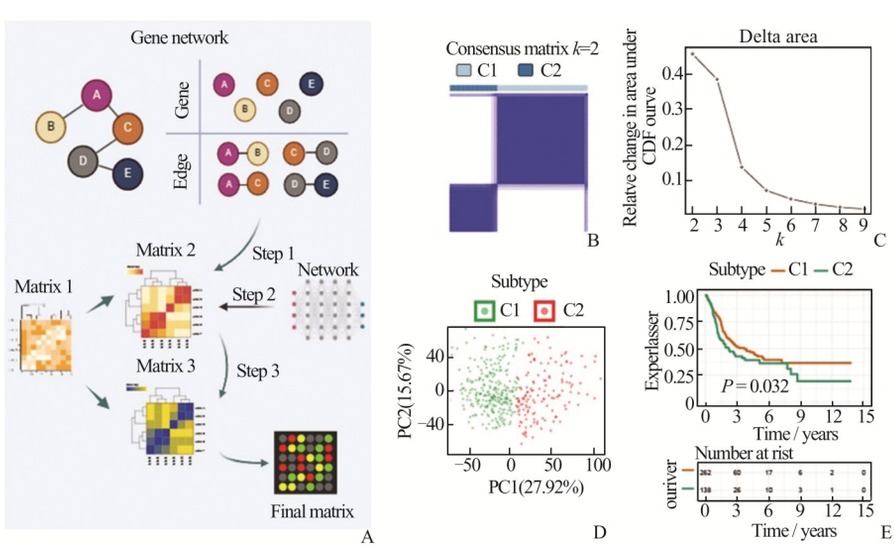


图 6　SPRR 相关基因串扰网络识别膀胱癌中的分子亚型

A. 基因扰动网络算法的过程：首先将基因表达矩阵转换为基因表达排名矩阵，随后参考互作网络中的关系进行减法运算得到边缘扰动矩阵，最后将边缘扰动矩阵用于后续的聚类分析；B. 样本聚类个数为 2 时的聚类情况；C. 当聚类个数为 2 时，Delta area 能获得最优值；D. 两个亚组间的 PCA 分析；E. 两个亚组之间的预后分析。

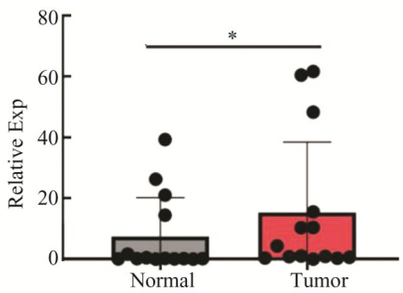


图7 SPRR1B在膀胱癌组织与配对癌旁组织中的表达水平

*$P<0.05$。

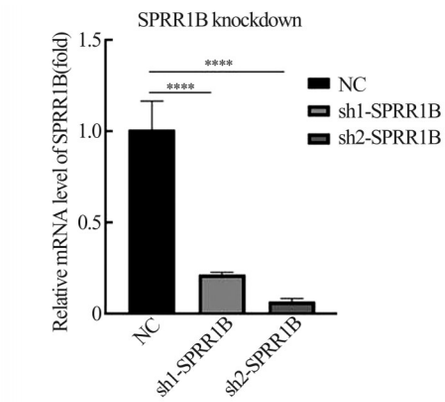


图8 SPRR1B敲降效率验证

****$P<0.000\ 1$。

为探索SPRR家族对膀胱癌临床病理特征的影响，本研究分析了TCGA数据库中的膀胱癌临床信息并利用在线数据库探索了SPRR家族表达水平与患者预后的相关性，发现SPRR家族有多个成员与较高的组织学分级相关，可能增加膀胱癌的恶性程度。这提示SPRR家族成员可能是膀胱癌的癌基因，且SPRR基因家族中多个成员的表达水平与膀胱癌患者的预后密切相关，可能是膀胱癌预后不良的重要因素。

为了从生物网络的角度探索SPRR家族的十个基因能否对膀胱癌的发生发展造成影响，本研究利用基因互作网络中的样本特异性边缘扰动来探索膀胱癌的异质性，并在此基础上进行无监督聚类分析，建立了基于边缘扰动的膀胱癌样本聚类。最终将膀胱癌样本分为2个分子亚型，对这两组患者进行预后分析发现，两组患者之间存在预后差异。

综上所述，在SPRR家族的各个成员中，SPRR1B在膀胱癌中发挥的作用较为显著。SPRR1B在膀胱癌组织中表达明显上调，并与较高的组织学分级和较差的预后相关。因此，本研究验证了SPRR1B在膀胱癌组织中的表达水平，发现SPRR1B在癌组织中显著上调，与TCGA数据库中的表达趋势一致。此外，本研究还通过细胞表型实验进一步验证了SPRR1B基因在膀胱癌细胞系5637中的作用，结果发现，与正常对照相比，敲降SPRR1B的细胞增殖和迁移能力下降，这提示SPRR1B在膀胱癌中促进肿瘤细胞增殖和迁移，具有促癌作用。目前也有多项研究报道过SPRR1B

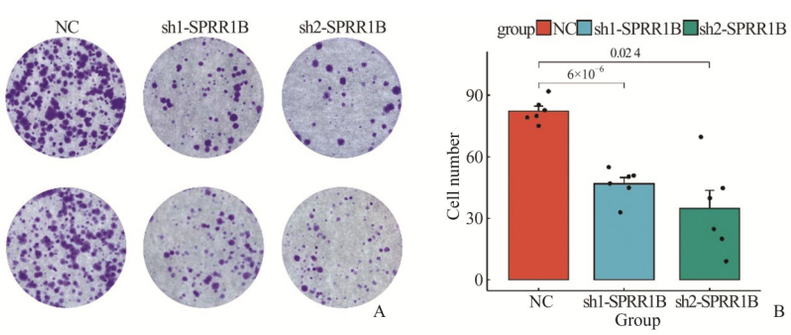


图9 敲降SPRR1B对膀胱癌细胞增殖的影响

A.细胞克隆形成情况镜下观；B.阴性对照组与两个敲降SPRR1B组细胞克隆形成数目的差异。

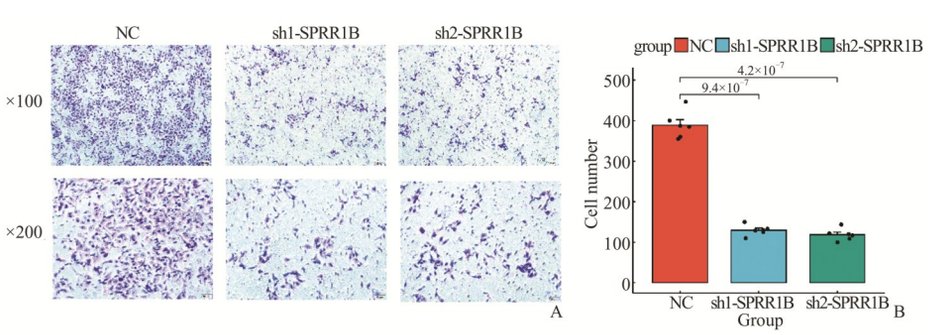


图10 敲降SPRR1B对膀胱癌细胞迁移能力的影响

A.细胞迁移情况镜下观，分别展示放大100倍和放大200倍视野；B.阴性对照组与两个敲降SPRR1B组细胞迁移数目的差异。

在恶性肿瘤中的作用，如SHI等[8]通过生物信息学分析发现，转移前SPRR1B的上调与黑色素瘤的不良预后相关，且在黑色素瘤细胞中过表达SPRR1B有利于细胞的增殖、侵袭和迁移；SHENG等[15]研究表明，SPRR1A和SPRR1B在预测黑色素瘤的转移转化中具有重要价值，有助于识别转移风险较高的患者，从而为患者提供早期的预防性治疗措施。SPRR1B在膀胱癌及其他恶性肿瘤中发挥的作用仍需研究人员进行更深入的探索。

综上所述，本研究综合运用多个数据库，分析了SPRR基因家族在膀胱癌中的表达水平；从表观遗传学角度揭示了SPRR家族在膀胱癌中表达异常的可能因素；分析探讨了SPRR家族及其共表达基因的蛋白互作网络，并探究了该网络可能参与的通路；分析了SPRR家族成员与临床病理特征的相关性；探究了SPRR基因家族与临床预后的关系；为膀胱癌的诊断及预后评估提供了理论支持，并进一步验证了SPRR1B在组织样本中的表达水平及其对膀胱癌5637细胞系恶性表型的影响。本研究的局限性在于，所作分析大多针对数据资料进行，所用组织样本数量较少，可能导致结果出现一定的偏差，且只开展了初步的细胞表型实验，缺少基础实验验证具体的作用机制。后续可增加样本量进行更加全面的验证，并对SPRR基因家族各个成员的生物学功能进行更加深入和全面的探究。

参考文献

[1] LENIS A T, LEC P M, CHAMIE K, et al. Bladder cancer: A review[J]. JAMA, 2020, 324(19): 1980-1991.

[2] DOBRUCH J, OSZCZUDŁOWSKI M. Bladder cancer: Current challenges and future directions[J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(8): 749.

[3] ZHU S, MA A H, ZHU Z, et al. Synergistic antitumor activity of pan-PI3K inhibition and immune checkpoint blockade in bladder cancer[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(11): e002917.

[4] ZABINI A, ZIMMER Y, MEDOVÁ M. Beyond keratinocyte differentiation: Emerging new biology of small proline-rich proteins[J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(1): 5-8.

[5] MICHIFURI Y, HIROHASHI Y, TORIGOE T, et al. Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(1): 96-102.

[6] BARBERO G, CASTRO M V, QUEZADA M J, et al. Bioinformatic analysis identifies epidermal development genes that contribute to melanoma progression[J]. Med Oncol, 2022, 39(10): 141.

[7] VASAIKAR S V, STRAUB P, WANG J, et al. LinkedOmics: Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(d1): D956-D963.

[8] SHI S, FAN Z, LIU Y, et al. Integration analysis of m6A related genes in skin cutaneous melanoma and the biological function research of the SPRR1B [J]. Front Oncol, 2021, 11: 729045.

[9] WANG S, ZHANG W. Small proline-rich protein 1A promotes lung adenocarcinoma progression and indicates unfavorable clinical outcomes [J]. Biochem Cell Biol, 2022, 100: 199-212.

[8] DENG Y, ZHENG X, ZHANG Y, et al. High SPRR1A expression is associated with poor survival in patients with colon cancer[J]. Oncol Lett, 2020, 19(5): 3417-3424.

[9] YAMAKAWA K, KOYANAGI-AOI M, UEHARA K, et al. Increased expression of SPRR1A is associated with a poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. PLoS One, 2022, 17(5): e0266620.

[10] NISHIYAMA A, NAKANISHI M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer[J]. Trends Genet, 2021, 37(11): 1012-1027.

[11] MIZUGUCHI Y, ISSE K, SPECHT S, et al. Small proline rich protein 2a in benign and malignant liver disease [J]. Hepatology, 2014, 59(3): 1130-1143.

[12] YANG J, ANTIN P, BERX G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial - mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21: 341-352.

[13] BABAEI G, AZIZ S G, JAGHI N Z Z. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110909.

[14] SADRKHANLOO M, ENTEZARI M, OROUEI S, et al. STAT3-EMT axis in tumors: Modulation of cancer metastasis, stemness and therapy response[J]. Pharmacol Res, 2022, 182: 106311.

[15] SHENG Z, HAN W, HUANG B, et al. Screening and identification of potential prognostic biomarkers in metastatic skin cutaneous melanoma by bioinformatics analysis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(19): 11613-11618.

（2024-12-23 收稿）
编辑　沈建国