

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0578

文章编号 1671-8852(2026)02-0181-09

PRIM2 潜在预后和免疫生物标志物价值的泛癌分析

鲁浩然 孙 前 丁 锐 秦小宏 张文斐 陈治标
武汉大学人民医院神经外科 湖北 武汉 430060

摘要 目的:通过泛癌分析,探究 DNA 引物酶亚基 2 (PRIM2) 在肿瘤预后和免疫浸润中的作用。方法:从 UCSC Xena 网站下载 PRIM2 的表达和临床数据。通过 GEPIA 和 TIMER2 数据库,研究 PRIM2 在肿瘤与正常组织中的表达差异,以及与免疫细胞浸润、免疫检查点基因、错配修复 (MMR) 和 DNA 甲基化的关联。使用 R 语言分析 PRIM2 与不同肿瘤的肿瘤突变负荷 (TMB) 和微卫星不稳定性 (MSI) 和免疫评分之间的关系。利用 LinkedOmics 数据库研究基因的共表达和 PRIM2 的富集分析。分子生物学实验采用了 Western 印迹分析、细胞活力分析、集落形成试验、Transwell 迁移和 EdU 染色等方法。结果:PRIM2 在大多数肿瘤中高表达,与生存预后呈负相关。PRIM2 的表达与肿瘤微环境 (TME)、TMB、MSI 和 MMR 等免疫相关因素密切相关。分子生物学实验证实,PRIM2 能促进胶质母细胞瘤的增殖和迁移。结论:PRIM2 影响各种肿瘤患者的预后。同时,PRIM2 与不同肿瘤的免疫浸润和免疫治疗反应有很强的相关性。

关键词 泛癌分析;PRIM2;预后;免疫浸润;胶质母细胞瘤

中图分类号 R739.4

文献标志码 A

Pan-cancer analysis of potential prognostic and immunobiomarker value for PRIM2

LU Haoran, SUN Qian, DING Rui, QIN Xiaohong, ZHANG Wenfei, CHEN Zhibiao

Department of Neurosurgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To explore the role of DNA primase subunit 2 (PRIM2) in tumor prognosis and immune infiltration by pan-cancer analysis. **Methods:** PRIM2 gene expression and clinical data were downloaded from the UCSC Xena website. The differences in PRIM2 expression were examined in tumor versus normal tissues and associations with immune cell infiltration, immune checkpoint genes, mismatch repair (MMR), and DNA methylation-related genes using the GEPIA and TIMER2 database. The association of PRIM2 with tumor mutational burden (TMB), microsatellite instability (MSI), and immune scores of different tumors were analyzed by R language. The LinkedOmics database was used to investigate co-expression of genes and enrichment analysis of PRIM2. Molecular biology experiments were performed by using Western Blot analysis, cell viability analysis, colony formation assays, Transwell migration, and EdU staining. **Results:** PRIM2 is highly expressed in most tumors and negatively correlates with survival prognosis. PRIM2 expression is strongly correlated with immune-related factors such as tumor microenvironment (TME), TMB, MSI, and MMR. Molecular biology experiments confirm that PRIM2 promotes the proliferation and migration of glioblasto-

课题来源:湖北省重点研发计划(编号:2022BCE020)。

作者简介:鲁浩然,男,1997—,医学硕士生,主要从事胶质瘤研究,E-mail: 2022283020096@whu.edu.cn。

通信作者:陈治标,E-mail: Chzbiao@126.com。

mas. **Conclusion:** PRIM2 affects the prognosis of various cancer patients. Meanwhile, PRIM2 has a strong correlation with immune infiltration and immune therapy response in different tumors.

Key Words Pan-Cancer Analysis; PRIM2; Prognosis; Immune Infiltration; Glioblastoma

免疫疗法,尤其是免疫检查点阻断疗法,正逐渐成为临床治疗肿瘤的有力策略^[1]。研究^[2]表明,免疫检查点抑制剂可显著改善预后,并增强患者对各类肿瘤的抵抗力。我们通过泛癌分析来寻找肿瘤组织新的生物学标志物,提高各种恶性肿瘤的诊断和改善预后。

DNA 引物酶亚基 2(DNA primase subunit 2, PRIM2)是 DNA 引物酶的一个大亚基,在调节 DNA 损伤修复、转录和细胞增殖方面发挥着重要功能^[3]。研究^[4-5]发现,PRIM2 与肿瘤的恶性增殖和抗凋亡有关。

本研究通过泛癌分析和体外分子实验探讨 PRIM2 在肿瘤的预后和免疫学价值(如免疫浸润等)。在胶质母细胞瘤(glioblastoma,GBM)中进行分子实验,以进一步验证 PRIM2 的作用。探讨 PRIM2 是否可以作为一种重要的生物标志物,预测各种癌症的预后,以及作为肿瘤免疫疗法的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 数据收集和处理 我们从 UCSC Xena 网站(<https://xena.ucsc.edu/>)下载了 RNA 测序数据和相关临床信息。接着,通过 PERL 软件从 TCGA(<https://tcga.xenahubs.net>)提取并转换了 PRIM2 表达数据,以便进行后续的分析。

1.2 PRIM2 基因表达分析 TIMER2 数据库(<http://timer.cistrome.org/>)用于分析 TCGA 数据库中不同肿瘤组织和正常组织中 PRIM2 表达水平的差异。此外,GEPIA2 数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)进一步用于分析 TCGA 和 GTEx 数据库中不同肿瘤组织与正常组织中 PRIM2 表达的差异。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。使用 R 软件中的“plyr”“reshape2”和“ggpubr”软件包分析不同肿瘤中 PRIM2 mRNA 的表达水平。

1.3 PRIM2 的免疫浸润分析 使用 R 语言的“fmsb”软件包分析 PRIM2 表达与肿瘤突变负荷(Tumor Mutational Burden, TMB)和微卫星不稳定性(Microsatellite Instability, MSI)的相关性。通过 TISIDE 数据库分析了 PRIM2 表达与三种免疫调节

剂(免疫抑制、免疫刺激和 MHC 分子)之间的关系。

1.4 PRIM2 表达和错配修复基因突变及 DNA 甲基化分析 错配修复(Mismatch Repair, MMR)基因包括 EPCAM、PMS2、MSH1、MSH2 和 MLH6。DNA 甲基化相关基因包括 DNMT1、DNMT3L、DNMT3A 和 DNMT3B。TIMER2 数据库分析 PRIM2 和 MMR 基因与 DNA 甲基转移酶基因表达水平的相关性。

1.5 探索胶质瘤中的 PRIM2 共表达基因 LinkedOmics 数据库(<http://www.linkedomics.org/>)用于探索胶质瘤中与 PRIM2 共表达基因。并且进一步探索 PRIM2 在胶质瘤中的基因本体生物过程(GO_BP)和 KEGG 通路。

1.6 细胞培养和转染 我们从上海生化与细胞生物研究所获得了人类 GBM 细胞系(U87 和 U251)。细胞在 37℃ 和 5% CO₂ 的培养箱中培养,培养基为高糖 DMEM(Gibco,美国),添加 1% 青霉素/链霉素(Servicebio,武汉)和 10% 胎牛血清(FBS)(Gibco,美国)。过表达质粒 pCDNA3.1-Flag-PRIM2 由苗岭生物(武汉)有限公司构建。用 Lipofectamine3000 试剂转染 U87 和 U251。

1.7 Western 印迹分析 在含有蛋白酶磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解细胞 30 min,然后在 4℃ 收集细胞样本。等量蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,并转移到 PVDF 膜(Millipore,德国)上。使用 5% BSA 封闭膜,并在 4℃ 下与一抗孵育过夜。随后,用对应的二抗孵育 1 h。

1.8 细胞活力实验和克隆形成实验 细胞活力用 CCK-8 试剂盒(Servicebio,中国)检测。每孔加入 CCK-8 试剂和 DMEM 完全培养基的混合物,然后将 96 孔板置于细胞培养箱中培养 2 h。使用酶标仪测量 450 nm 波长处的吸光度。选取 U87 和 U251 细胞,以每孔 1 000 个细胞的密度均匀种植在 6 孔板中,然后进行转染,每 3~4 d 更换一次培养基,持续约 2 周,以形成明显的单细胞集落。

1.9 Transwell 分析和 EdU 染色分析 将转染的 U87 和 U251 接种到用无血清培养基的 24 孔板的上腔,在下腔中加入含血清培养基,并在培养箱中放置 2 d。然后用结晶紫染色并用倒置显微镜拍照。EdU 染色是使用 EdU 细胞增殖试剂盒

(BeyoClick™,中国)。将U87和U251细胞接种到6孔板中,然后进行转染。细胞样品与EdU试剂一起孵育,并在荧光显微镜下拍照。

1.10 数据分析 使用GraphPadPrism 8.0软件进行统计分析。独立样本 t 检验用于比较两组之间的差异。单因素方差分析用于比较三组或更多组之间的差异,如果方差分析结果显著,则使用对数秩检验分析组间差异。

2 结果

2.1 不同肿瘤和正常组织中PRIM2表达水平和生存预后分析 我们利用TIMER2数据库研究PRIM2在正常组织和肿瘤组织中的表达水平。结果表明,PRIM2在多数肿瘤类型中的表达明显升高,包括BLCA、BRCA、CESC、CHOL、COAD、ESCA、GBM、HNSC、KIRP、LIHC、LUAD、LUSC、PEAD、STAD和UCEC(图1A)。然而,PRIM2在KIRC、SKCM和THCA中的表达水平较低。图1B显示了PRIM2在33种癌症中的mRNA表达水平。利用GEPIA平台将TCGA与GTEx数据库中的数据整合分析,PRIM2在DLBC、LGG、PAAD、SARC、TGCT、THYM、USC中的表达也明显偏高(图1C和1D)。这些差异可能是不同数据库收集方法不同造成的。同时,基于TISIDE平台,我们分析了PRIM2与肿瘤分期或分级的相关性。在9种癌症中,PRIM2的表达与肿瘤分期或分级呈正相关(图1E、1F),包括UCEC、PAAD、LIHC、LGG、KIRC、HNSC、CESC、KICH和KIPRP,然而,在SKCM和OV中呈负相关。

2.2 癌症中的免疫浸润水平分析 基于TIMER2平台分析PRIM2与肿瘤免疫浸润的相关性。结果显示,在多数肿瘤中,PRIM2表达与CD8⁺T细胞浸润水平呈正相关(图2A)。在BLCA、THYM、UVM和LUAD中,PRIM2表达水平与CD8⁺T细胞浸润水平呈显著正相关(图2B)。并且多数肿瘤的PRIM2表达与中性粒细胞明显正相关(图2C),图2D显示了中性粒细胞免疫浸润相关性最高的前4位。此外,除了KIRC和PRAD,PRIM2的表达水平与髓源性抑制细胞(MDSC)呈正相关(图2E),图2F中显示了相关性最强的前4种肿瘤。

2.3 PRIM2表达与免疫检查点基因和免疫调节剂之间的相关性 为了进一步探讨PRIM2与免疫浸

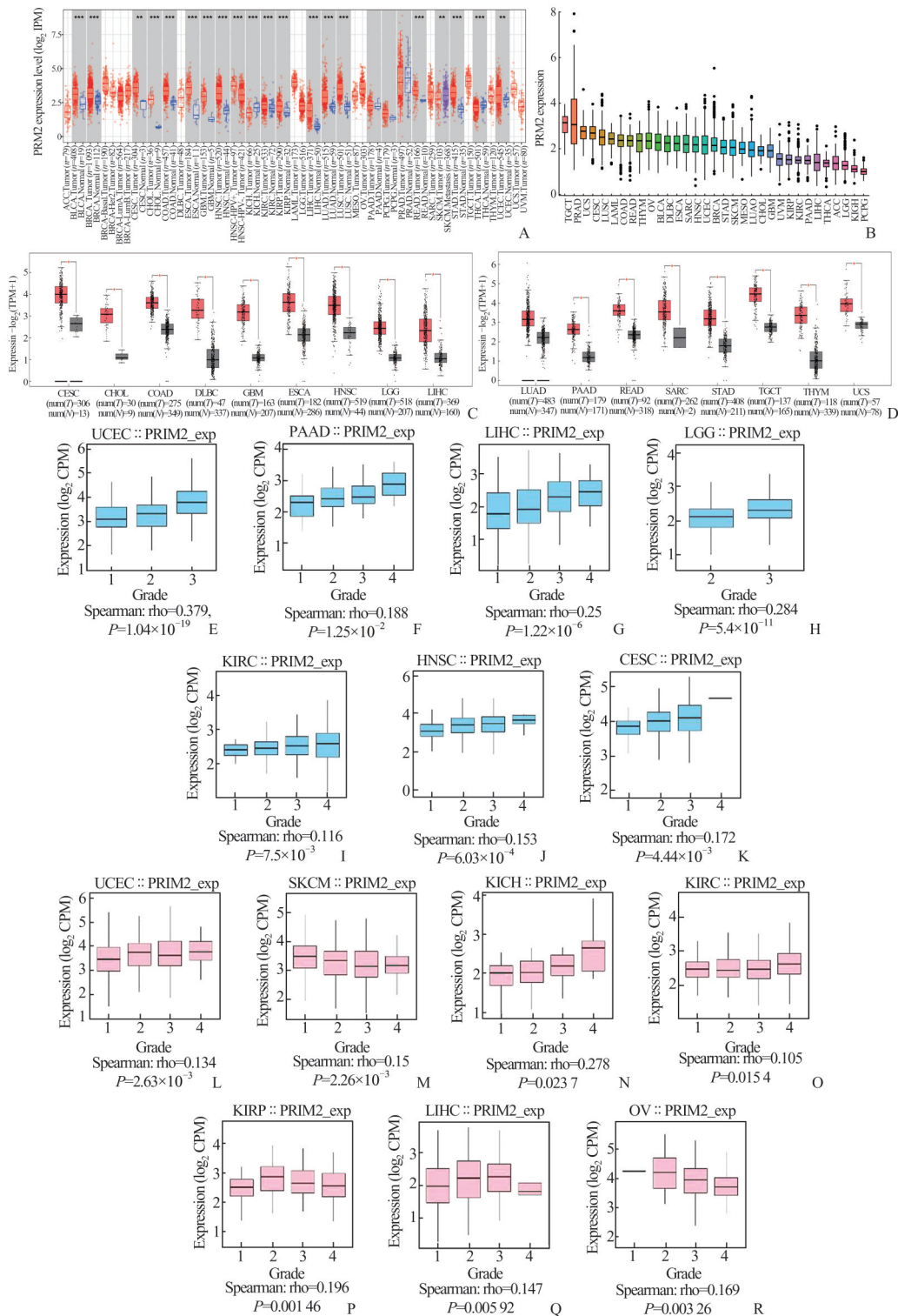
润的关系,我们通过共表达分析,研究PRIM2表达与免疫检查点基因的关联。结果显示,除TNFRSF14和TMIGD2外,PRIM2在大多数肿瘤中的表达与免疫检查点基因呈显著正相关(图3A)。此外,我们通过TISIDB数据库探讨了免疫调节剂与PRIM2的关系。结果表明,在33种肿瘤中,PRIM2的表达与免疫调节剂(包括免疫刺激因子、免疫抑制因子和MHC分子)呈负相关(图3B~3D)。

2.4 TMB、MSI、MMR和DNA甲基化 此外,我们还探索了PRIM2表达与TMB、MSI、MMR和甲基化之间的关系。在ESCA、LIHC、READ、SARC、STAD、UCEC中,PRIM2的表达与MSI呈正相关,但在DLBC、LGG、LUAD中呈负相关(图3E)。在ACC、BLCA、BRCA、LGG、LIHC、LUAD、LUSC、MESO、OV、PAAD、SARC、SKCM、STAD、UCEC中,PRIM2表达与TMB呈正相关,但在PRAD、THYM中呈负相关(图3F)。在多数肿瘤中,PRIM2的表达与MMR基因(MLH1、MSH2、MSH6、PMS2和EPCAM)的表达密切相关(图3G)。并且,PRIM2的表达与DNA甲基转移酶(DNMT1、DNMT3A和DNMT3B)的表达呈显著正相关(图3H)。

2.5 GBM中的PRIM2共表达基因 我们通过LinkedOmics平台分析PRIM2在GBM中的共表达基因。在GBM中,PRIM2的共表达基因如火山图所示(图4A),与PRIM2正相关和负相关的前50个基因如热图所示(图4B、4C)。我们还对PRIM2共表达基因进行了GO(生物过程)和KEGG分析。

KEGG结果显示,PRIM2的共表达基因涉及细胞周期,错配修复,NOD样受体信号通路,TNF信号通路,趋化因子信号通路和FcγR介导的吞噬作用(图4D)。GO结果显示,PRIM2的共表达基因参与细胞周期G₂/M期转变、细胞周期检查点、细胞周期的调控、T细胞活化、免疫反应调节信号通路、干扰素-γ的反应和白细胞-细胞黏附和吞噬(图4E)。上述结果表明,PRIM2可能在调控GBM的免疫反应和增殖中发挥重要作用。

2.6 GBM中PRIM2的表达分析 为了证实PRIM2在胶质瘤细胞中的功能,我们在U87和U251细胞中构建了Flag-PRIM2质粒,以验证PRIM2的功能。蛋白印迹分析验证了PRIM2过表达的效果(图5A、5B)。EdU试验结果表明,PRIM2过表达能显著促进细胞增殖(图5C、5D)。Tran-

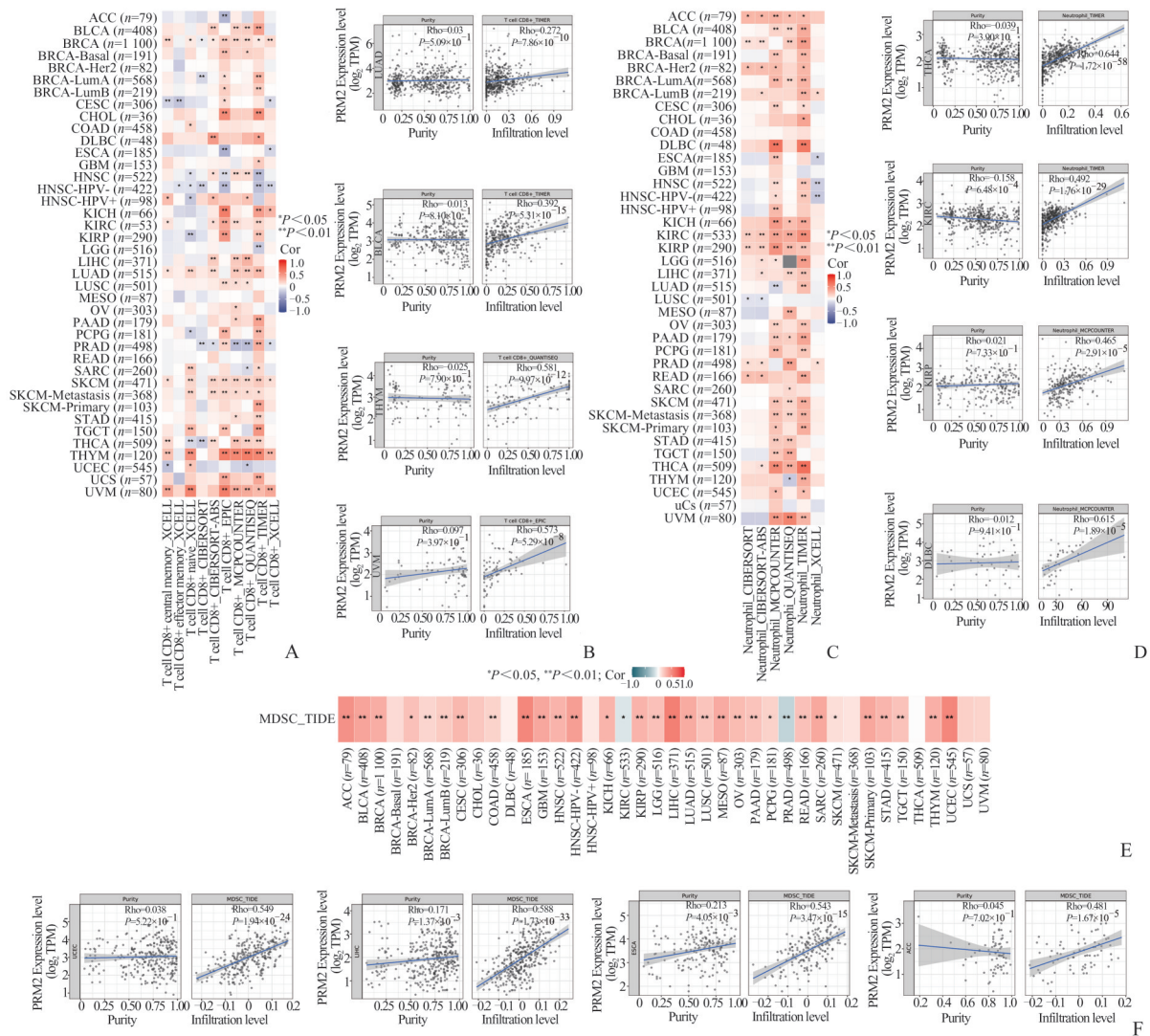


A. 采用TIMER2数据库分析不同类型肿瘤及配对正常组织中REIM2的差异表达水平;B. PRIM2在不同肿瘤中的表达水平;C、D. 采用GEPIA2平台分析不同类型肿瘤及配对正常组织中REIM2的差异表达水平;E~K. 利用TISIDE数据库研究PRIM2表达与肿瘤分期的相关性;L~R. 应用TISIDE数据库研究PRIM2表达与肿瘤分期的相关性。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图1 PRIM2在不同肿瘤和病理分期或分级中的表达水平

swell试验表明,PRIM2过表达可促进细胞迁移能力(图5E、5F)。过表达PRIM2的U87和U251细胞活力明显增强(图6A、6B)。集落形成实验表明,过

表达PRIM2的U87和U251细胞的集落形成明显增加(图6C~6F)。这些实验结果表明,PRIM2过表达会促进GBM的增殖。



A、B. 基于TCGA的肿瘤数据CD8⁺T细胞浸润水平与PRIM2表达的相关性;C、D. 基于TCGA的肿瘤数据中性粒细胞浸润水平与PRIM2表达的相关性;E、F. 基于TCGA的肿瘤数据髓系来源抑制细胞(MDSC)浸润水平与PRIM2表达的相关性。

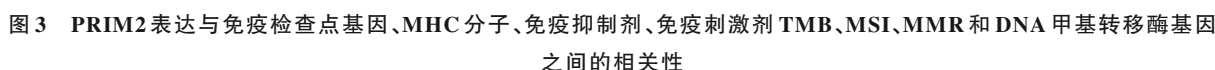
图2 使用不同算法探索PRIM2表达水平与免疫侵袭水平之间的潜在相关性

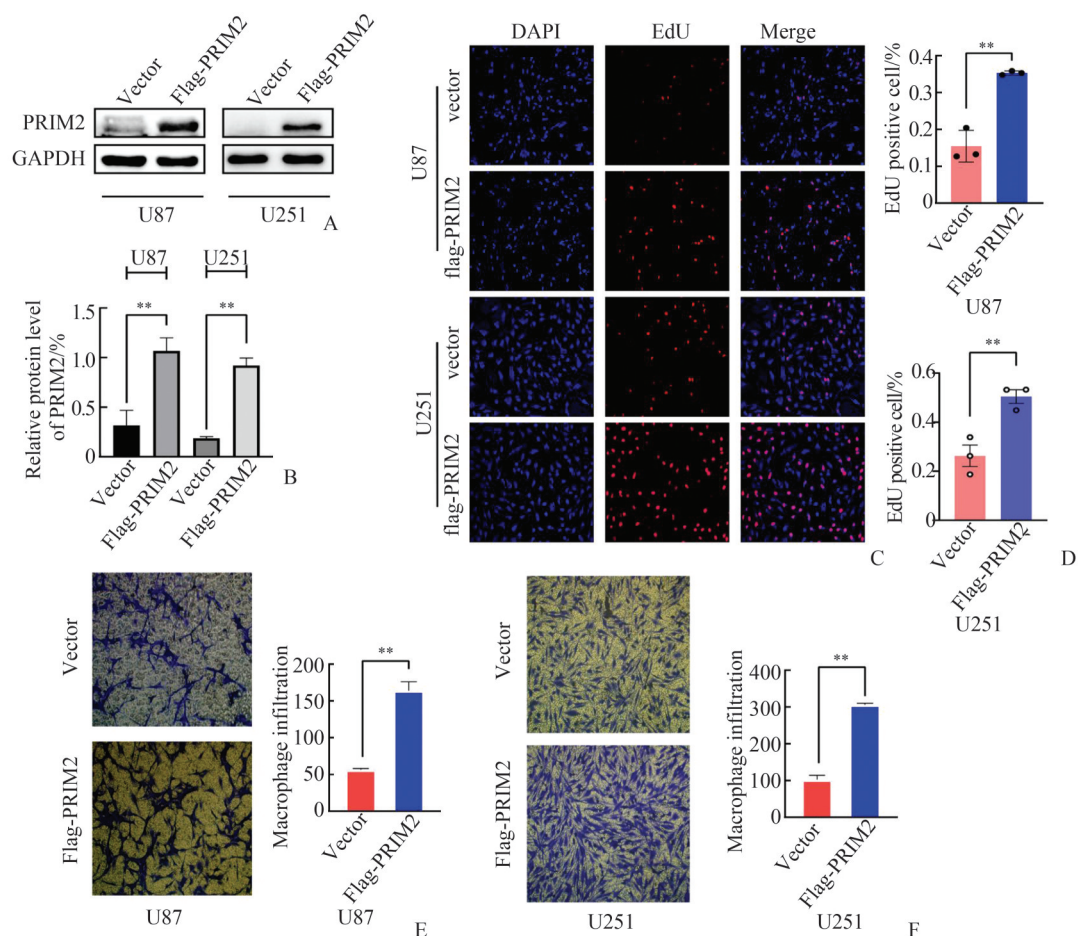
3 讨论

我们通过对PRIM2进行泛癌分析,探索其对肿瘤患者临床预后的影响,并探讨PRIM2免疫相关因素之间的潜在关联。结果表明,PRIM2在大多数肿瘤中的表达水平显著升高,并且高表达的PRIM2与患者的不良预后密切相关。PRIM2的表达与肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)、免疫检查点基因和免疫调节剂紧密相关。我们还发现,在大多数肿瘤类型中,PRIM2的表达与TMB、MSI、MMR呈正相关,但与DNA甲基化呈负相关。此外,我们还探讨了PRIM2在GBM共表达基因的GO和KEGG分析,并通过分子实验验证了PRIM2在胶质瘤中的促肿瘤增殖和侵袭性迁移作用。

TME为免疫疗法的选择提供指导,并对治疗效果和临床结局产生重要影响^[6]。在TME中,CD8⁺T细胞是抗肿瘤免疫细胞,但MDSC具有抑制T细胞免疫反应的促肿瘤功能,中性粒细胞也在促进肿瘤发生方面发挥作用^[7-8]。我们的结果显示,在多数肿瘤中,PRIM2的表达与CD8⁺T细胞浸润相关,并且与中性粒细胞和髓源性抑制性细胞浸润呈显著正相关。这表明PRIM2可能通过与免疫浸润相互作用,促进了肿瘤的进展。我们进一步探讨了免疫检查点基因与PRIM2表达的相关性。结果显示,大多数免疫检查点基因与PRIM2的表达呈显著正相关。这表明,免疫检查点阻断治疗可能对PRIM2高表达的患者具有更好的疗效。

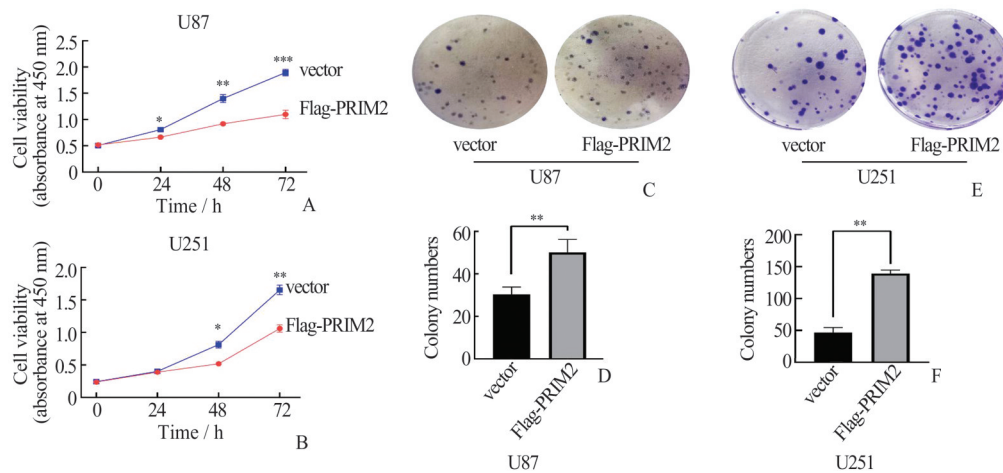
TMB、MSI和MMR是评估免疫疗法反应的生





A、B. 当PRIM2在U87和U251中过表达时,使用蛋白印迹分析法分析PRIM2的蛋白表达水平;C、D. 当过表达PRIM2时,使用EdU试验评估细胞增殖(免疫荧光 $\times 200$);E、F. Transwell试验用于评估过表达PRIM2时的细胞迁移能力($\times 200$)。** $P < 0.01$ 。

图5 PRIM2对胶质瘤增殖的影响



A、B. 当PRIM2上调时,U87和U251细胞的活力分析;C~F. PRIM2的过表达促进了U87和U251细胞集落的形成。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图6 PRIM2过表达可促进细胞增殖

与MSI呈显著正相关,大多数肿瘤与MMR呈极强正相关。这表明,PRIM2的高表达可能会对肿瘤患者的TMB、MSI和MMR产生影响,从而影响患者

对免疫疗法的反应。

DNA甲基化修饰是一种DNA表观遗传修饰形式,通过改变DNA稳定性和构象抑制基因表

达^[15-16]。我们研究发现,DNA 甲基转移酶在大多数肿瘤中高表达,而 PRIM2 的甲基化水平与其表达量显著负相关。据报道^[15-16],启动子区域的高甲基化会导致肿瘤抑制基因沉默或失活。

我们还分析了 GBM 中 PRIM2 的共表达基因,发现这些基因与 GBM 的免疫反应和细胞增殖密切相关;通过一系列分子实验,证实 PRIM2 能显著促进胶质瘤细胞的增殖和迁移。

综上所述,我们通过对 PRIM2 进行泛癌分析,表明 PRIM2 有望作为监测肿瘤预后的生物标志物以及免疫治疗的潜在靶点。然而,PRIM2 在各种肿瘤中的免疫反应机制仍需进一步研究。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] RILEY R S, JUNE C H, LANGER R, et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 175-196.
- [2] BELLMUNT J, DE WIT R, VAUGHN D J, et al. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(11): 1015-1026.
- [3] YIN J, QIN F, CHEN H, et al. PRIM2 promotes proliferation and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma through interactions with FAM111B [J]. *Med Oncol*, 2024, 42(1): 6.
- [4] CHEN Q, GUO H, ZONG Y, et al. Curcumin restrains hepatocellular carcinoma progression depending on the regulation of the circ_0078710/miR - 378b/PRIM2 axis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2022, 42(3): 313-324.
- [5] WANG T, TANG T, JIANG Y, et al. PRIM2 promotes cell cycle and tumor progression in p53-mutant lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(14):3370.
- [6] WU T, DAI Y. Tumor microenvironment and therapeutic response [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387: 61-68.
- [7] COFFELT S B, WELLENSTEIN M D, DE VISSER K E. Neutrophils in cancer: Neutral no more [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(7): 431-446.
- [8] LEI X, LEI Y, LI J K, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 126-133.
- [9] DENG H, ZHAO Y, CAI X, et al. PD-L1 expression and tumor mutation burden as pathological response biomarkers of neoadjuvant immunotherapy for early-stage non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2022, 170: 103582.
- [10] MANDAL R, SAMSTEIN R M, LEE K W, et al. Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response [J]. *Science*, 2019, 364(6439): 485-491.
- [11] ZHU H, HU X, YE Y, et al. Pan-cancer analysis of PIMREG as a biomarker for the prognostic and immunological role [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 687778.
- [12] LEE D W, HAN S W, BAE J M, et al. Tumor mutation burden and prognosis in patients with colorectal cancer treated with adjuvant fluoropyrimidine and oxaliplatin [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(20): 6141-6147.
- [13] HELLMANN M D, CIULEANU T E, PLUZANSKI A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22): 2093-2104.
- [14] ZHAO P, LI L, JIANG X, et al. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 54.
- [15] WANG M, NGO V, WANG W. Deciphering the genetic code of DNA methylation [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(5): 424.
- [16] MEHDI A, RABBANI S A. Role of methylation in pro- and anti-cancer immunity [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(3): 545.

(2024-07-30 收稿)

编辑 孙孝云