

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20241108.004

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241108.1623.008>

基于生物信息学和临床样本探究 *FMR1* 与胃癌的相关性及其在肿瘤微环境中的作用

韩宜倩¹, 胡楠^{1,2}, 周康杰^{1,2}, 蒋薇薇¹, 张森², 毛晨曦², 吴风雷^{1,2}✉

(1. 南京医科大学连云港临床医学院, 江苏 连云港 222000; 2. 徐州医科大学附属连云港医院, 江苏 连云港 222000)

[摘要] **目的:**本研究旨在分析脆性X智力低下1(Fragile X Mental Retardation 1, *FMR1*)基因在胃癌(gastric cancer, GC)和相邻非癌组织中表达的差异,并探讨其与胃癌患者临床病理特征和预后的相关性,分析了其可能调控的信号通路和在肿瘤微环境中的作用。**方法:**利用TIMER2.0工具对*FMR1*进行泛癌分析。利用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库探讨*FMR1*基因在胃癌及正常胃上皮组织中的表达差异情况,并使用qRT-PCR、免疫组化等对结果进行验证。采用Kaplan-Meier Plottery数据库进行生存分析。使用R软件及临床样本评估胃癌患者中*FMR1*表达水平与临床病理因素的相关性。通过TISIDB数据库分析*FMR1*与胃癌肿瘤免疫浸润之间的关系。通过功能注释工具分析*FMR1*及其互作基因的功能。**结果:***FMR1*在胃癌中的阳性表达率显著高于正常胃组织($P<0.001$);*FMR1*高表达的胃癌患者总体生存时间显著降低($P<0.05$);胃癌患者中*FMR1*的不同表达情况与其肿瘤微环境中多种免疫细胞的活动相关($P<0.05$);*FMR1*可能参与角蛋白丝、门控通道活动等过程,并与嗅觉传导、非洲锥虫病、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)等通路相关;生物信息学和临床样本分析结果表明*FMR1*的表达水平与胃癌患者的分期密切相关($P<0.05$)。**结论:***FMR1*基因高水平表达与胃癌患者的不良预后和免疫细胞浸润状况密切相关,其有望被确立为一种用于胃癌诊断和治疗的新型生物标志物。

[关键词] 胃癌;*FMR1*;免疫细胞浸润;预后;生物信息学;免疫组化

[中图分类号] R735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)09-0691-11

Exploration of the perturbation of *FMR1* in gastric cancer and the role in tumor microenvironment based on bioinformatics and clinical samples

HAN Yiqian¹, HU Nan^{1,2}, ZHOU Kangjie^{1,2}, JIANG Weiwei¹, ZHANG Miao², MAO Chenxi², WU Fenglei^{1,2}✉

(1. Lianyungang Clinical College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China; 2. Lianyungang Clinical College of Xuzhou Medical University, Lianyungang 222000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by Norman Bethune Medical Science Research Fund Project (KY2023-01-02); Lianyungang Health Commission Project (QN202304); Basic Research Plan Project of Lianyungang Science and Technology Bureau (JCYJ2307); Key Project of Lianyungang Cancer Prevention and Treatment Technology Development Plan (ZD202302); Excellent Talent Fund Project of Xuzhou Medical University Affiliated Hospital Science and Technology Development Fund (XYFY202329)

[Author]: HAN Yiqian, E-mail: Camillehan7@163.com.

[Correspondence to]: WU Fenglei, Ph.D., Associate Chief Physician, E-mail: wufenglei1981@163.com.

Received: 2024-07-29

Revised: 2024-11-03

JHMu, 2025;31(9):691-701

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To analyze the expression differences of Fragile X Mental Retardation 1 (*FMR1*) in gastric cancer and adjacent non-tumor tissues, investigate its correlation with the clinical pathological characteristics and outcomes of gastric cancer

[基金项目] 白求恩医学科学研究基金项目 (KY2023-01-02); 连云港市卫健委项目 (QN202304); 连云港市科技局基础研究计划项目 (JCYJ2307); 连云港市肿瘤防治科技发展计划重点项目 (ZD202302); 徐州医科大学附属医院科技发展基金优秀人才基金项目 (XY-FY202329)

[作者简介] 韩宜倩, E-mail: Camillehan7@163.com。

[通讯作者] 吴风雷, 博士, 副主任医师, E-mail: wufenglei1981@163.com。

[收稿日期] 2024-07-29

[修回日期] 2024-11-03

[网络出版时间] 2024-11-11 10:18:46

patients. And to analyze the potential signaling pathways regulated by *FMR1* and its role in the tumor microenvironment. **Methods:** The TIMER2.0 tool was used to analyze *FMR1* in the pan-cancer. The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to analyze differences in the expression of the *FMR1* gene between gastric cancer tissues and adjacent normal tissues, and the results were verified by qRT-PCR and immunohistochemistry. The Kaplan-Meier Plottery database was used for survival analysis. R software and clinical samples were used to assess the correlation between *FMR1* expression and clinical pathological factors in gastric cancer patients. The relationship between *FMR1* and tumor immune infiltration in gastric cancer was analyzed through the TISIDB database. The function of *FMR1* and its interacting genes was analyzed by functional annotation tools. **Results:** The positive expression rate of *FMR1* in gastric cancer was significantly higher than in normal gastric tissue ($P < 0.001$). Patients with high *FMR1* expression had a significantly reduced overall survival time ($P < 0.05$). The varying expression of *FMR1* in gastric cancer patients was associated with the activity of various immune cells in their tumor microenvironment ($P < 0.05$). *FMR1* may be involved in processes such as keratin filament and gated channel activities, and was associated with pathways related to olfactory signal transduction, African sleeping sickness, and PPAR signaling. Bioinformatics and clinical sample analysis indicated that the expression level of *FMR1* was closely related to the staging of gastric cancer patients ($P < 0.05$). **Conclusion:** The high expression level of the *FMR1* gene is closely associated with poor prognosis and immune cell infiltration in gastric cancer patients, suggesting its potential to be established as a novel biomarker for the diagnosis and treatment of gastric cancer.

[Key words] Gastric cancer; *FMR1*; Immune cell infiltration; Prognosis; Bioinformatics; Immunohistochemistry

胃癌是全球最普遍的恶性肿瘤之一,每年新增病例超过一百万例^[1], 占所有癌症诊断的 5.6%^[2]。目前,胃癌早期治疗的主要手段是手术治疗,但由于其起病隐匿、临床表现缺乏特异性,早期胃癌通常症状较轻或者无症状,因此胃癌患者确诊时已是晚期,从而导致胃癌的治疗困难。尽管目前已有对胃癌发病机制的大量研究,但探究细胞内分子异常表达、识别特异性分子标志物和治疗靶点对于胃癌患者的早期诊断和治疗仍然至关重要。迄今为止,靶向治疗已成为携带致癌驱动突变基因的癌症患者的一线治疗方法。大量研究表明,多靶点治疗在治疗癌症方面优于单药治疗^[3],所以有必要确定更多的药物分子靶点来优化联合治疗策略并改善胃癌治疗。

脆性 X 智力低下 1 基因 (Fragile X Mental Retardation 1, *FMR1*) 是脆性 X 相关 (FXR) 基因家族成员之一,它于 1991 年首次被发现。*FMR1* 是一个高度保守的基因,它位于 X 染色体长臂 (Xq27.3), 全长 40 kb, 包含 17 个外显子。其产生的约 4 kb 的 mRNA 编码一种最大长度为 632 个氨基酸、相对分子质量为 69 kD 的蛋白质,称为脆性 X 智力低下蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP)^[4]。FMRP 是具有代表性的 RNA 结合蛋白 (RNA-binding protein, RBP), 目前对 FMRP 的相关研究主要集中在神经科学领域,研究证明 FMRP 的缺失会导致脆性 X 综合征 (fragile X syndrome, FXS), 这是遗传性智力残疾和综合征型自闭症的最常见形式。尽管 FMRP 在大脑中的作用已经得到了很好的证实,但研究证明,该蛋白的表达是普遍存在的,其除了对中枢神经系统的影响外,在其

他器官和疾病中也发挥重要作用^[4]。此前已报道其与结直肠癌^[5]、肝癌^[6]、乳腺癌^[7]、胶质瘤^[8]等恶性肿瘤息息相关,参与癌症发病、进展和转移相关的不同分子机制。深入研究 *FMR1* 在肿瘤生物学过程中的调控机制,对于临床上实施针对 *FMR1* 的靶向治疗策略至关重要。然而,目前国内外关于 *FMR1* 在胃癌中的表达及其意义仍不清楚。

在过去十年中,新一代测序技术的出现和癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据集的发布使得常见癌症的基因组和转录组数据可以公开获取,这非常适合通过精准医学领域的全癌分析来分析和揭示潜在生物标志物的预后和预测价值^[9]。因此,为了探讨 *FMR1* 在胃癌发生和进展中的作用,本研究基于生物信息学和临床样本分析该基因在胃癌及癌旁组织中的表达差异,预测其对胃癌预后的价值及其可能的作用机制,探讨其与胃癌发生、发展的关系及临床意义,以期让更多患者受益。

1 资料与方法

1.1 一般材料

1.1.1 TCGA 数据库中的 STAD *FMR1* RNA-Seq 表达数据及临床信息 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 数据库是一个公共数据库,从 TCGA 官网下载 375 个胃癌和 32 个癌旁正常组织中的 *FMR1* 表达数据。所选样本来自 TCGA STAD 项目的 3 级 HTSeq-FPKM (Fragments Per Kilobase per Million) 格式的 RNA-seq 数据和临床数据 (包括年龄、性别、分级、TNM 分期等)。其中,FPKM 格式的 RNA-seq 数据转换为 TPM (Transcripts Per Million reads) 格式并通过 log2 转换进行分析。显著

性标记为: ns, $P \geq 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。使用 R 软件包 limma/ggplot2/ggpubr 对标准化后的数据进行 *FMR1* 差异表达分析并通过箱式图进行展示。另外, 使用 TIMER2.0 数据库 (<http://timer.cistrome.org>) 进行目标基因在泛癌中的差异分析, 探索人类癌症和匹配的正常组织之间 *FMR1* 的表达水平^[10]。

1.1.2 胃癌组织样本收集及一般资料 收集我院 2020 年至 2023 年存档的胃癌组织和对应的癌旁正常组织 78 对用于免疫组化实验, 所有胃癌标本均经本院病理科证实且临床病例资料完整。本研究经我院伦理委员会批准(批件号: LW-20240903002-01)。

1.1.3 仪器与试剂 购自德国 LEICA 公司的 RMB235 型轮转式切片机, 购自日本 OLYMPUS 公司的 CX22 显微镜, 购自上海一恒科学仪器有限公司的细胞培养箱, 购自海信容声冰箱有限公司的 4℃ 冰箱以及来自我院病理科的 Toup View 3.7 采图系统^[11]。兔抗人 *FMR1* 多克隆抗体 (50 μL, 1000 μg/mL, 批号: 13755-1-AP)、免疫显色试剂盒均购自 Proteintech 公司。细胞培养液、胰酶均购自江苏凯基生物技术股份有限公司, RNA 提取试剂盒购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目标基因的差异分析和差异基因的富集分析 根据 *FMR1* 的表达量对样本进行分组, 基于 *FMR1* 的中值表达, 将样本分为 *FMR1* 高和低表达组, 差异表达基因的阈值设为 $|\log_2 \text{fold-change}| > 1$ 和 $P < 0.05$, 得到显著共表达的基因, ggplot2R 包对热图进行可视化。通过基因本体 (Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析和基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) 分析共表达基因在通路上的表达情况。富集结果的 FDR 阈值设置为 0.05, ClusterProfiler 包执行, ggplot2R 包进行可视化。

1.2.2 基因表达与胃癌预后的关系 运用 Kaplan-Meier Plottery 数据库 (<http://kmplot.com/analysis/>) 分析胃癌基因芯片数据, 筛选 *FMR1* 基因, 使用 Log-rank 检验来研究 *FMR1* 在胃癌患者中的预后价值。使用 Kaplan-Meier 绘图工具中的 GSE62254 数据集, 根据胃癌组织中 *FMR1* 基因表达水平的中位数进行高表达和低表达 *FMR1* 基因分组。使用自动选择的最佳截断值 (auto select best cutoff) 分析 *FMR1* 对胃癌患者的总生存期 (overall survival, OS) 的影响。

1.2.3 免疫相关细胞浸润的评估 使用 CIBERSORT 包进行肿瘤免疫浸润分析, 通过 ggpubr 包将 *FMR1* 高低表达组之间免疫细胞的丰度进行可视化, 展示为箱线图。通过棒状图和散点图分析 *FMR1* 与不同免疫细胞含量之间的相关性。

1.2.4 临床病理特征相关性分析 利用 Perl 软件及 R 语言中的 Limma 和 ggpubr 包, 对从 TCGA 获取的 375 例胃癌样本的转录组数据和临床数据进行合并处理, 并将 *FMR1* 表达与年龄、性别、肿瘤分级、肿瘤分期、TNM 分期这 5 项临床指标进行分析。

1.2.5 细胞培养 在细胞培养过程中, 采用了胃癌细胞株 SGC-7901、MGC-823、AGS 以及人正常胃上皮细胞株 GES-1, 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 并置于细胞培养箱中培养。待细胞密度达 80%~90% 时, 通过胰酶消化更换培养基传代^[12]。

1.2.6 总 RNA 提取及 qRT-PCR 使用离心柱式提取总 RNA, 反转录获得互补 DNA (cDNA), 并通过实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 获得表达数据^[13]。所有细胞系均采用 GAPDH 作为内参。

1.2.7 免疫组织化学染色 采用免疫组化 SP 两步法进行染色, 并于 DAB 显色、乙醇脱水、中性树胶封固后镜下观察并拍照^[14]。染色结果判读: *FMR1* 阳性染色主要集中在细胞质中。根据阳性细胞百分比进行计分: $\leq 5\%$ 计为 0 分, 6%~25% 计为 1 分, 26%~50% 计为 2 分, 51%~75% 计为 3 分, 超过 75% 计为 4 分。根据阳性细胞的染色强度进行计分: 未着色计为 0 分, 淡黄色计为 1 分, 棕黄色计为 2 分, 棕褐色计为 3 分。最终得分通过将上述两项结果相乘得到: ≤ 2 分被定义为阴性表达, > 2 分被定义为阳性表达。

1.2.8 统计学分析 统计学分析采用 SPSS 27.0 软件进行, 计数资料使用卡方检验法处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *FMR1* 在泛癌中的表达分析

与正常样本相比, *FMR1* 表达在胆管癌 (CHOL, $P < 0.001$)、结肠腺癌 (COAD, $P < 0.001$)、食管癌 (ESCA, $P < 0.001$)、头颈鳞癌 (HNSC, $P < 0.001$)、肺鳞状细胞癌 (LUSC, $P < 0.05$)、肝细胞癌 (LIHC, $P < 0.001$)、胃癌 (STAD, $P < 0.001$) 中显著上调, 在多形性胶质母细胞瘤 (GBM, $P < 0.05$)、肾透明细胞癌 (KIRC, $P < 0.001$)、肾乳头状癌 (KIRP, $P < 0.001$)、前列腺腺癌 (PRAD, $P < 0.001$)、子宫内膜癌 (UCEC, $P < 0.001$) 五种肿瘤类型中低表达, 然

而,在膀胱癌(BLCA)、乳腺癌(BRCA)、宫颈鳞癌(CESC)、肾嫌色细胞癌(KICH)、肺腺癌(LUAD)、胰腺癌(PAAD)、肾上腺癌(PCPG)、直肠癌(READ)和甲状腺癌(THCA)及其正常组织中的表达无明显差异,这可能是由于不同的致癌机制所

致。另外,*FMR1* mRNA的表达与人乳头瘤病毒(HPV)相关的HNSC和皮肤黑色素瘤(SKCM)的转移呈显著正相关($P<0.001$)(图1)。这表明*FMR1*可能在多种癌症的发生发展中发挥着重要作用。

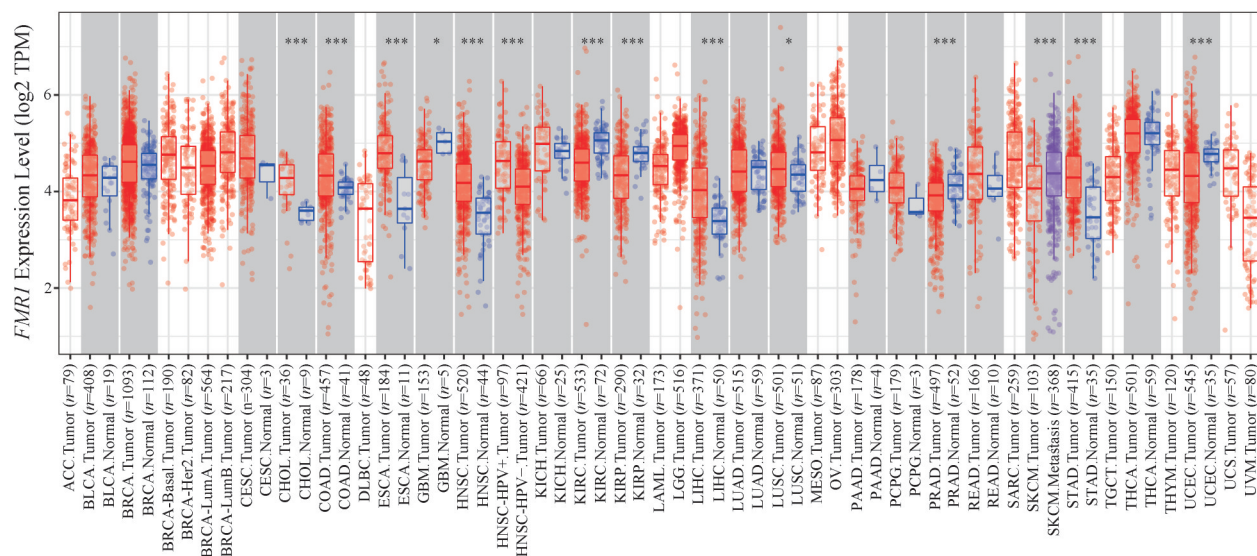


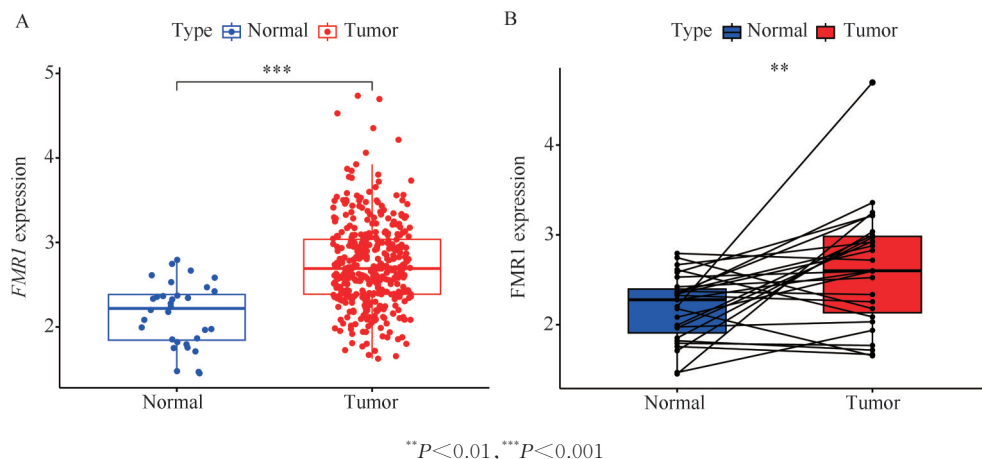
图1 *FMR1*在泛癌中的差异表达

Fig 1 Differential expression of *FMR1* in pan-cancer

2.2 胃癌组织中*FMR1*的表达

通过R软件(<https://www.r-project.org>)对TCGA数据集进行分析。未配对的样本数据分析结果表明,相较于正常组织,胃癌组织中*FMR1*的mRNA表达水平显著上调($P<0.001$)(图2A)。配对的数据分析结果表明,相较于正常组织,胃癌组织中*FMR1*的mRNA表达水平显著上调($P<0.01$)(图2B)。为了确认数据库分析结果,进行了

qRT-PCR和免疫组织化学染色(IHC)。qRT-PCR显示,人胃癌细胞系(AGS,SGC-7901,MGC-823)中*FMR1* mRNA的表达水平显著高于人正常胃上皮细胞(GES-1)($P<0.001$)(图3)。免疫组化结果证明,*FMR1*的蛋白表达水平在胃癌组织中高表达,且差异具有统计学意义($\chi^2=6.915, P=0.009$)(图4和表1)。以上结果均提示*FMR1*表达水平的升高可能与胃癌的发生有关。



** $P<0.01$, *** $P<0.001$

A: *FMR1*在TCGA数据库胃癌非配对样本中的差异表达; B: *FMR1*在TCGA数据库胃癌配对样本中的差异表达

图2 *FMR1*在胃癌中的差异表达

Fig 2 Differential expression of *FMR1* in gastric cancer

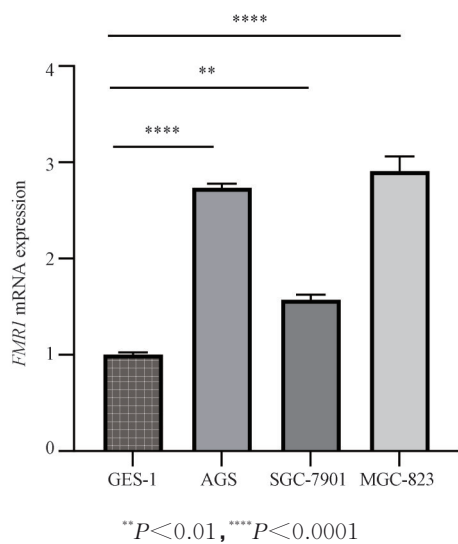


图3 正常细胞系与胃癌细胞系中 *FMR1* mRNA 的表达水平

Fig 3 Expression levels of *FMR1* mRNA in normal cell lines and gastric cancer cell lines

2.3 胃癌中 *FMR1* 表达水平与临床病理特征的关系

表1 胃癌组织与癌旁组织中 FMRP 表达阳性率的比较
Tab 1 Comparison of the positive rate of FMRP expression in gastric cancer tissues and adjacent tissues

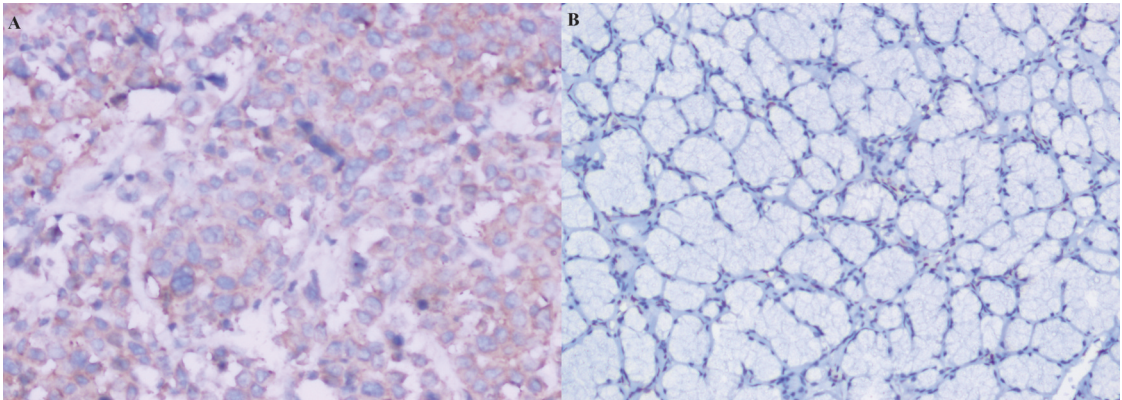
类型	FMRP
胃癌组织	72(92%)
癌旁组织	67(86%)
χ^2	6.915
<i>P</i>	0.009

在生物信息学分析中, *FMR1* 在胃癌中的表达水平与胃癌患者临床病理特征比较的结果显示, *FMR1* 表达与年龄和 T 分期显著正相关($P<0.05$) (图 5 A,B), 而其他临床指标没有统计学意义(图

表2 FMRP 表达与临床病理特征的关系
Tab 2 Relationship between FMRP expression and clinic opathological features

临床病理特征	例数	FMRP	
		+ / 例	<i>P</i>
年龄(岁)			0.161
≥65	47	45	
<65	31	27	
性别			0.808
男	62	57	
女	16	15	
分化程度			0.390
低	32	28	
中	42	40	
高	4	4	
浸润程度			0.212
黏膜层	2	2	
肌层	17	14	
浆膜层	59	56	
淋巴结转移			0.012
有	59	57	
无	19	15	
TNM 分期			0.008
I	8	5	
II	27	25	
III	35	34	
IV	8	8	
肿瘤大小(cm)			0.401
≥5	25	24	
<5	53	48	

5C,D,E,F,G)。通过免疫组化结果分析 *FMR1* 的表达与胃癌临床病理特征之间的关系, 结果表明, 在胃癌中 *FMR1* 表达与患者淋巴结转移、临床 TNM 分期有关($P<0.05$), 与年龄、性别、分化程

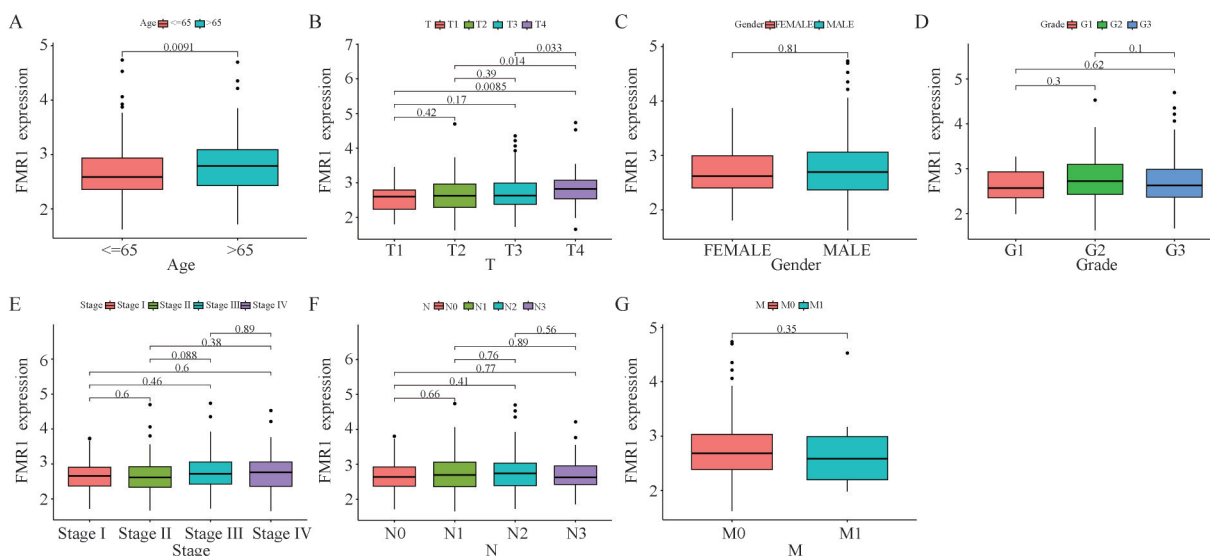


A:FMRP在胃癌组织中表达;B:FMRP在癌旁组织中表达

图4 FMRP 在胃癌组织和癌旁组织中的表达(SP, ×200)

Fig 4 Expression of FMRP in gastric cancer tissues and adjacent tissues (SP, ×200)

度、浸润程度、肿瘤直径无显著相关性($P > 0.05$)(表2)。



A: FMR1的表达水平与年龄之间的关系; B: FMR1的表达水平与T分期之间的关系; C: FMR1的表达水平与性别之间的关系; D: FMR1的表达水平与分级之间的关系; E: FMR1的表达水平与分期之间的关系; F: FMR1的表达水平与N分期之间的关系; G: FMR1的表达水平与M分期之间的关系

图5 胃癌组织中FMR1的表达水平与临床特征之间的关系

Fig 5 Relationship between FMR1 expression level and clinical features in gastric cancer tissues

2.4 FMR1高表达的患者比低表达的患者具有更差的预后

FMR1表达与胃癌患者预后的关系可以利用OS进行检验^[15]。研究结果表明,在胃癌患者中,相较于FMR1低表达组,FMR1高表达组的患者总体生存率明显更低,且这一差异具有统计学意义(风险比(HR)=1.54,95%置信区间(CI):1.07-2.21, $P=0.019$)(图6)。表明高表达的FMR1与胃癌患者的不良临床结果密切相关,FMR1可以作为GC的预后标志物。

2.5 FMR1的差异基因分析与富集分析

根据FMR1高低表达分组进行差异基因分析,并显示与FMR1呈正负相关的前100个基因(图7)。GO富集的主要功能途径为“中间丝细胞骨架组织”、“角蛋白丝”、“细胞顶端”、“门控通道活动”、“皮肤表皮的结构成分”、“类异戊二烯结合”(图8A,B)。在KEGG富集中主要的富集途径为“嗅觉传导”、“非洲锥虫病”、“PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor,过氧化物酶体增殖物激活受体)信号通路”,而在GABA能突触(gamma-aminobutyric acid-ergic synapse, γ -氨基丁酸能突触)、JAK-STAT(janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway, janus激酶-信号转导及转录激活因子途径)等信号通路的富

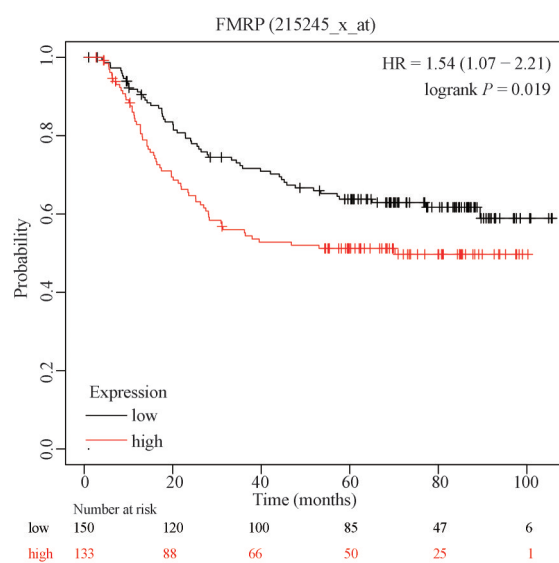


图6 FMR1表达水平与胃癌患者预后的关系

Fig 6 Relationship between FMR1 expression level and prognosis of gastric cancer patients

集程度较上述通路低(图9A,B)。在GSEA富集分析中,当富集的基因集来自KEGG数据库时,显示“嗅觉传导通路”在目标基因的高表达组中是活跃的,“花生四烯酸代谢”、“补血和凝血级联反应”、“细胞色素P450对外源性药物的代谢作用”、“PPAR信号通路”在目标基因的低表达组中是活跃

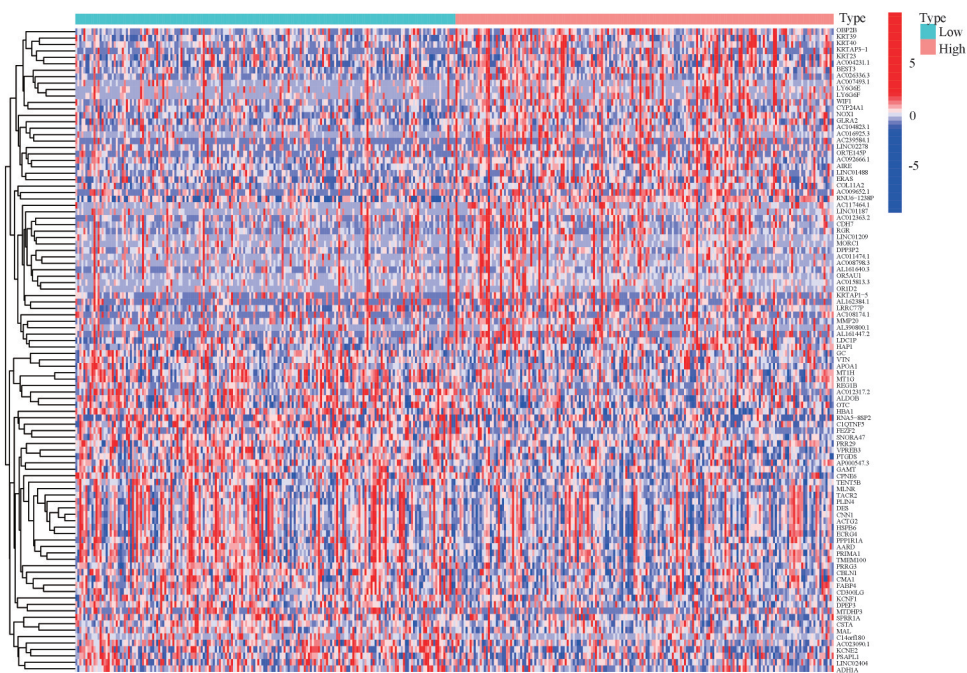
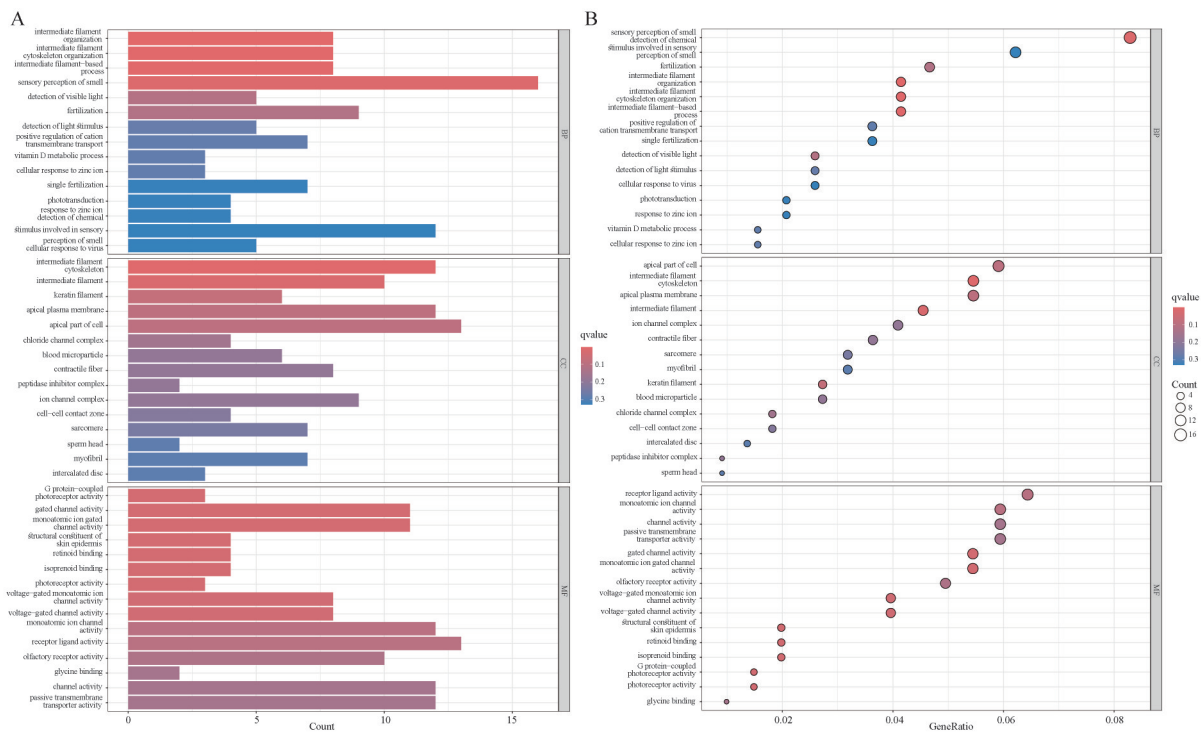


图7 *FMR1* 差异表达基因

Fig 7 Different genes correlated with high and low expression Levels of *FMR1*



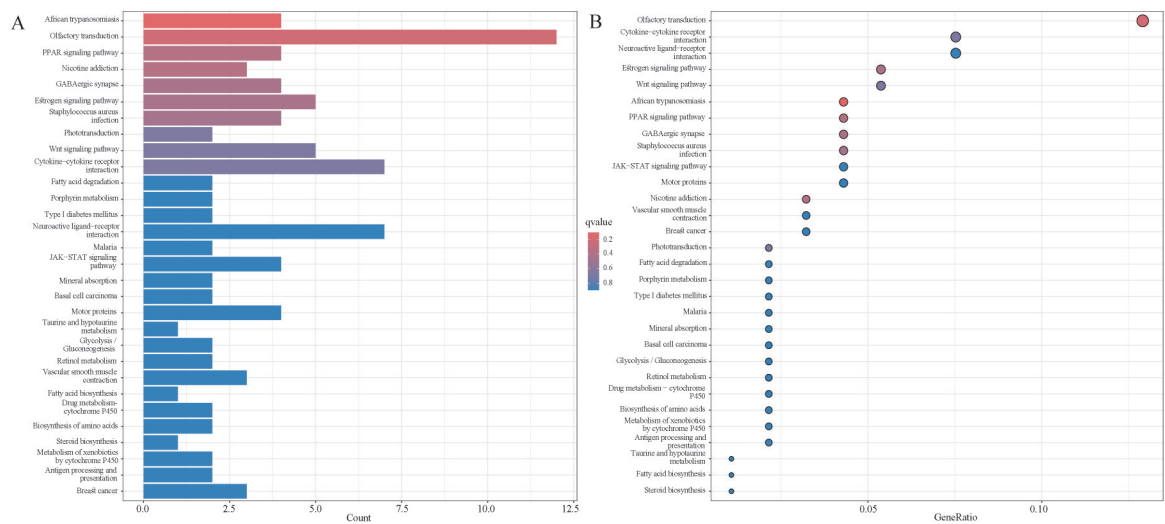
A:柱状图;B:气泡图

图8 *FMR1* 的GO富集分析

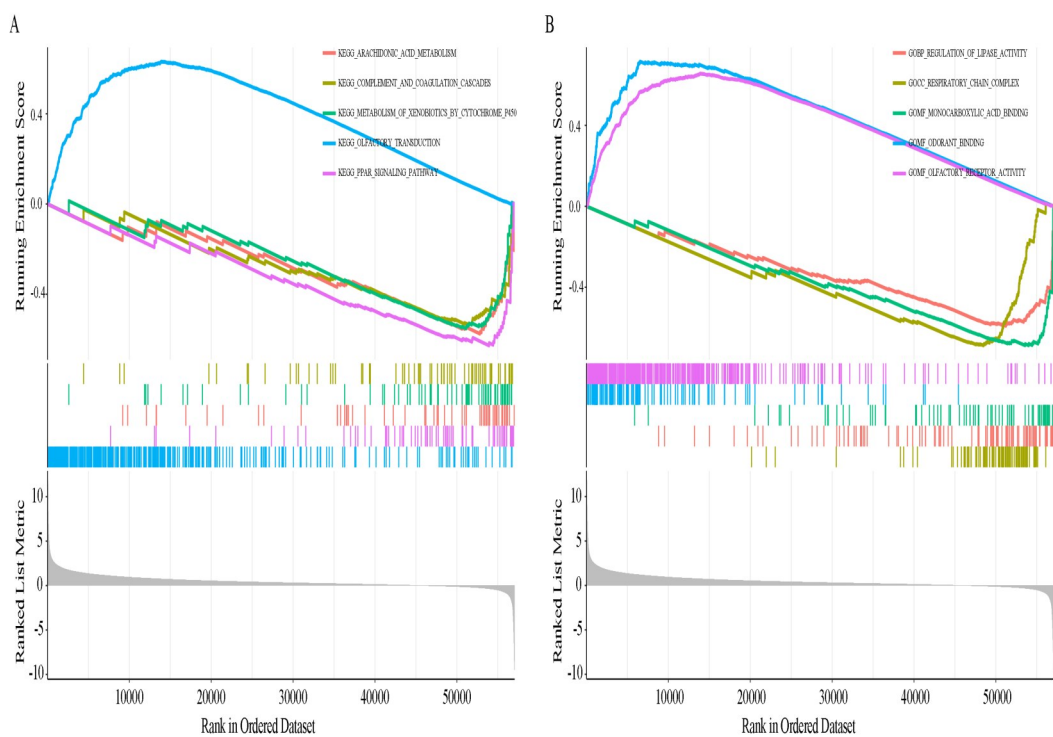
Fig 8 GO enrichment analysis of *FMR1*

的;当富集的基因集来自GO数据库时,显示“气味分子结合”、“嗅觉受体活性”等功能在目标基因的高表达组中是活跃的,“脂肪酶的调控”、“呼吸链复

合物”、“单羧酸结合”等功能在目标基因的低表达组中是活跃的(图10)。表明这些途径可能与 *FMR1* 相关基因的调节有关。



A:柱状图;B:气泡图

图9 *FMR1*的KEGG富集分析Fig 9 KEGG enrichment analysis of *FMR1*

A:GSEA-KEGG; B:GSEA-GO

图10 *FMR1*的GSEA富集分析Fig 10 GSEA enrichment analysis of *FMR1*

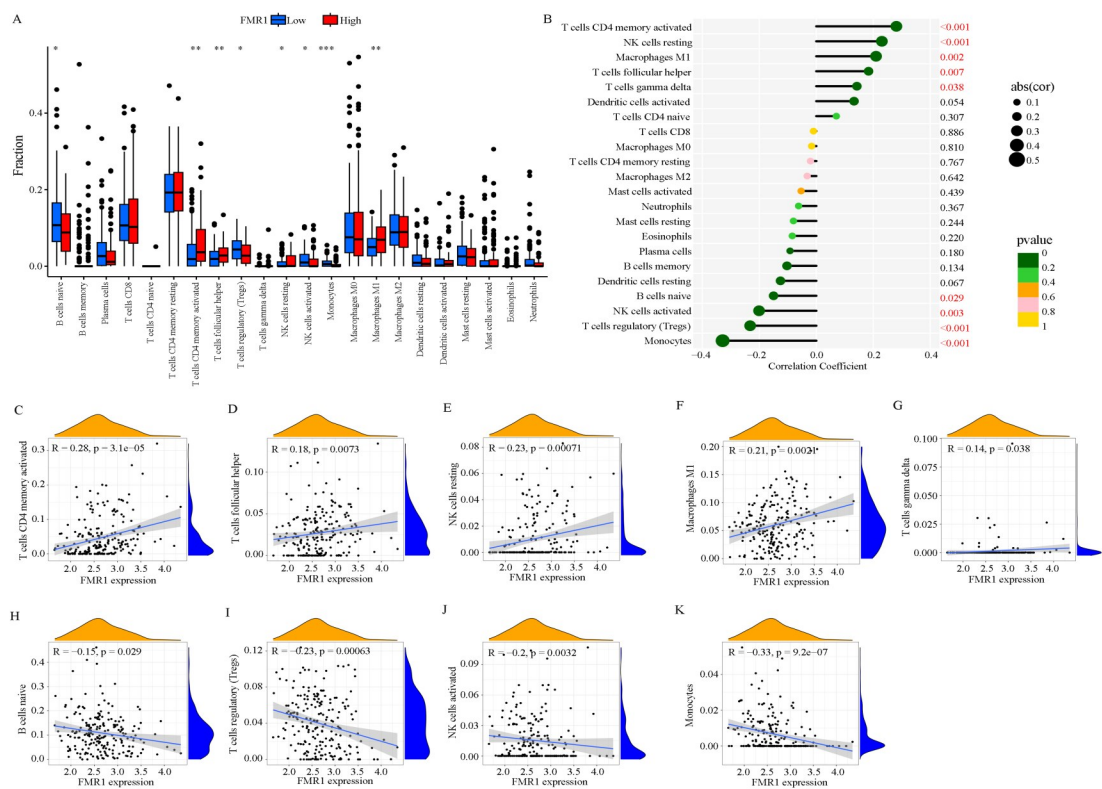
2.6 *FMR1*在胃癌免疫浸润中的作用

图 11A 和图 11B 显示,幼稚 B 细胞、活化 CD4 阳性记忆 T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、Tregs(regulatory T cells,调节性 T 细胞)、静息 NK 细胞(resting natural killer cells,静息自然杀伤细胞)、活化 NK 细胞(activated natural killer cells,活化自然杀伤细

胞)、单核细胞、M1 巨噬细胞与 *FMR1* 的表达显著相关($P < 0.05$)。针对与 *FMR1* 的表达显著相关的免疫细胞绘制相关性的散点图,进一步证明活化 CD4 阳性记忆 T 细胞($R = 0.28$, $P = 3.1 \times 10^{-5}$)、滤泡辅助性 T 细胞($R = 0.18$, $P = 0.0073$)、静息 NK 细胞($R = 0.23$, $P = 0.00071$)、M1 巨噬细胞($R = 0.21$, P

$=0.0021$) 与 *FMR1* 表达呈正相关(图 11C,D,E,F), γ - δ T 细胞($R=0.14$, $P=0.038$)、幼稚 B 细胞($R=-0.15$, $P=0.029$)、Tregs($R=-0.23$, $P=0.00063$)、活化 NK 细胞($R=-0.2$, $P=0.0032$)、单核细

胞($R=-0.33$, $P=9.2 \times 10^{-7}$) 与 *FMR1* 表达呈负相关(图 11G,H,I,J,K)。因此,推测 *FMR1* 可能通过免疫细胞影响胃癌的发生、发展。



A: *FMR1* 表达水平与胃癌 22 种免疫细胞丰度相关性的箱图; B: *FMR1* 表达水平与胃癌 22 种免疫细胞丰度相关性的棒状图; C: *FMR1* 表达水平与活化 CD4 阳性记忆 T 细胞的相关性; D: *FMR1* 表达水平与滤泡辅助性 T 细胞的相关性; E: *FMR1* 表达水平与静息 NK 细胞的相关性; F: *FMR1* 表达水平与 M1 巨噬细胞的相关性; G: *FMR1* 表达水平与 γ - δ T 细胞的相关性; H: *FMR1* 表达水平与幼稚 B 细胞的相关性; I: *FMR1* 表达水平与 Tregs 的相关性; J: *FMR1* 表达水平与活化 NK 细胞的相关性; K: *FMR1* 表达水平与单核细胞的相关性

图 11 *FMR1* 表达水平与胃癌肿瘤免疫浸润水平的相关性

Fig 11 Correlation between *FMR1* expression level and tumor immune invasion level of gastric cancer

3 讨论

近年来越来越多的报道证实 *FMR1* 在实体肿瘤的起源和演进过程中发挥着举足轻重的作用,在肿瘤患者体内, *FMR1* 基因通过多种复杂的分子调控网络与信号传导途径有力地驱动了肿瘤细胞增殖、分化、侵袭和转移的能力,进而与肿瘤的进展和耐药性以及患者的预后密切相关。将 *FMR1* 基因作为靶点指导肿瘤治疗的临床前研究目前取得了一些初步的成果。

本研究借助 TCGA 数据库资源,深入探讨了胃癌组织相较于其毗邻正常组织间 *FMR1* mRNA 表达水平的差异,并采用 qRT-PCR 方法进行实验验证。同时,收集临床组织样本,通过免疫组化染色对其蛋白表达差异进行了进一步验证。说明通过

FMR1 表达水平能够很好地区分肿瘤和正常组织, *FMR1* 可能是一个具有潜力的生物标志物,能够用于胃癌的早期诊断。深入的生存分析和预后评估显示, *FMR1* 有可能成为胃癌患者预后不良的分子诊断标志物。另外,公共数据库和临床数据分析也共同证明,胃癌组织中 *FMR1* 表达水平与 TNM 分期显著相关。

肿瘤免疫在肿瘤的起源、演进、复发及转归中的作用不可替代,近年来,针对肿瘤免疫机制开发的治疗策略,即肿瘤免疫治疗,已成为抗击肿瘤的新兴支柱^[16]。宿主免疫系统决定肿瘤进展的命运,利用患者自身的免疫系统来对抗恶性肿瘤成为一种有前景的治疗选择^[17]。肿瘤细胞的恶性生物学行为受到多方面的影响,包括肿瘤细胞内部的分子

事件以及肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 的生物学特性, 另外二者的相互作用也可以共同促进这些恶性特性的形成^[18]。受内在致癌机制和表观遗传修饰调控的肿瘤微环境已成为近年来的研究热点, TME 的特征包括缺氧、代谢失调和免疫抑制^[19], 它能够通过多种复杂的机制打破机体对肿瘤免疫监视和免疫耐受之间的平衡, 进而为肿瘤的生长提供有利条件^[20]。近年来, 基于 TME 免疫抑制活性的抑制和靶向治疗引起了广泛的关注。肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) 是 TME 的重要组成部分, 主要包括 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。近年来, TILs 在肿瘤过继免疫治疗中得到了广泛的应用, 研究显示 TILs 的高度浸润不仅反映了宿主体内具有强有力的抗肿瘤免疫反应, 还预示着患者的预后情况较为乐观^[21]。本研究发现, 胃癌患者体内 FMR1 高表达时, 幼稚 B 细胞、Tregs、活化 NK 细胞和单核细胞浸润丰度较低, 这与患者不良预后相关, 同之前观察到的 FMR1 高表达患者总体生存率低的分析结果相吻合。若以 FMR1 为治疗靶点, 不仅可以延长胃癌患者的总生存期, 亦有利于胃癌患者的过继免疫治疗。有报道表明, 肿瘤浸润性 FoxP3⁺ Tregs 细胞与结直肠癌、头颈部癌和食管癌的良好预后相关^[22]。本研究发现高丰度的 Tregs 浸润与胃癌的较好预后相关, 进一步证实了 Tregs 浸润丰度与肿瘤预后之间的关系。Ishigami 等^[23]的研究显示, 相较于低密度的 NK 细胞, 胃癌患者中高密度的 NK 细胞与更好的预后相关, 与本文的研究结果具有一致性。尽管已经初步探索了免疫细胞在 FMR1 的影响下与胃癌预后之间的关系, 但未来仍需进一步研究不同类型免疫细胞在胃癌发病及预后中作用的机制。

富集分析结果提示 FMR1 与生物体内多种功能和通路相关。其中, FMR1 在胃癌中与“角蛋白丝”功能相关, 上皮细胞可以根据细胞角蛋白表达进行分类, 由于角蛋白的表达在不同的上皮细胞中差异很大, 且当上皮发生恶性转化时, 其角蛋白谱通常保持不变, 因此, 它们已被广泛用于各种癌的指纹图谱^[24]。胃癌中 FMR1 还与“门控通道活动”功能相关, 许多肿瘤都与跨细胞膜离子通道功能异常有关, 例如 Kv2.1 就是髓母细胞瘤细胞中促凋亡的 K⁺ 通道^[25], 然而, 胃癌患者体内离子通道所涉及的具体生物学功能仍需进一步探索。另外, 自 20 世纪 90 年代首次发现以来, PPAR 信号通路受到了研究者的广泛关注, 随着研究人员的不断探索, 已经确定 PPAR 信号通路在细胞分化、炎症、脂质代谢、

免疫调节和肿瘤发生中发挥着至关重要的作用, 许多研究表明, PPAR 信号通路的异常调控通常伴随着各种癌症的发生、发展^[26], 本文证明的胃癌中 FMR1 与“PPAR 信号通路”的相关性也支持了这一点, 二者作用的具体分子机制仍需进一步探索。

综上所述, 本研究利用生物信息学和临床样本证明 FMR1 不仅在胃癌诊断及预后评估中发挥着关键作用, 而且还参与了胃癌的免疫调节。因此, FMR1 有潜力成为胃癌的生物标志物和治疗靶点。对 FMR1 功能的探索为深入理解胃癌的发病机制以及其在免疫和靶向治疗中的作用提供了新的思路。

然而, 本研究也存在一定的局限性, 所使用的生物信息学分析数据和临床样本均来自公共数据库, 且均为回顾性研究。今后需要进行前瞻性和深入的研究, 以探索其分子机制, 并进行大量的临床试验来验证其安全性和有效性, 从而为临床提供新的分子靶点。

作者贡献度说明:

韩宜倩: 撰写、文章投稿, 周康杰: 数据分析、图表制作, 蒋薇薇、张森和毛晨曦: 数据统计, 吴风雷和胡楠: 作出指导, 进行客观审校。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Guan WL, He Y, Xu RH, et al. Gastric cancer treatment: Recent progress and future perspectives[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 57.
- Li C, Yin Y, Tao R, et al. ESRP1-driven alternative splicing of CLSTN1 inhibits the metastasis of gastric cancer[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 464.
- Janjigian YY, Kawazoe A, Yanez P, et al. The KEYNOTE-811 trial of dual PD-1 and HER2 blockade in HER2-positive gastric cancer [J]. Nature, 2021, 600(7890): 727-730.
- Zhu YJ, Zheng B, Luo GJ, et al. Circular RNAs negatively regulate cancer stem cells by physically binding FMRP against CCAR1 complex in hepatocellular carcinoma[J]. Theranostics, 2019, 9(12): 3526-3540.
- Hu Y, Gao Q, Ma S, et al. FMR1 promotes the progression of colorectal cancer cell by stabilizing EGFR mRNA in an m⁶A-dependent manner[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(11): 941.
- Shen Z, Liu B, Wu B, et al. FMRP regulates STAT3 mRNA localization to cellular protrusions and local translation to promote hepatocellular carcinoma metastasis [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 540.

- 7 Brown JAL, Caredda E, Pedini G, et al. FMRP expression in primary breast tumor cells correlates with recurrence and specific site of metastasis [J]. *PLoS One*, 2023, 18(6):e0287062.
- 8 Pedini G, Buccarelli M, Bianchi F, et al. FMRP modulates the Wnt signalling pathway in glioblastoma [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8):719.
- 9 Cao K, Ling X, Jian X, et al. Pan-cancer analysis of UBE2T with a focus on prognostic and immunological roles in lung adenocarcinoma [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1):306.
- 10 Wei C, Wang B, Chen ZH, et al. Validating RRP12 expression and its prognostic significance in HCC based on data mining and bioinformatics methods [J]. *Front Oncol*, 2022, 12:812009.
- 11 张竞舟, 胡楠, 汤佳琦, 等. 胃癌中 TGF- β 、PD-L1 表达与肿瘤免疫表型的关系及其临床意义 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(9):1025-1030.
Zhang JZ, Hu N, Tang JQ, et al. Correlation of the expression of TGF- β and PD-L1 and cancer-immune phenotypes in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(9):1025-1030.
- 12 曾智, 阎红琳, 陈龙艳, 等. 结直肠癌组织中 *USP10* 的表达及生物信息学分析 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(10):1063-1069.
Zeng Z, Yan HL, Chen LY, et al. Expression and bioinformatics analysis of *USP10* in colorectal adenocarcinoma tissues and bioinformatics analysis [J]. *J Clin Exp Pathol*, 2017, 33(10):1063-1069.
- 13 An Y, Jia Y. Bioinformatics analysis of PKMYT1 expression in breast cancer and screening of experimental cell lines [J]. *J Med Res*, 2023, 52(2):64-70, 75.
- 14 Zhang C, Peng L, Gu H, et al. ANXA10 is a prognostic biomarker and suppressor of hepatocellular carcinoma: A bioinformatics analysis and experimental validation [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 1583.
- 15 Lu X, Li G, Liu S, et al. Bioinformatics analysis of KIF1A expression and gene regulation network in ovarian carcinoma [J]. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 3707-3717.
- 16 Mei R, Ju Q, Li Y, et al. A bioinformatics analysis of P2RY8 expression in hepatocellular carcinoma and its clinical significance [J]. *J Clin Hepat*, 2022, 38(8): 1825-1833, 1945-1946.
- 17 Goliwas KF, Deshanel JS, Elmetts CA, et al. Moving immune therapy forward targeting TME [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(2): 417-425.
- 18 毕佩, 王洁, 鲁娟, 等. 鼻咽癌免疫逃逸中 EB 病毒募集 Treg 细胞相关性分析 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 52(9):692-697.
Bi P, Wang J, Lu J, et al. Correlation analysis of the Epstein-Barr virus recruited regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma of immune escape [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2017, 52(9): 692-697.
- 19 Zhang F, Liu H, Duan M, et al. Crosstalk among m⁶A RNA methylation, hypoxia and metabolic reprogramming in TME: From immunosuppressive microenvironment to clinical application [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 84.
- 20 赵铤活, 苗蓓, 费素娟. 基于生物信息学分析 *MCM8* 基因在胃癌组织中的表达及临床意义 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(12):1495-1506.
Zhao BH, Miao B, Fei SJ. Expression of *MCM8* gene in gastric cancer and its clinical significance by bioinformatics analysis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 37(12):1495-1506.
- 21 Zhang D, He W, Wu C, et al. Scoring system for tumor-infiltrating lymphocytes and its prognostic value for gastric cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 418697.
- 22 Choi Y, Kim JW, Nam KH, et al. Systemic inflammation is associated with the density of immune cells in the tumor microenvironment of gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(4):602-611.
- 23 Shang B, Liu Y, Jiang SJ, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: A systematic review and meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1):15179.
- 24 Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms [J]. *Histopathology*, 2002, 40(5): 403-439.
- 25 Huang P, Guo YD, Zhang HW. Identification of hub genes in pediatric medulloblastoma by multiple-microarray analysis [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70:522-531.
- 26 Xu YK, Shu D, Shen MY, et al. Development and validation of a novel PPAR signaling pathway-related predictive model to predict prognosis in breast cancer [J]. *J Immunol*, 2022(1):9412119.

[本文编辑] 雷燕 宋睿璞 朱昊