

TM4SF19——一种新的膀胱尿路上皮癌诊断和预后的生物标志物

刘蕴博, 李延江*

青岛大学附属医院泌尿外科, 山东 青岛

收稿日期: 2024年1月27日; 录用日期: 2024年2月21日; 发布日期: 2024年2月27日

摘要

近年来科学研究证实四次跨膜L6超家族中的TM4SF19在肿瘤的发生、发展中发挥着重要作用, 但TM4SF19在膀胱尿路上皮癌(BLCA)中的预后和免疫侵袭中的作用仍不清楚。本研究探讨TM4SF19在肿瘤组织中的表达及其与免疫侵袭的关系, 并确定其在BLCA患者中的预后作用。本研究从癌症基因组图谱(TCGA)数据库中获取了患者的表达谱和临床信息。Mann-Whitney U检验(Wilcoxon秩和检验)分析BLCA中TM4SF19的差异表达。通过功能富集分析以探索所涉及的潜在信号通路和生物学功能。使用单样本基因集富集分析评估免疫细胞浸润。采用Kaplan-Meier法和Cox回归分析来确定TM4SF19的预后价值。构建列线图来预测癌症诊断后1年、5年和10年的总生存(OS)率。结果: TM4SF19在BLCA中过度表达。TM4SF19高表达组中多条途径被显著富集, 其中不乏多条肿瘤相关途径及免疫相关途径。TM4SF19表达与巨噬细胞、Th1细胞和其他免疫细胞呈正相关, 但与NKCD56bright细胞和肥大细胞呈负相关。TM4SF19的表达水平与T分期、N分期、年龄显著相关。TM4SF19过度表达会导致总生存期(OS)和疾病特异性生存率显著下降。多变量Cox分析将TM4SF19确定为OS的独立危险因素。使用校准图分析了列线图的准确性, 显示1年、5年和10年的实际OS值与预测OS值之间具有良好的一致性。结果表明, TM4SF19的上调与疾病的进展和不良预后相关。TM4SF19有望作为BLCA患者诊断和预后的生物标志物。

关键词

TM4SF19, 膀胱尿路上皮癌, 诊断, 预后, 生物标志物

TM4SF19—A New Biomarker for Diagnosis and Prognosis of Bladder Urothelial Carcinoma

Yunbo Liu, Yanjiang Li*

Department of Urology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

*通讯作者 Email: lyj2001353@163.com

Abstract

In recent years, scientific research has confirmed that TM4SF19 in the four-transmembrane L6 superfamily plays an important role in the occurrence and development of tumors. However, the role of TM4SF19 in the prognosis and immune invasion of bladder urothelial carcinoma (BLCA) remains unclear. This study explores the expression of TM4SF19 in tumor tissues and its relationship with immune invasion and determines its prognostic role in BLCA patients. This study obtained patients' expression profiles and clinical information from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. Mann-Whitney U test (Wilcoxon rank sum test) analyzed the differential expression of TM4SF19 in BLCA. Functional enrichment analysis was performed to explore the potential signaling pathways and biological functions involved. Immune cell infiltration was assessed using single-sample gene set enrichment analysis. The Kaplan-Meier method and Cox regression analysis were used to determine the prognostic value of TM4SF19. Nomograms were constructed to predict overall survival (OS) rates at 1, 5, and 10 years after cancer diagnosis. Results: TM4SF19 is overexpressed in BLCA. Multiple pathways were significantly enriched in the TM4SF19 high-expression group, including many tumor-related pathways and immune-related pathways. TM4SF19 expression was positively correlated with macrophages, Th1 cells, and other immune cells, but negatively correlated with NKCD56 bright cells and mast cells. The expression level of TM4SF19 was significantly related to the T stage, N stage, and age. Overexpression of TM4SF19 results in a significant decrease in overall survival (OS) and disease-specific survival. Multivariate Cox analysis identified TM4SF19 as an independent risk factor for OS. The accuracy of the nomogram was analyzed using calibration plots, showing good agreement between actual and predicted OS values at 1, 5, and 10 years. The results showed that upregulation of TM4SF19 was associated with disease progression and poor prognosis. TM4SF19 is expected to serve as a biomarker for the diagnosis and prognosis of BLCA patients.

Keywords

TM4SF19, Bladder Urothelial Carcinoma, Diagnosis, Prognosis, Biomarkers

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

BLCA 是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。据统计, 每年大约有 573,000 例新发病例和 213,000 例的死亡病例[1] [2]。并且由于复发率高, BLCA 的终生治疗费用高于其他癌症[3] [4]。因此, 寻找新的生物标志物和分子靶点对于 BLCA 的治疗、早期诊断和预后评估至关重要[5] [6]。

四次跨膜 L6 超家族是四[7]次跨膜蛋白超家族的一个分支, 由六个成员(TM4SF1、TM4SF4、TM4SF5、TM4SF18、TM4SF19 和 TM4SF20 组成) [8]。该家族的成员与非共价整合素分子相互作用, 以改变组织发育、信号转导途径、细胞活化、增殖、运动、粘附和血管生成[9] [10] [11]。根据以往的研究证实, TM4SF1、TM4SF4 和 TM4SF5 的表达与多种肿瘤生物活性有关[12]-[18]。TM4SF18 在胰腺癌和胃癌中被发现过表达[19] [20]。TM4SF19 与肺癌的发生和发展有关[21]。越来越多的研究表明, 四次跨膜 L6 超家族在癌症预后中起着至关重要的作用[22]-[29]。然而, TM4SF19 在 BLCA 进展中的潜在作用仍有待探索。

本研究分析了 TCGA 数据库中 TM4SF19 的表达及其与各种临床特征的潜在关联。我们构建了一个

涉及 TM4SF19 及其相关差异表达基因的 PPI 网络。通过通路富集分析和免疫浸润分析预测了 TM4SF19 在促进 BLCA 发展中的作用。我们的研究提供了对 TM4SF19 在 BLCA 中的作用的更全面和深入的理解, 并为 BLCA 的新型诊断和预后生物标志物提供了新的见解。

2. 材料与方法

2.1. 数据来源与数据预处理

我们通过 TCGA 和 GTEx 数据库获得了泛癌和相应正常组织中 TM4SF19 的 mRNA 表达谱[30]。随后收集并处理 TCGA 数据库中 BLCA 中未配对和配对样本的 RNA-seq 数据。“limma”和其他 R 语言(v3.6.3)软件包用于规范化、标准化和可视化[31]。

2.2. TM4SF19 的差异表达分析

使用 R 语言(v3.6.3)分析数据, 使用 ggplot2 [v3.3.3]可视化差异分析结果。采用 Mann-Whitney U 检验(Wilcoxon 秩和检验)分析泛癌中 TM4SF19 的差异表达。采用 Shapiro-Wilk 正态性检验分析 TM4SF19 在配对和未配对样本中的表达谱数据, 然后采用 Wilcoxon 符号秩检验和 Mann-Whitney U 检验(Wilcoxon 秩和检验)进行分析。最后, ROC 使用 pROC 软件包[v1.17.0.1]对数据进行分析, 以确定 TM4SF19 的诊断准确性。上述所有分析均将 $p < 0.05$ 定义为具有统计学意义。

2.3. 高低表达组和低 TM4SF19 表达组差异表达基因(DEGs)分析

对 TM4SF19 高表达组和低表达组中差异表达基因(DEG)的分析将 TM4SF19 高表达或低表达的 TM4SF19 表达水平分别统计为高于或低于中值。差异表达分析以调整后的 p 值 < 0.05 和 $|\text{Log}_2\text{-foldchange}| > 1$ 。为了可视化筛选出的差异基因的火山图并分析 PPI 网络, 我们使用了 Cytoscape 和 STRING 数据库[32]。使用 MCODE 筛选 hub 基因。随后使用 hub 基因来说明 TM4SF19 基因的共表达模式。

2.4. TM4SF19 单基因表达相关性分析

对于转录组数据, 使用 STAT 包进行单基因表达相关性分析。分析结果筛选相关 p 值为 0.05 的基因, 按降序排列 $|\text{Pearsonvalue}|$, 并选择前 30 个相关性进行基因共表达热图, 同时选择前 300 个相关性进行 GO 和 KEGG 功能富集分析。

2.5. 免疫细胞浸润的功能富集和分析

通过 GO、KEGG 和 GSEA 功能富集分析获得了与 TM4SF19 最相关的基因[33]。选择基因集“h.all.v2022.1.Hs.symbols.gmt [Hallmarks]”进行 GSEA 分析[34]。我们将富集显著性阈值定义为错误发现率(FDR) < 0.25 且 $p.\text{adjust} < 0.05$ 。

分析 TM4SF19-高表达组和 TM4SF19-低表达组之间的 24 种免疫细胞浸润水平, 并通过 ssGSEA 算法计算相应的富集分数[35] [36]。最后, 我们使用 circlize 包[版本 0.4.12]通过绘制弦图来可视化相关性[37]。我们将显著相对阈值定义为 p 值 < 0.001 。

2.6. 临床统计分析、模型构建和预后评估

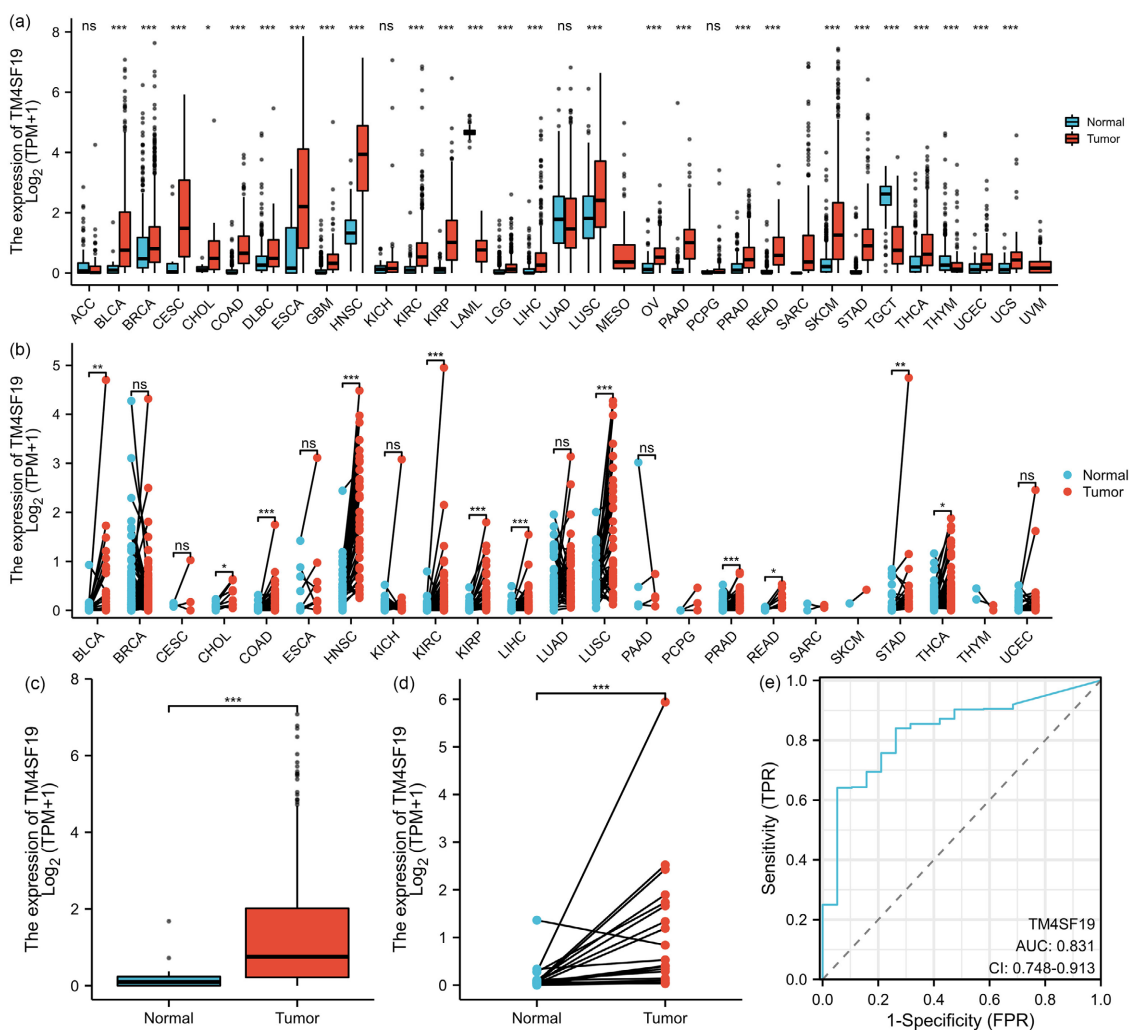
采用 Wilcoxon 符号秩和检验来检查 TM4SF19 与临床病理特征之间的关联。使用 Cox 回归和 Kaplan-Meier 方法分析亚组患者的 TM4SF19 表达水平的总生存期(OS)、疾病特异性生存期(DSS)、无进展间期(PFI)和其他临床参数。多变量 Cox 分析评估了 TM4SF19 表达和生存的临床特征。中值确定了 TM4SF19 表达阈值。

利用多变量分析和 Cox 回归模型生成列线图。这些图使用独立的预后变量来预测 1 年、5 年和 10 年间隔的生存率。校准分析和校准图确定列线图预测的准确性。预后数据来自 Cell 文章[38]。

3. 结果

3.1. TM4SF19 在 BLCA 中的表达

TM4SF19 在大多数癌症中表达增加, 包括膀胱癌(BLCA)、乳腺浸润性癌等(图 1(a))。然而, 它在一些癌症中下降, 例如睾丸癌(TGCT)和胸腺癌(THYM)。大多数癌症(包括 BLCA)的配对样本中 TM4SF19 的表达水平有所增加(图 1(b))。在 BLCA 的配对和未配对样本中, TM4SF19 的表达与正常样本显著不同(图 1(c)和图 1(d))。采用 ROC 分析分析 TM4SF19 在膀胱尿路上皮癌中对癌组织和正常组织的分化作用。TM4SF19 的曲线下面积为 0.831 (图 1(e))。这些表明 TM4SF19 在预测肿瘤和正常结果方面具有一定的准确性。结果均具有统计学意义。



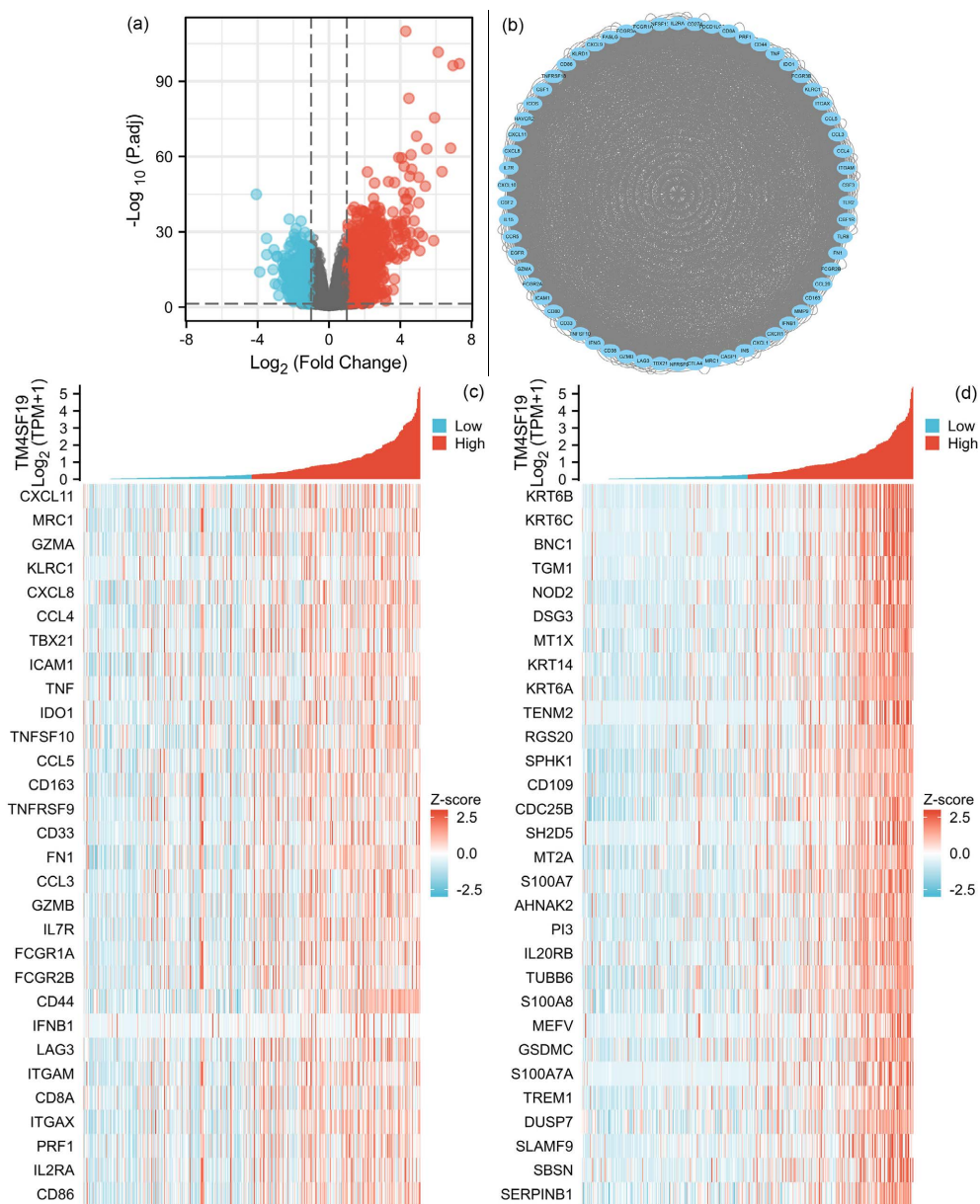
TCGA 数据库中(a) 未配对和(b) 配对的泛癌样本中 TM4SF19 的表达。TCGA-BLCA 的(c) 未配对和(d) 配对样本中的 TM4SF19 表达。根据(e) TCGA-BLCA 中 TM4SF19 的表达水平来区分 BLCA 肿瘤组织和正常组织的诊断 ROC 曲线。p ≥ 0.05; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001。

Figure 1. Expression and diagnostic value of TM4SF19 in BLCA

图 1. TM4SF19 在 BLCA 中的表达及诊断价值

3.2. BLCA 中 TM4SF19 的单基因差异表达分析

经过 TM4SF19 单基因差异表达分析, 我们筛选出 1011 个符合标准的基因, 在标准下, 有 893 个基因强表达(positive logFC)。有 118 例低表达(negative logFC)。火山图用于描述单基因差异分析结果(图 2(a))。我们利用上述 1011 个基因组构建了不同的蛋白质相互作用网络。我们发现了 62 个 HUB 基因(图 2(b))。然后将与 TM4SF19 关系最密切的 30 个基因用于相关性分析, 以生成共表达热图(图 2(d))。图 2(c)描绘了说明前 30 个 HUB 基因和 TM4SF19 共表达的热图。



(a) 蓝色表示下调基因的表达, 红色表示上调基因的表达。(b) 中心基因的 PPI 网络。(c) 热图显示了 hub 基因和 TM4SF19 之间的共表达模式。(d) 通过单基因相关性研究得出与 TM4SF19 关联性最高的前 30 个基因。

Figure 2. Single gene differential analysis and correlation analysis of TM4SF19

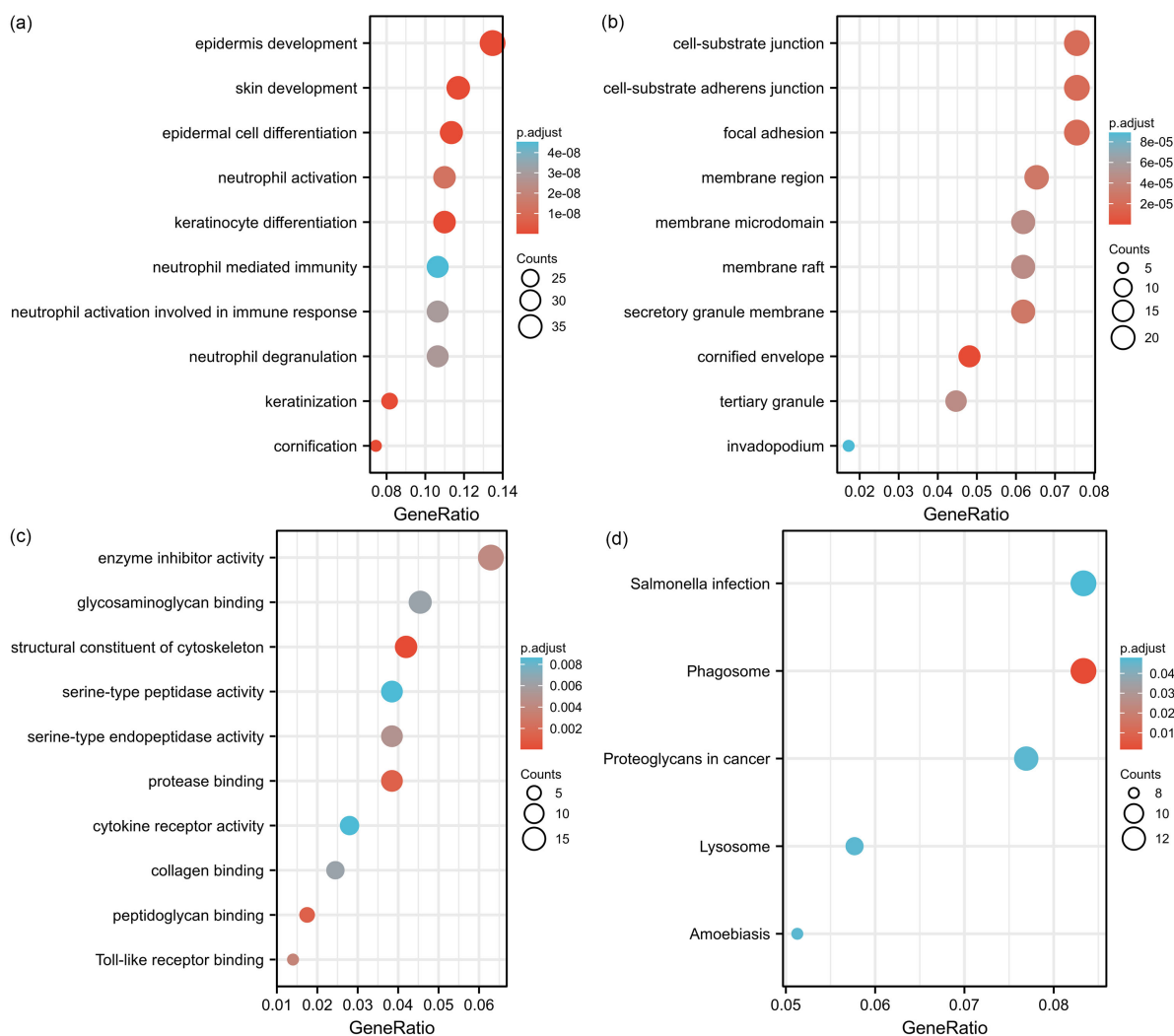
图 2. TM4SF19 的单基因差异分析及相关性分析

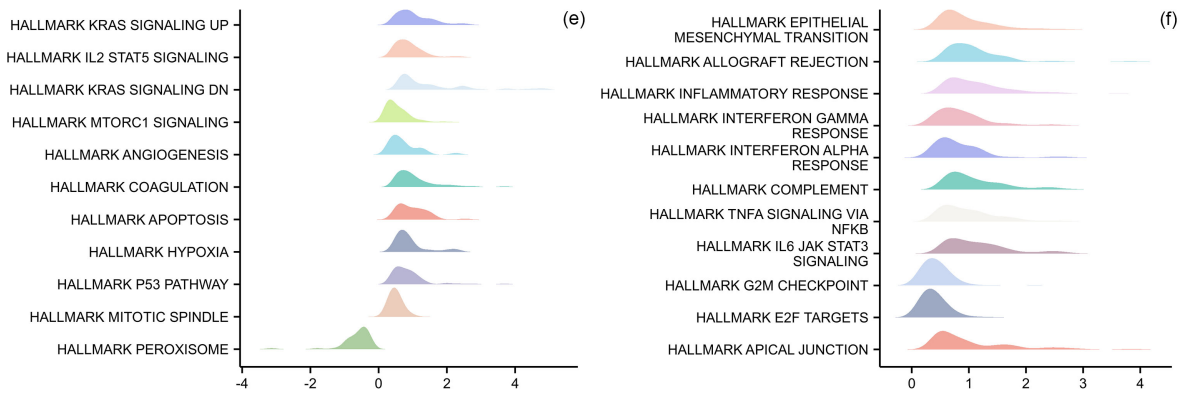
3.3. BLCA 中 TM4SF19 的通路富集和分析

对 TM4SF19 和差异基因进行 GO 富集分析(图 3(a)~(c))。TM4SF19 相关基因被证明参与表皮发育、角质形成细胞分化、细胞-基质连接、酶抑制剂活性等。随后,进行了 KEGG 富集分析(图 3(d))。结果表明 TM4SF19 与吞噬体、蛋白多糖在癌症、阿米巴病等方面发挥功能。最后,我们对 TM4SF19 差异基因和选定的通路进行 GSEA 分析,结果显示共有 22 条通路显著富集,即上皮间质转化、同种异体移植排斥、炎症反应等(图 3(e), 图 3(f))。

3.4. TM4SF19 表达与免疫浸润的关系

TM4SF19 表达与巨噬细胞、Th1 细胞和其他免疫细胞呈正相关,但与 NK CD56bright 细胞和肥大细胞呈负相关(图 4(b), $p < 0.05$)。此外, aDC、B 细胞、细胞毒性细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、CD56bright 细胞、NK CD56dim 细胞、T 细胞、Tcm、Tem、Tgd 中 TM4SF19 高表达水平和低表达水平组之间的免疫浸润评分存在统计学显著差异。Th2 细胞、Th1 细胞和 TReg ($p < 0.05$, 图 4(a))。接下来,我们绘制了每个免疫细胞浸润评分与 TM4SF19 表达的散点图。图 4(c)~(h)中给出了显示显著相关性($p < 0.001$)的结果。上述研究结果表明肿瘤的免疫激活状态与 TM4SF19 的高表达之间存在很强的相关性。

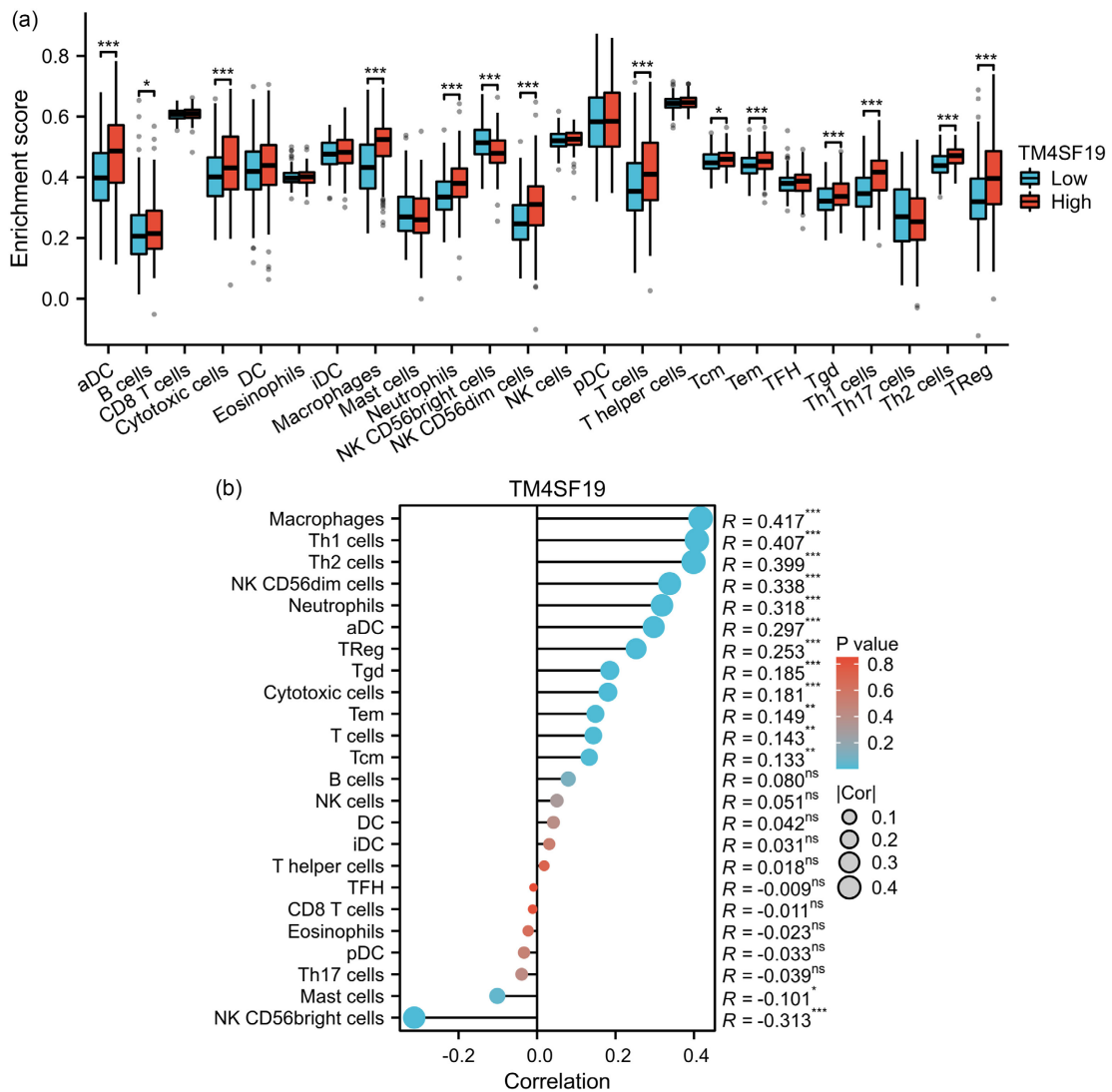


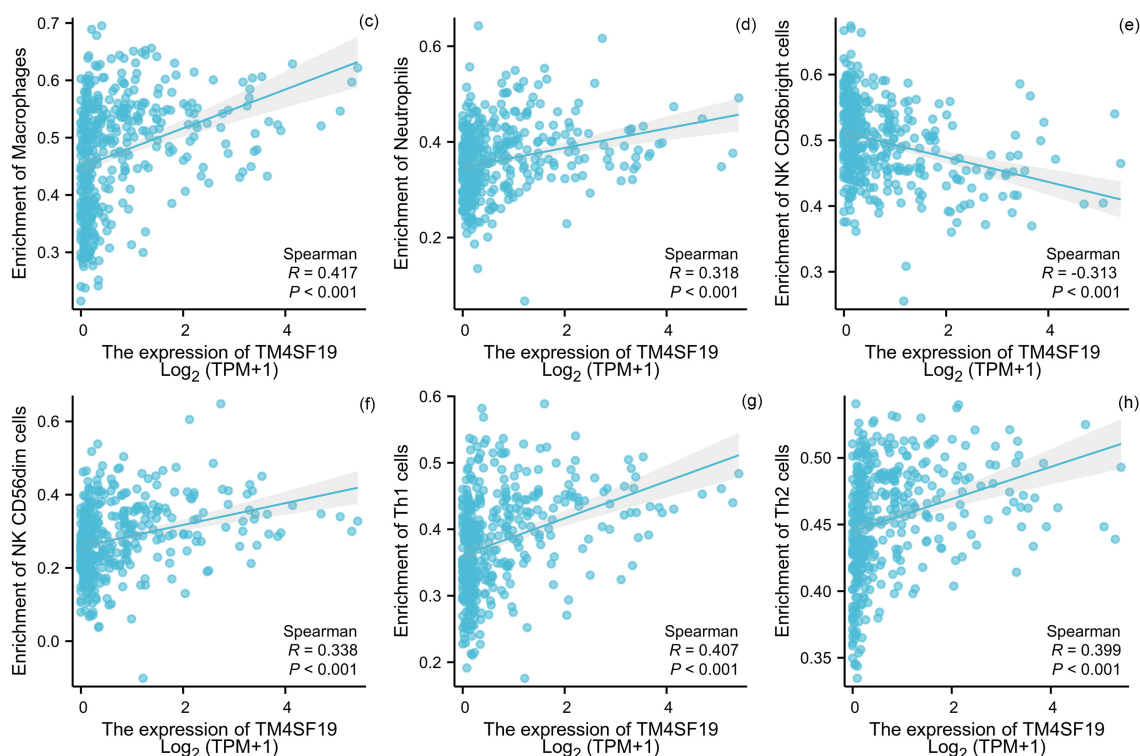


(a)~(d) TM4SF19 相关 DEGs 的 GO 和 KEGG 富集分析。(e) (f) 使用 GSEA 分析得出 TM4SF19-低表达和 TM4SF19-高表达之间最显著富集的通路。

Figure 3. The function enrichment analysis of related DEGs of TM4SF19 in BLCA

图 3. BLCA 中 TM4SF19 相关 DEG 的功能富集分析





(a) 比较 TM4SF19 高组和 TM4SF19 低组之间 24 个免疫细胞的富集分数, 并使用箱线图显示结果。(b) 棒棒糖图代表 24 个免疫细胞和 TM4SF19 之间的相关性。(c)~(h) 散点图显示 TM4SF19 的表达与巨噬细胞、Th1 细胞、Th2 细胞、NKCD56dim 细胞、中性粒细胞、NKCD56bright 细胞浸润程度的关系。p ≥ 0.05; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001。

Figure 4. Immune infiltration analysis of TM4SF19

图 4. TM4SF19 的免疫浸润分析

3.5. TM4SF19 表达与临床病理变量之间的关系

临床基线信息表(表 1)是从 TCGA 数据库的 414 个 BLCA 样本中获得的, 用于检查 TM4SF19 表达和临床病理特征。病理 NM 分期、年龄、性别、BMI、淋巴血管侵犯、吸烟者之间 TM4SF19 表达与临床数据的相关性无显著变化。尽管如此, TM4SF19 的表达因病理 T 分期、病理分期、种族、组织学分级和亚型而存在显著差异(图 5(a)~(l))。

Table 1. The clinical baseline information table about the association between the expression of TM4SF19 and different clinical-pathological characteristics of BLCA patients from the TCGA database

表 1. TCGA 数据库中 BLCA 患者 TM4SF19 表达与不同临床病理特征相关性的临床基线信息表

Characteristic	Low expression of TM4SF19	High expression of TM4SF19	p
n	207	207	
T stage, n (%)			0.003
T1	3 (0.8%)	2 (0.5%)	
T2	75 (19.7%)	44 (11.6%)	
T3	83 (21.8%)	113 (29.7%)	
T4	28 (7.4%)	32 (8.4%)	

续表

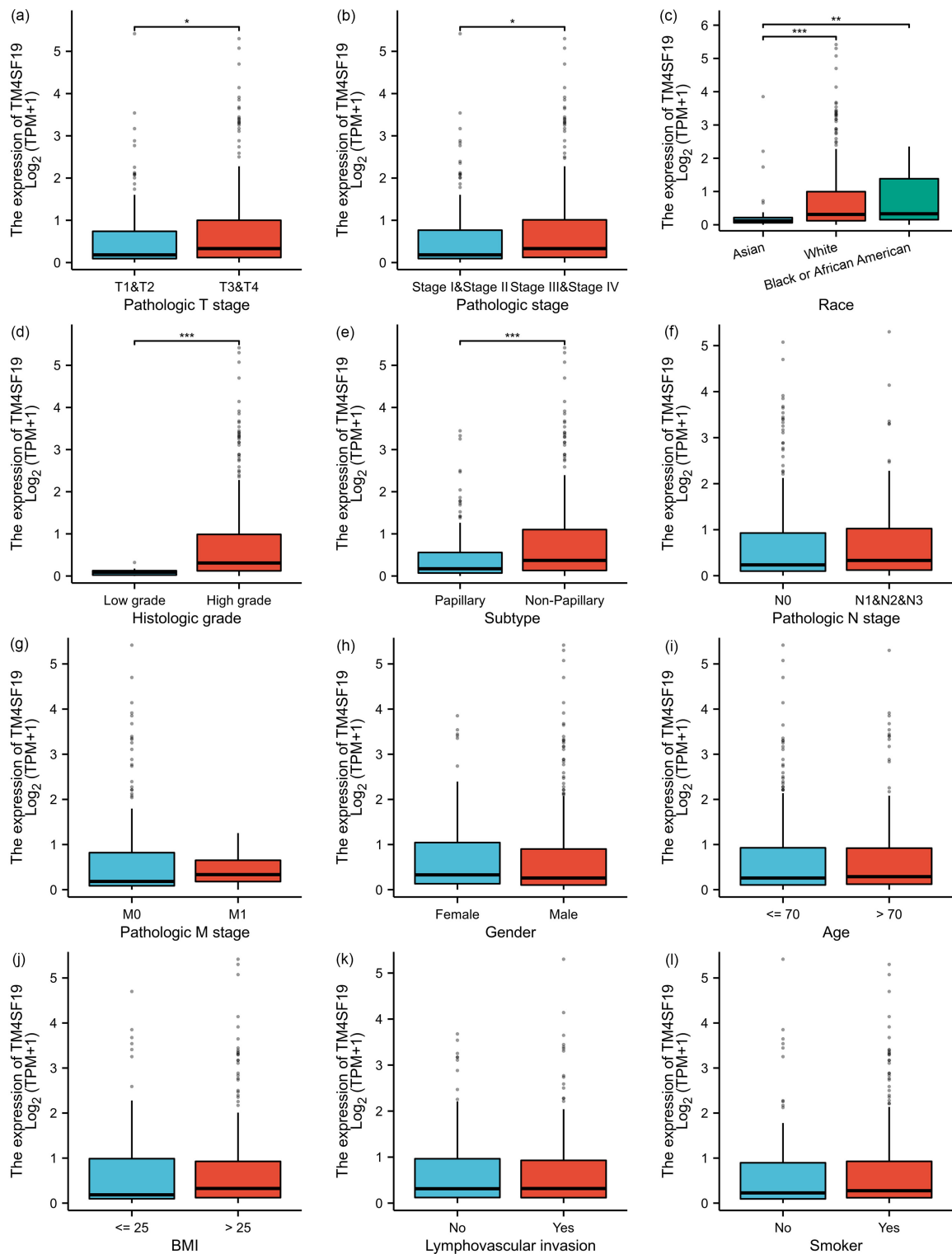
N stage, n (%)			0.103
N0	124 (33.5%)	115 (31.1%)	
N1	19 (5.1%)	27 (7.3%)	
N2	38 (10.3%)	39 (10.5%)	
N3	1 (0.3%)	7 (1.9%)	
M stage, n (%)			0.209
M0	119 (55.9%)	83 (39%)	
M1	4 (1.9%)	7 (3.3%)	
Pathologic stage, n (%)			0.005
Stage I	3 (0.7%)	1 (0.2%)	
Stage II	80 (19.4%)	50 (12.1%)	
Stage III	61 (14.8%)	81 (19.7%)	
Stage IV	61 (14.8%)	75 (18.2%)	
Radiation therapy, n (%)			0.194
No	182 (46.9%)	185 (47.7%)	
Yes	14 (3.6%)	7 (1.8%)	
Primary therapy outcome, n (%)			<0.001
PD	21 (5.9%)	49 (13.7%)	
SD	13 (3.6%)	18 (5%)	
PR	11 (3.1%)	11 (3.1%)	
CR	133 (37.3%)	101 (28.3%)	
Gender, n (%)			0.264
Female	49 (11.8%)	60 (14.5%)	
Male	158 (38.2%)	147 (35.5%)	
Race, n (%)			<0.001
Asian	36 (9.1%)	8 (2%)	
Black or African American	11 (2.8%)	12 (3%)	
White	151 (38%)	179 (45.1%)	
Age, n (%)			0.921
≤70	118 (28.5%)	116 (28%)	
>70	89 (21.5%)	91 (22%)	
Weight, n (%)			0.437
≤80	107 (28.8%)	98 (26.4%)	
>80	79 (21.3%)	87 (23.5%)	

续表

Height, n (%)			0.351
≤170	85 (23.3%)	73 (20%)	
>170	100 (27.4%)	107 (29.3%)	
BMI, n (%)			0.128
≤25	85 (23.4%)	68 (18.7%)	
>25	99 (27.2%)	112 (30.8%)	
Histologic grade, n (%)			<0.001
High Grade	186 (45.3%)	204 (49.6%)	
Low Grade	19 (4.6%)	2 (0.5%)	
Subtype, n (%)			<0.001
Non-Papillary	115 (28.1%)	160 (39.1%)	
Papillary	90 (22%)	44 (10.8%)	
Lymphovascular invasion, n (%)			0.680
No	67 (23.7%)	63 (22.3%)	
Yes	74 (26.1%)	79 (27.9%)	
Smoker, n (%)			0.632
No	57 (14.2%)	52 (13%)	
Yes	143 (35.7%)	149 (37.2%)	
OS event, n (%)			<0.001
Alive	133 (32.1%)	98 (23.7%)	
Dead	74 (17.9%)	109 (26.3%)	
DSS event, n (%)			0.002
Alive	152 (38%)	122 (30.5%)	
Dead	48 (12%)	78 (19.5%)	
PFI event, n (%)			0.007
Alive	131 (31.6%)	103 (24.9%)	
Dead	76 (18.4%)	104 (25.1%)	
Age, median (IQR)	68 (59, 75)	69 (61.5, 76)	0.223

3.6. TM4SF19 与 BLCA 患者预后的关系

TM4SF19 高表达组表现出相对较差的 OS 率(HR = 1.67, $p = 0.001$, 图 6(c))。DSS (HR = 1.84, $p = 0.001$)和 PFI (HR = 1.57, $p = 0.003$)的生存结果表明 TM4SF19 高表达的肿瘤患者预后更差(图 6(d)和图 6(e))。附录图 S1 显示了各个亚组的生存分析结果。TM4SF19 高表达亚组生存率更差。最后,我们对常见的临床病理因素进行了单变量和多变量 Cox 回归(图 6(a)、图 6(b))。TNM 分期、病理分期、年龄、淋巴管侵犯和 TM4SF19 在单变量分析中存在统计学差异。选择具有统计显著性的结果进行进一步研究,从而执行多元 Cox 回归分析。该分析结果显示, T 分期、N 分期、年龄和 TM4SF19 仍具有统计学显著性($p < 0.05$),表明 TM4SF19 表达升高是 BLCA 患者的总生存风险的独立危险因素。



TM4SF19 表达与(a) T 分期、(b) 病理分期、(c) 种族、(d) 组织学分级、(e) 亚型、(f) N 分期、(g) M 分期、(h) 性别、(i) 年龄、(j) BMI、(k) 淋巴血管侵犯和(l) 吸烟者的相关性, $p \geq 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

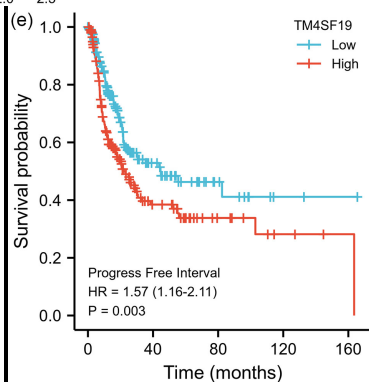
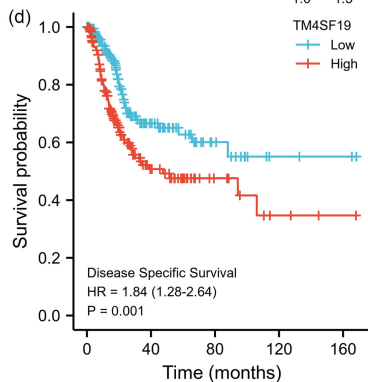
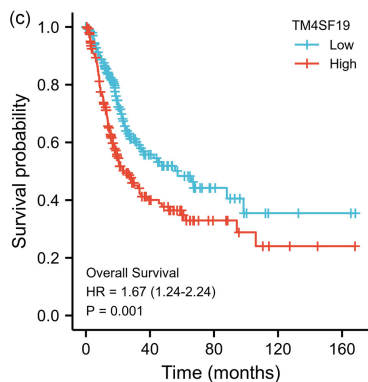
Figure 5. In the TCGA-BLCA database, the relationship between the expression of TM4SF19 and clinicopathological factors
图 5. TCGA-BLCA 数据库中 TM4SF19 的表达与临床病理因素的关系

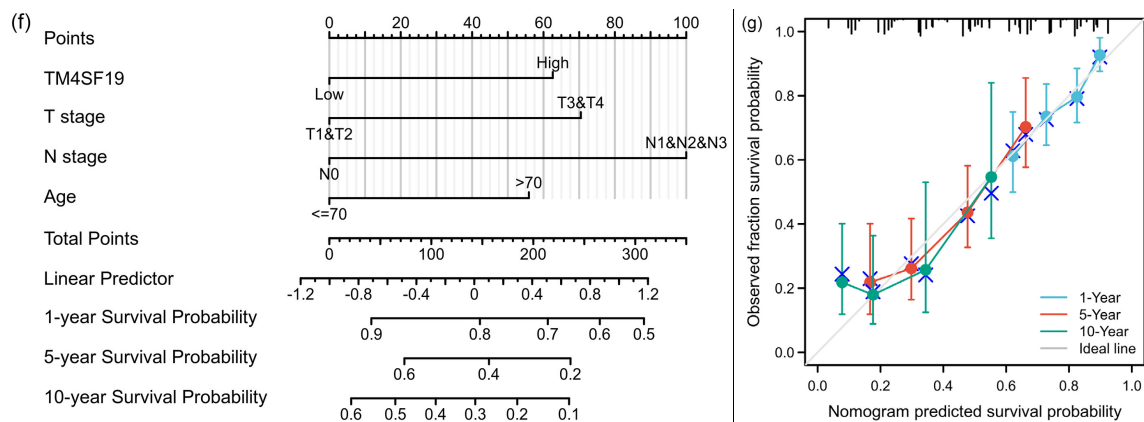
(a)

Characteristics	Total(N)	HR(95% CI)	P value
TM4SF19	413		
Low	207	Reference	
High	206	1.669 (1.241-2.244)	<0.001
T stage	379		
T1&T2	124	Reference	
T3&T4	255	2.199 (1.515-3.193)	<0.001
N stage	369		
N0	239	Reference	
N2&N3&N1	130	2.289 (1.678-3.122)	<0.001
M stage	213		
M0	202	Reference	
M1	11	3.136 (1.503-6.544)	0.002
Pathologic stage	411		
Stage I&Stage II	134	Reference	
Stage III&Stage IV	277	2.310 (1.596-3.342)	<0.001
Age	413		
≤70	233	Reference	
>70	180	1.421 (1.063-1.901)	0.018
BMI	363		
≤25	152	Reference	
>25	211	0.978 (0.706-1.353)	0.892
Radiation therapy	387		
No	366	Reference	
Yes	21	0.965 (0.475-1.964)	0.923
Gender	413		
Female	109	Reference	
Male	304	0.849 (0.616-1.169)	0.316
Primary therapy outcome	357		
CR	234	Reference	
PD&SD&PR	123	5.224 (3.710-7.354)	<0.001
Weight	370		
≤80	204	Reference	
>80	166	0.968 (0.709-1.323)	0.84
Height	364		
≤170	158	Reference	
>170	206	1.100 (0.798-1.518)	0.561
Histologic grade	410		
Low Grade	21	Reference	
High Grade	389	2.972 (0.735-12.008)	0.126
Subtype	408		
Non-Papillary	275	Reference	
Papillary	133	0.690 (0.488-0.976)	0.036
Smoker	400		
No	109	Reference	
Yes	291	1.305 (0.922-1.847)	0.133
Lymphovascular invasion	282		
No	130	Reference	
Yes	152	2.294 (1.580-3.328)	<0.001

(b)

Characteristics	Total(N)	HR(95% CI)	P value
TM4SF19	413		
Low	207		
High	206	1.554 (1.126-2.145)	0.007
T stage	379		
T1&T2	124		
T3&T4	255	1.643 (1.091-2.474)	0.017
N stage	369		
N0	239		
N1&N2&N3	130	2.023 (1.464-2.794)	<0.001
Age	413		
≤70	233		
>70	180	1.483 (1.082-2.032)	0.014





基于(a) 单变量和(b) 多变量 Cox 分析的 OS 森林图 (c)~(e) BLCA 中 TM4SF19-low 和 TM4SF19-high 之间 OS、DSS 和 PFI 的 K-M 分析。(f) 用于预测 1BLCA 的 1 年、5 年和 10 年 OS 生存率。(g) 1 年、5 年和 10 年 OS 生存率列线图的校准曲线。

Figure 6. Prognostic values of TM4SF19 and construction of prognostic nomogram model

图 6. TM4SF19 的预后价值和预后列线图模型的构建

3.7. 基于 TM4SF19 的列线图构建与验证

BLCA 患者的预后列线图是使用多变量 Cox 回归分析得出的。列线图中包含的变量为 T 分期、N 分期、年龄和 TM4SF19。所得列线图显示 C 指数为 0.661 (0.637~0.685)，显示出预测患者预后的准确性(图 6(f))。之后，我们制作了校准图来测试模型的预测准确性。偏差修正线接近理想曲线(45°)，投影值与实际值相符(图 6(g))。

4. 讨论

TM4SF19 是一种新发现的蛋白编码基因，其在肿瘤中的作用及其对肿瘤预后的影响目前尚未有研究报道。本研究通过挖掘分析 TCGA 数据库中的 BLCA 转录本数据，发现 TM4SF19 在 BLCA 中高表达，并进一步通过 GO、KEGG、GSEA 分析 TM4SF19 的功能，以系统了解 TM4SF19 在 BLCA。最终分析显示，TM4SF19 高表达可能是 BLCA 预后不良独立的危险因素。

在 TCGA 泛癌研究中，我们发现大多数癌症中 TM4SF19 的表达高于正常样本，这表明 TM4SF19 是一种可能的促癌分子。另外，在 TCGA-BLCA 数据库中，诊断 ROC 曲线结果显示 $AUC = 0.831$ ，表明 TM4SF19 的表达对 BLCA 的诊断效果具有一定的准确性。这些结果表明 TM4SF19 可能是诊断 BLCA 的有用分子标记。

通过单基因差异分析和单基因相关分析，共鉴定出 62 个与 TM4SF19 功能密切相关的枢纽基因和 30 个相关性最强的基因。其中包括 KRT 系列、CXCL、CCL 等。其中，角蛋白基因家族与 TM4SF19 的表达关系尤为密切。角蛋白(KRT)是上皮细胞的细胞骨架蛋白 39，在癌细胞侵袭和转移中发挥作用，许多 KRT 家族成员是癌症诊断或预后指标[39] [40] [41] [42]。因此，我们推测 TM4SF19 可能通过促进角蛋白相关蛋白和角蛋白的功能来发挥促进 BLCA 的作用。炎症因子，包括 C-C 基序趋化因子配体(CCL)和 C-X-C 基序趋化因子配体(CXCL)，是与 TM4SF19 相关的 HUB 基因。研究表明，炎症可调节癌症的形成和对治疗的反应，从而促进或抑制肿瘤进展并对治疗结果产生相反的影响[43]。针对 CCL 或 CXCL 的治疗可抑制肿瘤侵袭和增殖[35]。这些研究表明 TM4SF19 是膀胱癌患者的潜在治疗靶点。

然后我们对 TM4SF19 及其相关基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析，发现它们与粘着斑、细胞骨

架的结构组成、角化包膜、癌症中的蛋白聚糖、溶酶体、上皮间质转化和炎症反应等相关。细胞迁移历来需要通过粘着斑位点、突出延伸和细胞体收缩来粘附基质[44]。癌症的扩散取决于细胞迁移失调。当粘着斑蛋白被靶向时, 癌细胞对放射、化疗和新的分子疗法非常敏感[45]。GSEA 分析显示, 上皮间质转化和炎症反应信号通路在 TM4SF19 高表达组中出现丰富, 这些通路于肿瘤的生长、转移和侵袭的表型密切相关[46] [47], 提示 TM4SF19 的高表达可以作为预测 BLCA 患者预后的危险因素。

肿瘤微环境(TME)是具有异质性的, 决定着抗肿瘤或肿瘤发生免疫反应[48] [49] [50] [51]。免疫逃逸在初始抗肿瘤免疫阶段保护肿瘤细胞免遭肿瘤消除[52]。我们的研究表明 TM4SF19 与巨噬细胞、Th1 细胞、Th1 细胞、NK CD56dim 细胞、中性粒细胞、aDC、Treg 和 Tgd 呈正相关, 而与 NK CD56bright 细胞和 Msat 细胞呈负相关。实体瘤中的巨噬细胞浸润与大多数恶性肿瘤的不良预后和治疗耐药性有关[53]。因此, 针对 BLCA 靶向巨噬细胞的靶向治疗可以有效抑制 BLCA 的增殖、侵袭和迁移[54]。Th2 细胞对 TME 具有矛盾的作用, TME 通过释放细胞因子与其他免疫细胞一起活跃[55]。先前的研究报告称, Th2 会改变免疫反应以促进肿瘤的发展。例如, Th2 细胞向 Th1 细胞的转化发生在小鼠肺移植肿瘤缓解期间。TME 中 Th2 细胞的主导地位与不良预后相关[56]。此外, 研究还报道, Th2 细胞进行的免疫反应与多种肿瘤的肿瘤进展有关[57] [58] [59]。这也提示 TM4SF19 可能促进 TME 介导的 Th2 细胞型免疫应答介导的免疫逃逸, 促进 BLCA 肿瘤的发生和发展。上述结果提示 TM4SF19 表达增加能够抑制 BLCA 患者的抗肿瘤免疫反应。

最后, 我们研究了 TM4SF19 和 BLCA 患者之间临床病理因素的相关性, 并构建了列线图作为临床医生的预后工具。BLCA 中 TM4SF19 的高表达与较差的临床病理特征相关, 包括亚型、组织学分期等。在生存分析中, 与 TM4SF19 低表达的患者相比, TM4SF19 高表达的患者 OS、PFI 和 DSS 显著缩短。在多个亚组中, TM4SF19 的高表达也与不良预后相关。通过校准图分析了列线图的准确性, 显示 1 年、5 年和 10 年的实际 OS 值与预测 OS 值之间具有良好的一致性。因此, 我们的列线图可能是未来临床医生一种有价值的新预后方法。

总之, 我们的研究结果揭示了 TM4SF19 和 BLCA 之间的关系, 但存在一些局限性。首先, 本研究中用作对照的正常样本和肿瘤样本的数量存在较大差异, 因此需要进行额外的研究来填补样本量的空白。此外, 这些发现缺乏实验验证, 未来还需要更多的实验来进一步验证 TM4SF19 在 BLCA 患者中的作用机制。

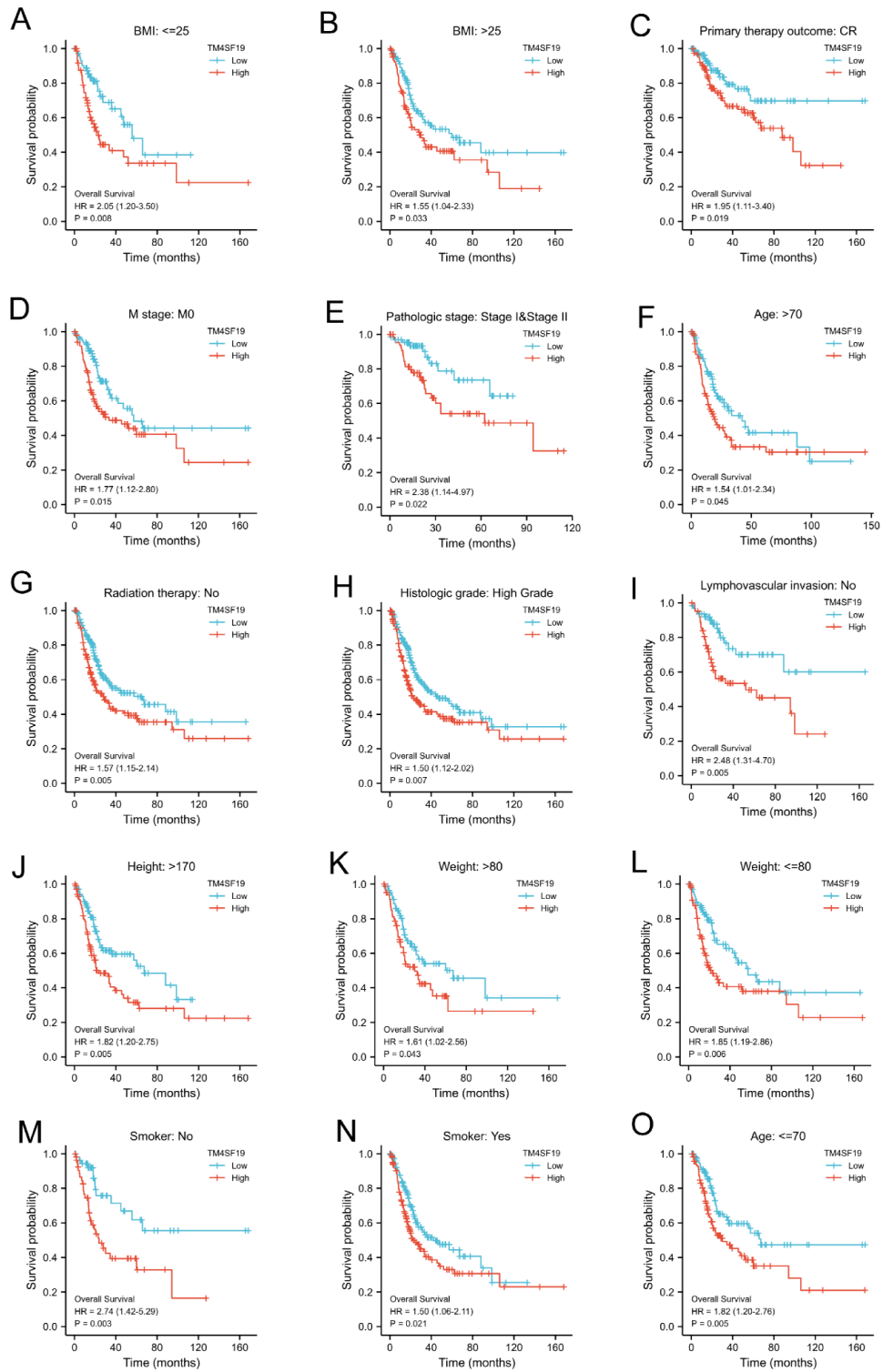
参考文献

- [1] Sung, H., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Martinez Rodriguez, R.H., Buisan Rueda, O. and Ibarz, L. (2017) Bladder Cancer: Present and Future. *Medicina Clínica (Barc)*, **149**, 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2017.10.005>
- [3] Hurst, C.D., *et al.* (2017) Genomic Subtypes of Non-Invasive Bladder Cancer with Distinct Metabolic Profile and Female Gender Bias in KDM6A Mutation Frequency. *Cancer Cell*, **32**, 701-715.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.005>
- [4] Smolensky, D., Rathore, K. and Cekanova, M. (2016) Molecular Targets in Urothelial Cancer: Detection, Treatment, and Animal Models of Bladder Cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, 3305-3322. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S112113>
- [5] Kojima, T., *et al.* (2017) Biomarkers for Precision Medicine in Bladder Cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, **22**, 207-213. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-1068-8>
- [6] Lin, T.Y., *et al.* (2016) Novel Theranostic Nanoporphyrins for Photodynamic Diagnosis and Trimodal Therapy for Bladder Cancer. *Biomaterials*, **104**, 339-351. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.026>
- [7] Zhou, J., *et al.* (2022) An Oncogenic JMJD6-DGAT1 Axis Tunes the Epigenetic Regulation of Lipid Droplet Formation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Molecular Cell*, **82**, 3030-3044.E8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.06.003>
- [8] Wright, M.D., Ni, J. and Rudy, G.B. (2000) The L6 Membrane Proteins—A New Four-Transmembrane Superfamily.

- Protein Science*, **9**, 1594-1600. <https://doi.org/10.1110/ps.9.8.1594>
- [9] Tang, Q., *et al.* (2020) TM4SF1 Promotes EMT and Cancer Stemness via the Wnt/beta-Catenin/SOX2 Pathway in Colorectal Cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **39**, Article No. 232. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01690-z>
 - [10] Rahim, N.S., *et al.* (2023) Three Members of Transmembrane-4-Superfamily, TM4SF1, TM4SF4, and TM4SF5, as Emerging Anticancer Molecular Targets against Cancer Phenotypes and Chemoresistance. *Pharmaceuticals (Basel)*, **16**, Article 110. <https://doi.org/10.3390/ph16010110>
 - [11] Jung, J.W., *et al.* (2020) Amino Acid Transporters as Tetraspanin TM4SF5 Binding Partners. *Experimental & Molecular Medicine*, **52**, 7-14. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0363-7>
 - [12] Hou, S., *et al.* (2022) TM4SF1 Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Metastasis by Interacting with Integrin $\alpha 6$. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 609. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05067-2>
 - [13] Huang, Y.K., Fan, X.G. and Qiu, F. (2016) TM4SF1 Promotes Proliferation, Invasion, and Metastasis in Human Liver Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, Article 661. <https://doi.org/10.3390/ijms17050661>
 - [14] Gao, C., *et al.* (2019) TM4SF1 Is a Potential Target for Anti-Invasion and Metastasis in Ovarian Cancer. *BMC Cancer*, **19**, Article No. 237. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5417-7>
 - [15] Jung, K., *et al.* (2021) TM4SF4 and LRRK2 Are Potential Therapeutic Targets in Lung and Breast Cancers through Outlier Analysis. *Cancer Research and Treatment*, **53**, 9-24. <https://doi.org/10.4143/crt.2020.434>
 - [16] Zhang, F., *et al.* (2022) TYMS-TM4SF4 Axis Promotes the Progression of Colorectal Cancer by EMT and Upregulating Stem Cell Marker. *American Journal of Cancer Research*, **12**, 1009-1026.
 - [17] Jung, O., *et al.* (2012) Tetraspan TM4SF5-Dependent Direct Activation of FAK and Metastatic Potential of Hepatocarcinoma Cells. *Journal of Cell Science*, **125**, 5960-5973. <https://doi.org/10.1242/jcs.100586>
 - [18] Lee, S.A., *et al.* (2008) Tetraspanin TM4SF5 Mediates Loss of Contact Inhibition through Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Hepatocarcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, **118**, 1354-1366. <https://doi.org/10.1172/JCI33768>
 - [19] Qin, X., *et al.* (2022) Immune-Related Gene TM4SF18 Could Promote the Metastasis of Gastric Cancer Cells and Predict the Prognosis of Gastric Cancer Patients. *Molecular Oncology*, **16**, 4043-4059. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13321>
 - [20] Singhal, M., *et al.* (2019) TM4SF18 Is Aberrantly Expressed in Pancreatic Cancer and Regulates Cell Growth. *PLOS ONE*, **14**, e0211711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211711>
 - [21] Luo, M., *et al.* (2022) TM4SF19-AS1 Facilitates the Proliferation of Lung Squamous Cell Carcinoma by Recruiting WDR5 to Mediate TM4SF19. *Molecular and Cellular Probes*, **65**, Article 101849. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2022.101849>
 - [22] 张蕊. 基于生物信息学分析 TM4SF19 在肺鳞状细胞癌中的表达及意义[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 中国医科大学, 2023.
 - [23] 俞思薇, 王红霞. 四次跨膜蛋白超家族成员与肿瘤的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(4): 672-681.
 - [24] 王坤. TM4SF1 在甲状腺乳头状癌淋巴结转移中的作用及机制研究[D]: [博士学位论文]. 济南: 山东大学, 2023.
 - [25] 李昆, 等. 乳腺癌患者血清 CEACAM1、TM4SF1 水平变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2022, 62(16): 14-18.
 - [26] 李昌安, 等. TM4SF1 水平与胃癌病理特征的相关性[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(10): 1614-1616+1643.
 - [27] 霍宏志, 梁金, 柴尔青. TM4SF1 与脑胶质瘤病理分级及预后的相关性[J]. 中国临床神经外科杂志, 2022, 27(6): 447-451.
 - [28] 胡效林, 等. SLC1A5 协同 TM4SF1 通过 mTOR 信号通路调控食管鳞癌细胞迁移[J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(14): 33-39+45.
 - [29] 盖欣欣, 等. TM4SF1 对结直肠癌细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2023, 44(3): 1-4+13.
 - [30] Vivian, J., *et al.* (2017) Toil Enables Reproducible, Open Source, Big Biomedical Data Analyses. *Nature Biotechnology*, **35**, 314-316. <https://doi.org/10.1038/nbt.3772>
 - [31] Ritchie, M.E., *et al.* (2015) *limma* Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Research*, **43**, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
 - [32] Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biology*, **15**, Article No. 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
 - [33] Yu, G., *et al.* (2012) clusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene Clusters. *OMICS*, **16**, 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
 - [34] Subramanian, A., *et al.* (2005) Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Ge-

- nome-Wide Expression Profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 15545-15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- [35] Hänzelmann, S., Castelo, R. and Guinney, J. (2013) GSVA: Gene Set Variation Analysis for Microarray and RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics*, **14**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>
- [36] Bindea, G., *et al.* (2013) Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity*, **39**, 782-795. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.003>
- [37] Gu, Z., *et al.* (2014) *circlize* Implements and Enhances Circular Visualization in R. *Bioinformatics*, **30**, 2811-2812. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu393>
- [38] Liu, J., *et al.* (2018) An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell*, **173**, 400-416.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.052>
- [39] Takan, I., *et al.* (2023) "In the Light of Evolution": Keratins as Exceptional Tumor Biomarkers. *PeerJ*, **11**, e15099. <https://doi.org/10.7717/peerj.15099>
- [40] Karsch, S., *et al.* (2020) An Intact Keratin Network Is Crucial for Mechanical Integrity and Barrier Function in Keratinocyte Cell Sheets. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **77**, 4397-4411. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03424-7>
- [41] Zhang, N., *et al.* (2017) Keratin 23 Promotes Telomerase Reverse Transcriptase Expression and Human Colorectal Cancer Growth. *Cell Death & Disease*, **8**, e2961. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.339>
- [42] Bilandzic, M., *et al.* (2019) Keratin-14 (KRT14) Positive Leader Cells Mediate Mesothelial Clearance and Invasion by Ovarian Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, **11**, Article 1228. <https://doi.org/10.3390/cancers11091228>
- [43] Zhao, H., *et al.* (2021) Inflammation and Tumor Progression: Signaling Pathways and Targeted Intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **6**, Article No. 263. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>
- [44] Paluch, E.K., Aspalter, I.M. and Sixt, M. (2016) Focal Adhesion-Independent Cell Migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **32**, 469-490. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125341>
- [45] Eke, I. and Cordes, N. (2015) Focal Adhesion Signaling and Therapy Resistance in Cancer. *Seminars in Cancer Biology*, **31**, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.07.009>
- [46] Banyard, J. and Bielenberg, D.R. (2015) The Role of EMT and MET in Cancer Dissemination. *Connective Tissue Research*, **56**, 403-413. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1060970>
- [47] Castaño, Z., *et al.* (2018) IL-1 β Inflammatory Response Driven by Primary Breast Cancer Prevents Metastasis-Initiating Cell Colonization. *Nature Cell Biology*, **20**, 1084-1097. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0173-5>
- [48] 范彦鹏. 基于单细胞 RNA 测序分析膀胱癌组织肿瘤微环境的转录异质性[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [49] 叶峻江, 等. 肿瘤相关成纤维细胞在膀胱癌发生发展中的研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志, 2023, 38(10): 796-802.
- [50] 张建军, 等. 膀胱肿瘤微环境细胞亚群分布及与复发的关系[J]. 临床医药实践, 2023, 32(8): 570-573.
- [51] 张庆磊, 等. 肿瘤微环境中 CD4+T 细胞浸润、MFAP5 与膀胱癌患者预后关系的临床研究[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(8): 1719-1723.
- [52] Schreiber, R.D., Old, L.J. and Smyth, M.J. (2011) Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, **331**, 1565-1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- [53] Cassetta, L. and Pollard, J.W. (2018) Targeting Macrophages: Therapeutic Approaches in Cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, **17**, 887-904. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.169>
- [54] DeNardo, D.G. and Ruffell, B. (2019) Macrophages as Regulators of Tumour Immunity and Immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, **19**, 369-382. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0127-6>
- [55] Lorvik, K.B., *et al.* (2016) Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an *in Situ* Inflammatory Immune Response. *Cancer Research*, **76**, 6864-6876. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1219>
- [56] Dai, M., *et al.* (2018) Tumor Regression and Cure Depends on Sustained Th1 Responses. *Journal of Immunotherapy*, **41**, 369-378. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000231>
- [57] DeNardo, D.G., *et al.* (2009) CD4(+) T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell*, **16**, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.018>
- [58] Espinoza, J.A., *et al.* (2016) Cytokine Profiling of Tumor Interstitial Fluid of the Breast and Its Relationship with Lymphocyte Infiltration and Clinicopathological Characteristics. *Oncoimmunology*, **5**, e1248015. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1248015>
- [59] Feng, Q., *et al.* (2012) Th2 Type Inflammation Promotes the Gradual Progression of HPV-Infected Cervical Cells to Cervical Carcinoma. *Gynecologic Oncology*, **127**, 412-419.

附录



(a)~(o) BLCATM4SF19-低和 TM4SF19-高之间临床病理亚组的 OS 的 K-M 分析。

Figure S1. Prognostic values of TM4SF19 expression in BLCA patients
图 S1. BLCA 患者中 TM4SF19 表达的预后价值