DOI:10.16016/j.2097-0927.202205078

CPT1A、CPT2 表达水平在肾透明细胞癌预后评估中的价值

黄义强[1], 彭 松[1], 唐 朋[1], 汪 泽[1],徐 静[1],马 强[2],钟 鹏[2],张 军[1],刘秋礼[1], 江 军[1] 400042
重庆,陆军特色医学中心:泌尿外科[1],病理科[2]

[**摘要**] **目的** 探索脂肪酸降解相关基因肉碱棕榈酰转移酶 IA(carnitine Palmitoyltransferase 1A,CPT1A)和肉碱棕榈酰转移酶Ⅱ(carnitine Palmitoyltransferase 2,CPT2)在肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma,ccRCC)的表达及意义。**方法** 生物信息学分析癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)、纪念斯隆·凯特琳癌症中心(Memorial Sloan Kettering Cancer Center,MSKCC)的 ccRCC 数据中脂肪酸降解相关基因及代谢物。采用免疫组化染色和 Western blot 分析脂肪酸降解关键基因 CPT1A、CPT2 蛋白表达水平。构建 ccRCC 组织芯片($n=103$),通过 CPT1A、CPT2 免疫组化染色评分分析二者表达和预后的关系。构建并初步评价预后预测模型。**结果** 生物信息学分析结果显示,CPT1A、CPT2 是参与棕榈酰肉碱代谢、脂肪酸氧化及肾癌进展的关键基因。组织芯片和 TCGA 队列的结果显示:(1)ccRCC 中 CPT1A 和 CPT2 的表达水平均较正常肾组织降低($P<0.05$);(2)免疫组化评分显示 CPT1A、CPT2 的表达与病理分级($r=-0.243$,$P=0.013$;$r=-0.391$,$P<0.01$)和 TNM 分期($r=-0.363$,$P<0.01$;$r=-0.430$,$P<0.01$)负相关;(3)CPT1A、CPT2 低表达与较低的无疾病生存率相关($P<0.01$)。Cox 回归分析结果显示,CPT2 表达水平是 ccRCC 独立预后因素($P<0.01$)。TNM-CPT1A、TNM-CPT2 预后模型能显著提高 TNM 分期对预后的预测能力。**结论** 与高表达患者相比,CPT1A、CPT2 低表达预示 ccRCC 患者预后不良。

[**关键词**] 肾透明细胞癌;脂质代谢重编程;CPT1A; CPT2; 预后
[**中图法分类号**] R730.43; R730.7; R737.11 [**文献标志码**] A

Predictive value of CPT1A and CPT2 expression levels in prognosis of clear cell renal cell carcinoma

HUANG Yiqiang[1], PENG Song[1], TANG Peng[1], WANG Ze[1], XU Jing[1], MA Qiang[2], ZHONG Peng[2], ZHANG Jun[1], LIU Qiuli[1], JIANG Jun[1] [1]Department of Urology, [2]Department of Pathology, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the expressions of fatty acid degradation related genes carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) and carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their prognostic significance. **Methods** The genes involved in fatty acid degradation and their related metabolites in the ccRCC datasets from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) were analyzed by bioinformatic tools. Clinical data of renal carcinoma patients admitted to our hospital from 2007 to 2016 were collected. Immunohistochemical (IHC) staining and Western blotting were performed to detect the levels of CPT1A and CPT2, key genes of fatty acid degradation. The tissue chips of ccRCC were prepared ($n=103$), and IHC scores of CPT1A and CPT2 were used to estimate the relationship between their expression and prognosis of patients. Subsequently, the prognostic models were constructed and preliminarily evaluated. **Results** Bioinformatics analysis revealed that CPT1A and CPT2 were key genes involved in palmitylcarnitine metabolism, fatty acid oxidation and renal carcinoma progression. The results of tissue microarray and TCGA cohort showed that ①The expression levels of both CPT1A and CPT2 in ccRCC were lower than those in normal renal tissues ($P<0.05$); ②IHC scores

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81972398,82172807)
[**通信作者**] 江 军,E-mail: jiangjun_64@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

indicated that the expression levels of CPT1A and CPT2 were negatively correlated with pathological grade ($r=-0.243$, $P=0.013$; $r=-0.391$, $P<0.01$) as well as with TNM stage ($r=-0.363$, $P<0.01$; $r=-0.430$, $P<0.01$); ③Reduced levels of CPT1A and CPT2 were associated with declined disease-free survival ($P<0.01$). Moreover, Cox regression analysis showed that CPT2 expression level was an independent prognostic factor for ccRCC patients ($P<0.01$). Finally, TNM-CPT1A and TNM-CPT2 models significantly improved the ability of TNM stage alone to predict ccRCC prognosis. **Conclusion** Compared with patients with high expression, low expression of CPT1A and CPT2 predicted poor prognosis in patients with ccRCC.

[**Key words**] clear cell renal cell carcinoma; lipid metabolism reprogramming; carnitine palmitoyltransferase 1A; carnitine palmitoyltransferase 2; prognosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81972398, 82172807). Corresponding author: JIANG Jun, E-mail: jiangjun_64@163.com

肾癌(renal cell carcinoma,RCC)是泌尿系统主要的恶性肿瘤之一。在美国,每年约有 65 000 例新诊断 RCC 和约 15 000 例 RCC 相关的死亡[1];在中国,RCC 是排名第二位的泌尿生殖系统恶性肿瘤,2015 年新增 66 800 例,死亡则达到 23 400 例[2]。肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma,ccRCC)是 RCC 最常见的亚型(75%~80%),具有较高的侵袭性和转移性。手术是局限性或局部进展性 ccRCC 的一线治疗方法,术后 5 年生存率约为 70%,其中约 30%病例会在 3~5 年内发生转移,转移性 ccRCC 的 5 年生存率不到 20%。目前,病理分级、TNM 分期和体能评分是 ccRCC 临床上最常用的预后预测指标。但基于这些指标的预后结果往往并不一致,部分原因是肿瘤的高度异质性[3]。

据报道,近 90% ccRCC 携带 VHL(von hippel-lindau tumor suppressor)基因突变,由此导致缺氧诱导因子(hypoxia inducible factors,HIFs)降解减少并形成假性缺氧微环境,最终发生广泛的代谢重编程[4]。脂质代谢重编程是 ccRCC 细胞的代谢特点之一,包括了脂质摄入、运输、从头脂肪合成、脂滴积累和脂肪酸氧化等方面的广泛变化[5]。肉碱穿梭系统是脂肪酸氧化过程的重要组成部分,在正常细胞和癌细胞脂肪酸代谢的精细调节中均起着重要作用[6]。肉碱棕榈酰转移酶 IA(carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A)和肉碱棕榈酰转移酶Ⅱ(carnitine palmitoyltransferase 2,CPT2)分别位于线粒体外膜和内膜上,是长链脂肪酸转运至线粒体进行 β 氧化的限速酶[7]。最近研究表明,脂肪酸氧化除了有助于癌细胞增殖外,还在抗血管生成药物的耐药方面发挥着重要作用[8],但脂肪酸降解在 ccRCC 脂质沉积中的作用、CPT1A 和 CPT2 表达水平及其意义尚不完全清楚。

本研究旨在探索脂肪酸降解相关基因及代谢产物在正常肾组织及不同分期 ccRCC 的变化,通过生物信息学分析寻找 ccRCC 脂质沉积的关键分子,采用免疫组化染色、Western blot 实验等验证脂肪酸降解关键分子的表达情况,分析其与患者预后的关系,为 ccRCC 寻找新的预后标志物及治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 生物信息学分析

本研究使用 TCGA 中 ccRCC 转录组学数据和 MSKCC 中 ccRCC 代谢组学数据,通过 Metabologram[9] 分析脂肪酸降解相关基因在正常肾组织、ccRCC 组织以及较早(Ⅰ/Ⅱ)、较晚(Ⅲ/Ⅳ)分期 ccRCC 中基因表达、代谢物丰度的差异。通过 R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (http://r2.amc.nl) 及 UALCAN(http://ualcan.path.uab.edu/index.html)等网页工具分析脂肪酸降解通路(参考 KEGG)和肉碱穿梭系统中基因(CPT1A,CPT2)在正常肾组织及不同病理、临床分期 ccRCC 的表达[10]。使用 Reactome 数据库(https://reactome.org)分析棕榈酰肉碱相关的代谢酶(CPT1A、CPT2、CACT、CrAT)。脂肪酸氧化相关 19 个基因(ACAA1 CPT1A, ACADM, GCDH, ACADS, ACAT2, ECI2, ACAT1, ACADSB, CYP4A11, ACADVL, ADH1A, CPT2, HADHB, ADH1B, ALDH9A1, ACSL5, ADH4, ADLH3A2)参考 AIDERUS 等[11]定义的基因标签。

1.2 临床资料

本研究队列纳入本院 2007-2016 年肾癌患者,共 154 例,患者基本临床信息见表 1。肿瘤病理分级采用 2016 WHO/ISUP 病理分级系统,临床分期则采用了第 8 版 TNM 分期系统。石蜡包埋癌组织样本来自病理科,并成功构建了组织芯片[12]。154 例样本中,26 例因石蜡样本不合格而被排除,22 例因芯片打孔取材较少,难以染色和评分而被排除。患者在手术前均未接受任何治疗,3 名患者在术后因接受舒尼替尼治疗而被排除,最终 103 名患者的临床资料被纳入分析。患者年龄范围 21~79 岁,平均 55.6 岁,随访时间范围为 2~114 个月,中位随访时间为 52 个月(Q1=26,Q3=70)。至随访结束时,33 例患者出现局部复发(2 例)或远处转移(31 例),死亡 31 例(26 例肾癌相关死亡)。本研究经陆军特色医学中心伦理委员会批准[医研伦审(2018)第 26 号]。

表 1 肾透明细胞癌患者临床资料及 CPT1A、CPT2 的表达情况(n=103)

临床指标	例数(%)	CPT1A		P	CPT2		P
		低表达	高表达		低表达	高表达	
性别							
男	59(57.28)	40	19		25	24	
女	44(42.72)	23	21	0.082	20	24	0.371
年龄/岁							
<55	62(60.19)	39	23		33	29	
≥55	41(39.81)	29	12	0.372	22	19	0.481
病理分级							
Ⅰ	15(14.71)	6	9		5	10	
Ⅱ	43(41.18)	23	20		17	26	
Ⅲ	32(31.37)	27	5		23	9	
Ⅳ	13(12.75)	9	4	0.009	10	3	0.004
T 分期							
pT1	63(61.1)	33	30		30	33	
pT2	16(15.5)	11	5		9	7	
pT3	16(15.5)	11	5		12	4	
pT4	2(1.9)	2	0	0.224	1	1	0.137
N 分期							
pN0	94(91.26)	58	36		50	44	
pN1	9(8.74)	5	4	0.688	5	4	0.892
M 分期							
M0	84(81.37)	46	38		37	47	
M1	19(18.63)	16	3	0.015	18	1	<0.001
TNM 分期							
Ⅰ	53(51.46)	27	26		21	32	
Ⅱ	17(16.50)	11	6		7	10	
Ⅲ	11(10.68)	5	6		6	5	
Ⅳ	22(21.36)	19	3	0.025	21	1	<0.001

1.3 材料与试剂

正常肾组织及 ccRCC 组织来源于 2019 年 6-9 月收集的临床样本(经病理证实为正常肾组织及 ccRCC)。临床样本离体后立即置入液氮冷冻后转入-80 ℃冰箱保存备用。鼠抗人单抗 CPT1A(ab128568)和兔抗人单抗 CPT2 (ab181114)均购自英国 Abcam 公司,鼠和兔 IgG 二抗均购自 Proteintech 公司。RIPA 裂解液购自 Thermo Fisher 公司,SDS-PAGE 胶试剂盒购自北京鼎国昌盛生物公司,ECL 发光液购自美国 Advansta 公司,PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司。

1.4 Western blot 实验

10 对新鲜冰冻的 ccRCC 及正常肾组织,在含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液中匀浆。组织裂解物在 10%聚丙烯酰胺凝胶上分离,凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上。CPT1A(1∶3 000 稀释)和 CPT2(1∶3 000 稀释)的一抗以及抗小鼠或抗兔 IgG 二抗用于蛋白检测。

1.5 免疫组化染色及评分

CPT1A(1∶1 000)和 CPT2(1∶200)一抗在 4 ℃的加湿室中孵育过夜。然后在 37 ℃下应用生物素化的抗小鼠 IgG/抗兔 IgG 二抗孵育 30 min。二氨基联苯胺分别显色 5 s 和 10 s,最后苏木精复染。2 名病理专家独立对组织芯片免疫组化染色进行评分。评分公式如下:染色强度×阳性细胞率。染色强度从 0~3 分(0,无染色;1,轻微染色;2,中等染色;3,强染色)。阳性细胞率标准如下:①染色细胞数<1/3 为 1 分;②1/3≤染色细胞数<2/3 为 2 分;③染色细胞数≥2/3 为 3 分。CPT1A 和 CPT2 的评分中位数均等于 2,因此将得分 2 用作高低表达分界值,≤2 被认为是低表达,>2 被认为是高表达。

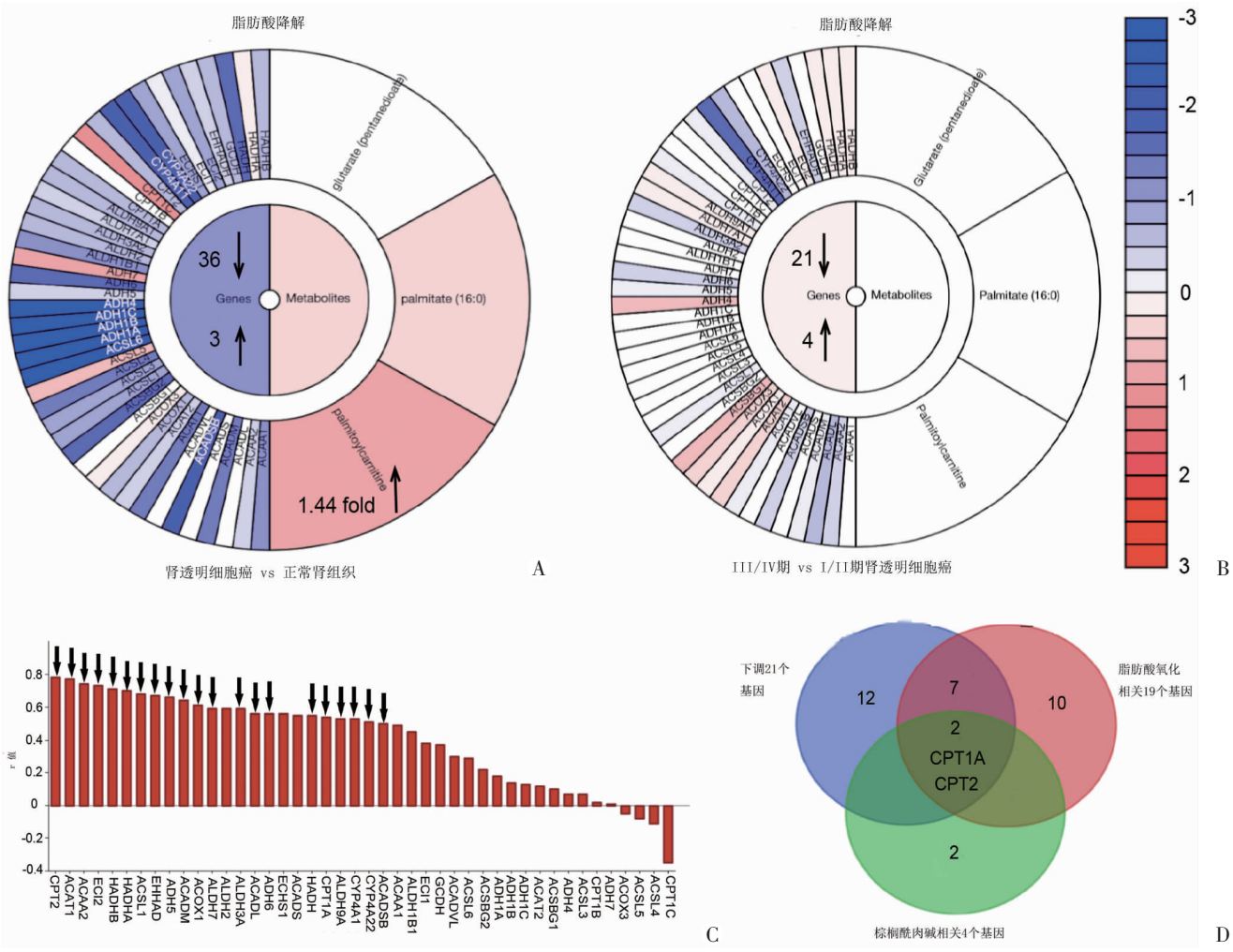
1.6 统计学分析

免疫组化评分分析中采用 Pearson 卡方检验和 Spearman 相关性检验分析蛋白表达差异及与临床资料之间的关系。生存分析通过 R 软件“survival”包完成。采用 Cox 风险回归模型进行单因素和多因素分析,并通过受试者工作曲线(ROC)分析预测 5 年无疾病生存率的敏感性和特异性,曲线下面积(AUC)用于衡量预测准确性。R 软件“pROC”用于绘制 ROC 曲线。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ccRCC 中的脂质沉积是肉碱棕榈酰转移酶介导的脂肪酸氧化减少的结果

代谢图(Metabologram)中显示,与癌旁正常组织相比,44 个脂肪酸降解相关基因中有 36 个基因表达下调,3 个基因表达上调,其余 5 个基因在 ccRCC 组织中变化不明显,脂肪酸降解基因在 ccRCC 低表达;代谢物棕榈酰肉碱丰度升高(图 1A)。因此,下调的脂肪酸降解通路可能在 ccRCC 中发挥重要作用。比较临床早期(Ⅰ/Ⅱ期)和晚期(Ⅲ/Ⅳ期)ccRCC 中 44 个脂肪酸降解相关基因的变化,发现大约一半(21/44)基因在晚期 ccRCC 表达下调,4 个基因上调,19 个基因表达几乎没有变化(图 1B、C)。这些结果表明脂肪酸降解减少可能是 ccRCC 进展过程中细胞中脂肪过度沉积的原因,并且与肿瘤更高的临床分期相关。进一步分析发现,CPT1A 和 CPT2 是脂肪酸氧化、棕榈酰肉碱代谢及 ccRCC 临床进展的关键基因(图 1D)。

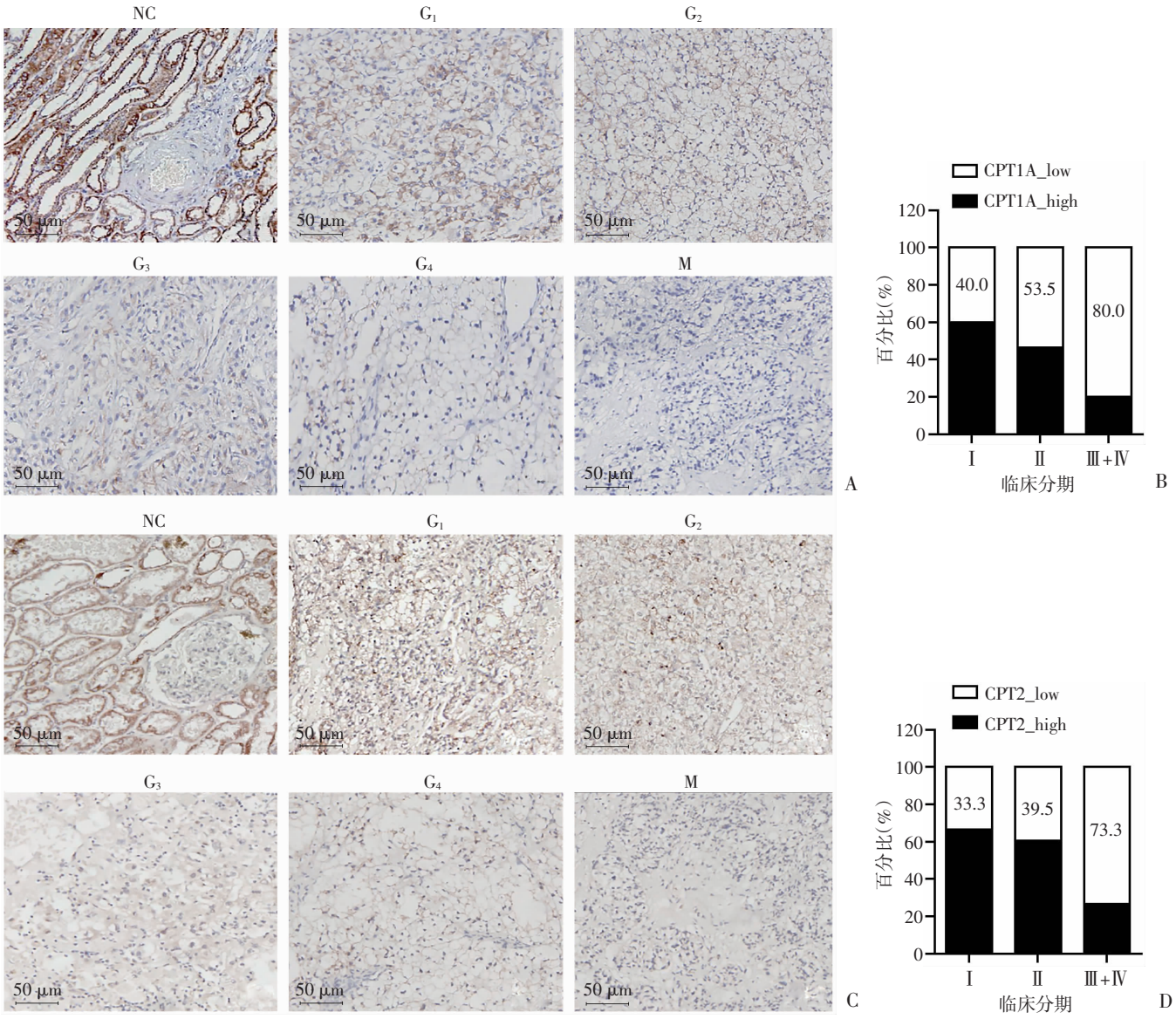


A:脂肪酸降解相关基因及代谢物在 ccRCC 的变化情况;B:脂肪酸降解相关基因及代谢物在临床Ⅲ/Ⅳ期 ccRCC 的变化情况;C:表达下调的脂肪酸降解基因及其通路贡献指数;D:CPT1A、CPT2 是 ccRCC 脂肪酸降解关键基因

图 1 肾透明细胞癌中脂肪酸降解减少

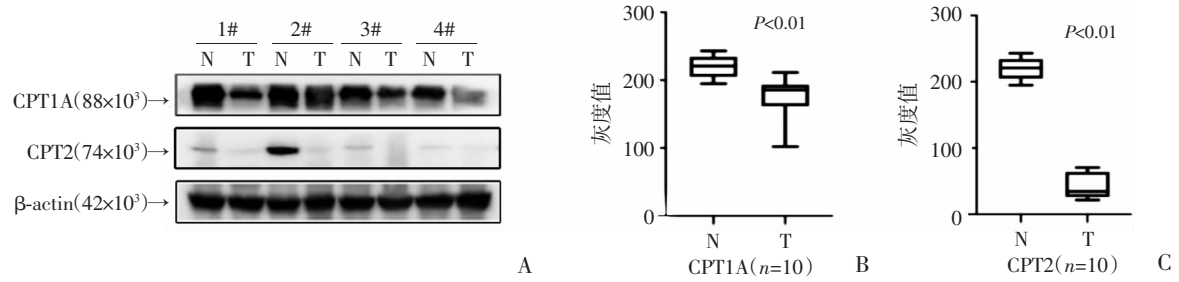
2.2 ccRCC 中 CPT1A、CPT2 表达水平与临床分期、病理分级呈负相关

为进一步验证 CPT1A、CPT2 在 ccRCC 的表达情况,我们使用 ccRCC 组织芯片对 CPT1A 和 CPT2 进行免疫组化染色和评分,结果表明 CPT1A 和 CPT2 在 ccRCC 组织中表达下调($P<0.05$,图 2)。Western blot 实验结果同样显示与正常肾组织相比,CPT1A、CPT2 在 ccRCC 肿瘤组织中表达下调($P<0.01$,图 3)。进一步分析发现,CPT1A 和 CPT2 的表达水平与病理分级($r=-0.243$,$P=0.013$;$r=-0.391$,$P<0.01$)和 TNM 分期($r=-0.363$,$P<0.01$;$r=-0.430$,$P<0.01$)呈负相关(表 1)。分析 TCGA 转录组学数据还发现,CPT1A、CPT2 在 ccRCC 中表达下调,其表达水平与病理分级、TNM 分期、局部淋巴结和远处转移相关。这些数据共同表明,ccRCC 中 CPT1A、CPT2 的表达水平与 TNM 分期和恶性程度呈负相关。



A:CPT1A 在正常肾组织及不同病理分级 ccRCC 中的表达情况;B:不同病理分级样本中 CPT1A 表达高/低的比例;C:CPT2 在正常肾组织及不同病理分级 ccRCC 中的表达情况;D:不同病理分级样本中 CPT2 表达高/低的比例

图 2 CPT1A、CPT2 在肾透明细胞癌的表达及与病理分级的关系



A: CPT1A、CPT2 蛋白免疫印迹;B:CPT1A 灰度分析;C:CPT2 灰度分析

图 3 CPT1A、CPT2 在肾透明细胞癌表达下调

2.3 CPT1A、CPT2 表达降低与肾透明细胞癌不良预后相关

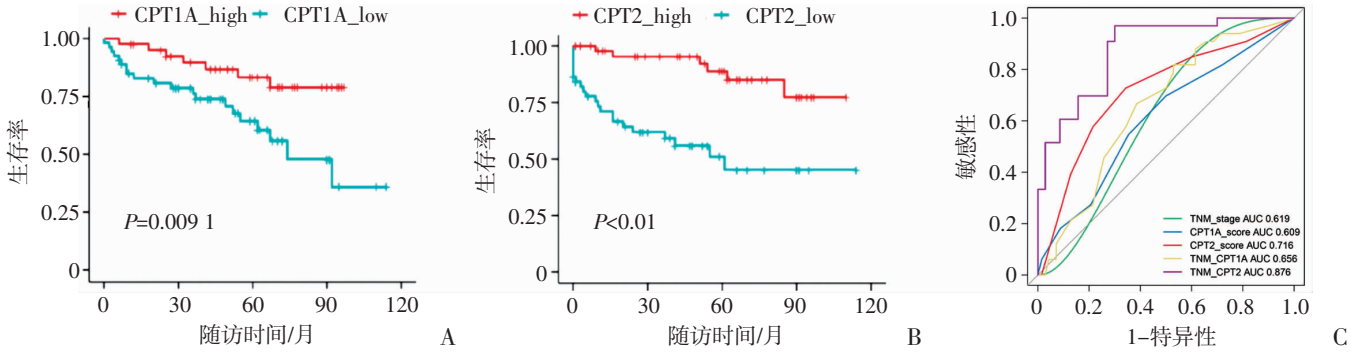
为进一步分析 CPT1A、CPT2 表达在 ccRCC 的意义,进行生存分析,结果表明 CPT1A 和 CPT2 低表达患者无疾病生存率较高表达患者明显更低(图 4A、B)。为了研究 CPT1A、CPT2 表达水平是否可以作为无疾病生存率的独立预后预测因素,进行 Cox 回归分析。单因素 Cox 回归分析显示,CPT1A、CPT2 表达水平降低与较低的无疾病生存率显著相关($P<0.05$,$P<0.01$)。对性别、年龄、病理分级、CPT1A 和 CPT2 的表达水平、TNM 分期进行多因素 Cox 回归分析,结果显示 CTP2 是 ccRCC 无疾病生存率独立预后预测因素(表 2)。

2.4 CPT1A、CPT2 与 TNM 分期联合预后预测模型的建立

单因素 Cox 回归分析显示,病理分级、坏死、TNM 分期、CPT1A、CPT2 表达水平均与无疾病生存率相关;多因素 Cox 回归分析显示 TNM 分期、CPT2 表达与 ccRCC 预后相关,是独立的预后预测因子(表 2)。基于此,构建预后风险函数 $H=\alpha X_1+\beta X_2$(X_1=TNM 分期;X_2=CPT1A 评分 or CPT2 评分)。TNM-CPT1A 模型=$2.220X_1+0.884X_2$;TNM-CPT2 模型=$2.110X_1+0.697X_2$;模型评分越高,ccRCC 预后越差。以各独立因素为协变量,以本研究队列中非转移样本($n=84$)随访结果为因变量,做 ROC 曲线分析,采用曲线下面积评估模型优劣。分析结果显示,与单独的 TNM 分期(AUC 0.619, 95% *CI* = 0.467~0.811)相比,TNM-CPT1A 模型(AUC 0.656,95%*CI*=0.547~0.764, $P=0.207$)和 TNM-CPT2 模型(AUC 0.876, 95% *CI* = 0.808~0.944, $P<0.01$)显著提高了预测准确性(图 4C)。

表 2 肾透明细胞癌无疾病生存率的 Cox 回归分析($n=103$)

因素	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%*CI*	*P*	*HR*	95%*CI*	*P*
性别						
(女性 *vs* 男性)	0.930	0.442~1.958	0.848			
年龄/岁						
(>55 *vs* ≤55)	1.788	0.850~3.761	0.126			
手术方式	1.320	0.585~2.710	0.104			
(腹腔镜 *vs* 开放)						
坏死	1.540	1.084~2.971	0.047	1.365	0.873~2.162	0.076
(有 *vs* 无)						
病理分级						
(G3~G4 *vs* G1~G2)	2.074	1.310~3.285	0.002	1.267	0.758~2.120	0.404
TNM 分期						
(S3~S4 *vs* S1~S2)	2.37	1.726~3.255	<0.001	2.625	1.630~4.228	0.009
CPT1A 表达						
(高 *vs* 低)	0.789	0.635~0.981	0.033	1.086	0.814~1.450	0.576
CPT2 表达						
(高 *vs* 低)	0.650	0.518~0.816	<0.001	0.681	0.496~0.936	<0.001



A: CPT1A 生存分析;B: CPT2 生存分析;C: 各独立预后因素及评分模型的 ROC 分析

图 4 CPT1A、CPT2 与肾透明细胞癌预后的关系

3 讨论

长期以来,肾透明细胞癌缺乏良好的预后标志物。本研究从 TCGA 的 ccRCC 转录组学数据和 MSKCC 的代谢组学数据的生物信息学分析入手,发现脂肪酸降解减少可能是 ccRCC 脂质沉积重要原因。其中,CPT1A 和 CPT2 是 ccRCC 脂肪酸降解关键基因。本研究结果表明,与癌旁正常组织相比,CPT1A、CPT2 在 ccRCC 组织 mRNA 和蛋白水平均表达下调,其表达水平与病理分级和 TNM 分期呈负相关。而且 CPT1A、CPT2 表达水平越低,患者无疾病生存率越低。本研究发现,CPT1A、CPT2 表达水平与 TNM 分期联合构建的预后预测模型 TNM-CPT1A、TNM-CPT2 可以显著提高 TNM 分期对预后预测的准确性,尤其是 TNM-CPT2 能更准确预测 ccRCC 患者预后。

本研究结果表明棕榈酰肉碱在 ccRCC 的代谢丰度高于正常肾组织。既往 WETTERSTEN 和 GANTI 等[13-14]也发现 ccRCC 患者尿液中酰基肉碱和肉碱水平升高,而且二者升高水平与病理分级相关,这都提示肉碱穿梭系统在 ccRCC 发生和进展中发挥重要作用,但肉碱棕榈酰转移酶(CPT1A、CPT2)的表达情况并不完全清楚。CPT1A 在前列腺癌、肺癌、胃癌和乳腺癌等多种癌症中表达上调[6];与此相反,DU 等[15]发现,与正常肾组织相比,CPT1A 在 ccRCC 中表达下调,CPT1A 是缺氧诱导因子 1α(hypoxia inducible factor 1 alpha,HIF1A)和缺氧诱导因子 2α(hypoxia inducible factor 2 alpha,HIF2A)转录抑制的直接靶点。CPT1A 低表达是在 VHL 缺失的 ccRCC 细胞中观察到的,而再表达 VHL 可导致 HIFs 的降解、CPT1A 信号及蛋白水平升高,并能抑制脂滴形成和肿瘤生长,这表明 CPT1A 是以 VHL 缺失依赖的方式被抑制[15-16]。另一项研究发现,CPT1A 表达下调可促进 ccRCC 中脂质积聚和肿瘤进展,而过表达 CPT1A 可通过 PPARα-CD36 信号减少脂质积聚并抑制肿瘤细胞增殖[17]。尽管如此,ccRCC 中 CPT1A 蛋白表达与病理分级、临床分期关系并不清楚。本研究结果证实 CPT1A 蛋白在 ccRCC 低表达;其表达水平与病理分级、临床分期呈负相关;分期分级越高,CPT1A 表达越低。此外,值得注意的是,CPT1A 也是琥珀酰化修饰的调节酶,可调节烯醇酶 1(enolase 1)的琥珀酰化而促进乳腺癌增殖,以及调节 S100A10 的琥珀酰化而促进胃癌转移[18]。因此,CPT1A 在 ccRCC 进展中的作用有待于进一步研究。

研究表明,CPT2 在各癌种的表达情况并不一致,在前列腺癌和复发性乳腺癌中高表达,而在结直肠癌、肝癌、卵巢癌中低表达。目前 CPT2 在 ccRCC 的表达及临床意义并不清楚。本研究结果证实 CPT2 在 ccRCC 中表达降低;其表达水平与病理分级、临床分期呈负相关;分期分级越高,CPT2 表达越低。近期多个研究表明下调 CPT2 可以抑制肉碱穿梭系统,影响 β 氧化和酮体的利用[19],与肿瘤治疗反应、化疗耐药、肿瘤细胞干性、增殖及转移能力有关。例如,CPT2 下调可通过 p53 通路促进结直肠癌增殖并抑制凋亡[20],也可通过激活 ROS/Wnt/β-catenin 诱导的糖酵解以触发结直肠癌细胞干性和对奥沙利铂耐药[21]。另外,CPT2 下调使肝癌细胞适应富脂微环境,促进肿瘤发生并增加对顺铂的耐药性[22-23];也可通过诱导 ROS/NF-κB 信号促进卵巢癌生长和转移[24]。因此,CPT2 表达下调在 ccRCC 脂质沉积和肿瘤进展中的作用及重要性可能不亚于 CPT1A,其机制值得深入研究。

脂质沉积是 ccRCC 最重要的病理学特征,是脂质摄入、合成及氧化等过程的结果,与肿瘤侵袭性、抗血管

生成药物耐药及较差预后相关[8,13,15]。既往研究发现,HIF1A 的激活增加了脂质受体基因(CD36,ACVRL1)和脂质储存基因(HILPDA,FABP7)的转录,增加了脂质的摄入[25]。而 ccRCC 中 ACLY、ACC、FASN 及 SCD1 等脂肪酸从头合成关键酶的过表达则增加了脂肪酸的合成。本研究则发现 CPT1A、CTP2 表达下调是 ccRCC 脂肪酸降解减少的重要原因之一。以上脂代谢重编程过程最终导致了 ccRCC 细胞中脂质过度沉积,形成脂滴,构成病理染色上的"透明"表型。

TNM 分期是目前肿瘤诊疗中应用最广泛的预后评价系统,最新版(第 8 版)肾癌 TNM 分期对 ccRCC 预后预测具有重要指导意义,但同一分期患者的临床结局常存在明显差异[26]。SSIGN 评分和 Leibovich (2018)评分是目前用于 ccRCC 预后风险评估的良好模型,二者分别在 TNM 分期之外添加了更多的临床指标,二者对 ccRCC 预后预测有重要意义,但存在指标更复杂、临床操作不便的问题[27-28]。本研究发现 CPT1A、CPT2 表达水平与 ccRCC 预后明显正相关,CPT1A、CPT2 可作为 ccRCC 预后的预测指标。基于此,我们构建了结合 TNM 分期与 CPT1A、CPT2 表达的预后预测模型。结果显示,TNM-CPT1A、TNM-CPT2 模型均可提高 TNM 分期对 ccRCC 预后预测的准确性,其中 TNM-CPT2 模型优于 TNM-CPT1A 模型。因此,CPT2 可能是 ccRCC 中比 CPT1A 更优越的预后标志物。

本研究也存在一些不足。首先,本研究是一个单中心的回顾性队列研究,虽然有公共数据库 TCGA-ccRCC 队列 mRNA 水平的数据佐证,但结论仍需要进一步的外部验证。其次,血液相关指标,如血红蛋白、血钙、乳酸脱氢酶、中心粒细胞和血小板计数的纳入可能增加我们结果的可信度。

总之,本研究结果表明,与高表达患者相比,CPT1A、CPT2 低表达预示 ccRCC 患者预后不良,二者可能是 ccRCC 预后标志物和潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] BARATA P C, RINI B I. Treatment of renal cell carcinoma: current status and future directions[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(6): 507-524. DOI:10.3322/caac.21411.

[2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.

[3] LJUNGBERG B, ALBIGES L, ABU-GHANEM Y, *et al*. European Association of Urology guidelines on renal cell carcinoma: the 2019 update[J]. Eur Urol, 2019, 75(5): 799-810. DOI:10.1016/j.eururo.2019.02.011.

[4] HSIEH J J, LE V H, OYAMA T, *et al*. Chromosome 3p loss-orchestrated VHL, HIF, and epigenetic deregulation in clear cell renal cell carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(36): JCO2018792549. DOI: 10.1200/JCO.2018.79.2549.

[5] KOUNDOUROS N, POULOGIANNIS G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer[J]. Br J Cancer, 2020, 122(1): 4-22. DOI:10.1038/s41416-019-0650-z.

[6] MELONE M A B, VALENTINO A, MARGARUCCI S, *et al*. The carnitine system and cancer metabolic plasticity[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 228. DOI:10.1038/s41419-018-0313-7.

[7] BONNEFONT J P, DJOUADI F, PRIP-BUUS C, *et al*. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects[J]. Mol Aspects Med, 2004, 25(5/6): 495-520. DOI:10.1016/j.mam.2004.06.004.

[8] IWAMOTO H, ABE M, YANG Y L, *et al*. Cancer lipid metabolism confers antiangiogenic drug resistance[J]. Cell Metab, 2018, 28(1): 104-117.e5. DOI:10.1016/j.cmet.2018.05.005.

[9] HAKIMI A A, REZNIK E, LEE C H, *et al*. An integrated metabolic atlas of clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer Cell, 2016, 29(1): 104-116. DOI:10.1016/j.ccell.2015.12.004.

[10] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A H, *et al*. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. Neoplasia, 2017, 19(8): 649-658. DOI:10.1016/j.neo.2017.05.002.

[11] AIDERUS A, BLACK M A, DUNBIER A K. Fatty acid oxidation is associated with proliferation and prognosis in breast and other cancers[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 805. DOI:10.1186/s12885-018-4626-9.

[12] KALLIONIEMI O P, WAGNER U, KONONEN J, *et al*. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(7): 657-662. DOI:10.1093/hmg/10.7.657.

[13] WETTERSTEN H I, HAKIMI A A, MORIN D, *et al*. Grade-dependent metabolic reprogramming in kidney cancer revealed by combined proteomics and metabolomics analysis[J]. Cancer Res, 2015, 75(12): 2541-2552. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-14-1703.

[14] GANTI S L, TAYLOR S L, KIM K, *et al*. Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 130(12): 2791-2800. DOI:10.1002/ijc.26274.

[15] DU W N, ZHANG L C, BRETT-MORRIS A, *et al*. HIF

drives lipid deposition and cancer in ccRCC via repression of fatty acid metabolism[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1769. DOI:10.1038/s41467-017-01965-8.

[16] HERAVI G, YAZDANPANAH O, PODGORSKI I, *et al*. Lipid metabolism reprogramming in renal cell carcinoma[J]. Cancer Metastasis Rev, 2022, 41(1): 17-31. DOI:10.1007/s10555-021-09996-w.

[17] YANG H, ZHAO H, REN Z, *et al*. Overexpression CPT1A reduces lipid accumulation *via* PPARα/CD36 axis to suppress the cell proliferation in ccRCC[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2022, 54(2): 220-231. DOI:10.3724/abbs.2021023.

[18] LU W Q, CHE X F, QU X J, *et al*. Succinylation regulators promote clear cell renal cell carcinoma by immune regulation and RNA N6-methyladenosine methylation[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 622198. DOI:10.3389/fcell.2021.622198.

[19] LU X, ZHANG X H, ZHANG Y J, *et al*. Metabolic profiling analysis upon acylcarnitines in tissues of hepatocellular carcinoma revealed the inhibited carnitine shuttle system caused by the downregulated carnitine palmitoyltransferase 2[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(5): 749-759. DOI:10.1002/mc.22967.

[20] LIU F Q, LI X Q, YAN H, *et al*. Downregulation of CPT2 promotes proliferation and inhibits apoptosis through p53 pathway in colorectal cancer[J]. Cell Signal, 2022, 92: 110267. DOI:10.1016/j.cellsig.2022.110267.

[21] LI H, CHEN J H, LIU J, *et al*. CPT2 downregulation triggers stemness and oxaliplatin resistance in colorectal cancer *via* activating the ROS/Wnt/β-catenin-induced glycolytic metabolism[J]. Exp Cell Res, 2021, 409(1): 112892. DOI:10.1016/j.yexcr.2021.112892.

[22] FUJIWARA N, NAKAGAWA H, ENOOKU K, *et al*. CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis *via* acylcarnitine accumulation in obesity[J]. Gut, 2018, 67(8): 1493-1504. DOI:10.1136/gutjnl-2017-315193.

[23] LIN M H, LV D, ZHENG Y L, *et al*. Downregulation of CPT2 promotes tumorigenesis and chemoresistance to cisplatin in hepatocellular carcinoma[J]. OncoTargets Ther, 2018, 11: 3101-3110. DOI:10.2147/OTT.S163266.

[24] ZHANG X H, ZHANG Z, LIU S J, *et al*. CPT2 down-regulation promotes tumor growth and metastasis through inducing ROS/NFκB pathway in ovarian cancer[J]. Transl Oncol, 2021, 14(4): 101023. DOI:10.1016/j.tranon.2021.101023.

[25] VAN DER MIJN J C, FU L P, KHANI F, *et al*. Combined metabolomics and genome-wide transcriptomics analyses show multiple HIF1α-induced changes in lipid metabolism in early stage clear cell renal cell carcinoma[J]. Transl Oncol, 2020, 13(2): 177-185. DOI:10.1016/j.tranon.2019.10.015.

[26] TAMAYO P, CHO Y J, TSHERNIAK A, *et al*. Predicting relapse in patients with medulloblastoma by integrating evidence from clinical and genomic features[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(11): 1415-1423. DOI:10.1200/JCO.2010.28.1675.

[27] PARKER W P, CHEVILLE J C, FRANK I, *et al*. Application of the stage, size, grade, and necrosis (SSIGN) score for clear cell renal cell carcinoma in contemporary patients[J]. Eur Urol, 2017, 71(4): 665-673. DOI:10.1016/j.eururo.2016.05.034.

[28] BLACKMUR J P, GABA F, FERNANDO D, *et al*. Leibovich score is the optimal clinico-pathological system associated with recurrence of non-metastatic clear cell renal cell carcinoma[J]. Urol Oncol, 2021, 39(7): 438.e11-438.438.e21. DOI:10.1016/j.urolonc.2021.04.007.

(收稿:2022-05-14;修回:2022-09-13)

(编辑 刘秋池)