



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.09.019
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.09.019
China Journal of General Surgery, 2023, 32(9):1433-1438.

· 简要论著 ·

腺苷酸基琥珀酸裂解酶在胃癌中的表达及其临床意义

曾德余¹, 罗嘉², 陶一明³, 裴雷⁴, 殷先利¹

(湖南省肿瘤医院 1. 消化泌尿内科 2. 外科, 湖南长沙 410031; 3. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南长沙 410008; 4. 中南大学湘雅二医院 普通外科, 湖南长沙 410011)

摘要

背景和目的: 腺苷酸基琥珀酸裂解酶 (ADSL) 是嘌呤从头生物合成的必需酶, 参与调控肿瘤嘌呤核苷酸、细胞周期和细胞增殖重要功能。然而, 它在胃癌 (GC) 中的表达与作用仍不清楚。因此, 本研究探讨 ADSL 在 GC 组织中的表达与作用以及与局部晚期 GC 新辅助化疗的关系。

方法: 利用 TCGA 队列中的配对 GC 和正常组织表达数据, 通过 TNM plot、人类蛋白图谱、UALCAN、STRING 数据库, 分析 ADSL 表达及临床意义。用荧光定量 PCR 检测 24 例在湖南省肿瘤医院接受新辅助化疗 (SOX 方案 5 例、XELOX 方案 7 例、FLOT 方案 12 例) 的局部晚期 GC 患者的组织标本中 ADSL 表达。

结果: 数据库分析结果显示, 与正常胃组织相比, GC 组织中的 ADSL mRNA 和蛋白表达明显性增加, 且 ADSL 过表达患者与预后较差。ADSL 表达与磷酸核糖甲酰基甘氨酸合酶、磷酸核糖氨基咪唑羧化酶等呈明显正相关。ADSL 表达涉及 p53 信号通路、Wnt 信号通路、miRNA (microRNA) 调控以及细胞周期调控。行不同新辅助化疗方案后的 GC 组织中 ADSL mRNA 表达均明显高于各自的癌旁组织, 相对另两种方案, 行 FLOT 方案的患者临床客观缓解率较高, GC 组织 ADSL mRNA 表达较低。

结论: ADSL 在 GC 组织中表达升高, 且与不良预后密切相关。ADSL 有望成为局部晚期 GC 新辅助化疗疗效的标志物。

关键词

胃肿瘤; 腺苷酸基琥珀酸裂解酶; 肿瘤辅助疗法

中图分类号: R735.2

胃癌 (gastric cancer, GC) 每年新发病例超过 100 万例^[1], 是全球癌症相关死亡的第三大原因^[2]。局部晚期 GC, 单独手术通常不能治愈。研究^[3]表明, 新辅助化疗为局部晚期 GC 带来新的契机, 新辅助化疗对提高局部晚期 GC 的整体疗效也得到认可。对于局部晚期 GC, 新辅助化疗可以提高阴性切缘 R₀ 切除率, 使得 GC 患者生存获益^[4]。更新的中国临床肿瘤学会 (CSCO) 指南^[5], 强调对于非转移性 GC 的综合治疗, 应该重视新辅助治疗。然而, 目前缺乏用于 GC 患者新辅助化疗选择的生物标志物, GC 患者的总体生存率仍不理想, 对于 GC

化疗耐药机制的深入了解也十分有限^[6]。因此, 分析潜在机制并找到可能的临床治疗靶点有重要价值。

腺苷酸基琥珀酸裂解酶 (adenylosuccinate lyase, ADSL) 是嘌呤从头生物合成一磷酸腺苷 (AMP) 的必需酶^[7]。新近研究表明, ADSL 在结直肠癌^[8]、前列腺癌^[9]、乳腺癌^[10]、子宫内膜样癌^[11]和肝癌^[12]中表达上调, 参与调控肿瘤细胞周期, 以促进肿瘤发生发展。然而, 它在 GC 发展中的作用在很大程度上未知。本研究通过生物信息学方法结合新辅助化疗 GC 临床组织标本检测, 初步探讨 ADSL 在 GC 中的作用及其与新辅助化疗的关系。

基金项目: 湖南省科技厅科技创新计划基金资助项目 (2017SK50609)。

收稿日期: 2022-10-23; **修订日期:** 2023-03-24。

作者简介: 曾德余, 湖南省肿瘤医院副主任医师, 主要从事消化肿瘤临床及基础方面的研究。

通信作者: 殷先利, Email: yinxianli2009@163.com

1 材料与方法

1.1 GC组织标本

选择2016年1月—2021年12月间湖南省肿瘤医院收治的24例接受新辅助化疗的局部晚期GC病例，其中SOX方案5例、XELOX方案7例、FLOT方案12例。SOX方案：奥沙利铂130 mg/m²，第1天，替吉奥80 mg/m²，第1~14天，3周为1个周期。XELOX方案：奥沙利铂130 mg/m²，第1天，卡培他滨1 000 mg/m²，第1~14天，3周为1个周期。FLOT方案：多西他赛60 mg/m²，第1天，奥沙利铂85 mg/m²，第1天、亚叶酸200 mg/m²，第1天，5-氟尿嘧啶2 600 mg/m²，48 h静脉输注，2周为1个周期，2~4个周期化疗完成后3周进行手术。GC患者接受新辅助化疗周期结束后，通过胃镜检查、增强CT或MRI通过计算肿瘤大小和淋巴结转移来评估肿瘤对新辅助化疗的反应，行胃切除术，术后组织病理学检测确诊为腺癌。收集GC组织和配对的距肿瘤外缘至少5 cm的相应正常黏膜组织。手术切除后立即收集样品并在液氮中快速冷冻，-80 ℃超低温冰箱保存备用。手术标本采集均已被告知并签署书面知情同意书。本课题研究内容已通过湖南省肿瘤医院医学伦理委员会审批（批文号：2022078）。

1.2 数据库分析

1.2.1 TNMplot 数据库 TNMplot (<https://www.tnmplot.com>) 包括来自GEO的Genechip差异基因表达分析(3 691个正常、29 376个肿瘤和453个转移样本)和来TCGA的RNA-seq差异基因表达分析(730个正常、9 886个肿瘤和394个转移样本)^[13]。使用该数据库比较和分析ADSL在正常组织和癌组织中的表达。

1.2.2 UALCAN 数据库 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>) 是用于分析癌症OMICS数据(TCGA和MET500)开放的数据库^[14]，提供泛癌基因表达和基于基因表达的患者生存信息的分析结果，ADSL基因表达与GC预后的分析使用UALCAN。

1.2.3 人类蛋白表达图谱数据库 人类蛋白表达图谱(HPA)是一个在线数据库(<https://www.proteinatlas.org>)，包含近20种癌组织和48种正常组织的免疫组化蛋白质表达数据，本研究通过免疫组化图像比较了ADSL蛋白在正常胃组织和GC组

织中表达的定位。

1.2.4 STRING 数据库 通过STRING数据库(<https://cn.string-db.org>)进行ADSL表达蛋白网络交互网络(protein-protein interaction networks, PPI)分析。使用DAVID数据库在线工具对ADSL基因进行GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析。

1.3 荧光定量PCR

约50 mg配对GC组织样本冰上匀浆后，使用TRIzolTM RNA Purification试剂盒(Invitrogen, 货号12183555)从组织中提取RNA，琼脂糖凝胶电泳检测总RNA提取物的完整性。取1 μg RNA合成互补DNA(cDNA)，按Merck公司RT-PCR第一条链cDNA合成试剂盒(AMV, 货号11483188001)操作说明书进行。定量PCR检测引物序列设计和扩增反应条件参考PrimerBank^[15]。ADSL(ID183227686c2)上游引物序列：5'-ACA TTG GGT TTG CCT ATC ACA G-3'；下游引物序列：5'-GCC ATC ACA TCA TGT CGT AAA CG-3'，GAPDH作为实时PCR的内参对照，GAPDH(ID378404907c3)上游引物序列：5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3'；下游引物序列：5'-AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG-3'。使用iTaQ SYBR Green Mix(Bio-Rad公司, 货号720001564)，30个循环扩增，扩增产物大小116 kb，退火温度60 ℃。进行实时定量PCR分析基因表达。

1.4 统计学处理

TNMplot数据库正常组织和肿瘤组织表达差异比较使用Wilcoxon检验。UALCAN数据库使用Kaplan-Meier统计分析整体生存率。验证队列mRNA表达比较采用配对t检验，用GraphPad Prism Version 9.02软件分析制图。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSL在GC组织中的表达

使用TNM plot分析了TCGA队列中的配对GC和正常组织中的表达(图1A)。与正常胃组织相比，肿瘤组织中的ADSL mRNA表达明显增加(P=1.11e-20)。HPA数据库图像显示，与正常胃组织样本切片相比，在GC肿瘤组织切片中观察到更深的ADSL染色。

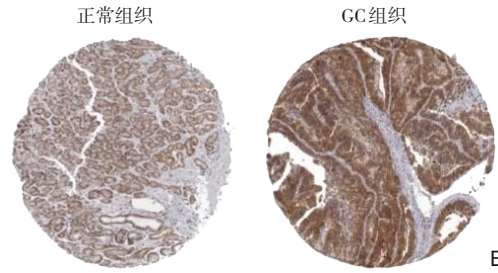
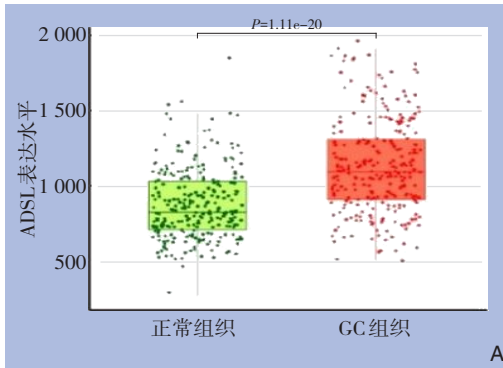


图1 ADSL在GC中的表达 A: TNMplot分析ADSL基因在GC于正常组织中的表达; B: HPA中ADSL蛋白在GC和正常组织中的表达

2.2 ADSL表达与GC预后的关系

利用UALCAN数据库探讨了ADSL mRNA表达预测GC患者的预后价值,结果表明,ADSL高表达的GC患者的生存率更低 ($P=0.018$) (图2)。

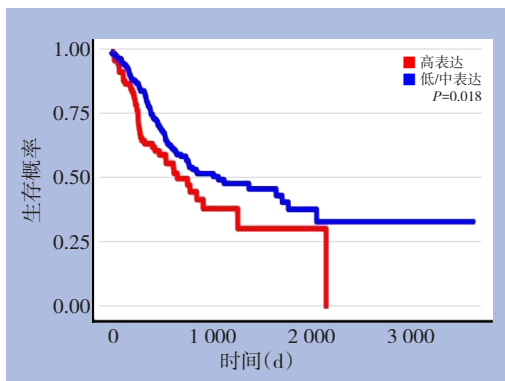


图2 GC中ADSL表达与患者预后的关系

2.3 ADSL蛋白相互作用的分析

为了进一步研究ADSL在GC中的分子作用基础,将ADSL引入STRING数据库以获得功能性蛋白相关网络(图3A)。与ADSL相关的功能性蛋白表达PPI网络包含腺苷脱氨酶(ADA)、腺苷激酶(ADK)、磷酸腺苷脱氨酶3(AMPD3)、腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)、ASS1、5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸甲酰基转移酶(ATIC)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、磷酸核糖基甘氨酸甲酰基转移酶(GART)、甲酰基四氢叶酸合成酶(MTHFD1)、亚甲基四氢叶酸脱氢酶1(MTHFD1L)、亚甲基四氢叶酸环化水解酶(MTHFD2)、磷酸核糖氨基咪唑羧化酶(PAICS)、磷酸核糖甲酰基甘氨酸合酶(PFAS)、丝氨酸羟甲基转移酶1

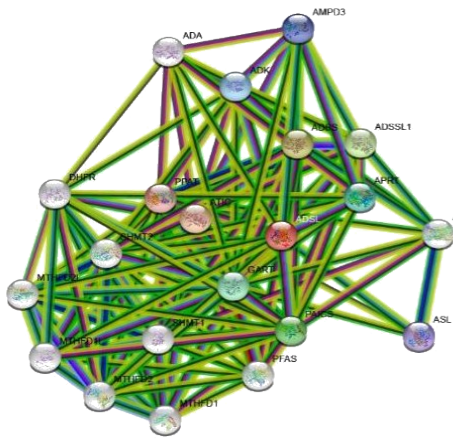
(SHMT1)。其中ADK、PFAS、ATIC、PAICS、GART的可信度评分分别为0.992、0.997、0.987、0.999。由TCGA-GC患者数据进行相关性分析,结果显示,ADSL表达与ADK、PFAS、ATIC、PAICS、GART呈明显正相关,相关性系数分别为0.28、0.47、0.32、0.35、0.35(图3B)。

2.4 ADSL表达调控相关信号通路及功能的预测分析

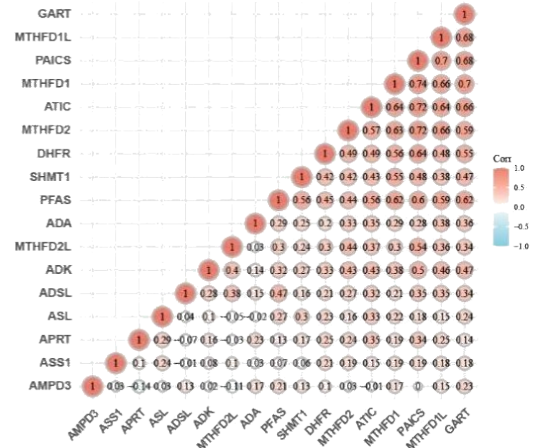
用DAVID对ADSL及其相互分子进行KEGG通路分析(图4A)和GO功能富集分析(图4B)。KEGG通路分析结果发现,ADSL过表达涉及p53信号通路、Wnt信号通路、miroRNA调控以及细胞周期;ADSL低表达涉及氮素代谢、果糖和甘露糖的代谢、黏蛋白型O-聚糖的生物合成、甘油酯代谢。GO富集分析结果发现,ADSL过表达涉及有丝分裂细胞周期、有丝分裂细胞周期检查点、细胞周期检查点的调控;ADSL低表达有利于维护胃肠道上皮细胞结构的完整性和组织稳态。

2.5 新辅助化疗后GC肿瘤组织中ADSL表达的变化

为探讨新辅助化疗和ADSL表达的关系,通过荧光定量PCR检测了新辅助化疗后GC肿瘤组织中ADSL表达的情况,结果显示:SOX方案组、XELOX方案组、FLOT方案组ADSL mRNA在GC组中表达水平分别为: 3.27 ± 1.34 、 2.66 ± 0.98 、 2.47 ± 0.79 ;明显高于正常胃组织中的ADSL mRNA表达 1.25 ± 0.2 、 1.21 ± 0.39 、 1.13 ± 0.33 (图5)。与XELOX组和SOX组比较,FLOT方案组有更高的临床客观缓解率,更低的ADSL mRNA表达。

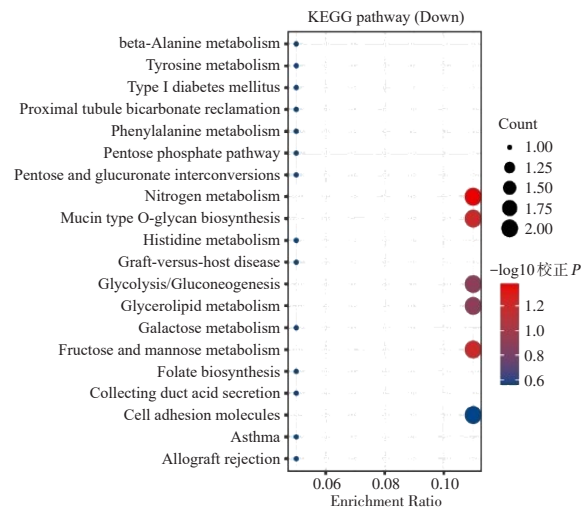
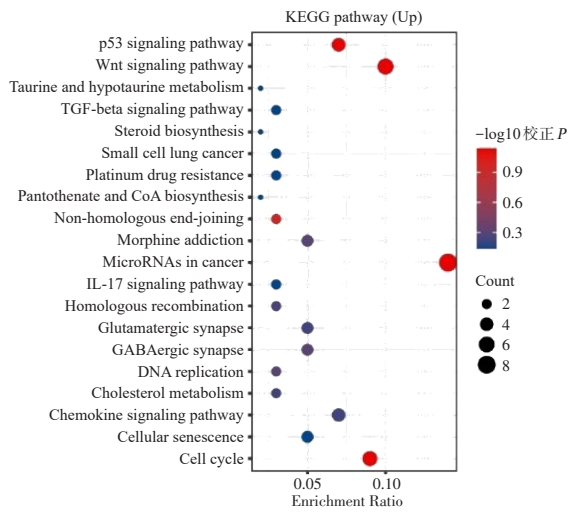


A

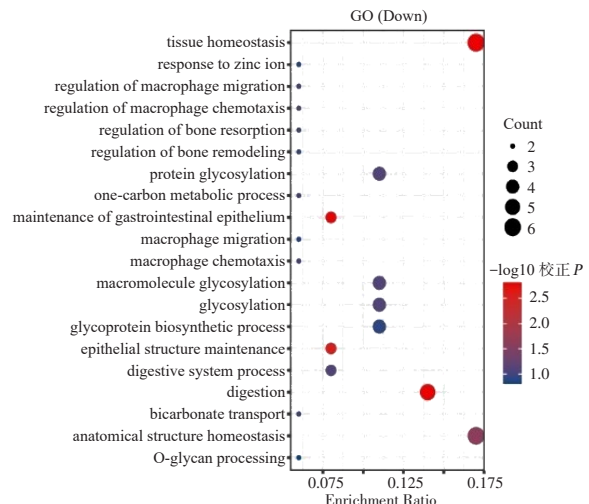
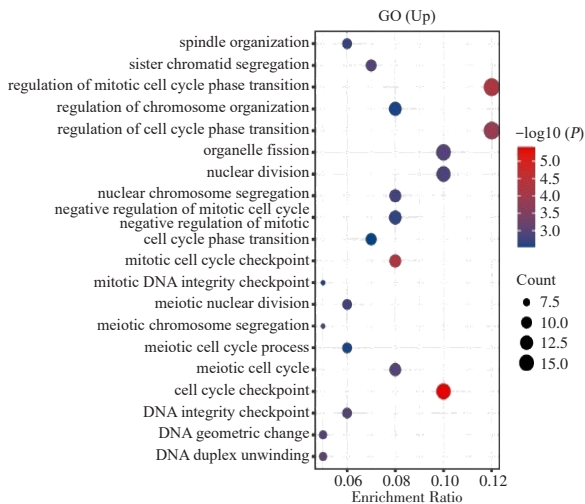


B

图3 ADSL 相关作用分子的分析 A: STRING 数据库分析 ADSL 相关蛋白-蛋白相互作用网络; B: TCGA 队列 GC 患者 ADSL 相互作用基因的相关性分析



A



B

图4 GC 中 ADSL 表达的富集分析 A: ADSL 高表达组和 ADSL 低表达组之间改变的 KEGG 通路图; B: ADSL 高表达组和 ADSL 低表达组之间改变的 GO 富集图

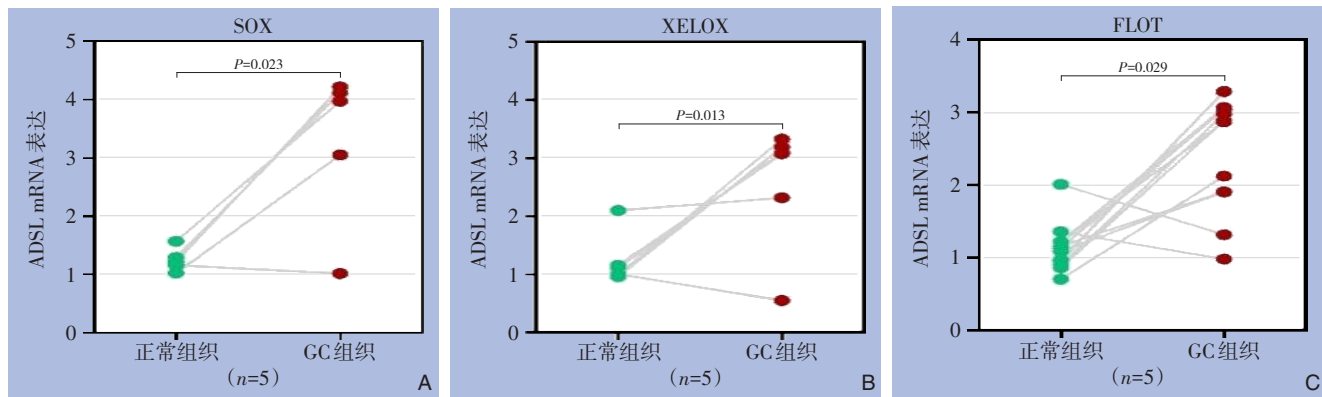


图5 新辅助化疗后GC组织和邻近的非肿瘤胃组织中的ADSL mRNA表达 A: SOX方案组; B: XELOX方案组; C: FLOT方案组

3 讨论

研究^[8, 16]表明, ADSL的抑制通过破坏从头嘌呤合成途径来减少AMP合成。较低的AMP水平会导致氧化磷酸化产生的ATP减少, 从而导致线粒体应激。较低的ATP水平诱导细胞周期停滞在S期。线粒体功能障碍可以通过一系列应激反应途径减少, 包括ATF5介导的未折叠蛋白反应(UPR)途径。而未得以解决的线粒体应激可能导致癌细胞周期停滞和程序性细胞死亡。越来越多的证据表明, 核苷酸合成和线粒体功能之间存在串扰—嘌呤从头合成通过介导ATP产生来调节细胞生长治疗抵抗^[17], 而线粒体ATP在癌症增殖中促进核苷酸合成。线粒体压力也可以激活从头嘌呤合成途径促进癌细胞生长^[18]。已报道的证据发现ADSL过表达GC的细胞周期密切相关。

新辅助化疗后进行腹腔镜D₂胃切除术, 对晚期可切除的GC是有效和安全的^[19]。FLOT方案在进展期GC患者的病理反应和生存率方面显示出优势。在本研究中, FLOT方案与两药方案XELOX组、SOX组对比, 前者表现出更高的临床客观缓解率, 而且笔者通过组织样本验证了新辅助化疗和ADSL表达可能的内在联系, 结果提示, FLOT方案的疗效可能与下调ADSL mRNA表达有关。在本研究中, 通过KEGG通路富集分析发现在GC中ADSL过表达涉及miRNA调控以及细胞周期的调控。这与新近的肿瘤研究发现基本相一致, Zhang等^[20]发现miR-21-5p和miR-21-3p的上调可调节嘌呤代谢, 导致药物耐受性增加。代谢组学数据表明, 与亲代细胞相比, 嘌呤代谢是DTPC中的主要途

径。靶向miR-21部分挽救了DTPC中嘌呤代谢物的变化。在miR-21敲低后, ADSL的表达减少被逆转。ADSL是从头嘌呤生物合成途径中的一种必需酶, 通过将磷酸核糖基氨基咪唑琥珀酰胺转化为氨基咪唑甲酰胺核苷, 以及将腺苷酸琥珀酸转化为AMP。但是ADSL和miR-21在GC中的调控作用仍然有待开展基础实验进一步予以证明。

综上所述, ADSL在GC呈高表达, 其过表达可以预测不良临床预后。ADSL调控的嘌呤从头合成途径可能参与GC的发生发展。ADSL有望成为进展期GC新辅助化疗疗效的标志物。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 曾德余负责课题设计、课题资助、文稿撰写; 罗嘉负责组织样本采集; 陶一明协助课题设计; 裴雷负责组织样本检测; 殷先利负责课题资助、文稿审阅修改建议。

参考文献

- [1] Thrift AP, El-Serag HB. Burden of gastric cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(3): 534–542. doi: 10.1016/j.cgh.2019.07.045.
- [2] Joshi SS, Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 264–279. doi: 10.3322/caac.21657.
- [3] Sun J, Wang XZ, Zhang ZM, et al. The sensitivity prediction of neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11:641304. doi: 10.3389/fonc.2021.641304.
- [4] Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, et al. Effect of Neoadjuvant

- Chemotherapy Followed by Surgical Resection on Survival in Patients With Limited Metastatic Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer: The AIO-FLOT3 Trial[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(9):1237-1244. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0515.
- [5] Wang FH, Zhang XT, Li YF, et al. The Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO): clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer, 2021[J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(8): 747-795. doi: 10.1002/cac2.12193.
- [6] Li ZY, Gao XY, Peng XX, et al. Multi-omics characterization of molecular features of gastric cancer correlated with response to neoadjuvant chemotherapy[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(9): eaay4211. doi: 10.1126/sciadv.aay4211.
- [7] Gooding JR, Jensen MV, Dai XQ, et al. Adenylosuccinate is an insulin secretagogue derived from glucose-induced purine metabolism[J]. *Cell Rep*, 2015, 13(1): 157-167. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.072.
- [8] Taha-Mehlitz S, Bianco G, Coto-Llerena M, et al. Adenylosuccinate lyase is oncogenic in colorectal cancer by causing mitochondrial dysfunction and independent activation of NRF2 and mTOR-MYC-axis[J]. *Theranostics*, 2021, 11(9): 4011-4029. doi: 10.7150/thno.50051.
- [9] Liao JL, Song Q, Li J, et al. Carcinogenic effect of adenylosuccinate lyase (ADSL) in prostate cancer development and progression through the cell cycle pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):467. doi: 10.1186/s12935-021-02174-6.
- [10] Zurlo G, Liu XJ, Takada M, et al. Prolyl hydroxylase substrate adenylosuccinate lyase is an oncogenic driver in triple negative breast cancer[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5177. doi: 10.1038/s41467-019-13168-4.
- [11] Park H, Ohshima K, Nojima S, et al. Adenylosuccinate lyase enhances aggressiveness of endometrial cancer by increasing killer cell lectin-like receptor C3 expression by fumarate[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(4):449-461. doi: 10.1038/s41374-017-0017-0.
- [12] Jiang TT, Sánchez-Rivera FJ, Soto-Feliciano YM, et al. Targeting the de novo purine synthesis pathway through adenylosuccinate lyase depletion impairs liver cancer growth by perturbing mitochondrial function[J]. *Hepatology*, 2021, 74(1):233-247. doi: 10.1002/hep.31685.
- [13] Bartha Á, Györfy B. TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2622. doi: 10.3390/ijms22052622.
- [14] Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et al. UALCAN: an update to the integrated cancer data analysis platform[J]. *Neoplasia*, 2022, 25:18-27. doi: 10.1016/j.neo.2022.01.001.
- [15] Wang XW, Spandidos A, Wang HJ, et al. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(Database issue): D1144-1149. doi: 10.1093/nar/gkr1013.
- [16] Yin J, Ren WK, Huang XG, et al. Potential mechanisms connecting purine metabolism and cancer therapy[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1697. doi: 10.3389/fimmu.2018.01697.
- [17] Shireman JM, Atashi F, Lee G, et al. De novo purine biosynthesis is a major driver of chemoresistance in glioblastoma[J]. *Brain*, 2021, 144(4):1230-1246. doi: 10.1093/brain/awab020.
- [18] Martínez-Reyes I, Cardona LR, Kong H, et al. Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth[J]. *Nature*, 2020, 585(7824):288-292. doi: 10.1038/s41586-020-2475-6.
- [19] Zhang S, Yan DY, Sun Q, et al. FLOT neoadjuvant chemotherapy followed by laparoscopic D2 gastrectomy in the treatment of locally resectable advanced gastric cancer[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 2020:1702823. doi: 10.1155/2020/1702823.
- [20] Zhang WC, Skiados N, Aftab F, et al. microRNA-21 guide and passenger strand regulation of adenylosuccinate lyase-mediated purine metabolism promotes transition to an EGFR-TKI-tolerant persister state[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(12):1878-1894. doi: 10.1038/s41417-022-00504-y.

(本文编辑 熊杨)

本文引用格式: 曾德余, 罗嘉, 陶一明, 等. 腺苷酸基琥珀酸裂解酶在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(9): 1433-1438. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.09.019

Cite this article as: Zeng DY, Luo J, Tao YM, et al. Expression of adenylosuccinate lyase in gastric cancer and its clinical significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(9): 1433-1438. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.09.019