

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科
佳作

052009

多組學分析確定 STING1 為膀胱癌的預測因子

學校名稱： 國立南科國際實驗高級中學

作者： 高二 陳尚均 高二 崔森泉	指導老師： 杭艾倫
---------------------------------	------------------

關鍵詞： STING1、膀胱癌、預測因子

摘要

全球每年約有 165 萬人罹患膀胱癌，其中死亡人數高達20 萬，為癌症相關死因中第九名。手術治療後的五年內復發率高達31%至78%，造成健保極大負擔。本研究決定從傳統生物學轉向生物資訊學，透過基因多組學分析來診斷癌症。*STING1*(干擾素反應刺激物cGAMP交互作用子1)能編碼跨膜蛋白，主要調節細菌與病毒感染的先天免疫反應。因此，本研究用GEPIA2、UALCAN、cSurvival、與UCSC Xena來探討不同表現量與存活率的關聯，用cBioPortal來進行基因變異分析，用STRING、GeneMania和TIMER2.0來確定*STING1*與基因的交互關係，用LinkedOmics與Gene Ontology進行了基因富集分析，用TISIDB與TISCH1評估*STING1*在腫瘤環境中的作用。從此尋找到明確的預測因素、理解*STING1*在BLCA中的潛在機制，為BLCA開闢新的治療標靶療法。

壹、前言

一、動機

膀胱癌(BLCA)是癌症相關死亡中排名第九，全球每年約有 165 萬名患者，其中 20 萬人便是因膀胱癌而死亡 (Ferlay, 2024)。最要緊的是 BLCA 在手術治療後的五年內有高達大約 31% 至 78% 的超高復發率 (Mari A, 2018)，因此治療費昂貴，造成健保極大的負擔，導致膀胱癌的危險因子包括吸菸、糖尿病、遺傳、慢性發炎、和接觸飲用水或砷 (Burger, 2013)。膀胱癌的症狀包含了血尿、排尿時疼痛、下腹部不適等症狀(Sweet, 2023)。膀胱癌可以從腫瘤侵犯之深度分為:(1)非肌肉侵襲性，腫瘤只達黏膜(2) 肌肉侵入性，癌細胞已入侵膀胱的肌肉層，穿出膀胱壁或者轉移至其它器官(Wong MCS 2018)。其中許多徵兆和症狀並非膀胱癌特有，特別是對於轉移性膀胱癌和潛在的肌肉侵入性膀胱癌(MIBC)，因此膀胱癌很難提早被診斷。

NVIDIA創辦人黃仁勳宣稱「電腦的時代已經過去，生命科學才是未來」(林詠琪, 2024)。換句話說，他認為生命科學時代已經到來，迎接生物學革命的方法是將生物學資訊學融入機器學習和人工智慧中，這樣就可以更好地預測疾病並精確的藥物治療。藉由閱讀了文章和引用，從傳統的生物學轉向生物資訊學，透過基因的多組學分析來診斷癌症。

二、文獻回顧

(一) BLCA的不良治療

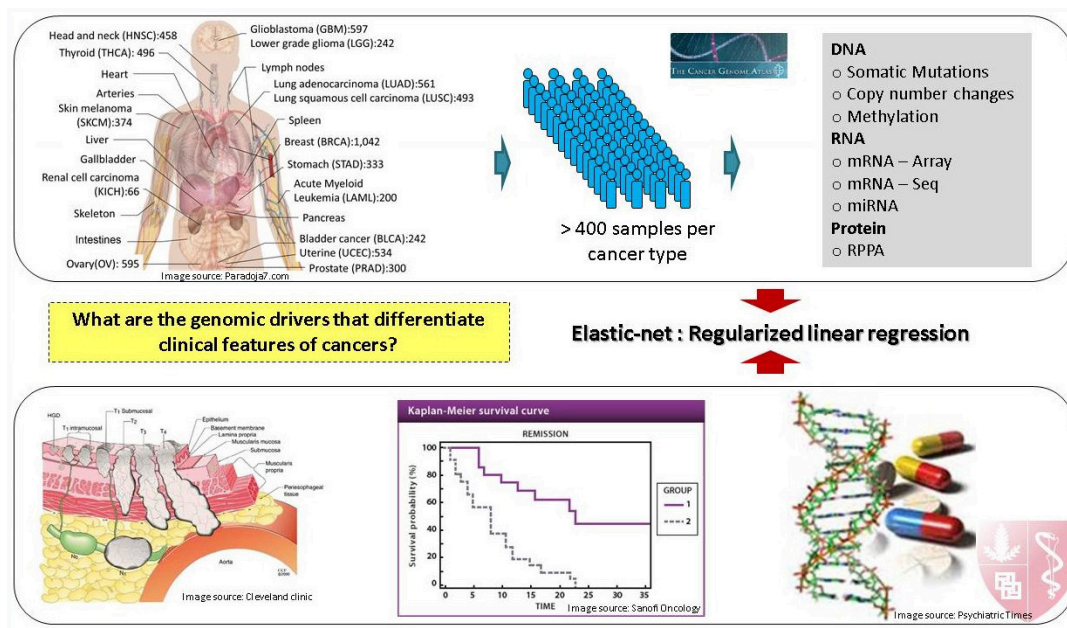
膀胱癌的標準治療方法是經尿道切除術 (TUR)，然後進行卡介苗 (BCG) 免疫治療，但是這會導致 50% 的復發風險和 20% 的惡化風險 (Kikuchi H, 2022)。然而卡介苗在全球供應短缺的情況下，對患者的耐受性不見得是良好且有效的。而膀胱癌的替代療法，比如化療或免疫療法，又不如卡介苗有效。對於 MIBC 和轉移性膀胱癌，如果不做任何進一步的改變，治療方式將更加受限或甚至無效 (Gakis, 2020)。無論是卡介苗或替代療法，患者整體存活率(OS)和無病存活率(DFS)從得病到腫瘤再次復發的時間內並沒有顯著改善 (Delgado, 2021 ; Brody, 2016)，為了能提供更有效和個人化的治療方法，需要探索膀胱癌的生物標記 (biomarker)來拯救 BLCA 的患者，特別是那些無法接受治療的患者。

(二)BLCA 遺傳交互作用和生物標記

膀胱癌的發生可能來自於基因的變化/誘發，例如週期蛋白依賴性激酶(CDK)機制喪失或化學誘導的結果。常見的基因誘發包括49%的*TP53*失活、29%的*MDM2*過度表現、20%的*RBI*腫瘤抑制基因突變、20%的螺旋結構域*PIK3CA*突變以及12%的已知激酶實現位點上作為癌基因的*FGFR*過度表現，其中*TP53*和*RBI*抑癌基因可以透過停止癌細胞週期、抑制癌基因表現（即*RAS*）、誘導癌細胞凋亡、以及修復正常細胞的DNA來預防癌症（《自然》雜誌2014）。儘管研究人員尚未確切知道大多數膀胱癌的真正病因，但他藉由發現一些危險因子來了解導致膀胱細胞發生癌變的原因。

(三)The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Cancer Genome Atlas是一個開源的癌症基因組計畫平台，也是生物學中最重要的數據庫，涵蓋了超過20,000個癌症的分子特徵、以及33種癌症類型的資料庫(NIH, 2023)。這個計劃的目的是藉由資料，而非執行冗長費力的傳統生醫實驗來找到潛在的預測因子以及新的癌症治療方法。TCGA透過組織處理、整合研究、資料分享、全群研究的過程來收集資料(鄒佩玲, 2013)。通常在生物資訊案例研究中，會採用 p 值、false discovery rate(FDR)比或 q 值小於 0.05 的資料來證明資料的顯著性，並且以不同形式統計方法呈現本研究的臨床數據(圖二)(徐倩儀, 2024)。除病歷臨床數據外，每個腫瘤樣本會同時取得基因突變（包括插入與刪除）、DNA拷貝數複製資料、mRNA表現、microRNA表現、蛋白質表現、及DNA甲基化資料(鄒佩玲,2013)。TCGA加速了計算生物學在理解基因的臨床價值和影響方面的發展，而許多其他生物學家基於 TCGA 資料庫設計了自己的遺傳工具，並協助該領域的其他生物學家進行研究。本研究接受機器學習和大數據時代來確定 BLCA 中 *STING1* 的預測因素。



圖一: National Institute Health(N.I.H)如何分類不同癌症特徵

資料屬性	兩群獨立樣本	三群以上獨立樣本	相關	前後測比較
連續資料	Independent t test	ANOVA	Pearson Correlation	Paired t test
序位資料 (連續無母數)	Wilcoxon Rank Sum test (Mann-Whitney U test)	Kruskal-Wallis test	Spearman's rho	Wilcoxon signed-rank test
類別資料	Chi-square (χ^2) test ➢ Fisher's exact ➢ Yate's 校正數	Chi-square (χ^2) test		McNemar's test

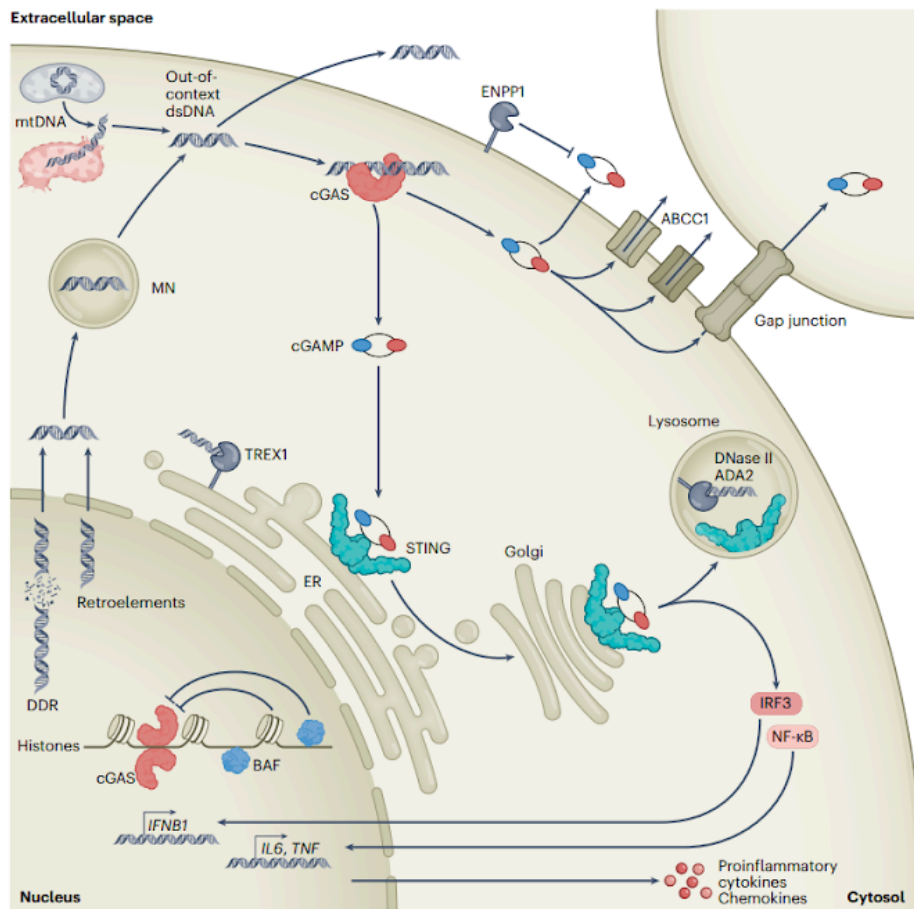
圖2: 臺中榮民總醫院統計學

(四) *STING1* 的已知遺傳和功能特徵

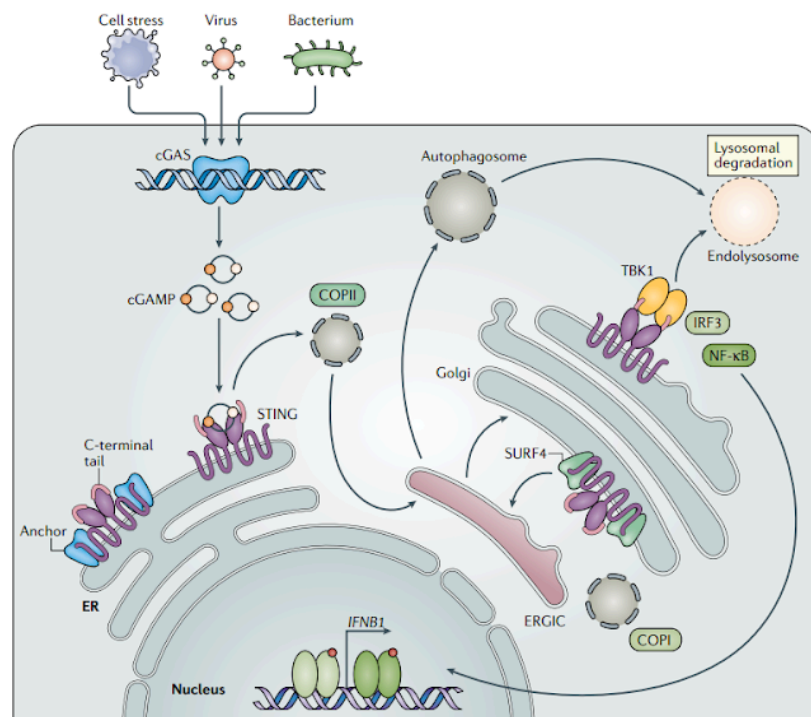
STING1 (干擾素反應刺激物cGAMP交互作用子1)，又稱*TMEM173* (人類跨膜蛋白173)，編碼一個五跨膜蛋白，與cGAMP或其他環狀二核苷酸結合，在胞質核酸模式辨識與細胞凋亡中發揮重要作用，並與 II 型主要組織相容性複合體 (MHC II) 訊號互相傳導 (Uniprot, 2024)。從生理學上講，*STING1* 可以保護細胞免受細菌感染和病毒插入 DNA，根據細胞環境和癌症，*STING1* 可能在一些最常見的人類癌症 (如結腸癌、肺癌和乳癌) 中充當癌基因或抑癌基因，最近的研究確定*STING1* 的過度表達是與腎細胞癌發展相關的遺傳機制 (Pu, 2022)。*STING1* 表現量可能作為許多癌症誘發因素的獨立預測因素。

(五) CGAS 和 *STING1* 途徑

STING1 在代謝途徑中最顯著的相互作用之一是與 *CGAS* (*C6orf150*)，並針對感染、細胞壓力和組織損傷的發炎產生反應，從而防止腫瘤細胞增殖。體外(vitro)實驗揭示了致癌的信號通路是環GMP-AMP合成酶 (*cGAS*) 產生環GMP-AMP，然後與兩分子*STING1*結合導致*STING1* 易位(translocate)至高爾基體網絡，並透過與干擾素調節因子 3 (*IRF3*) 和核因子 kappa B (*NFκb*) 等轉錄因子相互作用，激活關鍵發炎基因的轉錄，包括 *IL-6*、腫瘤壞死因子(*TNF*) 和干擾素(*IFN*) α 和β (Marletta S, 2023) (圖三)。*NFκb* 的活化增加了*IL-6* 的表達並上調了 STAT3 依賴性訊號傳導，從而導致癌細胞存活和腫瘤相關發炎反應的沉默 (Wang Y., 2023)。*STING-cGAS* 路徑的另一個組成部分是將*STING1* 錨定在內質網中，它與 TANK 結合激酶 1 (TBK1) 結合，啟動自磷酸化並招募干擾素調節因子 (*IRF3*)，然後 TANK 結合激酶 1 (TBK1) 對 *IRF* 進行磷酸化，使核仁二聚化並移位，以誘導促凋亡(apoptotic)基因和趨化素 (chemokine) (Decout, 2021) (圖四)。



圖三:腫瘤細胞中的 *cGAS-STING* 途徑(Samson 2022)



圖四:*cGAS-STING* 訊號通路概圖

貳、研究目的

- 一、探討**STING1**量的多寡與膀胱癌病人癌症表現量的關係。
- 二、探討**STING1**量的多寡與膀胱癌病人的生存狀況。
- 三、探討**STING1**基因量的改變與其他同時改變的基因彼此的關係。
- 四、探索**STING1**的轉譯產物與其他蛋白質的相互作用。
- 五、利用基因富集分析，探討**STING1**在膀胱癌中的潛在功能與路徑。
- 六、透過TISIB數據，探討**STING1**與免疫調節劑的關聯，並尋找潛在的生物標記。

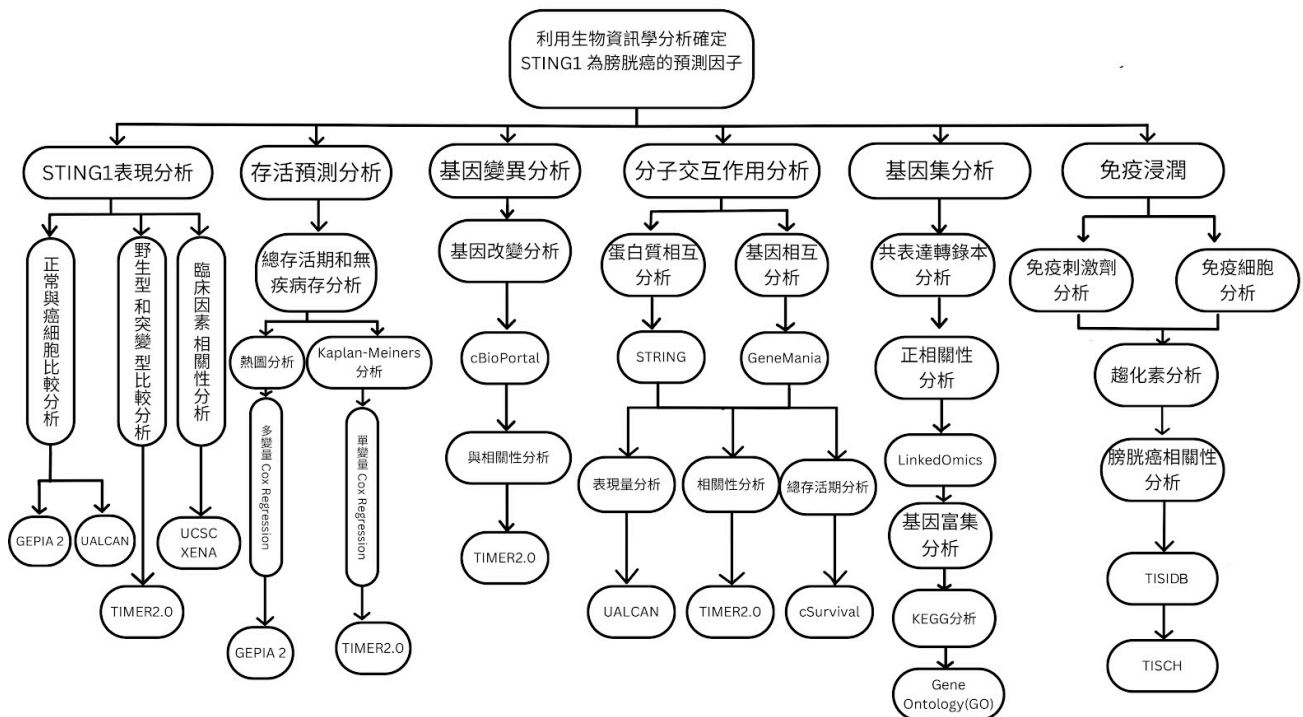
參、研究設備及器材

一、生物資訊學軟體

- (一) GEPIA 2 (Tang Z, 2019)
- (二) TIMER 2.0 (Li T, 2020)
- (三)UALCAN (Chandrashekar DS, 2017)
- (四)cBioportal(de Bruijn et al., 2023)
- (五) STRING(Szklarczyk D , 2021)
- (六)GeneMania (Warde-Farley, 2018)
- (七)LinkedOmics (Vasaikar 2018)
- (八)Gene Ontology(GO) (Thomas 2017)
- (九)SRPlot (Tang D, 2023)
- (十)TISIDB (Ru B, 2019)
- (十一) cSurvival (Cheng X, 2019)
- (十二)UCSC Xena (Goldman, 2020)
- (十三)TISCH1 (Li, 2021)

肆、研究過程或方法

一、實驗架構



二、*STING1*表現分析

本研究使用GEPIA2平台探討了癌症組織和正常組織之間 *STING1* 的 mRNA 表現量，並且用UALCAN再次確認*STING1*的mRNA表現量無誤。透過TIMER2.0 的Gene Mutation module 來評估*TRIM56*與*PSIP1* 突變型與野生型和BLCA的影響。

在UALCAN資料庫上，以20歲為間隔的患者年齡和淋巴結轉移的狀態，進一步分析BLCA腫瘤不同階段的*STING1*表現。GEPIA2中的基因/轉錄表現的表示為 $\log_2$ [每百萬轉錄物 (TPM)] 或 $\log_2$ (TPM + 1)；透過 TIMER2.0 中的 $\log_2$ 將RNA-Seq 期望最大化 (RSEM)。本研究認為 $p < 0.05$ 代表有顯著差異。

本研究從 UCSC Xena 平台上，下載了截至 2023 年 6 月 11 日的 436 例膀胱癌 (BLCA) 樣本的臨床資料與核糖核酸定序 (RNA-Seq) 數據。UCSC Xena 顯示了美國癌症聯合委員會

(AJCC) 的 T 分期和 N 分期的分類數據、淋巴血管侵犯的存在、手術切緣、淋巴結的表現、以及物質使用情況。在物質使用方面，根據患者是否有活躍(active)或任何(ever)香煙使用，將其分為陽性或陰性使用者。本研究利用這些數據，並根據 *STING1* 表現與這些臨床因子的關聯性，對數據進行了平均值、標準差和中位數的計算，從而分出高與低*STING1*表現。

三、存活預測分析

存活預測分析是一種統計方法，它是用來處理事件發生的時間數據，例如死亡、復發或癌症復原的時間，存活預測分析的目的是預測並比較不同組別患者的生存率，並連結各種因素或治療對存活率的影響。

本研究將*STING1*預測存活的狀況製成存活圖和 Kaplan-Meier 曲線，是利用從TCGA 數據的GEPID2 生成 *STING1*的整體存活期(OS)和無病存活率(DFS)。根據資料庫的定義，前50%的表現表現被認為是高*STING1*組(Lin, 2023)。為了進一步測試*STING1*表現是否與BLCA的其他變數相關，本研究進行了單變量和多變量Cox Regression分析，TIMER2.0 產生單變數 Cox 迴歸的原始數據，並進一步組織成森林圖。

四、基因變異分析

從 2017 TCGA 發表關於膀胱癌的文獻中，本研究先使用 cBioPortal 平台來探討不同基因變化(Gene alteration)，像基因突變與基因異常。在*STING1*基因表現的關聯上確定了最常發生*STING1*變化的基因後，本研究透過 q 值和 p 值估計了這些核心基因與*STING1*改變的遺傳共現性。接下來，本研究使用Timer2.0的「Gene_Corr」驗證了*STING1*表現與主要基因的關聯，繪製相關曲線並找出具有最高改變頻率的最顯著改變基因。

五、分子交互作用分析

本研究使用 STRING 資料庫來探索 *STING1* 在文本挖掘(text mining)、共表現(co-expression)、蛋白質同源性(protein homology)、實驗確定的(experimentally determined)，來自精選資料庫(from curated database)與基因共現(gene co-occurrence)中的蛋白質間相互作用。LinkedOmics透過與 *STING1* 相關共表現基因交叉識別了重要的蛋白質，然後在 TIMER 2.0 上測試了它在 mRNA 層面上的相關性。GeneMania 透過吸引基因的共表現(co-expressed)、

共定位(co-localization)、基因功能和相關途徑的資訊進一步驗證了 *STING1* 與重要蛋白質之間的關聯。UALCAN確認蛋白質的基因的mRNA表現量，並且生成整體存活率。

六，基因集分析

基因集分析是將一組基因分類為具有相似遺傳特徵或功能的基因組的方法，並納入 Gene Ontology (GO) 術語中豐富地描述基因特性。GO 術語是受控詞彙，在本例中，本研究描述了Biological Process (BP) 資料庫來進行分類分析 (NTUHMC, 2018)。

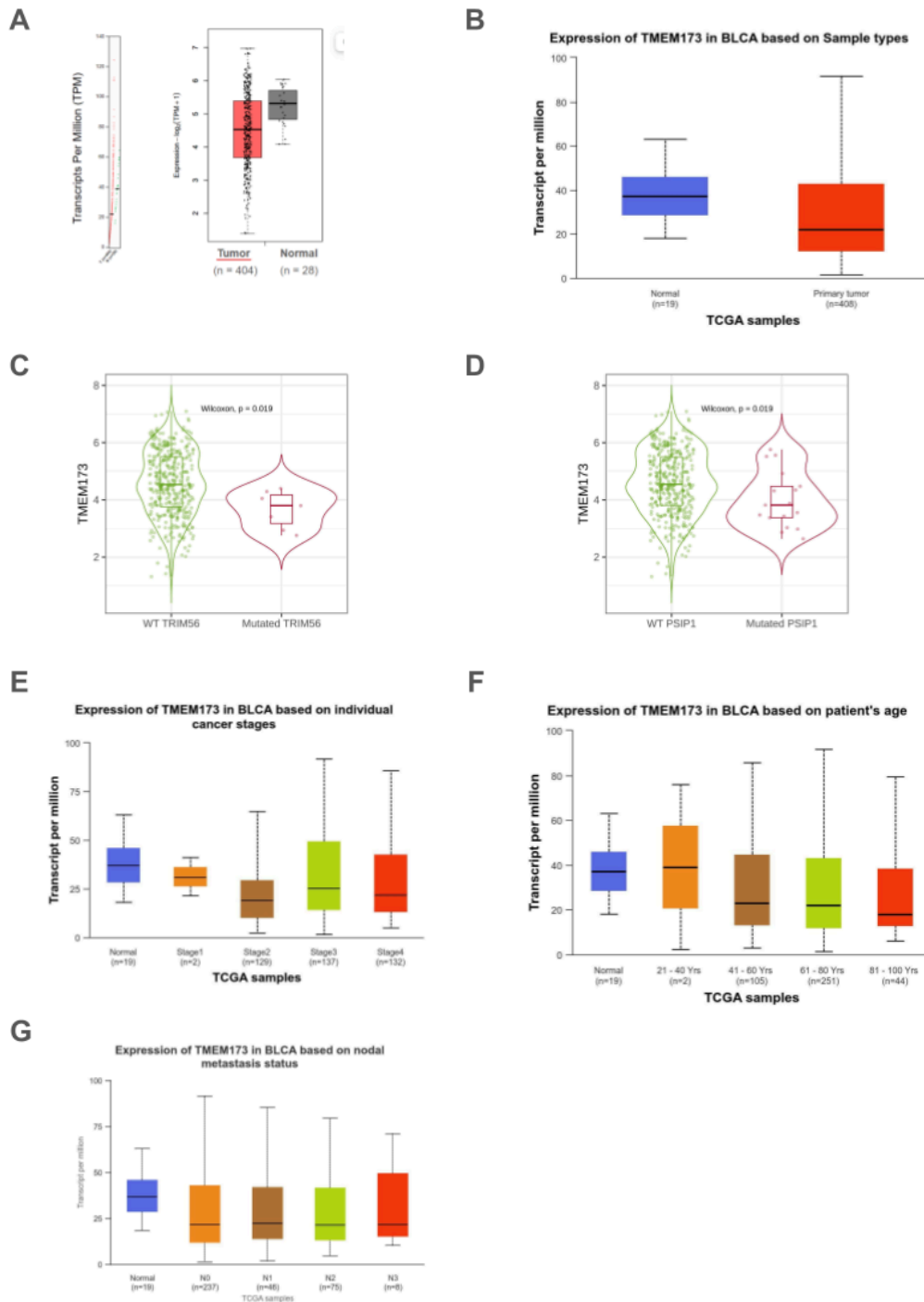
首先，本研究使用LinkedOmics資料庫下載BLCA患者的RNAseq或mRNA資料集，並取得BLCA病例的*STING1* mRNA表現和其他臨床資訊。從 LinkedOmics 識別出 20,044 個基因後，產生與 *STING1* 相關的所有轉錄本(transcript)的火山圖。此外，還提供了 *STING1* 表現前 50 個正相關和負相關轉錄基因的熱圖。這些是共表現基因(co-expressed)，被選擇並轉換成 txt 檔案以進行 GO (Gene Ontology) 分析。透過結合共表現基因和整個 *STING1* 資料集，GO 識別了生物過程中最重要的基因集。 $p < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$ 被認為是顯著的。SRPlot 將基因集組織成為長條圖以便更清楚地分析，基因集分析(GSEA)利用京都基因百科資料庫(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)的途徑來分析模擬 BLCA 資料集中最少 3 個基因 (size) 進行500次模擬。

七，免疫浸潤

首先，本研究透過TISIDB中immunomodulatory轉錄物的關聯，並且篩選了具有與 *STING1* 表現相關的顯著浸潤估計值的免疫細胞，轉換成Spearson Correlation Test圖形。接下來使用「Immune_Gene module」在 TIMER2.0 中驗證辨識出的免疫細胞，以Spearson各式呈現 *STING1*表現相關的顯著浸潤估計值。其中，本研究使用不同的演算法(包括TIMER、EPIC、QUANTISEQ、XCELL、MCP-COUNTER、CIBERSORT和CIBERSORT-ABS)，選擇了在相同方向上顯著相關的免疫細胞。最後，本研究將TISIDB資料庫和TIMER2.0的相關結果與免疫相關分子和免疫檢查點進行了相鄰比較。Spearman 相關性檢定分析了關聯性， p 值小於 0.05 表示統計顯著性。此外，本研究使用 TISCH (單細胞核糖核酸定序 (scRNA-seq) 數據庫) 來探索來自兩個 GEO 隊列的不同大體腫瘤中的 *STING1* 表現，以進一步提高本研究對 *STING1* 表現量在調節免疫細胞浸潤方面的理解。

伍、研究結果

一、*STING1* 轉錄本在 BLCA 的負調控



圖五: *STING1* 在膀胱癌 (BLCA) 患者表現分析 (A) GEPIA 2 圖解 BLCA 中腫瘤 (tumor) 和鄰近正常 (tumor) 組織中 *STING1* 轉錄本的差異表達 (B) UALCAN 顯示正常 ($n = 19$) 和原發腫瘤 ($n = 404$) 的 *STING1* 轉錄本的箱線圖. (C) TIMER 2.0 比較具有 *TRIM56* 野生型 (WT) 和突變型 (D) TIMER 2.0 的 BLCA 中的 *STING1* 表現比較具有野生型 *PSIP1* (WT) 和突變的 BLCA 中的 *STING1* 表現 (E) 不同癌症

進展階段腫瘤組織中的中*STING1*表現 (F) 不同患者年齡腫瘤組織中的中*STING1*表現 (G) 基於淋巴結轉移狀態的BLCA中*STING1*表現

圖五A中，與正常組織相比，癌細胞中*STING1* mRNA表現量顯著降低 ($p < 0.01$ ， $q < 0.01$)，並且這是在所有不同階段和淋巴結轉移中均一致 (圖五E、G)。透過使用 *STING1* mRNA 表現的中位數作為 436 名 BLCA 患者高表達表現和低表達表現的分界線，本研究發現 BLCA 患者中 *STING1* 表現從低級別(low grade)到高級別(high grade) BLCA 顯著下降 ($p = 6.8 \times 10^{-3}$) (表1)。本研究發現，在正常年齡和 61-81 歲 ($p = 2.729 \times 10^{-2}$) 和 81-100 歲 ($p = 2.027 \times 10^{-2}$) 之間，*STING1*表現顯著下調 (圖五F)。此外，在*STING1* 轉錄數量(n=19)和 *STING1* mRNA數量(n = 406)上有顯著差異 ($p = 2.178 \times 10^{-2}$)(圖五B)。在圖五C 的 Wilcoxon Rank Sum 檢定中，較低的 *STING1* 表現與較高的 *TRIM56* 突變率相關 ($p = 1.9 \times 10^{-3}$)。本研究也發現 *PSIP1* 突變體和野生型之間的 *STING1* 表現有顯著差異 ($p = 6.9 \times 10^{-2}$) (圖五D) 這些發現可以證明在BLCA組織中，*STING1*的負調控(downregulation) 在轉錄和轉譯層級的變化。

表格1: *STING1* 表現與這些臨床因子的關聯性

Characteristics		Mean $\pm$ SD		Mean value		Medium Value		p - value
	n = 436	<i>STING1</i> level	p - value	<i>STING1</i> -H	<i>STING1</i> -L	<i>STING1</i> -H	<i>STING1</i> -L	
Age			0.6241					0.64
	< 60	91 9.03 $\pm$ 1.08		42	49	43	48	
	≥ 60	335 9.02 $\pm$ 1.14		164	171	170	165	
Gender			0.006617					0.0086
	male	311 8.93 $\pm$ 0.43		152	159	143	168	
	female	115 9.26 $\pm$ 1.08		64	51	70	45	
Subtype			0.004839					0.0026
	Papillary	137 8.77 $\pm$ 1.08		64	73	53	84	
	Non-papillary	285 9.14 $\pm$ 1.13		151	134	155	130	
MIBC			0.8162					0.577
	Yes	245 9.01 $\pm$ 1.15		116	129	120	125	
	No	65 9.05 $\pm$ 1.28		34	31	35	30	
Smoking			0.7787					0.7401
	ever/active	298 8.98 $\pm$ 1.15		148	150	148	150	
	no	112 9.09 $\pm$ 1.07		53	59	58	54	
Grade			0.02924					0.0068
	Low	21 8.61 $\pm$ 0.85		9	12	4	17	
	High	423 9.02 $\pm$ 0.84		204	219	209	214	
LVI			0.5662					0.0759
	Yes	160 9.06 $\pm$ 1.16		85	75	87	69	
	No	132 8.99 $\pm$ 1.19		60	72	59	73	
AJCC T			0.0003653					0.0174
	1+2	127 8.92 $\pm$ 1.08		63	64	52	75	
	3+4	265 9.17 $\pm$ 1.11		136	129	144	121	
AJCC N			0.8764					0.9042
	0	247 9.02 $\pm$ 1.13		117	130	120	127	
	N+	137 9.10 $\pm$ 1.09		50	87	72	65	
Stage			0.07861					0.1175
	1+2	136 8.84 $\pm$ 1.09		74	61	60	75	
	3+4	288 9.12 $\pm$ 1.12		140	148	153	135	

* MIBC: Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer(肌肉侵犯性膀胱癌); LVI: lymphovascular invasion(淋巴血管侵犯); AJCC: American Joint Committee of Cancer

表格2: *STING1* mRNA 表現與解剖亞位點臨床變數的關聯

		Papillary			Non-Papillary		
Characteristics		n = 137	<i>STING1</i> level Mean $\pm$ SD	p - value	n = 285	<i>STING1</i> level Mean $\pm$ SD	p - value
Age	< 60	40	8.9 $\pm$ 0.9	0.421	50	9.56 $\pm$ 0.88	0.0002
	$\geq$ 60	96	9.73 $\pm$ 0.64		229	10.6 $\pm$ 0.34	
Gender	male	108	8.7 $\pm$ 1.1	0.0897	199	9.07 $\pm$ 1.14	0
	female	29	9.06 $\pm$ 0.97		85	9.32 $\pm$ 1.11	
MIBC	Yes	85	8.84 $\pm$ 1.07	0.1889	158	9.10 $\pm$ 1.18	0.1811
	No	17	8.35 $\pm$ 1.42		39	9.39 $\pm$ 1.18	
Smoking	ever/active	90	8.65 $\pm$ 1.11	0.1292	204	9.12 $\pm$ 1.15	0.3125
	no	40	8.95 $\pm$ 1.01		71	9.15 $\pm$ 1.11	
Grade	Low	18	8.52 $\pm$ 0.85	0	3	9.16 $\pm$ 0.69	0
	High	117	8.82 $\pm$ 1.11		280	9.14 $\pm$ 1.14	
LVI	Yes	48	8.86 $\pm$ 1.18	0	107	9.19 $\pm$ 1.14	0.5003
	No	45	8.84 $\pm$ 1.17		87	9.08 $\pm$ 1.23	
AJCC T	1+2	64	8.74 $\pm$ 1.04	0.408	69	8.90 $\pm$ 1.11	0.1109
	3+4	65	8.96 $\pm$ 1.16		213	9.22 $\pm$ 1.12	
AJCC N	0	90	8.75 $\pm$ 1.07	0.4703	154	9.18 $\pm$ 1.13	0.7468
	N+	33	8.65 $\pm$ 1.08		94	9.25 $\pm$ 1.07	
Stage	1+2	64	8.74 $\pm$ 1.04	0.7803	71	8.92 $\pm$ 1.14	0.0575
	3+4	69	8.79 $\pm$ 1.07		213	9.22 $\pm$ 1.12	

* MIBC: Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer(肌肉侵犯性膀胱癌); LVI: lymphovascular invasion(淋巴血管侵犯); AJCC: American Joint Committee of Cancer

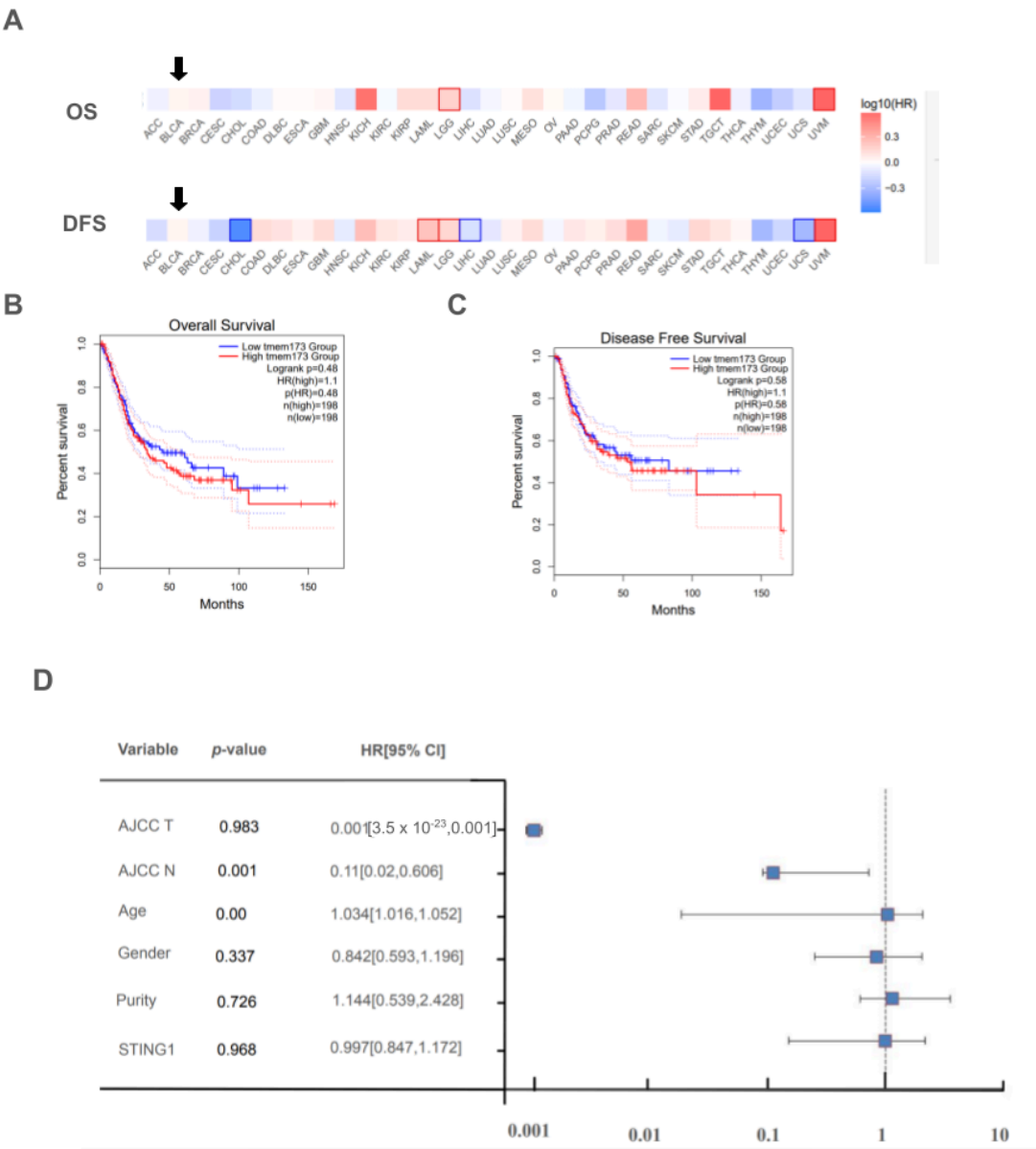
二、高*STING1*表現量為良好的BLCA病人預測因子

(一)高*STING1* 表現量與BLCA的有利預測臨床因子

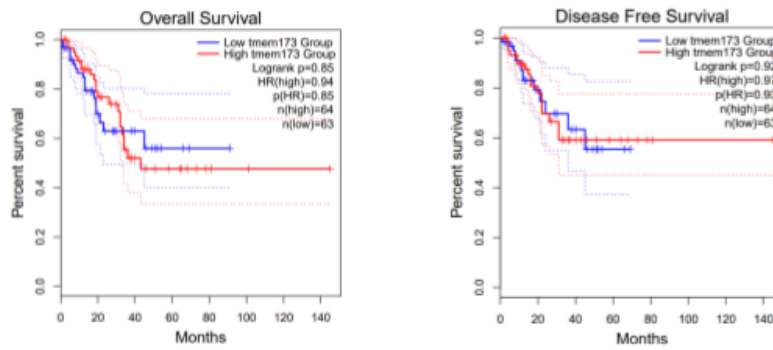
*STING1*病人平均年齡為68.14歲，範圍為34歲至90歲，平均追蹤時間為68.13個月。由於乳頭狀和非乳頭狀 BLCA 的不可預測性，對 137 例乳頭狀患者 (32.5%) (其中 62% 為 MIBC) 和 285 例非乳頭狀患者進行了單變量分析。如圖所示，低 *STING1* 表現與性別 ($p = 8.6 \times 10^{-3}$)、AJCC N ($p = 4.18 \times 10^{-2}$)、進階 AJCC T 分類 ($p = 1.74 \times 10^{-2}$) 以及癌症級數相關 ($p = 6.8 \times 10^{-3}$) (表1)。根據中位數截止值(cut-off)將436 名BLCA 患者進一步分為兩個亞組：*STING1-high*($n = 213$) 和*STING1-low*($n = 223$)，用Fisher Exact Test 算p-value，顯示高*STING1* 表現與四種臨床因子呈正相關: (1)女性($p = 8.6 \times 10^{-3}$)、(2)診斷亞型顯著相關乳頭狀 BLCA ($p = 2.6 \times 10^{-3}$)、(3)AJCC T 後分期、及(4)低級別癌症 ($p = 6.8 \times 10^{-3}$)。AJCC N 的 N0(無淋巴結轉移) 與低 *STING1* 表現有顯著相關 (表 1)。多變量分析表明，當*STING1*表現較高時，乳頭狀癌中的癌症侵襲性(aggressiveness)顯著較高，但非乳頭狀癌中的癌症侵襲性(aggressiveness)顯著較低 (表2)。此外，本研究發現高 *STING1*表現 與乳頭狀癌中俱陽性

LVI患者 以及非乳頭狀癌中 60 歲及以上的女性患者有顯著相關（表 2）。

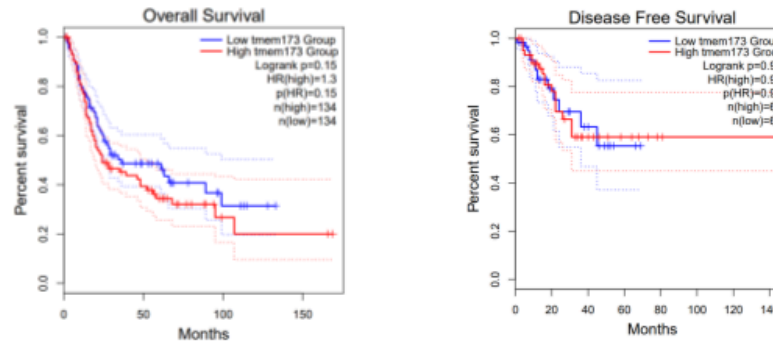
(二)高*STING1*表現量BLCA病人有較久存活率優勢



E



F



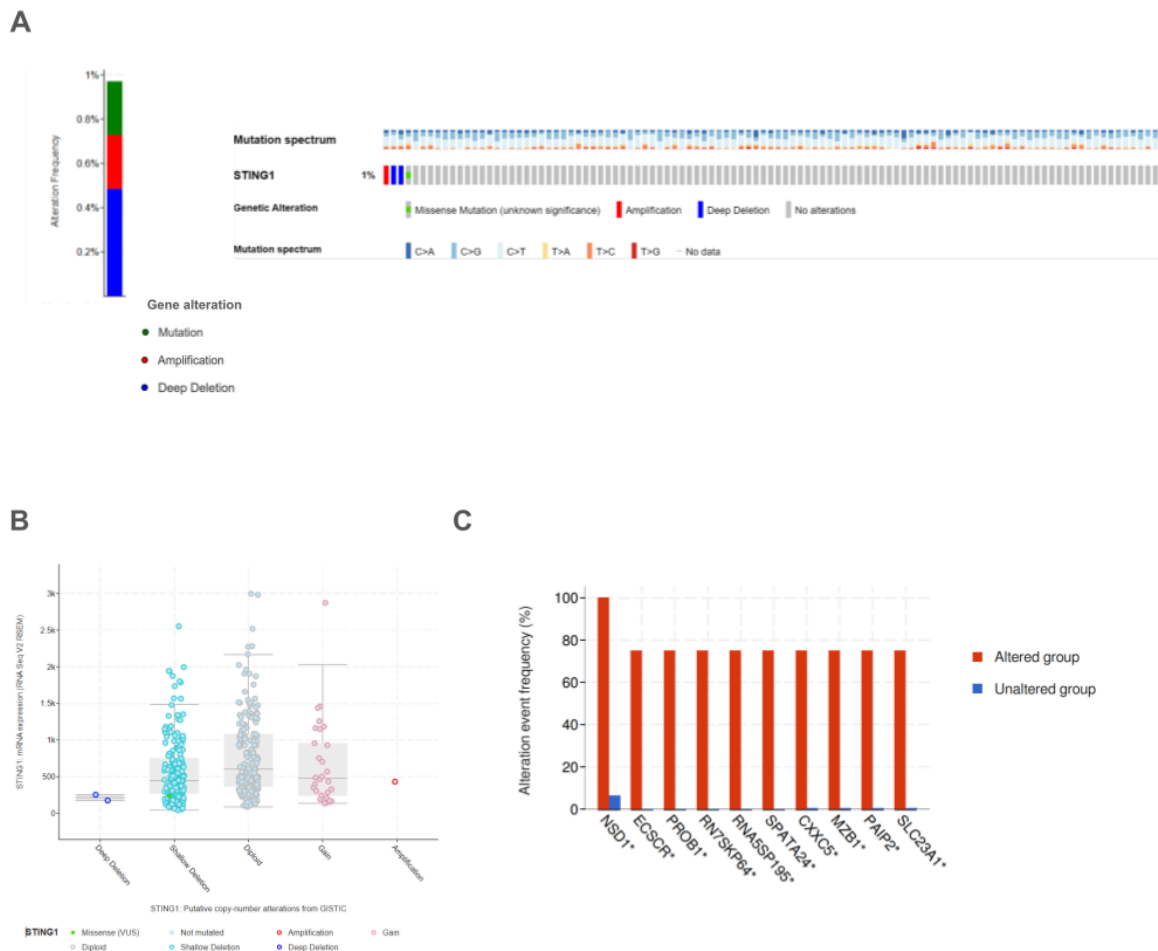
圖六: BLCA患者在*STING1*存活預測分析. (A) GEPIA 2 說明了總存活期(OS) 和無疾病存活熱圖($p < 0.05$) (B,C) GEPIA 2 進行了顯示OS 的Kaplan-Meiers分析高和低 *STING1* 表現之間 BLCA 患者的 OS 和 DFS。 (D) 單變量 Cox Regression分析顯示 TIMER2.0 中不同變數的風險比 (HR) (E,F) UALCAN 顯示非乳頭狀和乳頭狀 BLCA 患者的 Kaplan-Meiers 圖 OS

圖六A顯示了TCGA資料集中各種癌症的生存熱圖。對於BLCA，總生存期 (OS) ($HR = 1.1, p = 0.48$) 與無病存活率 (DFS) ($HR = 1.1, p = 0.58$) Kaplan-Meier曲線表明低*STING1* 表現量的患者死亡率以更快的速度增加 ($HR = 0.78, p = 0.098$)，(圖六B, C)。圖六D 中的單變量 Cox Regression模型資料集識別出高 AJCC N 表現 ($p = 0.001$)，高年齡表現 ($p = 0.00$) 對 OS 有正面影響。多變量分析顯示，乳頭狀 ($HR = 0.97, p = 0.92$) 和非乳頭狀 ($HR = 0.97, p = 0.93$)。這些發現表明 *STING1* 表現量可能與 BLCA 患者生存有正相關趨勢。總體來說，上述研究結果表明*STING1* 表現可能是非乳頭狀或乳頭狀 BLCA 患者的趨勢。

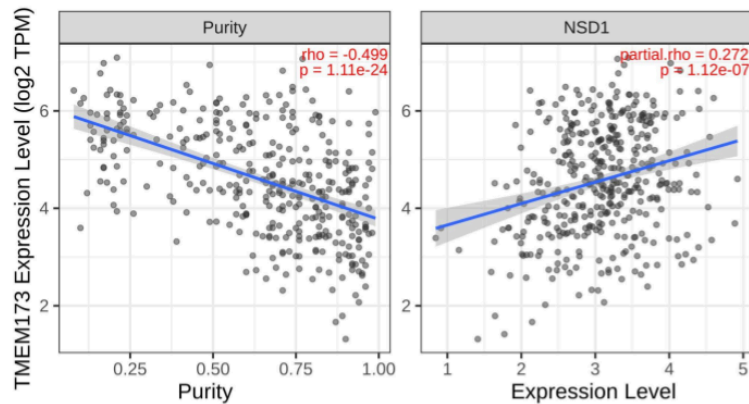
三、BLCA 患者中 *STING1* 與 *NSD1*改變呈正相關

為了尋找*STING1*基因改變與其他基因改變的相關性，本研究對 Nature 2017的 BLCA/TCGA中*STING1*的基因改變進行了分析，總共413 BLCA患者，結果顯示其改變率為 1%，深度缺失率(deep deletion)為0.49%，擴增率為0.25%，突變率為0.25% (圖七A)。從圖七B可以看出，由於突變譜中藍色占大多數，佔據最大百分比的基因擴增與*STING1*表現呈負

相關。進一步分析與*STING1*基因變異交替出現的最頻繁改變的基因，確定了核受體結合SET結構域蛋白1 (*NSD1*)、內皮細胞表面表達趨化和凋亡調節因子 (*ECSCR*)、富含脯氨酸的鹼性蛋白1 (*PROB1*)、*RN7SKP64*和Spermatogenesis Associated 24(*SPATA24*)，頻率由高到低排列 (圖七C)。就顯著性而言，*STING1*與*NSD1*($q = 0.0302$) , *ECSCR* ($q = 1.534 \times 10^{-3}$) , *PROB1*($q = 1.534 \times 10^{-3}$) , *RN7SKP64*($q = 1.534 \times 10^{-3}$) , *RNA5SP195*($q = 1.534 \times 10^{-3}$) , *SPATA24*($q = 1.534 \times 10^{-3}$)有顯著共現(co-occur)關係。對TIMER 2.0的*STING1*表現與共現基因之間的額外分析發現，*NSD1*與*STING1* mRNA表現顯著相關($r = 0.272$, $p = 1.12 \times 10^{-7}$)(圖七D)。因此，當*NSD1*的調控存在問題，而異變或異常，加上*STING1*得參與，可能會導致BLCA的癌症發展。



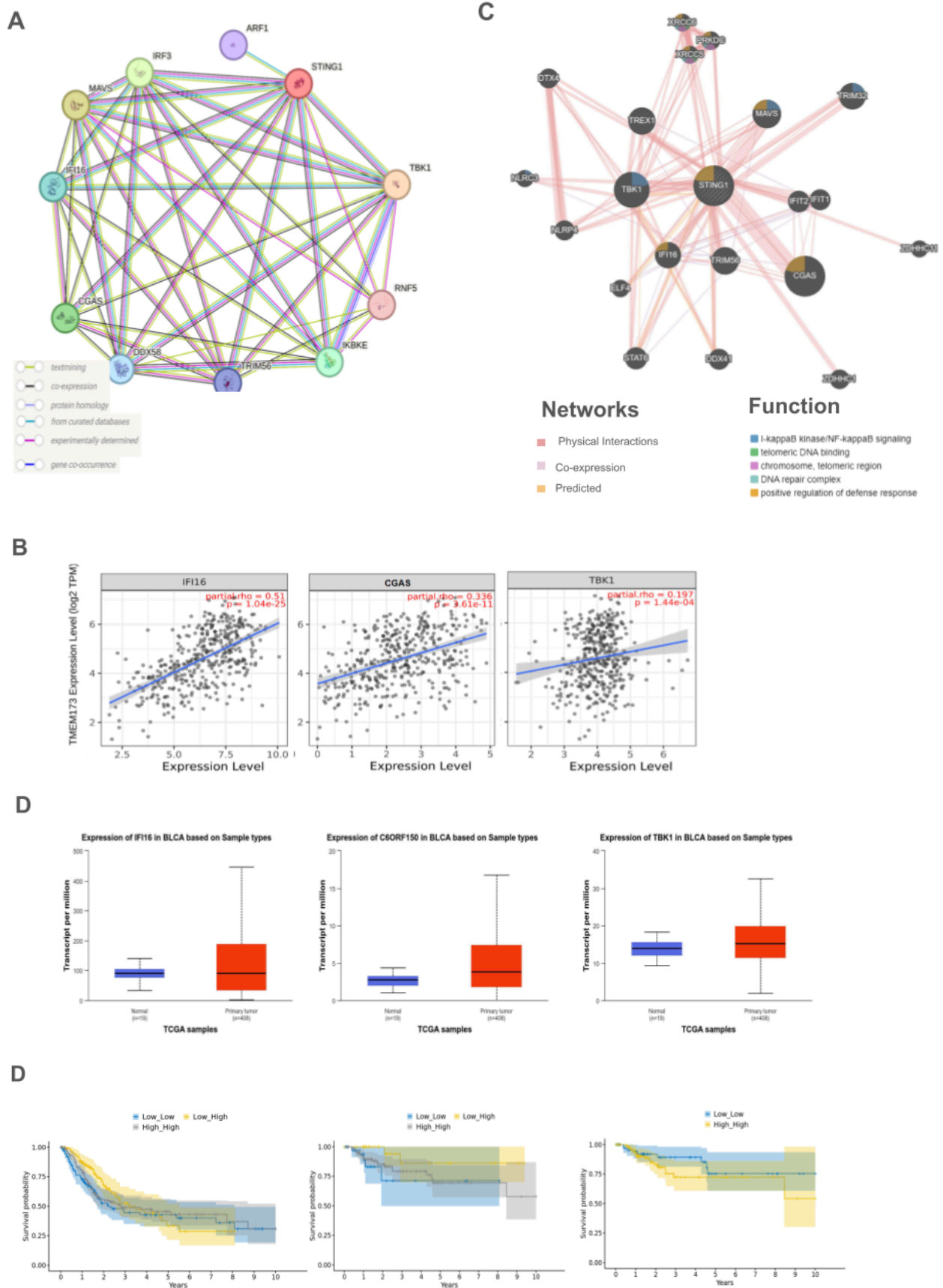
D



圖七: *STING1* 基因改變與相關性分析在BLCA患者中(A) cBioportal 顯示不同顏色表示不同的 *STING1* 基因改變 (B)cBioportal oncoprint 上顯示了突變頻率和頻譜 (C) BLCA (n=413) 中發生 *STING1* 改變頻率最高的改變基因 (D) TIMER2.0分析 *STING1* mRNA表現與NSD1 (右) 和腫瘤純度 (左) 的基因相關性

四、 *STING1* 的轉譯產物與其他蛋白質的相互作用

STRING資料庫已經辨識出11個可能與 *STING1* 有關聯的蛋白質(圖八A)。將 *STING1* 相關共表現(co-expression)基因相關蛋白的對應基因輸入LinkedOmics、*IRF3* ($p = 8.474 \times 10^{-39}$)、*IFI16* ($p = 1.511 \times 10^{-37}$)、*DDX58* ($p = 2.26 \times 10^{-23}$)、*CGAS* ($p = 1.295 \times 10^{-12}$)、*MAVS* ($p = 3.95 \times 10^{-3}$)、*TRIM56* ($p = 4.885 \times 10^{-2}$)、*ARF1* ($p = 1.395 \times 10^{-1}$)、*TBK1* ($p = 1.31 \times 10^{-1}$)與 *RNF5* ($p = 6.989 \times 10^{-1}$)，透過比較 *STING1* 與共表現蛋白的相關性在TIMER2.0上，*IFI16* ($r = 0.51, p = 1.04 \times 10^{-25}$)，*cGAS* ($r = 0.336, p = 3.61 \times 10^{-11}$)，and *TBK1* ($r = 0.197, p = 1.44 \times 10^{-4}$) 是具有顯著相關性的蛋白(圖八B)。文本挖掘也識別了細胞質活化先天免疫中由 *cGAS/STING* 介導的粒線體因子的突變 (Chen W, 2017)。GeneMania 進一步證明 *STING1* 與 *IFI16*、*cGAS* 和 *TBK1* 共表現和共定位。功能分析顯示其他共表現轉錄本可能與其他共表現轉錄本可能與「I-kappaB激酶/NF-kappaB訊號傳導」、「端粒DNA結合」、「染色體耐受區」、「DNA修復複合物」和「防禦反應的正向調節有關」($FDR < 0.05$) (圖八C) 本研究發現顯著上調 *cGAS* ($p = 1.6247 \times 10^{-12}$)，*IFI16* ($p = 4.2108 \times 10^{-5}$)，and *TBK1* ($p = 4.786 \times 10^{-4}$) 在BLCA瘤腫(tumor)組織 ($p = 0.0041$) (圖八D上)，並且在含有低 *IFI16* ($p = 0.31$)，*cGAS* ($p = 0.14$)，and *TBK1* ($p = 0.27$) 表現量的BLCA患者相較良好的無疾病存活熱(disease-free survival) (圖八D下)

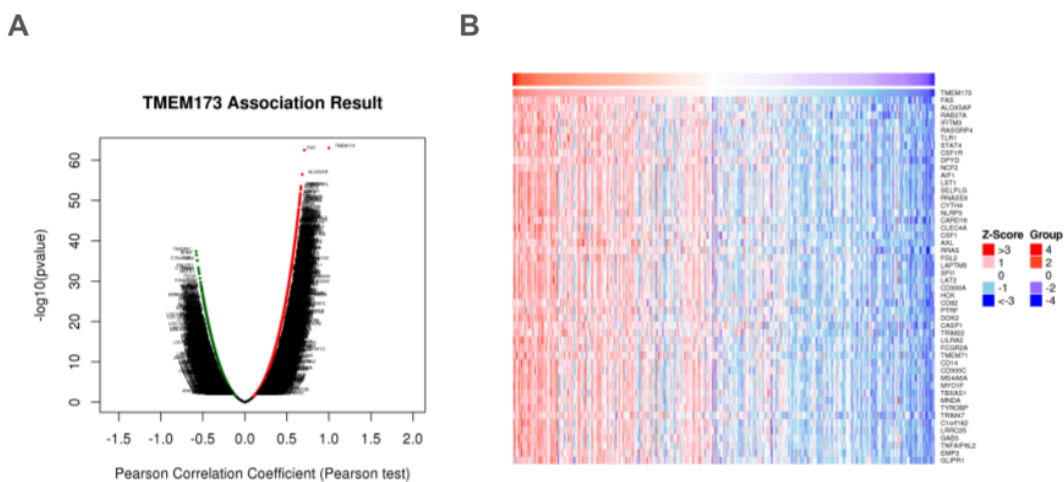


圖八: *STING1* 的翻譯產物與其他蛋白質的相互作用 (A) STRING 資料庫顯示 *STING1* 相互作用的基因或蛋白質網絡 (B) 在 TIMER2.0 資料庫，BLCA 患者中共表現的 IFI16, cGAS, and *TBK1* 和 *STING1* 潛在相互作用 (C) GeneMania 資料庫顯示基因與基因間相互作用 (D)

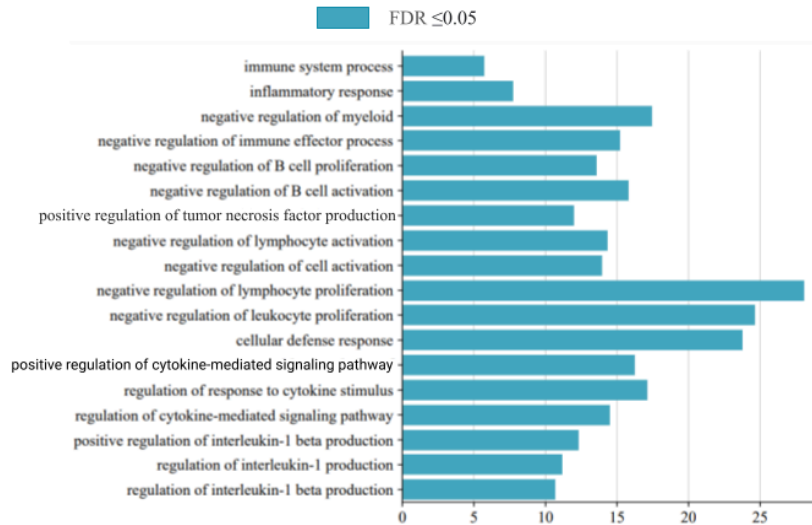
UALCAN分析出 *IFI16*, *cGAS*, and *TBK1* 表現量在BLCA瘤腫(tumor)組織與正常(normal)組織(上)(D)Survival 顯示了 *IFI16*、*CGAS*、*TBK1* 的無疾病存活率(DFS)(下)

五、基因富集分析，*STING1*在BLCA中的潛在功能與通路

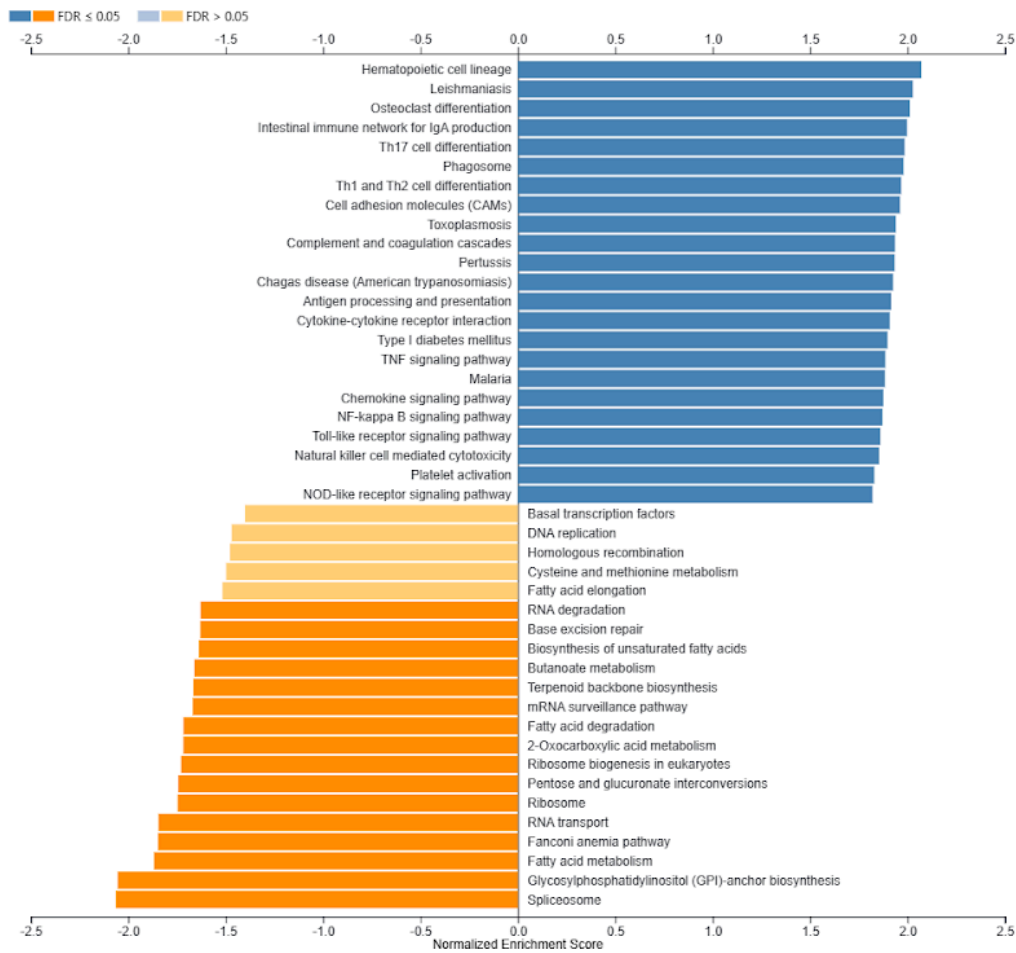
為了探討 BLCA 中 *STING1* 的潛在功能和通路，本研究在圖九A 中確定了總共 20,044 個與 LinkedOmic 資料顯著相關的火山圖 ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$)。圖九B顯示了與*STING1*正相關的前50個基因。透過 GO 分析對相關基因進行進一步分析，建立基因富集長條圖。在圖九C 中的 GO 項中，重要且最顯著的 GO 項含「腫瘤壞死因子產生的正調節」富集比 = 11.97 ($p < 0.05$ 且 $FDR < 0.05$)。其他GO 術語「淋巴細胞增殖的負調節」(富集比= 28.56)、「淋巴細胞增殖的負調節」(富集比= 17.1)、「白血球介素1 產生的調節」(富集比= 11.13)和「發炎反應」(富集比= 7.73) ($p < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$)。其他GO 術語「蛋白質-DNA 複合體組織」(富集比= 5.63)、「RNA 生物合成過程的調節」(富集比= 2.97)、「RNA 聚合酶II 的轉錄調節」(富集比= 2.82) ($p < 0.05$, $FDR < 0.05$)。圖九D 的 KEGG 分析包括「NF-kappa B 訊息傳遞路徑」、「Toll 樣受體訊號路徑」、「自然殺手細胞介導的細胞毒性」、「DNA 複製」和「mRNA 監視路徑」，顯示*STING1*在 BLCA 患者的細胞週期調節和轉導免疫訊號傳導中發揮作用。 ($p < 0.05$, $FDR < 0.05$)。



C



D



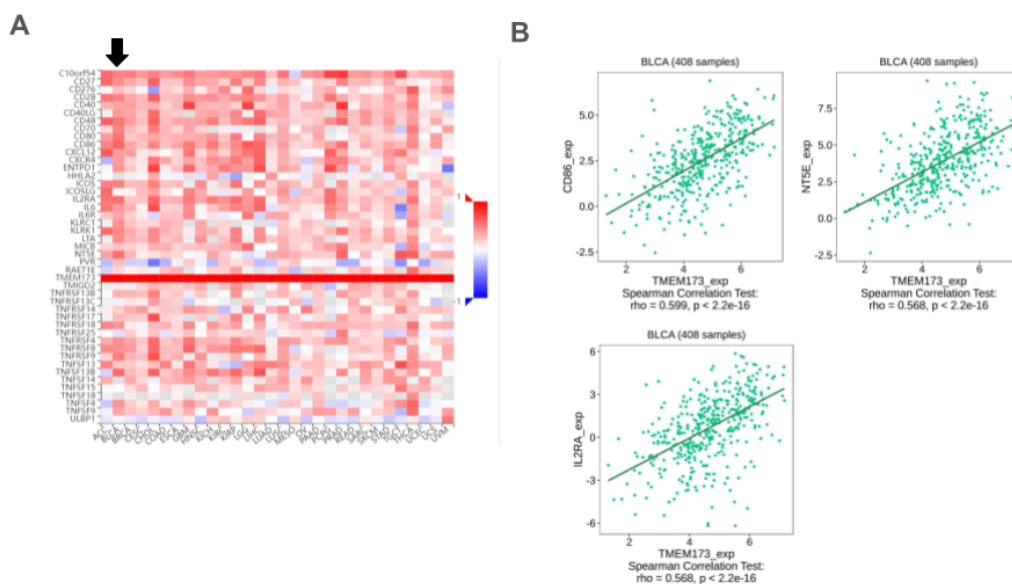
圖九: *STING1* 相關轉錄本和富集分析(A)LinkedOmics 展示了 Pearson 相關分析中 20,044 個 *STING1* 共表現轉錄本的火山圖。紅色為陽性；綠色為陰性(B) 熱圖顯示前50 個轉錄本正相

關基因(C) GO 顯示在富集GO (生物過程) 中顯著分類的共表現轉錄物 ($p < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$) (D) 基因集富集分析顯示共表現轉錄物進入 KEGG 路徑 ($FDR < 0.05$)

六、*STING1*和Immunostimulator之間的關係以及免疫細胞浸潤值

在評估*STING1*表現與免疫調節劑的關聯後，TISIDB資料庫顯示在各種BLCA中低*STING1*表現與免疫刺激劑呈顯著負相關 (圖十A)。從正相關免疫刺激劑的患者中，前四名的免疫刺激劑(immunostimular)是 CD86($r = 0.599, p = 2.2 \times 10^{-16}$)、IL2RA($r = 0.568, p = 2.2 \times 10^{-16}$)和 NT5E($r = 0.568, p = 2.2 \times 10^{-16}$) (圖十B)。這些發現證明，低 *STING1* 表現可能與免疫系無法維持人體正常運作有關，因為高 *STING1* 促進更好應對BLCA的免疫反應。接下來本研究利用TISIDB資料庫對免疫細胞的浸潤情況進行了全面的篩檢 (圖十C)。TIMER2.0 辨識出與 TISIB 熱圖相關性方向相同的免疫細胞。Natural Killer T cell (NKT, $r = 0.666, p < 2.2 \times 10^{-16}$), natural killer cell(NK, $r = 0.658, p < 2.2 \times 10^{-16}$), regulatory T cell(Treg, $r = 0.65, p < 2.2 \times 10^{-18}$), myeloid derived suppressor cell (MDSC, $r = 0.65, 2.2 \times 10^{-18}$), and effector memory CD8 T cell(Tem_CD8, $r = 0.645, p < 2.2 \times 10^{-18}$) 皆與*STING1*表現相關(圖十D)。TISCH 顯示內皮細胞(endothelial)和纖維母細胞(fibroblast)的*STING1*表現比癌細胞高。所有研究結果都揭示了許多免疫生物標記與 *STING1* 表現差異相關，可以作為免疫療法的標靶(圖十G)。

進一步TISIDB分析*STING1*表現與趨化素和受體之間的相關性表明*STING1*可能參與多種免疫分子的調節(圖6E、F)。相關性最高的兩個分子和受體是C-C 基序趨化素配體4 (*CCL4*) 和 C-X-C 基序配體16 (*CXCL16*)，以及C-C 趨化素受體5 型和C-C 趨化素受體6 型(*CCR6*)。這些顯示*STING1*及其共表現基因可能與趨化素和receptors相互作用，參與BLCA腫瘤微環境的重要免疫反應。



癌症類型中趨化素、趨化素受體和 BLCA (箭頭) 的熱圖 (G) TISCH 從兩個 GEO 隊列的微環境顯示腫瘤內12種細胞*STING1*表現($p = 0.05$)

陸、討論

本研究發現*STING1*可以作為膀胱癌的預測趨勢。BLCA 發展的一個潛在機制是 *STING1* 的下調與較高的 *NSD1* 突變率有相關。從臨床因子中，本研究發現高*STING1*表現能預測病人的non-papillary subtype, high grade level, AJCC T stage, 和 AJCC N presence. 此外，*STING1* 與 IFI16、cGAS 和 TBK1 相關，這些在轉錄和轉譯層面上都是各種癌症的特定預測生物標記。GO 的分析支持了 *STING1* 的預測價值，因為它能夠調節 BLCA 腫瘤微環境的細胞凋亡和免疫反應（例如自然殺手細胞和發炎反應）的進展。這是因為 *STING1* 相關共表現基因主要在免疫反應中會富集免疫細胞。最後，免疫刺激劑和免疫分子與*STING1* mRNA表現有顯著相關，調節了免疫細胞的浸潤率。

（一）、*STING1*在不同變數因子下的差異表現

BLCA 中較低的 *STING1* 表現主要歸因於 cBioPortal 突變 (49%) 方面的拷貝數改變。當評估不同的淋巴結轉移時，只有正常組織和沒有任何淋巴結的組織之間存在顯著比較 ($p = 2.299 \times 10^{-2}$)，這與本研究的 AJCC N 相矛盾，AJCC N 應該具有 N1(含淋巴結)。一個可能的原因是在不同微環境下對 BLCA 中的 *STING1* 表現量進行取樣。因為UALCAN在轉錄本層級觀察整體表達，收集到無顯著差異的數據，而AJCC則專注於不同階段的特定*STING1*風險比。

TRIM56 和 *PSIP1* 可能在 BLCA 中 *STING1* 的發病機制裡發揮重要作用。*TRIM56* 是干擾素誘導型 E3 泛素連接酶，其生理學對於檢測胞質雙股 DNA、刺激抗病毒防禦至關重要。潛在的機制是與 *STING1* 的相互作用，導致 *TBK1* 招募。如果在膀胱細胞中過度表達，*TRIM56* 會誘導膀胱癌細胞增殖和遷移(Chen W, 2017)。另一方面，*PSIP1* (*PC4* 和 *SRSF1* 相互作用蛋白 1) 是染色質蛋白，透過招募 DNA 修復因子來控制組蛋白伴侶活性，並與 R 環的轉錄位點相互作用。研究表明，*PSIP1*的過度表現，會導致癌細胞的遷移。因此，乳頭狀癌中高*STING1*表現與淋巴管侵犯和輕微AJCC N淋巴結轉移相關的預後意義可能是這種機制的結果(Jayakumar, 2023)。*PSIP1* 調節RNA pol II 與細胞週期基因啟動子的關聯(Singh DK,2017)，進而無法調節其轉錄，而導致 BLCA 的發病機制。

膀胱癌以生長模式可分類為乳頭狀和非乳頭狀，而乳頭狀癌被定義為薄、手指狀的生長物，通常從膀胱內壁開始延伸到膀胱中心（Watson, 2022），其他的生長模式都是非乳頭狀。本研究發現了(1) 乳頭狀和非乳頭狀大部分是高侵襲性(aggressiveness)癌症，且擴散速度更快; (2) *STING1*證實膀胱發生率男性高於女性; (3)進一步發現41歲到81歲的男/女性是BLCA復發或死亡的顯著高危險群; (4) 患有非乳頭狀癌的男性老年人(≥ 60)比其他群體更有可能面臨更具高侵襲性(aggressiveness)的 BLCA。這呼應了文獻中Wong MCS關於BLCA與患者的生長模式、年齡、與性別的研究。

本研究透過假設 *PSIP1* 和 *TRIM56* 與 *STING1* 的協作促進更好的生存結果，解釋高 *STING1* 表現對 AJCC N N0 膀胱附近不存在淋巴結轉移的顯著預測。高 *STING1* 表現也可以顯著識別乳頭狀癌中的 LVI，打破Yoneda表明 LVI 不良臨床預測的研究（Yoneda, 2021），並且更快尋找應對各種臨床因子的有效治療，阻止侵襲性BLCA擴散至其他身體部位，例如：淋巴結、骨骼、肺、肝、腹膜與肌肉(Shinagare AB, 2011)。

非乳頭狀和乳頭狀 BLCA 中的高 *STING1* 表現顯示出比總存活期(OS)更好的無疾病存活期(DFS)，然而Kepler-Meier 曲線卻表明，*STING1* 表現高的 BLCA 患者俱有良好的 OS 和 DFS。存活率與預期值相比有很大差異可能是BLCA 患者的高復發率，則很難追蹤這些患者的 OS 或 DFS。另一種可能是，STING 的低表達在人類黑色素瘤細胞系和組織中比較容易觀察到，因此無法全面說明 BLCA 在 *STING1*(Falahat R, 2019) 中的存活情況的數據。所以，存活分析在轉錄mRNA層級上為患者存活提供參考，因此應進一步對*STING1*蛋白表現進行存活分析。

（二）、*NSD1* 在癌症發展中的作用

NSD1 可能會誘導 *STING1* 發生癌變。本研究的結果表明，*NSD1* 是與 *STING1* 突變最常見的相關基因並且有顯著共現性。之後進一步分析驗證*STING1*與*NSD1*的標靶基因顯著相關，包括*HVF4G*、*RXRA*、*ZNF-496*、*RARA*和*RELA*。*NSD1* 在膀胱癌中主要作為腫瘤抑制因子。最近的研究表明，*NSD1* 作為 DNA 損傷的表觀遺傳調節因子參與染色質組織，透過組蛋白 3 (H3K36me1/2) 的賴氨酸 36 甲基化來控制表達 (Tauchmann, 2021)。此外，對具有267 Kda 的人類雄激素受體相關蛋白(ARA267) 的配體結合域(LBD) 的患者進行了兩種雜交選擇，顯示其在不同組織中廣泛表達，其中淋巴結中的表現最高(Tauchmann, 2021)。此結果從 *NSD1*在BLCA中的作用角度驗證並解釋了AJCC N分類的直接相關性。*NSD1* 突變可導致「人類頭頸癌、肺鱗狀細胞癌、神經母細胞瘤和膠質母細胞瘤中最常見的病變」（Tauchmann S, 2021）。

(三)、*cGAS-STING1* 途徑的抑癌和促癌功能

本研究的研究顯著驗證了過去研究結果關於*cGAS/STING1*在GO術語「NF- κ B訊號路徑」的GSEA富集分析以及*cGAS*和*TBK1*的蛋白質到蛋白質分析中。在*cGAS-STING1* 路徑中，*NFKB1* 透過MHC 增強交叉存在的內源性抗原，促進自然殺手(NK) 細胞的殺傷活性，並指導細胞毒性CD8+ T 細胞（內源性抗腫瘤免疫的核心參與者），從而預防膀胱癌的誘發（Wang, 2017）。GO術語「自然殺手細胞介導的細胞毒性」和NK細胞作為免疫細胞的顯著相關性證實了NK在阻礙癌症方面的作用。此通路的破壞是淋巴球的流失，導致細胞死亡反應，使癌細胞能夠利用 *cGAS-STING* 有效殺死 T 細胞。另一方面，高度染色體不穩定(CIN)細胞中*cGas-STING*路徑的活化會透過經典NF- κ B訊號傳導至非經典NF- κ B級聯促進侵襲和轉移。因此，非經典 NF- κ B 透過動員骨髓抑制細胞來限制放射治療的益處，這些細胞會關閉本研究的 GO TERM 所顯示的 *STING1* 的「骨髓細胞負調節」(Hou, 2018)。這可能解釋了為何低 *STING1* 表現出更好的整體存活率，因為 *STING1* 在 CIN 癌細胞中具有促腫瘤特性。因此，腫瘤細胞中*cGAS-STING*路徑的活化是打破免疫抑制微環境平衡的驅動力。

(四)、*TBK1* 在人類疾病發病機制中的作用

預測因子中 *STING1* 表現低的另一個可能機制是透過 *cGAS* 磷酸化招募(recruit) *TBK1*。在遺傳網絡分析中，*STING1*和*TBK1*共表現和共定位，揭示了它在轉錄和轉譯層面的關聯。在發病機制發展中，*TBK1* 在促進 T 細胞中乾擾素 α/β 等促炎和抗病毒細胞因子的產生方面與 TLR3 和 TLR4 發揮重要作用(Yu, 2022)。在 *cGAS/STING* 路徑中，*TBK1* 協調發炎、自噬作用、細胞週期和細胞死亡，是預防癌症發病機制的重要基因。由於中節和有絲分裂紡錘體缺乏 *TBK1*，刪除或抑制 *TBK1* 可阻止 *TBK1* 與癌細胞 G2/M 區塊中的粒線體結合（Runde AP, 2022）。「TNF 誘導的細胞凋亡受到後續 NF- κ B 活化以及抗細胞凋亡和發炎訊號路徑上調的抑制 (Ting AT, 2016)。

(五)、*STING1*在BLCA治療的應用

所有這些發現都支持 *STING1* 作為 BLCA 的預測趨勢和治療標靶。*STING1* 是 BLCA 的生物標記物，可以透過識別可能對特定療法有反應的患者來指導個人化和有效的醫療，從而

挽救更多生命。例如，治療性 mRNA 疫苗方法可以透過 *STING* 訊號傳導增強腫瘤免疫原性 (immunogenicity) 來治療 BLCA。Samson 建議設計一種用於 mRNA 遞送的脂質組合物，其中包含編碼 *cGAS* 或 *STING1* 的 mRNA，可以促進抗原呈現細胞的瘤內激活，並透過類型改善 CD8+ T 細胞反應 (Samson, 2022)。可以對細胞進行類似的方法，例如增加 *NSD1* 或 *TBK1* 的表達來調節和維持細胞週期中的細胞狀況。當遇到癌細胞中的 *cGAS* 活性時，透過交替輻射劑量藥物來防止 *TREX1* 誘導會增加樹突狀細胞 (DC) 刺激以及內源性抗腫瘤 CD8 T 細胞反應的啟動 (Vanpouille-Box, 2017)。透過治療靶向，*STING1* 也可能有助於提高放射治療和化療的療效，這可能是由於這些治療期間釋放的 DNA (Wang Y, 2020)。

柒、結論：

- (一)、發現不同癌症進展階段、不同年齡、不同淋巴結轉移狀態的 BLCA 患者正常組織及腫瘤組織中 *STING1* 表現顯著下調
- (二)、發現轉錄表現下的高 *STING1* 表現可能表明 (1) 臨床和表現相關性與 (2) 生存分析為良好 BLCA 預測因子
- (三)、證明 *STING1* 改變與 *NSD1* 顯著同時發生，並與 *TRIM56* 和 *PSIP1* 呈負相關
- (四)、發現 *STING1* 與 *IFI16*、*cGAS* 和 *TBK1* 的相互作用，它都參與多種癌症的發病機制
- (五)、證實了 *STING1* 在「調節 DNA 複製」、「細胞壞死和 mRNA 監視」以及「參與 NFκB1 路徑」、「自然殺手細胞介導的細胞毒性方面」的生物學功能
- (六)、發現 *STING1* 表現與免疫細胞、免疫分子的浸潤顯著相關，潛在調節腫瘤微環境的免疫反應。*STING1* 可能是膀胱癌的潛在預測生物標記物，但需要進一步的研究來闡明這些

捌、參考資料及其他

- “The Cancer Genome Atlas Program (TCGA).” *NCI*, National Institutes of Health , www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga. Accessed 12 June 2024.
- Project overview*. Project Overview | The Stanford-Cancer Genome Atlas Portal. (n.d.). https://genomeportal.stanford.edu/pan-tcga/project_overview
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, 鄒佩玲・吳昌俊.美國癌症基因體圖譜計畫TCGA (the cancer genome atlas) ... (2013). <http://www.tsim.org.tw/journal/jour24-1/05.PDF>
- Chen W, Luo K, Ke Z, Kuai B, He S, Jiang W, Huang W, Cai Z. TBK1 Promote Bladder Cancer Cell Proliferation and Migration via Akt Signaling. *J Cancer*. 2017 Jul 3;8(10):1892-1899. doi: 10.7150/jca.17638. PMID: 28819387; PMCID: PMC5556653. Xu Y, Wu G, Li J, Li J, Ruan N, Ma L, Han X, Wei Y, Li L, Zhang H, Chen Y, Xia Q. Screening and Identification of Key Biomarkers for Bladder Cancer: A Study Based on TCGA and GEO Data. *Biomed Res Int*. 2020 Jan 23;2020:8283401.
- Chamie K, Litwin MS, Bassett JC, Daskivich TJ, Lai J, Hanley JM, Konety BR, Saigal CS; Urologic Diseases in America Project. Recurrence of high-risk bladder cancer: a population-based analysis. *Cancer*. 2013 Sep 1;119(17):3219-27. doi: 10.1002/cncr.28147. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23737352; PMCID: PMC3773281.
- Decout, A., Katz, J.D., Venkatraman, S. *et al.* The cGAS–STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 21, 548–569 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00524-z>
0. Tauchmann, S.; Schwaller, J. NSD1: A Lysine Methyltransferase between Developmental Disorders and Cancer. *Life* 2021, 11, 87
- Mari A, Campi R, Tellini R, et al. Patterns and predictors of recurrence after open radical cystectomy for bladder cancer: a comprehensive review of the literature. *World J Urol*. 2018 Feb;36(2):157-170.
- 醫學研究部(Department of Medical Research). (2018, June 10). 共同研究室電子報 第五十四期. Qs@Ps. <https://ntuhmc.ntuh.gov.tw/epaper-54th.htm>
- 徐倩儀.統計學概念(二). Taichung Veteran General Hospital. (n.d.). <https://www.vghtc.gov.tw/UploadFiles/WebFiles/WebPagesFiles/Files/59834ffe-967c-438f-bbc3-4f0b28879f16/10804-20190503.pdf>. Accessed 1 April, 2024.
- Gakis G. Management of Muscle-invasive Bladder Cancer in the 2020s: Challenges and Perspectives. *Eur Urol Focus*. 2020 Jul 15;6(4):632-638. doi: 10.1016/j.euf.2020.01.007. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31987763.
- Sweet, J. (2023, July 25). *Bladder cancer: Medlineplus genetics*. MedlinePlus. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/bladder-cancer/>
55. Xia T, Konno H, Barber GN. Recurrent loss of STING signaling in melanoma correlates with susceptibility to viral oncolysis. *Cancer Res*. 2016;76:6747–59. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1404.
- Lin YH, Yang YF, Shiue YL. Multi-Omics Analyses to Identify FCGBP as a Potential Predictor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Diagnostics (Basel)*. 2022 May 9;12(5):1178. doi: 10.3390/diagnostics12051178. PMID: 35626334; PMCID: PMC9140089.
- Delgado A, Guddati AK. Clinical endpoints in oncology - a primer. *Am J Cancer Res*. 2021 Apr 15;11(4):1121-1131. PMID: 33948349; PMCID: PMC8085844.
- Brody, T. (2008, May 22). *Disease free survival*. Disease Free Survival - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/disease-free-survival#:~:text=Disease-free%20survival%20%28DFS%29%20is%20defined%20as%20the%20time,is%20typically%20us>

ed%20in%20the%20adjuvant%20treatment%20setting.

Wang, H. et al. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 1637–1642 (2017).

Hou, Y. et al. Non-canonical NF- κ B antagonizes STING sensor-mediated DNA sensing in radiotherapy. *Immunity* 49, 490–503 (2018).

Hu L, Xie H, Liu X, et al. TBK1 Is a Synthetic Lethal Target in Cancer with VHL Loss. *Cancer Discov.* 2020. Mar;10(3):460–475.

Vanpouille-Box, C. et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* 8, 15618 (2017).

Samson, N., & Ablasser, A. (2022, December 12). *The CGAS–sting pathway and cancer*. Nature News. <https://www.nature.com/articles/s43018-022-00468-w>

Yoneda K, Kamiya N, Utsumi T, Wakai K, Oka R, Endo T, Yano M, Hiruta N, Ichikawa T, Suzuki H. Impact of Lymphovascular Invasion on Prognosis in the Patients with Bladder

Cancer-Comparison of Transurethral Resection and Radical Cystectomy. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Feb 4;11(2):244.

Yu T, Yi YS, Yang Y, Oh J, Jeong D, Cho JY. The pivotal role of TBK1 in inflammatory responses mediated by macrophages. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:979105. Epub 2012 Dec 6..

Kikuchi H, Abe T, Matsumoto R, Osawa T, Maruyama S, Murai S, Shinohara N. Outcomes of bacillus Calmette-Guérin therapy without a maintenance schedule for high-risk

non-muscle-invasive bladder cancer in the second transurethral resection era. *Int J Urol.* 2022 Mar;29(3):251-258. doi: 10.1111/iju.14761. Epub 2021 Dec 11. PMID: 34894009; PMCID: PMC9299795.

Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, Inghirami G, Coleman CN, Formenti SC, Demaria S. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun.* 2017 Jun 9

Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013 Feb;63(2):234-41. doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.033. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22877502. ￼ *About the program.* ccg - National Cancer Institute. (n.d.).

<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga/history>

Gaki, G. (2020, January 5). *Aging, Cell Division*. Nature news.

<https://www.nature.com/scitable/topicpage/aging-and-cell-division-14230076/>

Marletta S, Calì A, Bogina G, Rizzo M, Brunelli M, Pedron S, Marcolini L, Stefanizzi L, Gobbo S, Princiotta A, Porta C, Pecoraro A, Antonelli A, Martignoni G. STING is a prognostic factor related to tumor necrosis, sarcomatoid dedifferentiation, and distant metastasis in clear cell renal cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2023 Jul;483(1):87-96. doi: 10.1007/s00428-023-03549-y. Epub 2023 Apr 29. PMID: 37120444; PMCID: PMC10326155.

Nature Publishing Group. (2014, January 29). *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. Nature News. <https://www.nature.com/articles/nature12965>

Wang X, Lin M, Zhu L, Ye Z. GAS-STING: a classical DNA recognition pathways to tumor therapy. *Front Immunol.* 2023 Oct 18;14:1200245. doi: 10.3389/fimmu.2023.1200245.

Shinagare AB, Ramaiya NH, Jagannathan JP, Fennessy FM, Taplin ME, Van den Abbeele AD.

Metastatic pattern of bladder cancer: correlation with the characteristics of the primary tumor. *AJR Am J Roentgenol.* 2011 Jan;196(1):117-22. doi: 10.2214/AJR.10.5036. PMID: 21178055.

Runde AP, Mack R, S J PB, Zhang J. The role of TBK1 in cancer pathogenesis and anticancer immunity. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Apr 9;41(1):135. doi: 10.1186/s13046-022-02352-y. PMID: 35395857; PMCID: PMC8994244.

Wang Y, Zhang Y. Prognostic role of interleukin-6 in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Clinical and Translational Oncology.* 2020;22:835–843. doi: 10.1007/s12094-019-02192-x

Li T, Fu J, Zeng Z, Cohen D, Li J, Chen Q, Li B, Liu XS. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jul 2;48(W1):W509-W514.

Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi BVSK, Varambally S. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*. 2017 Aug;19(8):649-658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28732212; PMCID: PMC5516091.

de Bruijn et al. Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer Res* (2023)

Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, Doncheva NT, Legeay M, Fang T, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8.

Warde-Farley, D.; Donaldson, S.L.; Comes, O.; Zuberi, K.; Badrawi, R.; Chao, P.; Franz, M.; Grouios, C.; Kazi, F.; Lopes, C.T.; et al. The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res*. 2010, 38, W214–W220.

Vasaikar SV, Straub P, Wang J, Zhang B. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4;46(D1):D956-D963. doi: 10.1093/nar/gkx1090. PMID: 29136207; PMCID: PMC5753188.

Thomas PD. The Gene Ontology and the Meaning of Biological Function. *Methods Mol Biol*. 2017;1446:15-24. doi: 10.1007/978-1-4939-3743-1_2. PMID: 27812932; PMCID: PMC6438694.

Tang D, Chen M, Huang X, Zhang G, Zeng L, Zhang G, Wu S, Wang Y. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS One*. 2023 Nov 9.

Ru B, Wong CN, Tong Y, Zhong JY, Zhong SSW, Wu WC, Chu KC, Wong CY, Lau CY, Chen I, Chan NW, Zhang J. TISIDB: an integrated repository portal for tumor-immune system interactions. *Bioinformatics*. 2019 Oct 15.

Cheng X, Liu Y, Wang J, Chen Y, Robertson AG, Zhang X, Jones SJM, Taubert S. cSurvival: a web resource for biomarker interactions in cancer outcomes and in cell lines. *Brief Bioinform*. 2022 May 13.

Goldman, M.J., Craft, B., Hastie, M. et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>

Dongqing Sun, Jin Wang, Ya Han, Xin Dong, Jun Ge, Rongbin Zheng, Xiaoying Shi, Binbin Wang, Ziyi Li, Pengfei Ren, Liangdong Sun, Yilv Yan, Peng Zhang, Fan Zhang, Taiwen Li, Chenfei Wang, TISCH: a comprehensive web resource enabling interactive single-cell transcriptome visualization of tumor microenvironment, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, 8 January 2021, Pages D1420–D1430, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1020>

Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, Ng CF. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep*. 2018 Jan 18;8(1):1129. doi: 10.1038/s41598-018-19199-z. PMID: 29348548; PMCID: PMC5773684.

林詠琪.郭文海“學電腦時代已過去？黃仁勳：工程化的生命科學將是未來。” *Yahoo! News*, Yahoo!, 19 Feb. 2024, tw.news.yahoo.com/%E5%AD%B8%E9%9B%BB%E8%85%A6%E6%99%82%E4%BB%A3%E5%B7%B2%E9%81%E5%8E%BB%E9%BB%83%E4%BB%81%E5%8B%B3-%E5%B7%A5%E7%A8%8B%E5%8C%96%E7%9A%84%E7%94%9F%E5%91%BD%E7%A7%91%E5%AD%B8%E5%B0%87%E6%98%AF%E6%9C%AA%E4%BE%86-104843512.html.

Q86WV6 · STING_HUMAN. *UniProt*, www.uniprot.org/uniprotkb/Q86WV6/entry. Accessed 17 June 2024.

Ting AT, Bertrand MJM. More to Life than NF- κ B in TNFR1 Signaling. *Trends Immunol.* 2016 Aug;37(8):535-545. doi: 10.1016/j.it.2016.06.002. Epub 2016 Jul 13. PMID: 27424290; PMCID: PMC5076853.

Jayakumar, S., Patel, M., Boulet, F. *et al.* PSIP1/LEDGF reduces R-loops at transcription sites to maintain genome integrity. *Nat Commun* 15, 361 (2024).
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-44544-w>

Pu, Z., Liu, J., Liu, Z. *et al.* STING pathway contributes to the prognosis of hepatocellular carcinoma and identification of prognostic gene signatures correlated to tumor microenvironment. *Cancer Cell Int* 22, 314 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02734-4>

Singh DK, Gholamalamdari O, Jadalihia M, Ling Li X, Lin YC, Zhang Y, Guang S, Hashemikhabir S, Tiwari S, Zhu YJ, Khan A, Thomas A, Chakraborty A, Macias V, Balla AK, Bhargava R, Janga SC, Ma J, Prasanth SG, Lal A, Prasanth KV. PSIP1/p75 promotes tumorigenicity in breast cancer cells by promoting the transcription of cell cycle genes. *Carcinogenesis*. 2017 Oct 1;38(10):966-975. doi: 10.1093/carcin/bgx062. PMID: 28633434; PMCID: PMC6410955.

Watson, Stephanie. "Papillary Urothelial Carcinoma: Treatment, Prognosis, and More." *Healthline*, Healthline Media, 27 Aug. 2020,
www.healthline.com/health/papillary-urothelial-carcinoma#:~:text=Papillary%20tumors%20are%20thin%2C%20finger,can%20spread%20to%20other%20organs.

Falahat R, Perez-Villarroel P, Mailloux AW, Zhu G, Pilon-Thomas S, Barber GN, Mulé JJ. STING Signaling in Melanoma Cells Shapes Antigenicity and Can Promote Antitumor T-cell Activity. *Cancer Immunol Res.* 2019 Nov;7(11):1837-1848. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0229. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31462408; PMCID: PMC6825582.

【評語】 052009

以現有的資料庫附帶的分析功能進行查尋自動繪圖及多組學分析，資料豐富，充分應用生物資訊功能。利用各種已發展的生物資訊工具來探討 STING1 不同表現量與存活率的關聯、基因變異分析、確定 STING1 與基因的交互關係、基因富集分析及評估 STING1 在腫瘤環境中的作用，利用資料庫查尋並配合統計學分析進行篩選得到 candidates。

1. 413 個 BLCA 患者，發生 STING1 突變的人佔 1%，是否合適做為預測因子。
2. STING1 是已報導過的 target，以 co-express 或跨多體學交叉分析方法可以把相關的基因找出來，並不意外，有相關關係存在不一定有因果關係存在，到底是 STING1 的基因表現造成 NSD1 突變？或者是因 NSD1 的突變，才造成 STING1 gene expression 的改變？NSD1 是 histone methyltransferase，由它來調控基因表達的可能性也不小。
3. “對 TIMER 2.0 的 STING1 表現與共現基因之間的額外分析發現，NSD1 與 STING1 mRNA 表現顯著相關($r = 0.272$)”，以 r 值來

看 NSD1 與 STING1 算是低度相關，顯著相關應該是介於(0.4 - 0.7)。整段敘述有先設定好目標再找相關性的感覺。不太符合研究進行該有的邏輯性，從相關性高的(如 $r > 0.5$)慢慢往下找。

4. 生物資訊的分析雖然短時間內可以得到很多 targets 的 list，但是準確性需要後面的實驗驗證，答案或應用性高的不是 list 上前幾名的例子也常見，所以如何設計實驗來驗證也非常重要。

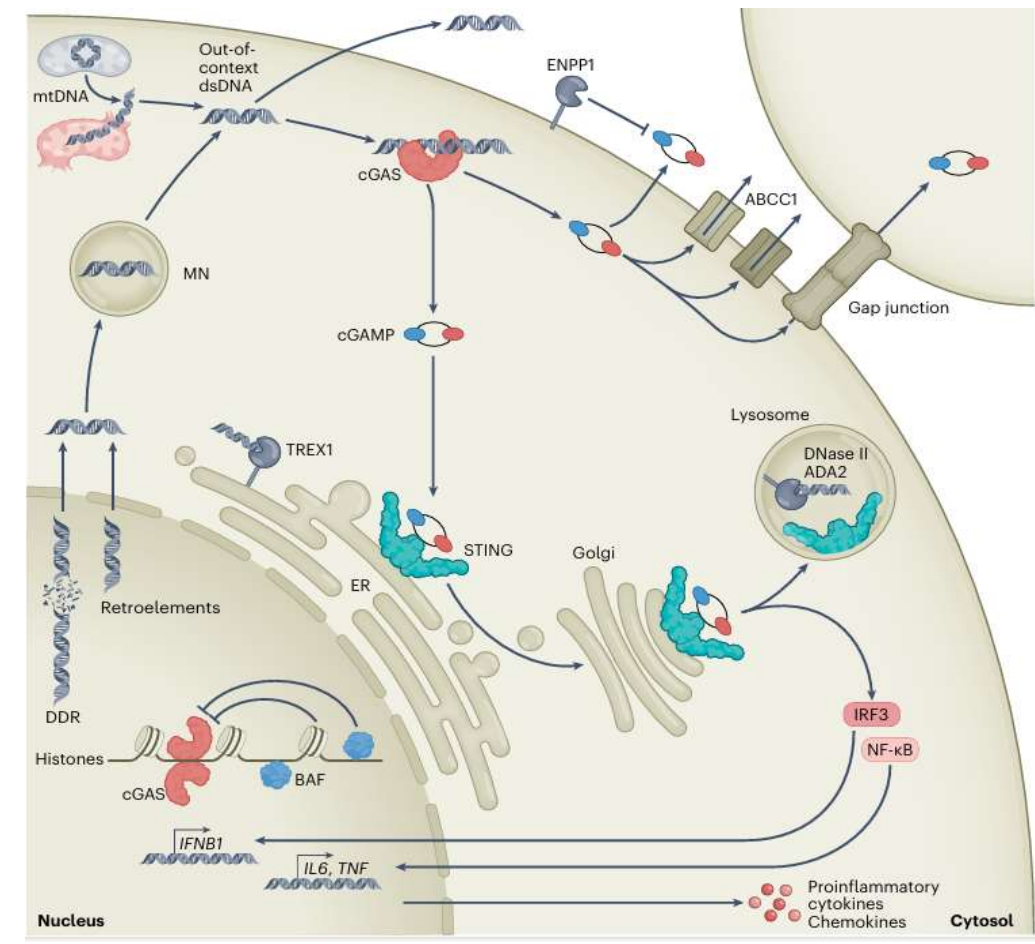
作品簡報

多組學分析確定 *STING1* 的膀胱癌的預測因子



壹、摘要

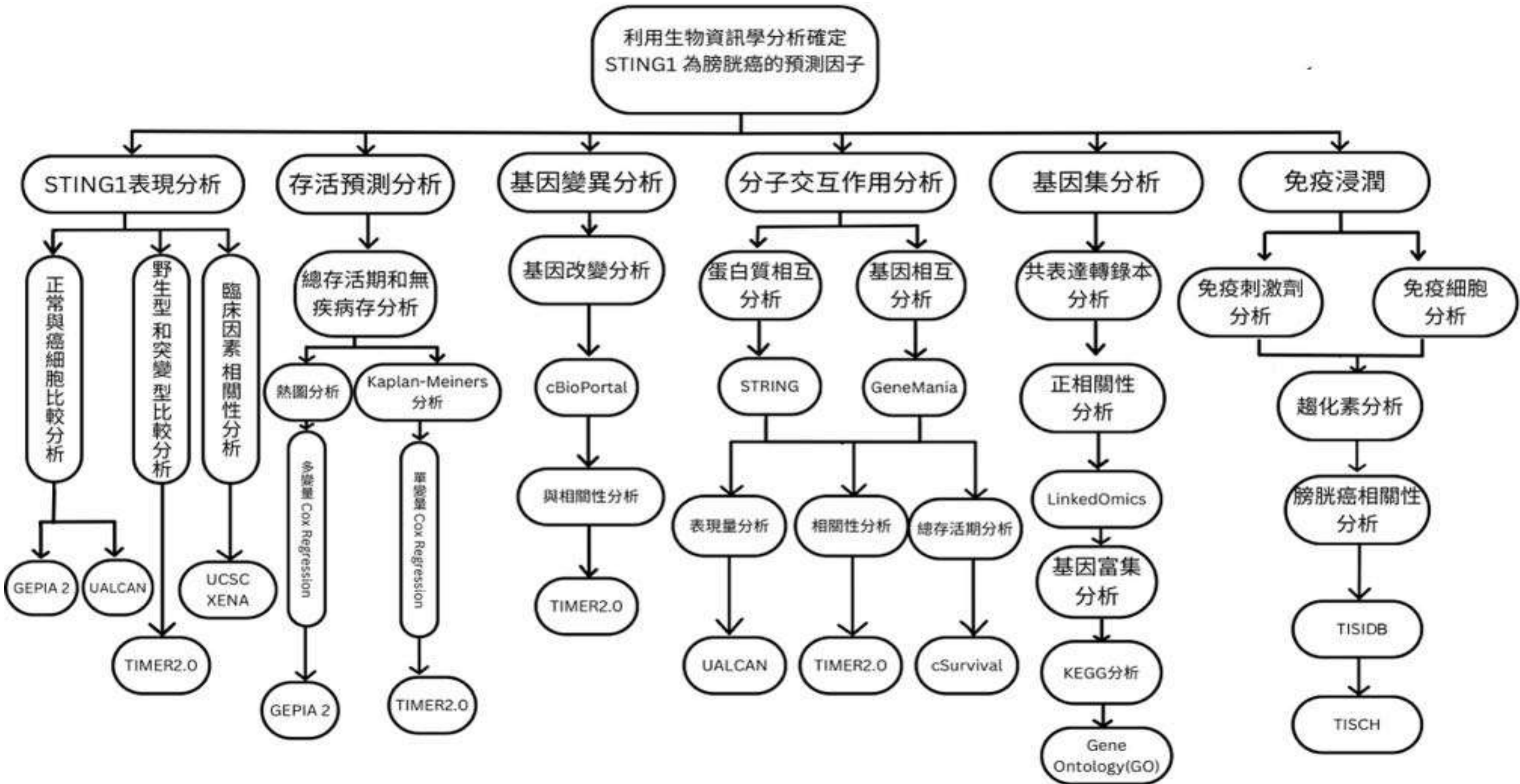
膀胱癌(BLCA)是癌症相關死亡中排名第九，全球每年約有 165 萬名患者，其中 20 萬人便是因膀胱癌而死亡（Ferlay, 2024）。最要緊的是 BLCA 在手術治療後的五年內有高達大約 31% 至 78% 的超高復發率（Mari A, 2018），因此治療費昂貴，造成健保極大的負擔，其中許多徵兆和症狀並非膀胱癌特有，特別是對於轉移性膀胱癌和潛在的肌肉侵入性膀胱癌(MIBC)，因此膀胱癌很難提早被診斷。NVIDIA創辦人黃仁勳宣稱「電腦的時代已經過去，生命科學才是未來」，迎接生物學革命的方法是將生物學資訊學融入機器學習和人工智慧中，這樣就可以更好地預測疾病並精確的藥物治療。



貳，研究目的

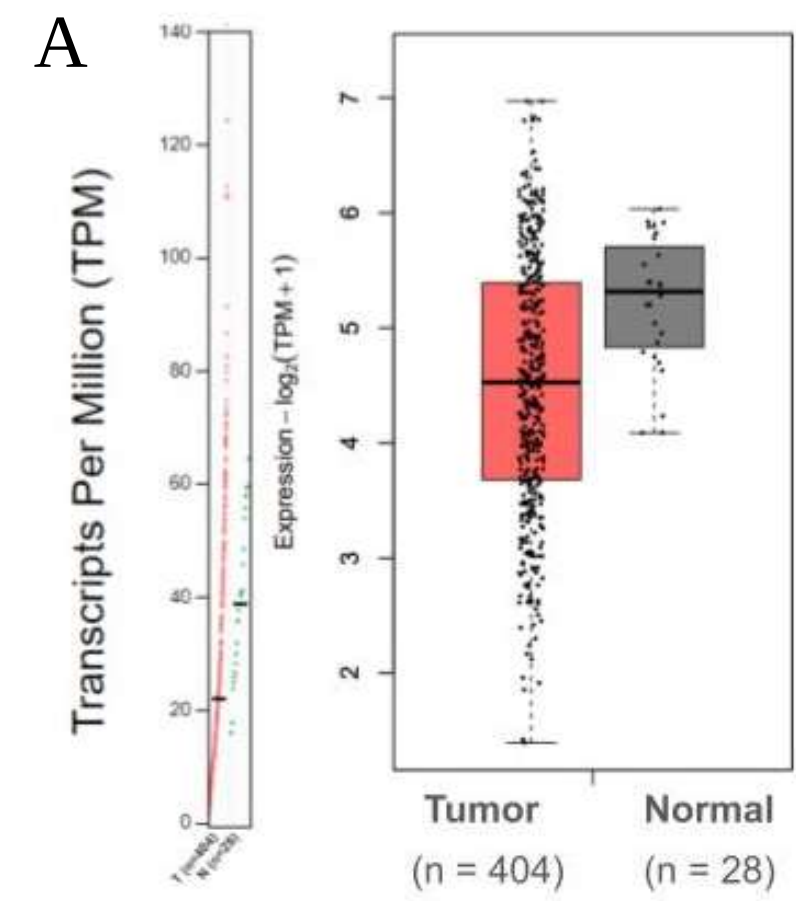
- 一、探討*STING1*量的多寡與膀胱癌病人癌症表現量的關係。
- 二、探討*STING1*量的多寡與膀胱癌病人的生存狀況。
- 三、探討*STING1*基因量的改變與其他同時改變的基因彼此的關係。
- 四、探索*STING1*的轉譯產物與其他蛋白質的相互作用。
- 五、利用基因富集分析，探討*STING1*在膀胱癌中的潛在功能與路徑。
- 六、透過TISIB數據，探討*STING1*與免疫調節劑的關聯，並尋找潛在的生物標記。

參、研究架構與過程

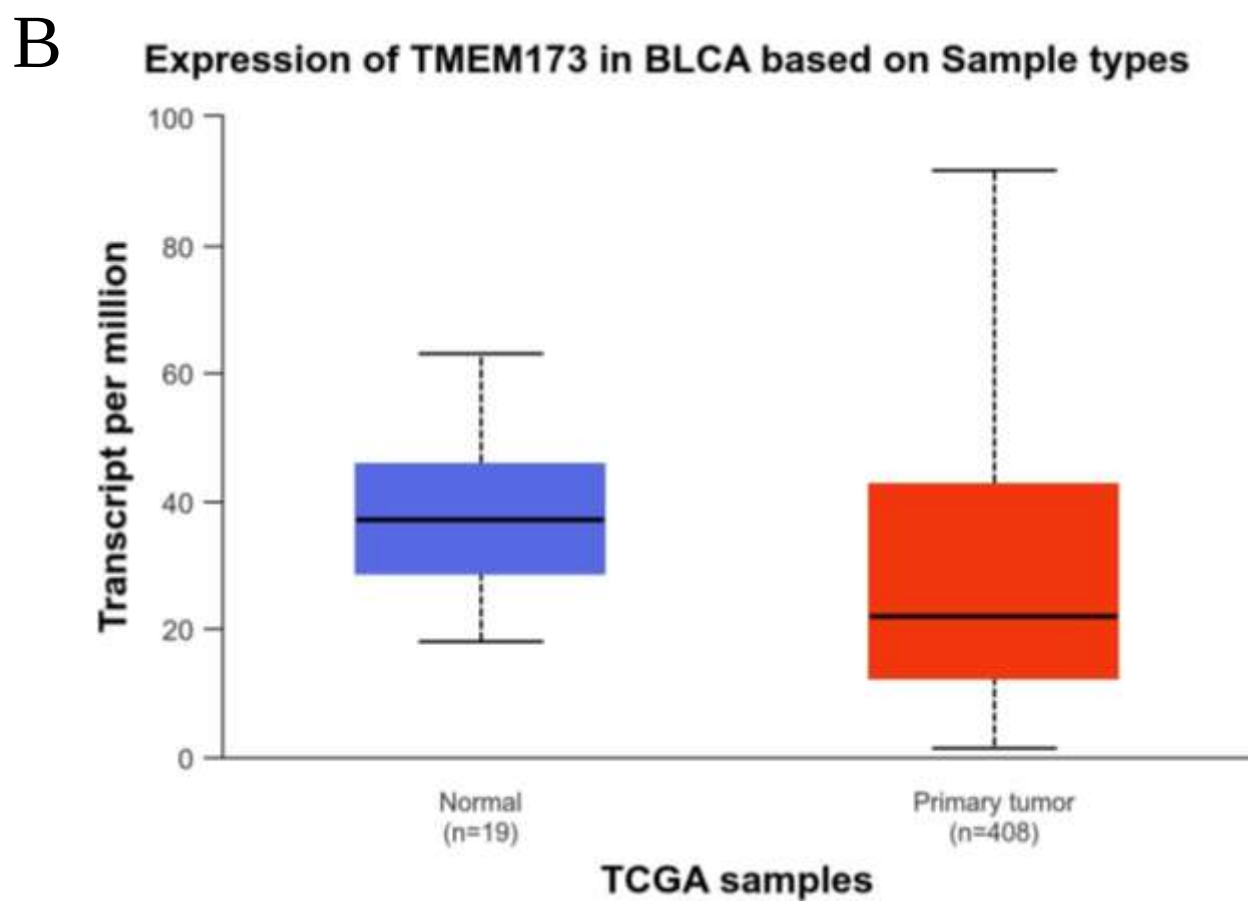


肆、研究結果與討論

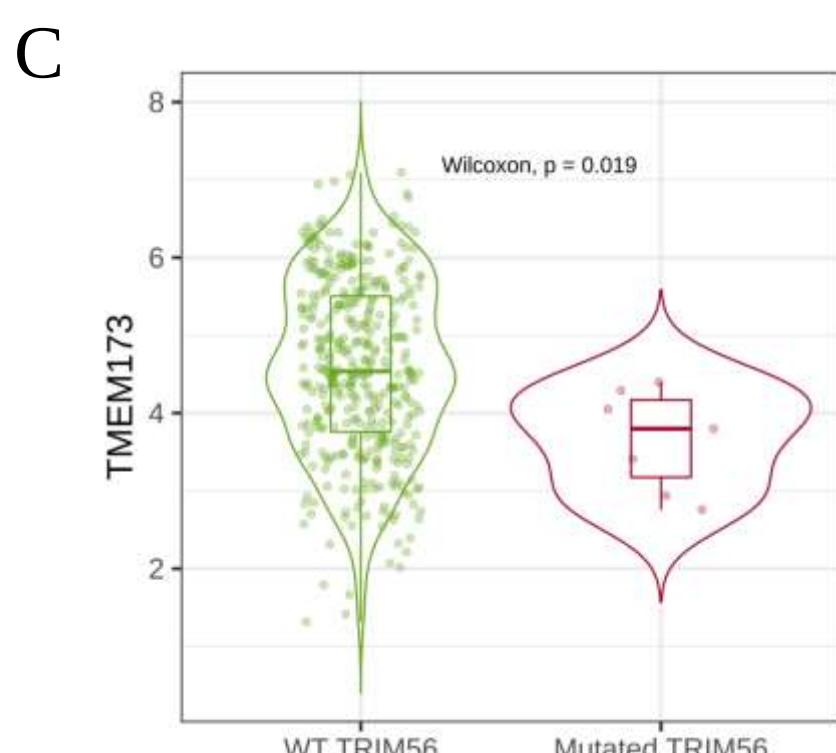
一、STING1 轉錄本在 BLCA的負調控



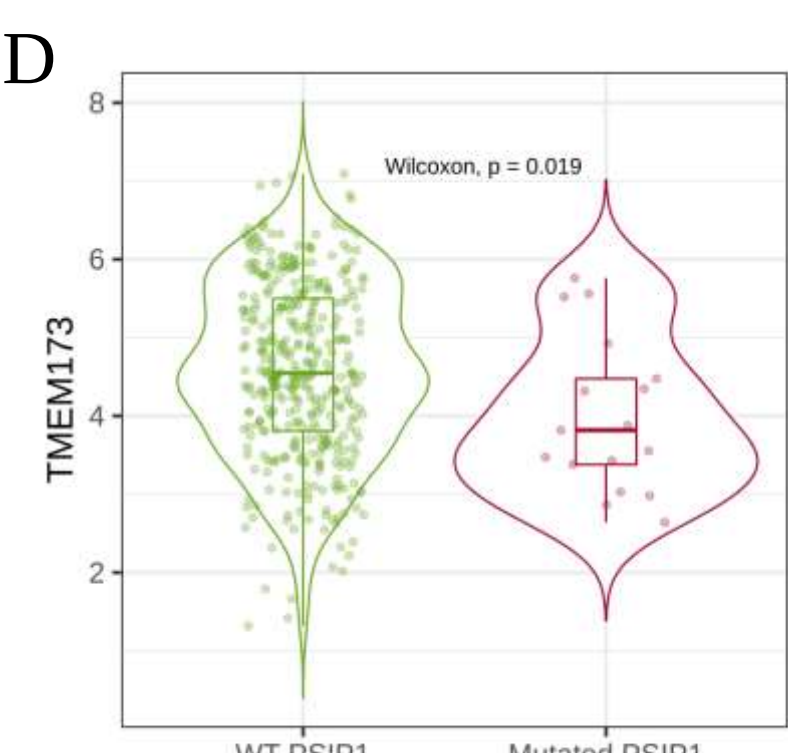
圖一A、GEPIA 2 圖解BLCA 中腫瘤(tumor)和鄰近正常組織中*STING1* 轉錄本的表達



圖一B、UALCAN 顯示正常($n = 19$)和原發腫瘤($n = 404$)的*STING1* 轉錄本的箱線圖

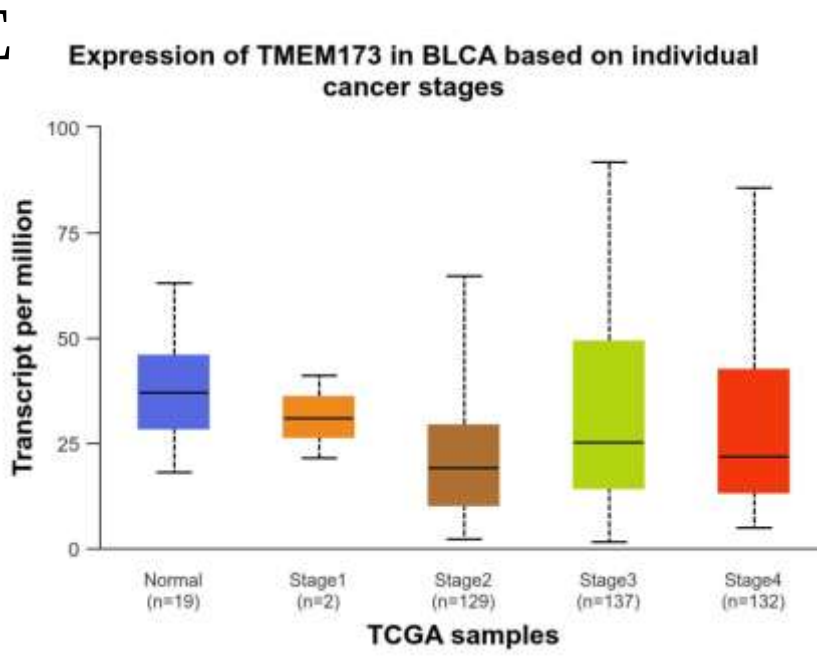


圖一C、TIMER2.0中 Wilcoxon Rank Sum

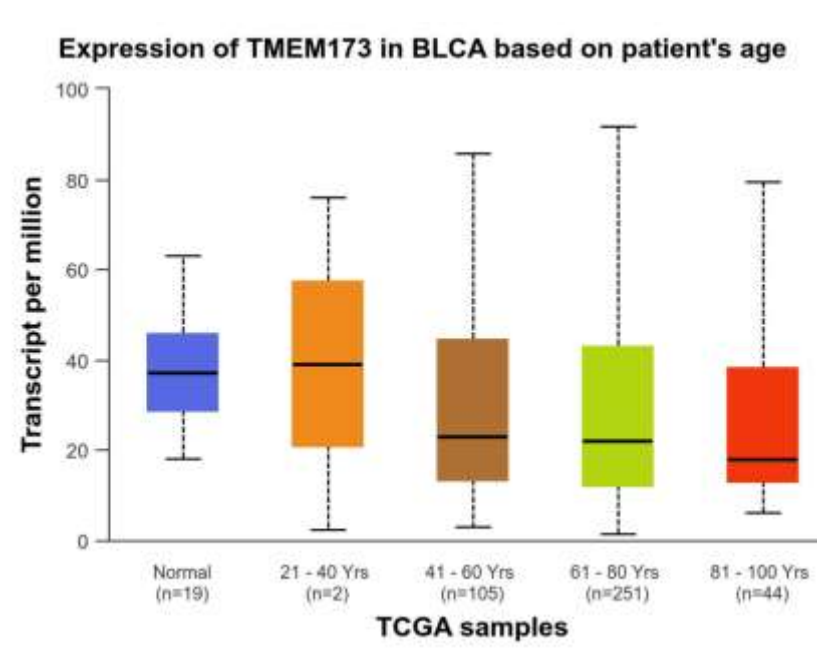


圖一D、TIMER2.0中BLCA的*PSIP1*

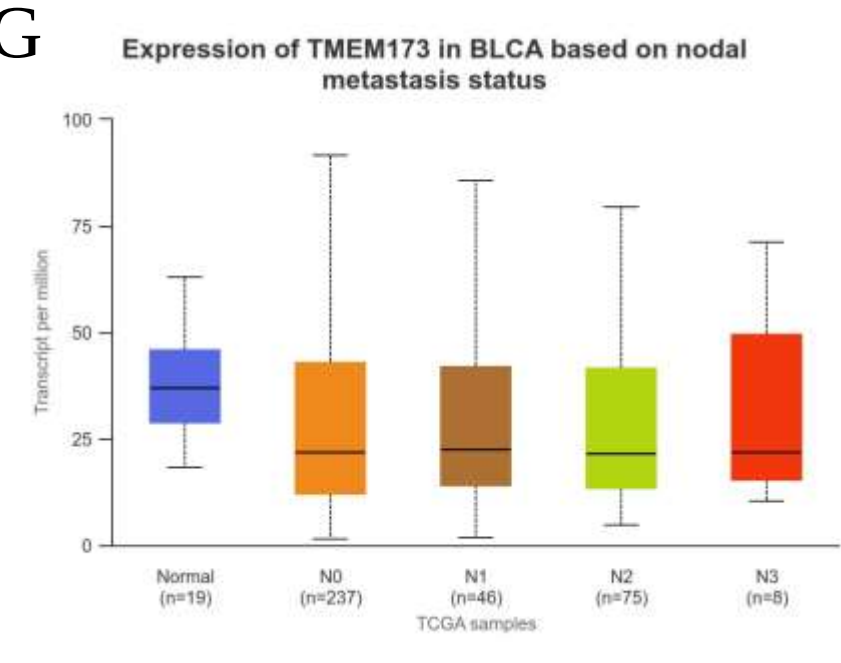
- 與正常組織相比，癌細胞中*STING1* mRNA表現量顯著降低 ($p < 0.01$, $q < 0.01$)，並且這是在不同患者臨床中均一致。
- *STING1*的負調控(downregulation) 在轉錄和轉譯層級的變化，代表在BLCA是抑癌基因



圖一E、不同癌症進展階段腫瘤組織中的中*STING1*表現



圖一F、不同患者年齡腫瘤組織中的中*STING1*表現



圖一G、基於淋巴結轉移狀態的BLCA中*STING1*表現

二、高STING1表現量為良好的BLCA病人預測因子

(一)高STING1 表現量與BLCA的有利預測臨床因子

1. *STING1*證實膀胱發生率男性高於女性
2. 進一步發現41歲到81歲的男/女性是BLCA復發或死亡的顯著高危險群
3. 乳頭狀和非乳頭狀大部分是高侵襲性 (aggressiveness) 癌症
4. 患有非乳頭狀癌的男性老年人(≥ 60) 更有可能面臨更具高侵襲的BLCA

表格1: *STING1* 表現與這些臨床因子的關聯性

Characteristics	n = 436				Median Value			
	Mean ± SD	<i>STING1</i> level	p - value	Mean value	<i>STING1</i> -H	<i>STING1</i> -L	p - value	Median Value
Age			0.6241				0.7229	
< 60	91	9.03 ±1.08		42	49			43
≥ 60	335	9.02 ±1.14		164	171			170
Gender			0.006617				0.2399	
male	311	8.93 ±0.43		152	159			143
female	115	9.26 ±1.08		64	51			70
Subtype			0.004839				0.2534	
Papillary	137	8.77±1.08		64	73			53
Non-papillary	285	9.14±1.13		151	134			155
MIBC			0.8162				0.4887	
Yes	245	9.01 ±1.15		136	129			120
No	65	9.08±1.28		34	31			35
Smoking			0.7787				0.7396	
everactive	298	8.98±1.15		148	150			148
no	112	9.00±1.07		53	59			58
Grade			0.02924				0.6553	
Low	21	8.61 ±0.85		9	12			4
High	423	9.02 ±0.84		204	219			209
LVI			0.5662				0.1983	
Yes	160	9.06 ±1.16		85	75			87
No	132	8.99 ±1.19		60	72			59
AJCC T			0.0003653				0.8291	
1+2	127	8.92 ±1.08		63	64			52
3+4	265	9.17 ±1.11		136	129			144
AJCC N			0.8764				0.0418	
0	247	9.02 ±1.13		117	130			120
N+	137	9.10 ±1.12		50	87			72
Stage			0.07861				0.2521	
1+2	136	8.84 ±1.09		74	61			60
3+4	288	9.12 ±1.12		140	148			153

* MIBC: Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer(肌肉侵入性膀胱癌); LVI: lymphovascular invasion(淋巴血管侵犯); AJCC: American Joint Committee of Cancer

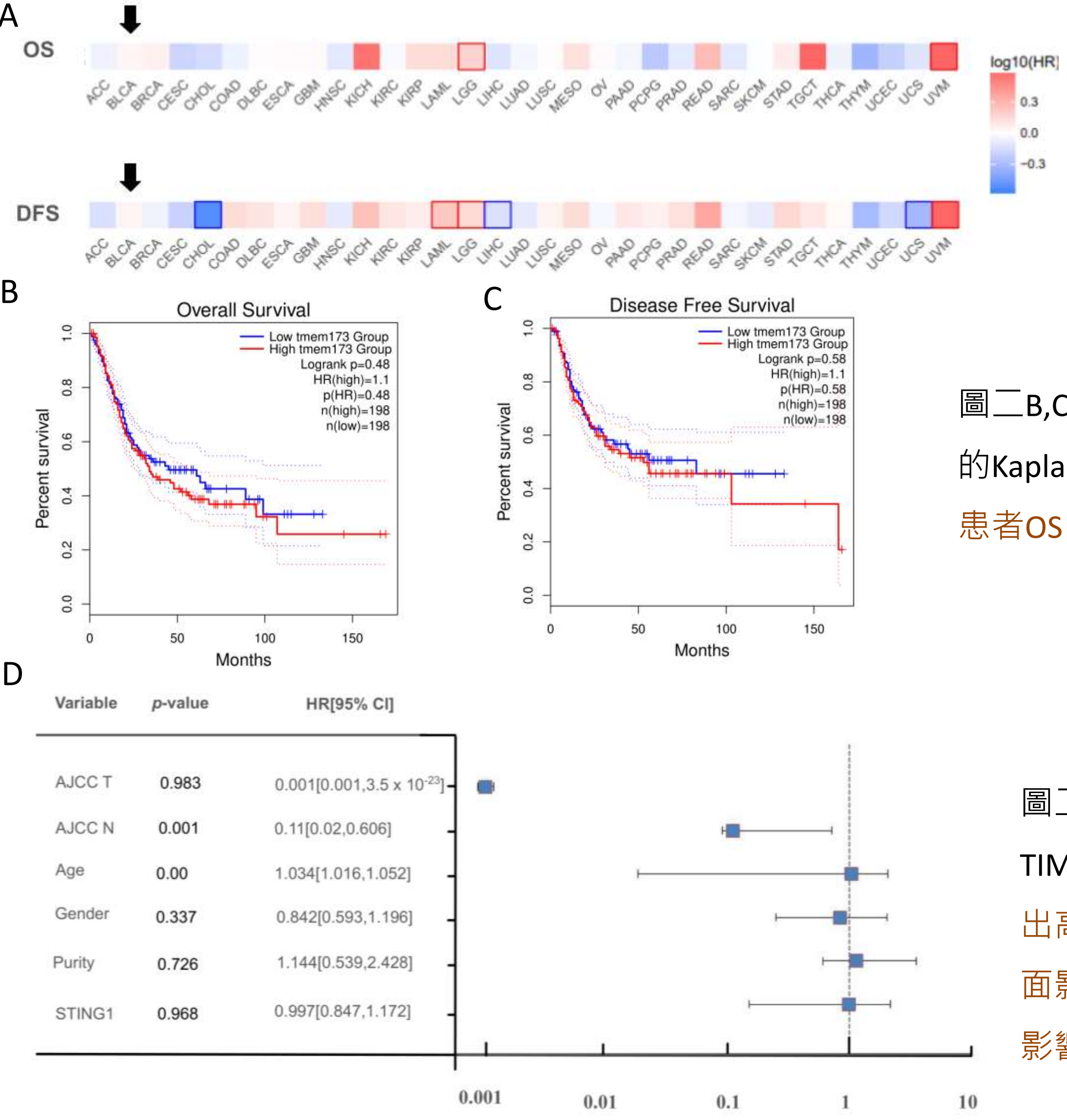
表格2: *STING1* mRNA 表現與解剖亞位點臨床變數的關聯

Characteristics	Papillary				Non-Papillary			
	n = 137	<i>STING1</i> level	p - value	Mean ± SD	n = 285	<i>STING1</i> level	p - value	Mean ± SD
Age			0.421				0.0002	
< 60	40	8.95±0.9			50	9.50±0.88		
≥ 60	96	9.75±0.64			229	10.65±0.34		
Gender			0.0897				0	
male	108	8.71±1.1			199	9.07±1.14		
female	29	9.08±0.97			85	9.32±1.11		
MIBC			0.1889				0.1811	
Yes	85	8.84±1.07			158	9.10±1.18		
No	17	8.35±1.42			39	9.59±1.18		
Smoking			0.1292				0.3125	
everactive	90	8.65±1.11			204	9.12±1.15		
no	40	8.95±1.01			71	9.15±1.11		
Grade			0				0	
Low	18	8.52±0.85			3	9.16±0.69		
High	117	8.82±1.11			280	9.14±1.14		
LVI			0				0.5003	
Yes	48	8.86±1.17			107	9.19±1.14		
No	45	8.84±1.18			87	9.08±1.23		
AJCC T			0.408				0.1109	
1+2	64	8.74±1.04			69	8.90±1.11		
3+4	65	8.96±1.16			213	9.22±1.12		
AJCC N			0.4703				0.7468	
0	90	8.75±1.07			154	9.18±1.13		
N+	33	8.65±1.08			94	9.25±1.07		
Stage			0.7803				0.0575	
1+2	64	8.74±1.04			71	8.92±1.14		
3+4	69	8.79±1.07			213	9.22±1.12		

* MIBC: Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer(肌肉侵入性膀胱癌); LVI: lymphovascular invasion(淋巴血管侵犯); AJCC: American Joint Committee of Cancer

- 中位數截止值(cut-off)將436 名BLCA 患者進一步分為兩個亞組：*STING1-high*($n = 213$) 和*STING1-low*($n = 223$)，再用Fisher Exact Test 算p-value，顯示高*STING1* 表現與呈正相關：
1. 女性($p = 8.6 \times 10^{-3}$)
2. 診斷亞型顯著相關乳頭狀 BLCA ($p = 2.6 \times 10^{-3}$)
3. AJCC T 後分期
4. 低級別癌症 ($p = 6.8 \times 10^{-3}$)
- 當*STING1*表現較高時，乳頭狀癌中的癌症侵襲性 (aggressiveness)顯著較高，但非乳頭狀癌中的癌症侵襲性 (aggressiveness)顯著較低。

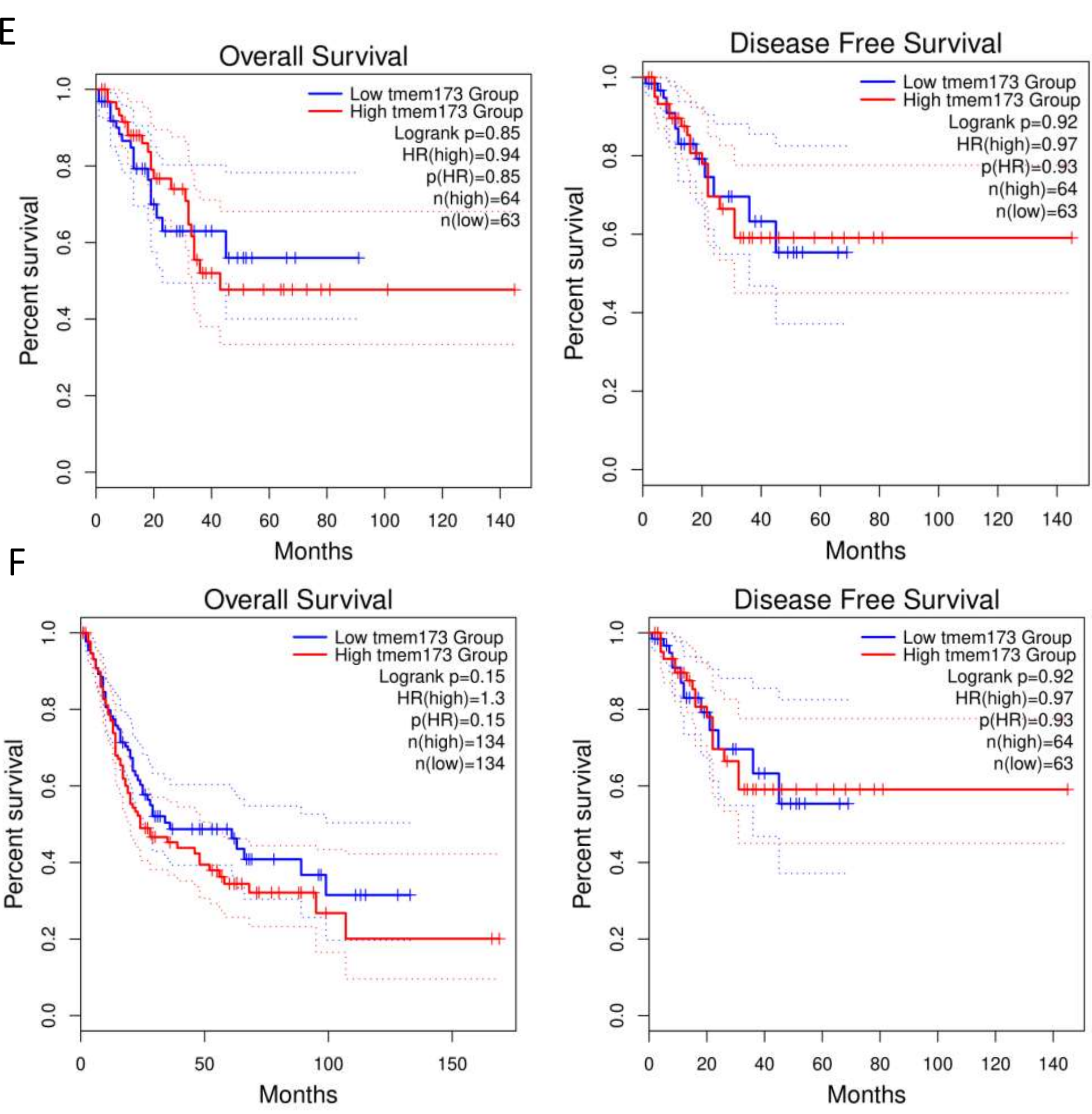
(二)高STING1表現量BLCA病人有較久存活率優勢



圖二A、GEPIA 2 說明了總存活期(OS) 和無疾病存活熱圖(p < 0.05)

圖二B,C、GEPIA 2 進行了顯示OS 的Kaplan-Meiers分析高和低 STING1 表現之間 BLCA 患者OS (p= 0.48) 與DFS(p=0.58)Kaplan-Meier曲線

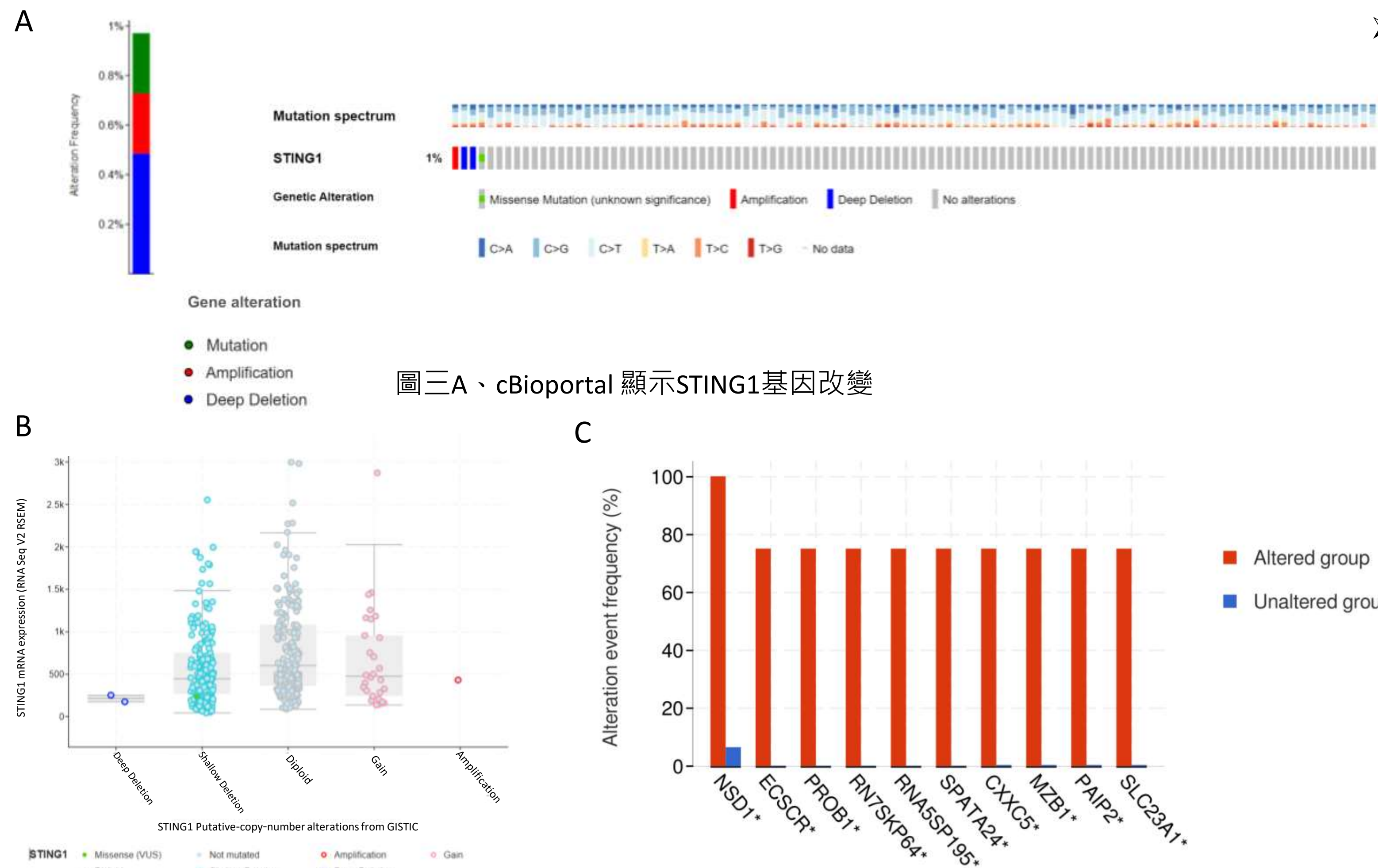
圖二D、單變量 Cox Regression分析顯示 TIMER2.0 中不同變數的風險比 (HR)。集識別出高 AJCC N分類表現 (p = 0.001) 對 OS 有負面影響,高年齡分類 (p = 0.00) 對 OS 有負面影響



圖二E,F、多變量分析顯示，乳頭狀 (HR = 0.97 , p = 0.92) 和非乳頭狀 (HR = 0.97 , p = 0.93) 高 STING1 表現量可能與 BLCA 患者生存有正相關趨勢。

➤ BLCA 患者的高復發率可能會導致存活率與預期值相比有很大差異，則很難追蹤這些患者的 OS 或 DFS。另外，在人類黑色素瘤組織中而不是膀胱組織中比較容易觀察到STING1的表現低。

三、BLCA 患者中 STING1 與 NSD1改變呈正相關

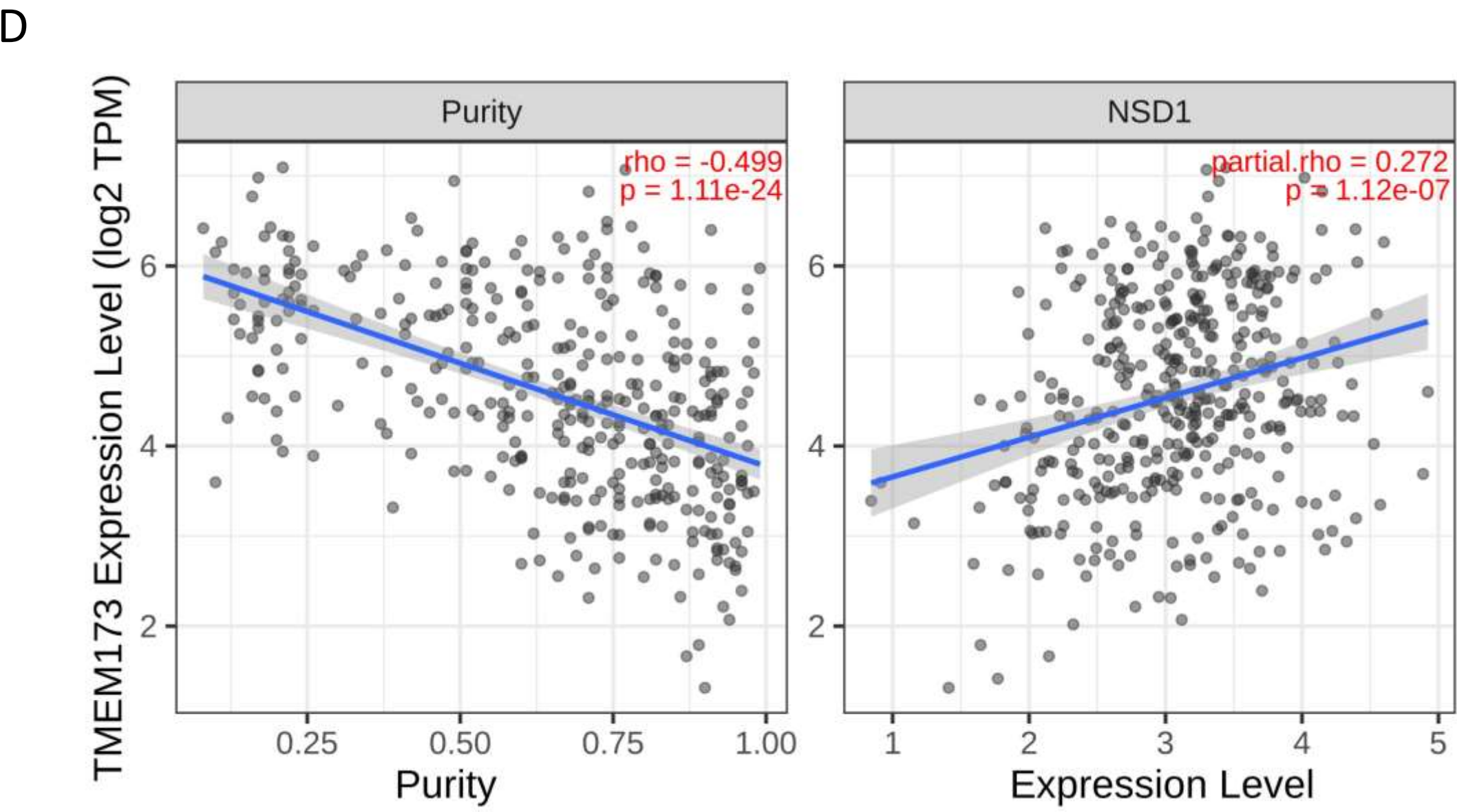


圖三A、cBioportal 顯示STING1基因改變

圖三B、cBioportal oncoprint 上顯示了突變頻率和頻譜

圖三C、STING1與NSD1(核受體結合SET結構域蛋白1) (q = 0.0302)有顯著共現(co-occur)關係

➤ 圖三A結果顯示其改變率為1%，深度缺失率(deep deletion)為0.49%，擴增率為0.25%，突變率為0.25%，並且圖三B顯示深度缺失率與低STING1相關。

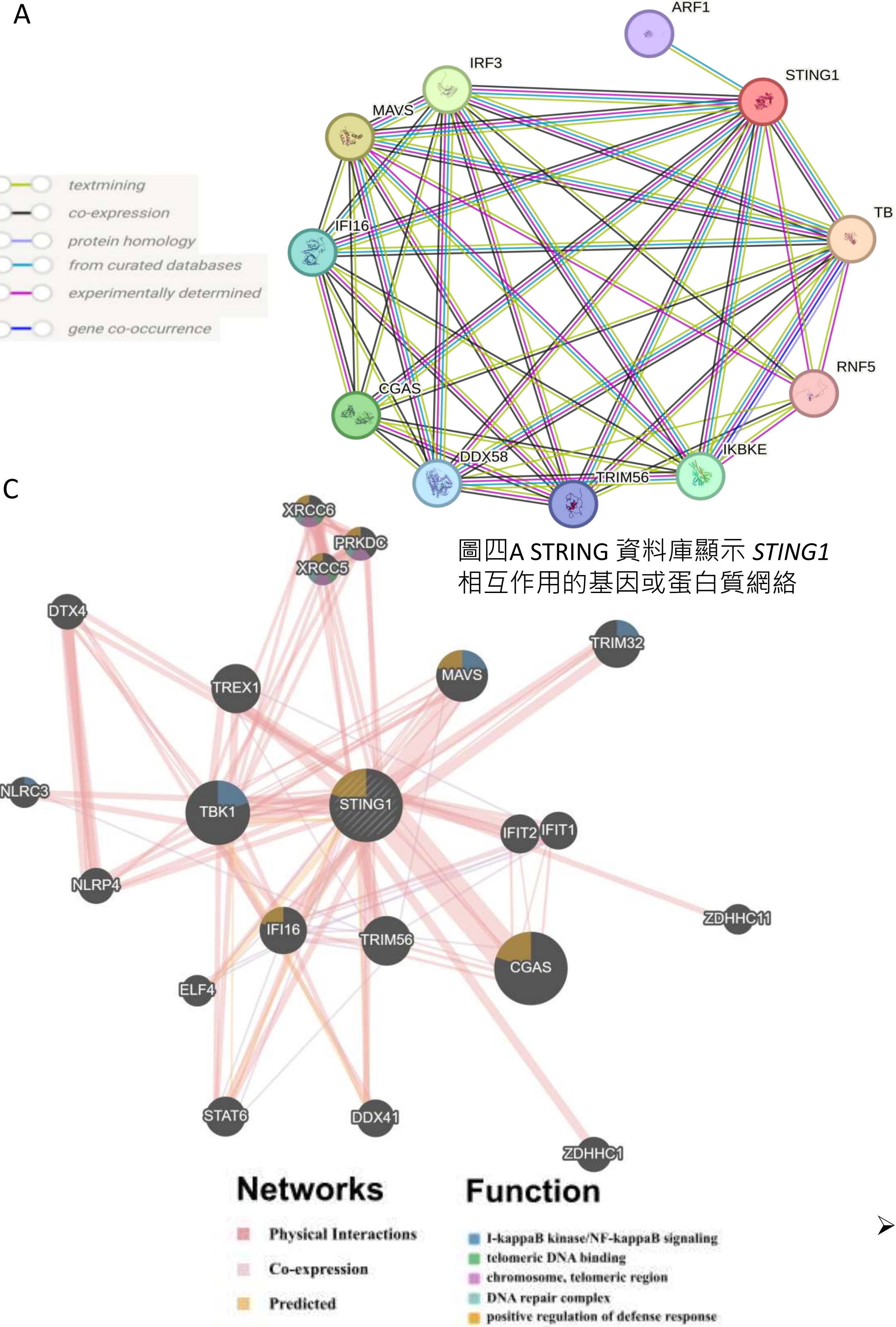


圖三D、TIMER2.0分析STING1 mRNA表現與NSD1 (右)和腫瘤純度(左)

➤ 對TIMER 2.0的STING1表現與共現基因之間的額外分析發現，NSD1與STING1 mRNA表現顯著相關($r = 0.272, p = 1.12 \times 10^{-7}$)

- NSD1 在膀胱癌中主要作為腫瘤抑制因子。NSD1 作為 DNA 損傷的表觀遺傳調節因子參與染色質組織，透過組蛋白 3 (H3K36me1/2) 的賴氨酸 36 甲基化來控制表達
- 因此，當NSD1的調控存在問題，而異變或異常，加上低STING1表現得參與，可能會導致BLCA的癌症發展。

四、STING1的轉譯產物與其他蛋白質的相互作用



圖四A、STRING 資料庫辨識出11個可能與STING1有關聯的蛋白質，再將STING1相關共表達(co-expression)基因相關蛋白的對應基因輸入LinkedOmics得出IFI16 (p = 1.511 x 10⁻³⁷)CGAS (p = 1.295 x 10⁻¹²)、與TBK1 (p = 1.31 x 10⁻¹)

➤ GeneMania 進一步證明 STING1 與 IFI16、cGAS 和 TBK1 共表達和共定位。功能分析顯示其他共表達轉錄本可能與其他共表達轉錄本可能與「I-kappaB激酶/NF-kappaB訊號傳導」、「DNA修復複合物」和「防禦反應的正向調節有關」(FDR < 0.05)

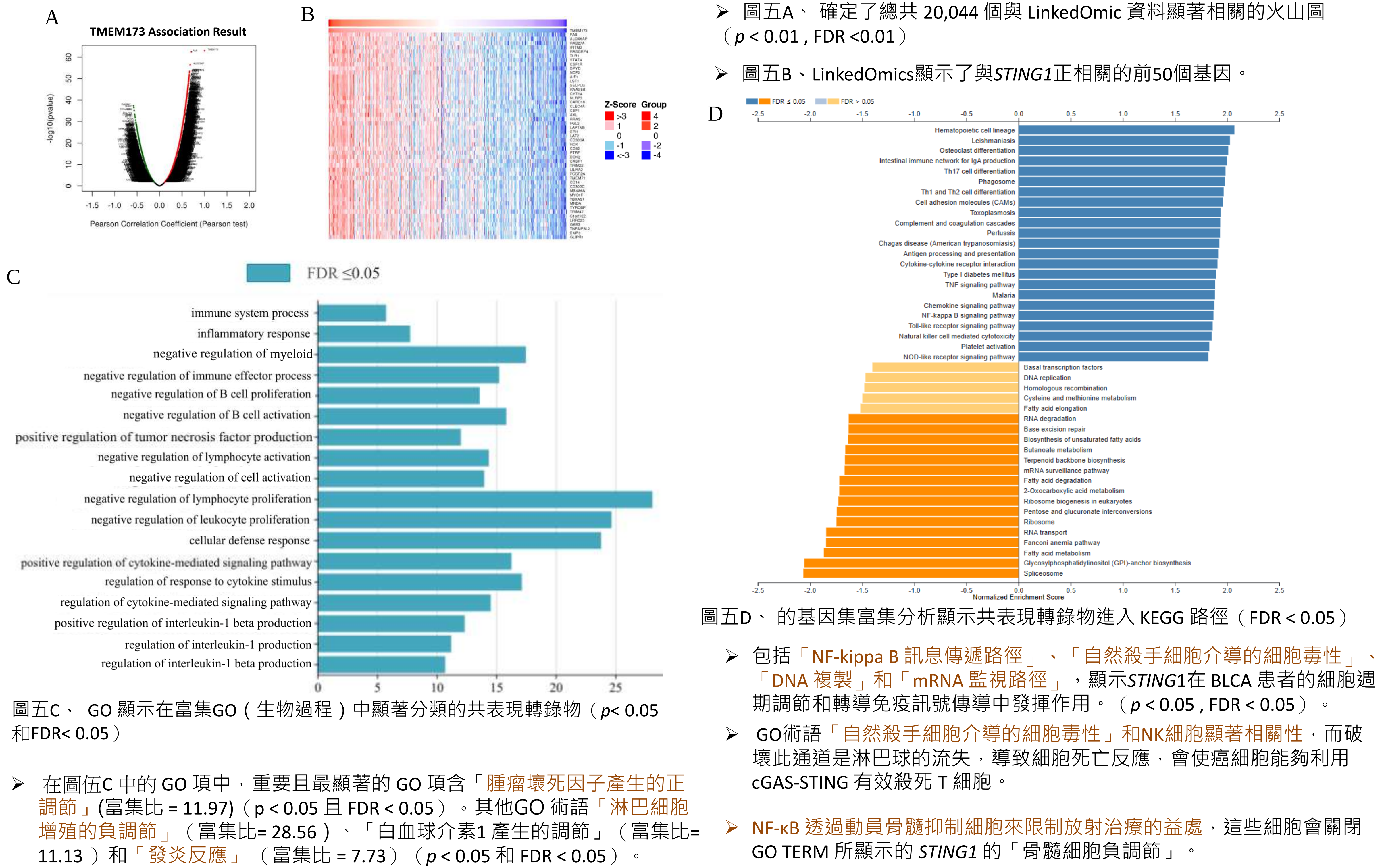
圖四D、UALCAN表現量在BLCA瘤腫(tumor)組織與正常(normal)組織，顯著上調cGAS (p = 1.6247 x 10⁻¹²), IFI16 (p = 4.2108 x 10⁻⁵)與 TBK1(p = 4.786 x 10⁻⁴) 在BLCA瘤腫(tumor)組織 (p = 0.0041)

➤ 在cGAS-STING1 路徑中，NFKB1 透過MHC 增強交叉存在的內源性抗原，促進自然殺手(NK) 細胞的殺傷活性，並指導細胞毒性CD8+ T 細胞 (內源性抗腫瘤免疫的核心參與者)，從而預防膀胱癌的誘發

➤ 在 cGAS/STING 路徑中，TBK1 協調發炎、自噬作用、細胞週期和細胞死亡，是預防癌症發病機制的重要基因

圖四C、GeneMania 資料庫顯示基因與基因間相互作用

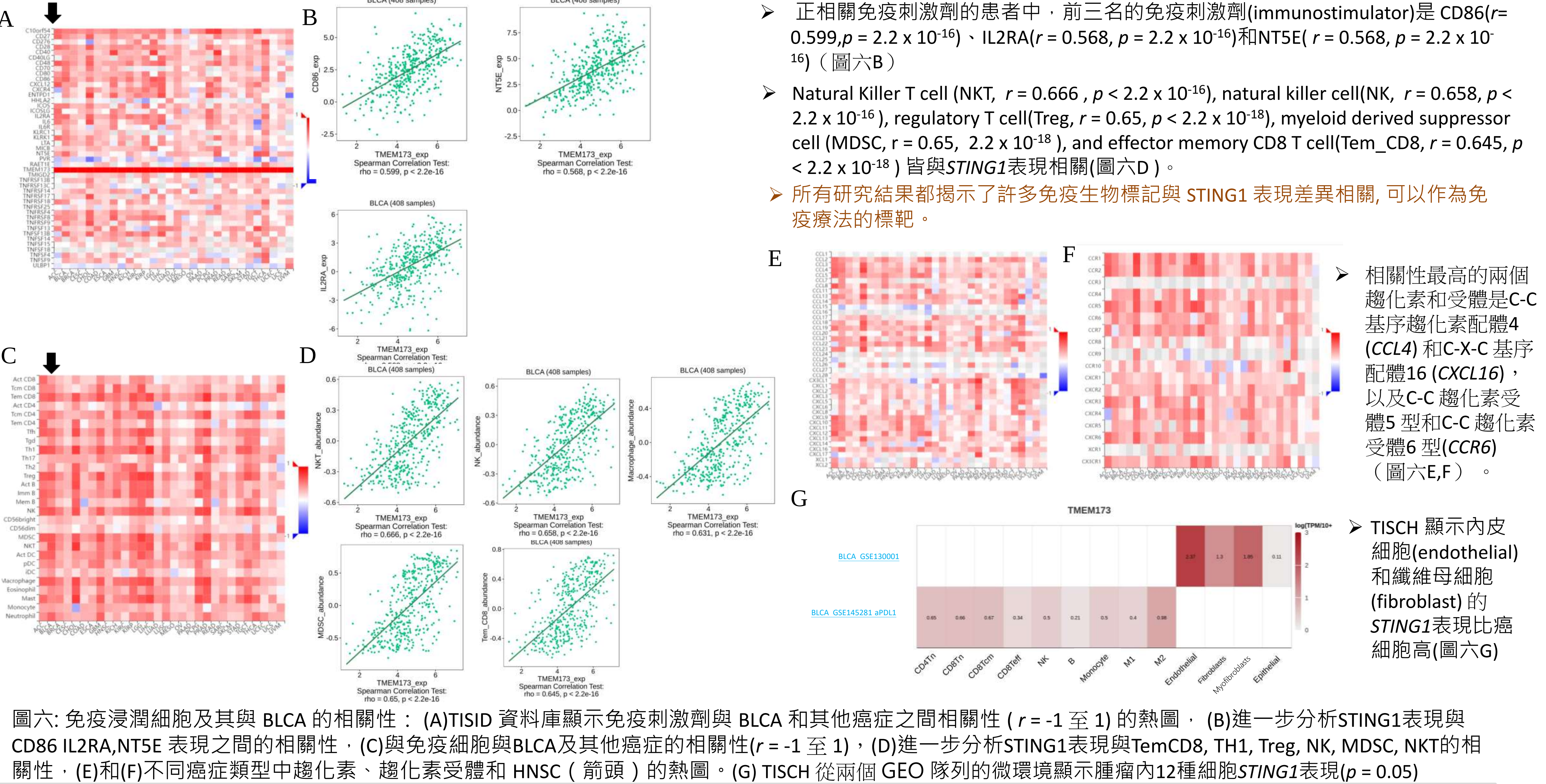
五、基因富集分析，*STING1*在BLCA中的潛在功能與通路



圖五C、GO 顯示在富集GO (生物過程) 中顯著分類的共表現轉錄物 ($p < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$)

- 在圖伍C 中的 GO 項中，重要且最顯著的 GO 項含「腫瘤壞死因子產生的正調節」(富集比 = 11.97) ($p < 0.05$ 且 $FDR < 0.05$)。其他GO 術語「淋巴細胞增殖的負調節」(富集比 = 28.56)、「白血球介素1 產生的調節」(富集比 = 11.13) 和「發炎反應」(富集比 = 7.73) ($p < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$)。

六、*STING1*和Immunostimulator之間關係以及免疫細胞浸潤值



*STING1*在BLCA治療的應用

- 治療性 mRNA 疫苗方法可以透過 *STING* 訊號傳導增強腫瘤免疫原性(immunogenicity)來治療 BLCA
- 設計一種用於 mRNA 遞送的脂質組合物，其中包含編碼 cGAS 或 *STING1* 的 mRNA，可以促進抗原呈現細胞的瘤內激活，並透過類型改善 CD8+ T 細胞反應
- 當遇到癌細胞中的cGAS 活性時，透過交替輻射劑量藥物來防止*TREX1* 誘導會增加樹突狀細胞(DC) 刺激以及內源性抗腫瘤CD8 T 細胞反應的啟動

伍、結論

- 發現不同癌症進展階段、不同年齡、不同淋巴結轉移狀態的BLCA患者正常組織及腫瘤組織中*STING1*表現顯著下調
- 發現轉錄表現下的高 *STING1* 表現可能表明(1)臨床和表現相關性與(2)生存分析為良好BLCA預測因子
- 證明 *STING1* 改變與 *NSD1* 顯著同時發生，並與 TRIM56 和 PSIP1 呈負相關
- 發現*STING1*與*IFI16*、*cGAS*和*TBK1*的相互作用，它都參與多種癌症的發病機制
- 證實了*STING1*在「調節DNA複製」、「細胞壞死和mRNA監視」以及「參與NFKB1路徑」、「自然殺手細胞介導的細胞毒性方面」的生物學功能
- 發現*STING1*表現與免疫細胞、免疫分子的浸潤顯著相關，潛在調節腫瘤微環境的免疫反應。*STING1*可能是膀胱癌的潛在預測生物標記物，但需要進一步的研究來闡明這些

陸、文獻

Wang, H. et al. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 1637–1642 (2017).

Hou, Y. et al. Non-canonical NF- κ B antagonizes STING sensor-mediated DNA sensing in radiotherapy. *Immunity* 49, 490–503 (2018).

Hu L, Xie H, Liu X, et al. TBK1 Is a Synthetic Lethal Target in Cancer with VHL Loss. *Cancer Discov.* 2020. Mar;10(3):460–475.

Vanpouille-Box, C. et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* 8, 15618 (2017).

Samson, N., & Ablasser, A. (2022, December 12). *The CGAS–sting pathway and cancer*. Nature News. <https://www.nature.com/articles/s43018-022-00468-w>

Yoneda K, Kamiya N, Utsumi T, Wakai K, Oka R, Endo T, Yano M, Hiruta N, Ichikawa T, Suzuki H. Impact of Lymphovascular Invasion on Prognosis in the Patients with Bladder Cancer-Comparison of Transurethral Resection and Radical Cystectomy. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Feb 4;11(2):244.

Yu T, Yi YS, Yang Y, Oh J, Jeong D, Cho JY. The pivotal role of TBK1 in inflammatory responses mediated by macrophages. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:979105. Epub 2012 Dec 6..

Kikuchi H, Abe T, Matsumoto R, Osawa T, Maruyama S, Murai S, Shinohara N. Outcomes of bacillus Calmette-Guérin therapy without a maintenance schedule for high-risk non-muscle-invasive bladder cancer in the second transurethral resection era. *Int J Urol.* 2022 Mar;29(3):251-258. doi: 10.1111/iju.14761. Epub 2021 Dec 11. PMID: 34894009; PMCID: PMC9299795.

Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, Inghirami G, Coleman CN, Formenti SC, Demaria S. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun.* 2017 Jun 9

Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013 Feb;63(2):234-41. doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.033. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22877502. ￼About the program. ccg - National Cancer Institute. (n.d.). <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga/history>

Gaki, G. (2020, January 5). *Aging, Cell Division*. Nature news. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/aging-and-cell-division-14230076/>

Marletta S, Calò A, Bogina G, Rizzo M, Brunelli M, Pedron S, Marcolini L, Stefanizzi L, Gobbo S, Princiotta A, Porta C, Pecoraro A, Antonelli A, Martignoni G. STING is a prognostic factor related to tumor necrosis, sarcomatoid dedifferentiation, and distant metastasis in clear cell renal cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2023 Jul;483(1):87-96. doi: 10.1007/s00428-023-03549-y. Epub 2023 Apr 29. PMID: 37120444; PMCID: PMC10326155.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>,