

结直肠癌中 SP1 的瘤内异质性表达及其临床意义

魏闫若雪¹, 李梓绮¹, 刘春铖¹, 刘晓晗¹, 赵然^{1,2}, 刘玉昆^{1,2}

(1.山东大学齐鲁医学院,山东 济南 250012;2.济宁医学院附属医院病理科,山东 济宁 272029)

摘要:目的 探讨结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中特异性蛋白1(specificity protein 1, SP1)表达的瘤内异质性(intratumor heterogeneity, ITH)及其临床意义。方法 收集CRC临床标本,采用免疫组化EnVision法检测SP1蛋白的表达水平及模式,明确SP1蛋白表达的ITH特征,定义SP1蛋白的ITH水平,并分析SP1蛋白ITH水平与CRC患者临床病理特征及预后的关系。结果 在CRC中SP1蛋白呈典型的ITH表达特征,其ITH水平与淋巴结转移($P<0.001$)和TNM分期($P<0.001$)相关。生存分析表明,SP1蛋白高ITH患者的总生存期(overall survival, OS)显著低于SP1蛋白低ITH患者(61.25% vs 81.82%),差异有统计学意义($P=0.004$)。单因素和多因素Cox回归分析显示,SP1蛋白高ITH是CRC患者不良OS($HR=2.680, P=0.017$)的独立预测因子。结论 CRC中SP1蛋白的表达具有显著的ITH特征,并首次定义了SP1 ITH水平的量化标准,证实SP1蛋白高ITH与CRC进展及不良预后显著相关。

关键词:结直肠癌;SP1蛋白;瘤内异质性;免疫组织化学;预后

中图分类号:R735.3

文献标志码:A

Intratumor heterogeneity of SP1 expression in colorectal cancer and its clinical significance

WEI Yanruoxue¹, LI Ziqi¹, LIU Chuncheng¹, LIU Xiaohan¹, ZHAO Ran^{1,2}, LIU Yukun^{1,2}

(1. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;

2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the intratumor heterogeneity (ITH) of specificity protein 1 (SP1) protein expression in colorectal cancer (CRC) and its clinical significance. **Methods** Clinical specimens of CRC were collected. The expression level and pattern of SP1 protein were detected by immunohistochemical EnVision method. The ITH characteristics of SP1 protein expression were identified, and the ITH level of SP1 protein was defined. The relationship between ITH level of SP1 protein and clinicopathological characteristics and prognosis of CRC patients was analyzed. **Results** SP1 protein showed typical ITH expression in CRC. The ITH level of SP1 protein was associated with lymph node metastasis ($P<0.001$) and TNM stage ($P<0.001$). Survival analysis showed that the overall survival (OS) of patients with high ITH level of SP1 protein was significantly lower than that with low ITH level (61.25% vs 81.82%, $P=0.004$). Univariate and multivariate Cox regression analyses showed that high SP1 protein ITH was an independent predictor of poor OS in CRC patients ($HR=2.680, P=0.017$). **Conclusion** The expression of SP1 protein in CRC has significant ITH characteristics, and defines the quantitative criteria of SP1 ITH level for the first time. It is demonstrated that a high ITH level of SP1 protein is significantly associated with CRC progression and poor prognosis.

Key words: Colorectal cancer; SP1 protein; Intratumor heterogeneity; Immunohistochemistry; Prognosis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全世界癌症相关死亡的第二大原因^[1]。近年来,我国CRC发生率和死亡率均呈上升趋势^[2]。尽管CRC发生发展具有典型的多步骤、多阶段的特征^[3],但其也是一类极具异质性的恶性肿瘤,既表现为肿瘤间异质性,也极具肿瘤内异质性(intratumor heterogeneity, ITH)^[4-5],而且ITH是CRC进展、复发及耐药的关键驱动因素^[6-8]。因此,CRC ITH的解析仍是目前亟待解决的科学问题。特异性蛋白1(specificity protein 1, SP1)高表达是多种恶性肿瘤发生发展的重要因素^[9-10],其中包括CRC^[11-13]。本研究通过免疫组化实验检测了SP1在CRC组织中的表达情况,探讨了CRC中SP1蛋白的ITH水平与患者临床病理特征和预后的关系,旨在为CRC患者的分子分型、预后预测提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床资料

收集2010年1月至2019年3月济宁医学院附属医院病理科存档的福尔马林固定石蜡包埋的CRC组织标本,所有样本均为根治性手术切除标本。157例CRC患者平均61(25~84)岁,男95例,女62例。结肠癌和直肠癌占比分别为36.94%(58/157)和63.06%(99/157)。根据第8版TNM分期,I期13例(8.28%)、II期69例(43.95%)、III期35例(22.29%)、IV期40例(25.48%)。本研究获得济宁医学院附属医院伦理审查委员会的批准(编号:2023-11-B003),患者均知情同意。通过检索济宁医学院附属医院电子病例数据库,收集每位患者的临床病理资料。本研究的观察结局为总生存期(overall survival, OS),OS为自患者初次确诊为结直肠癌之日至根治术后死亡的时间间隔。

1.1.2 主要试剂

无水乙醇、二甲苯等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司,抗-SP1抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司,通用二步法检测试剂盒(增强聚合物法检测系统)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,柠檬酸盐修复液(pH值6.0)、苏木素染色液购自上海碧云天生物技术有限公司,中性树胶封片剂购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色

标本均常规取材,经10%中性福尔马林固定,石蜡包埋组织切片厚度4 μm ,置于60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烤箱内40 min,经二甲苯溶液脱蜡及梯度乙醇水化后,置于柠檬酸盐修复液(pH值6.0)中,利用微波炉加热煮沸20 min,对组织切片进行抗原修复。免疫组织化学染色采用通用二步法检测试剂盒,使用内源性过氧化物酶阻断剂处理切片,将组织切片与抗-SP1抗体(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。滴加反应增强液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,加增强酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,DAB室温孵育5 min,苏木素复染,分化并返蓝后,梯度乙醇脱水,二甲苯溶液透明,中性树胶封片。

1.2.2 SP1 ITH定义及评分

我们通过IHC技术检测SP1蛋白的表达、亚细胞定位情况,发现在同一个患者的同一组织切片内,存在一个SP1阴性表达的癌细胞亚群,而且基于SP1的蛋白表达能够将CRC细胞明确地分为两个主要亚群,即SP1蛋白阳性表达亚群和阴性表达亚群,表明SP1的表达在CRC患者中具有典型的ITH特征。

结合两个细胞亚群的空间分布模式,我们进一步基于CRC细胞的SP1蛋白表达阳性率定义了SP1蛋白的ITH评分:在200 \times 明场视野下,当同一CRC患者同一组织切片中同时存在SP1蛋白阳性表达和阴性表达CRC癌细胞亚群时,表明该区域内SP1的表达具有ITH,为了能够进一步量化SP1蛋白的ITH特征,我们将该区域内SP1的ITH评分定义为1;而当一个区域中只有SP1蛋白阳性表达或只有SP1蛋白阴性表达CRC细胞亚群时,则该区域中SP1的表达不具有ITH特征,我们将该区域内SP1的ITH评分定义为0。同时,为了使结果的呈现更客观,我们将100 \times 明场视野分割为6个不同的区域,并分别计算每个区域内SP1蛋白的ITH评分,最后将6个区域的ITH评分之和作为患者的SP1蛋白ITH得分,即患者的SP1蛋白ITH水平,而且当ITH得分 >2 时,则定义为SP1蛋白高ITH水平,ITH得分 ≤ 2 则为SP1蛋白低ITH水平。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism10软件进行统计分析,采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法分析SP1蛋白高ITH组及低ITH组之间临床病理参数的分布是否具有差异性;通过log-rank检验比较SP1蛋白高

ITH 与 SP1 蛋白低 ITH 组生存情况,采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线;采用单因素和多因素 Cox 回归分析确定 CRC 患者的预后相关因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC 中 SP1 蛋白表达的 ITH 及其与患者临床病理特征的关系

SP1 蛋白免疫组化阳性染色定位于 CRC 细胞核,而且在同一个患者的同一组织切片内,同时存在

两个主要的癌细胞亚群,即 SP1 阳性表达癌细胞亚群和 SP1 阴性表达癌细胞亚群,表明在 CRC 患者中 SP1 蛋白的表达具有典型的 ITH 特征(图 1)。同时,我们进一步基于 SP1 蛋白的 ITH 特征定义并计算了 SP1 蛋白的 ITH 得分。

根据 CRC 患者中 SP1 蛋白的 ITH 水平,我们将患者分为 SP1 蛋白高 ITH 组与低 ITH 组,发现 SP1 蛋白的 ITH 水平与患者淋巴结转移($P < 0.001$)和 TNM 分期($P < 0.001$)相关,差异有统计学意义。见表 1。

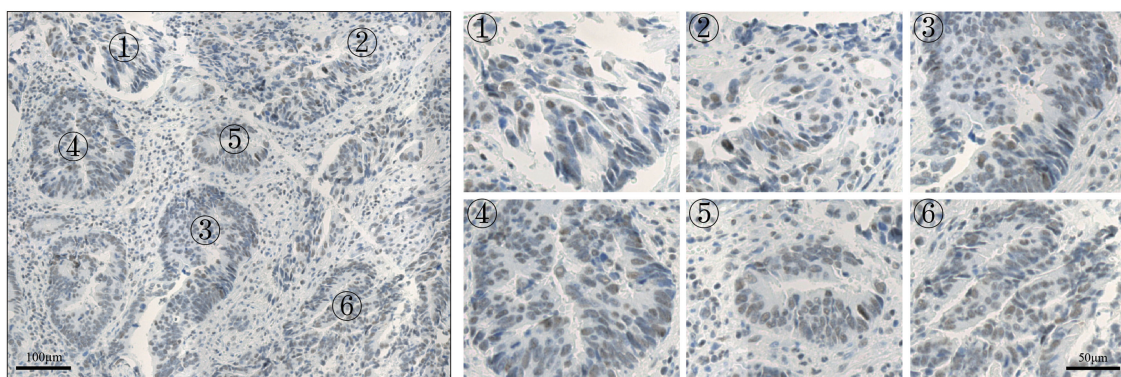


图 1 CRC 中 SP1 蛋白表达的 ITH 特征及其 ITH 水平

Figure 1 ITH characteristics and ITH levels of SP1 protein expression in CRC

表 1 SP1 蛋白 ITH 水平与 CRC 临床病理特征的关系/ n (%)

Table 1 Relationship between the ITH of SP1 protein and clinicopathological features of CRC/ n (%)

临床病理参数	SP1 蛋白 ITH 水平		χ^2	P
	高($n=80$)	低($n=77$)		
年龄/岁			1.033	0.310
≤ 60	32(40.00)	37(48.05)		
>60	48(60.00)	40(51.95)		
性别			1.239	0.266
女	35(43.75)	27(35.06)		
男	45(56.25)	50(64.94)		
肿瘤部位			0.034	0.855
结肠	29(36.25)	29(37.66)		
直肠	51(63.75)	48(62.34)		
肿瘤最大径/cm			1.406	0.236
≤ 4	46(57.50)	37(48.05)		
>4	34(42.50)	40(51.95)		
淋巴结转移			20.240	<0.001
有	47(58.75)	18(23.38)		
无	33(41.25)	59(76.62)		
分化程度			—	0.207 ^a
高	5(6.25)	1(1.30)		
中	51(63.75)	47(61.04)		
低	24(30.00)	29(37.66)		
TNM 分期			5.364	<0.001
I + II	25(31.25)	57(74.03)		
III + IV	55(68.75)	20(25.97)		

注:^a表示采用 Fisher 确切概率法。

2.2 SP1 蛋白的 ITH 水平与 CRC 患者预后的关系
157 例 CRC 患者中,死亡病例为 45 例,存活病

例为 112 例。生存曲线显示,SP1 蛋白高 ITH 患者的 OS 率为 61.25%,低 ITH 患者为 81.82%,差异有

统计学意义($P=0.004$),见图2。

单因素和多因素 Cox 回归分析显示,SP1 蛋白高 ITH($HR=2.680, P=0.017$)、高年龄($HR=2.015, P=0.035$)、淋巴结转移($HR=0.110, P<0.001$)和

TNM III+IV期($HR=5.335, P=0.001$)是 CRC 患者不良 OS 的独立预测因素,差异有统计学意义。见表2。

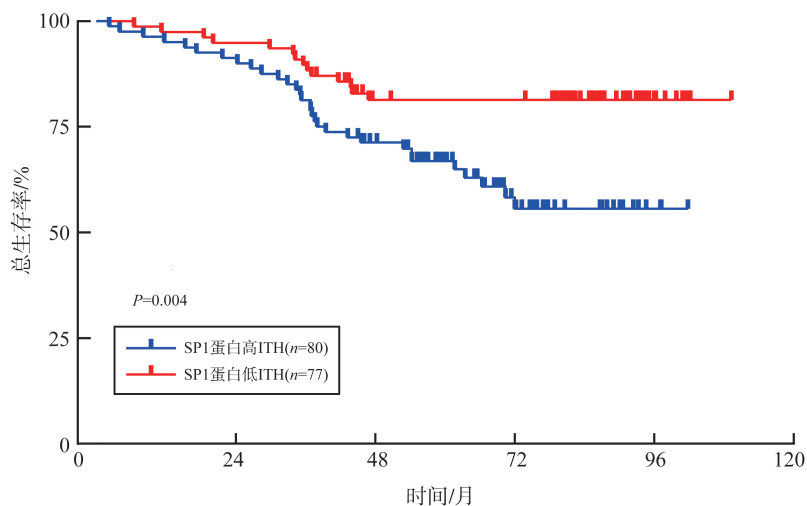


图2 Kaplan-Meier 生存曲线分析 SP1 蛋白 ITH 水平与 CRC 患者 OS 的关系

Figure 2 The relationship between ITH level of SP1 protein and OS of CRC patients analyzed by Kaplan-Meier survival curve

表2 单因素和多因素 Cox 回归分析 CRC 患者 OS 的预测因素

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis of predictors of OS in patients with CRC

临床病理参数	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
SP1 蛋白 ITH(高 vs 低)	2.445(1.323~4.752)	0.006	2.680(1.200~6.130)	0.017
年龄(>60岁 vs ≤60岁)	1.914(1.039~3.712)	0.044	2.015(1.072~3.975)	0.035
性别(女 vs 男)	1.080(0.589~1.941)	0.800	0.620(0.318~1.173)	0.148
肿瘤部位(结肠 vs 直肠)	1.198(0.654~2.157)	0.549	1.493(0.764~2.871)	0.234
肿瘤最大直径(>4 cm vs ≤4 cm)	0.907(0.500~1.631)	0.744	0.778(0.419~1.435)	0.421
淋巴结转移(有 vs 无)	0.701(0.367~1.283)	0.262	0.110(0.046~0.271)	<0.001
分化程度(低 vs 中+高)	1.333(0.715~2.412)	0.351	1.424(0.753~2.620)	0.263
TNM 分期(III+IV vs I+II)	1.484(0.825~2.705)	0.189	5.335(2.020~13.910)	0.001

3 讨论

SP1 作为锌指蛋白家族中的一个关键转录因子,其定位于细胞核内,通过直接靶向调控众多肿瘤发生发展相关的核心下游靶基因,参与 CRC 的发生发展。比如,SP1 通过直接结合硫氧还原蛋白-1 从而增强溶质载体家族 1 成员 5 的启动子活性,最终调控 CRC 细胞的糖代谢过程^[14];SP1 通过与 ELK4 的结合,从而在转录水平直接调控富亮氨酸 α -2 糖蛋白 1 的表达,最终促进 CRC 的发生发展^[12];SP1 作为转录因子通过靶向激活 PROX1-AS1/miR-32/FBXL20 调控轴,从而促进 CRC 细胞的增殖和侵袭转移,最终促进 CRC 的发生发展^[15]。本研究通过

IHC 技术检测 CRC 患者中 SP1 蛋白的表达及亚细胞定位情况,发现 SP1 蛋白主要定位于 CRC 细胞核内;SP1 蛋白的异常高表达是 CRC 发生发展的关键始动因素,但本研究结果显示,在同一 CRC 患者的同一组织中,不仅存在 SP1 蛋白阳性表达的癌细胞,也同时存在 SP1 蛋白阴性表达的癌细胞,表明在 CRC 中基于 SP1 蛋白的表达(阳性表达 vs 阴性表达)能够将同一个患者同一肿瘤组织中的癌细胞分为两个主要亚群。ITH 是恶性肿瘤的关键特征之一,而且蛋白表达的异质性是恶性肿瘤 ITH 形成的重要机制。比如,在三阴性乳腺癌中,同一患者肿瘤组织内不同癌细胞亚群中程序性死亡配体 1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) 蛋白表达的阳性率并不一致,表明 PD-L1 蛋白表达具有显著

的 ITH 特征^[16]。本研究结果表明,同一 CRC 患者同一肿瘤组织中既存在 SP1 蛋白阳性表达癌细胞亚群,也存在 SP1 蛋白阴性表达癌细胞亚群,表明在 CRC 中 SP1 的蛋白表达具有显著的 ITH 特征。

有研究表明,在不同的癌细胞亚群中某些基因的表达缺失促进恶性肿瘤 ITH 的形成。比如,三阴性乳腺癌是一类极具 ITH 特征的恶性肿瘤,高 ITH 水平与三阴性乳腺癌不良预后及免疫治疗抵抗密切相关,而 ZNF689 基因的表达缺失是三阴性乳腺癌 ITH 形成的关键^[17]。本研究结果显示,在同一 CRC 患者的同一肿瘤组织中,存在一个 SP1 蛋白表达缺失的癌细胞亚群,因此形成了 SP1 蛋白表达的 ITH。大量研究证据表明,蛋白表达缺失的分子机制是多维度的,比如一个基因座在染色体中拷贝数的缺失突变^[18],基因启动子或其他顺式作用元件的突变^[19],基因 CpG 岛的超甲基化^[20],介导基因转录激活的相关转录因子表达下调或缺失^[21],基因 mRNA 稳定性或其编码蛋白的稳定性发生异常等^[22-24],均能引起某一个基因编码蛋白的表达缺失。然而,我们并不明确 CRC 患者中 SP1 蛋白表达缺失的明确机制,该问题也是本课题后续的重要研究方向之一。

ITH 不仅是恶性肿瘤发生发展的驱动因素,也是患者耐药、复发及转移的关键机制。比如,主要组织相容性复合体 I 的表达具有显著的 ITH 特征,而且与三阴性乳腺癌患者的临床抗 PD-L1 治疗抵抗密切相关^[25];在前列腺癌中,前列腺特异性膜抗原作为一个跨膜糖蛋白,其在大多数患者中高表达,被作为一个极具潜力的治疗靶点,然而其表达的 ITH 特征极大地限制了其靶向治疗效果^[26];PD-L1 的时空异质性表达特征是患者对免疫抑制剂治疗抵抗的主要因素^[27];在乳腺癌、胃癌和结直肠癌中,人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 过表达患者对 HER2 靶向治疗敏感,然而 HER2 的蛋白表达呈显著的 ITH 特征,使得患者对 HER2 靶向治疗的响应明显不同^[28]。本研究结果证实,SP1 高 ITH 水平与患者淋巴结转移和 TNM 分期显著相关;更重要的是,其能够作为独立的预测因子预测 CRC 患者的不良预后,表明 SP1 蛋白的 ITH 是 CRC 肿瘤异质性的的重要组成部分,其 ITH 特征是 CRC 恶性进展的重要促进因素,提示 SP1 蛋白 ITH 分子机制的深入解析可能为 CRC 患者肿瘤异质性的解析、分子分型、临床诊治及预后预测等提供理论依据和治疗靶点。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] Lu Z, Chen Y, Liu D, et al. The landscape of cancer research and cancer care in China [J]. *Nat Med*, 2023, 29(12): 3022-3032.
- [3] Du L, Cheng Q, Zheng H, et al. Targeting stemness of cancer stem cells to fight colorectal cancers [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 82: 150-161. doi: 10.1016/j.semcancer.
- [4] Jiang M, Jin S, Han J, et al. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer [J]. *Biomark Res*, 2021, 9(1): 85. doi: 10.1186/s40364-021-00326-4.
- [5] Pietropaolo G, Scarno G, Stabile H, et al. NK cell and ILC heterogeneity in colorectal cancer. New perspectives from high dimensional data [J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 80: 100967. doi: 10.1016/j.mam.2021.100967.
- [6] Crucitta S, Cucchiara F, Mathijssen R, et al. Treatment-driven tumour heterogeneity and drug resistance: lessons from solid tumours [J]. *Cancer Treat Rev*, 2022, 104: 102340. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102340.
- [7] Mauri G, Vitiello PP, Sogari A, et al. Liquid biopsies to monitor and direct cancer treatment in colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(3): 394-407.
- [8] Al Zein M, Boukhoud M, Shammaa H, et al. Immunotherapy and immunoevasion of colorectal cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2023, 28(9): 103669. doi: 10.1016/j.drudis.2023.103669.
- [9] Zhang GP, Xie ZL, Jiang J, et al. Mechanical confinement promotes heat resistance of hepatocellular carcinoma via SP1/IL411/AHR axis [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(8): 101128. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101128.
- [10] Zhang M, Kan D, Zhang B, et al. P300/SP1 complex mediating elevated METTL1 regulates CDK14 mRNA stability via internal m7G modification in CRPC [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 215. doi: 10.1186/s13046-023-02777-z.
- [11] Zhao G, Yuan H, Li Q, et al. DDX39B drives colorectal cancer progression by promoting the stability and nuclear translocation of PKM2 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 275. doi: 10.1038/s41392-022-01096-7.
- [12] Zhu Z, Guo Y, Liu Y, et al. ELK4 Promotes colorectal cancer progression by activating the neoangiogenic factor LRG1 in a noncanonical SP1/3-dependent manner [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(32): e2303378. doi: 10.1002/advs.202303378.

- [13] Fosso E, Leo M, Muccillo L, et al. Quercetin's dual mode of action to counteract the Sp1-miR-27a axis in colorectal cancer cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(8): 1547. doi: 10.3390/antiox12081547.
- [14] Tang T, Fang D, Ji Z, et al. Inhibition of thioredoxin-1 enhances the toxicity of glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose by downregulating SLC1A5 expression in colorectal cancer cells [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2023. doi: 10.1007/s13402-023-00887-6.
- [15] Liu J, Zhan W, Chen G, et al. SP1-induced PROX1-AS1 contributes to tumor progression by regulating miR-326/FBXL20 axis in colorectal cancer [J]. *Cell Signal*, 2023, 101: 110503. doi: 10.1016/j.cellsig.2022.110503.
- [16] Kahn AM, Golestani R, Harigopal M, et al. Intratumor spatial heterogeneity in programmed death-ligand 1 (PD-L1) protein expression in early-stage breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2023, 201(2): 289-298.
- [17] Ge LP, Jin X, Ma D, et al. ZNF689 deficiency promotes intratumor heterogeneity and immunotherapy resistance in triple-negative breast cancer [J]. *Cell Res*, 2024, 34(1): 58-75.
- [18] Geng K, Merino LG, Veiga RG, et al. Intrinsic deletion at 10q23.31, including the PTEN gene locus, is aggravated upon CRISPR-Cas9-mediated genome engineering in HAP1 cells mimicking cancer profiles [J]. *Life Sci Alliance*, 2023, 7(2): e2023 02128. doi: 10.26508/lsa.202302128.
- [19] Tornesello ML, Cerasuolo A, Starita N, et al. Reactivation of telomerase reverse transcriptase expression in cancer: the role of TERT promoter mutations [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1286683. doi: 10.3389/fcell.2023.1286683.
- [20] Enikeeva K, Rafikova G, Sharifyanova Y, et al. Epigenetics as a key factor in prostate cancer [J]. *Adv Biol (Weinh)*, 2024, 20: e2300520. doi: 10.1002/adbi.202300520.
- [21] Gasperoni JG, Fuller JN, Darido C, et al. Grainyhead-like (Grhl) target genes in development and cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2735. doi: 10.3390/ijms23052735.
- [22] He W, Hong X, Chen G, et al. RNA modifications in gynecological cancer: current status and future directions [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 11: 1314075. doi: 10.3389/fmed.2024.1314075.
- [23] Su X, Lu R, Qu Y, et al. Diagnostic and therapeutic potentials of methyltransferase-like 3 in liver diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 172: 116157. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116157.
- [24] Peng N, Liu J, Hai S, et al. Role of post-translational modifications in colorectal cancer metastasis [J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16(3): 652. doi: 10.3390/cancers16030652.
- [25] Taylor BC, Sun X, Gonzalez-Ericsson PI, et al. NKG2A is a therapeutic vulnerability in immunotherapy resistant MHC-I heterogeneous triple negative breast cancer [J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(2): 290-307.
- [26] Corpetti M, Müller C, Beltran H, et al. Prostate-specific membrane antigen-targeted therapies for prostate cancer: towards improving therapeutic outcomes [J]. *Eur Urol*, 2024, 85(3): 193-204.
- [27] Wang Y, Zhou Y, Yang L, et al. Challenges coexist with opportunities: spatial heterogeneity expression of PD-L1 in cancer therapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(1): e2303175. doi: 10.1002/advs.202303175.
- [28] Valenza C, Guidi L, Battaiotto E, et al. Targeting HER2 heterogeneity in breast and gastrointestinal cancers [J]. *Trends Cancer*, 2024, 10(2): 113-123.

(编辑:张彩凤)