

宫颈癌淋巴脉管浸润的生物信息学分析

何炫明

(兰州市城关区甘肃中医药大小第一临床医学院 甘肃兰州 730000)

摘要: 目的:本研究旨在探讨淋巴脉管浸润宫颈癌患者的潜在分子机制, 筛选淋巴脉管浸润+的生物标志物。方法:采用差异分析和通路富集分析探索脉管浸润的分子机制。采用 ssGSEA 分析免疫浸润分布。将差异基因与免疫相关基因交集后用单因素 Cox 回归筛选免疫预后基因, 最后构建最优多变量 COX 模型。结果:宫颈癌脉管浸润阳性的差异基因富集在免疫相关通路。ssGSEA 结果显示 LVSI+患者的适应性免疫受到抑制。使用交集基因 EREG 和 IL-9R 构建 Cox 模型。

结论:本研究发现了脉管浸润的免疫浸润差异, 并提出 2 个免疫预后生物标志物。

前言

宫颈鳞癌是全球女性癌症死亡的主要原因。脉管浸润(lymphatic invasion, LVSI)是宫颈癌细胞扩散的重要途径, 是恶性肿瘤远处转移的关键过程。高通量测序已经确定一些与 LVSI 相关的基因, mir-221-3p 下调 THBS2 促进血管生成, 并通过依赖血管内皮生长因子的途径诱导淋巴管生成^[1]。人乳头状瘤病毒 E6 和 E7 通过抑制 lnc-CCDST 的表达促进肿瘤转移和血管生成^[2]。

本研究旨在探索 LVSI+宫颈癌中的潜在分子机制。通过 RNA 数据的差异分析和富集分析, 结果显示 LVSI 阳性组和阴性组间的免疫浸润存在显著差异。为了筛选风险因子, 将免疫相关基因进行了单变量和多变量 Cox 回归分析并构建了 LVSI 的多变量 Cox 模型并提出了提示 LVSI+患者预后的 2 个生物标志物。

材料与与方法

收集资料

从 TCGA 数据库(<https://gdc.cancer.gov/>)下载宫颈癌 RNA 数据。由于所有研究案例都来自公共数据库, 因此放弃了伦理原则的知情同意。

差异分析和通路富集分析

本研究使用 Limma 包进行差异基因分析, 差异阈值设置为 1, 假阳性率<0.05 且超过阈值为差异基因。使用“ClusterProfiler”包进行通路富集分析探索背后通路。

免疫差异基因的获取和免疫浸润分布的探索

取出差异基因内的免疫相关基因进一步分析, 免疫相关基因集从 IMMPORT 数据集(<https://www.immport.org/shared/home>)获得, 用单样本基因富集分析(ssGSEA)进一步分析两个亚组的免疫图谱和免疫细胞分布。

免疫差异基因的预后分析

将免疫差异基因进行单变量 COX 分析以获得预后相关基因并使用 Kaplan-Meier 分析, 单因素 Cox 回归分析筛选出 p 值<0.05 的基因命名为免疫预后基因。

基于 ISG 的多变量 Cox 模型的构建

以 TCGA 队列的总体生存期为生存指标并使用 Akaike Pool 信息标准分别构建多变量 Cox 生存模型。生存分析使用 R “Survival” 软件包, 风险系数使用以下公式计算:

$$Riskscore = \sum_{i=1}^n Expression(gene_i) \times Coefficient(gene_i)$$

“n”表示预测基因的总数, “i”表示每个选定基因的序列号。

统计学分析

年龄、生存时间和生存事件被表示为公式: $\bar{x} \pm s$, 肿瘤分期采用卡方检验, 差异分析使用双尾 t 检验, 单因素和多因素分析 COX 构建风险回归模型均使用 R 软件处理。

结果

临床一般资料

TCGA 数据库共检索到宫颈癌病例 253 例。在 LVSI 组中, 有 66 例 LVSI+和 49 例 LVSI-病例(表 1)。

表 2: 一般临床资料

	negative(N=49)	positive(N=66)	p-value
stage			
I-II	47 (75.5%)	51 (62.1%)	0.088
III-IV	2 (4.1%)	15 (16.7%)	
age			
Mean (SD)	47.7 (13.3)	48.6 (14.2)	0.714
time			
Mean (SD)	20.1 (35.2)	26.0 (36.0)	0.383

差异分析结果

LVSI 阳性组与阴性组相比共有 868 个差异表达基因, Go 富集分析结果表明 LVSI+组主要富集在“抗原加工通过 MHC-II 类递呈外源性多肽抗原”和“免疫受体活性”等通路。

免疫浸润结果

利用免疫细胞集中 24 个免疫细胞进行基因组单样本基因富集集(ssGSEA)分析进一步探索两组之间的免疫浸润模式。(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124716317090>)。结果显示, 活化 CD4+T 细胞、效应记忆 CD8+T 细胞、中央记忆 CD4+T 细胞和激活的树突状细胞的丰度均显著减少 (P<0.05)。

免疫差异基因的筛选

免疫基因集和差异基因的交集得到 59 个基因。对结果进行单因素 Cox 分析, 结果显示在 LVSI 组中鉴定出两个预后显著相关的基因, 即免疫预后差异基因。

临床生物标志物的确定和多变量 COX 模型的构建

利用免疫预后基因构建多因素 COX 回归模型预测 LVSI+患者的生存情况。风险比揭示了 IL-9R 作为保护因素和 EREG 作为 LVSI+患者的危险因素。根据单因素和多因素 COX 回归分析结果, IL-9R 和 ERG 可能是 LVSI+组中独立的预后生物标志物。LVSI 组的风险分数使用以下公式计算:

$$Riskscore = 1.6272 \times expression(EREG) + 0.1803 \times expression(IL9R)$$

讨论

本研究发现了在 LVSI+宫颈癌中在免疫相关调节, 我们进一步挖掘了免疫机制并筛选了免疫相关基因构建预后模型。以往的研究尚未对 LVSI+宫颈癌患者的免疫因素进行过多探究, 我们的研究发现了 LVSI+患者的免疫浸润差异。富集结果显示 LVSI+组富集在免疫相关通路。ssGSEA 结果发现 LVSI+组获得性免疫细胞的表达减少。我们进一步确定了具有预后意义的免疫基因并构建了多变量 Cox 生存模型。

研究 LVSI 的分子机制对于了解宫颈癌的侵袭性至关重要。在大多数宫颈癌中, 抗原提呈和 MHC I 类分子的活性常常被抑制^[3]。我们根据两种转移模式对宫颈癌进行了更准确的分类。CD8+细胞毒性 T 细胞只有在激活的树突状细胞和 CD4+T 细胞的条件下才能产生^[4]。通过抑制获得性免疫和维持原发肿瘤的血管生成, CTL 下降与 LVSI 之间存在相关性^[5]。我们的结果与前人研究一致并支持获

(下转第 46 页)

(上接第 42 页)

得性免疫在 LSVI 过程中起关键作用的假说。EREG 是表皮生长因子受体配体之一, 在结肠癌^[6]中表达持续增加被视为危险因子, 我们的 EREG 结果与其一致。IL9R 作为一种抗肿瘤活性基因, 在几种癌症^[7]中上调 T 调节细胞活性。我们的结果表明, IL9R 在 LSVI 组中表达降低并且提示可作为宫颈癌的免疫治疗靶点和预测 LSVI 状态的生物标志物。我们的研究也存在一定局限性: 本研究为回顾性单中心研究, 可能存在偏倚。我们将前瞻收集来自多个中心的宫颈癌数据以验证免疫浸润和模型的适用性。

结论

综上所述, 我们的研究结果表明了脉管浸润阳性的免疫浸润情况, 还提出了四个潜在的宫颈癌化疗靶点。

引文

[1] Zhou C F, Ma J, Huang L, et al. Cervical squamous cell carcinoma-secreted exosomal mir-221-3p promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by targeting vash1[J]. *Oncogene*, 2019, 38(8): 1256-1268. DOI:10.1038/s41388-018-0511-x

[2] Ding X, Jia X, Wang C, et al. A dhx9-lncrna-mdm2 interaction regulates cell invasion and angiogenesis of cervical cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(9): 1750-1765. DOI:10.1038/s41418-018-0242-0

[3] Cromme F V, Airey J, Heemels M T, et al. Loss of transporter

protein, encoded by the tap-1 gene, is highly correlated with loss of hla expression in cervical carcinomas[J]. *J Exp Med*, 1994, 179(1): 335-340. DOI:10.1084/jem.179.1.335

[4] Shankaran V, Ikeda H, Bruce A T, et al. Ifngamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity[J]. *Nature*, 2001, 410(6832): 1107-1111. DOI:10.1038/35074122

[5] Tian L, Goldstein A, Wang H, et al. Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming[J]. *Nature*, 2017, 544(7649): 250-254. DOI:10.1038/nature21724

[6] Baba I, Shirasawa S, Iwamoto R, et al. Involvement of deregulated epiregulin expression in tumorigenesis in vivo through activated ki-ras signaling pathway in human colon cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(24): 6886-6889

[7] Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing t cells[J]. *Nat Med*, 2012, 18(8): 1248-1253. DOI:10.1038/nm.2856

何炫明, 男, 1995 年 3 月生, 广西南宁人, 硕士在读研究生, 主要研究方向生物信息学分析, 影像组学