

SEP15 与胶质瘤患者预后和免疫浸润的关系

The relationship between SEP 15 and prognosis and immune infiltration in glioma patients

侯俊志^{1,2} 张亮^{1,2} 张白雪^{1,2} 董静² 张志^{1,2}

Hou Junzhi 1,2, Zhang Liang 1,2, Zhang Snow 1,2, Dong Jing 2, Zhang Zhi 1,2

(1 华北理工大学; 2 唐山工人医院)

(1. North China University of Science and Technology, 2. Tangshan Workers' Hospital)

摘要:目的:通过生物信息方法分析 SEP15 与胶质瘤预后和免疫的关系, 为 SEP15 在胶质瘤中的诊断和治疗提供依据。

方法:我们从 UCSC 数据库中下载了经统一标准化的泛癌数据集,使用 R 软件包 survival 的 survfit 分析 SEP15 对胶质瘤预后的影响, R 软件包 ESTIMATE、IOBR 分析 SEP15 与胶质瘤免疫浸润的关系。

结果:差异分析表明, SEP15 在肿瘤患者中表达量高于正常人, 生存分析表明, SEP15 高表达对胶质瘤预后不利, 此外瀑布图显示, SEP15 低表达的患者往往伴随着 IDH1 突变。免疫浸润分析表明, SEP15 与胶质瘤免疫微环境密切相关, 其可能通过 B 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞在胶质瘤中发挥作用。

结论: SEP15 是一个新的胶质瘤诊断和预后的因子。

Abstract: Objective: To analyze the relationship between SEP 15 and glioma prognosis and immunity by bioinformatic method, and to provide a basis for the diagnosis and treatment of SEP 15 in glioma.

Methods: We downloaded the uniformly standardized pan-cancer dataset from the UCSC database and analyzed the effect of SEP 15 on the prognosis of glioma using the R package survival and the survfit of the R package ESTIMATE and IOBR.

Results: Differential analysis showed that SEP 15 was more highly expressed in tumor patients than normal people, and survival analysis showed that high expression of SEP 15 had impaired the prognosis of glioma. In addition, the waterfall chart showed that patients with low expression of SEP 15 were often accompanied by IDH 1 mutation. Immune infiltration analysis revealed that SEP 15 is closely related to the glioma immune microenvironment, and it may play a role in glioma through B cells, neutrophils, macrophages, and dendritic cells.

Conclusion: SEP 15 is a new diagnostic and prognostic factor for glioma.

关键词: 胶质瘤, SEP15, 免疫浸润, 生存分析

Key words: glioma, SEP 15, immune infiltration, survival analysis

引言

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性肿瘤, 占中枢神经系统 (CNS) 恶性肿瘤的 81%。它们通常起源于神经胶质细胞或前体细胞, 室管膜细胞并发展成星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤或少突星形细胞瘤或胶质母细胞瘤^{1,2}。世界卫生组织将胶质瘤分为四级, 其中 1 级和 2 级胶质瘤为低级别胶质瘤, 3 级和 4 级胶质瘤为高级别胶质瘤³。其中胶质母细胞瘤的预后最差, 根据 NCCN 指南, 标准治疗包括肿瘤切除、放疗联合替莫唑胺 (TMZ) 和辅助 TMZ 化疗, 放疗和其他治疗相结合, 5 年总生存率为 9.8%, 而单纯放疗为 1.9%。尽管采用标准治疗, GBM 患者的中位生存时间仅为诊断后 12-15 个月⁴。因此迫切需要寻找对胶质瘤治疗的新靶点来改善患者预后。15-kDa 硒蛋白 (SEP15) 是一种可能介导硒化学预防作用的候选蛋白^{5,6}。Sep15 基因位于人类 1 号染色体上的 p31 位

置。该区域已被证明会发生杂合性丢失, 这通常与肿瘤进展相关, 表明该硒蛋白具有潜在的肿瘤抑制作用⁷。据报道 SEP15 可以通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响结直肠癌进展⁸, 体内研究表明, Sep15 敲除小鼠可以免受化学诱导的异常隐窝病灶形成的影响, 并且 Sep15 在体内结肠癌发生中似乎具有致癌特性⁹, 此外吸烟个体中与硒状态相关的肺癌风险通过 Sep15 多态性被改变。SEP15 在肿瘤中的作用愈发凸显, 然而目前还没有文章表明, SEP15 与胶质瘤有关, 本研究通过生物信息学的方法分析 SEP15 与胶质瘤分期、预后和免疫的关系, 旨在为胶质瘤诊断和治疗提供新思路。

材料方法

数据集信息获取

我们从 UCSC(<https://xenabrowser.net/>)数据库中下载了经统一标准化的泛癌数据集: TCGA、TARGET、GTEx

(PANCAN,N=19131,G=60499),此外我们从中提取了 SEP15 基因在 GBM、LGGGBM 和 LGG 数据集和正常人中的表达数据, LGG 数据集包括胶质瘤 WHO II、III 级患者, GBM 数据集包含 WHO IV 级患者, LGGGBM 数据集包含 WHOII、III、IV 级患者。我们过滤了表达水平为 0 的样本,更进一步的对每一个表达值进行了 $\log_2(x+0.001)$ 变换。

差异分析

我们使用 R 软件(version 3.6.4)计算了肿瘤中正常样本和肿瘤样本中 SEP15 的表达差异,使用非配对的 Wilcoxon Rank Sum and Signed Rank Tests 进行差异显著性分析。此外我们进一步分析了 SEP15 基因在胶质瘤不同 WHO 分级中的表达差别。

预后分析

为了研究 SEP15 对胶质瘤预后的影响,我们首先根据 SEP15 基因表达中位数将患者分成两组,进一步使用 R 软件包 survival 的 survfit 函数分析两组的预后差异,利用 logrank test 方法评估了不同组样本之间的预后差异显著性。

免疫浸润与免疫细胞分析

为了研究 SEP15 与免疫浸润的关系,我们利用 R 软件包 ESTIMATE 根据基因表达计算了每个肿瘤中每个患者的 ESTIMATE scores,并利用皮尔森相关计算 SEP15 与 ESTIMATE scores 的相关系数。为了进一步研究 SEP15 对免疫细胞的影响,我们利用 R 软件包 IOBR 的 Timer 方法,根据基因表达重新评估了每个肿瘤中每个患者的 B 细胞、CD4 T 细胞、CD8 T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞浸润评分,并利用皮尔森相关计算了 sep15 与这些免疫细胞的相关系数。

基因突变分析

为了研究 SEP15 与胶质瘤突变的关系,我们根据 SEP15 表达量中位数,将胶质瘤患者分为高低两组,总共包含 662 个检测了突变的样本,通过使用“oncoplot()”函数生成的瀑布图来评估不同组间 SNV 突变的变化,并使用卡方检验评估了每一组样本中基因突变频次的差异。

结果

差异分析结果显示(图 1A), SEP15 在肿瘤患者中的表达量显著高于正常人,在 IV 级胶质母细胞瘤中(肿瘤: 8.19 ± 0.62 ,正常: 5.92 ± 0.66 , $p=1.4e-86$)、在所有胶质瘤中(肿瘤: 7.32 ± 0.75 ,正常: 5.92 ± 0.66 , $p=4.1e-205$)、II III 级胶质瘤中(肿瘤: 7.06 ± 0.58 ,正常: 5.92 ± 0.66 , $p=1.2e-158$)。此外,SEP15 表达量与胶质瘤分级也有关(图 1B),

其中胶质瘤分级越高, SEP15 表达越高,差异结果具有统计学意义 ($P<0.05$)。

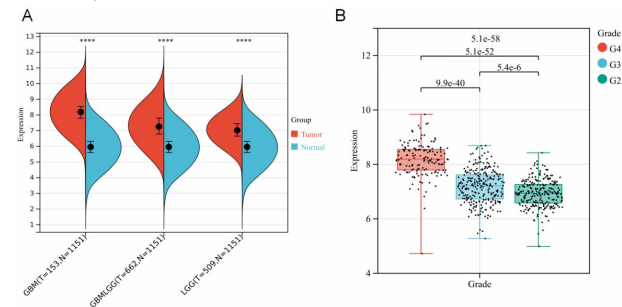


图 1: A:SEP15 在肿瘤和正常人表达的差异分析图。B: SEP15 在不同 WHO 分级中的表达差异分析。

生存分析结果显示, SEP15 与胶质瘤总生存相关,是预后的不利因素。在 II、III 级胶质瘤中(图 2A), SEP15 的风险比 $HR=2.52$, 95%可信区间 (1.70, 3.73), $p=2.0e-6$ 。在所有胶质瘤中(图 2B), SEP15 的风险比 $HR=4.79$,95%可信区间 (3.52,6.51), $p=3.4e-28$ 。SEP15 与 IV 级胶质瘤患者预后无关。

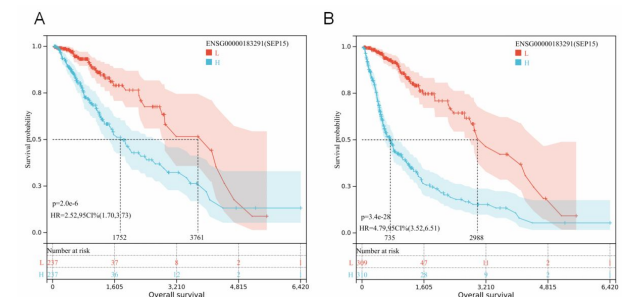


图 2: A: SEP15 在 II、III 级患者中的生存分析图。B: SEP15 在 II、III、IV 患者中的生存分析图。

免疫浸润相关性分析结果提示,SEP15 与胶质瘤患者、胶质母细胞瘤患者,和 II、III 级胶质瘤的 estimatescore 相关。其中在胶质瘤患者中, SEP15 与 estimatescore 的相关系数为 0.62, $P=4.7e-72$, 在 II III 级胶质瘤中, SEP15 与 estimatescore 的相关系数为 0.52, $P=6.8e-37$, 在 IV 级胶质母细胞瘤中, 相关系数为 0.33, $P=2.9e-5$ (图 3)。

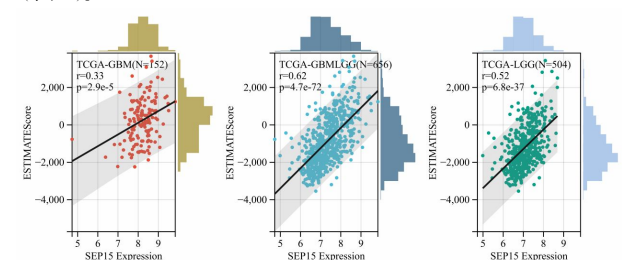


图 3: SEP15 与 ESTIMATEscore 相关分析图

免疫细胞相关分析结果提示: 在 II III 级胶质瘤中 SEP15 与

B 细胞、CD4 T 细胞、CD8 T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞相关，其中与树突状细胞相关系数最大，为 0.7。在胶质瘤中 SEP15 与 CD8 T 细胞相关系数最大，为 0.57。SEP15 与 IV 级胶质母细胞瘤的免疫细胞相关性较弱（图 4）。

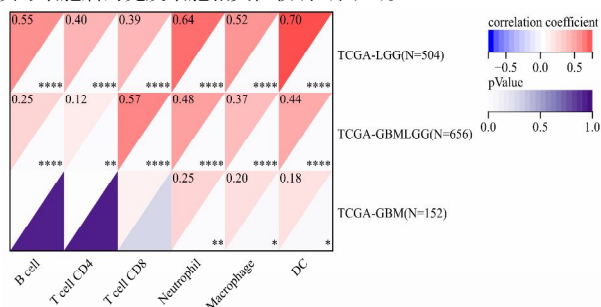


图 4：SEP15 与免疫细胞相关分析的热图

瀑布图提示：SEP15 低表达的患者绝大多数都是 II III 级胶质瘤患者。在胶质瘤中，IDH1, TP53, CIC, TTN, EGFR, PTEN 是最常见的突变基因。在 SEP15 高低组之间，这些基因突变频率差异具有统计学意义（图 5）。

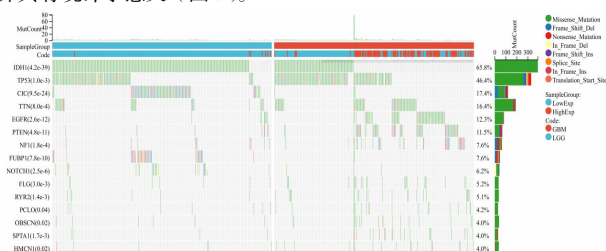


图 5：胶质瘤患者中前 15 个突变基因的瀑布图

讨论：

SEP15 在肿瘤中的作用愈发被研究者重视，然而尚没有研究表明 SEP15 与胶质瘤预后相关。差异分析表明，SEP15 在胶质瘤患者中的表达要显著高于正常人。此外有研究表明 SEP15 表达变化可能影响肿瘤发生发展^{10,11}，进一步的生存分析表明，SEP15 高表达是胶质瘤的预后不利因素，进一步的突变分析表明：SEP15 与 IDH1 突变有关，SEP15 低表达组的 IDH1 突变频率远高于 SEP15 高表达组。IDH1 编码细胞质异柠檬酸脱氢酶，可将异柠檬酸转化为 α -酮戊二酸。由 IDH1 和 IDH2 编码的 NADP+ 依赖性异柠檬酸脱氢酶的突变发生在几种类型的恶性胶质瘤中¹²。该突变影响 40% 的神经胶质瘤（约 70% 的 II 级、50% 的 III 级和 5% 至 10% 的原发性胶质母细胞瘤¹³。多项研究报告了 IDH1 突变对预后的影响。无论级别如何，携带 IDH1 基因突变的肿瘤比非突变肿瘤具有更好的结果^{14,15}。这也从侧面证明 SEP15 与预后密切相关。

免疫与胶质瘤预后和治疗密切相关^{16,17}。为了评估 SEP15 与胶质瘤免疫的关系，我们进行了免疫浸润分析，结果表明 SEP15 与胶

质瘤 estimatescore 评分密切相关，而且与树突状细胞密切相关。有研究表明，自体树突状细胞免疫疗法已被证明对治疗中枢神经系统外的肿瘤有效。目前来自 I 期和 II 期试验的证据表明，对中枢神经系统肿瘤也有类似的疗效，并且可以产生针对这些肿瘤的主动免疫反应¹⁸。总之我们的研究表明 SEP15 可能是胶质瘤预后的重要影响因素，是胶质瘤治疗的潜在靶点。

参考文献：

- [1] Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol.* 2018 Oct 1;20(suppl_4):iv1–iv86. doi: 10.1093/neuonc/now131. Erratum in: *Neuro Oncol.* 2018 Nov 17;null. PMID: 30445539; PMCID: PMC6129949.
- [2] Zhang N, Zhang L, Qiu B, Meng L, Wang X, Hou BL. Correlation of volume transfer coefficient Ktrans with histopathologic grades of gliomas. *J Magn Reson Imaging.* 2012 Aug;36(2):355–63. doi: 10.1002/jmri.23675. Epub 2012 May 11. PMID: 22581762; PMCID: PMC3399966.
- [3] Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106. PMID: 34185076; PMCID: PMC8328013.
- [4] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC–NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):459–66. doi: 10.1016/S1470–2045(09)70025–7. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19269895.
- [5] Kumaraswamy E, Malykh A, Korotkov KV, Kozyavkin S, Hu Y, Kwon SY, Moustafa ME, Carlson BA, Berry MJ, Lee BJ, Hatfield DL,

Diamond AM, Gladyshev VN. Structure–expression relationships of the 15–kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology. *J Biol Chem.* 2000 Nov 10;275(45):35540–7. doi: 10.1074/jbc.M004014200. PMID: 10945981.

[6] Apostolou S, Klein JO, Mitsuuchi Y, Shetler JN, Poulikakos PI, Jhanwar SC, Kruger WD, Testa JR. Growth inhibition and induction of apoptosis in mesothelioma cells by selenium and dependence on selenoprotein SEP15 genotype. *Oncogene.* 2004 Jun 24;23(29):5032–40. doi: 10.1038/sj.onc.1207683. PMID: 15107826.

[7] Apostolou S, De Rienzo A, Murthy SS, Jhanwar SC, Testa JR. Absence of BCL10 mutations in human malignant mesothelioma. *Cell.* 1999 Jun 11;97(6):684–6; discussion 686–8. doi: 10.1016/s0092-8674(02)09765-9. PMID: 10380921.

[8] Tsuji PA, Carlson BA, Yoo MH, Naranjo–Suarez S, Xu XM, He Y, Asaki E, Seifried HE, Reinhold WC, Davis CD, Gladyshev VN, Hatfield DL. The 15kDa selenoprotein and thioredoxin reductase 1 promote colon cancer by different pathways. *PLoS One.* 2015 Apr 17;10(4):e0124487. doi: 10.1371/journal.pone.0124487. PMID: 25886253; PMCID: PMC4401539.

[9] Tsuji PA, Carlson BA, Naranjo–Suarez S, Yoo MH, Xu XM, Fomenko DE, Gladyshev VN, Hatfield DL, Davis CD. Knockout of the 15 kDa selenoprotein protects against chemically–induced aberrant crypt formation in mice. *PLoS One.* 2012;7(12):e50574. doi: 10.1371/journal.pone.0050574. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23226526; PMCID: PMC3514276.

[10] Gresner P, Gromadzinska J, Jablonska E, Kaczmarek J, Wasowicz W. Expression of selenoprotein–coding genes SEPP1, SEP15 and hGPX1 in non–small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009 Jul;65(1):34–40. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.10.023. Epub 2008 Dec 6. PMID: 19058871.

[11] Reszka E. Selenoproteins in bladder cancer. *Clin Chim Acta.* 2012 May 18;413(9–10):847–54. doi: 10.1016/j.cca.2012.01.041. Epub 2012 Feb 12. PMID: 22349600.

[12] Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic–Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B,

Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765–73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710. PMID: 19228619; PMCID: PMC2820383.

[13] Rossetto M, Ciccarino P, Boisselier B, Labussiere M, Sanson M. Metabolism of glioma and IDH1/IDH2 mutations. *Rev Neurol (Paris).* 2011 Oct;167(10):699–703. doi: 10.1016/j.neurol.2011.08.002. Epub 2011 Aug 31. PMID: 21885076.

[14] Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009 Oct 1;15(19):6002–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715. Epub 2009 Sep 15. PMID: 19755387.

[15] Sanson M, Marie Y, Paris S, Idhah A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang–Xuan K, Delattre JY. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 1;27(25):4150–4. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832. Epub 2009 Jul 27. PMID: 19636000.

[16] Barthel L, Hadamitzky M, Dammann P, Schedlowski M, Sure U, Thakur BK, Hetze S. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2022 Mar;41(1):53–75. doi: 10.1007/s10555-021-09997-9. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34687436; PMCID: PMC8924130.

[17] Wei J, Chen P, Gupta P, Ott M, Zamler D, Kassab C, Bhat KP, Curran MA, de Groot JF, Heimberger AB. Immune biology of glioma–associated macrophages and microglia: functional and therapeutic implications. *Neuro Oncol.* 2020 Feb 20;22(2):180–194. doi: 10.1093/neuonc/noz212. PMID: 31679017; PMCID: PMC7442334.

[18] Sokratous G, Polyzoidis S, Ashkan K. Immune infiltration of tumor microenvironment following immunotherapy for glioblastoma multiforme. *Hum Vaccin Immunother.* 2017 Nov 2;13(11):2575–2582. doi: 10.1080/21645515.2017.1303582. Epub 2017 Mar 31. PMID: 28362548; PMCID: PMC5703406.

第一作者简介：姓名：侯俊志，性别：男，民族：汉族，出生年月：1998年5月16日，籍贯：河北省唐山市，学历：研究生在读，专业：放射肿瘤学