

基于大型队列鉴定肺腺癌共刺激 / 共抑制分子亚型并预测肿瘤预后和免疫特征

陈耀丰 *

佛山市第一人民医院呼吸与危重症医学科 佛山广东 528000

摘要: 目的: 共刺激 / 共抑制分子通过 T 细胞信号转导影响抗肿瘤免疫反应。本研究通过分子亚型鉴定, 探究了共刺激 / 共抑制分子对肺腺癌预后和免疫微环境的预测性能。方法: 本研究纳入了 1456 例肺腺癌样本和 76 例对照样本, 从中进一步提取 74 个共刺激 / 共抑制分子的表达数据并筛选在肿瘤和对照样本中具有显著差异的基因。基于 ConsensusClusterPlus, 研究对样本进行了共刺激 / 共抑制亚型分析, 比较了不同亚型间的生存预后、临床表型、突变状态、免疫评分和免疫细胞浸润的差异。最后, 研究纳入了独立的 UCSC 肺腺癌数据集, 用于分子亚型的外部验证。结果: 本研究共筛选了 16 个在肺腺癌和对照样本中显著差异表达的共刺激 / 共抑制分子, 并鉴定出三个疾病分子亚型, 其中 cluster1 预后最好, 而 cluster3 预后最差。同时, 这些共刺激 / 共抑制分子绝大部分在 cluster3 中显著低表达。通过亚型间的临床和突变特征比较, 我们发现性别、总生存状态、KRAS 突变状态和 STK11 突变状态可能是 cluster1 和 3 预后差异的原因。此外, 我们还发现 cluster3 的免疫评分和基质评分显著降低, 而多种免疫细胞浸润异常升高, 提示 cluster3 中可能存在抗肿瘤免疫抑制导致预后不良。结论: 本研究筛选的 16 个共刺激 / 共抑制分子可作为肺腺癌分子亚型的标志物, 预测肺腺癌的生存预后和免疫特征。

关键词: 共刺激 / 共抑制分子; 分子亚型; 肺腺癌; 预后; 免疫微环境

1. 背景

肺腺癌是非小细胞肺癌最常见的组织学亚型, 占总病例数的 78%。通过手术切除原发肿瘤和局部肿瘤的早期肺腺癌患者的 5 年生存率可达 70% 以上, 但是 75% 的非小细胞肺癌患者在确诊时已进入疾病晚期^[1]。随着先进的癌症治疗策略的不断开发, 肺腺癌患者的生存概率已经有所提高。免疫检查点抑制剂的引入给非小细胞肺癌的免疫治疗带来了新的希望^[2]。但是, 目前只有部分患者可以从基于 PD-1 和 PD-L1 的免疫治疗中获益^[3]。因此需要进一步开发新的免疫检查点靶点, 来改善肺腺癌患者的治疗手段和临床结局。

在肿瘤免疫中, Treg 细胞可以通过抑制抗肿瘤免疫参与肿瘤的发生发展, 而其关键的调控机制是靶向在 T 细胞表面表达的共刺激分子。共刺激分子由 B7-CD28 家族和肿瘤坏死因子家族组成, 是免疫治疗策略的潜在分子靶点^[4]。已有研究发现, 共刺激分子相关的基因标记可以预测肺腺癌的预后和免疫治疗反应^[5]。因此, 本研究基于这些共刺激和共抑制分子, 揭示了肺腺癌中可能存在的不同分子亚型。此

外, 本研究还揭示了不同共刺激 / 共抑制分子亚型的免疫和预后特征, 为进一步筛选免疫检查点靶点、丰富肺腺癌患者的免疫治疗手段提供了理论基础。

2. 材料与方法

2.1 数据来源与预处理

本研究从 NCBI-GEO 数据库中筛选了 7 套肺腺癌相关数据集, GSE11969、GSE26939、GSE31210、GSE37745、GSE63459、GSE68465 和 GSE72094。从中挑选生存时间 >0 的腺癌样本 1410 例正常或癌旁组织的对照样本 76 例。

研究从 UCSC-Xena 平台^[6]下载了肺腺癌患者的基因表达数据, 挑选了 497 例具有 OS 信息的肿瘤样本作为验证集。

我们采用 R3.6.1 语言 version3.38.0 对数据集进行批次效应去除。

2.2 获取肿瘤中显著差异表达的 T 细胞标记基因

我们从文献中下载了 74 个共刺激和共抑制分子^[7,8]。与上述得到的数据集中包含的基因进行匹配, 获得共刺激和共抑制分子对应基因在各个样本中的表达值。我们通过 T 检

验比较基因在肿瘤样本和对照样本中的表达差异。

2.3 分子亚型鉴定

我们利用 R3.6.1 ConsensusClusterPlus Version 1.54.0 对样本进行共刺激 / 共抑制亚型分析。研究计算了样本间的 Pearson 相关系数, 观察亚型内的样本相关性是否大于亚型间的相关性。研究通过主成分分析法 (PCA) 观察不同亚型样本的聚集性。

2.4 不同亚型间的预后分析以及和临床表型的关联分析

研究利用 survival package Version2.41-1 中的 Kaplan-Meier (KM) 法来评估不同亚型样本之间的生存预后相关性。研究通过卡方检验对不同亚型样本的年龄、性别、吸烟状态、OS、N 分期、T 分期、肿瘤分期、肿瘤分级、KRAS 突变状态、EGFR 突变状态、TP53 突变状态和 STK11 突变状态进行了统计和比较。

2.5 亚型间的免疫微环境比较

研究采用 ESTIMATE 算法, 计算了肿瘤样本的基质评分和免疫评分, 并采用 T 检验对各亚型的各个评分进行比较。

研究利用 CIBERSORT 算法计算样本中 22 种免疫细胞的比例, 并通过 KW 检验比较不同亚型间免疫细胞浸润丰度的差异。

2.6 亚型外部验证

结合样本的预后信息, 本研究进一步开展了 KM 生存分析, 并通过 log-rank 检验评估了亚型间的生存差异。研究采用了 KW 检验比较了各个共刺激 / 共抑制基因是否在 UCSC 肺腺癌亚型间存在显著差异。

3. 结果

3.1 共刺激 / 共抑制分子在肿瘤和对照样本中的表达差异分析

研究流程如图 1 所示。本研究合并了 7 个 GEO 数据集的基因表达数据, 并进行批次效应去除。批次效应去除前后的 PCA 结果如图 2A-B 所示。与合并数据集注释到的基因进行匹配, 我们共获得了 49 个共刺激 / 共抑制基因的表达数据。

研究比对了对肿瘤和对照样本的共刺激 / 共抑制基因表达谱, 筛选出 16 个具有显著表达差异的基因 (图 2C-D)。3.2 肺腺癌分子亚型鉴定

基于 16 个差异基因, 我们识别出 3 个 cluster 亚型 (图 3A-B), 不同的 cluster 更趋向于聚集在一起 (图 3C-D)。

研究发现, HHLA2 在 cluster1 中显著高表达, TNFRSF10D 在 cluster3 中显著高表达, TNFRSF21 和 CD58 在三个亚型间表达无显著差异, 其余基因均在 cluster2 呈现显著高表达, 并在 cluster3 中显著低表达 (图 3E-F)。

3.3 不同亚型在生存预后和临床表型中的差异
研究发现不同亚型之间, 年龄、性别、吸烟状态、OS 状态、肿瘤分级、KRAS 突变状态、EGFR 突变状态和 STK11 突变状态存在显著差异 ($P < 0.05$) 如图 4A-H 所示。KM (图 4I) 曲线提示, cluster1 患者的预后最好, cluster3 患者预后较差。

3.2 亚型间的免疫微环境分析

相比于 cluster1 和 2, cluster3 的免疫评分、基质评分、综合评分最低, 肿瘤纯度最高 (图 5A)。研究发现有 19 种免疫细胞在 3 个亚型中存在显著差异。其中, 幼稚 B 细胞、记忆 CD4T 细胞、活化的自然杀伤细胞、单核细胞、M0 巨噬细胞、M2 巨噬细胞、以及活化的肥大细胞在 cluster3 中明显升高 (图 5B)。

3.3 分子亚型验证

研究发现验证集中三个亚型之间存在显著的生存预后差异 ($P < 0.05$), 并且 cluster3 的预后更差 (图 6A) 绝大部分基因在 cluster3 中显著低表达 (图 6B)。验证结果与前期研究结果基本一致, 表明这 16 个基因可作为疾病亚型的标记物, 用于预测肺腺癌的生存预后。

4. 讨论

本研究基于 16 个 T 细胞共刺激和共抑制分子, 鉴定了三个肺腺癌亚型, 这三个亚型在共刺激 / 共抑制分子的表达、患者临床特征、生存预后状态、免疫细胞浸润丰度等方面都具有显著差异, 说明共刺激和共抑制分子可以作为肺腺癌分子亚型的标志物来预测患者的预后和免疫特征。

三个分子亚型中, cluster3 的预后最差, HHLA2 在 cluster3 中显著低表达, 在预后较好的 cluster1 中高表达, 说明 HHLA2 可能是识别共刺激 / 共抑制分子亚型并且预测预后的关键基因。有研究证实了 HHLA2 可能是肺腺癌潜在的预后免疫检查点, 并与患者的预后风险显著相关^[9]。此外, 还有研究发现 HHLA2 的表达升高可能与 EGFR 突变激活的肺腺癌有关^[10]。而在 HHLA2 的表达升高的 cluster1 中, 我们还发现了 EGFR 突变型患者的分布显著增加, 进一步说明了 HHLA2 的表达在肺腺癌中与 EGFR 突变状态显著相关。

我们发现 cluster3 的免疫评分和基质评分显著低于 cluster1, 这可能与抗肿瘤免疫被抑制有关, 并导致了肺腺癌患者的不良临床结局。我们还在 cluster3 中观察到了巨噬细胞等免疫细胞的浸润丰度显著升高。有研究发现, 相比于肺鳞癌, M0 和 M2 巨噬细胞在肺腺癌中比例显著增加, 同时 M0 巨噬细胞浸润丰度与肺腺癌患者的生存率显著相关^[11]。肺腺癌中巨噬细胞的浸润丰度增加可能会导致更高的预后风险和更差的临床结局。

本研究鉴定并验证了肺腺癌中的共刺激 / 共抑制分子亚型, 但这 16 个共刺激 / 共抑制因子如何调控 T 细胞的信号转导影响肺腺癌预后仍未可知。因此, 需要进一步开展基于实验的免疫调控机制研究。

5. 结论

本研究基于 16 个共刺激 / 共抑制分子鉴定了 3 个肺腺癌分子亚型, 其中 cluster3 预后最差, 大部分的共刺激 / 共抑制基因在 cluster3 中显著低表达。共刺激 / 共抑制分子的表达可作为肺腺癌分子亚型的标志物, 用于预测肺腺癌患者的预后和免疫特征。

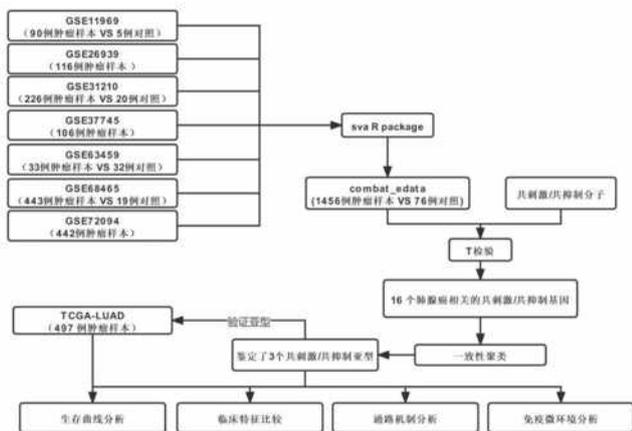


图 1 研究流程图。

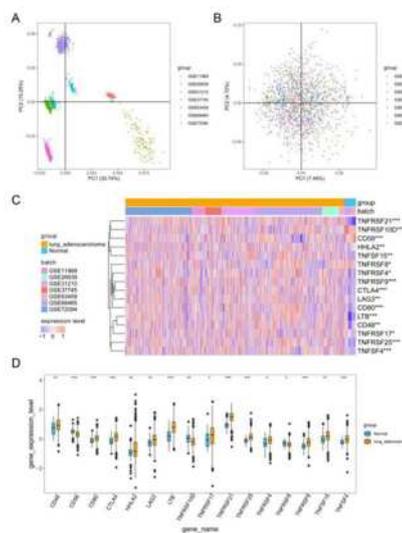


图 2 筛选在合并数据集的肿瘤和对照样本间显著差异表达的共刺激 / 共抑制分子。

A-B: 7 个 GEO 数据集去除批次效应前 (A) 后 (B) 的 PCA 图。C-D: 16 个差异共刺激 / 共抑制基因的表达热图 (C) 和箱式图 (D); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

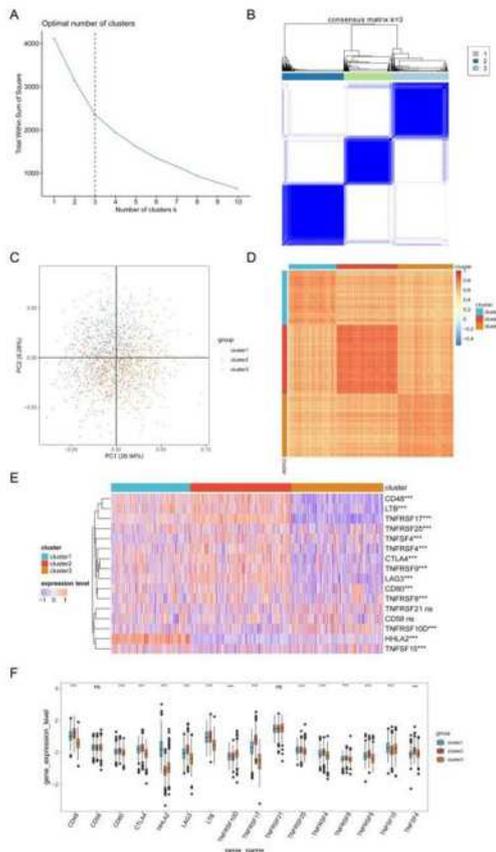


图 3 根据 16 个差异基因鉴定肺腺癌分子亚型。

A: 肺腺癌样本的最佳聚类数为3。B: 无监督聚类分析识别出3个cluster亚型。C: 不同的cluster样本的PCA图。D: 样本间相关系数热图。E-F: 16个差异基因在三个亚型间的表达热图(E)和箱式图(F); $***P < 0.001$ 。

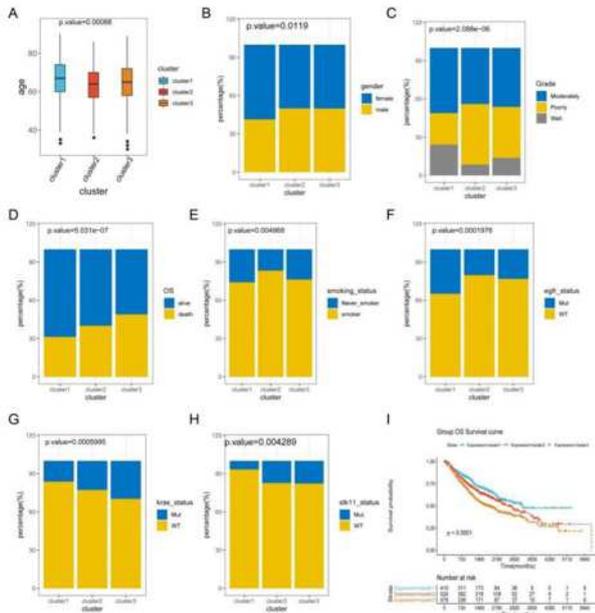


图4 三个分子亚型在临床特征、遗传突变特征和生存预后中的差异。

A-E: 三个亚型在年龄(A)、性别(B)、肿瘤分级(C)、OS状态(D)和吸烟状态(E)的分布差异。F-H: 三个亚型在, 包括EGFR突变(F)、KRAS突变状态(G)和STK11突变状态(H)的分布差异。I: 不同亚型间KM曲线。

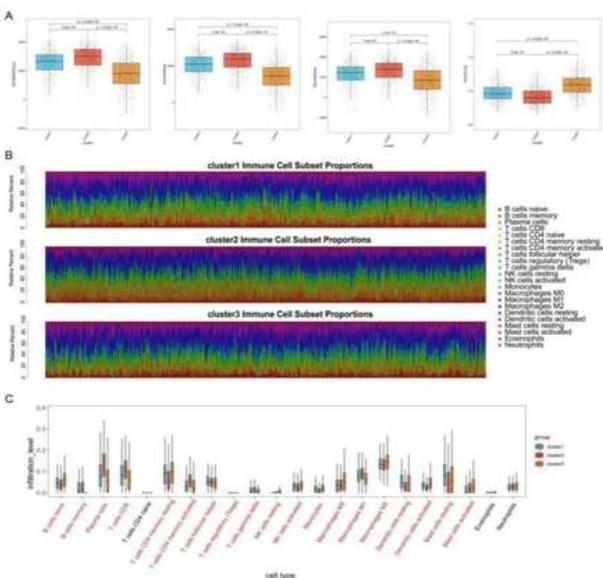


图5 三个分子亚型间的免疫评分和免疫细胞浸润差异。

A: 不同亚型间免疫评分、基质评分、综合评分以及肿瘤纯度分布差异箱式图。B: 免疫细胞浸润景观图。C: 22中免疫细胞在三个亚型中的浸润差异。

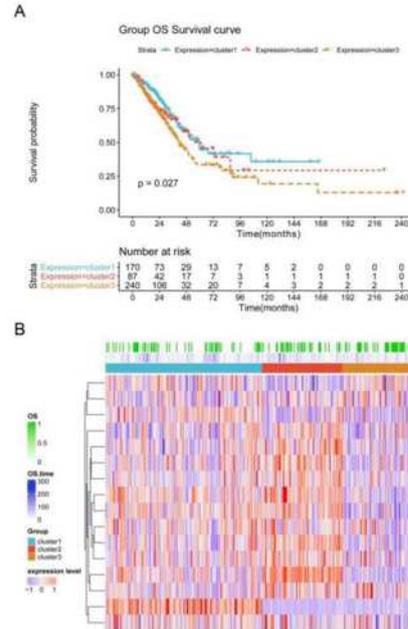


图6 验证集中分子亚型验证。

A: 三个亚型的KM曲线。B: 16个基因在三个亚型间的表达差异热图。

参考文献:

- [1] Blandin Knight S, et al. Progress and prospects of early detection in lung cancer [J]. *Open biology*, 2017, 7(9).
- [2] 刘斌, et al. 晚期非小细胞肺癌免疫检查点抑制剂治疗的研究进展 [J]. *中国癌症防治杂志*, 2024, 16(02): 243-8.
- [3] Spella M, et al. Immune Resistance in Lung Adenocarcinoma [J]. *Cancers*, 2021, 13(3).
- [4] Zhang C, et al. Large-scale analysis reveals the specific clinical and immune features of B7-H3 in glioma [J]. *Oncimmunology*, 2018, 7(11): e1461304.
- [5] Zhang C, et al. Identification of a costimulatory molecule-based signature for predicting prognosis risk and immunotherapy response in patients with lung adenocarcinoma [J]. *Oncimmunology*, 2020, 9(1): 1824641.
- [6] Goldman MJ, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform [J]. *Nature biotechnology*,

2020, 38(6): 675–8.

[7]Hodge JW, et al. Costimulatory molecules as adjuvants for immunotherapy [J]. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2006, 11: 788–803.

[8]Aye L, et al. Identification of a Costimulatory Molecule Gene Signature to Predict Survival and Immunotherapy Response in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma [J]. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2021, 9: 695533.

[9] 阮鑫, et al. 基于铁死亡相关长链非编码 RNA 的肺腺癌临床预后模型构建和免疫相关分析 [J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2024, 10(01): 93–103.

[10] 王鑫, et al. EGFR 突变非小细胞肺癌免疫治疗相关研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2019, 22(08): 541–5.

[11]Zhang L, et al. Identification of the key genes and characterizations of Tumor Immune Microenvironment in Lung Adenocarcinoma (LUAD) and Lung Squamous Cell Carcinoma (LUSC) [J]. *Journal of Cancer*, 2020, 11(17): 4965–79.

作者简介:

陈耀丰(1986–), 男, 汉族, 广东省佛山市, 硕士研究生, 佛山市第一人民医院, 副主任医师, 研究方向: 肺癌的发生发展过程研究。