

# NOX4 在胃癌的高表达与 M2 样巨噬细胞浸润及不良预后相关

周星宇, 叶锦宁, 房得梁, 赵绍基, 孙开宇, 徐建波\*

中山大学附属第一医院 胃肠外科中心, 广东 广州 510080

**【摘要】** 目的 筛选与胃癌免疫相关基因(immune-related genes, IRGs)及其预后分析。方法 首先通过 R 软件,分析 TCGA 数据库胃癌基因表达数据集获得差异表达 IRGs,并进一步筛选出与预后相关的 IRGs。分析胃癌组织转录组测序数据获得差异表达 IRGs,与前者取交集获得关键 IRGs。接着,对关键 IRGs 进行差异分析、生存分析及临床病理特征相关性分析。然后,使用 CIBERSORT 方法计算胃癌免疫浸润情况,分析关键 IRGs 与免疫浸润的相关性,使用 TIMER 数据库分析免疫浸润与患者生存的关系。最后,使用 GEPIA 工具分析关键 IRGs 与巨噬细胞相关趋化因子表达的相关性。**结果** 通过分析 TCGA 来源的数据集获得 32 个预后相关 IRGs,分析转录组测序数据获得 46 个 IRGs,二者取交集得到基因:巨噬细胞清道夫受体 1 (macrophage scavenger receptor 1, MSR1)和 NADPH 氧化酶 4(NADPH oxidase 4, NOX4)。与正常组织相比,MSR1 和 NOX4 在胃癌组织均为高表达。NOX4 高表达与胃癌患者低生存相关,而 MSR1 表达与患者生存无显著相关性。NOX4 表达与患者临床分期及 T 分期呈显著正相关,未发现与 N 和 M 分期的显著相关性。通过免疫浸润分析发现,NOX4 表达与 M2 样巨噬细胞浸润呈正相关,与浆细胞、记忆 B 细胞浸润呈负相关。而生存分析发现巨噬细胞高浸润与胃癌患者低生存有关。通过相关性分析发现 NOX4 与 M2 样巨噬细胞相关趋化因子呈正相关。**结论** 基于生物信息学筛选出了胃癌免疫浸润的关键基因 NOX4,NOX4 的高表达与胃癌组织 M2 样巨噬细胞浸润及不良预后相关。

**【关键词】** 胃癌; 免疫浸润; 巨噬细胞; NADPH 氧化酶 4

## High expression of NOX4 in gastric cancer is associated with the infiltration of M2 macrophages and poor prognosis

Zhou Xingyu, Ye Jinning, Fang Deliang, Zhao Shaoji, Sun Kaiyu, Xu Jianbo\*

Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: Xu Jianbo, E-mail: xjianb@mail.sysu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To identify immune-related genes (IRGs) in gastric cancer (GC) and analyze their prognostic value. **Methods** First, through the R software, gene expression datasets of GC from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) database were analyzed to obtain differentially expressed IRGs. Then the IRGs related to the prognosis were screened out. The RNA-sequencing data of GC tissue were analyzed to obtain differentially expressed IRGs. The key IRGs were the intersection of prognosis-related IRGs from TCGA and IRGs from transcriptome-sequencing. Difference analysis, survival analysis and correlation analysis were conducted via R software. CIBERSORT computational method was applied for estimating the immune infiltration profile. Correlation analysis between key IRGs and immune infiltration was performed. Next, Tumor Immune Estimation Resource (TIMER) database was used to predict the survival rate of GC patient with different immune infiltration level. Finally, Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) online tool was applied to explore the correlation between IRGs and macrophage-related chemokines. **Results** There were 32 prognosis-related IRGs from TCGA and 46 IRGs from transcriptome-sequencing. MSR1 and NOX4 were overlapping from the above data. Expression of MSR1 (macrophage scavenger receptor 1) and NOX4 (NADPH oxidase 4) in the tumor samples were significantly higher than that in the normal

基金项目:国家自然科学基金(81871915);广东省自然科学基金(2017A030313570)

\* 通信作者:徐建波,主任医师,E-mail: xjianb@mail.sysu.edu.cn

samples. GC patients with NOX4 high expression had shorter survival than that of NOX4 low expression while MSR1 expression was not significantly correlated with patient survival. Additionally, NOX4 expression was positively correlated with stage and T classification while there was not significant correlation between NOX4 expression and N or M classification. Analysis of immune infiltration profile indicated that NOX4 was positively correlated with infiltration of M2 macrophages but negatively correlated with infiltration of plasma cells and memory B cells. Moreover, proportion of macrophages had negative correlation with GC patient survival. Finally, NOX4 was positively correlated with M2 macrophage-related chemokines. **Conclusion** Based on bioinformatics analysis, the key gene for immune infiltration of gastric cancer was screened out. The high expression of NOX4 in GC is associated with the infiltration of M2 macrophages and poor prognosis.

**【Key words】** Gastric cancer; Immune infiltration; Macrophage; NADPH oxidase 4

胃癌是世界上第五大最常见的癌症,也是与癌症相关死亡的第四大主要原因<sup>[1]</sup>。目前治疗胃癌的主要手段有手术及放化疗,而靶向治疗、免疫治疗等其他治疗手段也正在兴起。肿瘤微环境是指肿瘤组织中肿瘤细胞、免疫细胞以及各种细胞因子构成的集合。其中,免疫细胞浸润情况将直接影响患者的治疗效果及临床结局<sup>[2]</sup>。肿瘤微环境既有细胞毒性T细胞、自然杀伤细胞、M1样巨噬细胞等抗肿瘤细胞,也有调节T细胞、髓源性抑制细胞、M2样巨噬细胞等促肿瘤细胞。而免疫抑制细胞在肿瘤微环境的大量浸润会直接降低患者的免疫应答能力、促进肿瘤进展,因此寻找相关的靶点使免疫应答正常化是目前肿瘤免疫的研究方向<sup>[3]</sup>。本研究基于生物信息学分析,评估胃癌组织免疫浸润情况并筛选免疫相关基因,以期对胃癌免疫治疗及预后判断提供帮助。

## 1 材料与方法

1.1 胃癌基因表达数据集获取及基因差异表达分析 从TCGA数据库(<https://cancergenome.nih.gov/>)获取375例胃癌组织及32例正常组织,同时下载相应的临床数据。使用R软件“limma”包进行差异分析及Wilcoxon检验,得到差异表达显著的基因,筛选标准:错误发现率(false discovery rate, FDR) $<0.05$ 且 $\log_2|FC|>1$ 。

1.2 胃癌组织转录组测序及基因差异表达分析 分别收集3对胃癌患者的癌组织及癌旁正常组织样本,3对样本均取材自中山大学附属第一医院胃肠外科中心,患者的诊断基于其病理活检。使用Trizol试剂盒,从3对组织中提取RNA,构建基因文库,并对基因文库进行配对测序,得到差异表达显著的基因(FDR $<0.05$ 且 $\log_2|FC|>2$ )。

1.3 免疫相关差异基因的筛选 从ImmPort数据库(<https://www.immport.org/shared/home>)获得免疫

相关基因集<sup>[4]</sup>。与TCGA数据库及转录组测序所得差异基因取交集,得到相应差异表达的免疫相关基因(immune-related genes, IRGs),并由R软件“pheatmap”包绘制热图。

1.4 生存分析 使用R软件“survival”包和“survminer”包进行单因素Cox回归分析、绘制Kaplan-Meier生存曲线及Log-rank检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5 免疫浸润分析 CIBERSORT是基于线性支持向量回归的原理对人类免疫细胞亚型的表达矩阵进行去卷积的工具<sup>[5]</sup>,使用CIBERSORT计算方法预测所有肿瘤样本中的免疫浸润情况。TIMER(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)是系统评估不同癌症类型免疫浸润的网页工具<sup>[6]</sup>,使用TIMER数据库分析胃癌免疫浸润与患者生存的关系, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.6 相关性分析 GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn>)是一种用于TCGA数据库可视化分析的网页工具<sup>[7]</sup>,使用GEPIA进行IRGs和巨噬细胞相关趋化因子的相关性分析。使用R软件分析IRGs和免疫细胞浸润的相关性,检验方法为Spearman秩相关检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TCGA数据库差异表达IRGs情况 通过分析TCGA数据库中获取375例胃癌组织及32例正常组织基因表达矩阵,以FDR $<0.05$ 且 $\log_2|FC|>1$ 为筛选标准,获取差异表达基因,并与ImmPort数据库的IRGs取交集,获得差异表达IRGs共345个,其中上调( $\log_2FC>1$ )198个,下调( $\log_2FC<-1$ )147个(图1)。

2.2 单因素Cox回归分析 为筛选出与预后相关的差异表达IRGs,进行单因素Cox回归分析。以 $P<0.05$ 为标准共获得32个预后相关基因,其

中高风险( $HR>1$ )基因 29 个,低风险( $HR<1$ )基因 3 个(图 2)。

**2.3 胃癌组织差异表达 IRGs 及关键 IRGs** 通过分析 3 对胃癌组织转录组数据,以  $FDR<0.05$  且  $\log_2|FC|>2$  为筛选标准,获取差异表达基因,并与 ImmPort 数据库的 IRGs 取交集,获得差异表达 IRGs 共 46 个,其中上调 ( $\log_2FC>2$ )33 个,下调 ( $\log_2FC<-2$ )13 个。通过与 TCGA 数据库预后相关 IRGs 取交集,我们获得了关键 IRGs:巨噬细胞清道夫受体 1 (macrophage scavenger receptor 1, *MSR1*) 和 NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, *NOX4*) (图 3)。由图 2 可知,*MSR1* 和 *NOX4* 均为高风险基因( $HR>1$ )。

**2.4 *MRS1* 和 *NOX4* 在胃癌组织的表达情况及生存分析** 为了进一步验证 *MRS1* 和 *NOX4* 作为关键 IRGs 的表达情况,本研究分析了 TCGA 数据库中 *MRS1* 和 *NOX4* 的表达情况。通过单基因差异

分析和单基因配对差异分析发现,*MRS1* 和 *NOX4* 在胃癌组织中均为高表达 ( $P<0.001$ )。通过绘制 Kaplan-Meier 生存曲线及 Log-rank 检验发现 *NOX4* 的高表达与患者的低生存率有关 ( $P<0.05$ ),而未发现 *MRS1* 的表达与患者生存率有显著关系 ( $P>0.05$ )(图 4)。

**2.5 *NOX4* 表达水平与患者临床病理特征的关系** 为了进一步获得 *NOX4* 与胃癌进展的关系,本研究分析了不同临床分期和 TNM 分期的 *NOX4* 表达情况。在临床分期中,I 期与 II 期、III 期、IV 期的 *NOX4* 表达差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),而 II 期与 III 期、IV 期以及 III 期与 IV 期的 *NOX4* 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。在 TNM 分期中, $T_1$  与  $T_2$ 、 $T_3$ 、 $T_4$  以及  $T_2$  与  $T_3$ 、 $T_4$  的 *NOX4* 表达差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),而  $T_3$  与  $T_4$  的 *NOX4* 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。N 和 M 分期与 *NOX4* 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )(图 5)。

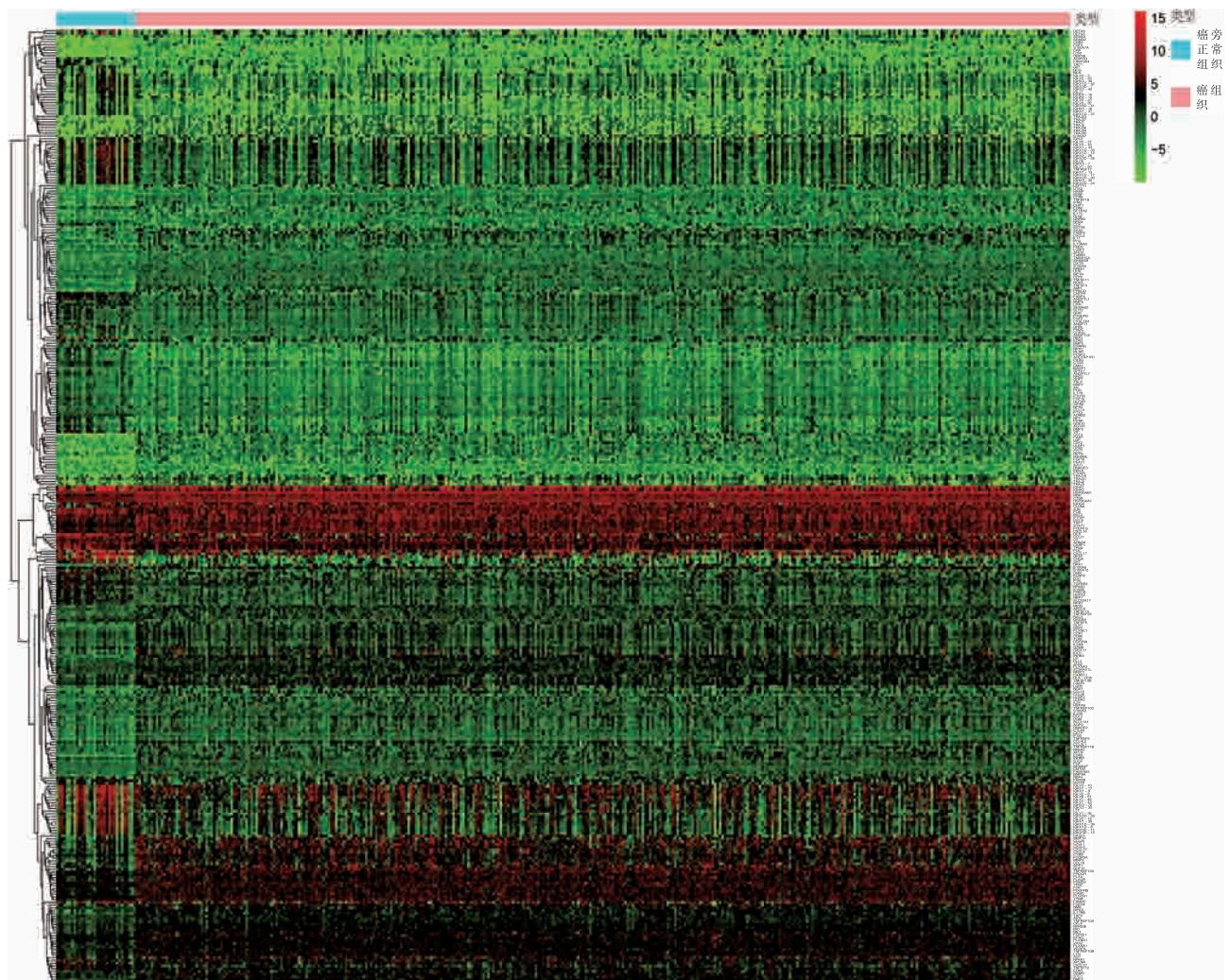


图 1 TCGA 数据库胃癌组织差异 IRGs 表达情况

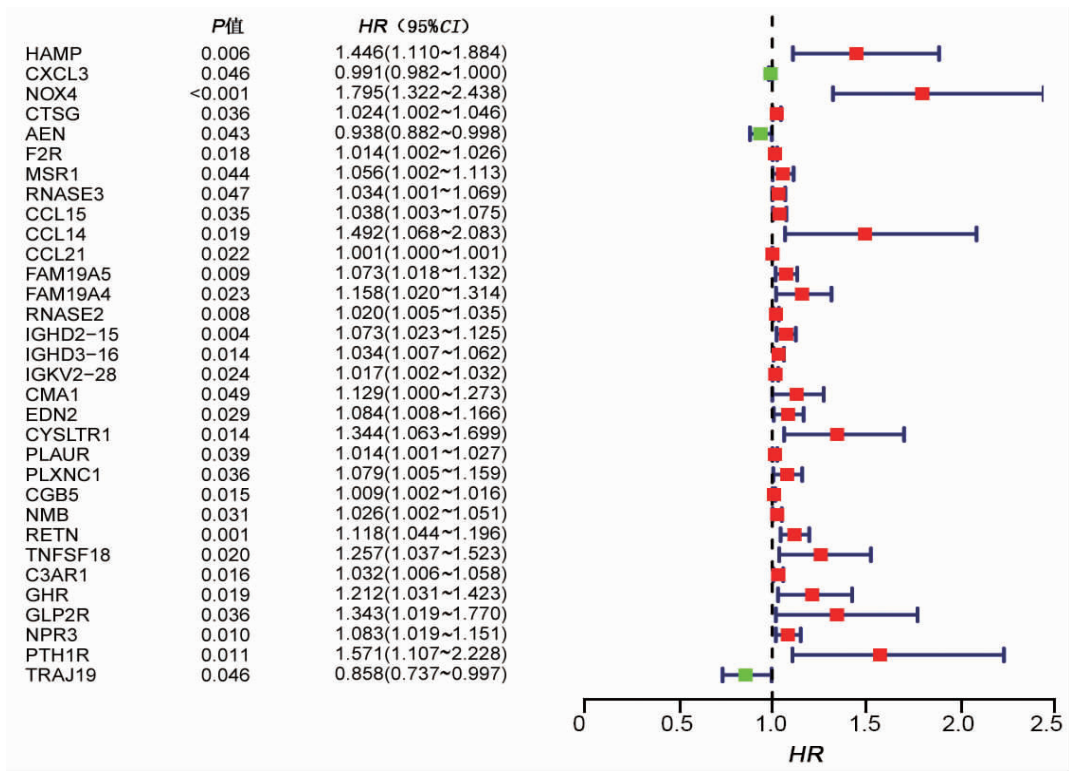


图2 差异IRGs单因素Cox回归分析

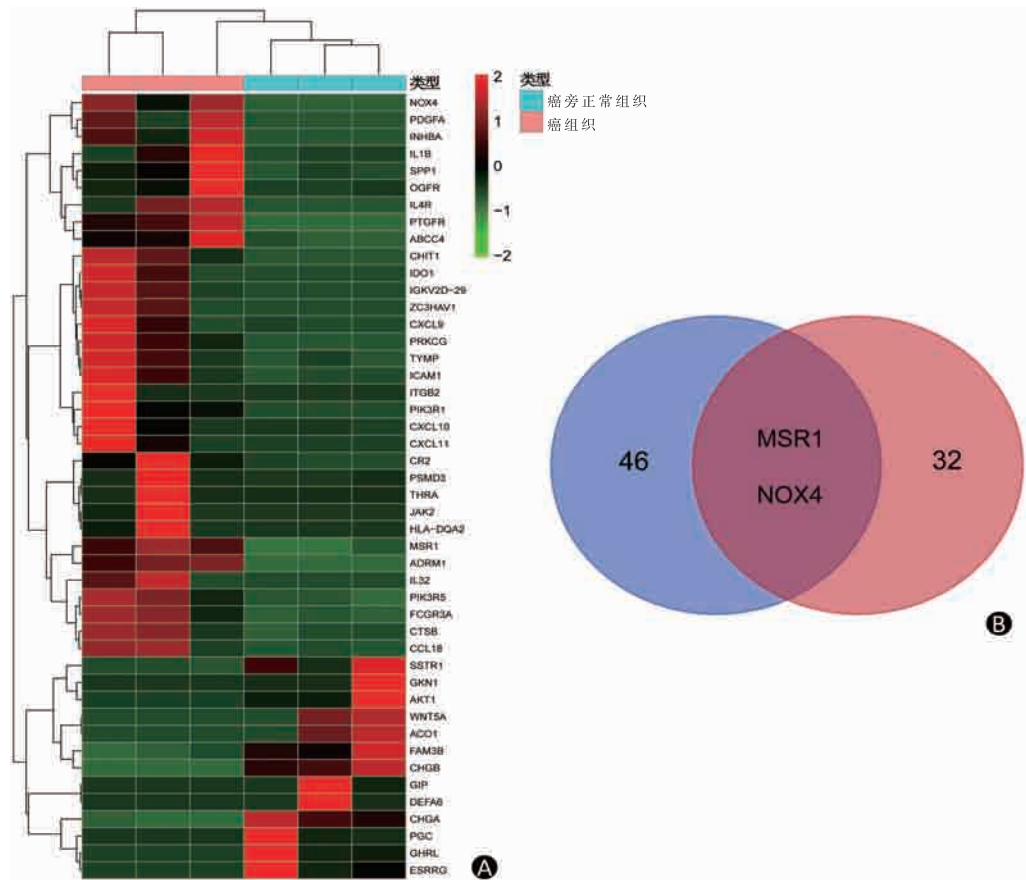


图3 胃癌组织差异IRGs表达情况

注:A为胃癌组织转录组测序差异IRGs热图;B为胃癌组织转录组测序差异IRGs(46个)与TCGA数据库预后相关差异IRGs(32个)的交集Venn图。

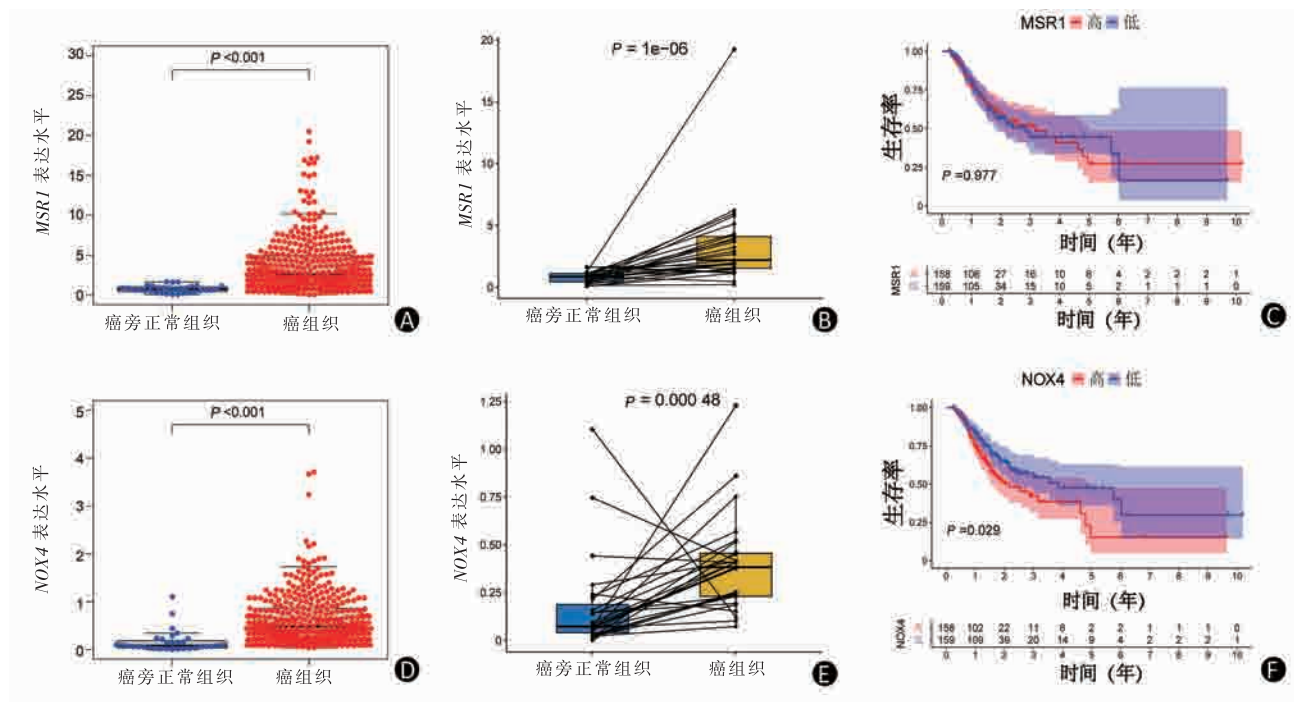


图4 MSR1和NOX4在胃癌组织的表达及预后情况

注:A~C为MSR1单基因表达、配对表达、生存曲线;D~F为NOX4单基因表达、配对表达、生存曲线。

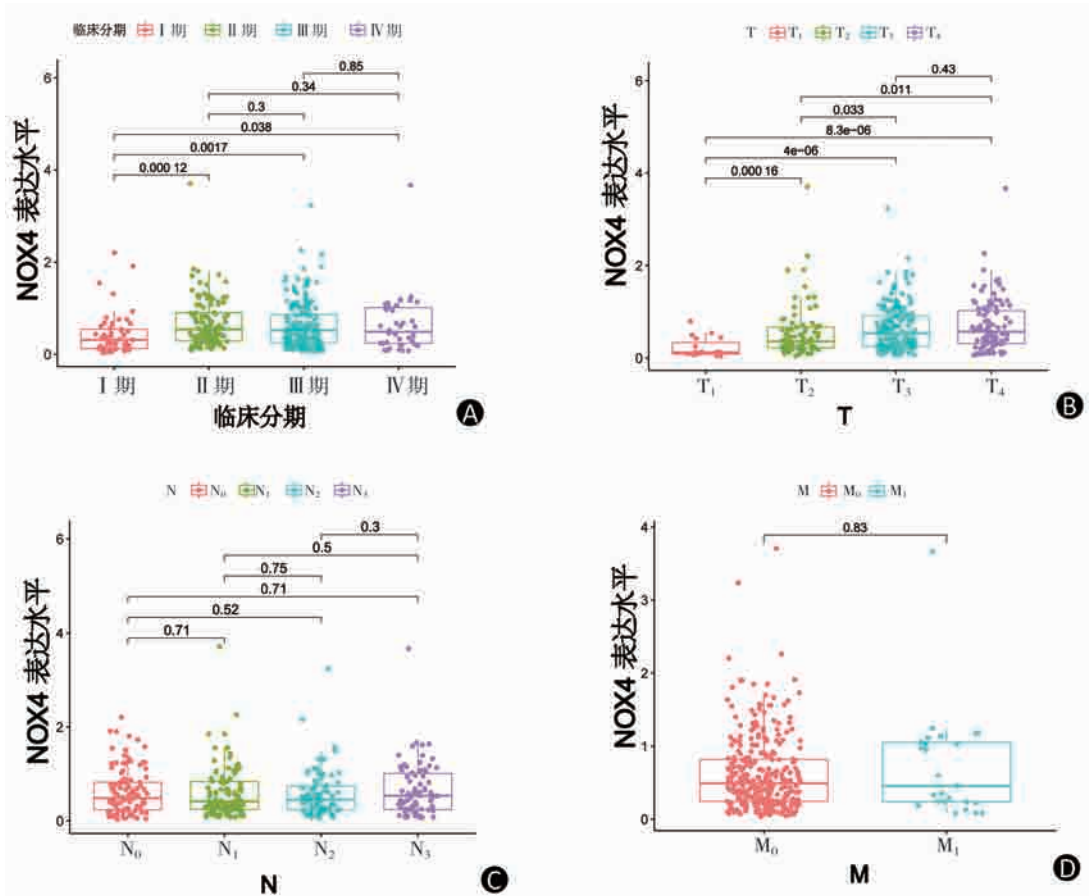


图5 NOX4表达与胃癌临床病理特征的关系

注:A为NOX4在不同临床分期的表达情况;B~D分别为NOX4在不同T、N、M分期的表达情况。

2.6 NOX4 表达水平与免疫浸润的关系 经过 CIBERSORT 方法计算 TCGA 数据库中胃癌组织免疫浸润情况。通过差异发现 NOX4 的表达与记忆 B 细胞、浆细胞及 M2 样巨噬细胞有关 ( $P < 0.05$ )；通过相关性分析发现 NOX4 与 M2 样巨噬细胞 ( $P = 2.2e-07, r = 0.33$ )、幼稚 B 细胞 ( $P = 0.023, r = -0.15$ )、浆细胞 ( $P = 0.0051, r = -0.18$ )、记忆 B 细胞 ( $P = 0.00031, r = -0.24$ )、树突状细胞 ( $P = 0.024, r = 0.15$ ) 有关。取二者的交集认为 NOX4 可能与 M2 样巨噬细胞、浆细胞、记忆 B 细胞有关。具体来说, NOX4 表达与 M2 样巨噬细胞呈正相关, 而与浆细胞和记忆 B 细胞呈负相关(图 6)。

2.7 胃癌免疫浸润与患者生存的关系 为了了解影响胃癌患者生存的免疫细胞类型, 本研究通

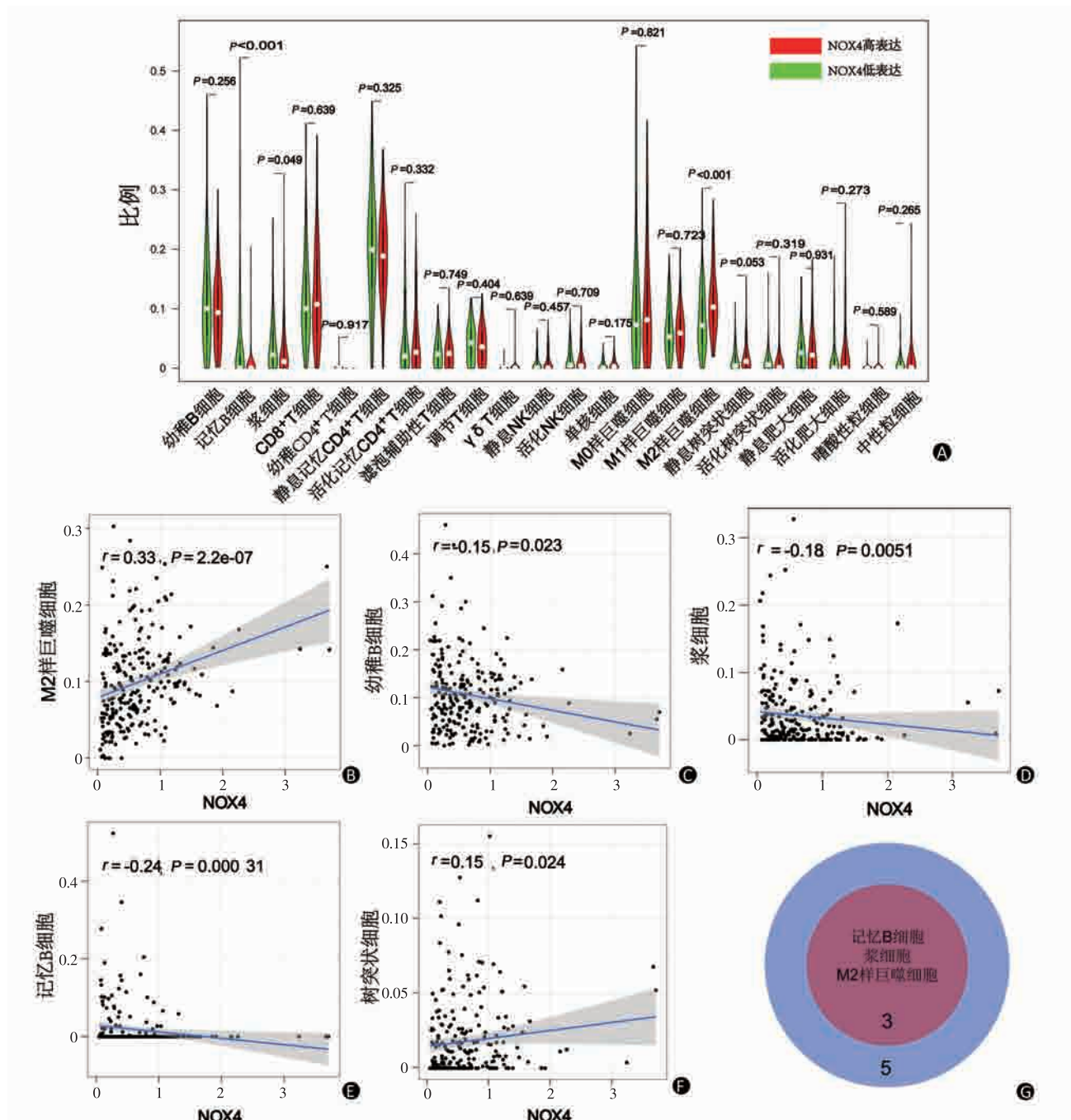


图 6 NOX4 表达与胃癌组织免疫浸润的关系

注:通过 CIBERSORT 方法计算免疫浸润情况, A 为 NOX4 与不同类型免疫细胞的差异分析; B~F 为 NOX4 与不同类型免疫细胞的相关性分析 ( $P < 0.05$ ); G 为差异分析和相关性分析的交集 Venn 图。

过TIMER数据库分析免疫浸润与患者生存的关系。TIMER数据库共有6种免疫细胞类型,经Log-rank检验,只有巨噬细胞浸润与患者生存具有显著相关( $P<0.05$ ),且巨噬细胞浸润水平越高,患者累计生存越差(图7)。

**2.8 NOX4表达水平与巨噬细胞相关趋化因子的关系** NOX4可能经趋化因子影响胃癌组织巨噬细胞浸润,因此通过GEPIA工具分析NOX4与巨噬细胞相关趋化因子表达的相关性(图8)。结果发现,NOX4与M1样巨噬细胞的相关趋化因子IL-12 $\alpha$ ( $P=0.48, r=0.035$ )、IL-12 $\beta$ ( $P=0.56, r=0.029$ )、TNF( $P=0.067, r=0.091$ )、IL-23 $\alpha$ ( $P=0.26, r=-0.056$ )、IL-23 $\gamma$ ( $P=0.43, r=-0.039$ )及IFNG( $P=0.14, r=0.073$ )均无显著相关性。M2样巨噬细胞的相关趋化因子中,NOX4与IL-4( $P=0.36, r=-0.045$ )、IL-10( $P=0.49, r=-0.034$ )均无显著相关性,而与IL-13( $P=0.035, r=0.1$ )、TGF- $\beta$ 1( $P<0.0001, r=0.4$ )、TGF- $\beta$ 2( $P=0.0029, r=0.15$ )及TGF- $\beta$ 3( $P<0.0001, r=0.34$ )呈正相关。由此可见,NOX4与M2样巨噬细胞的

相关趋化因子具有更大关联。

### 3 讨论

胃癌是全球性健康问题,在中国尤为严峻,发病率和癌症相关死因分别列第三和第二位<sup>[8]</sup>。免疫治疗是胃癌治疗的新兴领域,目前免疫治疗代表性药物PD-1单抗已被推荐用于晚期胃癌三线治疗。肿瘤微环境中免疫细胞浸润将直接影响机体免疫应答,寻找能够改善免疫浸润及预测预后的靶点是目前肿瘤免疫的研究方向。通过分析TCGA数据库和胃癌转录组测序数据发现,预后相关的差异表达IRGs:MSR1和NOX4。通过差异分析及生存分析,我们发现只有NOX4高表达与患者低生存率相关。进一步分析NOX4与临床病理特征的联系发现NOX4与临床分期及T分期具有相关性。接着,我们分析NOX4表达与胃癌免疫浸润的关系,并发现NOX4高表达与M2样巨噬细胞浸润高水平相关,而与浆细胞和记忆B细胞浸润低水平相关。而通过分析TIMER数据库发现巨噬

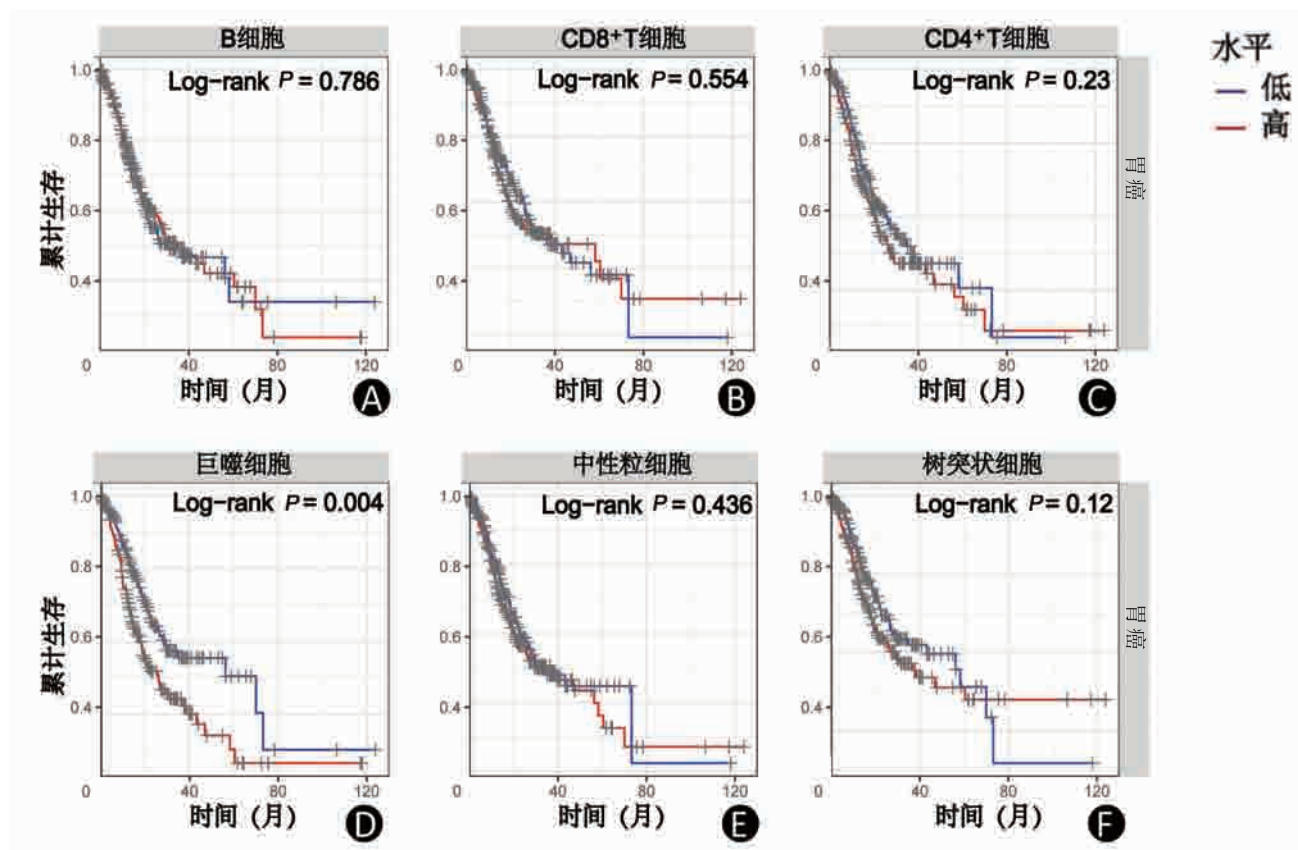
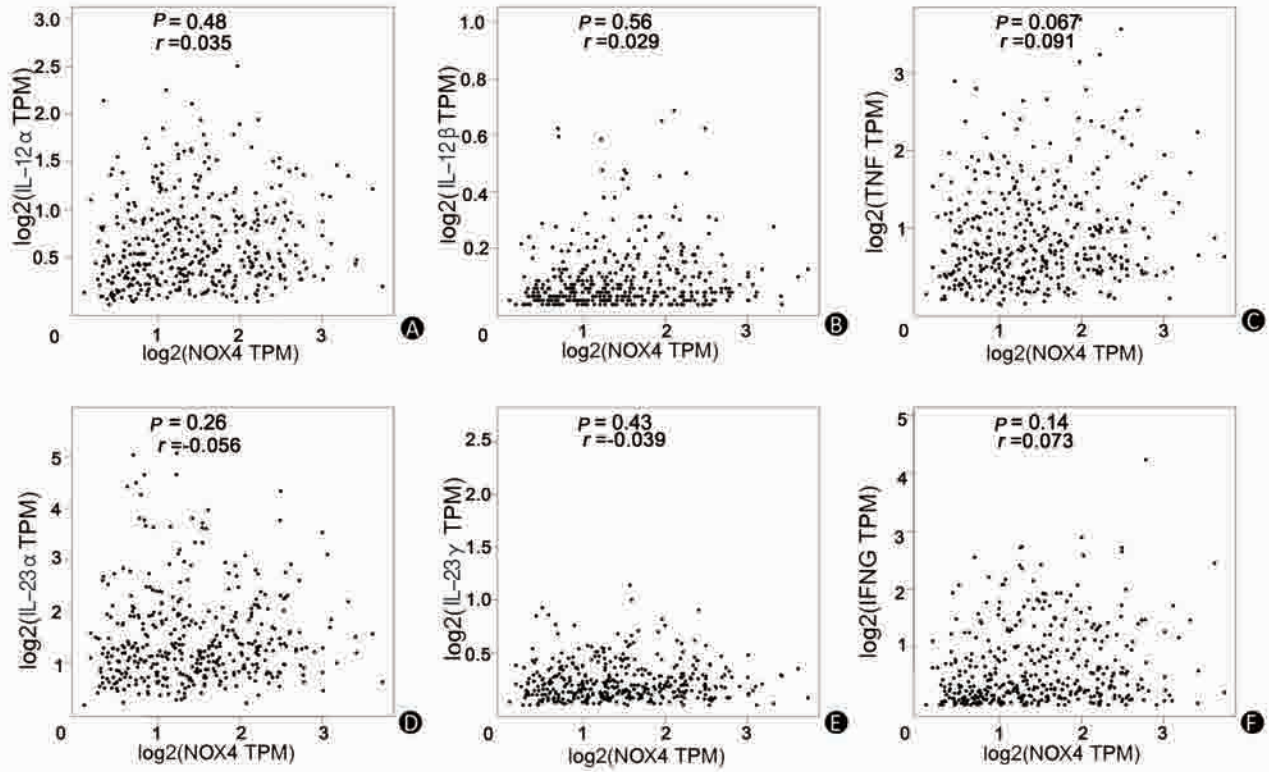


图7 免疫浸润与胃癌患者生存的关系

注:通过TIMER数据库分析不同类型免疫细胞浸润水平的胃癌患者生存曲线,A~F分别为不同浸润水平B细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞的胃癌患者生存曲线。

M1



M2

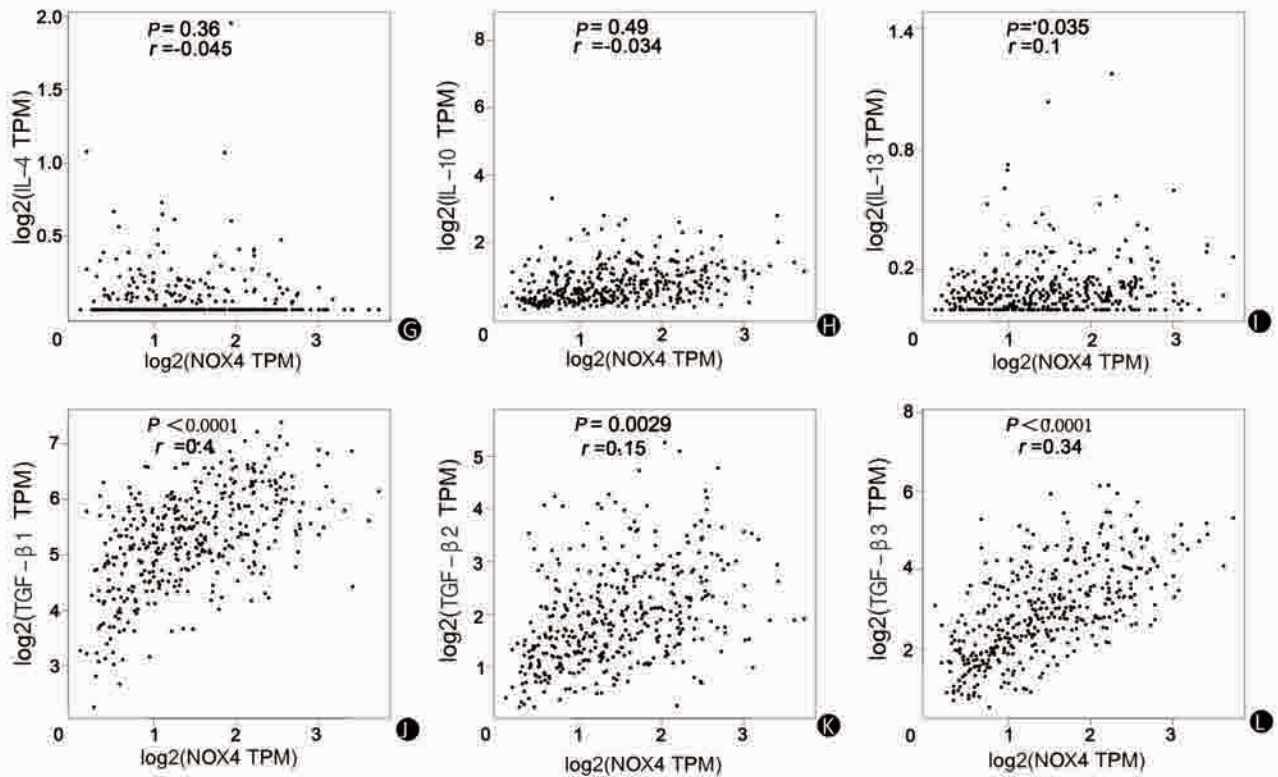


图8 NOX4与巨噬细胞有关趋化因子的关系

注:通过 GEPIA 工具分析胃癌组织 NOX4 与巨噬细胞相关趋化因子表达的相关性, A~F 为 M1 样巨噬细胞有关趋化因子; G~L 为 M2 样巨噬细胞有关趋化因子。



细胞浸润高水平与患者低生存率相关。通过 GEPIA 工具分析 NOX4 与巨噬细胞相关趋化因子相关性发现 NOX4 与 M2 样巨噬细胞相关因子 IL-13、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 及 TGF- $\beta$ 3 呈正相关。因此推断,NOX4 高表达可能通过相关趋化因子增加 M2 样巨噬细胞在胃癌的浸润,从而引起胃癌免疫抑制状态,介导胃癌进展及患者不良预后。

NOX4 是 NADPH 氧化酶家族成员。NADPH 氧化酶家族有 6 个同源物,包括 NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1、DUOX2。NADPH 氧化酶可以催化生成活性氧(reactive oxygen species,ROS),后者用以清除病原微生物。NADPH 氧化酶的生理功能包括宿主防御、细胞信号转导和基因表达调控等<sup>[9]</sup>。既往已有研究报道 NOX4 及其同源物在巨噬细胞及肿瘤免疫中的作用。在一项异种移植非小细胞肺癌小鼠研究中,NOX4 在 A549 肿瘤细胞中的过表达促进了肿瘤的生长<sup>[10]</sup>。而清除 ROS 或抑制 NOX4 活性均可抑制肿瘤生长,并同时减少了巨噬细胞浸润和 M2 样巨噬细胞百分率。而另一项研究中发现,NOX4 在人单核细胞和成熟巨噬细胞中表达,定位于内质网和细胞核<sup>[11]</sup>。小干扰 RNA 敲除 NOX4 可抑制 OxLDL(氧化低密度脂蛋白)诱导的细胞内 ROS 生成和巨噬细胞的细胞毒作用,而过表达 NOX4 可促进 OxLDL 刺激的 ROS 形成和巨噬细胞死亡。在炎症反应中,NOX4 也发挥着作用<sup>[12]</sup>。LPS 刺激后,慢病毒 shRNA 敲除 NOX4 可显著减轻巨噬细胞炎症反应,而慢病毒过表达 NOX4 可加重其炎症反应。在离体骨髓来源的单核细胞中,用 LPS/IFN 或 IL4/IL13 处理后,细胞分别极化为 M1 或 M2 样巨噬细胞<sup>[13]</sup>。NOX4 的缺失降低了 M2 极化并增强了 M1 巨噬细胞,这也与本研究结论一致。在一项肝癌的研究中,给予 14 日龄 NOX1 敲除小鼠、NOX4 敲除小鼠、NOX1 和 NOX4 双基因敲除小鼠和 WT(野生型)C57BL/6 小鼠腹腔注射二乙基亚硝胺(DEN),9 个月后进行肝肿瘤检查。NOX4 敲除小鼠和 WT 小鼠在注射 DEN 后 9 个月内发生肝癌,而 NOX1 敲除小鼠的肿瘤发生率比 WT 小鼠低 80%,肿瘤比 WT 小鼠小 50%<sup>[14]</sup>。在一项泛癌的研究发现,NOX4 对于维持肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts,CAF)表型至关重要。药物抑制 NOX4 通过克服 CAF 介导的 CD8<sup>+</sup>T 细胞耐受而加强免疫治疗<sup>[15]</sup>。在一项胃癌的研究中,沉默 NOX4 可减

少 ROS 的产生并下调 EGFR,使癌细胞对失巢凋亡敏感<sup>[16]</sup>。过表达 NOX4 则上调 ROS 和 EGFR 水平,促进癌细胞失巢凋亡抵抗。另外,NOX4 的缺失抑制了胃癌在血液循环中的存活,并减少了远处转移。在胃癌相关的其他 NOX4 研究中,NOX4 已被证明与胃癌的增殖、凋亡及侵袭等细胞功能有关,并可以用于预测患者的不良预后<sup>[17-19]</sup>。

总之,NOX4 与胃癌免疫浸润水平相关,其可能通过影响相关趋化因子表达增加 M2 样巨噬细胞的浸润,进而导致胃癌免疫抑制状态及肿瘤进展。NOX4 可以视为免疫治疗的相关靶点,并可以作为预测患者预后的标志物。本研究的不足之处是以上结果基于生物信息学分析,期望后续进行实验验证。

#### 参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249.
- [2] QUAIL D, JOYCE JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2013, 19(11):1423-1437.
- [3] SANMAMED M, CHEN L. A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization [J]. Med Hypotheses, 2018,175(2):313-326.
- [4] BHATTACHARYA S, ANDORF S, GOMES L, et al. ImmPort: disseminating data to the public for the future of immunology [J]. Immunol Res, 2014,58:234-239.
- [5] NEWMAN A, LIU C, GREEN M, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. Nat Methods, 2015,12(5):453-457.
- [6] LI T, FAN J, WANG B, et al. TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor Infiltrating Immune Cells [J]. Front Oncol, 2017,77(21):e108-e110.
- [7] TANG Z, LI C, KANG B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. Nucleic Acids Res, 2017,45:W98-W102.
- [8] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [9] BEDARD K, KRAUSE K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2007,87(1):245-313.
- [10] ZHANG J, LI H, WU Q, et al. Tumoral NOX4 recruits M2 tumor-associated macrophages via ROS/PI3K signaling-dependent various cytokine production to promote NSCLC growth [J]. Redox Biol, 2019,22:101116.

(下转第 208 页)