

# 基于生物信息学刻画 II B 期胰腺癌的免疫微环境特征和预后的差异

贾雷, 于新颖, 徐丽娟, 徐有青\*

首都医科大学附属北京天坛医院 消化内科, 北京 100070

**【摘要】** **目的** 探索 II B 期胰腺癌的免疫微环境特征, 为胰腺癌的免疫治疗和预后预测提供理论依据。**方法** 从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)和基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus database, GEO)中下载 II B 期胰腺癌患者的转录组数据, 并通过 R 分析, 鉴别免疫亚型及不同亚型的免疫反应、差异表达基因、免疫细胞和免疫调节分子的相互作用以及其对预后的影响。使用免疫细胞和检查点基因风险评分来评估 II B 期胰腺癌患者的预后, 并通过独立数据集进行验证。**结果** 鉴别出 3 种免疫亚型(M1~M3), 表现出不同的免疫反应, 代表 3 种不同的免疫微环境。3 种免疫亚型在特异性免疫特性上有显著差异, 并鉴定出在 M2 亚型(预后最差的亚型)中显著差异表达的 12 个基因。此外, M1 亚型(预后最好的亚型)和 M2 亚型免疫细胞与检查点基因的相互作用不同, M1 亚型的相互作用系数高于 M2 亚型。其中 CD47、ICOS 和 LAG3 处于相互作用网络中心, 在不同免疫亚型中的相互作用强度不同。**结论** 免疫细胞与检查点基因作用紊乱可以导致免疫微环境的改变, 进而影响胰腺癌患者的预后。

**【关键词】** 胰腺癌; 生物信息学; 免疫微环境; 预后

## Differences in characterization of immune microenvironment and prognosis of stage II B pancreatic adenocarcinoma based on bioinformatics

Jia Lei, Yu Xinying, Xu Lijuan, Xu Youqing\*

Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100070, China

Corresponding author: Xu Youqing, E-mail: youqingxutty@163.com

**【Abstract】** **Objective** To provide a theoretical basis for immunotherapy and prognosis prediction of pancreatic adenocarcinoma (PAAD), we explored the immune microenvironment characteristics of stage II B PAAD. **Methods** The transcriptome data of stage II B PAAD patients were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus database (GEO), and the R software was used to identify the immune subtype. Then the characteristics of different immune microenvironments were compared, including immune subtypes, expressed genes and the interaction between immune cells and checkpoint genes. We used immune cells and checkpoint gene risk scores to evaluate the prognosis of patients with stage II B PAAD patients, and verified with independent data sets. **Results** We identified 3 immune subtypes (M1~M3), showing different immune responses, representing different immune microenvironments. The 3 subtypes were significantly different in terms of specific immune characteristics. In addition, 12 genes were identified related to M2 subtype (the worst prognosis subtype) in the microenvironment. More importantly, the interactions between immune cells and checkpoint genes in M1 subtype (the best prognosis subtype) and M2 subtype were different, and the interaction coefficient was higher in M1 subtype than M2 subtype. CD47, ICOS and LAG3 were at the center of the network, and the intensity of interaction was different in different immune subtypes. **Conclusion** The dysfunction of immune cells and checkpoint genes can lead to changes in immune microenvironment, thereby affecting the prognosis of patients with PAAD.

**【Key words】** Pancreatic adenocarcinoma; Bioinformatics; Immune microenvironment; Prognosis

基金项目:北京市医院管理中心“青苗”计划(QML20200505)

\*通信作者:徐有青, E-mail: youqingxutty@163.com

胰腺癌是临床常见的一种恶性程度极高的消化系统肿瘤,预后极差,其发病率及病死率均逐年升高,5年生存率不足5%。由于许多患者就诊时已为晚期,虽然现在有手术、化疗、免疫治疗等手段,但治疗效果不尽人意,严重危害人们身体健康,影响生活质量<sup>[1-3]</sup>。因此,查找新的治疗靶点,建立胰腺癌预后预测模型,具有重要意义。免疫治疗越来越受到人们的重视,在多种肿瘤的治疗中已取得显著的成就,将成为肿瘤治疗的重要手段<sup>[4]</sup>。然而,只有一部分患者能够从免疫制剂中获益,对于其他患者疗效欠佳。因而迫切需要新的标准来指导个体化治疗。有研究提示,肿瘤免疫环境的差异与免疫治疗的效果密切相关<sup>[5]</sup>。例如,同样是ⅡB期胰腺癌患者,对免疫制剂的效果不同,可能是微环境特征的差异影响免疫制剂(免疫调节分子)的效果。基于此,我们利用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)和基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus database, GEO)的ⅡB期胰腺癌患者的转录组数据,通过分析免疫微环境的特征、免疫细胞与免疫调节分子之间的相互作用,以及对患者预后的影响,深入探索免疫微环境对患者免疫治疗效果的差异,为胰腺癌的免疫治疗和预测预后提供理论依据,为临床个体化治疗提供指导。

## 1 资料与方法

1.1 资料来源 本研究使用的ⅡB期胰腺癌转录组数据来自TCGA,该数据包括118个样本,其中男性65例,女性53例;平均年龄64.69岁(35~88岁);中位随访时间是449 d,72例死亡,46例存活。验证数据集来自GEO的GSE62452,该数据包括35个样本,中位随访时间是326 d,25例存活,9例死亡,1例失访。

另外,从NanoString网站下载404个免疫相关的基因,其中包括4种免疫应答类型,24个免疫细胞和22个免疫反应类别,用于刻画肿瘤样本的免疫微环境特征。

### 1.2 研究方法

1.2.1 通过免疫基因鉴定ⅡB期胰腺癌的免疫亚型 通过免疫相关基因的表达描绘免疫的微环境特征。首先利用t分布随机邻域嵌入(T distributed stochastic neighbor embedding, T-SNE)将TCGAⅡB期胰腺癌分为3个免疫亚型,代表3种不同的

免疫微环境。最优聚类数由R包NbClust确定,它决定了数据集中聚类的最佳数量。

1.2.2 鉴别ⅡB期胰腺癌亚型的免疫反应和差异表达基因 通过R包基因集变异分析(gene set variation analysis, GSVA)的单样本富集分析确定各免疫亚型中免疫反应的富集分数,评估免疫反应的程度,得出并比较各亚型免疫应答的富集分数<sup>[6]</sup>。

利用t检验将该亚型的样本与其余样本进行比较,确定各亚型的差异表达基因。通过将M3亚型与M1亚型、M2亚型的差异表达基因分别进行比较,鉴别M2亚型中差异表达显著的基因。

1.2.3 构建免疫反应相互作用网络 基于基因表达数据,构建免疫细胞与基因(免疫检查点抑制剂,先天免疫系统与适应性免疫系统的共抑制剂和共刺激标志物)的相互作用网络,这些免疫检查点基因选自之前的报道<sup>[7]</sup>。通过GSVA评估各免疫细胞的富集分数,该分数可以代表免疫细胞的表达或浸润情况,通过Pearson相关法计算免疫细胞的富集评分与目标检查点基因表达水平的相关性,使用Cytoscape对相互作用网络进行可视化。根据免疫细胞与目标检查点基因之间的Pearson相关系数确定网络的边缘权重。

1.2.4 预后分析 为了预测ⅡB期胰腺癌患者预后,本研究计算了一个危险因素评分来评估患者的生存。使用单变量Cox回归分析来评估生存时间和每种免疫细胞浸润以及检查点基因表达水平之间的关系。同时构建了一个预测生存的数学公式,通过单变量Cox回归分析的回归系数为每例患者分配一个风险评分<sup>[8]</sup>。将每例患者的风险评分计算如下:

危险评分 =  $\sum_{i=1}^n \alpha_i \times$  检查点基因的表达值 +  $\beta \times$  免疫细胞的浸润/表达水平

$\alpha_i$ 和 $\beta$ 分别代表基因表达值和免疫细胞浸润程度的回归系数,将数据集中的所有患者分为高风险组和低风险组,采用Kaplan-Meier法评估两个亚组的总生存时间,采用log秩检验分析总生存时间的差异。

1.2.5 统计分析 本研究中的所有统计分析均使用R软件(<http://www.r-project.org>)。T-SNE是在T-SNE包中实现。heatmap和Circos图分别由R包pheatmap和OmicCircos生成。统计学检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 鉴别 II B 期胰腺癌的免疫亚型** 为了描绘 II B 期胰腺癌的免疫特征,使用 404 个免疫相关基因及其分类来刻画 II B 期胰腺癌的免疫背景。不同样本的免疫反应与免疫微环境的差异有关(图 1A)。为了鉴别常见的免疫亚型和评估肿瘤微环境特征对结果的预测情况,我们分析了 II B 期胰腺癌样本的微环境。利用 404 个基因进行聚类,得到 3 种免疫亚型,代表 3 种不同的免疫微环境,即 M1、M2 和 M3(图 1B)。此外,免疫微环境亚型与总生存时间相关。M1 预后最好,M2 预后最差(图 1C),提示免疫微环境不同,患者的预后也不同。因此,从免疫微环境的视角来探索免疫治疗的效果,这为我们提供了新的线索。

**2.2 比较 3 个免疫亚型的免疫反应差异及基因表达差异** 通过 GSVA 分析得到 3 种免疫亚型表现出不同的免疫应答。M2 亚型(预后最差)显著富集的免疫反应有衰老途径、细胞周期检查点和细胞周期阻滞等,而 M1 亚型(最佳预后)显著富集在 T 细胞激活、CD8<sup>+</sup>T 细胞的反应、Th2 激活等(图 2A)。

为了探索 M2 中差异表达的基因,利用 *t* 检验鉴别出 12 个差异表达基因,其中 *TREM1*、*ATG12*、*IL1RAP*、*RIPK2* 高表达,*CRP*、*LTF*、*CRP1*、*C4BPA*、*C6*、*C8A*、*CLU*、*CRP2* 低表达,提示这些基因的差异表达对患者的预后影响不良,可能对胰腺癌的治疗效果至关重要,需要进一步的探索(图 2B)。

**2.3 构建调控网络** 在 M1(预后最好)和 M2(预后最差)亚型中免疫细胞与检查点分子之间的相

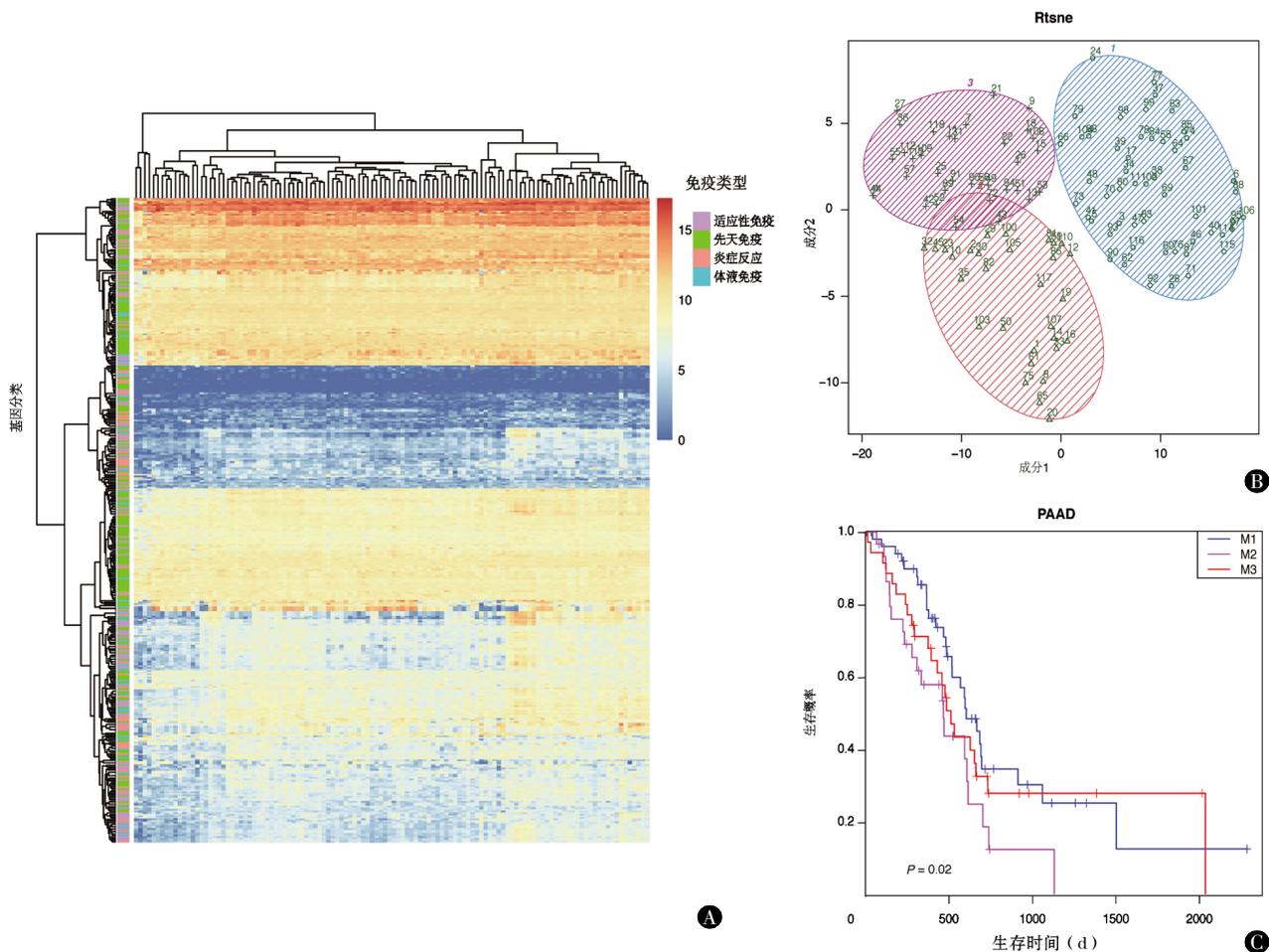


图 1 II B 期胰腺癌的差异表达特征

注:A,在 II B 期胰腺癌样本中 404 个免疫相关基因的表达热图。这些基因被分为适应免疫相关基因、炎症相关基因、体液免疫相关基因和先天免疫应答相关基因。B, II B 期胰腺癌样本分为 3 个免疫亚型。蓝色阴影代表免疫微环境 1 (M1, 53 个样本),品红色阴影代表免疫微环境 2(M2, 30 个样本),红色阴影代表免疫微环境 3(M3, 35 个样本),成分 1 和成分 2 能够解释 100%可能性。C, II B 期胰腺癌患者的 Kaplan-Meier 生存图(蓝色代表 M1 亚型,品红色代表 M2 亚型,红色代表 M3 亚型)。

相互作用明显不同,在M1亚型的相互作用系数高于M2亚型,即免疫细胞和检查点基因之间的相互作用越强,患者的预后越好(图3)。CD47、ICOSL和LAG3是网络的中心,提示这3个基因在不同的免疫微环境严重影响患者的预后,有望成为免疫靶点。

2.4 预后 为了探讨免疫细胞和免疫调节分子的网络互作关系对生存的影响,测试了CD47、

ICOSL、LAG3和24个免疫细胞的预后价值。首先进行了单变量Cox回归分析,以评估生存时间与3个检查点基因表达水平和24个免疫细胞富集评分之间的关系。在TCGA和GSE62452数据集中,生存分析均显示可以预测II B期胰腺癌患者的预后,高风险评分与预后不良相关(图4),提示交互作用关系能够预测II B期胰腺癌患者的预后,协助免疫治疗,为个体化治疗和靶向治疗提

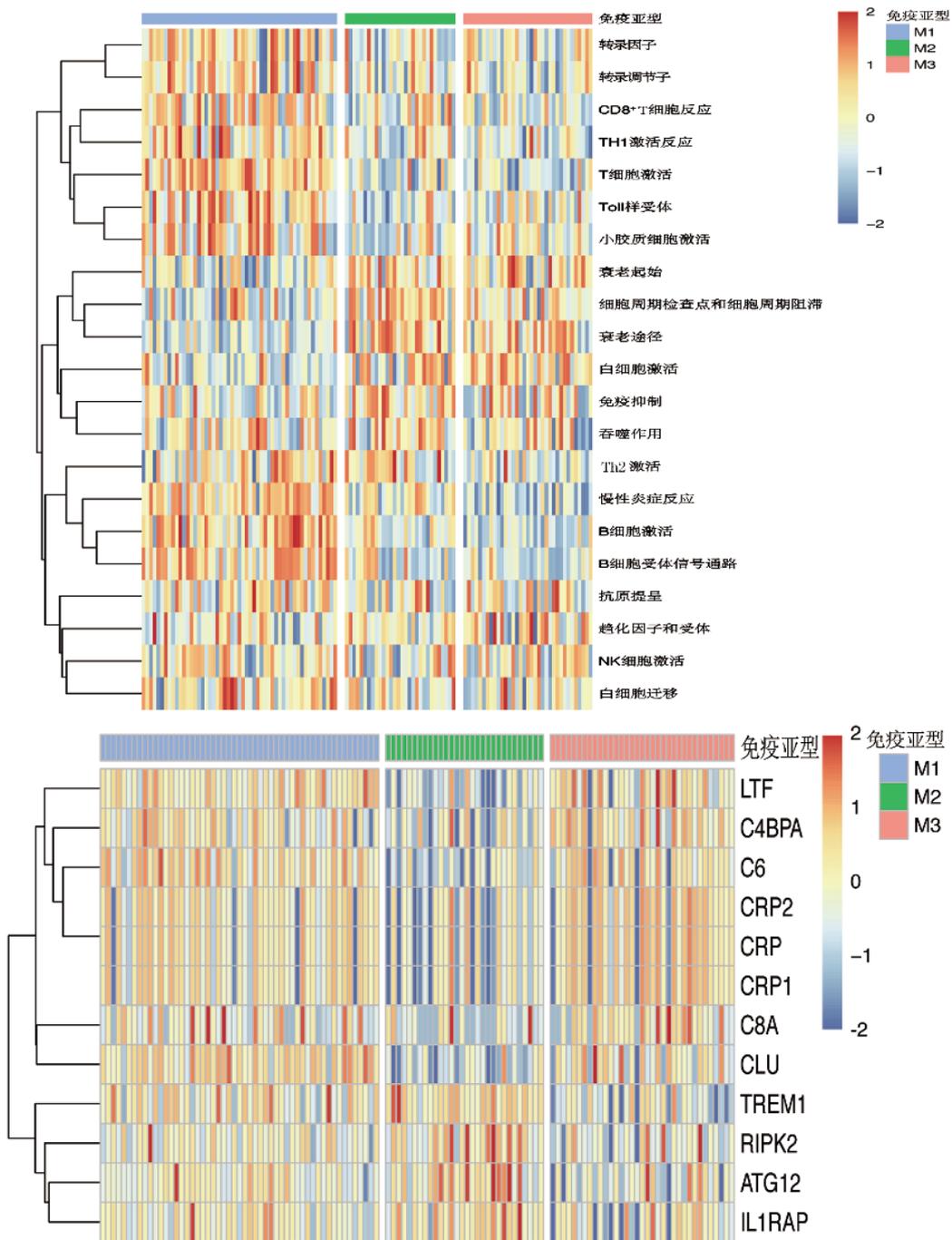


图2 3种免疫亚型的免疫应答反应和差异表达基因

注:A,3种免疫亚型的不同免疫应答;B,M2亚型的差异表达基因。

供临床指导。

### 3 讨论

胰腺癌是恶性程度极高的消化系统肿瘤之一,预后差,死亡率高,诊断和治疗均十分困难<sup>[9,10]</sup>。针对胰腺癌靶向治疗的生物学标志物及免疫微环境的研究,不仅有助于胰腺癌的早期诊断,也有助于制订新的治疗策略,更好地改善患者预后,提高患者的生存率<sup>[11]</sup>。

目前,许多免疫检查点抑制剂、先天免疫系统

和适应性免疫系统的共抑制和共刺激标志物研究正在多种癌症中开展。患者的预后或疾病的发生不是由单个分子决定的,而是由基因或分子与所处环境的相互作用决定的。由于不同患者对药物的敏感性有显著差异,其预后也有显著差异<sup>[12]</sup>。这就要求针对不同的个体采取个体化治疗,以达到最佳的治疗效果。因此,利用生物信息学研究靶分子与其他分子或细胞之间的相互作用,并将其与患者的预后联系起来,对于确定患者的预后和指导临床治疗具有重要意义。

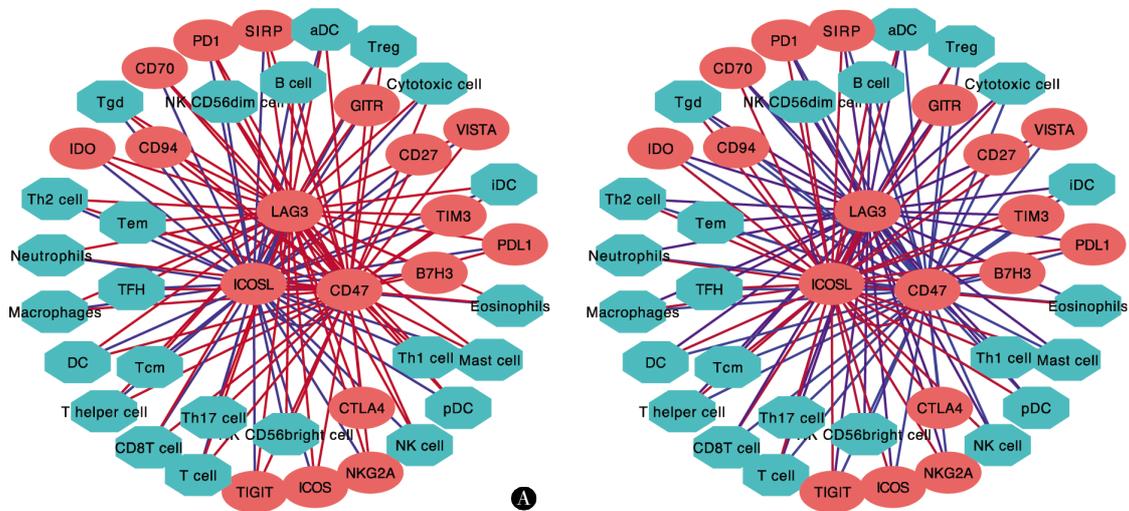


图3 M1和M2亚型中24种免疫细胞与18个检查点基因的互作网络

注:A,在M1亚型中免疫细胞和检查点基因的相互作用网络。B,M2亚型中免疫细胞和检查点基因的相互作用网络。青色八角形节点代表免疫细胞,橙色椭圆形节点代表检查点基因。边代表Pearson系数,红色代表高相关,蓝色代表低相关。

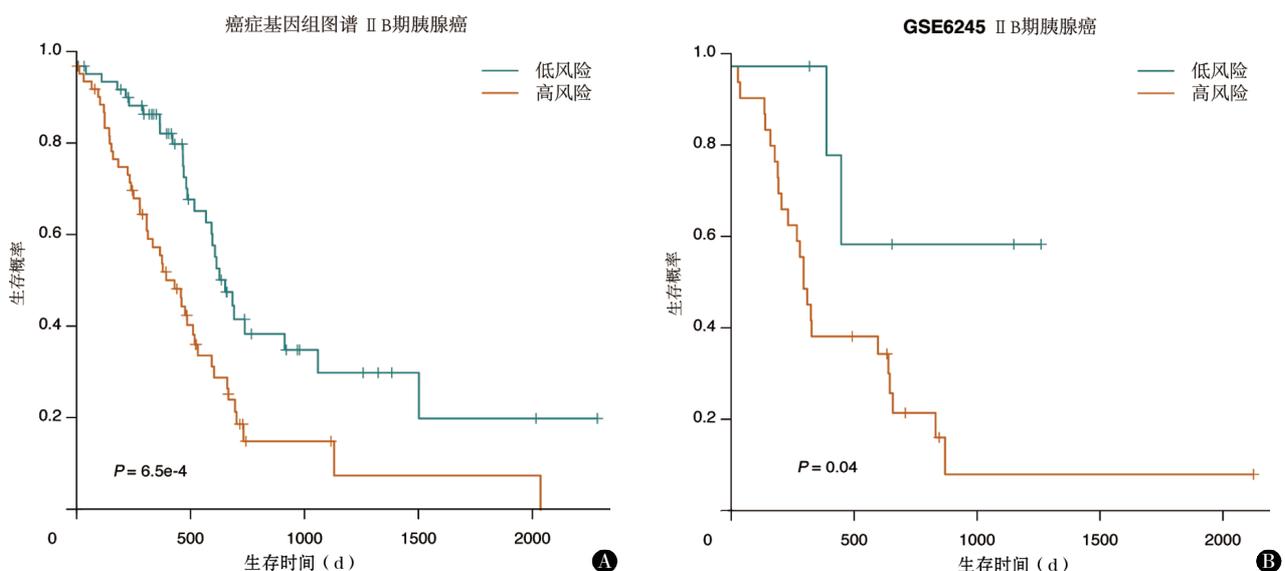


图4 Kaplan-Meier根据风险评分评估患者的总生存时间

注:A,TCGA数据中24个免疫细胞和3个基因的风险评分的生存曲线;B,GSE62452数据集中24个免疫细胞和3个基因的风险评分的生存曲线。

本研究关注了免疫相关基因图谱, M1亚型的预后最好, T细胞激活、CD8<sup>+</sup>T细胞的反应、Th2激活是抑制肿瘤进展的必要条件, 这与之前的报道一致<sup>[13]</sup>。相反, M2亚型预后最差, 富集到的免疫反应有衰老途径、细胞周期检查点和细胞周期阻滞等。

免疫反应是由免疫细胞和其他基质细胞通过可溶性蛋白, 如细胞因子等介导细胞之间的相互作用。因此, 研究免疫细胞和分子之间的相互作用对于各种癌症的免疫治疗是很重要的<sup>[14,15]</sup>。本研究发现 M1 和 M2 亚型免疫细胞与免疫检查点基因之间的相互作用不同。M1 亚型与 M2 亚型相比, 免疫检查点基因与免疫细胞的相互作用系数更大, 免疫细胞与检查点基因的相互作用紊乱, 导致免疫微环境发生变化, 进而影响患者预后。基于互作网络, 发现了 3 个基因(*CD47*、*ICOSL* 和 *LAG3*) 处于网络的中心, 并且 24 个免疫细胞和这 3 个基因的风险评分能后预测患者的预后。值得注意的是, 由于目前数据的有限和人体的复杂性, 使用这些方法, 并不能完全确定特定的相互作用在人体中所起作用, 但这可以通过不断的技术进步来改善。

本研究也有一些局限性。首先, 由于研究对象是 II B 期胰腺癌, 可用的数据少, 样本量小, 评价免疫细胞浸润性有一定的偏差。其次, 由于目前分析方法和收集数据的限制, 缺乏用于确认细胞表型分布的靶向经典细胞免疫学的分析。此外, 还需要进一步的研究来验证我们的结论, 并阐明这些现象潜在的机制。

综上所述, 我们利用免疫基因表达谱, 在 II B 期胰腺癌样本中鉴定出 3 种免疫亚型。这些亚型与预后和免疫调节改变相关, 这些改变可能会影响观察到的特定类型的免疫环境。肿瘤的免疫亚型在患者的预测用药和评估疗效方面有重要的指导作用, 可能为胰腺癌患者的免疫治疗策略提供新的思路。

#### 参考文献

- [1] RIZZATO C, CAMPA D, TALAR-WOJNAROWSKA R, et al. Association of genetic polymorphisms with survival of pancreatic ductal adenocarcinoma patients [J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37 (10): 957-964.
- [2] ANDREW M, PAUL K, RICHARD CT, et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24 (43): 4846-4861.
- [3] ORTH M, METZGER P, GERUM S, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches [J]. *Radiat Oncol*, 2019, 14 (1): 141.
- [4] PATEL MA, PARDOLL DM. Concepts of immunotherapy for glioma [J]. *J Neurooncol*, 2015, 123 (3): 323-330.
- [5] WOO SR, CORRALES L, GAJEWSKI TF. Innate Immune Recognition of Cancer [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33 (1): 445-474.
- [6] HÄNZELMANN S, CASTELO R, GUINNEY J, et al. GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data [J]. *Bmc Bioinformatics*, 2013, 14: 7.
- [7] BURUGU S, DANCOSK AR, NIELSEN TO. Emerging targets in cancer immunotherapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 52 (Pt 2): 39-52.
- [8] LI YS, XU J, CHEN H, et al. Comprehensive analysis of the functional microRNA-mRNA regulatory network identifies miRNA signatures associated with glioma malignant progression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41 (22): 203.
- [9] NEOPTOLEMOS JP, KLEEFF J, MICHL P, et al. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15 (6): 333-348.
- [10] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69 (1): 7-34.
- [11] BIRNBAUM DJ, BERTUCCI F, FINETTI P, et al. Molecular classification as prognostic factor and guide for treatment decision of pancreatic cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1869 (2): 248-255.
- [12] CUI GL, SHI YP, CUI J, et al. Immune microenvironmental shift along human colorectal adenoma-carcinoma sequence: is it relevant to tumor development, biomarkers and biotherapeutic targets? [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2012, 47 (4): 367-377.
- [13] MATSUMOTO H, THIKE AA, LI HH, et al. Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 156 (2): 237-247.
- [14] Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Nature*, 2013, 499 (7456): 43-49.
- [15] LUISA B, FRANCHESKA C, LINDSAY C, et al. Resistance to Checkpoint Inhibition in Cancer Immunotherapy [J]. *Transl Oncol*, 2020, 13 (3): 100738.