

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.007

· 临床研究 ·

## HIF1A 可作为乳腺癌的预后标志物且与免疫细胞浸润相关

欧阳洋, 李娟娟, 涂毅, 孙圣荣(武汉大学人民医院 乳腺甲状腺外科, 湖北 武汉 430060)

**[摘要]** **目的:** 借助多种癌症生物信息数据库研究乳腺癌组织中缺氧诱导因子1亚基 $\alpha$ (HIF1A)的表达水平及其与乳腺癌患者预后及肿瘤免疫细胞浸润的关系。**方法:** 利用 Oncomine、人类蛋白质图谱、基因表达谱交互式分析(GEPIA)及TCGA数据库分析 HIF1A 基因在乳腺癌组织中的表达及其与患者预后、临床病理特征的关系,并在中国人乳腺癌组织标本(选用2011年1月至2015年12月中国武汉大学人民医院手术切除的93例乳腺癌组织和14例良性乳腺疾病组织)中进行验证。对 HIF1A 高低表达组间的差异基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,用 Cibersort R 软件评估 HIF1A 高低表达样本中免疫细胞浸润丰度差异。**结果:** 生物信息数据显示, HIF1A 在乳腺癌组织中高表达,预示着患者 DFS 预后更好( $P<0.05$ )。HIF1A 的表达与雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体2(HER2)表达相关(均 $P<0.05$ )。GO 生物功能及 KEGG 通路富集分析结果提示, HIF1A 可能参与肿瘤免疫调节等生物活动。使用 Cibersort 分析结果显示, HIF1A 与肿瘤免疫细胞浸润之间具有相关性(均 $P<0.01$ ),发现活化记忆 CD4<sup>+</sup>T 细胞、M0 和 M1 型巨噬细胞与 HIF1A 表达呈正相关,在乳腺癌组织中高表达, Treg 细胞、活化 NK 细胞、M2 型巨噬细胞与 HIF1A 表达呈负相关(均 $P<0.01$ )。**结论:** HIF1A 参与调节肿瘤微环境的免疫活性,与乳腺癌患者 DFS 相关,其可能成为乳腺癌分级诊断、免疫治疗和预后判断的生物标志物。

**[关键词]** 乳腺癌; 肿瘤免疫细胞浸润; 无病生存期; 缺氧诱导因子1亚基 $\alpha$

**[中图分类号]** R737.9; R730.2; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)04-0317-10

## HIF1A is a prognostic biomarker of breast cancer and correlates with immunocyte infiltration

OUYANG Yang, LI Juanjuan, TU Yi, SUN Shengrong (Department of Breast and Thyroid Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF1A) in breast cancer (BC) and its relationship with prognosis and tumor immune cell infiltration in BC based on various cancer bioinformatics databases. **Methods:** The expression of HIF1A gene in BC tissues and its correlation with the prognosis and clinicopathological characteristics of patients were analyzed using the Oncomine, the Human Protein Atlas and TCGA databases, which were then verified in human breast cancer tissue specimens (93 cases of breast cancer tissues and 14 cases of benign breast disease tissues surgically resected from January 2011 to December 2015 in Renmin Hospital of Wuhan University). Gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis were conducted to analyze the differentially expressed genes between HIF1A-high and HIF1A-low expression groups. The differences in the abundance of immune cell infiltration in samples with high and low HIF1A expression were assessed by CIBERSORT. **Results:** As indicated by bioinformatics data, HIF1A was highly expressed in BC tissues and predicted a better prognosis ( $P<0.05$ ). The expression of HIF1A was associated with estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels in BC (all  $P<0.05$ ). The GO biological function analysis and KEGG pathway enrichment analysis suggested that HIF1A might be involved in tumor immunoregulation. CIBERSORT analysis suggested the correlation between HIF1A and tumor immune cell infiltration, and found that activated memory CD4<sup>+</sup> T cells, M0 and M1 macrophages were positively correlated with HIF1A expression, while Treg cells, activated NK cells, and M2 macrophages were negatively correlated with HIF1A expression (all  $P<0.05$ ). **Conclusion:** HIF1A is involved in regulating the immunological activity of the tumor microenvironment and is related to the disease-free survival (DFS) of breast cancer patients. It can be served as a biomarker for graded diagnosis, immunotherapy and prognosis judgment of BC.

**[Key words]** breast cancer; tumor immune cell infiltration; disease-free survival (DFS); hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF1A)

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(4): 317-326. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.007]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金资助项目(No.81302314);湖北省自然科学基金资助项目(No.2020CFA026)

**[作者简介]** 欧阳洋(1996—),女,硕士生,主要从事乳腺癌免疫微环境的研究, E-mail:2014302180180@whu.edu.cn

**[通信作者]** 孙圣荣, E-mail:sun137@sina.com

乳腺癌是全球性的健康问题,其是全世界女性与癌症相关的死亡的第二大主要原因<sup>[1]</sup>。尽管使用BRCA1/2突变为主要的各种致癌基因和抑癌基因的突变评估可以很好地预测乳腺癌患者的预后和治疗效果,但是因为乳腺癌表现出高度的肿瘤内异质性,乳腺癌患者的生存率仍有待提高<sup>[2-3]</sup>。近年来分子遗传学和生物标志物方面的研究进展为乳腺癌的精确诊断、个体化治疗及预后判断带来了新的希望,找到可靠、有效的生物标志物对乳腺癌的基础研究和临床治疗意义重大。

与肿瘤发生高度相关的病症之一是缺氧。缺氧诱导因子1亚基 $\alpha$ (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF1A)在调节细胞对缺氧的反应中起着重要作用<sup>[4]</sup>。在正常有氧条件下,HIF1A在大多数细胞中低表达,但在缺氧条件下通常显著上调<sup>[5]</sup>。HIF1A在多种癌症中过表达,并与癌症生物学的各个方面相关,包括通过诱导血管生成促进肿瘤的发展、侵袭和转移,以及在缺氧的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中调节细胞代谢<sup>[6-9]</sup>。此外,HIF1A还可以在多种免疫细胞中表达,包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞和淋巴细胞,从而在免疫微环境中调节固有免疫和适应性免疫<sup>[10-11]</sup>。但是关于乳腺癌组织中的HIF1A水平是否与肿瘤免疫浸润和临床结局有关,尚未进行评估。

本研究调查来自癌症基因组图谱(TCGA)计划(<https://cancergenome.nih.gov/>)乳腺癌患者队列中HIF1A表达与乳腺癌患者的预后之间的关联,分析HIF1A mRNA水平与乳腺癌患者的临床病理特征和肿瘤免疫细胞浸润的相关性,为揭示HIF1A在乳腺癌中的重要作用及其与肿瘤-免疫相互作用之间的潜在关系和潜在机制提供实验依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 采集数据

Oncomine数据库(<https://www.oncomine.org/resource/login.html>)用于评估HIF1A在各种类型癌症中的表达水平<sup>[12]</sup>。 $P=0.01$ ,倍数变化为1.5,阈值为TOP10%,数据类型为mRNA。

在线数据库“基因表达谱交互式分析”(GEPIA)(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)是一个交互式网站,其中包含来自TCGA和基因型-组织表达(genotype-tissue expression, GTEx)项目的9 736例肿瘤和8 587例正常样品中的RNA测序表达<sup>[13]</sup>。采用GEPIA数据对乳腺癌进行Log-Rank检验和Mantel-Cox检验,根据基因表达情况生成生存曲线,包括OS和DFS。另外,在人类蛋白质图谱(the human protein

atlas, HPA)(<https://www.proteinatlas.org/>)中获得HIF1A在乳腺癌组织与正常乳腺组织中的表达图谱。

从TCGA数据库中检索了1 109例乳腺癌组织和113例正常乳腺组织的转录组谱和体细胞突变信息,并从cBioportal(<http://cbioportal.org>)检索了相应的临床数据<sup>[14]</sup>。

### 1.2 HIF1A相关的信号通路富集分析

本研究根据HIF1A基因表达的中位值,将1 109个肿瘤样品标分为高表达组或低表达组,使用limma包进行基因表达的差异分析,并通过比较HIF1A高表达组样本和低表达组样本间的差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)。log<sub>2</sub>转换后得分变化大于1的DEG(高表达组/低表达组)和错误发现率(false discovery rate, FDR) $<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。借助于ClusterProfiler、Richplot和Ggplot2软件包,使用R语言对295个DEG进行了基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析,仅将 $P$ 值和 $q$ 值均 $<0.05$ 的项被认为是显著富集的。

### 1.3 肿瘤免疫分析

基于RNA-Seq数据,利用“Cibersort”R包来估计单样本中22种免疫细胞的丰度<sup>[15]</sup>。

### 1.4 IHC检测乳腺癌组织中HIF1A的表达水平

选取2011年1月至2015年12月在武汉大学人民医院收治的乳腺癌93例,14例良性乳腺疾病作为对照。癌组织和良性乳腺疾病组织经甲醛固定、石蜡包埋。从病历和病理报告中提取临床信息,所有患者均未接受化疗、放疗或免疫治疗。本研究经武汉大学人民医院伦理委员会批准,并征得所有患者知情签字同意。IHC染色如下:脱蜡、抗原修复、封闭,以一抗(HIF-1 $\alpha$ , Abcam公司, ab51608)处理(稀释1:100, 37 $^{\circ}$ C 2 h),洗涤,封闭,以辣根过氧化物酶偶联的二抗(优宁维生物公司)处理(稀释1:500, 37 $^{\circ}$ C 30 min),洗涤,并用二氨基联苯胺染色。染色结果由两位独立的高资质的病理医生根据阳性染色肿瘤细胞的比例和染色强度进行评分。HIF1A的表达水平根据ImageJ软件计算的阳性细胞百分比来描述。肿瘤细胞比例评分:0( $<10\%$ 阳性细胞),1( $10\%\sim<20\%$ 阳性细胞),2( $20\%\sim<50\%$ 阳性细胞)或3( $\geq 50\%$ 阳性细胞)。蛋白质染色强度评分:0(无染色),1(弱染色,浅棕色),2(中度染色,棕色)或3(强染色,深棕色)。

### 1.5 统计学处理

应用SPSS 22.0和R4.0.1软件进行分析。计量资料以中位数(下四分位数,上四分位数)表示,采用非

参数 Mann-Whitney *U* 检验; 计数资料以例数和百分数表示, 用 Kaplan-Meier 法绘制患者生存曲线, 生存率的比较采用 Log-Rank 检验。HIF1A 表达量与乳腺癌患者临床病理特征的关系分析使用  $\chi^2$  检验及 Fisher 确切概率法, 采用 Spearman 偏相关分析法分析 HIF1A 基因表达与肿瘤免疫浸润细胞的关系。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

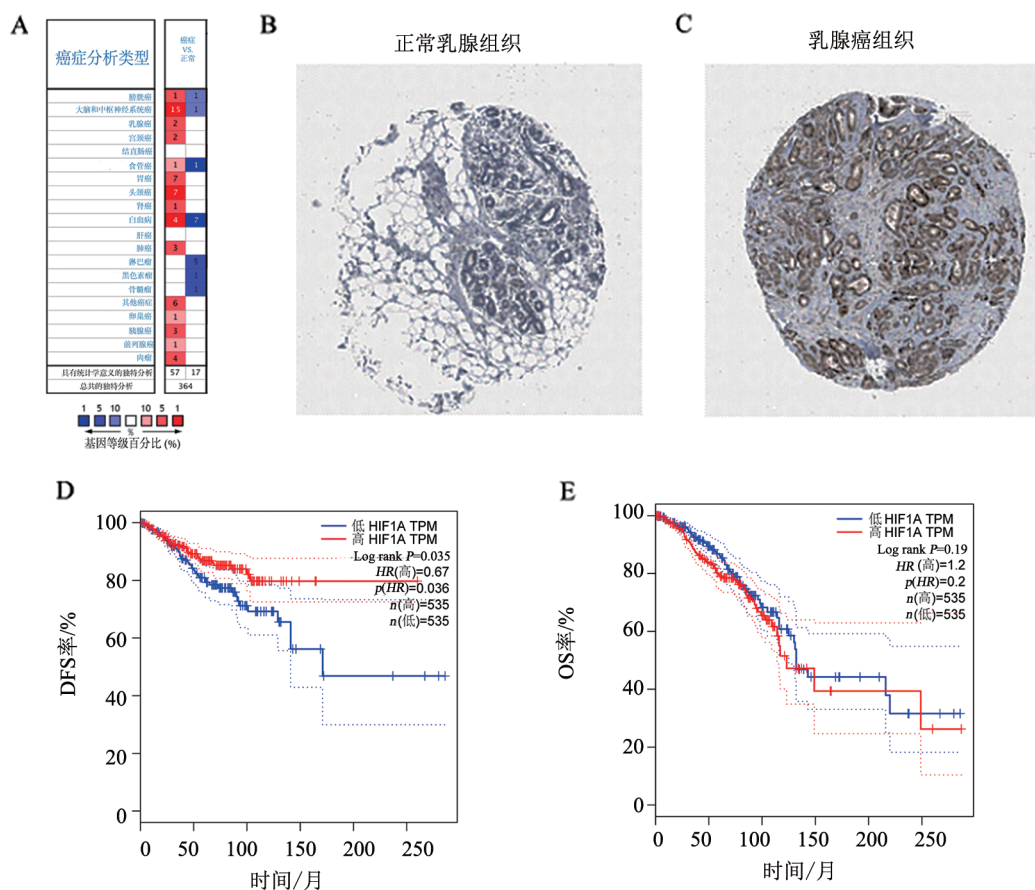
## 2 结果

### 2.1 HIF1A 高表达的乳腺癌患者预后较好

利用 Oncomine 数据库数据分析了各种类型癌症的肿瘤组织和正常组织中 HIF1A mRNA 的水平, 与正常组织相比, HIF1A 在大多数肿瘤组织(包括膀胱癌、中枢神经系统肿瘤、乳腺癌、宫颈癌、胃癌、肾癌、

白血病、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和肉瘤)中的表达均较高(图 1A)。此外, 通过检测 HPA 中数据发现, HIF1A 在乳腺癌组织中表达较强, 而在正常乳腺组织中表达较弱或呈阴性(图 1B、C), 进一步在临床病理方面验证了 HIF1A 在乳腺癌中高表达的趋势。

接着分析了 HIF1A 表达与乳腺癌患者预后的相关性, 发现 HIF1A 与乳腺癌 DFS 显著相关, 低 HIF1A 表达组预后明显差于 HIF1A 高表达组 ( $HR=0.67$ ,  $P=0.036$ ), 但未观察到 HIF1A 与乳腺癌患者 OS 之间有明显的相关性 ( $HR=1.2$ ,  $P=0.2$ ) (图 1D、E)。因此, 可以推断, HIF1A 低表达可能是乳腺癌患者预后不良的危险因素。



A: Oncomine 数据库中不同癌症数据集的 HIF1A 表达水平; B: 人类蛋白图谱项目中 HIF1A 在正常乳腺组织的表达; C: 人类蛋白图谱项目中 HIF1A 在乳腺癌组织的表达; D: 乳腺癌组织中 HIF1A 表达与患者 DFS 关系的分析; E: 乳腺癌组织中 HIF1A 表达与患者 OS 关系的分析

图 1 HIF1A 在乳腺癌患者中的表达水平及其与患者生存关系的分析

### 2.2 乳腺癌组织中 HIF1A 的表达与病理特征的关系

为了研究乳腺癌中 HIF1A 表达与临床病理特征之间的关系, 采用中位数切割法, 计算得截断值为 6 442 counts, 根据此值将乳腺癌患者分为高表达组和低表达组。结果发现 HIF1A 与患者雌激素受体

(estrogen receptor, ER)、孕酮受体 (progesterone receptor, PR) 和人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 表达明显有关联(表 1)。接下来, 在 TCGA 数据集中进一步检测到肿瘤组织中 HIF1A 在 ER 阴性组、PR 阴性组和

HER2 阳性组中表达上调(图 2A~C)。还观察到 HIF1A 在基底样乳腺癌和 HER2 过表达型乳腺癌比 luminal A、luminal B 及正常组织中的表达明显升高,而在 luminal A 和 luminal B 乳腺癌亚型中没有发现差异(图 2D)。

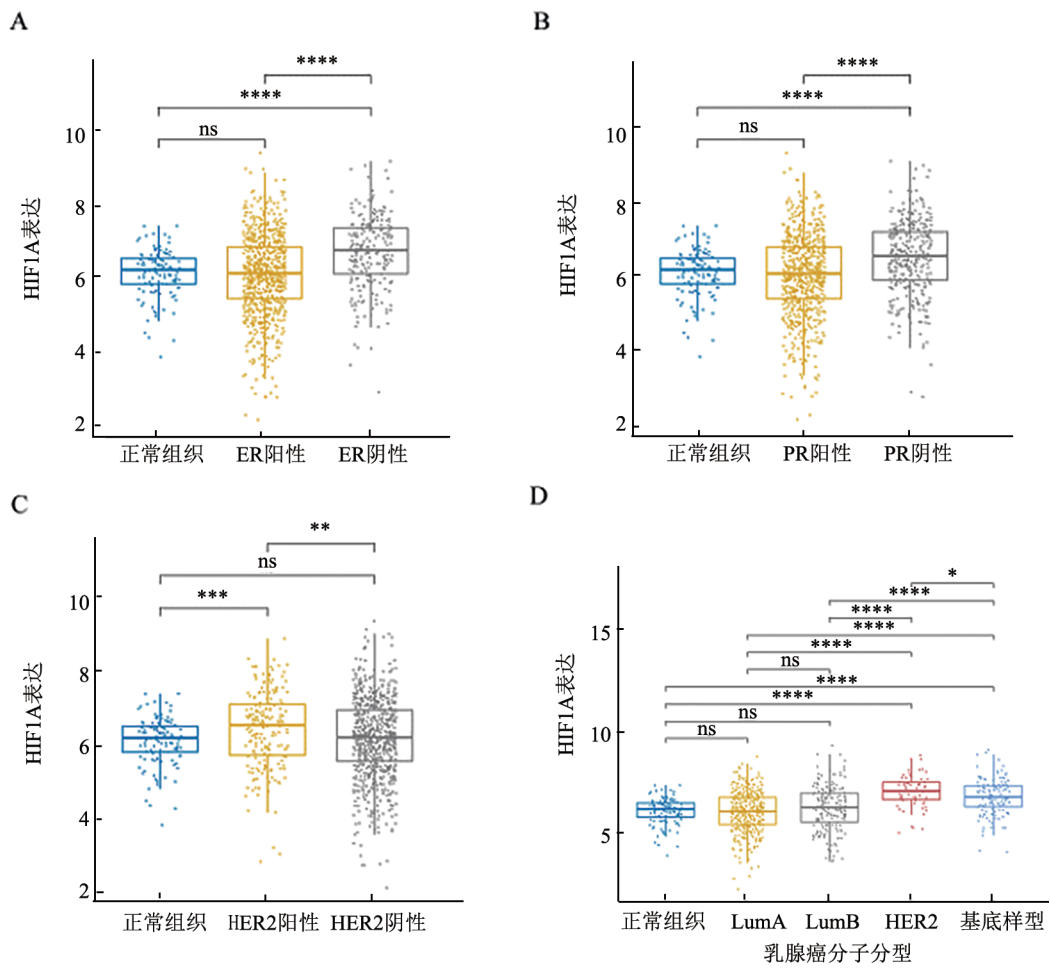
### 2.3 中国人乳腺癌组织中 HIF1A 高表达

HIF1A 在国人乳腺癌组织中的病理表达特征见表 2。与乳腺良性组织相比,乳腺癌中 HIF1A 表达水平明显升高( $P<0.01$ ;图 3)。分析乳腺癌各个亚型中

HIF1A 的表达水平,发现与正常组织相比,各个亚型中 HIF1A 的表达水平均升高(均  $P<0.01$ ),但是没有观察到各个亚型之间 HIF1A 表达水平的差异。以 Kaplan-Meier 分析乳腺癌患者 RFS 表明,表达低水平 HIF1A 的患者比表达高水平 HIF1A 组的患者预后更差( $P<0.05$ )。以上结果表明,中国人癌组织标本中 HIF1A 低表达可能是乳腺癌患者预后不良的因素,可以作为乳腺癌患者预测预后的指标。

表 1 TCGA 队列中 HIF1A mRNA 表达与临床病理特征的关系[n(%)]

临床特征	样本量 (N=1 096)	HIF1A 高表达 (N=548)	HIF1A 低表达 (N=548)	P
年龄/岁				
≥55	645(58.85)	316(57.66)	329(60.04)	0.645
<55	451(41.15)	232(42.34)	219(39.96)	
T 分期				
T1	279(25.46)	138(25.18)	141(25.73)	0.422
T2	637(58.12)	328(59.85)	309(56.39)	
T3	137(12.50)	60(10.95)	77(14.05)	
T4	40(3.65)	21(3.83)	19(3.47)	
未知	3(0.27)	1(0.18)	2(0.36)	
N 分期				
N0	514(46.90)	260(47.45)	254(46.35)	0.332
N1	364(33.21)	174(31.75)	190(34.67)	
N2	120(10.95)	69(12.59)	51(9.31)	
N3	78(7.12)	39(7.12)	39(7.12)	
未知	20(1.82)	6(1.09)	14(2.55)	
M 分期				
M0	913(83.30)	489(89.23)	424(77.37)	0.11
M1	22(2.01)	8(1.46)	14(2.55)	
未知	161(14.69)	51(9.31)	110(20.07)	
AJCC 分期				
I	180(16.42)	87(15.88)	93(16.97)	0.477
II	624(56.93)	313(57.12)	311(56.75)	
III	249(22.72)	130(23.72)	119(21.72)	
IV	20(1.82)	7(1.28)	13(2.37)	
未知	23(2.10)	11(2.01)	12(2.19)	
ER				
阴性	808(73.72)	350(63.87)	458(83.58)	<0.000 1
阳性	238(21.72)	168(30.66)	70(12.77)	
未知	50(4.56)	30(5.47)	20(3.65)	
PR				
阴性	344(31.39)	222(40.51)	122(22.26)	<0.000 1
阳性	699(63.78)	297(54.20)	402(73.36)	
未知	53(4.84)	29(5.29)	24(4.38)	
HER2				
阴性	759(69.25)	369(67.34)	390()	0.014
阳性	195(17.79)	114(20.80)	81(14.78)	
未知	142(12.96)	65(11.86)	77(14.05)	



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns:  $P > 0.05$

图2 在TCGA队列中HIF1A在不同的ER(A)、PR(B)、HER2(C)状态和分子亚型(D)肿瘤组织中的表达

#### 2.4 与HIF1A相关的DEG与乳腺癌的免疫功能密切相关

为了探索乳腺癌中HIF1A表达相关的生物学过程,对HIF1A高表达组和低表达组样本进行DEG分析,总共获得了295个DEG,其中179个基因表达上调、116个基因表达下调。随后,进行GO和KEGG富集分析。GO富集分析结果表明,HIF1A参与白细胞趋化反应、由抗菌肽介导的体液免疫反应、粒细胞趋化反应、趋化因子信号转导途径和嗜中性粒细胞趋化反应等(图4A)。KEGG富集分析还显示了细胞因子与细胞因子受体间相互作用通路和IL-17信号通路(图4B)。结果表明,HIF1A表达与乳腺癌患者的免疫功能相关,提示HIF1A可能参与乳腺癌TME的调节。

#### 2.5 HIF1A表达影响肿瘤浸润免疫细胞(tumor-infiltrating immune cell, TIC)的群谱特性

为了进一步证实HIF1A表达与TME的相关性,使用Cibersort算法分析了TIC亚群的比例,并在乳腺癌样品中构建了22种免疫细胞谱。差异分析发现,HIF1A高表达组表现出较高水平的静息记忆CD4<sup>+</sup>T

细胞( $P < 0.01$ )、活化记忆CD4<sup>+</sup>T细胞( $P < 0.0001$ )、M0型巨噬细胞( $P < 0.01$ )和M1型巨噬细胞( $P < 0.01$ )。另外,HIF1A高表达组表现出较低水平的Treg细胞( $P < 0.01$ )、活化NK细胞( $P < 0.0001$ )、单核细胞( $P < 0.01$ )、M2型巨噬细胞( $P < 0.0001$ )和静息肥大细胞( $P < 0.0001$ )(图5A)。相关性分析表明,总共8种TIC与HIF1A的表达相关,其中记忆型B细胞、Treg细胞、活化NK细胞、静息肥大细胞、M2型巨噬细胞与HIF1A表达呈负相关,而静息记忆CD4<sup>+</sup>T细胞、活化记忆CD4<sup>+</sup>T细胞、M1型巨噬细胞与HIF1A表达呈正相关(图5B)。这些结果进一步支持了HIF1A表达水平影响TME的免疫活性。

### 3 讨论

缺氧是导致肿瘤侵袭性微环境最常见的特征之一。瘤内低氧激活HIF-1和HIF-2,在几种人类癌症中已证明HIF1A的表达与肿瘤转移和死亡率密切相关<sup>[6]</sup>。特别是在多形性胶质母细胞瘤、成血管细胞瘤、结肠腺癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌的亚型中观察到HIF1A高表达,HIF1A是缺氧、血管生成、细胞

表2 HIF1A在中国人乳腺癌组织中的病理表达特征[n(%)]

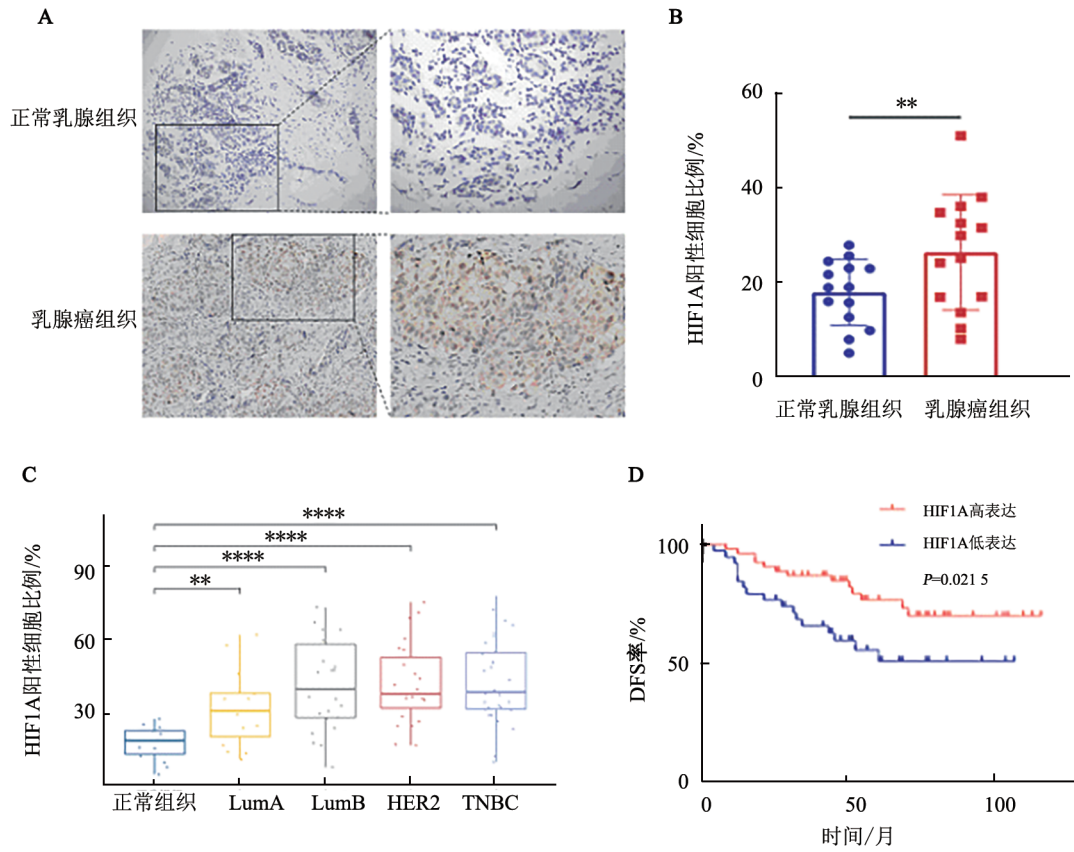
变量	HIF1A		P
	低表达(N=39)	高表达(N=54)	
诊断年龄/岁			0.513
<55	26(66.7)	37(68.5)	
≥55	13(33.3)	17(31.5)	
分级			0.438
≤2	21(53.8)	27(50.0)	
>2	18(46.2)	27(50.0)	
淋巴结转移			0.037
阴性	7(17.9)	20(37.0)	
阳性	32(82.1)	34(73.0)	
肿瘤大小1 cm			0.396
≤2	9(23.1)	15(27.8)	
>2	30(76.9)	39(72.2)	
ER			0.071
阴性	20(51.3)	37(68.5)	
阳性	19(48.7)	17(31.5)	
PR			0.194
阴性	24(61.5)	39(72.2)	
阳性	15(38.5)	15(27.8)	
HER2			0.458
阴性	28(71.8)	37(68.5)	
阳性	11(28.2)	17(31.5)	
Ki67			0.111
<14%	13(33.3)	11(20.4)	
≥14%	26(66.7)	44(79.6)	
分子分型			0.496
Luminal A型	8(20.5)	7(13.0)	
Luminal B型	11(28.2)	14(25.9)	
HER2型	7(17.9)	16(29.6)	
基底样型	13(33.3)	17(31.5)	
复发			0.039
否	22(56.4)	41(75.9)	
是	17(43.6)	13(24.1)	

增殖、代谢、癌症进展和转移的主要调节剂<sup>[17]</sup>。本研究表明,与正常乳腺组织相比,HIF1A在乳腺癌中表达显著上调,并且与乳腺癌患者良好DFS预后相关。然而,一些文献报道了HIF1A在乳腺癌中的致癌和促癌作用。EBRIGHT等<sup>[8]</sup>报道了HIF1A信号选择性促进了乳腺癌脑转移,CHEN等<sup>[18]</sup>也报道了HIF1A可以诱导表观遗传阅读器锌指MYND型8

(eigenetic reader zinc finger MYND-type containing 8, ZMYND8)表达上调,从而促进体外乳腺癌细胞集落的形成、迁移和侵袭,并促进了小鼠乳腺肿瘤的生长和向肺的转移。造成这种不一致的主要原因是本研究在整体水平上分析了HIF1A的表达。KACHAMAKOVA-TROJANOWSKA等<sup>[19]</sup>最近的研究也支持了本研究的发现,HIF1A的稳定化可降低肿

瘤细胞的侵袭性,在体外和体内的乳腺癌细胞中发挥抗癌作用,并增强了吉西他滨化疗的疗效。此外, TIWARI等<sup>[20]</sup>研究结果也表明,HIF1A可以促进胰腺癌细胞中p53蛋白的降解来发挥肿瘤抑制作用,胰腺

癌细胞中HIF1A的缺失增加了他们的侵袭和转移活性。这些数据共同表明,HIF1A在乳腺癌中发挥着抑癌和促癌的双重作用<sup>[21-22]</sup>。



\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001; ns: P>0.05

A: 正常乳腺组织及乳腺癌组织中HIF1A表达的免疫组化染色代表性图像,放大倍数分别为×100(左)、×200(右);B: 正常乳腺组织与乳腺癌组织中HIF1A的定量分析;C: HIF1A在乳腺癌各个亚型中的表达水平;D: 乳腺癌患者HIF1A表达与DFS分析

图3 中国人乳腺癌组织中HIF1A的表达水平及其与患者DFS的关系

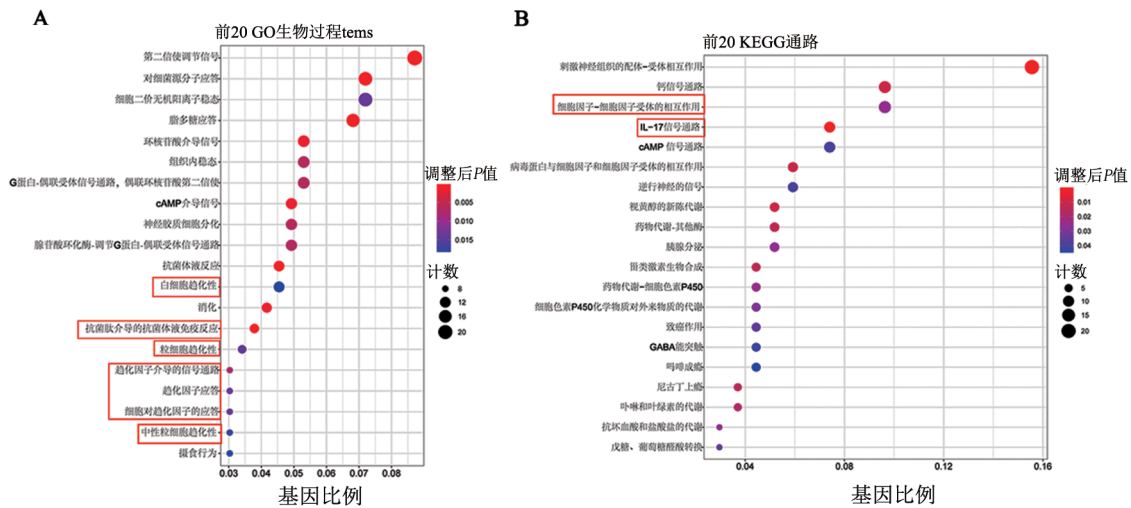
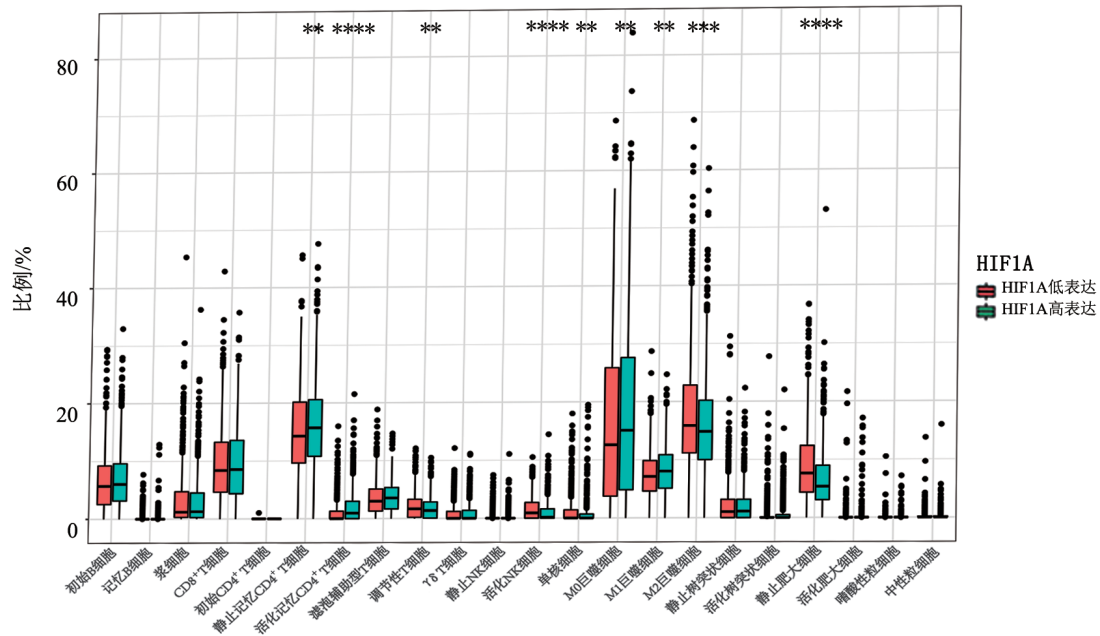
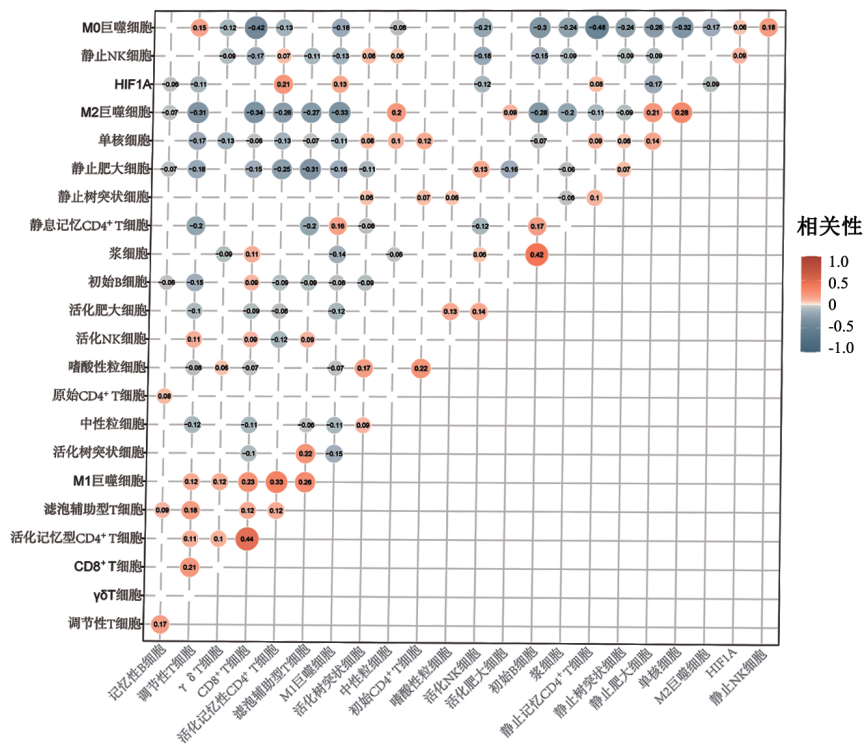


图4 GO(A)和KEGG(B)富集分析显示HIF1A相关DEG与免疫功能有关

A 肿瘤微环境中免疫细胞组成



B



\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001

A: 柱状图显示了低HIF1A表达或高HIF1A表达的乳腺癌样本中22种免疫细胞的组间差异, 并使用t检验进行显著性检验;

B: 热图显示了22种TIC及HIF1A之间的相关性(框内数值表示对应的相关值; 使用Pearson相关性检验)

图5 HIF1A表达与TIC群谱相关性分析

此外, 本研究还发现在TCGA队列中HIF1A mRNA水平与ER、PR表达呈负相关, 和HER2的状态呈正相关。其中HIF1A在HER2过表达型乳腺癌中表达最高, 这之前报道的HER2通过增加PI3K/Akt/mTOR信号转导来增加HIF1A水平相一致<sup>[23]</sup>。此外在一些研究中发现, 患者乳腺肿瘤中的

HIF1A免疫组化表达水平与HER2阳性相关<sup>[24]</sup>。

HIF1A参与了肿瘤相关炎症信号的内源性和外源性激活<sup>[25]</sup>。实体肿瘤的生长速度最终超过氧气和营养的供应, 导致局部坏死<sup>[16, 25]</sup>。肿瘤的缺氧和坏死区域反过来产生促炎介质, 招募更多的免疫细胞, 从而促进肿瘤部位的免疫反应以及抑制肿瘤细胞的增



殖、血管生成和转移<sup>[25-26]</sup>。本研究通过GO和KEGG富集分析,证实了HIF1A与乳腺癌中免疫活性以及炎症反应有关,例如白细胞趋化反应、趋化因子反应、IL-17信号通路等。

HIF1A作为缺氧的主要调节因子,可直接或间接调控缺氧介导的肿瘤免疫逃逸<sup>[27-28]</sup>,在免疫调控和炎症反应中发挥重要作用<sup>[10-11,29]</sup>。与肿瘤细胞一样,浸润性免疫细胞也暴露在缺氧环境中,因为他们从富含氧气的血流中外溢到炎症部位,从而激活免疫细胞中的HIF1A<sup>[30]</sup>。而髓细胞中HIF1A的缺失导致细胞ATP池的减少,并且严重损害了髓细胞聚集、运动性、侵袭性、抗菌活性和存活时间<sup>[30-31]</sup>。在癌症免疫学的背景下,Treg细胞可以抑制自身反应性T细胞,从而发挥抑制肿瘤免疫的作用,Treg细胞数量多与CD8<sup>+</sup>T细胞比例低与预后不良相关<sup>[32]</sup>。在本研究中,通过Cibersort软件对TIC比例进行分析结果表明,乳腺癌患者中Treg细胞与HIF1A表达呈负相关。此外,还发现HIF1A与M0和M2型巨噬细胞呈负相关,与M1型巨噬细胞呈正相关。巨噬细胞在TME中浸润非常丰富,在一些恶性肿瘤中他们的高浸润与不良预后和治疗耐药性相关<sup>[33]</sup>。由于他们的可塑性,巨噬细胞可以极化为促炎、抗肿瘤M1型或极化为抗炎、促肿瘤M2型<sup>[34]</sup>。M1型巨噬细胞通过分泌促炎性细胞因子和趋化因子,并专职提呈抗原,参与正向免疫应答,发挥免疫监视的功能。而M2型巨噬细胞仅有较弱抗原提呈能力,并通过分泌抑制性细胞因子IL-10或TGF-B等下调免疫应答,在免疫调节中发挥重要作用<sup>[35]</sup>。以上这些结果表明,HIF1A低表达抑制了肿瘤内炎症反应,导致肿瘤内Treg细胞、抗炎M2型巨噬细胞浸润增加,促炎M1型巨噬细胞浸润减少,形成肿瘤免疫抑制微环境,导致免疫逃逸,这可能是乳腺癌患者预后不良的原因。总之,乳腺癌患者的TIC与HIF1A密切相关,提示HIF1A可能是维持TME中免疫活性的重要因素。

必须承认本研究存在局限性。首先是缺乏动物实验来证实HIF1A在乳腺癌生长和进展中的作用及其与TME中免疫细胞浸润的关系。因此,需要进一步的研究以验证HIF1A在使用这些模型的乳腺癌中的作用。其次,本研究缺少对调控HIF1A具体机制的研究,有必要进一步探索乳腺癌中HIF1A可能的调控因子。

#### [参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21590.
- [2] LIANG Y, ZHANG H, SONG X, *et al.* Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 14-27. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.012.
- [3] YEO S K, GUAN J L. Breast cancer: multiple subtypes within a tumor? [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(11): 753-760. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.09.001.
- [4] IYER N V, KOTCH L E, AGANI F, *et al.* Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha[J/OL]. *Genes Dev*, 1998, 12(2): 149-162[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316445/>. DOI: 10.1101/gad.12.2.149.
- [5] CIMMINO F, AVITABILE M, LASORSA V A, *et al.* HIF-1 transcription activity: HIF1A driven response in normoxia and in hypoxia[J/OL]. *BMC Med Genet*, 2019, 20(1): 37[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6390360/>. DOI: 10.1186/s12881-019-0767-1.
- [6] JING X M, YANG F M, SHAO C C, *et al.* Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J/OL]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 157[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6844052/>. DOI:10.1186/s12943-019-1089-9.
- [7] SEMENZA G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 721-732. DOI:10.1038/nrc1187.
- [8] EBRIGHT R Y, ZACHARIAH M A, MICALIZZI D S, *et al.* HIF1A signaling selectively supports proliferation of breast cancer in the brain[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6311[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7725834/>. DOI: 10.1038/s41467-020-20144-w.
- [9] VAUPEL P, MAYER A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(2): 225-239. DOI:10.1007/s10555-007-9055-1.
- [10] PALAZON A, GOLDRATH A W, NIZET V, *et al.* HIF transcription factors, inflammation, and immunity[J]. *Immunity*, 2014, 41(4): 518-528. DOI:10.1016/j.immuni.2014.09.008.
- [11] YOU L, WU W, WANG X, *et al.* The role of hypoxia-inducible factor 1 in tumor immune evasion[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(3): 1622-1643. DOI:10.1002/med.21771.
- [12] RHODES D R, KALYANA-SUNDARAM S, MAHAVISNO V, *et al.* OncoPrint 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18, 000 cancer gene expression profiles[J/OL]. *Neoplasia*, 2007, 9(2): 166-180[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1813932/>. DOI:10.1593/neo.07112.
- [13] TANG Z F, LI C W, KANG B X, *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-W102 [2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5570223/>. DOI:10.1093/nar/gkx247.
- [14] GAO J J, AKSOY B A, DOGRUSOZ U, *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal[J/OL]. *Sci Signal*, 2013, 6(269): p11[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160307/>. DOI: 10.1126/scisignal.2004088.
- [15] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, *et al.* Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles[J/OL]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453-457[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4739640/>. DOI:10.1038/nmeth.3337.
- [16] BALAMURUGAN K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation,

- and cancer[J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(5): 1058-1066. DOI:10.1002/ijc.29519.
- [17] ZHONG H, DE MARZO A M, LAUGHNER E, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5830-5835. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10582706/>.
- [18] CHEN Y, ZHANG B, BAO L, *et al.* ZMYND8 acetylation mediates HIF-dependent breast cancer progression and metastasis [J/OL]. *The Journal of clinical investigation*, 2018, 128(5): 1937-55 DOI:10.1172/JCI95089.
- [19] KACHAMAKOVA-TROJANOWSKA N, PODKALICKA P, BOGACZ T, *et al.* HIF-1 stabilization exerts anticancer effects in breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 175: 113922. DOI:10.1016/j.bcp.2020.113922.
- [20] TIWARI A, TASHIRO K, DIXIT A, *et al.* Loss of HIF1A from pancreatic cancer cells increases expression of PPP1R1B and degradation of p53 to promote invasion and metastasis[J/OL]. *Gastroenterology*, 2020, 159(5): 1882-1897.e5[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7680408/>. DOI:10.1053/j.gastro.2020.07.046.
- [21] ABU-JAMOUS B, BUFFA F M, HARRIS A L, *et al.* *In vitro* downregulated hypoxia transcriptome is associated with poor prognosis in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 105. DOI: 10.1186/s12943-017-0673-0.
- [22] DE HEER E C, JALVING M, HARRIS A L. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5074-5087. DOI:10.1172/JCI137552.
- [23] JARMAN E J, WARD C, TURNBULL A K, *et al.* HER2 regulates HIF-2 $\alpha$  and drives an increased hypoxic response in breast cancer[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 10[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6343358/>. DOI:10.1186/s13058-019-1097-0.
- [24] BOS R, VAN DER GROEP P, GREIJER A E, *et al.* Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma[J]. *Cancer*, 2003, 97(6): 1573-1581. DOI:10.1002/cncr.11246.
- [25] MAMLOUK S, WIELOCKX B. Hypoxia-inducible factors as key regulators of tumor inflammation[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(12): 2721-2729. DOI:10.1002/ijc.27901.
- [26] MIAR A, ARNAIZ E, BRIDGES E, *et al.* Hypoxia induces transcriptional and translational downregulation of the type I IFN pathway in multiple cancer cell types[J/OL]. *Cancer Res*, 2020, 80(23): 5245-5256[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7611234/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-19-2306.
- [27] GUO Y, XIAO Z Q, YANG L, *et al.* Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma (review)[J/OL]. *Oncol Rep*, 2020, 43(1): 3-15[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6908932/>. DOI:10.3892/or.2019.7397.
- [28] SEMENZA G L. Pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factors[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2019, 59: 379-403. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637.
- [29] SCHOLZ C C, TAYLOR C T. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(4): 646-653. DOI:10.1016/j.coph.2013.04.009.
- [30] CRAMER T, YAMANISHI Y, CLAUSEN B E, *et al.* HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation[J/OL]. *Cell*, 2003, 112(5): 645-657[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4480774/>. DOI:10.1016/s0092-8674(03)00154-5.
- [31] WALMSLEY S R, PRINT C, FARAH N, *et al.* Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity[J/OL]. *J Exp Med*, 2005, 201(1): 105-115[2021-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212759/>. DOI:10.1084/jem.20040624.
- [32] WHITESIDE T L. FOXP3<sup>+</sup> Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(4): 353-363. DOI:10.1080/14728222.2018.1451514.
- [33] YANG M, MCKAY D, POLLARD J W, *et al.* Diverse functions of macrophages in different tumor microenvironments[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(19): 5492-5503. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-1367.
- [34] PINTO M L, RIOS E, DURÃES C, *et al.* The two faces of tumor-associated macrophages and their clinical significance in colorectal cancer. *Front Immunol*. 2019, 10: 1875 [2021-10-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31481956/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01875.
- [35] ARTYOMOV M N, SERGUSHICHEV A, SCHILLING J D. Integrating immunometabolism and macrophage diversity[J]. *Semin Immunol*, 2016, 28(5): 417-424. DOI:10.1016/j.smim.2016.10.004.

[收稿日期] 2021-11-12

[修回日期] 2022-04-03

[本文编辑] 向正华,沈志超