

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.008

· 临床研究 ·

卵巢癌中血管生成相关免疫基因预后模型的构建和肿瘤微环境分析

吕微¹, 王佳丽¹, 刘天旭¹, 王郁¹, 刘丽华^{1,2,3} (1. 河北医科大学第四医院 肿瘤免疫治疗科, 河北 石家庄 050000; 2. 河北省肿瘤研究所, 河北 石家庄 050000; 3. 河北医科大学国际合作研究干细胞实验室, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的:** 采用生物信息学方法探索卵巢癌中与血管生成相关的免疫基因(ARIG), 探讨其与卵巢癌患者预后的关系, 并说明不同预后患者肿瘤微环境和免疫治疗的潜在差异, 为卵巢癌患者提供新的治疗靶点。 **方法:** 分别从TCGA和GEO数据库下载卵巢癌的转录组数据和生存数据。利用R软件分析差异表达基因, 利用Pearson相关系数鉴定血管生成相关基因与免疫相关基因之间的相关性, 筛选出差异表达的ARIG。通过Lasso回归分析构建预后模型, 通过Cox分析临床特征和风险评估, 将样本分为高风险组和低风险组。通过单样本基因集富集分析(ssGSEA)、肿瘤免疫功能障碍和排斥(TIDE)分析预后风险模型与免疫浸润、免疫治疗反应的相关性。最后, 收集河北医科大学第四医院2015年5月至2016年5月手术的卵巢癌患者的肿瘤组织和输卵管组织85对, 通过qPCR和WB法验证五个差异表达的ARIG在卵巢癌组织中的表达情况, 分析其与卵巢癌患者临床病理特征的关系, 并初步探索其在卵巢癌细胞的生物学功能。 **结果:** 通过生信分析筛选出142个差异表达的ARIG, 通过Lasso和Cox回归分析, 得到5个基因作为预后基因(PTGER3、SCTR、IGHG1、HSPA8、IGF2), 构建了预后风险模型, 高风险组患者的预后更差; 此外, 不同风险评估的患者在免疫细胞浸润和免疫治疗反应方面存在显著差异(均 $P<0.05$)。通过qPCR和WB法验证这5个基因在卵巢癌组织中均为高表达(均 $P<0.01$), 其中HSPA8表达量最高, 且高表达HSPA8与卵巢癌患者FIGO分期晚、组织分级差、淋巴结转移及腹膜转移呈显著正相关($P<0.001$)。细胞功能实验证实, HSPA8可促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭($P<0.01$)。 **结论:** 差异表达的5种ARIG能有效预测卵巢癌患者的预后, 并且与免疫细胞浸润和免疫治疗疗效有关, 初步证实其在卵巢中发挥促癌作用。

[关键词] 卵巢癌; 血管生成; 免疫治疗; 预后; 肿瘤微环境

[中图分类号] R730.3; R737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)08-0803-12

Construction of a prognostic model with angiogenesis-related immune genes in ovarian cancer and analysis of tumor microenvironment

LYU Wei¹, WANG Jiali¹, LIU Tianxu¹, WANG Yu¹, LIU Lihua^{1,2,3} (1. Department of Tumor Immunotherapy, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 2. Hebei Cancer Institute, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 3. International Cooperation Laboratory of Stem Cell Research, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore angiogenesis-related immune genes (ARIGs) in ovarian cancer using the bioinformatics method, investigate their relationship with ovarian cancer prognosis, and elucidate potential differences in tumor microenvironment and immunotherapy response among patients with different prognosis, so as to provide new therapeutic targets for ovarian cancer patients. **Methods:** Transcriptome and survival data for ovarian cancer were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus (GEO) databases, respectively. The differentially expressed genes were analyzed using R software, and the correlation between ARIGs and immune-related genes was identified by the Pearson correlation coefficient, leading to the selection of differentially expressed ARIGs. A prognostic model was constructed by LASSO regression analysis, and the clinical features and risk scores were evaluated through COX analysis. Patients were divided into a high-risk group and a low-risk group. Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) and tumor immune dysfunction and exclusion (TIDE) were used to analyze the correlation between the prognostic risk model and immune invasion and immunotherapy response. Finally, 85 pairs of tumor tissues and fallopian tube tissues of ovarian cancer patients who were surgically treated in the Fourth Hospital of Hebei Medical University from May 2015 to May 2016 were collected. The expression of five differentially expressed ARIGs in ovarian cancer tissues was verified by qPCR and WB, and their

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81871894)

[作者简介] 吕微(1986—), 女, 博士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的临床治疗和肿瘤分子生物学研究。E-mail: lvwei0326@foxmail.com

[通信作者] 刘丽华, E-mail: cdlihua@aliyun.com

relationship with clinicopathological features of ovarian cancer patients was analyzed. The biological function of these ARIGs in ovarian cancer cells was preliminarily explored. **Results:** A total of 142 differentially expressed ARIGs were screened by bioinformatics analysis. Lasso and Cox regression analyses identified five genes (PTGER3, SCTR, IGHG1, HSPA8, IGF2) as prognostic genes, and a prognostic risk model was constructed. Patients in the high-risk group had a worse prognosis. Moreover, significant differences were observed in immune cell infiltration and immunotherapy response between patients with different risk scores. Finally, qPCR and WB verified that these 5 genes were highly expressed in ovarian cancer tissues, with HSPA8 being the most highly expressed. High HSPA8 expression was positively correlated with advanced FIGO stage, poor histological grade, lymph node metastasis and peritoneal metastasis in ovarian cancer patients (all $P < 0.001$). Cell function experiments confirmed that HSPA8 could promote the proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** The five differentially expressed ARIGs can effectively predict the prognosis of ovarian cancer patients and are related to immune cell infiltration and immunotherapy efficacy. Preliminary evidence suggests that these genes play a pro-carcinogenic role in ovary cancer.

[Key words] ovarian cancer; angiogenesis; immunotherapy; prognosis; tumor microenvironment

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(8): 803-814. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.008]

卵巢癌是恶性程度最高的妇科肿瘤,由于早期症状隐匿,缺乏合适的诊断性生物标志物,80%的卵巢癌患者被诊断为晚期,5年生存率不足30%^[1-3]。诱导血管生成和免疫逃逸是癌症的两大标志,在癌症的发生发展中起着重要作用^[4]。ICON7和GOG0218两项具有里程碑意义的试验证实了抗血管生成治疗在卵巢癌中的抗肿瘤效果,但仍不能满足临床需求^[5-6]。免疫疗法的进步改写了很多瘤种的治疗格局^[7],但卵巢癌对免疫检查点抑制剂治疗不敏感^[8-9]。近年来,抗血管生成联合免疫治疗作为一种癌症治疗策略受到广泛关注^[10],在许多实体瘤中显示出较强的抗肿瘤作用^[11-12]。然而,血管生成相关的免疫特征在卵巢中的应用仍有待探索。随着基因芯片、高通量测序技术和相关生物信息学算法的进步,基于各种数据库的肿瘤相关基因及其调控机制分析是当前肿瘤基因组研究的重要组成部分。本研究首次利用卵巢癌相关公共数据库的数据和综合生物信息学方法,确定了血管生成相关的免疫基因(angiogenesis related immune gene, ARIG)在卵巢癌中的预后作用及其潜在的作用机制,并在卵巢癌组织和细胞中初步进行验证,为卵巢癌患者的预后评估和个体化治疗提供研究思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据资料

从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载卵巢癌的基因表达及转录组数据,其中354份卵巢癌样本具有完整的生存信息。从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE26712>)下载卵巢癌的基因表达、转录数据及临床数据,其中153个卵巢癌样本有相应的随访信息。从MSigDB数据库(<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>)中下载血管生成相关基因,从ImmPort数据库(<https://www.immport.org/home>)中收

集免疫相关基因。

1.2 ARIG的提取及差异分析

使用R软件对GSE26712数据集进行差异表达分析,筛选卵巢癌与正常组之间的差异表达基因。通过对血管生成相关基因和免疫相关基因进行Pearson相关性分析,生成了ARIG。将两者进行交集,筛选出差异表达的124个ARIG。通过GO和KEGG对这些基因进行富集分析,探索其潜在功能和途径。

1.3 预后风险模型的构建及评价

通过Lasso及Cox回归分析,构建预后风险模型。将TCGA数据集中354例患者以7:3随机划分为训练集($n=248$)和测试集($n=106$),将GSE26712数据集作为外部验证集($n=153$)。根据R包:glmnet,使用predict.glmnet函数,计算患者的风险评分,公式如下:

$$risk\ score = \sum_{i=1}^n (coef_i * expr_i)$$

[即 riskscore=sum(lasso 回归系数×基因表达量)],以风险评分的最佳阈值为分界点,将354例卵巢癌患者划分为高危和低危组。绘制Kaplan-Meier曲线、ROC曲线评估预后风险模型的预测能力。结合模型中的风险评分,分别采用单因素及多因素Cox回归分析来寻找卵巢癌患者的独立预后因素。

1.4 免疫相关分析

采用单样本基因集富集分析(single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)确定高、低风险组间的免疫细胞浸润情况,并通过Spearman相关分析显示差异免疫细胞与风险评分的相关性。通过肿瘤免疫功能障碍和排斥(tumor immune dysfunction and exclusion, TIDE)评分评价不同风险组卵巢癌患者的免疫治疗反应。

1.5 临床资料

收集河北医科大学第四医院2015年5月至2016

年5月手术的卵巢癌患者的肿瘤组织和输卵管组织85对。患者年龄为26~74岁,中位年龄为59岁。按照FIGO的分期标准:I/II期34例、II+IVA期51例。组织离体之后置于液氮中转运至-80℃冰箱保存。本研究方案经过河北医科大学第四医院医学伦理委员会批准(伦理批准号:2015KY317)。

1.6 细胞及生物制剂

人卵巢癌细胞A2780、SKOV3、OVCAR3、OV90和正常人卵巢上皮细胞IOSE80均购于普赛尔生命科技有限公司。DMEM培养基、胰蛋白酶购自武汉普诺赛生物公司,胎牛血清购自新西兰Ausbian公司, RNA提取试剂、逆转录试剂均购自上海翌圣生物科技股份有限公司,转染试剂Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司,Transwell小室购自美国康宁公司,干扰序列HSPA8-siRNA由苏州吉玛基因股份有限公司合成,引物由上海生物工程有限公司合成。

1.7 细胞培养及转染

A2780、SKOV3、OVCAR3、OV90和IOSE80细胞均用含有10%胎牛血清,100 U/ml青霉素和0.1 mg/L链霉素的DMEM培养基进行培养,放置于37℃、5% CO₂培养箱中。

取对数生长期细胞按照siRNA转染试剂盒说明书的步骤,将si-NC和si-HSPA8分别转染至SKOV3细胞,培养48 h进行后续实验。

1.8 qPCR法检测卵巢癌组织中ARIG的表达

通过TRIzol试剂提取组织RNA,用逆转录试剂盒进行逆转录,获得的cDNA作为模板进行扩增,5个ARIG引物序列见表1。反应条件:95℃ 5 min, 95℃ 15 s、59℃ 30 s、72℃ 30 s,共38个循环。以2^{-ΔΔCt}法计算ARIG mRNA的相对表达量。

表1 5个ARIG引物序列

基因	引物序列(5'-3')
PTGER3	正向:CAACCTTTTCTTCGCCTCTG
	反向:TTTCTGCTTCTCCGTGTGTG
SCTR	正向:GATGTCACCTACTGCGATGC
	反向:ACAAAAATGGCTGGAGAACC
IGHG1	正向:GCAGCCGGAGAACAACACTACA
	反向:TGGTTGTGCAGAGCCTCATG
HSPA8	正向:CACTTGGGTGGAGAAGATTTTG
	反向:CTGATGTCCTTCTTATGC
IGF2	正向:ATGGGGATCCCGATGAGGAAGC
	反向:TGGTGGCACCGCAGAATTACGA
GAPDH	正向:CCTGAGGGTTCTTTGTGCTGA
	反向:AAAGGCTCAACCTTCCCCAT

1.9 WB法检测卵巢癌组织中ARIG蛋白的表达

在卵巢癌和输卵管组织中分别加入细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,提取总蛋白。采用SDS-PAGE分离蛋白,将蛋白质转至PVDF膜;放入脱脂牛奶中在37℃温箱封闭60 min;加入一抗HSPA8(1:1 000)、IGF2(1:2 000)、IGHG1(1:1 000)、PTGER3(1:500)、SCTR(1:200)、GAPDH(1:2 500)抗体,4℃下处理过夜;TBST洗膜3次,每次10 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,置于摇床室温下处理60 min;TBST洗膜3次,每次10 min;滴加ECL发光液显影。

1.10 平板克隆法检测HSPA8表达对SKOV3细胞增殖能力的影响

将两组SKOV3细胞按照每孔1×10³个细胞的密度接种于6孔板中,置于培养箱中培养,待形成单个克隆集落细胞数目超过50个时即可终止培养,进行固定染色,并拍照进行结果分析。计算相对克隆数,以其代表细胞的克隆形成能力。相对克隆数=实验组克隆数÷对照组克隆数。

1.11 划痕愈合检测HSPA8表达对SKOV3细胞迁移能力的影响

将两组SKOV3细胞以每孔5.0×10⁵/mL个的密度接种到六孔板中,当细胞生长至80%汇合时,用无菌微量移液枪头在每孔的细胞上垂直划痕来制备划痕伤口,用无菌PBS冲洗细胞3次,将培养基更换为不含血清的培养基,分别于0 h和48 h在倒置显微镜下观察并拍照。

1.12 Transwell实验检测HSPA8表达对SKOV3细胞侵袭能力的影响

将两组SKOV3细胞按照每孔5×10⁴个细胞转移至Transwell小室的上室,在下室中加入600 μL DMEM培养基,培养24 h。PBS冲洗3次,加入1 mL 4%多聚甲醛固定20 min, PBS清洗3次后加入结晶紫染液1 mL,共反应15 min,用清水轻轻冲洗,晾干后在显微镜下进行观察,并随机选取5个视野进行拍照,统计穿膜细胞数。计算相对侵袭细胞数,以其代表细胞的侵袭能力。相对侵袭细胞数=实验组侵袭细胞数÷对照组侵袭细胞数。

1.13 统计学处理

生物信息分析均使用R语言进行(<https://www.r-project.org/>),采用Wilcoxon检验比较不同亚组间的差异。实验数据采用SPSS 22.0软件分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采取两独立样本t检验。以P<0.05或P<0.01表示差异有统计学意义。

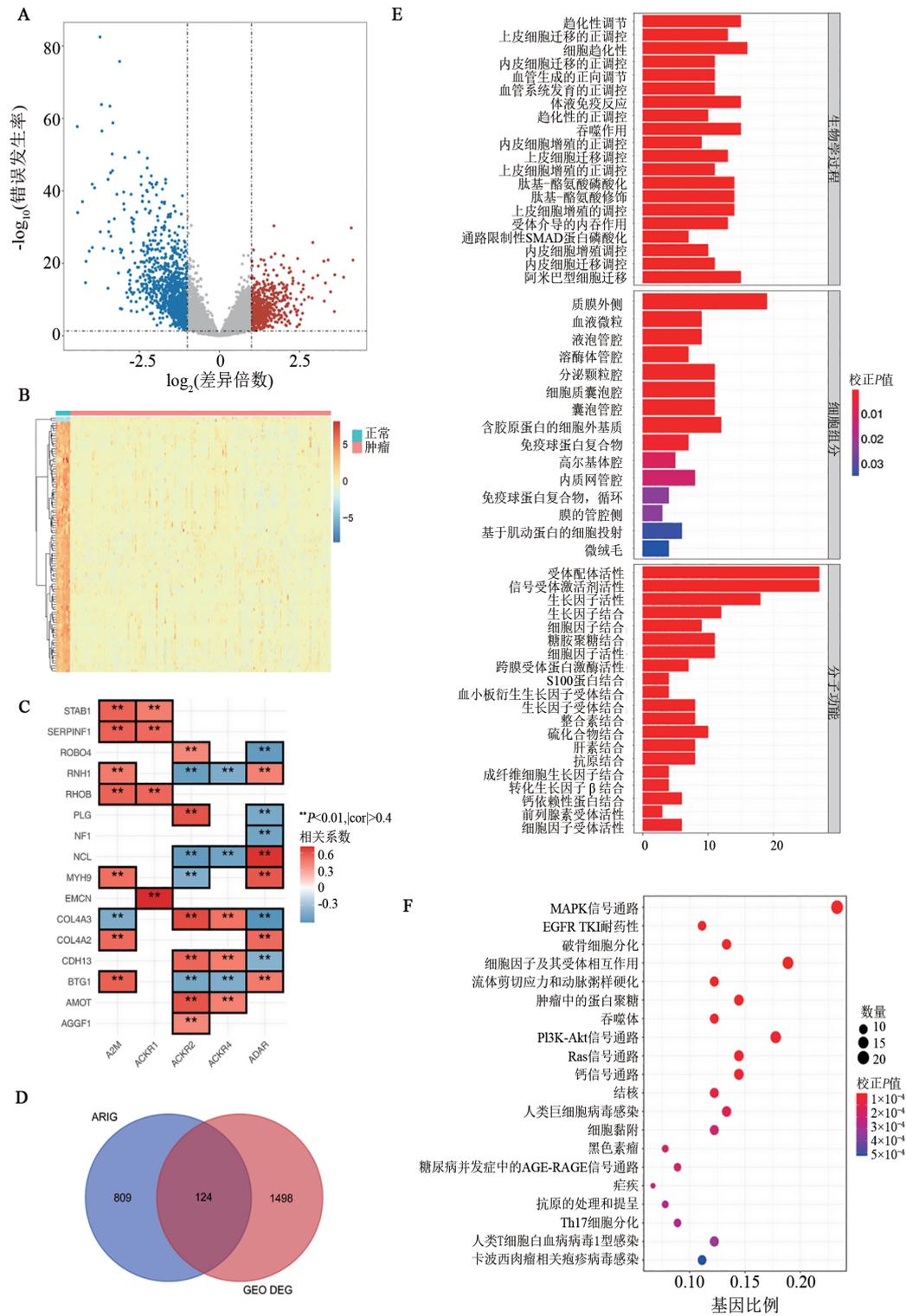
2 结果

2.1 124个差异表达的ARIG的鉴定

通过TCGA数据库筛选出1 622个差异表达的基

因,有589个基因上调,1033个基因下调(图1A、B)。利用Pearson相关系数鉴定血管生成相关基因与免疫相关基因之间的相关性,共筛选出933个ARIG ($P < 0.001$, $cor > 0.4$),通过与1622个差异表达的基因进行交叉重叠,最终确定124个差异表达的ARIG(图

1C、D)。功能富集分析表明,这些差异表达ARIG富集了781个GO功能,如受体配体活性、信号受体激活活性等(图1E),同时涉及78条KEGG通路,包括MAPK信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用等(图1F)。



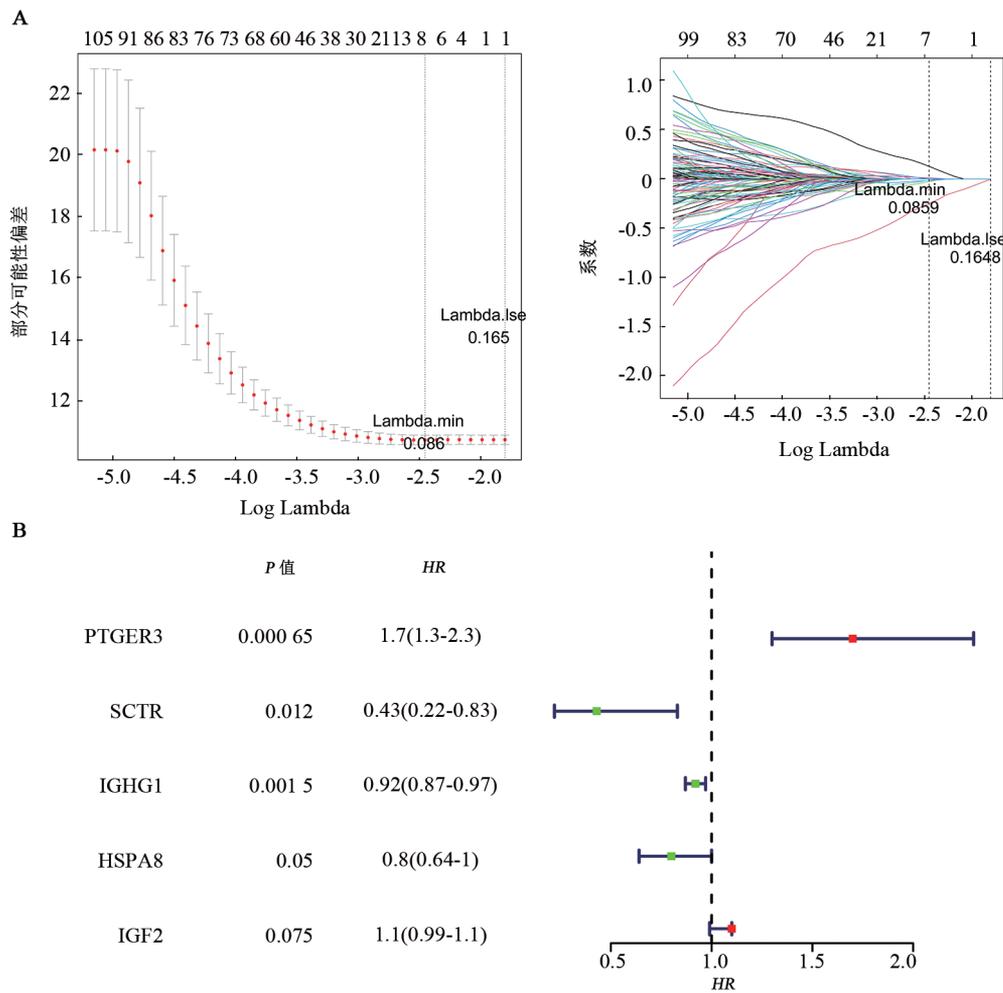
A: 卵巢癌中差异表达基因的火山图; B: 卵巢癌中差异表达基因的热图; C: ARIG的热图; D: 韦恩图; E: GO分析结果中前20个重要生物过程、细胞组分和分子功能; F: KEGG分析结果中前20个信号通路

图1 124个差异表达ARIG的鉴定

2.2 预后模型建立及评价

通过Lasso和多因素Cox回归分析,筛选出5个与生存相关的ARIG (PTGER3、SCTR、IGHG1、HSPA8和IGF2),构建了预后风险模型(图2A、B)。为了评估风险模型预后价值,通过5个基因的表达量,计算每个患者的风险值,根据风险值计算出最佳阈值(1.126 821)将患者分为高低风险两组(图3A)。通过Kaplan-Meier分析发现高危组患者预后更差(图

3B, $P < 0.000 1$)。通过绘制ROC曲线评估预测的准确性,5年时ROC曲线下面积(AUC)值达到0.7(图3C)。同样,测试组(图3D、E)和验证组(图3G、H)患者的生存存在两个风险组之间也存在显著差异(均 $P < 0.01$),预测5年生存的AUC值分别为0.608、0.712(图3F、I)。以上结果表明,构建的风险回归模型能够有效作为预后模型。



A:Lasso分析; B:多因素Cox分析。

图2 预后风险模型的建立

2.3 独立预后分析

通过单因素和多因素Cox统计分析,筛选独立预后因素,结果表明只有风险评分对生存预测具有独立预后价值(图4A、B)。构建风险模型与其他临床因素5年的生存率列线图及校正曲线,结果表明该风险模型能够较为准确的预测患者生存率(图4C、D)。接着用ROC曲线进一步验证了模型,结果显示AUC=0.701,同时,DCA曲线的结果也证实了校正曲线和ROC曲线的结果是可信的,以上结果表明该风险模型是可靠的(图4E、F)。

2.4 富集分析

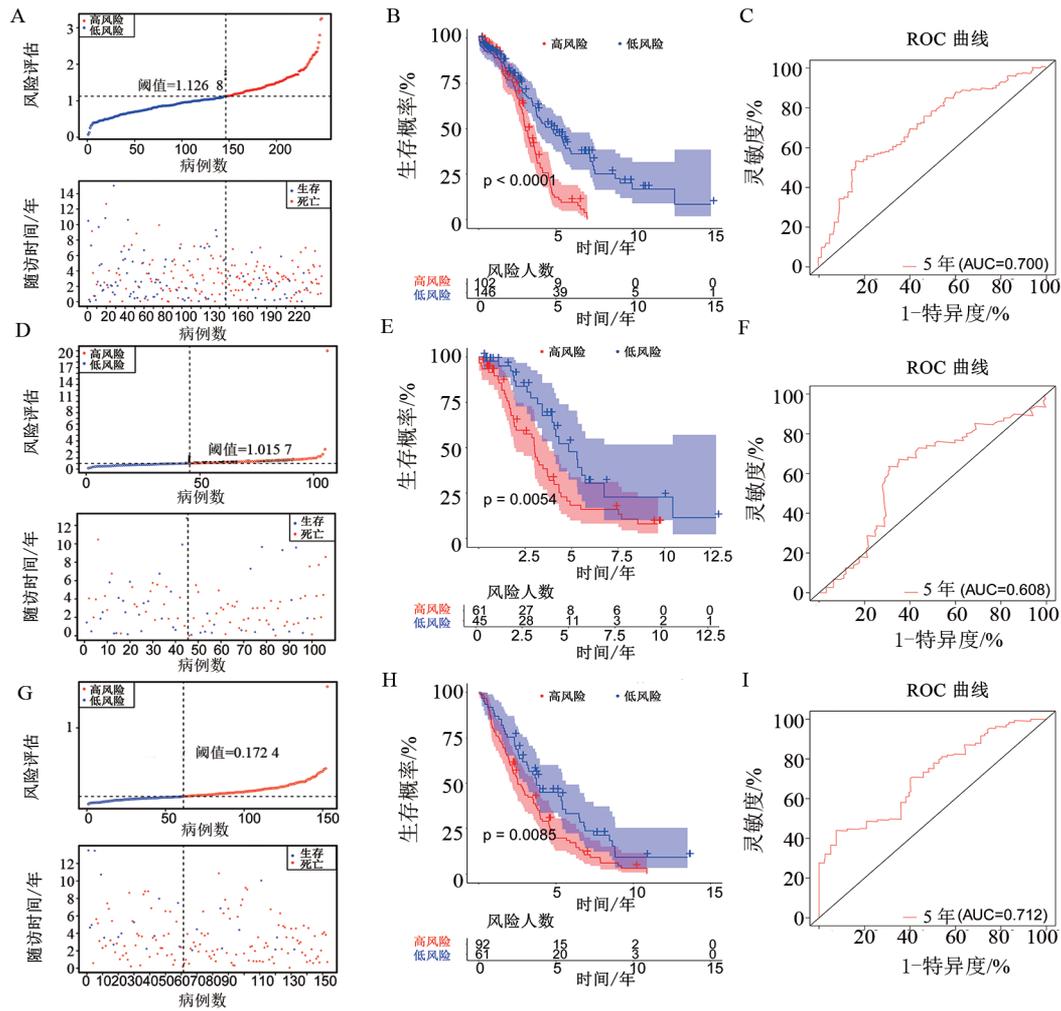
通过GSEA对数据集进行富集分析,设置的阈值为 $|NES| > 1$, $NOM P < 0.05$ 和 $q < 0.25$ 。一共富集到884条GO通路和31条KEGG通路,挑选了排在前10位的GO通路和KEGG通路对其进行可视化,如图5A、B所示,这些差异基因主要与B细胞介导的免疫应答、补体激活、抗原加工与递呈、细胞外基质中的细胞间接触等肿瘤微环境显著富集的通路相关。以上结果提示,免疫应答反应可能在卵巢癌进展中发挥了关键性的调控作用。这些结果可以帮助理解肿瘤

微环境的特点, 识别与肿瘤相关的关键生物学过程和信号通路。

2.5 预后风险模型与肿瘤微环境的关系

基于上述结果, 本研究进一步对高低风险组患者的肿瘤微环境特征进行分析, ssGSEA 分析结果发现, 活化的 B 细胞等 12 种免疫细胞的富集水平在两个风险组之间存在明显差异 (图 6A、B, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$), 其中活化的 B 淋巴细胞及 CD8⁺ T 淋巴细胞的富集水平与风险评分相关性较大, 低风险组两种细胞的富集水平更高, 提示低风险组患者从免

疫治疗中获益的可能性更大。ESTIMATE 分析发现, 低风险组的免疫评分明显高于高风险组 ($P < 0.05$, 图 6C), 提示低风险组人群预后更好。此外, 分析了一些关键免疫检查点分子的表达, 从免疫治疗应答的角度来看, 发现一共有 19 个分子在高低风险组之间存在明显差异 (图 6D)。其中在低风险组 CD27 和 TIGIT 表达水平明显高于高风险组, 提示低风险组可能对免疫治疗反应更显著。本研究进一步通过 TIDE 分析发现高风险组的 TIDE 评分高于低风险组 ($P < 0.05$, 图 6E), 高风险组人群在免疫治疗中获益的可能性更小。



A、D、G: 风险得分; B、E、H: 高/低危患者的 Kaplan-Meier 曲线; C、F、I: ROC 曲线显示构建模型预测的准确性。

图3 预后模型的验证

2.6 ARIG 在卵巢癌组织中高表达

通过 qPCR 和 WB 法检测了 5 个基因在卵巢癌组织中的表达水平, 结果显示, 这 5 种与生存相关的 ARIG 在卵巢癌组织中均高表达, 其中 HSPA8 的表达水平最高 (图 7、8, 均 $P < 0.01$)。

2.7 HSPA8 表达水平与临床病理特征的关系

为明确 HSPA8 在卵巢癌中的临床意义, 进一步分析肿瘤组织中 HSPA8 表达水平与患者临床病理特征的

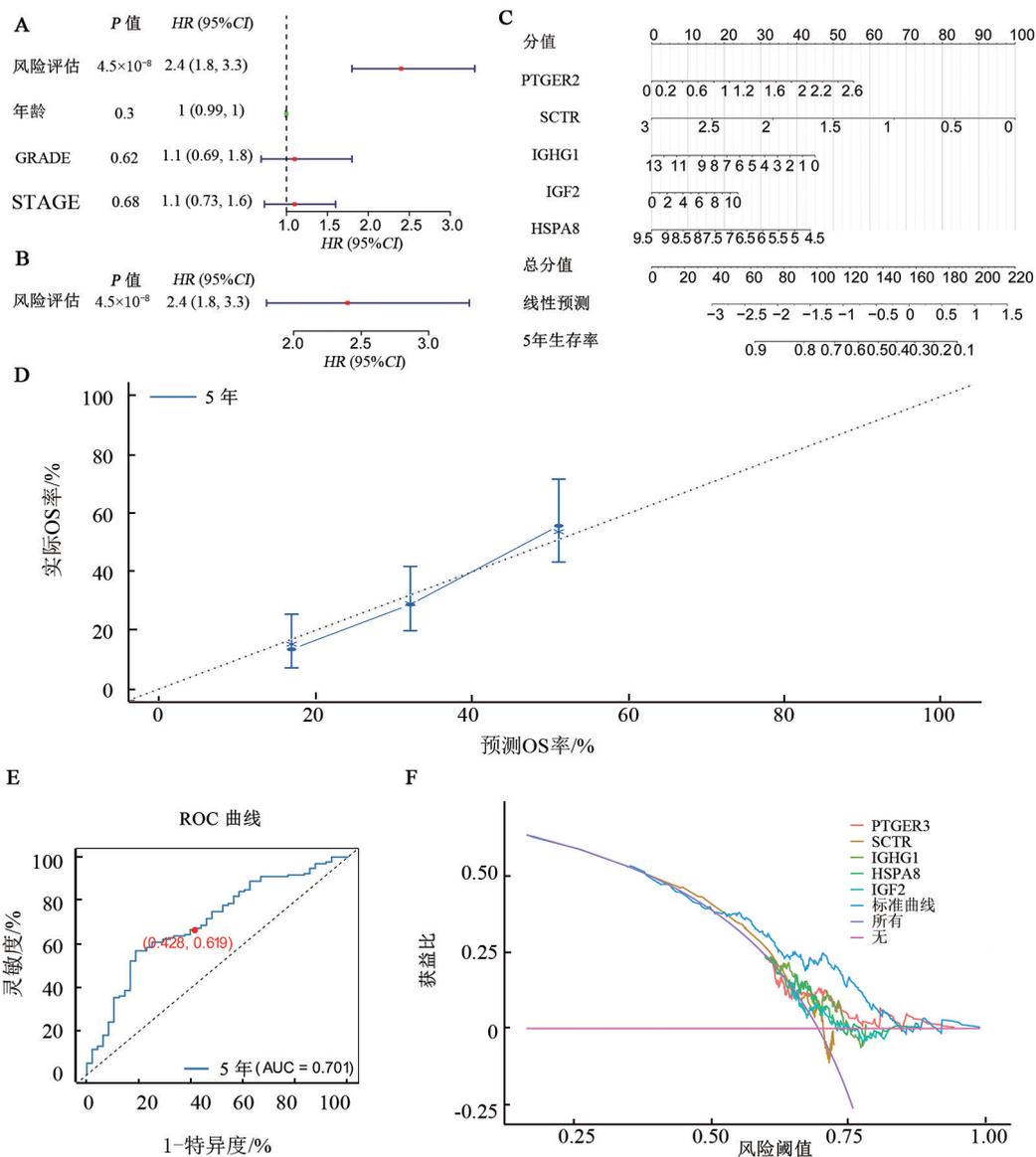
关系。结果显示, 高表达 HSPA8 与卵巢癌患者 FIGO 分期晚、组织分级差、淋巴结转移及腹膜转移呈显著正相关 ($P < 0.001$), 与年龄无关 ($P = 0.965$) (表 2)。这些结果提示 HSPA8 可能在卵巢癌的发生发展中起重要作用, 特别是与侵袭和转移有关。

2.8 敲低 HSPA8 可抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭

为了探讨 HSPA8 在卵巢癌中的生物学功能, 本研

究用qPCR首先在卵巢癌细胞检测HSPA8 mRNA的表达水平,结果发现HSPA8在卵巢癌细胞中高表达($P<0.01$,图9A),然后在SKOV3细胞中转染si-HSPA8建立HSPA8低表达细胞,结果显示,与si-NC组相比,si-HSPA8组HSPA8的表达水平显著下降($P<0.01$,图9B)。实验结果说明,本实验成功地在SKOV3细胞中敲低了HSPA8

mRNA的表达。通过平板克隆、划痕愈合及Transwell实验观察了敲低HSPA8对卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果显示,敲低HSPA8可明显抑制卵巢癌细胞增殖能力(图9C)、迁移能力(图9D)和侵袭能力(图9E)(均 $P<0.01$)。以上结果表明,敲低HSPA8可以抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭。



A:单因素Cox回归分析; B:多因素Cox回归分析; C:列线图预测生存率; D:列线图校正曲线; E:ROC曲线验证列线图; F:DAC曲线验证列线图。

图4 独立预后分析

3 讨论

在肿瘤的发生发展过程中,血管生成相关基因总是被激活,进而促进肿瘤生长^[13]。抗血管生成治疗广泛应用于临床实践,但其治疗效果差强人意。免疫逃逸在肿瘤生长、侵袭和转移的生物学行为中起着关键作用。肿瘤免疫治疗领域已经取得了巨大的

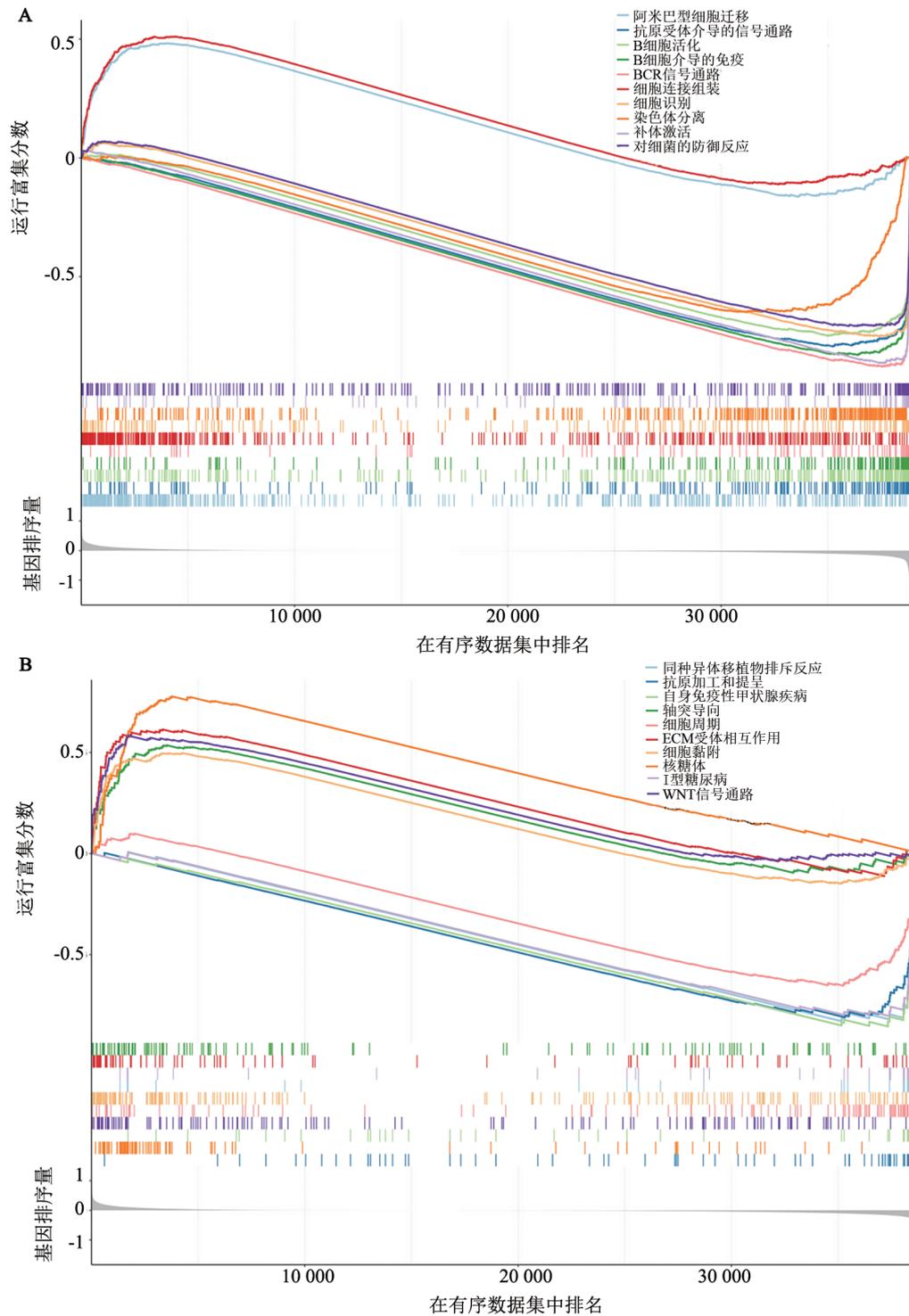
进步^[14-16],但其在卵巢癌患者中几乎没有临床获益^[8-9]。既往研究^[17-18]表明,血管生成相关基因是卵巢癌的潜在预后基因。然而,与免疫特征相关的血管生成基因是否能预测卵巢癌患者的预后和免疫治疗效果尚不清楚。

在本研究中,通过生信分析发现142个ARIG在卵巢癌中差异表达。然后,通过Lasso回归分析和

Cox 回归分析, 构建了一个基于 5 种 ARIG (PTGER3、SCTR、IGHG1、HSPA8 和 IGF2) 的预后风险模型。ROC 曲线和 Kaplan-Meier 生存分析表明, 该风险模型能有效预测卵巢癌的预后, 并且是卵巢

癌预后的独立预测因子。

许多研究表明, 诱导血管生成和免疫逃逸会通过多种信号通路影响卵巢癌的发生发展。本研究通过 GSEA 方法揭示了卵巢癌发生发展中潜在的 GO



A: 高低风险分组富集到的top10的KEGG通路; B: 高低风险分组富集到的top10的GO通路。

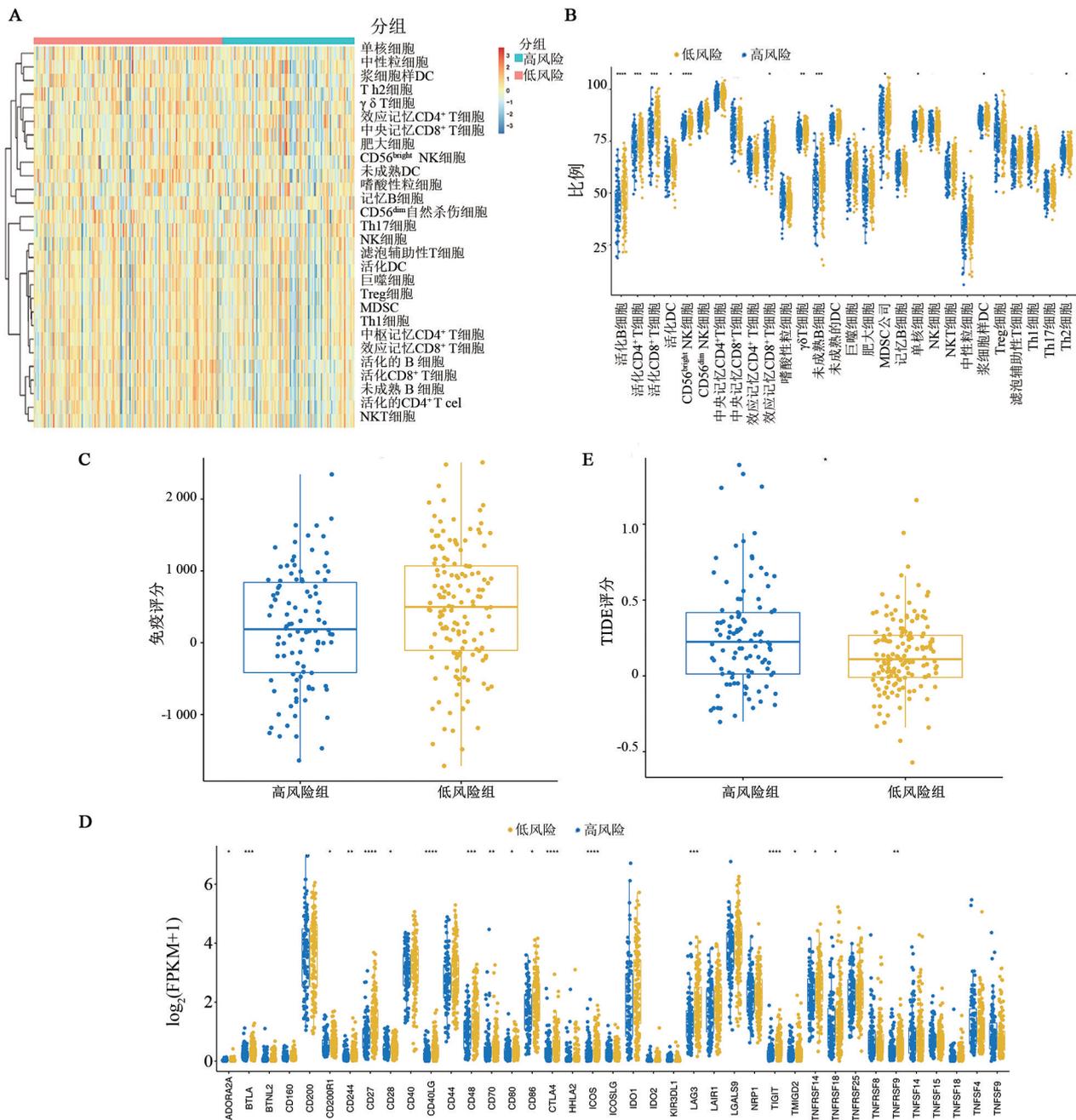
图5 富集分析

通路和KEGG通路水平的变化。结果表明, 这些差异基因主要与B细胞介导的免疫应答、补体激活、抗原加工与递呈、细胞外基质中的细胞间接触等肿瘤微环境通路相关。肿瘤微环境是一个高度结构化的生态系统,

包括多种免疫细胞、肿瘤相关的成纤维细胞、内皮细胞和细胞外基质等。其中B细胞是非常重要的适应性免疫细胞, 其介导的免疫应答是免疫系统识别和清除“非己”物质的过程; 补体系统是先天免疫系统的一部分,

补体被激活后可以通过吞噬及介导炎症反应来清除入侵的病原体;抗原加工与递呈是适应性免疫的基石,通过抗原递呈才能激活T细胞进而执行效应功能;肿瘤微环境形成的基本原理为肿瘤细胞与宿主细胞之间的相互通讯,微环境中有多种机制可以调节这种细胞间的

对话,包括细胞间接触和旁分泌信号传导^[9]。细胞外基质通过充当分泌分子的基质和细胞黏附、迁移的底物来促进细胞间通信,从而形成癌症中复杂的信号网络。因此GSEA富集分析的结果提示这些差异基因可能在肿瘤微环境中发挥了重要作用。



A: 免疫细胞在高低风险组中的热图; B: 免疫细胞在高低风险组中的箱线图; C: ESTIMATE 评分在高低风险组的箱线图; D: 免疫检查点在高低风险组中的箱线图; E: 免疫治疗效果在高低风险组中的箱线图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图6 免疫分析

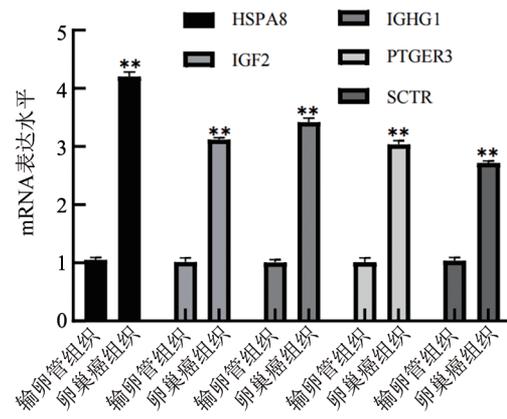
为了明确 ARIG 在肿瘤微环境中的作用,首先探讨了风险评分与免疫浸润的关系,结果表明 12 种免疫细胞的富集水平在高、低风险组之间存在差异,其中在低风险组中活化 B 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞的富集水平明显升高,提示低风险组可能在免疫治

疗中获益更大。同时研究了预后风险模型与免疫检查点分子之间的潜在相关性,发现有 19 个免疫检查点分子在高、低风险组之间表现出明显的差异。其中在低风险组 CD27 和 TIGIT 表达水平明显高于高风险组,CD27 与 CD70 结合后可产生细胞内信号促

进T淋巴细胞活化^[20]。TIGIT常与PD-L1显著共表达^[21],提示低风险组可能对免疫治疗反应更显著。还通过TIDE预测了免疫治疗的疗效,结果表明,高风险组人群的TIDE评分更高,提示高风险组免疫逃逸的可能性越高,在免疫治疗中的获益的可能性越小。

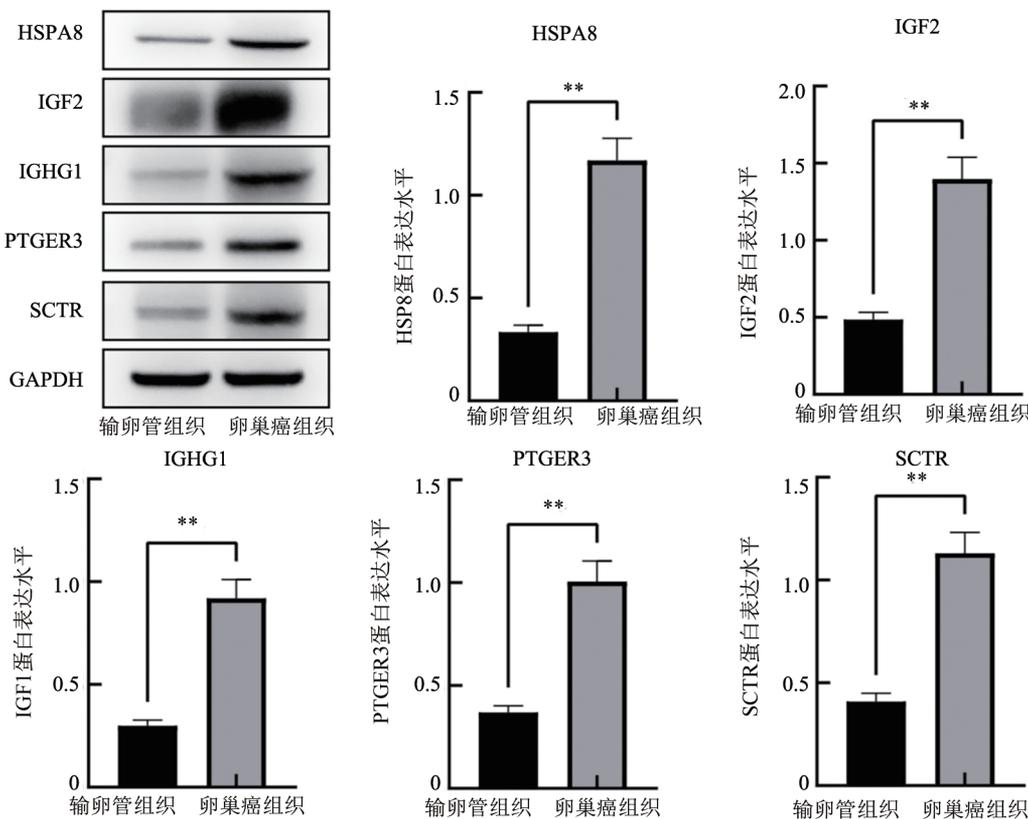
最后,在临床标本中验证了基于ARIG的预后模型。首先,通过qPCR和WB检测5个ARIG在卵巢癌组织中的表达水平,结果显示其在卵巢癌组织中均高表达。其中HSPA8的表达量最高,因此进一步分析了HSPA8表达与卵巢癌临床病理特征的相关性。发现HSPA8的表达水平与卵巢癌患者FIGO分期晚、组织学分级差、淋巴结转移及腹膜转移呈显著正相关。还通过体外细胞功能实验探讨了HSPA8在卵巢癌中的生物学功能。结果表明,HSPA8可促进卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭能力。以上结果说明HSPA8在卵巢癌的恶性进展过程中发挥了促癌作用。发现临床验证结果与生信分析中HSPA8、SCTR和IGHG1为保护性因素($HR < 1$)的结果不一致。HSPA8是热休克蛋白家族的伴侣基因,在多种癌症的发生发展中起到了促癌作用^[22-23];SCTR已被证明是胃肠道肿瘤预后不良的生物标志物和潜在的治疗靶点^[24-25];有研究表明IGHG1高表达与卵巢癌患者预后不良密切相关,可能通过促进EMT进程发挥了促癌作用^[26-27]。既往研究结果与本研究临床验证结果不一

致,考虑可能的因素有临床样本特征差异,可能由于临床验证的样本中可能纳入了更多高危患者如期别更晚、病理组织学分级更差的患者;分子生物学特征差异,可能HSPA8、SCTR和IGHG1在不同的病理阶段或不同的微环境中扮演的角色有所不同,从而导致实验结果不一致。在未来,将从样本特征差异、方法学差异和生物学因素对其进行解释,然后提出进一步的验证计划,包括增加样本量、采用更精细的分析方法以及进行生物学实验验证等,以确认这些基因在卵巢癌发生发展中的作用及其与预后的关系。



与输卵管组织相比,** $P < 0.01$ 。

图7 qPCR法检测ARIG mRNA在卵巢癌组织中的表达

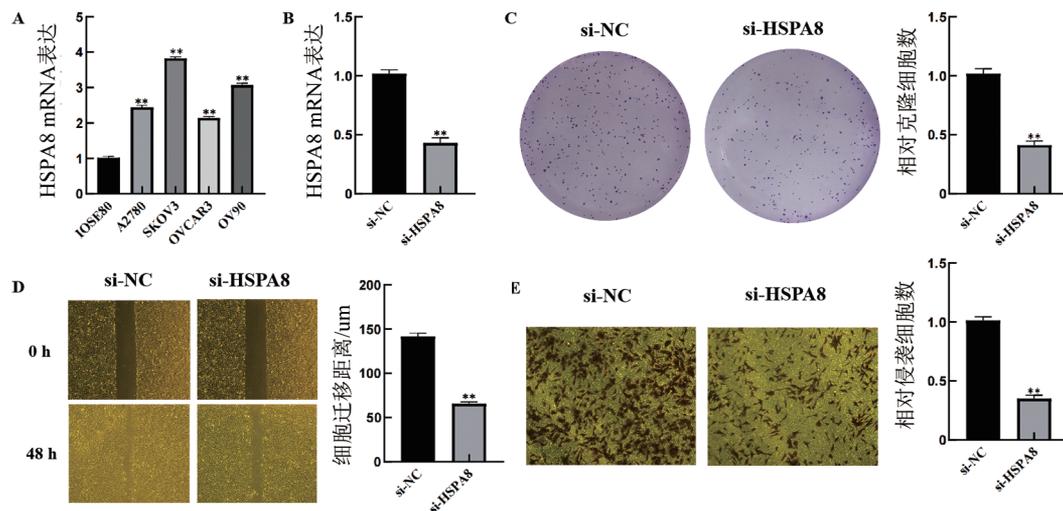


** $P < 0.01$ 。

图8 WB法检测ARIG蛋白在卵巢癌组织和输卵管组织中的表达

表2 HSPA8表达水平与卵巢癌临床病理特征的关系

病理特征	例数(N)	HSPA8高表达(n)	HSPA8低表达(n)	χ^2	P
年龄				0.002	0.965
≤50	21	14	7		
>50	64	43	21		
FIGO分期				30.899	<0.001
I+II	34	11	23		
III+IV	51	46	5		
分化程度				11.739	0.001
中高分化	25	10	15		
低分化	60	47	13		
淋巴结转移				25.326	<0.001
阳性	48	43	5		
阴性	37	14	23		
腹膜转移				25.884	<0.001
阳性	51	45	6		
阴性	34	12	22		



A: qPCR法检测卵巢癌细胞中HSPA8的表达水平; B: qPCR法检测SKOV3细胞中敲低HSPA8的效率; C: 平板克隆形成实验敲低HSPA8对检测SKOV3细胞的增殖能力的影响; D: 划痕愈合实验检测敲低HSPA8对SKOV3细胞的迁移能力的影响($\times 40$); E: Transwell实验检测敲低HSPA8对SKOV3细胞的侵袭能力的影响(结晶紫染色, $\times 200$)。与IOSE80细胞或si-NC组相比, $**P < 0.01$ 。

图9 HSPA8 mRNA在正常卵巢上皮细胞和卵巢癌细胞中的表达以及敲低HSPA8对SKOV3细胞迁移、增殖、侵袭的影响

综上所述,本研究对ARIG的综合分析成功证明了其在卵巢癌患者的预后、临床特征、肿瘤微环境及免疫治疗效果等方面的价值。然而,本研究有一定的局限性,结论主要基于对公共数据库数据的分析,缺乏深入的临床验证。在未来将进一步探索和验证这些基因的潜在机制,为卵巢癌患者的个体化治疗和临床决策提供依据。

【参考文献】

[1] WEBB P M, JORDAN S J. Global epidemiology of epithelial ovarian cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2024, 21: 389-400. DOI: 10.1038/s41571-024-00881-3.

[2] VENEZIANI A C, GONZALEZ-OCCHOA E, ALQAISI H, et al. Heterogeneity and treatment landscape of ovarian carcinoma[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20: 820-842. DOI: 10.1038/s41571-023-00819-1.

[3] MOMENIMOVAHED Z, TIZNOBAIK A, TAHERI S, et al. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors[J]. Int J Womens Health, 2019, 11: 287-299. DOI: 10.2147/IJWH.S197604.

[4] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

[5] PERREN T J, SWART A M, PFISTERER J, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer[J]. N Engl J Med, 2011, 365(26): 2484-2496. DOI: 10.1056/NEJMoa1103799.

[6] BURGER R A, BRADY M F, BOOKMAN M A, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer[J]. N

- Engl J Med, 2011, 365(26): 2473-2483. DOI: 10.1056/NEJMoa1104390.
- [7] KELLY P N. The cancer immunotherapy revolution[J]. Science, 2018, 359(6382): 1344-1345. DOI: 10.1126/science.359.6382.1344.
- [8] HAMANISHI J, MANDAI M, IKEDA T, *et al.* Safety and antitumor activity of anti-PD-1 antibody, nivolumab, in patients with platinum-resistant ovarian cancer[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(34): 4015-4022. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.3397.
- [9] MATULONIS U A, SHAPIRA-FROMMER R, SANTIN A D, *et al.* Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study[J]. Ann Oncol, 2019, 30(7): 1080-1087. DOI: 10.1093/annonc/mdz135.
- [10] KUO H Y, KHAN K A, KERBEL R S. Antiangiogenic-immune-checkpoint inhibitor combinations: lessons from phase III clinical trials[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2024, 21(6): 468-482. DOI: 10.1038/s41571-024-00886-y.
- [11] REN S J, XIONG X X, YOU H, *et al.* The combination of immune checkpoint blockade and angiogenesis inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer[J/OL]. Front Immunol, 2021, 12: 689132[2024-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8206805/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.689132.
- [12] GALLE P R, FINN R S, QIN S K, *et al.* Patient-reported outcomes with atezolizumab plus bevacizumab versus sorafenib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (IMbrave150): an open-label, randomised, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2021, 22(7): 991-1001. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00151-0.
- [13] HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- [14] MOK T S K, WU Y L, KUDABA I, *et al.* Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2019, 393(10183): 1819-1830. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32409-7.
- [15] EGGERMONT A M M, BLANK C U, MANDALA M, *et al.* Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma[J]. N Engl J Med, 2018, 378(19): 1789-1801. DOI: 10.1056/NEJMoa1802357.
- [16] ANDRÉ T, SHIU K K, KIM T W, *et al.* Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 383(23): 2207-2218. DOI: 10.1056/NEJMoa2017699.
- [17] WANG Y, LI B X, LI X. Identification and validation of angiogenesis-related gene expression for predicting prognosis in patients with ovarian cancer[J/OL]. Front Oncol, 2022, 11: 783666 [2024-08-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35047401/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.783666.
- [18] TANG H X, SHAN J S, LIU J, *et al.* Molecular subtypes, clinical significance, and tumor immune landscape of angiogenesis-related genes in ovarian cancer[J/OL]. Front Oncol, 2022, 12: 995929 [2024-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9464911/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.995929.
- [19] DE VISSER K E, JOYCE J A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth[J]. Cancer Cell, 2023, 41(3): 374-403. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.02.016.
- [20] GRIMSHOLM O. CD27 on human memory B cells-more than just a surface marker[J]. Clin Exp Immunol, 2023, 213(2): 164-172. DOI: 10.1093/cei/uxac114.
- [21] JOLLER N, ANDERSON A C, KUCHROO V K. LAG-3, TIM-3, and TIGIT: Distinct functions in immune regulation[J]. Immunity, 2024, 57(2): 206-222. DOI: 10.1016/j.immuni.2024.01.010.
- [22] URQUHART K R, ZHAO Y H, BAKER J A, *et al.* A novel heat shock protein alpha 8 (Hspa8) molecular network mediating responses to stress- and ethanol-related behaviors[J]. Neurogenetics, 2016, 17(2): 91-105. DOI: 10.1007/s10048-015-0470-0.
- [23] YING B C, XU W T, NIE Y, *et al.* HSPA8 is a new biomarker of triple negative breast cancer related to prognosis and immune infiltration[J/OL]. Dis Markers, 2022, 2022: 8446857[2024-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9705114/>. DOI: 10.1155/2022/8446857.
- [24] KLUSSMEIER A, AURICH S, NIEDERSTADT L, *et al.* Secretin receptor as a target in gastrointestinal cancer: expression analysis and ligand development[J/OL]. Biomedicines, 2022, 10(3): 536 [2024-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8944975/>. DOI: 10.3390/biomedicines10030536.
- [25] LI D P, ZHANG L, FU J M, *et al.* SCTR hypermethylation is a diagnostic biomarker in colorectal cancer[J]. Cancer Sci, 2020, 111(12): 4558-4566. DOI: 10.1111/cas.14661.
- [26] JI F X, CHANG X H, LIU C Y, *et al.* Prognostic value and characterization of the ovarian cancer-specific antigen CA166-9[J]. Int J Oncol, 2015, 47(4): 1405-1415. DOI: 10.3892/ijo.2015.3115.
- [27] QIAN J F, JI F X, YE X, *et al.* IGHG1 promotes motility likely through epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(2): 282-290. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2018.02.11.

[收稿日期] 2024-05-05

[修回日期] 2024-08-13

[本文编辑] 黄静怡