

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.03.008

· 临床研究 ·

基于 GINS 家族成员在胶质瘤组织中的表达水平对其进行分型及其临床意义

廖永珍¹, 梁禄², 李意², 丛丽² (1. 顺德职业技术学院 医药卫生学院 临床与药学教研室, 广东 佛山 528333;
2. 湖南师范大学 医学院 基础医学系, 湖南 长沙 410013)

[摘要] **目的:** 基于 GINS 家族成员在胶质瘤组织中表达水平对其分型, 探究此分型预测胶质瘤患者的预后、免疫治疗疗效的有效性, 采用 TCMOI 数据库虚拟筛选可靶向 GINS 的中药小分子。 **方法:** 数据库分析 GINS 基因组学、胶质瘤组织中差异表达基因与患者预后的关系, 基于 GINS 家族成员基因表达对胶质瘤进行分型并分析各亚型的预后情况, 数据库数据分析各亚型中的基因突变、基因富集、肿瘤纯度和免疫细胞浸润评分, 以及与 GINS2 可能相互作用的中药小分子, 最后用 qPCR 法检测中国人胶质瘤组织中 GINS1~4 mRNA 的表达水平以验证其与数据库数据的一致性。 **结果:** GINS 家族各成员间的基因、蛋白结构和功能相似, 胶质瘤组织中 GINS 家族成员呈高表达且与患者不良预后密切相关 ($P < 0.05$), 基于 GINS 家族成员在胶质瘤组织中表达水平的 S1、S2 亚型分类能较好地预测胶质瘤患者的预后, S1 亚型主要突变基因为 CDKN2A/B、EGFR、PTEN 而 S2 亚型的突变基因为 IDH1、TP53 和 ATRX, GINS 家族可能通过调控免疫微环境影响胶质瘤患者预后, CD276 和 CX3CL1 可能是 S1 亚型胶质瘤患者实施免疫治疗的潜在靶点, ChEMBL66033、266935、293914、436859、1594881 可能是潜在的靶向 GINS2 的中药小分子。 **结论:** 基于 GINS 家族构建的胶质瘤分子分型有助于识别更适合免疫治疗的高风险患者, 筛选出的中药小分子可为胶质瘤患者分子靶向治疗和免疫治疗提供参考。

[关键词] 胶质瘤; GINS 家族; 分子分型; 预后; 分子对接; 中药

[中图分类号] R739.41; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)03-0261-10

Classification of GINS family members based on their expression levels in glioma tissues and its clinical significance

LIAO Yongzhen¹, LIANG Lu², LI Yi², CONG Li² (1. Department of Clinical and Pharmaceutical, School of Medicine & Health Care, Shunde Polytechnic, Foshan 528300, Guangdong, China; 2. Department of Basic Medicine, School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha, 410013 Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** The classification of GINS family members based on their expression level in glioma tissue was explored to predict the prognosis of glioma patients, the efficacy of immunotherapy and the small molecules of traditional Chinese medicine. **Methods:** The database analyzed the relationship between GINS genomics, differentially expressed genes in glioma tissue and patient prognosis. Classification of gliomas based on gene expression of GINS family members and analysis of the prognosis of each subtype. Database data was analyzed for mutations, gene enrichment, tumor purity and immune cell infiltration scores for each subtype, as well as for Chinese traditional medicine small molecules that may interact with GINS2. Finally, the expression levels of GINS1~4 mRNA in Chinese human glioma tissues were detected by qPCR to verify their consistency with the database data. **Results:** GINS family members share similarities in gene, protein structure and function. Furthermore, they are highly expressed in glioma tissues and are strongly associated with poor patient prognosis ($P < 0.05$). The classification of S1 and S2 subtypes based on the expression level of GINS family members in glioma tissue can better predict the prognosis of glioma patients. The main mutant genes of the S1 subtype are CDKN2A/B, EGFR and PTEN, while the mutant genes of the S2 subtype are IDH1, TP53 and ATRX. In addition, GINS family may affect the prognosis of glioma patients by regulating the immune microenvironment. CD276, and CX3CL1 may be potential targets for immunotherapy in patients with S1 subtype glioma. ChEMBL66033, 266935, 293914, 436859 and 1594881 May be the potential Chinese medicine small molecules targeting GINS2. **Conclusion:** The molecular typing of glioma constructed based on GINS family helps identify high-risk patients more suitable for immunotherapy, and the selected traditional Chinese medicine small molecules can provide a reference for molecular targeted therapy and immunotherapy for glioma patients.

[Key words] glioma; GINS family; molecular typing; prognosis; molecular docking; traditional chinese medicine

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(3): 261-270. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.03.008]

[基金项目] 湖南省自然科学基金(No. 2023JJ30425); 湖南省卫生健康委科研课题(No. 202103011683)

[作者简介] 廖永珍(1982—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事疾病预后相关数据的分析。E-mail: 76647611@qq.com

[通信作者] 丛丽, E-mail: congli@hunnu.edu.cn

胶质瘤是中枢神经系统(central nervous system, CNS)最常见的原发性脑肿瘤,具有生存期短、病死率高的特点^[1]。胶质瘤组织病理学分类主要包括胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤等^[2],这种传统组织学分类方式由于其异质性容易影响诊断,且临床信息和组织学类型一致的胶质瘤患者仍存在预后差异,原因尚未完全阐明^[3-4]。为推进胶质瘤临床诊断与治疗,WHO的CNS肿瘤分类一直在更新不同亚型的分子生物标志物^[5-6]。蛋白质 GINS 是真核细胞复制复合体 Cdc45-MCM-GINS 的重要组成部分,GINS 基因家族成员(GINS1~4)组成四聚体与 DNA 结合并参与 DNA 复制的起始和延伸^[7-8]。研究^[9]显示,GINS1 可通过泛素特异性蛋白酶 15 介导的拓扑异构酶 2A 蛋白去泛素化,促进胶质瘤细胞的增殖和迁移;GINS2 可能通过影响细胞周期促进胶质瘤细胞增殖及致癌性^[10];而 GINS4 可能通过 JAK/STAT 信号通路参与胶质瘤发生发展^[11]。由此可见,基于 GINS 家族研究胶质瘤患者预后分型及个体化诊治具有重要的临床意义。本研究基于 TCGA 和 CGGA 胶质瘤数据,通过分析 GINS 家族成员的基因表达谱对胶质瘤患者进行分子分型,探索其预后差异和潜在机制,并筛选中药小分子,以期为胶质瘤患者临床靶向治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据库数据分析 GINS 的基因组学

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 GINS 基因家族序列文件,通过 MEGA 7.0 软件(<https://www.megasoftware.net/>),采用邻接法构建系统进化树,观察 GINS 家族基因在不同物种间的进化差异。GSDS 2.0 网站(<http://gsds.gao-lab.org/index.php>)导入 GINS 家族基因区和编码区序列,绘制基因结构图。用 MEME 5.5.3 软件(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)在线分析 GINS 蛋白保守基序(鉴定数设为 10 个)。导入 GINS 家族基因组序列和相关注释文件,Gene Structure View 工具可视化保守基因序列和保守结构域。

1.2 数据库数据分析胶质瘤差异表达基因与患者预后的关系

从 TCGA (<https://cancerge-nome.nih.gov/>) 和 CGGA 数据库(<http://www.cgga.org.cn/>)下载胶质瘤患者数据,剔除缺失生存资料和临床信息的病例后,分别获得 691 例和 590 例胶质瘤样本。其中,TCGA-691 作为训练队列,CGGA-590 作为验证队列。用 ggplot2 R 语言包绘制 GINS 家族在正常脑组织和胶质瘤组织中的差异表达基因的箱线图,用“beanplot”

包绘制 GINS 家族在低级别胶质瘤(low-grade glioma, LGG)和 GBM 中差异表达基因的豆荚图。单/多因素 COX 回归分析和 Kaplan-Meier(KM)分析探究 GINS 家族基因与胶质瘤患者预后的关系。人类蛋白质图谱数据库(The Human Protein Atlas, HPA)包含不同正常人体组织和不同癌症组织的蛋白质表达图谱,用于检索 GINS 家族蛋白在人正常脑组织和胶质瘤组织中的表达情况。

1.3 根据胶质瘤组织中差异表达基因对其分型并分析各亚型患者的预后情况

一致性聚类分析常用于对癌症进行亚型分类,可依据基因功能不同将其划分为不同的聚类模块。使用 R 软件包“ConsensusClusterPlus”对训练队列 GINS 家族基因表达矩阵进行无监督聚类,获得胶质瘤患者亚型。随后,通过“ropis”包对亚型实施降维并评估分类效果,“survival”包绘制 KM 生存曲线评价患者亚型间的生存差异。

1.4 数据库数据分析各亚型基因突变情况

肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)指特定基因组区域内体细胞非同义突变的个数,通常用每兆碱基突变数(mut/Mb)表示^[12]。cBioPortal 数据库(<http://www.cbioportal.org/>)是一个整合了 TCGA、ICGC 等癌症基因数据和临床数据的公共数据库。通过 cBioPortal 数据库对不同预后亚型胶质瘤患者进行 TMB 评估和基因突变分析。

1.5 数据库数据分析各亚型的基因富集情况

基因本体论(Gene Ontology, GO)用于进行基因功能分类,包括生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3 个组成部分,京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析用于注释基因所在通路。使用“limma”包获得亚型差异表达基因,通过“clusterProfiler”包进行 GO 分析,Cytoscape 3.9.1 软件的 Clue GO 工具进行 KEGG 分析,“gsea”R 软件包进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)发现高风险亚型的富集基因集。

1.6 数据库数据分析各亚型的肿瘤纯度评分和免疫评分

利用“estimate”包评估不同亚型的肿瘤纯度和免疫评分,“cibersort”计算 22 种免疫细胞丰度,“easier”包计算免疫治疗响应评分^[13],NanoString PanCancer IO 360 Panel 获取肿瘤发炎指数^[14]。GINS 家族表达矩阵与免疫检查点的相关性热图由“linkET”R 包绘制,GINS 家族与 CD276、CX3CL1 基因表达的相关性散点图由“ggstatsplot”执行。

1.7 数据库数据分析可能与 GINS2 蛋白结合的中药小分子

从中医免疫肿瘤学综合数据库 (Traditional Chinese Medicine on Immuno-Oncology, TCMIO, <http://tcmio.xielab.net>) 获取 126 972 个针对免疫肿瘤学靶点的中药小分子配体^[15], 从蛋白质数据库 (The Universal Protein Resource, UniProt; <https://www.uniprot.org/>) 下载 GINS2 蛋白结构。分别将中药小分子配体和 GINS2 导入 Autodock Vina 1.2.2 进行分子对接, 通过预测结合能评估分子结合的可靠性, 并利用 PyMOL 4.6.0 软件进行 3D 可视化呈现。

1.8 qPCR 法检测中国人胶质瘤组织中 GINS1~4

mRNA 表达

用 TRIzol 试剂 (货号: R401-01, 诺唯赞, 南京) 提取胶质瘤组织总 RNA, 经测定浓度和纯度后, 按照 HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒 (货号: MR05101M, 莫纳生物, 苏州) 说明书将其逆转录为 cDNA, 用 AceQ® qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒 (货号: MQ00401S, 莫纳生物, 苏州) 进行 qPCR。PCR 反应参数: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。以 β -action 为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。每种样品设置 3 个复管。引物序列见表 1。

表1 qPCR 引物

基因名称	正向序列 (5'~3')	反向序列 (5'~3')
β -actin	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
GINS1	GCAAAGTCAGGTGGACGAAGTG	CTGATCCGAAGCAAGCGGTCAT
GINS2	AGCCAAACTCCGAGTGTCTGCT	CTTGTGTGAGGAAAGTCCCGCT
GINS3	GCTCCTGCATTTTGACAGTCCC	TCCATCTCGTCTAGCCTGGCTA
GINS4	CTGGAGAGCAAGCCTGAGATTG	GCAAGTAGCTGCTGAGGACGTA

1.9 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。数据统计和可视化均使用 RStudio 4.2.2。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 Wilcoxon 检验和 t 检验, Mantel 分析用于观察两个矩阵之间的相关性分析, Spearman 用于分析两个变量的相关性。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GINS 家族成员间的基因、蛋白结构和功能相似

系统进化树呈现了 GINS 家族在人、鼠、鸡、斑马鱼、非洲蟾蜍、果蝇、酵母七个物种中的进化情况, 发现人类基因 GINS2 的进化分支长度最短, 提示其变异程度最小、保守性最高 (图 1A)。GINS1 位于 20 号染色体, GINS2 和 GINS3 位于 16 号染色体, GINS4 位于 8 号染色体。进一步分析 GINS 家族编码区/非编码区 (图 1B)、保守基因序列 (图 1C) 和保守结构域 (图 1D) 分布发现, 该家族有着极其相似的基因结构和蛋白结构。由此推测 GINS 家族可能在肿瘤发生发展过程中发挥相似功能。

2.2 胶质瘤组织中 GINS 家族成员呈高表达且与患者不良预后密切相关

为探索 GINS 家族对胶质瘤患者预后的影响, 首先使用 TCGA 数据库和 GTEx 数据库比较其在正常脑组织和胶质瘤组织以及 LGG 和 GBM 的表达差异。

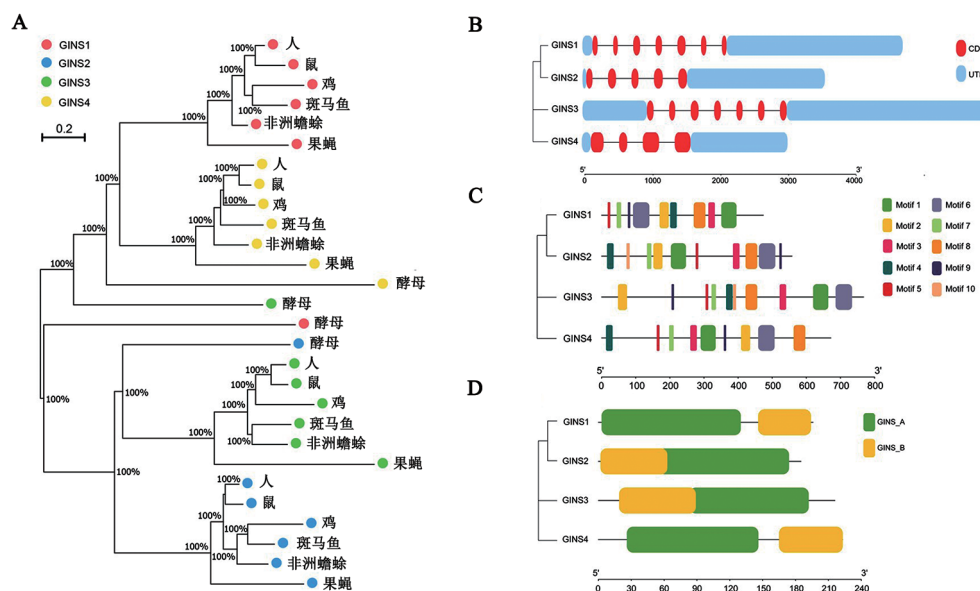
结果显示, GINS 家族成员均在胶质瘤中均呈高表达 (图 2A, $P < 0.001$), 且 GBM 中的表达均明显高于 LGG (图 2B, 均 $P < 0.000 1$)。qPCR 法检测 9 对中国人胶质瘤组织和配对正常脑组织样本, 结果 (图 2C) 显示, 胶质瘤组织中 GINS1 和 GINS2 mRNA 表达水平明显高于正常脑组织 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 验证了数据库数据与中国人胶质瘤组织检测结果的一致性。单因素 COX 回归和 KM 生存分析发现, GINS 家族成员在胶质瘤中均为风险基因 (图 2D, $HR > 1$, $P < 0.05$), 且家族成员高表达组患者总生存期均明显低于低表达组患者 (图 2E, $P < 0.05$)。此外, 通过 HPA 获得 GINS 家族蛋白在正常脑组织和胶质瘤中的免疫组织化学染色, 结果显示 GINS1、GINS2、GINS4 在胶质瘤组织中的染色呈强阳性, 而在正常脑组织中的染色明显较弱, GINS3 在胶质瘤组织中的染色也略强于正常脑组织 (图 2F)。分析结果提示, GINS 家族高表达与胶质瘤患者预后不良具有密切联系, 基于 GINS 家族基因表达的分子分型有望用于指导胶质瘤患者生存预后及临床治疗。

2.3 基于 GINS 家族成员中胶质瘤组织中表达水平的 S1、S2 亚型分类能较好地预测胶质瘤患者的预后

为进一步探讨 GINS 家族对胶质瘤患者临床预后的指导意义, 将患者年龄、性别、肿瘤分级和 GINS 家族基因表达纳入多因素 COX 回归分析。如图 3A 所示, GINS2、GINS4 和肿瘤类型是胶质瘤患者预后

的独立风险因素($HR>1$, $P<0.05$)。随后,使用TCGA-691胶质瘤患者GINS家族成员的基因表达谱,通过一致性聚类分析成功将患者分为S1、S2两个亚型(图3B),其中S1亚型有417位胶质瘤患者,S2亚型有274位胶质瘤患者。偏最小二乘回归分析法(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)显示, $Q^2Y>0.5$,说明该亚型分类具有差异(图3C),

KM生存曲线分析表明S1亚型患者较S2亚型患者预后更差(图3D)。此外,对CGGA-590进行聚类、回归和生存分析,发现训练队列结果在外部队列得以验证(图3E、F、G)。上述结果说明,基于GINS家族成员中胶质瘤组织中表达水平的S1、S2亚型分类能较好地预测胶质瘤患者的预后。



A: GINS家族系统发育树; B: GINS家族基因结构; C: GINS家族的保守基因序列; D: GINS家族的保守结构域。

图1 基因组学分析GINS家族背景

2.4 S1亚型突变基因为CDKN2A/B、EGFR、PTEN而S2亚型的突变基因为IDH1、TP53和ATRX

为探讨影响不同亚型胶质瘤患者生存预后差异的可能原因,使用cBioPortal在线数据库对S1、S2亚型患者的突变情况进行分析。结果显示,S1亚型较S2亚型的肿瘤突变负荷更高(图4A),基因突变数更多(图4B)。进一步分析结果显示,S1亚型常见的突变基因有CDKN2A/B^[16]、EGFR^[17]、PTEN^[18]等与胶质瘤预后不良密切相关的标志物,而S2亚型以LGG分子特征突变最为常见,包括IDH1、TP53和ATRX^[19](图4C~E)。据此,推测部分基因的突变差异可能在不同亚型胶质瘤患者的生存预后中发挥重要作用。

2.5 GINS家族可能通过调控免疫微环境和上皮间充质转换影响胶质瘤患者预后

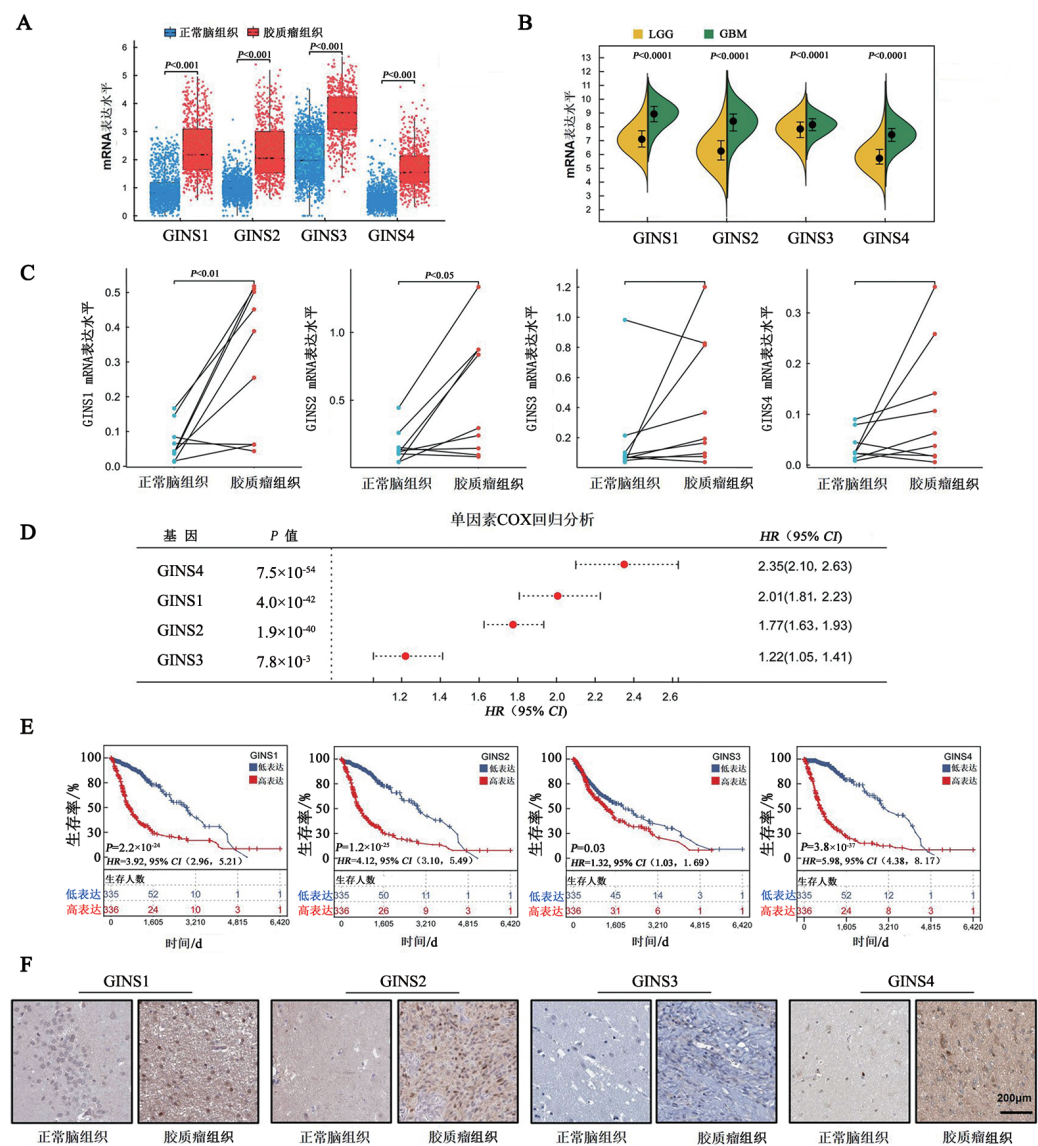
对TCGA-691胶质瘤S1、S2亚型进行差异表达基因分析,火山图显示849个基因上调,683个基因下调,GINS1、GINS2、GINS4在S1亚型中的表达水平显著高于S2亚型(图5A, $P<0.05$)。GO分析结果提示,1532个差异基因主要参与细胞器裂变、核分裂等细胞周期相关生物学过程(图5B, $P<0.05$),KEGG通路富集分析发现,差异基因主要富集在细胞因子与细

胞因子受体相互作用、人类T细胞白血病病毒感染以及癌症相关通路(图5C, $P<0.05$)。此外,以C2作为参考基因集,使用GSEA对各通路进行评分,结果发现差异基因在CCL18信号通路、免疫系统中的细胞因子信号、白介素的信号传导、细胞因子受体相互作用等众多免疫调节相关通路得分较高(图5D, $P<0.05$)。由此可见,GINS家族可能通过调控免疫微环境影响胶质瘤患者预后。

2.6 CD276和CX3CL1可能是S1亚型胶质瘤患者免疫治疗的潜在靶点

为进一步探讨胶质瘤S1、S2亚型与免疫细胞浸润、免疫治疗疗效的关系,首先利用ESTIMATE算法和CIBERSORT算法评估肿瘤免疫浸润情况,发现S1亚型较S2亚型表现出更高的免疫评分、基质评分、自然杀伤细胞和T细胞浸润水平以及较低的肿瘤纯度(图6A、B, $P<0.05$)。免疫治疗反应评分^[13]和肿瘤发炎指数^[20]均能预测肿瘤患者PD-1/PD-L1检查点疗法受益情况,本研究结果显示S1亚型中三种免疫治疗响应评分和肿瘤发炎指数均高于S2亚型(图6C、D, $P<0.05$),提示S1亚型胶质瘤患者可能更适合进行免疫疗法。此外,60个免疫检查点基因^[21]与GINS家族的相关性分析结果表明,

不良预后亚型 S1 中 GINS 家族与各免疫检查点基因表达相关性更强,其中免疫激活基因 CD276 和免疫抑制基因 CX3CL1 相关关系最紧密(图 6E, $P<0.05$),并且均与 CD276 呈正相关,与 CX3CL1 呈负相关(图 6F, $P<0.05$)。因此,推测 CD276 和 CX3CL1 可能是 S1 亚型胶质瘤患者免疫治疗的潜在靶点。



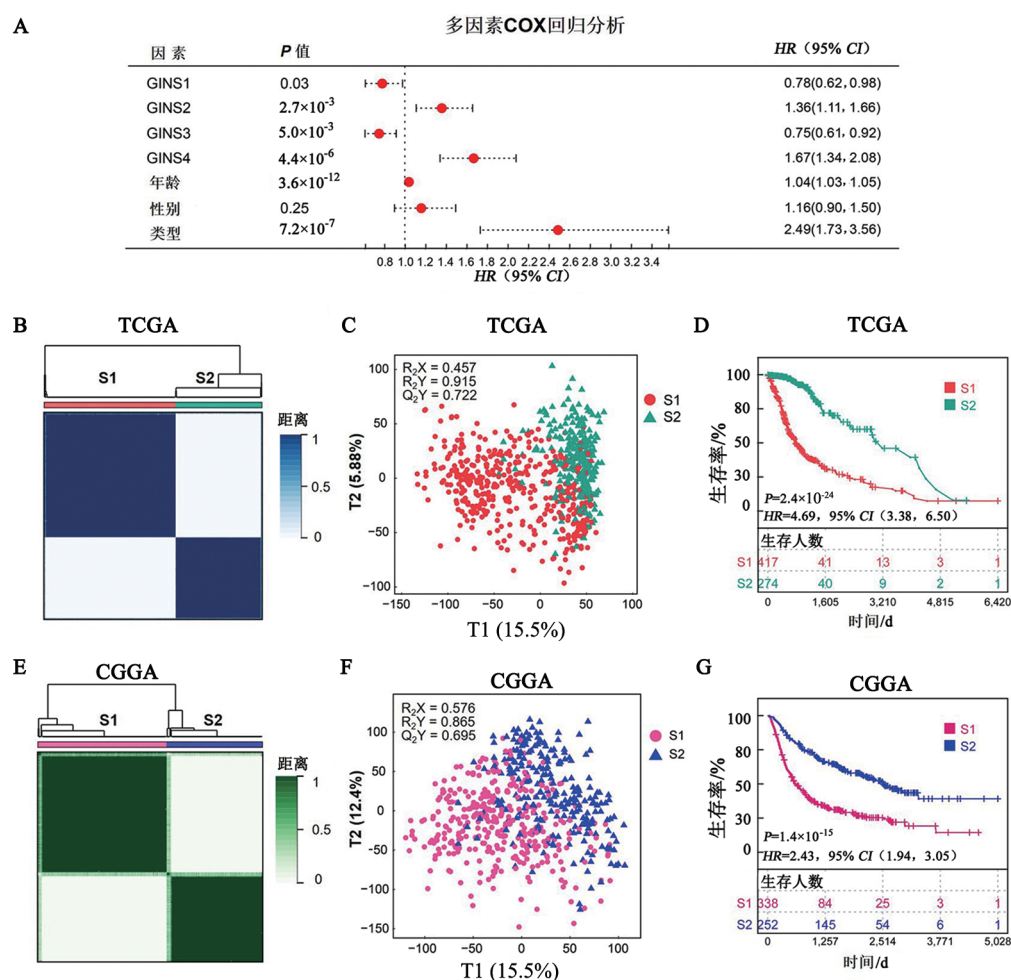
A:TCGA 和 GTEx 数据中正常脑组织与胶质瘤中 GINS 家族基因表达;B:TCGA 数据中 GINS 家族在低级别胶质瘤和 GBM 中的基因表达;C:临床胶质瘤组织及配对正常脑组织样本中 GINS 家族基因 mRNA 表达的 qPCR 检测;D:单因素 COX 回归分析;E:KM 生存曲线;F:正常脑组织和胶质瘤中 GINS 家族蛋白表达。* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图 2 评估 GINS 家族基因表达及其与胶质瘤患者预后的关系

2.7 CHEMBL66033、266935、293914、436859、1594881 可能是靶向 GINS2 的潜在中药小分子

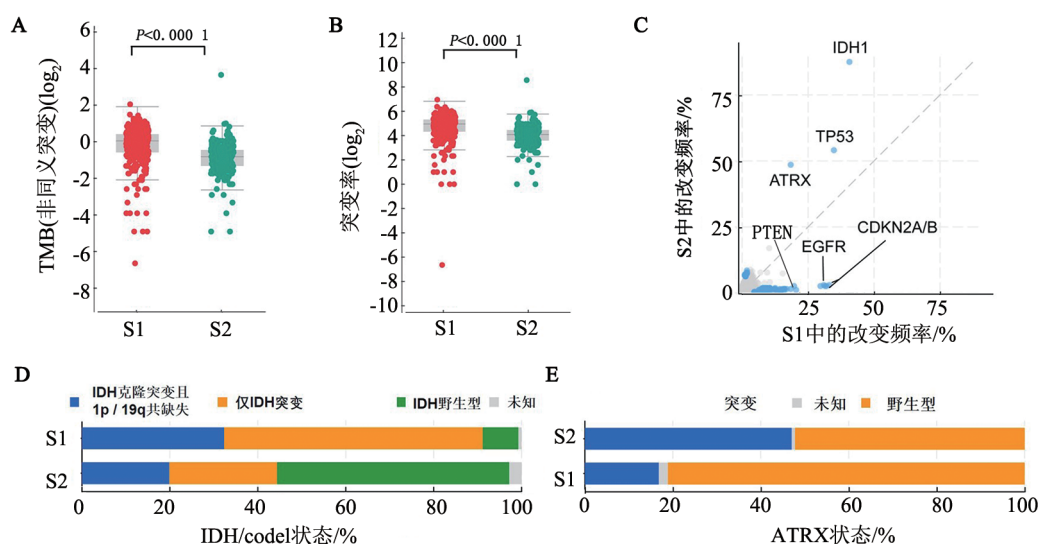
TCMIO 数据库是一个较为全面的中药免疫肿瘤学数据库,可用于探索中药调节癌症免疫微环境的分子机制^[15]。GINS 家族成员 GINS2 在进化过程中保守性最高(图 1A),且在不同亚型胶质瘤患者中其基因表达差异倍数最大(差异倍数为 2.75, $P<0.05$,图 5A),而人胶质瘤组织中 GINS2 mRNA 表达水平也明显高于正常脑组织(图 2C, $P<0.05$)。于是本研究选取 TCMIO 数

据库中 126 972 个针对免疫肿瘤学靶点的中药小分子与 GINS2 进行分子对接分析,结果显示,对接得分排名前五的中药小分子依次为 CHEMBL1594881 [ΔE (Kcal/mol) = -24.5]、CHEMBL66033 [ΔE = -23.4]、CHEMBL293914 [ΔE = -23.2]、CHEMBL266935 [ΔE = -23.1] 和 CHEMBL436859 [ΔE = -22.0]。上述结果表明,通过分子对接分析初步虚拟筛选出的 5 个中药小分子可能是 GINS2 高表达胶质瘤患者的潜在免疫治疗药物。



A: 多因素 COX 回归分析; B 和 E: 一致性聚类分析; C 和 F: PLS-DA 分析; D 和 G: KM 生存曲线。

图3 基于 GINS 家族基因表达谱对胶质瘤患者进行分子分型与验证



A: TMB 分析; B: 突变率分析; C: 改变事件频率分析; D: IDH/codel 状态分析; E: ATRX 状态分析。

图4 S1和S2亚型胶质瘤患者的突变分析

3 讨论

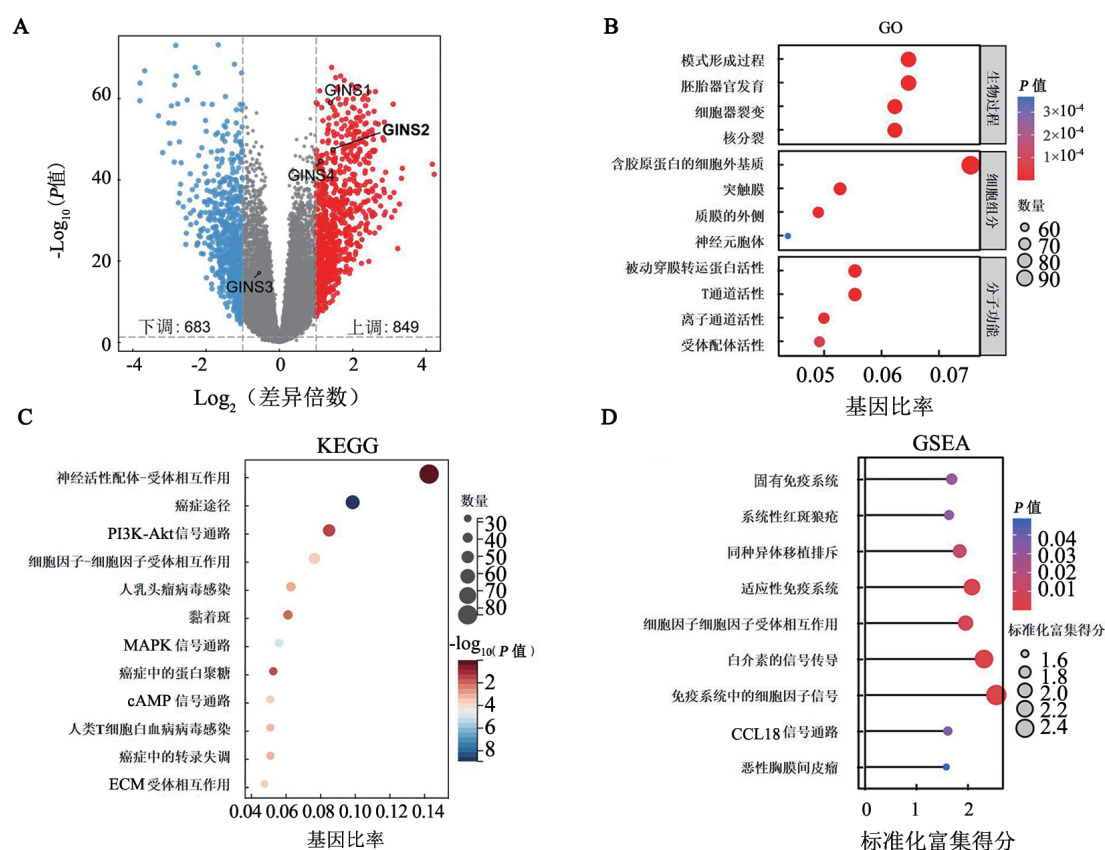
胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤,2007年 WHO 基于组织学分类和肿瘤恶变程度,将胶质瘤分

为 I~IV 级^[22]。目前胶质瘤分类主要依赖于形态学特征并辅以免疫组织化学等技术,然而随着靶向测序和组学技术的发展,人们逐渐发现结合分子标志物的分类方式更能反映疾病亚型,提高临床治疗收

益^[23-24]。因此,2016年修订 WHO 的 CNS 肿瘤分类第四版首次将分子特征与组织学分级相结合^[25],2021年第五版 WHO 的 CNS 肿瘤分类进一步强调了分子诊断在 CNS 肿瘤分类中的作用^[5]。分子分型的探索不仅为精确诊断胶质瘤患者提供崭新见解,也为开发分子疗法提供可行途径。

GINS 家族作为参与 DNA 复制这一重要生物过程的复合蛋白,其家族成员在许多肿瘤中呈高表达,且与患者预后不良密切相关。本研究通过基因组学分析发现,GINS 家族成员基因结构相似,具有完全相同的 9 个保守基因序列和 2 个蛋白结构域(α -螺旋和 β -链)^[26]。公共数据分析结果显示,GINS 家族基因在胶质瘤中的表达水平明显高于正常脑组织,且 GBM 组织中较 LGG 的表达水平更高。通过检测收集的中国人临床配对样本发现,GINS1 和 GINS2 mRNA 在胶质瘤组织中的表达水平明显高于正常脑组织,验证了数据库数据与中国人胶质瘤标本中其表达水平的一致性。COX 回归和 KM 生存曲线分析结果显示,GINS 家族是风险基因,并对胶质瘤患者的生存预后产生不良影响。据此,推测相似的基因结构和蛋白结构可能使 GINS

家族对胶质瘤发生发展的影响具有一致性,基于该家族基因表达的分子分型有望成为筛选高风险胶质瘤患者的有效方法。于是,选用 TCGA 胶质瘤患者 GINS 家族基因表达谱,通过一致性聚类分析将胶质瘤患者分成两个预后分子亚型。进一步研究结果显示,S1 亚型具有更高的 TMB 和基因突变数目,较为多见的突变基因为 CDKN2A/B (32.99%/31.97%)、EGFR (30.95%)、PTEN (19.69%),S2 亚型则以 IDH1 (87.50%)、TP53 (54.04%) 和 ATRX (48.53%) 突变多见。2021 年 WHO CNS 5 分级系统已将 IDH 突变状态正式确定为弥漫性低级别星形细胞瘤(WHO 2 级)和少突胶质细胞瘤的分子特征(WHO 3 级),而 IDH 突变伴随 TP53 和 ATRX 的失活突变是星形细胞瘤的标志^[27-28]。当 IDH 突变型星形细胞瘤存在 CDKN2A/B 纯合缺失时被认定为恶性程度最高的 GBM(WHO 4 级)^[5]。此外,EGFR 扩增或突变^[17]以及 PTEN 缺失或突变^[18]常表明胶质瘤患者预后不良。由此,认为胶质瘤患者不同亚型间的基因突变差异可能导致预后差异,为基于 GINS 家族基因的预后分型提供科学解释。



A:TCGA 数据库中 S1 和 S2 亚型的差异表达基因分析;B:差异表达基因的 GO 分析;C:差异表达基因的 KEGG 分析;
D:基于 C2 基因集的 GSEA 分析。

图5 S1 和 S2 亚型胶质瘤患者差异表达基因的功能及通路富集分析

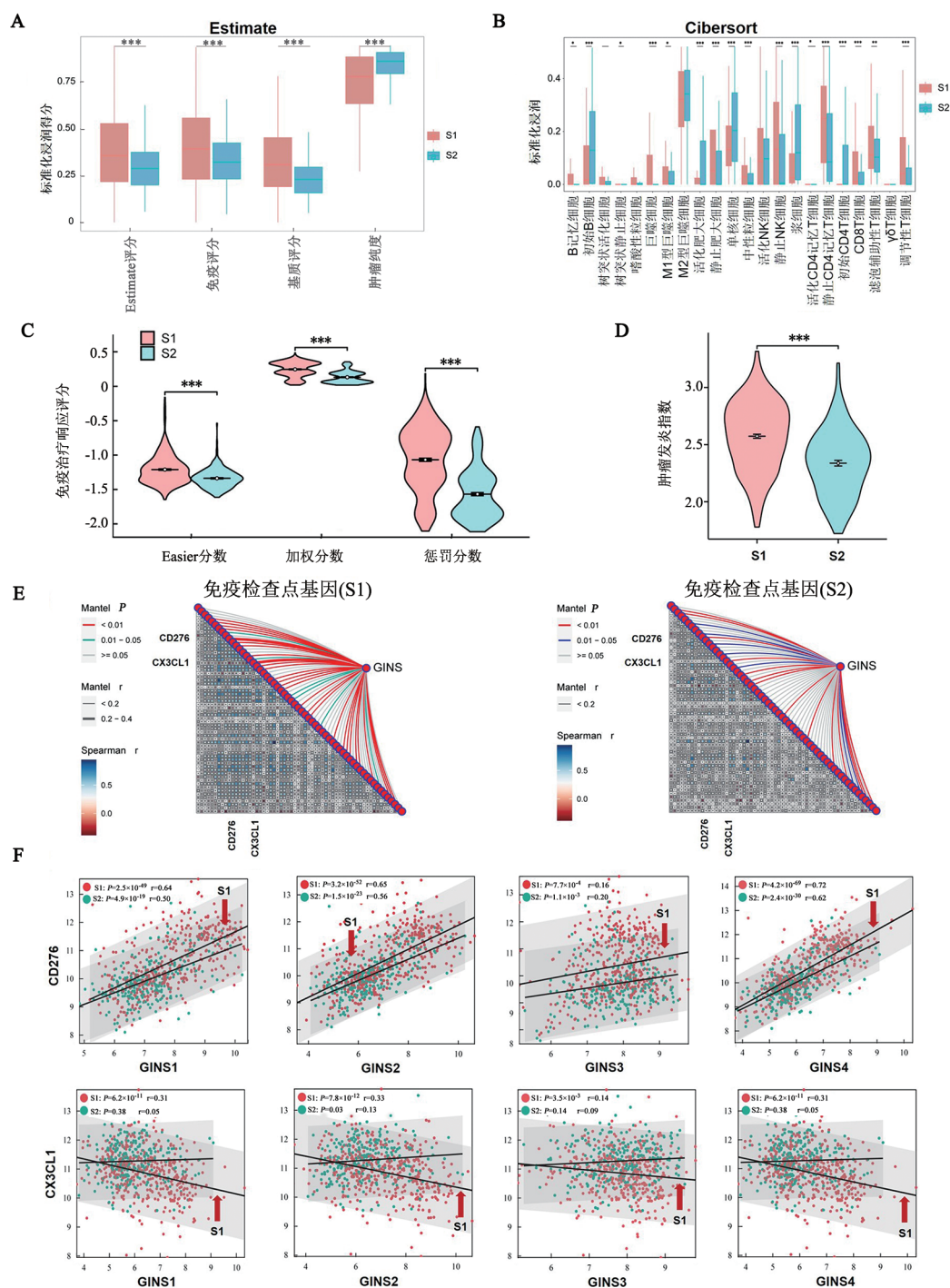


图6 S1和S2亚型胶质瘤患者的肿瘤免疫分析

通过富集分析意外发现,S1、S2亚型的差异上调基因能够富集在免疫相关通路,说明不同亚型患者的肿瘤免疫状态及免疫治疗反应可能存在区别。并且免疫浸润分析结果显示,S1亚型表现出更高的肿瘤免疫状态,更多T细胞浸润,尤其是 $CD8^+$ T细胞浸润,预示着该亚型具有较好的免疫治疗反应^[29]。进一步使用免疫治疗响应评分和肿瘤发炎指数评估胶质瘤患者对PD-1/PD-L1检查点疗法的受益情况,预测

结果显示,S1亚型对免疫治疗的反应更显著;相关分析表明,免疫检查点基因表达与S1亚型中GINS家族基因表达联系更密切。免疫细胞的高度浸润通常预示着患者较好的生存,而本研究结果显示预后不良亚型S1却有更多免疫细胞浸润,这可能是由于该亚型高TMB导致产生新的表面抗原,某些具有免疫原性的新抗原触发肿瘤免疫微环境中的T细胞反应^[30],使患者更适合进行免疫治疗。

免疫治疗是通过患者自身免疫系统治疗癌症或防治癌症复发,许多新型免疫治疗药物已得到批准并应用于临床^[31]。例如,帕博利珠单抗是首个FDA批准的PD-1单克隆抗体,已被确认能用于不可切除或转移性高TMB实体瘤^[32],在部分黑色素瘤^[33]、非小细胞肺癌^[34]、乳腺癌^[35]等肿瘤患者中的疗效已得以证实。随着学者对人脑免疫微环境认识的不断增多,免疫检查点阻断、嵌合抗原受体T细胞疗法、肿瘤疫苗等免疫疗法在胶质瘤中得以广泛开发、运用^[36]。目前,肿瘤免疫疗法中的药物大多是阻断T细胞检查点受体及其同源配体的单克隆抗体^[37]。早期胶质瘤免疫治疗发展缓慢的重要原因之一是血脑屏障阻断了生物制剂的效能^[38],而小分子药物能穿过血脑屏障进入细胞内发挥作用。此外,与生物制剂相比,小分子药物半衰期短,研究人员或临床医生可以通过间歇给药平衡药物不良反应^[39]。在中国,中药应用领域广泛,多种中药或中药成分已被证实具有抗肿瘤作用^[40]。于是,本研究利用中药免疫肿瘤学数据库中的中药成分配体与GINS家族重要蛋白GINS2进行分子对接分析,模拟筛选出既能调节肿瘤免疫又靶向GINS2的中药小分子。这些小分子抑制剂可与其他免疫疗法结合,提高单一治疗的反应率^[41],为胶质瘤免疫治疗提供新视角。

综上所述,GINS家族可能是胶质瘤预后分型的新型分子标志物,基于该家族的分子分型不仅能有效预测患者预后,而且还可以指导临床免疫治疗。通过分子对接筛选出能够抑制GINS2并参与肿瘤免疫调节的潜在中药小分子,为胶质瘤患者分子治疗和免疫治疗的临床转化奠定基础。然而,本研究主要基于在线数据库和生物信息学分析,缺乏实验论证,真实世界中胶质瘤新型靶向药物研发和临床运用仍有很长的道路要走。

【参 考 文 献】

- [1] GUO X, WANG G. Advances in research on immune escape mechanism of glioma[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(7): 1709-1720. DOI: 10.1111/cns.14217.
- [2] OSTROM Q T, PATIL N, CIOFFI G, *et al*. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(12 Suppl 2): iv1-iv96. DOI: 10.1093/neuonc/noaa200.
- [3] CHEN R, SMITH-COHN M, COHEN A L, *et al*. Glioma subclassifications and their clinical significance[J]. *Neurotherapeutics*, 2017, 14(2): 284-297. DOI: 10.1007/s13311-017-0519-x.
- [4] VAN DEN BENT M J. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinicians perspective[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 120(3): 297-304. DOI: 10.1007/s00401-010-0725-7.
- [5] LOUIS D N, PERRY A, WESSELINE P, *et al*. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231-1251. DOI: 10.1093/neuonc/noab106.
- [6] YANG K Y, WU Z J, ZHANG H, *et al*. Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 39[2023-10-15]. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-022-01513-z>. DOI: 10.1186/s12943-022-01513-z.
- [7] MARTINEZ M P, WACKER A L, BRUCK I, *et al*. Eukaryotic replicative helicase subunit interaction with DNA and its role in DNA replication[J/OL]. *Genes*, 2017, 8(4): 117[2023-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28383499/>. DOI: 10.3390/genes8040117.
- [8] BOSKOVIC J, COLOMA J, APARICIO T, *et al*. Molecular architecture of the human GINS complex[J]. *EMBO Rep*, 2007, 8(7): 678-684. DOI: 10.1038/sj.embor.7401002.
- [9] YANG H, LIU X C, ZHU X L, *et al*. GINS1 promotes the proliferation and migration of glioma cells through USP15-mediated deubiquitination of TOP2A[J/OL]. *iScience*, 2022, 25(9): 104952[2023-10-15]. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104952>. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104952.
- [10] SHEN Y L, LI H Z, HU Y W, *et al*. Loss of GINS2 inhibits cell proliferation and tumorigenesis in human gliomas[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(2): 273-287. DOI: 10.1111/cns.13064.
- [11] LIU B F, LIU Z D, WANG Y B, *et al*. Overexpression of GINS4 is associated with poor prognosis and survival in glioma patients[J/OL]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 117[2023-10-15]. <http://dx.doi.org/10.1186/s10020-021-00378-0>. DOI: 10.1186/s10020-021-00378-0.
- [12] JARDIM D L, GOODMAN A, DE MELO GAGLIATO D, *et al*. The challenges of tumor mutational burden as an immunotherapy biomarker[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(2): 154-173. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.10.001.
- [13] LAPUENTE-SANTANA Ó, VAN GENDEREN M, HILBERS P A J, *et al*. Interpretable systems biomarkers predict response to immune-checkpoint inhibitors[J/OL]. *Patterns*, 2021, 2(8): 100293[2023-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34430923/>. DOI: 10.1016/j.patter.2021.100293.
- [14] DAMOTTE D, WARREN S, ARRONDEAU J, *et al*. The tumor inflammation signature (TIS) is associated with anti-PD-1 treatment benefit in the CERTIM pan-cancer cohort[J/OL]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 357[2023-10-15]. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-019-2100-3>. DOI: 10.1186/s12967-019-2100-3.
- [15] LIU Z H, CAI C P, DU J W, *et al*. TCMIO: a comprehensive database of traditional Chinese medicine on immuno-oncology[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 439[2023-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32351388/>. DOI: 10.3389/fphar.2020.00439.
- [16] SIEVERS P, HIELSCHER T, SCHRIMPF D, *et al*. CDKN2A/B homozygous deletion is associated with early recurrence in meningiomas[J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(3): 409-413. DOI: 10.1007/s00401-020-02188-w.
- [17] ESKILSSON E, RØSLAND G V, SOLECKI G, *et al*. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma[J]. *Neuro-oncology*, 2018, 20(6): 743-752. DOI: 10.1093/neuonc/nox191.
- [18] BENITEZ J A, MA J H, DANTONIO M, *et al*. PTEN regulates glioblastoma oncogenesis through chromatin-associated complexes of DAXX and histone H3.3[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15223

- [2023-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28497778/>. DOI: 10.1038/ncomms15223.
- [19] XIE Y B. Omics-based integrated analysis identified ATRX as a biomarker associated with glioma diagnosis and prognosis[J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(4): 784-796. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0143.
- [20] AYERS M, LUNCEFORD J, NEBOZHYN M, *et al.* IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(8): 2930-2940. DOI: 10.1172/jci91190.
- [21] THORSSON V, GIBBS D L, BROWN S D, *et al.* The immune landscape of cancer[J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 812-830. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.023.
- [22] LOUIS D N, OHGAKI H, WIESTLER O D, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 97-109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- [23] HUSE J T, ALDAPE K D. The evolving role of molecular markers in the diagnosis and management of diffuse glioma[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(22): 5601-5611. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-14-0831.
- [24] Cancer Genome Atlas Research Network, BRAT D J, Roel G W VERHAAS R G W *et al.* Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(26): 2481-2498. DOI: 10.1056/nejmoa1402121.
- [25] LOUIS D N, PERRY A, REIFENBERGER G, *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(6): 803-820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- [26] OKI K, NAGATA M, YAMAGAMI T, *et al.* Family D DNA polymerase interacts with GINS to promote CMG-helicase in the archaeal replisome[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(7): 3601-3615. DOI: 10.1093/nar/gkab799.
- [27] ICHIMURA K, NARITA Y, HAWKINS C E. Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(6): 789-808. DOI: 10.1007/s00401-015-1439-7.
- [28] REUSS D E. Updates on the WHO diagnosis of IDH-mutant glioma [J]. *J Neuro Oncol*, 2023, 162(3): 461-469. DOI: 10.1007/s11060-023-04250-5.
- [29] LI J Y, BYRNE K T, YAN F X, *et al.* Tumor cell-intrinsic factors underlie heterogeneity of immune cell infiltration and response to immunotherapy[J]. *Immunity*, 2018, 49(1): 178-193. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.06.006.
- [30] ADDEO A, FRIEDLAENDER A, BANNA G L, *et al.* TMB or not TMB as a biomarker: that is the question[J/OL]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 163: 103374[2023-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34087341/>. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103374.
- [31] SZETO G L, FINLEY S D. Integrative approaches to cancer immunotherapy[J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(7): 400-410. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.05.010.
- [32] MARCUS L, FASHOYIN-AJE L A, DONOGHUE M, *et al.* FDA approval summary: pembrolizumab for the treatment of tumor mutational burden-high solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(17): 4685-4689. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-21-0327.
- [33] CRISTESCU R, AURORA-GARG D, ALBRIGHT A, *et al.* Tumor mutational burden predicts the efficacy of pembrolizumab monotherapy: a pan-tumor retrospective analysis of participants with advanced solid tumors[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(1): e003091[2023-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35101941/>. DOI: 10.1136/jitc-2021-003091.
- [34] AGUILAR E J, RICCIUTI B, GAINOR J F, *et al.* Outcomes to first-line pembrolizumab in patients with non-small-cell lung cancer and very high PD-L1 expression[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(10): 1653-1659. DOI: 10.1093/annonc/mdz288.
- [35] ALVA A S, MANGAT P K, GARRETT-MAYER E, *et al.* Pembrolizumab in patients with metastatic breast cancer with high tumor mutational burden: results from the targeted agent and profiling utilization registry (TAPUR) study[J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(22): 2443-2451. DOI: 10.1200/jco.20.02923.
- [36] LIM M, XIA Y X, BETTEGOWDA C, *et al.* Current state of immunotherapy for glioblastoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(7): 422-442. DOI: 10.1038/s41571-018-0003-5.
- [37] ADAMS J L, SMOTHERS J, SRINIVASAN R, *et al.* Big opportunities for small molecules in immuno-oncology[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(9): 603-622. DOI: 10.1038/nrd4596.
- [38] XU S C, TANG L, LI X Z, *et al.* Immunotherapy for glioma: current management and future application[J]. *Cancer Lett*, 2020, 476: 1-12. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.002.
- [39] HUCK B R, KÖTZNER L, URBANS K. Small molecules drive big improvements in immuno-oncology therapies[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57(16): 4412-4428. DOI: 10.1002/anie.201707816.
- [40] MA H D, DENG Y R, TIAN Z G, *et al.* Traditional Chinese medicine and immune regulation[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44(3): 229-241. DOI: 10.1007/s12016-012-8332-0.
- [41] SWART M, VERBRUGGE I, BELTMAN J B. Combination approaches with immune-checkpoint blockade in cancer therapy [J/OL]. *Front Oncol*, 2016, 6: 233[2023-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27847783/>. DOI: 10.3389/fonc.2016.00233.

[收稿日期] 2023-11-06

[修回日期] 2024-01-13

[本文编辑] 向正华