

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.009

· 临床研究 ·

CHI3L2在脑胶质瘤中的表达和生物学过程及其对患者临床预后的影响

周钰森¹, 贾鹏^{2△}, 练亿香³, 方雨婷¹, 陈婷⁴, 樊天禹¹, 彭高扬¹, 胡丽君¹, 尹江柳¹(1. 南华大学附属长沙中心医院 神经外科, 湖南 长沙 410004; 2. 中国人民解放军94750部队医院 外科, 福建 龙岩 366200; 3. 南华大学附属长沙中心医院 病理科, 湖南 长沙 410004; 4. 湖南博雅眼科医院 眼底病科, 湖南 长沙 410004)

[摘要] **目的:** 基于生物信息学方法探究几丁质酶-3样蛋白2(CHI3L2)在脑胶质瘤中的表达和生物学过程及其对患者临床预后的影响。**方法:** 以中国脑胶质瘤基因组图谱(CGGA)为训练集($n = 325$)、癌症基因组图谱(TCGA)为验证集($n = 702$), 对CHI3L2与脑胶质瘤患者临床病理特征的关系、预后价值和生物学过程进行交叉验证分析。用Kaplan-Meier法进行生存分析, 采用Cox回归模型分析CHI3L2表达及相关临床病理特征与脑胶质瘤患者预后的关系, 利用受试者工作特征(ROC)曲线分析CHI3L2在脑胶质瘤诊断中的价值, 用GO、KEGG及GSVA途径分析CHI3L2在脑胶质瘤中的潜在生物学过程, 构建CHI3L2的列线图以校准曲线及C-Index值来评估预测的准确性。WB法和qPCR法检测CHI3L2在正常星形胶质细胞HA1800、胶质瘤U215和U87细胞中蛋白质与mRNA水平表达的影响。选取长沙市中心医院病理科保存的7例正常脑组织、5例低级别胶质瘤(LGG, WHO I~II级)和6例胶质母细胞瘤(GBM, WHO IV级)标本进行免疫组化染色分析, 验证CHI3L2在正常脑组织和不同级别脑胶质瘤组织中的表达情况。**结果:** CHI3L2在GBM($P < 0.0001$)、非1p/19q编码($P < 0.0001$)、IDH-野生型($P < 0.0001$)、非MGMT甲基化($P < 0.01$)患者中显著表达, 对GBM具有一定的预测价值, 并且是脑胶质瘤患者总生存期(OS)的独立预后因素($P < 0.001$)。构建的列线图对脑胶质瘤患者的生存预后预测性良好。CHI3L2与LGG和GBM的免疫细胞浸润水平、肿瘤免疫微环境和免疫细胞均有显著关系。脑胶质瘤中CHI3L2蛋白($P < 0.05$)和mRNA($P < 0.0001$)的表达水平与更高的恶性程度相关, 免疫组化的结果进一步验证了这个发现。**结论:** CHI3L2的表达与脑胶质瘤的恶性程度、临床病理特征及预后关系密切, 并且参与脑胶质瘤的肿瘤微环境和免疫浸润, 有望成为脑胶质瘤治疗策略中的一个新靶点。

[关键词] 脑胶质瘤; 几丁质酶-3样蛋白2; 生物标志物; 预后

[中图分类号] R739.41; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)10-0997-11

Expression and biological processes of CHI3L2 in brain glioma and its impact on patient prognosis

ZHOU Yusen¹, JIA Peng^{2△}, LIAN Yixiang³, FANG Yuting¹, CHEN Ting⁴, FAN Tianyu¹, PENG Gaoyang¹, HU Lijun¹, YIN Jiangliu¹(1. Department of Neurosurgery, Changsha Central Hospital, University of South China, Changsha 410004, Hunan, China; 2. Department of Surgery, 94750th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Longyan 366200, Fujian, China; 3. Department of Pathology, Changsha Central Hospital, University of South China, Changsha 410004, Hunan, China; 4. Department of Ocular Fundus Diseases, Hunan Bright-Yard Eye Hospital, Changsha 410004, Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and biological processes of chitinase-3-like protein 2 (CHI3L2) in brain gliomas and its impact on clinical prognosis of patients based on bioinformatics methods. **Methods:** With Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) serving as the training set ($n = 325$) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) as the validation set ($n = 702$), the relationship between CHI3L2 and clinicopathologic features of brain glioma patients, as well as its prognostic value and biological processes were analyzed and cross-validated. Kaplan-Meier method was used for survival analysis. Cox regression model was employed to analyze the association between CHI3L2 expression and relevant clinicopathological features as well as prognosis of brain glioma patients. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to evaluate the diagnostic value of CHI3L2 for brain glioma. Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and Gene Set Variation Analysis (GSEA) were conducted to assess the potential biological processes associated with CHI3L2 in brain glioma. A Nomogram incorporating CHI3L2 and other

[基金项目] 湖南省科技创新计划项目(No. 2018JJ6086)

[作者简介] 周钰森(1998—), 男, 硕士, 主要从事神经外科基础与临床研究, E-mail: 724367192@qq.com; 贾鹏(1998—), 男, 本科, 主要从事恶性肿瘤外科治疗和机制研究, E-mail: bbj0317@163.com。△为共同第一作者

[通信作者] 尹江柳, E-mail: csszxyysjwk@163.com

relevant factors was constructed, and calibration curve and C-Index value were used to evaluate the Nomogram's accuracy in prognosis prediction. The protein and mRNA expression levels of CHI3L2 in normal astrocyte HA1800, as well as glioma U215 and U87 cells, were assessed using Western blotting and qPCR, respectively. Immunohistochemistry was performed on 7 normal brain samples, 5 low-grade glioma samples (LGG, WHO I - II), and 6 glioblastoma sample (GBM, WHO IV) that collected from the Department of Pathology at Changsha Central Hospital, with an aim to verify the expression of CHI3L2 in normal brain tissues and glioma tissues of different grades. **Results:** CHI3L2 was highly expressed in patients with GBM ($P < 0.0001$), non-1p/19q coding glioma ($P < 0.0001$), IDH-wild type glioma ($P < 0.0001$), and non-MGMT methylation glioma ($P < 0.01$), showing certain predictive value for GBM. Additionally, CHI3L2 was identified as an independent prognostic factor for overall survival (OS) in glioma patients ($P < 0.001$). The constructed nomogram exhibited good predictive accuracy for patient prognosis. Furthermore, CHI3L2 was significantly associated with immune cell infiltration level, tumor immune microenvironment, and immune cells in LGG and GBM. Elevated CHI3L2 protein ($P < 0.05$) and mRNA ($P < 0.0001$) levels in gliomas were correlated with higher malignant grade, as further confirmed by immunohistochemistry results. **Conclusion:** CHI3L2 expression is intricately associated with the malignancy, clinicopathological characteristics, and prognosis of brain glioma. It actively participates in the tumor microenvironment and immune infiltration within glioma, thereby representing a promising therapeutic target for glioma treatment.

[Key words] brain glioma; chitinase-3-like protein 2 (CHI3L2); biomarker; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(10): 997-1007. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.009]

脑胶质瘤作为起源于神经上皮的恶性肿瘤,是常见的原发性中枢神经系统肿瘤之一,其年发病率约为3~6.4/10万。目前,脑胶质瘤的治疗以手术作为主要的治疗方法,其缺乏进展的原因包括肿瘤在脑中呈侵袭性生长,这限制了局部治疗技术的应用,血脑屏障对肿瘤细胞具有保护作用,这也导致了它们对诱导细胞死亡具有天然的抵抗力,以及缺乏对单一、可靶向的致癌途径的深入认知等,均给全身治疗带来了巨大挑战^[1]。几丁质酶-3样蛋白2(chitinase-3-like protein 2, CHI3L2),是几丁质酶样蛋白(CLP)家族中的一员,参与自身免疫反应和组织重塑两种生理活动^[2]。研究^[3-4]发现,CHI3L2的同源基因CHI3L1的表达水平与乳腺癌及胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)组织中的免疫浸润相关。随着对CHI3L2与肿瘤的研究不断深入,发现CHI3L2与肾癌、肺癌、乳腺癌的肿瘤发展及预后具有相关性^[5-7]。CHI3L2在GBM组织中高表达水平并与不良预后和肿瘤复发相关^[8-10]。然而,目前关于CHI3L2在脑胶质瘤的预后的作用及相关机制的研究较少,尽管目前的研究证实了CHI3L2与脑胶质瘤的不良预后与免疫浸润相关,但这些研究都是不完整的。本研究将整合大量基因测序数据、临床数据、免疫组学等生物信息,以及利用多种基因功能分析方法和构建评价脑胶质瘤预后的列线图(nomogram),并通过细胞实验和免疫组化检测CHI3L2在脑胶质瘤组织中的表达情况,以期为脑胶质瘤的诊断治疗提供新的标志物和靶点。

1 资料与方法

1.1 数据的收集与处理

从中国脑胶质瘤基因组图谱(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA; <https://www.cgga.org.cn/>)检索包

括WHO II~IV级在内的脑胶质瘤的大量测序数据和临床数据作为训练集($n = 325$)。癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov/>)数据集作为外部验证数据集($n = 702$)。数据均使用SPSS 27软件或R软件(4.3.2)进行对照分析处理:(1)CHI3L2表达与临床病理特征及总生存期(OS)的关系;(2)绘制Kaplan-Meier曲线,进行CHI3L2表达与中位OS相关性分析;(3)采用Cox回归模型分析CHI3L2表达水平及相关临床病理因素与患者预后的关系;(4)绘制受试者工作特征(ROC)曲线,分析CHI3L2对脑胶质瘤患者的诊断价值。

1.2 GEPIA数据库与TIMER数据库在线分析

利用GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)检索CHI3L2基因在多种肿瘤组织与正常组织中的表达差异及CHI3L2在肿瘤和正常人组织中的平均表达量热图。利用TIMER数据库(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)计算CHI3L2在低级别胶质瘤(low-grade glioma, LGG)和GBM中免疫细胞的浸润水平。

1.3 GO与KEGG功能富集分析

通过Pearson相关性分析筛选出与CHI3L2最相关的基因,从CGGA数据库中选取 $Cor > 0.4$ 的基因329个,从TCGA数据库中选取 $Cor > 0.7$ 的基因229个,分别将选中的基因上传到DAVID网站(<https://david.ncifcrf.gov/>)。标识符为官方的基因符号,物种为Homo sapiens。最后,利用GO和KEGG通路分析富集结果。本研究选取 P 值升序排列前9名($P < 0.05$)作为展示结果。

1.4 基因集变异分析(Sene Set Variation Analysis, GSVA)

从AmiGO 2网站(<http://amigo.geneontology.org/amigo>)下载各种生物学功能基因列表,基于CGGA数据库与TCGA数据库测序数据,采用R 4.3.2软件

中“GSVA”包进行GSVA,以默认参数进行,生成每位患者的生物功能富集评分,通过Pearson相关分析确定CHI3L2与生物学过程的相关性。

1.5 列线图的构建

采用R 4.3.2软件中“rms”包对训练集构建列线图,基于CHI3L2和几种临床病理因素预测脑胶质瘤患者的OS,脑胶质瘤患者的1、2、3、5、10年OS率均可通过各因素的积分准确预测。使用校准曲线和C-Index值来显示生存预测的准确性。

1.6 细胞、组织标本及主要试剂

正常星形胶质细胞HA-1800、星型胶质细胞瘤细胞U251MG和GBM细胞U87MG均购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。将三种细胞培养于含有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素溶液的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

收集长沙市中心医院病理科保存的7例正常脑组织、5例LGG(WHO I-II级)和6例GBM(WHO IV级)组织标本,经固定、石蜡包埋制成石蜡组织块待用。

10%胎牛血清(10099141C)、1%青霉素/链霉素溶液(15070063)、DMEM培养基(11965092)均购自美国Gibco公司,TRIzol试剂盒(15596-026)购自Ambion公司,HiScript®IIQ Select RT SuperMix试剂盒(R233)购自Vazyme公司,RIPA裂解液购自北京普利莱生物公司,BCA蛋白定量试剂盒购自Wellbio公司,CHI3L2一抗(A7654)购自ABclonal公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗购自Proteintech公司,EDTA抗原修复液、DAB染色液、PBS缓冲液及抗体稀释液均购自无锡傲锐东源生物科技有限公司,即用型二抗(EnVision FLEX+, Mouse, High pH, Link)购自Dako公司。

1.7 qPCR法检测胶质瘤细胞中CHI3L2 mRNA的表达

使用TRIzol试剂盒提取HA-1800、U251和U87细胞的总RNA,并通过HiScript®IIQ Select RT SuperMix试剂盒逆转录为cDNA,取1 μL cDNA上样进行qPCR反应。PCR反应条件:95℃ 5 min; 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 34 s, 共计40个循环。以GAPDH为内参,引物序列:CHI3L2的上游引物序列为5'-CTGCCA GTTCCTGAAAGGAG-3',下游引物序列为5'-TTT GCCAGTGAAGTCATCCA-3';GAPDH上游引物序列为5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3',下游引物序列为5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'。采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因mRNA的相对表达量。实验重复3次。

1.8 WB法检测胶质瘤细胞中CHI3L2蛋白的表达

将对数生长期的U251、U87和HA-1800细胞接种于96孔板(1×10⁴个/孔),培养24 h后加入RIPA裂解液裂解制备样品,按照BCA蛋白定量试剂盒使用

说明测定蛋白浓度。利用4%浓缩胶和10%分离胶进行电泳,将蛋白条带转移至PVDF膜上,在含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中室温封闭1 h,加入CHI3L2一抗(稀释比例1:1 000)4℃下处理过夜。TBST洗膜3次后,加入HRP标记的山羊抗兔二抗(稀释比例1:3 000)处理45~60 min, TBST洗膜后,使用电化学发光(ECL)法显影。以GAPDH作为内参,用Image J软件(1.8.0)分析蛋白质条带的灰度值。实验重复3次。

1.9 免疫组化染色法检测不同级别胶质瘤组织中CHI3L2蛋白的表达

取正常脑组织、LGG和GBM石蜡组织标本,制成3.5 μm切片,在70℃烤片机烤片3 h后,切片经脱蜡、梯度乙醇溶液下行入水,冲洗后置于PBS缓冲液中。将EDTA抗原修复液加入高压锅中,高火预热,修复液沸腾后将切片置于其中,高火加热2 min,待锅中液体冷却至室温后取出切片,置于PBS缓冲液中清洗3次(2 min/次)。加入3%过氧化氢溶液中室温处理10 min,蒸馏水冲洗2次后用免疫组化笔在距离组织周围2~3 mm处画阻水圈。将一抗CHI3L2(稀释比例为1:200)溶液滴加至阻水圈中,37℃处理60 min。随后滴加即用型二抗,37℃处理20 min, PBS缓冲液冲洗3次(2 min/次)。然后在DAB染色液中染色6 min,自来水冲洗。经苏木素染色液中室温染色40 s,自来水冲洗后盐酸乙醇分化、返蓝及封片。光镜下观察CHI3L2蛋白的表达情况。根据组织切片着色的阳性细胞数量和染色范围进行评分。在5个高倍镜视野下观察并使用二级计分法,染色强度和范围结合形成最终的免疫组织化学评分,其中阴性为0分,弱阳性为1~2分,中等阳性为3~4分,强阳性为5分。本研究将阴性和弱阳性归类为阴性,中等阳性和强阳性归类为阳性。

1.10 统计学处理

采用SPSS 27软件和R软件(4.3.2)进行统计分析和作图。两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。采用Log-Rank检验中的Kaplan-Meier法进行生存分析及评估预后价值的显著性。采用单因素和多因素Cox回归模型分析CHI3L2及相关临床因素是否为患者生存的影响因素。ROC曲线分析CHI3L2在脑胶质瘤诊断中的价值。以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GEPIA数据库中CHI3L2在肿瘤与正常组织中的表达

CHI3L2在GEPIA数据库收录的所有肿瘤与正

常组织表达的比较,在肿瘤疾病中,CHI3L2在脑肿瘤中呈高表达态势(图1A),CHI3L2在GBM与LGG中的表达相较于正常组织均升高(图1B)。相较于在

其他肿瘤组织中的表达,CHI3L2在GBM组织中表达水平更高(图1B)。

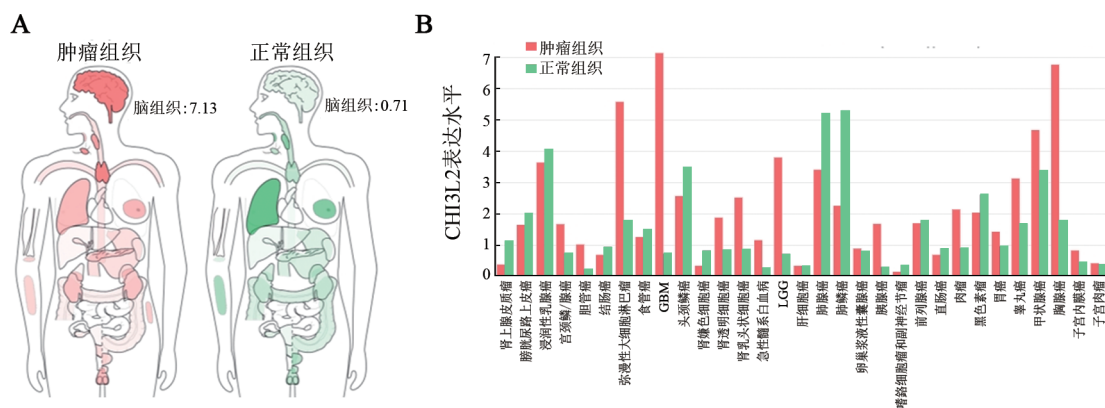


图1 CHI3L2基因在肿瘤组织与正常组织中的表达

2.2 CHI3L2在脑胶质瘤中的表达及其与患者临床病理因素的关系

通过CGGA与TCGA数据库分析结果(图2)发现,不同CHI3L2表达水平的患者表现出不同的临床和病理特征,随着CHI3L2表达的增加,O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶[O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT]甲基化状态、1p/19q编码、IDH类型、WHO分级和病理类型在CGGA和TCGA数据库中呈不对称分布(图2A、B)。在CGGA数据库中,CHI3L2在高级别胶质瘤(high grade glioma, HGG)、非1p/19q编码、IDH-野生型、非MGMT甲基化胶质瘤患者中显著高表达(图2C, $P < 0.0001$ 或 $P < 0.01$),此结果在TCGA数据库中得到验证(图2D, 均 $P < 0.0001$)。分析结果说明,CHI3L2在恶性程度较高的脑胶质瘤中表达较为显著。

2.3 CHI3L2在胶质瘤细胞和组织中呈高表达

WB法检测结果(图3A)显示,胶质瘤细胞中CHI3L2蛋白的表达水平显著高于HA-1800细胞($P < 0.001$),在U87细胞中CHI3L2表达水平显著高于U251细胞($P < 0.01$)。qPCR法检测结果(图3B)印证了WB实验结果,CHI3L2 mRNA在U87和U251细胞中的表达水平显著高于HA-1800细胞(均 $P < 0.001$),而在U87细胞中CHI3L2 mRNA的表达水平显著高于U251细胞($P < 0.001$)。免疫组化染色法检测结果(图3C)显示,正常脑组织(7例)、LGG(5例)和HGG(6例)组织切片的CHI3L2阳性表达率分别为0%(0/7)、40%(2/5)、83%(5/6),阳性染色颗粒均定位于细胞质。实验结果表明,CHI3L2蛋白和mRNA在胶质瘤细胞与组织中均呈高表达,其表达与脑胶质瘤的恶性程度相关联。

2.4 CHI3L2表达在GBM诊断中的预测价值

在CGGA和TCGA数据库中,与其他脑胶质瘤相比,CHI3L2在GBM中显著高表达(图4A, 均 $P < 0.001$)。ROC曲线评价CHI3L2在GBM中表达的特异性,在CGGA数据库中,AUC值为74.4;在TCGA数据库中,AUC值高达87.0。结果表明,CHI3L2表达在GBM诊断中具有预测价值。

2.5 肿瘤细胞中的CHI3L2参与炎症反应和免疫应答

为探索与CHI3L2相关的生物学功能,分别在CGGA和TCGA数据库中通过Pearson相关分析筛选出与CHI3L2最相关的基因。基于上述基因集进行GO分析结果(图4B)显示,在CGGA数据库中,与CHI3L2最相关的生物学过程包括:炎症反应、固有免疫反应和大量自由基形成的呼吸爆发。此外,CHI3L2最相关的分子功能为蛋白结合,最相关的细胞组分为细胞外的外泌体;KEGG分析结果(图4B)显示,CHI3L2与补体和凝血级联反应、破骨细胞分化和金黄色葡萄球菌感染最具相关性。TCGA数据库中CHI3L2的生物学过程、分子功能、细胞组分及KEGG分析结果与上述相似(图4B)。分析结果表明,胶质瘤细胞上的CHI3L2可能依靠补体和凝血级联反应在炎症反应和免疫应答方面发挥重要作用。

2.6 脑胶质瘤患者中CHI3L2的免疫学特征

TIMER数据库数据分析结果(图4B、C)显示,在GBM和LGG组织中,CHI3L2 mRNA表达水平与巨噬细胞、CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞DC、B细胞和中性粒细胞的浸润水平均呈正相关,而与其肿瘤纯度呈负相关。使用GSVA方法对CGGA数据库进行分析结果(图5A)表明,除NK细胞介导的免疫应答外,CHI3L2表达与大多数免疫功能呈正相关,表明

CHI3L2与脑胶质瘤免疫微环境中NK细胞的抑制活性之间存在联系。在TCGA数据库中,除NK细胞介导的免疫应答与CHI3L2表达呈轻度正相关外,其余结果与上述相似(图5A)。

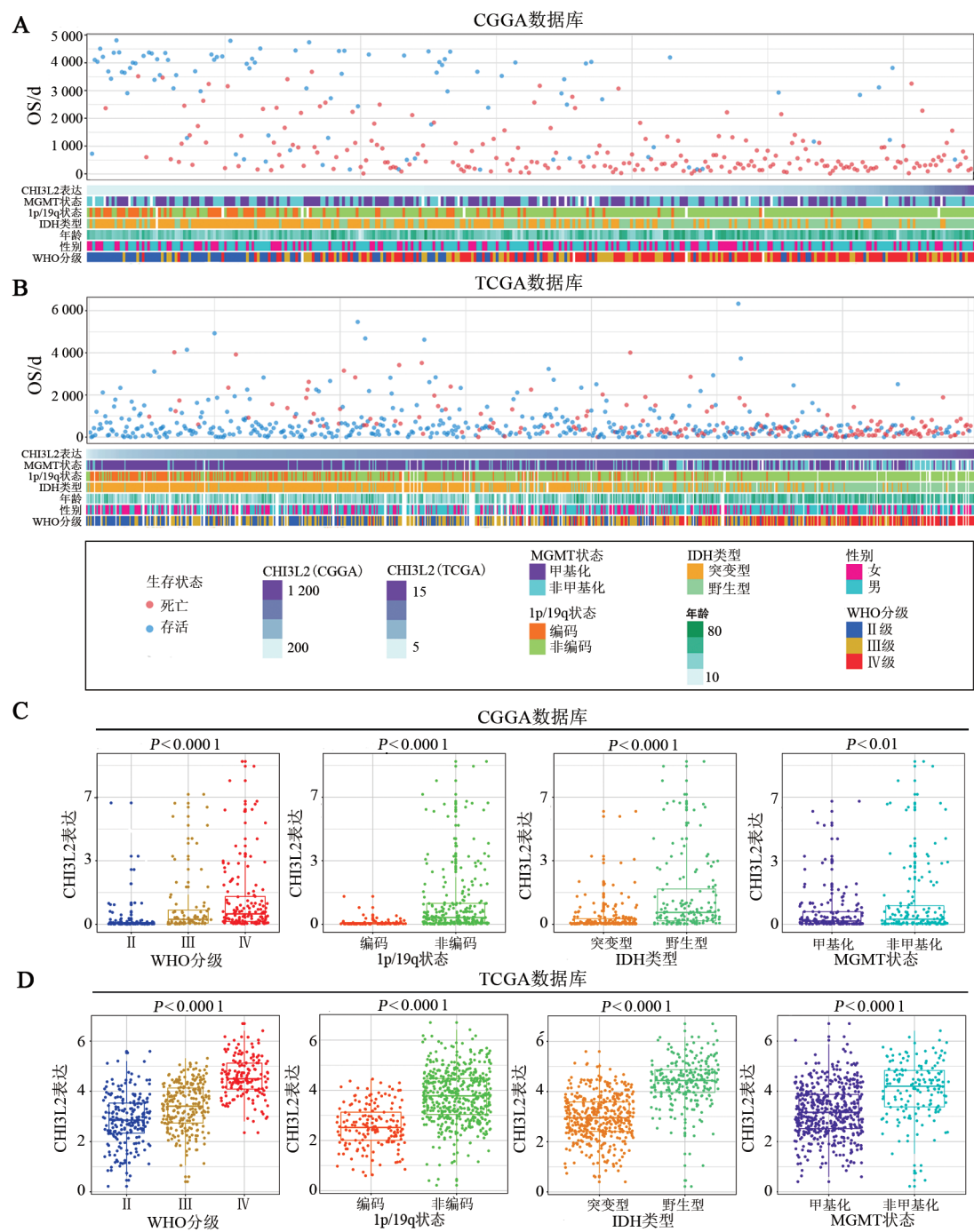


图2 CGGA(A、C)与TCGA(B、D)数据库中CHI3L2表达与脑胶质瘤患者临床病理特征及OS的关系

2.7 CHI3L2是脑胶质瘤患者OS的独立预后因素

基于CGGA和TCGA数据库的Kaplan-Meier分析和Cox回归模型分析结果(图5B)显示:在CGGA数据库中,CHI3L2高表达患者的OS(中位OS为415 d)明显短于CHI3L2低表达患者(中位OS为1 754 d),差异有统计学意义($P < 0.0001$);在TCGA数据库中验证了CHI3L2的预后价值($P < 0.0001$)。在Cox回归分析中,CHI3L2表达是脑胶质瘤患者生

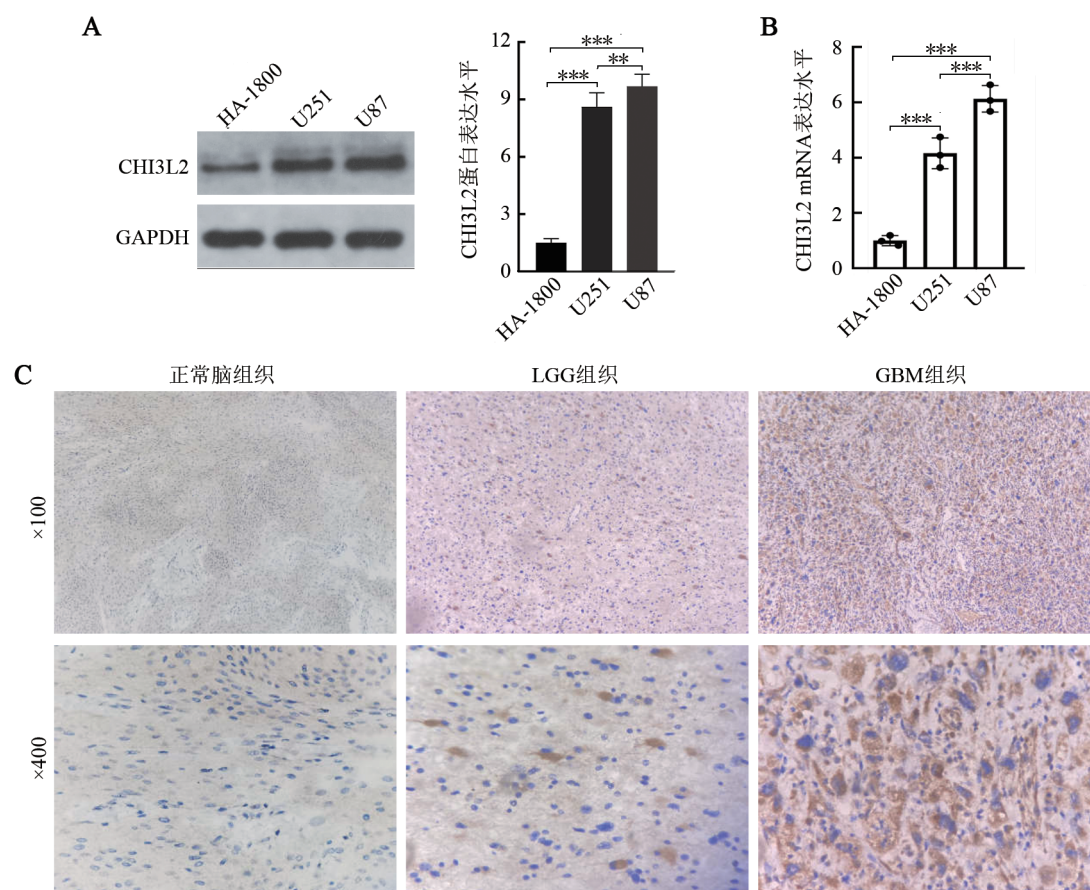
存的独立预后因素,包括年龄、WHO分级、1p19q编码、原/复发状态及化疗情况(表1、2)。

2.8 成功构建了CHI3L2表达和脑胶质瘤患者临床病理因素列线图

成功构建了整合CHI3L2表达和脑胶质瘤患者临床病理因素(包括原/复发类型、年龄、WHO分级、化疗情况、1p19q编码)的列线图(图5C)。通过此预测模型可以较准确的估计脑胶质瘤患者的1、2、3、5、

10年的OS率。校准曲线中的模态图和实际观测值显示出令人满意的重叠,该模型的C-Index值为0.79,

高于其他任何预测模型。



A: WB法检测3种不同细胞中CHI3L2蛋白的表达; B: qPCR法三种细胞中CHI3L2 mRNA的相对表达水平; C: 免疫组化染色法检测不同级别胶质瘤组织与正常脑组织中CHI3L2蛋白的表达。

*** $P < 0.0001$, ** $P < 0.05$ 。

图3 胶质瘤细胞与组织中CHI3L2蛋白和mRNA显著高表达

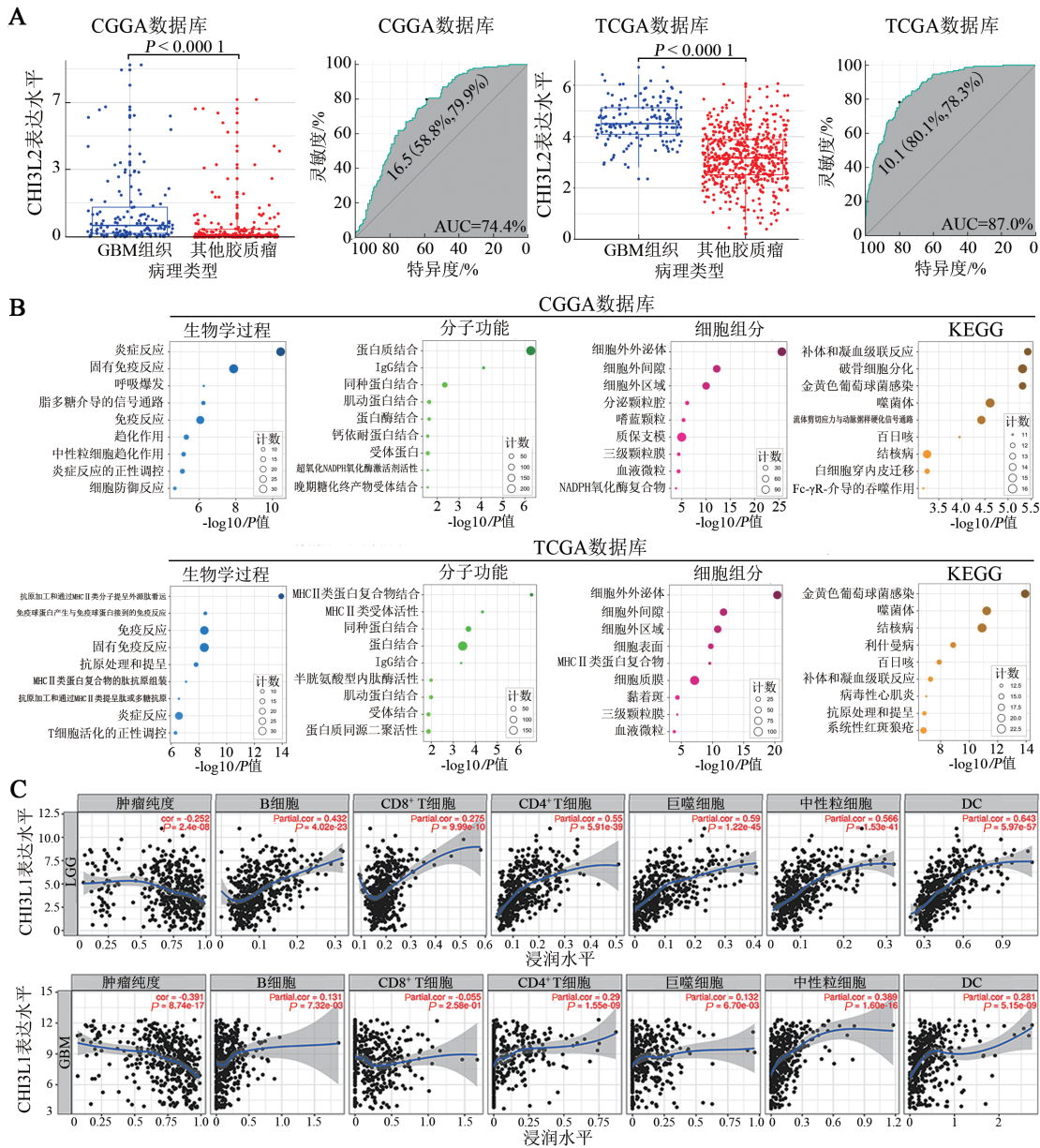
3 讨论

脑胶质瘤是一种高度复发和致死性的原发性脑肿瘤,主要发生于成人。这类肿瘤易发生迁移侵袭、细胞凋亡抵抗和基因组不稳定,从而导致预后不良,并对患者的日常生活和情绪产生巨大负面影响^[11]。胶质瘤干细胞是胶质瘤细胞中的一个亚群,具有较强的自我更新能力,这导致胶质瘤对化疗或放疗具有很强的抵抗力^[12]。尽管新的治疗方式对改善无进展生存期(PFS)和OS有了让人振奋的效果,如使用中频交变电场进行抗分裂治疗^[13],但脑胶质瘤患者的预后仍未得到显著的改善。免疫治疗使许多恶性肿瘤患者受益,但是脑胶质瘤的耐药性仍困扰着许多患者。研究^[14-15]表明,脑胶质瘤通过肿瘤微环境和肿瘤干细胞的多种机制和通路获得原发性耐药和获得性耐药,使得免疫治疗在抑制肿瘤进展中失效。因此,阐明脑胶质瘤新的潜在分子机制,对于促进临床

治疗效果无疑是极为重要的。

CHI3L2是CLP家族中的一种分泌性蛋白,在大小和序列上与哺乳动物CHI3L1高度相关。CHI3L1在许多肿瘤中被深入研究,特别是在脑胶质瘤中,CHI3L1的过表达使得胶质瘤细胞免受顺铂、依托泊苷和多柔比星诱导的细胞死亡,促使瘤细胞形成耐药从而促进肿瘤进展,CHI3L1与不良预后相关^[16]。研究^[17]表明,CHI3L2是由乳腺癌中肿瘤相关巨噬细胞产生的,对单核细胞具有显著的趋化作用,能刺激血管生成,在有转移的乳腺癌患者进行新辅助化疗后,CHI3L2水平升高则预示着预后不良。作为肿瘤微环境形成相关的组分,CHI3L2与晚期小细胞肺癌患者的预后显著相关^[6]。许多研究^[18-19]表明,化疗与巨噬细胞相互作用,但化疗药物作用于肿瘤微环境的机制及肿瘤微环境诱导的耐药形成的分子机制仍不清楚。本研究中提供的数据充分表明,基于多数据库的交叉验证下,CHI3L2与脑胶质瘤及其预后密切相关,对了解CHI3L2在脑胶质瘤中发挥的作用有

了更为充分的认识。



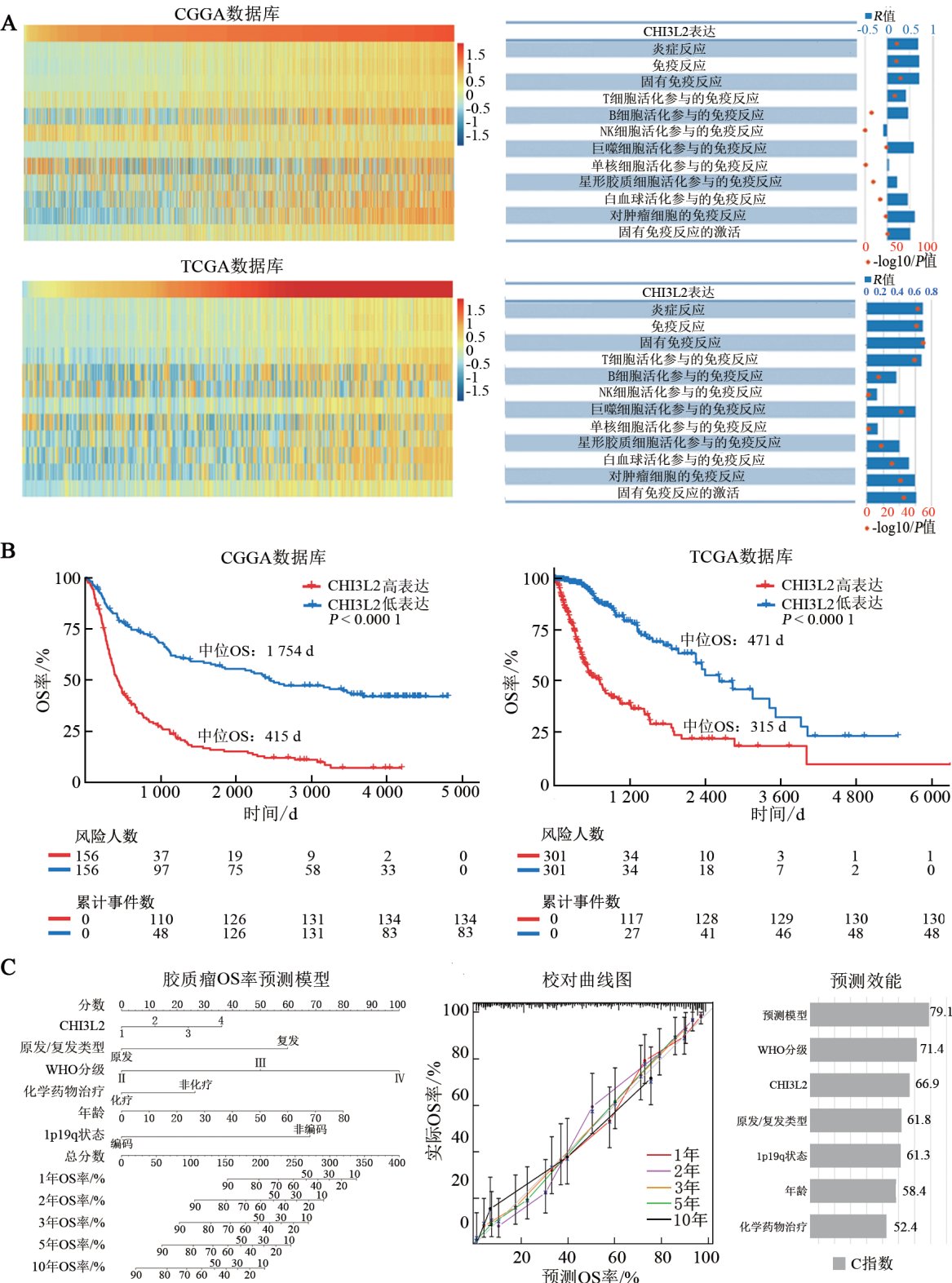
A:CGGA 与 TCGA 数据库中 CHI3L2 在 GBM 和其他脑胶质瘤中的表达;
B:CHI3L2 相关生物学功能;C:GBM 和 LGG 中 CHI3L2 与免疫浸润的关系。
图 4 脑胶质瘤中 CHI3L2 表达、相关生物学功能及其与免疫浸润的关系

通过 TCGA 和 CGGA 数据库分析,以及 GEPIA 数据库的检索结果,本研究发现 CHI3L2 主要表达于脑肿瘤中,并且与其他肿瘤中的表达相比,在 GBM 中表达显著上调,刘洪军等^[20]的研究也获得了相似的结果。在不同临床病理特点的脑胶质瘤患者中,CHI3L2 的表达增加,与更高级别的脑胶质瘤、IDH 野生型的脑胶质瘤尤为相关,这与 LIU 等^[9]的研究结果一致。同时还发现,CHI3L2 在非 MGMT 甲基化的患者中也显著增加,在 TCGA 数据库中也验证了相同的结果。MGMT 已经被证明是肿瘤对替莫唑胺化疗反应的重要标志物,在一项建立在北欧老年人的试验

(NOA-08)中观察到 MGMT 启动子甲基化与显著延长 OS 有关,而在非甲基化肿瘤患者中使用替莫唑胺则会导致有害的作用^[21-22]。本研究使用 ROC 曲线评估了 CHI3L2 在 GBM 中的预测价值,在两个数据库中的序列中,AUC 均表现出良好的结果,预示着 CHI3L2 在 GBM 的诊断中具有良好的预测价值和敏感性。通过 Kaplan-Meier 分析,CHI3L2 的高表达与更短的中位 OS 相关,单因素及多因素 Cox 风险回归模型提示肿瘤细胞中 CHI3L2 表达是脑胶质瘤患者的独立预后指标。在细胞学水平上,qPCR 法和 WB 实验结果显示,随着脑胶质瘤恶性程度增加,CHI3L2

的表达也显著增加,在GBM细胞中表达最高,这和本研究数据库分析结论一致,免疫组化的结果也进一步证实了这一点,本研究的结果与已有的研究结

论也是相似的^[9]。另外,本研究还构建了列线图来预测脑胶质瘤患者的生存预后,根据校准曲线和C-Index值结果所示,其预测准确性表现良好。



A:CHI3L2表达与炎症及免疫反应富集评分的相关性分析;B:CGGA和TCGA数据库中CHI3L2表达的Kaplan-Meier分析;
C:基于CGGA数据库的脑胶质瘤OS率的列线图。

图5 脑胶质瘤中CHI3L2表达的GSVA和生存分析

表1 CGGA数据库OS率预后参数的单因素和多因素分析

因素	单因素分析				多因素分析			
	B	SE	HR(95% CI)	P	B	SE	HR(95% CI)	P
CHI3L2 表达	0.560	0.063	1.750(1.546, 1.981)	< 0.001	0.187	0.080	1.206(1.030, 1.412)	0.020
WHO 分级	1.068	0.095	2.911(2.416, 3.507)	< 0.001	0.831	0.112	2.296(1.842, 2.863)	< 0.001
年龄	0.032	0.006	1.033(1.020, 1.046)	< 0.001	0.015	0.007	0.015(1.002, 1.029)	0.028
IDH 类型	-1.037	0.142	0.355(0.269, 0.468)	< 0.001	-0.107	0.187	0.899(0.623, 1.298)	0.569
1p/19q 状态	-1.773	0.250	0.170(0.104, 0.277)	< 0.001	-1.172	0.272	0.310(0.182, 0.528)	< 0.001
MGMT 状态	-0.187	0.139	0.830(0.632, 1.089)	0.178	-	-	-	-
性别	-0.061	0.139	0.941(0.716, 1.236)	0.660	-	-	-	-
原/复发类型	1.056	0.146	2.874(2.160, 3.824)	< 0.001	1.022	0.163	2.779(2.018, 3.827)	< 0.001
化疗	0.368	0.150	1.445(1.078, 1.937)	0.014	-0.465	0.170	0.628(0.450, 0.878)	0.006

表2 TCGA数据库OS率预后参数的单因素和多因素分析

因素	单因素分析				多因素分析			
	B	SE	HR(95% CI)	P	B	SE	HR(95% CI)	P
CHI3L2 表达	0.315	0.029	1.371(1.296, 1.450)	< 0.001	0.082	0.040	1.085(1.003, 1.174)	0.043
WHO 分级	1.589	0.127	4.901(3.822, 6.285)	< 0.001	0.590	0.164	1.804(1.308, 2.488)	< 0.001
年龄	0.073	0.006	1.075(1.063, 1.088)	< 0.001	0.054	0.008	1.056(1.040, 1.071)	< 0.001
IDH 类型	-2.402	0.181	0.091(0.064, 0.129)	< 0.001	-0.836	0.297	0.433(0.242, 0.777)	0.005
1p/19q 状态	-1.512	0.271	0.220(0.130, 0.375)	< 0.001	-0.601	0.320	0.548(0.293, 1.027)	0.060
MGMT 状态	-1.165	0.167	0.312(0.225, 0.433)	< 0.001	-0.116	0.196	0.890(0.607, 1.307)	0.553
性别	0.001	0.152	1.001(0.743, 1.347)	0.997	-	-	-	-
原/复发类型	-	-	-	-	-	-	-	-
化疗	-	-	-	-	-	-	-	-

基于前述的结果,本研究进一步分析了CHI3L2的生物学功能。通过GO和KEGG分析,发现CHI3L2相关的基因主要参与了炎症反应、自身免疫反应、导致大量自由基形成的呼吸爆发、补体和凝血级联反应等生物学过程,在分子功能上CHI3L2主要与蛋白质连接相关,而在细胞组分上,则于细胞外分泌体相关。据报道^[23],补体和凝血级联反应可能通过抑制肿瘤免疫来促进肿瘤的发生和发展。异常凝血是脑胶质瘤的共同特征,肿瘤相关血栓形成与脑胶质瘤患者的发病率和病死率显著相关^[24-25]。活化补体信号参与胶质瘤细胞与肿瘤微环境的多种相互作用,从而促进脑胶质瘤的生长^[26]。最近的一项研究^[27]表明,补体和凝血级联反应与LGG的预后和免疫微环境有关。与CHI3L2相似,CHI3L1也是在脑胶质瘤中过表达的基因之一,与肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞和炎性细胞产生息息相关,并通过对细胞外基质重塑从而参与细胞增殖、分化、抗凋亡、血管生成和侵袭性重建^[28]。肿瘤微环境和免疫细胞浸润逐渐被认为是脑胶质瘤研究的热点,可以用来预测患者的预后或免疫反应。并且,新兴的免疫疗法在脑胶质瘤治疗领域取得了显著进步^[29]。随着进一步探究CHI3L2与肿瘤免疫的关系,在TIMER数据库中发现GBM中

巨噬细胞、CD4⁺ T细胞、DC、B细胞和中性粒细胞均与CHI3L2显著相关,在LGG中也发现了类似的结果。HUSSAIN等^[30]的研究表明,小胶质细胞/巨噬细胞是脑胶质瘤中的主要免疫浸润细胞,并通过激活分泌细胞因子和激活共刺激因子从而使具有抗肿瘤效应的T细胞无法启动自身免疫反应。在免疫原性癌细胞死亡过程中,淋巴细胞(包括NK、T、B细胞)的活化及各种趋化因子和细胞因子的释放,增加了肿瘤细胞的凋亡和死亡^[31]。因此,本研究分析了CHI3L2激活对免疫途径和细胞因子特征的影响。根据GSVA分析结果可见,CHI3L2的表达与大多数免疫功能正相关,并且可能与免疫反应中NK细胞的抑制活性之间存在联系。PAVLO等^[32]研究表明,CHI3L2在脑胶质瘤中的表达增加,并通过ERK1/2的磷酸化刺激MAPK通路的激活,从而促进细胞增殖。因此认为,CHI3L2与其同源的CHI3L1相似,通过改变肿瘤微环境、诱导细胞增殖、抑制免疫反应启动,从而促进肿瘤的进展和耐药性的形成。

然而,本研究仍存在局限性。在细胞实验中,仅仅在胶质瘤U251和U87细胞中探究了CHI3L2在mRNA和蛋白水平上的表达情况,若能在更多的胶质瘤细胞系中验证,其说服力无疑会更强。在基因

功能分析中,没有充分分析出以CHI3L2为中心的上下游关联的通路,这对于如何有效地将CHI3L2作为治疗靶点造成了一定障碍。由于缺乏本地真实病例的验证,这使得本研究尚不能在更为真实全面的视角下清晰认识CHI3L2在脑胶质瘤发生发展中的作用。因此,后续将进一步关注CHI3L2在化疗药物耐药形成的机制,以及进行更为全面的基因功能分析,以揭示CHI3L2在肿瘤微环境中的作用及与化疗药物之间的关系,从而促进临床疗效的提升。

综上所述,本研究证明了CHI3L2可以作为脑胶质瘤的潜在生物标志物,主要参与炎症反应、自身免疫反应、导致大量自由基形成的呼吸爆发等生物学过程,同时可能通过补体和凝血级联反应参与肿瘤的生长,还证明了CHI3L2是脑胶质瘤OS的独立预后因子及与免疫的重要关系,表明了其在脑胶质瘤中的潜在预后作用和免疫作用。因此,CHI3L2可能成为脑胶质瘤患者新的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] DU H, MASUKO-HONGO K, NAKAMURA H, *et al.* The prevalence of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein, YKL-39, osteopontin, and cyclic citrullinated peptide in patients with early-stage knee osteoarthritis: evidence of a variety of autoimmune processes[J]. *Rheumatol Int*, 2005, 26(1): 35-41. DOI: 10.1007/s00296-004-0497-2.
- [3] 徐娜娜. CHI3L1 蛋白诱导巨噬细胞 M2 极化在脉络膜新生血管形成中的作用及机制研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [4] JOHANSEN J S, JENSEN B V, ROSLIND A, *et al.* Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(2): 194-202. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0011.
- [5] PUSZTAI C, YUSENKO M V, BANYAI D, *et al.* M2 macrophage marker chitinase 3-like 2 (CHI3L2) associates with progression of conventional renal cell carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(12): 6939-6943. DOI: 10.21873/anticancer.13915.
- [6] ZHANG X N, SHI X Z, ZHAO H, *et al.* Identification and validation of a tumor microenvironment-related gene signature for prognostic prediction in advanced-stage non-small-cell lung cancer [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8864436[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8028741/>. DOI: 10.1155/2021/8864436.
- [7] LITVIAKOV N, TSYGANOV M, LARIONOVA I, *et al.* Expression of M2 macrophage markers YKL-39 and CCL18 in breast cancer is associated with the effect of neoadjuvant chemotherapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 82(1): 99-109. DOI: 10.1007/s00280-018-3594-8.
- [8] NIMBALKAR V P, KRUTHIKA B S, SRAVYA P, *et al.* Chitinase 3-like 2[J]. *Am J Clin Pathol*, 2022, 158(4): 521-529. DOI: 10.1093/ajcp/aqac082.
- [9] LIU L L, YANG Y Z, DUAN H, *et al.* CHI3L2 is a novel prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gliomas[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 611038[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8084183/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.611038.
- [10] QIAN W B, WANG Q, ZHANG C, *et al.* M2 macrophage marker CHI3L2 could serve as a potential prognostic and immunological biomarker in glioma by integrated single-cell and bulk RNA-Seq analysis[J/OL]. *J Gene Med*, 2023, 25(9): e3523[2024-04-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37147894/>. DOI: 10.1002/jgm.3523.
- [11] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, TRUITT G, *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015[J/OL]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(suppl_4): iv1-iv86[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6129949/>. DOI: 10.1093/neuonc/noy131.
- [12] YANG X L, XIAO Z, DU X W, *et al.* Silencing of the long non-coding RNA NEAT1 suppresses glioma stem-like properties through modulation of the miR-107/CDK6 pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 555-562. DOI: 10.3892/or.2016.5266.
- [13] STUPP R, TAILLIBERT S, KANNER A, *et al.* Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial[J/OL]. *JAMA*, 2017, 318(23): 2306-2316 [2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5820703/>. DOI: 10.1001/jama.2017.18718.
- [14] MA Q Q, LONG W Y, XING C S, *et al.* Cancer stem cells and immunosuppressive microenvironment in glioma[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2924[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6308128/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02924.
- [15] YAN D, KOWAL J, AKKARI L, *et al.* Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor abrogates microenvironment-mediated therapeutic resistance in gliomas[J/OL]. *Oncogene*, 2017, 36(43): 6049-6058[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666319/>. DOI: 10.1038/nc.2017.261.
- [16] KU B M, LEE Y K, RYU J, *et al.* CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(6): 1316-1326. DOI: 10.1002/ijc.25466.
- [17] KZHYSHKOWSKA J, LARIONOVA I, LIU T F. YKL-39 as a potential new target for anti-angiogenic therapy in cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2930[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6988383/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02930.
- [18] BAGHDADI M, WADA H, NAKANISHI S, *et al.* Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(20): 6030-6042. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1170.
- [19] LARIONOVA I, CHERDYNTSEVA N, LIU T F, *et al.* Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(7): 1596004[2024-04-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31143517/>. DOI: 10.1080/2162402X.2019.1596004.
- [20] 刘洪军, 漆建, 尹久, 等. 基于 Oncomine 数据库及 GEPIA 数据库分析 CHI3L2 基因在胶质母细胞瘤中的表达及与预后的相关性 [J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(20): 3506-3510. DOI: 10.3969/j.

- issn.1672-4992.2020.20.009.
- [21] WICK W, PLATTEN M, MEISNER C, *et al.* Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(7): 707-715. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X.
- [22] MANSOURI A, HACHEM L D, MANSOURI S, *et al.* MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges[J/OL]. *Neuro Oncol*, 2019, 21(2): 167-178 [2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6374759/>. DOI: 10.1093/neuonc/noy132.
- [23] GUGLIETTA S, RESCIGNO M. Hypercoagulation and complement: connected players in tumor development and metastases[J]. *Semin Immunol*, 2016, 28(6): 578-586. DOI: 10.1016/j.smim.2016.10.011.
- [24] CHO A, MCKELVEY K J, LEE A, *et al.* The intertwined fates of inflammation and coagulation in glioma[J]. *Mamm Genome*, 2018, 29(11/12): 806-816. DOI: 10.1007/s00335-018-9761-8.
- [25] MORGAN E R, MASON W P, MAURICE C. A critical balance: managing coagulation in patients with glioma[J]. *Expert Rev Neurother*, 2016, 16(7): 803-814. DOI: 10.1080/14737175.2016.1181542.
- [26] ZHU H T, YU X J, ZHANG S J, *et al.* Targeting the complement pathway in malignant glioma microenvironments[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 657472[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8047198/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.657472.
- [27] YANG J M, SHEN L, YANG J Y, *et al.* Complement and coagulation cascades are associated with prognosis and the immune microenvironment of lower-grade glioma[J/OL]. *Transl Cancer Res*, 2024, 13(1): 112-136[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10894340/>. DOI: 10.21037/tcr-23-906.
- [28] JUNKER N, JOHANSEN J S, HANSEN L T, *et al.* Regulation of YKL-40 expression during genotoxic or microenvironmental stress in human glioblastoma cells[J/OL]. *Cancer Sci*, 2005, 96(3): 183-190[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11158589/>. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2005.00026.x.
- [29] 曲琳卓, 关宏铜. 神经胶质瘤的免疫治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(6): 613-620. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2024.06.011.
- [30] HUSSAIN S F, YANG D, SUKI D, *et al.* The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses[J/OL]. *Neuro Oncol*, 2006, 8(3): 261-279[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1871955/>. DOI: 10.1215/15228517-2006-008.
- [31] WANG Z L, WANG Z, LI G Z, *et al.* Immune cytolytic activity is associated with genetic and clinical properties of glioma[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1756[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6688525/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01756.
- [32] ARESHKOV P O, AVDIEIEV S S, BALYNSKA O V, *et al.* Two closely related human members of chitinase-like family, CHI3L1 and CHI3L2, activate ERK1/2 in 293 and U373 cells but have the different influence on cell proliferation[J/OL]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(1): 39-48[2024-04-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3226031/>. DOI: 10.7150/ijbs.8.39.
- [收稿日期] 2024-04-06 [修回日期] 2024-09-19
[本文编辑] 党瑞山