

CLDN11 在结肠癌中的预后价值及其作为潜在免疫治疗靶点的研究

操利超,张核子,余晨笛,卢晓萍,巴颖

(深圳市核子基因科技有限公司,广东 深圳 518071)

摘要:目的 分析 CLDN11 在结肠癌等肿瘤样本中的表达情况,探讨其预后价值及其与常见的免疫治疗靶点基因的相关性。方法 利用 TIMER2.0 在线分析 CLDN11 在泛癌种中的基因表达情况,分析 CLDN11 基因的表达与免疫细胞浸润水平的相关性。利用 GEPIA2 在线分析 CLDN11 与结肠癌患者总生存时间(OS)和无病生存时间(DFS)的关联,评价其在泛癌种中的预后价值。从 TCGA 数据库中下载结肠癌相关的 mRNA 表达数据矩阵和临床信息,分析 CLDN11 基因的表达在 TMN 分期和微卫星状态的关系,以及与免疫治疗靶点的相关性。其中,相关性大小用相关性系数(cor)表示。结果 CLDN11 在多种肿瘤包括结肠癌中高表达,在胆管癌(CHOL)和甲状腺癌(THCA)中低表达,且 CLDN11 的低表达与多种肿瘤患者的良好预后显著相关($P<0.05$);Kruskal-wallis 检验结果表明,CLDN11 的高表达与较高的 T 分期 ($P=0.019$)、M 分期 ($P=0.0076$)、N 分期 ($P=0.0043$)、病理分期($P=0.013$)和较稳定的微卫星状态($P=5.4e-5$)相关。CLDN11 的表达与免疫治疗靶点基因 CD274、CTLA4、HAVCR2、LAG3、PDCD1、TIGIT 的表达显著正相关($cor>0.25$, $P<0.05$)。结论 CLDN11 可作为多种肿瘤的预后标志物,且可作为结肠癌肿瘤分期的预测因子和潜在的免疫治疗靶点。

关键词:CLDN11;结肠癌;预后评估;生物信息学;TCGA 数据库

中图分类号:R714.24

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.14.002

文章编号:1006-1959(2022)14-0010-06

The Prognostic Value of CLDN11 in Colon Cancer and its Potential Immunotherapy Targets

CAO Li-chao,ZHANG He-zi,YU Chen-di,LU Xiao-ping,BA Ying

(Shenzhen Nucleus Gene Technology Co., Ltd., Shenzhen 518071,Guangdong,China)

Abstract: Objective To analyze the expression of CLDN11 in colon cancer and other tumor samples, and to explore its prognostic value and its correlation with common immunotherapy target genes.**Methods** TIMER2.0 was used to analyze the gene expression of CLDN11 in pan-cancer species online, and the correlation between CLDN11 gene expression and immune cell invasion was analyzed. GEPIA2 was used to online analyze the correlation between CLDN11 and total survival time (OS) and disease-free survival time (DFS) of colon cancer patients, and to evaluate its prognostic value in pan-cancer species. Download the mRNA expression data matrix and clinical information related to colon cancer from TCGA database, analyze the relationship between CLDN11 gene expression in TMN stage and microsatellite status, and the correlation with immunotherapy targets, where the correlation was expressed by the correlation coefficient (cor).**Results** CLDN11 was highly expressed in various tumors, including colon cancer, and lowly expressed in cholangiocarcinoma (CHOL) and thyroid cancer (THCA). The low expression of CLDN11 was significantly correlated with the good prognosis of patients with various tumors ($P<0.05$). The Kruskal-wallis test results showed that the high expression of CLDN11 was related to higher T staging ($P=0.019$), M staging ($P=0.0076$), N staging ($P=0.0043$), pathological staging ($P=0.013$) and stable microsatellite status ($P=5.4e-5$). The expression of CLDN11 was significantly positively correlated with the expression of CD274, CTLA4, HAVCR2, LAG3, PDCD1 and TIGIT ($cor>0.25$, $P<0.05$).**Conclusion** CLDN11 can be used as a prognostic marker for a variety of tumors, and can be used as a predictor of tumor staging of colon cancer and a potential target for immunotherapy.

Key words:CLDN11;Colon cancer;Prognosis evaluation;Bioinformatics;TCGA database

随着科学的发展,结肠癌在诊断筛查、预后和治疗等方面已取得了长足的进步,但其仍是世界上死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1]。有研究表明^[2-4],肿瘤微环境可能在肿瘤的发生、发展和治疗中发挥着重要的作用。近年来,一些研究从肿瘤免疫微环境中挖掘多种肿瘤分子标志物,用于肿瘤的预后、诊断和免疫治疗^[5-8]。CLDN11 是 claudin 家族的成员之一,是一种编码蛋白基因。有研究表明,claudin 家族成员

在多种肿瘤组织中均出现异常表达情况,且与多种肿瘤的预后相关^[9-12]。然而,尚缺少研究全面探讨 CLDN11 与多种肿瘤的预后和肿瘤微环境特征之间的关联。基于此,本研究将以结肠癌为例,重点探讨 CLDN11 作为潜在的标志物与结肠癌预后、肿瘤微环境特征和免疫治疗的相关性,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 数据来源 结肠癌的 mRNA 表达数据集和对应的临床信息、生存数据信息从 UCSC Xena 平台 (<https://xenabrowser.net/datapages/>) 下载,选择队列为 GDC TCGA Colon Cancer (TCGA-COAD)。总计 471 个样本,其中肿瘤样本 432 个,正常样本 39 个,对应的临床信息包括性别、年龄、病理分期、TMN 分期、总生存时间和无病生存时间。

1.2 TIMER2.0 在线分析 使用 TIMER2.0 (<http://>

作者简介:操利超(1984.4-),男,湖北黄冈人,硕士,工程师,主要从事基于多组学测序数据和临床指标的结直肠癌预测诊断和预后模型的研究

通讯作者:巴颖(1972.11-),女,辽宁辽阳人,硕士,主治医师,主要从事基因组学研究及其在人类疾病早筛早诊领域的应用

timer.cistrome.org/)进行在线分析^[13]。打开主页,选择“Exploration”菜单,点击“Gene_DE”选项卡,在文本框中输入“CLDN11”,点击“Submit”按钮,查看 CLDN11 在各种肿瘤中表达情况。接着,选择“Immune”菜单,点击“Gene”选项卡,在“Gene Expression”文本框中输入“CLDN11”,在“Immune Infiltrates”下选项中选择所有的免疫细胞类型,点击“Submit”按钮,查看 CLDN11 的表达与各种免疫细胞浸润程度的相关性。 $P < 0.05$ 为判断显著性的标准。

1.3 GEPIA2 在线分析 使用 GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)进行在线生存分析^[14]。打开主页,在左侧菜单栏选择“Expression Analysis”,选择子菜单“Survival Analysis”进入生存分析页面。在该页面中,选择“Gene”选项并填入“CLDN11”,“Methods”分别进行“Overall Survival”和“Disease Free Survival (RFS)”分析,“Datasets”每次选择 1 个数据集,其它参数默认,点击“Plot”提交分析,即可分析 CLDN11 的表达水平与不同肿瘤的总生存时间和无病生存时间的相关性。其中, $P < 0.05$ 作为 CLDN11 是否可以作为独立的预后因子的判断标准。

1.4 CLDN11 的表达与微卫星状态、免疫治疗靶点、结肠癌肿瘤分期的关联 选择 TCGA-COAD 队列中的肿瘤样本,根据其微卫星状态,将样本分为微卫星稳定组(MSS)、微卫星高不稳定组(MSI-H)和微卫

星低不稳定组(MSI-L)。利用 Kruskal-Wallis 检验分析比较这三组中 CLDN11 表达水平的差异性。并利用 R 软件中的 cor.test 分析 CLDN11 的表达与 CD274、CTLA4、HAVCR2、LAG3、PDCD1 和 TIGIT 的表达相关性,显著性判断标准为 $P < 0.05$ 。根据样本的肿瘤分期信息,利用 Kruskal-Wallis 检验和 Wilcoxon 检验分析 CLDN11 的表达与肿瘤 TMN 分析、病理分期的相关性。上述分析过程利用 R 语言(版本 3.6.1, <https://www.r-project.org/>)完成。

2 结果

2.1 CLDN11 在泛癌种中的表达情况和预后分析 CLDN11 在膀胱癌(BLCA)、乳腺癌(BRCA)、结肠癌(COAD)、头颈癌(HNSC)、肾嫌色细胞癌(KICH)、肾透明细胞癌(KIRC)、肾乳头细胞癌(KIRP)、肝癌(LIHC)、肺腺癌(LUAD)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、前列腺癌(PRAD)、直肠癌(READ)、子宫内膜样癌(UCEC)等肿瘤中高表达($P < 0.05$),而在胆管癌(CHOL)和甲状腺癌(THCA)中低表达($P < 0.05$),见图 1A。对于结肠癌(COAD)、肾乳头细胞癌(KIRP)、肾透明细胞癌(KIRC)和胃癌(STAD),低表达组(Low CLDN11 Group)的总生存时间和无病生存时间等预后指标均表现较好,而对于黑色素瘤(SCKM),高表达组(High CLDN11 Group)的预后表现较好($P < 0.05$),见图 1B~图 1K。

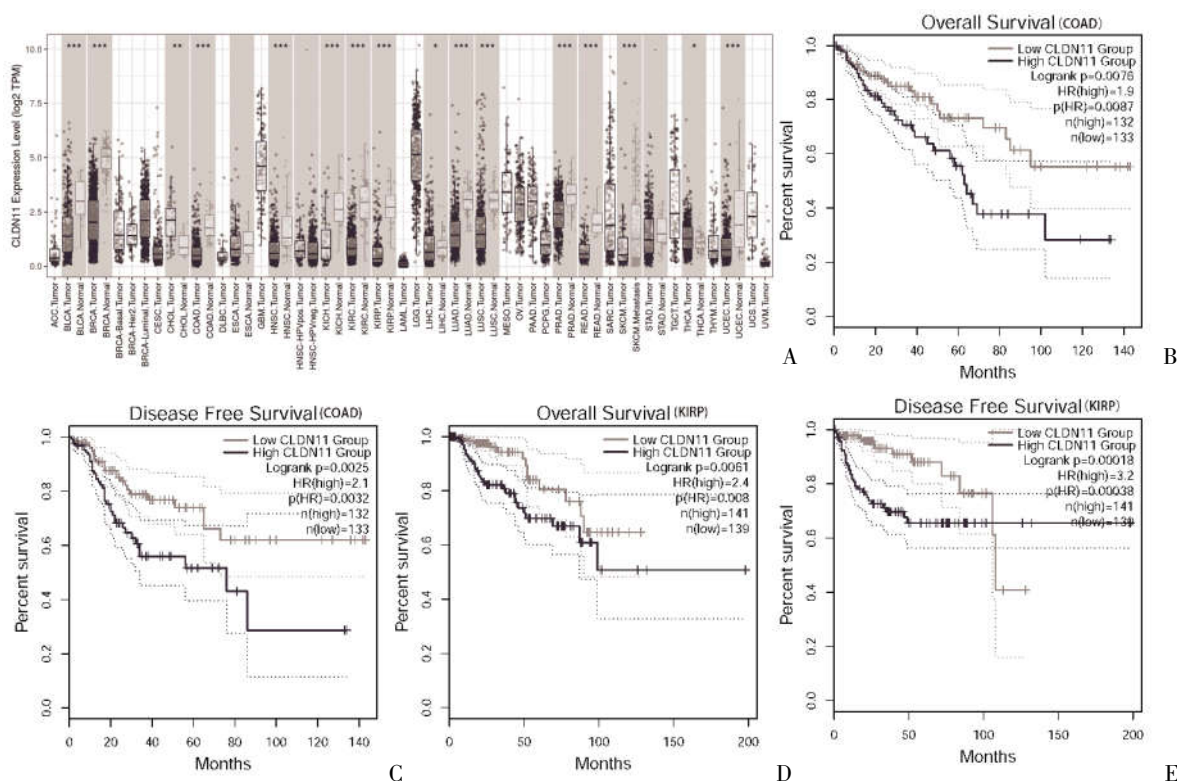


图 1 CLDN11 在泛癌种中的表达与生存预后分析

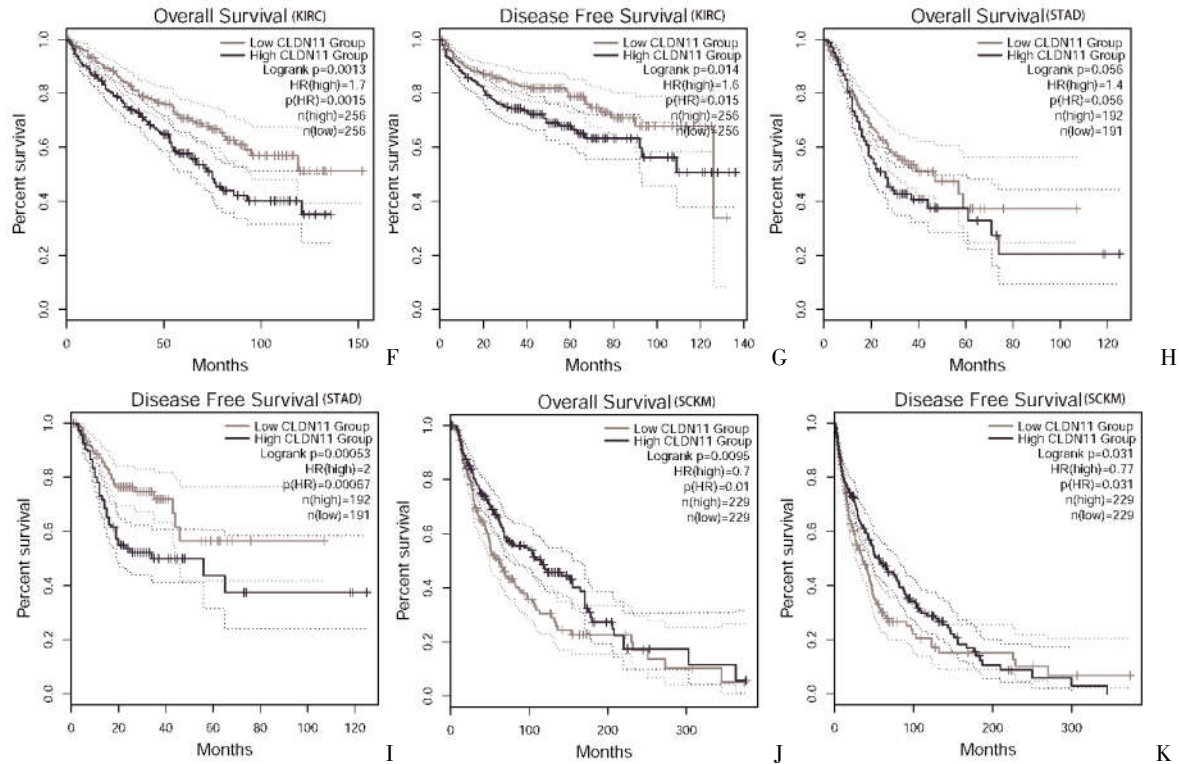


图1 CLDN11在泛癌种中的表达与生存预后分析(续)

2.2 结肠癌样本中 CLDN11 的表达与免疫细胞浸润程度的相关性分析 CLDN11 的表达水平与 CD4⁺T 细胞(CD4⁺TCell)、巨噬细胞(Macrophage)、中性粒细胞(Neutrophil)和树突状细胞(Dendritic Cell)的浸润水平正相关($\text{cor} > 0.1, P < 0.05$),见图 2。

2.3 结肠癌样本中 CLDN11 的表达与微卫星状态、免疫治疗靶点的相关性分析 CLDN11 在微卫星稳定组和微卫星低不稳定组的表达没有明显差异 ($P=0.4$),而微卫星状态越稳定,CLDN11 的表达水平越高($P < 0.05$),见图 3A。此外,CLDN11 的表达与常见的免疫治疗靶点基因的表达显著正相关(CD274:

$\text{cor} = 0.347, P = 1.639 \times 10^{-15}$; CTLA4: $\text{cor} = 0.293, P = 2.857 \times 10^{-11}$; HAVCR2: $\text{cor} = 0.489, P = 3.308 \times 10^{-31}$; LAG3: $\text{cor} = 0.369, P = 2.119 \times 10^{-17}$; PDCD1: $\text{cor} = 0.327, P = 8.046 \times 10^{-14}$; TIGIT: $\text{cor} = 0.407, P = 3.549 \times 10^{-21}$),见图 3B~图 3G。

2.4 CLDN11 表达水平与在结肠癌肿瘤分期的关联 CLDN11 表达量越高,预示着肿瘤的体积和浸润的范围越大 ($P=0.019$),肿瘤发生转移的可能性越高 ($P=0.0076$),与肿瘤相关的淋巴结转移越多 ($P=0.0043$),病理分期程度越高 ($P=0.013$),见图 4。

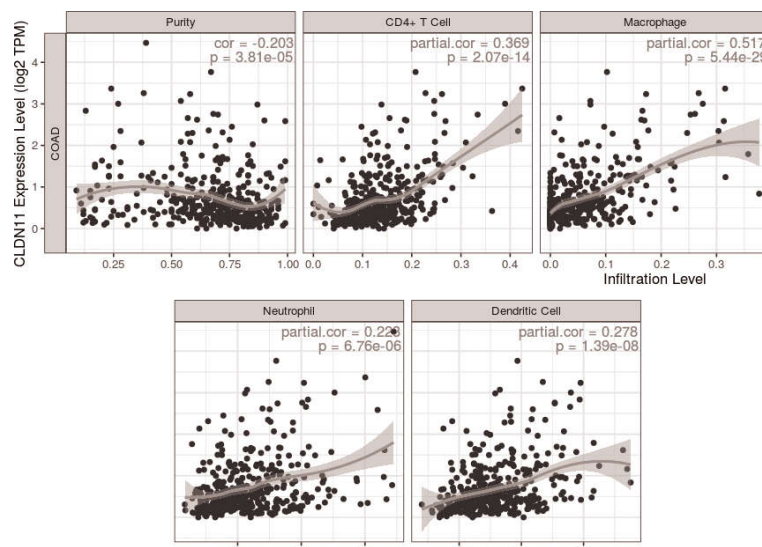


图2 CLDN11的表达与免疫细胞浸润程度的相关性

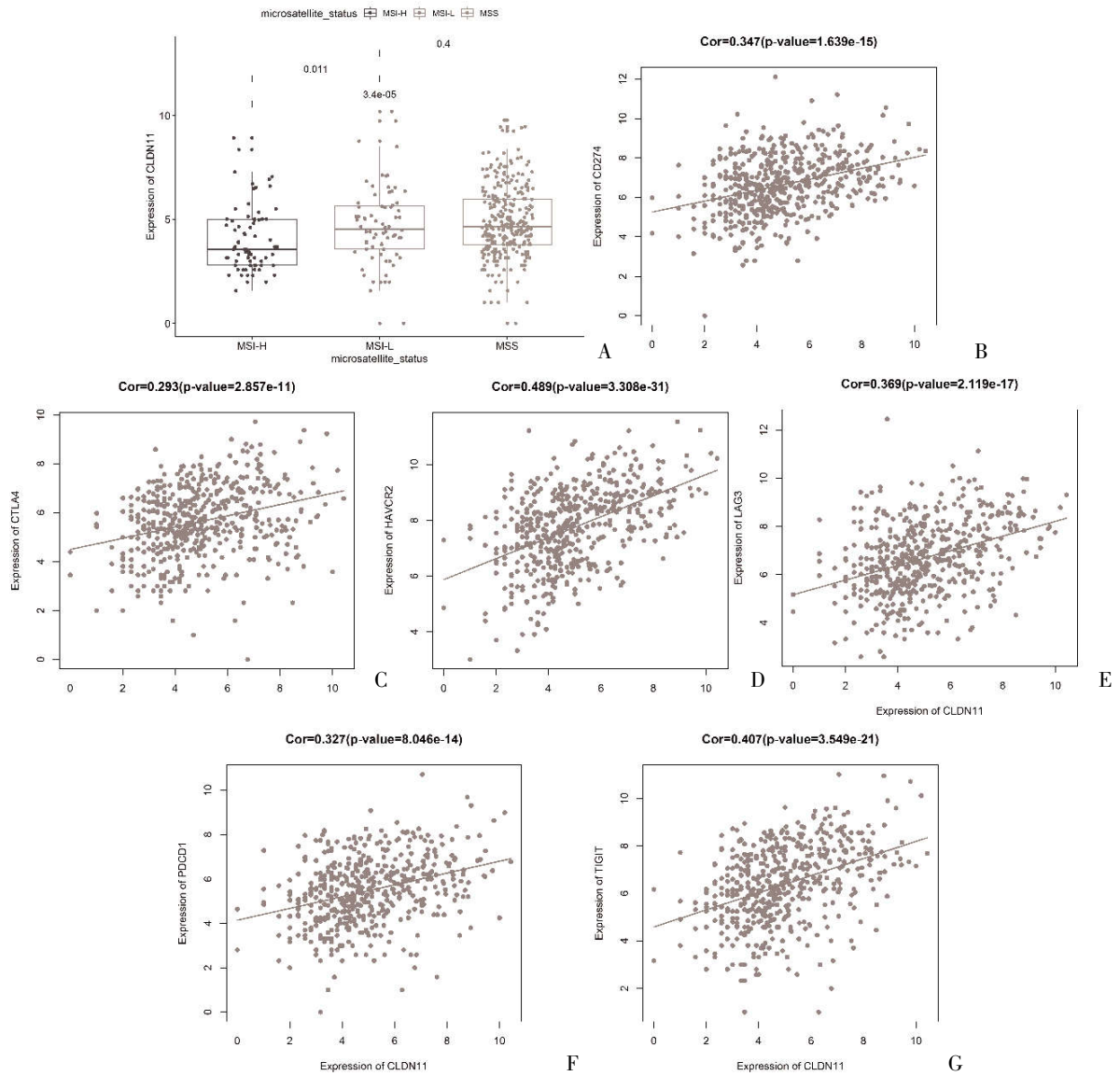


图 3 CLDN11 的表达与免疫治疗靶点的相关性

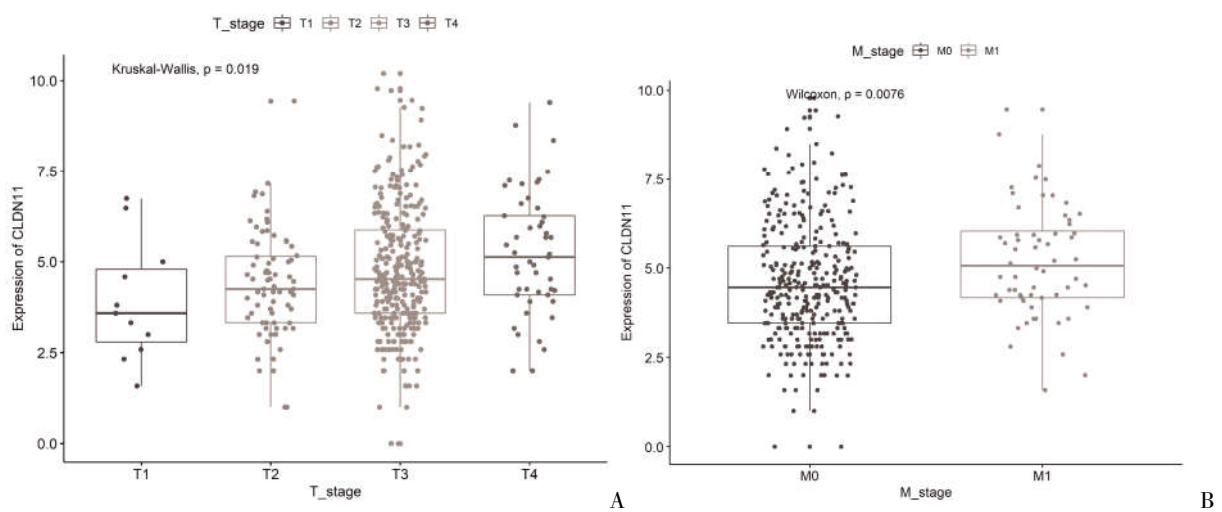


图 4 CLDN11 的表达与结肠癌肿瘤分期的相关性

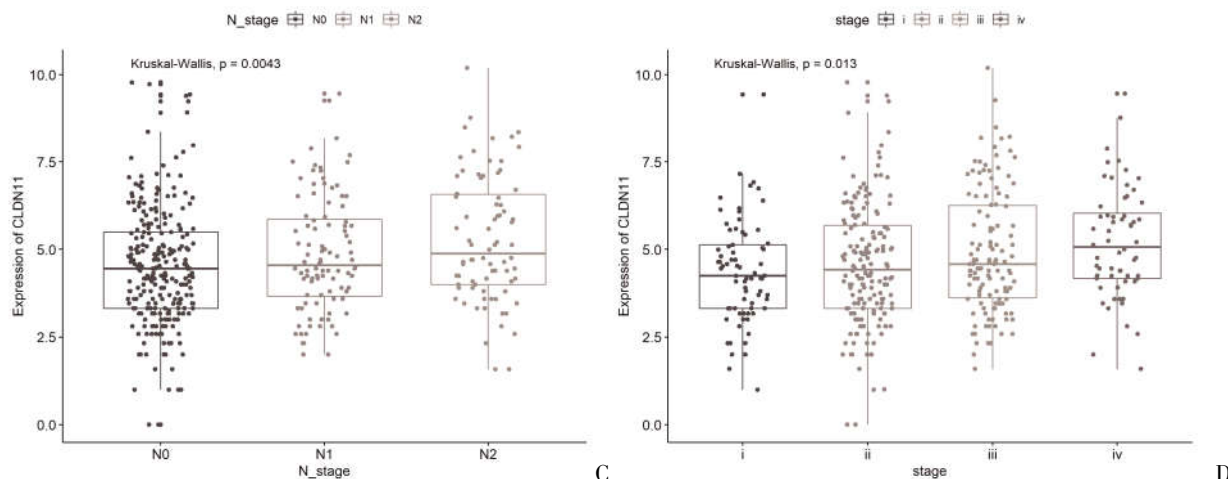


图4 CLDN11的表达与结肠癌肿瘤分期的相关性(续)

3 讨论

本研究结果表明,CLDN11在大多数肿瘤中低表达。CLDN11由于被高度甲基化而导致表达下调,并通过与微管蛋白相关作用,阻断微管蛋白的聚合和细胞迁移活动,从而导致肿瘤的发生^[15]。有研究表明^[15-17],CLDN11在多种肿瘤中作为一种潜在的肿瘤抑制基因而发挥作用。此外,本研究发现CLDN11可以作为多种肿瘤的独立的预后预测因子,且在大多数肿瘤CLDN11低表达组的预后相对良好。

在结肠癌中,本研究和既往报道的文献^[18]均表明CLDN11低表达的患者预示着总生存期越长;而在乳腺癌中则相反,CLDN11高表达的患者预后相对较差^[19,20]。其次,在结肠癌中,CLDN11的表达水平越高,CD4⁺T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞的浸润水平浸润越明显,这几种免疫细胞在抗肿瘤免疫中有着重要的调控作用。Borst J等^[21]概述了介导CD4⁺T细胞调控的细胞动力学和膜受体,可增强肿瘤内细胞毒性T淋巴细胞(scytotoxic T lymphocytes, CTL)的抗肿瘤活性。有研究表明^[22],巨噬细胞是具有高度可塑性的细胞,具有多种功能,包括组织发育和体内平衡、清除细胞碎片、清除病原体 and 调节炎症反应等,以巨噬细胞为基础,减少抗炎性巨噬细胞并增加促炎(抗肿瘤)巨噬细胞,达到肿瘤免疫治疗的目的。

在肿瘤微环境中,中性粒细胞具有不同的功能,能够对包括癌症在内的各种炎症信号做出应答反应,对肿瘤患者的预后会有一定的影响^[23]。树突

状细胞是一种异质性白细胞群,由驱动特定类型免疫反应的不同亚群组成,能启动和调节适应性免疫反应,从而达到抗肿瘤免疫反应的目的^[24]。因此,通过调控CLDN11的表达水平,可间接调控抗肿瘤免疫反应,从而达到免疫治疗的目的。此外,在结肠癌患者中,CLDN11的表达水平越低,微卫星状态越不稳定。有研究表明,微卫星高不稳定患者对免疫检查点抑制剂越敏感,将从免疫治疗中获益^[25-27],且CLDN11的表达与多种常见的免疫治疗靶点基因的表达呈现显著的正相关,进一步表明CLDN11可作为潜在的免疫治疗靶点。另外,在结肠癌中,CLDN11的表达水平与肿瘤的增值、转移和侵袭呈显著正相关,表明CLDN11可作为结肠癌分期等级的预测因子。

然而,本研究也存在一些不足之处:首先,本研究还需要更多的样本队列来进行交叉实验验证;其次,CLDN11的异常表达对于肿瘤的发生、发展和预后的影响尚待进一步开展机制研究和探讨;最后,CLDN11作为潜在的免疫治疗靶点是否具有临床价值尚待开展临床实验验证和作用机制研究。

综上所述,CLDN11在评估结肠癌患者复发风险分层、肿瘤分期、免疫治疗等方面具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1]Siegel RL,Miller KD,Fuchs HE,et al.Cancer statistics,2022[J].CA Cancer J Clin,2022,72(1):7-33.
- [2]Lei X,Lei Y,Li JK,et al.Immune cells within the tumor microenvironment:Biological functions and roles in cancer immunotherapy[J].Cancer Lett,2020,470:126-133.

- [3]Hinshaw DC,Shevde LA.The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression [J].Cancer Res,2019,79(18):4557–4566.
- [4]Xiao Y,Yu D.Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer[J].Pharmacol Ther,2021,221:107753.
- [5]Cao L,Li T,Ba Y,et al.Exploring Immune-Related Prognostic Signatures in the Tumor Microenvironment of Colon Cancer[J].Front Genet,2022,13:801484.
- [6]Cao L,Chen E,Zhang H,et al.Construction of a novel methylation-related prognostic model for colorectal cancer based on microsatellite status[J].J Cell Biochem,2021,122(12):1781–1790.
- [7]Herrera M,Berral-Gonzalez A,Lopez-Cade I,et al.Cancer-associated fibroblast-derived gene signatures determine prognosis in colon cancer patients[J].Mol Cancer,2021,20(1):73.
- [8]Li X,Wen D,Li X,et al.Identification of an Immune Signature Predicting Prognosis Risk and Lymphocyte Infiltration in Colon Cancer[J].Front Immunol,2020,11:1678.
- [9]Lu Y,Jing J,Sun L,et al.Expression of claudin-11,-23 in different gastric tissues and its relationship with the risk and prognosis of gastric cancer[J].PLoS One,2017,12(3):e0174476.
- [10]Yang G,Jian L,Chen Q.Comprehensive analysis of expression and prognostic value of the claudin family in human breast cancer[J].Aging(Albany NY),2021,13(6):8777–8796.
- [11]Rahman A,Kobayashi M,Sugimoto K,et al.Reduced Claudin-12 Expression Predicts Poor Prognosis in Cervical Cancer[J].Int J Mol Sci,2021,22(7):3774.
- [12]Zhang C,Guo C,Li Y,et al.Identification of Claudin-6 as a Molecular Biomarker in Pan-Cancer Through Multiple Omics Integrative Analysis[J].Front Cell Dev Biol,2021,9:726656.
- [13]Li T,Fu J,Zeng Z,et al.TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells [J].Nucleic Acids Res,2020,48 (W1): W509–W514.
- [14]Tang Z,Kang B,Li C,et al.GEPIA2:an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis [J].Nucleic Acids Res,2019,47(W1):W556–W560.
- [15]Li HP,Peng CC,Wu CC,et al.Inactivation of the tight junction gene CLDN11 by aberrant hypermethylation modulates tubulins polymerization and promotes cell migration in nasopharyngeal carcinoma[J].J Exp Clin Cancer Res,2018,37(1):102.
- [16]Li J,Zhou C,Ni S,et al.Methylated claudin-11 associated with metastasis and poor survival of colorectal cancer[J].Ncotarget,2017,8(56):96249–96262.
- [17]Shen Z,Cao B,Lin L,et al.The Clinical Signification of Claudin-11 Promoter Hypermethylation for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma[J].Med Sci Monit,2017,23:3635–3640.
- [18]Cherradi S,Martineau P,Gongora C,et al.Claudin gene expression profiles and clinical value in colorectal tumors classified according to their molecular subtype [J].Cancer Manag Res,2019,11:1337–1348.
- [19]Yang G,Jian L,Chen Q.Comprehensive analysis of expression and prognostic value of the claudin family in human breast cancer[J].Aging,2021,13(6):8777–8796.
- [20]Wang Y,Shi H,Zhang Y,et al.Identification of Differentially Expressed Hub Genes Associated With Immune Cell Recruitment in Claudin-Low Breast Cancer [J].Front Oncol,2022,12: 848206.
- [21]Borst J,Ahrends T,Babala N,et al.CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy [J].Nat Rev Immunol,2018,18(10):635–647.
- [22]Anderson NR,Minutolo NG,Gill S,et al.Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy [J].Cancer Res,2021,81(5):1201–1208.
- [23]Giese MA,Hind LE,Huttenloche RA.Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment[J].Blood,2019,133(20):2159–2167.
- [24]Lee YS,Radford KJ.The role of dendritic cells in cancer[J].Int Rev Cell Mol Biol,2019,348:123–178.
- [25]Lin A,Zhang J,Luo P.Crosstalk Between the MSI Status and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer [J].Front Immunol,2020,11:2039.
- [26]Bao X,Zhang H,Wu W,et al.Analysis of the molecular nature associated with microsatellite status in colon cancer identifies clinical implications for immunotherapy [J].J Immunother Cancer,2020,8:e001437.
- [27]Zhang X,Wu T,Cai X,et al.Neoadjuvant Immunotherapy for MSI-H/dMMR Locally Advanced Colorectal Cancer:New Strategies and Unveiled Opportunities [J].Front Immunol,2022,13:795972.

收稿日期:2021-05-07;修回日期:2021-06-09

编辑/肖婷婷