

# CCL2

黄志杰,马月龙,陈雅娟

(福建师范大学生命科学学院/细胞逆境响应与代谢调控福建省高校重点实验室,  
福建 福州 350108)

**摘要:**目的 分析趋化因子配体 2 (CCL2)与低级别胶质瘤(LGG)不良预后的相关性,构建用于评估 LGG 患者的 CCL2 相关基因预后模型。方法 通过 GEPIA 数据库与 TCGA 数据库中分别获得 TCGA 癌症数据以及 LGG 样本信息。鉴定 LGG 组织中与 CCL2 存在共表达关系的基因,并且对这些基因进行 KEGG 通路 GO 功能富集分析、Cox 单因素生存分析、蛋白质相互作用网络构建、对潜在预后模型的相关基因筛选并构建风险评分预后模型、对评分模型的预后区分能力评估。结果 总共鉴定了 1333 个 CCL2 共表达基因,分析 CCL2 在 LGG 中的表达及预后,发现 CCL2 在 LGG 中表达显著增强。富集分析结果显示 CCL2 共表达基因主要集中在免疫相关信号通路。构建了包含 31 个 CCL2 相关基因的预后模型,生存分析结果表明,高风险评分与 LGG 患者的不良预后相关,ROC 曲线表明该模型具有良好的准确性。风险评分相关的 nomogram 的 1、3 和 5 年生存率的 AUC 值分别为 0.93、0.91 和 0.888,显示该模型具有较好的预后区分能力。结论 CCL2 高表达与 LGG 预后不良密切相关,是评估 LGG 预后的有效指标,本研究成功构建了用于评估 LGG 患者预后的 CCL2 相关基因预后模型。

**关键词:**低级别胶质瘤;CCL2;WGCNA;免疫;预后

**中图分类号:**R739.4

**文献标识码:**A

**DOI:**10.3969/j.issn.1006-1959.2022.15.002

**文章编号:**1006-1959(2022)15-0007-07

## Correlation Between High Expression of CCL2 and Poor Prognosis in Patients with Low Grade Glioma

HUANG Zhi-jie, MA Yue-long, CHEN Ya-juan

(College of Life Science, Fujian Normal University/the Provincial University Key Laboratory of Cellular Stress Response and Metabolic Regulation, Fuzhou 350108, Fujian, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the correlation between chemokine ligand 2 (CCL2) and poor prognosis of low grade glioma (LGG), and to construct a CCL2-related gene prognosis model for LGG patients. **Methods** TCGA cancer data and LGG sample information were obtained by GEPIA database and TCGA database respectively. The genes co-expressed with CCL2 in LGG tissue were identified, and the KEGG pathway and GO function enrichment analysis, Cox single factor survival analysis, protein interaction network construction, gene screening for potential prognostic model, risk score prognostic model construction, and prognostic discrimination ability evaluation of the scoring model were performed on these genes. **Results** A total of 1333 CCL2 co-expression genes were identified, and the expression and prognosis of CCL2 in LGG were analyzed. It was found that the expression of CCL2 in LGG was significantly enhanced. The enrichment analysis showed that CCL2 co-expression genes were mainly concentrated in immune-related signaling pathways. A prognostic model containing 31 CCL2-related genes was constructed. Survival analysis showed that high risk score was associated with poor prognosis of LGG patients. ROC curve showed that the model had good accuracy. The AUC values of 1-, 3- and 5-year survival rates of nomogram related to risk score were 0.93, 0.91 and 0.888, respectively, indicating that the model had good prognosis discrimination ability. **Conclusion** The high expression of CCL2 is closely related to the poor prognosis of LGG, which is an effective indicator to evaluate the prognosis of LGG. This study successfully constructed a CCL2-related gene prognosis model for evaluating the prognosis of LGG patients.

**Key words:** Low grade glioma; CCL2; WGCNA; Immune; Prognosis

低级别胶质瘤(low-grade gliomas, LGG)又称脑胶质瘤,简称胶质瘤,是起源于神经胶质细胞的神经上皮肿瘤<sup>[1]</sup>,具有进展快、预后差、复发率高、致死率高的特点。2021 年世界卫生组织将胶质瘤从

I 级(最低级别)到 IV 级(最高级别)进行分类, LGG 通常包括 I 级胶质瘤和 II 级胶质瘤<sup>[2]</sup>。LGG 约占原发性脑肿瘤的 20%,典型的 LGG 患者为年龄在 30~40 岁的年轻人,多因癫痫发作而就医<sup>[3]</sup>。LGG 患者具有生存期长、自然病史长、弥散性生长、临床预后差异性大等特点,使得观察与积极干预的治疗决策至关重要。促使 LGG 获得全面高效治疗的措施成为目前神经肿瘤学的研究热点。趋化因子是一类能够趋化细胞定向移动的小分子分泌蛋白,趋化因子配体 2 [chemokine (C-C motif) ligand 2, CCL2] 又

基金项目:福建省自然科学基金面上项目(编号:2019J01278)

作者简介:黄志杰(1994.10-),男,福建漳州人,硕士研究生,主要从事细胞逆境响应与代谢调控研究

通讯作者:陈雅娟(1979.8-),女,福建漳州人,博士,讲师,硕士生导师,主要从事细胞逆境响应与代谢调控研究

名单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant-protein-1, MCP-1),是趋化因子中的一员,由于其在癌症免疫治疗中起着重要的作用<sup>[4]</sup>,因此成为趋化因子中CC亚族的重要成员。CCL2于1989年从单核细胞中纯化和克隆得到<sup>[5]</sup>。研究表明,CCL2不仅对单核细胞,还对巨噬细胞<sup>[6]</sup>、记忆T细胞<sup>[7]</sup>、自然杀伤(NK)细胞都具有趋化活性,从而将这些细胞募集到组织损伤和炎症反应的部位<sup>[8]</sup>。CCL2在许多类型的细胞中表达,这些细胞在外周循环和组织中的抗病毒免疫反应中具有重要作用<sup>[9]</sup>。近年来,关于趋化因子与癌症进展之间关系的报道日益增多。CCR2是CCL2在人体内发挥生物学效应的最主要受体。有研究发现<sup>[10]</sup>,CCL2-CCR2在肿瘤细胞的增殖、侵袭、创造肿瘤微环境(TME)过程中具有多种作用。且已有研究表明,CCL2-CCR2信号轴参与了包括乳腺癌<sup>[11]</sup>、前列腺癌<sup>[12]</sup>、肺癌<sup>[13]</sup>、肝细胞癌<sup>[14]</sup>、胰腺癌<sup>[15]</sup>、膀胱癌<sup>[6]</sup>、鼻咽癌<sup>[16]</sup>和肾癌<sup>[17]</sup>的发生和进展。因此,许多临床研究已将CCL2-CCR2轴确定为早期诊断和不良预后的预测依据<sup>[18]</sup>。同时也有研究在人脑胶质瘤细胞系中趋化因子的表达中检测到CCL2信使RNA<sup>[9]</sup>。但目前CCL2在LGG进展中的具体作用机制以及预后价值尚缺乏相关的研究报告。本研究主要关注CCL2在LGG中的表达及预后,同时研究CCL2共表达基因网络,分析其在LGG中的潜在作用机制,构建CCL2相关基因的LGG患者预后模型,旨在为LGG临床预后诊断提供支持。

## 1 资料与方法

1.1 CCL2基因表达分析 基于GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis)的TCGA癌症数据分析LGG组织与正常组织中CCL2基因的mRNA表达差异(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)。其中LGG组织样本有518例,正常组织有207例。 $\log_2FC \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 被认为存在显著性差异。

1.2 CCL2基因生存分析 下载TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)中的LGG样本信息,使用R包“survival”进行CCL2表达的生存分析,并通过“survivalROC”分析ROC曲线。其中用于生存分析具有完整临床信息的样本有506例。对数秩检验 $P$ 值( $\log\text{-rank } P$ ) $< 0.05$ 被认为存在显著性差异。

1.3 加权基因共表达网络分析(weighted correlation

network analysis, WGCNA)使用R语言中的“WGCNA”包进行分析。选择 $\beta=5$ 的幂和无标度 $R^2=0.95$ 作为软阈值参数,构建共表达基因网络。

1.4 CCL2相关基因功能富集分析 为了进一步分析CCL2共表达基因的潜在功能,本研究利用DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)数据库进行KEGG通路分析和GO-BP功能富集分析。

1.5 预后模型构建 通过TCGA数据库中的LGG数据,应用最小绝对收缩和选择算子(LASSO)构建CCL2相关基因特征。一个CCL2相关基因特征的风险评分公式是通过包括由其LASSO Cox系数加权的个体归一化基因表达值来建立的: $\sum i \text{Coefficient}(\text{mRNA}_i) \times \text{Expression}(\text{mRNA}_i)$ 。

1.6 统计学分析 使用 $t$ 检验分析LGG与癌旁组织中CCL2基因的差异表达。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

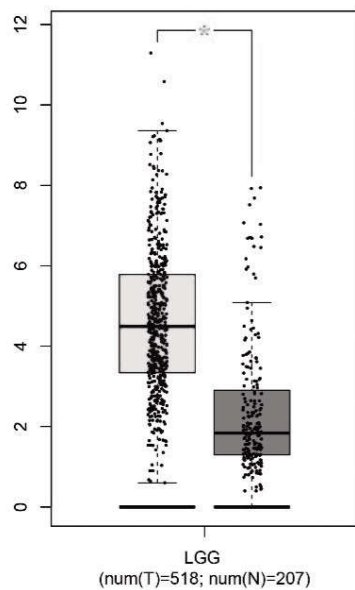
## 2 结果

2.1 CCL2在LGG组织中的表达与LGG患者预后相关性 GEPIA网站分析 CCL2在LGG患者组织及正常组织中的表达差异,结果显示CCL2在LGG患者组织中的表达显著高于正常组织(图1A);TCGA数据库中的LGG患者样本进行生存分析,结果显示CCL2高表达患者的生存时间显著低于CCL2低表达患者的生存时间,见图1B。

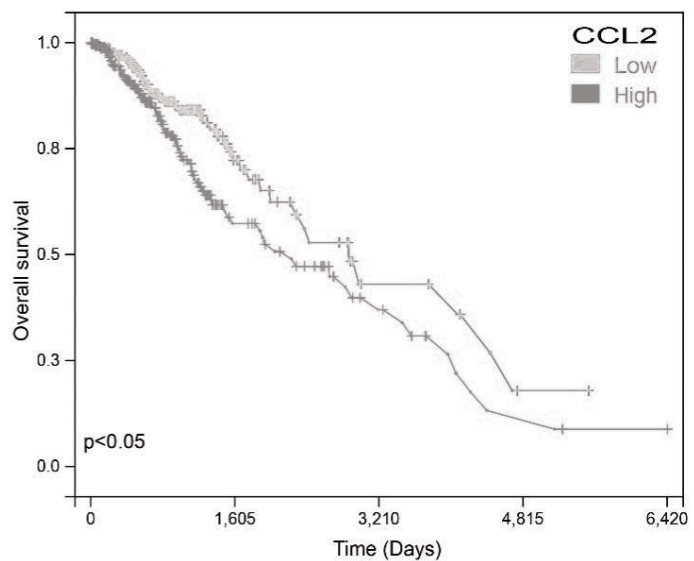
2.2 构建CCL2基因的共表达网络 通过WGCNA对TCGA数据集进行分析,以分析LGG组织中与CCL2存在共表达关系的基因。结果显示与CCL2存在共表达关系的有1333个基因,属于blue module,见图2A、图2B。为进一步研究CCL2共表达基因与肿瘤信号通路的关系,利用DAVID网站对这些基因进行KEGG-pathway及GO-BP富集分析,KEGG-pathway结果显示,以上基因富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用、结核、破骨细胞分化、金黄色葡萄球菌感染、用于IgA生产的肠道免疫网络、Th17细胞分化、B细胞受体信号通路、炎症性肠病(IBD)、T细胞受体信号通路及PD-L1在癌症中的表达和PD-1检查点通路,见图2C。GO-BP分析结果表明以上基因富集在防御反应、细胞活化、免疫系统过程的调节、对生物刺激的反应、免疫效应过程、免疫系统过程的正向调节、参与免疫反应的细胞活化、骨髓白细胞活化、T细胞活化及T细胞增殖,见图2D。

2.3 构建 CCL2 相关基因的 LGG 患者风险评分预后模型 利用 Cytoscape 及 MCODE 分析了 1333 个 CCL2 相关基因的蛋白互作网络。结果显示在 1333

个相关基因的蛋白互作图中与 CCL2 存在互作的蛋白有 55 个,见图 3。



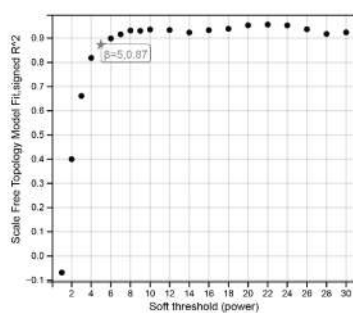
A



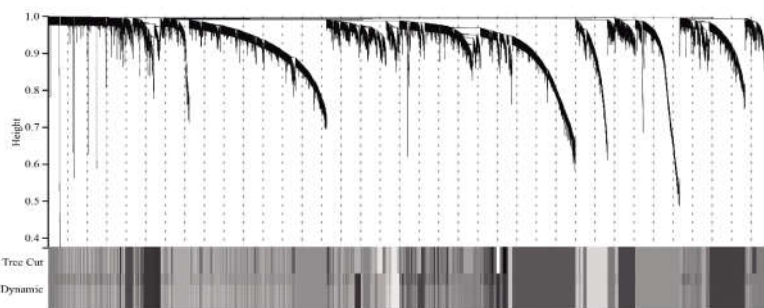
B

注:A:GEPIA 网站分析 CCL2 在 LGG 患者及正常组织中的表达差异;B:TCGA 数据分析 CCL2 表达在 LGG 患者中的预后

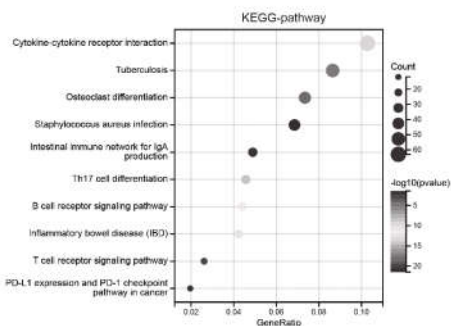
图 1 CCL2 在 LGG 患者中的表达及预后分析



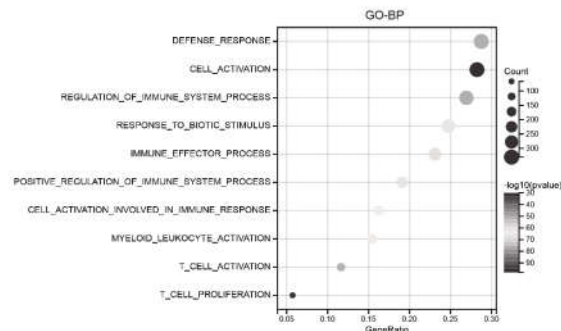
A



B



C



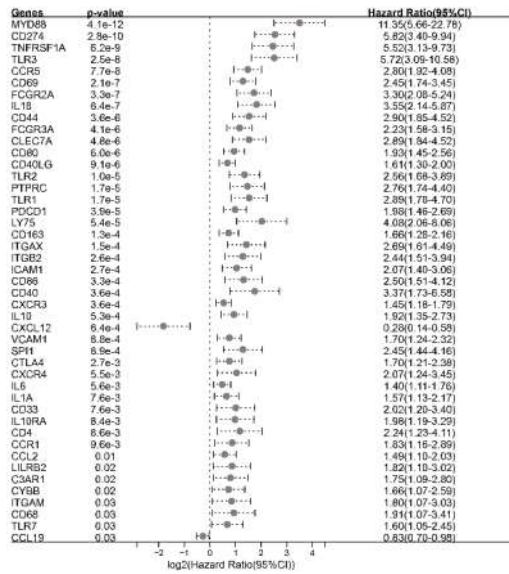
D

注:A:WGCNA 分析的平均连通性;B:WGCNA 模块树状图;C:KEGG-pathw 分析 CCL2 相关基因富集的信号通路;D:GO-BP 分析 CCL2 相关基因富集的信号通路

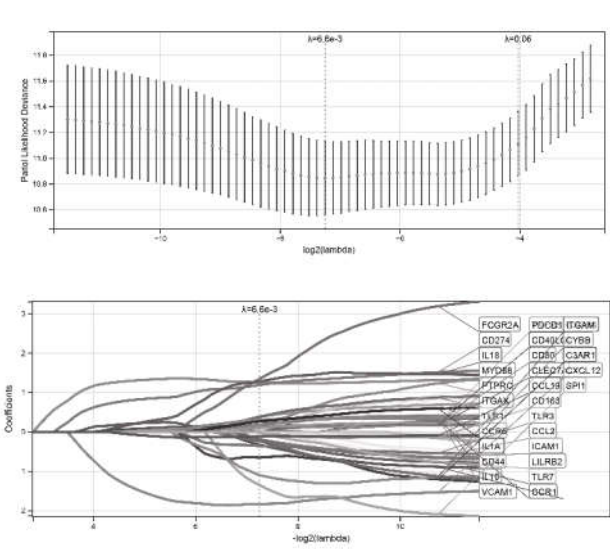
图 2 WGCNA 鉴定 CCL2 共表达基因







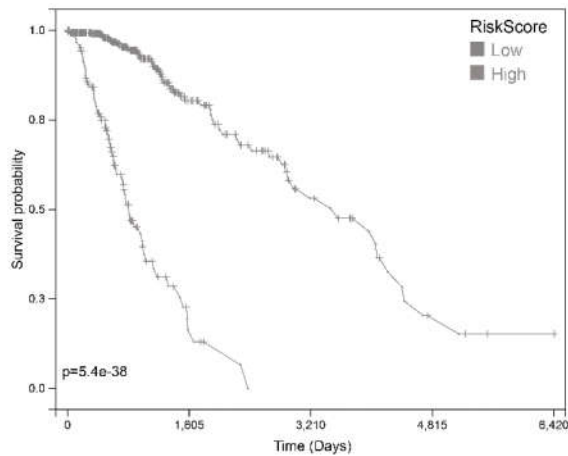
A



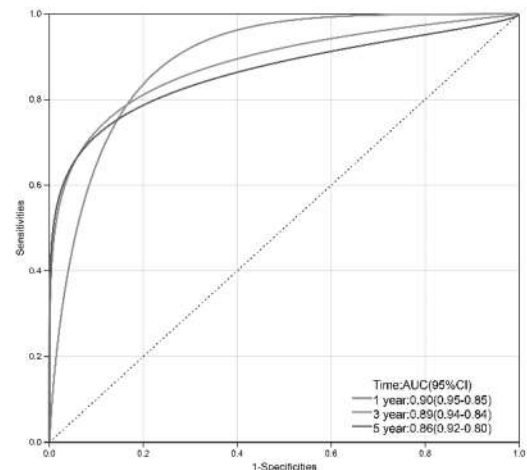
B

A

C



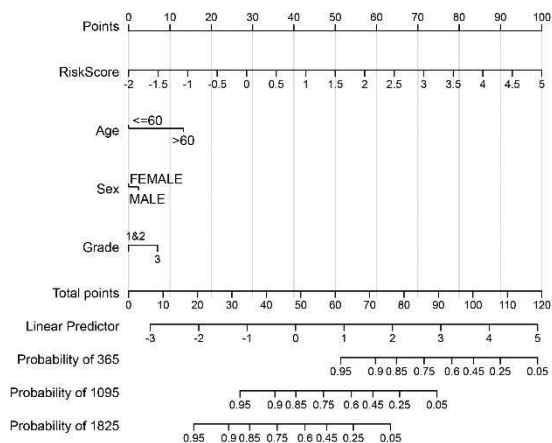
D



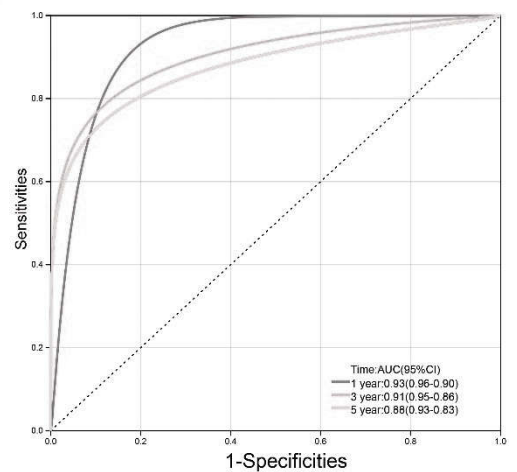
E

注:A:Cox 单因素生存分析;B:最佳 Lambda 值的识别;C:LASSO cox 模型拟合过程;D:不同风险评分组的生存分析;E:用于预测患者生存的 CCL2 相关基因模型的时间依赖性 ROC 曲线

图 4 基于 LGG 中 CCL2 相关基因的风险评分模型



A



B

注:A:基于风险评分及临床信息构建 Nomogram;B:用于预测患者生存的 nomogram 模型的时间依赖性 ROC 曲线

图 5 Nomogram 的构建及其 ROC 曲线

### 3 讨论

CCL2 是趋化因子家族中研究最多的成员之一,并且已被证明是治疗各种疾病的潜在干预点<sup>[4]</sup>。近年来,越来越多的研究发现 CCL2 在多种肿瘤的发生发展和预后中扮演着重要角色,其在肿瘤发展和进展中的一个重要的作用是它与肿瘤微环境中的各种正常宿主细胞的相互作用。CCL2 在血管内皮细胞中的高表达促进了肿瘤脉管系统的发育<sup>[20]</sup>,除了将巨噬细胞募集到各种癌症的肿瘤微环境中,还能够招募各种免疫细胞(如髓源性抑制细胞 MDSCs 等)形成免疫抑制微环境,使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视并支持肿瘤细胞增殖<sup>[10]</sup>。CCL2 在肿瘤微环境中对癌症生长、进展和转移中起重要作用。例如在三阴性炎性乳腺癌中,CCL2 过表达并通过激活 Src 和 Erk1/2 信号通路调节蛋白水解活性,从而导致侵袭和转移<sup>[21]</sup>。另有研究显示<sup>[22]</sup>,CCL2 在单核细胞诱导的前列腺癌细胞侵袭中充当介质,同时增加 NF- $\kappa$ B 活性,二者都参与介导前列腺癌细胞的侵袭。一项对处于不同阶段的前列腺癌患者的研究显示,血清 CCL2 升高与骨转移有关,这表明使用血清 CCL2 作为预后生物标志物的可能性。另有研究报道<sup>[23]</sup>,CCL2 在人类肝癌中过表达与肝癌患者的预后有关。

以上研究提示,肿瘤中异常表达的 CCL2 可作为预后、诊断和靶向治疗的分子标志物。本研究利用生物信息学分析,重点关注 CCL2 在 LGG 中的表达及潜在功能分析,结果显示 CCL2 在 LGG 组织中的表达高于正常组织;生存分析结果显示,CCL2 的高表达患者的生存时间低于 CCL2 低表达患者,表明高表达的 CCL2 是 LGG 患者的不良预后因素。同时进一步分析了 CCL2 的共表达基因,获得 1333 个共表达关系基因,并且在通路和功能分析的结果中显示,CCL2 的共表达基因主要富集在免疫信号通路,表明 CCL2 主要参与 LGG 进展中的免疫相关途径。此外,为了确定与 CCL2 相关基因的蛋白互作关系,从 1333 个基因中筛选得到 55 个相关基因,在经过建模分析后,又从中获得了 31 个非零系数的基因作为 LGG 预后分子标记物。根据风险评分模型将 LGG 患者分为低风险组和高风险组,同时生存分析结果表明,高风险评分与 LGG 患者的不良预后呈现相关性。

随着生命科学和计算机科学的迅猛发展,生物信息分析越来越多地被用于筛选与肿瘤预后相关的

分子标志物。综上所述,CCL2 高表达与 LGG 预后不良密切相关,是评估 LGG 预后的有效指标,本研究成功构建用于评估 LGG 患者预后的 CCL2 相关基因预后模型。

### 参考文献:

- [1]Aiman W,Rayi A.Low Grade Gliomas[EB/OL].<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560668/>,2022-05-15/2022-07-11.
- [2]Louis DN,Perry A,Wesseling P,et al.The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J].Neuro Oncol,2021,23(8):1231-1251.
- [3]Wang TJ,Mehta MP.Low -Grade Glioma Radiotherapy Treatment and Trials[J].Neurosurg Clin N Am,2019,30(1):111-118.
- [4]Fei L,Ren X,Yu H,et al.Targeting the CCL2/CCR2 Axis in Cancer Immunotherapy: One Stone, Three Birds?[J].Frontiers in Immunology,2021,12:771210.
- [5]Matsushima K,Larsen CG,Dubois GC,et al.Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line [J].J Exp Med,1989,169(4):1485-1490.
- [6]Chiang Y,Tsai YC,Wang CC,et al.Tumor -derived C -C motif ligand 2 (CCL2) induces the recruitment and polarization of tumor -associated macrophages and increases the metastatic potential of bladder cancer cells in the postirradiated microenvironment [J].Int J Radiat Oncol Biol Phys,2022 Jun 10:S0360-3016(22)00598-3.Epub ahead of print.
- [7]Lavender N,Yang J,Chen SC,et al.The Yin/Yan of CCL2: a minor role in neutrophil anti -tumor activity in vitro but a major role on the outgrowth of metastatic breast cancer lesions in the lung in vivo[J].BMC Cancer,2017,17(1):88.
- [8]Balkwill F.Cancer and the chemokine network [J].Nat Rev Cancer,2004,4(7):540-550.
- [9]Yoshimura T,Yuhki N,Moore SK,et al.Human monocyte chemoattractant protein -1 (MCP -1). Full -length cDNA cloning, expression in mitogen -stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE[J].FEBS Lett,1989,244(2):487-493.
- [10]Kadomoto S,Izumi K,Mizokami A.Roles of CCL2-CCR2 Axis in the Tumor Microenvironment [J].Int J Mol Sci,2021,22(16):8530.
- [11]Liu H,Yang Z,Lu W,et al.Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy[J].Cancer Med,2020,9(11):3786-3799.
- [12]Aerken M,Kouji I,Kazuyoshi S,et al.Tumor -associated macrophages promote prostate cancer migration through activa-

tion of the CCL22-CCR4 axis[J].Oncotarget,2017,8(6):9739-9751.

[13]Ding M,He SJ,Yang J.MCP-1/CCL2 Mediated by Autocrine Loop of PDGF-BB Promotes Invasion of Lung Cancer Cell by Recruitment of Macrophages Via CCL2-CCR2 Axis [J].J Interferon Cytokine Res,2019,39(4):224-232.

[14]Zhuang H,Cao G,Kou C,et al.CCL2/CCR2 axis induces hepatocellular carcinoma invasion and epithelial-mesenchymal transition invitro through activation of the Hedgehog pathway [J].Oncology Reports,2018,39(1):21-30.

[15]Sanford DE,Belt BA,Panni RZ,et al.Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis [J].Clin Cancer Res, 2013,19(13):3404-3415.

[16]Chen CH,Su LJ,Tsai HT,et al.ELF-1 expression in nasopharyngeal carcinoma facilitates proliferation and metastasis of cancer cells via modulation of CCL2/CCR2 signaling[J].Cancer Manag Res,2019,11:5243-5254.

[17]Wang Z,Xie H,Lin Z,et al.CCL2/CCR2 axis is associated with postoperative survival and recurrence of patients with non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma [J].Oncotarget,2016,7 (32):51525-51534.

[18]Xu M,Wang Y,Xia R,et al.Role of the CCL2-CCR2 sig-

nalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting [J]. Cell Prolif,2021,54(10):e13115.

[19]Yong VW.A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis[J].Carcinogenesis,2012,33(2):312-319.

[20]陈雨蒙.肿瘤相关血管内皮细胞通过 CCL2/CCR2 促进单核细胞趋化增强 M2 型极化作用的研究[D].长春:吉林大学,2021.

[21]Lindholm PF,Sivapurapu NJovanovic B,et al.Monocyte-Induced Prostate Cancer Cell Invasion is Mediated by Chemokine ligand 2 and Nuclear Factor-kappaB Activity [J].J Clin Cell Immunol,2015,6(2):308.

[22]Li X,Yao W,Yuan Y,et al.Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma[J].Gut,2017,66(1):157-167.

[23]Mohamed HT,El-Ghonaimy EA,El-Shinawi M,et al.IL-8 and MCP-1/CCL2 regulate proteolytic activity in triple negative inflammatory breast cancer a mechanism that might be modulated by Src and Erk1/2 [J].Toxicol Appl Pharmacol, 2020,401:115092.

收稿日期:2022-05-28;修回日期:2022-07-15

编辑/肖婷婷