

·生物信息学·

# 基于自噬相关基因构建的预后模型 对脑胶质瘤免疫微环境的影响

乔秋江, 庞琦

(山东大学附属山东省立医院神经外科, 山东 济南 250021)

**摘要:**目的 利用 TCGA 公共数据库筛选脑胶质瘤中与缺氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )表达相关的自噬相关基因(ARGs),分析其对患者生存预后的影响并构建风险评估模型及与肿瘤免疫微环境的关系。方法 从 TCGA 中提取脑胶质瘤患者的临床信息和基因表达数据,通过 Pearson 相关性分析筛选与 HIF-1 $\alpha$  表达有关的 ARGs。GO 和 KEGG 富集分析信号通路和生物学行为。单因素和多因素 Cox 回归分析选出对胶质瘤患者的生存预后影响的 ARGs。以中位数为截断值构建风险评估模型,ROC 曲线及 K-M 生存曲线评估模型性能,并分析风险评估模型与免疫微环境的关系。结果 共筛选出 2370 个基因与 HIF-1 $\alpha$  存在相关性,其中有 40 个与 HIF-1 $\alpha$  表达相关的 ARGs;GO 和 KEGG 富集分析显示,其与细胞死亡的调控相关;单因素 Cox 回归分析显示,与生存预后相关的基因有 36 个;利用多因素 Cox 回归确定了 4 个 ARGs(CASP3、MAPK9、NAMPT、CAMKK2)并构建了风险评估模型,其中 3 年时 AUC 最大,为 0.89;K-M 生存曲线显示,低风险组生存率高于高风险组;ESIMATE 算法显示,高风险组免疫浸润评分高于低风险组;免疫检查点基因结果显示,高风险组 PD1、PDL1、PDL2、LAG3、B7H3、TIM3、CTLA4 高于低风险组;免疫细胞浸润结果显示,高风险组单核细胞、活化自然杀伤细胞和浆细胞低于低风险组。结论 本研究构建了 HIF-1 $\alpha$  相关的 ARGs 预后模型,揭示了缺氧环境调控自噬相关基因对于胶质瘤患者临床预后及免疫治疗的影响。

**关键词:**脑胶质瘤;缺氧诱导因子;自噬;免疫微环境

中图分类号:R739.41

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.17.001

文章编号:1006-1959(2022)17-0001-06

## Effect of Prognostic Model Based on Autophagy-related Genes on Immune Microenvironment of Glioma

QIAO Qiu-jiang,PANG Qi

(Department of Neurosurgery,Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University,Jinan 250021,Shandong,China)

**Abstract: Objective** To screen autophagy-related genes (ARGs) related to the expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) in glioma by using TCGA public database, analyze their effects on the survival and prognosis of patients, and construct a risk assessment model and its relationship with tumor immune microenvironment.**Methods** The clinical information and gene expression data of glioma patients were extracted from TCGA, and ARGs related to HIF-1 $\alpha$  expression were screened by Pearson correlation analysis. GO and KEGG enrichment analysis of Shadow signaling pathways and biological behavior. Univariate and multivariate Cox regression analyses selected ARGs that affect the survival prognosis of glioma patients. The ROC curve and K-M survival curve were used to evaluate the performance of the model, and the relationship between the risk assessment model and the immune microenvironment was analyzed.**Results** A total of 2370 genes were screened to be correlated with HIF-1 $\alpha$ , of which 40 ARGs were related to HIF-1 $\alpha$  expression. GO and KEGG enrichment analysis showed that it was related to the regulation of cell death. Univariate Cox regression analysis showed that there were 36 genes related to survival prognosis, 4 ARGs (CASP3, MAPK9, NAMPT, CAMKK2) were identified by multivariate Cox regression and a risk assessment model was constructed. The AUC was the largest at 3 years, which was 0.89; K-M survival curve showed that the survival rate of low risk group was higher than that of high risk group. The ESIMATE algorithm showed that the immune infiltration score of the high-risk group was higher than that of the low-risk group; the results of immune checkpoint gene showed that PD1, PDL1, PDL2, LAG3, B7H3, TIM3 and CTLA4 in high risk group were higher than those in low risk group; the results of immune cell infiltration showed that monocytes, activated natural killer cells and plasma cells in high risk group were lower than those in low risk group.**Conclusion** This study constructed an ARGs prognosis model correlated with the important hypoxia regulator HIF-1 $\alpha$ , and further revealed the influence of ARGs regulated by hypoxia environment on the clinical prognosis and immunotherapy of glioma patients to provide a theoretical basis.

**Key words:** Gliomas; Hypoxia-inducible factor; Autophagy; Immune microenvironment

脑胶质瘤(glioma)是当前中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,预后较差<sup>[1]</sup>。胶质母细胞瘤(IV级)是其中恶性程度最高的一种,中位生存期不足15个月<sup>[2]</sup>。异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)突变状态、1p/19q共缺失和O-6-甲基鸟嘌呤

甲基转移酶(O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase, MGMT)启动子甲基化等被证明可以预测胶质瘤患者的药物反应及预后<sup>[3-4]</sup>。也有研究发现<sup>[5-7]</sup>,不同类型胶质瘤中DNA修复通路的激活、抗凋亡潜能或保护性自噬及胶质瘤干细胞(GSCs)的差异同样导致了预后的不同。由于恶性胶质瘤的肿瘤微环境异质性,目前治疗仍未见明显进展,探究影响胶质瘤肿瘤预后的潜在分子标志物对临床治疗有重要意义。自噬是一种高度保守的细胞动态自我消化过程,主要包括自噬体的形成以及自噬体与溶

作者简介:乔秋江(1996.9-),男,山东济南人,硕士研究生,主要从事脑肿瘤研究

通讯作者:庞琦(1961.12-),男,山东济南人,博士,教授,主任医师,主要从事神经外科方向研究

酶体的融合和降解<sup>[8]</sup>。自噬有助于维持细胞的能量代谢,也可消除受损细胞器和错误折叠的蛋白质,维持细胞内环境稳定。而过度自噬的发生,可引起细胞死亡,这种死亡方式称为Ⅱ型程序性细胞死亡<sup>[9]</sup>。自噬对于肿瘤微环境中抗肿瘤免疫中也有重要作用<sup>[10]</sup>,调节肿瘤细胞生存的潜在能力使其成为癌症治疗的目标。缺氧是影响胶质瘤肿瘤微环境的重要因素,可以导致肿瘤细胞的营养不足和基因表达的改变,也影响着细胞内自噬水平的改变<sup>[11]</sup>。缺氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )是细胞缺氧反应中的重要调控因子,能够影响细胞内自噬相关基因的表达,进而影响肿瘤细胞的免疫微环境。有研究表示<sup>[12]</sup>,缺氧可以激活HIF-1 $\alpha$ 依赖的自噬,从而通过抵消细胞毒性T淋巴细胞和NK细胞介导的抗肿瘤免疫反应来促进肿瘤细胞的生存。而本研究旨在通过公共数据库挖掘脑胶质瘤缺氧与自噬相关基因的关系,并建立模型预测患者预后和免疫微环境,以期脑胶质瘤的发生、发展及治疗提供更可靠的依据。

## 1 资料与方法

**1.1 数据下载及数据处理** 在 Human Autophagy Database (HADb) (<http://www.autophagy.lu/>) 下载 232 个自噬相关基因。通过 The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 和 Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) (<http://www.cgga.org.cn/>) 数据库分别收集 610 例和 658 例胶质瘤患者临床信息和基因表达数据,数据分析过程中去除临床信息不完整的样本。

**1.2 基因相关性分析** 利用 R4.1 软件进行 Pearson 相关性分析,并挑选出与 HIF-1 $\alpha$  相关性值  $>0.3$ ,  $P < 0.05$  的基因。通过与已下载的 232 个自噬相关基

因(ARGs)对比,筛选出与缺氧相关的 ARGs。

**1.3 差异表达基因功能分析** 使用 org.Hs.eg.db, cluster Profiler, ggplot2 等 R 包对已筛选出的 ARGs 进行 GO[生物过程(BP)、细胞成分(CC)和分子功能(MF)]和 KEGG 功能富集分析,  $FDR < 0.05$  视为差异有统计学意义。富集分析筛选出与缺氧相关的 ARGs 潜在分子机制和信号通路。

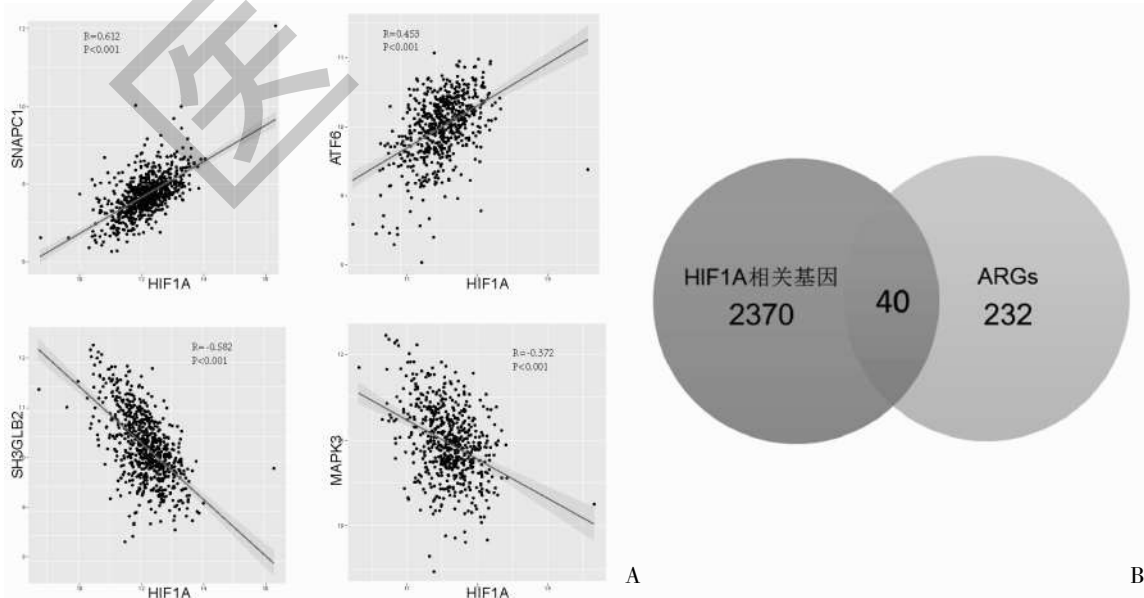
**1.4 预后分析** 对以上筛选出的 ARGs 使用单因素 Cox 回归分析,选出与预后相关的基因,筛选阈值为:风险比  $HR \neq 1$ ,  $P < 0.05$ 。对预后相关基因进行多因素 Cox 比例风险回归分析,获得预后相关基因的回归系数。使用基因的表达水平和回归系数计算患者的风险分数。根据风险评分中位数将以上患者分为高风险组和低风险组。使用 K-M 生存曲线评估两组之间生存预后的差异;绘制 ROC 曲线,计算 AUC 值,引入 CGGA 数据库数据作为验证集评估该风险评分模型效能。

**1.5 构建风险预测模型与肿瘤免疫微环境的关系分析** 使用 R 语言分别通过 ESIMTATE 算法和 Ciber-sort 算法计算高、低风险组的免疫浸润分数和 22 种免疫细胞浸润的差别,利用两组中抑制性免疫检查点的表达差异推测其对免疫治疗的反应。

**1.6 统计学分析** 使用 R4.1、Adobe Illustrator 2019 进行统计分析和作图。生存曲线使用 Log-rank 检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 基因表达相关性分析** 共筛选出 2370 个基因与 HIF-1 $\alpha$  存在相关性(图 1A)。通过与从 HADb 下载的 232 个 ARGs 比较,结果筛选出 40 个 HIF-1 $\alpha$  表达相关的 ARGs,见图 1B。



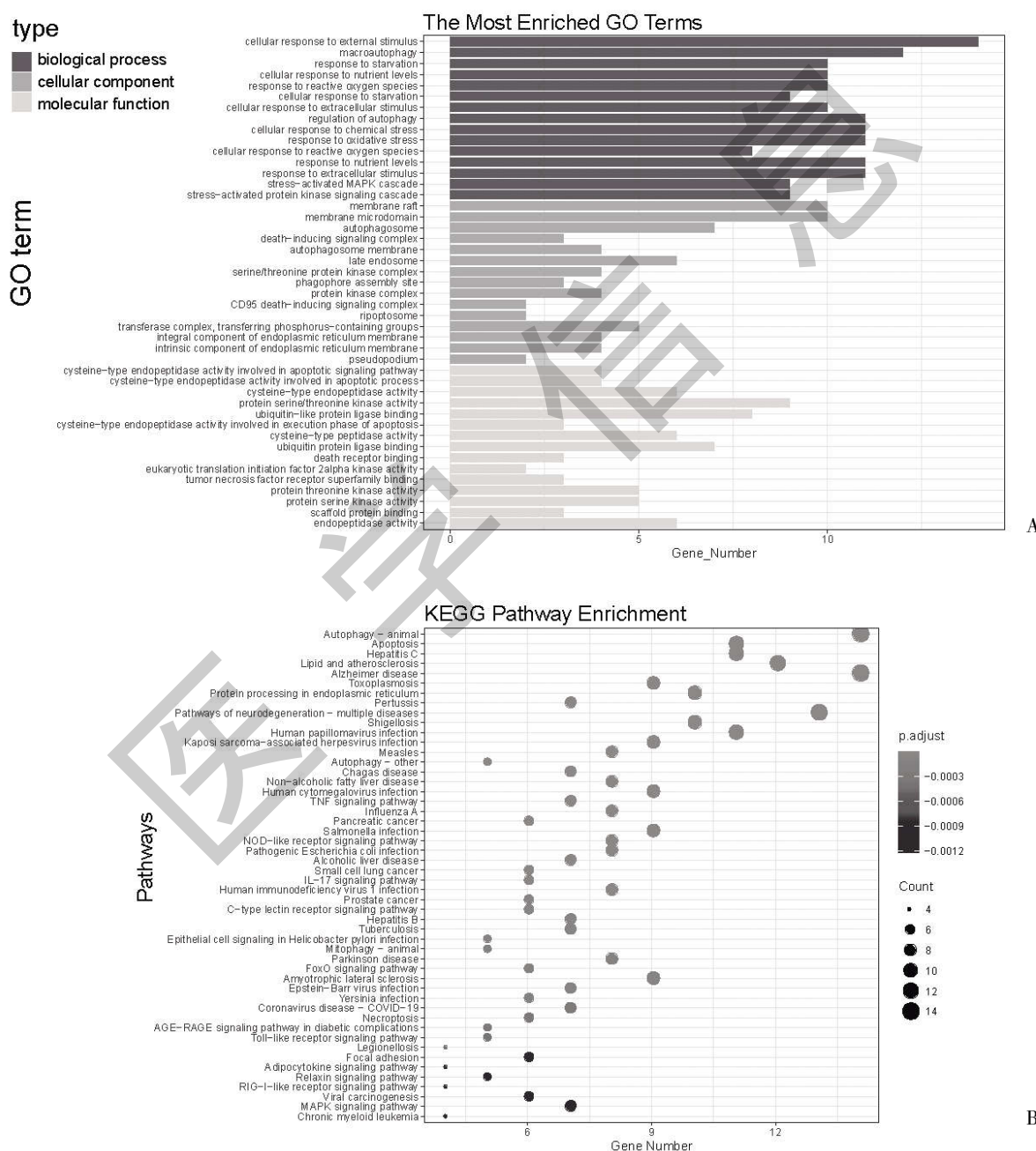
注:A:HIF-1 $\alpha$ 与其他基因 Pearson 相关性分析部分结果;B:HIF-1 $\alpha$ 相关基因与 ARGs 的韦恩图

图1 基因表达相关性分析

2.2 GO 和 KEGG 富集分析 GO 分析显示,BP 中主要包括对外界刺激的反应、自噬的调控和对营养水平的反应;CC 中主要为膜筏、自噬体以及死亡诱导复合体;MF 中主要为半胱氨酸型内肽酶活性参与的凋亡信通路,见图 2A;KEGG 富集分析显示,上述 ARGs 主要富集于自噬、凋亡、多种神经退行性疾病以及内质网中的蛋白质加工等,见图 2B。

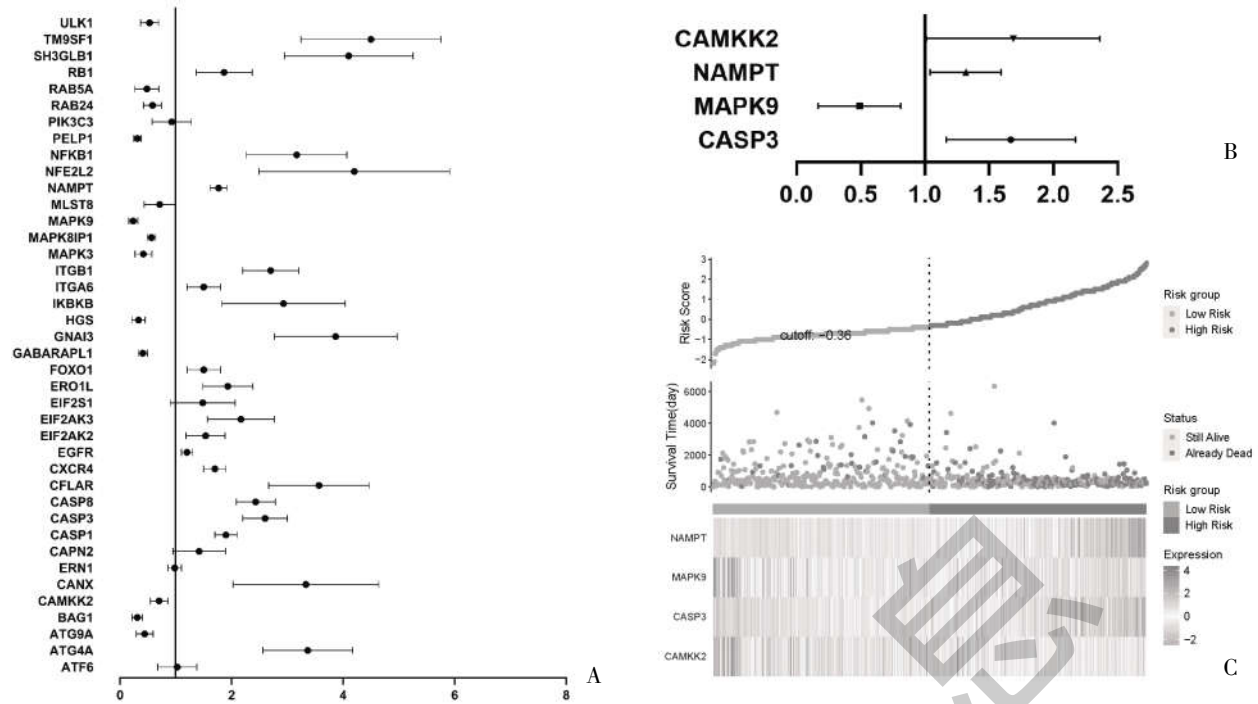
2.3 风险评估模型的建立 通过单因素 Cox 回归分析,在 40 个与 HIF-1 $\alpha$  相关的 ARGs 中有 36 个与患者生存预后密切相关(图 3A)。对其进行多元 Cox

回归分析,筛选出 4 个 ARGs (CASP3、MAPK9、NAMPT、CAMKK2)以构建风险评估模型(图 3B)。通过所选基因的回归系数系数及相对表达量构建胶质瘤患者的风险评分,并以中位风险评分将患者分为低风险组和高风险组,散点图显示高风险组死亡率高于低风险组,热图显示随着风险评分的升高,CASP3 和 NAMPT 在高风险组中表达升高,与不良预后相关;MAPK9 与 CAMKK2 在高风险组中表达降低,其低表达与不良预后相关,为保护性因素(图 3C)。



注:A:部分 GO 富集分析结果(前 15);B:部分 KEGG 富集分析结果(前 50)

图 2 HIF-1 $\alpha$  相关性 ARGs 的 GO 和 KEGG 富集分析



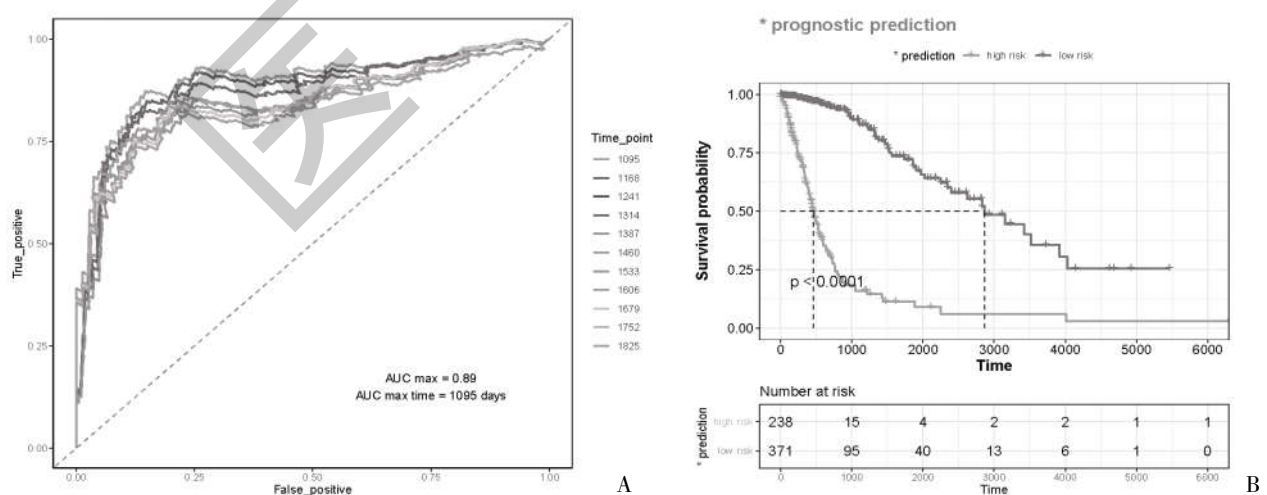
注:A:单因素 Cox 回归分析;B:多因素 Cox 回归分析;C:预后模型风险曲线散点图及 4 个预后基因表达热图

图 3 构建基于 HIF-1 $\alpha$  相关的 ARGs 的风险评分预后模型

2.4 预后模型的验证 使用 R 语言的 survival ROC 包,制作不同时间点的 ROC 曲线,并计算 AUC,结果显示该风险模型可预测胶质瘤患者预后的效果,其中 3 年时 AUC 最大,为 0.89(图 4A)。K-M 生存曲线显示,低风险组生存率高于高风险组(图 4B)。随着风险评分的升高,死亡患者随之增加,4 个 ARGs 表达情况与上述结果基本一致,K-M 生存曲线同样验证了该风险评估模型在预测胶质瘤患者的

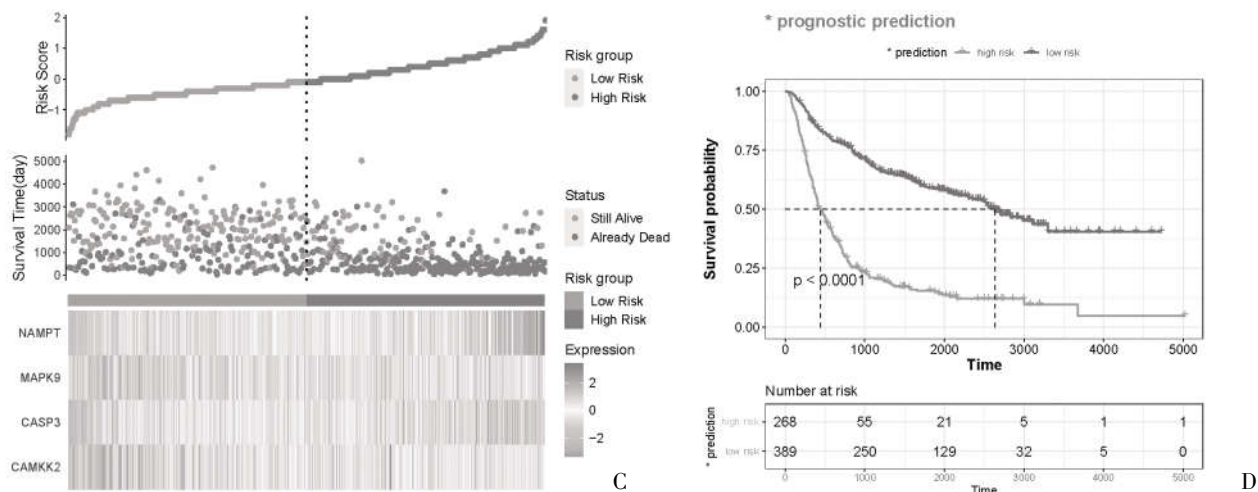
良好表现(图 4C、4D)。

2.5 风险评估模型与免疫微环境的关系 ESIMATE 算法显示,高风险组免疫浸润评分高于低风险组(图 5A);免疫检查点基因结果显示,高风险组 PD1、PDL1、PDL2、LAG3、B7H3、TIM3、CTLA4 高于低风险组(图 5B);免疫细胞浸润结果显示,高风险组单核细胞、活化自然杀伤细胞和浆细胞低于低风险组(图 5C)。



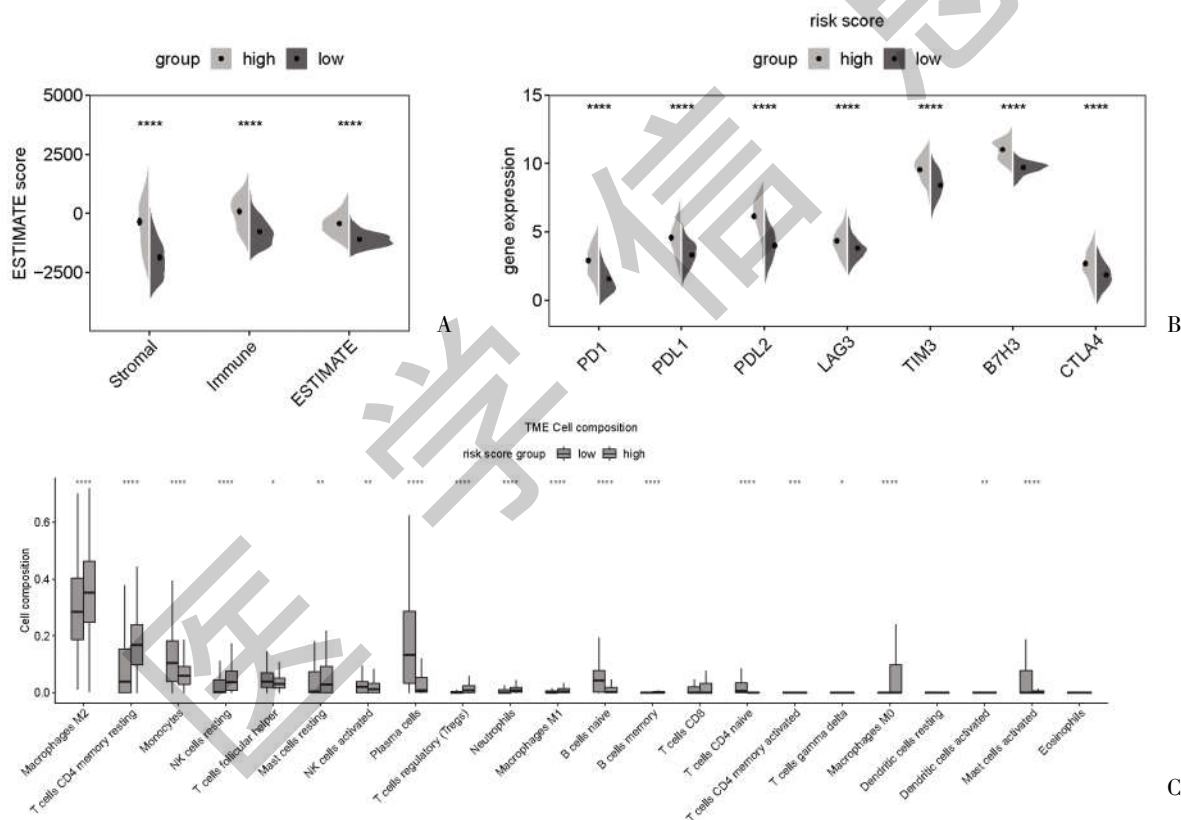
注:A:ROC 曲线分析;B:K-M 生存曲线;C:CGGA 数据库作为测试集的对风险模型效能的验证;D:CGGA 数据库中高、低风险组的 K-M 生存曲线

图 4 预后风险模型效能的评价



注:A:ROC 曲线分析;B:K-M 生存曲线;C:CCGA 数据库作为测试集的对风险模型效能的验证;D:CCGA 数据库中高、低风险组的 K-M 生存曲线

图 4 预后风险模型效能的评价(续)



注:A:免疫浸润评分;B:免疫检查点基因的表达差异;C:免疫细胞浸润程度

图 5 风险评估模型与免疫微环境的关系

### 3 讨论

胶质瘤具有很强的肿瘤异质性,相比肺癌、乳腺癌等其他恶性肿瘤,目前针对胶质瘤的靶向治疗仍未取得较大进展。恶性胶质瘤的遗传不稳定性不均一性明显,相关信号通路作用及相互调节机制尚未清楚,多靶点联合分析并构建相关风险模型是胶质瘤治疗中重要的研究思路。缺氧在胶质瘤肿瘤微环境起重要作用,参与了血管生成、转移、耐药、免疫

逃逸等在内的多个方面。同时研究证明<sup>[13]</sup>,缺氧与肿瘤细胞自噬的发生密切相关,自噬可以通过缺氧环境依赖的方式抑制或驱动肿瘤的发生与进展。HIF-1 $\alpha$ 是肿瘤缺氧环境的重要调控因子,也是肿瘤微环境中免疫逃逸的重要组成部分。研究报道<sup>[14]</sup>,HIF-1 $\alpha$ 通过诱导自噬促进肿瘤细胞免疫逃避。

本研究中用于构建风险评估模型的 4 个 ARGs,包括 CASP3、MAPK9、NAMPT、CAMKK2。



NAMPT 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)合成的重要限速酶,在调节肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用,可以驱动 IFN- $\gamma$  诱导 PD-L1 的表达,并以 CD8<sup>+</sup>T 细胞依赖的方式调控肿瘤免疫逃避,进而调控肿瘤的发生、发展、侵袭和转移。有研究证明<sup>[15]</sup>,抑制 NAMPT 可以通过激活线粒体功能障碍有效地靶向调控胶质瘤的遗传异质性。另有研究报道<sup>[16]</sup>,CAMKK2 抑制剂可以 CD8<sup>+</sup>T 细胞依赖的方式抑制乳腺癌细胞生长,并促进免疫细胞的重新编程。MAPK9 是 MAP 激酶家族的一员,在基因表达调控和细胞质生物功能中起关键作用。有研究证明<sup>[17]</sup>,MAPK9 在非小细胞肺癌中发挥作用。

肿瘤细胞具有多种免疫逃避的机制,但其受限于患者肿瘤免疫微环境的区别,存在应用局限性。通过此风险评估模型判断胶质瘤患者免疫微环境差异有助于免疫治疗的临床应用。肿瘤细胞通过产生异常的免疫检查点信号来减弱免疫反应,从而促进免疫逃逸<sup>[18]</sup>。PD1 是重要的 T 细胞抑制因子,其与肿瘤细胞的 PD-L1 结合可以明显抑制细胞毒性 T 细胞的增殖和活性,导致肿瘤细胞的免疫逃逸,且抑制性免疫检测点的阻断治疗方法已经在多种肿瘤治疗中展现了良好的效果。有研究证明<sup>[19]</sup>,HIF-1 $\alpha$  在非小细胞肺癌细胞中通过表皮生长因子受体突变调控程序性细胞死亡配体 1 的表达。PD1、PDL1、LAG3、TIM3、B7H3 等免疫检查点的高表达通常代表肿瘤细胞对免疫检查点抑制剂的反应较好。本研究中高风险组 PD1、PDL1、PDL2、LAG3、B7H3、TIM3、CTLA4 高于低风险组,提示本预后模型可以用于判断胶质瘤免疫治疗的效果。而免疫细胞浸润结果显示,高风险组单核细胞、活化自然杀伤细胞和浆细胞低于低风险组;同时高风险组免疫浸润评分高于低风险组,以上结果说明该风险评估模型可以用于判断胶质瘤免疫微环境的改变。

基于生物信息学构建的风险评估模型仍具有一定的局限性,使用公共数据库构建预后模型的基因仅具有具有统计学意义的关联,暂不能肯定其相互作用。本研究中基因的生物学功能及作用的信号通路仍需在国内实验和体外实验中验证,其临床意义也需在大规模多中心临床队列中进行验证。总之,本研究提供了一种通过构建基于缺氧这一重要肿瘤微环境相关 ARGs 的模型来预测胶质瘤患者预后的方法,为胶质瘤提供了研究方向和靶点。

#### 参考文献:

- [1]Yang K,Wu Z,Zhang H,et al.Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches[J].Mol Cancer,2022,21(1):39.
- [2]Louis DN,Perry A,Reifenberger G,et al.The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary[J].Acta Neuropathologica,2016,131: 803-820.
- [3]Mohile NA,Messersmith H,Gatson NT,et al.Therapy for Diffuse Astrocytic and Oligodendroglial Tumors in Adults: AS-CO-SNO Guideline[J].J Clin Oncol,2022,40(4):403-426.
- [4]Butler M,Pongor L,Su YT,et al.MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma[J].Trends Cancer,2020,6(5):380-391.
- [5]Mansouri A,Hachem LD,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].Neuro Oncol,2019,21(2):167-178.
- [6]Gimple RC,Bhargava S,Dixit D,et al.Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer [J].Genes Dev,2019,33(11-12):591-609.
- [7]Zhang Z,Yin J,Lu C,et al.Exosomal transfer of long noncoding RNA SBF2-AS1 enhances chemoresistance to temozolomide in glioblastoma[J].J Exp Clin Cancer Res,2019,38(1):166.
- [8]Dikic I,Elazar Z.Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J].Nat Rev Mol Cell Biol,2018,19(6): 349-364.
- [9]Taylor MA,Das BC,Ray SK.Targeting autophagy for combating chemoresistance and radioresistance in glioblastoma [J].Apoptosis,2018,23(11-12):563-575.
- [10]姚庆娟,孙龙昊,何向辉.自噬对肿瘤免疫微环境的调控作用及其相关治疗策略[J].天津医科大学学报,2019,25(2):180-183.
- [11]Jawhari S,Ratinaud MH,Verdier M.Glioblastoma,hypoxia and autophagy:a survival-prone 'ménage-à-trois' [J].Cell Death Dis,2016,7(10):e2434.
- [12]Abdul Rahim SA,Dirkse A,Oudin A,et al.Regulation of hypoxia-induced autophagy in glioblastoma involves ATG9A[J].Br J Cancer,2017,117(6):813-825.
- [13]Feng X,Zhang H,Meng L,et al.Hypoxia-induced acetylation of PAK1 enhances autophagy and promotes brain tumorigenesis via phosphorylating ATG5[J].Autophagy,2021,17(3):723-742.
- [14]Erin N,Grahovac J,Brozovic A,et al.Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance[J].Drug Resist Updat,2020,53:100715.
- [15]Sharma P,Xu J,Williams K,et al.Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase,the rate-limiting enzyme of the nicotinamide adenine dinucleotide salvage pathway,to target glioma heterogeneity through mitochondrial oxidative stress [J].Neuro Oncol,2022,24(2):229-244.
- [16]Racioppi L,Nelson ER,Huang W,et al.CaMKK2 in myeloid cells is a key regulator of the immune-suppressive microenvironment in breast cancer[J].Nat Commun,2019,10(1):2450.
- [17]Wang ZX,Zhao Y,Wang YB,et al.CircRNF20 aggravates the progression of non-small-cell lung carcinoma by activating MAPK9[J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2020,24(19):9981-9989.
- [18]Jiang X,Wang J,Deng X,et al.Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape[J].Mol Cancer,2019,18(1):10.
- [19]Guo R,Li Y,Wang Z,et al.Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and nuclear factor- $\kappa$ B play important roles in regulating programmed cell death ligand 1 expression by epidermal growth factor receptor mutants in non-small-cell lung cancer cells[J].Cancer Sci,2019,110(5):1665-1675.

收稿日期:2022-02-15;修回日期:2022-03-11

编辑/杜帆