

胶质母细胞瘤氧化应激相关基因的表达分析

黄冠又 张 欣 甘鸿川 郝淑煜 吴 震

【摘要】目的 探讨胶质母细胞瘤(GBM)氧化应激关键基因的表达变化。**方法** 从UCSC Xena数据库下载167例GBM基因表达谱数据(TCGA-GBM),从GeneCards数据库下载氧化应激基因集(168个氧化应激相关基因);通过富集分析确定差异表达基因(DEGs),建立蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络识别关键基因,利用Spearman相关系数对免疫因子和免疫检查点与关键基因进行相关性分析。**结果** 鉴定出两种与氧化应激相关的GBM分子亚型(Cluster1和Cluster2),Cluster1型GBM生存期明显高于Cluster2型($P<0.05$)。共筛选出54个DEGs,在细胞因子/趋化因子相关功能中显著富集。PPI网络鉴定出10个关键基因,即CSF2、CSF3、CCL7、LCN2、CXCL6、MMP8、CCR8、TNFSF11、IL22RA2和ORM1。大多数免疫因子和免疫检查点与关键基因呈正相关。**结论** 本文基于氧化应激相关基因将GBM划分为两个亚型,并且筛选出10个氧化应激基因,可能在GBM的发生、发展过程中起重要作用,也可能对GBM预后评估具有一定的价值。

【关键词】 胶质母细胞瘤;氧化应激;基因表达

【文章编号】 1009-153X(2023)04-0259-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Expression analysis of oxidative stress-related genes in glioblastoma based on bioinformatics analysis

HUANG Guan-you¹, ZHANG Xin¹, GAN Hong-chuan¹, HAO Shu-yu², WU Zhen². 1. Department of Neurosurgery, Affiliated Jinyang Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550081, China; 2. Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression changes of key genes related to oxidative stress in glioblastomas (GBM). **Methods** The transcriptome data of GBM (167 GBM patients) were downloaded from Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and the oxidative stress gene set (168 oxidative stress-related genes) was downloaded from GeneCards database. The function of differentially expressed genes (DEGs) was determined by GO and KEGG enrichment analyses, and the protein-protein interaction (PPI) network was established to identify key genes. Spearman correlation coefficient was used to analyze the correlation between immune factors and checkpoints and key genes. **Results** Two molecular subtypes related to oxidative stress of GBM were identified (Cluster1 and Cluster2), and the survival time of Cluster1 was significantly longer than Cluster2 ($P<0.05$). Fifty-four DEGs related to oxidative stress were identified and they were significantly enriched in cytokine/chemokine related functions. Ten hub genes were identified by PPI network, namely CSF2, CSF3, CCL7, LCN2, CXCL6, MMP8, CCR8, TNFSF11, IL22RA2 and ORM1. Most immune factors and immune checkpoints were positively correlated with the 10 hub genes. **Conclusions** Our results suggest GBM could be divided into two subtypes based on oxidative stress-related genes. Ten oxidative stress genes were screened out, which may play an important role in the tumorigenesis and development of GBM, and may also have a certain value for the prognosis assessment of GBM patients.

【Key words】 Glioblastoma; Oxidative stress; Gene expression; Bioinformatics analysis

胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是成人最常见的原发性恶性脑肿瘤,手术联合放化疗是目前新诊断的GBM的标准治疗方案,但只能小幅

度提高病人的生存率^[1]。由于存在血脑屏障以及独特的肿瘤免疫微环境等生物学因素,针对GBM研制新疗法仍面临许多挑战^[2]。研究表明,胶质瘤细胞线粒体DNA突变存在较高的氧化应激,与胶质瘤细胞耐药相关^[3]。本文采用生物信息学方法构建GBM氧化应激风险模型,以预测GBM的预后;并进行免疫细胞浸润和肿瘤微环境分析,以期GBM的免疫治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 数据来源 从UCSC Xena数据库下载167例GBM

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2023.04.010
基金项目:国家自然科学基金(81672506;81872052);贵州省卫健委科学技术基金(gzwmkj2022-348)
作者单位:550081 贵阳,贵州医科大学附属金阳医院神经外科(黄冠又、张欣、甘鸿川);100070 北京,首都医科大学附属北京天坛医院神经外科(郝淑煜、吴震)
通讯作者:吴震, E-mail: wuzhen1966@aliyun.com

病人基因表达谱数据(TCGA-GBM)。从 GeneCards 数据库下载氧化应激基因集,共获得 168 个氧化应激相关基因。

1.2 氧化应激相关分子亚型分析 从 GBM 转录组中提取 168 个氧化应激相关基因的表达基质,使用 R 包 ConsensusClusterPlus 对 GBM 氧化应激相关分子亚型进行一致性聚类分析,比较不同亚型病人之间的生存差异。

1.3 免疫微环境分析 应用 ESTIMATE 算法分析免疫细胞和基质细胞的特异性基因表达特征,计算免疫评分和基质评分,并评估两组间的 immune/stromal/ESTIMATE 评分和肿瘤纯度差异。

1.4 差异表达基因(differential expression genes, DEGs)的鉴定 使用 R 包 DESeq2 进行差异分析,使用 R 包 ggplot2 和 pheatmap 绘制火山图和热图显示筛选出的 DEGs。

1.5 DEGs 的功能富集分析 使用 R 包 ClusterProfiler 对所有 DEGs 进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析。

1.6 PPI 网络的构建 基于获得的氧化应激 DEGs,通过检索 STRING 在线数据库构建 PPI 网络,使用 cyto-Hubba 插件计算网络中各节点蛋白度值(Degree),以基因在网络中的前 10 位 Degree 值作为关键基因筛选标准,分析关键基因与免疫检查点分子、免疫因子的相关性。

1.7 关键基因与免疫相关性分析 从 TISIDB 数据库下载免疫因子,分别计算其与关键基因的相关系数,并绘制热图。从 TCGA-GBM 队列中提取 45 个免疫检查点,分析其与关键基因的表达相关性。

2 结果

2.1 氧化应激相关分子亚型的鉴定结果 共鉴定出两种与氧化应激相关的 GBM 分子亚型(图 1A),其中 Cluster1 含 93 个样本,Cluster2 含 74 个样本。两个亚型 GBM 生存期有统计学差异,Cluster1 生存期明显高于 Cluster2 ($P=0.041$,图 1B)。与 Cluster1 相比,Cluster2 免疫评分(图 1C)、基质评分(图 1D)和估计评分(图 1E)明显增高($P<0.05$),而肿瘤纯度明显降低(图 1F; $P<0.05$)。

2.2 GO 和 KEGG 富集分析 GO 分析结果表明,DEGs 在细胞因子/趋化因子相关功能中显著富集,主要包括细胞因子介导的信号通路、细胞对趋化因子的反应和受体-配体活性等。KEGG 分析结果表明,DEGs 显著富集在细胞因子/趋化因子相关通路,如细胞因子受体互作反应、病毒蛋白与细胞因子受体互作反

应等。

2.3 PPI 网络鉴定关键基因 按照 Degree 值从高到低依次为:CSF2、CSF3、CCL7、LCN2、CXCL6、MMP8、CCR8、TNFSF11、IL22RA2、ORM1。应用 Cytoscape 软件重建关键基因的相互作用。

2.4 关键基因的免疫相关性分析 大多数免疫因子和免疫检查点与关键基因呈正相关(图 5A~E),其中免疫抑制因子 IL10、免疫刺激因子 IL2RA、趋化因子 CCL2 和免疫检查点 LAIR1 与关键基因 CCL7 呈正相关,免疫受体 CCR4 与关键基因 CCR8 呈正相关。免疫抑制因子 VTCN1、免疫检查点 LAG3、免疫刺激因子 TNFRSF13C 和 LTA、趋化因子 CXCL17、CCL25 与大部分关键基因呈负相关。

3 讨论

研究表明,氧化应激与胶质瘤的关系密切且复杂,高水平的活性氧(reactive oxygen species,ROS)影响胶质瘤细胞的功能^[4]。ROS 作为正常细胞代谢的产物,可以调节细胞的存活、增殖、凋亡及细胞内环境稳定。当内环境稳态受损,氧化应激状态与胶质瘤的发生和耐药性有关^[5]。研究表明,氧化应激影响肿瘤内和细胞间分子异质性,产生免疫调节逃逸和对传统疗法的抵抗^[6,7]。本文通过聚类分析鉴定出 GBM 两种预后的分子亚型,即 Cluster1 和 Cluster2,Cluster2 组病人预后要差于 Cluster1 组($P<0.05$),而且免疫评分、基质评分、ESTIMATE 评分较高,而肿瘤纯度较低。这提示氧化应激相关分子亚型有助于对 GBM 进行预后的分层分析。

本文通过筛选氧化应激相关分子亚型之间的 DEGs,并对候选关键基因进行富集分析发现,细胞因子介导的信号通路、细胞对趋化因子的反应、信号受体激活剂活性、细胞因子活性和趋化因子受体结合等在 GBM 发病过程中具有重要作用。这些 DEGs 主要在信号受体激活剂活性、分泌颗粒内腔和细胞因子介导的信号通路相关的功能或通路中发挥作用。本文 KEGG 分析显示 DEGs 在细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路和 JAK-STAT 信号通路的富集最显著。研究显示细胞因子和趋化因子在多种人类恶性肿瘤中表达上调,既有抗肿瘤作用,也有促进肿瘤作用^[8]。这些可溶性介质(如 CCL2、CCL5、CXCL12、IL-6、TGF- β 、CSF-1 等)在 GBM 的肿瘤微环境中具有重要的免疫调节作用^[9-13]。这提示可溶性趋化因子和细胞因子在肿瘤微环

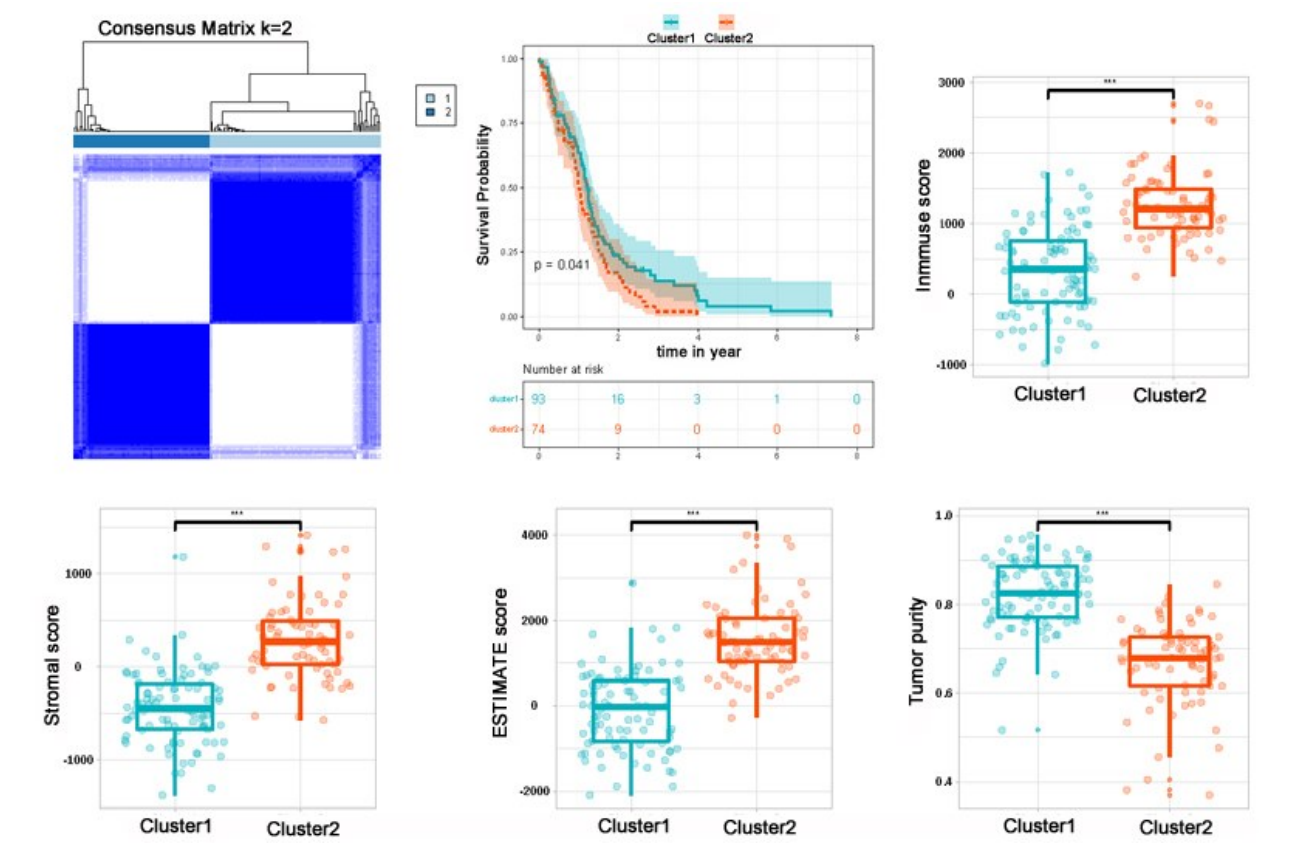


图1 GBM氧化应激相关亚型鉴定和肿瘤微环境评分
A. 一致性聚类分析,选择k=2作为最适k值,将全部样本分为2组,其中Cluster1含93个样本,Cluster2含74个样本;B. 根据两个不同聚类绘制Kaplan-Meier生存曲线(P=0.041);C~F. 不同亚型GBM肿瘤微环境评分;C. 基质评分;D. 免疫评分;E. ESTIMATE评分;F. 肿瘤纯度

境的免疫调节作用促进GBM的发展。

本文PPI网络分析筛选出前10个对GBM影响最大的关键基因(CSF2、CSF3、CCL7、LCN2、CXCL6、MMP8、CCR8、TNFSF11、IL22RA2、ORM1)。Sielska等^[14]通过TCGA数据集和GBM细胞学研究发现CSF2表达上调,并证实CSF2可诱导小胶质细胞募集和巨噬细胞极化,联合免疫检查点抑制剂和靶向CSF2信号可能是治疗GBM的一个靶点。Gao等^[15]通过常氧和缺氧条件下对GBM细胞系进行转录组分析,发现CSF3可作为GBM潜在的血浆标志物之一,这为GBM的诊断和治疗提供新的思路 and 方向。趋化因子CCL7通过与受体结合来介导免疫细胞的募集,是调节肿瘤免疫微环境的形成并参与肿瘤形成。研究发现,在Tim-3高表达的GBM样本中,CCL7、CXCL13、CCL18等表达显著上调,这些上调的趋化因子可能促进GBM进展,并与GBM的不良预后相关^[16]。LCN2作为一种免疫调节剂,参与各种生物反应和病理生理过程,包括氧化应激。LCN2在GBM中作用机制尚不清楚。Hsieh等^[17]研究发现GBM中LCN2表达水平低于正常组织,并且LCN2表

达水平较低与GBM较差的生存预后相关。

本文结果表明,多数免疫因子和免疫检查点与氧化应激关键基因呈正相关,其中免疫调节因子IL10和IL2RA、趋化因子CCL2、免疫检查点LAIR1与关键基因CCL7正相关程度最高,免疫受体CCR4与关键基因CCR8正相关程度最高。IL-10除了具有免疫抑制和免疫刺激激活的免疫调节功能外,还通过增加肿瘤细胞增殖来促进肿瘤进展。在GBM肿瘤微环境中,IL-10主要来源于肿瘤相关巨噬细胞,发挥免疫抑制作用,促进肿瘤进展和免疫逃逸。研究发现IL-10在GBM中的作用对于改善GBM的免疫疗法具有重要作用^[18]。细胞因子信号通路上的IL2RA基因遗传变异可能会增加GBM的发病风险,并且在GBM肿瘤微环境中具有免疫抑制作用^[19]。CCR2/CCL2信号通路可以促进血管生成、炎症反应以及免疫抑制作用,从而促进肿瘤生长^[20]。

总之,本文基于氧化应激相关基因将GBM划分为两个亚型,不同亚型生存情况存在明显差异;并且筛选出10个氧化应激关键基因,这些关键基因可能对GBM的发生和预后起重要作用,可以为GBM的个

体化治疗提供参考和新的方向。

【参考文献】

[1] 胡峻龙,赵世光. 替莫唑胺治疗脑胶质瘤的新进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2021, 26(8): 647-649.

[2] Tan AC, Ashley DM, López GY, *et al.* Management of glioblastoma: state of the art and future directions [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(4): 299.

[3] Bahadur S, Sahu AK, Baghel P, *et al.* Current promising treatment strategy for glioblastoma multiforme: a review [J]. Oncol Rev, 2019, 13(2): 417.

[4] Ostrowski RP, Pucko EB. Harnessing oxidative stress for anti-glioma therapy [J]. Neurochem Int, 2022, 154: 105281.

[5] Wu L, Wang F, Xu J, *et al.* PTPN2 induced by inflammatory response and oxidative stress contributed to glioma progression [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(11): 19044.

[6] Lu D, Yang N, Wang S, *et al.* Identifying the predictive role of oxidative stress genes in the prognosis of glioma patients [J]. Med Sci Monit, 2021, 27: e934161.

[7] Da Ros M, De Gregorio V, Iorio AL, *et al.* Glioblastoma chemoresistance: the double play by microenvironment and blood-brain barrier [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 2879.

[8] Yeo ECF, Brown MP, Gargett T, *et al.* The role of cytokines and chemokines in shaping the immune microenvironment of glioblastoma: implications for immunotherapy [J]. Cells, 2021, 10(3): 607.

[9] Chang AL, Miska J, Wainwright DA, *et al.* CCL2 produced by the glioma microenvironment is essential for the recruitment of regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells [J]. Cancer Res, 2016, 76(19): 5671.

[10] Pan Y, Smithson LJ, Ma Y, *et al.* Ccl5 establishes an autocrine high-grade glioma growth regulatory circuit critical for mesenchymal glioblastoma survival [J]. Oncotarget,

2017, 8(20): 32977.

[11] Giordano FA, Link B, Glas M, *et al.* Targeting the post-irradiation tumor microenvironment in glioblastoma via inhibition of CXCL12 [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(3): 272.

[12] Wang Q, He Z, Huang M, *et al.* Vascular niche IL-6 induces alternative macrophage activation in glioblastoma through HIF-2 α [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 559.

[13] Frei K, Gramatzki D, Tritzschler I, *et al.* Transforming growth factor- β pathway activity in glioblastoma [J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 5963.

[14] Sielska M, Przanowski P, Pasierbińska M, *et al.* Tumour-derived CSF2/granulocyte macrophage colony stimulating factor controls myeloid cell accumulation and progression of gliomas [J]. Br J Cancer, 2020, 123(3): 438.

[15] Gao Y, Zhang E, Liu B, *et al.* Integrated analysis identified core signal pathways and hypoxic characteristics of human glioblastoma [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 6228.

[16] Zhu Z, Zhang X, Yu Z, *et al.* Correlation of Tim-3 expression with chemokine levels for predicting the prognosis of patients with glioblastoma [J]. J Neuroimmunol, 2021, 355: 577575.

[17] Hsieh YH, Tsai JP, Yu CL, *et al.* Overexpression of lipocalin-2 inhibits proliferation and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells by activating ERK targeting Cathepsin D expression [J]. Biology (Basel), 2021, 10: 390.

[18] Widodo SS, Dinevska M, Furst LM, *et al.* IL-10 in glioma [J]. Br J Cancer, 2021, 125(11): 1466.

[19] Schwartzbaum JA, Xiao Y, Liu Y, *et al.* Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(10): 1770.

[20] Urbantat RM, Vajkoczy P, Brandenburg S. Advances in chemokine signaling pathways as therapeutic targets in glioblastoma [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(12): 2983.

(2022-11-19 收稿, 2023-01-12 修回)



(上接第 258 页)

[13] Wang Z, Ji X, Gao L, *et al.* Comprehensive in silico analysis of a novel serum exosome-derived competitive endogenous RNA network for constructing a prognostic model for glioblastoma [J]. Front Oncol, 2021, 11: 553594-553609.

[14] Kuratsu J, Leonard EJ, Yoshimura T. Production and characterization of human glioma cell-derived monocyte chemotactic factor [J]. J Natl Cancer Inst, 1989, 81(5): 347-351.

[15] Bhat KPL, Balasubramaniyan V, Vaillant B, *et al.* Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma [J]. Cancer Cell, 2013, 24(3): 331-346.

[16] Soukhtanloo M, Mohtashami E, Maghrouni A, *et al.* Natural products as promising targets in glioblastoma multiforme: a focus on NF- κ B signaling pathway [J]. Pharmacol Rep, 2020, 72(2): 285-295.

(2022-06-21 收稿, 2023-04-21 修回)