

• 论 著 •

肾癌免疫细胞浸润模式与生存预后分析*

华金骏¹, 李 兴², 王 杰^{1△}

上海中医药大学附属曙光医院:1. 泌尿外科;2. 麻醉科, 上海 201210

摘 要:**目的** 探讨肾癌免疫细胞浸润模式,分析浸润模式与生存预后的相关性,预测患者生存期及肿瘤进展。**方法** 在肿瘤癌症基因图谱(TCGA)中下载肾癌转录本数据和临床信息数据,运用开源数据包 CIBERSORT 反卷积算法计算肾癌 22 种免疫细胞浸润比例。采用 R 软件包绘制免疫细胞相关性热图。利用 R 软件包对肾癌免疫细胞浸润模式与肾癌临床分期进行分析。运用 Log-Rank 法评估肾癌免疫细胞浸润模式与生存预后之间的关系。**结果** 通过 TCGA 下载肾癌免疫细胞浸润数据,经过 CIBERSORT 运算和 P 值过滤后,得到 10 例正常组织免疫细胞浸润分布信息和 558 例肾癌组织免疫细胞浸润分布信息。在 TCGA 下载 943 例肾癌患者临床数据,经过剔除筛选后获得 526 例肾癌患者有效临床信息。肾癌组织与正常组织相比,M2 巨噬细胞水平较高($P<0.05$);幼稚 B 细胞、浆细胞、未活化的 CD4⁺ 记忆 T 细胞、静息态树突状细胞水平较低($P<0.05$)。随着肾癌进展,未活化的 NK 细胞、单核细胞、未活化的肥大细胞和未活化的 CD4⁺ 记忆 T 细胞水平逐渐降低;M0 巨噬细胞、滤泡辅助性 T 细胞、CD8⁺ T 细胞、活化的 CD4⁺ 记忆 T 细胞、浆细胞和调节性 T 细胞水平逐渐增加。根据生存分析发现,低水平调节性 T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞的患者 5 年生存率更高;高水平单核细胞、静息态树突状细胞、未活化的肥大细胞的患者 5 年生存率更高。**结论** 肾癌肿瘤微环境中存在免疫细胞不同程度浸润,免疫细胞浸润模式与肾癌生存、临床分期进展密切相关,未来可以根据免疫细胞浸润模式开发出更好的靶向治疗药物。

关键词: 肾癌; 免疫细胞浸润模式; 生存预后; 临床分期
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.08.002 **中图法分类号:**R737.11
文章编号:1673-4130(2021)08-0902-05 **文献标志码:**A

Analysis of immune cell infiltration pattern and survival prognosis of renal carcinoma*

HUA Jinjun¹, LI Xing², WANG Jie^{1△}

1. Department of Urology; 2. Department of Anesthesiology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China

Abstract:**Objective** To explore the infiltration pattern of immune cells in renal carcinoma, and to analyze the correlation between infiltration pattern and survival and prognosis, as well as to predict the survival time and tumor progression. **Methods** Transcript data and clinical information data of renal carcinoma were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA). CIBERSORT deconvolution algorithm was used to calculate the infiltration ratio of 22 kinds of immune cells in renal carcinoma. The R package was used to draw the correlation heat map of immune cells. R package was used to analyze the pattern of immune cell infiltration and staging of renal carcinoma. The Log-Rank method was used to evaluate the relationship between the infiltration pattern of immune infiltrating cells and survival prognosis of renal carcinoma. **Results** The data of immunocyte infiltration in renal carcinoma was downloaded by TCGA. After CIBERSORT operation and P-value filtering, the information of immunocyte infiltration distribution in 10 normal cases and 558 cases of renal carcinoma was obtained. A total of 943 cases of renal carcinoma clinical data were downloaded from TCGA website, and 526 cases of effective renal carcinoma clinical information were obtained after screening. Compared with normal tissues, level of macrophages M2 was higher in renal carcinoma tissues ($P<0.05$). Levels of immature B cells, plasma cells, resting CD4⁺ memory T cells, resting dendritic cells were lower ($P<0.05$). With the progression of renal carcinoma, the levels of resting NK cells, monocytes, resting mast cells and resting memory CD4⁺ T cells decreased gradually. M0 macrophages, follicular helper T cells, CD8⁺ T cells, activated memory CD4⁺ T cells, plasma cells and regulatory T cells increased gradually. According to survival analysis,

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973652)。
作者简介: 华金骏, 男, 主治医师, 主要从事泌尿系统疾病的中西医结合治疗方面的研究。△ 通信作者, E-mail: sgwangjiedoctor@163.com。
本文引用格式: 华金骏, 李兴, 王杰. 肾癌免疫细胞浸润模式与生存预后分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(8): 902-906.

patients with low expression of regulatory T cells and follicular helper T cells had higher 5-year survival rates. Patients with higher level of monocytes, resting dendritic cells and mast cells resting had higher 5-year survival rates. **Conclusion** There are various kinds of immune cells infiltrating in the tumor microenvironment of renal carcinoma, and the immune cell infiltration mode is closely related to the survival and clinical staging of renal carcinoma. Better targeted drugs can be developed according to the immune cell infiltration mode in the future.

Key words: renal carcinoma; immune cell infiltration pattern; survival prognosis; clinical stage

肾癌是泌尿系统常见的肿瘤,在我国发病率呈逐年升高趋势,约 25% 的患者就诊时已经出现了转移,转移后的患者 5 年生存率不足 10%^[1]。虽然手术治疗是肾癌的主要治疗手段,但约有 1/2 的患者术后出现复发和预后不良,疗效欠佳,占比最高的肾细胞癌对传统放化疗敏感程度也较低,总体而言,目前对于肾癌仍缺乏有效的针对性治疗方法^[2]。肾癌组织周围存在大量 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞等,免疫治疗可能成为肾癌治疗的有效手段^[3]。肿瘤微环境免疫模式已经被列入肿瘤十大特征之一,既能够预测患者生存预后,还能预测患者放化疗疗效^[4]。肿瘤微环境中免疫细胞分布模式与患者生存预后密切相关,免疫细胞浸润模式可以作为治疗依据来提高患者生存率与改善远期预后^[5]。目前对肾癌免疫细胞浸润及免疫标志物的研究较少,尚缺乏精准筛选肾癌免疫治疗标志物的方法。常规免疫组化和流式细胞检测技术在评估免疫细胞模式上存在一定的局限,单次评估免疫细胞效率较低。CIBERSORT 是目前生物信息学研究中新的基于基因表达大数据去卷积的复杂算法,可以根据患者的基因表达数据转化为免疫细胞浸润比例^[6]。本研究采用生物信息学的方法,挖掘肿瘤癌症基因图谱(TCGA)数据库,基于 CIBERSORT 复杂算法和 TCGA 肾癌患者样本数据,系统性探讨肾癌患者免疫细胞浸润模式及其与免疫细胞的相关性,深入分析肾癌免疫细胞浸润模式与患者生存预后、临床分期的关系。

1 资料与方法

1.1 获取数据 进入在线 TCGA 网站(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)选择疾病肾癌,数据来源方式选择 TCGA,然后选择转录本数据, workflow 数据选择矫正过的 FPKM 数据,下载组织样本基因表达数据^[7],共 1 023 例,包含正常组织 128 例,肾癌组织 895 例。在 TCGA 网站肾癌中选择临床样本数据,选择 TCGA 数据来源,选择数据格式 bcr xml,方便后期程序化处理,下载关于肾癌的临床数据,包括年龄、性别、生存时间、生存状态、肿瘤分期信息,共 943 例,运用 Excel 对临床信息进行筛选,剔除数据缺失、分期状态未知、生存状态未知的患者,保留完整数据的临床信息患者,最终获得 526 例有效肾癌患者临床特征信息。

1.2 评估肾癌免疫细胞浸润 运用 Excel 对 526 例肾癌患者临床信息中的年龄、性别、临床分期绘制直观三线表。利用 Perl 软件(5.26.1)提取肾癌相关转

录本中 mRNA 表达谱数据,生成转录本 mRNA 的矩阵文件,并进行基因名称转换标准化注释^[8]。运用 R 软件调用 CIBERSORT 数据包(<https://cibersort.stanford.edu/>)检查标准化后的矩阵文件中 22 种肿瘤免疫细胞浸润情况^[9]。这 22 种免疫细胞包括 M0 巨噬细胞、M1 巨噬细胞、M2 巨噬细胞、滤泡辅助 T 细胞等,其中幼稚 CD4⁺ T 细胞在全部样本中水平为 0,故针对性分析其余 21 种免疫细胞。运用 Perl 数据包,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,最终筛选得到 10 例正常组织和 558 例肾癌组织免疫细胞浸润信息。运用 Excel 分别绘制正常和肾癌组织免疫细胞占比饼图。运用 R 软件包中 vioplot 包绘制可视化肾癌组织与正常组织免疫细胞构成比小提琴图,利用 R 软件包中的 corroplot 包分析免疫细胞间的相关性。将免疫细胞水平矩阵与其对应的 TCGA 临床数据合并,生成包含临床数据和免疫细胞浸润信息的 TXT 文本,运用 R 软件包中的 survival 包完成生存分析,以及免疫细胞浸润与肾癌临床分期相关性评价。

1.3 统计学处理 总生存期定义为从诊断日期开始到死亡日期之间的间隔,应用 R 软件包批量绘制 K-M 生存分析曲线,并进行假设检验(Log-Rank test)分析差异。肾癌分期中两组样本的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,两组以上样本的比较则采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义^[10]。

2 结果

2.1 肾癌患者临床特征 从 TCGA 下载肾癌临床相关数据,剔除不完整的数据,得到 526 例肾癌患者临床信息,包含年龄、性别、临床分期信息,见表 1。

表 1 肾癌患者临床病理特征

指标	<i>n</i>	百分比(%)
年龄(岁)		
≥50	420	79.85
<50	106	20.15
性别		
男	339	64.45
女	187	35.55
临床分期		
G1	14	2.66
G2	228	43.35
G3	207	39.35
G4	77	14.64

2.2 肾癌免疫细胞浸润分布 从 TCGA 下载到 1 023 例免疫细胞浸润信息,经过筛选后获得 10 例正

常组织,558 例肾癌组织免疫细胞浸润信息,绘制正常组织和肾癌组织免疫细胞构成比图及肾癌免疫细胞相关性热图。结果显示,肾癌组织与正常组织相比,M2 巨噬细胞水平较高($P<0.05$);幼稚 B 细胞、浆细胞、未活化的 $CD4^{+}$ 记忆 T 细胞、静息态树突状细胞水平较低($P<0.05$)。同时,在肾癌组织中, $CD8^{+}$ T 细胞与滤泡辅助性 T 细胞($r=0.59$)、 $\gamma\delta$ T 细胞水平呈正相关($r=0.60$); $CD8^{+}$ T 细胞与 M2 巨噬细胞水平($r=-0.55$)、未活化的 $CD4^{+}$ 记忆 T 细胞水平($r=-0.62$)呈负相关。

2.3 肾癌浸润性免疫细胞水平与临床相关性评价
2.3.1 与临床分期的相关性 将获得的临床分期信息与其对应的免疫细胞浸润信息进行合并,绘制肾癌浸润性免疫细胞与临床分期箱式图,见图 1。随着临床分期的进展,未活化的 NK 细胞、单核细胞、未活化的肥大细胞、未活化的 $CD4^{+}$ 记忆 T 细胞水平逐渐降低,提示这些细胞抑制肾癌进展;M0 巨噬细胞、滤泡辅助性 T 细胞、 $CD8^{+}$ T 细胞、活化的 $CD4^{+}$ 记忆 T 细胞、浆细胞、调节性 T 细胞水平随着肾癌进展逐渐递增,提示这些细胞促进肾癌进展。

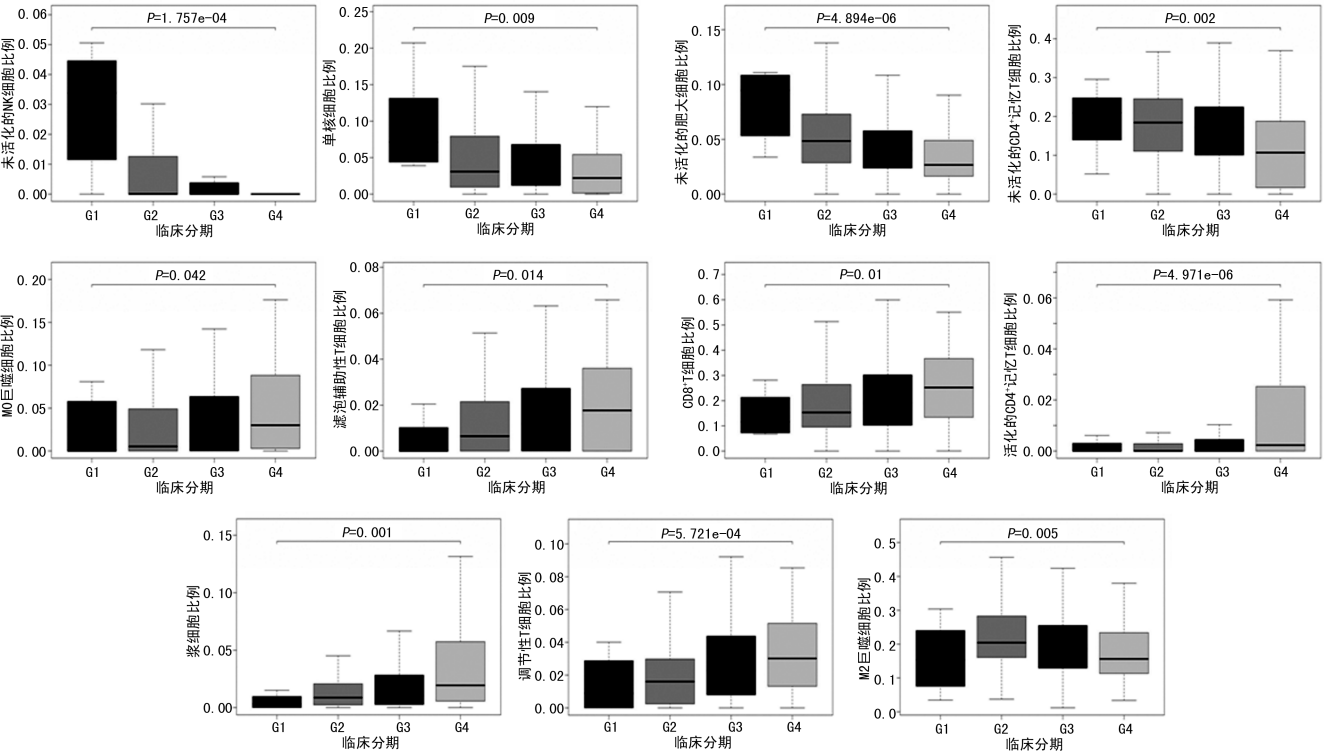
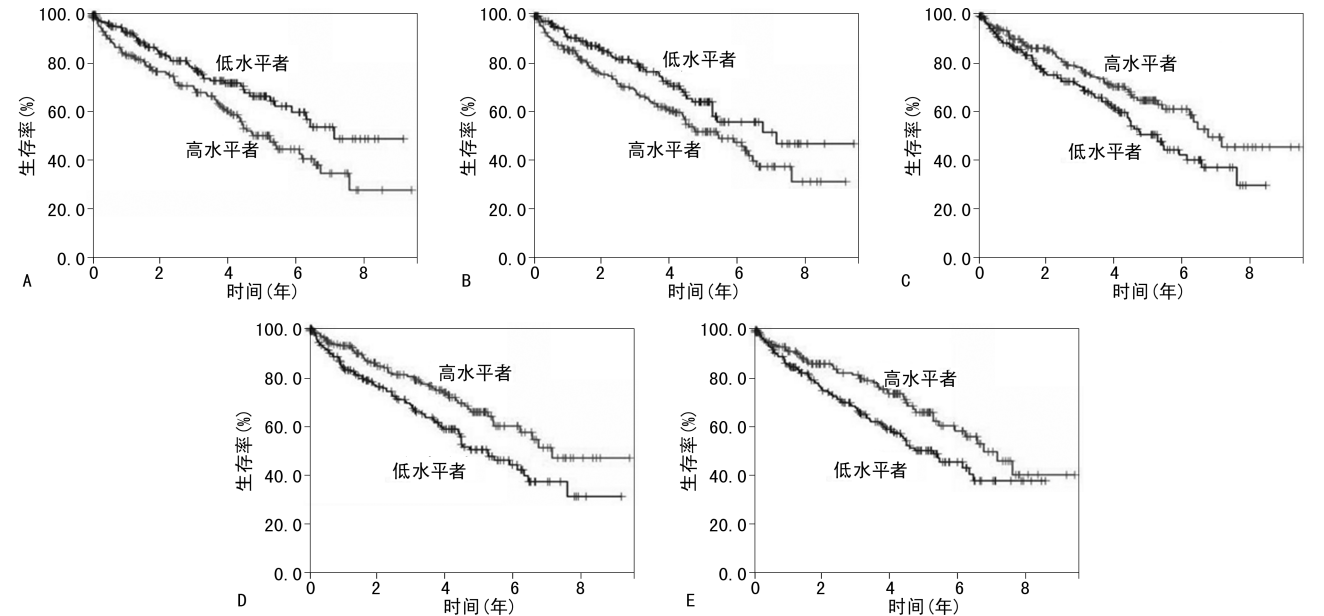


图 1 肾癌浸润性免疫细胞水平与临床分期箱式图



注:A、B、C、D、E 分别代表低水平和高水平调节性 T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、单核细胞、静息态树突状细胞、未活化的肥大细胞患者生存率的比较。

图 2 不同浸润性免疫细胞水平肾癌患者生存曲线图

2.3.2 与生存预后的相关性 根据肾癌免疫细胞构成比高和低,结合假设检验(Log-Rank test)计算其与生存的相关性,批量绘制肾癌组织免疫细胞 K-M 生存曲线,见图 2。可以发现,低水平调节性 T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞的患者 5 年生存率更高;高水平单核细胞、静息态树突状细胞、未活化的肥大细胞的患者 5 年生存率更高。

3 讨论

目前,相关学者对肿瘤免疫细胞浸润的研究和认识逐步提升,发现某些特定的免疫细胞亚群在预测个体化特异性治疗效果上起着主要作用^[11]。通常实验室采用流式细胞术和免疫组化技术分析肿瘤免疫细胞,但流程相对较复杂,周期较长。CIBERSORT 是斯坦福大学研究人员写出的分析包,创新性采用反卷积算法,可以准确、快速地分析基因表达数据,目前得到广泛应用^[12]。本研究基于 TCGA 数据库分析肾癌患者免疫细胞浸润和临床相关信息,对肾癌免疫细胞浸润模式进行了分析评价,发现对比正常组织,肾癌组织 M2 巨噬细胞水平较高;幼稚 B 细胞、浆细胞、未活化的 CD4⁺ 记忆 T 细胞、静息态树突状细胞水平较低。已有研究表明,M2 巨噬细胞与肿瘤增殖、侵袭、转移密切相关^[13],高水平的 M2 巨噬细胞是肾乳头状癌的核心特征之一,高水平的静息态树突状细胞与透明肾细胞癌的预后呈正相关^[14]。在肾癌组织中,CD8⁺ T 细胞与滤泡辅助性 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞水平呈正相关($P<0.05$);CD8⁺ T 细胞与 M2 巨噬细胞、未活化的 CD4⁺ 记忆 T 细胞水平呈负相关($P<0.05$),说明 CD8⁺ T 细胞改变与肾癌免疫微环境的变化密切相关,针对 243 例肾透明细胞癌患者的队列研究也证实 CD8⁺ T 细胞对诱导肿瘤免疫和细胞分布具有重要意义^[15],这提示 CD8⁺ T 细胞可能在免疫微环境平衡调控中发挥重要作用。

通过将肾癌免疫细胞浸润模式与临床分期特征结合分析,发现随着肾癌进展,未活化的 NK 细胞、单核细胞、未活化的肥大细胞、未活化的 CD4⁺ 记忆 T 细胞水平逐渐降低;M0 巨噬细胞、滤泡辅助性 T 细胞、CD8⁺ T 细胞、活化的 CD4⁺ 记忆 T 细胞、浆细胞、调节性 T 细胞水平逐渐增加,提示免疫细胞浸润模式的改变与肾癌的进展密切相关。有研究表明,相对于肾透明细胞癌低危患者,高危患者的滤泡辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞、M0 巨噬细胞水平明显升高^[16]。M0 巨噬细胞主要作用是吞噬清除凋亡细胞及致病物质,能够调控免疫应答,促进组织重构、纤维化等^[17-18]。单核细胞可以通过吞噬和产生抗体消灭外来入侵病原体,随着肿瘤进展,机体防御系统功能下降,失去对肿瘤的控制。当效应 T 细胞初次与肿瘤作

用后,肿瘤抗原得到清除,T 细胞逐步凋亡,但其中有少量的效应 T 细胞转为记忆 T 细胞,长期存活发挥效应,在遭遇同种抗原攻击时,快速介导发生效应。伴随肿瘤的进展,T 细胞逐步变为效应 T 细胞,发挥肿瘤抗原清除作用,活化的 CD4⁺ 记忆 T 细胞增多。调节性 T 细胞在肿瘤浸润淋巴细胞、外周淋巴细胞和局部淋巴结中占比较高,与包括肾癌在内的多种肿瘤进展密切相关,可以增强肿瘤抗原识别,加速抗原清除^[19]。这些免疫细胞可能参与了肾癌的发生和进展,为肾癌的诊断和转归提供了参考。

通过结合肾癌患者生存状态进一步分析,发现低水平调节性 T 细胞、滤泡辅助性 T 细胞的肾癌患者 5 年生存率更高,高水平单核细胞、静息态树突状细胞、未活化的肥大细胞的肾癌患者 5 年生存率更高。调节性 T 细胞在维持免疫稳态,介导外周信号上发挥重要作用,临床研究表明,外周血调节性 T 细胞的高水平与肾细胞癌患者的不良生存预后密切相关^[20]。滤泡辅助性 T 细胞是近些年来发现的一群独立的 CD4⁺ T 细胞亚群,但目前有关肾癌中滤泡辅助性 T 细胞的研究较少,仍有待进一步探索^[19,21-22]。树突状细胞是最强的专职抗原提呈细胞,是 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 初始细胞的主要激活细胞,然而肿瘤微环境中的因素会减弱树突状细胞的抗原提呈功能,从而限制 T 细胞活性,促进肿瘤生长^[23]。静息态树突状细胞水平与肾癌 5 年生存率相关,对比发现,其在正常组织中水平较高,在肾癌组织中水平较低,但是正常组织和肿瘤组织中活化的树突状细胞水平均不高,可能是肾癌肿瘤微环境抑制了树突状细胞的功能,减少抗原提呈,发生了免疫逃逸。已有学者研究表明,肥大细胞能够加速肾癌细胞侵袭和迁徙,促进肾癌恶化^[24]。

目前有关肾癌组织免疫细胞浸润模式的研究较少,本文通过 CIBERSORT 算法结合生物信息学对肾癌免疫细胞浸润模式进行了系统性分析,肾癌患者发病年龄整体较高,发病相对隐匿,如何早期鉴别肾癌、及时预测肾癌转归是今后重要的研究方向。相对正常组织,肾癌组织免疫细胞构成明显不同,M2 巨噬细胞明显增多,同时伴随肿瘤的恶化,肾癌免疫细胞浸润模式逐步改变,单核细胞、NK 细胞、树突状细胞等免疫细胞的抗原清除能力逐步降低,肿瘤微环境的免疫抑制逐步提升。临床上可以将肾癌免疫细胞浸润模式作为参照,预测肾癌患者的生存期及肿瘤进展情况,开展肾癌的个体化免疫治疗,改善患者预后,提高患者生存率,使更多患者获益。

参考文献

[1] 李思明,盛锡楠. 2018 年肾癌内科治疗进展盘点[J/CD].

- 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, 5(1): 15-19.
- [2] 鲁广建, 狄文玉, 张春晓. 肾癌病人外周血 NK 细胞活性表达与临床分期的相关性研究[J]. 临床研究, 2020, 28(7): 135-137.
- [3] 夏琳, 宋媛媛, 郝瑞敏, 等. 晚期肾细胞癌治疗现状和新药研发考虑[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(16): 2571-2577.
- [4] 吴林峰, 孙永吉, 叶乐乐, 等. 结直肠癌组织浸润免疫细胞组成及特征[J]. 温州医科大学学报, 2020, 50(6): 454-460.
- [5] HU B, SHI X, DU X, et al. Pattern of immune infiltration in lung cancer and its clinical implication[J]. Clin Chim Acta, 2020, 508: 47-53.
- [6] 张深燕. 结直肠癌生长模式与免疫细胞浸润及预后相关性分析[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [7] LIU S, SONG A, ZHOU X, et al. ceRNA network development and tumour-infiltrating immune cell analysis of metastatic breast cancer to bone[J]. J Bone Oncol, 2020, 24: 100304.
- [8] ZHANG J, ZHANG J, YUAN C, et al. Establishment of the prognostic index of lung squamous cell carcinoma based on immunogenomic landscape analysis[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 330.
- [9] ZENG H, SONG X, JIANG J, et al. HPV infection related immune infiltration gene associated therapeutic strategy and clinical outcome in HNSCC[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 796.
- [10] PANG Z P, CHEN X, WANG Y, et al. Comprehensive analyses of the heterogeneity and prognostic significance of tumor-infiltrating immune cells in non-small-cell lung cancer: development and validation of an individualized prognostic model[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 86: 106744.
- [11] 秦远, 黄娜, 谭燕, 等. 宫颈癌中肿瘤免疫细胞浸润模式及预后价值[J]. 西部医学, 2019, 31(11): 1651-1656.
- [12] 秦凯, 程熠, 黄露露, 等. 基于 TCGA 数据库探讨宫颈癌免疫细胞浸润模式与临床特征和预后的相关性[J/OL]. 海南医学院学报, 2020: 1-9 (2020-06-23) [2021-02-18]. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20200623.002>.
- [13] BEHNES C L, BREMMER F, HEMMERLEIN B, et al. Tumor-associated macrophages are involved in tumor progression in papillary renal cell carcinoma[J]. Virchows Arch, 2014, 464(2): 191-196.
- [14] PAN Q, WANG L, CHAI S, et al. The immune infiltration in clear cell Renal Cell Carcinoma and their clinical implications: a study based on TCGA and GEO databases[J]. J Cancer, 2020, 11(11): 3207-3215.
- [15] QI Y, XIA Y, LIN Z, et al. Tumor-infiltrating CD39⁺ CD8⁺ T cells determine poor prognosis and immune evasion in clear cell renal cell carcinoma patients[J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(8): 1565-1576.
- [16] HUA X, CHEN J, SU Y, et al. Identification of an immune-related risk signature for predicting prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. Aging, 2020, 12(3): 2302-2332.
- [17] 陈聪, 沈文涛, 刘彦. 微环境中巨噬细胞影响血吸虫肝纤维化的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(2): 241-245.
- [18] 牛卓娅, 张亚玲, 姚智燕, 等. 巨噬细胞极化与炎性疾病的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(6): 742-745.
- [19] 罗慧, 汪琪, 张大听. T 淋巴细胞在肿瘤免疫中的双重作用及其免疫治疗现状[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(11): 936-940.
- [20] GRIFFITHS R W, ELKORD E, GILHAM D E, et al. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival[J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(11): 1743-1753.
- [21] ZHANG H, YUE R, ZHAO P, et al. Proinflammatory follicular helper T cells promote immunoglobulin G secretion, suppress regulatory B cell development, and correlate with worse clinical outcomes in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2017, 39(6): 1010428317705747.
- [22] SHI W, DONG L, SUN Q, et al. Follicular helper T cells promote the effector functions of CD8 T cells via the provision of IL-21, which is downregulated due to PD-1/PD-L1-mediated suppression in colorectal cancer[J]. Exp Cell Res, 2018, 372(1): 35-42.
- [23] 王建莉, 路小超, 封贺, 等. 树突状细胞与肿瘤免疫系统相互作用研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(2): 188-194.
- [24] 吕不凡, 陈志雄, 蒋其龙, 等. 浸润性肥大细胞对肾癌细胞的侵袭与迁移能力的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(2): 129-132.

(收稿日期: 2020-09-15 修回日期: 2021-02-23)