

· 论 著 ·

基于生物信息学分析卵巢癌免疫细胞浸润程度及其与预后的关系

熊璐,苑雪萍,徐冲,许琳,韩旭东[△]

北京市中关村医院病理科,北京 100190

摘要:目的 探讨免疫细胞浸润程度与卵巢癌生存预后的关系。方法 通过生物信息学方法,从 GEO 数据库下载卵巢癌患者的组织芯片测序数据和临床分期、病理分级、生存状态、生存时间等信息。通过 ssGSEA 基因集的各项免疫评分,将卵巢癌患者分为高分组和低分组。通过生存曲线比较滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)高、低评分组的生存预后情况。通过 Cibersort 软件计算肿瘤组织中各类免疫细胞浸润的比例,并进行相关性分析。结果 Tfh 评分与预后生存有关($P < 0.05$)。Tfh 高分组的浆细胞、活化的 NK 细胞、M1 型巨噬细胞浸润程度明显高于低分组($P < 0.05$),而 M2 型巨噬细胞的浸润程度则明显低于低分组($P < 0.05$)。结论 卵巢癌中存在不同程度的免疫细胞浸润,Tfh 浸润可能是影响卵巢癌患者预后的因素。

关键词:卵巢癌; 免疫细胞; 预后分析; ssGSEA; Cibersort

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.021

中图法分类号:R446.8

文章编号:1673-4130(2021)17-2141-05

文献标志码:A

Correlation analysis of immune cell infiltration pattern and prognosis in ovarian cancer based on bioinformatics methods

XIONG Lu, YUAN Xueping, XU Chong, XU Lin, HAN Xudong[△]

Department of Pathology, Zhongguancun Hospital, Beijing 100190, China

Abstract: **Objective** To explore the correlation between immune cell infiltration and prognosis of ovarian cancer. **Methods** Downloaded the microarray sequencing data, clinical stage, tumor classification, survival status, survival time and other information of ovarian cancer patients from the GEO database by using bioinformatics methods. By using the immune score of ssGSEA gene set, divided the ovarian cancer patients into high-score group and low-score group. The survival curve was used to compare the survival prognosis between high and low T cells follicular helper (Tfh)-score group. Calculated the proportion of various types of immune cells infiltration in tumor tissues through Cibersort software, and perform correlation analysis. **Results** Tfh score was related to prognostic survival ($P < 0.05$). The degree of infiltration of plasma cells, activated NK cells, and M1 macrophages in the high Tfh-score group was significantly higher than that in the low Tfh-score group ($P < 0.05$), while the infiltration degree of M2 macrophages was significantly lower than that of the low Tfh-score group ($P < 0.05$). **Conclusion** There are varying degrees of immune cell infiltration in ovarian cancer, and Tfh infiltration may be a factor affecting the prognosis of patients with ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; immune cells; prognostic analysis; ssGSEA; Cibersort

卵巢癌是严重威胁妇女健康的恶性肿瘤。尽管近年来卵巢癌的手术和化学疗法取得了较大进步,但是其发病率和病死率仍呈逐年上升的趋势。全世界每年新诊断出超过 23 万例患者和超过 15 万名女性死于卵巢癌^[1-3],卵巢癌患者的 5 年存活率仅为 47%^[4]。关于卵巢癌的治疗,肿瘤细胞减灭手术和化疗药物铂类、紫杉醇等治疗是晚期卵巢癌患者的一线疗法。这种标准治疗方案在晚期卵巢癌中的完全反应率可达 40%~60%,但是在 18 个月后复发的患者超过了 90%,并且出现对化疗药物耐药,最终死于卵巢癌^[5]。由此可见,卵巢癌的预后仍有待进一步提高,探索新的治疗靶点和手段是十分必要的。

随着肿瘤免疫治疗的进展,肿瘤与免疫的相关性受到越来越多的重视,肿瘤中浸润的免疫细胞水平与肿瘤生长、进展和患者结局有关,成为近年研究的焦

点^[6-7]。从免疫学角度看,卵巢癌患者紊乱的免疫功能在肿瘤细胞的发生、发展中起着重要作用^[8-9]。有学者提出了从复杂组织的基因表达谱中计算免疫细胞组成的方法,该方法在结直肠癌、肺癌、滤泡淋巴瘤中通过流式细胞术得到很好的验证,能大规模应用于基因表达谱数据的分析^[10-11]。本研究利用 GEO 数据库中卵巢癌的表达谱数据,通过 R 软件计算了卵巢癌样本中免疫细胞的组成,并进一步分析了免疫细胞浸润与卵巢癌预后的关系。

1 资料与方法

1.1 数据来源 本研究的卵巢癌芯片数据来源于 GEO 数据库的 GSE63885 数据集, GSE63885 数据集包含 101 例卵巢癌患者的组织 RNA-seq 测序数据(由 GPL570 平台注释)。本课题组下载该数据集 RNA-seq 的 Counts 矩阵,同时还包括患者临床分期、

作者简介:熊璐,女,主治医师,主要从事病理诊断的相关研究。[△] **通信作者,** E-mail:13810833901@163.com。

本文引用格式:熊璐,苑雪萍,徐冲,等.基于生物信息学分析卵巢癌免疫细胞浸润程度及其与预后的关系[J].国际检验医学杂志,2021,42(17):2141-2145.

病理分级、生存状态、生存时间等信息。

1.2 方法

1.2.1 ssGSEA 免疫基因集分析及免疫评分 通过 ssGSEA 算法计算每个样本的免疫浸润程度,下载分析所需要的 gmt 格式基因集数据后,使用 R 包 GSVA 对 GSE63885 中的样本进行免疫评分,共包含 29 项免疫相关评分。

1.2.2 预后分析 使用 survival 程序包分析各项免疫评分与生存预后的关系。根据各项评分的中位数(作为界值)将患者分为高分组和低分组,然后筛选高分组与低分组预后生存情况差异有统计学意义($P < 0.05$)的免疫评分项并绘制生存曲线进行展示。

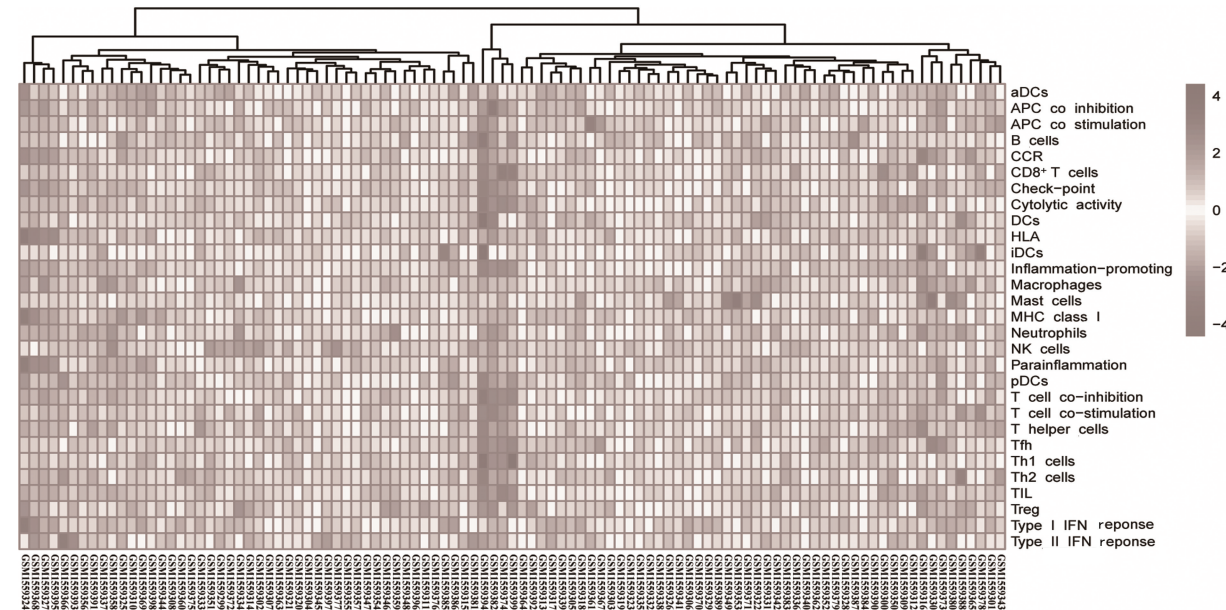
1.2.3 采用 Cibersort 软件计算免疫细胞构成 采用 limma 应用程序包的 Normalize Between Arrays 函数对 GSE63885 卵巢癌测序数据进行校正,即组间归一化处理,校正后的数据通过 Cibersort 软件的“反卷积法”得到 22 种免疫细胞在肿瘤组织中的占比数据,根据 $P < 0.05$ 筛选预测合格的样本,绘制免疫细胞占比相关性热图,同时根据与预后相关的免疫评分项进行分组,绘制免疫浸润细胞小提琴图。

2 结果

2.1 卵巢癌样本临床信息 本研究项目的数据共包

括 101 例卵巢癌患者信息。病理分级方面,G3 的患者居多(占 50.5%);临床分期中,Ⅲ期患者较多(占 63.4%)。此外,从乳腺癌易感基因 1(BRCA1)和 TP53 基因突变情况可知,TP53 基因突变是卵巢癌患者的主要特征,85.1% 的患者检测到突变位点,另有 30.7% 的患者有 BRCA1 突变。见表 1。

2.2 卵巢癌样本免疫评分 101 例卵巢癌样本的免疫评分热图见图 1。免疫细胞相关基因集有树突状细胞(DCs,分为 aDCs、iDCs、pDCs)、抗原呈递(共抑制)细胞(APC co-inhibition)、抗原呈递(共刺激)细胞(APC co-stimulation)、B 细胞、CD8⁺ T 细胞、巨噬细胞、肥大细胞、中性粒细胞、自然杀伤(NK)细胞、共抑制 T 细胞(T cell co-inhibition)、共刺激 T 细胞(T cell co-stimulation)、辅助性 T 细胞(Th 细胞,分为 Th1 细胞和 Th2 细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)、调节 T 细胞(Treg);免疫分子相关基因集有趋化因子受体(CCR)、检查点(Check point)、细胞活化因子(Cytolytic activity)、人类白细胞抗原(HLA)、副炎症(Parainflammation)、促炎性因子(Inflammation promoting)、主要组织相容性复合体 I(MHC class I)、I 性干扰素(Type I IFN reponse)、II 性干扰素(Type II IFN reponse)。



注:cells 表示细胞;Mast cells 为肥大细胞;Macrophages 为巨噬细胞;Neutrophils 为中性粒细胞。

图 1 卵巢癌免疫评分热图

表 1 卵巢癌患者临床信息[n(%)]		
临床信息	分级及分期	例数及所占比例
病理分级	G1	0(0.0)
	G2	10(9.9)
	G3	51(50.5)
	G4	19(18.8)
	NA	21(20.8)
病理分期	I	0(0.0)
	II	2(2.0)
	III	64(63.4)

续表 1 卵巢癌患者临床信息[n(%)]		
临床信息	分级及分期	例数及所占比例
	IV	11(10.9)
	NA	24(23.7)
BRCA1	突变	31(30.7)
	未突变	70(69.3)
TP53	突变	86(85.1)
	未突变	15(14.9)

注:NA 表示未能分级或分期。

2.3 免疫评分预后分析 以各项免疫评分的中位数为界值,将患者分为高、低分组,结合患者的生存时间和生存状态数据,采用 Kaplan-Meier Log-rank 法对各项免疫评分与生存预后的关系进行分析。Tfh 评分与患者的生存预后相关($P=0.0267<0.05$),见图 2,高 Tfh 评分组患者较低分组生存预后更佳。

2.4 卵巢癌免疫细胞浸润分析 通过 Cibersort 软件获得各样本的免疫细胞浸润比例,共 66 例样本符合筛选标准($P<0.05$),绘制 66 例样本的免疫细胞占比柱状图和免疫细胞占比相关性热图。卵巢癌组织中浸润水平较高的细胞是 M2 型巨噬细胞(0.180 ± 0.085)%、浆细胞(0.114 ± 0.090)%、 $CD8^{+}$ T 细胞(0.105 ± 0.066)%。在卵巢癌组织中,免疫细胞占比相关系数(r)较大的包括 $\gamma\delta$ T 细胞和嗜酸性粒细胞($r=0.63, P<0.05$),嗜酸性粒细胞和 Tfh($r=0.65,$

$P<0.05$),Tfh 分别与 M1 型巨噬细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞呈较强正相关($r=0.54, P<0.05$),B 记忆细胞和未成熟的 B 细胞呈负相关性($r=-0.51, P<0.05$),见图 3。

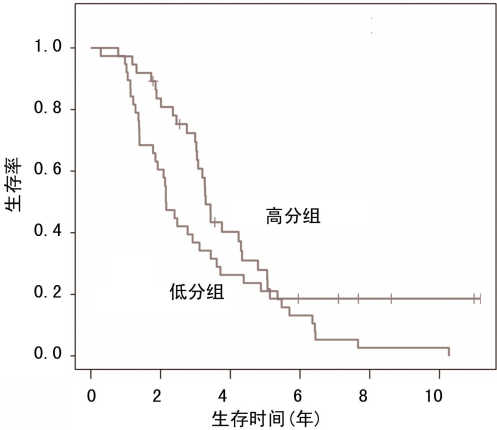
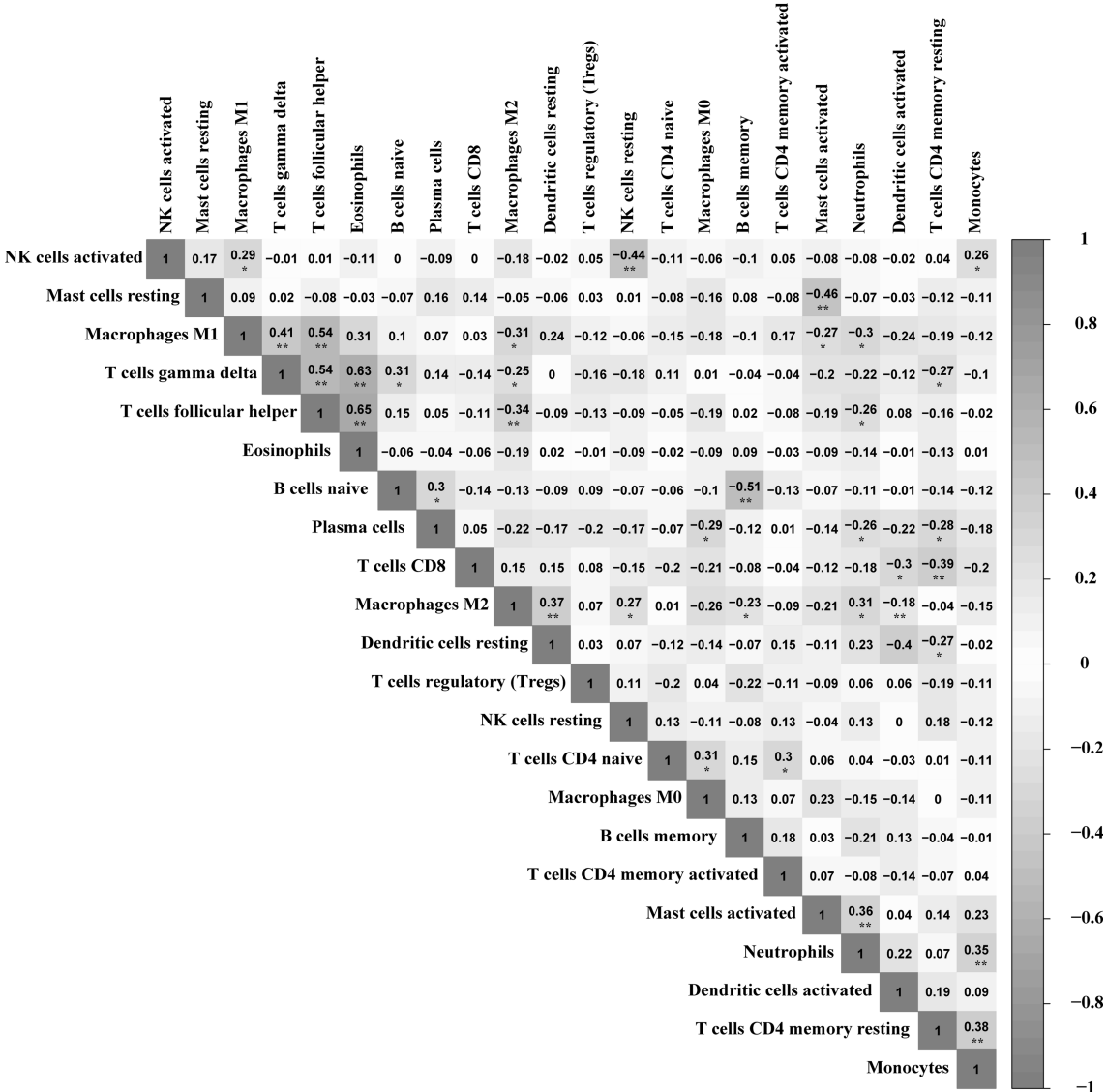


图 2 Tfh 评分相关生存曲线

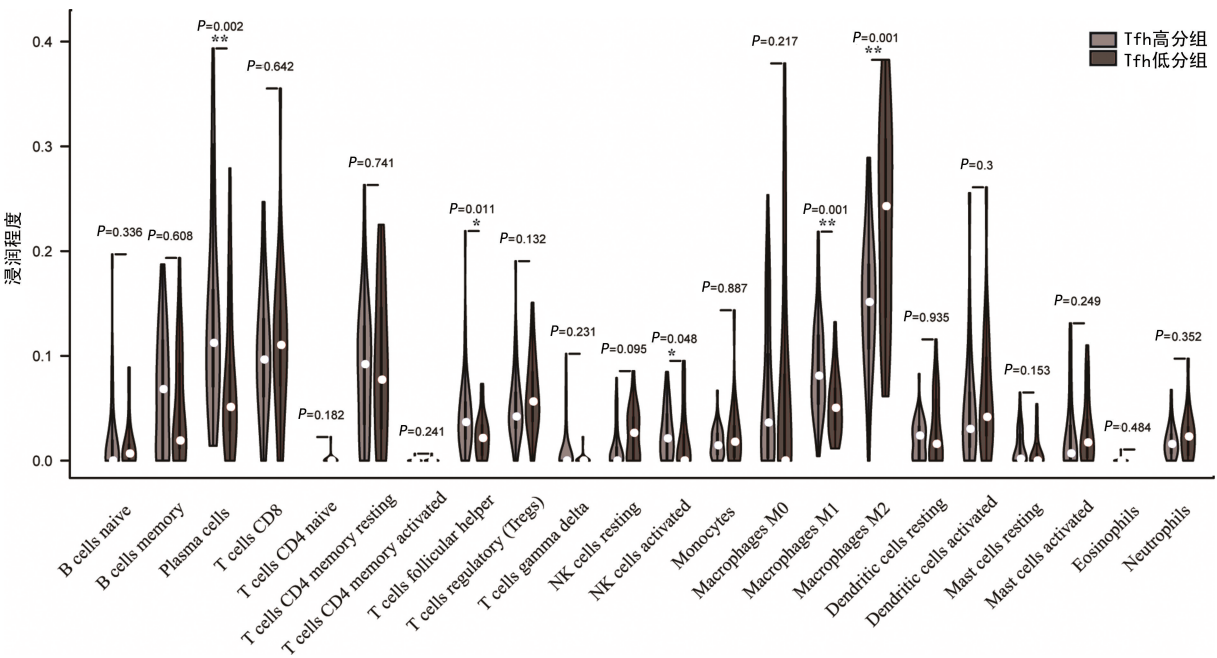


注: B cells naive 为未成熟的 B 细胞; B cells memory 为记忆 B 细胞; Plasma cells 为浆细胞; T cells CD8 为 $CD8^{+}$ T 细胞; T cells CD4 naive 为未成熟的 $CD4^{+}$ T 细胞; T cells CD4 memory resting 为静息记忆 $CD4^{+}$ T 细胞; T cells CD4 memory activated 为活化记忆 $CD4^{+}$ T 细胞; T cells follicular helper 为 Tfh; Tregs 为调节性 T 细胞; T cells gamma delta 为 $\gamma\delta$ T 细胞; NK cells resting 为静息 NK 细胞; NK cells activated 为活化 NK 细胞; Monocytes 为单核细胞; Macrophages 为巨噬细胞; Dendritic cells resting 为静息树突细胞; Dendritic cells activated 为活化树突细胞; Mast cells resting 为静息肥大细胞; Mast cells activated 为活化肥大细胞; Eosinophils 为嗜酸性粒细胞; Neutrophils 为中性粒细胞; * 表示 $P<0.01$, * 表示 $P<0.05$ 。

图 3 免疫细胞占比相关性热图

根据 Tfh 评分将患者分为 Tfh 高分组和低分组,比较两组间的免疫细胞浸润情况差异,绘制小提琴图,见图 4。Tfh 高分组的浆细胞、活化的 NK 细胞、

M1 型巨噬细胞浸润程度明显高于低分组 ($P < 0.05$),而 M2 型细胞的浸润程度则明显低于低分组 ($P < 0.05$)。



注:B cells naive 为未成熟的 B 细胞;B cells memory 为记忆 B 细胞;Plasma cells 为浆细胞;T cells CD8 为 CD8⁺ T 细胞;T cells CD4 naive 为未成熟的 CD4⁺ T 细胞;T cells CD4 memory resting 为静息记忆 CD4⁺ T 细胞;T cells CD4 memory activated 为活化记忆 CD4⁺ T 细胞;T cells follicular helper 为 Tfh;Tregs 为调节性 T 细胞;T cells gamma delta 为 $\gamma\delta$ T 细胞;NK cells resting 为静息 NK 细胞;NK cells activated 为活化 NK 细胞;Monocytes 为单核细胞;Macrophages 为巨噬细胞;Dendritic cells resting 为静息树突细胞;Dendritic cells activated 为活化树突细胞;Mast cells resting 为静息肥大细胞;Mast cells activated 为活化肥大细胞;Eosinophils 为嗜酸性粒细胞;Neutrophils 为中性粒细胞;* 表示 $P < 0.01$,* 表示 $P < 0.05$ 。

图 4 免疫浸润细胞小提琴图(Tfh 分组)

3 讨 论

本研究利用 GEO 数据集中卵巢癌患者的基因表达数据进行免疫评分,根据免疫评分中位数将卵巢癌患者分为高分组和低分组,发现 Tfh 评分与卵巢癌患者的生存预后相关,Tfh 高分组患者较低分组预后更佳。Tfh 是辅助 B 细胞功能的主要 T 细胞亚群,可通过抗原呈递与新激活的 B 细胞相互作用,Tfh 与自身免疫性疾病、免疫缺陷和肿瘤等疾病密切相关。研究表明,Tfh 在乳腺癌的炎性浸润灶内大量存在,Tfh 的存在可以改善存活率,同时减弱免疫抑制^[12]。在大肠癌中也有浸润性 Tfh 的报道,其水平与患者的生存时间呈正相关^[13-14]。结合本研究的结果进行分析,Tfh 在肿瘤组织中的高水平浸润可能有利于患者的预后。

本研究通过 Cibersort 软件分析了卵巢癌组织中免疫细胞的浸润比例,结果发现浸润水平最高的是 M2 型巨噬细胞。巨噬细胞是具有可塑性和多能性的免疫细胞,M2 型巨噬细胞可分泌抑制性细胞因子白细胞介素(IL)-10 和转化生长因子- β (TGF- β)等,从而下调免疫应答^[15]。在肿瘤免疫微环境中,M2 型巨噬细胞与肿瘤细胞免疫逃逸的发生密切相关。既往研

究显示,卵巢癌细胞分泌多种细胞因子,使血液中的单核细胞聚集在卵巢癌组织中并分化为巨噬细胞。卵巢癌细胞可以分泌大量的巨噬细胞集落刺激因子-1(CSF-1),从而诱导巨噬细胞向 M2 巨噬细胞极化^[16]。Tfh 高分组中浆细胞、活化的 NK 细胞、M1 型巨噬细胞浸润程度明显高于低分组,而 M2 型巨噬细胞的浸润程度则明显低于低分组。通过对 M2 巨噬细胞的特异性标记分子进行免疫组织化学染色发现,M2 巨噬细胞的数量越多,晚期卵巢癌患者的预后就越差^[17]。通过对卵巢癌的 M1 和 M2 巨噬细胞进行免疫组织化学分析发现,M1/M2 巨噬细胞比例较高的患者预后较好,这表明 M2 型巨噬细胞在卵巢癌的进展中起重要作用^[18]。NK 细胞是具有直接杀伤功能的天然免疫效应细胞,在清除肿瘤细胞中起关键作用,其潜在的癌症免疫治疗靶点引起人们的广泛关注^[19-20]。本研究也显示,在 Tfh 高分组中活化 NK 细胞的浸润水平明显高于低分组,这可能也是 Tfh 高分组患者预后更好的原因。

本研究通过 ssGSEA 方法和 Cibersort 软件,利用基因表达数据分析卵巢癌免疫细胞浸润情况及其

与预后的关系,发现卵巢癌中存在不同程度的免疫细胞浸润,Tfh 可能为影响卵巢癌患者预后的因素。同时这种方法可以为研究免疫细胞浸润情况与肿瘤的关系提供新的研究手段。

参考文献

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [3] JELOVAC D, ARMSTRONG D K. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(3): 183-203.
- [4] KANDALAFT L E, ODUNSI K, COUKOS G. Immune therapy opportunities in ovarian cancer[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2020, 40: 1-13.
- [5] AGARWAL R, KAYE S B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(7): 502-516.
- [6] HAINAUT P, PLYMOTH A. Targeting the hallmarks of cancer: towards a rational approach to next-generation cancer therapy[J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25(1): 50-51.
- [7] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [8] ZHANG L, CONEJO-GARCIA J R, KATSAROS D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(3): 203-213.
- [9] HWANG W T, ADAMS S F, TAHIROVIC E, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis[J]. Gynecol Oncol, 2012, 124(2): 192-198.
- [10] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. Nat Methods, 2015, 12(5): 453-457.
- [11] ANDREW J G, AARON M N, LIU C L, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells

across human cancers[J]. Nat Med, 2015, 21(8): 938-945.

- [12] GU-TRANTIEN C, LOI S, GARAUD S, et al. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival[J]. J Clin Invest, 2013, 123(7): 2873-2892.
- [13] BINDEA G, MLECNIK B, TOSOLINI M, et al. Spatio-temporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. Immunity, 2013, 39(4): 782-795.
- [14] WANG Z, WANG Z, DIAO Y, et al. Circulating follicular helper T cells in Crohn's disease (CD) and CD-associated colorectal cancer [J]. Tumour Biol, 2014, 35(9): 9355-9359.
- [15] CHISTIakov D A, MYASOEDOVA V A, REVIN V V, et al. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2[J]. Immunobiology, 2018, 223(1): 101-111.
- [16] KAWAMURA K, KOMOHARA Y, TAKAISHI K, et al. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors[J]. Pathol Int, 2009, 59(5): 300-305.
- [17] BARROS M H, HAUCK F, DREYER J H, et al. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80908.
- [18] ZHANG M, HE Y, SUN X, et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients[J]. J Ovarian Res, 2014, 7: 19.
- [19] HERMANSON D L, BENDZICK L, PRIBYL L, et al. Induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells for treatment of ovarian cancer[J]. Stem Cells, 2016, 34(1): 93-101.
- [20] GREPPI M, TABELLINI G, PATRIZI O, et al. Strengthening the anti-tumor NK cell function for the treatment of ovarian cancer[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4): 890.

(收稿日期: 2020-12-11 修回日期: 2021-05-15)