

## 浸润免疫细胞在食管癌中的表达及其临床意义

覃燕<sup>1</sup>, 唐习强<sup>2</sup>, 曾德创<sup>2</sup>, 覃花杏<sup>2</sup>, 黄薪伊<sup>3</sup>, 杨迪<sup>4</sup>

(1. 右江民族医学院护理学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院研究生学院2019级, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院2018级临床本科教改班, 广西 百色 533000;

4. 右江民族医学院附属医院小儿外科, 广西 百色 533000)

**摘要:**目的 研究食管癌中浸润免疫细胞的表达情况,探讨肿瘤浸润免疫细胞与食管癌患者临床病理特征及预后的关系。方法 运用CIBERSORT运算法则在R语言及Perl软件中运算出22种免疫细胞在食管癌组织及正常组织中的表达,运用R语言及Perl软件运算出22种免疫细胞与食管癌的临床数据的相关性及与食管癌预后的关系。结果 差异表达分析发现,与正常组织相比,浆细胞在食管癌中呈低表达( $P=0.038$ ),单核细胞在食管癌中呈低表达( $P=0.024$ ),M0巨噬细胞在食管癌中呈高表达( $P=0.032$ ),静息肥大细胞呈低表达( $P=0.016$ );临床病理特征分析发现,静息NK细胞在食管癌中与临床分期有关( $P=0.027$ ),单核细胞与食管癌临床分期有关( $P=0.045$ ),M2巨噬细胞与食管癌T分级有关( $P=0.021$ );生存分析发现,22种免疫细胞中的激活肥大细胞与食管癌的预后有关( $P=0.017$ )。结论 免疫细胞与食管癌临床分期及预后有关,有可能成为评估食管癌分期及预后的指标及治疗靶点。

**关键词:**食管肿瘤;免疫细胞;预后

中图分类号:R735.1 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2020)03-0275-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.03.003

### Expressions of infiltrated immunocytes in esophageal carcinoma and its clinical significance

Qin Yan<sup>1</sup>, Tang Xiqiang<sup>2</sup>, Zeng Dechuang<sup>2</sup>, Qin Huaxing<sup>2</sup>, Huang Xinyi<sup>3</sup>, Yang Di<sup>4</sup>

(1. Nursing School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. Grade 2019, Graduate School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,

Guangxi, China; 3. Graduate of Grade 2018 in Teaching Reform Class of Clinical Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

4. Department of Pediatric Surgery, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To study the expression of infiltrated immune cells in esophageal cancer, and to explore the relationship between tumor infiltrating immune cells and clinically pathological features and prognosis of patients with esophageal cancer. **Methods** The expressions of 22 kinds of immune cells in esophageal cancer tissues and normal tissues were calculated by CIBERSORT algorithm in R language and Perl software. The correlation between 22 kinds of immune cells and clinical data of esophageal cancer and their relationship with the prognosis of esophageal cancer were calculated by R language and Perl software. **Results** The differential expression analysis showed that the plasma cells were lowly expressed in esophageal cancer ( $P=0.038$ ), monocytes were lowly expressed in esophageal cancer ( $P=0.024$ ), M0 macrophages were highly expressed in esophageal cancer ( $P=0.032$ ), and resting mast cells were lowly expressed ( $P=0.016$ ) by comparing with

基金项目:广西百色市科学研究与技术开发计划(百科技20193125)

第一作者简介:覃燕(1991-),女,硕士,助教,研究方向:外科护理临床与基础研究,E-mail:121326304@163.com

通讯作者简介:杨迪(1988-),男,硕士,住院医师,研究方向:肿瘤相关疾病生物信息分析,E-mail:387851354@qq.com

the normal tissues. The clinically pathological features analysis showed that resting NK cells in esophageal cancer were related to clinical staging ( $P=0.027$ ), and monocytes were associated with clinical stage of esophageal cancer ( $P=0.045$ ), and M2 macrophages were associated with T grading of esophageal cancer ( $P=0.021$ ). The survival analysis showed that the activated mast cells in 22 kinds of immune cells were associated with prognosis of esophageal cancer ( $P=0.017$ ). **Conclusion** Immunocyte is correlated to clinical stage and prognosis of esophageal cancer. It may be an indicator and therapeutic target for evaluating the stage and prognosis of esophageal cancer.

**Key words:** esophageal neoplasms; immune cells; prognosis

食管癌是我国消化道常见的恶性肿瘤之一。食管癌具有恶性程度高、预后差的特点,患者5年的生存率约为15%,严重威胁人们的生命健康<sup>[1-2]</sup>。因此,对食管癌的早期诊断、早期治疗及延长食管癌患者生存时间是临床上需探究的问题之一。食管癌主要是以进行性吞咽困难为首要症状,大部分确诊食管癌患者已进入中晚期,食管癌的治疗主要以手术为主,放疗、化疗等多种治疗方式联合治疗。目前评估食管癌的生物行为及预后的方法主要有临床分期、病理分级、影像学、术后病理结果等,而食管癌的评价及治疗手段并不能完全反应食管癌的生物行为及不能较理想地延长患者的生存时间。因此,在食管癌中寻找新的评估指标对评估食管癌生物行为并延长患者生存时间具有重要的意义。

肿瘤免疫细胞浸润是指免疫细胞从血液中移向肿瘤组织中,并发挥免疫细胞作用,在肿瘤发生、发展过程中可能发挥重要的作用。经过多年研究及探索,肿瘤组织中浸润的免疫细胞可以通过直接杀伤肿瘤细胞来抑制肿瘤组织的生长<sup>[3]</sup>。大量的临床研究发现,肿瘤组织中的免疫细胞浸润与临床特点具有相关性,因此,肿瘤组织中的免疫细胞有可能成为肿瘤诊断或者治疗中的新靶点。目前研究免疫细胞浸润的实验方法大多是免疫组化、流式细胞技术和免疫荧光技术,现阶段运用这些实验技术进行大规模浸润免疫细胞检测,其结果并不能全面阐述不同亚群的免疫细胞,并且实验成本高,消耗大量的人力和时间。因此,运用生物信息学技术可为研究者们提供很多有价值的信息,同时也能为后续的研究指明方向。TCGA数据库(<https://www.cancer.gov/about-cancer>)是美国国家癌症研究所(National Cancer Institute)和美国人类基因组研究所(National Human Genome Research Institute)共同监督的一个项目,旨在应用高通量的基因组分析技术,以帮助人们对癌症有个更好的认知,从而提高对于癌症的预防、诊断和治疗能力,每年都会有大量的数据源自TCGA数据库的文章发表<sup>[4]</sup>。例如:2018年,Wu H等<sup>[5]</sup>分析TCGA数据库数据发现,TFAP2B在子宫内膜癌呈低表达,并且与子宫内膜癌

预后有关。2018年,Zhu XF等<sup>[6]</sup>利用TCGA数据库挖掘了肺腺癌中的DNA甲基化生物标志物。2019年,Kurbatov V等<sup>[7]</sup>利用TCGA数据库在早期肺腺癌中分析免疫细胞,推测早期肺腺癌中富含静息肥大细胞及巨噬细胞的患者临床风险较低。因此,运用生物信息学技术分析TCGA数据库中肿瘤相关数据,为研究的起步及实验方向起到了很好的引导作用。CIBERSORT是2015年由Bindea G等开发的反卷积算法,可以基于标准化的基因表达数据来估算复杂组织的细胞组成,该方法能量化特定细胞类型的丰度,通过流式细胞学技术很好地验证并成功地评估了乳腺癌及肝癌组织中免疫细胞的组成<sup>[8-10]</sup>。CIBERSORT可被运用并计算组织中22种免疫细胞所占免疫细胞的比例,这22种免疫细胞包括:7种T细胞(CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>幼稚T细胞、CD4<sup>+</sup>静息记忆T细胞、CD4<sup>+</sup>激活记忆T细胞、滤泡辅助T细胞、调节T细胞、YST细胞),3种B细胞(幼稚B细胞、记忆B细胞、浆细胞),NK细胞(静息NK细胞、激活NK细胞)及多种髓系细胞(单核细胞、MO巨噬细胞、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、静息树突状细胞、激活树突状细胞、静息肥大细胞、激活肥大细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞<sup>[8]</sup>)。目前在对乳腺癌<sup>[10]</sup>、胃癌<sup>[11]</sup>、直肠癌<sup>[12]</sup>、肾细胞癌<sup>[13]</sup>、前列腺癌<sup>[14]</sup>等的基因表达谱数据的研究中,已有运用CIBERSORT方法基因表达谱数据运算出肿瘤组织中免疫细胞浸润,而在食管癌组织的研究中,相关的报道较少。因此,本研究通过登录TCGA数据库,运用CIBERSORT计算方法探讨食管癌中浸润免疫细胞表达,为免疫细胞在食管癌中的研究提供一定的理论依据,同时也为课题研究指明方向。

## 1 数据来源及方法

1.1 数据来源 本研究通过登录TCGA官方网站(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)筛选并下载与食管癌相关基因表达谱数据矩阵及相关临床数据,同时下载相关临床数据。所有数据均通过TCGA官方网站下载或TCGA官方软件下载。

1.2 方法 通过运用Perl软件将所下载食管癌基因表达谱数据提取并进行整理及基因名转换,最终得到

行名是基因名,列名为组织的基因表达谱数据。登录 CIBERSORT 官网下载 22 种免疫细胞的 CIBERSORT.R 代码,运用 R 语言中 e1071 及 parallel 数据包运算并滤过表达谱数据免疫细胞浸润表达准确性较差的样品,最终得到 22 种免疫细胞在例子中的表达量,以百分比表示。运用 R 语言分析并绘制出 22 种免疫细胞在每例样品中的表达量;运用 R 语言中 pheatmap 包绘制出免疫细胞相关热图;在 R 语言中下载 vioplot 包,计算并绘制出免疫细胞在食管癌及正常组织中差异表达;在生存分析中,运用 R 语言中的 survival 数据包计算 22 种免疫细胞是否与患者生存时间有关;将入组食管癌患者的临床资料导入 R 语言中,并计算出 22 种免疫细胞与食管癌临床数据的相关性,绘制相关箱线图。

1.3 统计学方法 本研究运用 R 语言(3.4.1)内的多个统计数据包将数据导入 R 软件并进行统计学分析及结果图片绘制。计量资料运用  $t$  检验,计数资料运用  $\chi^2$  检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 法 Log-rank 检验,对于所有统计学计算,最终结果以  $P < 0.05$  确定为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 76 例食管癌的临床信息 在 TCGA 数据库所下载处理的食管癌组织及正常组织,依据 CIBERSORT 运算法则,首先需计算并剔除准确性较差的样品,最终得到 76 例食管癌组织和 2 例正常组织,而相关临床数据包括性别、临床分期、病理分期等(见表 1)。

表 1 76 例食管癌患者临床资料

临床资料	<i>n</i>	百分比(%)
性别		
男	61	80.26
女	15	19.74
临床分期		
I & II	42	55.26
III & IV	34	44.74
病理分期		
T1&T2	29	38.16
T3&T4	47	61.84

2.2 免疫细胞在食管癌中的表达 依据 CIBERSORT 运算法则剔除不符合用于分析免疫细胞浸润的样品后,最终得到 76 例食管癌组织,进一步运算得到 22 种免疫细胞在每个样品里的表达百分比,并绘制出百分比图及热图。例如:样品 TCGA-L5-A4OS-01A-11R-A28J-31 中 22 种浸润免疫细胞占比分别为:幼稚 B 细胞:9%;记忆 B 细胞:0%;浆细胞:10%;CD8<sup>+</sup> T 细胞:0%;CD4<sup>+</sup> 幼稚 T 细胞:0%;CD4<sup>+</sup> 静息记忆 T 细胞:10%;CD4<sup>+</sup> 激活记忆 T 细胞:2%;滤泡辅助 T 细胞:2%;调节 T 细胞:1%;YST 细胞:1%;激活 NK 细胞:2%;静息 NK 细胞:9%;单核细胞:0%;M0 巨噬细胞:0%;M1 巨噬细胞:23%;M2 巨噬细胞:5%;静息树突状细胞:15%;激活树突状细胞:0%;静息肥大细胞:1%;激活肥大细胞:5%;嗜酸性粒细胞:5%;中性粒细胞:0%,免疫细胞表达结果运用 R 语言绘制出百分比图及热图(见图 1、图 2)。

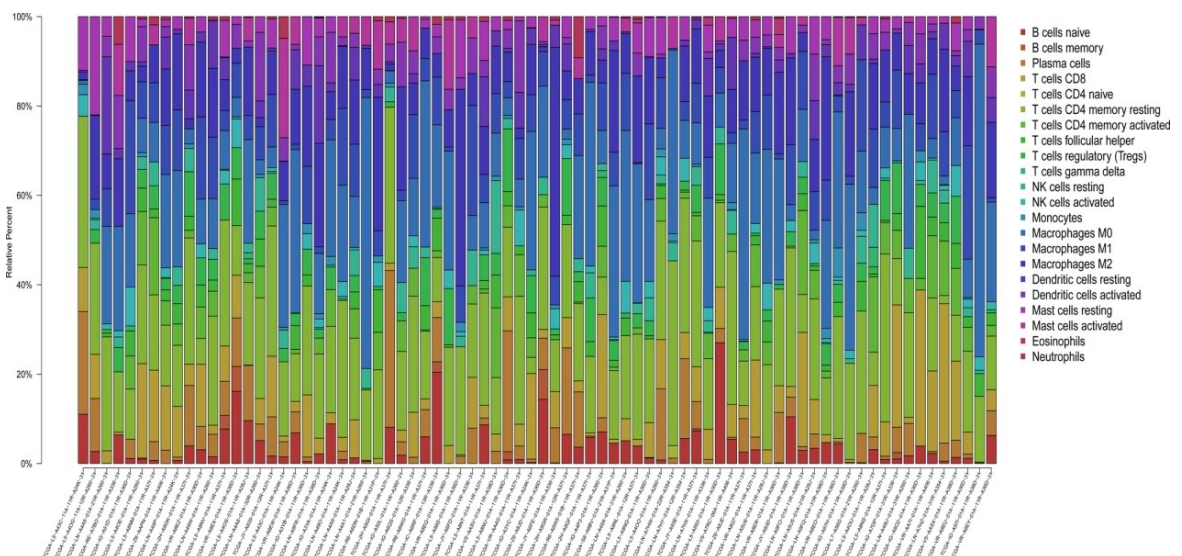


图 1 免疫细胞在食管癌中所占的百分比

2.3 免疫细胞在食管癌与正常组织中的表达差异 通过对比食管癌中免疫细胞与正常组织表达差异,研

究发现 22 种免疫细胞中,浆细胞在食管癌中呈低表达,差异具有统计学意义( $P = 0.038$ );食管癌组织

中,与正常组织相比单核细胞在食管癌中低表达( $P = 0.024$ );M0 巨噬细胞在食管癌中高表达( $P = 0.032$ );与正常组织相比,食管癌中静息肥大细胞呈低

表达( $P = 0.016$ ),上述结果均运用 R 语言绘制出小提琴图(见图 3)。

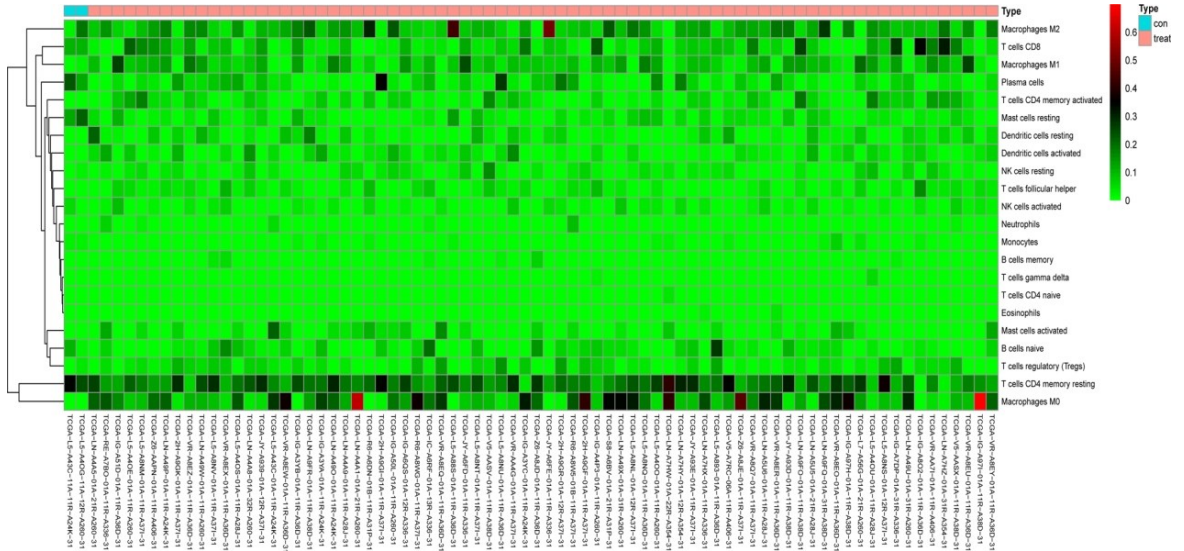


图 2 免疫细胞在食管癌中表达的热图

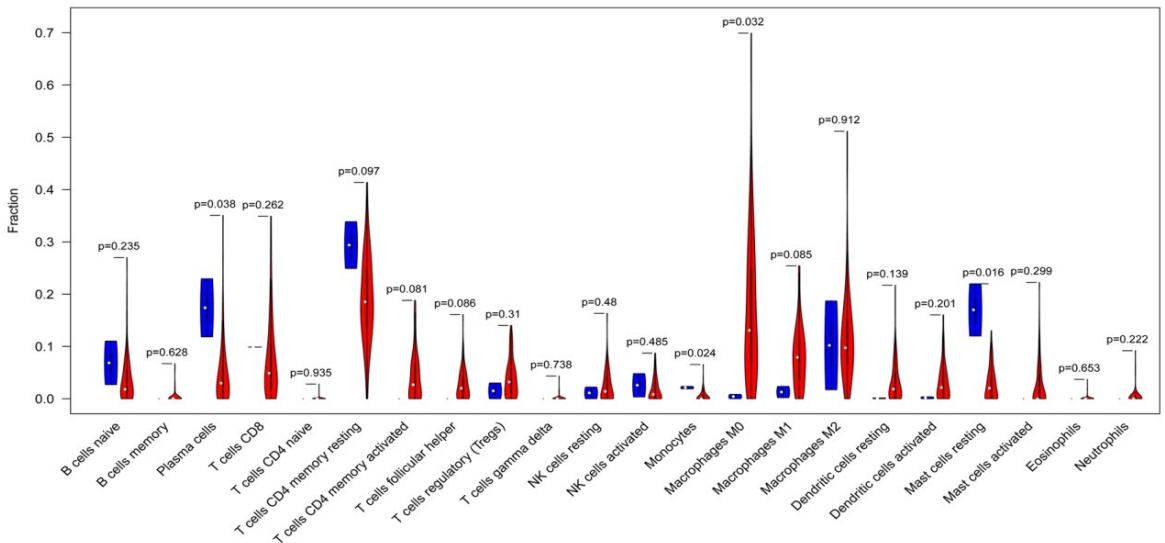


图 3 22 种免疫细胞在食管癌与正常组织中表达差异

2.4 免疫细胞与食管癌临床资料对比 得到免疫细胞在食管癌中的表达之后,运用 R 语言分析 22 种免疫细胞与食管癌临床资料的关系,结果得到:食管癌中静息 NK 细胞在食管癌中与临床分期有关,差异具有统计学意义( $P = 0.027$ );单核细胞与食管癌临床分期有关,差异具有统计学意义( $P = 0.045$ );在免疫细胞与食管癌临床 T 分级的研究中,发现 M2 巨噬细胞与食管癌 T 分级有关( $P = 0.021$ ),其余免疫细胞与食

管癌临床数据差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。以上相关结果数据运用 R 语言绘制箱型图(见图 4)。  
2.5 22 种免疫细胞与食管癌预后的关系 运用 R 语言中的 survival 生存分析包,分析 22 种免疫细胞与食管癌预后的关系。结果发现 22 种免疫细胞中,激活肥大细胞与食管癌的预后有关( $P = 0.017$ ),其余免疫细胞与食管癌预后无关系( $P > 0.05$ )(见图 5)。

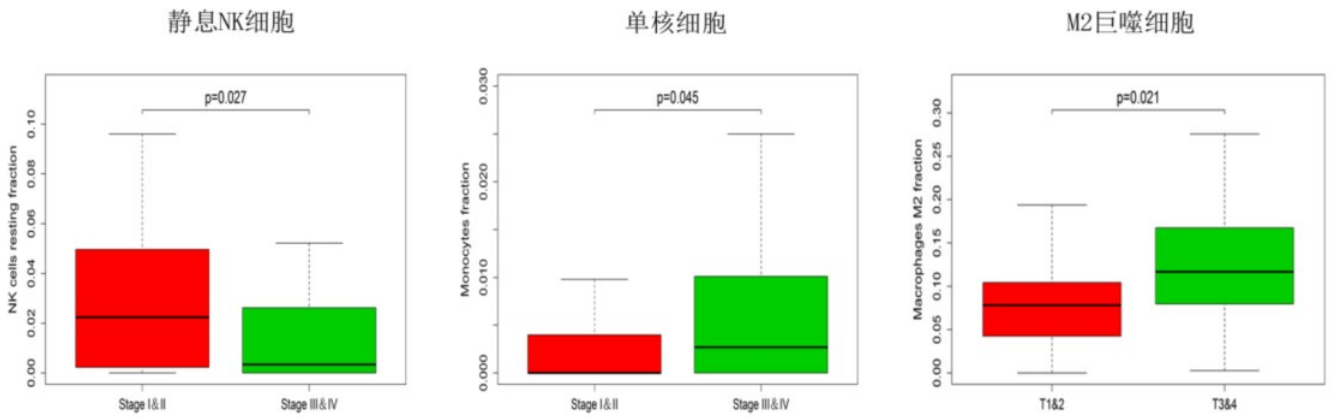


图 4 免疫细胞与食管癌临床资料的关系

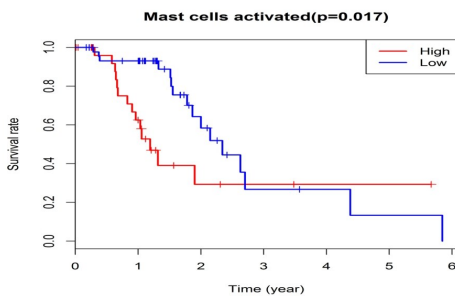


图 5 激活肥大细胞与食管癌预后的关系

### 3 讨论

TCGA 数据库是目前用于生物信息学分析数据来源最大的数据库之一,TCGA 数据库中不仅包含大量的肿瘤相关的芯片数据,同时还包含有患者的临床相关信息、生存时间及生存状态等。目前每年都有大量基于 TCGA 数据库数据的研究发表,研究涉及基因、蛋白、miRNA、lncRNA 等,给临床工作者的研究开拓了新的领域<sup>[15]</sup>。

本研究基于 TCGA 数据库中的基因表达谱数据,结合 CIBERSORT 计算方法利用 R 语言及 Perl 软件描述了免疫细胞在食管癌中的表达情况及与食管癌患者预后的关系。本研究结果展示了 22 种免疫细胞在食管癌中的分布情况,同时发现了与正常组织相比,浆细胞、单核细胞、静息肥大细胞在食管癌中呈低表达,而 M0 巨噬细胞在食管癌中高表达。目前已有多个研究证实,免疫细胞在癌症组织中表达具有差异性。例如:2019 年 Luo MS 等<sup>[16]</sup>在鼻咽癌研究中发现 M1 巨噬细胞在鼻咽癌中高表达,而记忆 B 细胞及 CD4<sup>+</sup> 静息记忆 T 细胞在鼻咽癌中低表达。2019 年 Meng J 等<sup>[14]</sup>研究发现,CD4<sup>+</sup> 激活记忆 T 细胞及 M0 巨噬细胞在前列腺癌组织中比例较高,而中性粒细胞和单核细胞在前列腺癌组织中表达较低,该研究结果中 M0 巨噬细胞、单核细胞与本研究结果类似。有研究通过同时分析 TCGA 数据库及 GEO 数据库关于结直肠癌

的数据发现,M0 巨噬细胞、M1 巨噬细胞和 CD4<sup>+</sup> 激活记忆 T 细胞在结直肠癌中的表达量高于正常组织<sup>[12]</sup>。最近研究肝癌与正常肝脏组织的研究中发现,活化肥大细胞、单核细胞、浆细胞在肝癌组织中表达减少,而静息肥大细胞、静息 CD4<sup>+</sup> 记忆细胞、幼稚 B 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞在肝癌组织中高表达,该研究结果中的单核细胞与浆细胞结果与本研究结果相似<sup>[9]</sup>。在免疫细胞与食管癌临床数据的分析中,本研究发现了静息 NK 细胞、单核细胞与食管癌的临床分期有关,并且静息 NK 细胞在低分期的表达相对较高,而单核细胞在高分期的表达较高,M2 巨噬细胞与食管癌的 T 分级有关,M2 巨噬细胞在 T3&4 分级的食管癌中分布较高。目前已有研究证实,免疫细胞与肿瘤临床资料有关,例如:2019 年 Meng J 等<sup>[14]</sup>研究发现,浆细胞、静息肥大细胞与前列腺癌患者分期有关。2019 年 Ge P 等<sup>[12]</sup>研究发现,在结直肠癌中,CD4<sup>+</sup> 激活记忆 T 细胞与癌症的分期有关,M0 巨噬细胞与结直肠癌淋巴结转移有关。在肝癌研究中发现,M1 巨噬细胞与肝癌的临床分期有关,并且与肝癌的预后有关<sup>[9]</sup>。这些结果证实了免疫细胞浸润在癌症的发生及进展有可能扮演着重要的角色。而在免疫细胞与食管癌生存关系分析中,本研究结果揭示了激活肥大细胞与食管癌预后相关,高分布激活肥大细胞预后相对较差。目前多个研究也已证实,免疫细胞与癌症患者的预后有关。例如:2019 年,Wang J 等<sup>[17]</sup>研究发现,CD4<sup>+</sup> 激活记忆 T 细胞与激活肥大细胞是宫颈癌的独立预后因子,高表达 CD4<sup>+</sup> 激活记忆 T 细胞患者生存时间较长,而高表达激活肥大细胞的宫颈癌患者预后较差,激活肥大细胞结果与本研究结果相似。在前列腺癌患者的研究中,M2 巨噬细胞的表达与前列腺癌患者的预后有关<sup>[14]</sup>。而在另一项关于免疫细胞在前列腺癌患者生存分析中发现,高比例的 M2 巨噬细胞患者的生存率明显低于低表达患者,并且 M2 巨噬细胞被认为是前列腺癌患

者的独立预后因子<sup>[18]</sup>。2019 年 Chen F 等<sup>[19]</sup>研究发现,通过运用 CIBERSORT 运算最终得出免疫细胞中的浆细胞及调节 T 细胞与非小细胞肺癌患者的预后有关。

综上所述,本研究展示了免疫细胞与食管癌之间的关系,并发现浸润性免疫细胞与食管癌临床资料及预后的关系。本研究结果将有助于推动免疫细胞在食管癌中的研究进展。

#### 参考文献:

- [1] Domper Arnal MJ, Ferrandez Arenas A, Lanas Arbeloa A. Esophageal cancer; Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(26): 7933-7943.
- [2] Short MW, Burgers KG, Fry VT. Esophageal Cancer[J]. *Am Fam Physician*, 2017, 95(1): 22-28.
- [3] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1565-1570.
- [4] Tomczak K, Czerwinska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(1A): A68-77.
- [5] Wu H, Zhang J. Decreased expression of TFAP2B in endometrial cancer predicts poor prognosis: A study based on TCGA data[J]. *Gynecol Oncol*, 2018, 149(3): 592-597.
- [6] Zhu XF, Zhu BS, Wu FM, et al. DNA methylation biomarkers for the occurrence of lung adenocarcinoma from TCGA data mining[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10): 6777-6784.
- [7] Kurbatov V, Balayev A, Saffarzadeh A, et al. Digital Inference of Immune Microenvironment Reveals "Low Risk" Subtype of Early Lung Adenocarcinoma[J]. *Ann Thorac Surg*, 2020, 109(2): 343-349.
- [8] Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453-457.
- [9] Rohr-Udilova N, Klinglmüller F, Schulte-Hermann R, et al. Deviations of the immune cell landscape between healthy liver and hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6220.
- [10] Ali HR, Chlon L, Pharoah PD, et al. Patterns of Immune Infiltration in Breast Cancer and Their Clinical Implications: A Gene-Expression-Based Retrospective Study[J]. *PLoS Med*, 2016, 13(12): e1002194.
- [11] Zeng D, Zhou R, Yu Y, et al. Gene expression profiles for a prognostic immunoscore in gastric cancer[J]. *Br J Surg*, 2018, 105(10): 1338-1348.
- [12] Ge P, Wang W, Li L, et al. Profiles of immune cell infiltration and immune-related genes in the tumor microenvironment of colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109228.
- [13] Zhang S, Zhang E, Long J, et al. Immune infiltration in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5): 1564-1572.
- [14] Meng J, Liu Y, Guan S, et al. The establishment of immune infiltration based novel recurrence predicting nomogram in prostate cancer[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(11): 5202-5213.
- [15] Deng M, Bragelmann J, Schultze JL, et al. Web-TCGA: an online platform for integrated analysis of molecular cancer data sets[J]. *BMC Bioinformatics*, 2016, 17: 72.
- [16] Luo MS, Huang GJ, Liu BX. Immune infiltration in nasopharyngeal carcinoma based on gene expression[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(39): e17311.
- [17] Wang J, Li Z, Gao A, et al. The prognostic landscape of tumor-infiltrating immune cells in cervical cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109444.
- [18] Zhang Q, Xia J, Wang Y, et al. Tumor infiltrating M2 macrophages could predict biochemical recurrence of localized prostate cancer after radical prostatectomy[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 384(1): 111588.
- [19] Chen F, Yang Y, Zhao Y, et al. Immune Infiltration Profiling in Nonsmall Cell Lung Cancer and Their Clinical Significance: Study Based on Gene Expression Measurements[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(11): 1387-1401.

收稿日期: 2019-12-15; 修回日期: 2020-04-10