

本文引文格式:董明右,王俊利,廖陆升,等.泛癌中CCL18的差异表达、预后及其与免疫细胞浸润的相关性分析[J].右江民族医学院学报,2023,45(4):583-593.

【论著与临床报道】

泛癌中CCL18的差异表达、预后及其与免疫细胞浸润的相关性分析

董明右^{1,2},王俊利^{1,2},廖陆升^{1,2},陈祥凤^{1,2},罗艳红¹,吴艳柳¹

(1. 右江民族医学院医学检验学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院生物医药与大健康现代产业学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 旨在通过多数据库的分析来揭示CCL18在33种癌症类型中的表达、预后及其与免疫细胞浸润的相关性。方法 通过GTEx数据库、CCLE数据库、TCGA数据库综合分析CCL18在泛癌中的表达模式。单因素Cox回归用于分析CCL18在泛癌中的生存和预后。通过TIMER2.0数据库分析CCL18与免疫微环境的关系。分析了CCL18与免疫检查点基因表达谱、DNA错配修复基因(MMRs)和甲基转移酶编码基因的关系。Spearman用于分析CCL18表达水平与肿瘤突变负荷(TMB)和微卫星不稳定性(MSI)的关系。结果 在本研究中,发现CCL18在大多数癌症中异常过表达。CCL18与肿瘤患者的年龄、性别、肿瘤分期和免疫亚型等临床参数密切相关。单因素回归分析表明CCL18表达与患者在ACC、DLBC、LAML、UVM、CESC和LGG中的不良预后密切相关。在大多数癌症中,CCL18的表达与28种免疫细胞亚型、免疫相关通路、肿瘤微环境呈正相关。CCL18与主要组织相容性复合体、免疫激活剂、免疫抑制剂、趋化因子和趋化因子受体相关基因共表达。此外,CCL18与许多癌症中的肿瘤新抗原、肿瘤突变负荷、微卫星不稳定性以及免疫检查点、错配修复和DNA甲基化转移酶相关基因的表达显著有关。GSEA分析表明CCL18表达显著富集了大多数肿瘤中的几种癌症相关通路和免疫相关通路。结论 CCL18可能是确定癌症预后和免疫浸润的潜在分子生物标志物。

关键词: CCL18;预后;免疫浸润;免疫相关途径;泛癌

中图分类号:R730.51

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)04-0583-11

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.04.007

Analysis of differential expression, prognosis of CCL18 and its correlation with immune cell infiltration in pan-cancer

Dong Mingyou^{1,2}, Wang Junli^{1,2}, Liao Lusheng^{1,2}, Chen Xiangfeng^{1,2}, Luo Yanhong¹, Wu Yanliu¹

(1. School of Medical Laboratory, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. School of Biomedicine and Modern Industry of Great Health, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To reveal the expression and prognosis of CCL18 in 33 cancer types and its association with immune cell infiltration through multi-database analysis. **Methods** The expression pattern of CCL18 in pan-cancer was analyzed using the GTEx database, CCLE database and TCGA database. Univariate Cox regression was used to analyze the survival and prognosis of CCL18 in pan-cancer. The relationship between CCL18 and the immune microenvironment was analyzed by TIMER 2.0 database. Moreover, the study examined the correlation between CCL18 and immune checkpoint gene expression profiles, DNA mismatch repair genes (MMRs) and methyltransferase coding genes. Spearman correlation was used to analyze the relationship between CCL18 expression levels and tumor mutation burden (TMB) and microsatellite instability

基金项目:广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2022KY0532);右江民族医学院科研项目(yy2020ky039);百色市科学研究与技术开发计划(20212347)

第一作者简介:董明右(1990-),男,博士,讲师,研究方向:肝癌诊断和预后标志物的鉴定及功能研究,E-mail:243171555@qq.com

(MSI). **Results** The study found that *CCL18* was abnormally overexpressed in most cancers and closely related to clinical parameters such as age, gender, tumor stage and immune subtype. Univariate regression analysis showed that *CCL18* expression was significantly associated with poor prognosis in ACC, DLBC, LAML, UVM, CESC, and LGG. Additionally, *CCL18* expression showed positive correlations with 28 immune cell subtypes, immune-related pathways, and tumor microenvironment in most cancers. Then, it was found that *CCL18* was co-expressed with major histocompatibility complex, immune activators, immunosuppressants, chemokines, and chemokine receptor-related genes. In addition, *CCL18* was significantly associated with tumor neoantigens, tumor mutation load, microsatellite instability, and the expression of genes associated with immune checkpoints, mismatch repair, and DNA methyltransferase in various cancers. GSEA analysis showed that *CCL18* expression was significantly enriched in several cancer-related and immune-related pathways in most tumors. **Conclusion** The findings suggest that *CCL18* may serve as a potential molecular biomarker for cancer prognosis and immune infiltration.

Key words: *CCL18*; prognosis; immune infiltration; immune-related pathways; pan-cancer

CCL18 是来自 β -趋化因子亚家族成员,它在 N 端具有-Cys-Cys-motif,主要在乳腺肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 中表达,其别名包括:CKb7、PARC、AM-AC1、DCCK1、MIP-4、AMAC-1、DC-CK1 和 SCYA18^[1-5]。在多种癌症中已经观察到 *CCL18* 的上调,例如口腔鳞状细胞癌^[6]、喉部鳞状细胞癌^[7]、卵巢上皮细胞癌^[8]、肺癌^[9]、卵巢癌^[10] 和乳腺癌^[11]。*CCL18* 的高表达与癌症患者的较差生存率是相关的^[6-8]。*CCL18* 已经被证明在肿瘤微环境^[12-13],上皮间质转化和转移^[8-9,11,14]、肿瘤增殖^[15] 和血管生成^[16] 中发挥着重要的作用。然而,*CCL18* 在肿瘤免疫学中的潜在机制仍不清楚。癌症是一种涉及肿瘤与免疫系统相互作用的复杂疾病,肿瘤微环境(TME)也已被公认为癌症发生和发展的主要因素^[17]。采用细胞疗法、治疗性疫苗、免疫检查点抑制剂等治疗策略提高了恶性肿瘤患者的存活率^[18]。许多研究表明,TME 中各种浸润性免疫细胞的积累直接关系到患者的预后和免疫治疗效果,如肿瘤相关巨噬细胞、中性粒细胞、调节性 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞等,它们可以在癌症免疫逃逸中发挥重要作用^[19-21]。免疫检查点(IC)与其配体之间的相互作用负向调节参与针对特定抗原的生理免疫反应的 T 细胞活化途径^[22]。ICs 及其配体在各种恶性肿瘤的肿瘤微环境(TME)中经常被上调以实现肿瘤免疫逃避^[23]。

本研究分析了 *CCL18* 在泛癌中的表达模式、临床意义和预后价值。还分析了 *CCL18* 表达与潜在分子机制、肿瘤浸润免疫细胞、免疫相关基因、免疫新抗原、免疫检查点基因、癌症中 TMB 和微卫星不稳定性之间的关系。还研究了 *CCL18* 表达是否影响泛癌中 DNA 修复相关基因和 DNA 甲基化转移酶相关基因的表达。同时,还进行了基因集富集分析(GSEA)来研究 *CCL18* 在不同类型肿瘤中的生物学功能和信号转导

通路。研究结果揭示了 *CCL18* 在癌症中的可能作用,表明 *CCL18* 是一种潜在的预后生物标志物。

1 材料与方法

1.1 数据收集及整理 从 GTEx 数据库 (<https://gtexportal.org/>) 获得 31 个正常组织的 *CCL18* 表达数据,并通过 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 下载所有癌症的临床信息和表达矩阵。21 个肿瘤细胞系的 *CCL18* 表达数据从 CCLE 数据库 (<https://portals.broadinstitute.org/>) 获得。通过将来自 the GTEx database 的正常组织数据与 the Cancer Genome Atlas(TCGA)的数据相结合,分析了癌症和正常组织之间 *CCL18* 表达的差异。所有表达数据均通过 log₂ 转换进行标准化。并使用 limma R package 进行差异表达分析。

1.2 *CCL18* 表达水平与生存或临床病理特征的相关性分析 单因素回归分析被用于分析 33 种癌症类型中 *CCL18* 表达水平与患者预后之间的相关性。用于患者预后的术语包括以下四个:总生存期(OS)、疾病特异性生存期(DSS)、无进展间隔期(PFI)和无疾病间隔期(DFI)。单变量生存分析用于计算危险比(HR)和 95% 置信区间。使用 Log-rank test 研究了 *CCL18* 表达与临床病理特征(年龄、性别和病理阶段)的相关性。在泛癌样本中检测 6 种免疫类型(C1~C6)。调整后的 $P < 0.05$ 被认为是显著的。

1.3 *CCL18* 表达与免疫相关因子的相关性 使用 CIBERSORT^[24] 计算 28 种免疫细胞亚型的浸润比例,这是预测免疫细胞表型的工具。使用 MCP-COUNTER、QUANTISEQ、TIMER 和 XCELL 的算法对其进行了验证。使用 ggplot2,ggpubr 和 ggExtra R packages 分析 *CCL18* 表达与免疫细胞浸润之间的相关性, $P < 0.001$ 被用作截止值。使用 ESTIMATE algorithm^[25] 计算所有癌症组织的免疫评分、基质评分

和 ESTIMATE 评分。通过 Spearman's method 分析 CCL18 表达水平与免疫评分、基质评分和 ESTIMATE 评分的相关性。 $P < 0.05$ 和 $|R| > 0.3$ 被视为筛选标准标准,并且 $|R| > 0.6$ 被认为是强相关的。此外,对 CCL18 和免疫相关基因进行了共表达分析,包括编码主要组织相容性复合体(MHC)、免疫激活、免疫抑制、趋化因子和趋化因子受体蛋白的基因,“limma”、“reshape2”和“RColorBrewer”R 包被用于结果的可视化。

1.4 CCL18 表达与免疫新抗原和免疫检查点的相关性 肿瘤细胞中由突变基因编码的新抗原,主要由点突变、缺失突变和基因融合等生物学事件产生。使用 scanneo R package 分别统计每个肿瘤样本的新抗原数量,并分析 CCL18 表达与抗原数量的关系。此外,收集了 40 多个免疫检查点基因,并使用 Spearman 统计方法分析了 CCL18 基因表达与免疫检查点基因表达之间的关系。相关热图由 reshape2 和 RColorBrewer R 包绘制。

1.5 CCL18 与肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性的相关性 肿瘤突变负荷(TMB)作为可量化的生物标志物,可用于反映肿瘤细胞中包含的突变数量^[26]。微卫星不稳定性(MSI)是指与正常组织相比,在肿瘤中,由于重复单元的插入或缺失引起的微卫星长度的任何改变,都会出现新的微卫星等位基因现象^[27]。在这里,本研究通过 the Maftools R 包分别计算了每个肿瘤样本的 TMB 和 MSI,并基于 Spearman 统计方法分析了 CCL18 表达与 TMB 和 MSI 之间的关系。

1.6 CCL18 与 DNA 错配修复相关基因及 DNA 甲基转移酶相关基因的相关性 从 TCGA 数据库获得 5 个错配修复(MMR)基因(*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2* 和 *EPCAM*)的突变水平。Spearman 统计方法用于评估 CCL18 表达与 MMR 基因突变水平之间的关系。在本研究中,使用 Spearman 统计方法来估计 CCL18 表达与 4 种甲基转移酶(DNMT1、DNMT2、DNMT3A 和 DNMT3B)之间的关系。可视化分析由 the ggplot R package 执行。当 $P < 0.05$ 和 $|R| > 0.20$ 时,相关性被认为是显著的。

1.7 功能富集分析 本研究计算了不同癌症组织的 50 个 hallmark 信号通路的 GSVA 评分,并使用 Spearman 统计方法来估计 CCL18 表达与这些途径评分之间的相关性($FDR < 0.05$)。

1.8 统计学方法 Kruskal Wallis test 用于分析 CCL18 在不同正常组织和不同肿瘤细胞系中的表达水平。在评估肿瘤组织和正常组织中 CCL18 表达水平的差异时,如果数据服从正态分布,采用 t 检验进行统计;如果数据不服从正态分布,采用 Wilcoxon 秩和

检验。使用 Log-rank test 研究了 CCL18 表达与临床病理特征(年龄、性别和病理阶段)的相关性。采用 Univariate survival 分析 CCL18 表达与患者生存的相关性。The Spearman rank 用于计算 CCL18 表达与肿瘤突变负荷、微卫星不稳定性、MMR 基因突变水平、甲基转移酶水平和免疫检查点标志物水平之间的关系。当 $P < 0.05$ 和 $|R| > 0.20$ 时,被认为是显著且正相关的。对于所有统计分析, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

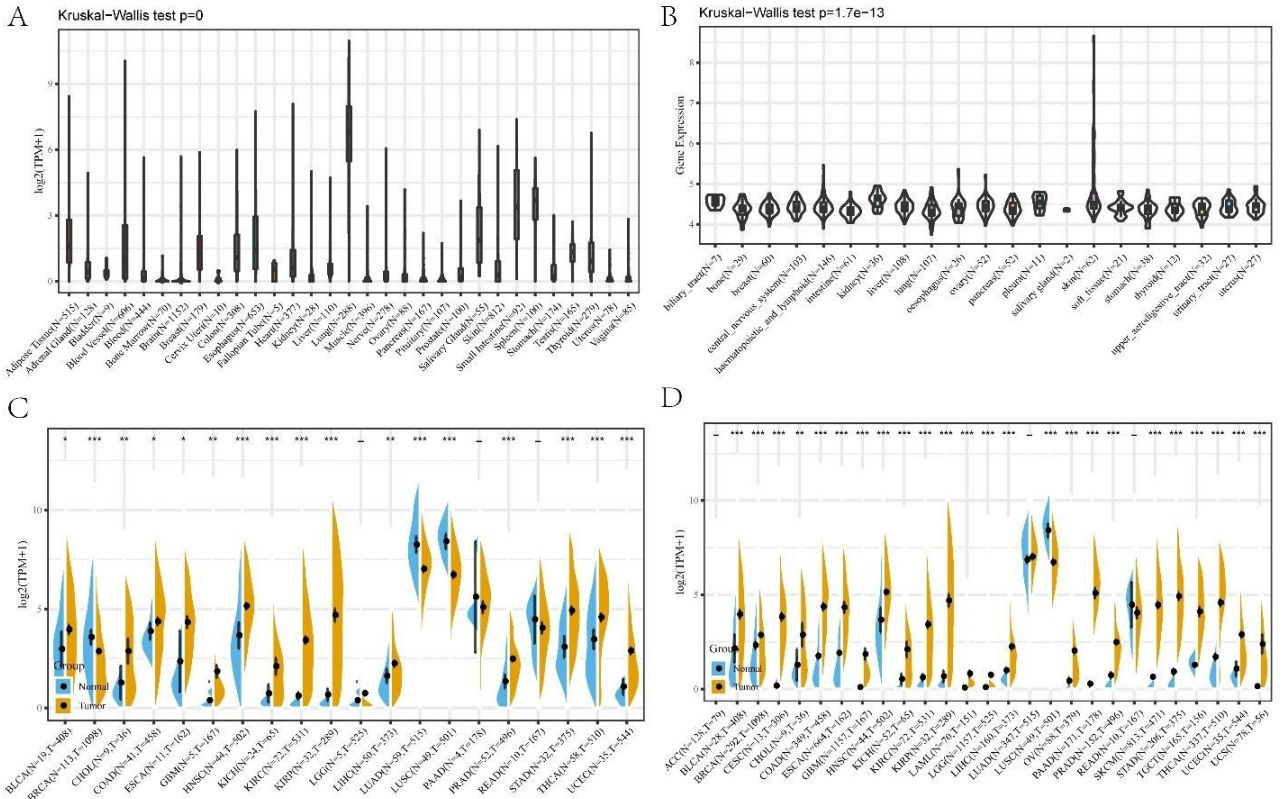
2 结果

2.1 CCL18 在泛癌中的差异表达 首先,本研究使用 GTEx 数据库分析了 31 个组织中 CCL18 的表达。研究发现 CCL18 在肺癌中高表达,在骨髓、大脑、子宫颈、肌肉和其他正常组织中低表达(见图 1A)。此外,从 CCLE 数据库中下载了肿瘤细胞系的数据,并分析了 21 个肿瘤细胞中 CCL18 的表达。研究发现 CCL18 在所有 21 种肿瘤细胞中均有表达(见图 1B)。为了确定肿瘤和正常组织中 CCL18 表达的差异,使用 TCGA 数据库分析了 20 种癌症类型的不同肿瘤和正常组织中的 CCL18 mRNA 水平。结果显示,BLCA、CHOL、COAD、ESCA、GBM、HNSC、KICH、KIRC、KIRP、LGG、LIHC、PRAD、STAD、THCA 和 UCEC 中的 CCL18 mRNA 水平显著高于正常组织(见图 1C)。考虑到 TCGA 中正常样本数量较少,本研究整合了 GTEx 数据库和 TCGA 数据库,分析了 CCL18 在 27 种癌症类型中的表达差异。本研究发现 CCL18 在 24 种肿瘤中存在显著差异表达,包括 BLCA、BRCA、CESC、CHOL、COAD、ESCA、GBM、HNSC、KICH、KIRC、KIRP、LAML、LGG、LIHC、LUSC、OV、PAAD、PRAD、SKCM、STAD、TGCT、THCA、UCEC 和 UCS(见图 1D)。这些结果表明 CCL18 在人类泛癌中异常过表达。

2.2 CCL18 与肿瘤临床特征及预后的相关性 使用 TCGA dataset 研究 CCL18 在泛癌预后中的作用。使用单因素回归分析 CCL18-related survival OS, DSS, DFI 和 PFI。结果发现, CCL18 表达水平与 ACC 中的 DFI 相关,与 ACC、CESC、DLBC、KIRP 和 UVM 中的 DSS 相关,与 ACC、DLBC 和 UVM 中的 OS 相关,与 ACC、CESC、KIRP 和 LGG 中的 PFI 相关(见图 2A~图 2D)。同时, CCL18 在 UCS、OV、SARC、COAD、STAD 和 LUAD 的老年患者中差异高表达,而在 BRCA 老年患者中表达较低(见图 3A)。LAML、LGG、KIRP、KIRC 的男性中 CCL18 表达较高(见图 3B)。此外, CCL18 表达与某些癌症的肿瘤分期显著相关,包括 CHOL、KICH、BLCA、THCA、COAD 和 KIRP(见图 3C)。还研究了 CCL18 表达与

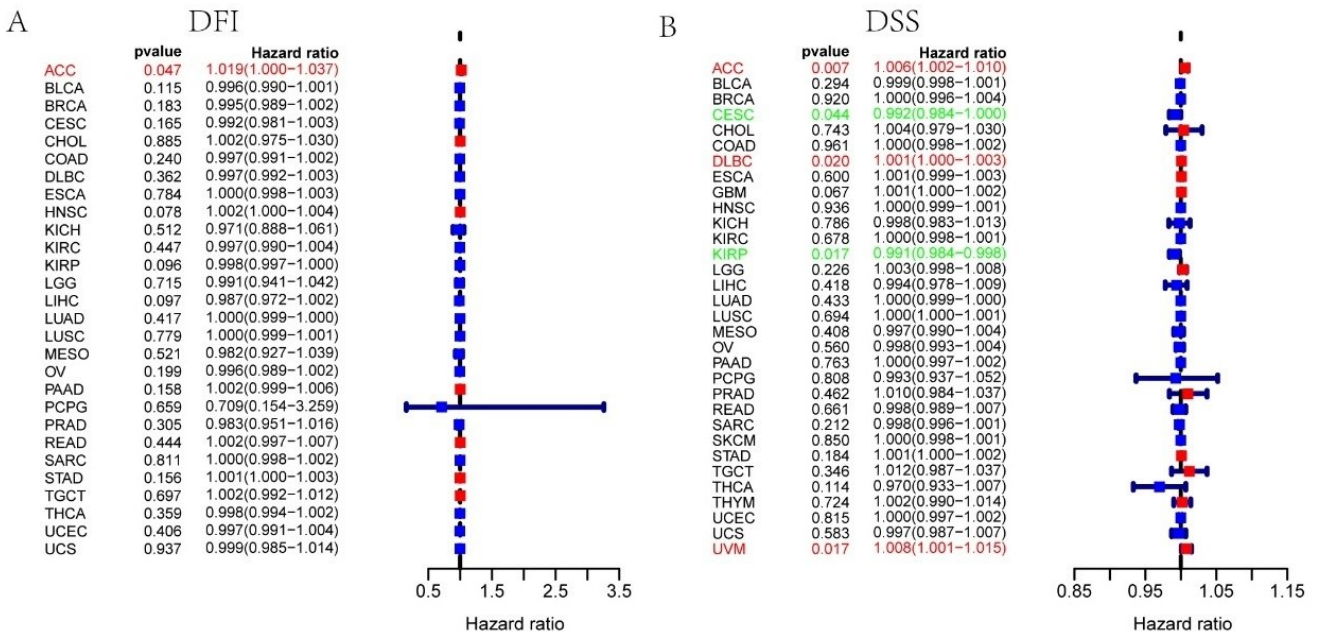
泛癌中 6 种免疫亚型的关联。结果表明, CCL18 与 17 种癌症类型的免疫亚型密切相关, 包括 BRCA、CHOL、UCS、KICH、PCPG、STAD、TGCT、UVM、

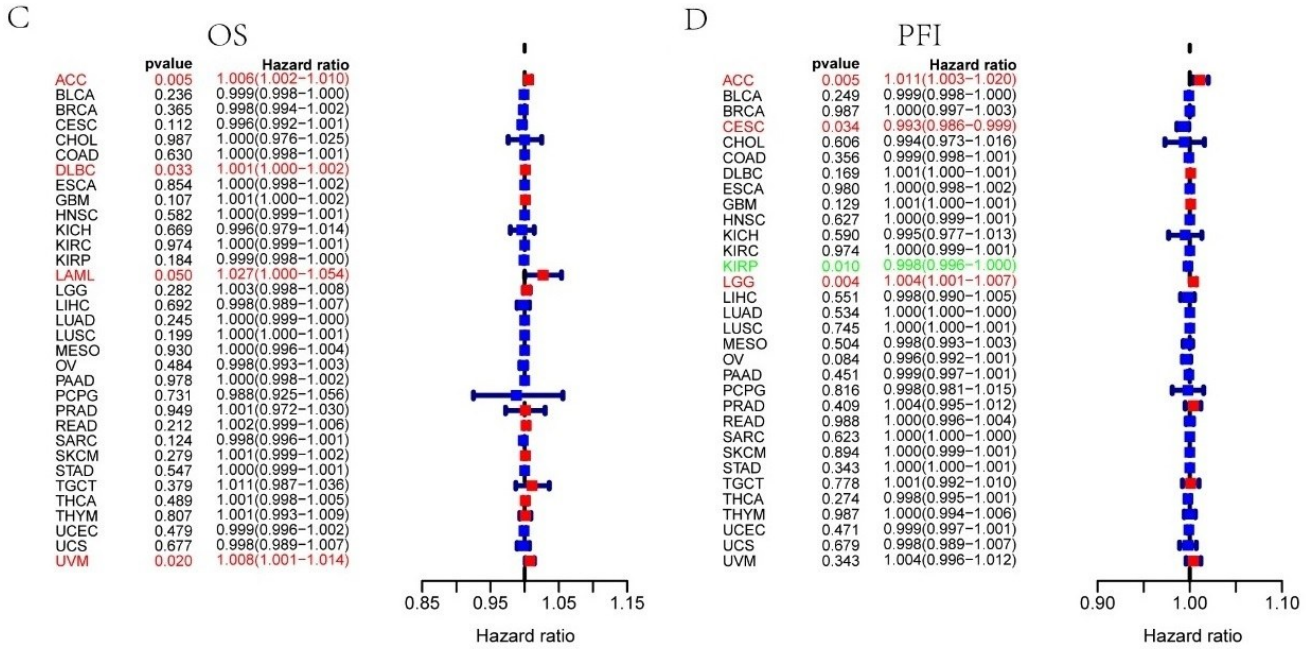
CESE、BLCA、LIHC、UECE、SARC、COAD、READ、LUAD 和 LUSC(见图 3D)。



注: A. CCL18 在包含 31 个组织的数据集中的表达水平, 来源于 GTEX; B. CCL18 在包含 21 个组织的肿瘤细胞系的数据集中的表达水平, 来源于 CCLE 数据库; C. CCL18 在肿瘤和配对的邻近非癌症组织中的表达水平, 包含 20 个组织, 来自 TCGA; D. 整合 GTEX 数据库中正常组织数据和 TCGA 肿瘤组织数据的 27 个肿瘤中 CCL18 的表达差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

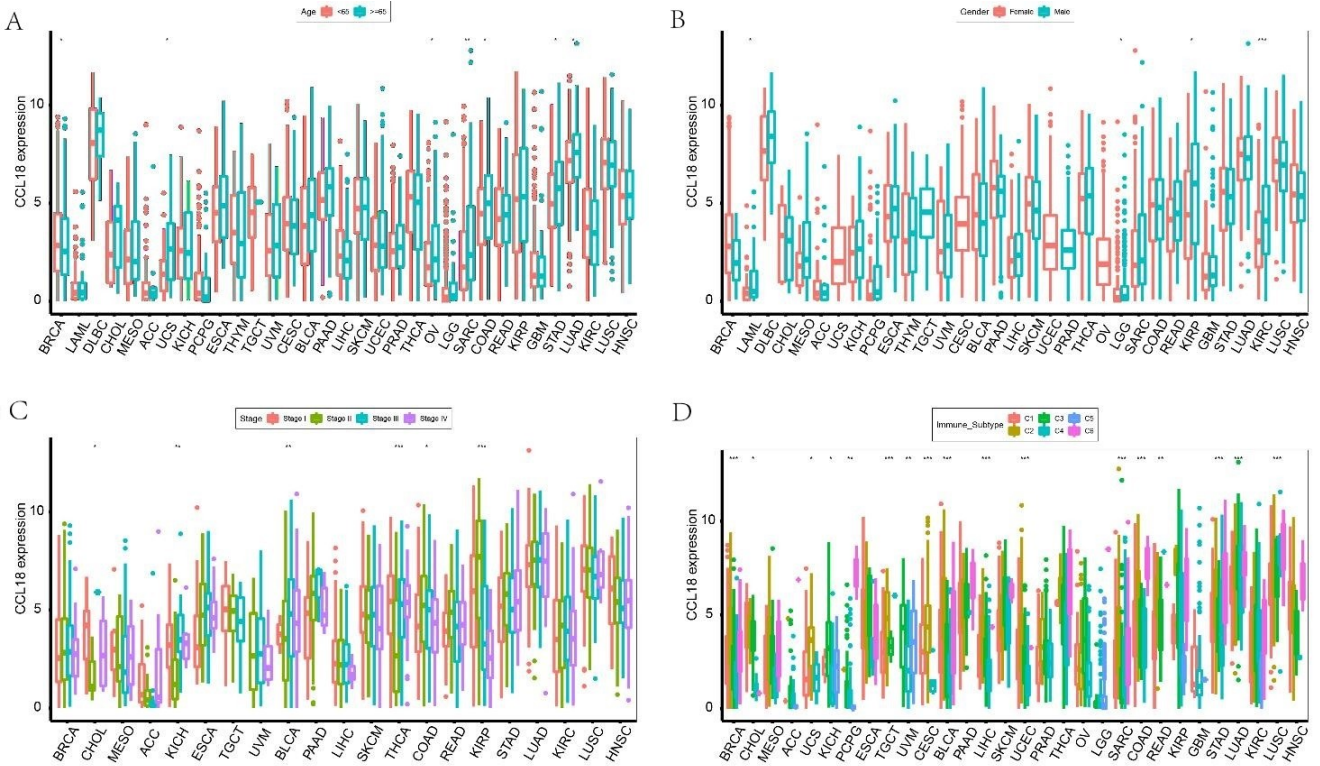
图 1 CCL18 在泛癌中的表达





注:A为DFI;B为DSS;C为OS;D为PFI。红色表示CCL18属于风险基因。绿色表示CCL18是一个保护基因。

图2 单变量Cox回归分析的森林图



注:A.年龄与CCL18的相关性;B.性别与CCL18的相关性;C.肿瘤分期与CCL18的相关性;D. CCL18表达与免疫浸润亚型的关系。

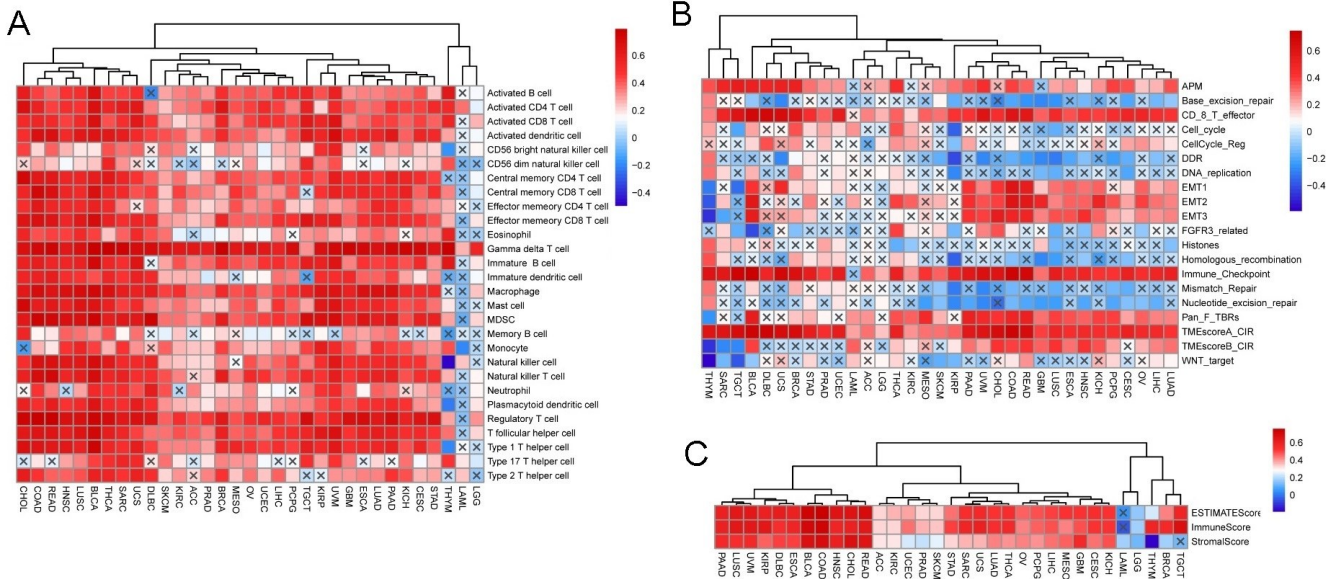
图3 泛癌中CCL18的表达与肿瘤患者预后的关系

2.3 CCL18与免疫细胞浸润、免疫相关通路和免疫微环境的关系 本研究评估了CCL18表达与免疫细胞浸润,免疫相关通路,免疫微环境的关系。使用Sangerbox在线分析平台进一步分析28种免疫细胞

亚型浸润与CCL18表达的相关性。除LAML和LGG外,CCL18表达水平与大多数浸润性免疫细胞水平显著相关,特别是在B细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、调节性T细胞、

自然杀伤细胞和滤泡辅助 T 细胞中(见图 4A)。随后,研究了 33 个肿瘤中 *CCL18* 表达与免疫相关通路之间的关联。在许多恶性肿瘤中,*CCL18* 表达与 APM, CD8 T 效应器、免疫检查点、Pan F TBRs 和 TMEscoreA CIR 途径呈正相关,但是与碱基切除修复、细胞周期、DDR、FGFR3 相关、同源重组、组蛋白、错配修复、核苷酸切除修复和 WNT 目标途径呈负相关。此外,在 PAAD、UVM、CHOL、COAD、READ、

LUSC、ESCA、HNSC、KICH、OV、LIHC 和 LUAD 中,*CCL18* 表达与 EMT1、EMT2、EMT3、pan F TBR 和 TMEscoreB CIR 通路呈正相关(见图 4B)。*CCL18* 表达水平与除 LAML、LGG 以外的 31 种癌症的免疫评分、25 种癌症类型的基质评分和除 LAML、LGG、THYM 以外的 30 种癌症类型的 ESTIMATE score 呈正相关(见图 4C)。



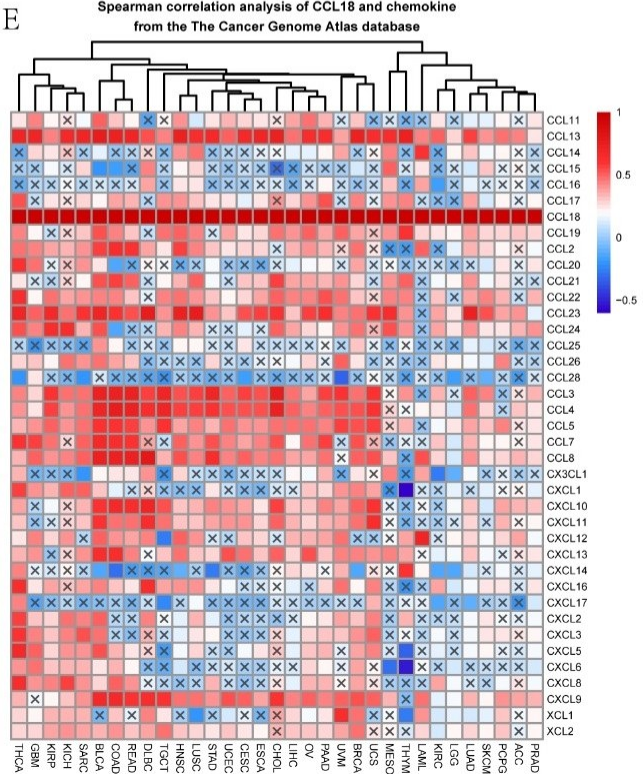
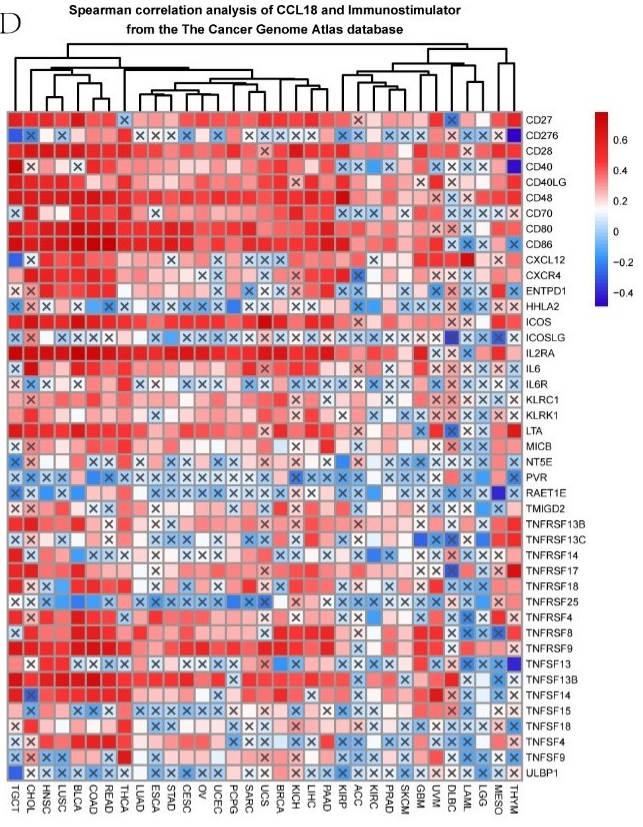
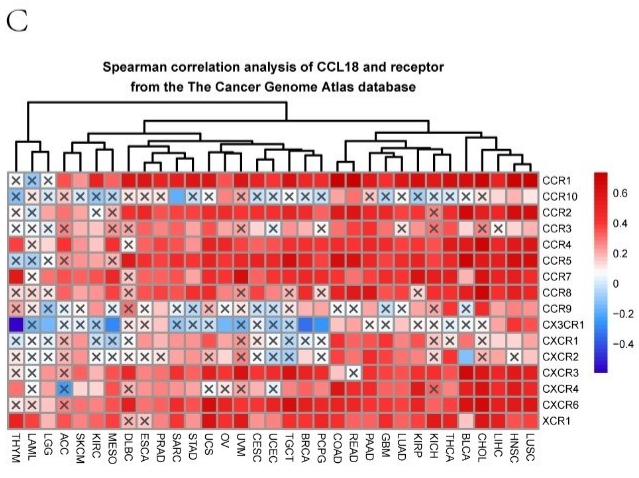
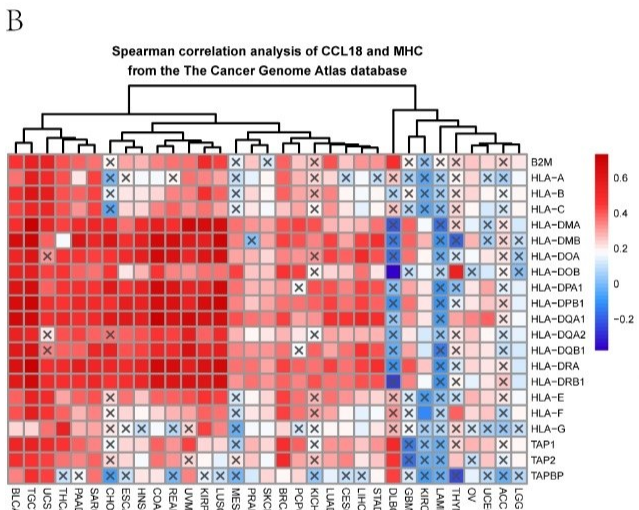
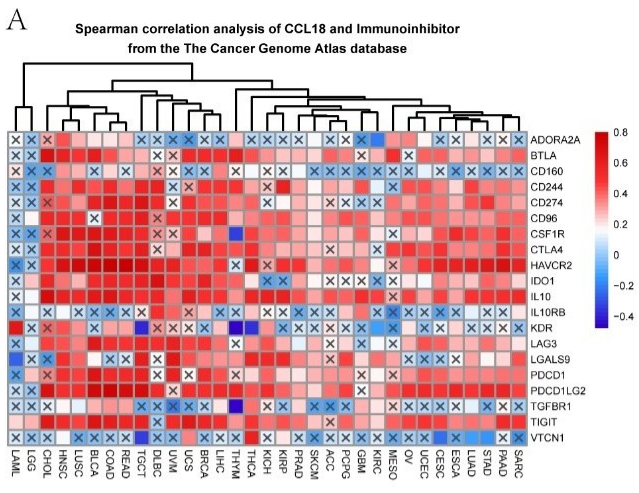
注: A. *CCL18* 的表达与泛癌中的免疫浸润水平的相关性;B. 泛癌中 *CCL18* 的表达与免疫相关途径的相关性;C. *CCL18* 的表达与肿瘤环境的相关性。

图 4 *CCL18* 表达与免疫浸润水平和免疫相关途径以及肿瘤微环境的相关性

2.4 *CCL18* 与免疫激活剂、免疫抑制剂、趋化因子及趋化因子受体的相关性 本研究通过基因共表达分析在 33 个肿瘤中评估了免疫相关基因与 *CCL18* 表达的相关性。结果表明,除 LAML 和 LGG 外,大多数癌症中 *CCL18* 基因表达与 CD244、CD274、CD96、CSF1R、CTLA4、HAVCR2、IL10、PDCD1LG2、TIGIT 等免疫相关基因密切相关(见图 5A)。在除 DLBC、GBM、KIRC、LAML、THYM、ACC 和 LGG 之外的大多数癌症中,*CCL18* 基因表达与 MHC 显著相关,包括 HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1(见图 5B)。在除 THYM、LAML 和 LGG 之外的大多数癌症中,*CCL18* 基因表达与包括 CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR7、CCR8、CXCR3、CXCR4、CXCR6、XCR1 在内的趋化因子受体密切相关(见图 5C)。在许多癌症中,*CCL18* 基因表达与包括 CD27、CD28、CD48、CD80、CD86、ICOS、IL2RA、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFSF13B、TNFSF14 在内的免疫激活基因呈正相关

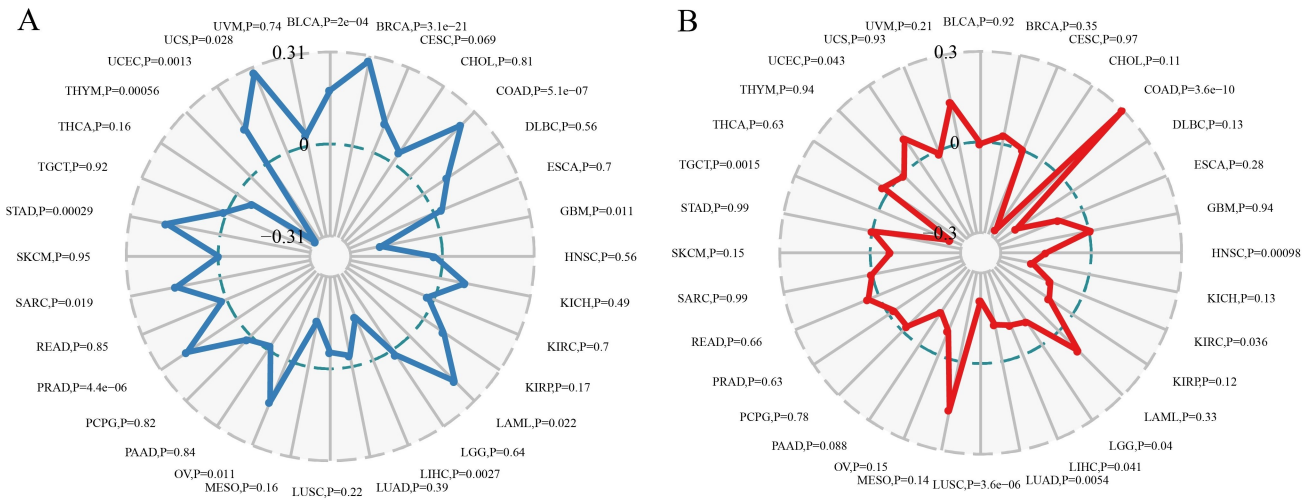
(见图 5D)。在 BLCA、COAD、READ、DLBC、TGCT、HNSC、LUSC、STAD、UCEC、CESC、ESCA、CHOL、UVM、BRCA 和 UCS 中,*CCL18* 基因表达与趋化因子密切相关,包括 CXCL10、CCL3、CCL4、CCL5、CCL8、CCL13(见图 5E)。

2.6 *CCL18* 与肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性的相关性 肿瘤突变负荷(TMB)和微卫星不稳定性(MSI)被认为是影响肿瘤发生和进展的重要因素。本研究分析了 33 种常见癌症中 TMB 与 *CCL18* 表达的相关性,以探讨泛癌中 *CCL18* 活性与突变之间的关系。结果表明,在 GBM、LIHC 和 THYM 中,*CCL18* 表达与 TMB 呈负相关。而在 BLCA、BRCA、COAD、LAML、OV、PRAD、SARC、STAD、UCEC 和 UCS 中,*CCL18* 表达与 TMB 呈正相关(见图 6A)。也发现 COAD 中 *CCL18* 表达与 MSI 呈正相关。而在 HNSC、KIRC、LGG、LIHC、LUAD、LUSC 和 TGCT 中,*CCL18* 表达与 MSI 呈负相关(见图 6B)。



注:A. 泛癌中 CCL18 的表达与免疫抑制物水平的相关性;B. CCL18 的表达和 MHC 在泛癌中的相关性;C. 泛癌中 CCL18 的表达与受体之间的相关性;D. 泛癌中 CCL18 的表达与免疫刺激物水平的相关性;E. 泛癌中 CCL18 的表达与趋化因子的相关性。

图 5 CCL18 的表达与免疫刺激因子、免疫抑制因子、趋化因子和 MHC 的相关性



注:A.使用 Spearman's rank 相关系数描述泛癌和 TMB 中 CCL18 表达的相关分析结果;B.使用 Spearman's rank correlation coefficient 描述 CCL18 在泛癌和 MSI 中的表达的相关分析结果。

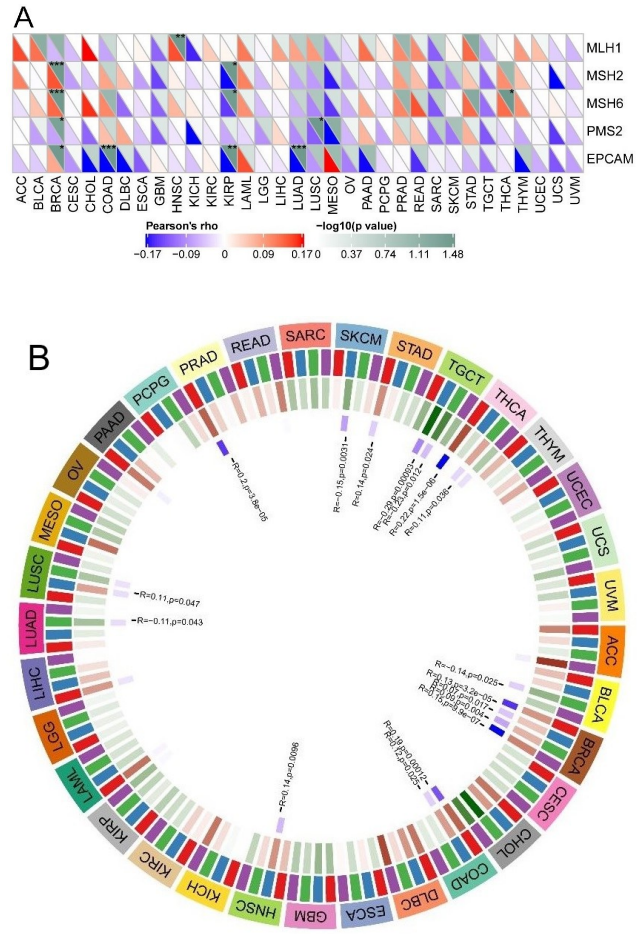
图 6 CCL18 在泛癌和 TMB、MSI 中表达的相关性分析

2.7 CCL18 表达与 DNA 错配修复相关基因及 DNA 甲基转移酶相关基因的相关性 为了评估 CCL18 在肿瘤发生中的作用,本研究分析了 CCL18 表达与 DNA 错配修复相关基因之间的相关性。结果表明, CCL18 的表达与 BRCA、COAD、HNSC、KIRP、LUAD、LUSC 和 THCA 的 5 个 MMR 基因突变水平相关(见图 7A)。结果发现接下来研究了 CCL18 表达与 4 种 DNA 甲基转移酶表达之间的相关性,结果发现 CCL18 表达与 BLCA、BRCA、COAD、HNSC、LUAD、LUSC、PRAD、SKCM、STAD、TGCT 和 THCA 中的 DNA 甲基转移酶表达密切相关(见图 7B)。

2.8 泛癌中 CCL18 参与的信号通路 为了研究 CCL18 在癌症中的作用机制,计算了每位癌症患者的这 50 条通路的 GSEA 评分。结果发现大多数通路富集水平与多种癌症类型的异体移植排斥反应、血管生成、细胞凋亡、凝血、补体、上皮间质转化、IL2 STAT5 标志、IL6 JAK STAT3 标志、炎症反应、α 干扰素反应、γ 干扰素反应、KRAS 信号传导等信号通路正相关(见图 8)。

3 讨论

CCL18 是以两个相邻的半胱氨酸为特征的蛋白质,该基因编码的细胞因子对新生 T 细胞、CD4+ 和 CD8+ T 细胞和非活化淋巴细胞显示趋化活性,但对单核细胞或粒细胞不显示趋化活性。已有研究表明在癌症病人中, CCL18 促进 EMT^[14]、细胞生长和转移^[15]、和肿瘤进展^[16]。尽管 CCL18 已在多种癌症中得到广泛研究,但其在泛癌中的作用以及是否可以用作生物标志物仍是未知数。本研究是基于 TCGA 数据库对恶性肿瘤中的 CCL18 进行了泛癌分析。



注:A.5 个 MMR 的基因表达水平与 CCL18 表达的相关性分析;B. CCL18 的表达与 4 种甲基转移酶的表达之间的相关性分析。DNMT1 被染成红色, DNMT2 被染成蓝色 DNMT3a 被染成绿色, DNMT3b 被染成紫色。

图 7 CCL18 在泛癌中的表达与 DNA 修复基因和甲基转移酶的表达水平之间的相关性分析

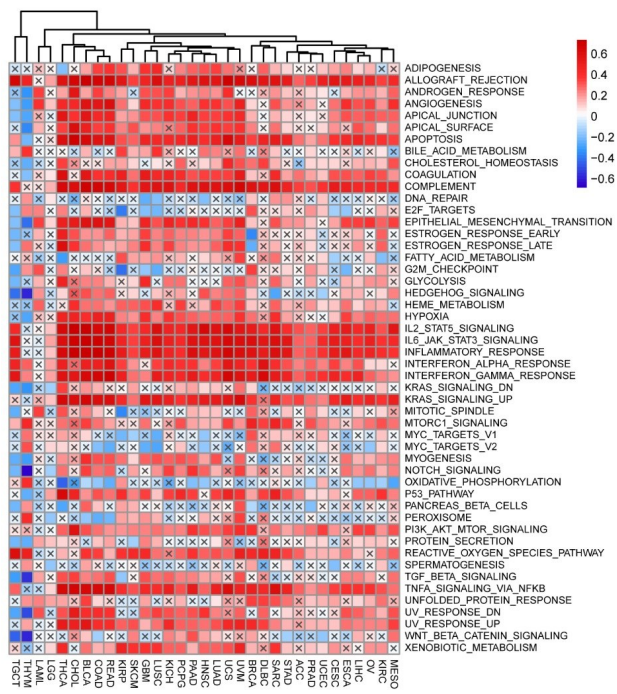


图 8 不同癌症中 CCL18 和 50 条信号通路之间的关系

本研究发现了 CCL18 在 24 种肿瘤中存在差异表达。根据文献检索结果,在许多癌症患者中发现了较高的 CCL18 表达^[6-8]。通过使用单因素回归分析表明, CCL18 与 CESC 和 KIRP 具有更好的生存率, ACC、DLBC、LAML、UVM、CESC 和 LGG 与更差预后相关。已有研究表明 CCL18 的高表达与口腔鳞状细胞癌^[6],喉部鳞状细胞癌^[7]和上皮性卵巢癌^[8]更差的预后是相关的,这些结果与本次研究结果一致。

本次研究了 CCL18 与各种临床参数之间的相关性,年龄包括 BRCA、STAD、UCS、OV、COAD、SARC 和 LUAD,性别包括 LAML、LGG、KIRP、KIRC,肿瘤分期包括 CHOL、KICH、BLCA、THCA、COAD 和 KIRP 都具有显著差异。这与之前的调查结果一致, CCL18 的表达与气喘病的年龄^[28];慢性阻塞性肺部疾病的性别^[29];乳腺癌^[30]、喉鳞状细胞癌^[7]、口腔鳞状细胞癌^[31-32]、膀胱癌^[14]、头颈部鳞状细胞癌^[33]、黑色素瘤^[34]和卵巢癌^[35]的分期具有相关性。最近的一项研究报告称,癌症患者可分为 6 种免疫亚型: C1-C6^[36]。本研究发现 CCL18 的高表达与更具攻击性的 C1、C2、C3 和 C6 亚型密切相关。

本研究还发现 CCL18 表达水平与大多数癌症中 28 种免疫细胞的浸润水平显著相关。晚期 HCC 患者中富含 CCL18 高表达的 M2 巨噬细胞亚群,可能参与肿瘤进展^[37]。CCL18 的过表达与炎症和免疫反应有关,与巨噬细胞丰度有关^[38]。降低 PITPNM3(一种 CCL18 受体)的表达,能够阻断初始 CD4⁺ T 细胞募集到肿瘤,显著抑制乳腺癌的肿瘤进展^[13]。CCL18 可作为一种趋化信号,促进未成熟的树突状细胞与原始的

T 淋巴细胞在 IL-10-dominated 的环境中共同定位,从而产生调节 T 细胞^[39],这些研究报道与本研究结果一致。还研究了在 33 种肿瘤中 CCL18 表达与免疫相关通路的相关性,结果发现 CCL18 表达与 10 种免疫相关通路呈正相关,包括 APM、CD8 T effector、Immune checkpoint、Pan F TBRs、TMEscoreA CIR、EMT1、EMT2、EMT3、pan F TBRs 和 TMEscoreB CIR 路径; CCL18 表达与 9 种免疫相关通路呈负相关,包括 base excision repair、cell cycle、DDR、FGFR3 related、homologous recombination、Histones、mismatch Repair、nucleotide excision repair 和 WNT target pathways。已有报道^[40]表明,随着 CCL18 表达的增加大多数免疫反应以及免疫相关途径都被激活。根据 TCGA 数据确定了 CCL18 水平与免疫评分、基质评分和 ESTIMATE 评分相关。这表明 CCL18 可能能够改变肿瘤微环境或肿瘤免疫细胞浸润程度。此外,为了进一步证明 CCL18 与免疫之间的关系,本研究发现在大多数癌症中 CCL18 表达水平与免疫相关基因呈正相关。大多数癌症中 T 细胞功能受损是癌细胞逃避保护性抗肿瘤免疫的主要原因,尽管 CCL18 调节免疫的机制尚未得到实验证实,但在理论上用 CCL18 抑制剂是可行的^[13,41-42]。

免疫检查点抑制剂 CTLA4 抑制剂和 PD-1 抑制剂已被证明对多种癌症患者的生存有显著的积极影响^[43-44]。在进一步分析中还发现, CCL18 可能通过调节特定免疫检查点基因的表达来调节 BLCA、BRCA、CESC、COAD、HNSC、LGG、LIHC、PRAD、READ、STAD、THCA 和 UCEC 等各种肿瘤的肿瘤免疫模式。CCL18 表达与 BRCA、UCEC、STAD 和 PRAD 中的免疫新抗原有关。还发现 CCL18 表达与 TMB 以及微卫星不稳定性之间存在相关性。有研究报道^[40], CCL18 的高表达分组 MSI、dMMR、TMB 比例相对较高,这与本研究结果一致。DNA 错配修复系统在维持遗传物质的完整性和稳定性以及避免基因突变的产生方面发挥了重要作用^[45]。本研究发现 CCL18 表达与 BRCA、COAD、HNSC、KIRP 和 LUAD 中的 DNA 错配修复相关基因呈正相关。此外, CCL18 表达与 BLCA、BRCA、COAD、HNSC、LUAD、LUSC、PRAD、SKCM、STAD、TGCT 和 THCA 中的甲基化转移酶相关基因呈正相关。以上结果表明, CCL18 可能通过调节 DNA 错配修复相关基因和 DNA 甲基化转移酶相关基因的表达水平,在肿瘤发生中发挥重要作用。

最后,通过 GSEA 富集分析分析 CCL18 在肿瘤中的生物学功能,发现 CCL18 富集在大多数信号相关通路中。CCL18 暴露诱导人脐带血管内皮细胞中的内皮细胞-间质转化并激活 ERK 和 Akt/GSK-3 β /Snail 信号传导,从而促进其促血管生成作用^[16]。CCL18 及其

共表达基因富集与细胞增殖、迁移、凋亡等生物学功能、NF- κ B、癌症通路、PI3K-AKT 通路相关^[46]。miR-484 在胃癌组织和细胞中表达下调,在胃癌的发生发展中发挥抗癌作用,这可能通过抑制转录因子 CCL18 的表达,阻断 PI3K/AKT 通路来实现^[47]。AnxA2 作为 Nir 1 与 CCL18 结合的下游分子,通过 PI3K/Akt/GSK3 β /Snail 信号通路促进 EMT 在乳腺癌中的侵袭和转移^[48-49]。CCL18 通过 EP300/UCA1/Wnt/ β -catenin 通路促进骨肉瘤细胞的增殖和迁移^[50]。本研究的泛癌分析同样支持 CCL18 在调节机制中的功能。因此,本研究为未来研究提供了对 CCL18 在肿瘤免疫学中潜在作用的重要见解。

总之,本研究全面揭示了 CCL18 在人类癌症中的表达谱,探讨了 CCL18 表达水平与临床病理特征和预后、肿瘤细胞生物学特征、肿瘤免疫的相关性。还确定了涉及 CCL18 的功能途径。基于这些发现,CCL18 可能是确定人类癌症诊断和预后的有用生物标志物,也是评估免疫疗法疗效的生物标志物。因此,本研究为更好地了解 CCL18 在肿瘤发生、进展和预后中的作用以及未来免疫治疗的作用提供了准确而详细的参考。本研究的局限性在于 CCL18 的相关功能和机制需要通过实验进一步验证。

参考文献:

- [1] ADEMA G J, HARTGERS F, VERSTRATEN R, et al. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells[J]. *Nature*, 1997, 387 (6634): 713-717.
- [2] HIESHIMA K, IMAI T, BABA M, et al. A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes[J]. *J Immunol*, 1997, 159(3): 1140-1149.
- [3] GUAN P, BURGHESE A H, CUNNINGHAM A, et al. Genomic organization and biological characterization of the novel human CC chemokine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18[J]. *Genomics*, 1999, 56(3): 296-302.
- [4] KODELJA V, MÜLLER C, POLITZ O, et al. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern[J]. *J Immunol*, 1998, 160(3): 1411-1418.
- [5] TASAKI Y, FUKUDA S, IIO M, et al. Chemokine PARC gene (SCYA18) generated by fusion of two MIP-1alpha/LD78alpha-like genes[J]. *Genomics*, 1999, 55(3): 353-357.
- [6] MAO L, ZHUANG R, QIN L, et al. CCL18 overexpression predicts a worse prognosis in oral squamous cell carcinoma (OSCC)[J]. *Neoplasma*, 2020, 67(3): 700-706.
- [7] WANG J C, QIN Y X, ZHU G C, et al. High serum CCL18 predicts a poor prognosis in patients with laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2019, 10(27): 6910-6914.
- [8] WANG Q, TANG Y, YU H J, et al. CCL18 from tumor-cells promotes epithelial ovarian cancer metastasis via mTOR signaling pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(11): 1688-1699.
- [9] SHI L H, ZHANG B G, SUN X N, et al. CC chemokine ligand 18 (CCL18) promotes migration and invasion of lung cancer cells by binding to Nir1 through Nir1-ELMO1/DOC180 signaling pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(12): 2051-2062.
- [10] YANG Y Z, ZHANG W, ZHAO B B, et al. Expression of CCL18 gene in ovarian cancer and its impact on the biologic function of ovarian cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(7): 2572-2584.
- [11] CHEN J Q, YAO Y D, GONG C, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PTPN3[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 541-555.
- [12] GÜNTHER C, ZIMMERMANN N, BERNDT N, et al. Up-regulation of the chemokine CCL18 by macrophages is a potential immunomodulatory pathway in cutaneous T-cell lymphoma[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3): 1434-1442.
- [13] SU S C, LIAO J R, LIU J, et al. Blocking the recruitment of naive CD4(+) T cells reverses immunosuppression in breast cancer[J]. *Cell Res*, 2017, 27(4): 461-482.
- [14] LIU X Q, XU X Y, DENG W, et al. CCL18 enhances migration, invasion and EMT by binding CCR8 in bladder cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 1678-1686.
- [15] JIANG X, HUANG Z J, SUN X, et al. CCL18-NIR1 promotes oral cancer cell growth and metastasis by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 632.
- [16] LIN L, CHEN Y S, YAO Y D, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34758-34773.
- [17] PITT J M, MARABELLE A, EGGERMONT A, et al. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(8): 1482-1492.
- [18] DA SILVA J L, DOS SANTOS A L S, NUNES N C C, et al. Cancer immunotherapy: the art of targeting the tumor immune microenvironment[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 84(2): 227-240.
- [19] JIN L, KIM H S, SHI J Q. Neutrophil in the pancreatic tumor microenvironment[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1170.
- [20] LIANG W, HUANG X, CARLOS C J J, et al. Research progress of tumor microenvironment and tumor-associated macrophages[J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(12): 2141-2152.
- [21] SHAIN K H, DALTON W S, TAO J. The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies[J]. *Oncogene*, 2015, 34(36): 4673-4682.

- [22] TOOR S M, SASIDHARAN NAIR V, DECOCK J, et al. Immune checkpoints in the tumor microenvironment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 65: 1-12.
- [23] SALEH R, ELKORD E. Treg-mediated acquired resistance to immune checkpoint inhibitors [J]. *Cancer Lett*, 2019, 457: 168-179.
- [24] 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.
- [25] YOSHIHARA K, SHAHMORADGOLI M, MARTÍNEZ E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2612.
- [26] GREILLIER L, TOMASINI P, BARLESI F. The clinical utility of tumor mutational burden in non-small cell lung cancer [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2018, 7(6): 639-646.
- [27] HAUSE R J, PRITCHARD C C, SHENDURE J, et al. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types [J]. *Nat Med*, 2016, 22(11): 1342-1350.
- [28] FOUQUET H, GIOVANNELLI J, DE NADAÏ P, et al. Is CCL18 a potential biomarker of type-2 asthma endotypes? [J]. *J Asthma*, 2022, 59(3): 536-540.
- [29] DE TORRES J P, CASANOVA C, PINTO-PLATA V, et al. Gender differences in plasma biomarker levels in a cohort of COPD patients: a pilot study [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16021.
- [30] HUANG H, LI J, HU W J, et al. Positive expression of chemokine (C-C Motif) ligand 18 and prognosis in cancer: a meta-analysis [J]. *J BUON*, 2018, 23(4): 1185-1194.
- [31] JIANG X, WANG J, CHEN X J, et al. Elevated autocrine chemokine ligand 18 expression promotes oral cancer cell growth and invasion via Akt activation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16262-16272.
- [32] WANG H F, LIANG X Y, LI M X, et al. Chemokine (CC motif) ligand 18 upregulates Slug expression to promote stem-cell like features by activating the mammalian target of rapamycin pathway in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(8): 1584-1593.
- [33] QIN Y X, WANG J C, ZHU G C, et al. CCL18 promotes the metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck through MTDH-NF- κ B signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2689-2701.
- [34] ITA M I, WANG J H, FANNING N, et al. Plasma circulating cell free messenger RNA as a potential biomarker of melanoma [J]. *Acta Oncol*, 2021, 60(9): 1201-1209.
- [35] WANG Q, ZHANG W, LI D R, et al. Identification of two potential serum biomarkers for ovarian cancer and clinical validation thereof [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(15): 1012-1016.
- [36] THORSSON V, GIBBS D L, BROWN S D, et al. The immune landscape of cancer [J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 812-830. e14.
- [37] SONG G H, SHI Y, ZHANG M Y, et al. Global immune characterization of HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma identifies macrophage and T-cell subsets associated with disease progression [J]. *Cell Discov*, 2020, 6(1): 90.
- [38] ZHANG J Z, YU S R, HU W, et al. Comprehensive analysis of cell population dynamics and related core genes during vitiligo development [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 627092.
- [39] VULCANO M, STRUYF S, SCAPINI P, et al. Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2003, 170(7): 3843-3849.
- [40] YUE T H, LIU X Z, ZUO S, et al. BCL2A1 and CCL18 are predictive biomarkers of cisplatin chemotherapy and immunotherapy in colon cancer patients [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9: 799278.
- [41] CHENIVESSE C, CHANG Y, AZZAOUI I, et al. Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2012, 189(1): 128-137.
- [42] SUN Z R, DU C C, XU P B, et al. Surgical trauma-induced CCL18 promotes recruitment of regulatory T cells and colon cancer progression [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4608-4616.
- [43] BORGHAEI H, PAZ-ARES L, HORN L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(17): 1627-1639.
- [44] PASQUALI S, HADJINICOLAOU A V, CHIARION SILENI V, et al. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 2(2): CD11123.
- [45] HUANG Y P, LI G M. DNA mismatch repair in the chromatin context: mechanisms and therapeutic potential [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2020, 93: 102918.
- [46] ZHOU Q P, HUANG L S, GU Y Y, et al. The expression of CCL18 in diffuse large B cell lymphoma and its mechanism research [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21(4): 925-934.
- [47] LIU J, LI S M. MiR-484 suppressed proliferation, migration, invasion and induced apoptosis of gastric cancer via targeting CCL-18 [J]. *Int J Exp Pathol*, 2020, 101(6): 203-214.
- [48] ZHAO C L, ZHENG S X, YAN Z Q, et al. CCL18 promotes the invasion and metastasis of breast cancer through Annexin A2 [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(2): 571-580.
- [49] ZHANG B G, YIN C G, LI H G, et al. Nir1 promotes invasion of breast cancer cells by binding to chemokine (C-C motif) ligand 18 through the PI3K/Akt/GSK3 β /Snail signalling pathway [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(18): 3900-3913.
- [50] SU Y, ZHOU Y, SUN Y J, et al. Macrophage-derived CCL18 promotes osteosarcoma proliferation and migration by upregulating the expression of UCA1 [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(1): 49-61.

收稿日期: 2023-03-09; 修回日期: 2023-05-24