

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.12.008

· 临床研究 ·

基于生物信息学数据分析 ELTD1 在肾透明细胞癌组织中的表达、甲基化水平及其临床意义

黄逸婷¹, 王珂², 方晨¹ (1. 苏州大学附属第二医院 临床营养科, 江苏 苏州 215004; 2. 南京医科大学附属苏州医院 泌尿外科, 江苏 苏州 215004)

[摘要] **目的:** 探讨表皮生长因子受体7穿膜结构域蛋白1(ELTD1)在肾透明细胞癌(ccRCC)组织中的表达、甲基化水平及其与患者临床病理特征和预后的相关性。**方法:** 通过公共数据库分析 ccRCC 组织中 ELTD1 表达和甲基化的差异水平, 探讨 ELTD1 表达水平与患者临床病理特征和预后的相关性。通过 TIMER2.0 数据库评估 ccRCC 免疫细胞浸润, 筛选 ELTD1 相关免疫检查点基因, 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 通过基因共表达分析、筛选与 ELTD1 相关的基因。**结果:** 与癌旁组织比较, ELTD1 在 ccRCC 组织中呈高表达 ($P<0.05$)。TCGA-KIRC 队列中, ELTD1 的甲基化水平与其表达呈负相关 ($R=-0.37, P<0.01$)。ELTD1 转录表达在 ccRCC 患者年龄、T 分期、M 分期、临床分期及病理分级组间存在显著差异 (均 $P<0.01$), 且高表达 ELTD1 与较长的 OS 和 PFS 密切相关 ($HR=0.55, 0.63$, 均 $P<0.01$), ELTD1 高表达是 ccRCC 的独立保护因素。ELTD1 表达与 B 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞的免疫浸润呈显著负相关 ($R=-0.16, -0.27, -0.25, -0.31, -0.27$, 均 $P<0.01$)。GO 功能和 KEGG 通路富集分析结果显示, 血管生成及肿瘤相关信号通路在 ELTD1 高表达型中显著富集 (均 $P<0.01$)。ELTD1 共表达基因的生存分析提示, 其肿瘤抑制作用与共表达网络有关。**结论:** ELTD1 在 ccRCC 组织中高表达和低甲基化是患者预后良好的指标, 且与免疫浸润相关。

[关键词] 肾透明细胞癌; 表皮生长因子受体7穿膜结构域蛋白1; 甲基化; 免疫浸润; 预后标志物

[中图分类号] R737.11; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)12-1115-10

Analysis of expression, methylation, and clinical significance of ELTD1 in clear cell renal cell carcinoma based on bioinformatics

HUANG Yiting¹, WANG Ke², FANG Chen¹ (1. Department of Clinical Nutrition, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China; 2. Department of Urological Surgery, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215004, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and methylation level of epidermal growth factor, latrophilin and seven transmembrane domain-containing 1 (ELTD1) in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their correlation with the clinicopathological features and prognosis of patients. **Methods:** The differential expression and methylation of ELTD1 gene were analyzed with open databases to discuss the correlation between the ELTD1 expression and the clinicopathological characteristics and prognosis of patients. TIMER 2.0 database was adopted to analyze the tumor immune cell infiltration of ccRCC and screen out ELTD1-related immune checkpoint genes. GO function enrichment and KEGG pathway enrichment analysis were also performed. The genes closely related to ELTD1 were identified through gene co-expression analysis. **Results:** ELTD1 was significantly upregulated in ccRCC ($P<0.05$), whose expression is negatively correlated with its methylation in TCGA-KIRC ($R=-0.37, P<0.01$). ELTD1 transcription expression was significantly correlated with age, T stage, M stage and grade (all $P<0.01$). Higher expression of ELTD1 was closely associated with overall survival (OS) ($HR=0.55, P<0.01$) and progression-free survival (PFS) ($HR=0.63, P<0.01$). Upregulation of ELTD1 expression was an independent protective factor in ccRCC. ELTD1 expression was significantly correlated with immune infiltrating of B cells ($R=-0.16, P<0.01$), CD4⁺ T cells ($R=-0.27, P<0.01$), CD8⁺ T cells ($R=-0.25, P<0.01$), macrophages ($R=-0.31, P<0.01$) and neutrophils ($R=-0.27, P<0.001$), and diverse immune checkpoint genes (all $P<0.01$). GO function and KEGG pathway enrichment analysis showed that vascular process and tumor-related signaling pathways were enriched in the ELTD1 high expression phenotypes (all $P<0.01$). Gene co-expression analysis showed that the effect of tumor inhibition was related to the co-expression network.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.82070814)

[作者简介] 黄逸婷(1994—),女,硕士,主要从事免疫治疗相关研究,E-mail: hycassie@sina.com

[通信作者] 方晨,E-mail: afa9911@sina.com

Conclusion: Upregulation of ELTD1 expression and lower methylation level of ELTD1 in ccRCC are indicators of better prognosis and are related to tumor immune infiltration.

[Key words] clear cell renal cell carcinoma (ccRCC); epidermal growth factor; latrophilin and seven transmembrane domain-containing 1 (ELTD1); methylation; immune infiltration; prognostic marker

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(12):1115-1124. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.12.008]

肾癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。据统计,2020年全球肾癌新发病例高达431 288例,占新增肿瘤病例总数的2.2%^[1]。80%~85%的肾癌起源于肾上皮细胞,其中又以肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)最常见,是泌尿系统恶性肿瘤相关死亡的主要原因^[2-4]。临床上,约1/3的ccRCC患者在初诊时即发生转移,约1/4原位癌在手术后依旧会出现复发转移,且术后转移与高病死率显著相关^[5-6]。染色体3p丢失是ccRCC的重要致病因素,多种基因突变与疾病的发生发展密切相关。基因突变通过诱导VEGF、PDGF- β 、TGF- α 和碳酸酐酶IX等多种血管生成因子表达异常,参与ccRCC的发生发展进程^[7]。表皮生长因子蛛毒素受体7穿膜结构域蛋白1(epidermal growth factor, latrophilin and seven transmembrane domain-containing 1, ELTD1)是G蛋白偶联受体超家族的成员之一,其功能涉及生理和病理状态下的血管生成^[8]。ELTD1在多种类型肿瘤组织中表达上调,在ccRCC细胞中高表达,其表达水平与微血管密度呈正相关,在ccRCC中具有促血管生成作用^[9-10]。因此,有必要深入研究ELTD1参与ccRCC发生发展的具体机制。本研究利用生物信息学方法,结合癌症基因组图谱(TCGA)、基因型-组织表达(GTEX)和基因表达综合(GEO)数据库数据研究ELTD1在ccRCC患者组织中的转录表达、主要生物学功能以及可能的分子机制,旨在为ccRCC的诊断、治疗和预后评估提供标志物和治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 ELTD1基因的转录表达及DNA甲基化分析

从TCGA和GEO数据库下载基因表达谱,通过TIMER2.0(<http://timer.cistrome.org/>)分析ELTD1在肿瘤中的表达。从UCSC Xena(<https://xenabrowser.net>)下载以下信息:(1)TCGA-KIRC(kidney renal clear cell carcinoma)队列转录表达谱信息为RNA-Seq2 3级数据,样本量为535例ccRCC组织和72例癌旁组织,平台为Illumina HiSeq 2000,版本为2019-07-19;(2)DNA甲基化图谱信息为DNA甲基化3级数据,样本量为323例ccRCC组织和160例癌旁组织,平台为Illumina Infinium Human Methylation 450k,版本为2019-07-19。由TCGAbiolinks排除未合格样本^[11],共排除4个含转

录表达信息的肿瘤组织和3个含甲基化信息的肿瘤组织。通过GEPIA2分析TCGA和GTEx联合数据库中ccRCC组织和癌旁组织样本之间ELTD1转录表达水平的差异。采用配对 t 检验分析TCGA-KIRC中ccRCC和癌旁组织中ELTD1的表达差异,同时在GEO数据库中进行验证。ELTD1的免疫组织化学信息和蛋白组学定量数据分别从人类蛋白图谱数据库(Human Protein Atlas, HPA)^[12]及临床蛋白质组肿瘤分析联盟(clinical proteomic tumor analysis consortium, CPTAC)数据库中获取。

1.2 ELTD1表达/甲基化与ccRCC患者临床病理特征的相关性分析

从UCSC Xena下载ccRCC患者TCGA-KIRC队列的临床数据,包括年龄、性别、病理分级、临床分期、OS和PFS等信息。采用卡方检验和Wilcoxon分析ELTD1表达/甲基化与患者临床特征的相关性,采用Cox比例风险模型进行单变量和多变量分析。

1.3 ELTD1表达/甲基化的Kaplan-Meier生存分析

采用survival和survminer软件包进行Kaplan-Meier和单变量Cox比例风险回归分析。采用对数秩检验和单变量Cox比例风险回归计算 P 值和风险比(hazard ratio, HR)。

1.4 ELTD1表达与免疫特征的相关性

基于TIMER2.0数据库对ELTD1表达与6种肿瘤免疫细胞进行相关性分析。进一步采用Cibersort算法分析ELTD1表达与22种免疫细胞亚型在不同组间的浸润程度。采用Limma软件包通过Spearman相关性分析,筛选与ELTD1表达相关的免疫检查点基因,筛选条件为 $P < 0.01$ 。

1.5 差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)测定和富集分析

采用Limma软件包筛选DEG,筛选标准为 $P < 0.05$ 和 \log_2 倍数变化 > 1 。采用ClusterProfiler软件包进行基因本体论(Gene Ontology, GO)分析。采用Fgsea法进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA),通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路数据库进行信号通路的富集。筛选标准为 $P < 0.01, q < 0.01$ 。

1.6 ELTD1基因的共表达基因分析

采用Limma软件包进一步筛选与ELTD1表达相

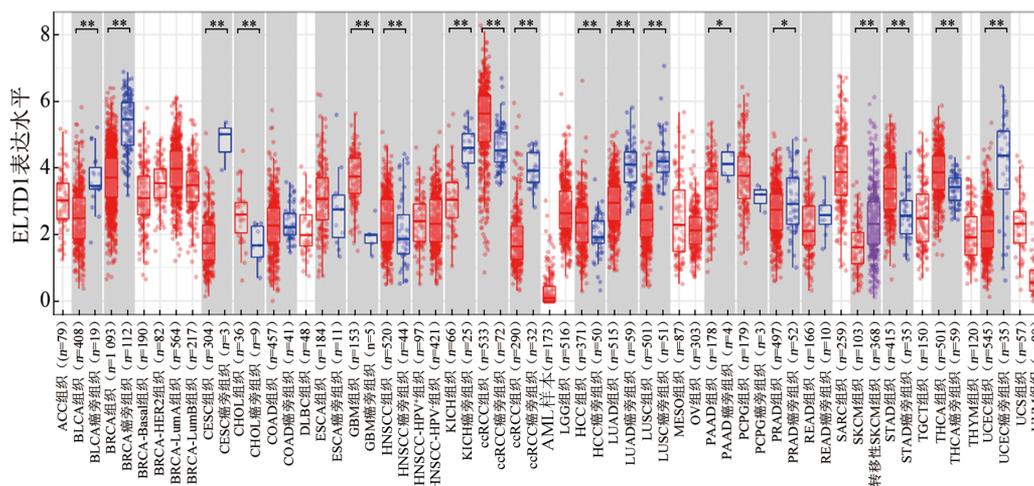
关的基因,使用 Corplot 和 Circlize 软件包绘制与 ELTD1 基因表达正相关和负相关的前 5 个基因的相关性圈图。通过 GEPIA2 进行单变量 Cox 比例风险回归的生存分析。

2 结果

2.1 ELTD1 在多种类型肿瘤组织中呈高表达

通过 TIMER2.0 检测 TCGA 数据库中不同肿瘤

组织的 RNA-seq 数据集,生物信息学分析结果(图 1)显示,ELTD1 在胆管癌(cholangiocarcinoma, CHOL)、多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)、头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)、ccRCC、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、胃与食管癌(stomach and esophageal carcinoma, STAD)、甲状腺癌(thyroid carcinoma, THCA)中呈高表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$

ACC:肾上腺皮质癌;BLCA:膀胱移行细胞癌;BRCA:乳腺浸润性癌;CESC:宫颈鳞状细胞癌;COAD:结肠癌;DLBC:弥漫性大B细胞淋巴瘤;ESCA:食管癌;KICH:肾嫌色细胞癌;KIRP:肾乳头状细胞癌;AML:急性髓系白血病;LGG:脑低级别胶质瘤;LUAD:肺腺癌;LUSC:肺鳞状细胞癌;MESO:间皮瘤;OV:卵巢浆液性囊腺癌;PAAD:胰腺癌;PCPG:嗜铬细胞瘤和副神经节瘤;PRAD:前列腺腺癌;READ:直肠癌;SARC:肉瘤;SKCM:皮肤黑色素瘤;TGCT:睾丸生殖细胞肿瘤;THYM:胸腺癌;UCEC:子宫内腺癌;UCS:子宫癌肉瘤;UVM:葡萄膜黑色素瘤

图1 ELTD1在不同肿瘤组织中的表达

2.2 ELTD1 在 ccRCC 中表达和甲基化水平升高

采用 GEPIA2 比较 TCGA 和 GTEx 数据库中 523 个 ccRCC 和 100 个癌旁组织之间 ELTD1 的表达差异,结果显示,与癌旁组织相比,ccRCC 组织中 ELTD1 呈高表达($P<0.05$,图 2A)。TCGA-KIRC 及 GSE40435、GSE46699 和 GSE53757 数据集的配对分析结果同样显示,ELTD1 在 ccRCC 中呈高表达(均 $P<0.01$,图 2B)。免疫组织化学染色结果(图 2C)显示,ccRCC 细胞中 ELTD1 蛋白的表达水平显著高于癌旁组织,CPTAC 数据库的结果($P<0.01$,图 2D)也验证了该结论。

在 MethSurv 数据库中,通过 11 个 ELTD1 CpG 位点检测其甲基化水平,结果显示,ccRCC 中 ELTD1 的整体甲基化水平升高($P<0.01$,图 2E)。其中, cg04360793、cg13175159、cg14319235、cg15084543、cg18592365、cg21113740 和 cg26422458 位点的甲基化水平显著升高,cg17095278、cg17750919 则降低

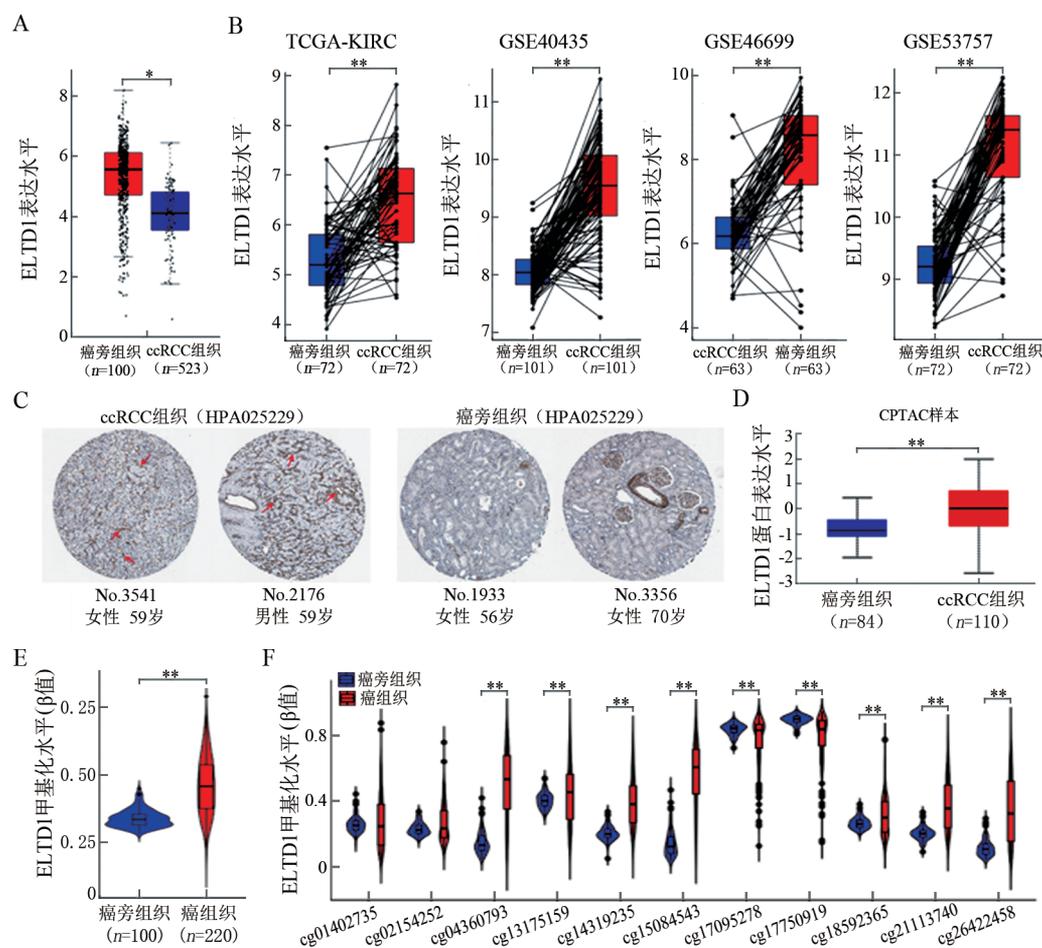
(图 2F)。Spearman 相关性分析结果显示,ELTD1 的表达与甲基化水平之间呈负相关($R=-0.37$, $P<0.01$;表 1),提示 ELTD1 高甲基化可能抑制其转录表达。

2.3 ELTD1 表达/甲基化与临床病理特征的相关性

根据 ELTD1 表达水平的中位数和 11 个位点甲基化水平的平均 β 值,将 TCGA-KIRC 队列中 ccRCC 患者分为高和低水平的 ELTD1 表达/甲基化组,采用卡方检验分析 ELTD1 表达、甲基化水平与临床病理特征之间的相关性,结果见图 3A、3B。

通过 Wilcox 秩和检验分析组间差异,结果显示,ELTD1 转录表达在以下组中显著上调(图 3C),分别为年龄 <65 岁、T分期 1~2 期、M分期 0 期、病理分级 1~2 级和临床分期 I~II 期(均 $P<0.01$),在性别和 N 分期亚组中,未发现 ELTD1 表达存在显著差异(均 $P>0.05$)。ELTD1 甲基化分析结果(图 3D)显示,年龄 <65 岁、女性、T分期 1~2 期、M分期 0 期、病理分级

1~2级和临床分期 I~II 期组的 ELTD1 甲基化水平显著降低(均 $P < 0.01$)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: TCGA 和 GTEx 数据库中在 ccRCC 组织中 ELTD1 的表达; B: TCGA-KIRC 及 GSE40435、GSE46699、GSE53757 数据集配对分析; C、D: 免疫组化染色法检测 ELTD1 蛋白在 ccRCC 组织中的表达($\times 100$); E、F: ccRCC 组织中 ELTD1 的甲基化水平

图 2 ELTD1 在 ccRCC 组织及癌旁组织中的表达及甲基化水平

表 1 ELTD1 转录表达与 DNA 甲基化的相关性

探针 ID	基因组区段	CpG 岛区段	R	P
ELTD1 甲基化	/	/	-0.37	<0.001
cg01402735	TSS200	上游	-0.24	<0.001
cg13175159	TSS200	上游	-0.23	<0.001
cg17750919	TSS1500	上游	-0.33	<0.001
cg02154252	TSS200	CpG 岛	-0.23	<0.001
cg18592365	TSS200	CpG 岛	-0.15	0.007
cg04360793	5'UTR;1stExon	CpG 岛	-0.31	<0.001
cg15084543	5'UTR;1stExon	CpG 岛	-0.30	<0.001
cg21113740	5'UTR;1stExon	CpG 岛	-0.27	<0.001
cg26422458	5'UTR;1stExon	CpG 岛	-0.28	<0.001
cg14319235	Body	CpG 岛	-0.26	<0.001
cg17095278	Body	下游	-0.27	<0.001

2.4 ELTD1 高表达和低甲基化预示临床预后良好
TCGA-KIRC 数据集 Kaplan-Meier 生存分析结果显

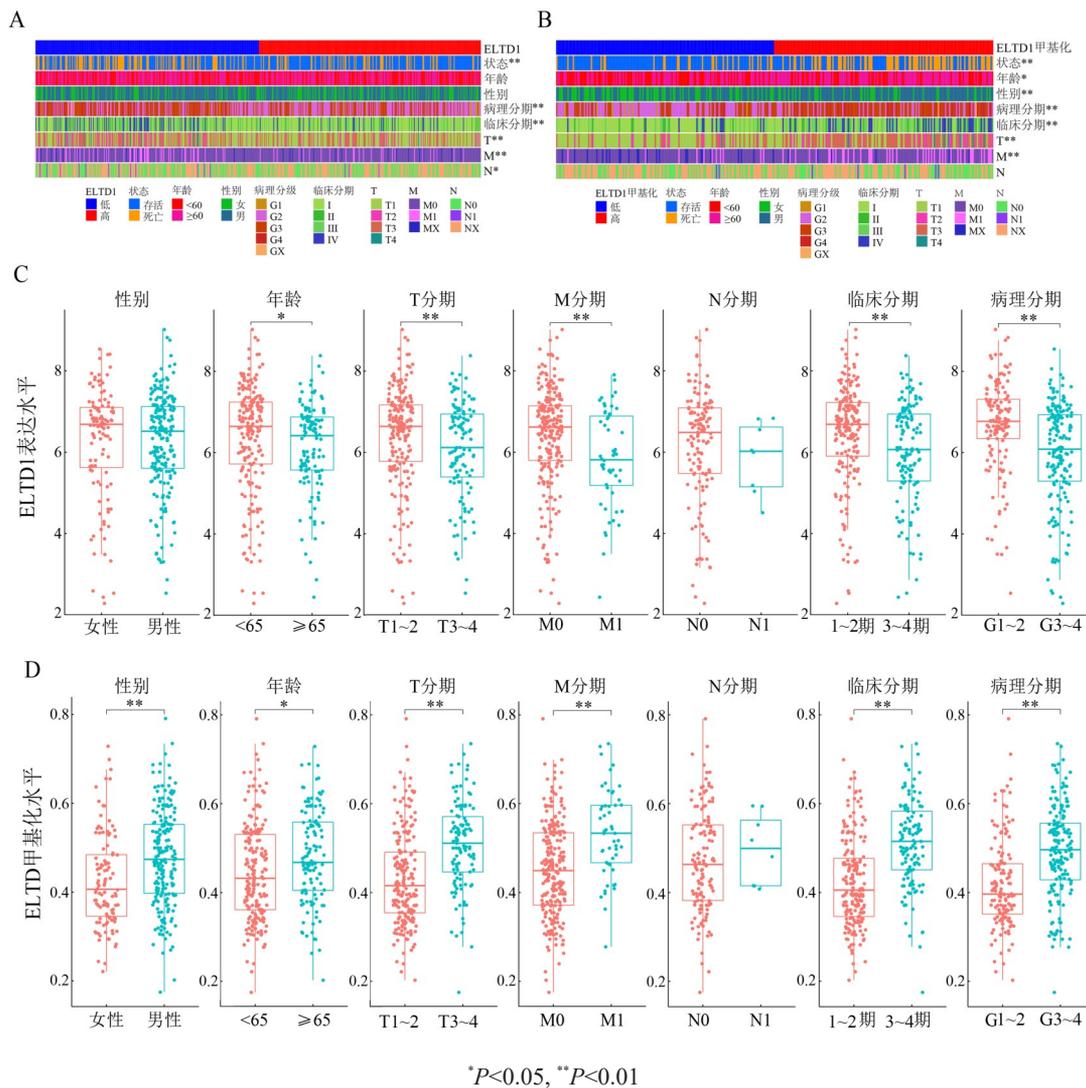
示, ccRCC 患者中 ELTD1 高表达与较好的 OS ($HR=0.55$, $P < 0.01$; 图 4A) 及 PFS ($HR=0.63$, $P < 0.01$; 图 4B) 显著相

关。GSE22541 数据集的分析结果与上述结果一致, 表明 ELTD1 高表达与较长的无病间期(disease-free interval, DFI)显著相关($HR=0.45, P<0.01$; 图 4C)。

Cox 回归分析提示, ELTD1 高表达是 ccRCC 患者预后良好的独立保护因素(单变量 Cox 回归分析结果显示, $HR=0.73, P<0.01$; 图 4D; 多变量 Cox 回归分析中 $HR=0.79, P<0.01$; 图 4E)。进一步评估 ELTD1 预测临床预后的效能, ROC 曲线显示, ELTD1 对 ccRCC 具有较高的诊断价值($AUC=0.757$, 当选取 ELTD1 表达量 5.55 为阈

值时, 敏感度 59.9%, 特异性 91.7%; 图 4F)。

ELTD1 的高甲基化水平与 ccRCC 患者的不良 OS($HR=2.88, P<0.01$; 表 2)和 PFS($HR=2.57, P<0.01$; 表 2)密切相关。根据 CpG 位点的中位 β 值将 ccRCC 患者分为高/低甲基化组, 以评估单个 ELTD1 CpG 位点的预后意义。Kaplan-Meier 分析结果显示, 9 个位点的高甲基化与 ccRCC 患者的 OS 不良预后显著相关(表 2)。以上分析结果均提示, ELTD1 及其甲基化水平是 ccRCC 较好的预后预测因子。



A: ELTD1 表达与临床病理特征的相关性聚类热图; B: ELTD1 甲基化与临床病理特征的相关性聚类热图; C: Wilcoxon 分析 ELTD1 表达在各组临床病理特征中的组间差异; D: Wilcoxon 分析 ELTD1 甲基化在各组临床病理特征中的组间差异

图 3 ELTD1 表达/甲基化与临床病理特征之间的相关性分析

2.5 ELTD1 表达与 ccRCC 中免疫细胞浸润有关

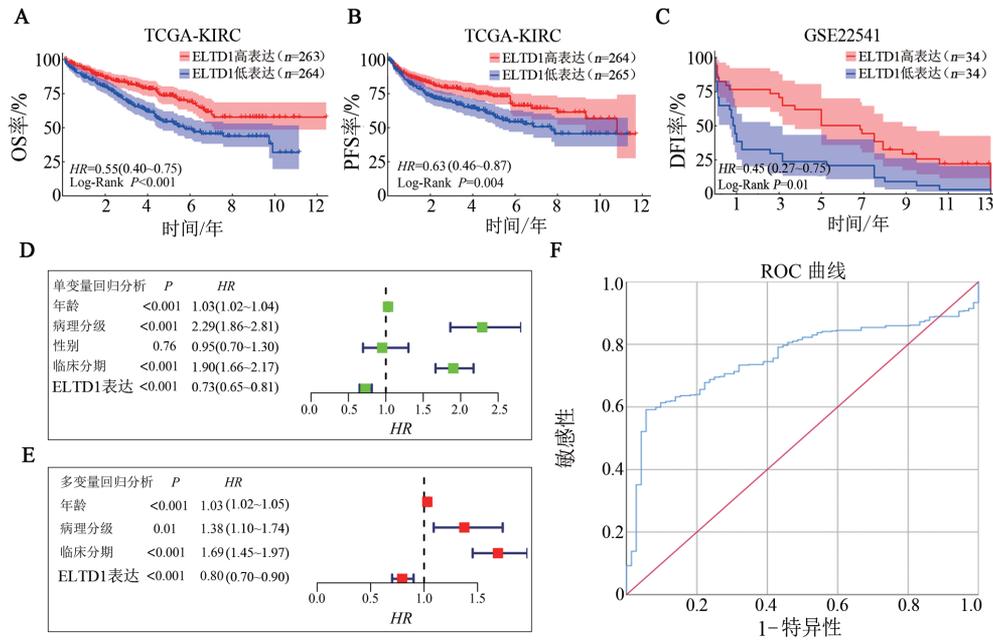
TIMER 数据库分析结果显示, 在 TCGA-KIRC 队列中 ELTD1 的表达与肿瘤纯度、B 细胞呈负相关($R=-0.13, -0.16$, 均 $P<0.01$; 图 5A), 与 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞($R=0.27, 0.25, 0.31, 0.27$, 均 $P<0.01$)呈正相关。

通过 Cibersort 软件分析不同水平的 ELTD1 表达组间免疫细胞浸润差异, 结果提示, 初始 B 细胞、静息记忆 $CD4^+$ T 细胞、静息 NK 细胞、单核细胞和活肥大细胞在 ELTD1 高表达组的浸润程度较高(均 $P<0.05$), 而记忆 B 细胞、浆细胞、 $CD8^+$ T 细胞、滤泡辅助 T 细胞(T cells follicular helper, Tfh)、Treg 细

胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、效应NK 细胞和M0巨噬细胞在ELTD1 高表达组的浸润程度则较低(均 $P < 0.05$, 图5B)。

通过 Spearman 相关性分析筛选与ELTD1 表达高度相关的免疫检查点基因, 筛选条件为 $P < 0.01$ 。如

图5C所示, 23个免疫检查点标志物与ELTD1 表达显著相关, 包括NRP1、CD200、TNFRSF4、IDO1、CD40、PDCD1LG2 等。以上结果提示, ELTD1 可能是ccRCC的预后标志物和免疫治疗靶点。



A、B: TCGA-KIRC 数据集Kaplan-Meier生存分析; C: GSE22541 数据集Kaplan-Meier生存分析;

D: 单因素Cox回归分析; E: 多因素Cox回归分析; F: ROC曲线分析

图4 ELTD1表达在ccRCC中的预后价值

表2 ELTD1甲基化在ccRCC中的预后价值

探针ID	OS			PFS		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
ELTD1 甲基化	2.88	1.86~4.44	<0.001	2.57	1.70~3.87	<0.001
cg01402735	1.8	1.21~2.68	0.003	1.5	1.02~2.20	0.038
cg13175159	1.61	1.09~2.39	0.017	1.21	0.83~1.77	0.330
cg17750919	1.17	0.80~1.73	0.420	1.08	0.74~1.59	0.680
cg02154252	1.66	1.11~2.48	0.012	1.98	1.33~2.94	<0.001
cg18592365	1.66	1.42~3.22	<0.001	1.96	1.32~2.91	<0.001
cg04360793	2.5	1.63~3.82	<0.001	2.57	1.70~3.88	<0.001
cg15084543	2.32	1.53~3.52	<0.001	2.13	1.43~3.19	<0.001
cg21113740	2.83	1.84~4.34	<0.001	2.21	1.48~3.30	<0.001
cg26422458	2.8	1.81~4.32	<0.001	2.66	1.76~4.03	<0.001
cg14319235	2.13	1.41~3.21	<0.001	1.99	1.34~2.96	<0.001
cg17095278	1.37	0.93~2.03	<0.001	1.07	0.73~1.56	<0.001

2.6 ELTD1基因的功能及信号通路富集分析

基于TCAG-KIRC队列中ELTD1高/低表达组筛选DEG, 如火山图所示(图6A), 686个DEG与ELTD1基因表达相关, 其中包括676个上调和10个下调基因。GO富集结果(图6B)提示, ELTD1高表达

组在内皮细胞发育及分化、细胞基质黏附、阿米巴样细胞迁移、血管生成过程中显著富集(均 $P < 0.01$)。KEGG通路分析结果(图7)提示, ELTD1参与ErbB信号通路、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药性、MAPK、HIF-1、cGMP-PKG、Rap1等相关信号通路。

2.7 ELTD1 共表达基因分析

通过 ELTD1 基因共表达分析, 绘制与 ELTD1 正相关的前 6 个基因和负相关的前 5 个基因的相关性圈图(图 8)。结果表明, ELTD1 基因与 PECAM1、S1PR1、MYCT1、ERG、CYR1、CDH5 基因的表达呈

显著正相关($r=0.93、0.93、0.93、0.92、0.92、0.92$, 均 $P<0.01$), 与 HAGHL、MT-CO2、ATP5MF、TLCD1、NDUFS8 的表达呈显著负相关($r=-0.52、-0.51、-0.50、-0.49、-0.49$, 均 $P<0.01$)。

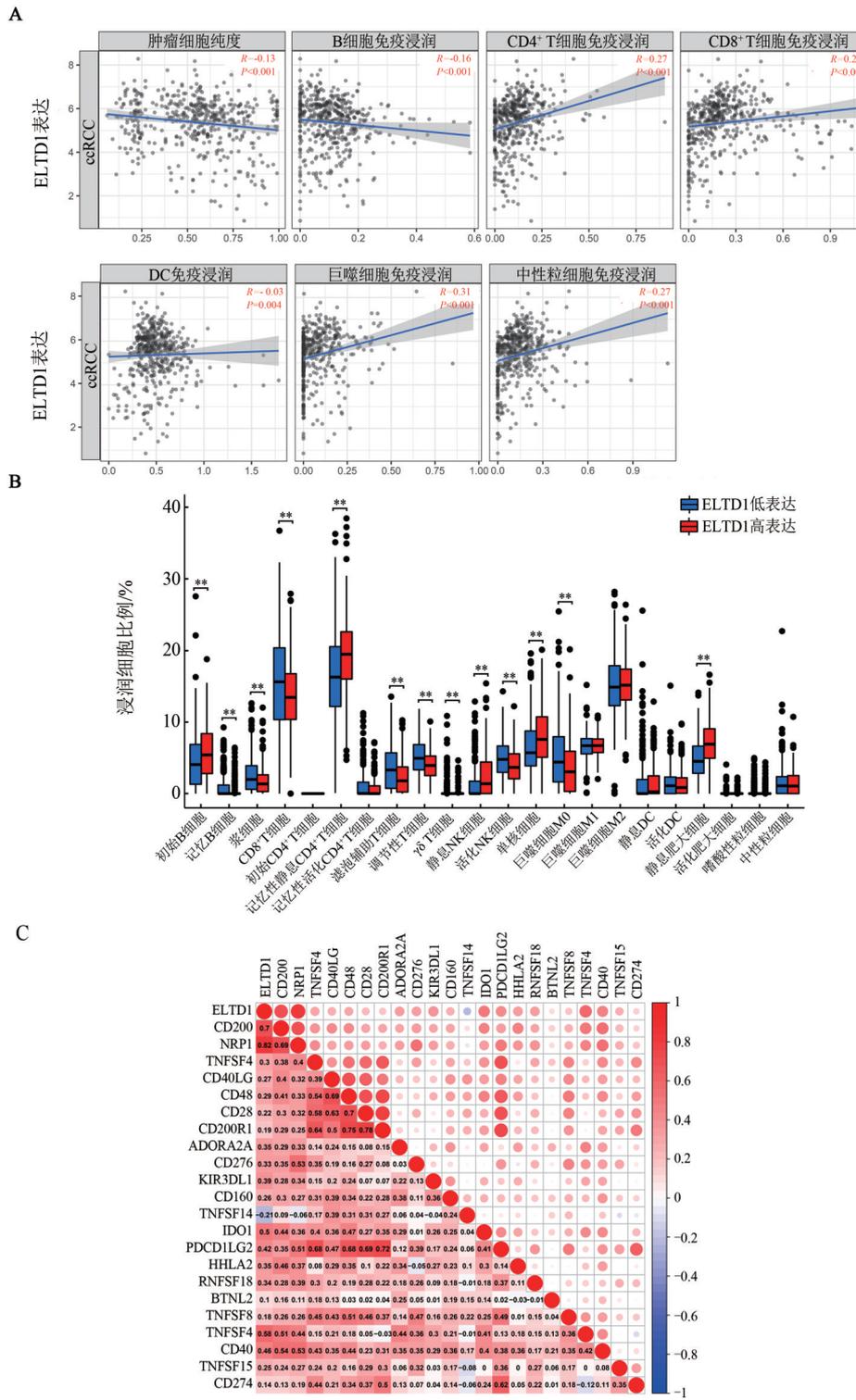


图5 ELTD1 表达与 ccRCC 中免疫细胞浸润的关系

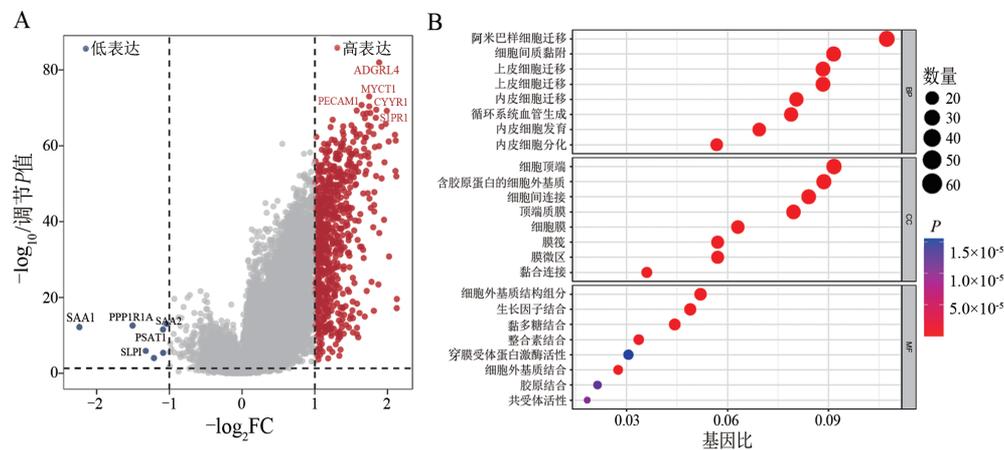


图6 DEG 筛选火山图(A)及 ELTD1 基因的 GO 功能富集分析(B)

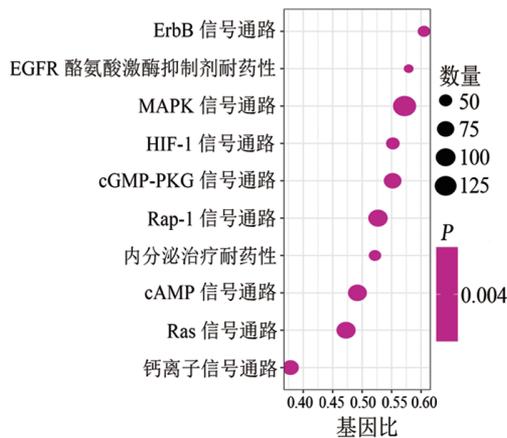
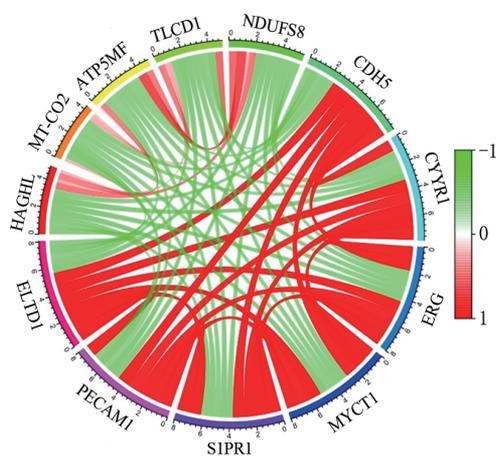


图7 ELTD1 基因的 KEGG 信号通路富集分析



红色: 正相关基因; 绿色: 负相关基因

图8 ccRCC 中 ELTD1 基因正相关的前 6 个基因和负相关的前 5 个基因的相关性圈图

3 讨论

ccRCC 是最常见的肾恶性肿瘤之一, 是泌尿系统主要癌症相关死亡的主要因素。约 1/3 的 ccRCC

患者在初诊时即发生转移, 这使得 ccRCC 的治疗充满挑战。根治性手术是 ccRCC 最重要的治疗手段, 然而约 1/4 的原位癌在手术后仍旧出现复发转移, 严重影响患者预后。因此, 寻找癌组织中异常表达基因并阐明其作用机制, 将为 ccRCC 提供新的治疗方式选择和预后标志物^[13]。

ELTD1 是 G 蛋白偶联受体家族中的一种孤儿受体, 位于染色体 1p31.1, 编码 3 527 核苷酸并翻译为含 690 个氨基酸的蛋白质^[14-15]。近年来, ELTD1 在生理和病理过程中血管生成相关作用引起了广泛关注。当前 ELTD1 在 ccRCC 中的研究报道仍较少, 因此, 本研究通过全面的生物信息学分析来评估 ELTD1 在 ccRCC 中的预后价值。

本研究在 ccRCC 相关文献中发现 ELTD1 表达水平及 DNA 甲基化水平升高, 且 ELTD1 的表达及甲基化水平均与患者的多种临床病理特征相关, 这表明 ELTD1 与 ccRCC 的发生发展进程密切相关。现有的研究结果^[9]提示, ELTD1 可通过调控内皮尖端细胞的数量及活性影响血管生成参与肿瘤的发生发展。ccRCC、乳腺癌、HNSCC 等组织中 ELTD1 的表达与微血管密度呈正相关, 这也证实了 ELTD1 在肿瘤中的促血管生成作用^[15-18]。作为血管生成相关的标志物, ELTD1 在 ccRCC、胃癌、胶质瘤等多种人类肿瘤中均高表达, 促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 导致预后变差^[19-21]。然而, 临床研究^[22]却提示, ELTD1 表达上调与 ccRCC 患者更好的临床预后和较低的复发转移率相关。SHELDON 等^[23]在小鼠乳腺癌模型中也观察到 ELTD1⁺肿瘤接受化疗的治疗效果更佳。基于上述临床研究及基础实验推测, 高表达的 ELTD1 可能通过调控肿瘤血管生成参与其成熟和分化, 血管在肿瘤组织的增生有利于降低组织中缺氧和改善灌注, 同时抗肿瘤药物也能更好地转运至肿瘤部位, 通过免疫浸润减少肿瘤侵袭及缺氧诱导的肿瘤转移^[24]。

本研究也证实了 ELTD1 高表达对 ccRCC 患者的保护作用,但具体的作用机制仍需进一步研究。

ELTD1 的表达受多种信号因子影响,其中 VEGF/bFGF 促进其表达,Delta 样配体 4(DLL4)则起抑制作用^[8-9]。ELTD1 还可通过 JAK/STAT3/HIF-1 α 、MAPK/ERK、PI3K/AKT、JNK 等信号通路参与肿瘤发生与进展^[17,19,21]。本研究结果揭示了 ELTD1 参与 ccRCC 发病的潜在通路,包括 ErbB、cGMP-PKG、Rap1、cAMP、Ras 和钙信号通路等。ELTD1 在不同肿瘤中的抗肿瘤或促肿瘤作用也可能与其下游信号通路在不同的组织细胞类型中的表达及作用差异有关。

本研究通过生物信息学方法研究 ELTD1 表达及甲基化水平与 ccRCC 患者临床病理特征及预后的关系,结果提示,ccRCC 组织中 ELTD1 高甲基化抑制其转录表达。值得注意的是,多个 CpG 位点的高甲基化与 ccRCC 的不良预后显著相关。因此,ELTD1 的甲基化水平可能也是 ccRCC 患者重要的预后标志物之一。ccRCC 中存在高度的免疫浸润,免疫浸润细胞在肿瘤发生发展中发挥重要作用^[25]。本研究分析结果显示,ELTD1 高表达与 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞的免疫浸润相关。进一步的免疫细胞亚群分析提示,Tfh、Treg 细胞等重要的肿瘤免疫调节细胞均在高表达组浸润程度较低,这可能也是 ELTD1 表达上调可改善免疫治疗作用,使患者预后更好的原因。

另外,本研究还观察到多个免疫检查点基因与 ELTD1 密切相关,如阻断在 ccRCC 中与 ELTD1 高度共表达的 NRF1,可促进肿瘤特异性记忆 T 细胞的发育,维持长期抗肿瘤免疫作用^[26]。同样,CD200 通过在肿瘤微环境中调节髓样细胞间接影响 T 细胞的激活和效应功能^[27],抑制 TNFRSF4 可促进 T 细胞活化和抗肿瘤免疫作用^[28]。这些免疫检查点相关基因均为 ELTD1 高表达的 ccRCC 患者提供了潜在的免疫治疗策略。

综上所述,本研究发现 ELTD1 的表达及甲基化水平是 ccRCC 患者的独立预后指标,ELTD1 高表达或低甲基化水平提示患者预后良好;ELTD1 与 ccRCC 的免疫浸润密切相关,因此也可指导患者的抗肿瘤免疫治疗策略。不足的是,本研究尚未进行体内外实验验证,但以上生物信息学分析结果均可为进一步探讨 ELTD1 在 ccRCC 中的生物学功能提供参考依据。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] D'AVELLA C, ABBOSH P, PAL S K, *et al.* Mutations in renal cell carcinoma[J]. *Urol Oncol*, 2020, 38(10): 763-773. DOI:10.1016/j.urolonc.2018.10.027.
- [3] HSIEH J J, PURDUE M P, SIGNORETTI S, *et al.* Renal cell carcinoma[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17009[2022-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28276433/>. DOI: 10.1038/nrdp.2017.9.
- [4] MOCH H, CUBILLA A L, HUMPHREY P A, *et al.* The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part A: renal, penile, and testicular tumours[J]. *Eur Urol*, 2016, 70(1): 93-105. DOI:10.1016/j.eururo.2016.02.029.
- [5] LALANI A A, MCGREGOR B A, ALBIGES L, *et al.* Systemic treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma in 2018: current paradigms, use of immunotherapy, and future directions[J]. *Eur Urol*, 2019, 75(1): 100-110. DOI:10.1016/j.eururo.2018.10.010.
- [6] JONASCH E, WALKER C L, RATHMELL W K. Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(4): 245-261. DOI:10.1038/s41581-020-00359-2.
- [7] EDELINE J, MOTTIER S, VIGNEAU C, *et al.* Description of 2 angiogenic phenotypes in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(11): 1982-1990. DOI:10.1016/j.humpath.2012.01.023.
- [8] SEVASTRE A S, BUZATU I M, BALOI C, *et al.* ELTD1-an emerging silent actor in cancer drama play[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5151[2022-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8152501/>. DOI:10.3390/ijms22105151.
- [9] MASIERO M, SIMÕES F C, HAN H D, *et al.* A core human primary tumor angiogenesis signature identifies the endothelial orphan receptor ELTD1 as a key regulator of angiogenesis[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(2): 229-241. DOI:10.1016/j.ccr.2013.06.004.
- [10] ZIEGLER J, PODY R, COUTINHO DE SOUZA P, *et al.* ELTD1, an effective anti-angiogenic target for gliomas: preclinical assessment in mouse GL261 and human G55 xenograft glioma models[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(2): 175-185. DOI: 10.1093/neuonc/now147.
- [11] COLAPRICO A, SILVA T C, OLSEN C, *et al.* TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8): e71[2022-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4856967/>. DOI:10.1093/nar/gkv1507.
- [12] UHLÉN M, FAGERBERG L, HALLSTRÖM B M, *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome[J]. *Science*, 2015, 347(6220): 1260419. DOI:10.1126/science.1260419.
- [13] 李燕妮, 齐士勇, 颜艳. 基于 Keap1 基因多态性的肾透明细胞癌分子标志物的研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(3):278-283. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.011.
- [14] HOWE K L, ACHUTHAN P, ALLEN J, *et al.* Ensembl 2021[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D884-D891. DOI: 10.1093/nar/gkaa942.
- [15] FAVARA D M, BANHAM A H, HARRIS A L. ADGRL4/ELTD1 is a highly conserved angiogenesis-associated orphan adhesion GPCR that emerged with the first vertebrates and comprises 3 evolutionary variants[J/OL]. *BMC Evol Biol*, 2019, 19(1): 143[2022-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31299890/>. DOI:10.1186/s12862-019-1445-9.
- [16] HUANG H, GEORGANAKI M, CONZE L L, *et al.* ELTD1 deletion reduces vascular abnormality and improves T-cell

- recruitment after PD-1 blockade in glioma[J]. *Neuro Oncol*, 2022, 24(3): 398-411. DOI:10.1093/neuonc/noab181.
- [17] FAVARA D M, LIEBSCHER I, JAZAYERI A, *et al.* Elevated expression of the adhesion GPCR ADGRL4/ELTD1 promotes endothelial sprouting angiogenesis without activating canonical GPCR signalling[J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 8870[2022-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8065136/>. DOI: 10.1038/s41598-021-85408-x.
- [18] SERBAN F, ARTENE S A, GEORGESCU A M, *et al.* Epidermal growth factor, latrophilin, and seven transmembrane domain-containing protein 1 marker, a novel angiogenesis marker[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 3767-3774[2022-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689259/>. DOI: 10.2147/OTT.S93843.
- [19] SUN B, ZHONG F J. ELTD1 promotes gastric cancer cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition through MAPK/ERK signaling by regulating CSK[J/OL]. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 4897-4911[2022-07-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34475781/>. DOI:10.2147/ijgm.s325495.
- [20] GUIHURT SANTIAGO J, BURGOS-TIRADO N, LAFONTAINE D D, *et al.* Adhesion G protein-coupled receptor, ELTD1, is a potential therapeutic target for retinoblastoma migration and invasion[J/OL]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 53[2022-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7802354/>. DOI: 10.1186/s12885-020-07768-3.
- [21] LI J J, SHEN J Y, WANG Z, *et al.* ELTD1 facilitates glioma proliferation, migration and invasion by activating JAK/STAT3/HIF-1 α signaling axis[J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13904[2022-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6761139/>. DOI:10.1038/s41598-019-50375-x.
- [22] KAN A N, LE Y, ZHANG Y F, *et al.* ELTD1 function in hepatocellular carcinoma is carcinoma-associated fibroblast-dependent[J]. *J Cancer*, 2018, 9(14): 2415-2427. DOI: 10.7150/jca.24406.
- [23] SHELDON H, BRIDGES E, SILVA I, *et al.* ADGRL4/ELTD1 expression in breast cancer cells induces vascular normalization and immune suppression[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(11): 1957-1969. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-21-0171.
- [24] FAVARA D M, BANHAM A H, HARRIS A L. A review of ELTD1, a pro-angiogenic adhesion GPCR[J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(6): 1658-1664. DOI:10.1042/bst20140216.
- [25] KRISHNA C, DINATALE R G, KUO F S, *et al.* Single-cell sequencing links multiregional immune landscapes and tissue-resident T cells in ccRCC to tumor topology and therapy efficacy[J/OL]. *Cancer Cell*, 2021, 39(5): 662-677.e6[2022-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8268947/>. DOI:10.1016/j.ccell.2021.03.007.
- [26] LIU C, SOMASUNDARAM A, MANNE S, *et al.* Neuropilin-1 is a T cell memory checkpoint limiting long-term antitumor immunity [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(9): 1010-1021. DOI: 10.1038/s41590-020-0733-2.
- [27] LIU J Q, HU A Y, ZHU J M, *et al.* CD200-CD200R pathway in the regulation of tumor immune microenvironment and immunotherapy [J/OL]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1223: 155-165[2022-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7339106/>. DOI: 10.1007/978-3-030-35582-1_8.
- [28] BUCHAN S L, ROGEL A, AL-SHAMKHANI A. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy[J]. *Blood*, 2018, 131(1): 39-48. DOI:10.1182/blood-2017-07-741025.

[收稿日期] 2022-07-30

[修回日期] 2022-11-06

[本文编辑] 党瑞山