

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.010

· 基础研究 ·

## 谷胱甘肽过氧化物酶家族的功能及其成员作为胶质瘤免疫治疗标志物的可能性

李光明<sup>1,2</sup>, 张园园<sup>1</sup>, 乔晓龙<sup>1</sup>, 宋大勇<sup>2</sup> (1. 安徽理工大学 医学院, 安徽 淮南 232000; 2. 上海市奉贤区中心医院 神经外科, 上海 201499)

**[摘要]** **目的:** 探讨谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)家族在胶质瘤发生发展中的生物学功能和预后价值。**方法:** 利用TCGA、GTEx和CGGA等多个数据库数据分析胶质瘤中GPX各亚型基因的表达及其相关性、蛋白之间的相互作用、基因突变、GPX表达与胶质瘤患者预后的关系以及GPX7、8的基因集富集分析; GPX8与胶质瘤中免疫细胞浸润以及免疫检查点分子表达的相关性分析, 胶质瘤中GPX8表达与化疗药物IC<sub>50</sub>的相关性分析。采用qPCR法、WB法和免疫荧光技术检测国人胶质瘤组织和对照组织(标本收集自2022年10月20日至12月20日间在上海奉贤区中心医院神经外科手术切除的5例胶质瘤和3例严重脑外伤的病灶组织)中GPX mRNA、蛋白以及相关免疫检查点分子的表达进行验证。**结果:** 数据库分析显示胶质瘤中GPX各亚型蛋白之间存在相互作用、基因表达水平存在相关性( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 胶质瘤组织中多个GPX亚型存在单核苷酸变异和拷贝数变异; 不同类型胶质瘤组织的免疫细胞和肿瘤细胞中主要表达的GPX亚型有明显不同, 在胶质瘤组织中GPX1、4、7、8均呈高表达(均 $P<0.05$ )且与胶质瘤患者预后不良相关( $P<0.01$ )。qPCR法、WB法检测中国人胶质瘤组织中GPX7、8均呈高表达验证了数据库信息的正确性。在胶质瘤中GPX7、8表达具有独立预后预测价值; 富集分析显示GPX7、8与胶质瘤细胞周期和免疫途径有关, 在GBM和LGG中GPX8表达与免疫评分呈明显相关( $P<0.01$ )、GPX8可能在胶质瘤中诱导抑制性免疫细胞浸润导致免疫抑制、GPX8表达与胶质瘤中多个免疫检查点分子表达正相关(均 $P<0.01$ )、GPX8表达与化疗药物IC<sub>50</sub>呈明显正相关(均 $P<0.01$ )且其高表达可导致胶质瘤对化疗药物的耐药。**结论:** GPX8在胶质瘤中呈显著高表达, GPX8高表达能诱导胶质瘤中抑制性免疫细胞的浸润其与多个免疫抑制点、与多个化疗药物IC<sub>50</sub>和患者预后密切相关, 可作为胶质瘤免疫治疗的潜在靶点。

**[关键词]** 胶质瘤; 谷胱甘肽过氧化物酶; 免疫浸润; 谷胱甘肽过氧化物酶8; 免疫检查点; 耐药

**[中图分类号]** R739.41; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)11-0997-12

## The function of the glutathione peroxidase family and the possibility of its members as immunotherapeutic markers for glioma

LI Guangming<sup>1,2</sup>, ZHANG Yuanyuan<sup>1</sup>, QIAO Xiaolong<sup>1</sup>, SONG Dayong<sup>2</sup> (1. Medical College, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232000, Anhui, China; 2. Department of Neurosurgery, Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201499, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the biological function and prognostic value of the glutathione peroxidase (GPX) family in gliomas. **Methods:** The correlation of gene expression of GPX isoforms in gliomas, protein interactions, gene mutations, the relationship between GPX expression and the prognosis of glioma patients, and the gene set enrichment analysis of GPX7 and 8 were analyzed using various databases such as TCGA, GTEx, and CGGA; the correlation analysis of the expression of GPX8 with the immune cell infiltration and the expression of immune checkpoint molecules in glioma; and the correlation analysis of GPX8 expression with IC<sub>50</sub> of chemotherapeutic agents in glioma. The correlation between GPX8 expression and IC<sub>50</sub> of chemotherapeutic drugs was analyzed; the expression of GPX mRNA, protein and related immune checkpoint molecules in glioma tissues and control tissues of Chinese people (Specimens were collected from five cases of glioma and three cases of severe traumatic brain injury surgically removed by neurosurgery at Fengxian District Central Hospital, Shanghai, China, between October 20, 2022 and December 20, 2022.) were detected by qPCR, WB and immunofluorescence techniques for validation. **Results:** Database analysis showed that there were interactions and correlation of gene expression levels among GPX isoforms in gliomas ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and there were single-nucleotide and copy-number variations of several GPX isoforms in glioma tissues; there were significant differences of GPX isoforms in different types of immune cells and tumor cells of glioma tissues; and high expression levels of GPX1, 4, 7, and 8 (all  $P<0.05$ ) were correlated with poor prognosis of glioma patients ( $P<0.01$ ). 7 and 8 were highly expressed in glioma tissues (all  $P<0.05$ ), and correlated

**[基金项目]** 上海市科委科研基金(No.19411968200)

**[作者简介]** 李光明(1993—),男,硕士生,主要从事胶质瘤的基础与临床研究。E-mail: gml\_93@163.com

**[通信作者]** 宋大勇, E-mail: dayong\_song1974@sina.com

with poor prognosis of glioma patients ( $P < 0.01$ ); qPCR and WB assays for GPX7 and 8 expression in human glioma tissues verified the correctness of the database information; the expression of GPX7 and 8 in gliomas has an independent prognostic value; GSEA analysis showed that GPX7 and 8 are associated with the glioma cell cycle and the immune pathway; GBM and LGG are associated with GBM and LGG; and GPX7 and 8 are associated with GBM and LGG are associated with GBM and LGG. related; GPX8 expression was significantly correlated with immune scores in GBM and LGG ( $P < 0.01$ ); GPX8 may induce infiltration of suppressive immune cells in gliomas leading to immunosuppression; there was a positive correlation between GPX8 expression and the expression of several immune checkpoint molecules in gliomas ( $P < 0.01$ ); there was a significant positive correlation between GPX8 expression and the  $IC_{50}$  of the chemotherapeutic agents ( $P < 0.01$ ), and its high expression could lead to the resistance of glioma to chemotherapeutic drugs. **Conclusion:** GPX8 expression is significantly high in gliomas, and GPX8 expression may induce infiltration of suppressor immune cells in gliomas, which is strongly associated with multiple immunosuppression points, with the  $IC_{50}$  of multiple chemotherapeutic agents, and with patient prognosis, which may serve as a potential target for immunotherapy of gliomas.

**[Key words]** glioma; glutathione peroxidase (GPX); immune infiltration; GPX8; immune checkpoint; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(11): 997-1008. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.010]

胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤, 占所有恶性脑肿瘤的81%。胶质母细胞瘤约占所有胶质瘤的45%, 5年相对生存率仅为5%<sup>[1]</sup>。经过先进的多模式治疗(包括手术、化疗和放疗)后, 胶质瘤的总体预后仍然较差。尽管已经开发出包括异柠檬酸脱氢酶1(isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)和O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)在内的预后监测生物标志物, 但IDH1突变的低级别胶质瘤(low-grade glioblastoma, LGG)通常在后期转变为高级别胶质瘤(glioblastoma multiforme, GBM)<sup>[2-3]</sup>。因此, 迫切需要可靠的预后生物标志物。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)家族是一个与系统发育有关的酶家族, 有八个成员(GPX 1~8), 它们主要的生物学作用是保护生物体免受氧化损伤<sup>[4-5]</sup>。研究<sup>[6-7]</sup>表明, GPX在多种肿瘤中异常表达。此外, 研究<sup>[8]</sup>发现, 多个GPX成员在肿瘤中起协同作用。通过氧化应激、免疫反应调节、炎症死亡和铁死亡等途径共同调节急性髓系白血病的发生发展; GPX作为差异表达的独立预测标志物, 通过杂合缺失、等位基因差异和调节药物敏感性参与乳腺癌的发病机制, 可作为乳腺癌的潜在治疗靶点<sup>[9]</sup>。鉴于以往研究, 如果可以探索GPX在胶质瘤中的表达特征, 它将有希望为胶质瘤治疗提供新的见解。因此, 本研究旨在确定胶质瘤中GPX的表达谱及其生物学功能, 以便寻找新的生物标志物和潜在的治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据库分析胶质瘤中GPX各亚型基因表达的相关性、蛋白之间的相互作用以及基因突变

从UCSC XENA (<https://xenabrowser.net/datapages/>)<sup>[10]</sup>上的癌症基因组图谱(TCGA)收集胶质瘤的基因表达谱和临床资料并进行计算分析, CGGA (<http://www.cgga.org.cn/>)<sup>[11]</sup>上的中国胶质瘤基因组图谱数据(CGGA)(mRNAseq\_693)用于验证分析。基于

GeneMARIA (<http://genemania.org/>)<sup>[12]</sup>和STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)<sup>[13]</sup>分析GPX各亚型蛋白之间的关系。R语言R包“Circlize”用于分析TCGA数据库中GPX基因之间的相关性, CGGA数据库验证GPX基因相关性(此数据库无GPX 5和6)。GSCA数据库(<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/GSCA/#/>)<sup>[14]</sup>用于分析GPX的单核苷酸、DNA拷贝数变化和基因甲基化修饰。TISCH数据库([http://TISCH\(comp-genomics.org\)](http://TISCH(comp-genomics.org)))用于分析胶质瘤单细胞数据集中的基因表达。

### 1.2 数据库分析GPX表达与胶质瘤患者预后的关系

由于TCGA数据库缺乏足够的癌旁或对照组织, 因此使用GEPIA2<sup>[15]</sup>数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)分析TCGA和GTEx数据中GPX在胶质瘤中的表达并进行差异基因筛选。在TCGA数据库中使用R包“Survival”对差异基因进行生存分析, CGGA数据库验证差异基因在胶质瘤中的预后价值。最后, 在TCGA和CGGA数据中分别对GPX 7和GPX8进行单变量和多变量回归分析。

### 1.3 GPX7、8的基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)

在TCGA中, 对GPX 7、GPX 8分别与所有基因进行相关性分析, 基于相关性分析结果使用R包“ClusterProfiler”进行GSEA富集分析, 包括GO, Reactome数据库, 并展示前20个结果。

### 1.4 GPX8与胶质瘤中免疫细胞浸润以及免疫检查点分子表达的相关性分析

使用R包“Estimate”计算泛癌组织的基质评分、免疫评分、估计评分和肿瘤纯度, 使用ImmuCellAI (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/ImmuCellAI#!/>)数据集分析GPX8与免疫浸润细胞(肿瘤相关巨噬细胞、自然调节性T细胞(natural regulatory T cell, nTreg细胞)和诱导性调节T细胞(induced regulatory T cell, iTreg细胞)之间的相关性。进一步分析GPX8与免疫检查点分子表达的相关性。

### 1.5 胶质瘤中GPX8表达与化疗药物IC<sub>50</sub>的相关性分析

使用GDSC2数据库(<https://www.cancerrxgene.org/>)<sup>[16]</sup>分析基因和药物的IC<sub>50</sub>之间的关系,并选择了相关性最高的前9个结果进行展示并单独展示胶质瘤主流化疗药物的IC<sub>50</sub>。

### 1.6 qPCR检测国人胶质瘤组织中GPX mRNA表达

本研究纳入2022年10月20日至2022年12月20日期间在上海市奉贤区中心医院神经外科就诊的胶质瘤患者,选取5对GBM和5对LGG组织标本,病理确认后液氮保存。此外,收集3例严重创伤性脑损伤患者的受损脑组织作为对照。本研究计划经上海市奉贤区中心医院伦理委员会批准(批准文号:SL-2022-KY-09-02),并征得每位受试者充分知情并签署了书面知情同意书。用TRIzol试剂提取胶质瘤和对照组织中的总RNA,用Evo M-MLV RT混合试剂盒(AG11728,艾科瑞生物技术有限公司)将总RNA反转录为cDNA,采用SYBR GREEN 预混液 Pro Taq HS qPCR 试剂盒(AG11718,艾科瑞生物技术有限公司)进行qPCR,检测胶质瘤组织和对照组织中GPX各亚型mRNA的表达。以GAPDH作为内参基因,用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法分析GPX各亚型的相对表达量,GraphPad Prism8软件作图。引物序列列于补充材料表S1中。

### 1.7 WB法检测国人胶质瘤组织中GPX8蛋白的表达

收集组织样本进行蛋白质提取,BCA蛋白质检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司)用于定量蛋白质浓度,并使用SDS-PAGE(新赛美生物技术有限公司)分离蛋白质,5%脱脂牛奶封闭。一抗在4℃下处理过夜(GPX8,稀释比例1:1 500,Abcam公司;GAPDH,稀释比例1:10 000,Proteintech公司),辣根过氧化物酶标记二抗室温下处理1 h后,使用ECL试剂盒(碧云天生物技术有限公司)进行显影。以GAPDH为内参基因,使用ImageJ 8.0软件评估蛋白质表达。

### 1.8 免疫荧光技术法检测胶质瘤组织中GPX8、CD274、LAG3、CTLA4、TIGIT蛋白的表达

将石蜡包埋的组织切片脱蜡水化,并用柠檬酸钠缓冲液95℃~100℃煮15~20 min进行抗原修复。一抗GPX8(稀释比例1:200)、CD274(稀释成2 μg/mL)、LAG3(稀释比例1:100)、CTLA4(稀释比例1:500)和TIGIT(稀释比例1:300)在4℃下处理过夜,荧光标记二抗室温下处理1 h后,显微镜下拍照。ImageJ8.0软件用于分析GPX8和免疫检查点之间的关联。

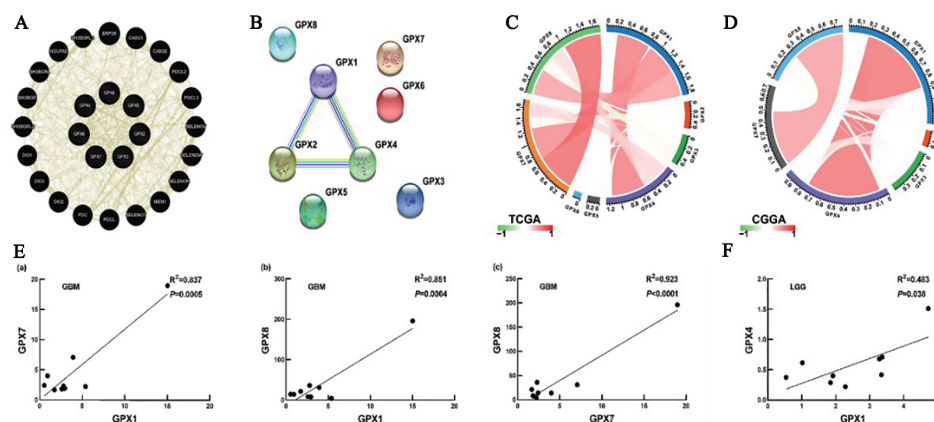
### 1.9 统计学处理

使用GraphPad Prism 8、ImageJ8.0软件对所有数据进行统计分析和图像处理。每组实验均独立重复3次。计数资料以百分率表示;两组间均数比较采用双侧t检验,多组间比较采用单因素方差检验。以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 数据库分析显示胶质瘤中GPX各亚型蛋白之间存在相互作用、各亚型基因表达水平存在相关性

采用GeneMANIA数据库数据分析GPX蛋白与其他蛋白(包括GPX)相互作用,结果显示,GPX与其他蛋白质之间形成一个广泛的相互作用网络(图1A);采用STRING数据库分析GPX间的相互作用,发现GPX 1、2和4之间存在紧密蛋白质相互作用(图1B)。采用TCGA和CGGA(CGGA中没有GPX 5和6)数据库分析GPX基因之间的关系,发现GPX 1、4、7和8基因之间显著相关(图1C,D)。qPCR检测国人胶质瘤组织和对照组织结果(图1E~F)显示,在GBM中GPX 1和7、1和8以及7和8的表达均密切相关(均P<0.01),在LGG中GPX 1和4的表达也存在显著相关性(图1F,P<0.05)。数据库和qPCR实验检测结果说明,GPX多个成员在胶质瘤的发生发展中可能存在密切关联。



A、B:分析GeneMANIA和STRING数据库中GPX家族中多个成员之间蛋白质的相互作用;C:在TCGA数据中分析的多种GPX基因表达的相关性;D:CGGA数据库验证多种GPX基因表达的相关性(红线和绿线分别表示正相关性和负相关性,深色表示相关性更强);E~F:qPCR检测国人胶质瘤组织中几种GPX mRNA表达的相关性。

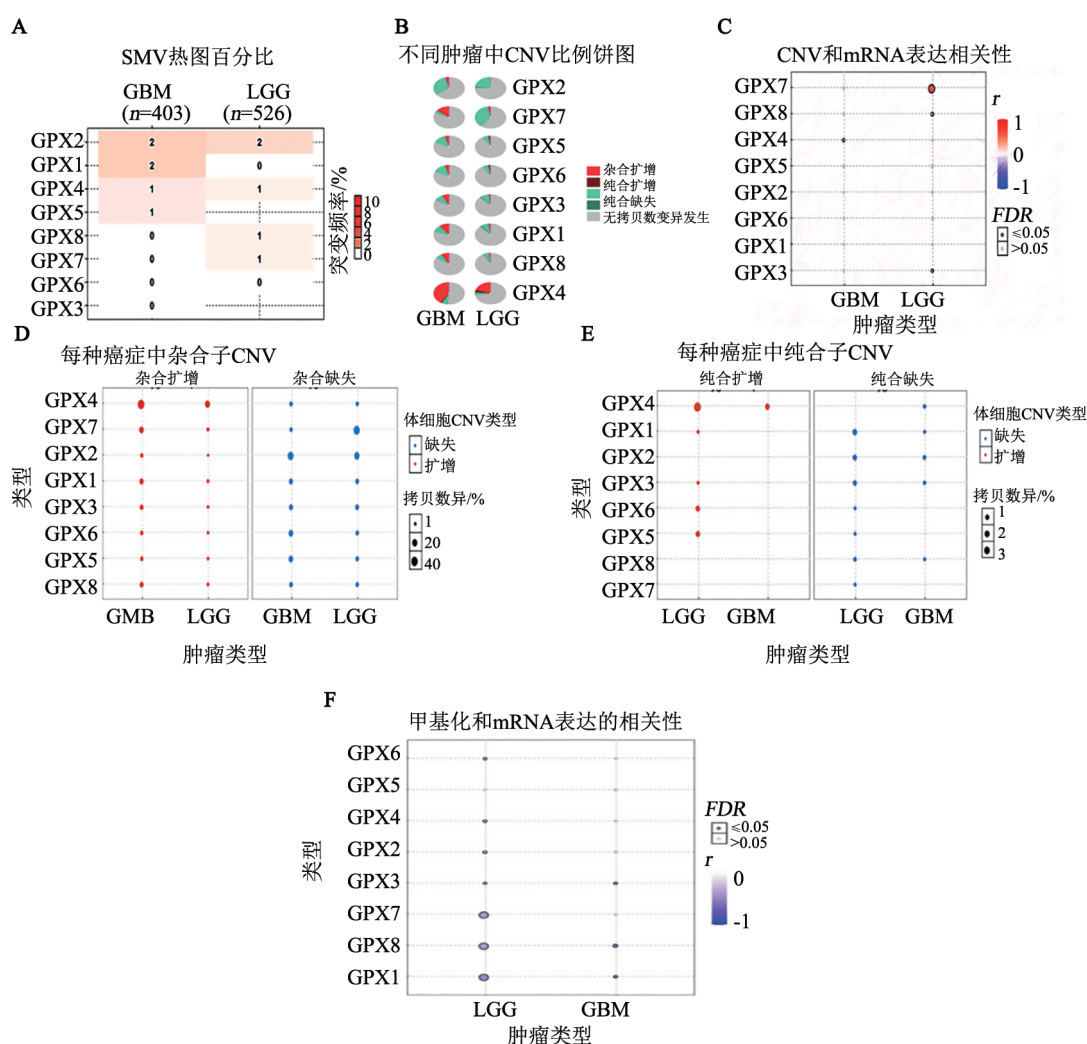
图1 胶质瘤中GPX蛋白质之间的相互作用以及其mRNA表达的相关性



## 2.2 在胶质瘤中多个GPX亚型存在变异

使用GSCA数据库分析GPX的核苷酸、拷贝数变异及甲基化修饰。GBM中的单核苷酸变异(single nucleotide variants, SNV)分析显示, GPX 1、2、4和5的突变频率相对较高, LGG中的GPX 2、4、7和8之间存在显著差异(图2A)。异常DNA拷贝数分析显示, GBM中GPX 1、4和7杂合拷贝数变异(copy number variation, CNV)的比例增加, 杂合CNV缺失主要集中在GPX 2、5和6。LGG中杂合CNV的增加

主要表现在GPX4中, 杂合CNV的缺失在GPX 2和7中更为显著(图2B)。CNV与mRNA表达相关性分析表明, GBM中的GPX4 CNV和mRNA表达更密切相关, 而GPX 7、8的CNV和mRNA相关性反映在LGG中(图2C)。之后, 进一步详细地检查了杂合子和纯合子中的表达和缺失(图2D, E)。最后, 甲基化和mRNA相关性分析发现, GPX 1、7和8与LGG呈负相关, 这些结果表明, 这些基因的异常表达可能与异常甲基化无关(图2F)。



A:总结选定癌症类型中SNV频率;B:总结了选定癌症类型中GPX的CNV比例;C:基因CNV与mRNA表达的相关性;D、E:选定癌症中GPX的杂合CNV及纯合CNV图谱;F:肿瘤和正常样本之间GPX甲基化与mRNA表达的相关性。

图2 GSCA数据库分析GBM和LGG中GPX的SNV、CNV和甲基化状况

## 2.3 胶质瘤组织不同类型的免疫细胞和肿瘤细胞中主要表达的GPX亚型不同

从TISCH数据库中获取了胶质瘤单细胞数据集中GPX的基因表达。分析结果显示, GPX1主要在单核细胞/巨噬细胞中表达(图3A); GPX2主要集中于星形胶质细胞样肿瘤细胞(图3B)。GPX3主要在单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞和星形胶质细胞样肿瘤细胞表达增高(图3C); GPX4主要表

达在单核细胞/巨噬细胞、肿瘤细胞、星形胶质细胞样肿瘤细胞、少突细胞样肿瘤细胞、少突胶质前体样肿瘤细胞和少突胶质细胞中(图3D)。GPX5主要表达于小胶质细胞(图3E); 而单核细胞/巨噬细胞主要表达GPX6(图3F)。GPX7更多表达于星形胶质细胞样肿瘤细胞、少突细胞样肿瘤细胞和少突胶质前体样肿瘤(图3G); GPX8表达则与单核细胞/巨噬细胞和星形胶质细胞样肿瘤细胞相

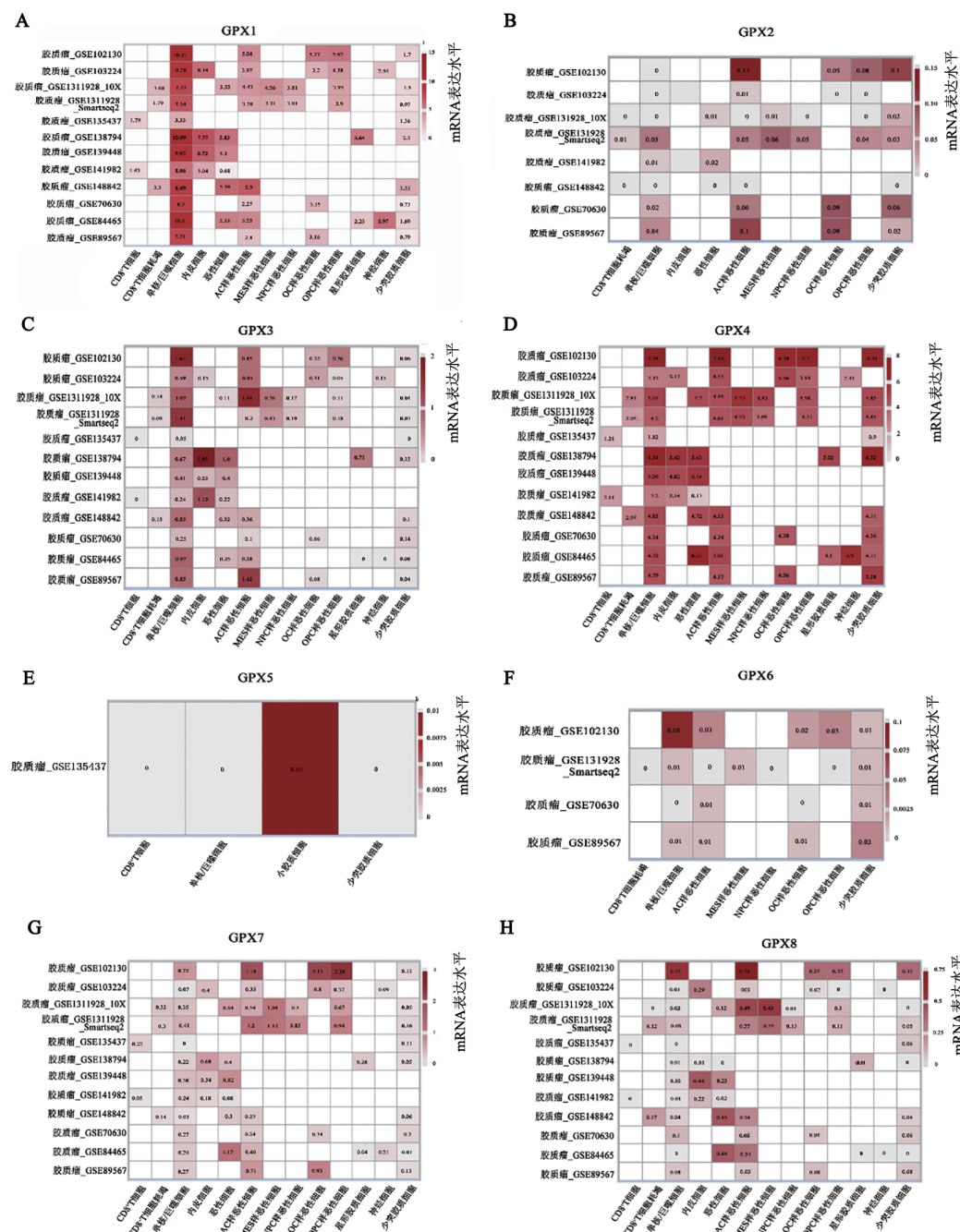


关(图3H)。数据库分析结果表明,GPX 差异表达于胶质瘤中的多种免疫细胞和肿瘤细胞中,表明GPX 可能与胶质瘤的发生发展密切相关且可能涉及肿瘤免疫微环境变化。

## 2.4 数据库分析显示在胶质瘤组织中 GPX1、4、7、8 的高表达与胶质瘤患者预后不良相关

采用 GEPIA2、TCGA 和 GTEx 数据库分析 GPX 的表达,分析结果(图4A~H)显示,与正常组织比较,

GPX 1、3、4、7 和 8 mRNA 在 GBM 和 LGG 组织中的表达均呈高表达(均  $P < 0.05$ ),而 GPX2 mRNA 均呈低表达(均  $P < 0.05$ ),GPX5 和 6 mRNA 的表达则无显著差异。采用 TCGA 数据库分析差异基因与患者生存预后的关系,分析结果(图4I~N)显示,GPX 1、4、7 和 8 的高表达与患者预后较差有关,GPX2 表达下调与患者预后无明显关联。



A~H:分析选定的多个单细胞数据集中GPX 1~8 mRNA的平均表达水平

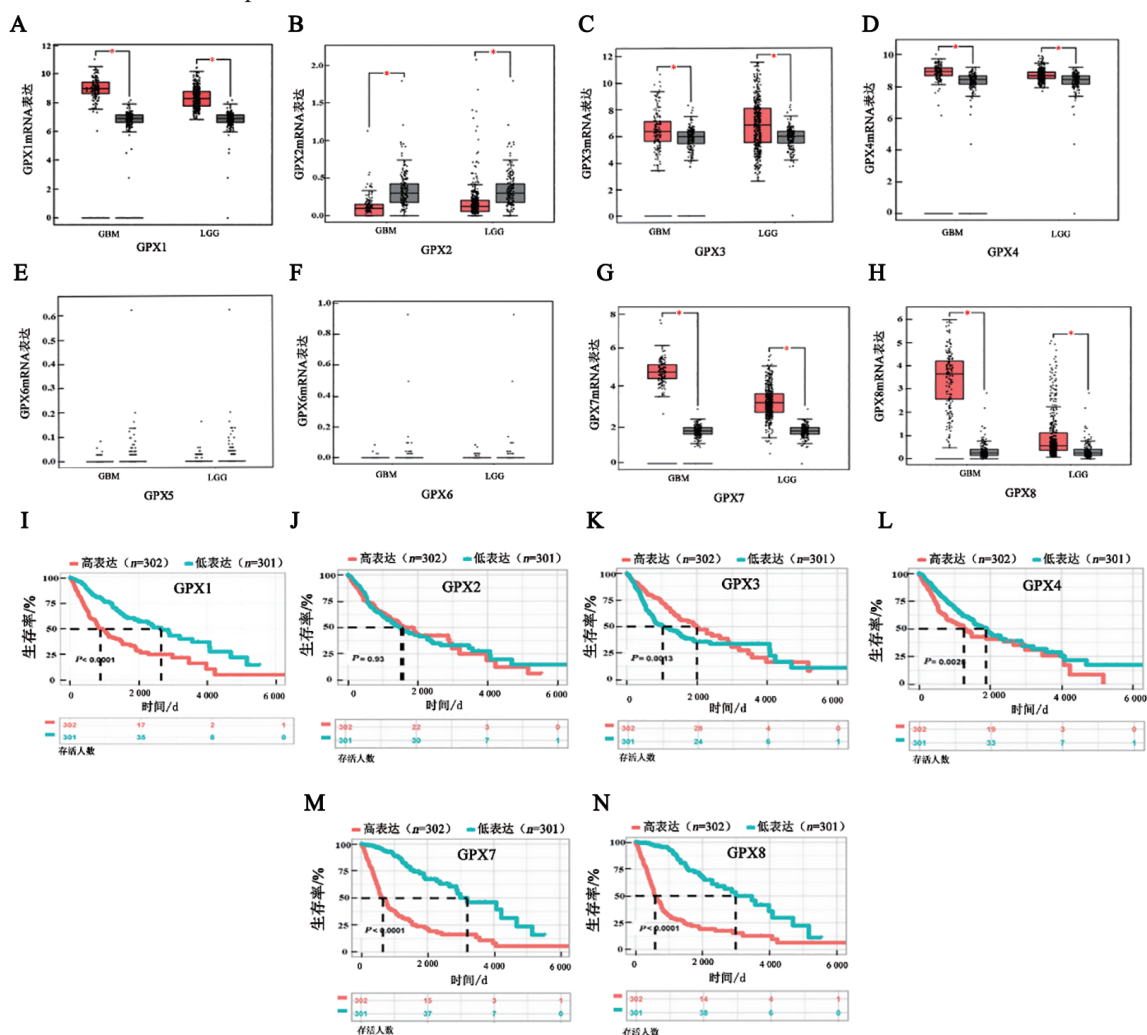
图3 用TISCH数据库分析胶质瘤组织中各种细胞中GPX各亚型的表达

## 2.5 qPCR法、WB法检测显示国人胶质瘤组织中 GPX7、8 均呈高表达

qPCR法检测结果(图5A)显示,与对照组比较,GPX7和8在GBM和LGG组织中呈均高表达( $P < 0.05$ )

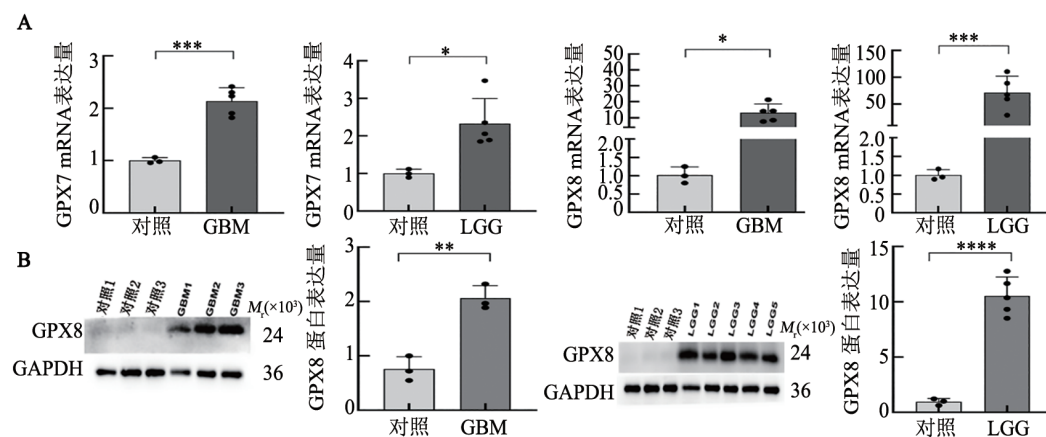
或\*\*\* $P<0.001$ )。WB法检测结果(图5B)显示,与对照组比较,GPX8在GBM和LGG组织中显著高表达(\*\* $P<0.01$ 或\*\*\* $P<0.0001$ )。qPCR、WB法实验结果以国

人标本验证了数据库中GPX7、8在GBM、LGG组织中的高表达。



A~H:用GEPIA2数据库分析GBM和LGG中GPX 1~8 mRNA的差异表达(GBM:肿瘤 $n=163$ ,对照 $n=207$ ;LGG:肿瘤 $n=518$ ,对照 $n=207$ );I~N:用TCGA数据库分析了差异表达基因与患者生存预后的关系。与对照组比较,\* $P<0.05$ 。

图4 胶质瘤组织和对照组织中GPX 1~8 mRNA差异表达及其与患者生存的关系



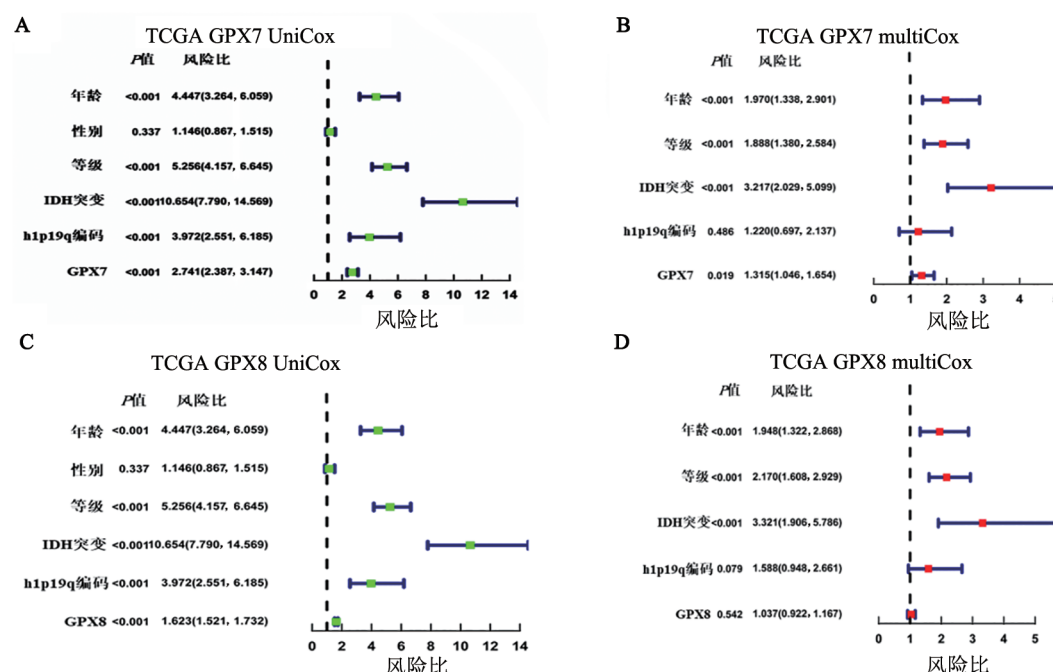
A:qPCR法检测GPX7和8 mRNA在GBM、LGG和对照组织中的表达;B:WB法检测GPX8蛋白在GBM、LGG和对照组织中的表达。与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图5 GPX7、8在国人胶质瘤组织中均呈高表达

## 2.6 在胶质瘤中 GPX 7 和 8 表达具有独立的预后价值

采用 TCGA 数据库对 GPX 7 和 8 表达进行单因素和多因素回归分析。单因素分析结果(图 6A、B)显示,GPX7 在胶质瘤中具有独立的预测价值;GPX8 单

因素回归分析在胶质瘤患者预后中具有独立预测价值(图 6C),但多因素回归分析显示 GPX7、8 不具有独立预后预测价值(图 6D)。



A、B: TCGA 数据库中的 GPX7 单因素和多因素回归分析; C、D: TCGA 数据库中的 GPX8 单因素和多因素回归分析。

图 6 数据库单因素和多因素回归分析 GPX7、8 在胶质瘤预后中的预测价值

## 2.7 GSEA 分析显示 GPX7 和 8 表达与胶质瘤细胞周期和免疫途径有关

基于 TCGA 数据库对 GPX 7 和 8 与所有基因进行了相关性分析,并根据相关性结果进行基因富集分析,探索与 GPX7、8 相关基因所涉及的生物学机制。GO 和 Reactome 数据库分析结果(图 7)显示,GPX 7、8 相关基因功能通常与胶质瘤细胞的细胞周期和免疫途径有关。

## 2.8 在胶质瘤中 GPX8 表达与免疫评分呈明显相关

使用 ESTIMATE 方法计算肿瘤基质评分、免疫评分、评估分数和肿瘤纯度,并对这些指标与 GPX7(图 8A)和 GPX8(图 8B)在泛癌中的表达进行相关性分析结果显示,GPX8 与 GBM 和 LGG 的基质、免疫评分呈正相关(均  $P=0$ );进一步分析结果(图 8C~J)显示,在 GBM 和 LGG 中 GPX8 表达与肿瘤基质评分、免疫评分、评估分数呈正相关(均  $P=0$ ),与肿瘤纯度呈负相关(均  $P=0$ )。分析结果表明,在 GBM 和 LGG 中 GPX8 表达与多种免疫评分呈相关性。

## 2.9 GPX8 可能在胶质瘤中诱导免疫抑制

采用 ImmuCellAI 数据集的免疫细胞浸润数据分析 GPX8 与免疫细胞浸润之间的相关性,结果表明,GPX8 与 GBM 发生发展与多种免疫细胞类型密切相关(图 9A);在 GBM 中,GPX8 表达与巨噬

细胞, nTreg 细胞和 iTreg 细胞浸润呈显著正相关(图 9B~D,  $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。在 LGG 中,GPX8 表达与巨噬细胞和 nTreg 细胞浸润呈显著正相关(图 9E~H,  $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。数据库分析表明,在胶质瘤组织中 GPX8 的高表达可能诱导免疫抑制。

## 2.10 GPX8 表达与胶质瘤中多个免疫检查点分子表达存在正相关

采用 TCGA 数据库分析发现 GPX8 表达与胶质瘤多个免疫检查点表达呈正相关(图 10A、B)。通过免疫荧光检测国人胶质瘤组织(3 个 GBM、3 个 LGG 和 3 个对照组织)中相关免疫检查点蛋白表达,检测结果(图 10C~F)显示,与对照组织相比,GPX8 与 GBM 和 LGG 中的 CD274、CTLA4 和 TIGIT 蛋白的表达均呈显著正相关(均  $P<0.0001$ );LGG 中 GPX8 与 LAG3 蛋白的表达呈正相关( $P<0.0001$ )。实验结果说明,GPX8 可能参与胶质瘤的免疫细胞浸润和肿瘤免疫抑制微环境的形成。

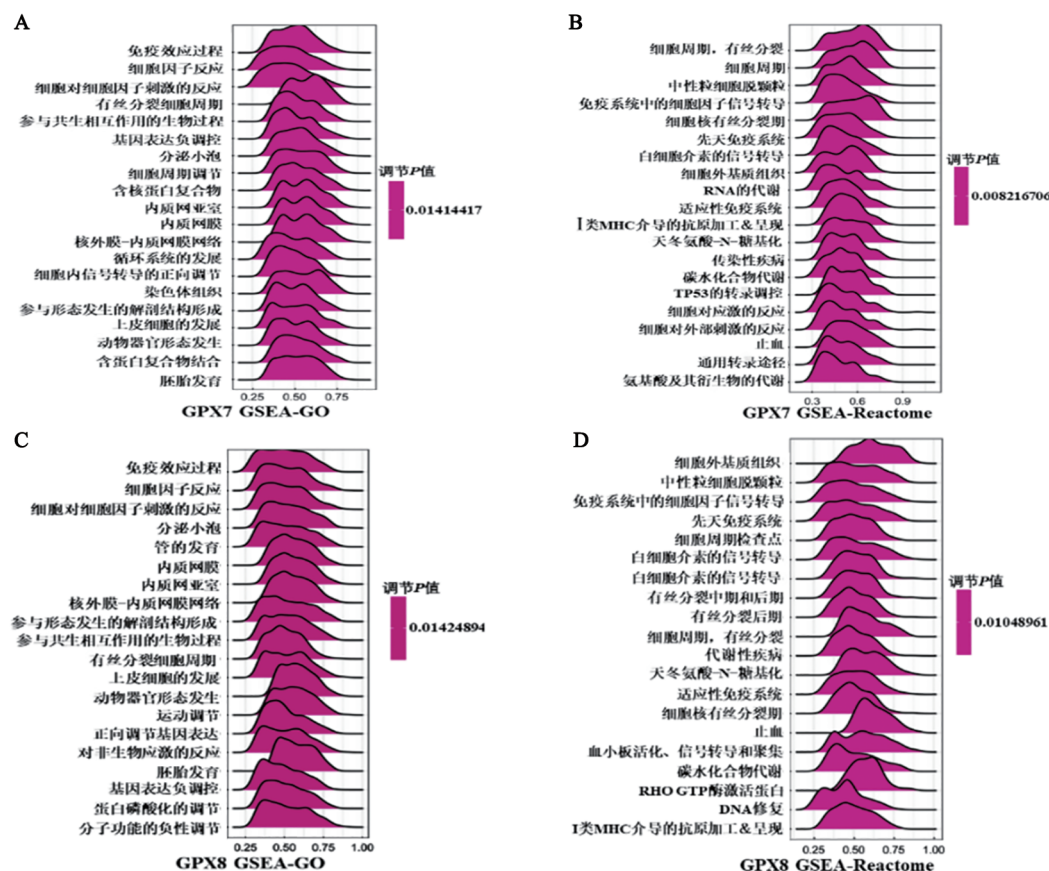
## 2.11 GPX8 与化疗药物耐药相关

采用 GDSC2 数据库分析 GPX8 表达与药物促进胶质瘤细胞凋亡的  $IC_{50}$  之间的相关性,分析结果(图 11)显示,胶质瘤中 GPX8 蛋白表达水平与伏立诺他、恩替诺特、AZD1208、LGK974、索拉菲尼、ML323、ABT373、MIRA-1 和维奈托克的  $IC_{50}$  呈显著正相关



(图 11 均  $P=0$ ), 说明胶质瘤中 GPX8 的高表达可能导致胶质瘤患者对上述药物的耐药。此外, GPX8 蛋白表达还与目前胶质瘤主流化疗药物如替莫唑胺和卡

莫司汀的  $IC_{50}$  呈显著正相关(图 11, 均  $P=0$ ), 这也说明, 胶质瘤中 GPX8 蛋白的高表达也会导致患者对这两种药物的耐药。



A、B:GO 和 Reactome 数据库用于探究 TCGA 数据库中 GPX7 基因的相关生物学途径;C、D:GO 和 Reactome 数据库用于分析 TCGA 数据库中的 GPX8 基因的相关生物学途径。

图 7 基因富集分析 GPX7、8 相关生物学途径中关系较高的前 20 个

### 3 讨论

胶质瘤乃是中枢神经系统最常见、病死率最高的恶性肿瘤<sup>[17]</sup>。对于大多数恶性胶质母细胞瘤, 目前标准的手术治疗联合放疗和化疗并不能显著提高患者总生存率<sup>[18]</sup>。由于传统疗法对胶质瘤的预后改善有限, 免疫疗法可能是胶质瘤治疗的新策略。许多研究<sup>[19]</sup>已经证明了胶质瘤的免疫抑制特性, 例如表达调节抗肿瘤免疫反应的 PD-1 肿瘤细胞。因此, 对于临床治疗, 研究肿瘤相关的免疫抑制分子和基因、探索新的机制, 并利用这些机制研发新的治疗方法非常重要。

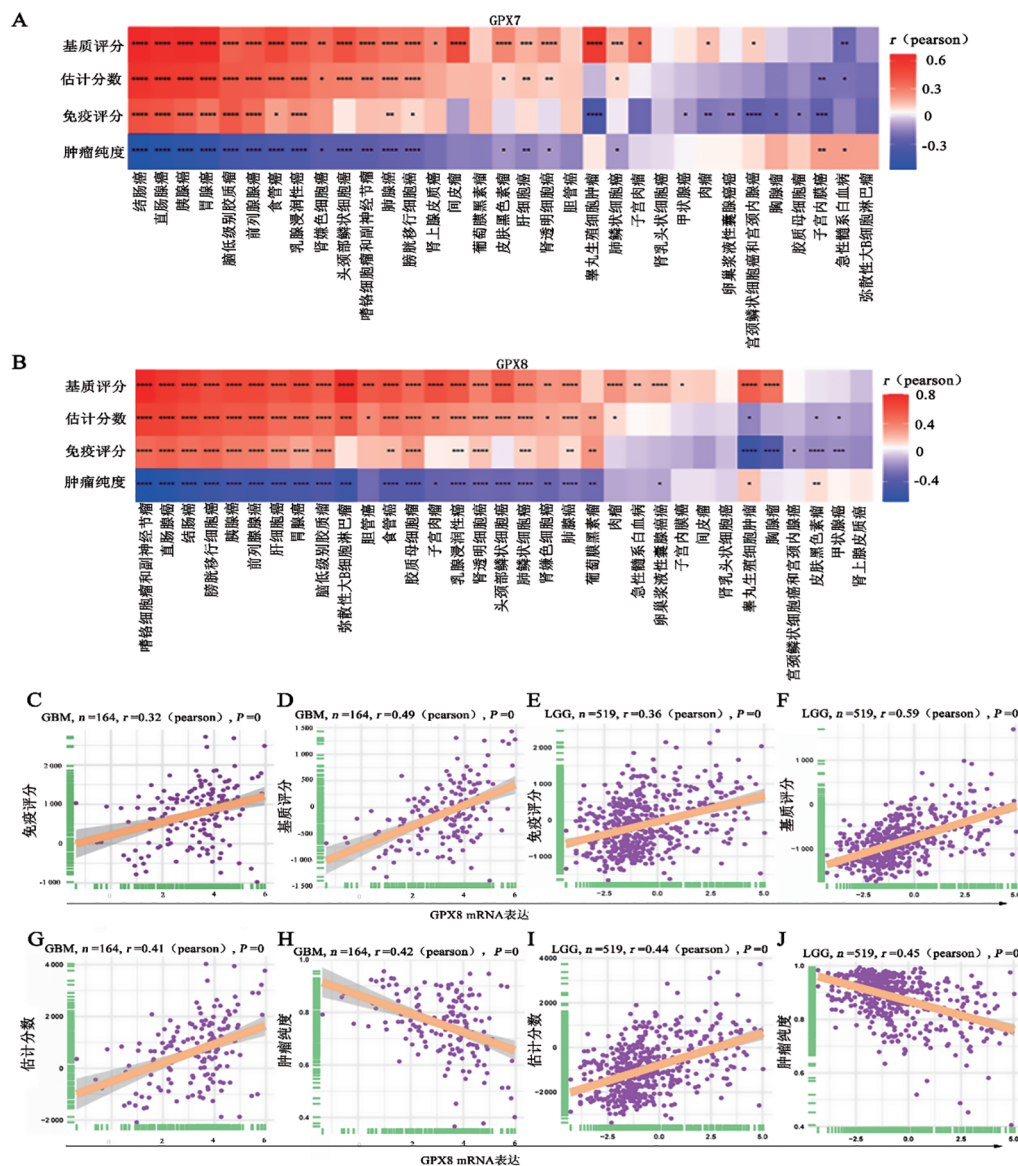
在体内, GPX 被确定为系统发育相关的过氧化物酶, 其在维持氧化应激中起重要作用, 氧化应激反过来又影响多种非肿瘤和肿瘤疾病<sup>[20]</sup>。因此, GPX 的抗氧化活性与多种肿瘤的发生发展有关<sup>[21]</sup>。本研究旨在阐明尚未明晰的 GPX 在胶质瘤中的表达模式。有研究<sup>[22]</sup>发现, 胶质瘤干细胞表现出高放射耐受性, 而 GPX1 的转

录激活可以增强这种耐受性。在一项关于肿瘤抑制因子 ARID1B 的研究中, 敲减 ARID1B 表达抑制 GPX3 表达并促进胶质瘤母细胞瘤细胞的增殖<sup>[23]</sup>。GPX4 是铁死亡过程中的关键分子, 受胶质瘤组织中多种因素调节。例如, RSL3 (GPX4 的抑制剂) 使 GPX4 失活, 导致胶质瘤细胞中的糖酵解功能障碍<sup>[24]</sup>。有研究<sup>[25]</sup>还表明, 肿瘤细胞在体外可以有效地被巨噬细胞吞噬, 并且 GPX4 活性和胶质瘤的进展与慢性炎症有关, 这表明 GPX4 有望成为胶质瘤增殖、炎症和免疫的枢纽。GPX7 是 GPX 家族的另一个成员, 参与氧化应激和肿瘤发生。GPX7 的高表达与胶质瘤预后不良有关, 敲减 GPX7 可显著增加胶质瘤铁死亡敏感性<sup>[26]</sup>。GPX8 是 GPX 家族中唯一直接促进胶质瘤细胞增殖和迁移并抑制胶质瘤细胞凋亡的成员。敲减 GPX8 在体外实验中产生了欣喜的结果, 但 GPX8 所涉及的生物学途径尚不清楚<sup>[27]</sup>。

在本研究中通过使用 GEPIA2 数据库分析 TCGA 和 GTEx 数据库的胶质瘤数据, 确定五个高差异表达基

因(GPX 1、3、4、7和8)。结合TCGA和CGGA数据库预后分析,初步确定GPX 7和8的高表达患者其预后较差,并确认了GPX8在LGG和GBM中的高表达。通过单因素和多因素回归分析确认两个预后相关基因为GPX 7和8,表明它们是独立的预后因素,在胶质瘤中起重要作用。接下来,分别对GPX 7和8进行了富集分析和ESTIMATE分析,发现这两个基因通常与细胞周期和免疫途径有关。此外,GPX8在GBM和LGG中与免疫评分和基质评分呈正相关,从而选择GPX8进行深入的免疫相关分析。先前的研究发现,GPX8可能通过激活Wnt信号通路<sup>[28]</sup>,促进非小细胞癌细胞的迁移和增殖;GPX8高表达<sup>[29]</sup>也可促进胃癌细胞的增殖;在乳腺癌中,GPX8由上皮间充质转化诱导,从而促进肿瘤侵袭性<sup>[30]</sup>。本研

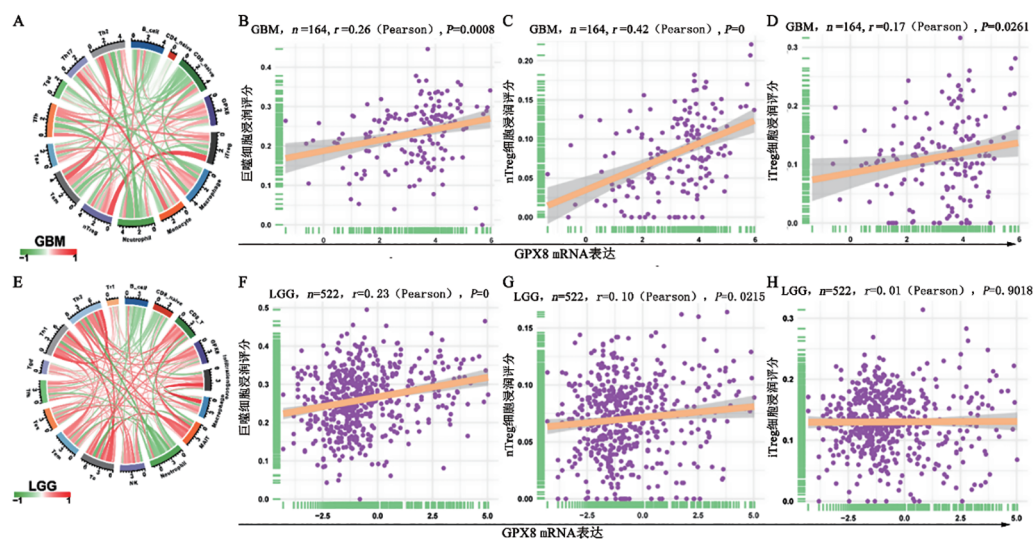
究分析了GPX8在GBM和LGG中的免疫功能。免疫浸润分析显示,GPX8表达与胶质瘤微环境主要细胞成分如肿瘤相关巨噬细胞、nTreg、iTreg和肿瘤相关成纤维细胞呈显著正相关。肿瘤相关巨噬细胞主要为肿瘤提供营养以拮抗治疗<sup>[31]</sup>;而Treg细胞则由肿瘤特异性塑造以拮抗免疫<sup>[32]</sup>;肿瘤相关成纤维细胞主要参与肿瘤转移、血管生成和耐药性<sup>[33]</sup>。此外,本研究还发现GPX8与GBM中的CD274、CTLA4和TIGIT呈正相关,与LGG中的CD274、CTLA4、TIGIT和LAG3呈正相关。进一步使用免疫荧光技术分析确定GPX8与GBM和LGG中的多个免疫检查点相关。本研究首次发现GPX8和免疫检查点紧密相关,表明GPX8可能参与促进胶质瘤发展的多种免疫途径。



A、B:泛癌中GPX7(A)、GPX8(B)的肿瘤基质评分、免疫评分、评估分数和肿瘤纯度分析;C、D、G、H:GPX8在GBM中的基质评分、免疫评分、评估分数和肿瘤纯度分析;E、F、I、J: GPX8在LGG中的基质评分、免疫评分、评估分数和肿瘤纯度分析。

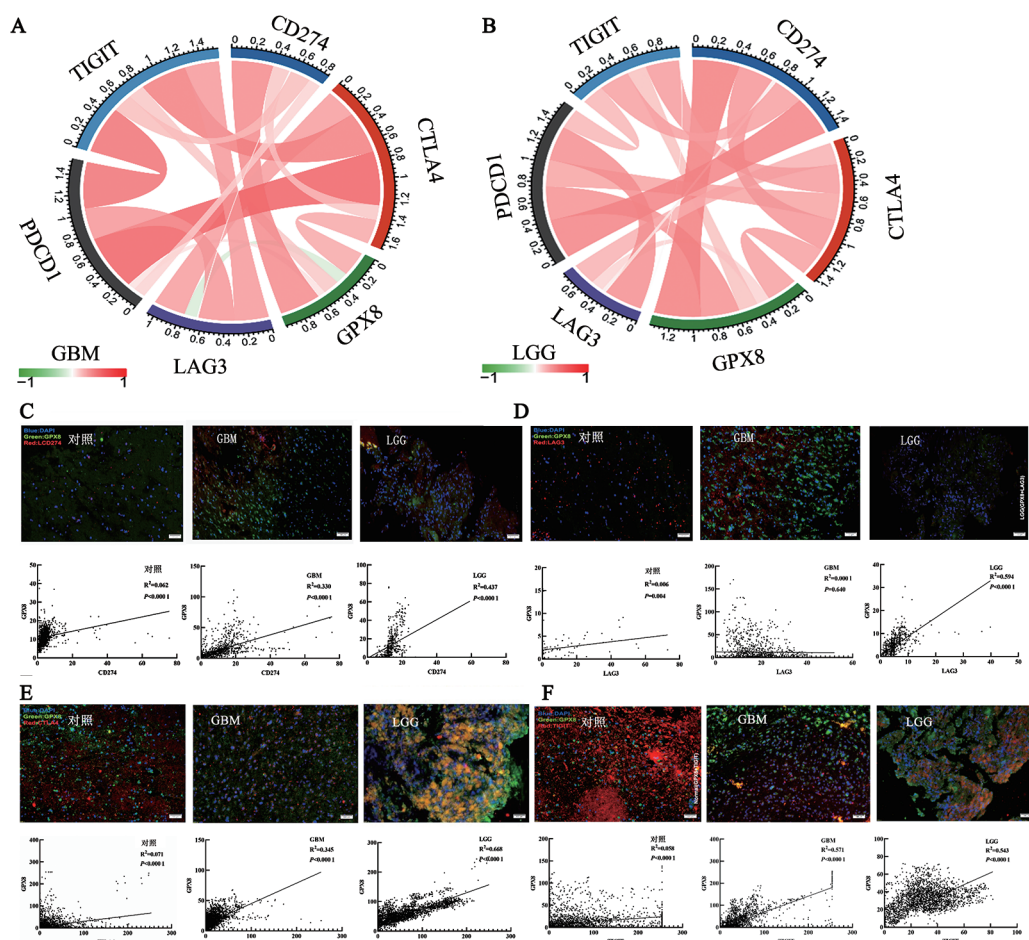
图8 GPX 7和GPX 8 mRNA表达的泛癌分析





A: GPX8 与 GBM 免疫细胞浸润的相关性分析; B~D: GBM 中 GPX8 与巨噬细胞, nTreg 细胞和 iTreg 细胞浸润的相关性分析; E~H: 在 LGG 中 GPX8 与巨噬细胞, nTreg 细胞和 iTreg 细胞浸润的相关性分析。红线和绿线分别表示正相关性和负相关关系, 颜色越深表示相关性越强。

图9 在胶质瘤中 GPX7,8 mRNA 表达水平与免疫细胞浸润的相关性分析

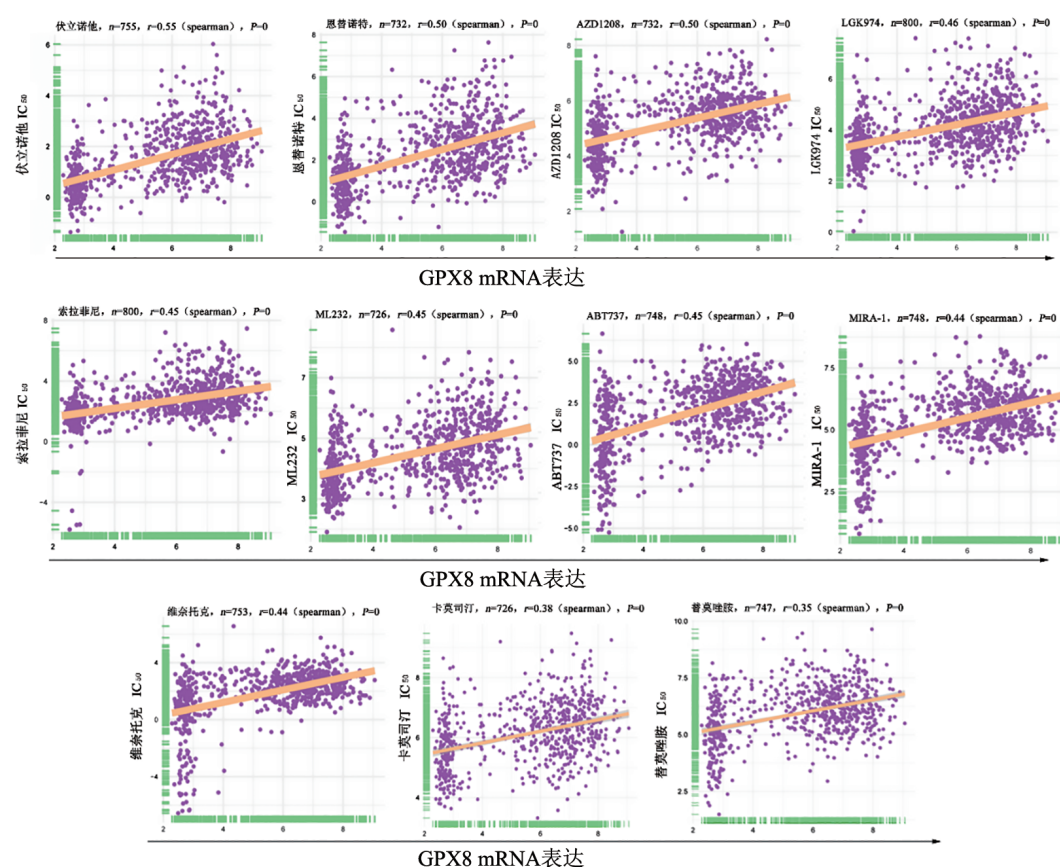


A、B: GPX8 与 GBM 和 LGG 免疫检查点的相关性分析(红线和绿线分别表示正相关和负相关, 颜色越深表示相关性越强); C: GBM 和 LGG 组织中 GPX8 和 CD274 蛋白表达的相关性分析; D: GBM 和 LGG 组织中 GPX8 和 LAG3 蛋白表达的相关性分析; E: GBM 和 LGG 组织中 GPX8 和 CTLA4 蛋白表达的相关性分析; F: GBM 和 LGG 组织中 GPX8 与 TIGIT 蛋白表达的相关性分析。

图 C~F 中标尺长度为 200  $\mu\text{m}$ 。

图10 数据库分析 GPX8 与免疫检查点蛋白表达的相关性分析及免疫荧光技术检测国人胶质瘤组织中 GPX8 和上述蛋白分子表达的相关性加以验证





A~K: GPX8 mRNA 表达与伏立诺他(A)、恩替诺特(B)、AZD1208(C)、LGK974(D)、紫拉菲尼(E)、ML232(F)、ABT737(G)、MIRA-1(H)、维奈托克(I)、卡莫司汀(J)和替莫唑胺 IC<sub>50</sub> 的相关性。

图 11 用 GDSC2 数据库分析胶质瘤组织中 GPX8 蛋白表达与药物 IC<sub>50</sub> 的相关性分析

免疫检查点阻断疗法在许多癌症中取得了进展<sup>[34]</sup>。例如,与单一疗法相比,PD-1 和 TIGIT 的双检查点阻断已被证明可以提高 GBM 小鼠的抗肿瘤免疫力和存活率<sup>[35]</sup>;切除复发性 GBM 术后给予 CTLA4 和 PD-1 抗体可进一步改善患者预后<sup>[36]</sup>。此外,LAG3 抗体可以显著提高 GBM 小鼠的存活率和 PD-1 疗效<sup>[37]</sup>。越来越多的研究表明,免疫检查点阻断可能是治疗胶质瘤有着美好前景。

胶质瘤单细胞数据集显示,GPX8 在多种免疫细胞中高表达。富集分析发现,GPX8 的功能通常与细胞周期和免疫途径有关。重要的是,这是首次表明 GPX8 可能与 GBM 和 LGG 中的多个免疫检查点呈正相关,且有望作为胶质瘤免疫治疗的新靶点。

综上,本研究结果表明,LGG 和 GBM 中 GPX8 表达显著增加,高 GPX8 表达与胶质瘤患者的生存和预后显著相关。并发现 GPX8 与 LGG 和 GBM 中的多个免疫检查点之间存在正相关,因此,GPX8 可能是胶质瘤免疫治疗的有价值的生物标志物。

## 参考文献

[1] OSTROM Q T, BAUCHET L, DAVIS F G, *et al.* The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review[J]. *Neuro Oncol*,

2014, 16(7): 896-913. DOI: 10.1093/neuonc/nou087.

- [2] JIANG T, NAM D H, RAM Z, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas[J]. *Cancer Lett*, 2021, 499: 60-72. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.10.050.
- [3] NICHOLSON J G, FINE H A. Diffuse glioma heterogeneity and its therapeutic implications[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(3): 575-590. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1474.
- [4] MARGIS R, DUNAND C, TEIXEIRA F K, *et al.* Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview[J]. *FEBS J*, 2008, 275 (15): 3959-3970. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x.
- [5] BRIGELIUS-FLOHÉ R, MAIORINO M. Glutathione peroxidases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(5): 3289-3303. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- [6] BALIGA M S, WANG H B, ZHUO P, *et al.* Selenium and GPX-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2007, 115(3): 227-241. DOI: 10.1007/BF02685998.
- [7] LIU J R, DU J, ZHANG Y P, *et al.* Suppression of the malignant phenotype in pancreatic cancer by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase[J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17 (1): 105-116. DOI: 10.1089/hum.2006.17.105.
- [8] WEI J, XIE Q N, LIU X R, *et al.* Identification the prognostic value of glutathione peroxidases expression levels in acute myeloid leukemia [J/OL]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(11): 678[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32617298/>. DOI: 10.21037/atm-20-3296.
- [9] ZHANG M L, WU H T, CHEN W J, *et al.* Involvement of glutathione peroxidases in the occurrence and development of

- breast cancers[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 1-11. DOI: 10.1186/s12967-020-02420-x.
- [10] GOLDMAN M J, CRAFT B, HASTIE M, *et al.* Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(6): 675-678. DOI: 10.1038/s41587-020-0546-8.
- [11] ZHAO Z, ZHANG K N, WANG Q W, *et al.* Chinese glioma genome atlas (CGGA): a comprehensive resource with functional genomic data from Chinese glioma patients[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2021, 19(1): 1-12. DOI: 10.1016/j.gpb.2020.10.005.
- [12] WARDE-FARLEY D, DONALDSON S L, COMES O, *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W214-W220[2023-07-10]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20576703/>. DOI: 10.1093/nar/gkq537.
- [13] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612. DOI: 10.1093/nar/gkaa1074.
- [14] LIU C J, HU F F, XIA M X, *et al.* GSCALite: a web server for gene set cancer analysis[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(21): 3771-3772. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty411.
- [15] TANG Z F, KANG B X, LI C W, *et al.* GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W556-W560. DOI: 10.1093/nar/gkz430.
- [16] YANG W J, SOARES J, GRENINGER P, *et al.* Genomics of drug sensitivity in cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D955-D961[2023-07-10]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23180760/>. DOI: 10.1093/nar/gks1111.
- [17] TOUAT M, IDBAIH A, SANSON M, *et al.* Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(7): 1457-1472. DOI: 10.1093/annonc/mdx106.
- [18] CARLSSON S K, BROTHERS S P, WAHLESTEDT C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme[J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(11): 1359-1370. DOI: 10.15252/emmm.201302627.
- [19] XU S C, TANG L, LI X Z, *et al.* Immunotherapy for glioma: current management and future application[J]. *Cancer Lett*, 2020, 476: 1-12. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.002.
- [20] HE L, HE T, FARRAR S, *et al.* Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(2): 532-553. DOI: 10.1159/000485089.
- [21] JIAO Y, WANG Y R, GUO S C, *et al.* Glutathione peroxidases as oncotargets[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45): 80093-80102. DOI: 10.18632/oncotarget.20278.
- [22] YANG W, SHEN Y M, WEI J, *et al.* MicroRNA-153/Nrf-2/GPx1 pathway regulates radiosensitivity and stemness of glioma stem cells via reactive oxygen species[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 22006-22027. DOI: 10.18632/oncotarget.4292.
- [23] DEOGHARKAR A, SINGH S V, BHARAMBE H S, *et al.* Downregulation of ARID1B, a tumor suppressor in the WNT subgroup medulloblastoma, activates multiple oncogenic signaling pathways[J]. *Hum Mol Genet*, 2021, 30(18): 1721-1733. DOI: 10.1093/hmg/ddab134.
- [24] CHI H Z, LI B Y, WANG Q T, *et al.* Opportunities and challenges related to ferroptosis in glioma and neuroblastoma[J/OL]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1065994[2023-07-10]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1065994>. DOI: 10.3389/fonc.2023.1065994.
- [25] WANG K K, WANG J J, ZHANG J H, *et al.* Ferroptosis in glioma immune microenvironment: opportunity and challenge[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 917634[2023-07-10]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.917634>. DOI: 10.3389/fonc.2022.917634.
- [26] ZHOU Y, WU H Y, WANG F C, *et al.* GPX7 is targeted by miR-29b and GPX7 knockdown enhances ferroptosis induced by erastin in glioma[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 11: 802124[2023-07-10]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.802124>. DOI: 10.3389/fonc.2021.802124.
- [27] YANG Z S, YANG Q, SUN X X, *et al.* GPX8 as a novel prognostic factor and potential therapeutic target in primary glioma[J/OL]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 8025055[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36052280/>. DOI: 10.1155/2022/8025055.
- [28] CHEN H, XU L, SHAN Z L, *et al.* GPX8 is transcriptionally regulated by FOXC1 and promotes the growth of gastric cancer cells through activating the Wnt signaling pathway[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 596[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33317536/>. DOI: 10.1186/s12935-020-01692-z.
- [29] ZHANG J, LIU Y, GUO Y, *et al.* GPX8 promotes migration and invasion by regulating epithelial characteristics in non-small cell lung cancer[J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(11): 3299-3308. DOI: 10.1111/1759-7714.13671.
- [30] KHATIB A, SOLAIMUTHU B, BEN YOSEF M, *et al.* The glutathione peroxidase 8 (GPX8)/IL-6/STAT3 axis is essential in maintaining an aggressive breast cancer phenotype[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(35): 21420-21431. DOI: 10.1073/pnas.2010275117.
- [31] VITALE I, MANIC G, COUSSENS L M, *et al.* Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 36-50. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.06.001.
- [32] WHITESIDE T L. FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(4): 353-363. DOI: 10.1080/14728222.2018.1451514.
- [33] XIAO Y, YU D H. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer[J/OL]. *Pharmacol Ther*, 2021, 221: 107753[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33259885/>. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753.
- [34] DUNN G P, CLOUGHESY T F, MAUS M V, *et al.* Emerging immunotherapies for malignant glioma: from immunogenomics to cell therapy[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(10): 1425-1438. DOI: 10.1093/neuonc/noaa154.
- [35] HUNG A L, MAXWELL R, THEODROS D, *et al.* TIGIT and PD-1 dual checkpoint blockade enhances antitumor immunity and survival in GBM[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(8): e1466769[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30221069/>. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1466769.
- [36] DUERINCK J, SCHWARZE J K, AWADA G, *et al.* Intracerebral administration of CTLA-4 and PD-1 immune checkpoint blocking monoclonal antibodies in patients with recurrent glioblastoma: a phase I clinical trial[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(6): e002296[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34168003/>. DOI: 10.1136/jitc-2020-002296.
- [37] HARRIS-BOOKMAN S, MATHIOS D, MARTIN A M, *et al.* Expression of LAG-3 and efficacy of combination treatment with anti-LAG-3 and anti-PD-1 monoclonal antibodies in glioblastoma[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(12): 3201-3208. DOI: 10.1002/ijc.31661.

[收稿日期] 2023-07-18

[修回日期] 2023-10-12

[本文编辑] 向正华,沈志超