

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.009

· 临床研究 ·

肺腺癌中免疫治疗相关氧化应激基因表达的临床意义及其与免疫细胞浸润和药物敏感性的关系

金山^{1,2}, 李欣^{1,2}, 王若澜^{1,2}, 夏伟², 贺娟² (1. 大理大学 药学院, 云南 大理 671000; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院 药剂科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的:** 探究肺腺癌中与免疫治疗相关氧化应激基因(IROSG)及其与肿瘤组织免疫浸润和患者预后的关系。**方法:** 从TCGA数据库和GEO数据库下载肺腺癌患者IROSG表达数据及相关临床信息。对非小细胞肺癌免疫治疗队列进行差异基因表达分析以获取免疫治疗相关基因, 然后与从GeneCards数据库筛选的氧化应激相关基因取交集得到IROSG。基于得到的IROSG对肺腺癌患者进行分型, 对亚型的差异表达基因进行单因素COX、LASSO和多因素COX回归分析以构建预后模型。使用模型公式计算每个患者的风险评分, 并将患者划分为高、低风险组。从多个层面验证模型的预测效能, 并进行肿瘤微环境(TME)分析、免疫治疗反应预测和药物敏感性分析。**结果:** 通过数据库分析获取82个IROSG, IROSG高表达的肺腺癌患者预后较好($P<0.05$)。基于IROSG表达水平分型和风险评分构建的肺腺癌患者预后模型预测能力好, 基于风险评分和病例特征等预后因子构建的列线图 and 校正曲线能较好地预测肺腺癌患者的总生存率。低风险组主要富集于同种异体移植排斥和自身免疫性疾病等通路, 而高风险组主要富集在细胞周期和DNA复制等通路上, 且低风险组肺腺癌组织中免疫细胞浸润水平较高。高、低风险评分结合肿瘤突变负荷(TMB)、TME、肿瘤免疫功能障碍和排斥(TIDE)评分和免疫检查点分子表达水平能较好地预测肺腺癌患者预后、免疫治疗反应和对化疗药物的敏感性。**结论:** 本研究构建了一个可以预测肺腺癌患者预后和免疫治疗反应的模型, 可为肺腺癌患者个体化治疗提供了理论依据。

[关键词] 肺腺癌; 免疫治疗; 氧化应激; 免疫治疗相关氧化应激基因; 免疫浸润; 预后预测

[中图分类号] R734.2; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)01-0062-13

Clinical significance of immunotherapy-associated oxidative stress gene expression in lung adenocarcinoma and its relationship with immune cell infiltration and drug sensitivity

JIN Shan^{1,2}, LI Xin^{1,2}, WANG Ruolan^{1,2}, XIA Wei², HE Juan² (1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China; 2. Department of Pharmacy, 920th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Kunming 650032, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the immunotherapy-related oxidative stress genes (IROSGs) in lung adenocarcinoma (LUAD) and their relationship with immune infiltration and patient prognosis. **Methods:** The expression profile IROSG and corresponding clinical information of LUAD patients were downloaded from the TCGA and GEO databases. To identify immunotherapy-related genes, differential gene expression analysis was conducted on a cohort of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing immunotherapy. By intersecting the results with oxidative stress-related genes screened from the GeneCards database, the IROSG set was obtained. The LUAD patients were clustered based on the obtained IROSG, and a prognostic model was constructed by performing univariate COX regression analysis, Lasso and multivariate COX regression analysis on the differentially expressed genes of the subtypes. The risk score was calculated for each patient based on the model, and patients were categorized into high-risk and low-risk groups. The predictive efficacy of the model was validated using multiple external validation sets, and further analyses were performed including tumor microenvironment (TME) analysis, drug sensitivity analysis, and prediction of immunotherapy response. **Results:** A total of 82 IROSGs were obtained through comprehensive database analysis, and LUAD patients with high IROSG expression had a better prognosis ($P<0.05$). The prognostic model for LUAD patients constructed on the basis of expression of IROSG and risk scores showed good predictive performance. A nomogram was constructed based on the prognostic factors such as risk score and patient characteristics, and its calibration curve demonstrated good performance to predict the overall survival rate in LUAD patients. The

[基金项目] 云南省基础研究计划科研项目(No. 202301AY070001-099)

[作者简介] 金山(1997—), 男, 硕士生, 主要从事临床药学的研究。E-mail: 2646234922@qq.com

[通信作者] 贺娟, E-mail: hhejuan@126.com

low-risk group was primarily enriched in pathways such as allograft rejection and autoimmune diseases, while the high-risk group was primarily enriched in pathways such as cell cycle and DNA replication. Additionally, the levels of immune cell infiltration were higher in the LUAD tissues of low-risk group. Combining high- and low-risk scores with tumor mutation burden (TMB), TME, tumor immune dysfunction and exclusion (TIDE) scores, as well as immune checkpoint molecule expression levels, can effectively predict the prognosis of LUAD patients, immune therapy response, and sensitivity to chemotherapy drugs. **Conclusion:** In this study, we developed a model for predicting the prognosis and immunotherapy response of LUAD patients, providing a theoretical basis for personalized treatment of LUAD patients.

[Key words] lung adenocarcinoma (LUAD); immunotherapy; oxidative stress; immunotherapy-related oxidative stress gene (IROSG); immune infiltration; prognostic prediction

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(1): 62-74. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.009]

肺癌是癌症相关死亡的主要原因^[1],肺腺癌是其最常见的组织学亚型^[2]。以免疫检查点抑制剂为代表的免疫治疗在肺癌治疗中表现出了较好的疗效^[3],但大多数患者对免疫治疗仍是无反应或无明显反应^[4]。因此,研究免疫治疗耐药机制并寻找可以预测肺腺癌患者免疫治疗反应新的生物标志物是至关重要的。氧化应激是体内氧化与抗氧化之间的失衡造成的,而氧化应激的罪魁祸首是活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[5]。肿瘤细胞中ROS的增加会促进肿瘤的发生发展、转移和耐药^[6],但过量的ROS具有细胞毒效应,可以通过诱导细胞凋亡等细胞死亡过程来抑制肿瘤的发展^[7]。一项研究^[8]表明,铜诱导的谷胱甘肽消耗和多柔比星引发的氧化应激可导致细胞内氧化还原失衡,从而促进免疫原性细胞死亡,进而抑制了肿瘤的生长。ROS在促进肿瘤相关抗原释放、防止免疫逃逸和减少免疫抑制等方面有促进作用,调节肿瘤微环境(TME)中ROS水平可能改善免疫治疗患者临床结局^[9-10]。免疫系统中不同类型的免疫细胞可能协同响应ROS刺激,从而影响肿瘤免疫治疗的效果^[11]。因此,针对氧化应激相关基因的研究,为探索肺腺癌患者免疫治疗耐药提供了新思路,也对提高免疫治疗疗效具有重要意义。本研究基于免疫治疗相关氧化应激基因(immunotherapy-related oxidative stress gene, IROSG)的表达水平,通过无监督聚类分析对肺腺癌患者进行分型以识别出新的分子亚型。此外,基于分型的差异基因构建了一个多基因预后模型,并在多个数据集中验证了模型的预测效能。最后对TME、潜在生物功能及药物敏感性等方面进行了分析,以期对肺腺癌临床治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 数据收集及预处理

从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载了490例肺腺癌患者表达谱数据和相对应的临

床信息。从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载GSE31210和GSE30219转录组数据和临床信息,并提取其中的肺腺癌样本数据。本研究纳入的所有患者生存时间必须大于30 d。

1.2 从数据库中获取IROSG

以“oxidative stress”为检索词检索GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>),并以相关性 ≥ 5 为阈值筛选IROSG。随后使用GEO数据库的在线分析工具GEO2R对GSE126044数据集非小细胞肺癌(NSCLC)免疫治疗反应组和无反应组进行差异基因表达分析获取免疫治疗相关基因,设置阈值为 $|\log$ 基因表达变化倍数(fold change, FC) > 1 ,调整后的 $P < 0.05$ 。将得到的氧化应激相关基因与免疫治疗相关基因取交集作为IROSG,并以韦恩图的形式展示。为了了解IROSG的生物学功能,使用R包“clusterProfiler”对IROSG进行GO和KEGG富集分析,调整后 $P < 0.05$ 被认为显著富集。

1.3 基于IROSG的共识聚类将肺腺癌进行分型

基于TCGA-LUAD队列中IROSG的表达水平,使用R包“ConsensusClusterPlus”对490例肺腺癌患者进行无监督聚类分析并对这个过程执行1 000次以得到稳定的聚类结果。使用Kaplan-Meier生存曲线比较不同亚型的生存差异。主成分分析(principal component analysis, PCA)被用来评估不同亚型的分布差异。

1.4 基于亚型间差异表达基因构建预后模型并绘制ROC曲线评估其效能

使用R包“DESeq2”识别不同亚型间的差异表达基因($|\log FC| > 1$,调整后 $P < 0.05$),并进行KEGG富集分析。首先以TCGA-LUAD队列为训练集对差异基因进行单因素COX回归分析筛选预后基因($P < 0.01$),然后进行LASSO和多因素COX回归分析识别模型基因构建预后模型。再根据公式计算训练集和验证集每个患者的风险评分,风险评分公式如下:风险评分=基因1的回归系数 $\times$ 基因1的表达量+基因2的回归系数 $\times$ 基因2的表达量+……+基因 n 的回归系数 $\times$ 基因 n 的表达量。为

了获得最佳的预后预测效率,每个数据集根据各自风险评分的最佳截断值划分为高、低风险组。然后绘制ROC曲线评估模型的预测效能,并使用Kaplan-Meier曲线比较了高、低风险组的生存差异。

1.5 独立预后因子分析及列线图的构建

为了筛选独立预后因子,对肺腺癌患者性别、年龄、分期和风险评分进行了单因素和多因素COX回归分析。然后综合临床病理特征构建列线图预测肺腺癌患者的生存率,并绘制校准曲线评估列线图的预测性能。

1.6 高低风险组患者的GSEA-KEGG富集和TME中免疫细胞浸润的分析

为了了解高、低风险组生物学差异,本研究对高、低风险组进行了GSEA-KEGG富集分析。使用ESTIMATE算法计算患者的免疫评分、基质评分和综合评分并比较其在高、低风险组患者中的差异。为了验证ESTIMATE的结果,使用CIBERSORT算法计算每个患者中22种免疫细胞浸润比例,然后比较高、低风险组免疫细胞浸润差异情况,并以雷达图的形式可视化。

1.7 风险评分在预测免疫治疗及其他治疗中的作用

本研究使用免疫检查点分子表达、肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)评分、肿瘤免疫功能障碍和排斥(tumor immune dysfunction and exclusion, TIDE)评分等一系列指标来评估不同风险患者对免疫治疗的反应。从TCGA数据库下载肺腺癌相关的突变信息,并计算每个患者的TMB。上传肺腺癌表达矩阵到TIDE数据库(<http://tide.dfci.harvard.edu/>)计算每个患者的TIDE评分,TIDE评分越大发生免疫逃逸就越大。使用R包“oncoPredict”预测高、低风险组患者对常用抗肿瘤药物的敏感性,IC₅₀越小表示药物敏感性越强。

1.8 统计学处理

所有数据处理、统计分析和图形绘制均由R软件(4.2.3)和相对应的R包完成。使用Wilcoxon秩和检验对两组间的比较进行分析,所有P值都是双侧的。以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 通过数据库分析获取82个IROS G

从GeneCards数据库获取1 893个氧化应激相关基因(相关性≥5)。使用GEO数据库在线分析工具GEO2R对GSE126044数据集的免疫治疗反应组和非反应组进行差异基因表达分析,得到689个免疫治疗相关基因(图1A)。然后将免疫治疗相关基因与氧化应激相关基因取交集得到82个IROS G(图1B)。为

了探索IROS G的生物学功能,本研究进行了KEGG和GO富集分析。KEGG和GO结果显示,IROS G在免疫相关生物过程中显著富集(图1C~F)。

2.2 IROS G高表达的肺腺癌患者预后较好

基于TCGA肺腺癌样本中82个IROS G的表达量,无监督聚类分析确定两个不同的亚型,包括C1(n=246)和C2(n=244)(图2A)。生存分析发现,C1中患者的预后显著好于C2(P=0.020,图2B)。PCA结果(图2C)显示,两个亚型的患者能被较好地地区分开。热图显示,大部分IROS G在C1中呈高表达,但临床病理参数在分子亚型间无显著差异(图2D)。这些结果表明,IROS G高表达的患者预后较好。

2.3 基于IROS G表达水平分型构建的肺腺癌患者预后模型预测能力好

为进一步探索分子亚型潜在的生物学功能,基于TCGA-LUAD的计数数据使用R包“DESeq2”识别出了943个C1和C2之间差异表达的基因(调节后P<0.05,|logFC|>1)。KEGG富集分析发现,这些差异基因主要富集在免疫相关通路上(图3A、B),这进一步证明了氧化应激和免疫密切相关。首先以TCGA队列为训练集对943个分子亚型的差异基因进行单因素COX回归分析,筛选出P<0.01的预后基因163个,然后通过LASSO回归分析得到29个预后关键基因(图3C、D),最后进行多因素COX回归分析得到13个候选基因作为模型基因。森林图显示,HHATL、ASB2、LAX1、CD200R1和CLEC7A是保护因子,而BIRC3、NTSR1、PEX5L、CTCF、BCAN、CLMP、B3GALT1和KRT14是危险因子(图3E)。根据风险评分公式计算每个患者的风险得分,公式如下:风险评分=(-0.395×HHATL)+(0.397×BIRC3)+(-0.271×ASB2)+(0.128×NTSR1)+(0.318×PEX5L)+(-0.157×LAX1)+(0.194×CTCF)+(0.172×BCAN)+(-0.453×CD200R1)+(0.179×CLMP)+(-0.150×CLEC7A)+(0.395×B3GALT1)+(0.077×KRT14)。为了获得最佳的预测预后效率,根据风险评分的最佳截断值将训练集和验证集患者划分为高风险组和低风险组。桑基图显示,预后较好的C1患者大多是低风险组患者(图3F),且C1的风险评分显著低于C2(P=1.2×10⁻⁹,图3G)。这初步说明了本研究构建的模型预测预后能力较好。

为了检验模型的稳定性,本研究对训练集和验证集绘制了ROC曲线,并比较了高、低风险组患者间的生存差异。其中TCGA队列1、3和5年ROC曲线的AUC值为0.769、0.763和0.747(图4A);GSE31210队列1、3和5年ROC曲线的AUC值为0.872、0.611和0.588(图4C);GSE30219队列1、3和5年ROC曲线的AUC值为

0.828、0.673 和 0.655(图 4E)。训练集和验证集的低风险组患者预后比高风险组患者好(图 4B、D、F)。分析结果进一步说明了本研究构建的模型具有较好的预测效能。

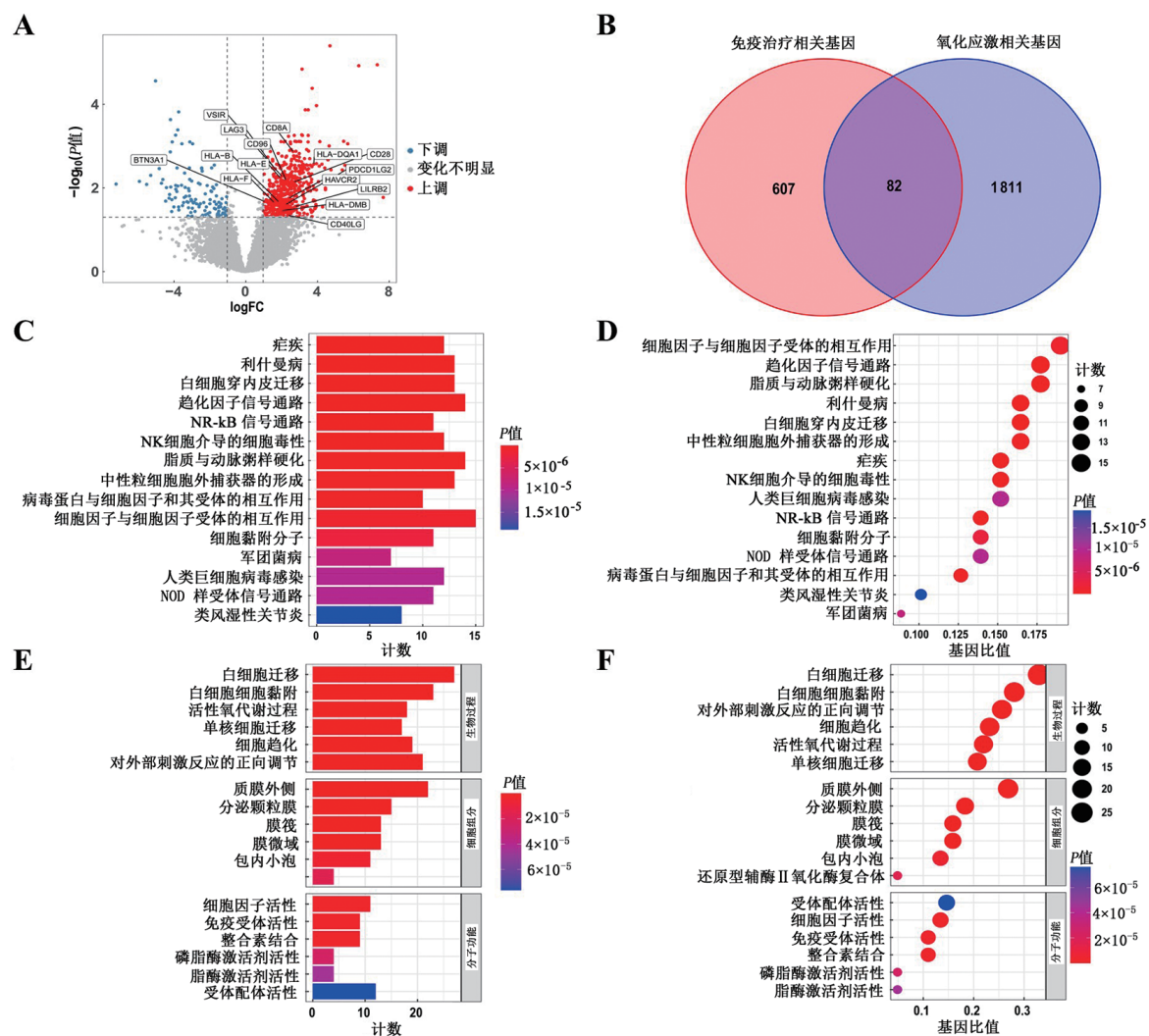


图 1 IROSG 的获取及其 KEGG 和 GO 富集分析

为了检验模型的适用性,本研究对 TCGA 队列的不同临床亚组进行了一系列分析。对不同亚组的高、低风险组患者生存分析得到了与训练集和外部验证集相同的结果,低风险患者的预后较高风险患者好(图 5A、B、D、E、G、H)。临床亚组的风险评分比较发现,风险评分在年龄和性别亚组中的差异没有统计学意义(图 5C、F),但 III~VI 期患者的风险评分显著高于 I~II 期患者的风险评分(图 5I)。这些结果再一次证明了本研究构建的预后模型预测性能较好,在不同临床亚组中也能区分出高、低风险患者。

2.4 基于预后因子构建的列线图和校正曲线能较好地预测肺腺癌患者的生存率

结合临床病理特征和风险评分进行单因素和多因素 COX 回归分析以寻找肺腺癌患者的独立预后因子。单因素 COX 回归分析中与预后相关因素有分期

[$P < 0.001$, $HR = 1.659$, 95%CI (1.440, 1.912)], 风险评分 [$P < 0.001$, $HR = 1.229$, 95%CI (1.188, 1.271)] (图 6A)。多因素 COX 回归分析中与预后相关因素有分期 [$P < 0.001$, $HR = 1.590$, 95%CI (1.379, 1.833)] 和风险评分 [$P < 0.001$, $HR = 1.177$, 95%CI (1.188, 1.282)] (图 6B)。随后构建了列线图预测患者的生存率,结果显示患者 1、3 和 5 年的生存率分别为 95.9%、83.4% 和 66.9% (图 6C)。为了检验列线图的预测能力,绘制了 1、3 和 5 年校准曲线。如图 6D 所示,列线图预测的生存率和实际生存率基本上一致。这些结果表明,风险评分可以独立于其他临床病理特征预测肺腺癌患者的预后,结合临床病理特征构建的列线图具有较好的稳定性。

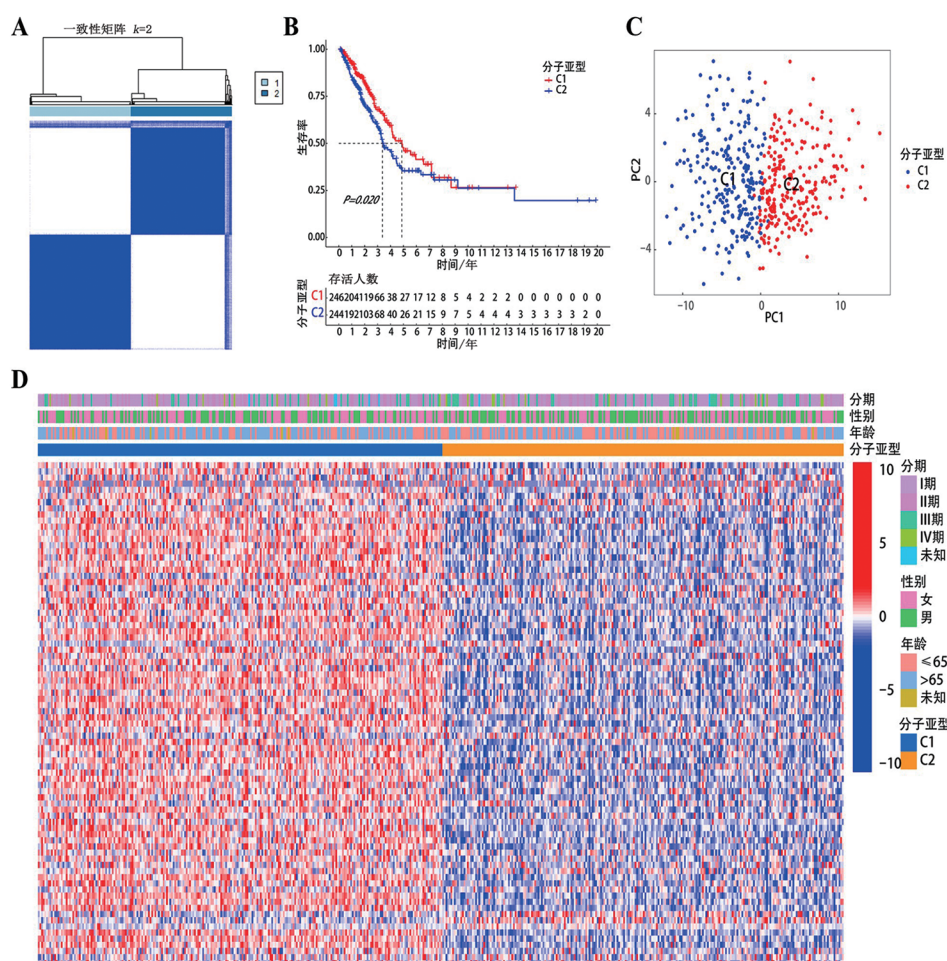
2.5 低风险组肺腺癌组织中免疫细胞浸润水平较高

GSEA-KEGG 结果显示,低风险组在同种异体移植排斥、自身免疫性疾病、造血细胞谱和肠道免疫

网络IgA的产生、T细胞受体信号通路等通路上显著富集(图7A),而高风险组在细胞周期、DNA复制、同源重组等通路上显著富集(图7B)。这表明低风险患者主要富集在免疫相关通路上,而高风险患者富集的通路跟细胞分裂有关。

TME分析显示,低风险组的免疫评分、基质评分和综合评分显著高于高风险组(图7C, $P<0.001$)。

CIBERSORT算法计算结果显示,低风险组中记忆B细胞、CD8⁺ T细胞、滤泡辅助T细胞和激活的DC浸润水平显著较高,而高风险组中M0型巨噬细胞、静息NK细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞浸润水平显著较高(图7D)。上述结果表明,低风险组免疫浸润水平较高。



A: 基于IROSG将490例肺癌患者分为两个亚型C1和C2; B: 两个亚型生存分析;
C: 两个亚型PCA; D: 两个亚型中IROSG的表达和临床病理参数的分布。

图2 在490例肺癌患者中基于IROSG的聚类分析

2.6 高、低风险评分结合TMB、TME、TIDE评分和免疫检查点分子表达水平能较好地预测肺癌患者预后、免疫治疗反应和对药物的敏感性

使用TME评分、TMB评分、免疫检查点分子表达和TIDE评分预测肺癌患者免疫治疗的反应。瀑布图显示,高风险组患者的突变率高于低风险组(图8A、B)。生存分析发现,高TMB患者预后比低TMB患者好(图8C),结合风险评分和TMB生存分析发现,高TMB且低风险患者预后最好(图8D)。高风险组的TIDE评分显著高于低风险组(图8E, $P<0.001$),说明高风险组患者免疫治疗发生免疫逃逸

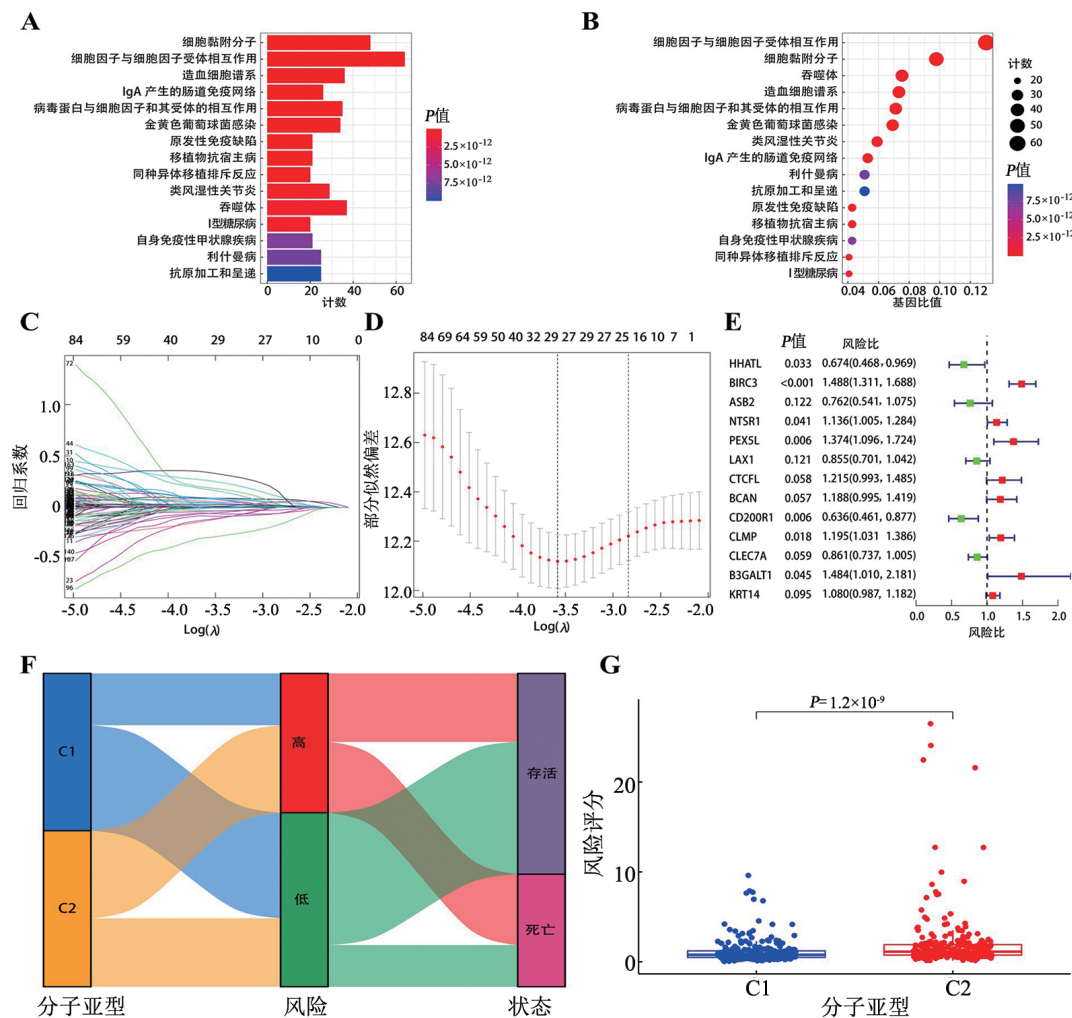
的可能性更大。如图8F所示,14个免疫检查点均在低风险组中呈高表达。这些结果表明,低风险组患者可能更适合免疫治疗。基于oncopredict算法发现,低风险组患者对阿昔替尼、喜树碱、表柔比星、氟维司群、维奈克拉、伊立替康、米托蒽醌、尼拉帕利、奥拉帕利、奥沙利铂、瑞波西利和拓泊替康的敏感性较高,而高风险组中吉非替尼、曲美替尼和优立替尼的敏感性较高(图9)。

3 讨论

临床上NSCLC免疫治疗的疗效显著,但免疫治

疗耐药仍是一个挑战^[12],且免疫治疗可能会引起严重的不良反应^[13-14],因此筛选免疫治疗获益人群是必要的。免疫治疗与氧化应激之间有着错综复杂的关系,但目前尚无研究系统评估 IROSG 是否可以作为肺腺癌患者预测预后及免疫治疗反应的生物标志物。本研究基于 IROSG 对肺腺癌患者分型,并构建和验证预后模型以寻找免疫治疗生物标志物筛选治疗最佳受益患者。本研究首先从 NSCLC 免疫治疗队

列和 GeneCards 数据库得到了 82 个 IROSG,富集分析发现 IROSG 在免疫相关通路上显著富集。基于 82 个 IROSG 的表达将肺腺癌患者分为两个亚型,生存分析发现预后好的亚型 IROSG 表达也较高。这与之前的研究一致,免疫水平高患者预后较好^[15]。有研究^[16]表明,ROS 是参与 T 细胞和 NK 细胞活化的重要信号,中性粒细胞和巨噬细胞也可通过 ROS 来破坏肿瘤细胞。这些结果表明,氧化应激对免疫细胞浸



A: 两个亚型的差异基因KEGG富集分析柱状图;B: 两个亚型的差异基因KEGG富集分析气泡图;C: 预后差异基因LASSO回归分析;D: 交叉验证选取预后关键基因;E: 预后关键基因多因素COX回归分析(虚线左侧为保护因子,虚线右侧为危险因子); F: 分子亚型、风险评分和生存状态关系;G: 分子亚型风险评分差异。

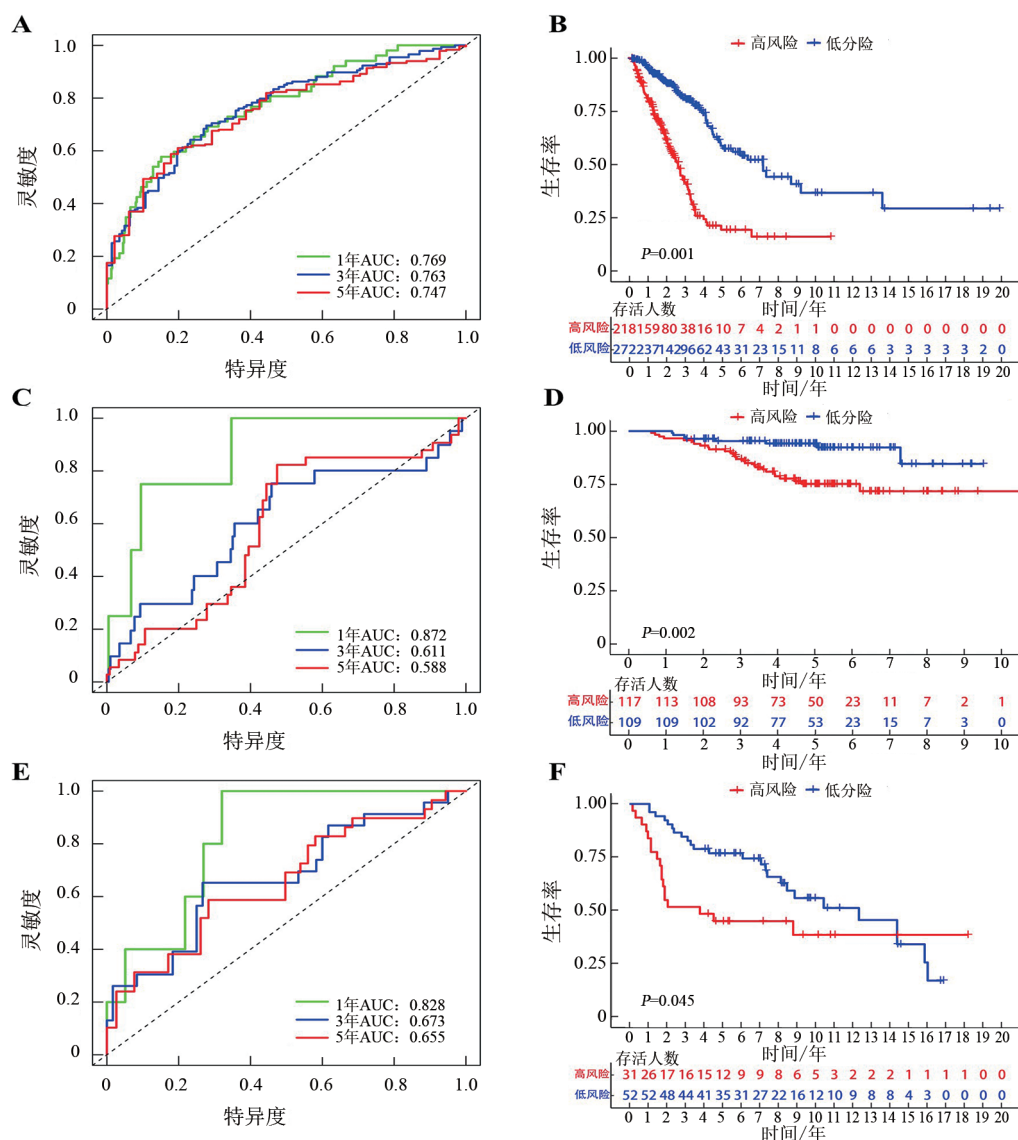
图3 基于TCGA构建预后模型

润水平有一定的影响。为了进一步探索氧化应激对免疫治疗潜在的影响,本研究对分型进行了差异分析并得到了 943 个差异表达基因。富集分析发现,这些差异表达基因富集通路与免疫相关,这说明氧化应激对免疫有调控作用。然后进行单因素、LASSO 和多因素 COX 回归分析构建了一个包含 13 个基因的预后模型,并使用外部验证集证明了该模型具有较好的预测预后性能。在癌症患者中耐药是治疗失

败的重要原因,耐药受相关基因调控,本研究中涉及 BIRC3、CTCF、BCAN、CLMP 等基因。BIRC3 可作为一种细胞凋亡抑制剂,在胶质母细胞瘤中,BIRC3 高表达会导致细胞凋亡逃避和耐药^[17]。CTCF 作为转录调节因子不在睾丸和胚胎干细胞以外的正常组织中表达^[18-19],当在癌症中异常表达时提示有耐药、侵袭增加可能。如 CTCF 异常上调促进了 ALK 突变、MYC 扩增的神经母细胞瘤细胞中染色质相交互

用进而对ALK抑制产生抵抗^[20]。CTCFL促进黑色素瘤细胞从增殖表型转变为侵袭表型^[21]。CTCFL在高级别上皮性卵巢癌中的表达水平较低级别上皮性卵巢癌中高^[22]。BCAN与胶质母细胞瘤干细胞、治疗耐药机制有关^[23]，且是肺腺癌患者的危险因素^[24]。CLMP是一种在结构上与柯萨奇病毒和腺病毒受体相关的穿膜蛋白，ZHANG等^[25]发现CLMP可能通过调节细胞周期、凋亡、TME等参与NSCLC顺铂耐药。在本研究中的模型基因NTSR1、B3GALT1和KRT14参与了转移。在胰腺癌中NTSR1高表达可加速癌细胞在体内的致瘤性和转移能力^[26]。B3GALT1是 β -1, 3-半乳糖基转移酶基因家族的成员，CHACHADI等^[27]证明了B3GALT1参与了前列腺癌细胞转移。敲低KRT14可显著减少三阴乳腺癌迁移、侵袭和腹膜转移^[28]。此外，CHEN等^[29]发现，PEX5L高表达的

NSCLC患者存活率较低。上述研究结果与本研究的结论一致，BIRC3、CTCFL、NTSR1、B3GALT1等参与耐药和转移的基因是危险因子。与之前的研究^[30]一致，ASB2是肺腺癌患者的保护因子。LAX1与CTLA4结合以促进CTLA4转运至细胞表面发挥免疫抑制作用^[31]。CD200R1是CD200的受体，NSCLC中CD200R1高表达提示预后不良^[32]。TANG等^[33]研究发现，阻断CLEC7A可抑制髓源性抑制细胞产生前列腺素E2并增强IL-22结合蛋白的表达，进而预防小鼠结直肠癌发展。这些结果表明，高表达LAX1、CD200R1和CLEC7A可发挥促癌作用，但在本研究中高表达LAX1、CD200R1和CLEC7A是预后有利因素，这需要更多的实验来证实。本研究可能为肺腺癌患者的预后和免疫治疗反应预测提供新的生物标志物。

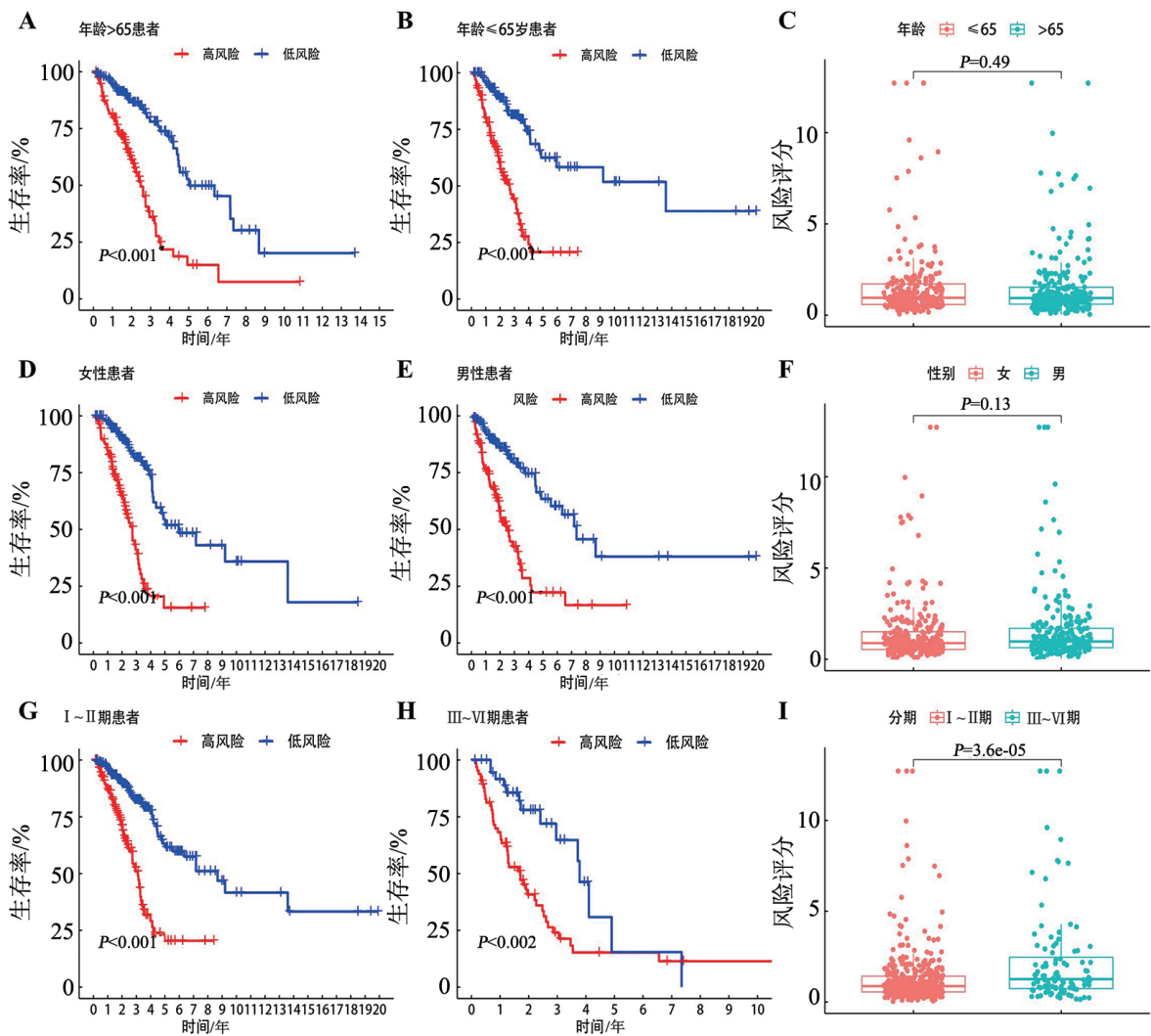


A、C、E:TCGA、GSE31210和GSE30219队列的ROC曲线; B、D、F:TCGA、GSE31210和GSE30219队列高、低风险组患者的生存分析。

图4 预后模型的预测效能检验

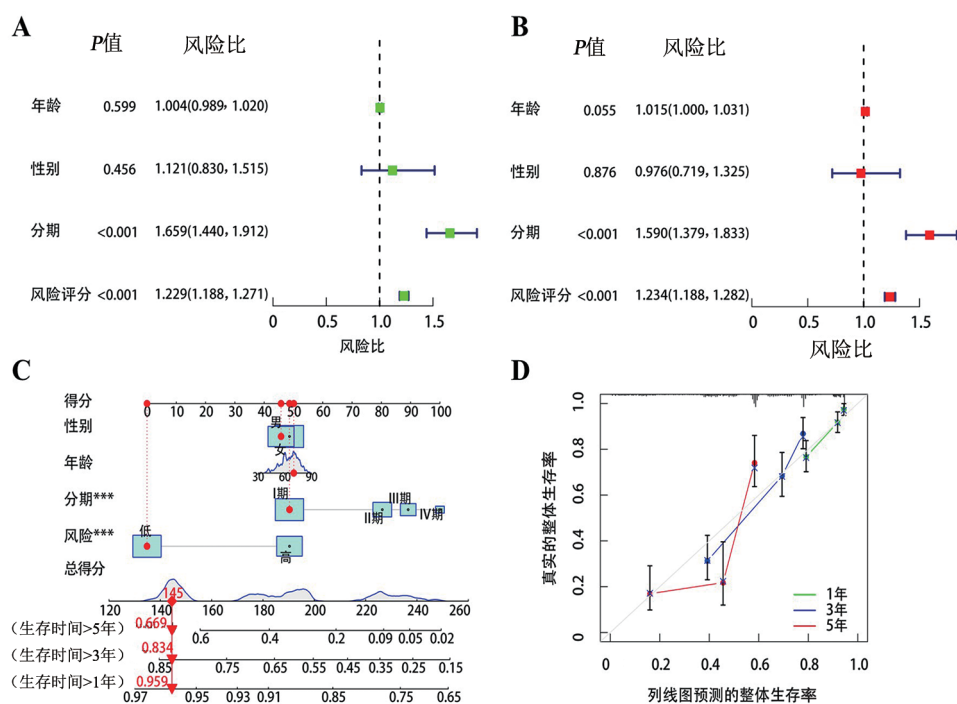
基因富集分析结果显示,低风险组主要富集在免疫相关通路上,而高风险组在细胞周期、DNA复制等通路上显著富集。免疫浸润分析显示,B细胞、CD8⁺T细胞、激活的DC在低风险组有较高的浸润水平,而M0巨噬细胞、静息NK细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞在高风险组有较高的浸润水平。固有免疫细胞(NK细胞、DC、中性粒细胞和巨噬细胞等)和适应性免疫细胞(T细胞和B细胞)浸润到TME中影响肿瘤进展^[34]。M0巨噬细胞为未分化的肿瘤相关巨噬细胞,可以分化为M1型和M2型巨噬细胞。M1型巨噬细胞具有促炎和抗肿瘤作用,而M2型巨噬细胞具有致瘤和抑制炎症反应作用^[35]。有研究^[36]表明,肿瘤相关巨噬细胞可以通过产生各种

趋化因子将调节性T细胞和髓源性抑制细胞等免疫抑制细胞吸引到肿瘤部位。此外,肿瘤相关巨噬细胞可以促进单核细胞表达PD-L1抑制细胞毒性T细胞反应^[37]。与巨噬细胞极化类似,研究^[38-40]表明中性粒细胞可极化为抗肿瘤型N1和促肿瘤型N2。N1可通过释放ROS和活性氮直接杀死肿瘤细胞,还可促进T细胞活化并招募M1型巨噬细胞。N2可以促进肿瘤血管生成和扩散,还可抑制NK细胞并招募M2巨噬细胞和调节性T细胞。嗜酸性粒细胞在TME中也有促肿瘤抑制肿瘤双重作用^[41]。综上所述,巨噬细胞、中性粒细胞等的双重作用可能是影响高风险患者预后的原因。



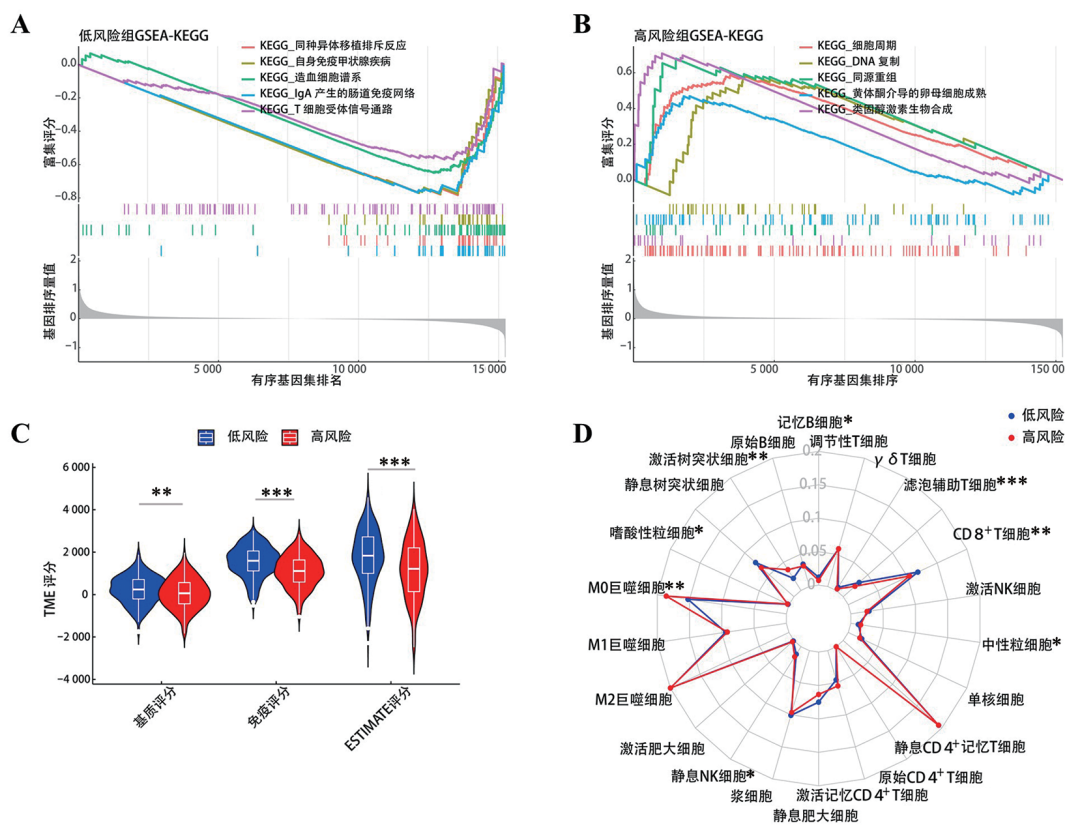
A、B、D、E、G、H: >65、≤65、女性、男性、I~II期和III~VI期患者高、低风险组生存分析;
C、F、I: 不同年龄、性别、分期患者风险评分差异。

图5 临床分组的模型验证



A:单因素COX回归分析; B:多因素COX回归分析; C:列线图; D:校准曲线(比较预测生存率和实际生存率间的相符程度)。

图6 独立预后分析及列线图



A:低风险组GSEA-KEGG; B:高风险组GSEA-KEGG; C:高低风险组TME评分比较; D:高低风险组免疫细胞浸润分析。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图7 GSEA-KEGG富集分析及免疫分析

本研究中使用免疫检查点表达、TMB评分、ESTIMATE评分和TIDE评分评估不同风险组对免疫

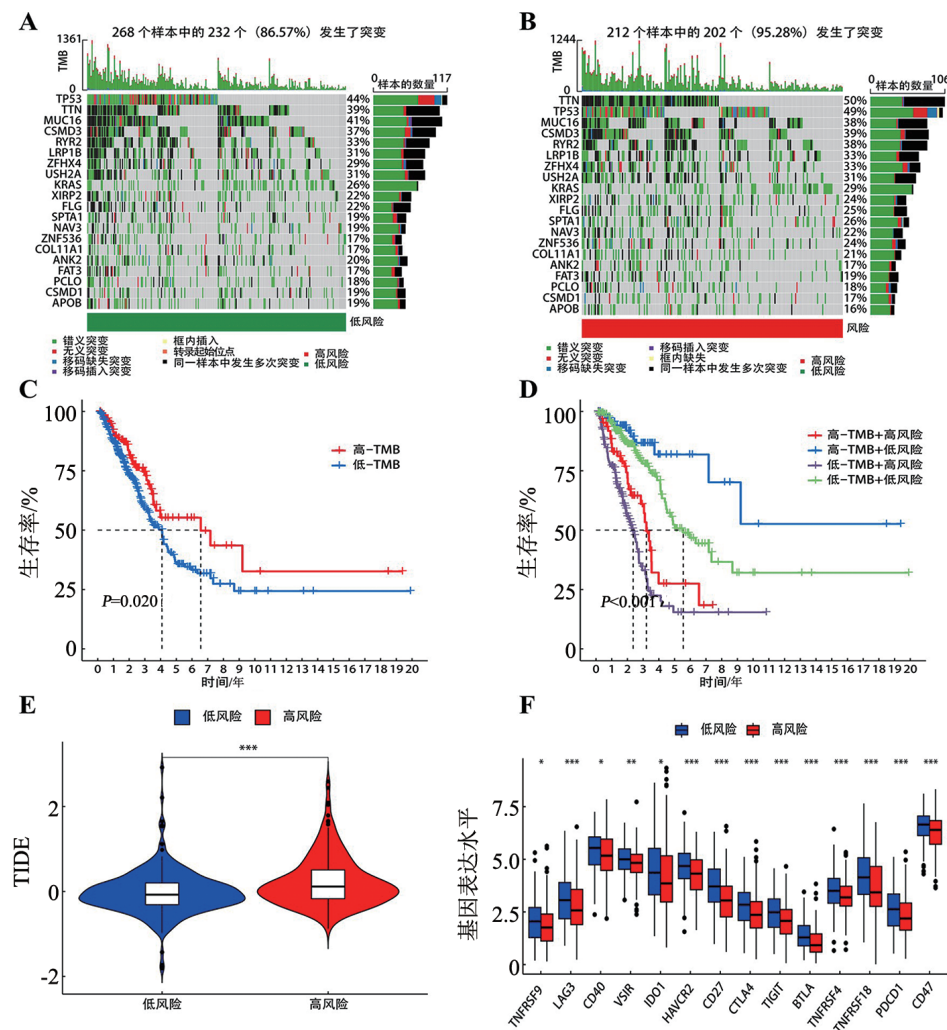
治疗的反应。研究^[42-44]表明,TMB可以预测患者对免疫检查点抑制剂的反应且TMB高的患者更容易从免

疫治疗中获益。本研究结果与之前的研究一致，高突变患者有较好的预后^[45]。TMB 分析的结果表明无论高低风险组，高 TMB 患者更可能从免疫治疗中获益。低风险组免疫检查点表达和 TME 评分均较高，而高风险组患者 TIDE 评分较高。综合考虑几种免疫治疗反应预测指标的结果表明低风险组可能对免疫治疗反应更好。药敏分析显示，低风险组对部分抗肿瘤药物更敏感，而高风险组对曲美替尼、吉非替尼和优立替尼更敏感。根据上述 GSEA 的结果本研究推测，高风险组使用细胞周期特异性药物阻断肿瘤细胞的增殖可能对肿瘤进展有一定的影响。研究^[11, 46-49]表明，癌细胞中的 ROS 失调可能与癌基因的激活、缺氧以及化疗、放疗等细胞外刺激有关。此外，化疗可导致氧化应激引起癌细胞死亡^[50]。综上所述，高风险组对免疫治疗的反应可能不好，但可以考虑免疫治疗联合引起氧化应激的治

疗方法包括化疗、放疗和抗血管生成治疗等，这可能会有较好的疗效。

虽然本研究构建的预后模型有较好的预测性能，但存在一些局限性。首先，研究所用的数据是从公共数据库收集的，所以就忽略了肿瘤异质性，但这可能对研究的结果造成一定的影响。其次，虽然在肺腺癌患者发现了免疫治疗和氧化应激有着密切联系，但其生物学机制仍不清楚。因此，需要大量实验来探索氧化应激对肺腺癌免疫治疗的影响。

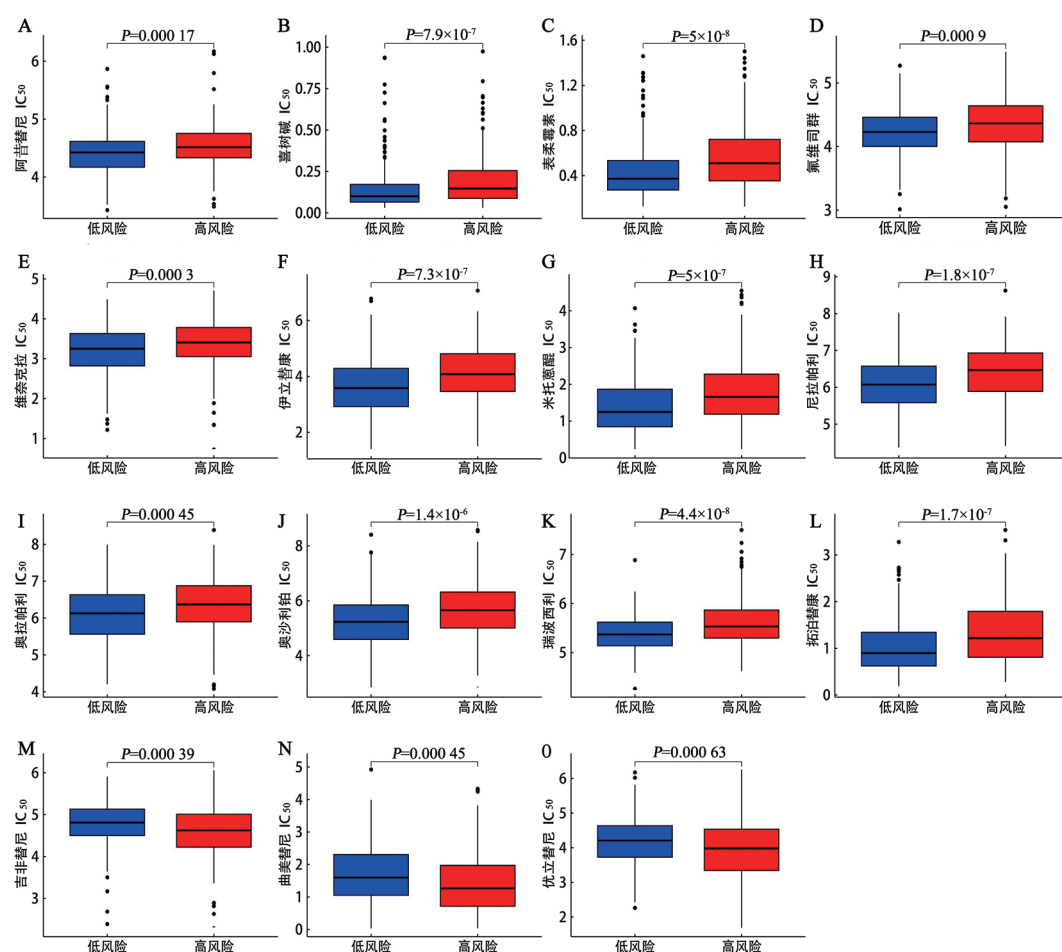
综上所述，研究结果表明氧化应激与免疫治疗反应相关。本研究构建并验证了一个基于 13 个基因的肺腺癌预测预后模型，且风险评分是肺腺癌患者独立的预后因素。此外，该模型也能较好地预测免疫治疗反应。同时也为免疫治疗耐药研究提供了一个突破口。



A: 低风险组突变率最高前 20 个基因瀑布图; B: 高风险组突变率最高前 20 个基因瀑布图; C: 高低突变组生存分析; D: 突变结合风险评分生存分析; E: 高低风险组 TIDE 评分比较; F: 高、低风险组免疫检查点表达差异分析。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 8 免疫治疗反应预测



A~O: 高、低风险组患者中阿昔替尼(A)、喜树碱(B)、表柔比星(C)、氟维司群(D)、维奈克拉(E)、伊立替康(F)、米托蒽醌(G)、尼拉帕利(H)、奥拉帕利(I)、奥沙利铂(J)、瑞波西利(K)、拓泊替康(L)、吉非替尼(M)、曲美替尼(N)和优立替尼(O) IC_{50} 的比较分析。

图9 高低风险组患者对药物敏感性的分析

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [2] SHI J X, HUA X, ZHU B, *et al.* Somatic genomics and clinical features of lung adenocarcinoma: a retrospective study[J/OL]. PLoS Med, 2016, 13(12): e1002162[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27923066/>. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002162.
- [3] LECLERC M, MEZQUITA L, GUILLEBOT DE NERVILLE G, *et al.* Recent advances in lung cancer immunotherapy: input of T-cell epitopes associated with impaired peptide processing[J/OL]. Front Immunol, 2019, 10: 1505[2023-09-10]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01505>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01505.
- [4] BLACH J, WOJAS-KRAWCZYK K, NICOS M, *et al.* Failure of immunotherapy-the molecular and immunological origin of immunotherapy resistance in lung cancer[J/OL]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 9030[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445735/>. DOI: 10.3390/ijms22169030.
- [5] WANG K, TANG Y, WU X, *et al.* Eugenol attenuates transmissible gastroenteritis virus-induced oxidative stress and apoptosis via ROS-NRF2-ARE signaling[J/OL]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(9): 1838[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36139913/>. DOI: 10.3390/antiox11091838.
- [6] GALADARI S, RAHMAN A, PALLICHANKANDY S, *et al.* Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress?[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 104: 144-164. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004.
- [7] REDZA-DUTORDOIR M, AVERILL-BATES D A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(12): 2977-2992. DOI: 10.1016/j.bbamer.2016.09.012.
- [8] ZHAO L P, ZHENG R R, LIU L S, *et al.* Self-delivery oxidative stress amplifier for chemotherapy sensitized immunotherapy[J/OL]. Biomaterials, 2021, 275: 120970[2023-09-10]. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120970>. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120970.
- [9] JIANG M S, LI X, ZHANG J L, *et al.* Dual inhibition of endoplasmic reticulum stress and oxidation stress manipulates the polarization of macrophages under hypoxia to sensitize immunotherapy[J]. ACS Nano, 2021, 15(9): 14522-14534. DOI: 10.1021/acsnano.1c04068.
- [10] ZHOU Z W, WU H, YANG R X, *et al.* GSH depletion liposome adjuvant for augmenting the photothermal immunotherapy of breast cancer[J/OL]. Sci Adv, 2020, 6(36): eabc4373[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32917602/>. DOI: 10.1126/sciadv.abc4373.

- [11] LIU R L, PENG L Y, ZHOU L, *et al.* Oxidative stress in cancer immunotherapy: molecular mechanisms and potential applications [J/OL]. *Antioxidants*, 2022, 11(5): 853[2023-09-10]. <https://doi.org/10.3390/antiox11050853>. DOI: 10.3390/antiox11050853.
- [12] FRISONE D, FRIEDLAENDER A, ADDEO A, *et al.* The landscape of immunotherapy resistance in NSCLC[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 817548[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35515125/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.817548.
- [13] KHOJA L, DAY D, WEI-WU CHEN T, *et al.* Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(10): 2377-2385. DOI: 10.1093/annonc/mdx286.
- [14] PAUKEN K E, DOUGAN M, ROSE N R, *et al.* Adverse events following cancer immunotherapy: obstacles and opportunities[J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(6): 511-523. DOI: 10.1016/j.it.2019.04.002.
- [15] LIN H, PAN X P, FENG Z Y, *et al.* Automated whole-slide images assessment of immune infiltration in resected non-small-cell lung cancer: towards better risk-stratification[J/OL]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 261[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35672787/>. DOI: 10.1186/s12967-022-03458-9.
- [16] ABOELELLA N S, BRANDLE C, KIM T, *et al.* Oxidative stress in the tumor microenvironment and its relevance to cancer immunotherapy [J/OL]. *Cancers*, 2021, 13(5): 986[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33673398/>. DOI: 10.3390/cancers13050986.
- [17] WANG D P, BERGLUND A, KENCHAPPA R S, *et al.* BIRC3 is a novel driver of therapeutic resistance in Glioblastoma[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21710[2023-09-10]. <https://www.nature.com/articles/srep21710>. DOI: 10.1038/srep21710.
- [18] LOUKINOV D I, PUGACHEVA E, VATOLIN S, *et al.* BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(10): 6806-6811. DOI: 10.1073/pnas.092123699.
- [19] MONK M, HITCHINS M, HAWES S. Differential expression of the embryo/cancer gene ECSA(DPPA2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT4, in human preimplantation development[J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(6): 347-355. DOI: 10.1093/molehr/gan025.
- [20] DEBRUYNE D N, DRIES R, SENGUPTA S, *et al.* BORIS promotes chromatin regulatory interactions in treatment-resistant cancer cells[J]. *Nature*, 2019, 572(7771): 676-680. DOI: 10.1038/s41586-019-1472-0.
- [21] JANSSEN S M, MOSCONA R, ELCHEBLY M, *et al.* BORIS/CTCF promotes a switch from a proliferative towards an invasive phenotype in melanoma cells[J/OL]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 1 [2023-09-10]. <https://www.nature.com/articles/s41420-019-0235-x>. DOI: 10.1038/s41420-019-0235-x.
- [22] GONG M, YAN C S, JIANG Y, *et al.* Genome-wide bioinformatics analysis reveals CTCFL is upregulated in high-grade epithelial ovarian cancer[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4): 4030-4039. DOI: 10.3892/ol.2019.10736.
- [23] WONG K K, ROSTOMILY R, WONG S T C. Prognostic gene discovery in glioblastoma patients using deep learning[J/OL]. *Cancers*, 2019, 11(1): 53[2023-09-10]. <https://doi.org/10.3390/cancers11010053>. DOI: 10.3390/cancers11010053.
- [24] ZHU X Z, LIU X Y, QIU X W, *et al.* Prognostic roles of a novel basement membranes-related gene signature in lung adenocarcinoma [J/OL]. *Front Genet*, 2023, 14: 1100560[2023-09-10]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1100560>. DOI: 10.3389/fgene.2023.1100560.
- [25] ZHANG Y W, ZHENG Y, WANG J Z, *et al.* Integrated analysis of DNA methylation and mRNA expression profiling reveals candidate genes associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Epigenetics*, 2014, 9(6): 896-909. DOI: 10.4161/epi.28601.
- [26] TAKAHASHI K, EHATA S, MIYAUCHI K, *et al.* Neurotensin receptor 1 signaling promotes pancreatic cancer progression[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(1): 151-166. DOI: 10.1002/1878-0261.12815.
- [27] CHACHADI V B, ALI M F, CHENG P W. Prostatic cell-specific regulation of the synthesis of MUC1-associated sialyl Lewis A[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57416[2023-09-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057416>. DOI: 10.1371/journal.pone.0057416.
- [28] VERMA A, SINGH A, SINGH M P, *et al.* EZH2-H3K27me3 mediated KRT14 upregulation promotes TNBC peritoneal metastasis[J/OL]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7344[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36446780/>. DOI: 10.1038/s41467-022-35059-x.
- [29] CHEN A S, LIU H L, WU Y F, *et al.* Genetic variants in DDO and PEX5L in peroxisome-related pathways predict non-small cell lung cancer survival[J]. *Mol Carcinog*, 2022, 61(7): 619-628. DOI: 10.1002/mc.23400.
- [30] LIU T T, LI R, HUO C, *et al.* Identification of CDK2-related immune forecast model and ceRNA in lung adenocarcinoma, a pan-cancer analysis[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 682002[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34409029/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.682002.
- [31] SCHNEIDER H, RUDD C E. Diverse mechanisms regulate the surface expression of immunotherapeutic target ctla-4[J/OL]. *Front Immunol*, 2014, 5: 619[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25538704/>. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00619.
- [32] YOSHIMURA K, SUZUKI Y, INOUE Y, *et al.* CD200 and CD200R1 are differentially expressed and have differential prognostic roles in non-small cell lung cancer[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1): 1746554[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32395395/>. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1746554.
- [33] TANG C, SUN H Y, KADOKI M, *et al.* Blocking Dectin-1 prevents colorectal tumorigenesis by suppressing prostaglandin E2 production in myeloid-derived suppressor cells and enhancing IL-22 binding protein expression[J/OL]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1493[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36932082/>. DOI: 10.1038/s41467-023-37229-x.
- [34] ZHANG Y Y, ZHANG Z M. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(8): 807-821. DOI: 10.1038/s41423-020-0488-6.
- [35] ZHANG X, JI L L, LI M O. Control of tumor-associated macrophage responses by nutrient acquisition and metabolism[J]. *Immunity*, 2023, 56(1): 14-31. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.12.003.
- [36] WANG D, YANG L, YUE D L, *et al.* Macrophage-derived CCL22 promotes an immunosuppressive tumor microenvironment via IL-8

- in malignant pleural effusion[J]. *Cancer Lett*, 2019, 452: 244-253. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.03.040.
- [37] KUANG D M, ZHAO Q Y, PENG C, *et al.* Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(6): 1327-1337. DOI: 10.1084/jem.20082173.
- [38] HEDRICK C C, MALANCHI I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted[J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(3): 173-187. DOI: 10.1038/s41577-021-00571-6.
- [39] JAILLON S, PONZETTA A, DI MITRI D, *et al.* Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(9): 485-503. DOI: 10.1038/s41568-020-0281-y.
- [40] SHAUL M E, FRIDLENDER Z G. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(10): 601-620. DOI: 10.1038/s41571-019-0222-4.
- [41] GRISARU-TAL S, ITAN M, KLION A D, *et al.* A new dawn for eosinophils in the tumour microenvironment[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(10): 594-607. DOI: 10.1038/s41568-020-0283-9.
- [42] LIU L, BAI X, WANG J, *et al.* Combination of TMB and CNA stratifies prognostic and predictive responses to immunotherapy across metastatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(24): 7413-7423. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0558.
- [43] SINGAL G, MILLER P G, AGARWALA V, *et al.* Association of patient characteristics and tumor genomics with clinical outcomes among patients with non-small cell lung cancer using a clinicogenomic database[J]. *JAMA*, 2019, 321(14): 1391-1399. DOI: 10.1001/jama.2019.3241.
- [44] SAMSTEIN R M, LEE C H, SHOUSHARI A N, *et al.* Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2): 202-206. DOI: 10.1038/s41588-018-0312-8.
- [45] DEVARAKONDA S, ROTOLO F, TSAO M S, *et al.* Tumor mutation burden as a biomarker in resected non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(30): 2995-3006. DOI: 10.1200/JCO.2018.78.1963.
- [46] FALLAH M, SHEN Y, BRODÉN J, *et al.* Plasminogen activation is required for the development of radiation-induced dermatitis[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1051[2023-09-10]. <https://www.nature.com/articles/s41419-018-1106-8>. DOI: 10.1038/s41419-018-1106-8.
- [47] KIM J, KIM J, BAE J S. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy[J/OL]. *Exp Mol Med*, 2016, 48(11): e269[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27811934/>. DOI: 10.1038/emmm.2016.119.
- [48] NOGUEIRA V, HAY N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(16): 4309-4314. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1424.
- [49] TAFANI M, SANSONE L, LIMANA F, *et al.* The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 3907147[2023-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26798421/>. DOI: 10.1155/2016/3907147.
- [50] GORRINI C, HARRIS I S, MAK T W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(12): 931-947. DOI: 10.1038/nrd4002.
- [收稿日期] 2023-09-14 [修回日期] 2023-12-15
[本文编辑] 向正华