DOI:10.16016/j.2097-0927.202110066

ADAP2 基因与肺鳞癌患者预后及肿瘤微环境免疫细胞浸润的关联研究

陈 峥,向 颖,邬 娜,夏婷婷,单亦凡,谢薇佳,许 斌,袁志权,胡 琴,贾潇岳,吴 龙,李亚斐
400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系军队流行病学教研室

[**摘要**] **目的** 分析 ADAP2 基因与肺鳞癌患者预后及其与肿瘤微环境免疫细胞浸润的关联。**方法** 下载 TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库肺鳞癌患者临床信息和癌组织 ADAP2 基因转录水平,运用 KM 生存曲线和 Cox 比例风险模型分析 ADAP2 基因和患者预后的关联;采用 xCell 数据库分析 ADAP2 基因表达和肿瘤微环境免疫浸润的关系;利用免疫荧光双染实验观察 ADAP2 蛋白与 M2 型巨噬细胞标志物 CD163 的空间共定位。**结果** 多因素 Cox 分析结果显示,ADAP2 表达是肺鳞癌患者独立的预后因素,其高表达与肺鳞癌患者不良预后密切相关(HR=1.533,95%CI:1.139~2.064,P=0.005)。ADAP2 基因与肿瘤微环境评分呈正相关(r=0.609,95%CI:0.550~0.661,P<0.001),与免疫评分也同样呈正相关(r=0.596,95%CI:0.536~0.650,P<0.001)。ADAP2 基因与肺鳞癌单核吞噬细胞系统(巨噬细胞、巨噬细胞 M1、巨噬细胞 M2、单核细胞)的浸润呈高度正相关(r=0.737、0.718、0.603、0.631,P<0.001)。ADAP2 与 CD163 存在共定位,主要表达于细胞膜。**结论** ADAP2 有望成为预测肺鳞癌患者预后和免疫治疗效果的潜在生物标志物。

[**关键词**] 肺鳞癌;ADAP2;肿瘤免疫微环境;预后;生物信息分析;xCell 算法
[**中图法分类号**] R394.3; R730.7; R734.2 [**文献标志码**] A

Association of ADAP2 gene with prognosis and immune infiltration in tumor microenvironment in patients with lung squamous cell carcinoma

CHEN Zheng, XIANG Ying, WU Na, XIA Tingting, SHAN Yifan, XIE Weijia, XU Bin, YUAN Zhiquan, HU Qin, JIA Xiaoyue, WU Long, LI Yafei Department of Military Epidemiology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the correlation between ADAP2 gene and immune infiltration in tumor microenvironment in lung squamous cell carcinoma (LUSC), and to explore the prognostic values of ADAP2 in patients with LUSC. **Methods** The clinical information of patients with LUSC as well as the data of ADAP2 mRNA levels in cancer tissues were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The association between ADAP2 gene and prognosis of patients was subsequently analyzed using Kaplan-Meier survival curve and Cox risk model analyses. xCell database was adopted to analyze the correlation of ADAP2 expression with immune infiltration in tumor microenvironment. Immunofluorescence double-staining test was employed to observe the co-localization of ADAP2 protein and CD163 (a specific biomarker of M2 macrophage). **Results** Multivariate Cox analysis showed that the expression of ADAP2 was an independent prognostic factor for LUSC patients, and its high expression was closely associated with the poor prognosis of patients (HR=1.533, 95%CI: 1.139~2.064, P=0.005). xCell analysis indicated that ADAP2 gene was positively correlated with both the tumor microenvironment score (r=0.609, 95%CI: 0.550~0.661, P<0.001),

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81871896)
[**通信作者**] 李亚斐,E-mail:liyafei2008@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and the immune infiltration score ($r=0.596$, 95%CI: 0.536~0.650, $P<0.001$), and the expression of ADAP2 also showed a high positive association with mononuclear phagocyte system (macrophage, macrophage M1, macrophage M2 and monocyte) in LUSC ($r=0.737$, 0.718, 0.603 and 0.631, respectively, $P<0.001$). Moreover, ADAP2 presented co-localization with CD163 and was mainly expressed in the cell membrane. **Conclusion** ADAP2 can act as a potential biomarker for predicting prognosis and evaluating the efficacy of immunotherapy in LUSC.

[**Key words**] lung squamous cell carcinoma; ADAP2; tumor immune microenvironment; prognosis; bioinformatics analysis; xCell algorithm

Supported by the General Program of National Natural Foundation of China(81871896). Corresponding author: LI Yafei, E-mail: liyafei2008@hotmail.com

2020年全球癌症统计数据显示,肺癌的发病率居第2位,死亡率位居首位[1]。肺鳞癌为肺癌第2高发亚型。肺鳞癌患者由于早期诊断困难,5年生存率较低,仅为12.4%[2]。晚期肺癌的治疗在经历了化学治疗、分子靶向治疗之后,目前已进入以免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors,ICIs)为代表的免疫治疗时代。但是当前免疫治疗取得重大突破的同时,仍旧存在诸多问题。纳武利尤单抗(PD-1单抗)的临床研究表明,单药用于未经选择的晚期非小细胞肺癌患者的有效率仅在20%左右。如何选择潜在获益人群,提高有效率是肺癌免疫治疗领域迫切需要解决的关键问题。

肿瘤微环境是由基质细胞、免疫细胞和血管等组成的局部病理环境。多项研究表明,肿瘤微环境生物标记物可预测晚期黑色素瘤患者的预后,免疫相关的肿瘤生物标志物的基线表达水平与免疫治疗的疗效密切相关[3-4]。进一步研究表明,免疫微环境中免疫基因的特征表达,可能是预测抗PD-1或抗PD-L1治疗效果的潜在生物标记物[5]。

ADAP2是具有ADP核糖基化因子(ARFs)GTP酶激活蛋白(GAP)结构域的蛋白质家族成员,该基因编码的蛋白质可与beta-微管蛋白结合,增加微管的稳定性,在免疫系统中已被证实是具有重要功能的干扰素刺激基因[6]。ADAP2基因表达在部分肿瘤中有预后价值。例如在原发性低分化的胶质瘤患者中,ADAP2基因具有预后预测价值[7]。ADAP2在肺鳞癌中作用的研究较少,目前尚不清楚其免疫治疗效果和预后预测中的价值。本研究利用公共数据库,分析ADAP2与肺鳞癌预后的关联,评估ADAP2基因表达与肿瘤免疫浸润的相关性,探讨其在肺鳞癌免疫微环境中的可能作用,为深入研究ADAP2基因在肺鳞癌发生、发展和免疫治疗中的作用机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 公共数据库

TCGA数据库:TCGA数据库是癌症基因组图谱数据库,在肺鳞癌相关研究中,TCGA数据库涵盖了Illumina RNA-seq基因表达数据,包括肿瘤分级和生存情况的临床数据等信息,我们根据是否涵盖表达谱数据和临床数据,最终筛选了501例肺鳞癌患者。

GEO数据库:是一个公共功能基因组学数据库。我们搜索了涵盖Illumina RNA-seq基因表达数据的肺鳞癌数据,最终纳入249例肺鳞癌患者进行分析(GSE157009)[8]。

1.2 肿瘤免疫浸润分析

xCell算法是2017年研发的计算肿瘤微环境中各种细胞存在的量的评估方法。它通过各种细胞类型样品的RNA-seq测序和基因芯片数据,针对适应性和固有免疫细胞、造血祖细胞、上皮细胞和细胞外基质细胞在内的64种细胞亚型,以数字矩阵的方式展现了肿瘤微环境中的各个细胞表达情况。它是迄今为止最全面的细胞计数免疫表型的比较工具[9]。细胞评分即分别代表上述64种细胞在肿瘤微环境中的表达水平;肿瘤微环境评分代表上述64种细胞在肿瘤微环境中的整体表达水平;免疫评分代表肿瘤微环境中已知的35种免疫细胞的整体浸润水平[9]。

1.3 GSEA富集分析

采用GSEA(4.1.0版本)进行基因富集分析,各参数均参照常规条件设置[10]。显著富集的基因集定义为多种检验校正(false discovery rate,FDR)<0.05,且$P<0.05$的基因集。

1.4 String蛋白网络分析

String(11.0版本)数据库旨在整合蛋白质之间所有已知和预测的关联,包括物理相互作用和功能关联。证据主要来自于科学文献的自动文本挖掘、相互作用实验和带注释的复合物通路数据库[11]。参数选择为①“Protein Name: ADAP2”;②“Organism: Homo sapiens”。

1.5 预后分析

首先将临床变量进行单因素 Cox 比例风险回归分析,以 $P<0.2$ 筛选可能的协变量,而后将年龄、性别、吸烟史以及筛选出的协变量纳入后续的多因素 Cox 风险回归分析[12]。

X-tile 软件可以将结局的界值优化,找到最佳的截断值[13],应用该软件将 TCGA 数据库中患者的 ADAP2 mRNA 表达量分为高水平组和低水平组。运用多因素 Cox 风险回归模型分析 ADAP2 mRNA 水平与总生存期(overall survival, OS)预后的关联[12],同时计算 P 值和风险率值(hazard ratio, *HR*)。使用 SPSS 23.0 统计软件进行预后分析,使用 Graphpad Prism 8.0 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。

1.6 免疫荧光双染

选取 2014 年 1-10 月在陆军军医大学第二附属医院初次诊断并接受手术的 5 例肺鳞癌患者的石蜡标本,所有标本的非癌细胞含量均在 40%左右。其中Ⅰa 期、Ⅰb 期、Ⅱa 期、Ⅱb 期和Ⅲa 期分别取 1 例,分期标准按照中华医学会临床诊疗指南(2018 版)界定。样本均为女性,平均年龄 61 岁(标准差 3.5 岁)。患者均签署知情同意书,本研究经陆军军医大学第二附属医院医学伦理委员会审批(伦审研第 2015030 号)。

选择含有 40%肺鳞癌微环境的肺鳞癌石蜡组织样本进行切片,先后将切片放入二甲苯、乙醇、蒸馏中水洗,完成石蜡切片脱蜡过程。将组织切片修复后用组化笔在组织周围画圈并完成封闭。甩掉封闭液后在切片上滴加 ADAP2 抗体(圣克鲁斯生物技术公司)并孵育过夜。PBS 脱色后滴加 FITC 抗体并孵育。滴加 CD163 抗体(圣克鲁斯生物技术公司)并孵育过夜。PBS 脱色后滴加 CY3 抗体并孵育 50 min。DAPI 复染细胞核后最终采集图像。双染后的组织切片使用 PANNORAMIC 扫描仪进行全景扫描,采用 CaseViewer2.4 软件进行观察和图像采集,应用 Halo v3.0.311.314 分析软件中的 Indica Labs - HighPlex FL v3.1.0 模块,分别定量每张切片的阳性细胞数、共定位细胞数和总细胞数。

1.7 统计学分析

采用单因素和多因素 COX 生存分析法分析 ADAP2 mRNA 表达与肺鳞癌患者临床预后的关系,采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。采用 Spearman 相关性分析评价 ADAP2 mRNA 表达与肿瘤免疫浸润的关系,相关性强度如下:0.00~0.19“非常弱”,0.20~0.39“弱”,0.40~0.59“中等”,0.60~0.79“强”,0.80~1.0“非常强”。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADAP2 与肺鳞癌患者预后的关联分析

TCGA 数据集中肺鳞癌患者的人口学统计特征及一般临床信息见表 1。共有 501 例肺鳞癌患者,平均年龄 67.2 岁,中位随访时间 660 d。

将 501 例肺鳞癌患者分为 ADAP2 高表达组和 ADAP2 低表达组。其中高表达组 189 例,低表达组 312 例。Kaplan-Meier 曲线表明,ADAP2 高表达组肺鳞癌患者的预后较差(log-rank 检验 $P=0.005$,图 1)。

对肺鳞癌患者分别进行单因素和多因素 Cox 比例风险回归分析(表 2)。单因素 Cox 比例风险回归分析筛选出 ADAP2 表达水平($P=0.005$)、病理分期($P=0.001$)、放疗($P=0.052$)、化疗($P=0.051$)4 个有统计学意义的协变量,考虑到性别、年龄和吸烟史与肺鳞癌预后密切相关,因而被共同列入多因素 Cox 模型分析的协变量。Cox 多因素分析矫正上述协变量后,结果显示 ADAP2 mRNA 表达量是肺鳞癌 OS 的独立预后因素(*HR*=1.533,95%*CI*:1.139~2.064,$P=0.005$)。

表 1 TCGA 数据集中肺鳞癌患者的临床和人口统计学特征

临床特征	患者($n=501$)
中位随访时间(四分位数)/d	660(322,1 268)
年龄($\bar{x}\pm s$)/岁	67.2±8.6
性别[例(%)]	
男性	371(74.1)
女性	130(25.9)
吸烟史[例(%)]	
吸烟	471(94.0)
不吸烟	18(3.6)
缺失值	12(2.4)
病理分期[例(%)]	
Ⅰ	244(48.7)
Ⅱ	165(32.9)
Ⅲ/Ⅳ	92(18.4)
放疗[例(%)]	
是	65(13.0)
否	436(87.0)
化疗[例(%)]	
是	142(28.3)
否	359(71.7)

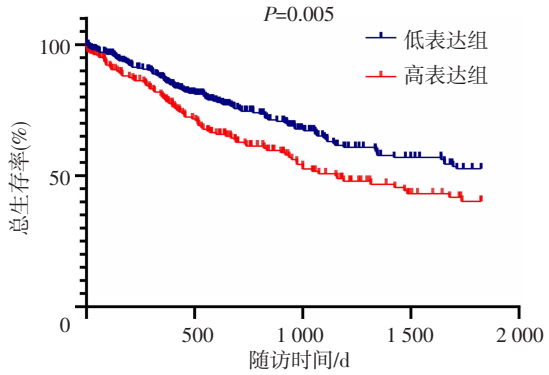


图 1 不同 ADAP2 基因表达肺鳞癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

2.2 ADAP2 表达与肿瘤微环境评分的相关性分析

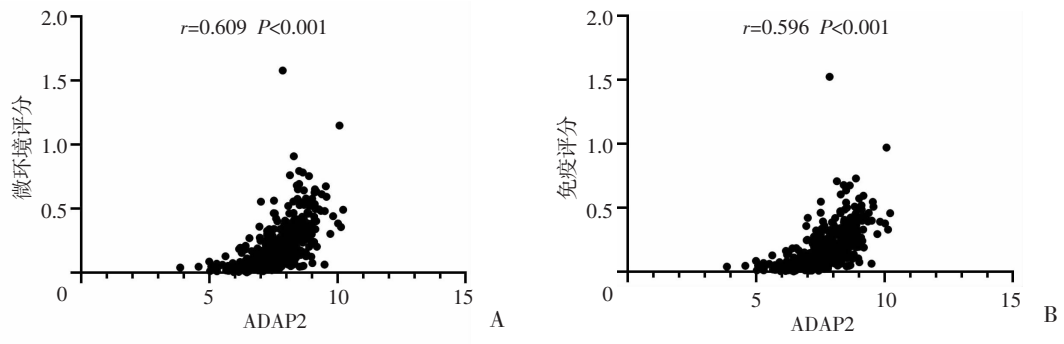
使用 xCell 分析 ADAP2 表达在肺鳞癌肿瘤微环境中的分布情况。将 501 例样本 ADAP2 表达数据同肺鳞癌微环境评分和免疫评分组合,而后应用 GraphPad 8.0 进行相关性分析。结果显示 ADAP2 基因表达与肺鳞癌微环境评分呈正相关(r = 0.609, 95% CI: 0.550~0.661, P<0.001,图 2A)。ADAP2 基因表达与肺鳞癌免疫评分同样为正相关(r = 0.596, 95% CI: 0.536~0.649, P<0.001,图 2B)。

2.3 ADAP2 表达与肺鳞癌肿瘤微环境免疫浸润细胞的关联

在 xCell 免疫细胞评分数据库中,检索 TCGA 免疫微环境数据,获取 36 种肿瘤免疫微环境细胞的富集分数,并与 ADAP2 基因表达进行匹配,而后进行相关性分析。结果显示 ADAP2 基因表达与巨噬细胞、巨噬细胞 M1 和 M2、单核细胞、活化树突状细胞呈强正相关(相关系数 r 分别为 0.737、0.718、0.603、0.631、0.630, P<0.001,图 3)。应用 GEO 数据库中的 GSE157009 数据集进行验证,结果同样显示 ADAP2 基因表达与巨噬细胞、巨噬细胞 M1、巨噬细胞 M2、单核细胞、活化树突状细胞呈强正相关(r 分别为 0.676、0.647、0.652、0.524、0.628, P<0.001,图 4)。

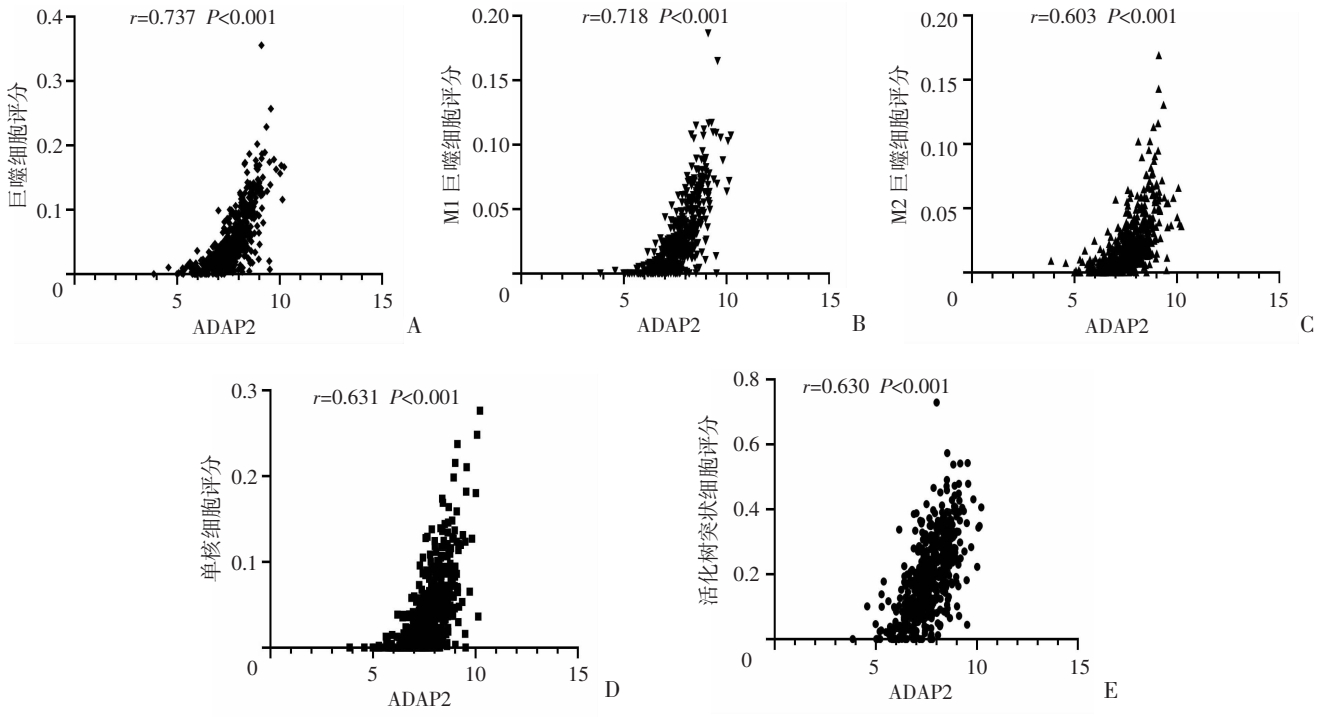
表 2 Cox 比例风险回归分析 ADAP2 表达水平与肺鳞癌患者 OS 预后的关联

协变量	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%*CI*)	*P* 值	*HR*(95%*CI*)	*P* 值
年龄	1.010(0.993~1.028)	0.249	1.012(0.994~1.030)	0.203
性别				
女性	参照		参照	
男性	1.292(0.912~1.831)	0.149	1.335(0.939~1.899)	0.108
分期				
Ⅰ	参照		参照	
Ⅱ	1.242(0.883~1.746)	0.213	1.484(1.041~2.115)	0.029
Ⅲ/Ⅳ	1.813(1.256~2.617)	0.001	1.926(1.306~2.842)	0.001
吸烟史				
不吸烟	参照		参照	
吸烟	1.824(0.583~5.714)	0.302	1.749(0.556~5.506)	0.339
放疗				
否	参照		参照	
是	0.690(0.475~1.003)	0.052	0.655(0.436~0.984)	0.042
化疗				
否	参照		参照	
是	0.713(0.507~1.001)	0.051	0.536(0.368~0.782)	0.001
ADAP2 表达水平				
低表达	参照		参照	
高表达	1.230(1.063~1.424)	0.005	1.533(1.139~2.064)	0.005



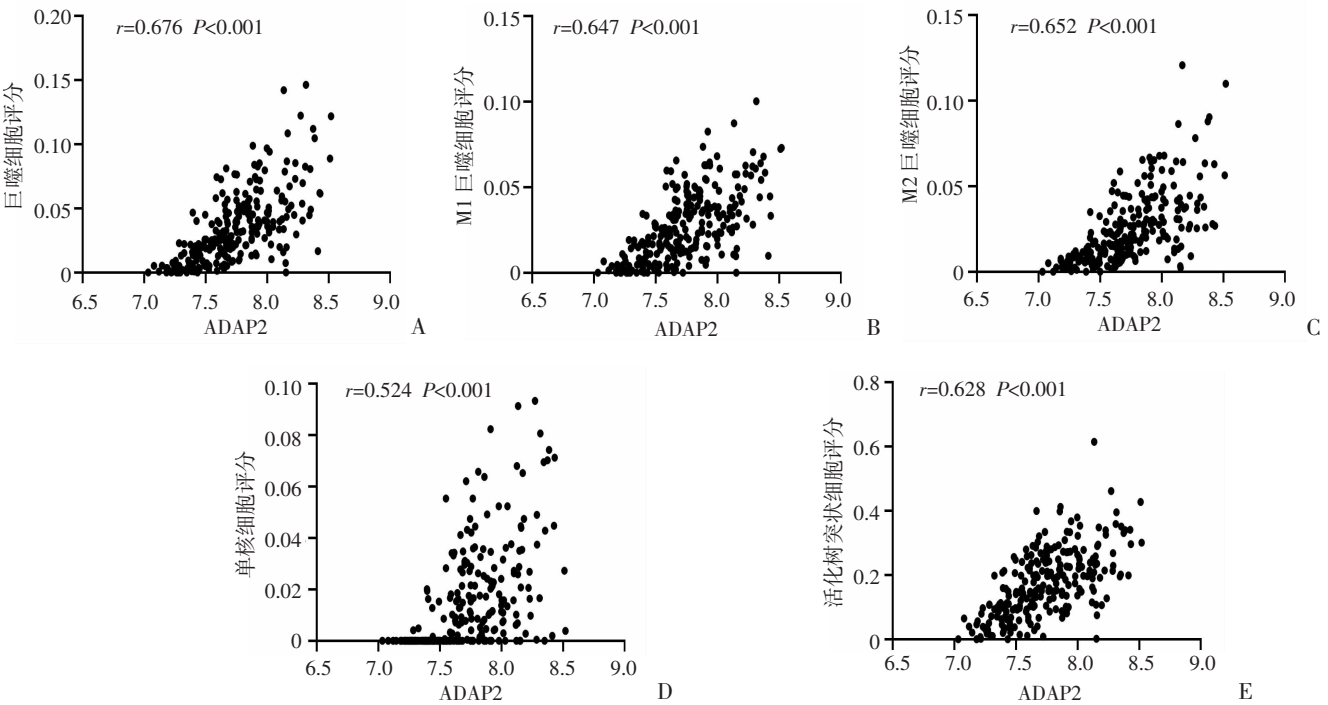
A:ADAP2 基因表达与肿瘤微环境评分相关性;B:ADAP2 基因表达与免疫评分相关性

图 2 ADAP2 基因表达与肺鳞癌组织免疫浸润丰度的关系



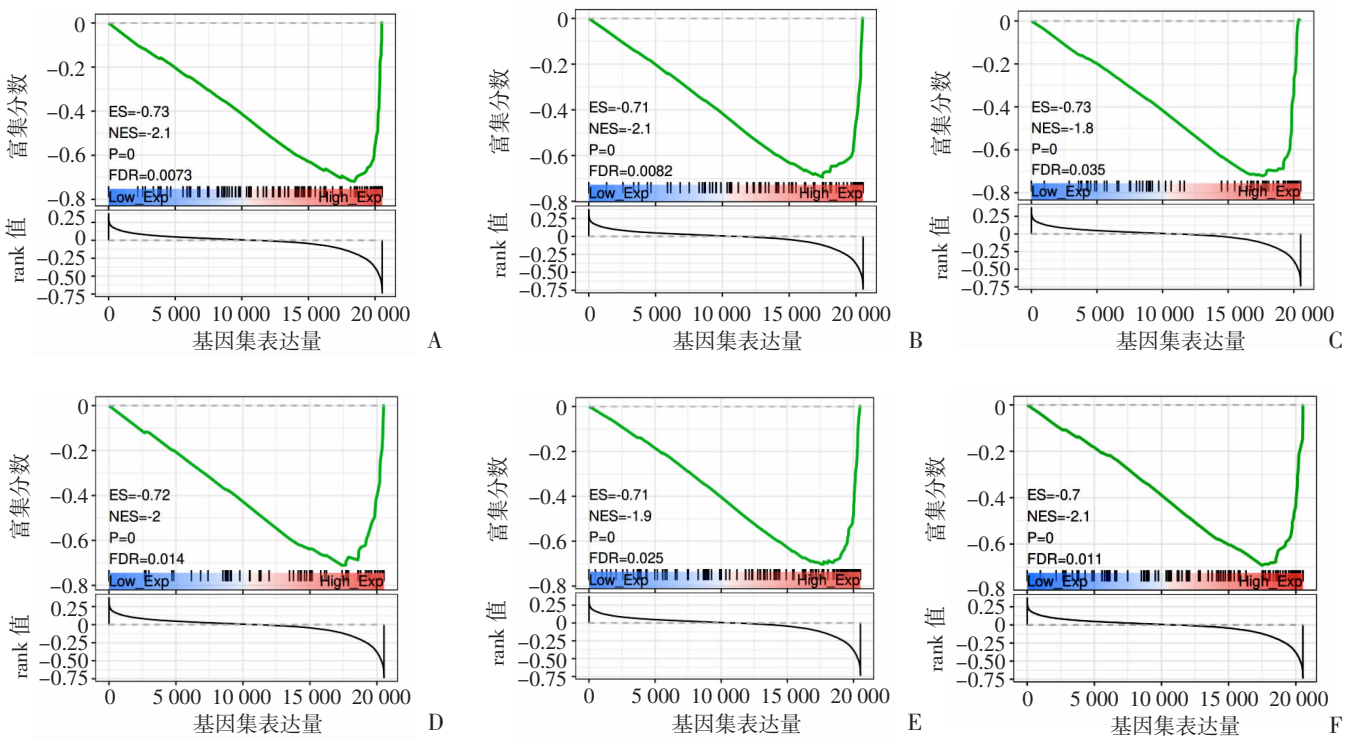
A:ADAP2 基因表达与巨噬细胞评分相关性分析;B:ADAP2 基因表达与 M1 型巨噬细胞评分相关性分析;C:ADAP2 基因表达与 M2 型巨噬细胞评分相关性分析;D:ADAP2 基因表达与单核细胞评分相关性分析;E:ADAP2 基因表达与活化树突状细胞评分相关性分析

图 3 TCGA 样本中 ADAP2 基因表达与免疫细胞表达相关性分析



A:ADAP2 基因表达与巨噬细胞评分相关性分析;B:ADAP2 基因表达与 M1 型巨噬细胞评分相关性分析;C:ADAP2 基因表达与 M2 型巨噬细胞评分相关性分析;D:ADAP2 基因表达与单核细胞评分相关性分析;E:ADAP2 基因表达与活化树突状细胞评分相关性分析

图 4 GSE157009 样本中 ADAP2 基因表达与免疫细胞表达相关性分析



A:T 细胞受体信号通路;B:B 细胞受体信号通路;C:抗原处理和递呈通路;D:NOD 样受体信号通路;E:自然杀伤细胞介导的细胞毒性;F:TOLL 样受体信号通路

图 5 ADAP2 基因 GSEA 通路分析

2.4 富集分析

为了在信号通路层面探讨 ADAP2 基因在肺鳞癌免疫微环境中的可能作用机制,采用 GSEA 系统分析 ADAP2 基因在免疫方面的功能以及上、下游信号通路。结果显示,ADAP2 表达与 T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路、抗原处理和递呈通路、NOD 样受体信号通路(免疫应答)、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、TOLL 样受体信号通路(抗原呈递)高度负相关(图 5)。提示 ADAP2 基因主要富集在免疫相关通路,且可能对免疫通路存在抑制作用。

应用 String 数据库探索 ADAP2 基因表达的蛋白互作情况,结果显示 ADAP2 蛋白与 TEFM、C1QA、MS4A6A、ARF6、ATAD5、C1QB、CRLF3、CSF1R、TYROBP、UTP6 十个蛋白可能有直接相互作用(图 6),提示其表达的蛋白有细胞代谢、免疫调节相关作用。

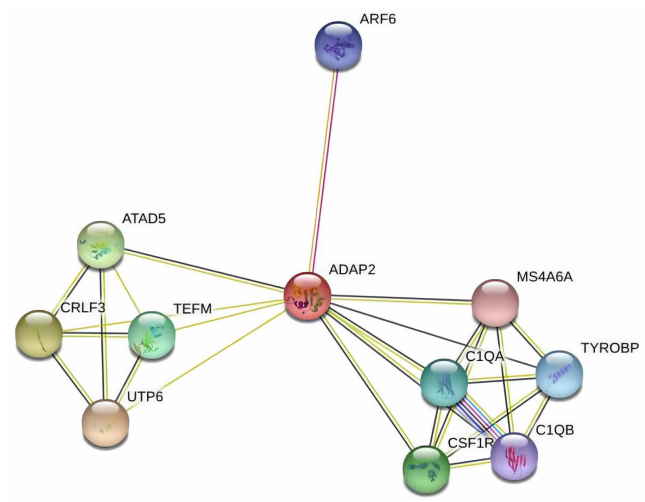
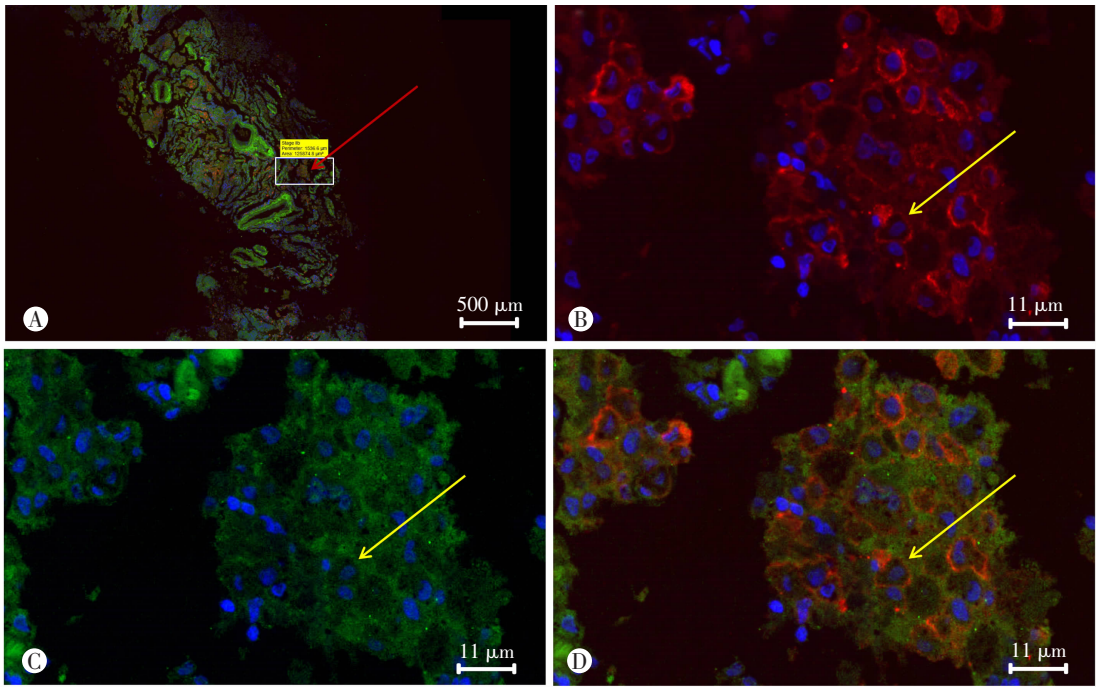


图 6 ADAP2 基因 String 蛋白网络



红色荧光标记 CD163 蛋白,绿色荧光标记 ADAP2 蛋白,DAPI 荧光标记细胞核,红色箭头示图 B、C、D 放大区域,黄色箭头示特征细胞 A:ADAP2 与 CD163 在肺鳞癌组织中的表达;B:CD163 表达情况;C:ADAP2 表达情况;D:ADAP2 与 CD163 表达情况

图 7 免疫荧光染色观察 ADAP2 抗体和 CD163 抗体在肺鳞癌组织中的表达

表 3 5 例样本 ADAP2 和 CD163 抗体免疫荧光染色定量分析结果

标本编号	样本分期	总细胞数	ADAP2 阳性细胞数	CD163 阳性细胞数	ADAP2 与 CD163 共表达阳性细胞数	ADAP2 阳性细胞占总细胞数的比例	CD163 阳性细胞占总细胞数的比例	ADAP2 与 CD163 共表达细胞数占总细胞数的比例
1	Ⅰa	72 036	47 223	850	426	65.55%	1.18%	0.59%
2	Ⅰb	70 975	62 476	121	121	88.03%	0.17%	0.17%
3	Ⅱa	43 900	26 848	2 381	1 658	61.16%	5.42%	3.78%
4	Ⅱb	82 917	80 902	10 288	10 228	97.57%	12.41%	12.34%
5	Ⅲa	61 372	18 078	2 897	1 503	29.46%	4.72%	2.45%

2.5 肺鳞癌患者癌症组织切片中 CD163 和 ADAP2 共表达

免疫荧光双染结果显示,ADAP2 在肺鳞癌环境中整体表达量较高(图 7A),ADAP2 和 CD163 均表达在细胞膜上(图 7B、C),表达存在明显的共定位(图 7D)。5 例样本的定量分析结果如表 3 所示,ADAP2 阳性细胞数量占比均高于 CD163 阳性细胞数量占比,提示不同临床分期的鳞癌组织局部微环境中,ADAP2 存在较高的表达。

3 讨论

有研究表明,ADAP2 基因是干扰素的刺激基因,它集成了 RIG-I 信号的上游和下游模块,并促进Ⅰ型干扰素的产生[6]。进一步研究表明,ADAP2 基因编码的蛋白能移位到细胞膜并结合磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PtdInsP3)和肌醇 1,3,4,5-四磷酸(InsP4)[14],即证明其在细胞膜表达并发挥作用。在成人低度神经胶质瘤中,该基因同样被发现具有预后价值[7],然而,ADAP2 基因与肺鳞癌的相关分析暂无报道。鉴于此,本研究进一步在公共数据库中分析 ADAP2 基因对肺鳞癌预后有何影响,采用 TCGA 数据进行 Cox 多因素生存分析,结果显示,在包括年龄、肿瘤分期等协变量的影响下,ADAP2 高表达仍旧是肺鳞癌患者 OS 的独立危险因素。

肿瘤免疫微环境主要包括基质细胞和免疫细胞,其中免疫细胞的浸润程度被认为与肿瘤的发生、发展高度相关,肿瘤中各个特定浸润免疫细胞亚群的量的改变同样影响患者的预后[15]。同时,随着包括 CTLA4 和 PD-L1/PD-1 免疫检查位点的发现和单抗的使用,免疫疗法已被证明是治疗多种癌症的有效方法[16],但

真正有效的只有一小部分病例。当前,还没有研究证明 ADAP2 基因与肺鳞癌免疫浸润程度之间的关系。因此,本研究使用 xCell 数据库,全面分析 ADAP2 基因表达与肺鳞癌免疫微环境中各类免疫细胞浸润之间的相关性。结果显示,在肺鳞癌中,ADAP2 表达与肿瘤微环境评分存在正相关,且 ADAP2 表达与免疫微环境评分存在正相关,提示 ADAP2 主要在肿瘤微环境中表达,并可能在免疫微环境中发生作用。

ADAP2 表达与免疫浸润细胞相关性分析显示,ADAP2 基因表达与巨噬细胞、巨噬细胞 M1、巨噬细胞 M2、单核细胞、活化树突状细胞在肺鳞癌免疫微环境中占比呈强正相关。多项流行病学及临床研究表明,实体肿瘤中巨噬细胞的高浸润水平预示着患者预后不良,在大多数癌症患者化疗过程中发现,巨噬细胞的浸润程度与耐药相关[17],例如肝癌[18]、肺癌[19]、肾癌[20]、霍奇金淋巴瘤[21]。巨噬细胞可以与肿瘤细胞进行异质性融合[22],尤其是 M2 巨噬细胞,可产生抑制性细胞因子,如 IL-10、TGF-β、活性氧、一氧化氮合成酶和精氨酸酶,抑制细胞毒性 T 细胞功能,从而帮助肿瘤细胞进行免疫逃逸和远处转移[22-23]。据此我们推测,ADAP2 可能通过促进干扰素的生成,影响单核吞噬细胞系统[24],尤其是影响 M2 巨噬细胞与肺鳞癌细胞之间的相互作用,进而调控肺鳞癌的进展。同时,也有研究表明,干扰素可以促进树突状细胞的激活[25],树突状细胞中的内质网应激同样促进癌症发生、发展[26]。提示 ADAP2 可能介导干扰素的生成,促进 M2 巨噬细胞的聚集和树突状细胞的活化,进而造成肺鳞癌不良预后。

那么,ADAP2 还可能影响哪些通路,进而影响肺鳞癌预后,为此我们进行了富集分析。GSEA 富集分析显示 ADAP2 表达主要抑制了 T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路、抗原处理和递呈通路、NOD 样受体信号通路(免疫应答)、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、TOLL 样受体信号通路(抗原呈递),这些通路的抑制均有利于肺鳞癌的发生、发展。String 蛋白网络分析显示,该基因表达蛋白与 TEFM、C1QA、MS4A6A、ARF6、ATAD5、C1QB、CRLF3、CSF1R、TYROBP、UTP6 十个蛋白可能有直接相互作用,提示其表达的蛋白有细胞代谢、免疫调节相关作用。CTLA4 和 PD-L1/PD-1 免疫检查位点单抗的应用已经有明确的临床意义,其表达蛋白均富集于细胞膜并发挥着免疫逃逸作用[27]。那么,ADAP2 基因如果对免疫通路具有抑制作用,其表达的蛋白可能与 CTLA4 和 PD-L1/PD-1 一样高表达于细胞膜上。为此,我们在肺鳞癌组织切片中,对 ADAP2 蛋白和 M2 巨噬细胞特异表达膜蛋白 CD163 进行了免疫荧光双染,其染色结果证明,ADAP2 与 CD163 共表达于细胞膜。

本研究还存在一定的不足,研究的结果主要是建立在生物信息学分析的基础上,为下一步研究提供了重要线索,但是 ADAP2 在肿瘤微环境中的免疫调节作用和机制需要进一步的试验验证;研究初步发现 ADAP2 与 CD163 存在共定位,但是两者的表达水平是否存在关联尚需要扩大样本量进行研究。

综上所述,ADAP2 高表达与肺鳞癌不良预后相关。同时 ADAP2 在细胞膜高表达,并与肺鳞癌微环境的单核吞噬细胞系统浸润呈正相关。ADAP2 有望成为肺鳞癌潜在的预后生物标志物,其在肺鳞癌肿瘤微环境中的作用和机制值得进一步研究。

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 A Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] THORSTEINSSON H, ALEXANDERSSON A, OSKARSDOTTIR G N, *et al*. Resection rate and outcome of pulmonary resections for non-small-cell lung cancer: a nationwide study from Iceland[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(7): 1164-1169. DOI: 10.1097/jto.0b013e318252d022.

[3] HAMID O, SCHMIDT H, NISSAN A, *et al*. A prospective phase Ⅱ trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma[J]. J Transl Med, 2011, 9: 204. DOI: 10.1186/1479-5876-9-204.

[4] CHEN P L, ROH W, REUBEN A, *et al*. Analysis of immune signatures in longitudinal tumor samples yields insight into biomarkers of response and mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade[J]. Cancer Discov, 2016, 6(8): 827-837. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-15-1545.

[5] JOHNSON D B, ESTRADA M V, SALGADO R, *et al*. Melanoma-specific MHC-II expression represents atumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10582. DOI: 10.1038/ncomms10582.

[6] BIST P, KIM S S Y, PULLOOR N K, *et al*. ArfGAP domain-containing protein 2 (ADAP2) integrates upstream and downstream modules of RIG-I signaling and facilitates type I interferon production[J]. Mol Cell Biol, 2017, 37(6): e00537-16. DOI: 10.1128/MCB.00537-16.

[7] ZHANG M, WANG X, CHEN X, *et al*. Prognostic value of astemness index-associated signature in primary lower-grade glioma[J]. Front Genet, 2020, 11: 441. DOI: 10.3389/

fgene.2020.00441.

[8] BUENO R, RICHARDS W G, HARPOLE D H, *et al*. Multi-institutional prospective validation of prognostic mRNA signatures in early stage squamous lung cancer (alliance)[J]. J Thorac Oncol, 2020, 15(11): 1748-1757. DOI: 10.1016/j.jtho.2020.07.005.

[9] ARAN D, HU Z, BUTTE A J. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape[J]. Genome Biol, 2017, 18(1): 220. DOI: 10.1186/s13059-017-1349-1.

[10] 段怡平, 陈梁玥, 柳家翠, 等. 基于TCGA数据库分析PFKFB4在肝细胞癌的临床意义及分子机制[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(1): 25-29. DOI: 10.19930/j.cnki.jmdt.2021.01.007.
DUAN Y P, CHEN L Y, LIU J C, *et al*. Analysis of the clinical significance and molecular mechanism of PFKFB4 in hepatocellular carcinoma based on the TCGA database[J]. J Mol Diagn Ther, 2021, 13(1): 25-29. DOI: 10.19930/j.cnki.jmdt.2021.01.007.

[11] SZKLARCZYK D, GABLEA 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.

[12] 陈梦雷, 袁帅, 周玫余, 等. 长链非编码RNA SFTA1P在肺腺癌中的表达及预后预测研究[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(21): 2075-2080, 2115. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202005271.
CHEN M L, YUAN S, ZHOU M Y, *et al*. Expression of long non-coding RNA SFTA1P in lung adenocarcinoma and its predictive value for prognosis[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(21): 2075-2080, 2115. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202005271.

[13] CAMP R L, DOLLED-FILHART M, RIMM D L. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-pointoptimization[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(21): 7252-7259. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-04-0713.

[14] SHU Q, LENNEMANN N J, SARKAR S N, *et al*. ADAP2 is an interferon stimulated gene that restricts RNA virus entry[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(9): e1005150. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005150.

[15] LIU X, WU S, YANG Y, *et al*. The prognostic landscape of tumor-infiltrating immune cell and immunomodulators in lung cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 55-61. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.003.

[16] CHEN D S, MELLMAN I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point[J]. Nature, 2017, 541(7637): 321-330. DOI: 10.1038/nature21349.

[17] BINGLE L, BROWN N J, LEWIS C E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies[J]. J Pathol, 2002, 196(3): 254-265. DOI: 10.1002/path.1027.

[18] YEUNG O W, LO C M, LING C C, *et al*. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2015, 62(3): 607-616. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.10.029.

[19] SCHMALL A, AL-TAMARI H M, HEROLD S, *et al*. Macrophage and cancer cell cross-talk *via* CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(4): 437-447. DOI: 10.1164/rccm.201406-1137oc.

[20] ROUMENINA L T, DAUGAN M V, NOÉ R, *et al*. Tumor cells hijack macrophage-produced complement C1q to promote tumor growth[J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7(7): 1091-1105. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-18-0891.

[21] STEIDL C, LEE T, SHAH S P, *et al*. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma[J]. N Engl J Med, 2010, 362(10): 875-885. DOI: 10.1056/nejmoa0905680.

[22] PAWELEK J M. Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(12): 988-993. DOI: 10.1016/s1470-2045(05)70466-6.

[23] FRANCIAN A, MANN K, KULLBERG M. Complement C3-dependent uptake of targeted liposomes into human macrophages, B cells, dendritic cells, neutrophils, and MDSCs[J]. Int J Nanomed, 2017, 12: 5149-5161. DOI: 10.2147/ijn.s138787.

[24] YIN Z, ZHOU Y, MA T, *et al*. Down-regulated lncRNA SBF2-AS1 in M2 macrophage-derived exosomes elevates miR-122-5p to restrict XIAP, thereby limiting pancreatic cancer development[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(9): 5028-5038. DOI: 10.1111/jcmm.15125.

[25] LAMBERTI M J, MENTUCCI F M, ROSELLI E, *et al*. Photodynamic modulation of type 1 interferon pathway on melanoma cells promotes dendritic cell activation[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2614. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02614.

[26] GARRIS C S, PITTET M J. ER stress in dendritic cells promotes cancer[J]. Cell, 2015, 161(7): 1492-1493. DOI: 10.1016/j.cell.2015.06.006.

[27] HOOS A. Development of immuno-oncology drugs—from CTLA4 to PD1 to the next generations[J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(4): 235-247. DOI: 10.1038/nrd.2015.35.

(收稿:2021-10-13;修回:2021-12-01)
(编辑 王 红)