DOI:10.16016/j.2097-0927.202305038

干扰素诱导基因 IFIT1 与卵巢癌免疫浸润及预后的相关性

王瑞伟,李凤杰,梁小龙,周 鑫,刘丽萍,李秋蓉,何明敏,李宇迪 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院妇产科

[摘要] **目的** 探讨干扰素诱导基因 IFIT1 与卵巢癌免疫浸润及预后的相关性。**方法** 通过 GEO 数据库筛选肿瘤免疫相关基因,Kaplan-Meier 与 Prognoscan 预后数据库筛选与卵巢癌预后显著相关的差异基因。GEPIA、Human Protein Atlas 与 Timer 数据库分析 IFIT1 在卵巢癌组织与正常组织中的表达差异。UALCAN 数据库分析 IFIT1 在不同分级和分期的卵巢癌组织中的表达情况。David 数据库对 String 和 Genemania 数据库筛选的相互作用基因与蛋白进行 GO 富集分析。Timer 和 Tisidb 数据库相互验证 IFIT1 与免疫细胞的相关性。IFIT1 干扰质粒成功构建后,利用 IFIT1 干扰稳转株构建裸鼠移植瘤模型,观察 IFIT1 敲降后肿瘤生长情况,免疫组化检测中性粒细胞浸润。**结果** GEO 数据库、Kaplan-Meier 与 Prognoscan 预后数据库筛选出 IFIT1 是与卵巢癌预后显著负相关的肿瘤免疫基因。GEPIA、Human Protein Atlas、Timer 数据库以及 UALCAN 数据库表明 IFIT1 在卵巢癌组织中表达显著高于正常卵巢组织($P<0.05$),但与肿瘤的分期、分级并不存在显著相关性。String、Genemania、David 数据库分析发现 IFIT1 的互作基因与蛋白富集于 2'-5' 寡聚腺苷酸合成酶的活化、病毒防御、先天性免疫等过程。Timer 数据库表明 IFIT1 与卵巢癌中 $CD8^+$ T 细胞、B 细胞、树突状细胞、中性粒细胞和巨噬细胞浸润呈正相关,其中与中性粒细胞相关性最为明显($P<0.001$)。Tisidb 与 GSCA 均验证了 IFIT1 与卵巢癌组织的中性粒细胞浸润呈高度正相关($P<0.05$)。RT-qPCR 和 Western blot 证明卵巢癌细胞中 IFIT1 被成功敲降后,IFIT1 干扰细胞的移植瘤生长显著减缓($P<0.05$),肿瘤中性粒细胞浸润减少。**结论** IFIT1 可能促进中性粒细胞浸润影响卵巢癌的恶性进程。

[关键词] 卵巢癌;干扰素诱导的四肽重复蛋白 1;生信分析;免疫浸润;中性粒细胞
[中图法分类号] R394.3;R73-37;R737.31 [文献标志码] A

Correlation of interferon-induced gene IFIT1 with immune infiltration and prognosis in ovarian cancer

WANG Ruiwei, LI Fengjie, LIANG Xiaolong, ZHOU Xin, LIU Liping, LI Qiurong, HE Mingmin, LI Yudi
Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the correlation of interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1) with immune infiltration and prognosis of ovarian cancer (OC). **Methods** GEO database was employed to select the tumor immune related genes, and Kaplan-Meier and Prognoscan databases were used to identify the genes significantly associated with OC prognosis. The differential expression of IFIT1 between OC tissue and normal tissue were confirmed with GEPIA, Human Protein Atlas, and Timer databases. The expression level of IFIT1 in OC tissues with different grades and stages were analyzed in the UALCAN database. In addition, based on David database, GO enrichment analysis was used to analyze the interacting genes and proteins of IFIT1 in the String and Genemania databases. Timer and Tisidb databases verified the correlation between IFIT1 and immune cells mutually. Finally, after IFIT1 knockdown xenograft

[基金项目] 重庆市卫生适宜技术推广项目(2021jstg010)
[通信作者] 李宇迪,E-mail:lydyzj1971@sina.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

model was constructed based on lentiviral vector of IFIT1 shRNA, the tumor growth was observed in the transplanted nude mice, and infiltration of neutrophils was observed with immunohistochemical assay. **Results** FIT1, a tumor immune gene, selected from the GEO database, Kaplan-Meier and Prognoscan databases, was negatively correlated with the OC prognosis. GEPIA, Human Protein Atlas, Timer database, and UALCAN database indicated that the expression level of IFIT1 was significantly higher in the OC tissues than the normal ovarian tissues, and had no obvious correlation with tumor stage and grade. Analysis in String, Genemania, and David database found the interaction genes and proteins of IFIT1 were enriched in activation of 2'-5' oligonucleotide synthase, virus defense, and innate immunity, and other processes. The Timer database presented that IFIT1 was positively correlated with the infiltration of $CD8^+$ T cells, B cells, dendritic cells, neutrophils, and macrophage in OC, with neutrophils having the most significant correlation. Tisidb and GSCA also confirmed the positive correlation between IFIT1 and neutrophil infiltration in OC ($P<0.05$). RT-qPCR and Western blotting confirmed that IFIT1 knockdown resulted in suppressed tumor growth in OC cells xenograft nude mice ($P<0.05$) and reduced neutrophil infiltration in the xenograft tissues. **Conclusion** IFIT1 may influence the malignant progression of OC by promoting neutrophil infiltration.

[**Key words**] ovarian cancer; IFIT1; bioinformatic analysis; immune infiltration; neutrophils

Supported by the Promotion Project of Chongqing Health Appropriate Technology (2021jstg010). Corresponding author: LI Yudi, E-mail: lydyzj1971@sina.com

卵巢癌是致命的妇科恶性肿瘤。最新统计数据显示,美国每年诊断出 19 000 余例新发卵巢癌病例,其中有超过 12 000 余死亡病例[1]。尽管通过手术和辅助化疗等积极的一线治疗,但对于被诊断患有Ⅲ期或Ⅳ期疾病的女性,5 年生存率低于 30%,主要原因是大多数患者会复发,并最终发展为化疗耐药[2]。因此,探索新的治疗策略具有重要意义。近年来,随着癌细胞免疫识别和免疫调节分子研究的深入,免疫微环境在肿瘤发生发展和耐药方面有着关键地位。靶向微环境中免疫细胞、细胞外基质、细胞因子等理化因素在内的众多因子,在治疗肿瘤时取得了显著的效果[3-4]。例如,美国食品和药物管理局批准的免疫检查点抑制剂以及癌症疫苗和过继细胞疗法用于治疗包括黑色素瘤、非小细胞肺、肾细胞癌、膀胱癌和经典霍奇金淋巴瘤等多种癌症[5-7]。但免疫治疗在卵巢癌中的疗效却不尽人意,寻找卵巢癌关键的免疫调控靶点意义重大。

IFIT 是位于人类 10 号染色体上的编码具有四肽重复序列蛋白的干扰素诱导基因家族(interferon stimulated genes, *ISGs*),包含 *IFIT*1、*IFIT*2、*IFIT*3 和 *IFIT*5 在内 4 个家族成员。研究证实该基因家族在免疫过程中发挥关键作用,细胞在未受到刺激时,胞内的 *IFIT* 表达极低。当受到干扰素、各种病毒和病原体感染时,*IFIT* 基因的转录被迅速诱导,继而发挥抗病毒、抗炎等作用[8-9]。随着研究深入,IFIT 合成的多种蛋白质复合物被证明参与细胞增殖、迁移、病毒诱导的翻译启动、复制和双链 RNA 信号传导等多种生物过程[10-11]。最近研究表明,IFIT 蛋白不仅参与肿瘤发生发展,还是胶质母细胞瘤、肝细胞癌、乳腺癌和胰腺癌等肿瘤标志物[12-13]。*IFIT*1 是 IFIT 基因家族的一员,负责编码一种含有多个四肽重复序列(tetratricopeptide repeat, TPR)的胞质蛋白。IFIT1 蛋白缺乏任何酶结构域或活性。然而,其拥有的 TPR 基序组成的螺旋-转-螺旋结构是介导蛋白质之间相互作用的基础。此外,含有 TPR 基序的蛋白质调节细胞周期、转录、蛋白质运输和折叠[14-15]。IFIT1 不仅在多种肿瘤中异常表达,还能通过调控肿瘤免疫浸润参与肿瘤进展和耐药发生。目前尚少 IFIT1 与卵巢癌的相关报道,本研究通过探讨 IFIT1 对卵巢癌免疫细胞浸润的影响,拟寻找新的卵巢癌诊治靶点。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器

本实验使用的主要材料有 T4 DNA 连接酶、T4 DNA 连接酶缓冲液(NEB)、琼脂糖凝胶、TBE 缓冲液、嘌呤霉素、蛋白 marker、免疫组化试剂盒、质粒提取试剂盒(碧云天)、无水乙醇、二甲苯(生工生物)、逆转录试剂盒(诺维赞)、感受态、裸鼠(斯莱克)。双酶切 klpo.1 载体由陆军军医大学第一附属医院病理科李思弟馈赠。卵巢癌细胞 Caov3 于 ATCC 细胞官网购买。引物合成及测序由擎科生物公司完成。IFIT1、ly6G 一抗购自 Abcam 公司、β-actin、二抗购自 CST 公司。实验仪器为奥林巴斯高倍显微镜,美国伯乐 Bio-Rad PCR 仪 CFX96。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 免疫相关基因的筛选 通过 GEO profiles (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/)下载免疫敏感细胞和免疫耐受细胞的差异基因数据集 GSE2774,并通过微阵列分析得到与肿瘤免疫耐受相

关的差异基因。在将差异基因导入 Hiplot(https://hiplot.com.cn)后,以差异倍数 Log_2(Fold Change)为横坐标,Log_{10}(*P* value)为纵坐标生成火山图,挑选差异最显著的 9 个差异基因生成可视化热图(聚类方法为 Word.D2)。随后,利用 Kaplan-Meier (http://kmplot.com/analysis/) 和 PrognoScan (http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/PrognoScan/index.html) 对差异基因进行生存分析,通过 *HR* 值和 Log RANK *P* 值以得出其与卵巢癌预后相关性。

1.2.2 IFIT1 差异表达分析 为了检测 IFIT1 在卵巢癌中的差异表达,通过 GEPIA(http://gepia.cancer-pku.cn/index.html)数据库分析其在卵巢癌、乳腺癌、胶质瘤等 16 种肿瘤中 mRNA 水平的差异表达,并利用 Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org/)数据库分析 IFIT1 在卵巢癌和正常卵巢组织中蛋白水平的表达差异。进一步通过 TIMER (Tumor Immune Estimation Resource)数据库分析 IFIT1 在各种肿瘤中的表达情况,以及 IFIT1 与卵巢癌免疫细胞浸润相关性。

1.2.3 IFIT1 与卵巢癌分期、分级的相关性分析 UALCAN(http://ualcan.path.uab.edu/index.html)数据库是基于 TCGA 数据库创建的能进行 biomarker 鉴定、表达谱分析等数据挖掘分析的在线网站。为了分析 IFIT1 在不同分级和分期的卵巢癌组织中的表达情况,运用 UALCAN 数据库进行分析。

1.2.4 IFIT1 互作蛋白的富集分析 String、Genemania 与 David 数据库 为了探究 IFIT1 在体内参与何种生物过程,利用 String 数据库(https://string-db.org/)和 Genemania 数据库(http://genemania.org)搜索 IFIT1 的相互作用基因与蛋白,并将 IFIT1 的相互作用基因与蛋白导入 David(https://david.ncifcrf.gov/)数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.2.5 IFIT1 免疫浸润分析 免疫浸润数据库 Tumor Immune Estimation Resource(https://cistrome.shinyapps.io/timer/)是基于 RNA-Seq 高通量测序分析 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞、B 细胞、中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞 6 种免疫细胞在肿瘤组织中的浸润情况以及与基因表达相关性。Tisidb (http://cis.hku.hk/TISIDB/)通过整合文献、基因图谱、高通量筛选等数据分析筛选出与肿瘤免疫相关的基因,计算其与免疫调节因子和淋巴细胞等免疫功能的相关性。本研究进一步利用 Timer 和 Tisidb 数据库相互验证其与免疫细胞的相关性。

1.3 实验验证

1.3.1 IFIT1 shRNA 构建 于 Sigma 官网确定 IFIT1 sh-1 靶标序列为:5′-CGTCAATGCAATTATCCATTA-3′, sh-2 靶标序列为:5′-GAGTTATCCATTGATGACGAT-3′。sh-IFIT1 全长序列以及 IFIT1、GAPDH 引物序列如表 1 所示。

分别在 EP 管中加入 9 μmol sh-RNA 正义链、反义链和 2 μL NE buffer,并置于装满沸水的烧杯中,缓慢降温 5~6 h 合成 shRNA。再将 0.5 μL shRNA,1 μL 双酶切载体,1 μL T4 DNA 连接酶,2 μL T4 DNA 连接酶缓冲液和 15 μL H_2O 加入 EP 管中室温放置 30 min 后转化感受态细胞。将感受态细胞涂布加入氨苄的固体培养基中,倒置过夜。挑选单一菌落摇菌,送至擎科测序。

1.3.2 IFIT1 shRNA 干扰效果检测 将 3 000 ng shRNA 或 5 μL lipo3000 和 500 μL optimem 混匀静置 5 min,再将 shRNA 和 lipo3000 混合,静置 20 min 后加入密度为 50%的卵巢癌 Caov3 细胞中。转染 48 h 后,进行 RT-qPCR 验证 IFIT1 的干扰效果。

1.3.3 慢病毒包装及 IFIT1 干扰稳转细胞株构建 状态良好的 293T 细胞培养于 10 cm 皿中,当长至 60%时,将 IFIT1 sh-1 和慢病毒包装质粒按 3∶2转染至 293T 细胞中。48 h 后,收集上清,加入 Caov3 细胞中。慢病毒转染 48 h 换加入 1 μg 嘌呤霉素的培养基,药筛 1 周后,稳转株构建成功,采用 Western blot 验证 IFIT1 干扰效果。

1.3.4 裸鼠成瘤 分别将 IFIT1 干扰和对照稳转细胞注射入小鼠右肩(约 1×10^9 个细胞),第 10 天观察到肿瘤形成,每日测量瘤体大小,21 d 肿瘤生长至 1.5 cm,通过断颈处死老鼠后,拍照并取出肿瘤组织送至陆军军医大学第一附属医院乳腺外科进行切片。

表 1 干扰序列与引物序列

基因名称	Primer 名称	序列(5′→3′)
IFIT1	sh-1 正义链	AATTAAAAAGAGTTATCCATTGATGACGATCTCGAGATCGTCATCAATGGATAACTC
	sh-1 反义链	CCGGGAGTTATCCATTGATGACGATCTCGAGATCGTCATCAATGGATAACTCTTTTTC
	sh-2 正义链	AATTAAAAACGTCAATGCAATTATCCATTACTCGAGTAATGGATAATTGCATTGACG
	sh-2 反义链	CCGGCGTCAATGCAATTATCCATTACTCGAGTAATGGATAATTGCATTGACGTTTTTC
IFIT1	IFIT1-正义链	AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA
	IFIT1-反义链	CTGAAACCGACCATAGTGGAAAT
GAPDH	GAPDH-正义链	AGCCACATCGCTCAGACAC
	GAPDH-反义链	TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC

1.3.5　免疫组化　　将组织切片进行脱蜡、非特异性抗原阻断、抗原修复后,4 ℃冰箱孵育 IFIT1 一抗(1∶200)过夜。次日,孵育兔二抗后,DAB 染色 30 s 显色,中性树脂封片。

1.4　统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。采用 Kaplan-Meier 法进行预后分析,相关性分析采用偏相关和 Spearman 相关分析。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

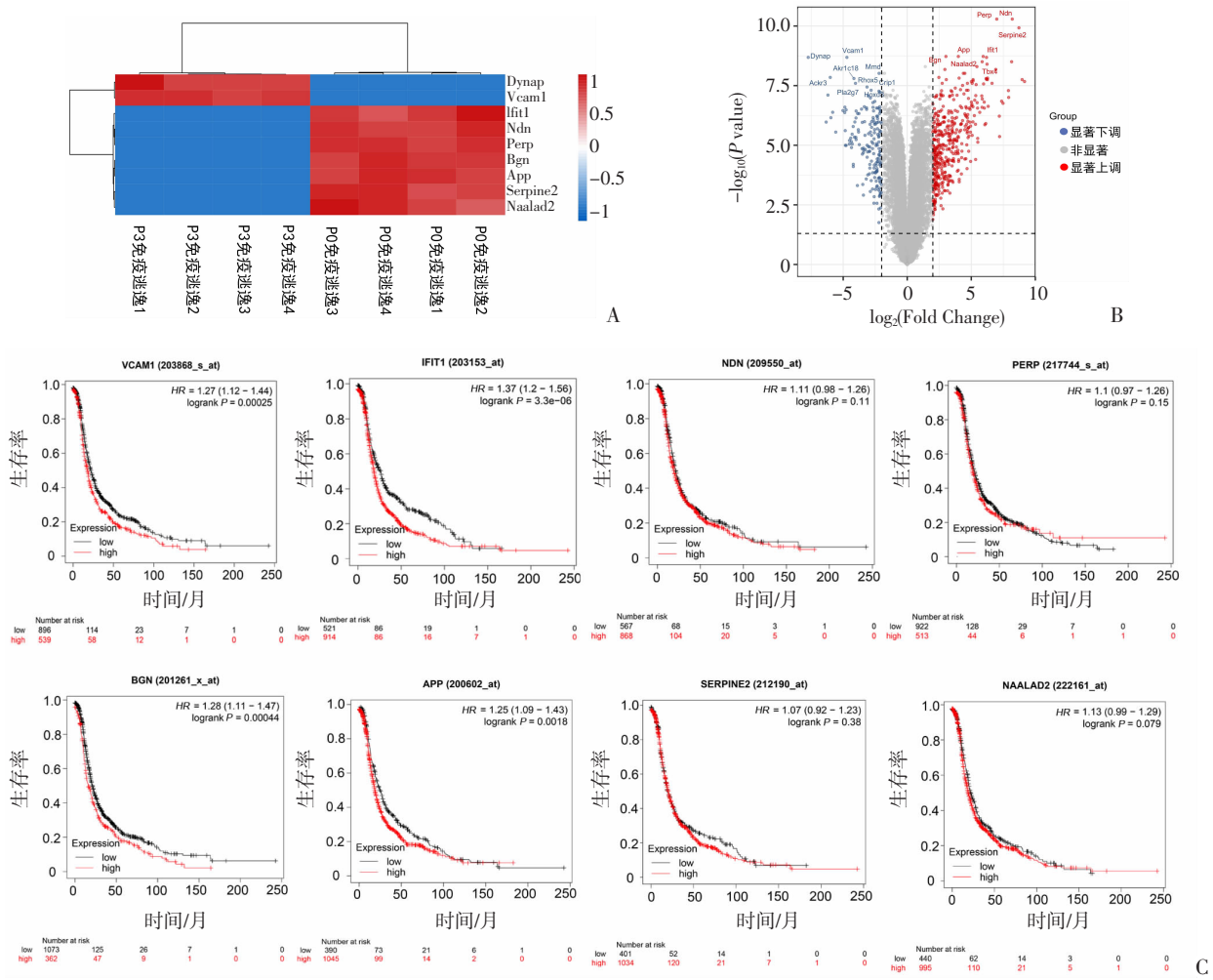
2　结果

2.1　免疫耐受相关基因中 IFIT1 与卵巢癌预后负相关

GSE2774 微阵列分析发现免疫耐受细胞 P3 细胞中差异最为显著的上调的差异基因是 DYNAP、VCAM1;下调的差异基因为 IFIT1、NDN、PERP、BGN、APP、SERPINE2 和 NAALAD2(图 1A)。图 1B 为差异基因的火山图。预后分析显示差异基因中 VCAM1、BGN、APP 和 IFIT1 与卵巢癌的预后显著负相关,其中 IFIT1 相关性最为显著($HR=1.37$, $P<0.001$,图 1C)。

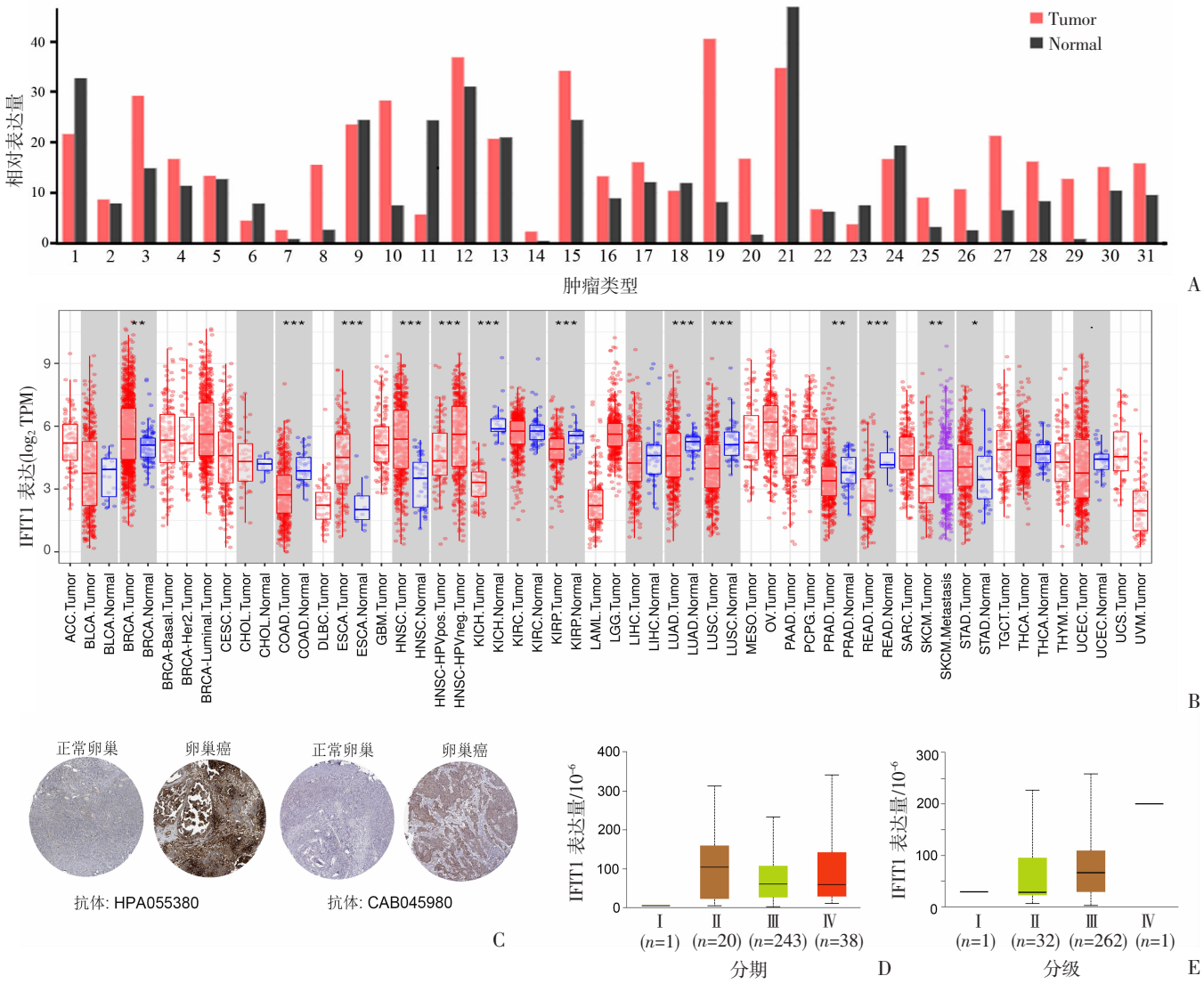
2.2　IFIT1 在卵巢癌中显著高表达

利用 GEPIA 数据库查询 IFIT1 在肾癌、乳腺癌、肝癌等 16 种肿瘤中的表达差异,如图 2A 所示 IFIT1 在卵巢癌组织中表达水平最高,且与正常卵巢上皮组织中表达差异最为显著(相对表达量:正常卵巢=8.15;宫颈癌=40.64)。此外,Timer 数据库显示在胶质瘤、膀胱癌、胆管癌等 38 种肿瘤中,IFIT1 在卵巢癌组织中表达水平最高(图 2B)。Human Protein Atlas 数据库中抗体 HPA055380 检测了 2 例正常卵巢组织和 19 例卵巢癌组织中 IFIT1 的表达,结果显示卵巢组织中 IFIT1 表达均为阴性,卵巢癌组织中 13 例表达呈强阳性,4 例为中等度阳性,2 例为阴性。抗体 CAB045980 检测显示结果显示 IFIT1 在 3 例正常卵巢组织中表达均呈阴性,卵巢癌组织中 3 例呈强阳性,9 例中等度阳性,2 例弱阳性,8 例呈阴性(图 2C)。然而 ULCAN 数据库显示 IFIT1 与卵巢癌分期、分级不存在显著相关性(图 2D、E)。



A:免疫耐受差异基因热图(排名前 9);B:免疫耐受差异基因火山图;C:差异基因在卵巢癌中的预后分析

图 1　免疫耐受差异基因及其表达对卵巢癌预后的影响



A: GEPIA 数据库分析 IFIT1 在各种肿瘤中的表达　1:肾上腺皮质癌;2:膀胱移行细胞癌;3:乳腺浸润性癌;4:宫颈鳞状细胞癌和宫颈内腺癌;5:胆管癌;6:结肠癌;7:弥漫性大 b 细胞淋巴瘤;8:食管癌;9:多形性成胶质细胞瘤;10:头颈部鳞状细胞癌;11:肾嫌色细胞癌;12:肾透明细胞癌;13:肾乳头状细胞癌;14:急性髓性白血病;15:脑低级别胶质瘤;16:肝脏肝细胞癌;17:肺腺癌;18:肺鳞状细胞癌;19:卵巢浆液性囊腺癌;20:胰腺癌;21:嗜铬细胞瘤和副神经节瘤;22:前列腺腺癌;23:直肠腺癌;24:肉瘤;25:皮肤黑色素瘤;26:胃腺癌;27:睾丸生殖细胞肿瘤;28:甲状腺癌;29:胸腺瘤;30:子宫内膜癌;31:子宫癌肉瘤;B:Timer 数据库分析 IFIT1 在各种肿瘤中的表达;C:Human Protein Atlas 数据库分析 IFIT1 在卵巢癌和正常卵巢中的表达;D、E:ULCAN 数据库分析 IFIT1 与卵巢癌分期、分级的相关性

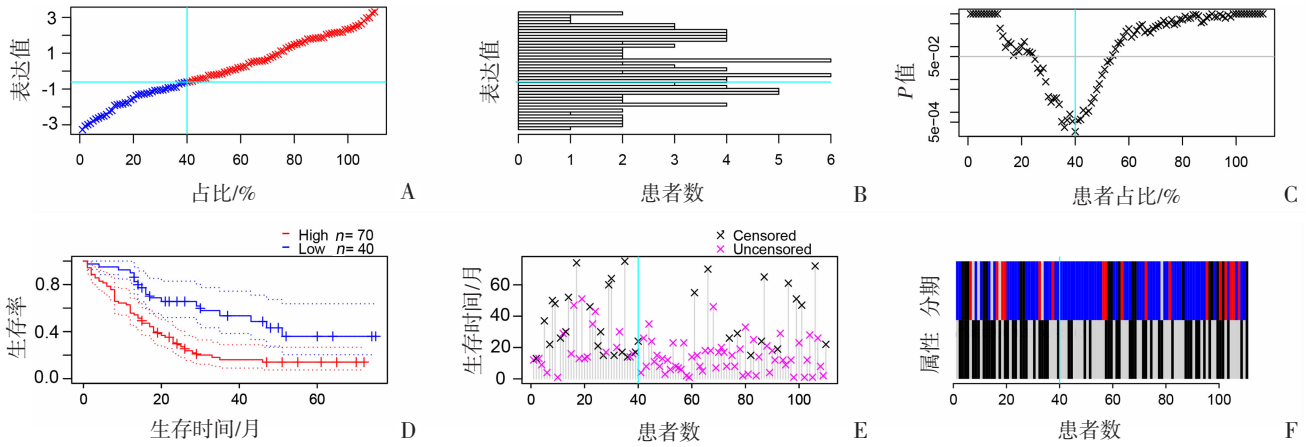
图 2　IFIT1 在不同肿瘤中的表达及与卵巢癌分期、分级的相关性分析

2.3　IFIT1 与卵巢癌预后显著负相关

通过 Prognoscan 数据库分析 IFIT1 与卵巢癌预后的相关性。图 3A 中根据基因表达高低将患者分为低表达组(蓝色)和高表达组(红色)。图 3B 使用直方图显示 IFIT1 不同表达水平的患者分布情况。通过 log-rank 方法检验 IFIT1 基因高表达和低表达患者的生存差异,灰度线以下的 P 值均小于 0.05(图 3C)。IFIT1 高表达以及低表达患者的生存曲线见图 3D。图 3E 的生存时间图中分别为删失数据(黑点)和无删失数据(粉红点)。患者的属性分布见图 3F。

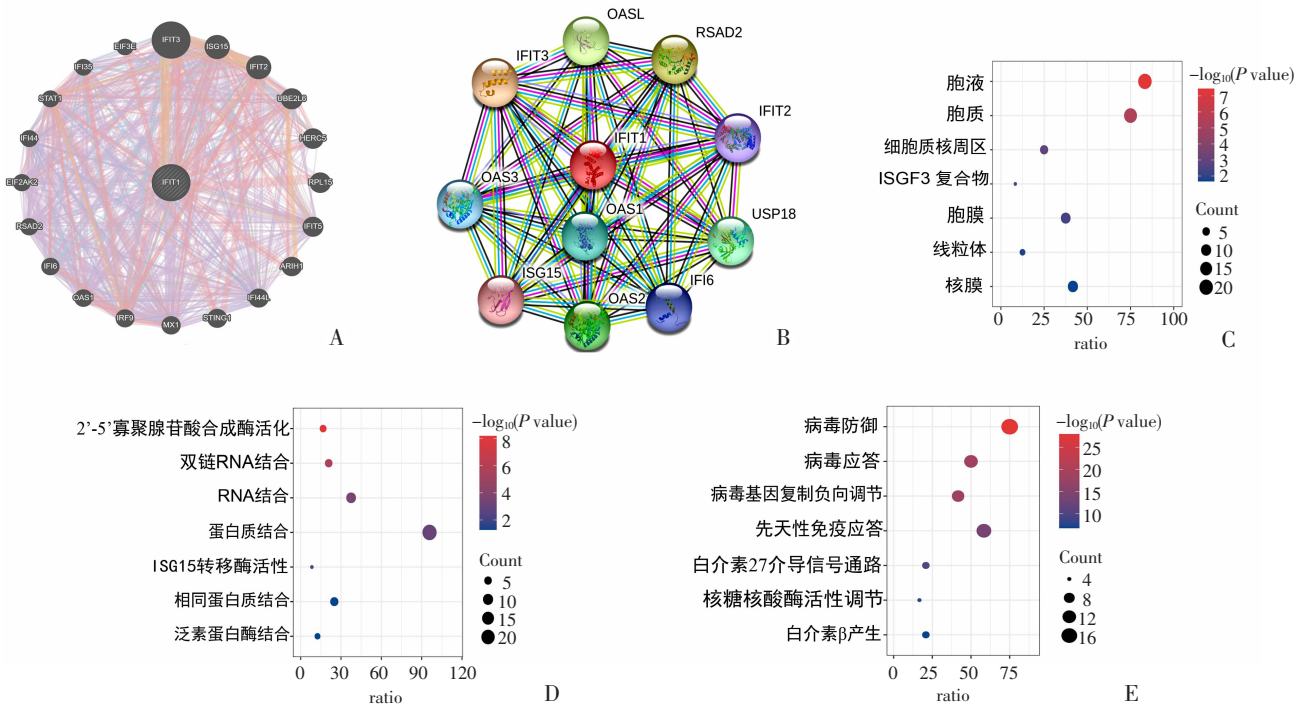
2.4　IFIT1 互作基因与蛋白的 GO 功能富集分析

Genemania 数据库预测出 IFIT1 与 IFIT3、IFIT2、IFIT5、ISG15、UBE2L6、HERC5、RPL15 等 20 个基因互作(图 4A)。String 数据库分析得出 IFIT1 互作蛋白为 IFI6、IFIT3、IFIT2、OAS1、OAS2、OAS3、OASL、RSAD2、USP18 与 ISG15(图 4B)。通过 David 数据库进行 GO 功能富集分析发现 IFIT1 互作蛋白主要分布于胞质,参与 2'-5' 寡聚腺苷酸合成酶的活化。此外,这些蛋白和基因参与的生物过程为病毒防御、先天性免疫等过程(图 4C~E)。



A：IFIT1 基因表达；B：IFIT1 基因表达直方图；C：*P* 值图；D：Kaplan-Meier 生存分析；E：患者生存时间分布；F：患者属性分布

图 3　Prognoscan 数据库分析 IFIT1 的表达及与卵巢癌预后的关系



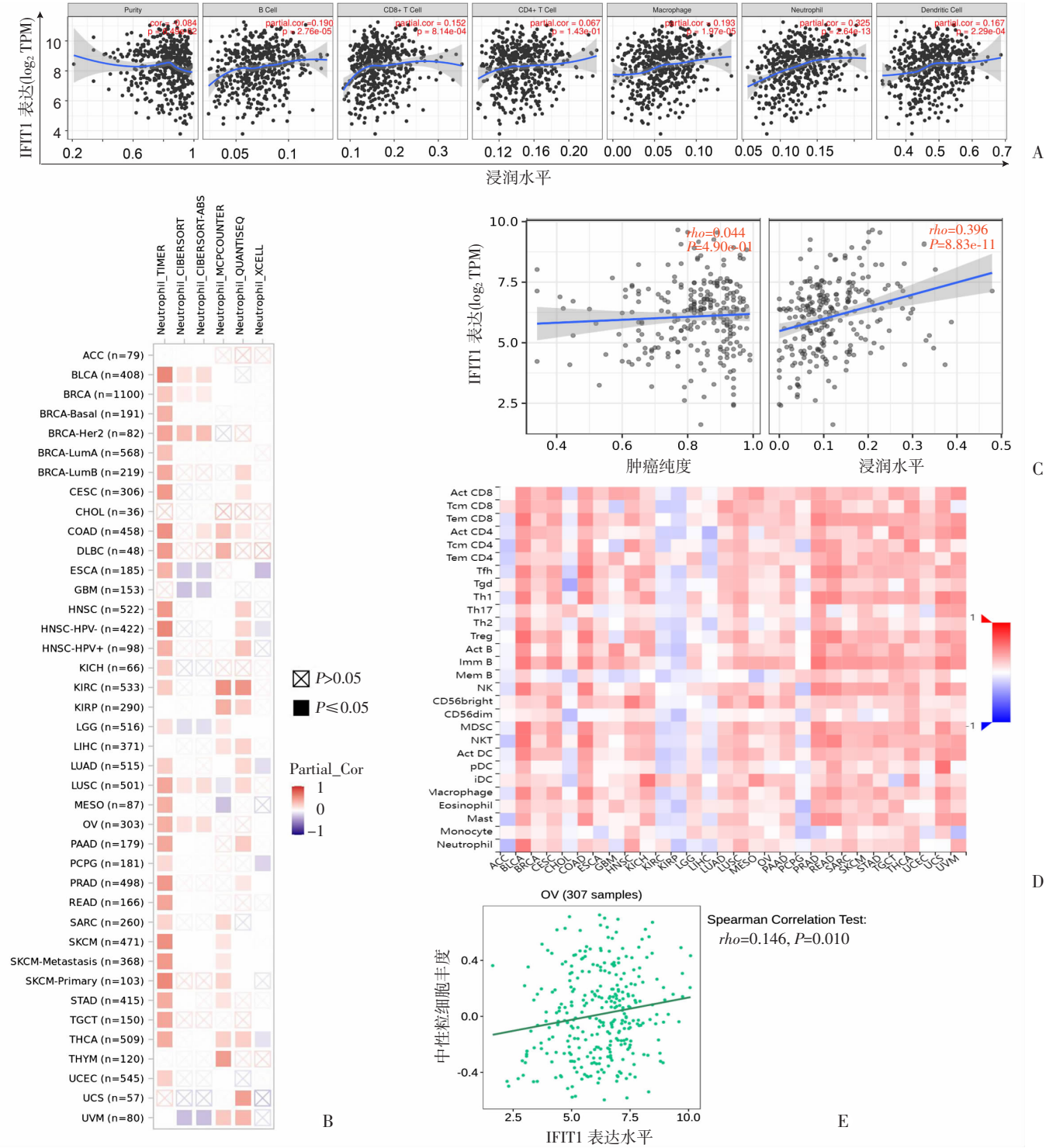
A：Genemania 数据库分析 IFIT1 的互作基因；B：String 数据库分析 IFIT1 的互作蛋白；C～E：IFIT1 互作基因的 GO 富集分析

图 4　数据库分析 IFIT1 互作基因与蛋白

2.5　IFIT1 与卵巢癌免疫浸润分析

Timer 数据库显示，IFIT1 在卵巢癌中与中性粒细胞浸润（$r=0.325$，$P<0.001$）、巨噬细胞浸润（$r=0.193$，$P<0.001$）、B 细胞浸润（$r=0.190$，$P<0.001$）、树突状细胞浸润（$r=0.167$，$P<0.001$）和 $CD8^+$ T 细胞浸润（$r=0.152$，$P<0.001$）显著相关（图 5A）。关注到 IFIT1 与卵巢癌的中性粒细胞浸润最为显著，继续借助 GSCA 数据库进行验证，利用 6 种常用免疫浸润分析方法计算 40 种肿瘤中 IFIT1 与中性粒细胞浸润相关性，发现 TIMER、CIBERSORT、CIBERSORT-abs 分析方法计算出卵巢癌中 IFIT1 与中性粒细胞浸润显著正相关（图 5B）。本研究展示了 TIMER 计算结果（*rho*=0.396，$P<0.001$，图 5C）。此外，Tisidb 数据库显示在肾上腺皮质癌、胆管癌、肾透明细胞癌、肝癌等肿瘤中 IFIT1

与大部分免疫细胞浸润呈负相关,而在卵巢癌中 IFIT1 表达与中性粒细胞、记忆性 T 细胞、辅助性 T 细胞、淋巴细胞、树突细胞等免疫细胞浸润呈现正相关。该数据库为 IFIT1 与卵巢癌中性粒细胞浸润呈现正相关提供了证据($rho=0.146$, $P=0.010$,图 5D、E)。



A:Timer 数据库分析 IFIT1 与卵巢中免疫细胞浸润相关性;B、C:GSCA 数据库分析 IFIT1 与卵巢癌中性粒细胞浸润相关性;D、E:Tisidb 数据库分析 IFIT1 与卵巢癌中性粒细胞浸润相关性

图 5 IFIT1 与卵巢癌中免疫细胞浸润的相关性分析

2.6　IFIT1 干扰抑制卵巢癌中性粒细胞浸润

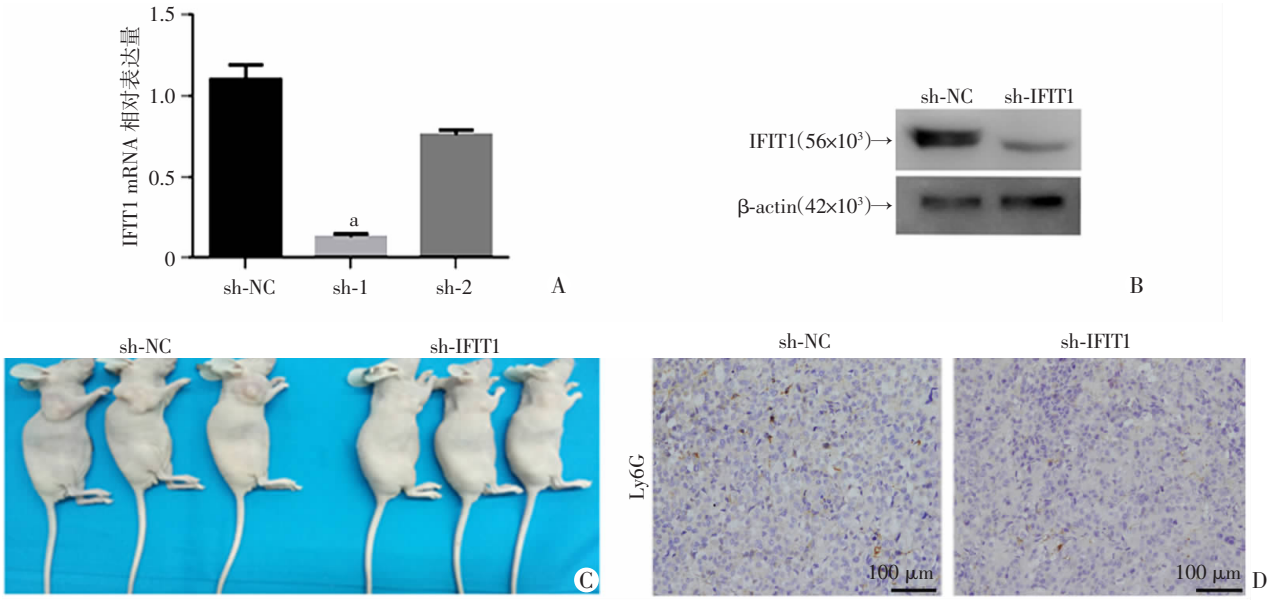
菌落测序结果与 sh-IFIT1 靶标序列比对一致,代表 IFIT1 shRNA 构建成功。RT-qPCR 检测发现 sh-1 在 mRNA 水平成功敲降 IFIT1(图 6A)。采用 sh-1 质粒包装慢病毒并构建稳转株,Western blot 验证稳转株中 IFIT1 被成功敲低(图 6B)。随后,利用裸鼠成瘤模型证明了 IFIT1 干扰抑制肿瘤生长($\bar{x}_{sh\text{-}NC}$=0.9 cm^3,$\bar{x}_{sh\text{-}IFIT1}$=0.4 cm^3),肿瘤组织的中性粒细胞浸润减少(图 6C、D)。

3　讨论

由于早期诊断困难,缺乏有效的治疗方法,目前卵巢癌的 5 年生存率并无显著提高。尽管最新研究发现 PARP 抑制剂对 HRR 缺陷的卵巢癌细胞具有致死性。然而,对于 50% HRD 阴性的患者来说,PARP 抑制剂效果不佳[16]。此外,大部分情况下抗血管生成抑制剂未能明显改善患者生存率[17]。因此,探索其他靶向治疗方法具有重要意义。近年来,免疫疗法作为一种新型癌症治疗手段在恶性肿瘤治疗中取得巨大进展,然而其在卵巢癌中的疗效不尽如人意,可能与卵巢癌自身独特的肿瘤微环境有关[18]。因此,探究卵巢癌免疫微环境中免疫细胞的浸润情况并寻找关键的调控因子是改善这一局面的关键所在。

本研究发现 IFIT1 是与卵巢癌预后最相关的免疫基因,它在卵巢癌组织中表达水平最高,且与正常卵巢上皮组织中表达差异最显著。GO 富集分析发现 IFIT1 参与抗病毒免疫过程中 2'-5' 寡聚腺苷酸合成酶的活化和病毒防御、先天性免疫等过程。发现 IFIT1 与卵巢癌中多种免疫细胞的浸润呈现显著正相关,与中性粒细胞的浸润最显著(P<0.001)。此外,我们成功构建了 IFIT1 shRNA 并在裸鼠移植瘤模型中证明 IFIT1 促进卵巢癌中性粒细胞浸润。

近年来,借助体内成像、表观基因组学、高维转录组学以及单细胞测序的发展,人们发现血液中最丰富的中性粒细胞在肿瘤发生发展中起到关键作用[19]。证据表明,中性粒细胞在肿瘤中发挥双重作用。少数研究报道它通过诱导肿瘤细胞凋亡和杀伤肿瘤细胞发挥抑癌作用;而大部分研究发现中性粒细胞与肿瘤进展正相关,作为重要的免疫成分,中性粒细胞不仅参与促肿瘤前炎性环境的形成,还通过调控 ROS、血管生成和旁分泌信号促进肿瘤细胞恶性增殖和转移[20]。促进血管生成是中性粒细胞发挥促癌作用的主要机制,自发性和移植性肿瘤模型证明中性粒细胞耗竭降低微血管密度,抑制肿瘤生长[21]。此外,中性粒细胞抑制其他免疫细胞的抗癌活性也是另一主要促癌原因[22-23]。其通过抑制 T 细胞效能调控免疫微环境,进一步促进卵巢癌恶性进展和免疫耐受。



A: RT-qPCR 检测 sh-IFIT1 在 mRNA 水平的敲降效果　a: P<0.05, 与 sh-NC 比较;B: Western blot 检测 sh-IFIT1 在蛋白水平的敲降效果; C: IFIT1 对卵巢癌细胞体内成瘤能力的影响;D: IFIT1 对卵巢癌中性粒细胞浸润的影响　ly6G 阳性为棕色细胞,即浸润的中性粒细胞

图 6　IFIT1 的敲降效果及其对裸鼠成瘤和卵巢癌中性粒细胞浸润的影响

研究表明中性粒细胞在卵巢癌进展中发挥关键作用[24],MAYER 等[25]发现卵巢癌中常出现中性粒细胞浸润,并且中性粒细胞能促进上皮细胞向间质细胞转化,使肿瘤细胞更具侵袭性。研究还发现中性粒细胞减少能延缓裸鼠移植瘤模型中卵巢癌的进展。此外,活化的中性粒细胞分泌的中性粒细胞胞外诱捕网在肿瘤发生发展、转移等方面发挥关键作用,其丰度能作为肿瘤复发风险的预测指标[26-27]。有研究发现中性粒细胞网膜定植是卵巢癌发生转移的基本前提之一[28]。我们推测卵巢癌中 IFIT1 可能通过引发中性粒细胞浸润,促进卵巢癌的进展并影响患者预后。

综上所述,本研究通过一系列生信分析发现免疫基因 IFIT1 不仅在卵巢癌中表达显著上调,还与肿瘤恶性进展相关,并能指导患者预后。免疫浸润分析发现 IFIT1 在卵巢癌中影响多种免疫细胞的浸润,其表达与中性粒细胞浸润显著相关;也证明了 IFIT1 促进卵巢癌中中性粒细胞的浸润。本研究显示 IFIT1 在卵巢癌中发挥重要作用,为卵巢癌的治疗寻找到新的靶点。然而,本研究的不足之处在于尚未验证 IFIT1 调控的生物过程,下一步将研究 IFIT1 是否参与抗病毒免疫过程中 2'-5'寡聚腺苷酸合成酶的活化和病毒防御、先天性免疫等过程。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al*. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.

[2] LHEUREUX S, GOURLEY C, VERGOTE I, *et al*. Epithelial ovarian cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10177): 1240-1253. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32552-2.

[3] PITT J M, MARABELLE A, EGGERMONT A, *et al*. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy[J]. Ann Oncol, 2016, 27(8): 1482-1492. DOI: 10.1093/annonc/mdw168.

[4] HINSHAW D C, SHEVDE L A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression[J]. Cancer Res, 2019, 79(18): 4557-4566. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.

[5] KENNEDY L B, SALAMA A K S. A review of cancer immunotherapy toxicity[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(2): 86-104. DOI: 10.3322/caac.21596.

[6] RECK M, REMON J, HELLMANN M D. First-line immunotherapy for non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2022, 40(6): 586-597. DOI: 10.1200/JCO.21.01497.

[7] RALLI M, BOTTICELLI A, VISCONTI I C, *et al*. Immunotherapy in the treatment of metastatic melanoma: current knowledge and future directions[J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 9235638. DOI: 10.1155/2020/9235638.

[8] ZHOU X, MICHAL J J, ZHANG L F, *et al*. Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(2): 200-208. DOI: 10.7150/ijbs.5613.

[9] FRANCO J H, CHATTOPADHYAY S, PAN Z K. How different pathologies are affected by IFIT expression[J]. Viruses, 2023, 15(2): 342. DOI: 10.3390/v15020342.

[10] LI T H, ZHAO B B, QIN C, *et al*. IFIT1 modulates the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells *via* Wnt/β-catenin signaling[J]. Cell Oncol (Dordr), 2021, 44(6): 1425-1437. DOI: 10.1007/s13402-021-00651-8.

[11] FENSTERL V, SEN G C. The ISG56/*IFIT*1 gene family[J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(1): 71-78. DOI: 10.1089/jir.2010.0101.

[12] PIDUGU V K, PIDUGU H B, WU M M, *et al*. Emerging functions of human IFIT proteins in cancer[J]. Front Mol Biosci, 2019, 6: 148. DOI: 10.3389/fmolb.2019.00148.

[13] TAN X F, CHEN Q F, HUA S H, *et al*. Roles of interferon induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT) family in cancer[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(25): 5034-5047. DOI: 10.2174/0929867328666210617105209.

[14] LEONTIOU I, LONDON N, MAY K M, *et al*. The Bub1-TPR domain interacts directly with Mad3 to generate robust spindle checkpoint arrest[J]. Curr Biol, 2019, 29(14): 2407-2414.e7. DOI: 10.1016/j.cub.2019.06.011.

[15] WU X, LIN L P, ZHOU F R, *et al*. The highly expressed IFIT1 in nasopharyngeal carcinoma enhances proliferation, migration, and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Mol Biotechnol, 2022, 64(6): 621-636. DOI: 10.1007/s12033-021-00439-z.

[16] SLADE D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment[J]. Genes Dev, 2020, 34(5/6): 360-394. DOI: 10.1101/gad.334516.119.

[17] LHEUREUX S, BRAUNSTEIN M, OZA A M. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(4): 280-304. DOI: 10.3322/caac.21559.

[18] YANG C, XIA B R, ZHANG Z C, *et al*. Immunotherapy for ovarian cancer: adjuvant, combination, and neoadjuvant[J]. Front Immunol, 2020, 11: 577869. DOI: 10.3389/fimmu.2020.577869.

[19] 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.

[20] FRIDLENDER Z G, SUN J, KIM S, *et al*. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1"

versus "N2" TAN[J]. Cancer Cell, 2009, 16(3): 183-194. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.

[21] DERYUGINA E I, ZAJAC E, JUNCKER-JENSEN A, *et al*. Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major *in vivo* source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumor microenvironment[J]. Neoplasia, 2014, 16(10): 771-788. DOI: 10.1016/j.neo.2014.08.013.

[22] XIONG S M, DONG L L, CHENG L. Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis[J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 173. DOI: 10.1186/s13045-021-01187-y.

[23] OCANA A, NIETO-JIMÉNEZ C, PANDIELLA A, *et al*. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 137. DOI: 10.1186/s12943-017-0707-7.

[24] BALKWILL F R, CAPASSO M, HAGEMANN T. The tumor microenvironment at a glance[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 23): 5591-5596. DOI: 10.1242/jcs.116392.

[25] MAYER C, DARB-ESFAHANI S, MEYER A S, *et al*. Neutrophil granulocytes in ovarian cancer-induction of epithelial-to-mesenchymal-transition and tumor cell migration[J]. J Cancer, 2016, 7(5): 546-554. DOI: 10.7150/jca.14169.

[26] DEMKOW U. Neutrophil extracellular traps (NETs) in cancer invasion, evasion and metastasis[J]. Cancers, 2021, 13(17): 4495. DOI: 10.3390/cancers13174495.

[27] KALTENMEIER C, SIMMONS R L, TOHME S, *et al*. Neutrophil extracellular traps (NETs) in cancer metastasis[J]. Cancers, 2021, 13(23): 6131. DOI: 10.3390/cancers13236131.

[28] LEE W, KO S Y, MOHAMED M S, *et al*. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum[J]. J Exp Med, 2019, 216(1): 176-194. DOI: 10.1084/jem.20181170.

(**收稿**:2023-05-15;**修回**:2023-11-24)

(编辑 张艺霖)