

基于生物信息学分析 EDIL3 作为乳腺癌骨转移和免疫浸润的潜在标志物*

黄颖 唐福兴 孙宇 陈新华 贺茂林[△]

(广西壮族自治区广西医科大学第一附属医院脊柱骨病外科, 广西 南宁 530021)

【摘要】目的: 探讨表皮生长因子样重复盘状结构 I 样域蛋白 3 (EGF like repeats and discoidin domains 3, EDIL3) 在乳腺癌骨转移组织中的表达水平及其在免疫浸润中的影响。**方法:** 基于公共数据库研究乳腺癌骨转移中 EDIL3 的表达水平和预后价值, CIBERSORT 算法评估 EDIL3 与免疫浸润的关系。**结果:** 与非骨转移性乳腺癌组织相比, 骨转移性乳腺癌组织中 EDIL3 显著上调 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 分析显示高表达的 EDIL3 与较差的总体生存率有关 ($P < 0.05$)。CIBERSORT 结果表明, EDIL3 与 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、M0 巨噬细胞、M2 巨噬细胞等多种免疫细胞的浸润丰度相关。相关性分析显示 EDIL3 与大多数免疫检查点基因负相关。免疫治疗分析显示, CTLA-4 或 PD-1 阻断剂在 EDIL3 低表达组的疗效优于 EDIL3 高表达组 ($P < 0.05$)。**结论:** EDIL3 高表达与乳腺癌骨转移及预后不良有关, 可能作为一种有效的预后及免疫治疗标志物。

【关键词】 乳腺癌; 骨转移; EDIL3; 预后; 免疫浸润

【中图分类号】 R737.9 Q811.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-5249(2023)01-0057-05

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 由于早期检测技术和综合治疗策略的进步, 乳腺癌患者的生存质量有了很大的提升, 但晚期转移性乳腺癌患者的预后仍然很不乐观^[1]。骨骼是晚期乳腺癌最常见的转移部位, 导致骨痛、脊髓受压、严重高钙血症、病理性骨折等骨骼相关并发症^[2]。研究表明, 肿瘤免疫细胞浸润可影响肿瘤化疗、放疗或免疫治疗的疗效, 以及肿瘤血管生成和远处转移^[3]。表皮生长因子样重复盘状结构 I 样域蛋白 3 (EGF like repeats and discoidin domains 3, EDIL3) 是一种与血管形态发生和重塑相关的细胞外基质 (ECM) 蛋白^[4]。据报道, EDIL3 在多种肿瘤类型中过度表达, 且与肿瘤恶化和预后不良相关^[5-7]。例如, EDIL3 激活 TGF- β 1/XIST/miR-137 通路, 从而促进胃癌细胞迁移、侵袭和上皮间质转化^[4]。在胰腺癌中 EDIL3 显著上调, 且与 TNM 分期正相关^[6]。此外, EDIL3 表达上调会增加乳腺癌的发生风险, 并且与细胞分化、淋巴结浸润和远处转移密切相关^[7]。然而, EDIL3 在乳腺癌骨转移和肿瘤免疫浸润中的潜在机制仍不清楚。在本研究中, 我们基于公共数据库分析 EDIL3 在乳腺癌骨转移中的表达及预后价值, 使用 CIBERSORT 算法来评估 EDIL3 与肿瘤浸润免疫细胞的关系, 并分析其与免疫检查点以及免疫治疗效果的关系,

旨在为探讨乳腺癌的发病机制和免疫治疗提供新的见解。

1 资料与方法

1.1 数据收集

基因微阵列数据从 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库中获得。检索词为: (breast OR mammary OR mastocarcinoma) AND (cancer OR carcinoma OR tumor OR malignant) AND (mRNA OR gene OR Protein)^[8], 限定物种为 "Homo sapiens", Entry Type 为 "Series", Study Type 为 "Expression Profiling by array"。纳入标准: (1) 数据集包括人乳腺癌骨转移组织和乳腺癌非骨转移组织。在重复研究或样本的情况下, 保留最新版本; (2) 对照组和实验组样本数均 ≥ 4 个; (3) 数据集中包含 EDIL3 的表达数据。TCGA 数据库 (<https://cancergenome.nih.gov/>) 下载乳腺癌患者表达数据及临床信息, 用于后续生存分析和免疫浸润评价。

1.2 功能富集分析

基于 GEO 数据集, 使用 Limma 包计算每个数据集的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 以 $\log_{2}FC \geq 1$ 和 $adj. P < 0.05$ 为标准。Pearson 相关性分析计算乳腺癌骨转移中 EDIL3 共表达基因, 以 $|cor| \geq 0.5$ 和 $P < 0.05$ 为阈值。DEGs 和 EDIL3 共表达基因的交集

* 基金项目: 中国国家自然科学基金 (编号: 81760485)

作者简介: 黄颖 (1997.10—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 脊柱外科与骨肿瘤。E-mail: huangying@stu.gxmu.edu.cn

[△] 通信作者: 贺茂林 (1975.02—), 男, 博士研究生, 主任医师, 研究方向: 脊柱外科与骨肿瘤。E-mail: hemaolin@stu.gxmu.edu.cn

· 实验研究 ·

基因被认为是乳腺癌骨转移中的EDIL3差异共表达基因。“cluster Profiler”包进行基因本体(GO)生物功能及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并使用“ggPlot2”包可视化。

1.3 免疫浸润分析

CIBERSORT是一个常用的免疫细胞浸润分析的方法。它利用线性支持向量回归的原理对免疫细胞亚型的表达矩阵进行去卷积,来评估免疫细胞的丰度。CIBERSORT提供了22种常见的免疫浸润细胞表达数据参考集特征LM22,包括不同的细胞类型和功能状态的免疫细胞^[9]。使用R软件的“CIBERSORT”包评估EDIL3与免疫细胞浸润的关系,Pearson相关性分析评价EDIL3与免疫检查点基因的相关性。通过TCIA数据库(httPs://tcia.at/)下载免疫打分文件,对每个样本进行免疫打分,预测乳腺癌患者接受PD-1和CTLA-4靶向治疗的效果。

1.4 人类蛋白质图谱(Human Protein Atlas, HPA)

计算机检索人类蛋白质图谱(httPs://www.Proteinatlas.org/)病理图谱中的“EDIL3”(“乳腺癌”为癌类型),分析乳腺癌组织和正常乳腺组织中EDIL3蛋白的表达水平。

1.5 统计学分析

使用R语言(v.4.1.3)、STATA14.0和IBM SPSS Statistics 26.0软件进行统计学分析。SMD和汇总接收器操作特征(SROC)通过STATA14.0计算。卡方检验和I²的Q检验用于检测异质性。当P > 0.05且I² < 50%,认为没有异质性,采用固定效应模型。或者,结合随机效应模型进行连续变量荟萃分析。对总体结果进行敏感性分析以确定每个基因芯片的影响。根据EDIL3中位值,将TCGA乳腺癌患者分为EDIL3高低表达两组,通过Wilcoxon检验评估两组间的免疫浸润差异。

2 结果

2.1 高表达的EDIL3与乳腺癌骨转移相关

根据纳入标准,我们筛选了4个乳腺癌骨转移数据集(GSE124647、GSE46141、GSE14020(GPL96)和GSE14020(GPL570))。GSE124647包含11个乳腺癌骨转移组织和129个乳腺癌非骨转移组织;GSE46141包含5个乳腺癌骨转移组织和85个乳腺癌非骨转移组织;GSE14020(GPL96)包含8个乳腺癌骨转移组织和28个乳腺癌非骨转移组织;GSE14020(GPL570)包含10个乳腺癌骨转移组织和19个乳腺癌非骨转移组织。与乳腺癌非骨转移组织相比,EDIL3在乳腺癌骨转移组织中高表达(P < 0.05),见图1A-D。

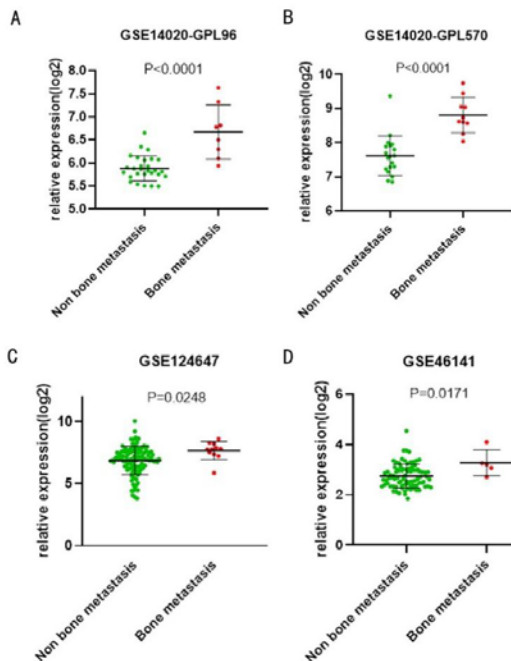
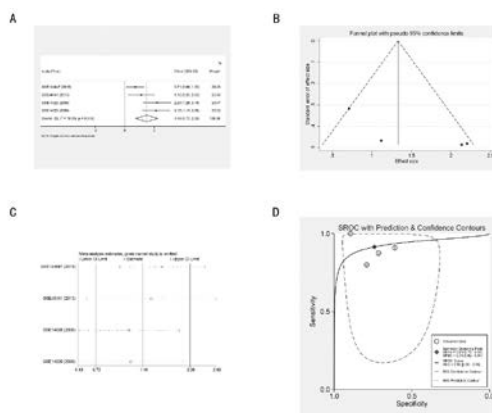


图1 EDIL3在乳腺癌骨转移组织中的表达情况。

同时,在对4个数据集的荟萃分析中,P < 0.05和70.0%的I²值被认为是异质的。因此,随机效应模型用于进行变量连续荟萃分析。34例乳腺癌骨转移样本中EDIL3的表达高于261例乳腺癌非骨转移组织,随机效应模型整合的总SMD为0.76(95%置信区间为0.22 ~ 1.30)(见图2A)。漏斗图结果显示,研究没有发表偏倚(见图2B)。敏感性分析表明,排除任何数据集数据对总效应影响不大(见图2C)。为了探索EDIL3对乳腺癌骨转移的诊断能力,我们使用sROC曲线。sROC曲线结果显示AUC为0.93(95% CI 0.90 ~ 0.95)(见图2D),表明EDIL3在乳腺癌骨转移诊断中可能具有很高的特异性和敏感性。



A. 乳腺癌骨转移中EDIL3表达水平表示为基于随机效应模型的森林图; B. 发表偏倚; C. 乳腺癌骨转移中EDIL3表达的敏感性分析; D. EDIL3区分乳腺癌骨转移组织和正常组织的能力
注:与乳腺癌非骨转移组织比较,P < 0.05

图2 STATA中的Meta分析

HPA数据库结果显示乳腺癌组织中EDIL3蛋白表达水平显著高于正常乳腺组织,见图3A-B。

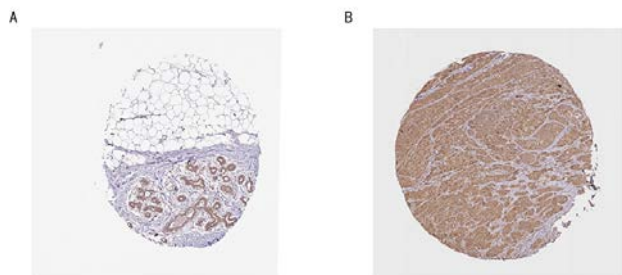


图3 HPA数据库中EDIL3蛋白在乳腺癌组织与正常组织中的表达水平

2.2 高表达的EDIL3预示着不良预后

为了研究EDIL3在乳腺癌中的预后价值,基于TCGA乳腺癌数据集进行Kaplan-Meier分析。结果显示EDIL3高表达的患者总生存期较差($P < 0.05$),见图4,提示EDIL3高表达是乳腺癌不良预后因素。

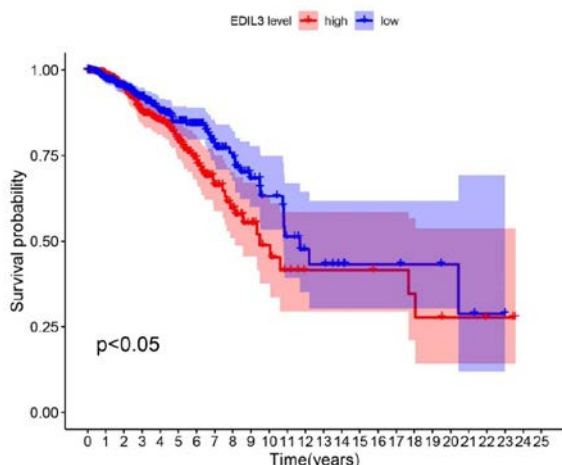
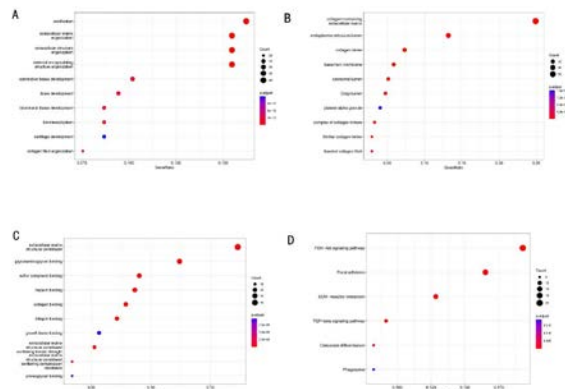


图4 EDIL3的表达与乳腺癌患者预后的关系

2.3 功能富集分析

从4个乳腺癌骨转移数据集中共筛选出487个DEGs和1194个EDIL3共表达基因,在重叠区域鉴定出287个差异共表达基因。EDIL3差异共表达基因的GO富集分析表明,生物过程(BP)主要集中在骨骼系统的发育、胶原纤维组织和细胞外基质组织等(见图5A);细胞成分(CC)主要富集在内质网腔、细胞外基质和胶原蛋白三聚体(见图5B);分子功能(MF)主要与细胞外基质结构成分、胶原结合和乳腺素结合有关(见图5C)。KEGG富集分析显示PI3 k-Akt信号通路、TGF- β 信号通路、细胞外基质(ECM)-受体相互作用和破骨细胞分化通路被富集(见图5D)。

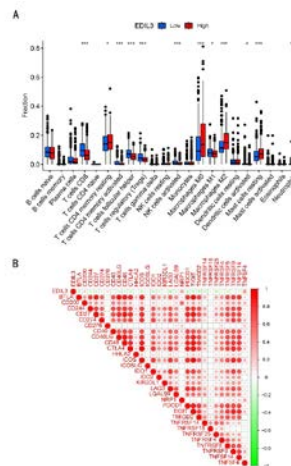


A.生物过程(BP); B.细胞成分; C.分子功能(MF); D.KEGG

图5 EDIL3差异共表达基因的GO和KEGG分析

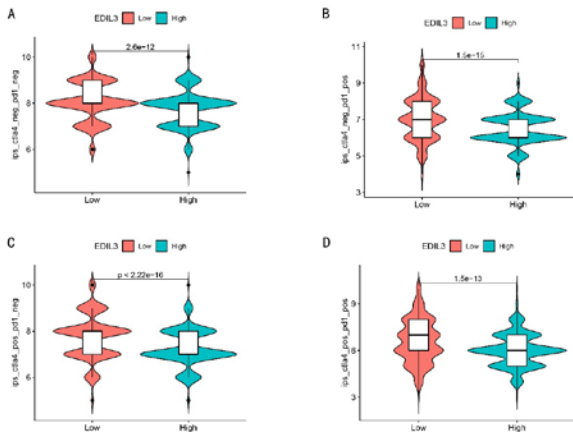
2.4 免疫浸润分析

为了进一步探索乳腺癌中EDIL3与免疫细胞浸润的相关性,我们使用CIBERSORT算法评估22种免疫细胞浸润丰度。结果显示EDIL3高表达组表现出较高水平的静息记忆CD4+T细胞($P < 0.05$)、M0型巨噬细胞($P < 0.05$)、M2型巨噬细胞($P < 0.05$)、静息肥大细胞($P < 0.05$)、中性粒细胞($P < 0.05$)浸润。相反地,EDIL3低表达组表现出较高水平的CD8+T细胞($P < 0.05$)、活化记忆CD4+T细胞($P < 0.05$)、滤泡辅助性T细胞($P < 0.05$)、Treg细胞($P < 0.05$)、活化自然杀伤细胞($P < 0.05$)、M1型巨噬细胞($P < 0.05$)、活化树突状细胞($P < 0.05$)浸润(见图6A)。上述结果表明EDIL3表达水平对免疫细胞浸润活性存在影响。相关性分析结果显示,EDIL3与大多数免疫检查点基因呈负相关(见图6B)。免疫治疗分析发现EDIL3低表达组患者在无治疗、单用CTLA-4阻断剂治疗、单用PD-1阻断剂治疗和联用CTLA-4和PD-1阻断剂治疗时的预后,皆优于高表达组($P < 0.05$)(见图7A-D)。



A.乳腺癌中EDIL3与免疫细胞浸润水平的关系; B.乳腺癌中EDIL3与免疫检查点的关系

图6 免疫浸润分析



A. 不使用抗PD-1治疗和抗CTLA4治疗; B. 单独使用抗PD-1治疗; C. 单独使用抗CTLA4治疗; D. 联合使用抗PD-1治疗和抗CTLA4治疗

图7 EDIL3高低表达组的免疫治疗分析差异

3 讨论

本研究基于公共数据库证实EDIL3在乳腺癌骨转移组织表达量高于非骨转移组织,且高表达的EDIL3预示着不良预后,提示EDIL3可能参与乳腺癌骨转移进程。

为了进一步明确EDIL3的致病机制,我们采用基因集富集分析探索乳腺癌骨转移中EDIL3可能参与的生物学过程。结果发现EDIL3可能通过PI3 k-Akt信号通路、TGF-β信号通路和破骨细胞分化通路等癌症相关通路参与乳腺癌骨转移过程。既往研究也表明,PI3 k/AKT信号通路以及TGF-β信号通路介导乳腺癌骨转移^[10-11]。

肿瘤免疫微环境与肿瘤恶化密切相关^[12]。CD8⁺T细胞通过与MHC I抗原结合破坏肿瘤细胞,与乳腺癌的肿瘤分级和预后正相关;同时,记忆CD4⁺T细胞通过促进CD8⁺细胞的增殖来抑制肿瘤细胞的生长^[13]。巨噬细胞是肿瘤微环境中重要的免疫细胞类型,其中M0型巨噬细胞呈未活化状态,可分化为M1型或M2型巨噬细胞^[14]。M2型巨噬细胞的促癌表型通过促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤免疫微环境、调节基质重塑、增强肿瘤血管生成等方式促进肿瘤的发生和转移。相反,M1型巨噬细胞促进炎症、增强免疫活性,发挥抗肿瘤作用^[15]。我们研究发现,EDIL3高表达组具有更多的M0巨噬细胞、M2巨噬细胞浸润,较少的CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞以及M1巨噬细胞浸润,这就解释了为什么EDIL3高表达组预后更差。因此,我们认为EDIL3可能是肿瘤免疫浸润的潜在标志物。近年来,免疫治疗成为晚期乳腺癌患者有前景的治疗方式^[11]。免疫治疗分析显示,CTLA-4或PD-1阻断剂在EDIL3低表达组的

疗效优于高表达组,暗示EDIL3在预测乳腺癌预后和免疫治疗反应方面表现良好,可作为免疫治疗的潜在靶点。

总之,EDIL3高表达与乳腺癌骨转移及预后不良有关,可作为一种可靠的预后及免疫治疗标志物。

参考文献

- [1] Coleman R. Bisphosphonates and breast cancer - From cautious palliation to saving lives [J]. Bone, 2020, 140: 115570.
- [2] Traves K P, Cokenakes S H. Breast Cancer Treatment [J]. American family physician. 2021, 104 (2): 171-178.
- [3] Fumet J D, Limagne E, Thibaudin M, et al. Precision medicine phase II study evaluating the efficacy of a double immunotherapy by durvalumab and tremelimumab combined with olaparib in patients with solid cancers and carriers of homologous recombination repair genes mutation in response or stable after olaparib treatment [J]. BMC cancer, 2020, 20 (1): 748.
- [4] Zhang L, Peng K W, Wang B, et al. EDIL3 regulates gastric cancer cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition via TGF-β 1/XIST/miR-137 feedback loop [J]. Translational cancer research, 2020, 9 (10): 6313-6330.
- [5] Jia X, Chen B, Li Z, et al. Identification of a Four-Genes-Based SERM Signature for Prognostic and Drug Sensitivity Prediction in Gastric Cancer [J]. Frontiers in oncology, 2021, 11 (2): 799223.
- [6] Jiang S H, Wang Y, Yang J Y, et al. Overexpressed EDIL3 predicts poor prognosis and promotes anchorage-independent tumor growth in human pancreatic cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7 (4): 4226-4240.
- [7] Lee J E, Moon P G, Cho Y E, et al. Identification of EDIL3 on extracellular vesicles involved in breast cancer cell invasion [J]. Journal of proteomics. 2016, 131 (3): 17-28.
- [8] He R Q, Xiong D D, Ma J, et al. The Clinicopathological Significance and Correlative Signaling Pathways of an Autophagy-Related Gene, Ambra1, in Breast Cancer: a Study of 25 Microarray RNA-Seq Datasets and in-House Gene Silencing [J]. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2018, 51 (3): 1027-1040.
- [9] Chen B, Khodadoust M S, Liu C L, et al. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT [J]. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2018, 1711: 243-259.
- [10] Jiang W, Rixiati Y, Huang H, et al. Asperolide A prevents bone metastatic breast cancer via the PI3 k/AKT/mTOR/c-Fos/NFATc1 signaling pathway [J]. Cancer medicine. 2020;9 (21): 8173-8185.
- [11] Kang Y, Siegel P M, Shu W, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone [J]. Cancer cell, 2003, 3 (6): 537-549.

(下转第68页)

瓷锅的化学性质相对稳定,同时。具备受热均匀的特点,应利用此类器皿实施药剂煎煮,不同药材的煎煮方法均具有一定差异性,其中的注意事项不相同。因此,配药医师需要凭借扎实的药理知识以及实践经验为患者进行积极指导,使患者治疗效果得到保障。积极指导患者能够掌握服药时间及方法,有效发挥药物的最佳药力,药师需要针对患者的服用方法及时间进行全面指导,对于服药过程中产生的副作用能够提出合理措施,如患者服药存在呕吐需要加姜末针对药汤进行处理,服药过程中避免进食辛辣刺激食物,少食用鱼类、肉类以及禁止烟酒。处方分析为中药房中的重要工作环节,同样为中医用药的辩证施药表现及治疗因素。中药房的工作质量会对患者的整体治疗水平及身体康复情况产生影响,同时关系到医疗机构的整体形象。因此,严格对于处方单据进行监控,并对于中药处方合理分析,提升整体中药房药学服务质量及工作水平,才能为其提供合理、科学、优质的药学服务。中药房药学服务过程中实施系统化运用干预可结合处方分析进行辩证加减,同时,可依据患者的适应症以及功效实施配置方剂,在药品配置调剂过程中能够保证中药配方与诊断结果一一对应,实现合理配伍以及用药剂量规范,并指导患者能够按照正确的方法进行煎药,提升临床整体药学服务水平。临床医院需要针对中药处方进行有效管理,并提高院内药师及医师的风险意识,使其能够针对中药药理作用全面了解,深入性进行周期性培训,进一步提高处方分析有效性,

同时,能够做到从多方面着手实现综合性中药房药学服务,应依据实际情况进行处方调配,积极预防产生医疗事故,避免重复用药,提升整体药学服务水平,使临床中药房处方不合理情况减少,进一步提高中药房服务质量。

综上所述,应用处方分析能够有效提高中药房药学服务质量,使漏发、错发、执行疏漏、变质药品、多发等情况减少,提高患者药学服务满意度。

参考文献

- [1] 顾冬梅,张传军.中药处方分析在中药房药事服务中的应用[J].中国医药科学,2021,11(22):133-135,140.
 - [2] 张济文.处方分析用于中药房药学服务的效果观察[J].中国社区医师,2021,37(21):6-7.
 - [3] 李新强.处方分析在中药房药学服务中的应用[J].北方药学,2021,18(6):108-109.
 - [4] 侯本庆.综合医院中药处方分析及中药药学服务水平分析[J].中国农村卫生,2021,13(4):93,92.
 - [5] 史相国,张峤.处方分析在中药房药学服务中的应用意义评析[J].中国现代药物应用,2020,14(3):220-222.
 - [6] 王晓辉.中药房服务中处方分析的重要性及作用[J].深圳中西医结合杂志,2019,29(17):195-197.
 - [7] 陈英奎.处方分析在中药房药学服务中的应用及价值评定[J].北方药学,2019,16(9):150-151.
 - [8] 赵正臣.某院门诊中药房103张不合格处方的原因分析及对策[J].抗感染药学,2019,16(1):52-54.
 - [9] 王思美,黄海珠,叶海波.中药房药学服务中处方分析的作用[J].中医药管理杂志,2018,26(23):103-105.
- (收稿日期:2022-05-31)

(上接第60页)

- [12] Mehraj U, Dar A H, Wani N A, et al. Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance [J]. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2021, 87(2): 147-158.
 - [13] Mahmoud S M, Paish E C, Powe D G, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2011, 29(15): 1949-1955.
 - [14] Zhang S C, Hu Z Q, Long J H, et al. Clinical Implications of Tumor-Infiltrating Immune Cells in Breast Cancer [J]. Journal of Cancer, 2019, 10(24): 6175-6184.
 - [15] Hao N B, Lü M H, Fan Y H, et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors [J]. Clinical & developmental immunology, 2012, 21(2): 948098.
- (收稿日期:2022-06-19)