·生物信息学·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.04.0170

利用在线数据库分析乳腺癌中程序性死亡蛋白-1相关信号通路基因的临床意义

陈 路[1], 李习平[1], 胡 爽[2], 戴周彤[3], 何晓宏[3], 王志文[1*]

(1. 岳阳职业技术学院 慢性病重点实验室, 中国湖南 岳阳 414000; 2. 湖南师范大学附属岳阳医院/岳阳市二人民医院, 中国湖南 岳阳 414000; 3. 武汉科技大学 生命科学与健康学院, 中国湖北 武汉 430065)

摘 要: 针对程序性死亡蛋白 -1 (programmed death-1, PD-1)的免疫疗法在乳腺癌中获得了显著成功。但是, 并非所有患者都能从抗体治疗中受益。为了鉴定 PD-1 信号通路相关基因的表达及在乳腺癌中作为预后标志物的潜力, 本文通过 Oncomine、GTEx 数据库和癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库挖掘了 PD-1 信号通路相关基因的表达特征及预后作用, 并且使用 STRING 数据库对其蛋白质 - 蛋白质相互作用网络进行了预测。结果显示, PD-1 信号通路相关基因的表达在不同的癌症中表现出显著差异。在乳腺癌中, PD-1 信号通路相关基因的表达水平显著高于正常组织, 并且其表达情况与乳腺癌患者的分期及年龄无关。将乳腺癌患者按照 PD-1 和程序性死亡蛋白配体 -1 (programmed death ligand-1, PD-L1)表达的中位值分为高表达组与低表达组, 高表达组显示出更好的总体生存率。此外, 蛋白质 - 蛋白质相互作用网络预测结果显示, PD-1 与非受体型蛋白质酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase non-receptor, PTPN)家族的表达高度相关。综上所述, 本研究为开展新的基于 PD-1 的免疫疗法提供了理论支持。

关键词: 程序性死亡蛋白 -1 (PD-1); 程序性死亡蛋白配体 -1 (PD-L1); 免疫治疗; 乳腺癌

中图分类号: Q811.4, R737.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 1007-7847(2021)06-0548-09

Analysis of the Clinical Significance of PD-1 Gene in Breast Cancer by Using Online Database

CHEN Lu[1], LI Xi-ping[1], HU Shuang[2], DAI Zhou-tong[3], HE Xiao-hong[3], WANG Zhi-wen[1*]

(1. *Yueyang Key Laboratory of Chronic Noncommunicable Diseases*, *Yueyang Vocational & Technical College*, *Yueyang* 414000, *Hunan*, *China*; 2. *Yueyang Hospital Affiliated to Hunan Normal University*, *Second People's Hospital of Yueyang*, *Yueyang* 414000, *Hunan*, *China*; 3. *College of Life Science and Health*, *Wuhan University of Science and Technology*, *Wuhan* 430065, *Hubei*, *China*)

Abstract: The immunotherapy targeting programmed death-1 (PD-1) has achieved remarkable success in breast cancer. However, not all patients can benefit from the antibody therapy. In order to identify the expression of genes related to the PD-1 signaling pathway and their potential as prognostic markers in breast cancer, the PD-1 signaling pathway-related genes, their expression characteristics and prognostic effects were explored based on Oncomine, GTEx and The Cancer Genome Atlas (TCGA) databases. STRING database was used to predict the protein-protein interaction (PPI) network. The results showed that the expression of genes related to the PD-1 signaling pathway exhibited significant differences in different cancers. In breast cancer, the expression level of PD-1 signaling pathway-related genes is significantly higher than that

收稿日期: 2020-04-27; **修回日期**: 2020-10-11

基金项目: 湖南省自然科学基金科教联合项目(2020JJ7072); 2019 年湖南省教育厅科学研究项目(19C1867); 岳阳市社科联基金项目(岳社科 2019x93)

作者简介: 陈路(1979—), 女, 湖南祁东人, 副教授、主治医师, 主要从事肿瘤分子流行病学、老年护理教育等研究; * 通信作者:王志文(1980—), 男, 湖南祁阳人, 主治医师、讲师, 主要从事肿瘤分子流行病学研究, Tel: 0730-8677501, E-mail: wzw189189@163.com。

in normal tissues. Moreover, their expression has nothing to do with the stage and age of breast cancer patients. When the patients were classified into high and low expression groups according to the median value of the expression levels of PD-1 and programmed death ligand-1 (PD-L1), the high expression group was found to have better overall survival rates. In addition, the prediction results of the PPI network showed that PD-1 is positively correlated with the expression of the protein tyrosine phosphatase non-receptor (PTPN) family. In summary, this study provides theoretical support for development of new PD-1 based immunotherapy.
Key words: programmed death-1 (PD-1); programmed death ligand-1 (PD-L1); immunotherapy; breast cancer
(*Life Science Research*, 2021, 25(6): 548~556)

乳腺癌属于全球健康问题, 特别是对于女性而言[1~2]。全球癌症观察站指出, 乳腺癌致死人数占 2018 年所有癌症死亡人数的 6%, 是女性癌症死亡的主要原因[2]。随着乳腺癌患者从阶段 0 和阶段Ⅰ (100%)、阶段Ⅱ和阶段Ⅲ (分别为 93%和 72%)到阶段Ⅳ (22%)的加重, 其 5 年生存率大大降低[1~3]。目前, 手术和化学疗法被常用于治疗乳腺癌[4~5]。但是, 化学疗法的使用已显示出严重的不良情况, 包括疼痛、恶心、神经认知功能障碍和心血管疾病等[6~7]。免疫治疗为治疗乳腺癌提供了一种新的方法。早在 1983 年就有研究发现, T 细胞能特异性地识别抗原[8]。但是, 1992 年 Harding 等[9]的研究显示, T 细胞的活化比以前想象的要复杂得多。例如: 在增殖和功能分化的过程中, T 细胞活化还刺激了一些抑制途径, 这些途径可以减弱甚至消除 T 细胞应答[9]。现在, 人们认识到肿瘤具有抑制抗肿瘤免疫应答的机制, 包括细胞因子的产生、免疫抑制细胞的募集和共抑制受体的上调, 这些机制被称为免疫检查点[10]。

针对免疫检查点的治疗主要包括两个途径。其一为细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4)和共刺激分子 B7。它们的结合能够有效阻断 T 细胞与抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)的相互作用, 下调 T 细胞活化能力, 从而降低机体的抗肿瘤免疫力, 使癌细胞免除被机体自身免疫系统杀死[11]。T 细胞表面分子 CD28 也是免疫球蛋白相关受体家族的成员, 负责 T 细胞免疫调节的各个方面[12~13]。但是, 目前为止针对 CD28 的治疗还在起步阶段。而针对 CTLA-4, 在 2011 年, 伊匹木单抗(ipilimumab)就被美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)批准为首个在转移性黑色素瘤中显示总体生存获益的药物, 其工作机制为靶向 *CTLA*-4 基因, 阻断 CTLA-4/B7 的信号通路, 从而使免疫系统识别并杀死癌细胞[14]。第二个主要途径为程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1)。PD-1 最早被发现于小鼠的 T 细胞, 最初被认为主要起到活化 T 细胞等免疫细胞的作用[15~16]。其途径包括 PD-1 及其配体程序性死亡蛋白配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1)和 PD-L2。研究报道, PD-1 不会直接诱导细胞死亡, 但会降低细胞生长因子以及存活信号; PD-L1/2 激活 PD-1 会诱导 T 细胞活性下调、细胞因子生成减少、T 细胞裂解以及抗原的耐受性增强[17~20]。体内研究表明, PD-L1 可增加肿瘤的发生和侵袭性, 并使肿瘤细胞对特定 $CD8^+$ T 细胞的敏感性降低[21]; 使用特异性抗体阻断 PD-1/PD-L1 途径可导致肿瘤消退[22]。肿瘤细胞通过 PD-1 的高表达逃脱 T 细胞的杀伤已成为免疫耐受的机制之一, 肿瘤细胞可通过阻断效应子功能并降低 T 细胞杀伤能力来抑制抗肿瘤免疫反应[23]。在过去的几年中, PD-1 和 PD-L1 的抑制剂, 例如纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维单抗(avelumab)和德瓦鲁单抗(durvalumab), 改变了癌症治疗的格局。这些药物因其在许多癌症治疗中的空前优势而获得 FDA 批准, 包括黑色素瘤、肺癌、尿路上皮癌、肾细胞癌和头颈癌等[24~30]。考虑到乳腺癌在女性中的高发生率、高转移性以及 PD-1/PD-L1 阻断剂在其他癌症中的成功应用, 在乳腺癌中使用其抑制剂似乎是一种合理的方法。

本研究旨在通过集成的大型数据库, 系统地研究乳腺癌患者 PD-1 相关信号通路的关键因子的表征: 从表达模式到预后价值以及潜在的临床病理学应用, 以协助 PD-1 相关信号通路的药物在乳腺癌中的应用。

1　材料与方法

1.1　数据采集

所有病人的表达数据与临床数据都是通过癌

症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库、GTEx (Genotype-Tissue Expression)数据库和 Oncomine 数据库获得。GTEx 数据库是对健康人提供的组织进行 RNA-seq 测序的表达谱数据库(https://www.gtexportal.org/)。TCGA 数据库包括 33 种癌症的基因表达谱数据以及对应的临床信息(https://portal.gdc.cancer.gov/)。Oncomine 是在线癌症微阵列数据库, 是可对全基因组表达进行分析的在线工具(https://www.oncomine.org/)[31]。

1.2 基因的表达分析

为了分析 PD-1 信号通路相关基因在 33 种肿瘤中的表达情况, 我们访问了 Oncomine 在线数据库并可视化了基因表达。对于 TCGA 和 GTEx 数据库获取的数据, 使用基因表达谱交互分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)作为可视化工具(http://gepia.cancer-pku.cn/)[32], 数据获取中以 PD-1、PD-L1、CTLA-4、B7 和CD28 作为关键词, 乳腺癌作为癌症类型。对于 Oncomine 数据库, 以 PD-1、PD-L1、CTLA-4、B7 和 CD28 作为关键词, 以差异倍数(fold change, FC)的绝对值 $|\log_2(FC)|>0.5$ 和表达差异 $P<0.05$ 作为筛选条件。

1.3 目标蛋白质的免疫组化图像分析

人类蛋白质图谱(The Human Protein Atlas, HPA)数据库整合了人类组织和癌症中蛋白质的免疫组织化学图像(http://www.proteinatlas.org/)[33]。文中以 PD-1 和 B7 为关键词, 从 HPA 下载了乳腺癌和正常组织中目标蛋白质的免疫组织化学结果。

1.4 基因的临床表达特征分析

UALCAN (http://ualcan.path.uab.edu/)是用于深入分析 TCGA 数据的工具, 用于验证目的基因表达水平的差异[34]。文中以 PD-1、PD-L1、CTLA-4、B7 和 CD28 作为关键词, 乳腺癌作为癌症类型, 分析了 PD-1 信号通路相关基因表达水平与基于美国癌症联合委员会的乳腺癌分期及患者年龄的关系。

1.5 基因的预后价值分析

使用 GEPIA 数据库, 按照目的基因表达的中位数将其分为高表达组与低表达组, 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线[32]。

1.6 蛋白质互作网络分析

STRING 数据库(https://string-db.org/)常被用于预测和分类协调基因所编码蛋白质之间的相互作用[35]。设置 STRING 数据库中置信区间的标准为≥0.900, 获取 PD-1 信号通路相关基因所编码蛋白质的相互作用关系网络。同时, 使用 GEPIA 工具进一步分析 PD-1 信号通路相关基因与预测蛋白质之间的表达相关性。

1.7 数据分析

采用 t 检验评估 PD-1 信号通路相关基因在不同组中的表达差异。使用 Spearman 相关分析探讨 PD-1 信号通路相关基因表达与预测蛋白质之间的相关性。生存曲线是根据对数秩检验通过 Kaplan-Meier 方法生成的。$P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-1 信号通路相关基因在泛癌中的表达

为了分析 PD-1 信号通路相关基因在泛癌中的表达情况, 使用 Oncomine 在线数据库分析了相关癌症和正常组织之间的 mRNA 差异, 结果如图 1 所示。对于 PD-1 信号通路相关基因 *PD-1*、*PD-L1*、*B7*、*CTAL-4* 和 *CD28*, Oncomine 数据库分别包含 293、176、329、303 和 329 个独立研究。有趣的是, 除了膀胱癌以外, 上述 5 个基因在大多数癌症类型中表达上调。进一步的分析发现, 在乳腺癌组织中, 以上 5 个基因的表达显著增加, 而且 *PD-1* 和 *B7* 表达升高的研究数量多于任何其他癌症类型。

2.2 PD-1 信号通路相关基因在乳腺癌中的表达

使用 UALCAN 工具从 TCGA 数据库查询相关基因在乳腺癌中的表达水平。针对 1 097 个乳腺癌组织和 114 个正常乳腺组织的分析结果如图 2 所示, 与正常乳腺组织相比, 乳腺癌组织中 *PD-1*、*B7* 和 *CTLA-4* 的表达显著增加(P 值分别为1.624×10^{-12}、1.000×10^{-12} 和 5.350×10^{-8}); 令人惊奇的是, *CD28* 的结果无统计学意义($P=0.881$), 而 *PD-L1*的 RNA-seq 表达则下调($P=0.049$)。结合 Oncomine 数据库中的 mRNA 数据结果, 我们推测 PD-1、B7 和 CTLA-4 的表达可能对乳腺癌有重要影响。

为了验证 PD-1、B7 和 CTLA-4 的表达在临床中的潜在应用, 我们从人类蛋白质图谱中提取了特征化的免疫组织化学图像。令人遗憾是, 数据中没有与 CTLA-4 相关的免疫组织化学图像。PD-1 与 B7 的免疫组织化学图像如图 3 所示, 在正常的乳腺组织中, 细胞核呈现不均匀的阳性染色, 且混合模式较弱, 相对表达量较低; 但是在乳腺癌组织中, PD-1 的表达存在明显的区别, 且相对表达量较高, 而 B7 的表达无显著差异。

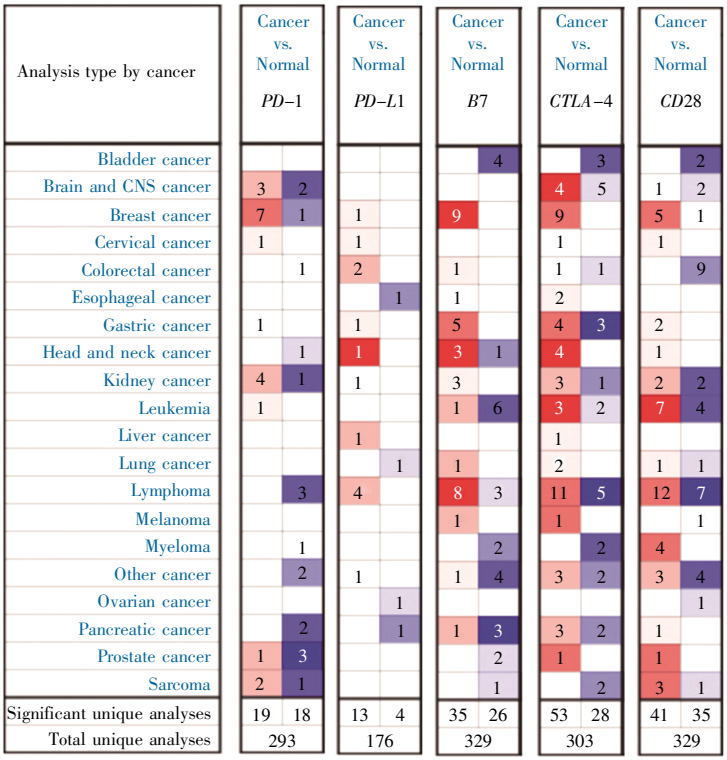


图 1　PD-1 信号通路相关基因在 Oncomine 数据库中的表达情况

红色代表与正常组织相比，在癌症中表达上升。蓝色代表与正常组织相比，在癌症中表达下降。数字代表具有统计学意义的数据集的数量。

Fig.1　Expression of PD-1 related signal pathway genes based on Oncomine database

Red represents increased expression in cancer compared with normal tissues. Blue represents decreased expression in cancer compared with normal tissues. The number represents the number of statistically significant data sets for the study.

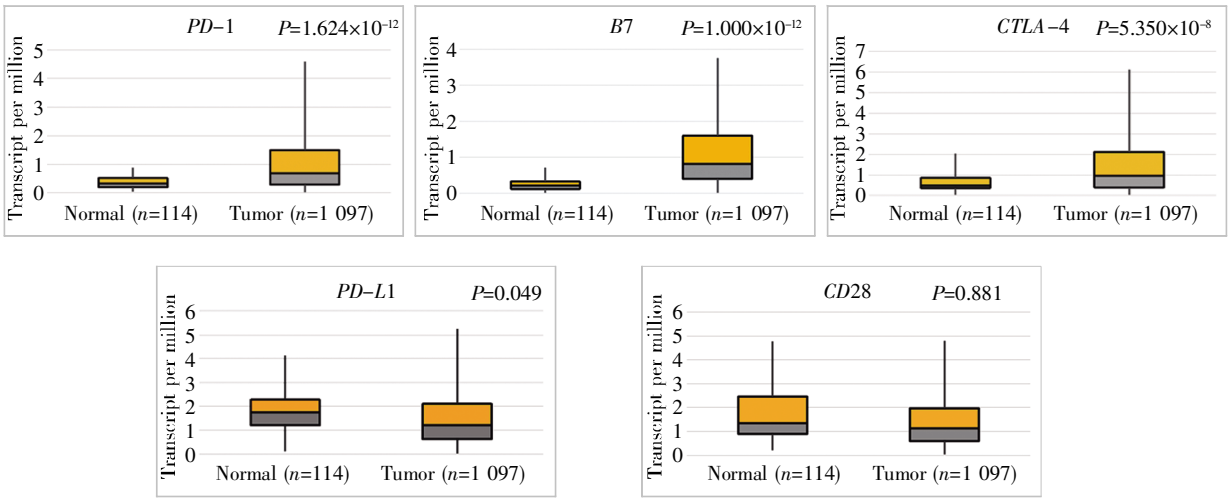


图 2　PD-1 信号通路相关基因在乳腺癌中的表达

Fig.2　Expression of PD-1 signaling pathway-related genes in breast cancer

2.3　PD-1 信号通路相关基因在乳腺癌中的病理特征

为了进一步探讨 PD-1 信号通路相关基因 *PD-1*、*B7* 和 *CTLA-4* 在乳腺癌中的病理特征，使用 UALCAN 数据库分析了它们在乳腺癌中的表达与不同阶段、年龄及亚型的关系。从图 4 可知，*PD-1*、*B7* 和 *CTLA-4* 的表达与患者乳腺癌所处阶段和年龄均无关($P\geqslant0.05$)，说明 *PD-1*、*B7* 和 *CTLA-4* 在所有分期及年龄段的乳腺癌患者体内表达上升。从图 5 可知，与正常组织相比，*PD-1*、*B7*

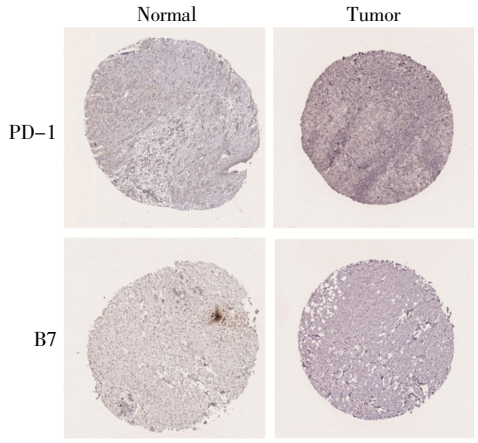


图 3 PD-1 和 B7 在乳腺癌中表达的典型免疫组化图像

Fig.3 Typical immunochemistry images of PD-1 and B7 expression in breast cancer

和 *CTLA*-4 在 luminal A 型乳腺癌、人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)阳性乳腺癌和三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC) 3 种乳腺癌细胞亚型中的表达量都有显著变化; 并且, *B7* 和 *CTLA*-4 在 TNBC 亚型中显示出最高的表达, 预示 PD-1 信号通路相关基因在 TNBC 的发生发展中扮演着重要的角色。

2.4 PD-1 信号通路相关基因在乳腺癌中的预后

迄今为止, 除了 PD-1 外, 人们对于乳腺癌中 PD-1 信号通路其他相关基因的表达水平或其可能的预后价值所知甚少。为了系统研究 PD-1 信号通路相关基因的表达与预后之间的关系, 通过 GEPIA 工具根据其 mRNA 表达进行了 Kaplan-Meier 生存分析。结果如图 6 所示, *CTLA*-4、*CD28*、*B7* 和 *PD-L1* 的结果不具有统计学意义, 只有*PD*-1 的结果具有显著性差异, 其高表达组具有更好的总体生存率。

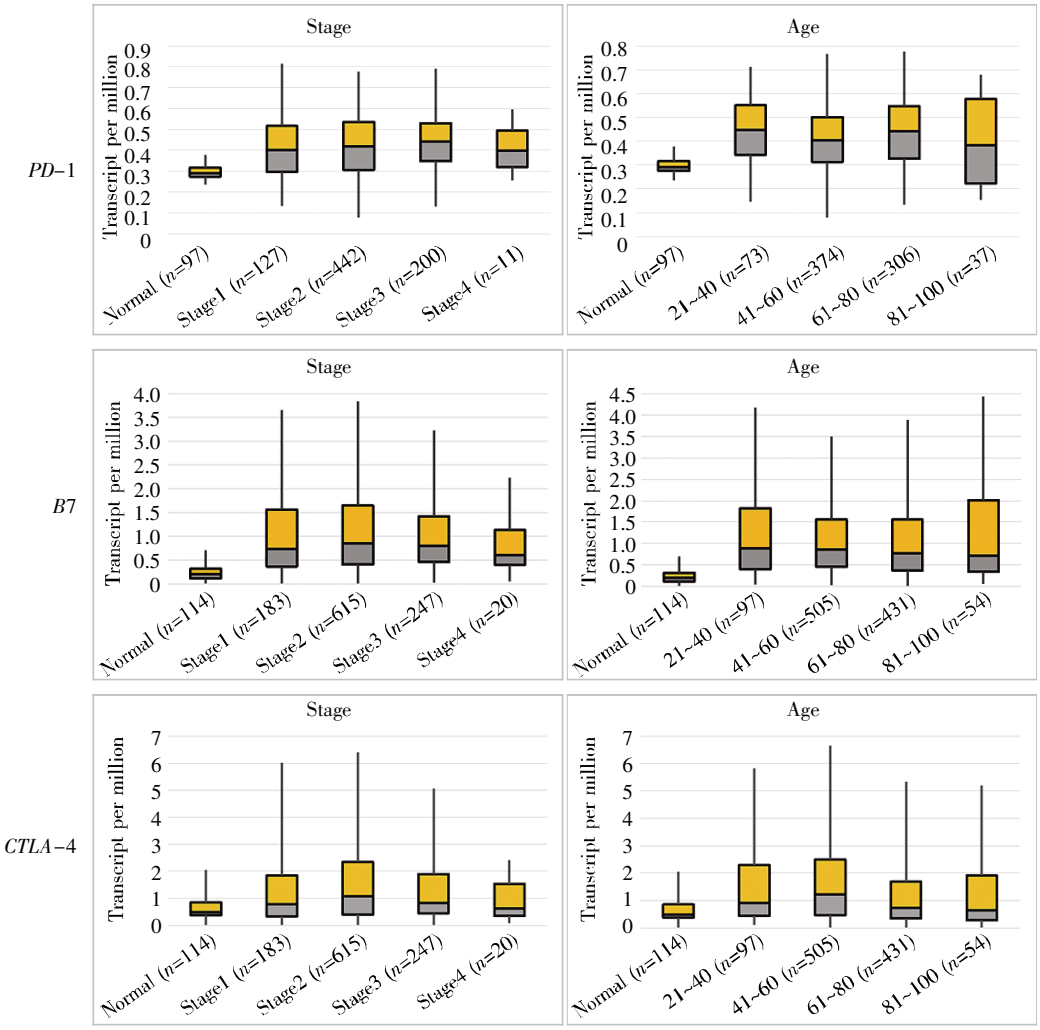


图 4 PD-1 信号通路相关基因的表达与乳腺癌分期和患者年龄的关系

Fig.4 The relationship between the expression of PD-1 signaling pathway-related genes and breast cancer stage and patient age

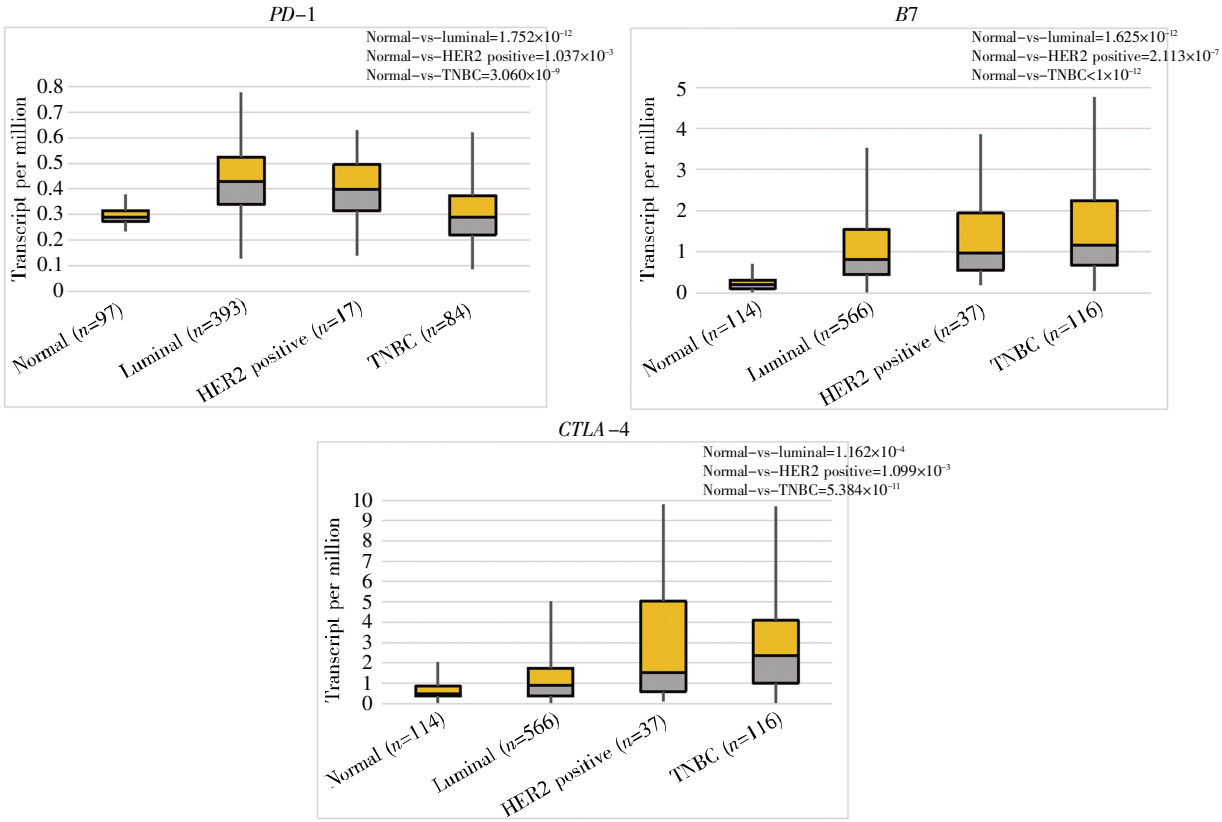


图 5　PD-1 信号通路相关基因在乳腺癌亚型中的表达分析

Fig.5　Expression of PD-1 signaling pathway related genes in breast cancer subtypes

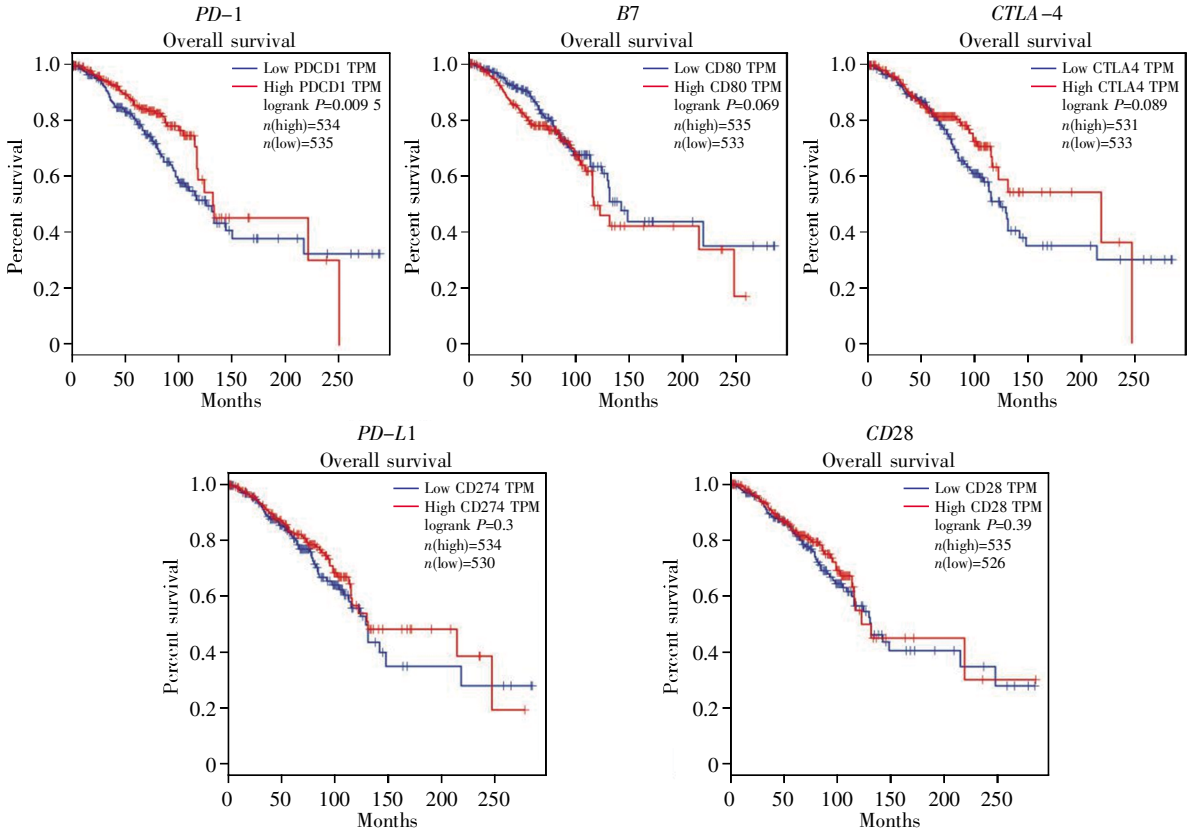


图 6　PD-1 信号通路相关基因在乳腺癌中的预后分析

Fig.6　Analysis of correlation between PD-1 signaling pathway related genes and breast cancer prognosis

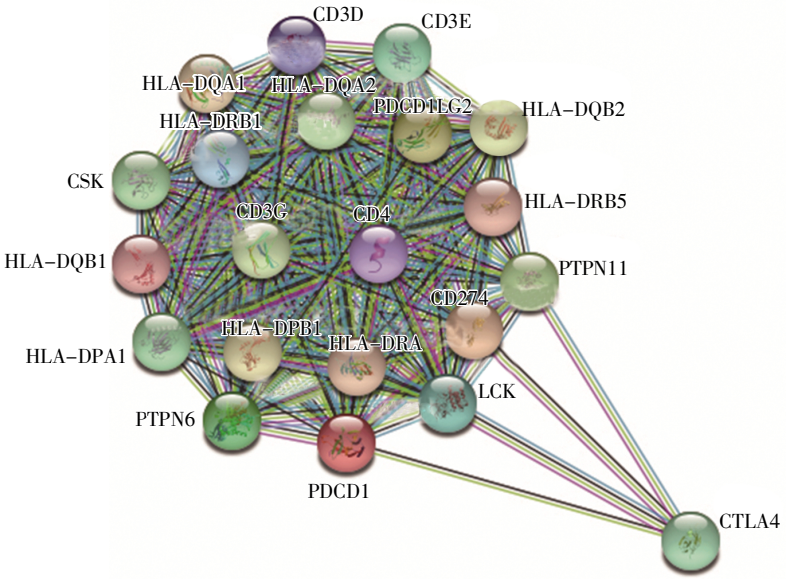


图 7 PD-1 信号通路相关蛋白质与其预测结合蛋白质间的相互作用网络

Fig.7 The interaction network between PD-1 signaling pathway related proteins and their predicted binding proteins

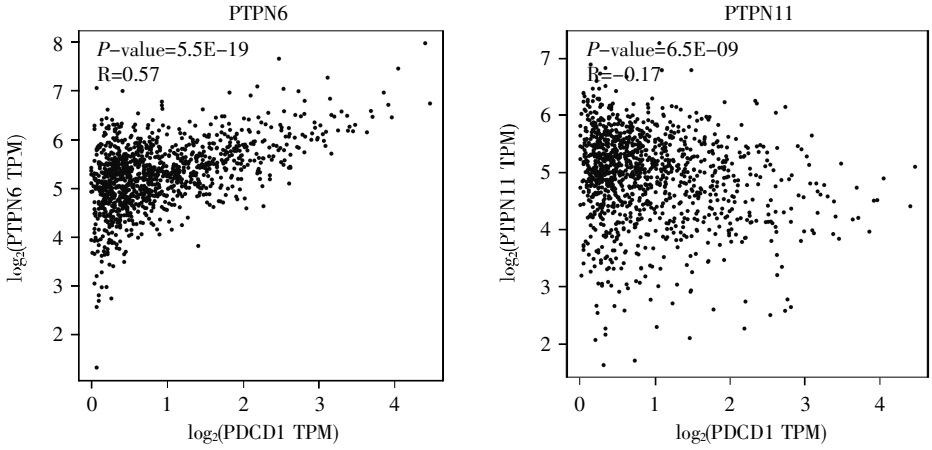


图 8 PD-1 与 PTPN-6 和 PTPN-11 表达的相关性

Fig.8 Correlation between PD-1 and PTPN-6 and PTPN-11 expression

2.5 PD-1 信号通路相关蛋白质的相互作用网络

为了更好地研究 PD-1 信号通路相关蛋白质的功能与其作用机制, 使用 STRING 数据库预测与其相互作用的蛋白质网络。根据设定的预测结合阈值, 结果如图 7 所示, 预测到的互作蛋白质共有 21 个, 其中多数蛋白质已有报道, 例如CD4、CD3G 及 CD274。它们参与 T 细胞活化、淋巴细胞活化、白细胞迁移、T 细胞凋亡、耐受诱导和细胞溶解等[15~16, 36]。通过计算 PD-1 与其预测结合蛋白质的相关系数, 我们发现正负相关系数最高的蛋白质为非受体型蛋白质酪氨酸磷酸酶 6 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6, PTPN6)。但是, PTPN6 与 PD-1 信号通路相关蛋白质之间相互作用的具体方式尚没有阐明。基于此, 我们通过 GEPIA 数据库分析了 PD-1 与 PTPN6 的相关性。图 8 的分析结果显示, PD-1 的表达与PTPN6 呈正相关, 与 PTPN11 呈负相关, 而 PTPN 家族主要在各种受体和细胞质蛋白质酪氨酸激酶的下游起作用, 参与从细胞表面到细胞核的信号转导, 因此推测 PD-1 可能还通过 PTPN 家族影响细胞的其他功能。

3 讨论

众所周知, 肿瘤及其微环境可以影响癌细胞的侵袭、增殖和转移功能[37~39]。尽管临床已经将许多化学疗法及外科手术应用于癌症的治疗, 但是人们仍然认为人类的免疫系统是抵抗癌症最基本的、有效的武器[40]。通过抑制免疫检查点 PD-1 和

PD-L1 来治疗癌症是细胞毒性免疫反应最关键的生物学手段之一, 其抗体已获得 FDA 前所未有的快速授权[41~42]。然而, PD-1/PD-L1 的抑制剂并不是对每个个体都有效, 这就需要对 PD-1 及其信号通路相关基因调控的特定机制有全面的了解[43]。

在先前的研究中, 研究基因的表达往往需要大量的基础实验, 存在时间周期较长和样品数量过少的缺点。生物信息学的出现为我们研究基因的表达提供了新的工具。大量研究显示, 生物信息已经被广泛地应用于基因在正常组织与癌症组织中的表达分析, 以及基因表达与患者生存的研究。Ge 等[44]通过荟萃分析 TCGA 的数据发现, 雌激素受体 α 和 β 在胃癌中异常表达, 并且, 雌激素受体 β 的高表达与淋巴结转移呈负相关, 雌激素受体 α 的表达可能与胃癌患者的预后不良有关。Qin 等[45]通过 TCGA 数据库分析发现, USP37 (ubiquitin-specific peptidase 37)在乳腺癌组织中的表达升高, 其过表达与死亡率增加密切相关; 进一步的 GSEA 分析显示, 在 TCGA 乳腺癌样品中, USP37 的表达与细胞生长和转移呈正相关, 而与细胞凋亡呈负相关。需要指出的是, 以上生物信息学分析均得到了该研究团队的实验验证。基于生物信息学分析的高效性、可靠性, 为了探讨PD-1 信号通路相关基因在癌症中的意义, 本研究使用 Oncomine 数据库, 首先揭示了包括乳腺癌等在内的不同癌症中 PD-1 信号通路相关基因在 mRNA 水平上的表达, 发现 *PD*-1、*PD-L*1、*B*7、*CTLA*-4 和 *CD*28 在多数癌症中表达上调(图 1)。为了验证结果的准确性, 使用 TCGA 数据库从 mRNA 水平对上述 5 个基因在乳腺癌中的表达进行了分析, 发现除了 *PD-L*1 与 *CD*28, 其他基因的表达趋势与 Oncomine 结果一致(图 2)。然而, TCGA 数据库是通过提取肿瘤组织的全部 RNA 进行芯片测序的结果。因此, 基于我们的发现, 进一步从 HPA 数据库中提取了相关蛋白质的免疫组织化学图像(图 3), 以验证 TCGA 数据库的分析结果。基因的临床表达特征分析显示, PD-1 通路相关基因的表达与乳腺癌不同临床阶段和年龄均无关(图 4), 说明 PD-1 通路相关基因具有作为潜在标记物来治疗乳腺癌的可行性。但是, 这部分结论还需要通过收集大量的数据进行验证。此外, 蛋白质-蛋白质互作网络分析显示, PD-1 通路相关基因可以通过多种途径参与 T 细胞活化的生物学过程、淋巴细胞活化的调节、T 细胞活化的调节和白细胞迁移(图 7), 其中有的途径已经被验证, 有的尚待发现。

在免疫治疗中, PD-1/PD-L1 作为免疫检查点通常被上调, 以创建免疫抑制性肿瘤微环境, 并帮助癌细胞逃避免疫介导的破坏[46]。先前的研究表明, PD-1 通路相关基因与预后之间的相关性在不同类型的肿瘤之间是不同的[47~50]。值得注意的是, 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中, 低 PD-1^+ 的病人预后更差[51], 而在肝内胆管癌患者中, PD-1 的表达会对患者的生存产生负面影响[52]。在本研究中, 通过使用 TCGA 数据库中乳腺癌的生存数据, 我们发现在 PD-1 信号通路相关基因中 *PD*-1 的表达与乳腺癌患者的生存情况呈正相关性(图6)。研究显示, 在 127 例原发性乳腺癌中, PD-L1 的高表达与良好临床预后相关[53]。另一项针对乳腺癌患者的研究表明, PD-L1 的表达与 $CD8^+$ T 细胞呈正相关, 并具有良好的临床效果[54]。但是, 也有报道指出, PD-L1 的高表达与三阴性乳腺癌患者的预后较差有关, 这抵消了肿瘤浸润淋巴细胞的作用[55]。与上述报道不同, 本研究尚未发现 PD-L1 的表达与乳腺癌患者生存的关系(图 6)。迄今为止, PD-1 是否可预测乳腺癌患者的预后仍在争论中。我们的研究为以后开展基于 PD-1 信号通路相关的基因治疗提供了新的理论支持。但是, 由于 TCGA 与 Oncomine 中主要的患者为美国生活的白种高加索人, 黄色人种与黑色人种的数据量较少。因此, 往后还需大量收集不同肤色、人种乳腺癌患者的预后和 PD-1 信号通路相关基因的表达数据, 进一步确认 PD-1 信号通路相关基因的表达与乳腺癌患者预后的关系。

4　结论

在本研究中, 我们探讨了 PD-1 信号通路相关基因在泛癌中的表达, 发现 *PD*-1、*PD-L*1、*B*7、*CTLA*-4 和 *CD*28 在包括乳腺癌在内的大多数癌症中表达上升; 并通过对 TCGA 数据库的临床信息与表达信息的挖掘, 证实上述 5 个基因在乳腺癌中表达异常, 其中 *PD*-1 的表达结果通过 HPA 数据库中的免疫组化图像得到了验证。同时, 数据分析发现, *B*7 和 *CTLA*-4 在 TNBC 乳腺癌亚型中表达最高; 蛋白质互作网络分析显示, PD-1/PD-L1 信号通路与多种蛋白质存在结合的可能性; 相关性分析发现, PD-1 表达与 PTPN 家族多个靶点蛋白质的表达有关。此外, 基于乳腺癌患

者临床生存数据的 Kaplan-Meier 生存曲线显示，PD-1 高表达的乳腺癌患者的预后更好。

参考文献(References):

[1] ANSARI M T. WHO Guidelines on Physical Activity, Sedentary Behaviour and Sleep for Children under 5 Years of Age[M]. Geneva: World Health Organization, 2019.

[2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.

[3] CUMMINGS M C, SIMPSON P T, REID L E, *et al*. Metastatic progression of breast cancer: insights from 50 years of autopsies[J]. The Journal of Pathology, 2014, 232(1): 23-31.

[4] AL-MAHMOOD S, SAPIEZYNSKI J, GARBUZENKO O B, *et al*. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options[J]. Drug Delivery and Translational Research, 2018, 8(5): 1483-1507.

[5] REDDY K B. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options[J]. Current Oncology, 2011, 18(4): e173-e179.

[6] GASTON-JOHANSSON F, WATKINS C C, KANU I K, *et al*. The effects of symptoms on quality of life during chemotherapy in African-American women with breast cancer[J]. The Journal of the National Black Nurses Association, 2015, 26(2): 7-16.

[7] TAO J J, VISVANATHAN K, WOLFF A C. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer[J]. The Breast, 2015, 24(Suppl. 2): S149-S153.

[8] MCINTYRE B W, ALLISON J P. The mouse T cell receptor: structural heterogeneity of molecules of normal T cells defined by xenoantiserum[J]. Cell, 1983, 34(3): 739-746.

[9] HARDING F A, MCARTHUR J G, GROSS J A, *et al*. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones[J]. Nature, 1992, 356(6370): 607-609.

[10] RIBAS A. Releasing the brakes on cancer immunotherapy[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 373(16): 1490-1492.

[11] KRUMMEL M F, ALLISON J P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation[J]. Journal of Experimental Medicine, 182(2): 459-465.

[12] KONG K F, YOKOSUKA T, CANONIGO-BALANCIO A J, *et al*. A motif in the V3 domain of the kinase PKC-theta determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28[J]. Nature Immunology, 2011, 12(11): 1105-1112.

[13] ESENSTEN J H, HELOU Y A, CHOPRA G, *et al*. CD28 costimulation: from mechanism to therapy[J]. Immunity, 2016, 44 (5): 973-988.

[14] HODI F S. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma[J]. The New England Journal of Medicine, 2010, 363(13): 711-723.

[15] ISHIDA Y, AGATA Y, SHIBAHARA K, *et al*. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death[J]. The EMBO Journal, 1992, 11(11): 3887-3895.

[16] MAMALIS A, GARCHA M, JAGDEO J. Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma[J]. Archives of Dermatological Research, 2014, 306(6): 511-519.

[17] BUTTE M J, KEIR M E, PHAMDUY T B, *et al*. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses[J]. Immunity, 2007, 27(1): 111-122.

[18] FREEMAN G J, LONG A J, IWAI Y, *et al*. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. Journal of Experimental Medicine, 2000, 192(7): 1027-1034.

[19] LATCHMAN Y, WOOD C R, CHERNOVA T, *et al*. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation[J]. Nature Immunology, 2001, 2(3): 261-268.

[20] RODIG N, RYAN T, ALLEN J A, *et al*. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates $CD8^+$ T cell activation and cytolysis[J]. European Journal of Immunology, 2003, 33(11): 3117-3126.

[21] IWAI Y, ISHIDA M, TANAKA Y, *et al*. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2002, 99(19): 12293-12297.

[22] KODUMUDI K N, SIEGEL J, WEBER A M, *et al*. Immune checkpoint blockade to improve tumor infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy[J]. PLoS One, 11(4): e0153053.

[23] TUMEH P C, HARVIEW C L, YEARLEY J H, *et al*. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. Nature, 2014, 515(7528): 568-571.

[24] WOLCHOK J D, KLUGER H, CALLAHAN M K, *et al*. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma[J]. The New England Journal of Medicine, 2013, 369(2): 122-133.

[25] ROBERT C, LONG G V, BRADY B, *et al*. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 372(4): 320-330.

[26] BRAHMER J, RECKAMP K L, BAAS P, *et al*. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 373(2): 123-135.

[27] BORGHAEI H, PAZ-ARES L, HORN L, *et al*. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 373 (17): 1627-1639.

[28] SHARMA P, CALLAHAN M K, BONO P, *et al*. Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial[J]. The Lancet Oncology, 2016, 17(11): 1590-1598.

[29] MOTZER R J, ESCUDIER B, MCDERMOTT D F, *et al*. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 373(19): 1803-1813.

[30] FERRIS R L, BLUMENSCHEIN G, FAYETTE J, *et al*. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck[J]. The New England Journal of Medicine, 2016, 375(19): 1856-1867.

[31] RHODES D R, YU J, SHANKER K, *et al*. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform[J]. Neoplasia, 2004, 6(1): 1-6.

[32] TANG Z, LI C, KANG B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W98-W102.

[33] PONTEN F, JIRSTROM K, UHLEN M. The Human Protein Atlas-a tool for pathology[J]. The Journal of Pathology, 2008, 216 (4): 387-393.

[34] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A H, *et al*. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. Neoplasia, 2017, 19(8): 649-658.

[35] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, *et al*. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 43(D1): D447-452.

[36] MENG Q, YANG P, LI B, *et al*. $CD4^+PD\text{-}1^+$ T cells acting as regulatory cells during the induction of anterior chamber-associated immune deviation[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006, 47(10): 4444-4452.

[37] GARNIER L, GKOUNTIDI A O, HUGUES S. Tumor-associated lymphatic vessel features and immunomodulatory functions[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 720.

[38] SINGH S, CHAKRABARTI R. Consequences of EMT-driven changes in the immune microenvironment of breast cancer and therapeutic response of cancer cells[J]. Journal of Clinical Medicine, 2019, 8(5): 642.

[39] WU L, SAXENA S, AWAJI M, *et al*. Tumor-associated neutrophils in cancer: going pro[J]. Cancers, 2019, 11(4): 564.

(下转第 564 页)

[15] 梁建萍. 植物学[M]. 北京: 中国农业出版社(LIANG Jian-ping. Botany[M]. Beijing: China Agriculture Press), 2014: 246-304.
[16] 王文和, 关雪莲. 植物学[M]. 北京: 中国林业出版社(WANG Wen-he, GUAN Xue-lian. Botany[M]. Beijing: China Forestry Publishing House), 2015: 302-332.
[17] 马三梅, 王永飞. 植物生物学[M]. 北京: 科学出版社(MA San-mei, WANG Yong-fei. Plant Biology[M]. Beijing: Science Press), 2017: 254-294.
[18] 杨世杰, 汪矛, 张志翔. 植物生物学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社(YANG Shi-jie, WANG Mao, ZHANG Zhi-xiang. Plant Biology[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press), 2017: 280-329.
[19] 张宪省. 植物学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社(ZHANG Xian-sheng. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press), 2014: 234-299.
[20] 胡宝忠, 张友民. 植物学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社(HU Bao-zhong, ZHANG You-min. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press), 2011: 166.
[21] 陆时万, 徐祥生, 沈敏健. 植物学: 上册[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社(LU Shi-wan, XU Xiang-sheng, SHEN Min-jian. Botany (Vol. 1)[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press), 2011: 203-204.
[22] 叶创兴, 朱念德, 廖文波, 等. 植物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社(YE Chuang-xing, ZHU Nian-de, LIAO Wen-bo, *et al*. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press), 2014: 98-374.
[23] 强胜. 植物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社(QIANG Sheng. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press), 2017: 282-332.
[24] 金银根. 植物学[M]. 3 版. 北京: 科学出版社(JIN Yin-gen. Botany[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press), 2018: 266-316.
[25] SINGH G. Plant Systematics: An Intergrated Approach[M]. 3rd ed. Enfield: Science Publishers & Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010: 84, 503.
[26] 赵桂仿. 植物学[M]. 北京: 科学出版社(ZHAO Gui-fang. Botany[M]. Beijing: Science Press), 2009: 133-199.
[27] 周云龙, 刘全儒. 植物生物学[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社(ZHOU Yun-long, LIU Quan-ru. Plant Biology[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press), 2016: 342-370.
[28] 吴万春. 植物学[M]. 2 版. 广州: 华南理工大学出版社(WU Wan-chun. Botany[M]. 2nd ed. Guangzhou: South China University of Technology Press), 2004: 221-235.
[29] 吴国芳, 冯志坚, 马炜梁, 等. 植物学: 下册[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社(WU Guo-fang, FENG Zhi-jian, MA Wei-liang, *et al*. Botany (Vol. 2)[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press), 1992: 214-353.
[30] 胡金良. 植物学[M]. 北京: 中国农业大学出版社(HU Jin-liang. Botany[M]. Beijing: China Agriculture University Press), 2012: 221-234.
[31] RUDALL P J, STUPPY W, CUNNIFF J, *et al*. Evolution of reproductive structures in grasses (Poaceae) inferred by sister-group comparison with their putative closest living relatives, Ecdeiocoleaceae[J]. American Journal of Botany, 2005, 92(9): 1432-1443.
[32] CIAFFI M, PAOLACCI A R, TANZARELLA O A, *et al*. Molecular aspects of flower development in grasses[J]. Sexual Plant Reproduction, 2011, 24(4): 247-282.
[33] ZHOU T Y, LU L L, YANG G, *et al*. Brassicaceae[M]//WU Z Y, RAVEN P H, HONG D Y. Flora of China, Vol. 8. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2001: 1-193.
[34] LU L D, GU C Z, LI C L, *et al*. Rosaceae[M]//WU Z Y, RAVEN P H, HONG D Y. Flora of China, Vol. 9. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2003: 1-430.

(上接第 556 页)

[40] LONGO V, BRUNETTI O, AZZARITI A, *et al*. Strategies to improve cancer immune checkpoint inhibitors efficacy, other than abscopal effect: a systematic review[J]. Cancers, 2019, 11(4): 539.
[41] FORCE J, LEAL J H S, MCARTHUR H L. Checkpoint blockade strategies in the treatment of breast cancer: where we are and where we are heading[J]. Current Treatment Options in Oncology, 2019, 20(4): 35.
[42] O′DONNELL J S, LONG G V, SCOLYER R A, *et al*. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition[J]. Cancer Treatment Reviews, 2017, 52: 71-81.
[43] CONSTANTINIDOU A, ALIFIERIS C, TRAFALIS D T. Targeting programmed cell death-1 (PD-1) and ligand (PD-L1): a new era in cancer active immunotherapy[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2019, 194: 84-106.
[44] GE H, YAN Y, TIAN F, *et al*. Prognostic value of estrogen receptor α and estrogen receptor β in gastric cancer based on a meta-analysis and The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets[J]. International Journal of Surgery, 2018, 53: 24-31.
[45] QIN T, LI B, FENG X, *et al*. Abnormally elevated USP37 expression in breast cancer stem cells regulates stemness, epithelial-mesenchymal transition and cisplatin sensitivity[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018, 37(1): 287-293.
[46] PATEL S P, KURZROCK R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2015, 14(4): 847-856.
[47] CHOUEIRI T K, FAY A P, GRAY K P, *et al*. PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma[J]. Annals of Oncology, 2014, 25(11): 2178-2184.
[48] SCHALPER K A, VELCHETI V, CARVAJAL D, *et al*. *In situ* tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas[J]. Clinical Cancer Research, 2014, 20(10): 2773-2782.
[49] YANG C Y, LIN M W, CHANG Y L, *et al*. Programmed cell death-ligand 1 expression is associated with a favourable immune microenvironment and better overall survival in stage Ⅰ pulmonary squamous cell carcinoma[J]. European Journal of Cancer, 2016, 57: 91-103.
[50] ZHANG Y, KANG S, SHEN J, *et al*. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis[J]. Medicine, 2015, 94(6): e515.
[51] KIM S, NAM S J, PARK C, *et al*. High tumoral PD-L1 expression and low PD-1$^+$ or CD8$^+$ tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of a poor prognosis in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system[J]. Oncoimmunology, 2019, 8(9): e1626653.
[52] LU J C, ZENG H Y, SUN Q M, *et al*. Distinct PD-L1/PD1 profiles and clinical implications in intrahepatic cholangiocarcinoma patients with different risk factors[J]. Theranostics, 2019, 9(16): 4678-4686.
[53] UHERCIK M, SANDERS A J, OWEN S, *et al*. Clinical significance of *PD*1 and *PDL*1 in human breast cancer[J]. Anticancer Research, 2017, 37(8): 4249-4254.
[54] HOU Y, NITTA H, WEI L, *et al*. PD-L1 expression and CD8-positive T cells are associated with favorable survival in HER2-positive invasive breast cancer[J]. The Breast Journal, 2018, 24(6): 911-919.
[55] ZHU X, ZHANG Q, WANG D, *et al*. Expression of PD-L1 attenuates the positive impacts of high-level tumor-infiltrating lymphocytes on prognosis of triple-negative breast cancer[J]. Cancer Biology & Therapy, 2019, 20(8): 1105-1112.