

论著·基础研究

CXCL9 在乳腺癌中的表达及其与肿瘤免疫浸润特征的相关性研究

杜少倩, 陶梦玉, 曹 源, 王红霞, 胡孝渠, 范广建[#], 臧丽娟[#]

上海交通大学医学院附属第一人民医院肿瘤中心, 上海 201600

[摘要] **目的**·探究 C-X-C 模体趋化因子配体 9 (C-X-C motif chemokine ligand 9, CXCL9) 表达对乳腺癌患者预后的影响及其与肿瘤浸润免疫细胞 (tumor-infiltrating immune cell, TIIC) 的相关性。**方法**·从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库获得乳腺癌患者的 1 100 例癌组织和 112 例癌旁组织的转录组数据, 并采用 CIBERSORT 反卷积算法分析乳腺癌免疫微环境中 TIIC 亚群比例及其对患者的预后影响。分别从 TCGA 数据库、ImmPort 数据库和 GEPIA2 数据平台下载差异表达基因、免疫相关基因和乳腺癌预后相关基因, 运用 R 语言分析该 3 类基因集的相关关系, 以筛选目的基因。根据已下载的转录组数据, 分析 CXCL9 的正相关基因、CXCL9 mRNA 在乳腺癌组织和癌旁组织中的表达差异及其对患者预后的影响。利用 STRING 数据平台对 CXCL9 进行蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析, 利用 R 语言对 CXCL9 正相关基因和 PPI 网络获得的互作蛋白对应的基因行基因本体数据库 (Gene Ontology, GO) 功能分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome, KEGG) 通路分析。运用 Spearman 相关系数分析 CXCL9 mRNA 表达与 TIIC 亚群、免疫检查点相关基因的相关性。收集 60 例乳腺癌患者的石蜡组织样本并制成组织芯片, 采用免疫组织化学染色 (immunohistochemistry staining, IHC) 分析芯片中 CXCL9 表达和 CD8⁺T 细胞浸润的相关性。采用多重荧光免疫组织化学染色 (multiplex immunohistochemistry staining, mIHC) 分析芯片中乳腺癌组织间质内 CXCL9⁺ 细胞的类型。采用 Kaplan-Meier (KM) 生存曲线分析 CXCL9 mRNA 表达、CD8⁺T 细胞浸润双因素对乳腺癌患者预后的影响。**结果**·CIBERSORT 算法分析显示乳腺癌免疫微环境中 TIIC 亚群的分布比例差异大, 其对患者的预后影响也大不相同。绘制上述 3 类基因集的韦恩图, 筛选出目的基因 CXCL9。获得与 CXCL9 正相关的前 150 个基因。在乳腺癌 4 种分子分型中 CXCL9 mRNA 的表达水平高于癌旁组织 (均 $P=0.000$), 且其高表达与患者的良好预后相关 ($HR=0.624$, $P=0.013$)。通过 PPI 网络分析共获得 41 个互作蛋白。GO 和 KEGG 分析的结果显示, CXCL9 及其相关基因主要富集在免疫调控相关的生物功能和通路。Spearman 相关系数分析的结果显示, CXCL9 mRNA 表达与 CD8⁺T 细胞的浸润比例呈正相关, 与 M2 型巨噬细胞的浸润比例呈负相关, 且与多数免疫检查点基因的表达式呈正相关 (均 $P<0.05$)。IHC 实验结果显示, 相较于癌旁组织, 乳腺癌组织中 CXCL9 的表达较高, 且伴随 CD8⁺T 细胞浸润比例增加 ($P=0.000$); mIHC 结果发现, 乳腺癌间质中 CXCL9 在部分 CD68⁺ 肿瘤相关巨噬细胞和 CD11c⁺ 树突状细胞内表达。KM 生存曲线显示, 当 CXCL9 高表达时, CD8⁺T 细胞高浸润才能延长乳腺癌患者的生存期。**结论**·CXCL9 可作为乳腺癌患者良好预后的生物标志物, 在乳腺癌微环境中 CXCL9 的高表达与 CD8⁺T 细胞的浸润比例呈正相关并可能激活其抗肿瘤作用。同时, CXCL9 的表达可能与肿瘤组织中募集淋巴细胞至肿瘤微环境发挥抗肿瘤免疫应答功能密切相关。

[关键词] 乳腺癌; C-X-C 模体趋化因子配体 9; 肿瘤免疫浸润; 生物信息学分析; CD8⁺T 细胞**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.07.008 **[中图分类号]** R737.9 **[文献标志码]** A

CXCL9 expression in breast cancer and its correlation with the characteristics of tumor immunoinfiltration

DU Shaoqian, TAO Mengyu, CAO Yuan, WANG Hongxia, HU Xiaoqu, FAN Guangjian[#], ZANG Lijuan[#]

Department of Oncology Center, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201600, China

[基金项目] 上海申康医院发展中心临床三年行动计划 (SHDC2020CR2065B, SHDC2020CR5005); 浙江省自然科学基金 (LY20H160010)。**[作者简介]** 杜少倩 (1997—), 女, 硕士生; 电子信箱: dushaoqian@163.com。**[通信作者]** 臧丽娟, 电子信箱: lou19941205@163.com。范广建, 电子信箱: gjfan@shsmu.edu.cn。[#]为共同通信作者。**[Funding Information]** Clinical Research Plan of Shanghai Hospital Development Center (SHDC2020CR2065B, SHDC2020CR5005); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY20H160010)。**[Corresponding Author]** ZANG Lijuan, E-mail: lou19941205@163.com. FAN Guangjian, E-mail: gjfan@shsmu.edu.cn. [#]Co-corresponding authors.

[Abstract] **Objective** To explore the effect of C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9) expression on the prognosis of breast cancer patients and its correlation with tumor-infiltrating immune cells (TIICs). **Methods** Transcriptome data of 1 100 breast tumor tissues and 112 adjacent tissues were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. CIBERSORT deconvolution algorithm was used to analyze the proportion of TIIC subgroups in breast cancer immune microenvironment and its effect on the prognosis of patients. Differentially expressed genes, immune-related genes and breast cancer prognostic-related genes were downloaded from TCGA database, ImmPort database and GEPIA2 data platform, respectively. The intersection relationships of the three gene sets were analyzed by using R language, and the target genes were screened. Based on the downloaded transcriptome data, CXCL9 positive-related genes, the difference of CXCL9 mRNA expression in breast cancer tissues and adjacent tissues and its effect on the prognosis of patients were analyzed. STRING data platform was used to analyze the protein-protein interaction (PPI) network of CXCL9. Gene Ontology (GO) function analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) pathway analysis were performed on CXCL9 positive correlation genes and the genes corresponding to the interacting proteins obtained from the PPI network by using R language. Spearman correlation coefficient was used to analyze the correlation between CXCL9 mRNA expression and TIIC subgroups and immune checkpoint-related genes. Paraffin tissue samples of 60 clinical breast cancer patients were collected and made into tissue chips. The correlation between CXCL9 expression and CD8⁺ T cells infiltration in the tissue chips was detected by immunohistochemical staining (IHC). The types of CXCL9⁺ cells in breast cancer interstitium were analyzed by multiplex immunohistochemistry staining (mIHC). Kaplan-Meier (KM) survival curve was used to analyze the effect of CXCL9 mRNA expression and CD8⁺ T cell infiltration on the prognosis of breast cancer patients. **Results** CIBERSORT algorithm analysis showed that the distribution proportion of TIIC subgroups in breast cancer immune microenvironment varied greatly, and their effect on patients' prognosis was also different. The Venn diagram of three types of gene sets was drawn, and CXCL9 was screened out. The top 150 positive correlation genes with CXCL9 were obtained. CXCL9 mRNA expression levels in four molecular types of breast cancer were higher than those in adjacent tissues (all $P=0.000$), and their high expressions were significantly associated with good prognosis of patients ($P=0.013$). A total of 41 interacting proteins were obtained through PPI network analysis. GO and KEGG analysis showed that CXCL9 and its related genes were mainly enriched in biological functions and pathways related to immune regulation. Spearman correlation coefficient analysis showed that the expression level of CXCL9 mRNA was positively correlated with CD8⁺ T cells infiltration ratio, negatively correlated with M2-type macrophages infiltration ratio, and positively correlated with most immune checkpoint genes expression (all $P<0.05$). IHC experiments showed that CXCL9 was highly expressed in breast cancer tissues compared with adjacent tissues, accompanied by an increased percentage of CD8⁺ T cells infiltration ($P=0.000$). mIHC results showed that CXCL9 was expressed in some CD68⁺ tumor-associated macrophages (TAMs) and CD11c⁺ dendritic cells (DCs) in the stroma of breast cancer. KM survival curve showed that when CXCL9 was highly expressed, CD8⁺ T cells high infiltration could prolong the survival of breast cancer patients. **Conclusion** CXCL9 can be used as a biomarker for good prognosis of breast cancer patients. The high expression of CXCL9 in the microenvironment of breast cancer is positively correlated with the infiltration ratio of CD8⁺ T cells and may activate its anti-tumor effect. The expression of CXCL9 may be closely related to the recruitment of lymphocytes into the tumor microenvironment for anti-tumor immune response.

[Key words] breast cancer; C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9); tumor immunoinfiltration; bioinformatics analysis; CD8⁺ T cell

乳腺癌是女性最常见的癌症之一,也是女性癌症相关死亡的第二大原因^[1]。据统计,2022年全球女性乳腺癌新发病例数约占所有新诊断癌症数的31%^[1],位居女性恶性肿瘤第1位,因其死亡的人数估计占女性癌症相关死亡总人数的15%。近年来,临床上常采用免疫检查点抑制剂(immun checkpoint inhibitor, ICI)对乳腺癌患者进行治疗,该方法虽能大幅提升转移性乳腺癌患者的总生存率^[2-4],但多数患者存在对免疫疗法无响应或在响应治疗后出现复发等问题,缓解率各不相同。因此,探究乳腺癌转移的分子机制并发现有潜力的预后生物标志物和分子靶点对于乳腺癌早期转移过程中的干预和治疗具有重要的科学意义。

研究^[5-6]显示,乳腺癌的侵袭性和耐药性可能是由于其肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的高度异质性所致。有研究发现,TME由肿瘤细胞、

肿瘤浸润免疫细胞(tumor-infiltrating immune cell, TIIC)、细胞因子、趋化因子、细胞外基质等组成^[7],且各组分间的相互作用是TME异质性的重要原因之一,可直接或间接地促进肿瘤转移^[8-9]。其中,有研究^[10]已证实TIIC的数量和活动状态可决定结直肠癌患者的生存时间。相关研究^[11-13]显示,运输和招募免疫细胞到肿瘤组织中是启动和传递抗肿瘤免疫反应的重要环节,而运输和招募过程需通过特定的免疫细胞受体与趋化因子结合来介导。同时,肿瘤细胞也可以通过免疫检查点抑制T细胞的激活,从而逃避免疫杀伤。与免疫细胞低浸润肿瘤(“冷”肿瘤)的患者相比,免疫细胞高浸润肿瘤(“热”肿瘤)的患者预后较好^[14],其更有可能从ICI中获益^[15-16]。多种肿瘤类型的研究发现,CD8⁺T细胞浸润比例的增加与患者更好的预后相关^[14],且肿瘤抗原呈递和突变负荷是CD8⁺T细胞浸润相关的重要因

素之一^[17-18]。在TME中,长期的抗原暴露刺激可导致CD8⁺T细胞出现耗竭状态;在理想情况下,ICI则可逆转这种耗竭^[19-20]。

在本研究中,我们利用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)、STRING、ImmPort和GEPIA2等多个数据库进行生物信息学分析,描述乳腺癌TME中免疫细胞的浸润特征,并筛选得到目的基因即C-X-C模体趋化因子配体9(C-X-C motif chemokine ligand 9, *CXCL9*)。而后,通过临床乳腺癌石蜡组织标本进行实验验证,探究*CXCL9*与乳腺癌TME中募集淋巴细胞并促进其发挥抗肿瘤免疫应答功能的相关性,旨在为*CXCL9*抑制乳腺癌进展的机制研究提供新的方向,并为其作为乳腺癌的良好预后标志物和治疗靶点提供新的证据。

1 资料与方法

1.1 公共数据来源

从TCGA数据库(<https://portal.gdc.com>)获得乳腺癌患者的1100例癌组织和112例癌旁组织的转录组数据及其相应的临床信息。对上述乳腺癌组织进行筛选,其分子分型可用数据如下:三阴(triple-negative, TN)型190例、人类表皮生长因子受体2过表达(human epidermal growth factor receptor 2 over-expression, HER2⁺)型82例、管腔A(Luminal A, LA)型564例、管腔B(Luminal B, LB)型217例。

1.2 生物信息学数据分析

1.2.1 乳腺癌微环境中TIIC的相关分析 根据从TCGA数据库获取的转录组数据和患者临床信息,采用CIBERSORT反卷积算法评估乳腺癌微环境中22种TIIC亚群的比例,并通过R语言ggplot2包和pheatmap包绘制可视化聚类热图^[21];采用Kruskal-Wallis检验分析TIIC亚群在4种分子分型间的占比差异。运用Kaplan-Meier(KM)生存曲线分析TIIC浸润水平与乳腺癌患者总生存期(overall survival, OS)的相关性。

1.2.2 目的基因*CXCL9*的筛选 根据TCGA数据库的转录组数据,使用R语言limma包分析乳腺癌和癌旁组织的差异表达基因(differentially expressed gene, DEG);将校正 $P < 0.05$ 、差异倍数(fold change, FC)的对数的绝对值($|\log_2(FC)|$) > 2 作为DEG的筛选条

件,取 $\log_2(FC) > 2$ 的上调基因作为基因集一。从ImmPort数据库(<https://www.immport.org/home>)中下载免疫相关基因,记为基因集二。从GEPIA2数据平台(<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)筛选出影响乳腺癌患者生存的具有显著意义的前500个基因,记为基因集三。利用R语言VennDiagram包分析上述3个基因集的相交关系,获得目的基因。

1.2.3 *CXCL9* mRNA的表达分析及其对患者的预后影响 根据从TCGA数据库获得的转录组数据和患者临床信息,在GEPIA2数据平台分析*CXCL9* mRNA在不同类型的癌症及其对应的正常组织中的表达,利用Kruskal-Wallis检验分析*CXCL9* mRNA在乳腺癌和癌旁组织、不同分子分型乳腺癌间的表达差异。根据*CXCL9* mRNA表达量的中位数将患者分为高表达组 and 低表达组,并利用KM生存曲线分析其表达与乳腺癌患者OS的相关性。

1.2.4 蛋白质相互作用网络的构建 利用STRING(<http://string-db.org>)数据平台筛选*CXCL9*相关的互作蛋白并构建蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。即以“相互作用蛋白的交互作用得分(中位数置信度)大于0.4”作为筛选条件^[22],将获得的蛋白用以构建PPI网络,并将该网络中的所有蛋白对应的基因作为数据集一。

1.2.5 *CXCL9*及其相关基因的GO功能分析和KEGG通路分析 根据TCGA数据库获取的转录组数据,运用Spearman相关系数评估*CXCL9*和其他基因之间的相关性,并筛选出正相关系数中前150位的基因作为数据集二。使用R语言clusterProfiler包对数据集一和数据集二合并行基因本体数据库(Gene Ontology, GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome, KEGG)通路分析;其中,GO功能分析包括生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)分析。设定 $P < 0.05$ 且富集因子 > 1.5 为筛选标准。

1.2.6 *CXCL9* mRNA表达与TIIC亚群的相关性分析及对患者OS影响 运用Spearman相关系数分析*CXCL9* mRNA表达与乳腺癌微环境中TIIC亚群、免疫检查点基因的相关性。根据*CXCL9* mRNA表达量中位数和CD8⁺T细胞浸润比例中位数分为4组,即组别1为*CXCL9* mRNA低表达+CD8⁺T细胞低浸润、组别2为*CXCL9* mRNA低表达+CD8⁺T细胞高浸润、

组别3为CXCL9 mRNA高表达+CD8⁺T细胞低浸润、组别4为CXCL9 mRNA高表达+CD8⁺T细胞高浸润,利用KM生存曲线分析CXCL9 mRNA表达和CD8⁺T细胞(TIIC亚群之一)浸润比例双因素对乳腺癌患者OS的影响。

1.3 组织标本收集

选择2016—2019年上海交通大学医学院附属第一人民医院的60例乳腺癌患者的石蜡组织样本(其中癌组织60例、癌旁组织40例),将其制作成组织芯片;采集患者的相关临床信息,包括肿瘤大小、分子分型、病理分期、生存时间等。

1.4 主要试剂及仪器

二甲苯和乙醇(国药集团化学试剂有限公司),通用型强力抗原修复液(上海碧云天生物技术有限公司),多重荧光免疫组织化学试剂盒(Opal™ 7-Color Manual IHC Kit, Akoya Biosciences, 美国),CD8 α 抗体(Proteintech, 美国),CXCL9抗体(Affinity, 美国),CK7抗体、CD68抗体、CD11c抗体(Abcam, 英国)。光学显微镜(Nikon, 日本),全自动定量病理成像分析系统(PerkinElmer Vectra Polaris™, 美国)。

1.5 实验方法

1.5.1 CXCL9表达水平及其与CD8⁺T细胞浸润的相关性分析 采用免疫组织化学染色(immunohistochemistry staining, IHC)对组织芯片中的乳腺癌和癌旁组织进行分析,即将芯片经65℃烘烤60 min、二甲苯脱蜡、乙醇梯度浓度水化后,用通用型强力抗原修复液水浴修复20 min,自然冷却至室温。采用内源性生物素封闭液进行封闭后,一抗(CD8 α 抗体、CXCL9抗体工作浓度分别为1:20 000、1:200)4℃孵育过夜。次日使用二抗增强液、增强酶标山羊抗小鼠/兔IgG聚合物先后分别孵育20 min。DAB辣根过氧化物酶显色后,采用苏木精染细胞核,随后乙醇梯度浓度脱水、二甲苯透明,封片后于显微镜下进行观察,统计CXCL9阳性、CD8 α 阳性的细胞比例以及染色强度,并进行病理评分。具体标准如下:①对阳性细胞的占比进行统计,即小于5%记为0分,5%~25%记为1分,26%~50%记为2分,51%~75%记为3分,>75%记为4分。②对阳性细胞的染

色强度进行统计,即淡黄色记为1分,棕黄色记为2分,棕褐色记为3分。③将前述阳性细胞占比得分和染色强度得分相乘获得每个样本的分数,再将所有样本分数行Wilcoxon秩和检验。

1.5.2 乳腺癌间质CXCL9⁺细胞种类分析 采用多重荧光免疫组织化学染色(multiplex immunohistochemistry staining, mIHC)分析组织芯片中乳腺癌组织间质内的CXCL9⁺细胞种类,即将芯片进行烘烤、二甲苯脱蜡、乙醇梯度浓度水化、通用型强力抗原修复液水浴、自然冷却、内源性生物素封闭液封闭后,室温下一抗(CXCL9抗体工作浓度为1:200)孵育1~2 h或4℃孵育过夜,而后于室温下使用多聚辣根过氧化物酶标记的鼠兔混合二抗孵育10 min,荧光染料室温孵育10 min。

而后,在同一张芯片上重复3轮上述从抗原修复至荧光染料孵育的步骤,每轮仅孵育一种抗体(分别为CK7抗体、CD68抗体、CD11c抗体,工作浓度依次为1:500、1:500、1:300),顺序自定,直至所有一抗被荧光染料逐一标记完成。于室温下,用DAPI工作液孵育芯片5 min,抗荧光淬灭封片剂进行封片。最后,采用全自动定量病理成像分析系统扫描组织芯片,观察乳腺癌组织间质内CXCL9阳性的细胞类型。

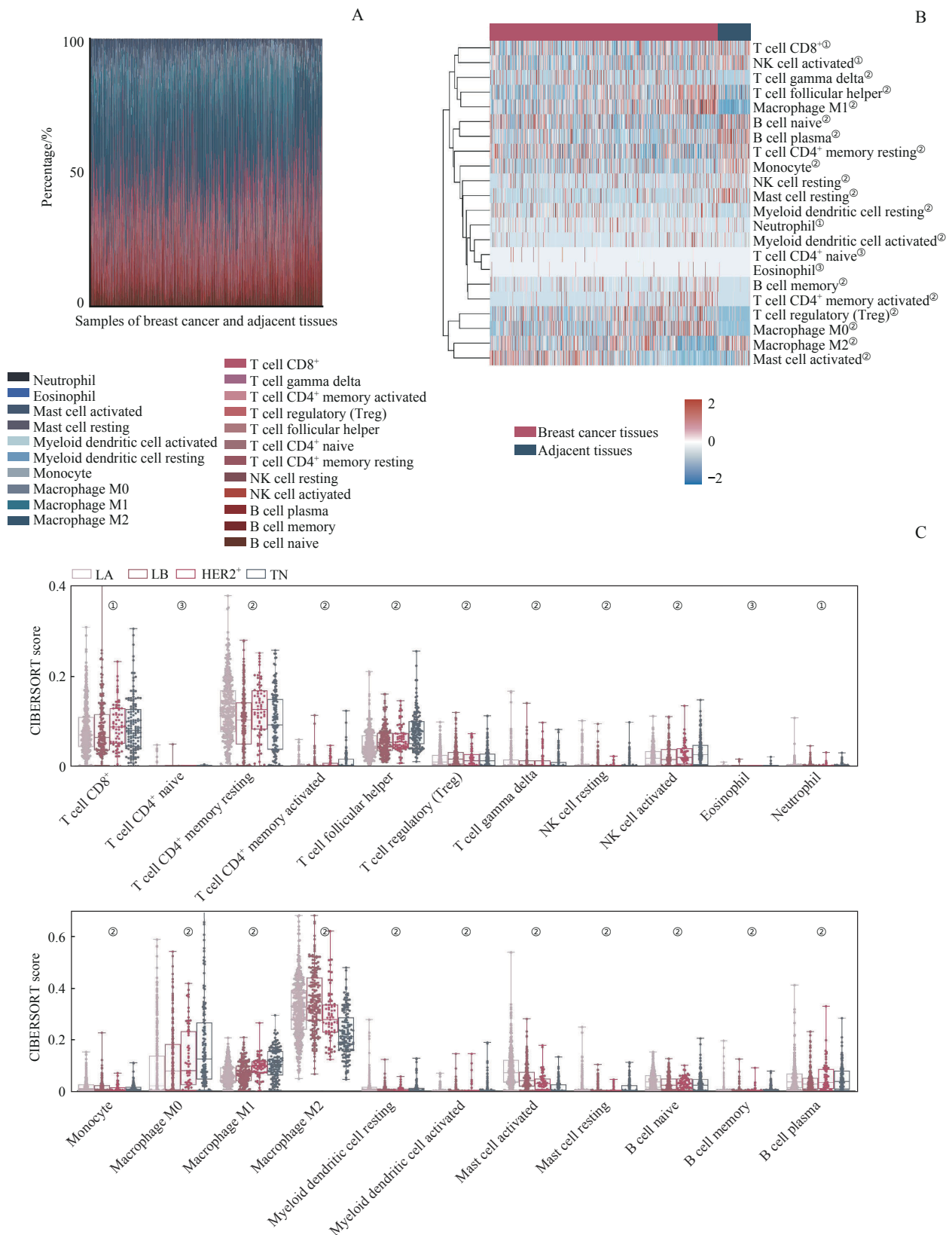
1.6 统计学分析

使用R语言软件和GraphPad Prism 9软件进行数据分析和可视化作图。使用Wilcoxon秩和检验进行2组间比较,使用Kruskal-Wallis检验进行3组及以上比较。使用KM生存曲线对CXCL9 mRNA表达或TIIC浸润水平与乳腺癌患者OS的相关性进行分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌微环境中TIIC亚群的差异分析和对患者预后影响

利用CIBERSORT反卷积算法提供的22种TIIC基因表达特征集,对乳腺癌组织及癌旁组织的转录组数据进行免疫浸润细胞分析。图1A展示了乳腺癌组织和癌旁组织中22种TIIC亚群的占比情况的柱状图;聚类热图的结果(图1B)显示,乳腺癌组织和癌旁组织中各TIIC亚群间的分布比例具有明显差异。随后,我们对22种TIIC亚群在4种乳腺癌分子分型中



Note: A. Proportions of 22 TIIC subgroups in the microenvironment of breast cancer and adjacent tissues. B. Comparison of the distributions of TIIC subgroups in breast cancer tissues and adjacent tissues by heatmap (^① $P=0.010$, ^② $P=0.001$, ^③ $P>0.05$). C. Differential analysis of 22 types of TIICs in different molecular types of breast cancer (^① $P=0.010$, ^② $P=0.001$, ^③ $P>0.05$).

图1 乳腺癌TME中TIIC亚群的差异分析

Fig 1 Differential analysis of TIIC subgroups in breast cancer TME

的占比进行比较,结果(图1C)发现多数TIIC亚群在不同亚型中的占比差异明显,其中CD8⁺T细胞、滤泡辅助T细胞、活化NK细胞、巨噬细胞M0、巨噬细胞M1在TN型和HER2⁺型中的比例明显高于Luminal型,活化的肥大细胞和巨噬细胞M2在Luminal型中的占比远高于另外2种分型(均 $P<$

0.05)。采用KM生存曲线分析TIIC浸润水平的高低与乳腺癌患者OS的相关性,结果(图2)显示在22种TIIC中,仅CD8⁺T细胞、巨噬细胞M1、滤泡辅助T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞的高浸润与乳腺癌患者较长的OS相关(均 $P<0.05$),巨噬细胞M2的高浸润则与患者较短的OS相关($P=0.000$)。

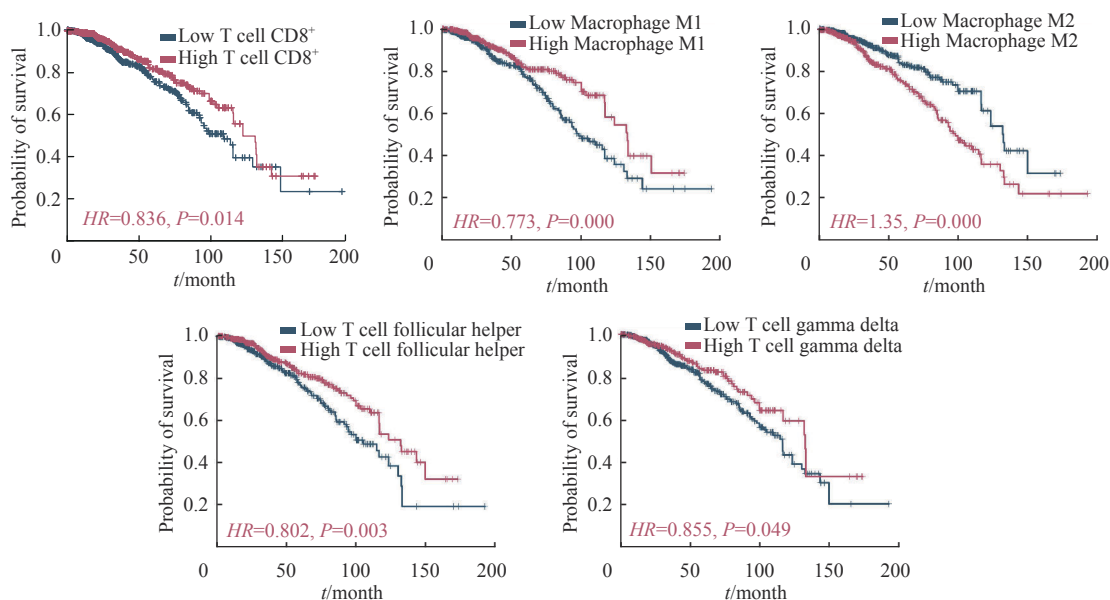


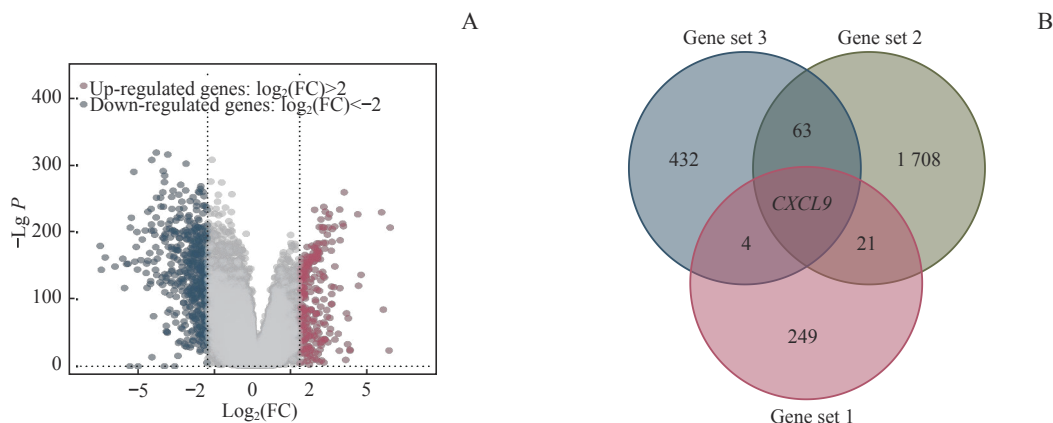
图2 TME中TIIC浸润水平对乳腺癌患者预后影响

Fig 2 Effect of TIICs infiltration ratio in TME on the prognosis of breast cancer patients

2.2 乳腺癌中目的基因的筛选及其表达水平与患者预后的相关性分析

采用R语言对来自TCGA数据库的乳腺癌组织及癌旁组织的转录组数据进行分析,绘制乳腺癌上调基因和下调基因火山图(图3A);其中,将 $\log_2(\text{FC}) > 2$ 的275个上调基因作为基因集一。从

ImmPort数据库获取1 793个免疫相关基因作为基因集二。从GEPID2数据平台筛选出影响乳腺癌患者生存的前500个基因作为基因集三。利用R语言分析上述3个基因集相交关系并绘制韦恩图,筛选获得目的基因——CXCL9(图3B)。随后,通过GEPID2数据平台分析CXCL9 mRNA在不同类型癌



Note: A. Volcano plot of DEGs between breast cancer tissues and adjacent tissues. B. Venn diagram of the target gene screened in the three gene sets.

图3 目的基因的筛选

Fig 3 Screening of target gene

症中的表达水平,和部分癌种及其对应正常组织的差异表达,结果(图4A)显示 *CXCL9* mRNA 在乳腺癌、膀胱尿路上皮癌、胆管细胞癌、结肠腺癌、食管癌、胶质母细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌、肾透明细胞癌、肝细胞癌、肺腺癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、前列腺癌、胃腺癌、子宫内膜癌等癌组织中的表达均高于其对应的正常组织(均 $P<0.05$)。

采用 Kruskal-Wallis 检验对乳腺癌(不同分子分型)及其癌旁组织中 *CXCL9* mRNA 的表达水平进行分析,结果(图4B)显示, *CXCL9* mRNA 在乳腺癌的4种分子分型中的表达水平高于癌旁组织(均 $P=0.000$),在 TN 型和 $HER2^+$ 型中的表达高于 Luminal 型(均 $P<0.05$)。利用 IHC 对组织芯片进行分析,结果(图4C、D)显示相较于癌旁组织,乳腺癌组织内肿瘤上皮细胞普遍高表达 *CXCL9*,且差异具有统计学意义($P=0.000$),与上述生物数据库的分析结果一致。为进一步探讨 *CXCL9* mRNA 表达与患者生存之间的关系,我们使用 KM 生存曲线评估 *CXCL9* mRNA 高表达和低表达对患者预后的影响。结果(图4E)显示, *CXCL9* mRNA 高表达与乳腺癌患者较长的 OS 有关($P=0.013$)。

2.3 *CXCL9* 的 PPI 网络构建和 *CXCL9* 及其相关基因的 GO 功能、KEGG 通路分析

为进一步探讨 *CXCL9* 基因在肿瘤发生中的分子机制,本研究对 *CXCL9* 相关的 PPI 网络蛋白对应的基因、乳腺癌中与 *CXCL9* 表达正相关的基因行 GO 功能分析和 KEGG 富集分析。图 5A 显示构建的 PPI 网络包括了 41 个蛋白,我们将其对应的基因记为数据集一。同时,将乳腺癌中与 *CXCL9* 表达正相关的前 150 位基因记为数据集二。将上述 2 个数据集合并,运用 R 语言对其行 GO 功能分析和 KEGG 通路分析。GO 功能分析的结果(图 5B)显示,多数基因与免疫细胞的生物过程有关,如适应性免疫应答、调节 T 细胞活化、免疫系统过程的负调控、免疫效应过程的调节、白细胞分化的调节、细胞因子产生的正调控等。KEGG 通路分析的结果(图 5C)显示, *CXCL9* 可能通过参与病毒蛋白与细胞因子或细胞因子受体的相互作用、T 细胞受体信号传导、自然杀伤细胞介导的细胞毒性等通路对 TME 中 TIIC 进行调节,来影响肿瘤发展及患者预后。

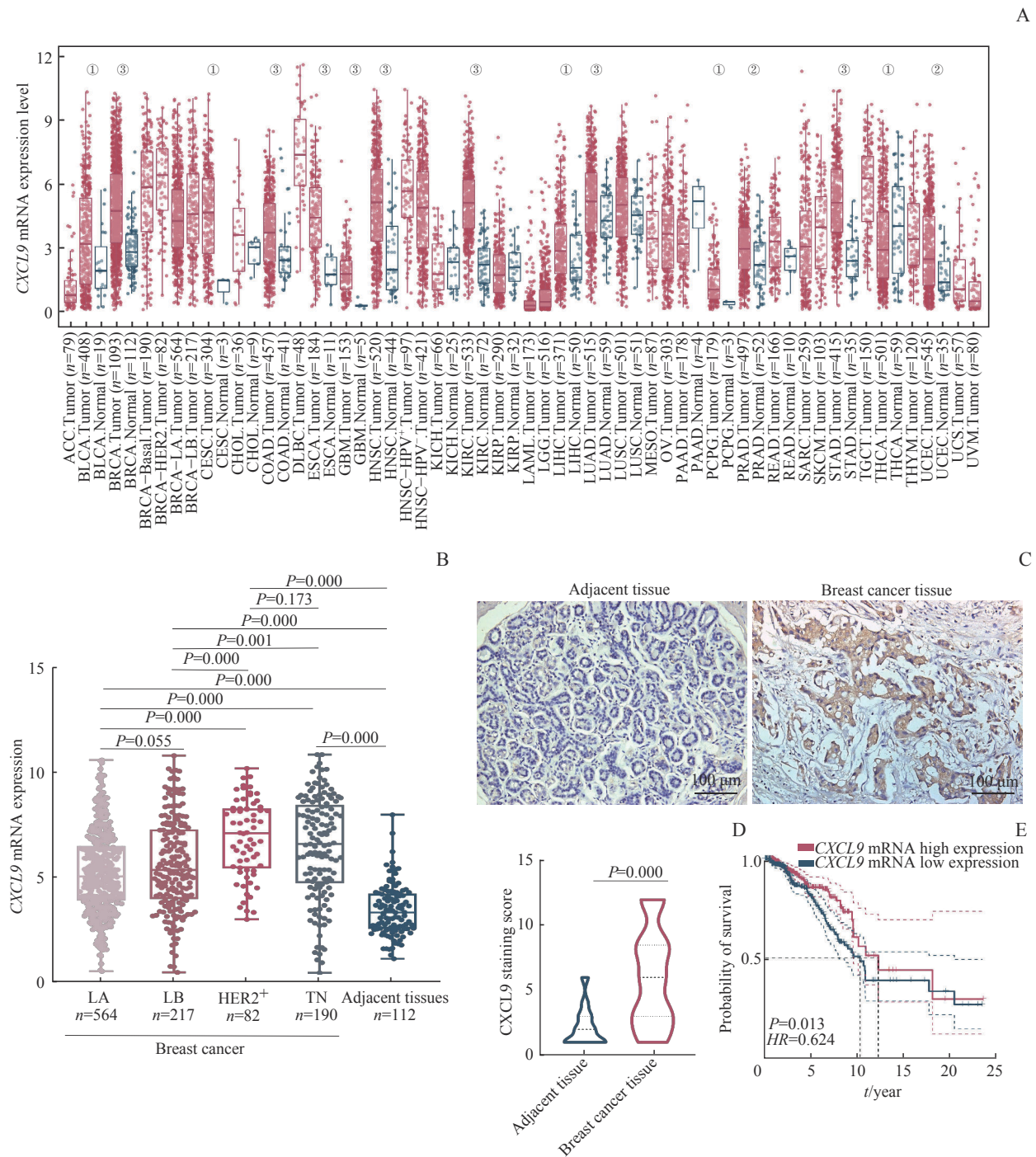
2.4 乳腺癌中 *CXCL9* mRNA 表达与 TIIC 相关性分析

本研究进一步探讨乳腺癌中 *CXCL9* mRNA 表达水平与 TIIC 浸润丰度的关系。采用 Spearman 相关系数分析乳腺癌微环境中免疫细胞浸润评分与 *CXCL9* mRNA 表达的相关性并绘制热图。结果(图 6A)显示, *CXCL9* mRNA 表达水平主要与记忆 B 细胞、 $CD8^+$ T 细胞、 $CD4^+$ 记忆 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、滤泡辅助 T 细胞、巨噬细胞 M1 等 TIIC 的浸润比例呈正相关(均 $P<0.05$),与静息型自然杀伤细胞、巨噬细胞 M0、巨噬细胞 M2、活化髓系树突状细胞、肥大细胞等的浸润比例呈负相关(均 $P<0.05$)。

随后,采用 IHC 对组织芯片进行分析,以验证 *CXCL9* 的表达水平与 TIIC 浸润数目的相关性。结果(图 6B、C)显示高表达 *CXCL9* 的肿瘤组织中 $CD8^+$ T 细胞浸润数目也较高,且该浸润数目的组间差异具有统计学意义($P=0.000$)。采用 mIHC 对肿瘤间质中 *CXCL9*⁺ 细胞种类进行检测,结果(图 6D)显示乳腺癌间质中部分 $CD68^+$ 肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)和 $CD11c^+$ 树突状细胞(dendritic cell, DC)均有 *CXCL9* 表达。

2.5 乳腺癌中 *CXCL9* mRNA 表达水平和 $CD8^+$ T 细胞浸润高低与患者预后的分析

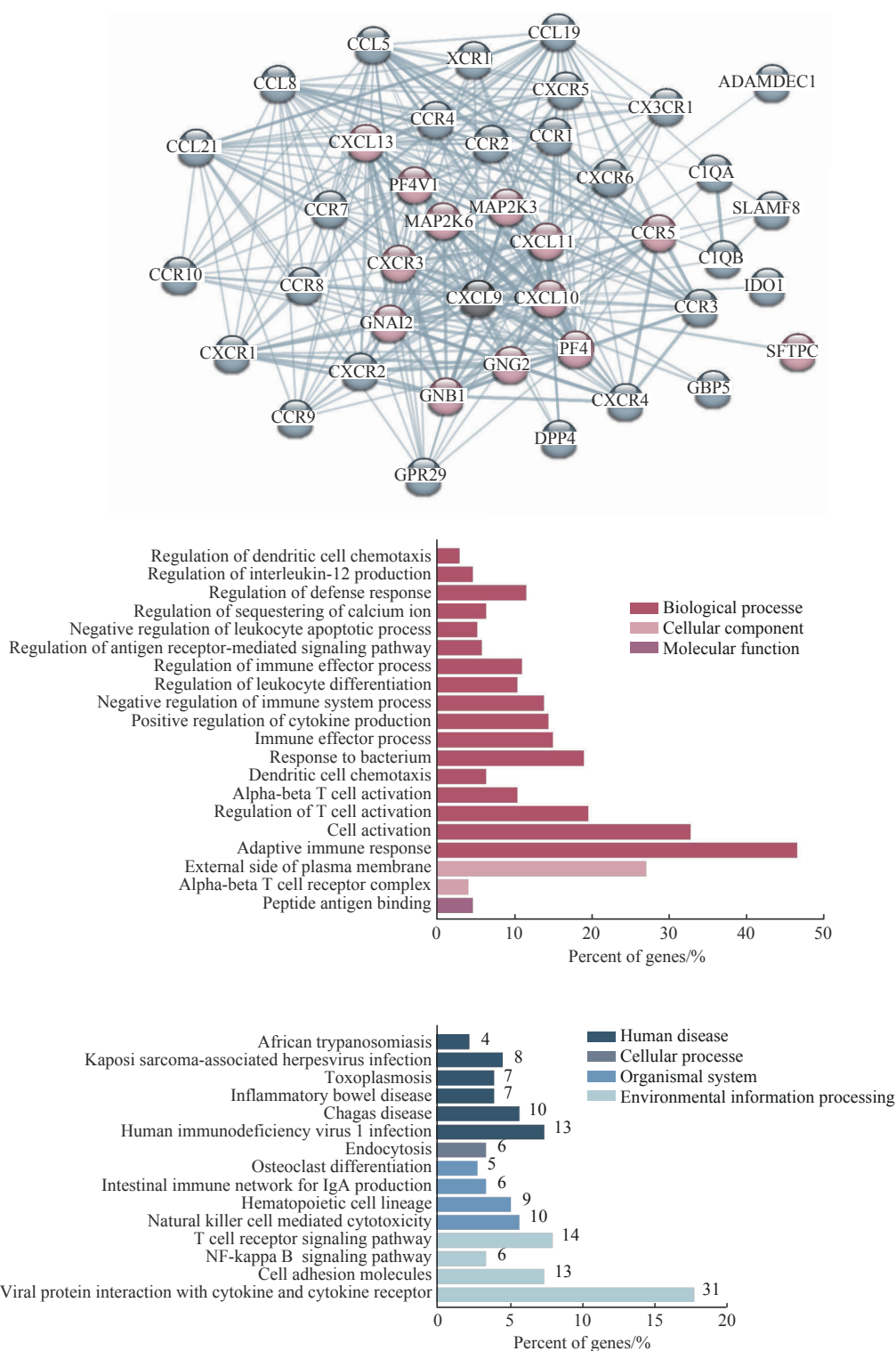
本研究使用 Spearman 相关系数分析 *CXCL9* mRNA 表达和 TIIC 浸润比例、免疫检查点基因表达水平之间的相关性,以探讨 *CXCL9* 在乳腺癌微环境中相关的免疫调控机制。结果(图 7A、B)显示, *CXCL9* mRNA 与大多数的免疫检查点基因呈强正相关性; $CD8^+$ T 细胞浸润比例与多数免疫检查点基因的表达亦呈正相关(均 $P<0.05$),其中 *LAG3* ($Rho=0.648$)、*PDCD1* ($Rho=0.809$)、*CTLA4* ($Rho=0.723$)、*TIGIT* ($Rho=0.821$) 这 4 个基因和 $CD8^+$ T 细胞的正相关性更为明显。为进一步探究 *CXCL9* 招募 $CD8^+$ T 细胞的潜在作用及其影响患者预后的机制,我们对两者开展 KM 生存曲线分析。结果(图 7C)显示, *CXCL9* mRNA 低表达时, $CD8^+$ T 细胞高浸润、低浸润的乳腺癌患者预后间差异无统计学意义;而 *CXCL9* 高表达时,与 $CD8^+$ T 细胞低浸润相比,细胞高浸润与乳腺癌患者的良好预后相关($P=0.001$)。



Note: A. Expression of *CXCL9* mRNA in different types of tumor and their corresponding normal tissues (① $P=0.050$, ② $P=0.010$, ③ $P=0.001$). ACC—adrenocortical carcinoma; BLCA—bladder urothelial carcinoma; BRCA—breast invasive carcinoma; CESC—cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma; CHOL—cholangiocarcinoma; COAD—colon adenocarcinoma; DLBC—lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma; ESCA—esophageal carcinoma; GBM—glioblastoma multiforme; HNSC—head and neck squamous cell carcinoma; KICH—kidney chromophobe; KIRC—kidney renal clear cell carcinoma; KIRP—kidney renal papillary cell carcinoma; LAML—acute myeloid leukemia; LGG—brain lower grade glioma; LIHC—liver hepatocellular carcinoma; LUAD—lung adenocarcinoma; LUSC—lung squamous cell carcinoma; MESO—mesothelioma; OV—ovarian serous cystadenocarcinoma; PAAD—pancreatic adenocarcinoma; PCPG—pheochromocytoma and paraganglioma; PRAD—prostate adenocarcinoma; READ—rectum adenocarcinoma; SARC—sarcoma; SKCM—skin cutaneous melanoma; STAD—stomach adenocarcinoma; TGCT—testicular germ cell tumor; THCA—thyroid carcinoma; THYM—thymoma; UCEC—uterine corpus endometrial carcinoma; UCS—uterine carcinosarcoma; UVM—uveal melanoma. B. Boxplot of *CXCL9* mRNA expression in four molecular types of breast cancer and adjacent tissues. C/D. Observation (C) and statistical analysis (D) of differential expression of *CXCL9* in breast cancer tissues and adjacent tissues by IHC. E. Detection of the effect of *CXCL9* mRNA expression on prognosis of breast cancer patients by KM survival curve.

图4 目的基因的表达水平对乳腺癌患者的预后影响

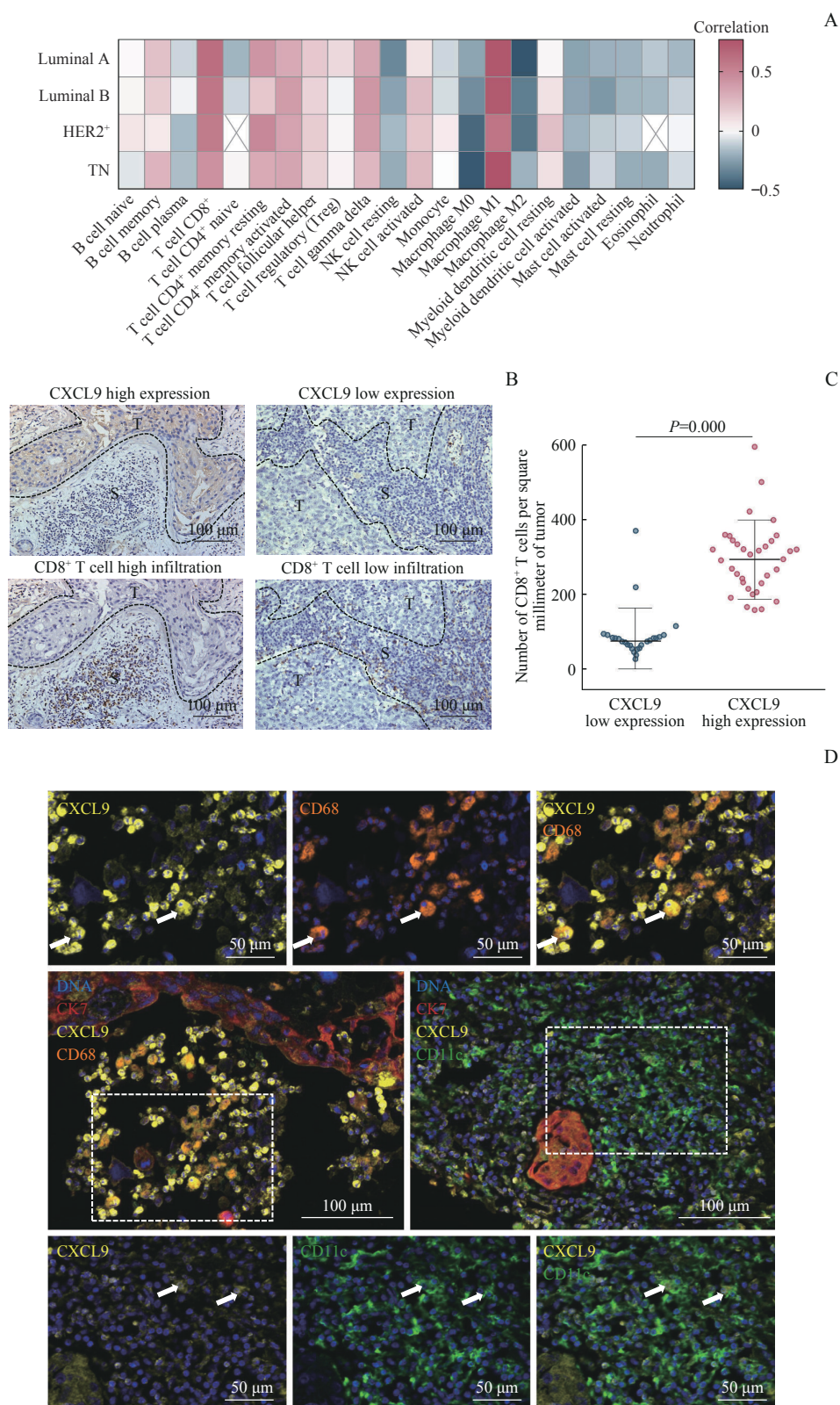
Fig 4 Effect of the expression of target genes on the prognosis of breast cancer patients



Note: A. PPI network of CXCL9. Red indicates proteins with CXCL9 interaction score >0.9, and blue indicates proteins with CXCL9 interaction score >0.7. PF4—platelet factor 4; PF4V1—platelet factor 4 variant 1; MAP2K3/6—dual specificity mitogen-activated protein kinase 3/6; GNAI2—guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2; GNG2—guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(o) subunit gamma-2; GNB1—guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) subunit beta-1; SFTPC—surfactant protein C; CCR1—C-C chemokine receptor type 1; CXCR1—C-X-C chemokine receptor type 1; CX3CR1—CX3C chemokine receptor 1; CCL5—C-C motif chemokine ligand 5; DPP4—dipeptidyl peptidase-4; GPR29—chemokine (C-C motif) receptor 6; XCR1—chemokine XC receptor 1; C1QA/B—complement component 1, Q subcomponent, A chain/B chain; IDO1—indoleamine 2,3-dioxygenase 1; SLAMF8—SLAM family member 8; ADAMDEC1—adam-like, decysin 1; GBP5—guanylate-binding protein 5. B/C. GO function analysis (B) and KEGG pathway analysis (C) of CXCL9 and its related genes.

图5 CXCL9的PPI网络构建和CXCL9及其相关基因的GO功能分析和KEGG通路分析

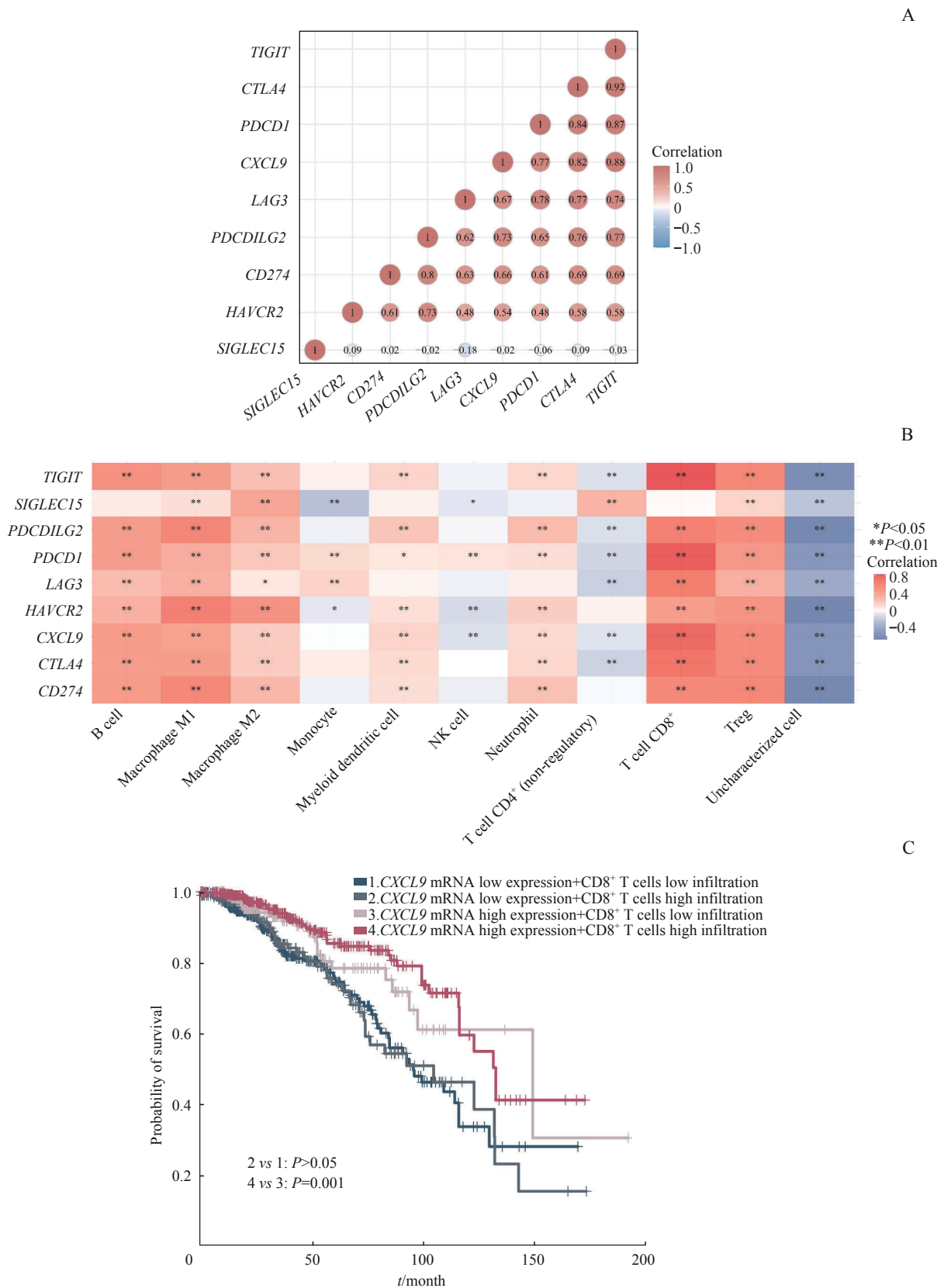
Fig 5 PPI network construction of CXCL9 and GO functional analysis and KEGG pathway analysis of CXCL9 and its related genes



Note: A. Spearman correlation analysis of TIICs infiltration ratio and CXCL9 mRNA expression. B. Observation of the relationship between CXCL9 expression and CD8⁺T cells infiltration ratio by IHC. S—stroma; T—tumor. C. Correlation between CXCL9 expression and the number of CD8⁺ T cells infiltration by beeswarm plot. D. Fluorescence images of CXCL9⁺ cell species in breast cancer interstitium. Yellow indicates CXCL9, orange indicates CD68, green indicates CD11c, red indicates CK7, and blue indicates DNA. The left dashed box indicates the field of upper 3 small figures, and the right one indicates the field of lower 3 small figures. The arrows indicate CXCL9⁺CD68⁺ cells or CXCL9⁺CD11c⁺ cells.

图6 乳腺癌中CXCL9 mRNA表达与TIIC浸润水平的相关性分析

Fig 6 Correlation between CXCL9 mRNA expression and TIICs infiltration ratio in breast cancer



Note: A. Correlation between *CXCL9* mRNA and immune checkpoint genes. B. Heatmap of various TIICs infiltration ratio in relation to *CXCL9* and immune checkpoint genes. C. Effect of combination of high and low expression of *CXCL9* mRNA and high and low infiltration of CD8⁺ T cells on the prognosis of breast cancer patients.

图7 *CXCL9* mRNA 表达水平和 CD8⁺ T 细胞浸润比例对乳腺癌患者预后的影响

Fig 7 Effect of *CXCL9* mRNA expression level and CD8⁺ T cells infiltration ratio on the prognosis of breast cancer patients

3 讨论

近年来,许多研究^[8-9]表明,TME在乳腺癌的发生、转移中起着至关重要的作用,TME中免疫效应细胞与抑制细胞的比例、免疫细胞浸润位置及免疫细胞激活程度也会影响患者预后及临床免疫治疗应答。在乳腺癌中,免疫治疗是癌症治疗的最新进展之一,尽管微卫星不稳定(microsatellite instability-high, MSI-H)/基因错配修复缺陷等生物标志物已被发现,但在临床实践中将MSI-H作为单药免疫治疗的预测因子的应答率仍较低^[23-25]。因此,开发有效的免疫治疗靶点和生物预测标志物是当前提高患者免疫治疗响应率的重要任务。

本研究通过生物信息学数据库分析,描述了乳腺癌微环境的特征,筛选出目的基因CXCL9;且相较于癌旁组织,CXCL9 mRNA在乳腺癌中表达更高,KM生存曲线显示其高表达与乳腺癌患者较长的OS相关。同时,先前的研究^[26]亦证明,在小鼠乳腺癌模型中CXCL9过表达组表现出更好的预后。继而提示,CXCL9或可作为预测乳腺癌预后的生物因子。而后,我们通过GO功能和KEGG通路分析发现,CXCL9及其相关基因主要在免疫调控相关功能和通路富集;分析目的基因的mRNA水平与TH1C的相关性后发现,CXCL9 mRNA与部分TH1C浸润比例呈正相关。IHC实验的结果显示,乳腺癌中CXCL9的表达与CD8⁺T细胞浸润数目呈正相关;KM生存曲线分析发现,只有在CXCL9 mRNA高表达时,CD8⁺T细胞高浸润才能延长乳腺癌患者的生存期。继而我们推测,CXCL9在乳腺癌微环境中可能是通过调控部分TH1C的迁移、激活等功能使患者获得更长的OS。YU等^[27]分析结肠癌微环境中的TH1C后发现,CXCL9-11 mRNA与自然杀伤细胞、CD8⁺T细胞的浸润比例高度相关;亦有小鼠模型的研究^[28-29]证明CXCL9可通过招募自然杀伤细胞、激活T细胞来减少肿瘤生长和转移。继而提示,CXCL9招募TH1C后可能会进一步调控TH1C的抗肿瘤作用,从而使患者获得更好的预后。此外,通过mIHC实验发现,乳腺癌间质中部分CD68⁺TAM和CD11c⁺DC均可表达CXCL9。同样,最近报道^[30]显示CXCL9在卵巢TME中的表达仅限于TAM和DC中,且CXCL9的表达依赖于肿瘤抗原的识别并由干扰素- γ (interferon- γ , IFN-

γ)特异性诱导上调。分析上述调控的原因,其可能的解释是前馈循环假说,即新招募的T细胞在抗原参与下产生IFN- γ 以诱导TAM和DC产生额外的CXCL9,进而可招募更多的T细胞进入TME,从而形成“热”肿瘤微环境,但该解释尚需进一步的功能实验研究验证。

本研究通过生物信息学、组织标本验证等手段,初步证明CXCL9可能可以作为评估乳腺癌患者预后和微环境免疫浸润类型的生物学标志物;并初步揭示了CXCL9可能是通过招募部分TH1C浸润并激活CD8⁺T细胞抗肿瘤功能抑制乳腺癌进展,从而延长患者的生存期。该结果或将为CXCL9作为乳腺癌的良好预后标志物和治疗靶点提供新的证据。在今后的工作中,我们将继续探索CXCL9调节乳腺癌免疫微环境的分子效应及促进CD8⁺T细胞发挥抗肿瘤作用的分子机制,从而优化乳腺癌患者的临床免疫治疗策略。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有实验均已通过上海交通大学医学院附属第一人民医院人类伦理委员会的审核批准(文件号:2019SQ220)。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

All experimental protocols in this study were reviewed and approved by the Ethical Committee of Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. 2019SQ220). Consent letters have been signed by the research participants or their relatives.

作者贡献/Authors' Contributions

臧丽娟、范广建、王红霞和胡孝渠参与了本研究的设计,杜少倩完成了生物信息学分析、临床组织验证实验及文章撰写,陶梦玉参与部分内容撰写,曹源参与部分生物信息学分析。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

ZANG Lijuan, FAN Guangjian, WANG Hongxia and HU Xiaoqu designed the study. DU Shaoqian completed bioinformatics analysis, clinical tissue validation experiments and article writing. TAO Mengyu participated in part of article writing. CAO Yuan participated in part of bioinformatics analysis. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2022-12-23

• Accepted: 2023-06-11

• Published online: 2023-07-28

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.
- [2] SCHMID P, ADAMS S, RUGO H S, et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(22): 2108-2121.
- [3] FRANZOI M A, DE AZAMBUJA E. Atezolizumab in metastatic triple-negative breast cancer: IMpassion130 and 131 trials-how to explain different results?[J]. *ESMO Open*, 2020, 5(6): e001112.
- [4] CORTES J, CESCON D W, RUGO H S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy *versus* placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial[J]. *Lancet*, 2020, 396(10265): 1817-1828.
- [5] GOODING A J, ZHANG B, GUNAWARDANE L, et al. The lncRNA BORG facilitates the survival and chemoresistance of triple-negative breast cancers[J]. *Oncogene*, 2019, 38(12): 2020-2041.
- [6] GONÇALVES H, GUERRA M R, DUARTE CINTRA J R, et al. Survival study of triple-negative and non-triple-negative breast cancer in a Brazilian cohort[J]. *Clin Med Insights Oncol*, 2018, 12: 1179554918790563.
- [7] 杨芳, 于雁. 肿瘤微环境: 肿瘤转移的关键因素[J]. *中国肺癌杂志*, 2015, 18(1): 48-54.
YANG F, YU Y. Tumor microenvironment: the critical element of tumor metastasis[J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2015, 18(1): 48-54.
- [8] JIA Q, WANG A, YUAN Y, et al. Heterogeneity of the tumor immune microenvironment and its clinical relevance[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11(1): 24.
- [9] JIA Q, WU W, WANG Y, et al. Local mutational diversity drives intratumoral immune heterogeneity in non-small cell lung cancer[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5361.
- [10] OHTANI H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer[J]. *Cancer Immun*, 2007, 7: 4.
- [11] BULE P, AGUIAR S I, AIRES-DA-SILVA F, et al. Chemokine-directed tumor microenvironment modulation in cancer immunotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9804.
- [12] HARLIN H, MENG Y, PETERSON A C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8⁺ T-cell recruitment[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 3077-3085.
- [13] MESSINA J L, FENSTERMACHER D A, ESCHRICH S, et al. 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 765.
- [14] FRIDMAN W H, PAGÈS F, SAUTÈS-FRIDMAN C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 298-306.
- [15] TENG M W, NGIOW S F, RIBAS A, et al. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11): 2139-2145.
- [16] GALON J, BRUNI D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 197-218.
- [17] GARRIDO F, APTSIAURI N, DOORDUIN E M, et al. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2016, 39: 44-51.
- [18] BONAVENTURA P, SHEKARIAN T, ALCAZER V, et al. Cold tumors: a therapeutic challenge for immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 168.
- [19] WHERRY E J, KURACHI M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(8): 486-499.
- [20] RIBAS A, WOLCHOK J D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1350-1355.
- [21] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453-457.
- [22] FRANCESCHINI A, SZKLARCZYK D, FRANKILD S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(database issue): D808-D815.
- [23] ADAMS S, GATTI-MAYS M E, KALINSKY K, et al. Current landscape of immunotherapy in breast cancer: a review[J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(8): 1205-1214.
- [24] NANDA R, CHOW L Q, DEES E C, et al. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: phase I b KEYNOTE-012 study[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(21): 2460-2467.
- [25] ADAMS S, LOI S, TOPPMEYER D, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(3): 405-411.
- [26] WALSER T C, MA X, KUNDU N, et al. Immune-mediated modulation of breast cancer growth and metastasis by the chemokine Mig (CXCL9) in a murine model[J]. *J Immunother*, 2007, 30(5): 490-498.
- [27] YU L, YANG X, XU C, et al. Comprehensive analysis of the expression and prognostic value of CXCL chemokines in colorectal cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt B): 107077.
- [28] BRONGER H, KRAEFT S, SCHWARZ-BOEGER U, et al. Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(1): R30.
- [29] Pein M, Insua-Rodríguez J, Hongu T, et al. Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1494.
- [30] DANGAJ D, BRUAND M, GRIMM A J, et al. Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(6): 885-900. e10.

[本文编辑] 邢宇洋

