

基于生物信息数据库分析 CD47 对肺鳞癌免疫微环境及其免疫治疗的影响

史卫忠, 徐蓓, 韩容, 赵志刚, 余克富^{*}(首都医科大学附属北京天坛医院药学部, 北京 100071)

摘要: 目的 采用生物信息学方法分析基因 CD47 对肺鳞癌免疫微环境的影响并预测其免疫治疗响应。方法 从 The Cancer Genome Atlas(TCGA)数据库下载基因 CD47 在肺鳞癌组织和正常组织中的测序数据并分析其表达差异。采用基因集富集分析研究 CD47 富集的免疫相关通路;通过肿瘤免疫数据库(Tumor Immune Estimation Resource, TIMER)和 TISIDB 数据库(<http://cis.hku.hk/TISIDB/TISIDB>)分析肺鳞癌患者中 CD47 基因表达情况与肿瘤微环境免疫细胞浸润的关系;同时也分析了 CD47 和其他免疫检查点基因 PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1 的相关性;采用 pRRophetic 和 TIDE 算法, 预测 CD47 基因表达与化疗药物敏感性以及免疫治疗的响应。结果 与正常组织相比, CD47 在肺鳞癌组织中低表达; CD47 富集了免疫相关通路如炎症反应、干扰素 α 反应、干扰素 γ 反应和 JAK-STAT 通路。2 个数据库分析结果显示, 在肺鳞癌组织中 CD47 表达水平与 B 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞以及树突状细胞呈正相关性。同时 CD47 与其他的免疫检查点 PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1 均呈一定的正相关性, 化疗敏感性结果显示, 在肺鳞癌组织中, 对于舒尼替尼、达沙替尼、阿霉素、吉西他滨等化疗药物, 高表达 CD47 组 IC₅₀ 值低于低表达组。但对于免疫治疗, 其响应率却低于低表达组。结论 CD47 在肺鳞癌组织中低表达, 能激活免疫相关通路, 对免疫治疗响应率高, 可作为肺鳞癌新型分子标志物。

关键词: 肺鳞癌; CD47; 免疫微环境; 化疗敏感性

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)17-2372-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223093

引用本文: 史卫忠, 徐蓓, 韩容, 等. 基于生物信息数据库分析 CD47 对肺鳞癌免疫微环境及其免疫治疗的影响[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(17): 2372-2377.

Research on Effect of CD47 on Immune Microenvironment and Immunotherapy of Lung Squamous Cell Carcinoma Based on Bioinformatics Database

SHI Weizhong, XU Bei, HAN Rong, ZHAO Zhigang, YU Kefu^{*}(Department of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of gene CD47 on immune microenvironment of lung squamous cell carcinoma and predict its immune response. **METHODS** The differences in the expression of CD47 between lung squamous cell carcinoma tissues and normal tissues were compared through The Cancer Genome Atlas(TCGA) databases. CD47 involved immune-related pathways were analyzed by Gene Set Enrichment Analysis(GSEA). Tumor Immune Estimation Resource(TIMER) databases and TISIDB databases(<http://cis.hku.hk/TISIDB/TISIDB>) were employed to analyze the relationship between CD47 gene expression in lung squamous cell carcinoma and immune cells infiltration in the tumor microenvironment. And further explored the associations between CD47 and other immune-related molecules such as PD-1, PD-L1, CTLA-4, IDO-1. Using the pRRophetic and TIDE algorithms, this study predicted the correlation between the expression of CD47 gene and chemotherapy drug sensitivity as well as the response to immunotherapy. **RESULTS** Compared with normal tissues, CD47 was lower expressed in lung squamous cell carcinoma tissues. It was found that CD47 could activate immune-related pathways such as the inflammatory response, interferon alpha response, interferon gamma response and JAK-STAT pathway. In lung squamous cell carcinoma tissues, the expression level of CD47 was significantly positively correlated with the infiltration level of B-cells, CD8⁺T-cells, CD4⁺T-cells, macrophage, neutrophils and dendritic cells according to the two databases. At the same time, CD47 showed a positive correlation with other immune checkpoints such as PD-1, PD-L1, CTLA-4, IDO1. The result of chemotherapy sensitivity indicated that in lung squamous cell carcinoma tissues, IC₅₀ values of high expression CD47 group were lower than that for chemotherapy drugs such as sunitinib, dasatinib, doxorubicin and gemcitabine. However, the response rate to immunotherapy was lower in the low expression group for the immunotherapy. **CONCLUSION** CD47 is low expressed in lung squamous tissue, it can activate immune related pathways, and has a high

作者简介: 史卫忠, 男, 硕士, 主管药师 E-mail: shiweizhong1983@163.com

^{*}通信作者: 余克富, 男, 博士, 主管药师 E-mail: kefu006@163.com

response rate to immunotherapy. It can be used as a novel molecular marker for lung squamous cell carcinoma.

KEYWORDS: lung squamous cell carcinoma; CD47; immune microenvironment; chemotherapy sensitivity

当前肿瘤的免疫治疗成为肿瘤治疗领域具有前景的研究方向之一。免疫治疗形式多样,如靶向 T 细胞的免疫检查点抑制剂^[1-2]、溶瘤病毒^[3]、肿瘤疫苗^[4]等,但目前只有少量的患者获益,因此,找到新的生物标记物来预测肿瘤免疫的疗效有重要意义。

CD47 是一种免疫球蛋白,可与信号调节蛋白 α (SIRP α)、血小板反应蛋白(thrombospondin-1, TSP1)以及整合素相互作用^[5-6],介导凋亡、增殖、免疫等一系列的反应。研究发现,在人类非霍奇金淋巴瘤的小鼠模型中,CD47 单抗治疗后,小鼠肿瘤体积明显缩小,生存率明显提高^[7]。由于 CD47 与巨噬细胞上的 SIRP α 相互作用后可阻止巨噬细胞吞噬,有人提出 CD47-SIRP α 阻断将会成为 PD-1/PD-L1 后部分肿瘤的免疫检查点阻断策略^[8]。

临床研究报告^[9],对于肺癌,CD47 过表达意味着较短的总生存期,但对于非小细胞肺癌,免疫组化显示其表达水平与总生存期的相关性无显著差异。为了进一步研究 CD47 在肺癌中的价值,本研究采用生物信息学方法,分析 CD47 基因在肺鳞癌组织中的表达情况,并分析 CD47 表达水平与免疫功能、肺鳞癌免疫微环境、化疗敏感性和免疫治疗响应的关系,希望为肺鳞癌治疗提供新的生物分子标记物,同时也为后期 CD47 在肺癌中的研究提供参考。

1 资料和方法

1.1 数据获取

TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)是由美国国家癌症研究所和国家人类基因组研究所合作建立的癌症研究项目。本研究下载其肺鳞癌的转录组表达数据,包括癌组织和正常组织, Xena(<http://xena.ucsc.edu/>)研究机构为本研究的肺鳞癌数据进行了标准化处理。

1.2 CD47 在肺鳞癌组织中的差异表达

从 TCGA 数据库下载肺鳞癌转录组数据(包含 502 例肺鳞癌组织, 51 例癌旁组织),并对其进行差异表达分析。

1.3 基因富集分析

采用 clusterProfiler 软件包对 CD47 基因表达谱

进行基因富集分析,以京都基因和基因组百科全书(KEGG)、特征基因集或效应基因集(HALLMARK)进行注释来发现 CD47 基因富集的免疫通路。

1.4 CD47 在肺鳞癌组织中的表达与免疫微环境的关系

使用 TIMER 和 TISIDB 数据库探究 CD47 的表达与免疫细胞浸润(B 淋巴细胞、CD4⁺淋巴细胞、CD8⁺淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞)水平的相关性。

1.5 CD47 与免疫检查点的相关性

从 TCGA 数据库得到 CD47 在肺鳞癌组织中的表达量,通过 Spearman 相关性分析研究 CD47 与免疫检查点如 PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1 的相关性。

1.6 CD47 表达水平与药物预测

按 CD47 在肺鳞癌中表达量的中位数将患者分为高表达组和低表达组,采用 pRRophetic 算法预测其对化疗药物的 IC₅₀ 值。

1.7 CD47 表达水平与免疫检查点治疗预测

按 CD47 在肺鳞癌中表达量的中位数将患者分为高表达组和低表达组,采用 TIDE(<http://tide.dfci.harvard.edu/>)算法预测其潜在的免疫治疗反应。

1.8 统计学处理

采用 R4.1.3 软件对数据进行统计分析。通过 *t* 检验比较 CD47 在肺鳞癌组织中和肺正常组织中的表达差异;采用非参数 Spearman 秩相关来计算 CD47 基因与肺鳞癌组织微环境中免疫细胞的相关性;*P*<0.05 为差异具有统计学意义。本研究中,统计分析和作图所用的 R 包为 ggplot2、ggsignif、enrichplot、clusterprofile、circlize。

2 结果

2.1 CD47 在肺鳞癌和正常组织间差异表达分析

用统计软件对 CD47 在肺鳞癌和正常组织中的表达进行统计学分析,结果见图 1。CD47 在正常肺组织中的表达量高于肺鳞癌组织中的表达量,且差异具有统计学意义(*P*<0.05)。

2.2 基因富集分析

采用 GSEA 分析 CD47 在免疫反应中的相关信号通路中的富集水平。采用加权富集法分析,随机迭代次数设为 1 000 次,所有其他参数均按默

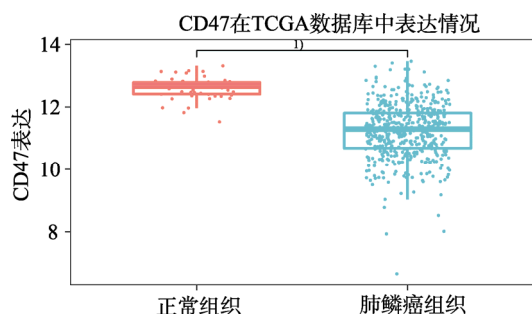


图1 CD47在肺鳞癌组织和正常组织中的表达与正常组织相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 1 Expression of CD47 in lung squamous cell carcinoma tissues and normal tissues Compared with normal tissues, $^{1)}P<0.05$.

认值设置。结果显示, GSEA 图中的峰均出现在前端, 因此说明 CD47 对这 4 个免疫相关的通路起激活作用, 见图 2。

2.3 CD47 与肺鳞癌免疫细胞浸润的相关性

肿瘤免疫微环境是肿瘤所在组织和肿瘤自身的免疫细胞浸润的内在环境, 根据表达谱数据, 通过一些主流的算法^[10], 推测出肿瘤微环境中免疫细胞的浸润比例, TIMER 和 TISIDB 数据库均可用转录组数据分析肿瘤组织中免疫细胞的浸润情况。结

果发现, 2 个数据库均推算出 CD47 的表达水平与 6 种免疫细胞的浸润水平显著正相关, 见图 3。

对于 TIMER 数据库, 其相关性为 B 细胞($r=0.108$, $P<0.05$)、CD8⁺T 细胞($r=0.313$, $P<0.05$)、CD4⁺T 细胞($r=0.17$, $P<0.05$)、巨噬细胞($r=0.292$, $P<0.05$)、中性粒细胞($r=0.501$, $P<0.05$)以及树突状细胞($r=0.362$, $P<0.05$)。

对于 TISIDB 数据库, 其相关性为 B 细胞($r=0.22$, $P<0.05$)、CD8⁺T 细胞($r=0.265$, $P<0.05$)、CD4⁺T 细胞($r=0.223$, $P<0.05$)、巨噬细胞($r=0.352$, $P<0.05$)、中性粒细胞($r=0.451$, $P<0.05$)以及树突状细胞($r=0.488$, $P<0.05$)。

2.4 CD47 与免疫检查点相关性

通过 Spearman 相关性分析考察了 CD47 与一些免疫检查点的相关性, 结果见图 4。CD47 与 PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1 均呈正相关性, 由于 IDO1 和 CD47 之间连线的宽度较其他免疫检查点之间的程度大, 因此, CD47 与 IDO1 的相关性较其他免疫检查点强。

2.5 CD47 与药物预测

利用 pRRophetic 算法^[11], 使用 GDSC(the

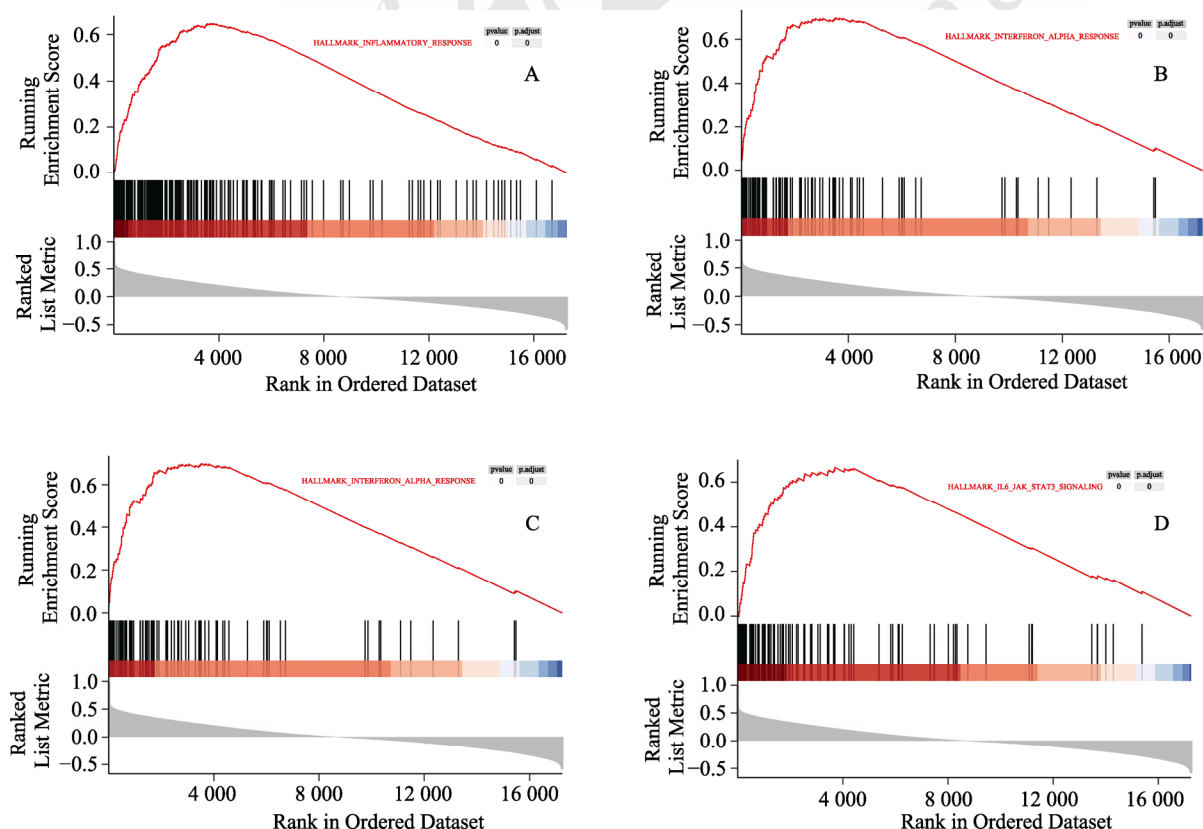


图2 GSEA 富集通路

A-炎症反应; B-干扰素 α 反应; C-干扰素 γ 反应; D-JAK-STAT。

Fig. 2 GSEA enrichment pathway

A-inflammatory response; B-interferon alpha response; C-interferon gamma response; D-JAK-STAT.

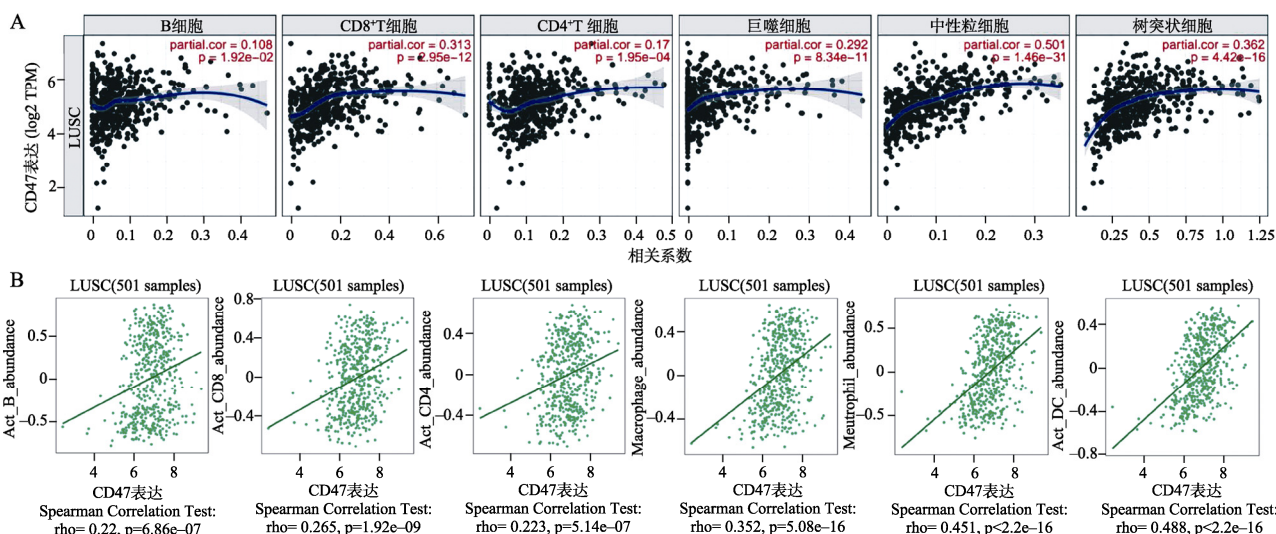


图3 CD47 的表达与肺鳞癌组织免疫细胞浸润的相关性

A-TIDE 数据库; B-TISIDB 数据库。

Fig. 3 Correlation of CD47 expression with immune cell infiltration in lung squamous cell carcinoma tissues

A-TIDE database; B-TISIDB database.

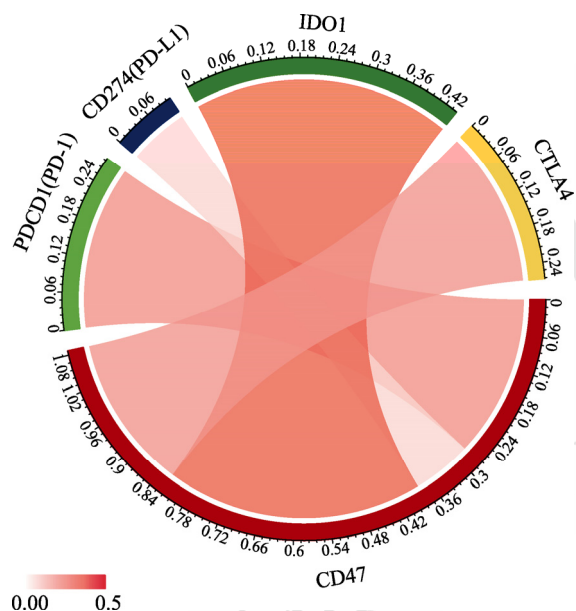


图4 CD47 与免疫检查点的相关性

Fig. 4 Correlation of CD47 with immune checkpoints

Genomics of Drug Sensitivity in Cancer)数据库预测肺鳞癌组织 CD47 表达水平对化疗药物 IC₅₀ 值的影响, 结果见图 5。结果发现对于舒尼替尼、达沙替尼、阿霉素、吉西他滨等化疗药物, 在 CD47 高表达的肺鳞癌组织中 IC₅₀ 值较低, 显示其对这些化疗药物敏感。

2.6 CD47 与免疫治疗预测

利用 TIDE 算法^[12]来预测肺鳞癌组织 CD47 表达水平对免疫疗效的影响, 结果发现, 对于 CD47 低表达的肺鳞癌患者免疫治疗的反应人数要高于 CD47 高表达的患者, 见图 6。

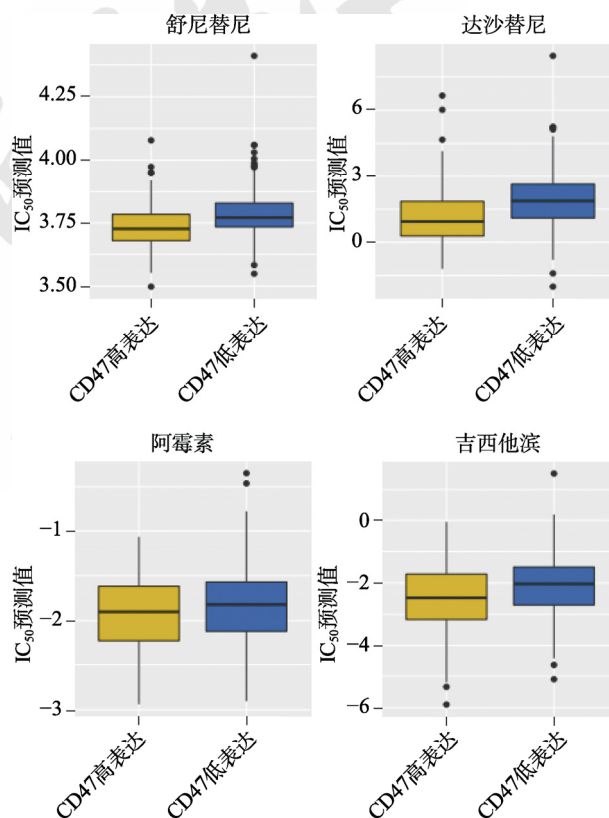


图5 CD47 表达与化疗药物的敏感性预测

Fig. 5 Sensitivity prediction for CD47 expression and chemotherapeutic agents

3 讨论

2022 年, 国际癌症研究机构发布了最新的全球癌症统计报告^[13], 报告中对中国的癌症数据进行了分析, 对于肺癌, 无论是发病率还是死亡人数都居于首位, 对于肺癌的治疗任重道远。

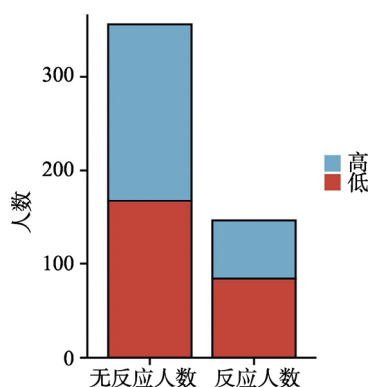


图6 CD47表达与免疫治疗反应预测

Fig. 6 Prediction between CD47 expression and immunotherapy response

肿瘤免疫疗法是利用人体自身的免疫系统来消灭肿瘤细胞的一种治疗方法。免疫检查点治疗肿瘤取得了一定的疗效,但找到有效的生物标记物来预测其免疫疗效一直是科学家们研究的热点。

本研究采用生物信息学方法研究了 CD47 基因在肺鳞状细胞癌组织和正常组织中的表达差异。相对于正常组织,CD47 在肺鳞癌组织中低表达,这一现象与其他基因的表达情况一致^[14]。但 CD47 在其他癌种组织的表达高于正常组织,如乳腺癌^[15-16]、非霍奇金淋巴瘤^[17]等,可见 CD47 基因表达在不同肿瘤之间存在异质性。

肿瘤细胞可以通过上调 CD47 来逃避吞噬细胞的攻击,然而 CD47 上调的机制仍不明确,研究发现^[18],对于肺腺癌在发生肿瘤转移或化学治疗后,其肿瘤微环境中干扰素- γ 的水平显著升高,进而发现肺腺癌中 CD47 的表达上升,实验发现干扰素- γ 通过激活干扰素调节因子-1 促进了 CD47 在肺腺癌中的表达。本研究通过 GSEA 发现,除了干扰素 α 反应、炎症反应、JAK-STAT 这些通路被富集到外,干扰素- γ 通路也被富集到。相对于正常组织,CD47 在肺鳞癌组织中低表达,可能的原因是肿瘤的异质性导致的,虽然在肺腺癌中,干扰素- γ 能促进 CD47 的高表达,但在肺鳞癌中,由于肿瘤环境的差异,干扰素- γ 不能促进 CD47 表达的上调,另一个原因可能是 CD47 发生了一定程度的突变^[19],影响其表达。

对于肺鳞癌免疫微环境,通过 TIMER 和 TISIDB 数据库均发现 CD47 与大多数免疫浸润淋巴细胞呈正相关。鉴于此,目前针对 CD47 免疫检查点的抗体已经显示出良好的抗肿瘤效果,一些已经进入 III 期临床试验^[20]。因此笔者推测 CD47

可能像 PD-1 那样在一些肿瘤免疫治疗中成为有意义的分子标记物。

在免疫治疗中,不同免疫检查点抑制剂的联合治疗与单一检查点治疗相比有一定的优势^[21]。研究表明 CTLA-4 抑制剂伊匹单抗和 PD-1 抑制剂纳武单抗的联合治疗效果显著,与单一疗法相比,更能显著延长生存周期^[22]。本研究考察了 CD47 和 PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1 的相关性,结果发现均呈正相关。因此,若 CD47 抑制剂与目前上市的免疫检查点抑制剂进行联合使用,可能会有新发现^[23-24]。

通过 pRRophetic 算法和 TIDE 算法,发现 CD47 低表达水平对化疗可能不敏感。但是对于采用免疫检查点的免疫治疗,低表达 CD47 的肺鳞癌患者响应率高,说明高表达 CD47 的肺鳞癌患者对于免疫检查点的获益有限,其可能的原因在于 CD47 基因对肺鳞癌免疫微环境起抑制作用,同时 CD47 的表达与 PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1 呈正相关性,当 CD47 表达量降低后,肺鳞癌的免疫微环境的抑制得到一定的缓解,因此响应率高。

本研究存在一定的不足,首先仅采用 TCGA 数据库肺鳞癌中 CD47 基因对免疫微环境进行了研究,没有采用其他的数据库或临床样本进行验证;其次本研究根据 CD47 表达量的中位值来划分 CD47 高表达和低表达,可能存在一定的误差,采用统计学方法确定 CD47 表达的具体数值然后划分组别将会是下一步的研究内容。

综上所述,本研究探讨了 CD47 在肺鳞癌免疫微环境中的重要作用,CD47 的表达也与肺鳞癌免疫细胞浸润水平密切相关,并激活免疫相关通路,对免疫治疗的响应做了预测,能为临床合理用药提供一定的参考。在下一步的研究中,将结合临床样本和其他数据库,进一步研究 CD47 在肺鳞癌细胞中的功能,并对其分子机制和耐药机制进行深入探讨。

REFERENCES

- [1] HUANG M Y, JIANG X M, WANG B L, et al. Combination therapy with PD-1/PD-L1 blockade in non-small cell lung cancer: Strategies and mechanisms[J]. Pharmacol Ther, 2021(219): 107694.
- [2] MAKUKU R, KHALILI N, RAZI S, et al. Current and future perspectives of PD-1/PDL-1 blockade in cancer immunotherapy[J]. J Immunol Res, 2021(2021): 6661406.
- [3] FRIEDMAN G K, JOHNSTON J M, BAG A K, et al.

- Oncolytic HSV-1 G207 immunovirotherapy for pediatric high-grade gliomas[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(17): 1613-1622.
- [4] BURKE E E, KODUMUDI K, RAMAMOORTHY G, et al. Vaccine therapies for breast cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2019, 28(3): 353-367.
- [5] YANG Y, YANG Z, YANG Y. Potential role of CD47-directed bispecific antibodies in cancer immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2021(12): 686031.
- [6] LOGTENBERG M E W, SCHEEREN F A, SCHUMACHER T N. The CD47-SIRPα immune checkpoint[J]. *Immunity*, 2020, 52(5): 742-752.
- [7] ZHANG W T, HUANG Q H, XIAO W W, et al. Advances in anti-tumor treatments targeting the CD47/SIRPα axis[J]. *Front Immunol*, 2020(11): 18.
- [8] JALIL A R, ANDRECHAK J C, DISCHER D E. Macrophage checkpoint blockade: Results from initial clinical trials, binding analyses, and CD47-SIRPα structure-function[J]. *Antib Ther*, 2020, 3(2): 80-94.
- [9] ARRIETA O, AVILES-SALAS A, OROZCO-MORALES M, et al. Association between CD47 expression, clinical characteristics and prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(7): 2390-2402.
- [10] JIN Z, ZHAO H Y, LUO Y, et al. Identification of core genes associated with the anti-atherosclerotic effects of salvianolic acid B and immune cell infiltration characteristics using bioinformatics analysis[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 190.
- [11] LU X F, JIANG L Y, ZHANG L Y, et al. Immune signature-based subtypes of cervical squamous cell carcinoma tightly associated with human papillomavirus type 16 expression, molecular features, and clinical outcome[J]. *Neoplasia*, 2019, 21(6): 591-601.
- [12] JIANG P, GU S Q, PAN D, et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response[J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1550-1558.
- [13] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [14] DENG H, HANG Q Q, SHEN D J, et al. Low expression of CHRDL1 and SPARCL1 predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma based on comprehensive analysis and immunohistochemical validation[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 259.
- [15] SI Y N, ZHANG Y, GUAN J S, et al. Anti-CD47 monoclonal antibody-drug conjugate: A targeted therapy to treat triple-negative breast cancers[J]. *Vaccines*, 2021, 9(8): 882.
- [16] CANDAS-GREEN D, XIE B W, HUANG J, et al. Dual blockade of CD47 and HER2 eliminates radioresistant breast cancer cells[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4591.
- [17] ADVANI R, FLINN I, POPPLEWELL L, et al. CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin's lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(18): 1711-1721.
- [18] QU S, JIAO Z C, LU G, et al. Human lung adenocarcinoma CD47 is upregulated by interferon-γ and promotes tumor metastasis[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2022(25): 276-287.
- [19] RIZVI N A, HELLMANN M D, SNYDER A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 124-128.
- [20] YU W B, YE Z H, CHEN X P, et al. The development of small-molecule inhibitors targeting CD47[J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(2): 561-568.
- [21] POSTOW M A, SIDLOW R, HELLMANN M D. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(2): 158-168.
- [22] LIU F K, HUANG J, LIU X M, et al. CTLA-4 correlates with immune and clinical characteristics of glioma[J]. *Cancer Cell Int*, 2020(20): 7.
- [23] GAO X Z, LIANG K Y, MEI S S, et al. Anti-tumor progress on dual blockage of immune checkpoints CD47 and PDL1[J]. *Chin J Cell Biol(中国细胞生物学学报)*, 2021, 43(4): 896-904.
- [24] THERUVATH J, MENARD M, SMITH B A H, et al. Anti-GD2 synergizes with CD47 blockade to mediate tumor eradication[J]. *Nat Med*, 2022, 28(2): 333-344.

收稿日期: 2022-10-11
(本文责编: 沈倩)