

· 基础研究 ·

CD27 在食管癌中的表达及其潜在基因通路的综合分析

肖凡凯^{1*}, 王琳², 杨帆³

(郑州大学第一附属医院:¹ 肿瘤科, ² 互联网医疗系统与应用国家工程实验室, ³ 心血管内科, 郑州 450052)

【摘要】目的 探讨 CD27 在食管癌中表达差异及其潜在基因调控通路。**方法** 本研究运用基于基因表达水平值的交互式分析平台 (GEPIA), cBio-Porta 分析 CD27 在食管癌中的表达差异和突变的情况; 运用 GEPIA 做 Kaplan-Meier 曲线分析 CD27 在食管癌和头颈部鳞癌患者预后的价值; 运用 linkedomics 做 CD27 在食管癌中的功能和通路分析, 并做 Pearson 相关系数分析。**结果** CD27 在食管癌中以扩增突变为主, 不同水平的 CD27 在食管癌中的表达对 TOR 复合体、多种激酶 (KIT 原癌基因受体酪氨酸激酶、转化生长因子受体 1、G 蛋白偶联受体激酶 3) 有潜在的影响; CD27 对头颈部鳞癌患者生存有显著影响, 虽然对食管癌总生存没有显著影响, 但高组的总生存较好。**结论** CD27 的差异表达可能是食管癌发生发展的关键因素。本研究结果提示 CD27 的表达程度有可能作为食管癌的生物标志物。

【关键词】 食管癌; CD27; 通路富集

【中图分类号】 R735.1; R181.13; R571

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2024.04.063

CD27 expression in esophageal carcinoma and its potential gene regulatory pathways

Xiao Fankai^{1*}, Wang Lin², Yang Fan³

(¹Department of Oncology, ²National Engineering Laboratory of Internet Medical System and Applications, ³Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

【Abstract】Objective To investigate the expression profile of CD27 in esophageal carcinoma and its potential gene regulatory pathways. **Methods** In this study, gene expression profiling interactive analysis (GEPIA) and cBio-Porta were used to analyze the differential expression and mutation of CD27 in esophageal cancer; GEPIA was used to perform Kaplan Meier curve analysis on the prognostic value of CD27 in patients with esophageal cancer and head and neck squamous cell carcinoma; functions and pathway enrichment of CD27 in esophageal cancer were performed by linkedomics through Pearson correlation coefficient analysis. **Results** The main type of CD27 mutation was amplification mutation in esophageal cancer. The expression of CD27 in esophageal carcinoma showed profound effects on TOR complex and various kinases (KIT-proto-oncogene receptor tyrosine kinase, transforming growth factor receptor 1, G protein-coupled receptor kinase 3). CD27 showed significant impact on overall survival of head and neck squamous cell carcinoma, and although it had no such effect on the overall survival of esophageal cancer, the patients with high expression had better overall survival. **Conclusion** The differential expression of CD27 may be a key factor in the occurrence and development of esophageal carcinoma. Our results suggest that the expression of CD27 might be a biomarker for esophageal cancer.

【Key words】 esophageal carcinoma; CD27; pathway enrichment

This work was supported by the Natural Science Foundation for Young Scholars of Henan Province (202300410416) and the Joint Construction Project of Medical Science and Technology Tackling Plan of Henan Province (LHGJ20190033).

Corresponding author: Xiao Fankai, E-mail: xfwk@hotmail.com

食管癌是全球第八最常见的癌症, 在肿瘤引发死亡率中居世界第六位^[1]。食管鳞状细胞癌是食管癌最常见的组织学类型, 约占所有食管癌的 90%^[2]。中国食管癌发病率高, 且人口众多, 世界范围内约有一半的新增食管癌病例发生在我国^[3]。尽管治疗方法在不断更新, 但食管癌患者 5 年生存较差, 分子机制病因尚不清楚, 从以往的流行病学研究来看, 基因对食管癌的发展有重要影响。为了提高食管癌患者的总生存率, 验证预后因素和评估新的诊断生物标志物是非常必要的。近年来, 单克隆

抗体特别是免疫调节剂在各种癌症治疗和生存分析中发挥了潜在的作用。CD27 是记忆 B 细胞的标志物, 是肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 超家族之一^[4]。CD27 和 CD70 之间的相互作用, 可以共同刺激 T 细胞的生长和分化。根据最近学术研究, 骨髓瘤细胞中 CD27 的异常表达可能与肿瘤的生存阶段有关^[5]。与此类似, 急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 和慢性髓性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 患者也表现出 CD27 的组成性表达^[6,7]。然而, CD27 在

收稿日期: 2023-05-24; 接受日期: 2023-09-19

基金项目: 河南省自然科学基金青年项目 (202300410416); 河南省医学科技攻关计划联合项目 (LHGJ20190033)

通信作者: 肖凡凯, E-mail: xfwk@hotmail.com

实体瘤的研究报道较少,关于食管癌患者 CD27 表达水平的研究更是十分有限。因此,本研究旨在探讨 CD27 在食管癌中表达及其潜在的基因调控网络,研究 CD27 作为预后生物标志物和治疗靶点的相关性,为食管癌的诊断和治疗提供新的生物标志物及诊断依据。

1 材料与方法

1.1 CD27 的 mRNA 表达分析

基于基因表达水平值的交互式分析平台 (gene expression profiling interactive analysis, GEPIA) 使用来自基因型组织表达和癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 项目的 RNA 测序数据进行各种肿瘤类型的预后分析、单基因分析、多基因分析和可视化分析。GEPIA 根据用户定义的样本选择和方法动态绘制给定基因的表达谱。结果可以以点图 (在 “profile” 选项卡中) 或框图 (在 “Boxplot” 选项卡中) 的形式呈现。此外,GEPIA 在 TCGA 临床注释的基础上按病理分期绘制基因表达。利用 GEPIA 的网络服务进一步分析 CD27 mRNA 在 GEPIA 中的表达模式。

1.2 CD27 与食管癌相关生存分析

GEPIA 基于基因表达水平进行生存分析。该功能允许用户选择他们自定义的癌症类型进行总体或无病生存分析。基于 TCGA 数据库,利用 GEPIA 分析 CD27 在食管癌和头颈部鳞癌预后中的相关性,总生存期为评估指标,做 Kaplan-Meier 曲线, $P<0.05$,则认为其具有预后价值。

1.3 CD27 通路富集及相关激酶分析

利用 cBioportal (<https://www.cbioportal.org/>) 一个开放公共的资源,用于研究、可视化和分析多维

肿瘤基因组数据,目前包含 225 项肿瘤研究。Linkedomics (<http://www.linkedomics.org/>) 是用 Linked Omics 的 Link Finder 模块研究 TCGA 食管癌队列中与 CD27 相关的表达差异基因,结果采用 Pearson 相关系数进行统计学分析。所有的结果都在火山图、热图或散点图中以图形形式表现出来。并进行基因本体 (细胞组分、通路分析、分子功能)、京都基因与基因组百科全书通路分析。

2 结果

2.1 CD27 表达差异的比较

在 GEPIA 数据库分析中,为了探讨食管癌中 CD27 表达情况,本研究分析了 CD27 在癌与癌旁及不同分期的表达,结果显示 CD27 在食管癌组织中的表达明显高于邻近正常组织 (图 1A),CD27 在食管癌不同分期表达差异无统计学意义 (图 1B)。

2.2 CD27 突变及其相关基因热图

为了研究 CD27 在食管癌中的突变,本课题通过 cBio-Portal 依据 TCGA 数据库食管癌患者的 RNA 测序情况,发现 1 915 例食管癌患者中有 40 例 (2.1%) 患者的 CD27 发生了突变,其中包含错义突变、扩增和深度缺失,扩增在所有突变中所占比例较大,是最常见的突变类型 (图 2A)。同时使用 Pearson 相关性分析列出了食管癌中 CD27 共表达基因情况,与 CD27 正相关基因标记为红色,负相关基因标记为绿色,这些基因参与多种信号通路 (图 2B)。为了进一步明确基因与 CD27 共表达的正负相关性,依据热图显示前 50 例与 CD27 正负相关基因 (图 3A,B)。3A 与 3B 的基因排名依据的是标准分数 (Z-score),分数范围 $-3\sim+3$ 。

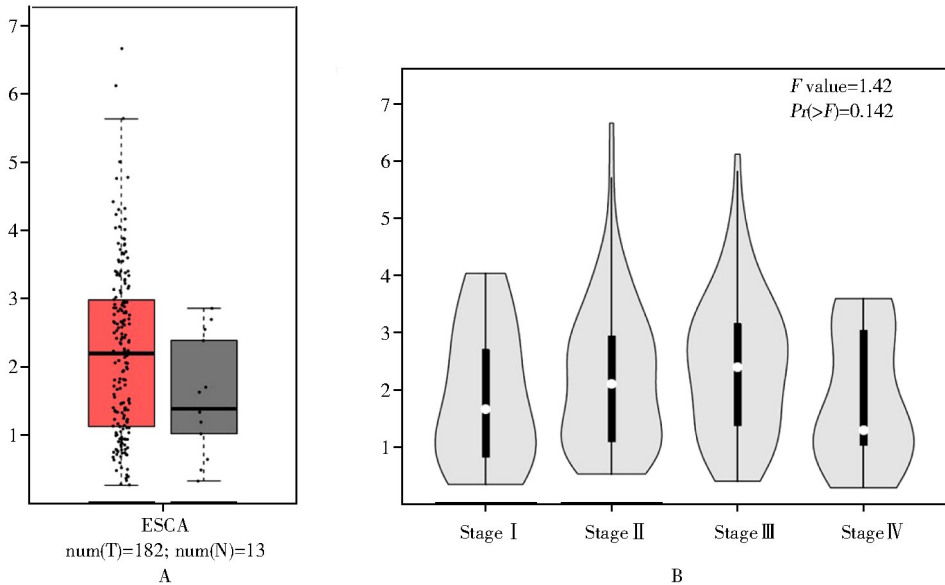


图 1 CD27 在食管癌与癌旁组织表达情况及在食管癌不同分期的表达情况

Figure 1 Expression of CD27 cancer in different stages of esophageal cancer and adjacent tissues
A: cancer and adjacent tissues; B: different stages. ESCA: esophageal carcinoma.

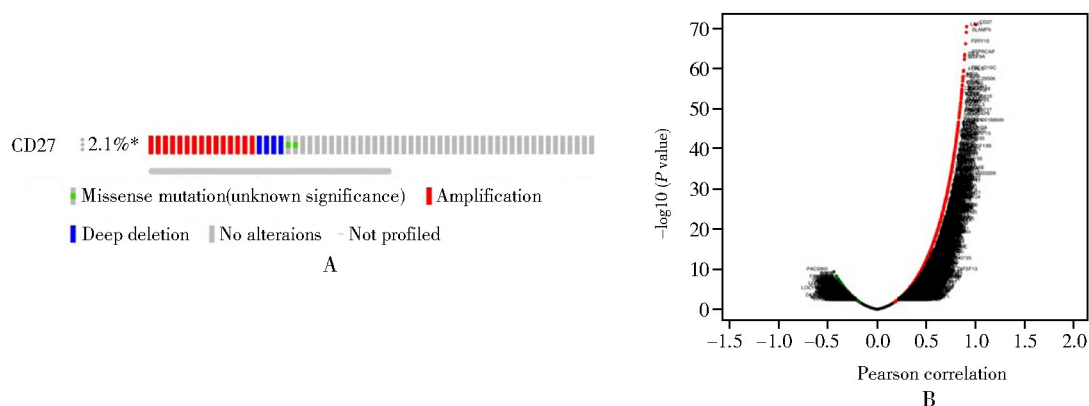


图 2 CD27 在食管癌中的突变及相关基因

Figure 2 Genetic alteration of CD27 and its related genes in esophageal cancer

A: CD27 alteration in esophageal cancer B: CD 27 and its related genes.

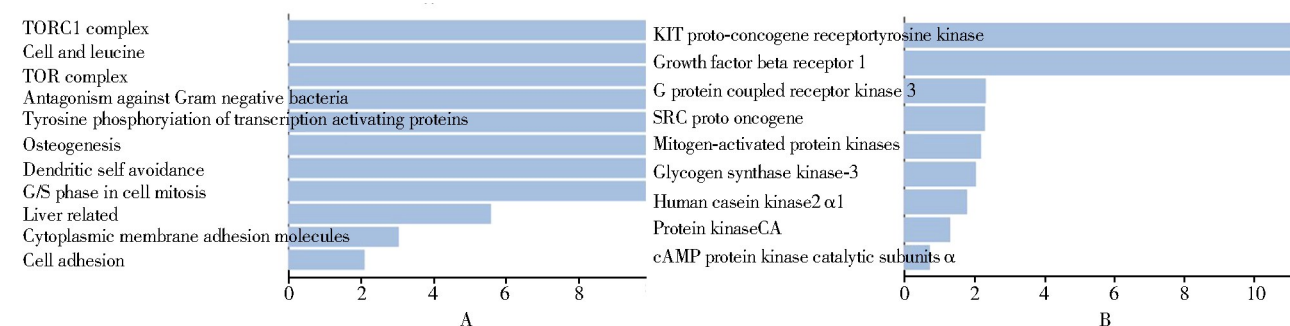
图3 CD27在食管癌的G₀功能富集分析与相关酶分析

Figure 3 CD27 functional enrichment analysis and related enzyme analysis in esophageal cancer

A; CD27 pathway enrichment; B; CD27 and its related enzyme.

2.3 CD27 在食管癌功能和通路分析

在 linkedomics 数据库中,对筛选到的 CD27 的功能进行了评估(图 4A,B)。在参与的生物学过程分析中,这些通路主要富集于雷帕霉素复合物(target of rapamycin complex 1,TORC1)信号通路、细

胞对亮氨酸的反应和雷帕霉素(target of rapamycin, TOR)信号通路调节(图4A)。通过激酶分析,主要富集途径为KIT原癌基因受体酪氨酸激酶、转化生长因子 β 受体1和G蛋白偶联受体激酶3(图4B)。

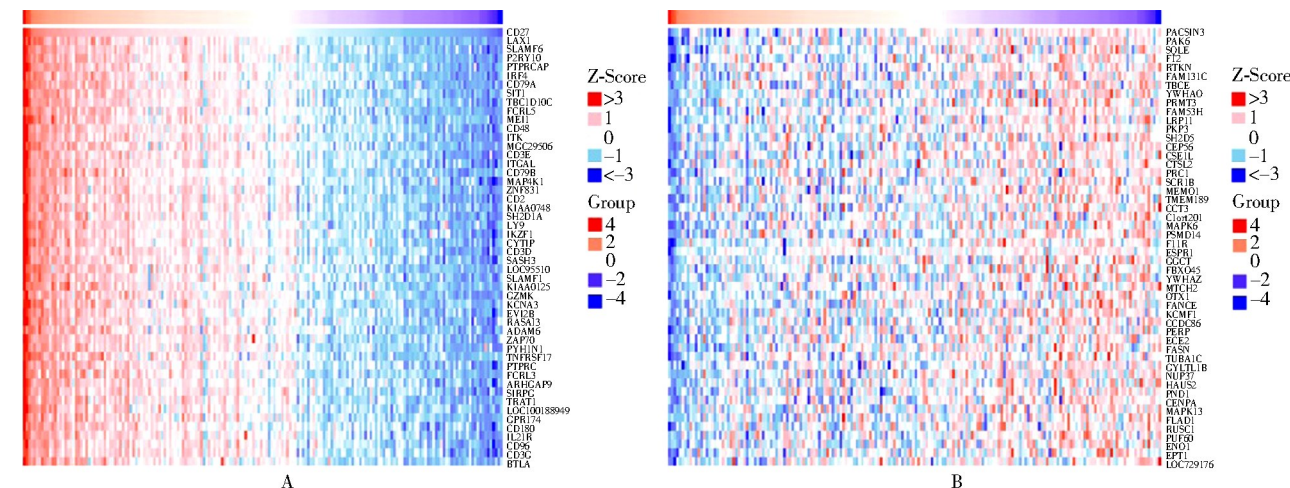


图 4 CD27 在食管癌的相关性基因热图

Figure 4 Hallmark gene set activity changes across the TCGA esophageal cancer patients with low or high expression

A; heat maps showing genes positively related with CD27 in esophageal cancer; B; CD27 and its negative correlated genes in esophageal cancer. TCGA; the cancer genome atlas.

2.4 CD27 与食管鳞癌及头颈部鳞癌生存分析

为了进一步研究 TCGA 数据库中 CD27 与食管鳞癌与头颈部鳞癌生存关系,本课题通过 GEPIA 中 TCGA 数据做出 CD27 在食管癌中与头颈部鳞癌的预后分析。结果显示,虽然食管癌组 CD27 对总生存没有显著影响,但高表达组的总生存较好(图 5A),头颈部鳞癌组中 CD27 低表达与总生存时间缩短显著相关($P<0.05$;图 5B)。

3 讨论

食管癌是最常见的癌症之一,在世界范围内的 5 年生存率很低。免疫疗法是一种增强或再生免疫系统以发现并摧毁肿瘤细胞的治疗方法。最近,对可能用于癌症免疫治疗的生物标志物的研究有所增加^[8]。根据早期的研究,CD27 可能会成为癌症免疫治疗中最可选的新靶点之一^[9,10]。基于 TCGA 数据库,本研究发现,CD27 在食管癌中突变率为 2.1%(40/1915),在食管癌和邻近正常组织 mRNA 表达评估中,CD27 在食管癌组织中显著高表达。本研究的相关热图基因与 CD27 相互作用可能与不同肿瘤相关,例如有研究显示,LAX1 与 CD27 被列入与乳腺癌 HER2 阳性预后相关基因^[11]。TOR 复合物在 CD27 及其相关基因通路富集中具有重要功能。近年来,TOR 信号通路的靶点已发展到将营养感知与细胞发育联系起来,并且在真核生物中高度保守。在细胞中,TOR 存在于 TORC1 和 TORC2 中,这是两种不同的信号复合物^[12]。这些复合物受到多种调控,并作为多种细胞功能的信号效应器,包括蛋白质合成、细胞骨架重组、自噬、代谢和存活。哺乳动物雷帕霉素(mammalian target of rapamycin, mTOR)在胚胎发育中起着关键作用,并与成年物种

的衰老和长寿效应有关。mTOR 通路参与了人类几种不同癌症类型的发展,其失调与家族性癌症综合征有关^[13,14]。

在人类中,CD27 仅在淋巴系中通过 T、B 和 NK 细胞及其直接前体表达。重要的是,CD27 已经存在于初始 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞中,大多数其他共刺激肿瘤坏死因子仅在 T 细胞激活后合成。激活后,初始 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞会短暂上调 CD27 的表达^[15]。活化的 T 细胞以蛋白水解的方式从细胞表面脱落 CD27,从而产生循环可溶性 CD27,可作为 T 细胞活化的诊断标记物^[16]。终末分化效应 CD8⁺ T 细胞丢失 CD27,而长寿的中枢记忆细胞保留 CD27。在小鼠模型中,已经通过多种研究评估了 CD27 激动剂促进癌症免疫的功效。在 B 细胞或树突状细胞上转基因表达 CD27 的小鼠中,针对携带外源抗原的 EL-4 淋巴瘤^[17] 和 B16 黑色素瘤^[18],以及亲代肿瘤的抗肿瘤免疫功能均得到提高^[19]。用小鼠 CD27 的激动性单抗治疗小鼠,同样提高了对 T 细胞淋巴瘤和 B 细胞淋巴瘤以及黑色素瘤的抗肿瘤免疫^[20]。近年来,许多学者对 CD70-CD27 信号轴产生了兴趣,早期报道发现,尽管在正常浆细胞中可以看到 CD27 的表达,但随着多发性骨髓瘤的进展,CD27 的表达会急剧下降,但 CD27 和 CD70 转染物共培养并不会通过 CD27-CD70 信号轴诱导细胞凋亡^[21]。一项研究显示,在 TCGA 数据库中,CD27 表达下调与头颈部鳞癌预后不良相关^[22]。通过 TCGA 数据库检测 CD27 与食管癌患者总生存率的关系,结果显示,虽然差异不显著,但 CD27 低表达的患者预后比 CD27 高表达的患者差,与先前报道相似^[22],CD27 低表达与头颈部鳞癌总生存期降低显著相关。

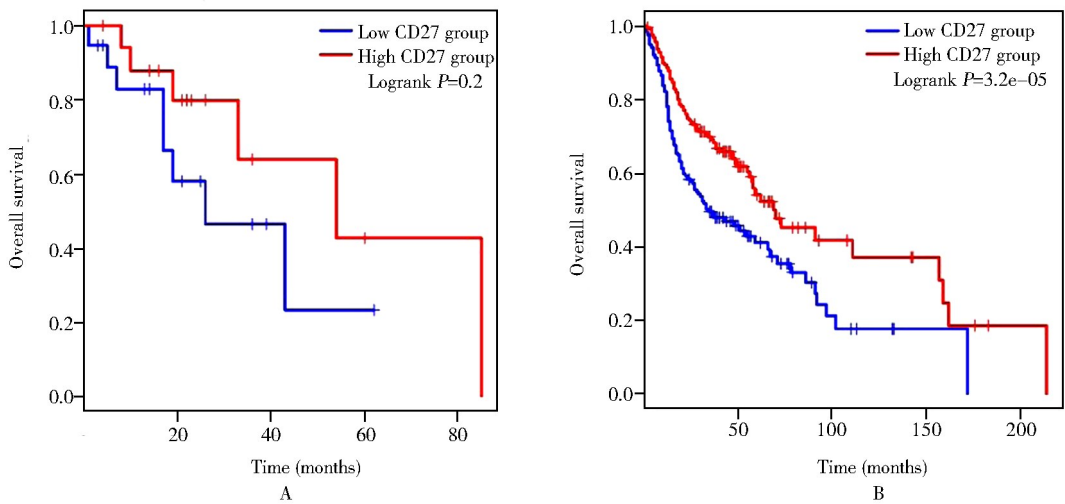


图 5 CD27 表达高低与食管癌及头颈部鳞癌的生存关系

Figure 5 Relationship between CD27 expression and 2 types of cancer survival

A: CD27 and esophageal cancer; B: CD27 and head ,neck squamous cell carcinoma.

本研究结果表明,不同水平的 CD27 在食管癌中的表达对 TOR 复合物、多种激酶(KIT 原癌基因受体酪氨酸激酶、转化生长因子受体 1 和 G 蛋白偶联受体激酶 3)以及细胞膜有一定影响,未来应注重研究 CD27 在食管癌表达中对原癌基因受体的影响,并探讨潜在机制。本研究局限性如下:TCGA 有关食管癌总生存和 CD27 测序的样本量较小,需要在人群中扩大样本量,减小误差,以确认这些生物标志物的可行性。

综上,本研究通过生物信息学分析,发现 CD27 在食管癌中差异表达与通路和激酶密切相关,发现 CD27 可能被认为是一种新的潜在生物标志物,未来有望投入食管癌靶向治疗的临床应用。

【参考文献】

[1] Uhlenhopp DJ, Then EO, Sunkara T, *et al.* Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors[J]. Clin J Gastroenterol, 2020, 13(6): 1010–1021. DOI: 10.1007/s12328-020-01237-x

[2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[3] Lin Y, Totsuka Y, Shan B, *et al.* Esophageal cancer in high-risk areas of China: research progress and challenges[J]. Ann Epidemiol, 2017, 27(3): 215–221. DOI: 10.1016/j.annepidem.2016.11.004.

[4] Buchan SL, Rogel A, Al-Shamkhani A. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy[J]. Blood, 2018, 131(1): 39–48. DOI: 10.1182/blood-2017-07-741025.

[5] Chu B, Bao L, Wang Y, *et al.* CD27 antigen negative expression indicates poor prognosis in newly diagnosed multiple myeloma[J]. Clin Immunol, 2020, 213: 108363. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108363.

[6] Leick MB, Silva H, Scarfò I, *et al.* Non-cleavable hinge enhances avidity and expansion of CAR-T cells for acute myeloid leukemia[J]. Cancer Cell, 2022, 40(5): 494–508. e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.04.001.

[7] Schürch C, Riether C, Matter MS, *et al.* CD27 signaling on chronic myelogenous leukemia stem cells activates Wnt target genes and promotes disease progression[J]. J Clin Invest, 2012, 122(2): 624–638. DOI: 10.1172/jci45977.

[8] Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, *et al.* Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(5): 325–340. DOI: 10.1038/nrclinonc.2018.29.

[9] Starzer AM, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7)[J]. ESMO Open, 2020, 4(Suppl 3): e000629. DOI: 10.1136/esmoopen-2019-000629.

[10] van de Ven K, Borst J. Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential[J].

Immunotherapy, 2015, 7(6): 655–667. DOI: 10.2217/imt.15.32.

[11] Brasó-Maristany F, Saez OM, Brunet LP, *et al.* 25P research-based HER2DX in patients with early-stage HER2-positive (HER2+) breast cancer treated in the N9831 phase III clinical trial[J]. Annals Oncol, 2022, 33: S134–S135.

[12] Ma EH, Jones RG. CELL GROWTH. (TORC)ing up purine biosynthesis[J]. Science, 2016, 351(6274): 670–671. DOI: 10.1126/science.aaf1929.

[13] Drago JZ, Formisano L, Juric D, *et al.* FGFR1 amplification mediates endocrine resistance but retains TORC sensitivity in metastatic hormone receptor-positive (HR(+)) breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(21): 6443–6451. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-19-0138.

[14] Linehan WM, Srinivasan R, Garcia JA. Non-clear cell renal cancer: disease-based management and opportunities for targeted therapeutic approaches[J]. Semin Oncol, 2013, 40(4): 511–520. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2013.05.009.

[15] Polak ME, Newell L, Taraban VY, *et al.* CD70-CD27 interaction augments CD8⁺ T-cell activation by human epidermal Langerhans cells[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(6): 1636–1644. DOI: 10.1038/jid.2012.26.

[16] Coquet JM, Ribot JC, Babala N, *et al.* Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway[J]. J Exp Med, 2013, 210(4): 715–728. DOI: 10.1084/jem.20112061.

[17] Sutton VR, Brennan AJ, Ellis S, *et al.* Serglycin determines secretory granule repertoire and regulates natural killer cell and cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity[J]. FEBS J, 2016, 283(5): 947–961. DOI: 10.1111/febs.13649.

[18] Riccione KA, He LZ, Fecci PE, *et al.* CD27 stimulation unveils the efficacy of linked class I/II peptide vaccines in poorly immunogenic tumors by orchestrating a coordinated CD4/CD8 T cell response[J]. Oncoimmunology, 2018, 7(12): e1502904. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1502904.

[19] Arens R, Schepers K, Nolte MA, *et al.* Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8⁺ T cell formation[J]. J Exp Med, 2004, 199(11): 1595–1605. DOI: 10.1084/jem.20031111.

[20] Sakanishi T, Yagita H. Anti-tumor effects of depleting and non-depleting anti-CD27 monoclonal antibodies in immune-competent mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(4): 829–835. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.092.

[21] Lutfi F, Wu L, Sunshine S, *et al.* Targeting the CD27-CD70 pathway to improve outcomes in both checkpoint immunotherapy and allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. Front Immunol, 2021, 12: 715909. DOI: 10.3389/fimmu.2021.715909.

[22] Wang F, Zhang W, Chai Y, *et al.* Contrast-enhanced computed tomography radiomics predicts CD27 expression and clinical prognosis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1015436. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1015436.