

基于生物信息学的CD39对肺腺癌免疫微环境及其免疫治疗的影响分析

王佳庆^{1#}, 宁霄^{2#}, 余克富³, 汪祺^{2*}, 史卫忠^{3*}

1. 首都医科大学附属北京天坛医院 临床试验中心, 北京 100050

2. 中国食品和药品检定研究院, 北京 100050

3. 首都医科大学附属北京天坛医院 药学部, 北京 100050

摘要: **目的** 采用生物信息学方法探讨CD39基因在肺腺癌组织中的表达情况, 并分析CD39与肺腺癌免疫微环境及免疫治疗响应的关系。**方法** 通过The Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库分析CD39在肺腺癌组织和正常肺组织中的表达差异。采用基因集富集分析(GSEA)研究CD39可能富集的免疫相关通路; 通过肿瘤免疫数据库(TIMER)分析肺腺癌患者中CD39基因表达情况与肿瘤微环境免疫细胞浸润的关系; 同时分析CD39和其他免疫检查点基因PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1的相关性, 采用药物敏感性基因组学数据库(GDSC)和肿瘤免疫功能障碍和排斥(TIDE)数据库, 预测CD39基因表达与化疗药物敏感性以及免疫治疗的响应。**结果** CD39在肺腺癌组织中的表达低于在正常组织中的表达, CD39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。TIMER数据库均显示在肺腺癌组织中, CD39的表达与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CD39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, 化疗敏感性显示在肺腺癌组织中, 对于博来霉素、顺铂、多西他赛、长春花碱等化疗药物, 高表达CD39组对其敏感。但对于免疫治疗, 其响应率却低于CD39低表达组。**结论** CD39在肺腺癌组织中低表达, 能激活免疫相关通路, 对免疫治疗响应率高, 可作为肺腺癌新型分子标志物。

关键词: 肺腺癌; CD39; 免疫微环境; 化疗敏感性; 免疫治疗

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 03-0490-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.005

Research on effect for immunotherapy of CD39 and its role on immunemicroenvironment and immunotherapy in lung adenocarcinoma based on bioinformatics

WANG Jiaqing¹, NING Xiao², YU Kefu³, WANG Qi², SHI Weizhong³

1. Clinical Trial Center, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

2. China Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

3. Department of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between CD39 in lung adenocarcinoma and the prediction the efficacy of immunotherapy. **Methods** The gap for the expression of CD39 between lung adenocarcinoma and normal tissues were completed through The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. With the help of Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), CD39 involved immune-related pathways were exploited. What more, the relationship between CD39 expression in lung adenocarcinoma and immune cells infiltration in the tumor microenvironment was accomplished by using the TIMER databases as well as other immune-related molecules such as PD-1, PD-L1, CTLA-4, IDO-1. According to the GDSC database, the relationship between CD39 expression and chemotherapy drug sensitivity by taking IC₅₀ value as the indicator was found. The TIDE algorithm was also exploited to calculate response for the immunotherapy. **Results** CD39 was lower in lung adenocarcinoma when compared to normal

收稿日期: 2023-08-31

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2401103)

#共同第一作者: 王佳庆, 女, 副主任药师, 主要从事药事管理及药物分析研究。E-mail: jiaqingwang2013@163.com

宁霄, 女, 副主任药师, 主要从事分析化学研究。E-mail: 506612164@qq.com

*共同通信作者: 史卫忠, 男, 主管药师, 主要从事临床药学与信息药师工作。E-mail: shiweizhong1983@163.com

汪祺, 研究员, 主要从事中药质量及安全性评价研究。E-mail: sansan8251@sohu.com

tissue. According to GSEA results, CD39 could activate immune-related pathways such as the inflammatory response, interferon alpha response, interferon alpha gamma response. As for immune microenvironment in lung adenocarcinoma, the expression level of CD39 was positively correlated with the infiltration level of B-cells, CD8⁺ T-cells, CD4⁺ T-cells, macrophage, neutrophils and dendritic cells according to the TIMER database. The same phenomenon was also occurred with other immune checkpoints such as PD-1, PD-L1, CTLA-4, IDO1. Chemotherapy sensitivity indicated that in lung adenocarcinoma, high level of CD39 expression could be sensitive to chemotherapy drugs such as bleomycin, cisplatin, docetaxel, vinblastine. But for immunotherapy, patients with low CD39 expression could get a good result. **Conclusion** CD39 is low expressed in lung adenocarcinoma which is beneficial for immunotherapy and participates in immune related pathways. It can be used as a novel molecular marker for lung adenocarcinoma.

Key words: lung squamous cell carcinoma; CD39; immune microenvironment; chemotherapy sensitivity; immunotherapy

肿瘤免疫治疗是指通过重新启动并维持肿瘤-免疫循环,恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应,从而控制与清除肿瘤的一种治疗方法,其治疗形式多样,如免疫检查点抑制剂^[1]、肿瘤疫苗^[2]、溶瘤病毒^[3]等,目前肿瘤的免疫治疗在一些肿瘤如黑色素瘤^[4]、非小细胞肺癌^[5]等实体瘤的治疗中表现出了理想的效果,但随着研究的深入,免疫治疗只能使特定的患者获益,因此,寻找新的生物标志物来预测肿瘤免疫治疗的疗效具有重要意义。

CD39是一种广泛表达于细胞表面的核苷酸水解酶,是参与产生免疫抑制性的腺苷过程中的限速酶,研究发现CD39与肿瘤的发生发展密切相关。有研究^[6]表明,对肿瘤患者,肿瘤组织CD39表达水平升高与较短的生存期有关。又有研究^[7]表明,CD39是一种新的免疫检查点抑制剂靶点。抗CD39治疗可逆转肿瘤细胞对T细胞增殖的抑制作用,增强细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和自然杀伤细胞(NK)介导的细胞毒性作用。

近年来,CD39单克隆抗体在体内外的抗肿瘤实验中取得显著抗肿瘤效果,这为抗肿瘤治疗提供了新选择和方向^[8]。然而CD39在肺腺癌中的研究尚未见文献报道,本研究采用生物信息学方法,分析CD39基因在肺腺癌组织中的表达情况,并分析CD39基因表达水平与免疫功能、肺腺癌免疫微环境、化疗敏感性和免疫治疗响应的关系,为肺腺癌治疗提供新的生物分子标记物同时,也为后期CD39在肺腺癌中研究及新药开发提供依据。

1 资料和方法

1.1 数据获取

通过TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载肺腺癌的转录组表达数据,包括癌组织和正常组织的表达,采用Xena(<http://xena.ucsc.edu/>)对肺腺癌数据进行标准化处理。

1.2 CD39在肺腺癌组织中的差异表达

从TCGA数据库下载肺腺癌转录组数据,并对

CD39基因的表达进行差异分析。

1.3 基因富集分析

采用clusterProfiler包对CD39基因的表达进行分析,以特征基因集或效应基因集(HALLMARK)进行注释来发现CD39基因富集的免疫通路。

1.4 CD39在肺腺癌组织中的表达与肿瘤免疫微环境的关系

使用TIMER数据库研究CD39的表达与免疫细胞浸润(B淋巴细胞、CD4⁺T淋巴细胞、CD8⁺T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 CD39与免疫检查点的相关性

根据CD39在肺腺癌组织中的表达,通过Spearman相关性分析研究CD39与免疫检查点如PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1的相关性。

1.6 CD39在肺腺癌组织中的表达与化疗药物敏感性预测

以CD39在肺腺癌中表达量的中位数将患者分为高表达组和低表达组,划分标准为若表达量 $\geq$ 中位数,则为高表达组,反之则为低表达组,采用pRRophetic包预测两组患者服用的化疗药物对肺腺癌细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)值。

1.7 CD39在肺腺癌组织中的表达与免疫检查点抑制剂治疗预测

以CD39在肺腺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CD39在肺腺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CD39基因与免疫检查点的相关性; $P < 0.05$ 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、pRRophetic。

2 结果

2.1 CD39在肺腺癌和正常组织间差异表达分析

对CD39在肺腺癌组织和正常组织之间的表达进行统计学分析,结果见图1,其中肿瘤组样本数为515例,正常组为61例,CD39在肺腺癌组织中的表达量要低于正常组织,且差异具有统计学意义($P < 0.001$)。

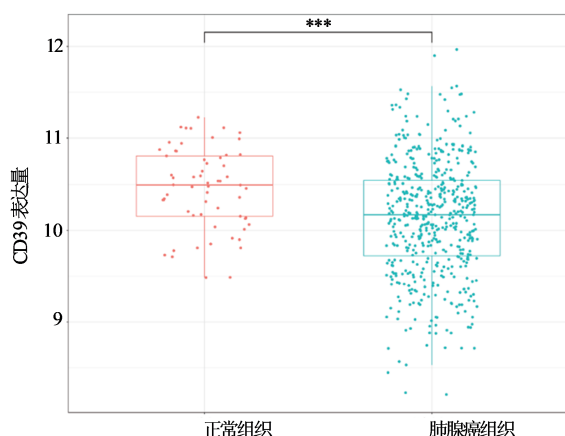


图1 CD39在肺腺癌组织和正常组织中的表达

Fig. 1 Expression of CD39 in lung adenocarcinoma and normal tissues

2.2 基因富集分析

采用GSEA分析CD39在免疫反应中的相关信号通路包括 α 干扰素反应、 γ 干扰素反应和炎症反应中的富集水平。采用加权富集法分析,随机组合次数设为1 000次。结果见图2,GSEA图的峰均出现在前端,因此说明CD39对这3个免疫相关的通路是起激活作用的。

2.3 CD39与肺腺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^[9],推测出肿瘤微环境中免疫细胞的浸润比例,TIMER数据库可用转录组数据分析

肿瘤组织中免疫细胞的浸润情况,结果见图3,结果发现,CD39的表达水平与6种免疫细胞的浸润水平显著正相关:B淋巴细胞($r = 0.309, P < 0.05$)、CD8⁺淋巴T细胞($r = 0.379, P < 0.05$)、CD4⁺淋巴T细胞($r = 0.328, P < 0.05$)、巨噬细胞($r = 0.455, P < 0.05$)、中性粒细胞($r = 0.603, P < 0.05$)以及树突状细胞($r = 0.567, P < 0.05$)。

2.4 CD39与免疫检查点相关性

通过Spearman相关性分析研究肺腺癌中CD39的表达与一些免疫检查点的相关性,结果见图4,连线的颜色深度表示两者之间的相关性,颜色越深,代表相关性越强,CD39与PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1均呈现出一定的正相关性,且差异均有统计学意义,其中,CTLA4和CD39之间连线的颜色最深,相关性最强。

2.5 CD39在肺腺癌中的表达与化疗药物预测

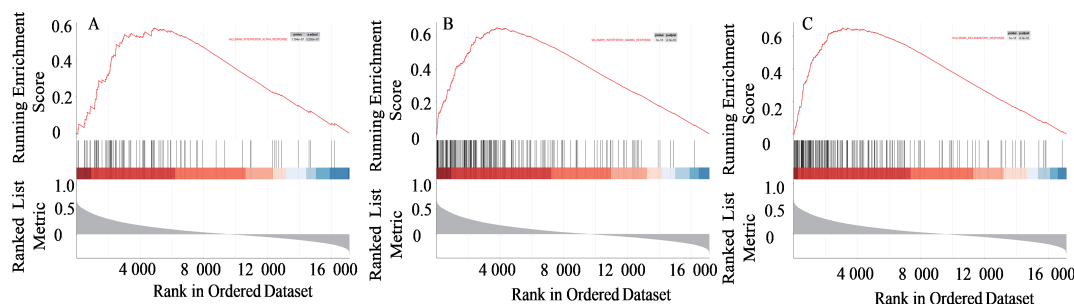
根据R软件中的pRRophetic包,使用GDSC数据库来预测肺腺癌组织CD39表达水平对化疗药物IC₅₀值的影响,其中高表达CD39的患者为257例,低表达为258例,结果见图5。结果发现对于博来霉素、顺铂、多西他赛、长春花碱等化疗药物,在CD39高表达的肺腺癌组织中预测的化疗药物的IC₅₀值较低,且差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明CD39高表达的肺腺癌组织对这些化疗药物敏感。

2.6 CD39与免疫治疗预测

使用(<http://tide.dfci.harvard.edu/> TIDE)数据库来预测肺腺癌组织CD39表达水平对免疫治疗疗效的影响,结果见图6,结果发现,对于CD39低表达的肺腺癌患者免疫治疗的反应率要高于CD39高表达的患者($P < 0.05$)。

3 讨论

目前,肺癌发病率和死亡率都比较高^[10],肺癌在临床中最常见的病理类型为肺腺癌,肺腺癌的治



A- α 干扰素反应;B- γ 干扰素反应;C-炎症反应。

A-interferon alpha response; B-interferon gamma response; C-inflammatory response.

图2 GSEA富集通路

Fig. 2 Enrichment plots from gene set enrichment analysis (GSEA)

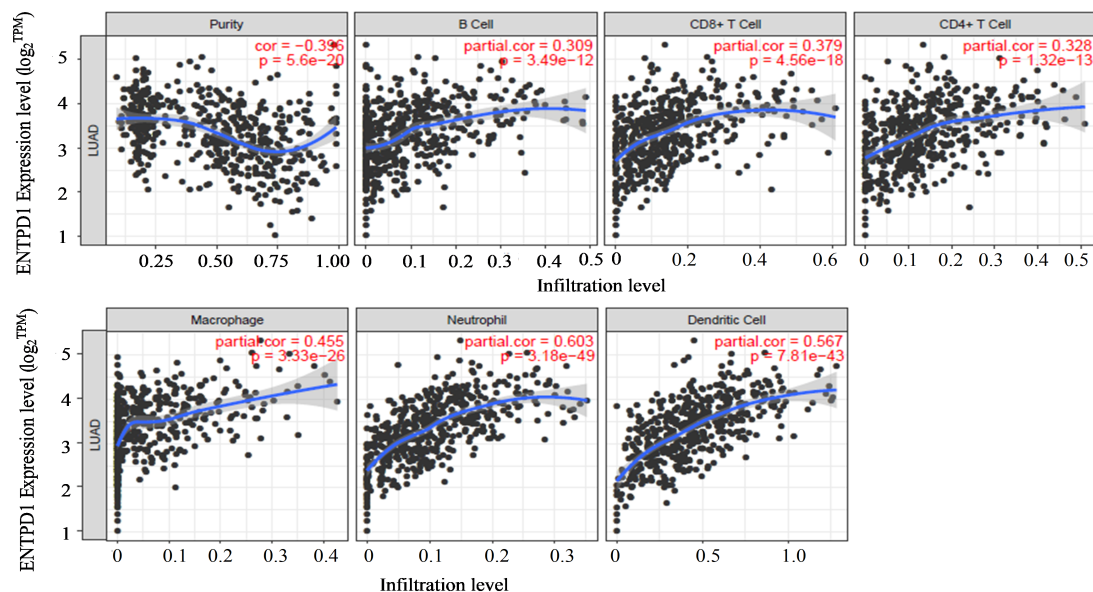


图3 CD39的表达与肺腺癌组织免疫细胞浸润的相关性

Fig. 3 Correlation of CD39 expression with immune cell infiltration in squamous lung adenocarcinoma tissues

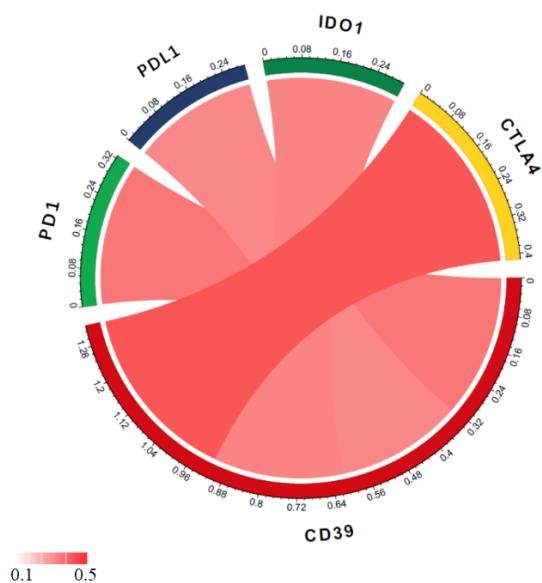


图4 CD39与免疫检查点的相关性

Fig. 4 Correlation of CD39 with immune checkpoints

疗手段包括手术、化疗、放疗、分子靶向治疗以及免疫治疗等。随着治疗方式的增多,肺腺癌的5年生存率得到一定的提升,特别是免疫治疗的出现,给肺腺癌患者带来了很大的希望^[11],但随着应用的深入,发现免疫治疗仅对部分患者有效,因此寻找能够预测肺腺癌对免疫治疗的反应的标志物显得尤为重要。

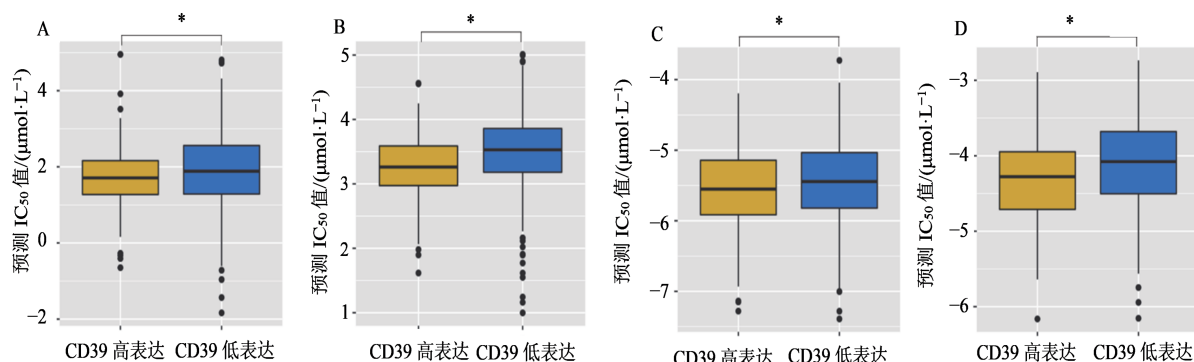
本研究探讨了CD39基因在肺腺癌组织和正常组织中的表达差异。相对于正常组织,CD39在肺腺癌组织中是低表达的,这一现象与其他基因在肺

腺癌组织中的表达情况一致^[12]。但CD39在其他癌种组织的表达高于正常组织,如肾癌、卵巢癌等^[13],可见CD39基因表达在不同肿瘤之间存在异质性。

对于CD39影响的肺腺癌的相关通路,GSEA发现,除了 α 干扰素反应、炎症反应, γ 干扰素通路也被富集到。肿瘤的最基本的两个特征是失去细胞稳态周期控制和增加凋亡抵抗。另外,肿瘤持续的生长需要一个微环境,并由促进血管生成、炎症和组织重塑的通路驱动,CD39高表达会激活炎症反应的相关通路如 α 干扰素反应、炎症反应,有利于肿瘤生长,同时, γ 干扰素的激活,又会促使PD-L1等免疫抑制表达的升高^[14],因此,从这一方面来说,CD39总体对肺腺癌的免疫微环境是起抑制作用的。

对于肺腺癌免疫微环境,通过TIMER数据库发现CD39与大多数免疫浸润淋巴细胞呈正相关,目前针对CD39免疫检查点的抗体已经显示出良好的抗肿瘤效果^[15],国内的一些抗CD39试验药物已经进入临床试验(受理号CXSL2200493、CXSL2101382),因此推测CD39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志物。

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^[16]。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相比单药疗效显著^[17],同时临床也发现靶向TIGIT的免疫检查点抑制剂与PD-1抑制剂联合使用时,对非小细胞肺癌患者疗效显



A-博来霉素; B-顺铂; C-多西他赛; D-长春花碱; * $P < 0.05$ 。
A-bleomycin; B-cisplatin; C-docetaxel; D-vinblastine; * $P < 0.05$ 。

图 5 CD39 表达与化疗药物的敏感性预测

Fig. 5 CD39 expression and sensitivity prediction for chemotherapeutic agents

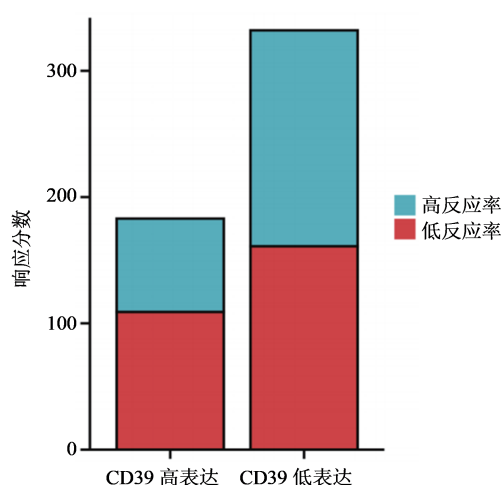


图 6 CD39 表达与免疫治疗反应预测

Fig. 6 Prediction between CD39 expression and immunotherapy

著^[18], 因此, 本研究考察了 CD39 和 PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO1 的相关性, 结果发现均呈正相关, 因此, 靶向 CD39 的抗体药物与免疫检查点联用, 可能会给患者带来的获益^[19]。

通过 GDSC 和 TIDE 数据库^[20], 结果发现 CD39 高表达水平的患者服用的化疗药物对肺腺癌细胞的 IC_{50} 值低, 说明高表达 CD39 的患者对化疗敏感。然而对于免疫治疗, 高表达 CD39 的肺腺癌患者对免疫反应的响应率较低表达患者低, 说明过表达 CD39 的肺腺癌患者对于免疫检查点的获益有限, 其可能的原因在于 CD39 水解 ATP 产生小分子腺苷, 腺苷与 T 淋巴细胞和 NK 细胞的腺苷受体结合会显著增加抗肿瘤免疫抑制作用, 从而促进肿瘤免疫逃逸。由于 CD39 对免疫反应的响应率是通过预测得出, 且本研究 CD39 分为高表达和低表达是通过表达量的中位数来进行划分的, 可能与实际有一

定的偏差, 需要进一步的临床研究验证。

由于采用 TCGA 数据库研究 CD39 对肺腺癌免疫微环境的影响, 证据略显不足, 应结合其他数据库或临床样本进行验证, 另外, 本研究采用的是 CD39 表达量的中位值来确定分组, 存在一定误差, 应根据统计学方法来确定 CD39 表达的最佳截断值。

本研究探讨了 CD39 在肺腺癌免疫微环境中的重要作用, CD39 的表达与肺腺癌免疫细胞浸润水平有一定的相关性, 并对免疫治疗的响应进行了预测, 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, 进一步研究 CD39 在肺腺癌细胞中的功能及对肺腺癌患者预后的影响, 为临床更合理用药提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ri M H, Ma J, Jin X J. Development of natural products for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy against cancer [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 281: 114370.
- [2] Peng M, Mo Y Z, Wang Y A, et al. Neoantigen vaccine: An emerging tumor immunotherapy [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 128.
- [3] Raja J, Ludwig J M, Gettinger S N, et al. Oncolytic virus immunotherapy: Future prospects for oncology [J]. J Immunother Cancer, 2018, 6(1): 140.
- [4] 徐立斌. 恶性黑色素瘤的免疫治疗现状与进展 [J]. 中国医师进修杂志, 2022, 45(4): 289-292.
- [5] Xu L B. Current situation and progress of immunotherapy for malignant melanoma [J]. Chin J Postgrad Med, 2022, 45(4): 289-292.
- [5] Zhang Q, Tang L S, Zhou Y W, et al. Immune checkpoint inhibitor-associated pneumonitis in non-small cell lung

- cancer: Current understanding in characteristics, diagnosis, and management [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 663986.
- [6] Wu J, Wang Y C, Xu W H, et al. High expression of CD39 is associated with poor prognosis and immune infiltrates in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 10453-10464.
- [7] Allard B, Longhi M S, Robson S C, et al. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets [J]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 121-144.
- [8] Moesta A K, Li X Y, Smyth M J. Targeting CD39 in cancer [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(12): 739-755.
- [9] 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.
- [10] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA A Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [11] Reck M, Remon J, Hellmann M D. First-line immunotherapy for non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(6): 586-597.
- [12] 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.
- [13] Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.
- [14] Yuan Y, Adam A, Zhao C, et al. Recent advancements in the mechanisms underlying resistance to PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy [J]. *Cancers*, 2021, 13(4): 663.
- [15] Wainberg Z, Kang Y K, Lee K W, et al. Safety and efficacy of TTX-030, an anti-CD39 antibody, in combination with chemoimmunotherapy for the first line treatment of locally advanced or metastatic gastric/GEJ cancer [A] // *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2022* [C]. Philadelphia: American Association for Cancer Research, 2022.
- [16] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(1): 23-34.
- [17] 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.
- [18] Yeo J, Ko M, Lee D H, et al. TIGIT/CD226 axis regulates anti-tumor immunity [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(3): 200.
- [19] Muth S T, Saung M T, Blair A B, et al. CD137 agonist-based combination immunotherapy enhances activated, effector memory T cells and prolongs survival in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2021, 499: 99-108.
- [20] Cheng Q, Duan W W, He S Q, et al. Multi-omics data integration analysis of an immune-related gene signature in LGG patients with epilepsy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 686909.

[责任编辑 刘东博]