

CXCL 趋化因子在头颈部鳞状细胞癌中的表达及临床意义

武旭¹ 达林泰¹ 苏尼特² 尚多² 周兴安² 德乐黑巴特尔²

1. 呼和浩特市口腔医院口腔颌面外科 呼和浩特 010000;

2. 内蒙古医科大学附属医院口腔科 呼和浩特 010050

[摘要] **目的** 探讨 CXCL 趋化因子家族在头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 中的表达及作为其诊断与预后标志物的价值。**方法** 利用公共数据库, 分析 HNSCC 中异常表达的 CXCL 因子类型以及与 HNSCC 患者不良预后的相关性, 计算 CXCL 家族与免疫因子浸润的相关性。**结果** 与正常组织相比, CXCL 在 HNSCC 组织及病理分期中存在差异表达, 且与 HNSCC 患者更长的总生存期 (OS) 及免疫细胞浸润密切相关; CXCL 趋化因子在 HNSCC 中基因功能主要富集在趋化因子活性等; KEGG 通路主要富集细胞因子-细胞因子受体相互作用等; CXCL 家族在 HNSCC 中有一定的突变率。**结论** 基于肿瘤生物信息学分析发现, CXCL 家族在 HNSCC 组织中的表达水平与正常组织有差异, 且其表达水平与免疫细胞浸润以及肿瘤预后具有相关性, 可作为 HNSCC 预后标志物以及基因治疗靶点。

[关键词] 趋化因子; 生物信息学; 头颈部鳞状细胞癌; 预后; 免疫浸润

[中图分类号] R739.81 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2024012



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Effect of CXCL chemokines on the diagnosis and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma

Wu Xu¹, Da Lintai¹, Su Nite², Shang Duo², Zhou Xing'an², Delehei Bateer²

1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Hohhot Stomatological Hospital, Hohhot 010000, China; 2. Dept. of Stomatology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Supported by: Joint Project of Inner Mongolia Medical University (YKD2023LH032); Scientific Research Project of Universities in Inner Mongolia Autonomous Region (NJZY21634)

Correspondence: Delehei Bateer, Email: nmgykdxdlh@163.com

[Abstract] **Objective** This study investigated the expression levels of CXCL chemokines in head and neck cancer and their value as diagnostic and prognostic markers. **Methods** Public databases were used in the analysis of various abnormally expressed CXCL factors in head and neck cancer and their correlation with the poor prognoses of patients with head and neck cancer, and the correlation between CXCL family and immune factor infiltration was determined. **Results** Compared with normal tissues, CXCL is differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) tissues and pathological stages, and it is closely related to long overall survival (OS) and immune cell infiltration in patients with HNSCC. CXCL chemokine gene function in HNSCC is mainly concentrated in chemokine activity. The KEGG pathway is mainly concentrated in cytokine-cytokine receptor interaction, and the CXCL family has a certain mutation rate in HNSCC. **Conclusion** Tumor bioinformatics analysis showed that the expression levels of the CXCL family in HNSCC

tissues are different from those in normal tissues and correlated with immune cell infiltration and tumor prognosis, showing potential as prognostic markers for HNSCC and gene therapy targets.

[Key words] chemokine; bioinformatics; squamous cell carcinoma of the head and neck; prognosis; immunoinfiltration

[收稿日期] 2023-08-25; [修回日期] 2023-12-23

[基金项目] 内蒙古医科大学联合项目 (YKD2023LH032); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY21634)

[作者简介] 武旭, 主治医师, 硕士, Email: 1329607312@qq.com

[通信作者] 德乐黑巴特尔, 副教授, 硕士, Email: nmgykdxdlh@163.com

头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 是世界上第六大最常见的恶性肿瘤, 全世界每年有超过50万例HNSCC新发病例, 每年有超过14万人死于HNSCC^[1]。目前, 治疗HNSCC的主要方法是手术切除及辅助放射和化学治疗。虽然在手术、放射和化学治疗方面取得了较大进展, 但目前HNSCC患者的总生存率没有显著改善。HNSCC具有侵袭性生长、远处转移、术后复发率高、预后差的特点, 其发生和发展是受多因素影响的复杂过程^[2]。因此, 早期诊断和有效评估预后对于改善HNSCC生存率具有重要意义。

趋化因子是细胞分泌的小分子细胞因子或信号蛋白, 相对分子质量小 (约810 kDa), 主要由4个亚家族组成: CXC、CC、CX3C和XC, 趋化因子通过与G蛋白连接的跨膜受体 (趋化因子受体) 相互作用发挥其生物学效应, 并参与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[3-4]。其中CXC趋化因子配体 (chemotactic ligand, CXCL) 家族参与调节免疫细胞活性、诱导肿瘤细胞迁移、调节肿瘤细胞增殖和肿瘤微血管形成, 与肿瘤的发生发展密切相关^[5]。CXCL家族包括CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4 (PF4)、CXCL5、CXCL6、CXCL7 (PPBP)、CXCL8 (IL8)、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL16和CXCL17, 已有研究^[6]表明部分CXCL趋化因子家族成员参与HNSCC的侵袭和转移, 但CXCL家族在作为HNSCC诊断和预后标志物的作用至今尚未明确。在本研究中, 通过利用相关公共数据库及R语言对CXCL在HNSCC中的表达和生存数据进行全面的生物信息学分析, 阐明整个CXCL家族在HNSCC中的预后价值。

1 材料和方法

1.1 UALCAN 数据库

UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) 基于癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 3级RNA-seq和31种癌症类型的临床数据^[7]。本研究利用UALCAN数据库探讨HNSCC组织与正常组织之间CXCL的表达。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2 TCGA 数据库

TCGA是一项包含多种人类肿瘤致癌基因组改变的公共数据库^[8]。为确定CXCL趋化因子家族在HNSCC中的表达量, 使用TCGA数据库分析

CXCL家族在HNSCC与正常头颈组织中的表达量。

1.3 GEPIA 网站

GEPIA (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) 是一种新开发的交互式网站, 使用标准流程处理分析来自TCGA和GTEx项目的9 736个肿瘤和8 587个正常样本的RNA测序表达数据^[9]。GEPIA提供肿瘤/正常差异表达分析、根据肿瘤类型或病理分期进行分析、患者生存分析、相似基因检测、相关性分析和降维分析。

1.4 Kaplan-Meier Plotter 数据库

Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) 是最权威的生存分析数据库, 能够评估21种肿瘤中54 000个基因与生存参数的关系^[10]。本研究利用GEPIA数据库评估差异表达的CXCL在HNSCC中的预后价值, 并通过K-M生存曲线验证其相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5 TIMER 数据库

TIMER (<http://timer.comp-genomics.org/>) 数据库是一种评判免疫细胞浸润及其对疾病影响的分析网站^[11]。使用TIMER数据库预测并评估差异表达的CXCL与HNSCC患者免疫细胞浸润之间的相关性。

2 结果

2.1 CXCL趋化因子在HNSCC中的表达情况

基于TCGA数据库的结果显示CXCL趋化因子在HNSCC组织与正常组织中表达的热图 (图1)。与正常组织相比, HNSCC组织中CXCL8 (IL8)、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13和CXCL14高表达 ($P < 0.05$), CXCL12和CXCL17低表达 ($P < 0.05$) (图2), 其余CXCL趋化因子在HNSCC组织与正常组织中的表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

在GEPIA中评估了差异表达CXCL趋化因子和HNSCC患者病理分期之间的相关性, 如图3所示: CXCL9 ($P = 0.035$)、CXCL10 ($P = 0.004$)、CXCL11 ($P = 0.003$)、CXCL12 ($P = 0.02$)、CXCL14 ($P = 0.02$) 的表达量在HNSCC的4个病理分期中差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 CXCL趋化因子在HNSCC患者中的预后价值

通过Kaplan-Meier Plotter数据库探讨HNSCC中CXCL趋化因子改变的预后价值, 与总体生存期显著相关的趋化因子共6个, 其总生存期 (overall

survival, OS) 曲线如图4所示, 结果表明: CXCL9、CXCL10、CXCL13、CXCL14及CXCL17高

表达以及CXCL8低表达的HNSCC患者与更长的OS相关 ($P<0.05$)。

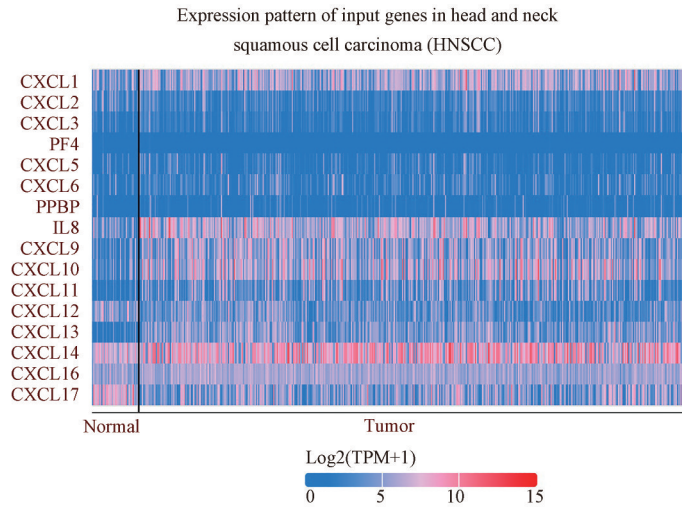


图 1 CXCL趋化因子在HNSCC与头颈正常组织中的mRNA表达水平热图

Fig 1 The mRNA expression level heatmap of CXCL chemokines in HNSCC and normal head and neck tissues

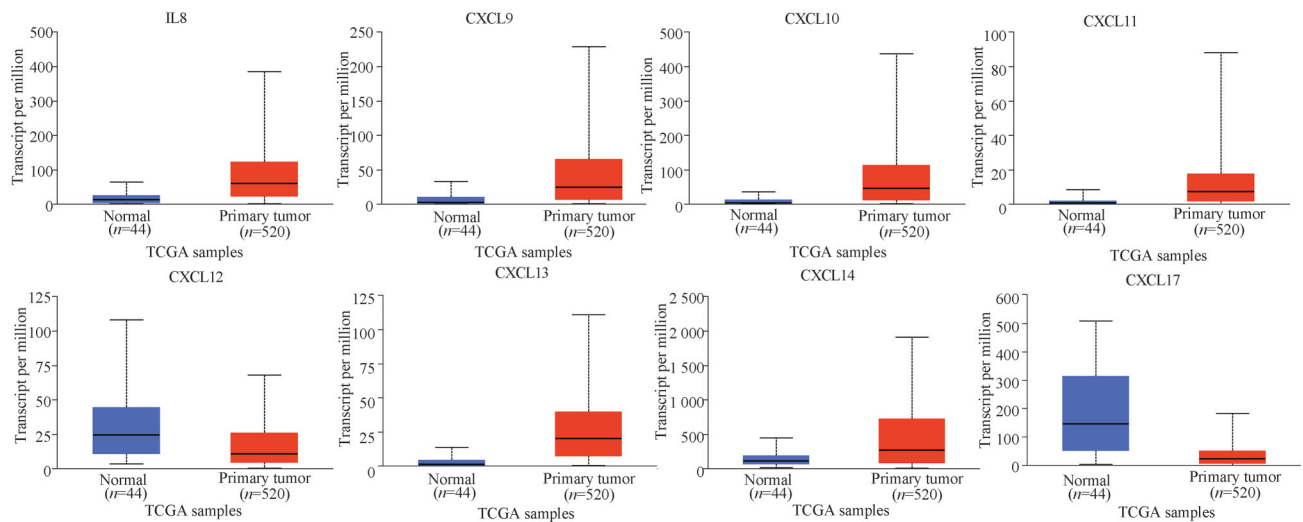


图 2 HNSCC患者与头颈正常组织中CXCL趋化因子的mRNA表达水平

Fig 2 The mRNA expression levels of CXCL chemokines in HNSCC patients and normal head and neck tissues

2.3 CXCL趋化因子与HNSCC患者免疫细胞浸润的相关性

TIMER数据库结果显示差异表达的CXCL趋化因子与HNSCC患者免疫细胞浸润 (CD8+T细胞、CD4+T细胞、树突状细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及B细胞) 密切相关, 其中CXCL9/10/11/14与CD8+T细胞浸润呈正相关, CXCL12/13/17与CD8+T细胞浸润呈负相关 ($P<0.05$), CXCL9/10/11/12/13/17与CD4+T细胞浸润呈正相关, CXCL14与CD4+T细胞浸润呈负相关 ($P<0.05$); CXCL10/11/14与B细胞浸润呈正相关, CXCL12与B细胞浸润呈负相关 ($P<0.05$); CXCL8/9/10/11/12/13与中

性粒细胞浸润呈正相关, CXCL14与中性粒细胞浸润呈负相关 ($P<0.05$); CXCL9/10/11/13/14与树突状细胞浸润呈正相关, CXCL17与树突状细胞浸润呈负相关 ($P<0.05$); CXCL8/12/13与巨噬细胞浸润呈正相关, CXCL10/17与巨噬细胞浸润呈负相关 ($P<0.05$); 其余差异表达的CXCL趋化因子与免疫浸润无显著相关性。

2.4 HNSCC中CXCL趋化因子的功能富集分析

利用GEPIA和Metascape分析HNSCC患者中差异表达的CXCL8/9/10/11/12/13/14/17的功能、通路富集。如图5所示: 基因功能主要富集在趋化因子活性 (chemokine activity)、细胞趋化作用 (cell

chemotaxis)、白细胞趋化性的正向调控 (positive regulation of leukocyte chemotaxis)、钙离子转运的正向调控 (positive regulation of calcium ion transport); KEGG通路主要富集在病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用 (viral protein inter-

action with cytokine and cytokine receptor)、细胞因子-细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction)、TLR信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)。

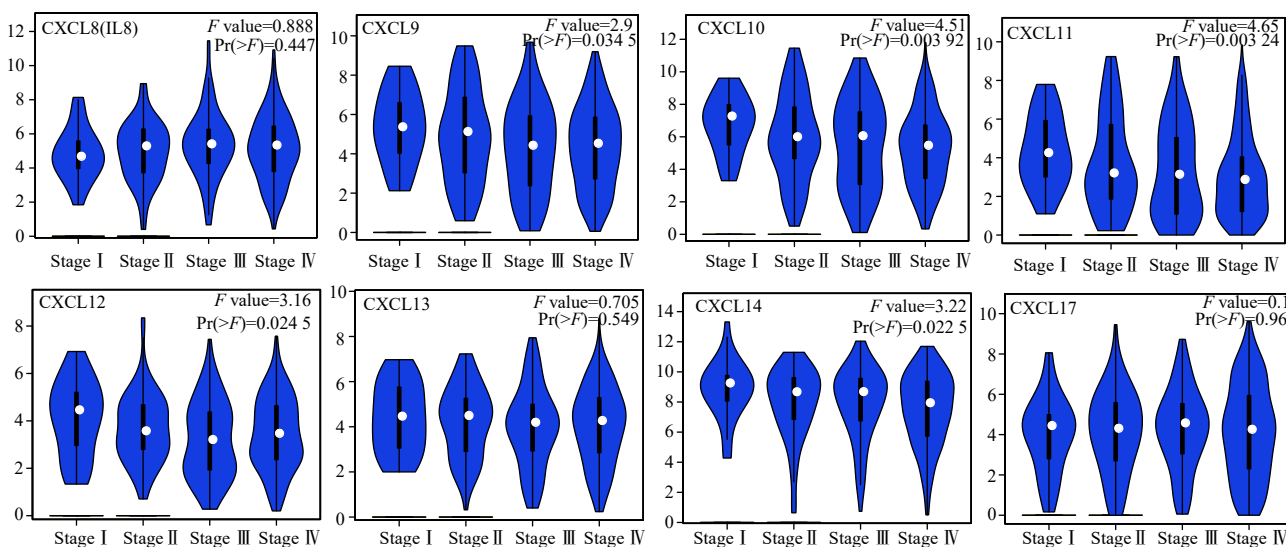


图 3 HNSCC组织中与病理分期相关的CXCL趋化因子mRNA表达水平

Fig 3 Expression level of CXCL chemokine mRNA related to pathological stage in HNSCC tissues

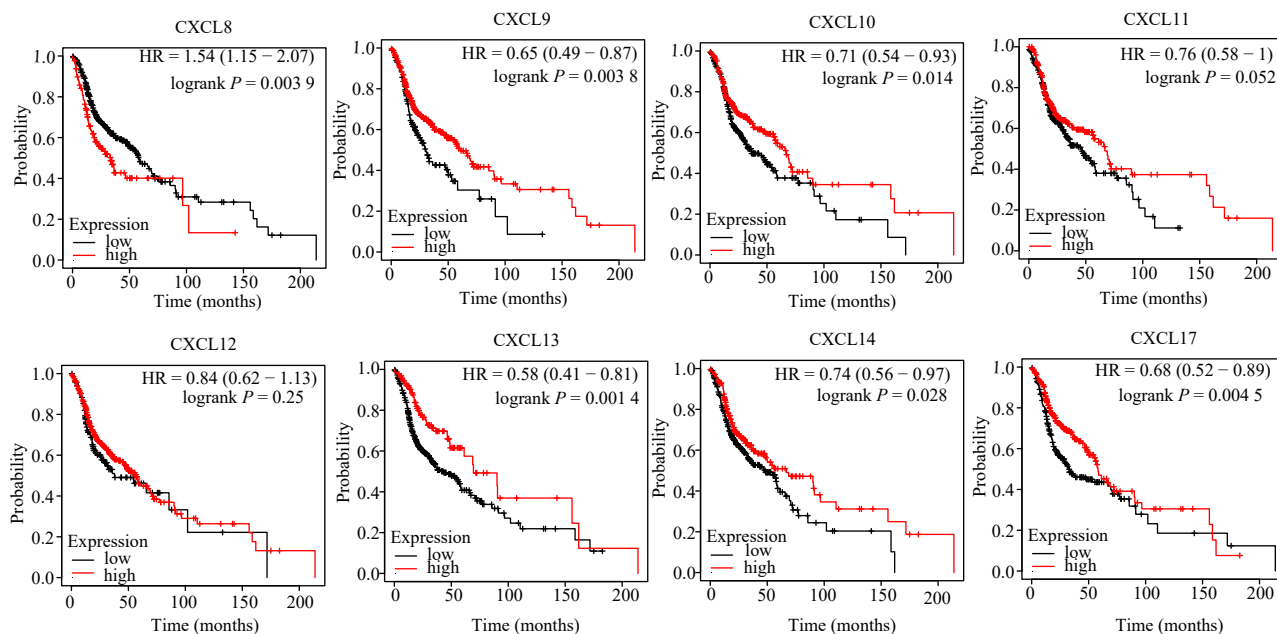


图 4 不同CXCL趋化因子在HNSCC患者中的预后价值

Fig 4 Prognostic value of different CXCL chemokines in HNSCC patients

2.5 HNSCC患者CXCL趋化因子的基因改变分析

通过cBioportal数据库分析差异表达的CXCL趋化因子在HNSCC患者中的突变情况, 如图6所示: 这些差异表达的CXCL趋化因子均发生了不同比例的突变, 其中CXCL12突变率最高, 达到

2.6%, 主要包括基因扩增和突变; CXCL13/14突变率最低为0.4%。通过cBioportal数据库分析了CXCL8/9/10/11/12/13/14/17之间的相关性, 结果如图6显示, 以下CXCL趋化因子发生突变关系为正相关。

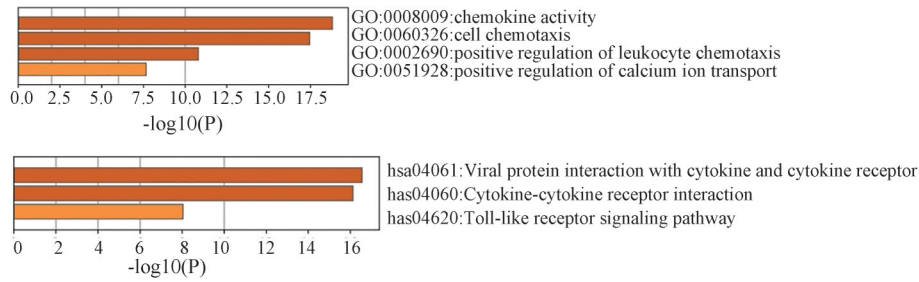


图 5 GO与KEGG富集分析结果

Fig 5 GO and KEGG enrichment analysis results

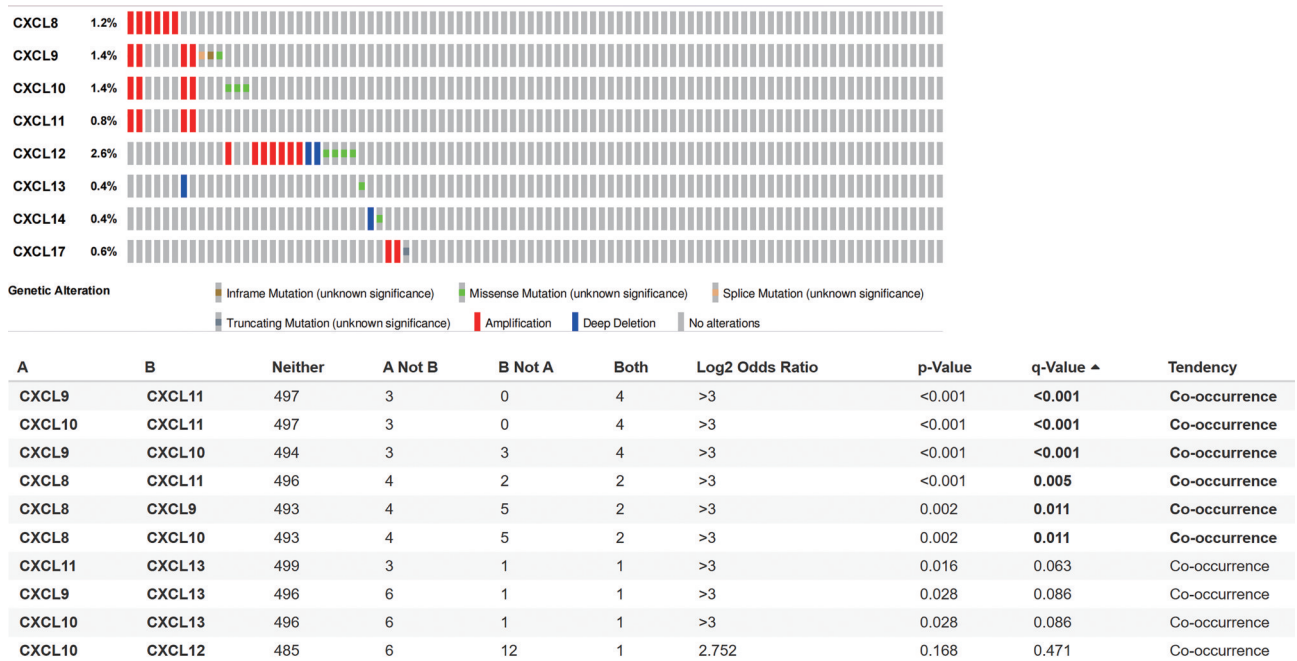


图 6 HNSCC患者与差异表达CXCL趋化因子基因突变的关系

Fig 6 Relationship between HNSCC patients and differentially expressed CXCL chemokine gene mutations

3 讨论

全世界每年有超过250万人患有HNSCC，每年死亡病例超过37万例^[12]。HNSCC的主要治疗方法通常是手术联合放射和化学治疗，虽然在手术、放射和化学治疗方面取得了较大进展，但目前HNSCC患者的总生存率没有显著改善。HNSCC具有侵袭性生长、远处转移、术后复发率高、预后差的特点，其发生和发展是受多因素影响的复杂过程^[2]。因此，早期诊断和有效评估预后对于改善HNSCC生存率具有重要意义。

趋化因子是一组结构上相关的小的相对分子质量的蛋白质^[13]。这些分子在许多类型细胞的生长、分化和活化中起重要作用。趋化因子主要由白细胞合成，并通过其同源G蛋白偶联受体发挥

作用，引起细胞应答，如迁移、黏附和趋化性^[14]。趋化因子及其受体在肿瘤发生发展中的重要作用是调节肿瘤的转移过程。临床研究^[15]证明：其中一些趋化因子能够在转移中促进肿瘤播散，包括肿瘤细胞与内皮的黏附、增殖、从血管外渗、血管生成以及保护免受宿主反应。这些蛋白质还可能简化肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）内恶性细胞和非肿瘤细胞之间的通讯，促进中性粒细胞和肿瘤相关巨噬细胞的浸润和活化^[16]。

本文研究结果显示：在HNSCC中趋化因子（CXCL）存在差异性表达，其中CXCL8/9/10/11/13/14在HNSCC组织中显著高表达，而CXCL12/17在HNSCC组织中显著低表达，高表达的CXCL9/10/11/14与低表达的CXCL12同时在HNSCC的不同病理分期中的表达差异存在统计学意义，表明这

些CXCL趋化因子在HNSCC的发生发展中起重要作用。有研究^[17]表明：CXCL9/CXCR3轴能激活Ca127移植瘤Akt信号通路，诱导裸鼠舌鳞状细胞癌移植瘤细胞发生上皮-间质转化，介导癌细胞发生转移。通过对CXCL趋化因子生存分析发现：低表达CXCL9/10/13/14/17以及过表达CXCL8的HNSCC患者与HNSCC不良的临床结局相关，提示CXCL趋化因子可作为判定HNSCC预后的标志物。Yorozu等^[18]通过对肿瘤内高表达CXCL12定量分析显示：CXCL12表达降低与较差的总生存期相关。以上研究结果表明：CXCL趋化因子对HNSCC的发生发展有一定的作用，具有作为判别病理分期及预后标志物的潜力。

本研究结果显示：差异表达的CXCL趋化因子与HNSCC患者免疫细胞浸润（CD8+T细胞、CD4+T细胞、树突状细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及B细胞）密切相关。Wang等^[19]的研究发现：上调的CXCL9/10/11-CXCR3A轴可能与口腔白斑病和口腔鳞状细胞癌中的免疫检查点及其配体相互作用，影响口腔鳞状细胞癌CD274和IDO1的浸润。另外有研究^[20]表明：过表达肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体（tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL）可以下调肿瘤细胞CXCL10的分泌，减少对CD8+T细胞的趋化。CXCL12表达水平与 α 平滑肌肌动蛋白表达呈负相关，并与CD8+淋巴细胞浸润呈正相关。Parikh等^[21]的研究发现：口腔鳞状细胞癌细胞中较高的CXCL14表达与肿瘤生长减少以及肿瘤浸润淋巴细胞增加有关，CXCL14在淋巴结转移中下调，CXCL14介导的免疫浸润可能阻止侵袭和转移的可能性。

目前，有研究^[22-23]证实：CXCL是TME的重要组成部分，CXCL及其受体可以作为化学诱导物引导免疫细胞向TME的浸润，可促进免疫识别反应，杀伤肿瘤细胞，亦可抑制免疫反应，对肿瘤的生长增殖、血管生成和转移等有一定的促进作用，对于评估新辅助免疫治疗疗效有一定的指导作用。CXCL可以参与免疫细胞发挥抗肿瘤效应，CXCL及其受体作为肿瘤免疫治疗靶点，可以指导有前景的免疫治疗策略。以上结果表明：CXCL8/9/10/11/12/13/14/17趋化因子表达与HNSCC免疫细胞浸润有关，提示CXCL趋化因子可作为HNSCC预测免疫治疗疗效的生物标志物以及作为肿瘤免疫治疗靶点。

通过对CXCL趋化因子在HNSCC中表达的功能富集分析及基因改变情况分析得出：基因功能主要富集在趋化因子活性、细胞趋化作用、白细胞趋化性的正向调控、钙离子转运的正向调控；KEGG通路主要富集在病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用、细胞因子-细胞因子受体相互作用、TLR信号通路。这就提示CXCL趋化因子对HNSCC细胞的作用主要通过以上功能及通路实现，为后续进一步验证其相关分子信号通路提供理论基础。通过基因突变分析得出差异表达的CXCL趋化因子与HNSCC发生发展密切相关，有研究^[24]表明基因组扩增可作为有前景的预测分子生物标志物并且可以用于靶向治疗，本研究结果中CXCL12突变率最高，主要包括基因扩增和突变，表明CXCL12可能作为未来HNSCC患者基因治疗的潜在靶点。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

4 参考文献

- [1] von Witzleben A, Wang C, Laban S, et al. HNSCC: tumour antigens and their targeting by immunotherapy[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2103.
- [2] Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 92.
- [3] Wei LY, Lee JJ, Yeh CY, et al. Reciprocal activation of cancer-associated fibroblasts and oral squamous carcinoma cells through CXCL1[J]. *Oral Oncol*, 2019, 88: 115-123.
- [4] Li YC, Wu TH, Gong SJ, et al. Analysis of the prognosis and therapeutic value of the CXC chemokine family in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 570736.
- [5] Li HY, Wu M, Zhao X. Role of chemokine systems in cancer and inflammatory diseases[J]. *MedComm*, 2022, 3(2): e147.
- [6] 刘宇. 基于生物信息学方法筛选头颈部鳞癌枢纽基因和关联通路[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
Liu Y. Screening of head and neck squamous carcinoma hub genes and associated pathways based on bioinformatics methods[D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [7] Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et

- al. UALCAN: an update to the integrated cancer data analysis platform[J]. *Neoplasia*, 2022, 25: 18-27.
- [8] Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge[J]. *Contemp Oncol*, 2015, 19 (1A): A68-A77.
- [9] Li CW, Tang ZF, Zhang WJ, et al. GEPIA2021: integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W242-W246.
- [10] Nagy Á, Munkácsy G, Gyórfy B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6047.
- [11] Li TW, Fu JX, Zeng ZX, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(W1): W509-W514.
- [12] GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet*, 2017, 390 (10100): 1211-1259.
- [13] Chen XY, Chen RP, Jin RF, et al. The role of CXCL chemokine family in the development and progression of gastric cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(3): 484-492.
- [14] Yamamoto Y, Kuroda K, Sera T, et al. The clinicopathological significance of the CXCR2 ligands, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, and CXCL8 in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(12): 6645-6652.
- [15] Łukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Szmitkowski M. Chemokines and their receptors in esophageal cancer: the systematic review and future perspectives[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8): 5707-5714.
- [16] 宋福勤. YAP通过调控CXCL5/CXCR2介导EGFR突变肺腺癌MDSCs迁移致T细胞增殖受抑的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- Song FQ. YAP mediates the migration of MDSCs by regulating CXCL5/CXCR2 resulting in the inhibition of T cell proliferation in EGFR mutant lung adenocarcinoma[D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [17] 王伊婷. CXCL9/CXCR3轴对裸鼠人舌鳞癌模型颈淋巴结转移调节作用的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2018.
- Wang YT. The role and mechanism of CXCL9/CXCR3 axis regulating oral squamous cell carcinoma metastasis *in vivo*[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2018.
- [18] Yorozu A, Sekiguchi S, Takasawa A, et al. CXCL12 is expressed by skeletal muscle cells in tongue oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2023, 12 (5): 5953-5963.
- [19] Wang X, Zhang J, Zhou G. The CXCL11-CXCR3A axis influences the infiltration of CD274 and IDO1 in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2021, 50(4): 362-370.
- [20] 杨惠云. TNF相关凋亡诱导配体表达促进食管鳞癌进展的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- Yang HY. Expression of TRAIL in esophageal squamous cell carcinoma promotes tumor progression [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2020.
- [21] Parikh A, Shin J, Faquin W, et al. Malignant cell-specific CXCL14 promotes tumor lymphocyte infiltration in oral cavity squamous cell carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001048.
- [22] 王文涛. CXCL8-CXCR1/2在乳腺癌新辅助化疗中的变化及意义[D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- Wang WT. Value and clinical significance of CXCL8-CXCR1/2 axis in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer[D]. Qingdao: Qingdao University, 2022.
- [23] 毛天琴. CXCL5预测食管癌新辅助免疫治疗疗效及其与肿瘤免疫的相关性研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2022.
- Mao TQ. CXCL5 predict the efficacy of neoadjuvant immunotherapy for esophageal cancer and its correlation with tumor microenvironment[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2022.
- [24] Liu YE, Wang D, Li ZJ, et al. Pan-cancer analysis on the role of PIK3R1 and PIK3R2 in human tumors [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5924.

(本文编辑 王姝)