

ANGPT1 和 TEK 影响人类肿瘤进展的泛癌分析

杜国庆¹⁾, 刘志琴¹⁾, 李姚¹⁾, 史永华^{1,2)}

(1)新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 新疆 830017;

2)新疆地方病分子生物学重点实验室, 乌鲁木齐 新疆 830017)

[摘要] **目的** 探讨血管生成素 1(angiotensin-1, ANGPT1)及其受体TEK(tyrosine kinase)在泛癌中的表达、预后及免疫浸润的情况。**方法** 应用TIMER2.0、Kaplan-Meier plotter、UALCAN 等数据库分析 ANGPT1 及 TEK 在泛癌中的表达、预后; 利用 SangerBox3.0 及 R 软件分析 ANGPT1、TEK 与肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)、微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)、免疫检查点(immune checkpoint, ICP)、免疫浸润的相关性; 使用 String 数据库、GO 与 KEGG 分析鉴定与 ANGPT1 和 TEK 相关的蛋白及调节通路。**结果** ANGPT1 和 TEK 在多数肿瘤中低表达($P < 0.05$)。ANGPT1、TEK 低表达患者预后不良($P < 0.05$)。ANGPT1 和 TEK 的表达水平与肾透明细胞癌、膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润性癌等临床分期相关($P < 0.05$)。ANGPT1、TEK 表达与肿瘤的 TMB、MSI、ICP 相关($P < 0.05$), 与免疫浸润正相关($P < 0.05$)。与 ANGPT1 和 TEK 关系密切的基因有 GRB2、PIK3R1、EGFR 等, 主要参与 Grb2-EGFR、ERBB3; ERBB2、Shc-EGFR 等复合物相关的生物学过程和功能, 主要涉及 ErbB 信号通路。**结论** ANGPT1 和 TEK 可能通过 ErbB 信号通路在肿瘤发生发展中起重要作用, 有望成为多种癌症的潜在临床预后标志物。

[关键词] ANGPT1; TEK; 泛癌分析; R 语言

[中图分类号] R73-31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)06-0057-12

Pan-Cancer Analysis for the Effects of ANGPT1 and TEK on Human Tumor Progression

DU Guoqing¹⁾, LIU Zhiqin¹⁾, LI Yao¹⁾, SHI Yonghua^{1,2)}

(1) School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830017;

2) Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology for Endemic Diseases,
Urumqi Xinjiang 830017, China)

[Abstract] **Objective** To probe the expression level, prognostic value, and immune invasion of angiotensin-1 (ANGPT1) and its receptor tyrosine kinase (TEK) in pan-cancer. **Methods** TIMER2.0, Kaplan-Meier plotter and UALCAN etc. databases were used to analyze the expression, prognostic value of ANGPT1 and TEK in various types of tumors. SangerBox 3.0 and R software were used to analyze the relationship between ANGPT1 and TEK tumor mutational burden (TMB), microsatellite instability (MSI), immune checkpoint (ICP) and immune cell infiltration. String database, GO and KEGG analysis were used to identify proteins and regulatory pathways related to ANGPT1 and TEK. **Results** ANGPT1 and TEK showed low expression in most tumors ($P < 0.05$). Patients with low expression of ANGPT1 and TEK had a worse prognosis ($P < 0.05$). The expression levels of ANGPT1 and TEK were correlated with the clinical stages of clear cell renal carcinoma, bladder urothelial carcinoma, and invasive breast carcinoma ($P < 0.05$). The expression of ANGPT1 and TEK was significantly correlated with TMB, MSI and ICP in various tumors ($P < 0.05$), and was significantly positively correlated with

[收稿日期] 2023-12-10

[基金项目] 新疆地区高发疾病教育部重点实验室基金资助项目(2023A02)

[作者简介] 杜国庆(2001~), 甘肃陇南人, 在读本科生。刘志琴与杜国庆对本文有同等贡献。

[通信作者] 史永华, E-mail: z5826711@126.com

immune invasion ($P < 0.05$). The genes were closely related to ANGPT1 and TEK include GRB2, PIK3R1, EGFR, etc., which were mainly involved in a series of biological processes and functions related to Grb2-EGFR, ERBB3:ERBB2, Shc-EGFR and other complexes, mainly involved ErbB signaling pathway. **Conclusion** ANGPT1 and TEK may play an important role in tumorigenesis and development through the ErbB signaling pathway, and are expected to be potential clinical prognostic markers for various types of cancer.

[**Key words**] ANGPT1; TEK; Pan-cancer analysis; The R Programming Language

癌症是死亡率居世界第二位的系统性慢性疾病^[1],其进展与血管生成关系密切,因此,研究癌症中与血管生成相关的分子机制,探索相关新靶点具有重要的理论和临床意义。在肿瘤形成过程中,与血管生成有关的因素有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管生成素(angiotensin, ANGPT)等^[2-4]。其中血管生成素/酪氨酸磷酸化激活受体(tyrosine kinase, TEK)系统已成为癌症治疗及药物开发中日益关注的靶标^[5]。由 TEK 基因编码的酪氨酸蛋白激酶-2 (tyrosine-protein kinase receptor-2, Tie2)在血管稳定性中起核心作用。在人类中,有 3 种已知的 Tie2 配体,即 ANGPT1、ANGPT2 和 ANGPT4。其中作为一种分泌型的血管生成因子,ANGPT1 是主要在内皮细胞上表达的酪氨酸激酶受体 Tie 2 的天然配体^[6],在血管发育和生成中起着决定性作用。ANGPT1 能够与血管内皮细胞 Tie2 受体结合,介导内皮细胞与周围基质和间充质的相互作用,抑制新生血管的生成^[7-8]。尽管如此,ANGPT1 在肿瘤发生发展的影响尚存争议。研究指出,在胶质瘤中,ANGPT1 表达量较高,可促进血管生长和肿瘤增殖^[9]。相反,在转移性结肠癌及乳腺癌中,ANGPT1 显示出增强血管稳定性的功能,从而抑制血管生成及肿瘤生长和转移^[10-12];肺腺癌的研究也表明,ANGPT1 的表达水平较低,且与淋巴结转移和 TNM 分期(tumor node metastasis classification)呈负相关^[13]。ANGPT1 对肿瘤血管系统的不同作用可能是由于不同类型的肿瘤、肿瘤中 Tie2 的表达程度或外源性 ANGPT1 的有效性存在基本差异^[14]。Tie2 不仅由肿瘤血管内皮细胞表达,还可表达于肿瘤微环境中的其他细胞。文献报道,肿瘤中表达 Tie2 的单核细胞参与肿瘤生长^[15],这意味着血管生成素可能通过表达 Tie2 的内皮细胞和单核细胞在肿瘤血管生成中发挥作用。总的说来,ANGPT/TEK 系统在肿瘤中的作用及其机制还不清楚,值得深入探讨。

目前,关于 ANGPT/TEK 在肿瘤中的系统性大数据分析尚未见报道。本研究中,作者系统性

分析了 ANGPT1/TEK 基因在多种肿瘤中的多组学数据,全面揭示了 ANGPT1/TEK 的表达、免疫及其与预后的关系,以阐明 ANGPT1/TEK 基因在肿瘤发生发展过程中的关键作用及可能的调节机制。

1 资料与方法

1.1 样本信息

对 ANGPT1 和 TEK 进行系统性泛癌分析所需公共数据库的原始数据主要来自 The Cancer Genome Atlas (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 和 GTEx 数据库(<http://commonfund.nih.gov/GTEx/>)。

1.2 基因的转录表达分析

使用 TIMER2.0 (<http://timer.cistrome.org/>) 数据库选择 Cancer Exploration 进行 ANGPT1 和 TEK 在泛癌以及正常组织表达水平的在线分析,得到 ANGPT1 和 TEK 在泛癌以及正常组织的表达差异图。对于在 TIMER 数据库中缺乏邻近正常组织的肿瘤,应用 GEPIA2 数据库进行基因差异分析补充,此外,通过 GEPIA2 分析 ANGPT1 和 TEK 在泛癌中临床分期的表达情况。

1.3 基因的蛋白质表达分析

使用 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/analysisprot.html>) 数据库选择 TCGA 进行 ANGPT1 和 TEK 在泛癌以及正常组织中的表达差异分析。应用人类蛋白质图谱(human protein atlas, HPA)数据库 (<https://www.proteinatlas.org>) 检索 ANGPT1、TEK 蛋白在肺、肝、肾、乳腺、结直肠中的表达图,得到以上组织和正常组织免疫组化对比图。

1.4 生存预后分析

使用 Kaplan-Meier plotter (<https://kmplot.com/analysis/>) 数据库 mRNA(RNA-seq)中的泛癌分析板块,通过总生存期(overall survival, OS)、无复发生存期(relapse-free survival, RFS)分析 ANGPT1 和 TEK 表达对 21 种癌症预后的影响。

1.5 基因免疫分析

肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)

和微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)均是实体瘤肿瘤微环境中非常重要的分子生物标志物,免疫检查点(immune checkpoint, ICP)是在肿瘤的发生发展过程中产生免疫耐受的主要原因之一。使用在线TCGA分析工具SangerBox3.0(<http://sangerbox.com/tool.html>),研究ANGPT1、TEK表达与TMB、MSI、ICP之间的关系,相关分析采用Spearman秩检验。

1.6 免疫浸润分析

从UCSC(<https://xenabrowser.net/>)数据库下载TCGA TARGET GTEX (PANCAN, N=19131, G=60499)泛癌数据集,从中提取ANGPT和TEK在各样本中的表达数据。免疫浸润分析利用R软件ESTIMATE包,根据基因表达计算每类肿瘤中每个样本的基质评分(stromal score)以评估肿瘤组织中的基质细胞浸润水平、免疫评分(immune score)以评估肿瘤组织中的免疫细胞浸润水平,以及2个分数相加即得到评估分数(estimate score)用于推断肿瘤纯度。免疫浸润细胞亚型分析用R软件IOBR包的Timer方法,根据基因表达评估每类肿瘤中每个样本的B细胞、CD4 T细胞、CD8 T细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞浸润分数。

1.7 蛋白相互作用网络分析

通过STRING(string-db.org)数据库获得ANGPT1与TEK的蛋白相互作用网络。在该数据库Multiple protein输入ANGPT1与TEK,物种来源设定为“Homo sapiens”,其他基本设置如下:主动交互源为实验,所需最低交互分数取中置信度(0.400),要显示的最大交互器数两壳均设置为不超过50个交互体。所得数据用Cytoscape软件构建PPI网络,将结果可视化。

1.8 基因通路富集分析

从DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)数据库中获取相互作用基因,利用R语言Cluster Profiler包对所得数据进行筛选处理。使用SangerBox3.0平台富集分析圈图快速绘制工具,绘制生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)与细胞组分(cellular component, CC)的和弦图,取 $P < 0.05$ 的条目前十进行excel表格的建立、导入、生成相应的可视化图像。

1.9 统计学处理

采用Wilcoxon检验评估TIMER中肿瘤与癌旁正常组织的差异表达。采用Mann-Whitney U检验分析HPA数据库中获得的免疫组织化学结果。

为了比较生存曲线,在Kaplan-Meier中采用logrank检验计算HR和logrank P 值。基因表达的相关性采用Spearman相关性分析。采用SPSS 26.0统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 ANGPT1 和 TEK 在泛癌中的转录表达量和蛋白表达量

TIMER数据库结果显示ANGPT1和TEK在大部分肿瘤中的差异表达有统计学意义。ANGPT1(图1A)在BLCA、BRCA、COAD、KIRC、KIRP、LUAD、LUSC、PRAD、READ、THCA、UCEC($P < 0.001$),CESC、SKCM($P < 0.01$)中表达下调。相反,在KICH、LIHC($P < 0.001$),GBM($P < 0.05$)中表达下调。TEK(图1B)在BLCA、BRCA、COAD、KICH、KIRC、KIRP、LIHC、LUAD、LUSC、PRAD、READ、SKCM、UCEC($P < 0.001$),CESC、GBM($P < 0.01$),THCA($P < 0.05$)中表达下调。利用GEPIA数据库评估了ANGPT1和TEK在肿瘤与对照组织中的表达差异,ANGPT1(图1A)在BRCA、CESC、KIRP、LUAD、LUSC、OV、PRAD、UCES($P < 0.05$)中的表达低于正常组织,而在GBM、KICH($P < 0.05$)中的表达高于正常组织。对于其他肿瘤未观察到显著差异。TEK(图1B)在ACC、BLCA、BRCA、CESC、KICH、KIRC、KIRP、LUAD、LUSC、OV、UCEC、UCS($P < 0.05$)中的表达低于正常组织,而在PAAD($P < 0.05$)中的表达高于正常组织。对于其他肿瘤未观察到显著差异。根据GEPIA的"stage plot"模块,发现KIRC($P < 0.05$)中ANGPT1的表达与肿瘤分期相关,而在其他癌症中未发现相关性(图1C)。而BLCA、BRCA、KICH、READ、SKCM、STAD和THCA($P < 0.05$)中TEK的表达与肿瘤分期相关,与其他肿瘤分期无关(图1D)。同时,笔者通过DALCAN数据库分析ANGPT1和TEK在泛癌和正常组织中的表达水平。结果表明ANGPT1(图1C)在18种癌症组织中显著低表达,其中包括BLCA、BRCA、CESC等;而在CHOL、ESCA、GBM、KICH、LIHC、PCPG中表达较正常显著上调($P < 0.05$)。同样地,与正常组相比,TEK在24种癌症组织中显著低表达且均具有统计学意义($P < 0.05$)(图1D),其中包括BLCA、BRCA、CESC等。通过HPA数据库进一步分析了ANGPT1、TEK蛋白在肺、肝、肾、乳腺、结

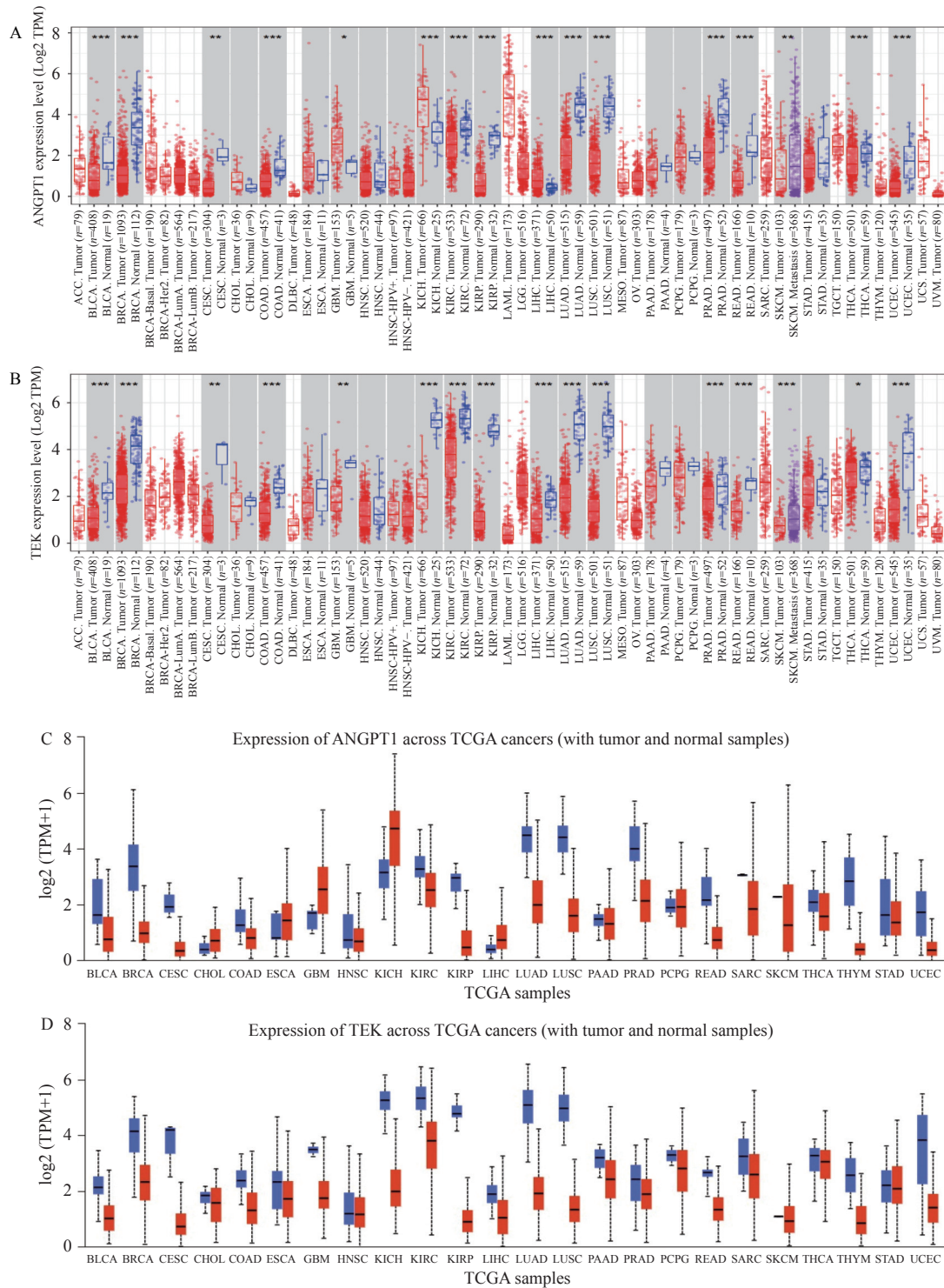


图 1 通过不同数据库分析 ANGPT1 与 TEK 在正常组织和不同肿瘤组织间的转录情况及蛋白表达量

Fig. 1 The transcription and protein expression levels of ANGPT1 and TEK in normal tissues and different tumor tissues were analyzed by different databases

A: 通过 TIMER 数据库分析 ANGPT1 在不同肿瘤组织中相对于正常组织中的表达水平。B: 通过 TIMER 数据库分析 TEK 在不同肿瘤组织中相对于正常组织中的表达水平。C: 通过 UALCAN 数据库分析 ANGPT1 在不同肿瘤组织的蛋白质组表达水平；D: 通过 UALCAN 数据库分析 TEK 在不同肿瘤组织的蛋白质组表达水平。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

直肠等肿瘤组织和癌旁正常组织中的蛋白表达情况(补充图 1E), 与癌旁正常对照组相比, ANGPT1 和 TEK 在大多数正常组织中呈低表达, 而在大多数肿瘤组织中 ANGPT1 呈高表达, TEK 呈低表达。

因此, ANGPT1 在肿瘤中高表达, TEK 在肿瘤中低表达。

2.2 ANGPT1 和 TEK 在泛癌中的预后价值

使用 Kaplan–Meier plotter 数据库 mRNA(RNA–

seq)中的泛癌分析板块分析ANGPT1 和 TEK 表达对 21 种癌症预后的影响。预后分析中, 具有统计学意义的 OS(总生存期)表明(图2A)ANGPT1 与 LUSC、LUAD、LIHC、KIRC、RCC、PCPG、HNSC、STAD、UCEC 相关, 其中 ANGPT1 高表达与 LUSC(HR = 1.44, $P = 0.023$)、LIHC(HR = 1.63, $P = 0.0072$)、RCC(HR = 2.14, $P = 0.012$)、STAD(HR=1.74, $P=0.0032$)、LICEC(HR=2.01, $P=0.0028$)患者预后不良高度相关, ANGPT1 低表达与 LUAD(HR = 0.51, $P = 8.5e-05$)、KIRC(HR = 0.57, $P = 0.00023$)、PCDG(HR = 0.08, $P = 0.0034$)、HNSC(HR = 0.72, $P = 0.028$)患者预后不良高度相关, 因此, ANGPT1 高表达对 RCC 和 STAD 患者预后不良起重要作用, 低表达则加速了 LUAD 患者死亡的进程。预后分析中, 具有统计学意义的 OS(总生存期)表明(图2B)TEK 与 BICA、LUAD、LIHC、KIRC、RCC、ESCC、PCPG、HNSC、STAD 相关, 其中 TEK 高表达与 BICA(HR = 1.55, $P = 0.0046$)、RCC(HR = 2.29, $P = 0.0061$)、ESCC(HR = 3.89, $P = 0.0097$)、STAD(HR = 1.66, $P = 0.012$)患者预后不良高度相关, TEK 低表达与 PAAD(HR = 0.67, $P = 0.012$)、LIHC(HR = 0.48, $P = 3e-05$)、KIRC(HR = 0.33, $P = 1.6e-14$)、PCPG(HR = 0.12, $P = 0.025$)、HNSC(HR = 0.64, $P = 0.0015$)、患者预后不良高度相关, 因此, TEK 高表达对 RCC 和 STAD 患者预后不良起重要作用, 低表达则加速了 LUAD 和 LIHC 患者死亡的进程。此外, 通过绘制 ROC 曲线评估 ANGPT1、TEK 在 GBM、CRC、OV、BRCA 中的诊断价值, AUC 值均 >0.5 , 预测结果具有一定的准确性(补充图 2)。以上结果表明, ANGPT1 与 TEK 高表达的 RCC 和 STAD 患者预后较差, 低表达则均加速了 READ 患者死亡的进程。

2.3 基因表达与 TMB、MSI 和 ICP 的相关性

在 ANGPT1 对 TMB 的影响的分析中(图3A), ANGPT1 在 15 种肿瘤中与 TMB 显著相关, 其中在 3 种肿瘤中显著正相关, 如: GBMLGG、BLCA ($P < 0.05$), 在 12 种肿瘤中显著负相关, 如: LUAD、COADREAD、ESCA 等($P < 0.05$); MSI(图3B)在 10 种肿瘤中显著相关, 其中在 2 种肿瘤中显著正相关, 如: TGCT、SKCM ($P < 0.05$), 在 9 种肿瘤中显著负相关, 如: GBMLGG、LUAD、STES、STAD、PRAD、HNSC、LUSC、DLBC ($P < 0.05$); ICP 分析(图3C)得到ANGPT1 与泛癌中的大多数免疫检查点呈正相关。TEK 对 TMB 影响的分析中(图3D), TEK 在 20 种肿瘤中与 TMB 显著

相关, 其中, 在 THYM ($P < 0.01$)中呈显著正相关, 在 19 种肿瘤中显著负相关, 如: GBMLGG、CESC、LUAD 等($P < 0.05$); TEK 与 MSI(图3E)在 13 种肿瘤中显著相关, 其中, 在 GBMLGG ($P < 0.01$)中显著正相关, 在 12 种肿瘤中显著负相关, 如: BRCA、STES、KIPAN 等($P < 0.05$); ICP 分析(图3F)得到TEK 与泛癌中的大多数免疫检查点呈正相关。

2.4 ANGPT1 和 TEK 表达与泛癌免疫浸润相关性及其免疫浸润细胞亚型分析

本团队分析了在不同类型的恶性肿瘤中, ANGPT1 和 TEK 的表达水平对其免疫浸润的影响。在 26 种癌症中, ANGPT1 与 22 种肿瘤微环境中的免疫浸润呈显著正相关($P < 0.05$), 与 4 种肿瘤呈显著负相关($P < 0.05$)(补充图 3A)。在 31 种癌症中, TEK 与 26 种肿瘤微环境中的免疫浸润呈显著正相关, 与 5 种肿瘤呈显著负相关(补充图 3B)。此外, 分析了在不同类型的恶性肿瘤中, ANGPT1 和 TEK 的表达水平对其免疫浸润细胞亚型的影响。ANGPT1(图4A)与TEK(图4B)在大多数恶性肿瘤中的表达与不同免疫细胞的浸润有统计学意义($P < 0.05$)。其中, 中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞在癌症中的浸润程度均与 ANGPT1 和 TEK 的表达呈正相关, 而 CD4T 细胞在癌症中的浸润程度均与 ANGPT1 和 TEK 的表达呈负相关。此外, 在与 ANGPT1 和 TEK 表达成正相关的癌症中, ANGPT1 和 TEK 的表达使 CD4 T 细胞、巨噬细胞在 COAD 中浸润程度升高, CD8 T 细胞在 PAAD 中的浸润度升高, 中性粒细胞在 DLBC 中浸润度升高; 在与 ANGPT1 和 TEK 表达成负相关的癌症中, 以 CD4 T 细胞浸润相关性最显著, 但肿瘤类型各不相同。

2.5 ANGPT1 和 TEK 相关基因蛋白相互作用网络与富集通路分析

通过 TIMER 数据库分析 ANGPT1 对 TEK 表达量的影响, 本团队发现 ANGPT1 的表达水平与 TEK 的表达量呈负相关(图5A)。通过 STRING 数据库检索得到的 59 个与 ANGPT1 和 TEK 相关的基因, 构建了包含 59 个节点, 332 条边的蛋白相互作用网络(图5B)。通过 Cytoscape 软件将网络可视化, 并利用 CytoCNA 插件进一步进行网络拓扑分析。GRB2、PIK3R1、EGFR 与 ANGPT1 和 TEK 的关系最密切。在通路富集分析中, GO 分析得到 270 个生物过程(BP)富集分析条目、49 个细胞组分(CC)富集分析条目和 64 个分子功能(MF)富集分析条目, 取各条目得分前 10 的条目为主要分

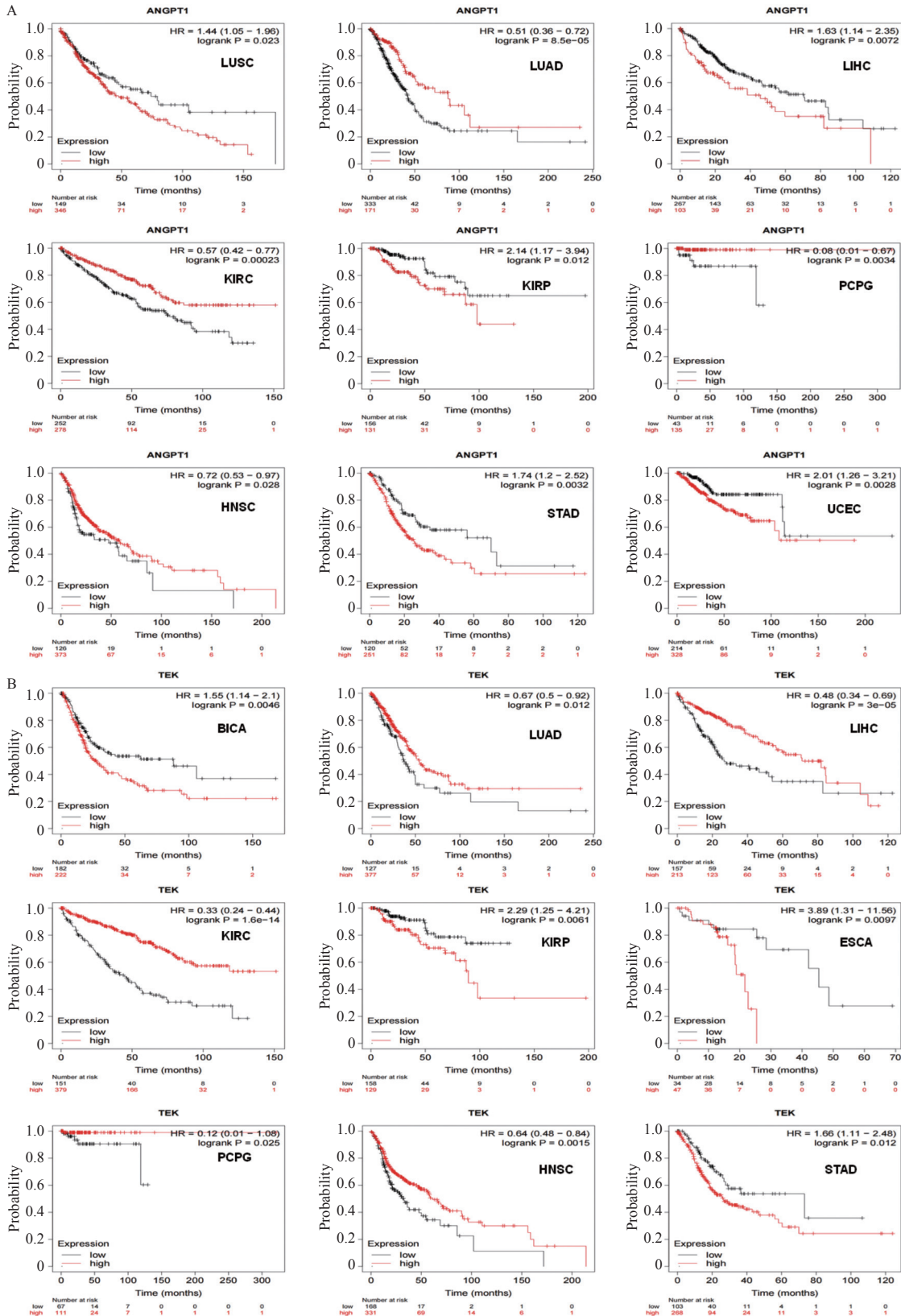


图 2 通过 Kaplan-Meier plotter 数据库分析 ANGPT1、TEK 表达在不同癌症中的预后价值

Fig. 2 Analysis of the prognostic value of ANGPT1 and TEK expression in different cancers by Kaplan-Meier plotter database

A: 基于 OS(总生存期)结果分析ANGPT1 表达在不同肿瘤中的预后影响($P < 0.05$); B: 基于 OS(总生存期)结果分析TEK 表达在不同肿瘤中的预后影响, * $P < 0.05$ 。

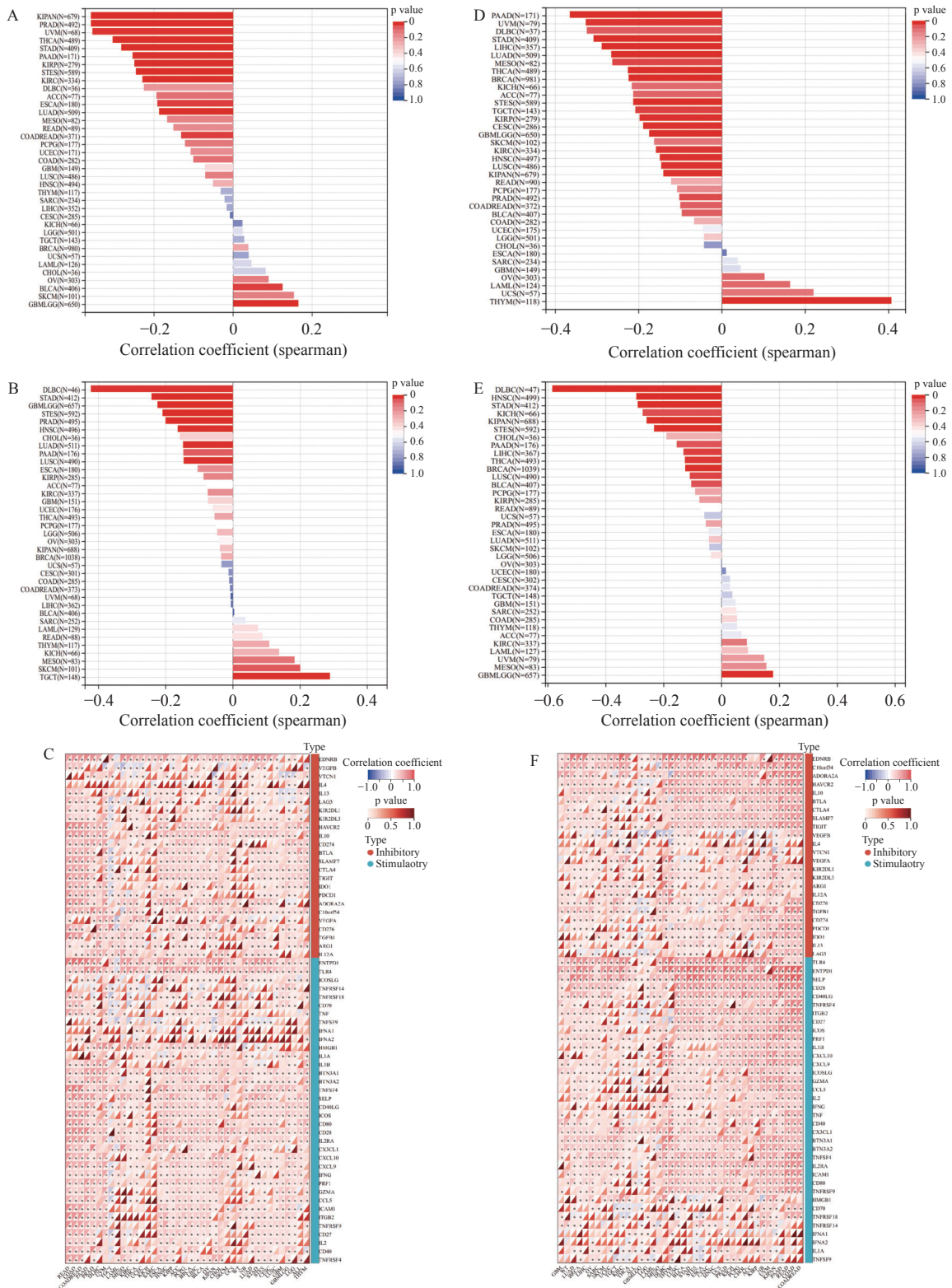


图 3 ANGPT1 和 TEK 在不同癌症类型中的基因免疫分析

Fig. 3 Gene immunoassays of ANGPT1 and TEK in different cancer types

A: ANGPT1 表达水平与不同癌症类型的 TMB(Tumor mutation burden)的相关性; B: ANGPT1 表达水平与不同癌症类型的 MSI(Microsatellite instability)评分的相关性; C: ANGPT1 表达水平与不同癌症类型的免疫检查点的相关性; D: TEK 表达水平与不同癌症类型的 TMB(Tumor mutation burden)的相关性; E: TEK 表达水平与不同癌症类型的 MSI(Microsatellite instability)评分的相关性; F: TEK 表达水平与不同癌症类型的免疫检查点的相关性。

析对象, 各条目结果用弦图表示(图5C-E)。由各条目可知, ANGPT1 和 TEK 可能在辅助性 T 细胞

渗出、血小板衍生生长因子受体- α 信号通路的调控、Grb-EGFR 复合物、ErbB-3 类受体结合等

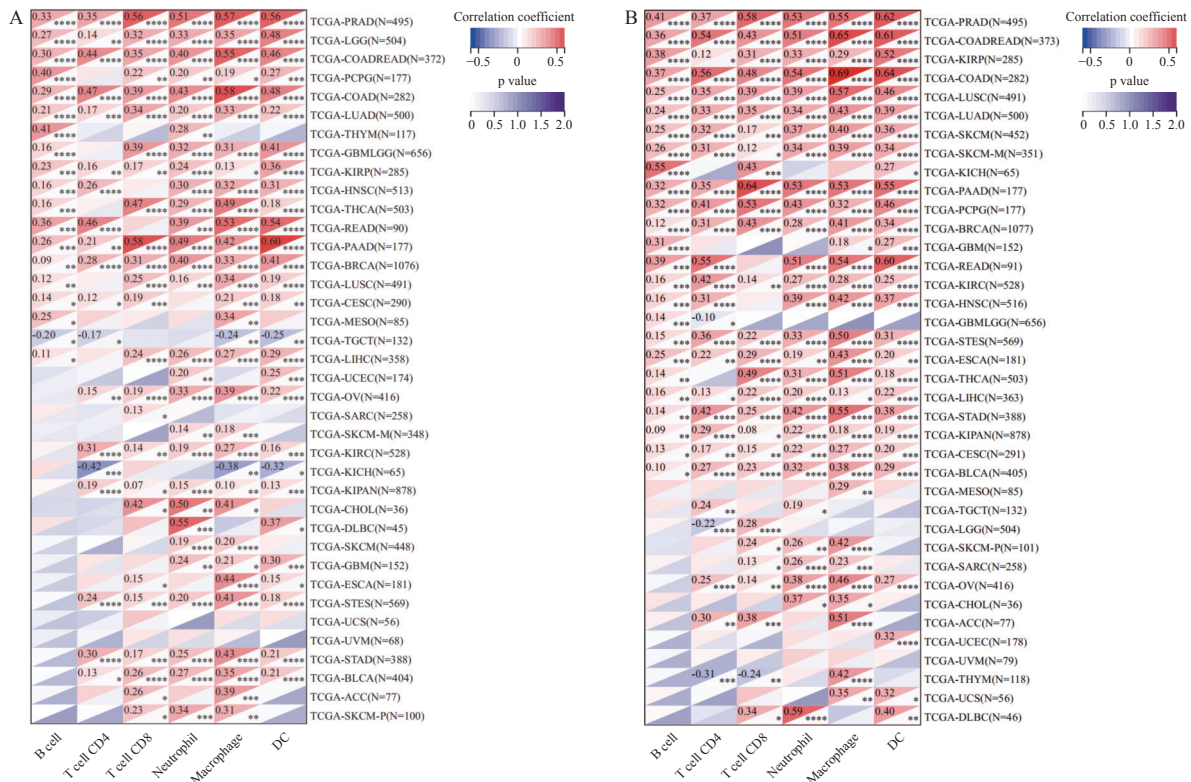


图 4 在不同癌症类型中 ANGPT1 和 TEK 的表达水平与免疫浸润细胞亚型的相关性分析 (其中 x 轴为不同免疫细胞亚型, y 轴为不同癌症类型, 红色表示癌症和免疫细胞亚型之间的正相关。蓝色表示负相关。颜色越深, 相关性越大。相关系数和 P 值显示在每个单元格中)

Fig. 4 Correlation analysis of ANGPT1 and TEK expression levels with immune-infiltrating cell subtypes in different cancer types (The x-axis is for different immune cell subtypes, the y-axis is for different cancer types, and red indicates a positive correlation between cancer and immune cell subtype. Blue indicates a negative correlation. The darker the color, the greater the relevance. The correlation coefficient and P-value are displayed in each cell)

A: 在不同癌症类型中 ANGPT1 表达水平与免疫浸润细胞亚型的相关性; B: 在不同癌症类型中 TEK 表达水平与免疫浸润细胞亚型的相关性, * $P < 0.05$ 。

方面发挥重要作用。KEGG 通路富集分析(图 5F)共得到 115 个条目, 主要涉及 ErbB、Ras、Rap1、磷脂酶 D 信号通路和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等。

3 讨论

3.1 ANGPT1-TEK 信号对血管重塑发挥重要作用

血管重塑是许多疾病的一种重要病理特征^[16], 与肿瘤生长、侵袭、转移密切相关。肿瘤血管重塑主要与肿瘤细胞和间质细胞分泌促血管生成因子增加有关。其中 ANGPT-TEK 受体信号控制周细胞覆盖率, 是除 VEGF 外血管稳定和重塑的关键调节信号。生理状态下周细胞源性 ANGPT1 是内皮细胞受体 Tie2 最主要的激动剂, 通过旁分泌诱导受体磷酸化^[18]。值得注意的是, ANGPT 2

与 ANGPT1 同源且与 TEK 受体有同样高的亲和力, 但其功能却大不相同。目前认为 ANGPT2 竞争性抑制 ANGPT1, 阻断 TEK 受体磷酸化, 使内皮细胞处于激活状态^[16-17]。近年的研究表明, 促血管生成素及 TEK 受体是新发现的在机体的生理、病理性血管形成中发挥调节作用的重要信息途径, 尤其在调节肿瘤血管新生过程中起着复杂而重要的作用。但目前对 ANGPT1、TEK 在泛癌中的表达尚无系统文献报道, 因此本团队通过联合多个在线数据库, 首次从整体角度分析 ANGPT1 和 TEK 在转录、蛋白水平的表达、预后价值、基因改变、免疫浸润及参与的相关细胞通路, 探讨 ANGPT1 和 TEK 在不同肿瘤发病或临床预后中的潜在分子机制, 从而为肿瘤的治疗提供新方向。

3.2 ANGPT1 和 TEK 在 34 种肿瘤中的转录、蛋白表达及相关预后分析

ANGPT 和 TEK 在调节肿瘤血管结构中起显

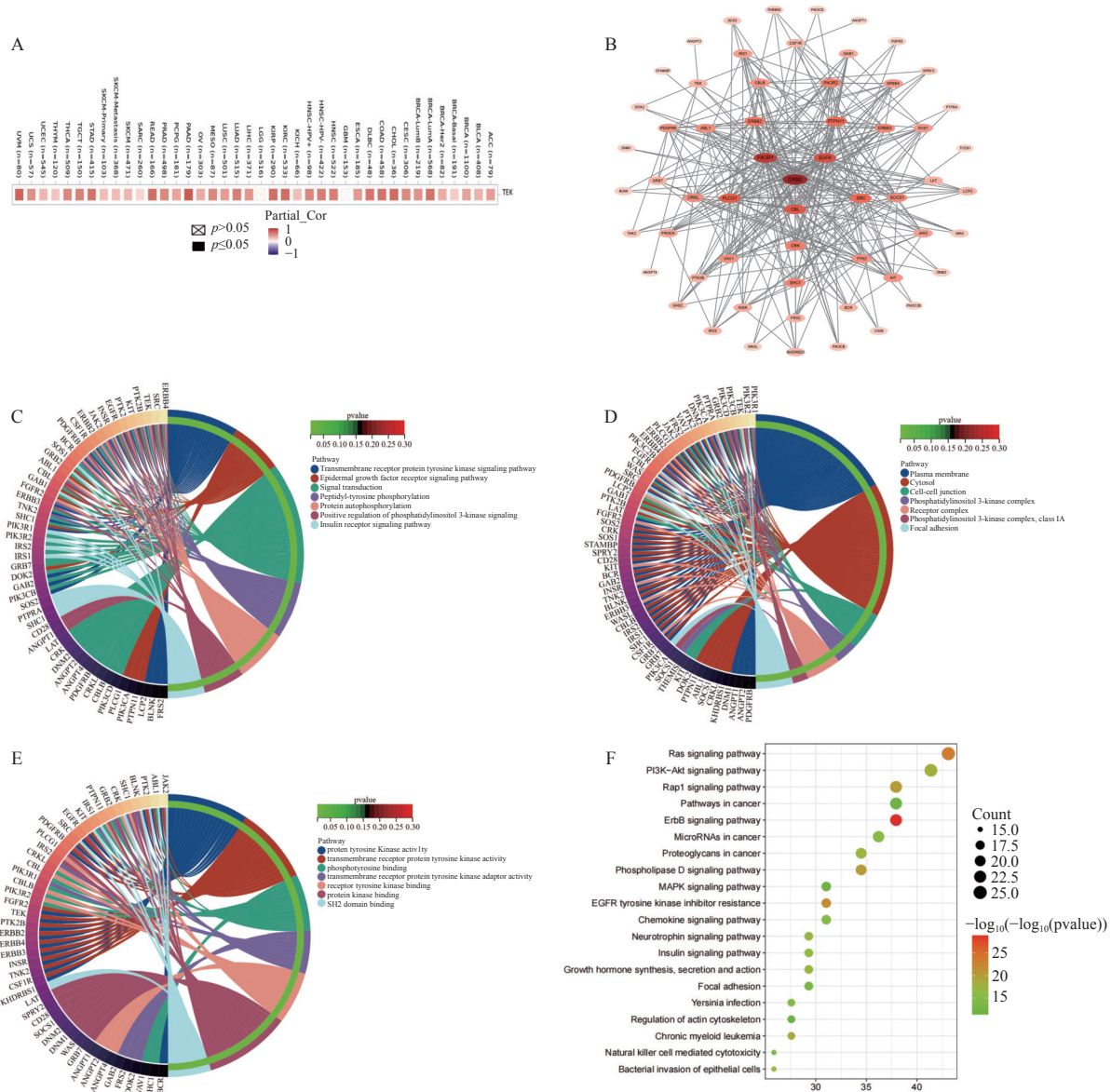


图 5 ANGPT1 和 TEK 相关基因蛋白相互作用网络与富集通路分析

Fig. 5 Analysis of protein interaction network and enrichment pathway of ANGPT1 and TEK-related genes

A: 通过 TIMER 数据库分析在不同癌症类型中 ANGPT1 对 TEK 表达量的影响; B: 59 个相关基因的蛋白质相互作用网络。通过 STRING 数据库检索得到的 59 个与 ANGPT1 和 TEK 相关的基因, 利用 Cytoscape 软件将网络可视化, 颜色节点代表已识别的蛋白质, 从内到外, 节点面积大小和颜色深浅程度代表节点的重要性强弱; C: ANGPT1 和 TEK 相关基因 GO 分析的生物过程 (BP) 富集分析条目; D: ANGPT1 和 TEK 相关基因 GO 分析的细胞组分 (CC) 富集分析条目; E: ANGPT1 和 TEK 相关基因 GO 分析的分子功能 (MF) 富集分析条目; F: ANGPT1 和 TEK 相关基因 KEGG 通路富集分析条目, $*P < 0.05$ 。

著作用, 特别对周围新生血管区的调节。研究表明, ANGPT1 在乳腺癌^[19]中呈低表达, 在肝癌^[20]中表达无明显变化, 而在膀胱癌^[21]等肿瘤组织中呈现高表达。TEK 在肿瘤组织如乳腺癌^[22]、透明细胞肾细胞癌^[23]、胃癌^[24]、甲状腺癌^[23]中均有表达。本课题组利用 TIMER 和 UALCAN 数据库分析了 ANGPT1 和 TEK 转录和蛋白表达水平。本结果发现: ANGPT1 在 BLCA、BRCA、COAD 等 14 种癌症中低表达, 在 3 种癌症 (KICH、LIHC、

GBM) 中高表达; TEK 在 BLCA、BRCA、COAD 等 16 种癌症中低表达。上述分析结果提示, 由于肿瘤微环境的不同, 其在不同类型肿瘤中的表达存在差异。Nong^[23]报道在子宫内膜癌中 ANGPT1 表达下调, Katoh^[25]证实 TEK 在子宫内膜癌中呈低表达, 上述结果与本研究分析结果一致。在癌组织中, ANGPT1 来源于癌细胞和周围新生血管的分泌, 由于癌组织的新生血管缺乏周细胞覆盖, 因此周细胞源性的 ANGPT1 减少。TEK 表达于多

种细胞中,包括内皮细胞、造血干细胞和多数肿瘤细胞中,与受体 ANGPT1 结合后可抑制血管异常增生进而抑制肿瘤的生长,并可提高对肿瘤治疗的敏感度^[26]。笔者还发现 TEK 在 PAAD 癌组织中的转录和蛋白表达情况并不一致。导致此现象的原因可能是, mRNA 表达水平只能决定 30–85% 的蛋白表达,另外 15–70% 可以由转录后调解、翻译后调解以及抽样误差来解释。

本团队发现与预后具有统计学意义的有 21 种肿瘤。研究发现^[20],患者血清 ANGPT1/ANGPT2 与鼻咽癌分级和分期相关;ANGPT1 在肺癌患者血清中低表达^[27],ANGPT2 和 VEGF 在肺癌患者血清中的表达升高^[28],II 期肺癌患者的血清中 ANGPT2 的表达要高于 I 期患者。本团队分析了 ANGPT1 和 TEK 的表达水平与肿瘤分期之间的关系,发现 KIRC 中 ANGPT1 的表达与肿瘤分期相关,而在其他肿瘤中未发现相关性,同时发现 BLCA、BRCA、KICH、READ、SKCM、STAD 和 THCA 中 TEK 的表达与肿瘤分期相关,与其他肿瘤分期无关。以上结果提示,随着肿瘤的恶化进展,ANGPT2 表达量逐步增多,提示 ANGPT2 具有促癌作用。程阳^[14]等研究表明 ANGPT2 在肝癌组织中大量表达,且表达量同肝癌病理分级成正相关,随着病理分级的进展,ANGPT2 表达量也逐渐增高。以往研究表明,随着肿瘤分级越来越严重,ANGPT1/ANGPT2 倒置。随后,笔者进一步对 OS 和 PFS 分析,结果提示 ANGPT1 高表达与 LUSC、LIHC、KIRC、STAD、UCEC 不良预后和较短的生存时间具有相关性;ANGPT1 低表达与 LUAD、KIRC、PCPG、HNSC 患者的不良预后和较短的生存时间具有相关性,总生存期和无复发生存期分析结果高度一致。相同地,TEK 高表达与 BICA、KIRC、ESCA、STAD 患者预后不良高度相关,TEK 低表达与 LUAD、LIHC、KIRC、PCPG、HNSC 患者预后不良高度相关。以上结果提示,在部分肿瘤中,随着肿瘤恶性程度加重,ANGPT1/ANGPT2 比例倒置,且 ANGPT1 表达增高是肿瘤预后良好的保护因素。

3.3 在 34 种肿瘤中 ANGPT1 和 TEK 与免疫、免疫浸润及细胞亚型的分析

笔者首次分析了 ANGPT1 和 TEK 的表达与 TMB、MSI、ICP 之间的关系,结果表明 ANGPT1 和 TEK 与 TMB、MSI 在大多数肿瘤中呈显著负相关,与 ICP 在泛癌中呈正相关。为探明 ANGPT1 和 TEK 与泛癌的免疫浸润及浸润细胞亚型的相关性,笔者通过在线平台进行相关分析,得到

ANGPT1 和 TEK 的表达与大多数肿瘤的免疫浸润呈正相关。ANGPT1 和 TEK 的表达使 CD4 T 细胞、巨噬细胞在 COAD 中浸润程度升高,且以巨噬细胞浸润为主。Lei Zhang^[29]等研究表明,特定巨噬细胞为肿瘤微环境中细胞串扰的关键介质,Li^[30]等人发现灵芝多糖可通过下调 IL-1 β 、iNOS 和 COX-2 表达从而抑制巨噬细胞浸润,说明结肠腺癌肿瘤微环境中 IL-1 β 、iNOS 和 COX-2 的高表达可募集巨噬细胞浸润其中,发挥促癌作用。中性粒细胞是最丰富的粒细胞类型,是宿主对不同病原体反应的基本组成部分。笔者的分析结果表明,中性粒细胞在 DLBC 中浸润度升高。Li 等^[17]的研究表明,中性粒细胞细胞外陷阱(NET)通过唤醒休眠癌细胞、捕获循环肿瘤细胞、覆盖和屏蔽癌细胞、从而防止 CD8 T 细胞和 NK 细胞介导的细胞毒性,进而促进肿瘤生长和转移形成。NET 的形成最主要是通过高度纯化的中性粒细胞产生和释放预先形成的 VEGF-A、ANGPT1、VEGF-B 实现,因此,ANGPT1 可促进 NET 的释放,从而在体内外发挥促血管生成作用。此外,笔者的分析结果表明,ANGPT1 高表达使 B 细胞在 THYM 中浸润程度升高,而 TEK 高表达使 B 细胞在 KICH 中浸润程度最高。这些结果表明,ANGPT1 和 TEK 可能对肿瘤微环境中免疫细胞的调控发挥重要作用。

3.4 ANGPT1 和 TEK 的相互作用蛋白及通路富集分析

笔者发现 ANGPT1 的表达水平与 TEK 的表达量呈负相关,通过蛋白相互作用网络分析得到 59 个相关蛋白与 ANGPT1 和 TEK 存在相互作用,其中 GRB2、PIK3R1、EGFR 与 ANGPT1 和 TEK 作用最为密切,GO 富集分析进一步表明,大多数基因主要参与了与 Grb2-EGFR 复合物、ERBB3:ERBB2 复合物、Shc-EGFR 复合物相关的一系列生物学过程和功能。KEGG 通路富集分析表明主要涉及 ErbB 信号通路。ERBB 家族包括 ERBB1–4 四个受体,即 EGFR、HER2、HER3 和 HER4。这四个受体可以形成同源或异源二聚体,受体与配体结合后激活下游信号,下游信号通路相互联系和重叠。其中,PI3K-AKT 和 MAPK 通路是比较重要的信号通路,ANGPT1 磷酸化 TIE2 受体导致 PI3K/AKT 活化,这导致转录因子 FOXO1 的磷酸化(失活)而使血管稳定。ANGPT2 是 TIE2 受体的拮抗剂,可使 PI3K/AKT 失活并阻止 FOXO1 磷酸化,诱导 BEC 释放 ANGPT2。在病理条件下,例如癌症中,ANGPT2 与 ANGPT1 竞争性结合

TIE2 受体, 引起的 AKT 磷酸化导致 Foxo1 的激活和 ANGPT2 的表达^[17]。此外, EGFR 信号通过 PI3K-Akt 信号与干扰素调节因子 IRF1 共同下调趋化因子配体 CXCL10, 导致效应 CD8+ T 细胞减少, 从而促进肿瘤的生长与转移^[26]。

3.5 宫颈癌中 ANGPT1 和 TEK 的表达、预后、免疫分析

本课题组长期致力于宫颈癌的研究, 在此对宫颈癌的相关结果进行简要分析。ANGPT1 与 TEK 启动子的甲基化水平在宫颈癌中的水平较高, 使 ANGPT1 与 TEK 在宫颈癌中无论是转录组水平还是蛋白表达水平均有所降低 ($P < 0.05$); 在预后方面, 无复发生存期中, ANGPT1 与 TEK 高表达的宫颈癌患者比低表达的患者预后更差; 在免疫方面, TEK 的肿瘤突变负荷与宫颈癌呈负相关; 此外, ANGPT1 表达与 CD8+ T 细胞和巨噬细胞浸润呈显著正相关, TEK 表达与巨噬细胞浸润程度呈显著正相关, 其次与中性粒细胞和树突状细胞浸润程度正相关。

综上所述, 本研究发现 ANGPT1 与 TEK 在大多数肿瘤中呈低表达, 并且在生存预后、免疫浸润及浸润细胞亚型等方面来探究 ANGPT1 与 TEK 在泛癌中作用。最后, GRB2、PIK3R1、EGFR 等基因与 ANGPT1 和 TEK 密切相关, 可能通过 ErbB 信号通路在肿瘤发生发展中起着重要作用, 有望成为多种类型癌症的潜在临床预后标志物。不足的是, 本研究主要通过数据挖掘、R 软件及在线平台进行了 ANGPT1 和 TEK 对泛癌进展影响的探究, 且由于部分数据库中缺乏有些肿瘤数据, 而使这些肿瘤无法得到分析。后续, 本团队将通过实验验证 ANGPT1 和 TEK 在宫颈癌中的表达、生存预后、免疫浸润及作用通路的情况, 以探明其在宫颈癌肿瘤血管形成中的具体作用及机制。

[参考文献]

- [1] Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide[J]. *Cancer-Am Cancer Soc*, 2021, 127(16): 3029-3030.
- [2] 林国享, 朱小东. 肿瘤血管生成的促进因素及其在肿瘤发生发展中的作用研究进展 [J]. *广西医学*, 2020, 42(3): 334-337.
- [3] Chen W Z, Jiang J X, Yu X Y, et al. Endothelial cells in colorectal cancer[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2019, 11(11): 946-956.
- [4] Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: Causes, consequences, challenges and opportunities[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(9): 1745-1770.
- [5] Omiyale A O. Primary vascular tumours of the kidney[J]. *World J Clin Oncol*, 2021, 12(12): 1157-1168.
- [6] 何丹华, 陈知英, 陈国菊. 婴幼儿血管瘤异常表达基因分析 [J]. *现代医药卫生*, 2023, 39(2): 199-203.
- [7] Li Y Y, Liu P, Zhou Y L, et al. Activation of angiopoietin-Tie₂ signaling protects the kidney from ischemic injury by modulation of endothelial-specific pathways[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2023, 34(6): 969-987.
- [8] 徐文婵, 刘珍银, 陈钦谕, 等. Tie2 突变与儿童静脉畸形相关性研究 [J]. *中华介入放射学电子杂志*, 2021, 9(4): 415-418.
- [9] Cam M, Charan M, Welker A M, et al. ΔNp73/ETS2 complex drives glioblastoma pathogenesis- targeting downstream mediators by rebastinib prolongs survival in preclinical models of glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(3): 345-356.
- [10] Liu W X, Gu S Z, Zhang S, et al. Angiopoietin and vascular endothelial growth factor expression in colorectal disease models[J]. *World J Gastroentero*, 2015, 21(9): 2645-2650.
- [11] Zhou M, Wang B, Li H, et al. RNA-binding protein SAMD4A inhibits breast tumor angiogenesis by modulating the balance of angiogenesis program[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(9): 3835-3845.
- [12] Wu F T, Lee C R, Bogdanovic E, et al. Vasculotide reduces endothelial permeability and tumor cell extravasation in the absence of binding to or agonistic activation of Tie2[J]. *Embo Mol Med*, 2015, 7(6): 770-787.
- [13] Qin S, Yi M, Jiao D C, et al. Distinct Roles of VEGFA and ANGPT2 in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2020, 11(1): 153-167.
- [14] 程阳, 王一喆, 金悦, 等. ANGPT1 基因在肺腺癌组织中的表达及其预后价值分析 [J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(4): 587-591.
- [15] Xue R, Sheng Y, Duan X, et al. Tie2-expressing monocytes as a novel angiogenesis-related cellular biomarker for non-small cell lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(6): 1519-1528.

- [16] Cai Z, Gong Z, Li Z, et al. Vascular extracellular matrix remodeling and hypertension[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 34(10): 765–783.
- [17] Li Y, Chen D, Sun L, et al. Induced expression of VEGFC, ANGPT, and EFNB2 and their receptors characterizes neovascularization in proliferative diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(13): 4084–4096.
- [18] Li Y, Liu P, Zhou Y, et al. Activation of angiotensin-Tie₂ signaling protects the kidney from ischemic injury by modulation of endothelial-specific pathways[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2023, 34(6): 969–987.
- [19] Staton C A, Hoh L, Baldwin A, et al. Angiotensin 1 and 2 and Tie-2 receptor expression in human ductal breast disease[J]. *Histopathology*, 2011, 59(2): 256–263.
- [20] Güveli M E, Duranyildiz D, Karadeniz A, et al. Circulating serum levels of angiotensin-1 and angiotensin-2 in nasopharynx and larynx carcinoma patients[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(7): 8979–8983.
- [21] Wen J, Li H Z, Ji Z G, et al. Expressions of receptor tyrosine kinases mRNA and protein in carcinoma of bladder[J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2011, 33(4): 393–396.
- [22] Yang F, Hu Y, Shao L, et al. SIRT7 interacts with TEK (TIE2) to promote adriamycin induced metastasis in breast cancer[J]. *Cell Oncol*, 2021, 44(6): 1405–1424.
- [23] Ha M, Son Y R, Kim J, et al. TEK is a novel prognostic marker for clear cell renal cell carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2019, 23(4): 1451–1458.
- [24] Zhou S J, Xu B, Qi L, et al. Next-generation sequencing reveals mutational accordance between cell-free DNA from plasma, malignant pleural effusion and ascites and directs targeted therapy in a gastric cancer patient[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(1): 15–20.
- [25] Nong B, Su T, Jin M, et al. Immune-related gene ANGPT1 is an adverse biomarker for endometrial carcinoma[J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(6): 2962–2976.
- [26] Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on Angiotensin family members[J]. *Int J Mol Med*, 2006, 17(6): 1145–1149.
- [27] Yao S, Dong S S, Ding J M, et al. Sex-specific SNP-SNP interaction analyses within topologically associated domains reveals ANGPT1 as a novel tumor suppressor gene for lung cancer[J]. *Gene Chromosome Canc*, 2020, 59(1): 13–22.
- [28] Di Tacchio M, Macas J, Weissenberger J, et al. Tumor Vessel Normalization, Immunostimulatory Reprogramming, and Improved Survival in Glioblastoma with Combined Inhibition of PD-1, Angiotensin-2, and VEGF[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(12): 1910–1927.
- [29] Zhang L, Li Z Y, Skrzypczynska K M, et al. Single-cell analyses inform mechanisms of myeloid-targeted therapies in colon cancer[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 442–459.
- [30] Li G L, Tang J F, Tan W L, et al. The anti-hepatocellular carcinoma effects of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by regulating macrophage polarization via the MAPK/NF- κ B signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2023, 14(7): 3155–3168.