

生物信息学分析髓系细胞触发受体-2 对低级别胶质瘤的影响

杨绪东, 陶瑞明

[沧州市第四医院(南皮县人民医院) 神经内科, 河北 沧州 061500]

摘要: **目的** 通过生物信息学手段探究髓系细胞触发受体-2 (TREM-2) 在低级别胶质瘤 (LGG) 中的表达情况以及对患者生存率的影响, 为 LGG 的早期发现、早期诊断及治疗提供潜在的靶点。**方法** 运用在线网站 GEPIA2 和 UALCAN 分析 TREM-2 在 LGG 肿瘤组织和正常组织中的表达差异; 与年龄、性别、种族、肿瘤分级等临床病理特征之间的关系; 以及 TREM-2 的 LGG 肿瘤组织中的异常表达对 LGG 患者总体生存率的影响。DAVID 6.8 软件对 TREM-2 相关基因进行 KEGG 通路富集分析; 使用 TIMER 数据库分析 TREM-2 表达与肿瘤纯度和免疫细胞浸润程度之间的相关性。**结果** 与正常组织相比, TREM-2 在 LGG 肿瘤组织中的表达较正常组明显升高 ($P<0.05$), 并且与肿瘤分级和组织学分型相关 ($P<0.001$), 而与患者的年龄、性别及种族不相关 ($P>0.05$), 生存分析表明 TREM-2 与 LGG 预后密切相关, LGG 表达越高, 患者的总体生存率越低 ($P=0.00025$ 和 $P=0.0029$), 同时无病生存率也降低 ($P=0.015$); 通路富集结果表明与 TREM-2 正相关基因通路主要涉及结核、癌症通路、吞噬体等, 负相关基因通路主要涉及 MAPK 信号通路、神经活性配体-受体相互作用等; TREM-2 的表达与肿瘤微环境中 6 种免疫细胞的浸润水平呈正相关。**结论** TREM-2 在 LGG 肿瘤组织中表达明显升高, 并且与患者生存率相关, 是 LGG 诊断和治疗的潜在靶点。

关键词: 低级别胶质瘤; 髓系细胞触发受体-2; TCGA; 表达差异; 总体生存率

中图分类号: R739.41

Bioinformatics analysis of the effect of triggering receptor expresses on myeloid cells-2 on low-grade glioma

YANG Xudong, TAO Ruiming

[Department of Neurosurgery, Cangzhou Fourth Hospital (Nanpi County People's Hospital), Cangzhou, Hebei 061500, China]

Abstract: **[Objective]** To explore the expression of triggering receptor expresses on myeloid cells-2 (TREM-2) in low-grade glioma (LGG) and its impact on patient survival by bioinformatics, and to provide potential targets for the early detection, early diagnosis and treatment of LGG. **[Methods]** The online websites GEPIA2 and UALCAN were used to analyze the expression difference of TREM-2 in LGG tumor tissue and normal tissue, the relationship with clinicopathological characteristics such as age, gender, race, tumor grade, and the effects of abnormal expression of TREM-2 in LGG tumor tissue on the overall survival rate in LGG patients. KEGG pathway enrichment analysis of TREM-2-related genes was conducted by DAVID 6.8 software. The correlation between TREM-2 expression and tumor purity and degree of immune cell infiltration was analyzed using the TIMER database. **[Results]** Compared with normal tissues, the expression of TREM-2 in LGG tumor tissues was significantly higher than that in the normal group ($P<0.5$), and it was correlated with tumor grade and histological type ($P<0.001$) and not correlated with the patient's age, gender and race ($P>0.05$). Survival analysis showed that TREM-2 was closely related to the prognosis of LGG. The higher the expression of LGG, the lower the overall survival rate of patients ($P=0.00025$ and $P=0.0029$), and disease free survival rate also decreased ($P=0.015$). Pathway enrichment results showed that the gene pathways positively related to TREM-2 mainly involved tuberculosis, cancer pathway, phagosome, etc., and the negatively related gene pathways mainly involved MAPK signaling pathway, neuroactive ligand-receptor. The expression of TREM-2 was positively correlated with the infiltration level of 6 kinds of immune cells in the tumor microenvironment. **[Conclusion]** The expression of TREM-2 in LGG tumor tissues is significantly

increased, and is related to the survival rate of patients. It is a potential target for the diagnosis and treatment of LGG.

Keywords: low-grade glioma; triggering receptor expresses on myeloid cells-2; TCGA; expression difference; overall survival rate

胶质瘤 (glioma) 是最常见的颅内恶性肿瘤, 根据 2007 年世界卫生组织制定的分类标准, 胶质瘤分为四级: I 级和 II 级胶质瘤被称为低级别胶质瘤 (low-grade glioma, LGG), III 级和 IV 级被称为高级别胶质瘤 (high-grade glioma, HGG) [1-2]。其中 LGG 占胶质瘤总发病率的 15%~25%, 主要包括星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤及少突胶质星形细胞瘤 [3]。LGG 的临床表现不明显, 54% 的患者出现头痛, 26% 的患者出现癫痫发作, 还有很多患者没有临床表现, 所以 LGG 的早期发现及诊断仍没有较好的方法。此外, 与 HGG 相比, LGG 生长缓慢, 生存期较长, 但是如果不及时诊断及治疗, 所有 LGG 最终都会进展为 HGG, 导致患者生存率降低甚至死亡 [4]。因此, 寻找 LGG 发生发展的相关标志物, 对于 LGG 的早期发现, 早期诊断及治疗具有重要意义。髓系细胞触发受体-2 (triggering receptor expresses on myeloid cells-2, TREM-2) 属于免疫球蛋白 (Ig) 跨膜受体超家族成员, 是树突状细胞和巨噬细胞等髓样细胞的膜表面受体, 主要通过与其接头蛋白 DAP-12 结合来向细胞内传递信号 [5]。TREM-2 与炎症反应密切相关。TREM-2 能抑制巨噬细胞活化, 抑制白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等促炎因子的释放, 从而发挥抑制炎症的作用 [6]。活化的巨噬细胞分为 M1 型和 M2 型, 前者发挥促炎作用, 后者具有抑制炎症作用, TREM-2 在 M2 型巨噬细胞膜上的表达增强, 也提示其能下调巨噬细胞等抗原提呈细胞的功能及炎症因子的释放 [7]。近年来, TREM-2 的免疫识别功能在肿瘤中的作用引起越来越多的关注。TREM-2 在肺癌 [8]、肝癌 [9-10]、结直肠癌 [11] 及黑色素瘤 [12] 的发生发展中发挥重要调控作用, 但是 TREM-2 在 LGG 发生发展过程中的作用研究较少。为进一步明确 TREM-2 在 LGG 肿瘤组织中的表达情况以及对恶性表型形成的机制, 本研究以 TCGA 数据库为基础, 分析 TREM-2 在 LGG 中的表达情况以及对患者总体生存率的影响, 以期对 LGG 的早期发现、早期诊断及治疗提供潜在的生物标志物。

1 资料与方法

1.1 TREM-2 基因在人 LGG 肿瘤组织和正常组织中的表达差异

运用在线分析软件 GRPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) 对 TCGA 数据库中提供的 LGG 患者临床数据进行分析, 分析 TREM-2 在 LGG 肿瘤组织和正常组织中的表达差异。具体操作步骤为: 在 GRPIA2 在线网站中选择 “Expression Analysis” 模块下的 “Expression DIY” 进行分析。顶部选择箱式图 “Box Plot” 后, 输入 “TREM2” 基因, 肿瘤类型选择 “LGG”, 差异阈值等其他参数默认, 点击 “Plot” 得到 TREM-2 在 LGG 肿瘤组织和正常组织表达差异的柱状图。

1.2 TREM-2 表达与 LGG 患者临床病理特征的关系

在 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>) 网站首页顶部点击 “TCGA” 分析模块, 然后选择 “TCGA Gene analysis”, 输入基因名称 “TREM2”, 在 TCGA dataset 处选择肿瘤类型 “Brain lower grade glioma”, 点击 “Explore” 进行分析, 然后在 links for analysis 分析下点击 “Expression”, 得到 TREM2 的表达与 LGG 患者年龄、性别、种族、肿瘤分级、组织学分型等临床病理特征之间的关系。

1.3 TREM-2 表达对 LGG 患者总体生存的影响

采用 UALCAN 和 GEPIA2 两个在线网站分析 TREM-2 的表达异常对 LGG 患者总体生存率及无病生存率的影响。具体分析步骤如下: 同样在 UALCAN 网站 “TCGA Gene analysis” 模块下输入基因名称和肿瘤类型, 点击 “Explore” 进行分析, 然后在 links for analysis 分析下点击 “Survival” 得到生存曲线图; 在 GRPIA2 在线网站中选择 “Expression Analysis” 模块下的 “Survival Analysis” 进行分析, 输入基因名称, 添加癌症类型, 选择 OS (总体生存率) 还是 RFS (无病生存率), 点击 “Plot” 得到最终的生存分析结果。

1.4 与 TREM-2 基因相关的信号通路富集

在 UALCAN 在线分析网站中检索出与 TREM-2

呈正相关和负相关的基因，其中正相关基因的相关系数 (r) 需在 0.3~0.9 之间，负相关基因的相关系数 (r) 需在 -0.6~-0.3 之间。然后分别将符合要求的正相关基因和负相关基因输入 DAVID6.8 在线软件 (<https://david.ncifcrf.gov/>)，对其进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集。

1.5 分析 TREM-2 基因在 LGG 中的免疫浸润水平

在 TIMER (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) 在线数据库中检索 TREM-2 的表达与 LGG 纯度和免疫浸润程度之间的关系。在 TIMER 中，基因表达与肿瘤纯度之间的相关性使用 Pearson 分析来计算，基因表达与 6 种免疫细胞浸润程度之间的关系采用 Spearman 分析，偏相分析方法可以排除肿瘤纯度对分析免疫细胞浸润的影响。

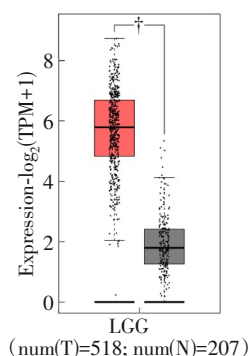
1.6 统计学方法

统计分析采用 SPSS 17.0 软件进行分析，组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 t 检验 (Student's test)， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义；Kaplan-Meier 分析用于患者总体生存率分析；R4.0.5 版软件及 ggplot2 包用于 KEGG 通路富集绘图。

2 结果

2.1 TREM-2 基因在人 LGG 肿瘤组织和正常组织中的表达差异

GEPIA2 在线网站纳入的 LGG 肿瘤患者为 518 例，正常对照 207 例；结果发现与正常对照组相比，TREM-2 在 LGG 肿瘤组织中的表达高于正常组织，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 1。



† $P < 0.05$ 。

图 1 TREM-2 在 LGG 肿瘤组织和正常组织中的表达差异

2.2 TREM-2 的表达与 LGG 患者临床病理特征的关系

TREM-2 的表达水平与 LGG 患者的年龄，性别及种族不相关 ($P > 0.05$)。与患者肿瘤分级 (Grade-2 vs. Grade-3, $P < 0.05$)，组织学分型 (星形细胞瘤 vs. 少突胶质星形细胞瘤 vs. 少突胶质细胞瘤, $P < 0.05$) 相关，见图 2。

2.3 TREM-2 表达对 LGG 患者总体生存率和无病生存率的影响

采用 UALCAN 和 GEPIA2 网站分别分析了 TREM-2 低表达和高表达对 LGG 患者总体生存率的影响。图 3A 是 UALCAN 网站分析结果，包括 LGG 低表达患者 382 例，高表达患者 129 例，分析结果表明 TREM-2 表达越高，LGG 患者的总体生存率越低 ($P = 0.00025$)。图 3B 是 GEPIA2 网站分析结果，纳入 LGG 低表达和高表达患者分别为 257 例，结果同样表明 TREM-2 表达越高，LGG 患者的总体生存率越低 ($P = 0.0029$)。此外，TREM-2 高表达会造成 LGG 患者的无病生存期缩短 ($P = 0.015$) (图 3C)。

2.4 TREM-2 相关基因信号通路富集

采用 UALCAN 在线网站检索与 TREM-2 相关的基因。其中正相关基因 1 585 个，相关系数 (r) 在 0.87~0.3 之间，负相关基因 1 554 个，相关系数 (r) 在 -0.54~-0.3 之间。分别将正相关基因和负相关基因输入 DAVID6.8 在线软件进行 KEGG 通路富集。1 585 个正相关基因共富集在 76 条通路中，其中参与基因数量 ≥ 15 个的信号通路有 60 条，主要涉及结核、癌症通路、吞噬体、HTLV-1 感染、肌动蛋白细胞骨架的调节、破骨细胞分化、Epstein-Barr 病毒感染及单纯疱疹感染等通路 (图 4)。1 554 个负相关基因共富集在 74 条通路中，其中参与基因数量 ≥ 15 个的信号通路有 36 条，主要涉及 MAPK 信号通路、神经活性配体-受体相互作用、谷氨酸能突触及多巴胺能突触等 (图 5)。

2.5 LGG 中 TREM-2 基因的免疫细胞浸润

在 TIMER 在线数据库中分析 LGG 中 TREM-2 表达与肿瘤微环境中 6 种免疫细胞浸润程度之间的相关性。结果表明，TREM-2 的表达与 B 细胞、CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞的浸润呈正相关，见图 6。

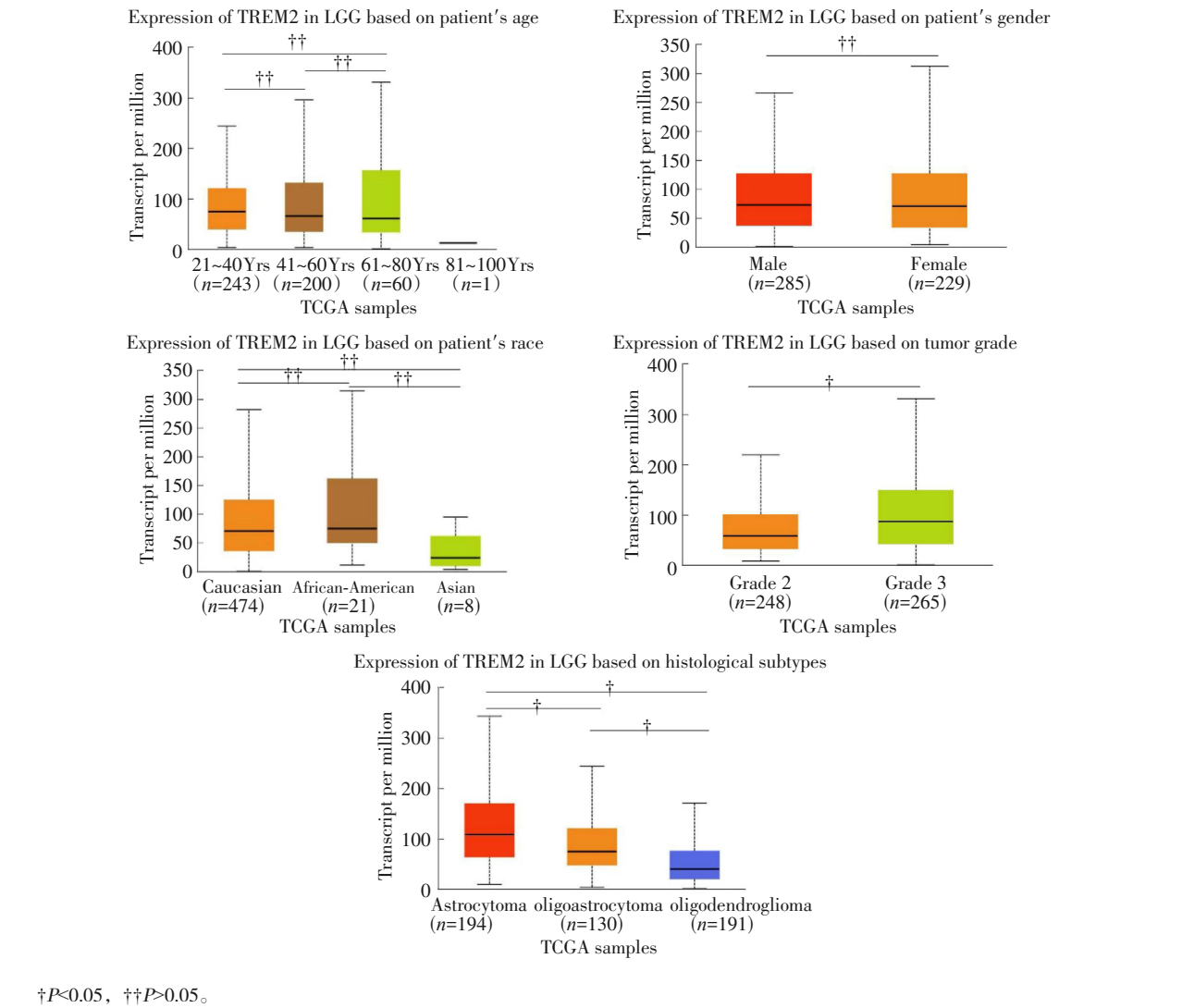
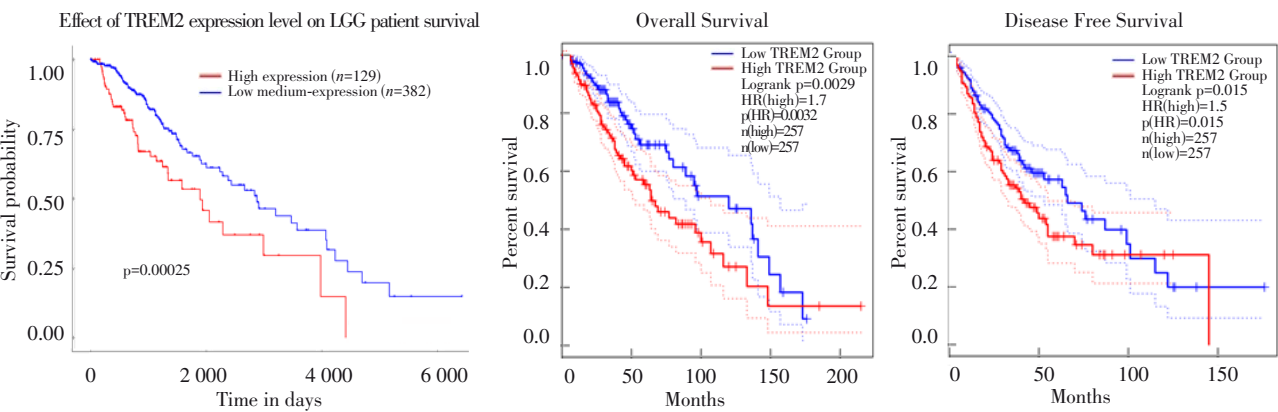


图 2 TREM-2 表达与 LGG 患者临床病理特征的关系



A: UALCAN数据库; B: GEPIA2数据库; C: GEPIA2数据库。

图 3 TREM-2 表达对 LGG 患者总体生存率及无病生存率的影响

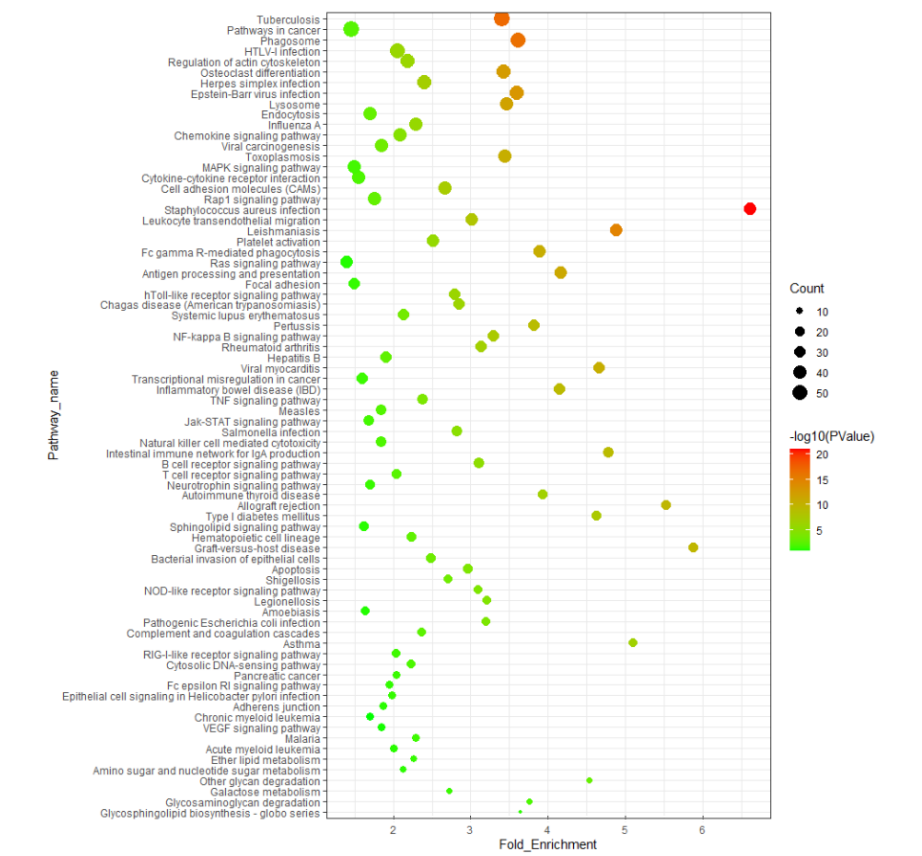


图 4 与 *TREM-2* 正相关基因的 KEGG 通路富集气泡图

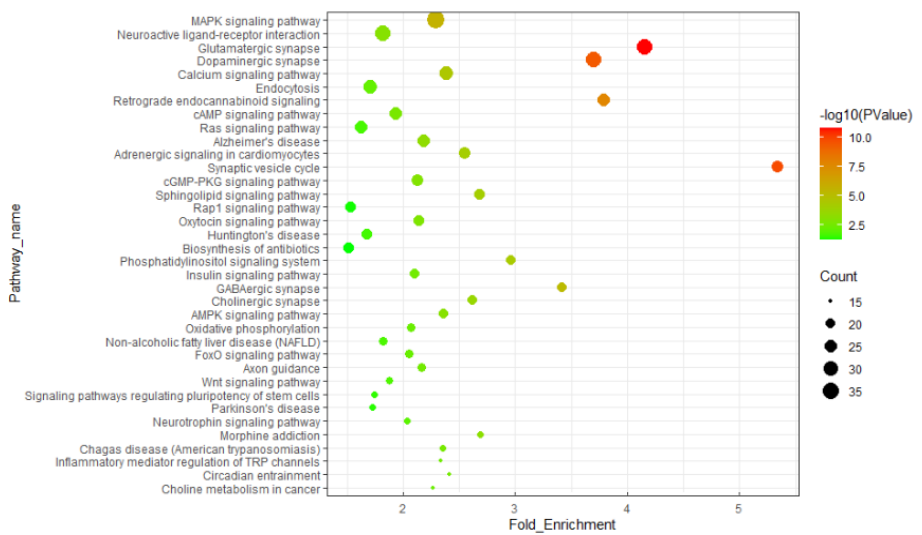


图 5 与 *TREM-2* 负相关基因的 KEGG 通路富集气泡图

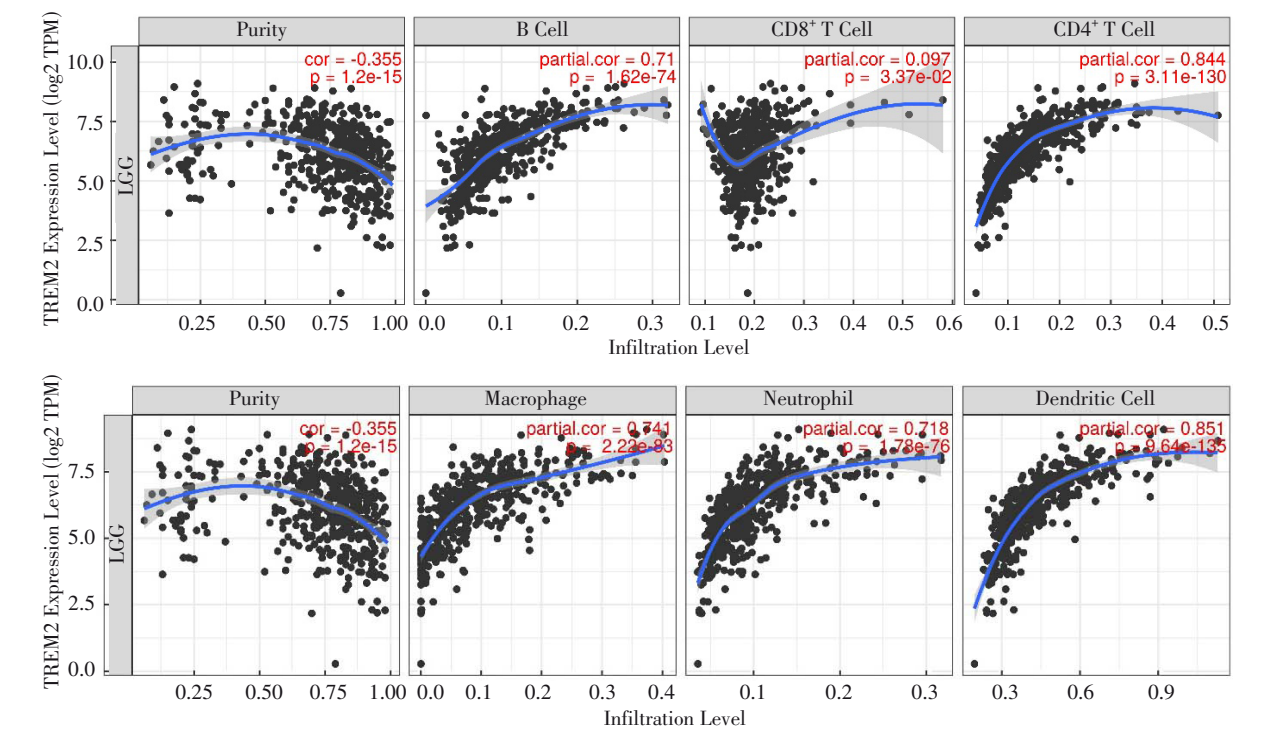


图 6 TREM-2 表达与免疫细胞浸润的相关性分析

3 讨论

TREM-2 编码一种在髓系细胞表面表达的天然免疫受体，能调控巨噬细胞和树突状细胞，进而参与调控机体的免疫反应，在 TLR 配体刺激下可以和接头蛋白 DAP12 耦合，引起下游信号通路的级联反应，负性调控 DC 和巨噬细胞，进而调节炎症反应^[13-15]。由于炎症介质以及免疫炎症级联反应的激活能够诱导细胞 DNA 损伤或者基因突变，导致细胞异常增殖，最终诱发癌变^[16-17]。有研究表明^[8]，在肺癌患者巨噬细胞中，TREM-2 的表达水平明显增加，并且与肺癌的恶性等级呈正相关，且体外实验进一步证明 Leiws 肺癌细胞高转移株 (3LL) 诱导巨噬细胞高表达 TREM-2，同时 3LL 诱导的荷瘤鼠体内 IL-12 分泌减少，IL-10 分泌增加，T 细胞增殖抑制，提示其有促进肺部肿瘤生长的作用。此外，在结直肠癌中，TREM-2 会影响肠道菌群平衡^[18]，有助于结直肠癌的产生。另一方面，敲除 TREM-2 能降低 IL-23，IL-6 等炎症因子的表达，进而影响结直肠癌的进展，表现为肿瘤病灶减小，肿瘤增殖速度减慢、肿瘤分级水平降低等^[11]，提示 TREM-2 可能对结直肠癌的发生发展有促进作用。然而，对于 TREM-2 在 LGG 中的表达情况及在 LGG 发生发展中的作用研究较少。

本研究基于 TCGA 数据库，采用生物信息学

的方法，初步发现 TREM-2 在 LGG 肿瘤组织中的表达是高于正常组织；病例特征分析发现，LGG 与患者肿瘤分级呈正相关，并且还和组织学分型有关，在星形胶质细胞瘤、少突胶质星形细胞瘤及少突胶质细胞瘤中的表达依次降低，差异有统计学意义，而与患者的年龄、性别及种族等不相关。对患者生存分析结果表明，TREM-2 表达越高，LGG 患者的总体生存率和无病生存率越低。TREM-2 的免疫-炎症调节作用可能是其影响 LGG 进展的重要机制之一，研究发现差异表达 TREM-2 与肿瘤微环境中的 B 细胞、CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞等 6 种免疫细胞的浸润程度呈正相关，表明 TREM-2 的表达对 LGG 的免疫微环境具有影响，能够调控肿瘤的免疫微环境。TREM-2 对肿瘤免疫微环境的调节目前已经有相关文献报道。对肿瘤微环境的 scRNA-seq 序列研究表明，TREM-2 在多个髓样细胞亚群中表达，尤其是巨噬细胞亚群，TREM-2 巨噬细胞的富集是肝细胞癌患者不良临床结局的独立指标^[19]。MOLGORA 等^[20]人发现 TREM-2 敲除小鼠对 MCA 诱导的肉瘤、结直肠癌和乳腺肿瘤更具抵抗力，并且证明 PD-1 抗肿瘤免疫治疗对 TREM-2 缺陷小鼠比 WT 荷瘤小鼠更有效。单细胞 RNA 测序分析髓系细胞表明，TREM-2 缺乏和抗

TREM-2 单抗治疗均引发浸润肿瘤的巨噬细胞群显著改变,说明 TREM-2 是人类肿瘤浸润巨噬细胞的标志物,是补充检查点免疫治疗的一个新途径,但是 TREM-2 调控肿瘤免疫微环境的机制还需深入研究。

综上所述, TREM-2 在 LGG 发生发展中可能是一个促癌基因,其对肿瘤的调节作用可能与肿瘤免疫-炎症微环境相关,这为进一步研究 TREM-2 在 LGG 的免疫治疗提供了新的见解和思路,为 LGG 早期诊断、早期治疗提供了潜在靶点。但是,本研究也存在一定局限性,没有在体外进一步研究 TREM-2 对 LGG 增殖、迁移、侵袭等恶性表型及其调控免疫微环境的具体机制,未在动物实验中进一步探究其作用来全面研究 TREM-2 在调控 LGG 中发挥的作用。

参 考 文 献

- [1] LOUIS DN, OHGAKI H, WIESTLER OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 97-109.
- [2] WANG SS, BANDOPADHAYAY P, JENKINS MR. Towards immunotherapy for pediatric brain tumors[J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(8): 748-761.
- [3] MELLAI M, ANNOVAZZI L, BISOGNO I, et al. Chondroitin sulphate proteoglycan 4 (NG2/CSPG4) localization in low- and high-grade gliomas[J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1538.
- [4] HSU JBK, CHANG TH, LEE GA, et al. Identification of potential biomarkers related to glioma survival by gene expression profile analysis[J]. *BMC Med Genomics*, 2019, 11(Suppl 7): 34.
- [5] KONISHI H, KIYAMA H. Non-pathological roles of microglial TREM2/DAP12: TREM2/DAP12 regulates the physiological functions of microglia from development to aging[J]. *Neurochem Int*, 2020, 141: 104878.
- [6] PERUGORRIA MJ, ESPARZA-BAQUER A, OAKLEY F, et al. Non-parenchymal TREM-2 protects the liver from immune-mediated hepatocellular damage[J]. *Gut*, 2019, 68(3): 533-546.
- [7] WYNN TA, CHAWLA A, POLLARD JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.
- [8] YAO YN, LI HQ, CHEN JJ, et al. TREM-2 serves as a negative immune regulator through Syk pathway in an IL-10 dependent manner in lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29620-29634.
- [9] ESPARZA-BAQUER A, LABIANO I, SHARIF O, et al. TREM-2 defends the liver against hepatocellular carcinoma through multifactorial protective mechanisms[J]. *Gut*, 2021, 70(7): 1345-1361.
- [10] TANG WQ, LV B, YANG BW, et al. TREM2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by targeting the PI3K/Akt/ β -catenin pathway[J]. *Oncogenesis*, 2019, 8(2): 9.
- [11] GENUA M, MONICO MC, D'ALESSIO S, et al. 149 intestinal microbiota defined by the absence of the triggering receptor expressed on myeloid cells type-2 (TREM-2) is transmissible and protects from colitis associated cancer[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(5): S-42.
- [12] NGUYEN AH, KOENCK C, QUIRK SK, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells in cutaneous melanoma[J]. *Clin Transl Sci*, 2015, 8(5): 441-444.
- [13] KOBER DL, BRETT TJ. TREM2-ligand interactions in health and disease[J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(11): 1607-1629.
- [14] LEE DS, OH K. Cancer stem cells in the immune microenvironment[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1187: 245-266.
- [15] SHARMA D, KANNEGANTI TD. Inflammatory cell death in intestinal pathologies[J]. *Immunol Rev*, 2017, 280(1): 57-73.
- [16] SHEN ZT, SIGALOV AB. Novel TREM-1 inhibitors attenuate tumor growth and prolong survival in experimental pancreatic cancer[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(12): 4572-4582.
- [17] TANG WQ, LV B, YANG BW, et al. TREM2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by targeting the PI3K/Akt/ β -catenin pathway[J]. *Oncogenesis*, 2019, 8(2): 9.
- [18] CORREALE C, GENUA M, VETRANO S, et al. Bacterial sensor triggering receptor expressed on myeloid cells-2 regulates the mucosal inflammatory response[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(2): 346-356. e3.
- [19] KATZENELENBÖGEN Y, SHEBAN FD, YALIN A, et al. Coupled scRNA-seq and intracellular protein activity reveal an immunosuppressive role of TREM2 in cancer[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 872-885. e19.
- [20] MOLGORA M, ESAULOVA E, VERMI W, et al. TREM2 modulation remodels the tumor myeloid landscape enhancing anti-PD-1 immunotherapy[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 886-900. e17.

(方丽蓉 编辑)