

WNT2B与肿瘤免疫浸润及患者预后的相关性

樊馨竹^{1,2,3}, 沈艺琳^{1,2,3}, 许涛^{1,2,3}, 罗驰恒^{1,2,3}, 高羽亭^{1,2,3} (1. 广东医科大学公共卫生学院, 广东东莞 523808; 2. 东莞市环境医学重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 东莞市环境与健康研究所, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 探讨WNT2B表达与肿瘤免疫浸润及患者预后的相关性。**方法** 癌症患者WNT2B表达的原始数据来自癌症基因组图谱(TCGA)和基因型-组织表达(GTEX)数据库。分析WNT2B表达与预后、肿瘤免疫浸润、肿瘤新抗原、肿瘤突变负荷(TMB)和微卫星不稳定性(MSI)之间的相关性。**结果** 在正常组织和肿瘤组织中WNT2B的表达存在显著差异; WNT2B与癌症患者的预后、癌相关成纤维细胞浸润、免疫浸润细胞、肿瘤新抗原、TMB和MSI相关。**结论** WNT2B可能作为肿瘤免疫浸润和预后不良的生物标志物, 为癌症的治疗提供了新靶点。

关键词: WNT2B; 癌症; 免疫浸润; 生物标志物

中图分类号: R 730.4

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 02-0137-08

Correlation between WNT2B expression and tumor immunoinfiltration and prognosis

FAN Xin-zhu^{1,2,3}, SHEN Yi-lin^{1,2,3}, XU Tao^{1,2,3}, LUO Chi-heng^{1,2,3}, GAO Yu-ting^{1,2,3} (1. School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Dongguan Key Laboratory of Environmental Medicine, Dongguan 523808, China; 3. Department of Environmental and Occupational Health, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between WNT2B expression and tumor immunoinfiltration and prognosis. **Methods** Raw data of WNT2B expression in cancer patients were obtained from the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases. The correlation between WNT2B expression and prognosis, tumor immunoinfiltration, tumor neoantigens, tumor mutation load (TMB) and microsatellite instability (MSI) was analyzed. **Results** WNT2B expression of tumor tissue was different from normal tissue. WNT2B was correlated with prognosis, cancer-associated fibroblast infiltration, immunoinfiltrating cells, tumor neoantigen, TMB, and MSI. **Conclusion** WNT2B may serve as a biomarker of tumor immunoinfiltration and prognosis, providing a novel target for cancer treatment.

Key words: WNT2B; cancer; immunoinfiltration; biomarker

癌症是全球人口死亡的主要原因之一^[1],且尚未发现治愈的方法^[2]。随着生物信息学方法和一些公共数据库的不断发展和改进,可以通过对基因进行泛癌分析来评估其与临床预后和免疫细胞浸润的相关性,以寻求新的治疗靶点^[3-4]。Wnt蛋白家族能够以旁分泌和自分泌方式激活细胞膜受体,是Wnt信号通路的主要组成部分^[5]。该信号通路参与细胞的生长、增殖等生物学过程,与肿瘤等多种人类疾病高度相关^[6]。WNT2B是刺激经典Wnt通路的Wnt配体之一^[7],在许多生理和病理过程,特别是在肿瘤的发展中起着至关重要的作用^[8-9]。在泛癌水平上对WNT2B的功能和临床重要性进行全面分析研究鲜见,据此,本文针对该基

因进行了泛癌分析,以探讨WNT2B在癌症进展中的作用。

1 材料和方法

1.1 WNT2B基因表达分析

本文从UCSC数据库中下载癌症基因组图谱(TCGA)泛癌数据集,从中提取ENSG00000134245(WNT2B)基因在各个样本中的表达数据,分析该基因在各个肿瘤样本中瘤与瘤旁的差异。考虑到TCGA中正常样本较少,本研究从UCSC数据库中下载TCGA TARGET基因型-组织表达(GTEX)泛癌数据集,整合GTEx数据库中的正常组织的数据和TCGA中肿瘤组

收稿日期: 2022-07-19

基金项目: 国家自然科学基金(81703266),广东省自然科学基金(2015A030310532),广东医科大学学科建设项目(4SG22003G)

作者简介: 樊馨竹(1997-),女,在读硕士研究生, E-mail: 1716068040@qq.com

通信作者: 高羽亭(1982-),女,博士,副教授, E-mail: gaoyuting@gdmu.edu.cn

织的数据分析各种肿瘤的表达差异。

1.2 基因表达预后分析

本文从先前发表在《Cell》上的TCGA预后研究^[10]中获得高质量的TCGA的预后数据集,从UCSC的癌症浏览器中获取TARGET随访数据作为补充,使用R软件包survival的coxph函数建立Cox比例风险回归模型以分析基因表达与每个肿瘤中的预后关系得到森林图,然后将患者分为高低两组,用R软件包survival的survfit函数分析两组的预后差异得到KM生存曲线。

1.3 免疫浸润分析

利用TIMER数据库分析WNT2B表达与癌症相关成纤维细胞浸润之间的相关性。从TIMER数据库下载了33种癌症的6种免疫浸润细胞的得分数据,分析基因表达与这些免疫细胞得分的相关性。利用R软件包ESTIMATE^[11]分析各个肿瘤样本的基质评分(Stromal score),免疫评分(Immune score)和综合评分(ESTIMATE score)。

1.4 基因突变与表达分析

从GDC上下载了经GISTIC软件^[12]处理的所有TCGA样本的拷贝数变异(CNV)数据集,整合样本的拷贝数数据和基因表达数据,使用R软件计算每个肿瘤中基因在基因组变异和非变异样本中的表达差异。

1.5 基因组异质性与基因表达分析

从先前的研究^[13]中获取每个肿瘤的免疫新抗原数据,计算在各个肿瘤中新抗原和WNT2B表达的相关性。从GDC上下载经MuTect2软件^[14]处理的所有TCGA样本的单核苷酸变异数据集,利用R软件包maftools的tmb函数计算每个肿瘤的TMB,并整合样本的TMB评分和WNT2B表达数据,计算他们之间的相关性。且从先前的研究^[15]中获取每个肿瘤的MSI评分,整合样本的MSI评分和基因表达数据,在每种肿瘤中计算他们之间的相关性。

1.6 统计学处理

癌症基因表达谱数据均通过 $\log_2(x+0.001)$ 转化进行标准化。使用非配对的秩和检验和秩和检验进行两两之间的差异显著性分析,利用kruskal.test进行多组样本的差异检验。使用单因素Cox回归模型、卡普兰—迈尔方法进行生存分析,并利用logrank test方法评估不同组样本之间的预后差异显著性。使用斯皮尔曼或皮尔森相关系数来进行相关性分析。

2 结果

2.1 WNT2B在泛癌中的表达水平

分析WNT2B在TCGA泛癌数据中的mRNA表达

水平,结果显示,WNT2B在头颈鳞状细胞癌(HNSC)、肾乳头状细胞癌(KIRP)、肾透明细胞癌(KIRC)、胆管癌(CHOL)、混合肾癌(KIPAN)、肝细胞肝癌(LIHC)和肺鳞癌(LUSC)这7种肿瘤中高表达,在多形成性胶质细胞瘤(GBM)、胶质瘤(GBMLGG)、子宫内膜癌(UCEC)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(PCPG)、膀胱尿路上皮癌(BLCA)、肾嫌色细胞癌(KICH)、甲状腺癌(THCA)、直肠癌(READ)、脑低级别胶质瘤(LGG)、肺腺癌(LUAD)、乳腺浸润癌(BRCA)、前列腺癌(PRAD)、结肠癌(COAD)及结直肠癌(COADREAD)这14种肿瘤中低表达,见图1A。

本文整合GTEx数据库中的正常组织的数据和TCGA中肿瘤组织的数据,结果显示WNT2B在KIRP、KIPAN、HNSC、KIRC、胰腺癌(PAAD)、睾丸癌(TGCT)、白血病(ALL)、急性髓细胞样白血病(LAML)和CHOL这9种肿瘤中高表达,而在25种肿瘤中表达较低,除上述14种肿瘤类型外,还有宫颈鳞癌和腺癌(CESC)、肾母细胞瘤(WT)、黑色素瘤(SKCM)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)、食管癌(ESCA)、子宫肉瘤(UCS)、肾上腺皮质癌(ACC)、胃和食管癌(STES)、胃癌(STAD)、LUSC和LIHC,见图1B。

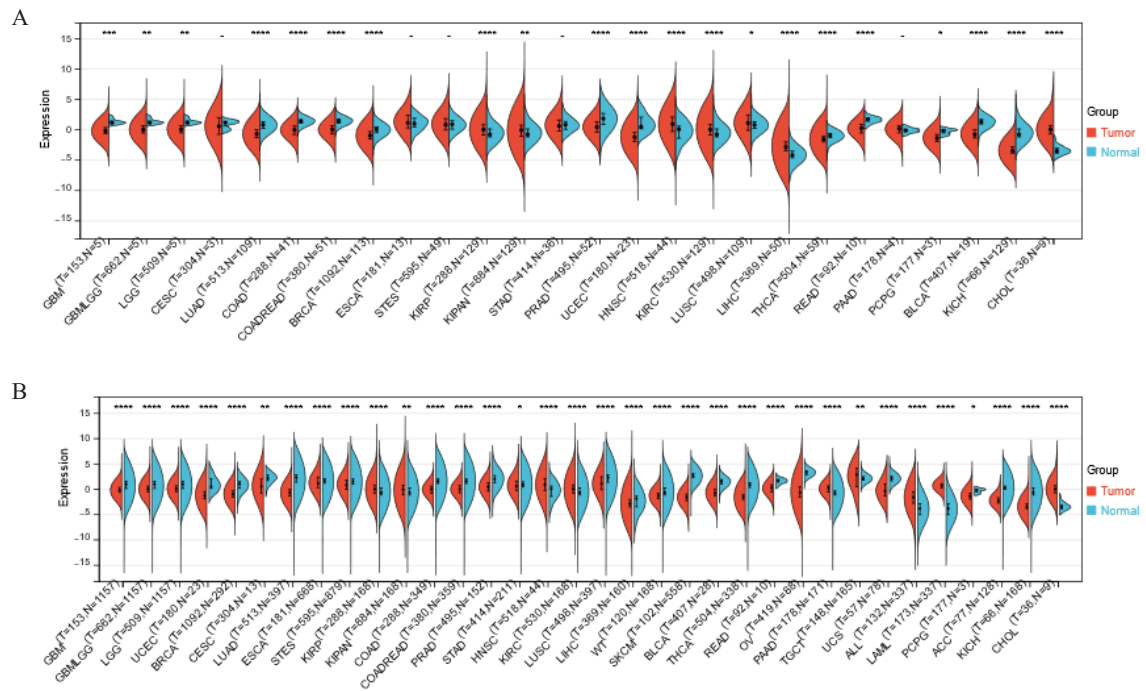
2.2 WNT2B在泛癌中的预后意义

Kaplan-Meier分析显示WNT2B高表达的患者在TCGA-LGG、TARGET-LAML、TCGA-BLCA、TCGA-LAML中总生存时间较短,在TCGA-LUSC、TARGET-ALL中总生存时间较长(图2A-F)。

单变量Cox回归分析显示,WNT2B高表达是TCGA-LGG、TARGET-LAML、TCGA-BLCA和TCGA-LAML患者总生存期(OS)的危险因素,是TCGA-LUSC和TARGET-ALL患者的保护因素(图3A)。此外,疾病特异性生存期(DSS)分析显示,WNT2B是TCGA-LGG、TCGA-BLCA患者的危险因素,是TCGA-LUSC患者的保护因素(图3B)。无病生存期(DFI)分析显示,WNT2B是TCGA-ACC患者的危险因素,是TCGA-UCEC患者的保护因素(图3C)。最后,无进展生存期(PFI)分析表明,WNT2B是TCGA-LGG、TCGA-BLCA、TCGA-ACC患者的危险因素,是TCGA-THYM、TCGA-PAAD患者的保护因素(图3D)。

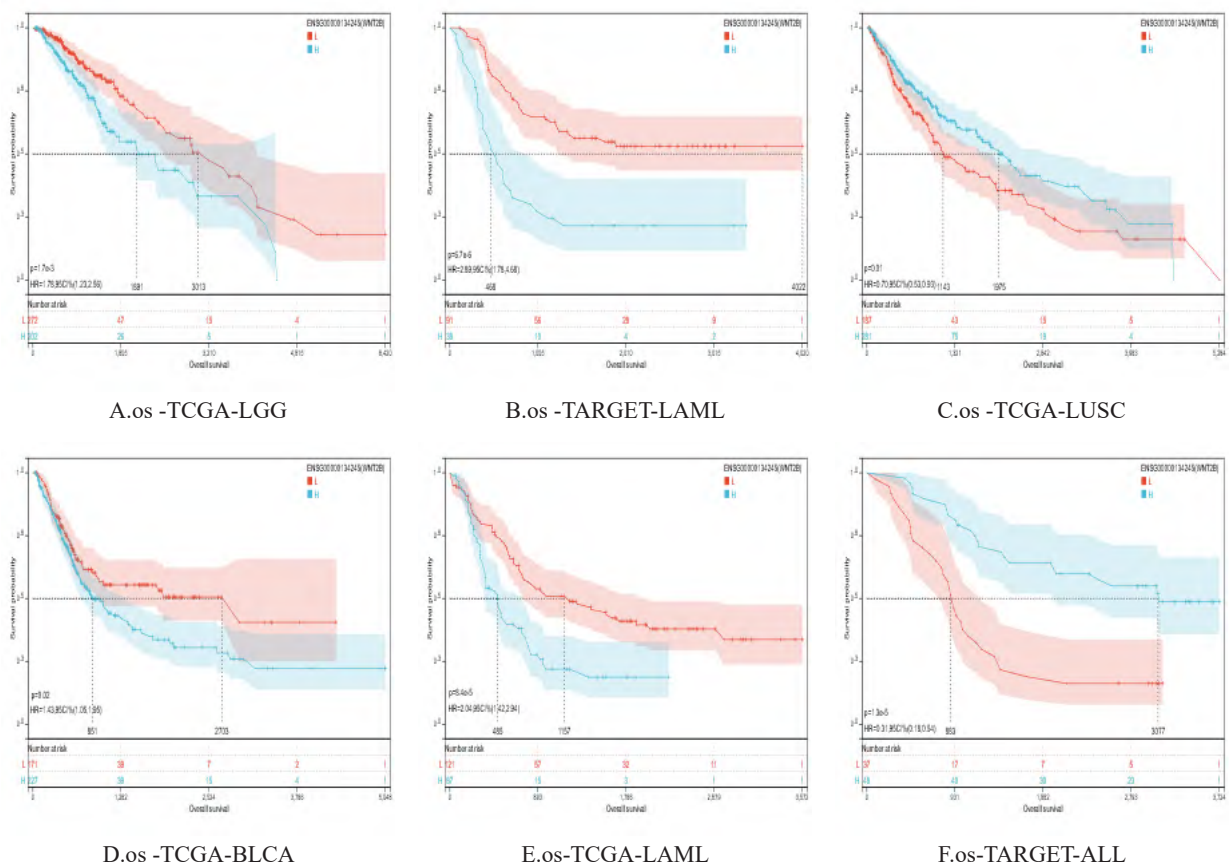
2.3 WNT2B表达与免疫细胞浸润水平的关系

结果显示WNT2B表达与LIHC、PRAD、STAD和THYM呈正相关($P<0.05$)。WNT2B表达与6种常见的免疫细胞得分也具有一定的相关性,其中最显著



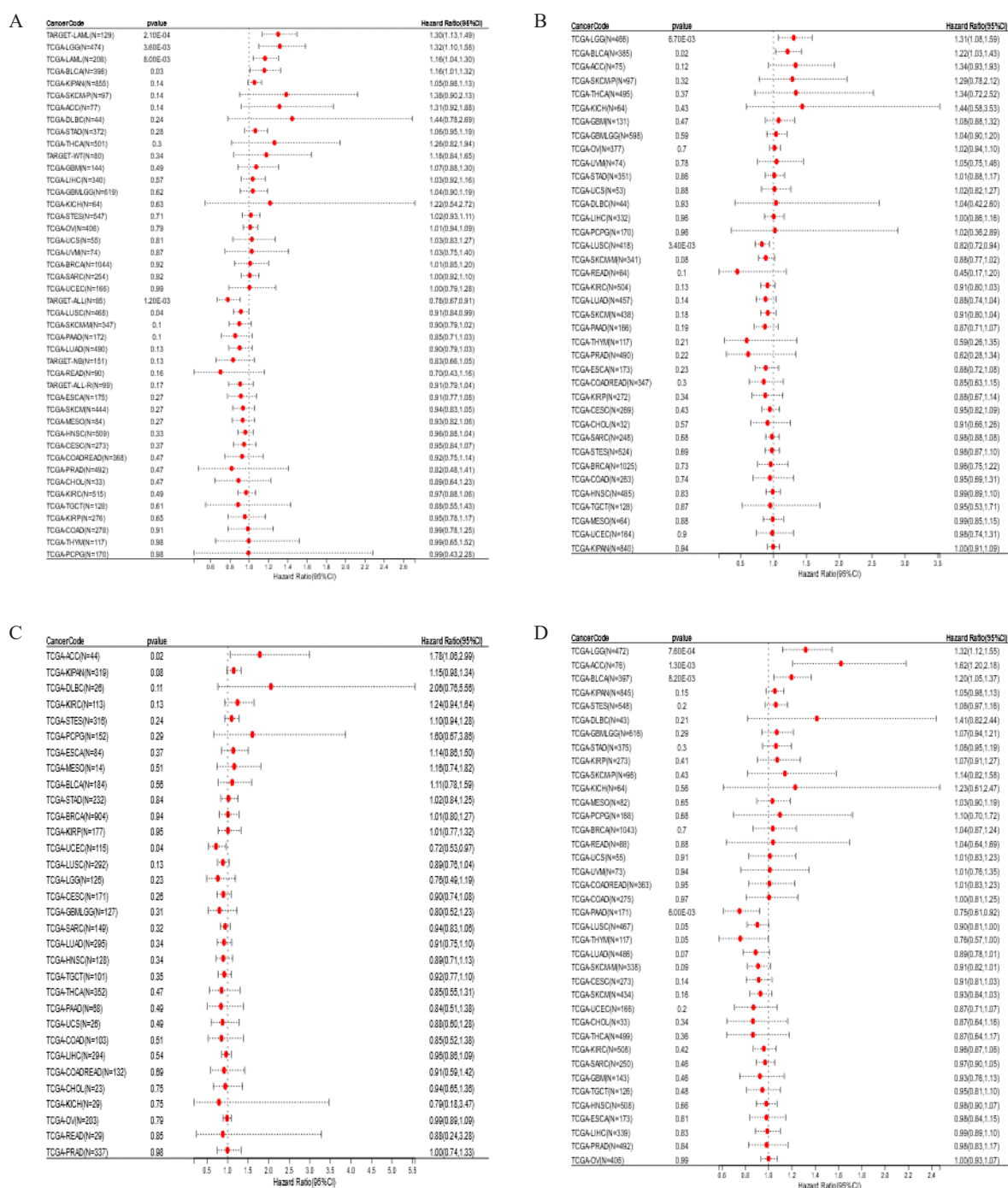
A. WNT2B 在 TCGA 泛癌数据中肿瘤和临近正常组织中的表达; B. WNT2B 在 TCGA 的肿瘤组织以及 TCGA 和 GTEx 的正常组织中的表达 ($P < 0.05$, $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$ 和 $^{***}P < 0.0001$)

图1 WNT2B 在泛癌中的表达分析



(A~F) WNT2B 在 TCGA-LGG、TARGET-LAML、TCGA-BLCA、TCGA-LAML、TCGA-LUSC、TARGET-ALL 中的 Kaplan-Meier 生存曲线分析 (仅显示 $P < 0.05$ 的肿瘤类型)

图2 WNT2B 表达与不同肿瘤患者总生存期的相关性



A.WNT2B 表达与OS 的关系；B.WNT2B 表达与DSS 的关系；C.WNT2B 表达与DFI 的关系；D.WNT2B 表达与PFI 的关系

图3 单因素Cox 回归分析结果(森林图)

相关的3个肿瘤是COAD、KIRC、LGG(图4)。在分析肿瘤样本中WNT2B表达与Immune Score、Stromal Score和ESTIMATE Score的关系,图中分别显示了最显著相关的3个肿瘤(图5)。

2.4 WNT2B 表达与基因突变有关

整合了样本的拷贝数数据和WNT2B表达数据,以探索每个肿瘤中基因组变异和非变异样品中基因表达的差异。结果显示ESCA、STES、STAD、PRAD、

LUSC、PAAD、OV、SKCM和BLCA这9种肿瘤中差异有统计学意义,如图6。

2.5 WNT2B 表达与基因组异质性的关系

结果显示在3种肿瘤中WNT2B的表达与TMB显著相关,其中在THCA及ACC中呈正相关,在ROADREAD中呈负相关(图7A)。在8种肿瘤中发现WNT2B与TMB显著的相关性。在KIPAN、ACC等2种肿瘤中呈显著正相关,在COADREAD、STES、

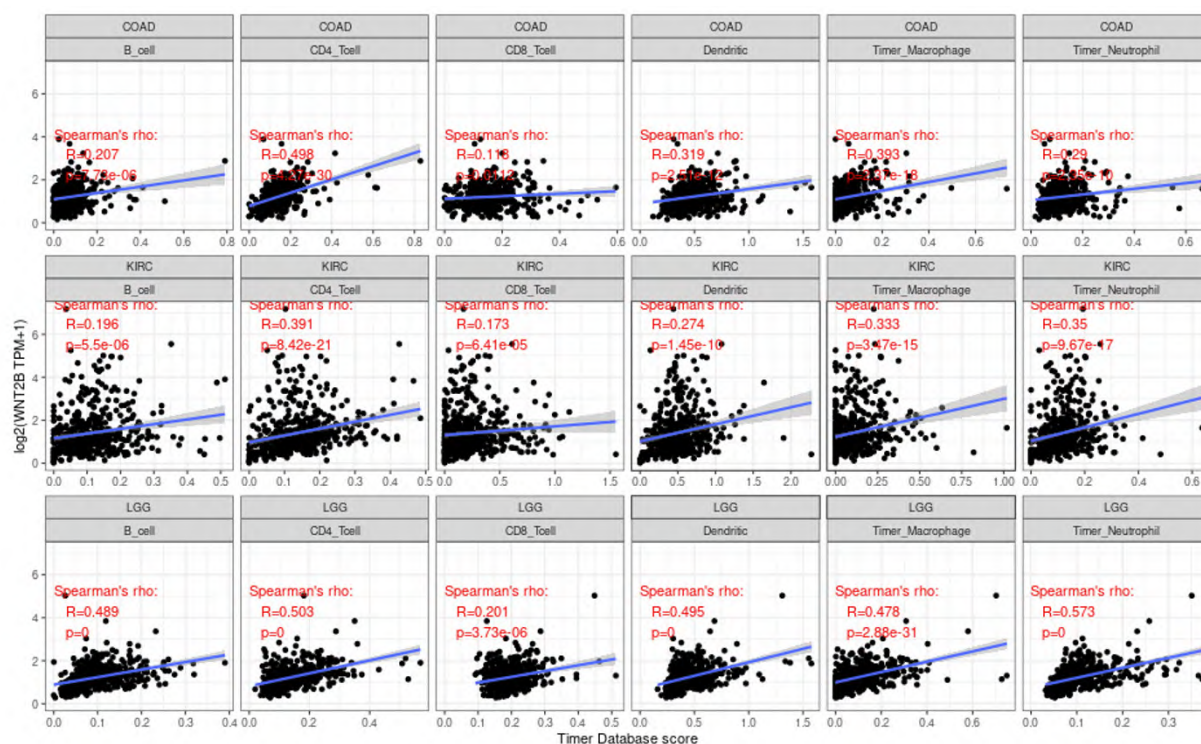
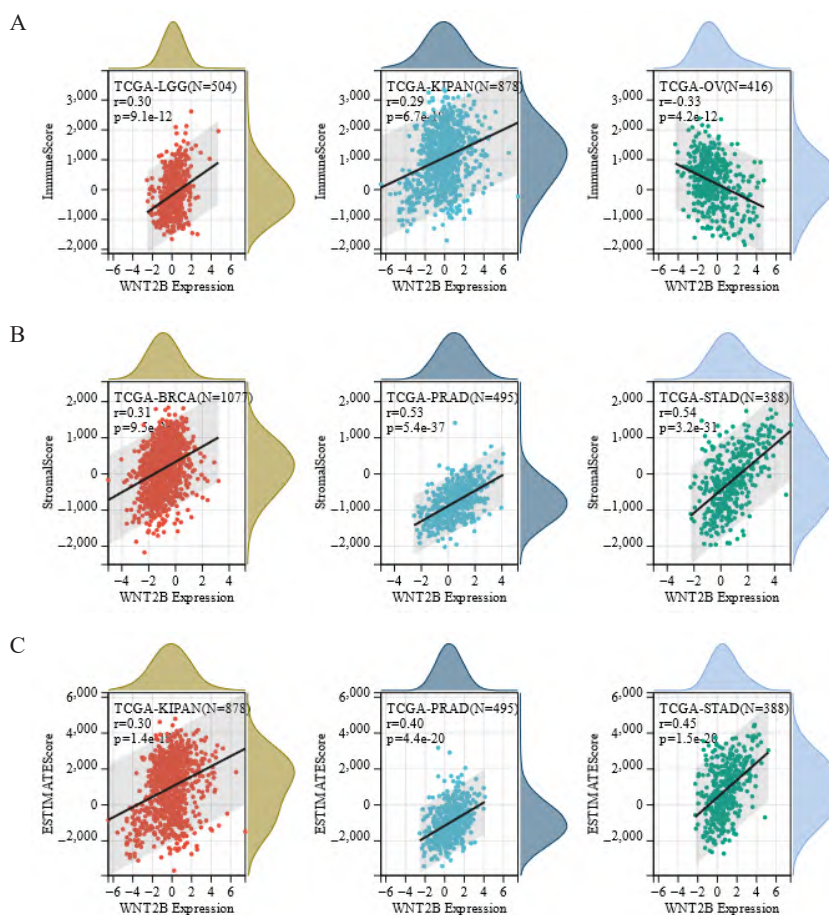


图4 WNT2B 表达与免疫细胞浸润水平的相关性分析



A.LGG、KIPAN、OV 中的 WNT2B 表达与 Immune Score 的相关性; B.BRCA、PRAD、STAD 中的 WNT2B 表达与 Stromal Score 的相关性; C.KIPAN、PRAD、STAD 中的 WNT2B 表达与 ESTIMATE Score 的相关性。

图5 WNT2B 与 Immune Score、Stromal Score 和 ESTIMATE Score 的相关性分析

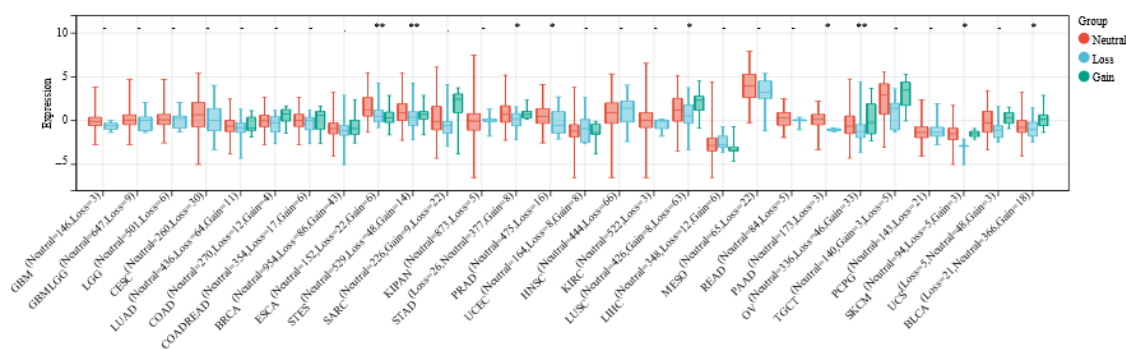


图6 WNT2B 表达与基因突变的相关性 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

STAD、PRAD、LUSC 与 CHOL 等 6 种肿瘤中呈显著负相关(图 7B)。在 13 种肿瘤中发现 WNT2B 与 MSI 也存在显著的相关性,其中在 4 种肿瘤中呈显著正相关,如 GBMLGG、LGG、LUAD、LUSC,在 9 种肿瘤中显著负相关,如 COAD、COADREAD、STES、KIPAN、STAD、UCEC、HNSC、SKCM 及 DLBC(图 7C)。

3 讨论

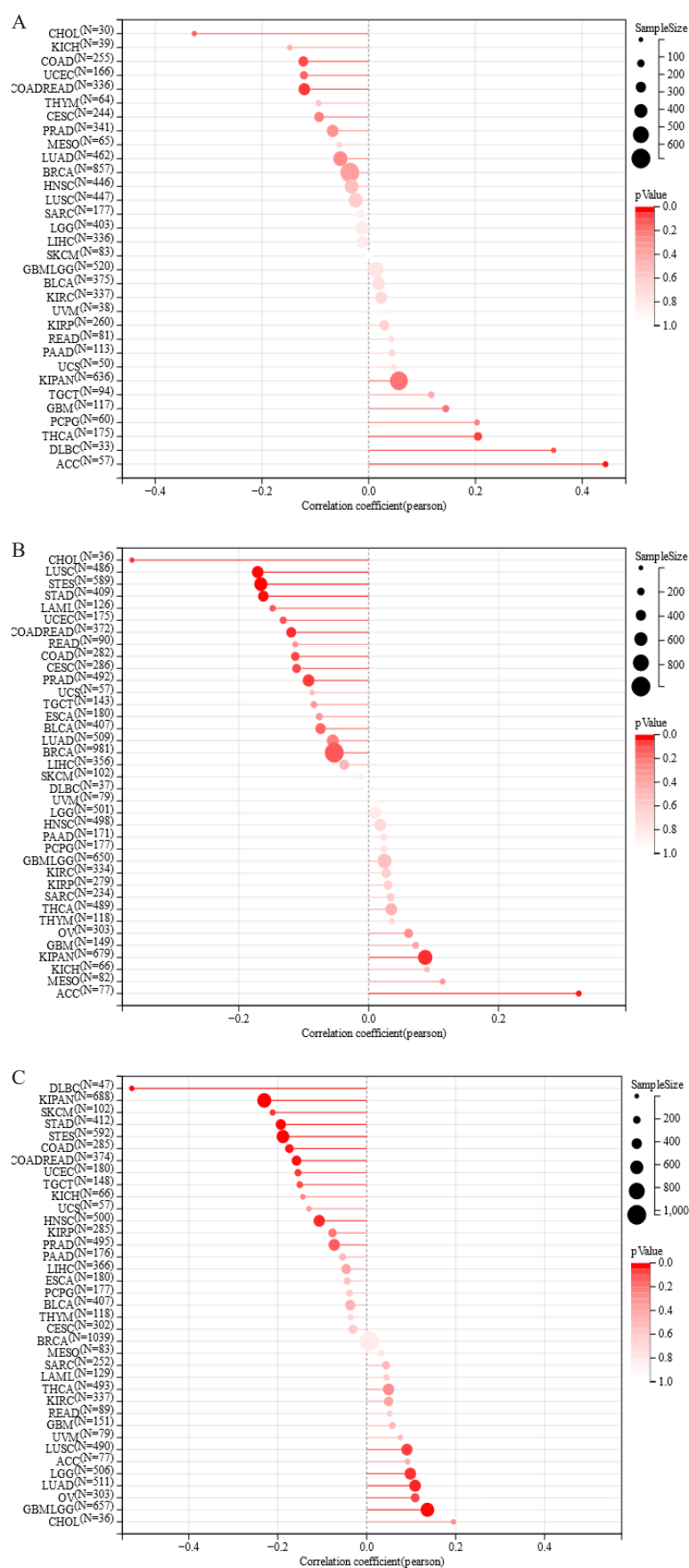
Wnt 信号通路是重要的信号通路之一, WNT2B 作为经典通路分子,在癌症进展中发挥重要的作用。已有研究证实,通过靶向 WNT2B 可以抑制胆囊癌和胆管癌细胞的增殖,迁移和侵袭^[16],以及延缓胶质母细胞瘤的癌变^[17]。沉默 WNT2B 能够增强卵巢癌细胞对顺铂的敏感性^[18]。然而,目前尚无针对 WNT2B 的泛癌研究。因此在本项研究中,本文整合 GTEX 和 TCGA 数据,详细分析 WNT2B 在泛癌中的表达水平、预后状态、免疫浸润和遗传改变等特征,旨探讨 WNT2B 与肿瘤免疫浸润的相关性及其在泛癌中潜在的预后价值,以寻求新的治疗靶点。

本文发现 WNT2B 在泛癌中的表达存在显著差异。与正常组织相比, WNT2B 在 KIRP、KIPAN、HNSC、KIRC、PAAD、TGCT、ALL、LAML 和 CHOL 中是高表达的,而在 GBM、GBMLGG、LGG、LUAD、COAD、COADREAD、BRCA、PRAD、UCEC、THCA、READ、PCPG、BLCA、KICH、CESC、ESCA、STES、STAD、LUSC、LIHC、WT、SKCM、OV、UCS 和 ACC 中则表达较低。研究表明,在化疗组中高表达 Wnt2B 的 AML 患者预后更差^[19]。此外, Wnt2B 在人胰腺癌组织中的表达显著高于正常胰腺组织,且与较低表达组相比,癌症组织中 Wnt2B 表达升高预示着总生存期更短,提示 Wnt2B 的高表达可能与癌症患者预后不良有关^[20]。在本研究中发现,高表达的患者在 TCGA-LGG、TARGET-LAML、TCGA-

BLCA 和 TCGA-LAML 中总生存时间较短,而在 TCGA-LUSC, TARGET-ALL 中总生存时间较长,表明 WNT2B 的表达会对不同癌症患者的预后造成不同的影响,体现 WNT2B 在泛癌中的预后价值,显示其可作为一种预后生物标志物的潜力。

肿瘤微环境(TME)是规范和非规范 Wnt 配体的来源,可以诱导癌细胞和免疫细胞中的信号通路发生异常^[21]。在 TME 中, CAFs 已被证实在肿瘤的发展中起着多种作用^[22]。肿瘤免疫微环境与各种基因的表达水平有关。在本研究中发现 WNT2B 的表达与多种肿瘤的 CAFs 浸润呈正相关,且在 LIHC、PRAD、STAD 和 THYM 中尤为显著。此外, WNT2B 的表达与 COAD、KIRC 和 LGG 中 6 种类型的免疫细胞浸润显著相关,并与一些肿瘤的 Immune Score、Stromal Score 和 ESTIMATE Score 相关。以上结果均显示了在不同肿瘤中免疫细胞的浸润状态,提示 WNT2B 的表达可以参与调节免疫细胞浸润到肿瘤组织中这一过程,表明 WNT2B 在调节癌症肿瘤免疫学中发挥了一定的作用。

肿瘤新抗原是肿瘤免疫治疗的新兴方法之一,主要是由肿瘤细胞突变产生的肿瘤特异性抗原,仅在肿瘤细胞中大量表达,具有很强的免疫原性和肿瘤异质性^[23]。用新抗原合成的疫苗具有多靶点,安全,广谱等优点,它不易引起中枢耐受和自身免疫反应,可用于为癌症患者准备个性化疫苗^[24]。利用肿瘤新抗原的免疫活性,可以根据肿瘤细胞突变的情况设计合成新抗原疫苗,对患者进行免疫注射,达到个体化治疗的效果。TMB 是肿瘤标本中存在的突变总数,可作为一种生物标志物预测多种癌症类型免疫治疗后的生存率^[25]。MSI 是指与正常组织相比,在肿瘤中某一微卫星由于重复单位的插入或缺失而造成的微卫星长度的任何改变,出现新的微卫星等位基因的现象。近年来的研究提示 MSI 有可能成为评估肿瘤恶性程度,



A. WNT2B 表达与免疫新抗原的关系; B. WNT2B 表达与肿瘤突变负荷的关系; C. WNT2B 表达与微卫星不稳定性的关系

图7 WNT2B 表达与基因组异质性的关系

疗效和预后的关键预测因子。在本研究结果中可看出WNT2B的表达在THCA、ACC和COADREAD中与肿瘤新抗原相关,在KIPAN、ACC、COADREAD、STES、STAD、PRAD、LUSC和CHOL中与TMB相关,在GBMLGG、LGG、LUAD、LUSC、COAD、COADREAD、STES、KIPAN、STAD、UCEC、HNSC、SKCM和DLBC中与MSI有关,表明WNT2B表达水平会影响癌症的肿瘤新抗原,TMB和MSI。

综上所述,我们应用综合生物信息学方法,表明WNT2B表达可能介导免疫浸润并影响泛癌患者的预后,展示其作为预后生物标志物的潜力,并为临床癌症治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1]WANG J J, LEI K F, HAN F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(12): 3855-3864.
- [2]BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3]BLUM A, WANG P, ZENKLUSEN J C. SnapShot: TCGA-Analyzed Tumors [J]. *Cell*, 2018, 173(2): 530.
- [4]TANG Z, KANG B, LI C, et al. GEPIA2: An enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W556-W560.
- [5]TACIAK B, PRUSZYNSKA I, KIRAGA L, et al. Wnt signaling pathway in development and cancer [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2018, 69(2).doi: 10.26402/jpp.2018.2.07.
- [6]NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [7]DAI Y, CHENG Z, FRICKE D R, et al. Prognostic role of Wnt and Fzd gene families in acute myeloid leukaemia [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3): 1456-1467.
- [8]CHEN Z, TANG J, CAI X, et al. HBx mutations promote hepatoma cell migration through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(10): 1380-1389.
- [9]WANG W, PAN Q, FUHLER G M, et al. Action and function of Wnt/ β -catenin signaling in the progression from chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2017, 52(4): 419-431.
- [10]LIU J, LICHTENBERG T, HOADLEY K A, et al. An integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics [J]. *Cell*, 2018, 173(2): 400-416.
- [11]YOSHIHARA K, SHAHMORADGOLI M, MARTÍNEZ E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2612.
- [12]MERMEL C H, SCHUMACHER S E, HILL B, et al. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(4): R41.
- [13]THORSSON V, GIBBS D L, BROWN S D, et al. The immune landscape of cancer [J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 812-830.
- [14]BEROUKHIM R, MERMEL C H, PORTER D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers [J]. *Nature*, 2010, 463(7283): 899-905.
- [15]BONNEVILLE R, KROOK M A, KAUTTO E A, et al. Landscape of microsatellite instability across 39 cancer types [J]. *JCO Precis Oncol*, 2017, 2017: PO. 17. 00073.
- [16]LI X L, LI S Z, WU C X, et al. Mir-188-5p inhibits proliferation, migration, and invasion in gallbladder carcinoma by targeting Wnt2b and Smad2 [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(4): 294-304.
- [17]HOU W Z, CHEN X L, QIN L S, et al. MiR-449b-5p inhibits human glioblastoma cell proliferation by inactivating WNT2B/Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(10): 5549-5557.
- [18]NIU Q, LIU Z, GAO J, et al. MiR-338-3p enhances ovarian cancer cell sensitivity to cisplatin by downregulating Wnt2b [J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(12): 1146-1156.
- [19]JIANG H, LI F, HE C, et al. Expression of Gli1 and Wnt2B correlates with progression and clinical outcome of pancreatic cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7): 4531-4538.
- [20]SWAFFORD D, MANICASSAMY S. Wnt signaling in dendritic cells: Its role in regulation of immunity and tolerance [J]. *Discov Med*, 2015, 19(105): 303-310.
- [21]BIFFI G, TUVESON D A. Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(1): 147-176.
- [22]JU Q, LI X, ZHANG H, et al. Nfe2l2 is a potential prognostic biomarker and is correlated with immune infiltration in brain lower grade glioma: A pan-cancer analysis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3580719.
- [23]BLASS E, OTT P A. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(4): 215-229.
- [24]XU P, LUO H, KONG Y, et al. Cancer neoantigen: Boosting immunotherapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110640.
- [25]SAMSTEIN R M, LEE C H, SHOUSHARI A N, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2): 202-206.