

进展期食管胃结合部腺癌患者术后辅助腹腔热灌注化疗的蛋白表达及免疫细胞变化分析

杨龙龙,尹清臣,李忠信,巩文婷,刘国魁,温桂海,牛学敏,张 肖
(邯郸市中心医院,河北 邯郸 056001)

摘要: [目的] 分析进展期食管胃结合部腺癌(adenocarcinoma of esophagogastric junction, AEG)术后辅助腹腔热灌注化疗(hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, HIPEC)治疗患者的免疫细胞水平及癌组织中己糖激酶结构域蛋白 1(hexokinase domain-containing protein 1, HKDC1)、膜联蛋白 A13(annexin A13, ANXA13)的表达,探讨两者对 AEG 患者预后的影响。[方法] 基于 GSE74553、GSE96668、GSE147762 数据集差异基因的筛选,选取 2018 年 6 月至 2019 年 6 月邯郸市中心医院进展期 AEG 术后辅助 HIPEC 患者 37 例。采用免疫组化法检测 AEG 组织和癌旁组织中 HKDC1、ANXA13 的表达,采用转录组测序技术检测 HIPEC 后患者血液中免疫细胞的水平,分析免疫细胞与 HKDC1、ANXA13 的关系。[结果] GSE74553、GSE96668、GSE147762 数据集的共有差异基因包括上调基因 *PGA5*、*MT1G* 和下调基因 *HKDC1*、*ANXA13*、*MUC13*。经多种数据库及临床数据验证, *HKDC1*、*ANXA13* 基因在食管癌、胃癌、AEG 组织中表达明显高于癌旁组织 (P 均 <0.05)。随访截至 2022 年 10 月 31 日, 37 例患者总生存率为 27.0%, 中位生存时间为 31 个月。HKDC1、ANXA13 的阳性表达率分别为 62.2%、51.4%, 两者阳性表达者的总生存率均显著短于阴性表达者 (21.7% vs 35.7%, 10.5% vs 44.4%); HKDC1、ANXA13 阳性和阴性表达者的中位生存时间差异均有统计学意义 (30 个月 vs 38 个月, $P=0.040$; 19 个月 vs 37 个月, $P=0.001$)。共检测出 22 种免疫细胞, 与 HKDC1 阳性表达者相比, CD8⁺ T 细胞、效应 NK 细胞在 HKDC1 阳性组显著降低 ($P=0.020, 0.010$), M2 型巨噬细胞显著升高 (0.05 ± 0.04 vs 0.09 ± 0.04 , $P=0.018$)。效应 NK 细胞、调节 T 细胞 (Tregs) 在 ANXA13 阳性和阴性组差异有统计学意义 ($P=0.040, 0.020$)。[结论] HIPEC 辅助治疗可能参与免疫细胞的调控, M2 型巨噬细胞水平与 HKDC1 表达相关, Tregs 水平与 ANXA13 表达相关, HKDC1、ANXA13 阳性表达可能是导致 AEG 患者治疗后预后差的危险因素。

关键词: 食管胃结合部腺癌; 腹腔热灌注化疗; 己糖激酶结构域蛋白 1; 膜联蛋白 A13; 免疫细胞

中图分类号: R735 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2024)02-0099-12

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2024.02.B003

An Analysis of Protein Expression and Immune Cell Levels in Patients with Advanced Adenocarcinoma of Esophagogastric Junction Receiving Postoperative Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy

YANG Longlong, YIN Qingchen, LI Zhongxin, GONG Wenting, LIU Guokui, WEN Guihai, NIU Xuemin, ZHANG Xiao

(Handan Central Hospital, Handan 056001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the immune cell levels and the expression of hexokinase domain-containing protein 1 (HKDC1) and annexin A13 (ANXA13) in cancer tissue of patients with advanced adenocarcinoma of esophagogastric junction (AEG) treated with adjuvant hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) after surgery, and their relation with the prognosis of patients. [Methods] Thirty seven patients with advanced AEG who received postoperative HIPEC in Handan Central Hospital from June 2018 to June 2019 were enrolled. The expression of HKDC1, ANXA13 in cancer tissues and pericancerous tissues was detected by immunohistochemistry, the levels of peripheral immune cells in patients after HIPEC was examined by transcriptome sequencing technique. The relationship of HKDC1 and ANXA13 expression with immune cells level and prognosis of patients was analyzed. [Results] The common differentially expressed genes in the GSE74553, GSE96668, and GSE147762 datasets include up-regulated genes *PGA5*, *MT1G*, and down-regulated genes *HKDC1*, *ANXA13* and *MUC13*. Verified by multiple databases and clinical data, the expression of *HKDC1* and *ANXA13* genes in esophageal cancer, gastric cancer, and AEG tissues were significantly higher than those in normal tissues (all $P<0.05$). The deadline for follow-up is October 31, 2022, the overall survival rate of 37 patients was 27.0%, with a median survival time of 31 months. The positive expression rates of HKDC1 and ANXA13 in AEG tissues were 62.2% and 51.4%, respectively. The overall survival rate in AEG patients with positive HKDC1 and ANXA13 expression was significantly lower than that in patients with negative expression (21.7% vs 35.7%, 10.5% vs 44.4%). The median survival time in patients with positive HKDC1 and ANXA13 was shorter than that in patients with negative expression (30 months vs 38 months, $P=$

基金项目: 河北省重点研发计划自筹项目(182777241)

通信作者: 张 肖, E-mail: 840357567@qq.com

收稿日期: 2023-09-08; **修回日期:** 2023-10-13

0.040; 19 months vs 37 months, $P=0.001$). Compared with HKDC1 negative patients, CD8⁺ T cells and NK cells activated were significantly decreased in the HKDC1 positive patients ($P=0.020$, 0.010), while macrophages M2 was increased (0.05 ± 0.04 vs 0.09 ± 0.04 , $P=0.018$). There was a statistically significant difference in NK cells activated and regulatory T cells (Tregs) between patients with positive ANXA13 expression and negative expression ($P=0.040$, $P=0.020$). [Conclusion] The study indicates that macrophage M2 level is associated with HKDC1 expression, Tregs levels is associated with ANXA13 expression, and positive expression of HKDC1 and ANXA13 may be associated with poor prognosis in AEG patients after adjuvant HIPEC therapy.

Subject words: adenocarcinoma of esophagogastric junction; hyperthermic intraperitoneal chemotherapy; hexokinase domain-containing protein 1; annexin A13; immune cells

食管胃结合部腺癌 (adenocarcinoma of esophagogastric junction, AEG) 是中国常见的消化道肿瘤之一, 近年来其发病率迅速上升^[1]。手术联合围手术期铂类化疗仍是 AEG 的标准治疗方法, 然而术后复发和转移多见于 2 年内, 5 年生存率多低于 40%^[2]。术后局部复发、腹腔内扩散和腹膜后淋巴结转移是治疗失败的主要原因, 其中, 腹腔内扩散占 40%~50%^[3]。腹腔内扩散的化疗效果差可能与“血-腹膜屏障”的存在有关, 导致腹膜腔延迟化疗而影响疗效, 理论上, 腹腔热灌注化疗 (hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, HIPEC) 因“血-腹膜屏障”而对全身影响较小, 另外, HIPEC 通过协同效应增加细胞毒性化疗效果^[4-5]。尽管有证据表明 HIPEC 不能作为胃肠道肿瘤的标准治疗, 但其对腹膜腔内肉眼受累的患者影响较小, 且预防性的 HIPEC 可代表一种更适合的辅助方法, 临床试验表明, 预防性 HIPEC 可减少腹膜复发, 改善胃癌患者预后, 然而其机制仍未完全阐明^[6]。

HIPEC 可有效杀灭肿瘤细胞及通过热休克蛋白诱发抗癌免疫效应, 包括免疫细胞应答、肿瘤细胞表面分子及血管的改变和外泌体的释放等^[7]。基于癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 的证据, AEG 具有高突变、高甲基化、免疫原性等特征。HIPEC 不仅在肿瘤微环境中产生新抗原, 而且上调 PD-1 及 PD-L1 表达等^[8-9]。然而, HIPEC 辅助治疗对 AEG 免疫细胞及其分子水平的影响仍不清楚。本研究通过观察 AEG 患者术后化疗辅助 HIPEC 中的免疫细胞、己糖激酶结构域蛋白 1 (hexokinase domain-containing protein 1, HKDC1)、膜联蛋白 A13 (annexin A13, ANXA13) 的水平, 探讨 HKDC1、ANXA13 表达对 AEG 的影响及其潜在机制。

1 资料与方法

1.1 数据库资料

为了解 AEG 患者的潜在基因变化, 通过 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分别下载 GSE74553 (正常食管黏膜=8, 正常胃黏膜=5, AEG=67)、GSE96668 (正常胃黏膜=7, AEG=34) 数据集中 mRNA 数据及临床数据^[10]。将两个数据集的 mRNA 数据通过 Sangerbox 3.0 (<http://vip.sangerbox.com/home.html>) 经去除批次效应, 整合成一个数据集并进行差异基因的分析^[11]。其中, 健康对象 20 人, 男性 12 人, 女性 8 人; 年龄 53~85 岁, 平均年龄 (68.80 ± 9.41) 岁。AEG 患者 101 例, 男性 79 例, 女性 22 例; 年龄 25~88 岁, 平均年龄 (70.66 ± 11.08) 岁; TNM 分期 (AJCC 第 7 版): I 期 18 例, II 期 24 例, III 期 48 例, IV 期 11 例。为了解 HIPEC 对基因变化的影响, 本研究通过 GEO 数据库及 GEO2R 平台 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) 下载和筛选 GSE147762 数据集中黏液阑尾癌的腹膜假性黏液瘤行细胞减灭术 ($n=13$) 与细胞减灭术+HIPEC ($n=64$) 治疗患者的差异基因 (Hub 基因)。将 GSE74553 和 GSE96668 整合的差异基因与 GSE147762 差异基因通过 FunRich 软件进行集合运算并绘制韦恩图 (version 3.1.3)。

TNMplot 数据库 (<https://tnmplot.com>, copyright 2021—2023) 是一个集 GEO、GTEx、TCGA、TARGET 数据库的数据, 包括癌组织 40 442 例、正常组织 15 648 例、癌转移组织 848 例样本数据^[12]。本研究通过此网站分析 HKDC1、MUC13、ANXA13、PGA5、MTIC 在食管癌/胃癌组织与癌旁组织中的差异。

1.2 临床资料

选取和纳入 2018 年 6 月至 2019 年 6 月邯郸市中心医院收治的进展期 AEG 患者 37 例,所有患者均行根治性手术治疗(R0 切除)并经组织学证实为局部晚期 AEG(基于 AJCC 第 7 版分期系统的 $cT_{any}N_{1-3}M_0$),术前行辅助放化疗及术后辅助化疗,资料完整。将存在活动性自身免疫性疾病、任何需要慢性系统性皮质类固醇或免疫抑制剂的疾病、原发性免疫缺陷、心肝肾功能障碍的患者排除。37 例患者年龄 31~73 岁,中位年龄 57 岁;男性 24 例,女性 13 例;TNM 分期:Ⅱ期 5 例,ⅢA 期 15 例,ⅢB 期 10 例,ⅢC 期 7 例;分化程度:高分化(G_1)3 例,中分化(G_2)10 例,低分化(G_3)24 例;脉管癌栓 30 例,无脉管癌栓 7 例;神经浸润 22 例,无神经浸润 15 例。根据 HKDC1、ANXA13 表达分为阳性和阴性表达组。所有患者及其家属均签署知情同意书,本研究通过邯郸市中心医院伦理委员会审批(审批号:2018016)。

1.3 研究方法

1.3.1 治疗方法

术前给予累及野调强放疗 45 Gy/25 f 同步 3~6 个周期双周 FLOT 方案(多西他赛 50 mg/m²+奥沙利铂 85 mg/m²+亚叶酸钙 200 mg/m²+5-氟尿嘧啶 2 600 mg/m²持续静脉滴注超过 24 h,每 2 周 1 次),完成治疗后行术前评估,将无疾病进展者纳入研究。术后 1~2 d 行 HIPEC 治疗 1 次,术后 6~8 周继续原方案化疗 4~6 个周期^[3]。

1.3.2 HIPEC 法

根据患者病情变化,于术后第 1 天或第 2 天行预防性 HIPEC 治疗,严格按照要求进行操作^[13]。在操作前尿液量至少大于每小时 1 mL/kg,并将 Tenckhoff 导管置于 McBurney's 点。将含化疗药物紫杉醇(100 mg/m², d_1 ,75 mg/m², d_2)的生理盐水 4 000~6 000 mL 连续灌入腹腔约 1 h,立即通过 NRL-001(吉林迈达股份有限公司,中国吉林)射频热疗装置加热,温度维持在(42.0±0.5)℃,持续 90 min,治疗结束后在腹腔内保留约 1 000 mL 的化疗液并于第 3 天拔除导管。

1.4 HKDC1 和 ANXA13 蛋白的免疫组化检测及血液免疫细胞检测

1.4.1 免疫细胞检测方法

HIPEC 治疗结束后使用 QIAGEN 公司 RAX-gene 血 RNA 管抽取患者的血液标本,通过 Illumina

TruSeq RNA 外显子文库试剂盒,并在 Illumina NovaSeq 6000 上进行 RNA 测序。使用 STAR 算法将原始 RNA-Seq 数据映射到人类基因组(hg38),并通过 Subread 包中的 featureCounts 模块生成表达基因的读取计数。标准化读取计数即每千碱基外显子每百万映射读取的片段数(FPKM)采用 edgeR 生成,将其通过网络工具 CIBERSORTx(cibersortx.stanford.edu)输出每个样本 22 种免疫细胞类型的相对比^[14]。

1.4.2 免疫组化检测及评分标准

将蜡块包埋的术后肿瘤组织及距肿瘤组织 5 cm 以上的癌旁组织标本切成 4 μm 置于载玻片上,使用全自动 Bond-III 自动染色仪(Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)行兔抗人多克隆抗 HKDC1 抗体(1:1 000,Proteintech,CHI,USA)和 ANXA13 抗体(1:200,Proteintech,CHI,USA)染色;多克隆抗兔 IgG 抗体(1:100,Proteintech,CHI,USA)作为同型对照;二抗采用通用生物素(SE134,1:200,Abcam,Cambridge,USA)复染。电子显微镜下(华康剂量检验有限公司,BX51 型)随机选取 3 个高倍视野进行拍照。染色评分均由两名副主任医师进行,采用免疫组化(immunohistochemical,IHC)半定量评分,即染色强度和染色阳性细胞百分比相乘进行评分。染色强度:阴性(0 分)、弱(1 分)、中(2 分)、强(3 分);染色阳性细胞百分比:≤5%(0 分)、6%~25%(1 分)、26%~50%(2 分)、51%~75%(3 分)、>75%(4 分);总评分 0~12 分,HKDC1 和 ANXA13 的阳性表达为评分≥4 分,阴性表达为<4 分^[15]。

1.5 疗效评价及随访

所有患者治疗前 1 个月内均进行胸部、腹部及骨盆的基线强化 CT 扫描,在治疗期间每 3 个月进行一次扫描,治疗结束后 1 年内每 3 个月,2~5 年内每 6 个月进行 CT 扫描,并进行相应的血液学指标复查。随访通过电话、微信、查阅病历、门诊复查等形式进行,末次随访时间为 2022 年 10 月 31 日。总生存时间(overall survival,OS)为从患者就诊起到随访结束因任何原因死亡的时间。患者死亡为终点事件,失访、存活或死于非肿瘤的计为截尾数据,随访率为 100%,计算上述时间以月为单位。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计软件分析及 R 软件包,符合正态和方差齐性,计量资料采用均数±标准差表示,两两比较采用 *t* 检验;不符合正态和方差齐性,

采用中位数(四分位数)描述,两两比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;计数资料采用百分数描述,采用卡方检验分析组间差异;采用 R 软件包秩和检验评估免疫细胞在两组患者的差异,采用箱图可视化;采用 R 软件包 inSilicoMerging(version 3.3.2)对 GSE74553 和 GSE96668 数据集进行合并,采用 Empirical Bayes 法去除批次效应;利用 R 软件包 *t* 检验函数评估每个基因在 AEG 和正常黏膜人群间的差异,经校准 *P* 值计算每个基因的显著性错误发现率(false discovery rate, FDR),采用 euclidean 距离计算方法,complete 聚类方法,以聚类热图可视化;使用 R 软件包 Survival 的 Survfit 函数分析 HKDC1、ANXA13 阳、阴性表达患者的预后差异,利用 Log-rank 检验方法评估阳、阴性风险组样本间的预后差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AEG 经 HIPEC 辅助治疗差异基因分析

对 GSE74553 和 GSE96668 数据集行去除批次效应,去除批次前两个数据集的样本分布差异较大,提示了具有批次效应,去批次效应后两个数据集的数据分布趋于一致(Figure 1A)。分析 AEG 患者和正常食管、胃黏膜者的 mRNA 数据,在 $P < 0.05$ 、差异倍数 1.5 倍的基础上,共筛选出 52 个差异基因,上调 25 个,包括 *CCL20*、*MMP12*、*MMP3*、*CXCL8*、*CFTR*、*MUC13*、*HOXB5*、*CLDN3*、*HKDC1*、*ANXA13* 等,下调 27 个,包括 *KLK11*、*ATP4B*、*PGA4*、*MT1G*、*ACTG2*、*PGA5*、*ADH7*、*TFF2*、*GPT2* 等。通过分析阑尾癌的腹膜假性黏液瘤行 HIPEC 辅助治疗的基因变化,结果显示,HIPEC 治疗组 147 个基因显著上调,如 *MMP9*、*VPS37C*、*S100A16*、*MYO10*、*TUFT1*、*MUC13*、*HKDC1*、*CDH1*、*TSPAN8*、*CAPS* 等,939 个基因明显下调,如 *MYH10*、*TXLNGY*、*EIF1AY*、*KDM5D*、*RPS4Y2*、*REM1*、*KLHL4*、*CHSY1*、*CLIP3*、*IL1R1* 等(Figure 1B)。

2.2 差异基因在食管癌、胃癌组织和正常组织间的比较分析

通过分析 GSE74553 和 GSE96668 去除批次后数据集和 GSE147762 数据集的差异基因,将两者差异基因进行集合并筛选出 5 个共同基因,分别为 *HKDC1*、*PGA5*、*MUC13*、*MT1G*、*ANXA13*(Figure 2A)。

与正常组织相比,*HKDC1* [192 (7,1173) vs 6 (3,11), $Z=233.20$]、*ANXA13* [19(4,170) vs 3(1,6), $Z=127.40$] 基因在食管癌组织中显著升高,而 *MT1G* 基因明显下降 [152(49,431) vs 299(131,917), $Z=67.84$] (P 均 < 0.05) (Figure 2B)。*PGA5* [1(0,9.5) vs 5 246 (72,12 251), $Z=4 396.00$]、*MT1G* [286(92,902.5) vs 1710 (413,4 569), $Z=471.40$]、*HKDC1* [655 (257,1 198.5) vs 10(4,30), $Z=6 321.00$]、*MUC13* [7 630(3 057,14 145) vs 137(14,544), $Z=5 439.00$] 和 *ANXA13* [208(41,602.5) vs 10(4,26), $Z=2 542.00$] 基因在胃腺癌组织和正常组织间差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05) (Figure 2C)。

2.3 HKDC1、ANXA13 蛋白在 AEG 与癌旁组织中的表达差异

37 例 AEJ 标本中, HKDC1、ANXA13 蛋白多分布于细胞膜和细胞质,呈棕褐色。HKDC1 在 AEG 和癌旁组织的阳性表达率分别为 62.2% (23/37) 和 32.4% (12/37), 差异有统计学意义 ($\chi^2=6.560$, $P=0.010$) (Figure 3A)。ANXA13 蛋白在 AEG 和癌旁组织的阳性表达率分别为 51.4% (19/37)、27.0% (10/37), 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.593$, $P=0.032$) (Figure 3B)。

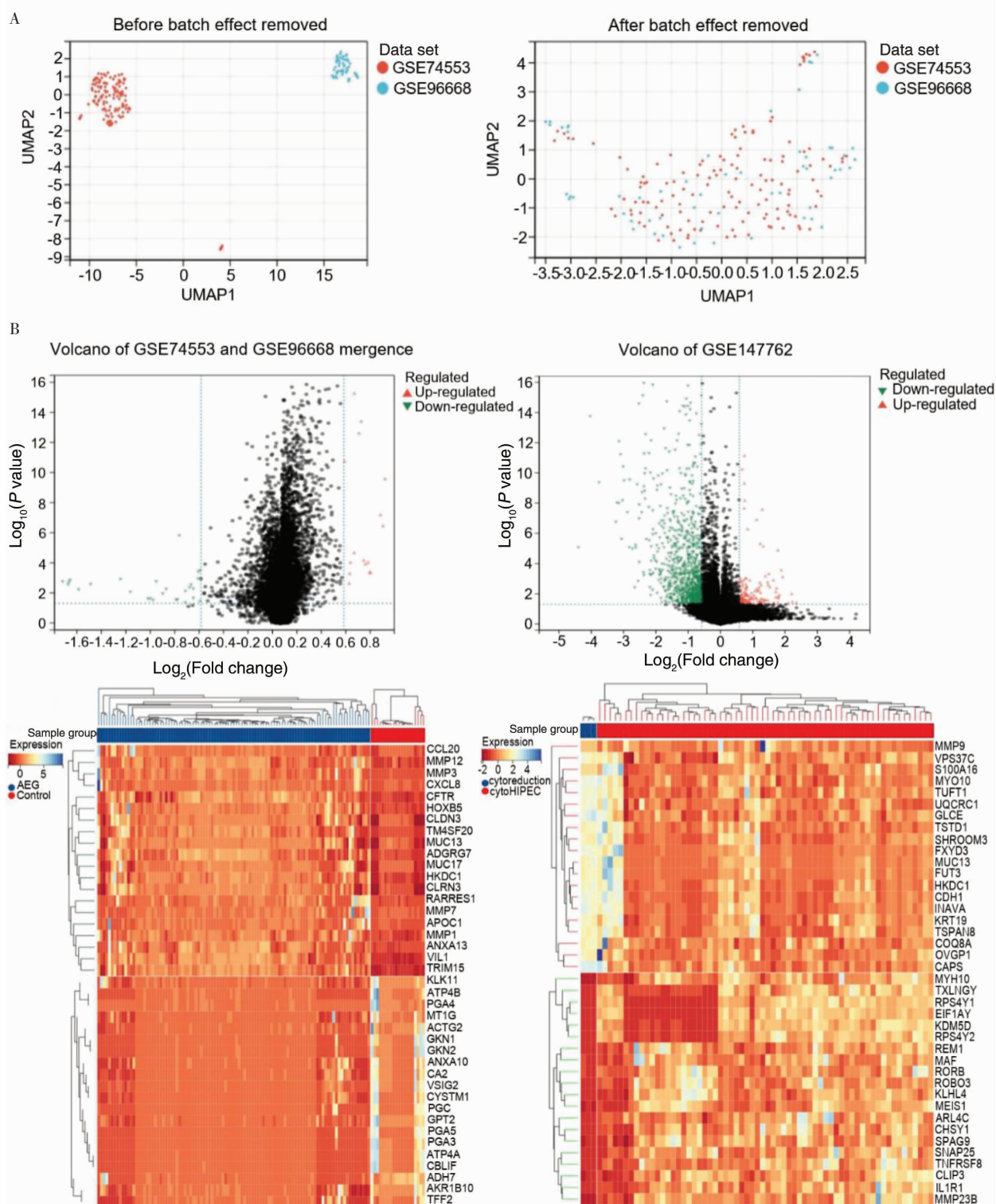
2.4 HKDC1、ANXA13 蛋白表达与 AEJ 临床病理特征的关系及对预后的影响

截至 2022 年 10 月 31 日,存活患者 10 例,存活率为 27.0%,中位 OS 为 31 (27.29~36.70) 个月,1、2、3 年及 40 个月总生存率分别为 81.1%、59.5%、35.1% 和 27.0%。HKDC1 阳性与阴性组相比, TNM 分期、脉管癌栓差异有统计学意义 ($P=0.031$ 、 $P<0.001$); ANXA13 阳性与阴性组比较, 仅 TNM 分期差异有统计学意义 ($P=0.024$) (Table 1)。

HKDC1 和 ANXA13 阳性表达患者的 40 个月总生存率分别为 21.7% 和 10.5%, 而 HKDC1 和 ANXA13 阴性表达患者的 40 个月总生存率分别为 35.7% 和 44.4%; HKDC1 阳性表达者中位 OS 明显短于阴性表达者 (30 个月 vs 38 个月, $\chi^2=4.344$, $P=0.040$, HR=2.69, 95% CI: 1.03~7.04)。ANXA13 阳性和阴性表达者中位 OS 分别为 19 个月和 37 个月, 差异有统计学意义 ($\chi^2=10.402$, $P=0.001$, HR=4.21, 95% CI: 1.68~10.56) (Figure 4)。

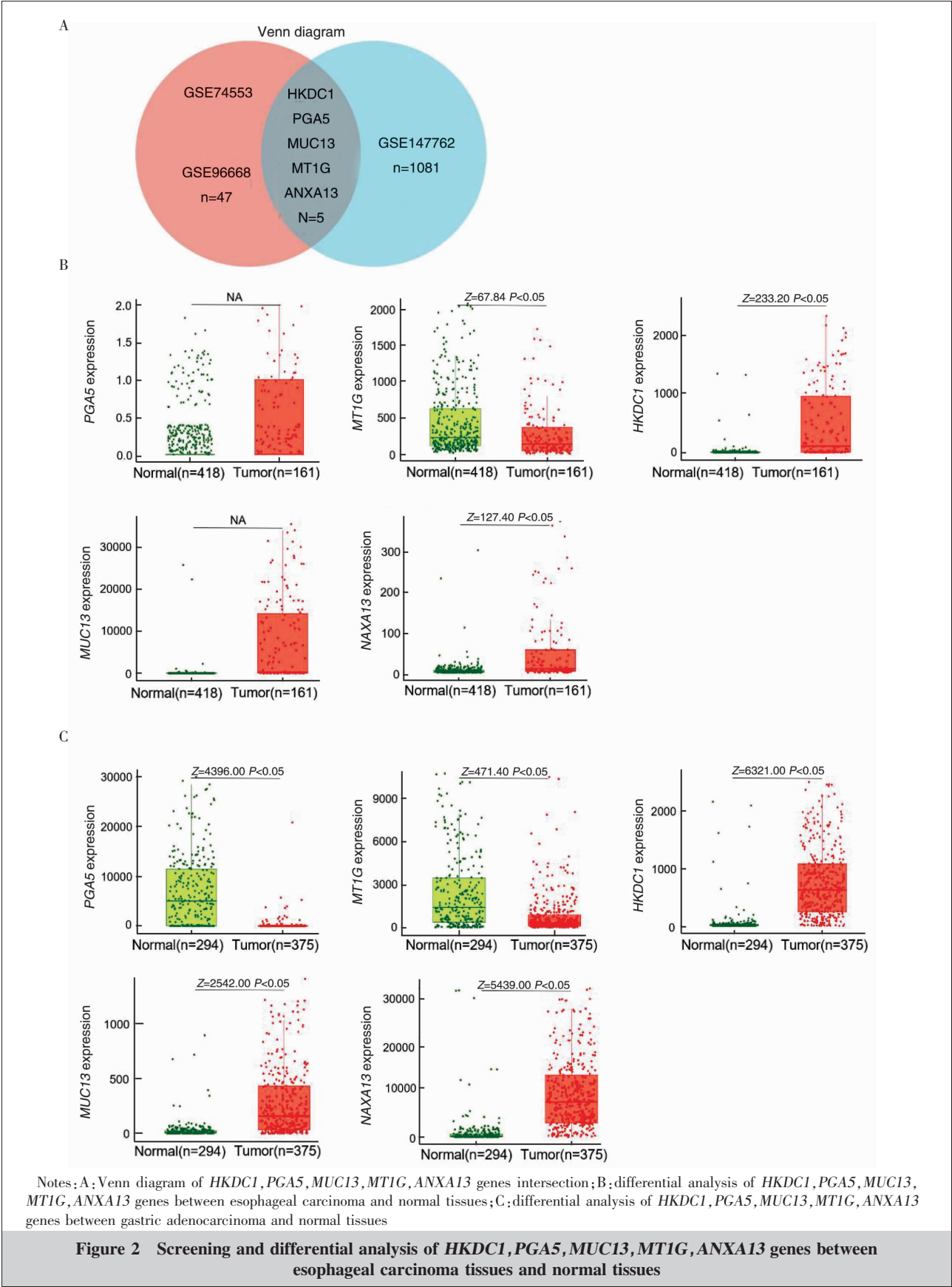
2.5 AEG 治疗后免疫细胞的表达情况及其与 HKDC1、ANXA13 表达的关系

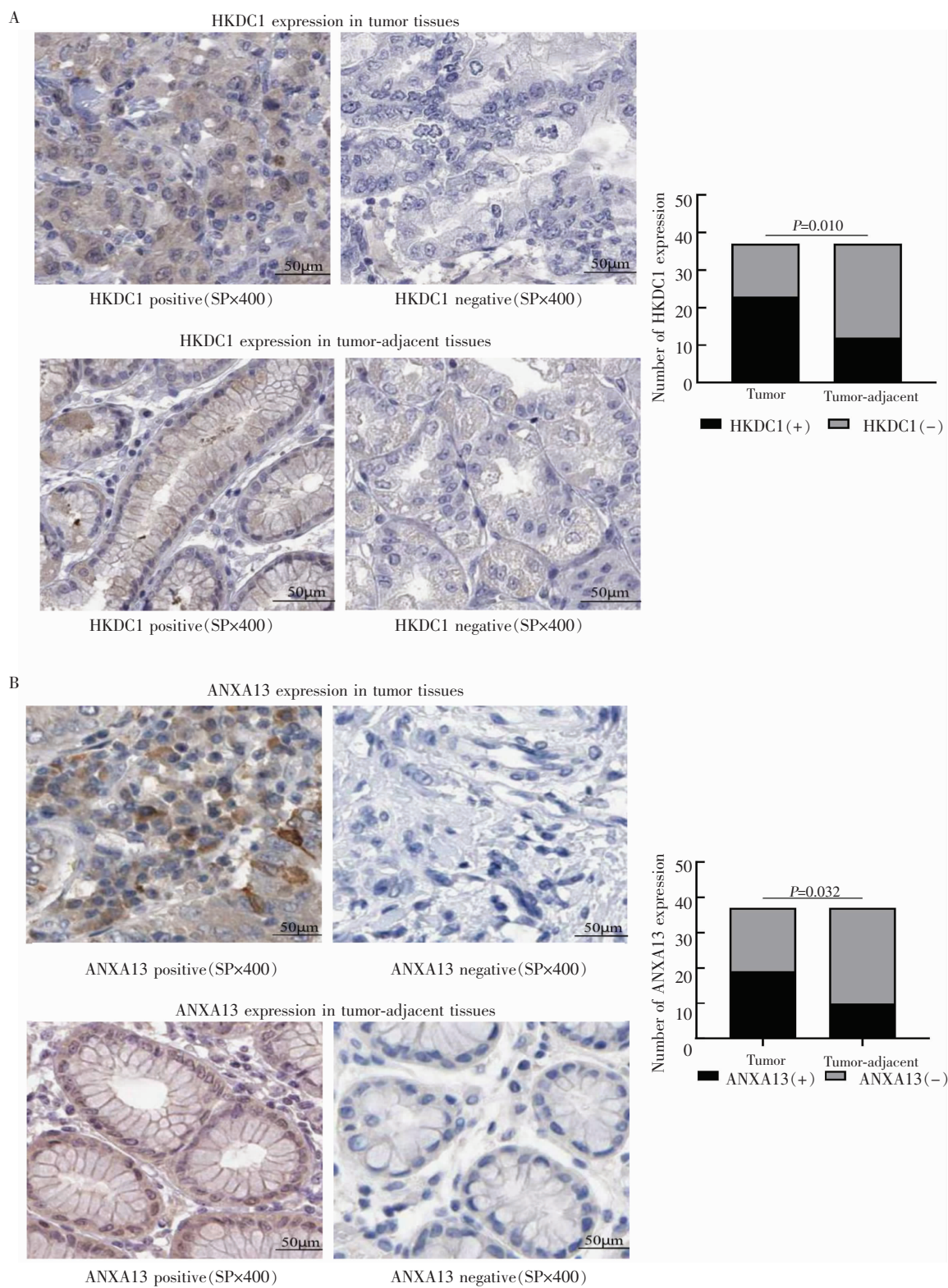
观察 AEG 术后辅助化疗联合 HIPEC 治疗患者



Notes: A: removal of batch effect in the GSE74553 and GSE96668 datasets; B: differential gene analysis of GSE74553, GSE96668 and GSE147762 datasets (volcano map and heat map)

Figure 1 Analysis of differential genes in adjuvant therapy of AEG





Notes:A:comparison of HKDC1 protein expression between AEG and tumor-adjacent tissues;B:comparison of ANXA13 protein between AEG and tumor-adjacent tissues

Figure 3 Comparison of HKDC1,ANXA13 protein expression between AEG and tumor-adjacent tissues

Table 1 Relationship of HKDC1 and ANXA13 protein expressions with clinical characteristics in AEG patients

Index	HKDC1				ANXA13			
	Positive (n=23)	Negative (n=14)	<i>t</i> / χ^2	<i>P</i>	Positive (n=19)	Negative (n=18)	<i>t</i> / χ^2	<i>P</i>
Age(years old)	58.96±9.40	53.29±12.44	1.076	0.125	59.53±11.34	53.94±9.81	1.598	0.119
Gender								
Female	10(43.5%)	3(21.4%)	1.857	0.173	8(42.1%)	5(27.8%)	0.833	0.362
Male	13(56.5%)	11(78.6%)			11(57.9%)	13(72.2%)		
Pathological grade								
G ₁	0	3(21.4%)	5.716	0.059	1(5.3%)	2(11.1%)	3.409	0.177
G ₂	6(26.1%)	4(28.6%)			3(15.8%)	7(38.9%)		
G ₃	17(73.9%)	7(50.0%)			15(78.9%)	9(50.0%)		
TNM stage								
II	3(13.1%)	2(14.3%)	8.312	0.031	2(10.5%)	3(16.6%)	8.846	0.024
III A	13(56.5%)	2(14.3%)			5(26.3%)	10(55.6%)		
III B	3(13.0%)	7(50.0%)			5(26.3%)	5(27.8%)		
III C	4(17.4%)	3(21.4%)			7(36.8%)	0		
Lymphovascular invasion								
No	0	7(50.0%)	14.183	<0.001	5(26.3%)	2(11.1%)	1.393	0.405
Yes	23(100.0%)	7(50.0%)			14(73.7%)	16(88.9%)		
Perineural invasion								
No	9(39.1%)	6(42.9%)	0.050	0.823	6(31.6%)	9(50.0%)	1.301	0.254
Yes	14(60.9%)	8(57.1%)			13(68.4%)	9(50.0%)		

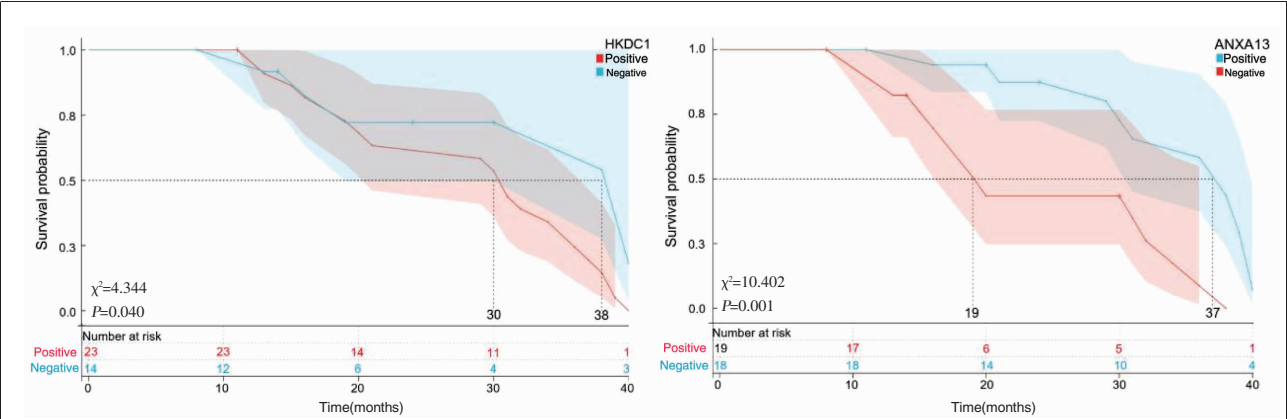


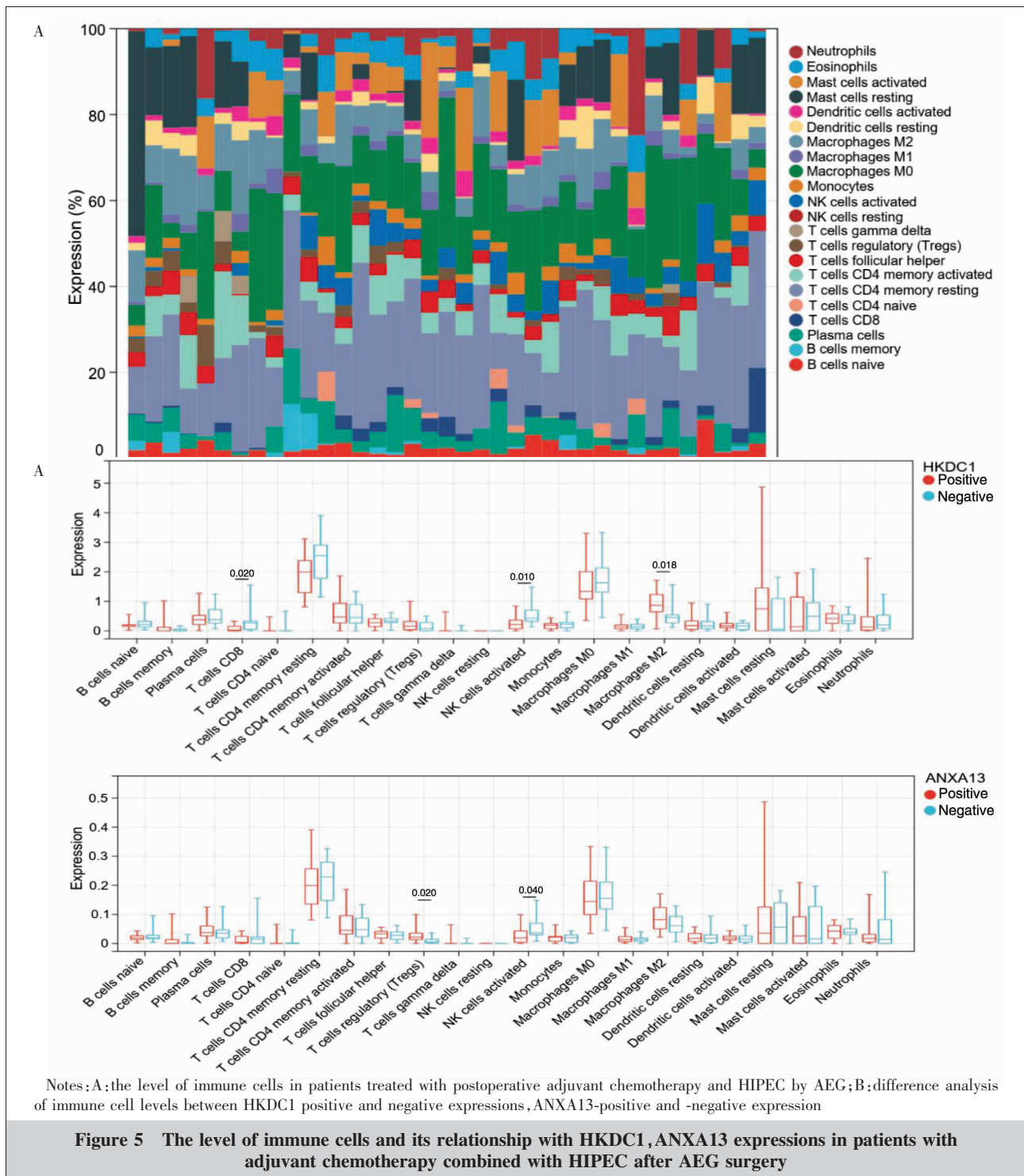
Figure 4 Effect of HKDC1 and ANXA13 expressions on prognosis of AEG patients

体内免疫细胞的水平，共检测出 22 种免疫细胞，主要富集的细胞有静息和效应记忆 CD4⁺ T 细胞(T cells CD4 memory resting/activated)、巨噬细胞 M0 和 M2 型(macrophages M0、M2)、静息和效应肥大细胞(mast cells resting/activated)、嗜酸性粒细胞(eosinophils)和中性粒细胞(neutrophils)，约占 73.40%。而 CD8⁺ T 细胞和调节 T 细胞 (T cells regulatory,Tregs) 约占 3.19%(Figure 5A)。与 HKDC1 阴性组相比,CD8⁺ T 细胞(T cells CD8)、效应 NK 细胞(NK cells activated)在 HKDC1 阳性组明显降低 ($t=2.58$ 、 2.60 , $P=0.020$ 、

0.010)，M2 型巨噬细胞在阴性组显著低于阳性组 (0.05 ± 0.04 vs 0.09 ± 0.04 , $t=2.95$, $P=0.018$)。与 ANXA1 阴性组相比,效应 NK 细胞在 ANXA13 阳性组明显降低 ($t=2.12$, $P=0.040$)，而调节 T 细胞(Tregs)显著升高($t=3.83$, $P=0.020$)(Figure 5B)。

3 讨 论

胃癌术后患者辅助化疗联合 HIPEC 的 Meta 数据分析 (包括 6 项随机对照试验和 10 项非随机研



究,共 1 700 例患者)结果发现,HIPEC 与 3 年(OR=1.89,95%CI:1.17~3.05) 和 5 年 (OR=1.87,95%CI:1.29~2.71)OS 显著改善相关。其中 HIPEC 的应用与总复发率和腹膜复发率降低相关,复发风险分别降低了 49%和 22%,提示 HIPEC 的治疗可预防胃癌术后患者的复发并提高生存时间^[16]。本研究中 AEG 患

者术后联合化疗+HIPEC 治疗的总生存率 (约 27.0%)明显低于相关研究^[17],究其原因可能与本研究患者的分期偏晚有关,其中脉管癌栓患者占 81.1%,神经浸润患者占 59.5%,这些都是导致患者预后差的危险因素。

为探讨 AEG 患者行 HIPEC 治疗的基因变化,

本研究通过 GEO 数据库筛选 AEG 的差异基因,结果显示,上调基因包括 *CCL20*、*MMP12*、*MMP3*、*CXCL8*、*CFTR*、*MUC13*、*HOXB5*、*CLDN3*、*HKDC1*、*ANXA13* 等 25 个,下调基因包括 *KLK11*、*ATP4B*、*PGA4*、*MT1G*、*ACTG2*、*PGA5*、*ADH7*、*TFF2*、*GPT2* 等 27 个。关于经 HIPEC 治疗的癌症数据集较少,仅 GSE147762 数据集是比较细胞减灭术与细胞减灭术+HIPEC 的基因,通过分析此数据集,本研究发现,147 个基因在 HIPEC 治疗中明显上调,而 939 个基因在 HIPEC 治疗中显著下调。将 AEG 差异基因与 GSE147762 数据集的差异基因进行集合,结果显示,两者共有 5 个差异基因,分别为 *HKDC1*、*PGA5*、*MUC13*、*MT1G*、*ANXA13*。糖酵解代谢是癌症能量的主要来源,糖酵解的异常是导致肿瘤进展的机制之一,*HKDC1* 是己糖激酶家族成员之一,其和己糖激酶 1、2 结合线粒体外膜调控葡萄糖-6-磷酸的合成进入糖酵解循环,在大部分正常组织中不表达,而在多种实体肿瘤中高表达,是肺癌预后不良的新的生物标志物^[18-19]。通过 TCGA、GEO、TARGET 和 GTex 数据库分析显示,*HKDC1* 和 *ANXA13* 在食管癌组织、胃癌组织中高表达,且明显高于正常组织。*ANXA13* 是多基因膜联蛋白超家族中的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,调控细胞生长和 Ca^{2+} 信号传导通路,研究证实,其参与 AEG 的发生及进展^[20-21]。为了进一步明确 *HKDC1* 和 *ANXA13* 在 AEG 中的表达,本研究采用免疫组化染色检测两者表达,结果显示,两者均分布在细胞膜及细胞质,且在 AEG 癌组织中表达显著高于癌旁组织。*HKDC1* 阳性与阴性表达患者相比,TNM 分期、脉管癌栓及 OS 差异有统计学意义,*ANXA13* 阳性与阴性表达患者 TNM 分期、OS 差异有统计学意义,提示 *HKDC1* 和 *ANXA13* 阳性表达的患者,TNM 分期较晚,预后较差。最新研究发现,*HKDC1* 在胃癌中过度表达,其上调与胃癌患者化疗耐药和不良预后相关,机制可能是 *HKDC1* 通过结合 G3BP1(一种癌蛋白)进而增强 DNA 激活催化亚基(PRKDC)转录的稳定性,重新编程脂质代谢诱导胃癌转移及化疗耐药,导致胃癌的进展^[15,22-23]。

HIPEC 辅助治疗不仅在解剖和癌细胞选择性上具有优势,而且可诱导免疫原性细胞死亡,导致死亡癌细胞释放损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns,DAMPs),而识别 DAMPs 的分子

被称为警报蛋白,其中,一个关键的警报蛋白家族是膜联蛋白的蛋白质,如 *ANXA11*、*ANXA13* 等,可激活树突状细胞的成熟和将癌性抗原呈递给 CD8^+ T 细胞^[24-25]。

有研究分析了腹膜转移癌经减灭术和 HIPEC 前后血免疫细胞的变化,结果提示 CD3^+ T 细胞、 $\text{CD3}^+/\text{CD4}^+$ T 细胞、 $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$ T 细胞、 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T 细胞、NK 细胞及 B 细胞在 HIPEC 治疗后显著升高,在晚期 AEG 术后患者行 HIPEC 后,也发现类似的结果,并伴有 Tregs、 CD4PD-1 细胞、 CD8PD-1 细胞的显著下降^[26-27],这些结果表明 HIPEC 不仅可调节免疫活性,而且改善细胞免疫功能。本研究除发现了 HIPEC 后患者血 CD8^+ T 细胞、 CD4^+ T 细胞、中性粒细胞、辅助 T 细胞、Tregs 外,还发现了 M0 及其亚型巨噬细胞和树突状细胞,表明 HIPEC 不仅调控免疫细胞的数量和种类,而且影响效应细胞的功能^[28]。本研究发现,与 *HKDC1* 阴性组相比, CD8^+ T 细胞、效应 NK 细胞在 *HKDC1* 阳性组明显降低,M2 型巨噬细胞显著升高。与 *ANXA11* 阴性组相比,效应 NK 细胞在 *ANXA13* 阳性组明显降低,而 Tregs 显著升高。*HKDC1* 分布在肺泡巨噬细胞,在胸腺瘤基因预后模型构建中,研究者发现 *HKDC1*、*ODZ1*、*CD1C* 等基因共同参与免疫微环境的调控,包括 M2 型巨噬细胞的增加, CD4^+ T 及 Tregs、树突状细胞的减少,说明 *HKDC1* 升高可能与 M2 型巨噬细胞数量增加有关,然而其调控巨噬细胞的机制仍不清楚^[29-30]。*ANXA13* 已被证实可直接或间接调节炎症和免疫活动,在自身免疫疾病如干燥综合征早期显著上调,可能与激活信号传导通路并将免疫细胞募集到损伤部位,与其受体结合以启动免疫反应有关^[25]。另外,*ANXA13* 可直接抑制树突状细胞分泌促炎细胞因子和下调共刺激分子的表达,阻止抑制性 T 细胞的活化,因此,调控 *ANXA13* 介导的免疫反应可能对癌症或自身免疫疾病患者有益^[31]。

本研究也存在一些不足,如 *HKDC1*、*ANXA13* 表达与临床病理特征的关系没有行 Cox 多因素回归分析,没有分析 *HKDC1*、*ANXA13* 的关系,*HKDC1*、*ANXA13* 与免疫细胞间的关系也没有进一步明确等。

综上所述,*HKDC1*、*ANXA13* 阳性表达的 AEG 患者 TNM 分期较晚、生存率降低。*HKDC1* 表达与 CD8^+ T、效应 NK、M2 型巨噬细胞水平有关;*ANX-*

A13 表达与效应 NK、Tregs 细胞水平有关。经 HIPEC 辅助治疗的 AEG 患者存在 HKDC1、ANXA13 的上调,不仅影响免疫细胞的数量,而且调控免疫细胞的功能。

参考文献:

- [1] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2021, 134(7): 783–791.
- [2] XU H, ZHANG L, MIAO J, et al. Patterns of recurrence in adenocarcinoma of the esophagogastric junction: a retrospective study[J]. *World J Surg Oncol*, 2020, 18(1): 144.
- [3] GÖTZE T O, PISO P, LORENZEN S, et al. Preventive HIPEC in combination with perioperative FLOT versus FLOT alone for resectable diffuse type gastric and gastroesophageal junction type II/III adenocarcinoma-the phase III “PREVENT”-(FLOT9) trial of the AIO/CAOGI/ACO[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1158.
- [4] 陈新华, 罗俊, 刘浩, 等. 腹腔热灌注化疗预防局部进展期胃癌根治术后腹膜复发的研究进展 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2018, 21(5): 593–599.
CHEN X H, LUO J, LIU H, et al. Progress in prophylactic hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for advanced gastric carcinoma [J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2018, 21(5): 593–599.
- [5] GUCHELAAR N, NOORDMAN B J, KOOLEN S, et al. Intraperitoneal chemotherapy for unresectable peritoneal surface malignancies[J]. *Drugs*, 2023, 83(2): 159–180.
- [6] FILIS P, KANELLOPOULOU A, GOGADIS A, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for management of gastrointestinal and biliary tract malignancies: a systematic review and meta-analysis of randomized trials[J]. *Ann Gastroenterol*, 2023, 36(1): 87–96.
- [7] WHITE M G, BADGWELL B. Oncologic components of HIPEC: key question: in patients with gastric or colorectal adenocarcinoma metastatic to the peritoneum, does cytoreductive surgery (CRS) plus hyperthermic intraperitoneal perfusion with chemotherapy (HIPEC) prolong survival or increase the risk of complications relative to CRS alone?[J]. *Ann Surg Oncol*, 2022, 29(11): 6561–6564.
- [8] IMAMURA Y, WATANABE M, OKI E, et al. Esophagogastric junction adenocarcinoma shares characteristics with gastric adenocarcinoma: literature review and retrospective multicenter cohort study [J]. *Ann Gastroenterol Surg*, 2020, 5(1): 46–59.
- [9] YOSHIDA T, OGURA G, TANABE M, et al. Clinicopathological features of PD-L1 protein expression, EBV positivity, and MSI status in patients with advanced gastric and esophagogastric junction adenocarcinoma in Japan [J]. *Cancer Biol Ther*, 2022, 23(1): 191–200.
- [10] SONG D, TIAN J, HU Y, et al. Identification of biomarkers associated with diagnosis and prognosis of gastroesophageal junction adenocarcinoma-a study based on integrated bioinformatics analysis in GEO and TCGA database[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2020, 99(51): e23605.
- [11] POLI-NETO O B, CARLOS D, JUNIOR F A, et al. Eutopic endometrium from women with endometriosis and chlamydial endometritis share immunological cell types and DNA repair imbalance: a transcriptome meta-analytical perspective[J]. *J Reprod Immunol*, 2021, 145: 103307.
- [12] BARTHA Á, GYÖRFFY B. TNMplot.com: a web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and metastatic tissues[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2622.
- [13] ZHU L, XU Z, WU Y, et al. Prophylactic chemotherapeutic hyperthermic intraperitoneal perfusion reduces peritoneal metastasis in gastric cancer: a retrospective clinical study[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 827.
- [14] NEWMAN A M, STEEN C B, LIU C L, et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7): 773–782.
- [15] WANG M Q, CHEN Y R, XU H W, et al. HKDC1 upregulation promotes glycolysis and disease progression, and confers chemoresistance onto gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(4): 1365–1377.
- [16] PATEL M, ARORA A, MUKHERJEE D, et al. Effect of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) on survival and recurrence rates in advanced gastric cancer-a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Surg*, 2023, 109(8): 2435–2450.
- [17] NIE R C, LUO T Q, LI G D, et al. Adjuvant chemotherapy for patients with adenocarcinoma of the esophagogastric junction: a retrospective, multicenter, observational study [J]. *Ann Surg Oncol*, 2023, 30(7): 4014–4025.
- [18] XU Z, ZHANG S, NIAN F, et al. Identification of a glycolysis-related gene signature associated with clinical outcome for patients with lung squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(12): 4017–4029.
- [19] FAROOQ Z, ISMAIL H, BHAT S A, et al. Aiding cancer’s “sweet tooth”: role of hexokinases in metabolic reprogramming[J]. *Life(Basel)*, 2023, 13(4): 946.

- [20] XUE G L, ZHANG C, ZHENG G L, et al. Annexin A13 predicts poor prognosis for lung adenocarcinoma patients and accelerates the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells by modulating epithelial-mesenchymal transition [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2020, 34(6): 687–696.
- [21] DISLICH B, KRÖLL D, LANGER R. Surgical pathology of adenocarcinomas arising around or within the gastroesophageal junction[J]. *Updates Surg*, 2023, 75(2):395–402.
- [22] YU C, BAO T T, JIN L, et al. HKDC1 silencing inhibits proliferation and glycolysis of gastric cancer cells [J]. *J Oncol*, 2023, 2023:3876342.
- [23] ZHAO P, YUAN F, XU L, et al. HKDC1 reprograms lipid metabolism to enhance gastric cancer metastasis and cisplatin resistance via forming a ribonucleoprotein complex [J]. *Cancer Lett*, 2023, 569:216305.
- [24] FIORENTINI C, SARTI D, GUADAGNI S, et al. Immune response and locoregional treatments for peritoneal carcinomatosis[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2022, 371:97–116.
- [25] PECK A B, AMBRUS J L J R. A temporal comparative RNA transcriptome profile of the annexin gene family in the salivary versus lacrimal glands of the sjögren's syndrome-susceptible C57BL/6.NOD-Aec1Aec2 mouse[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19):11709.
- [26] FIORENTINI G, SARTI D, PATRITI A, et al. Immune response activation following hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal metastases: a pilot study[J]. *World J Clin Oncol*, 2020, 11(6):397–404.
- [27] NIE Z, HUANG Y, LI S, et al. Effect of operation-introducing hyperthermic intraperitoneal chemotherapy on cellular immune function in patients with adenocarcinoma of the esophagogastric junction[J]. *Asian J Surg*, 2022, 45(1): 559–560.
- [28] CHIA D, DEMUYTERE J, ERNST S, et al. Effects of hyperthermia and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion on the peritoneal and tumor immune contexture[J]. *Cancers(Basel)*, 2023, 15(17):4314.
- [29] KHAN M W, DING X, COTLER S J, et al. Studies on the tissue localization of HKDC1, a putative novel fifth hexokinase, in humans [J]. *J Histochem Cytochem*, 2018, 66(5): 385–392.
- [30] YANG Y, XIE L, LI C, et al. Prognostic model of eleven genes based on the immune microenvironment in patients with thymoma[J]. *Front Genet*, 2022, 13:668696.
- [31] LINKE B, ABELER-DÖRNER L, Jahndel V, et al. The tolerogenic function of annexins on apoptotic cells is mediated by the annexin core domain[J]. *J Immunol*, 2015, 194(11):5233–5242.

《肿瘤学杂志》关于论文中基金项目标注的要求

获得基金/课题、计划等资助的论文应在论文首页地脚以“基金项目:”作为标识,注明基金项目名称(标准的书面全称,避免使用不规范的口头缩略语),并在圆括号内注明其项目编号(基金项目批准文号)。

基金项目名称应按照国家有关部门规定的正式名称填写,多项基金应依据基金级别依次列出,其间以“;”隔开。同一基金涉及多个项目,其间以“,”隔开连排,句末不加标点。示例如下:

基金项目:国家自然科学基金(81774233,81602088);“十一五”国家高技术研究发展计划(2006AA05Z102);浙江省教育科学规划课题(2020SCG307)

凡是标注基金项目的论文,在投稿时应同时邮寄体现基金项目名称全称及批准文号的相关通知复印件(全文),或扫描件其电子文档以附件形式上传至投审稿系统。