

# 白三烯B4受体在急性髓系白血病中的预后价值和功能富集分析

张晓宁<sup>1</sup>, 张晓瑜<sup>2</sup>, 刘鹏<sup>1</sup>, 刘阔<sup>1</sup>, 李文文<sup>1</sup>, 陈倩倩<sup>1</sup>, 马万山<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)检验医学//山东省医药卫生临床检验诊断学重点实验室, 山东 济南 250014; <sup>2</sup>济南市第五人民医院肾内科, 山东 济南 250022

**摘要:**目的 运用生物信息学分析白三烯B4受体(LTB4R)在急性髓系白血病(AML)患者中的表达模式、预后价值和潜在生物学功能。方法 从癌症基因组图谱(TCGA)数据库和美国国立生物技术信息中心(NCBI)公共基因芯片数据平台(GEO)下载 mRNA 基因芯片数据集和临床基线资料数据集,利用 R studio 进行表达分析、生存分析、Cox 风险回归分析、相关性分析研究 LTBR 的表达模式和预后价值。利用 UALCAN 平台研究 LTBR 表达水平与临床特征的关联。利用 linkedomics 平台筛选出 LTBR 共表达基因进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析。应用 STRING 平台构建蛋白质相互作用网络。基于 LTBR 表达水平将 LAML 数据集分组并筛选差异表达基因,继而进行 GSEA 分析。收集临床 30 例 AML 患者及 21 例健康对照者外周静脉抗凝血 2 mL,分离单个核细胞,采用 qRT-PCR 对 LTBR 和免疫检查点基因表达水平、相关性进行验证;分离外周血 500  $\mu$ L 血清,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 LTBR 蛋白表达水平。结果 LTBR 表达水平在 AML 患者骨髓样本中显著增强(4.898 $\pm$ 1.220 vs 2.252 $\pm$ 0.215,  $P < 0.001$ ),与不良预后相关[ $P = 0.004$ , 风险指数(HR)=1.74],并可做为 AML 预后的独立风险因素( $P = 0.019$ , HR=1.66)。同时 LTBR 与 FAB 分型、细胞遗传学风险、染色体异常、NPM1 突变相关。LTBR 的共表达基因富集到多个肿瘤发生相关的信号途径,例如粒细胞炎症、淋巴细胞激活、免疫反应信号传导、能量代谢等。GSEA 分析显示差异基因富集于免疫细胞分化、活化、细胞因子信号途径等。临床实验证实 AML 患者样本中 LTBR mRNA ( $P = 0.044$ )及蛋白表达水平增高( $P = 0.008$ ),并且 mRNA 表达水平与 HAVCR2 呈正相关( $r = 0.466$ ,  $P = 0.040$ )。结论 LTBR 可做为 AML 的新型标志物和独立预后指标,潜在功能富集于肿瘤免疫、代谢相关信号通路,可为 AML 疾病进程相关信号通路和分子网络研究提供线索。  
**关键词:**急性髓系白血病;白三烯B4受体;生物信息学;预后;功能富集;免疫浸润

## Prognostic implications and functional enrichment analysis of LTBR in patients with acute myeloid leukemia

ZHANG Xiaoning<sup>1</sup>, ZHANG Xiaoyu<sup>2</sup>, LIU Peng<sup>1</sup>, LIU Kuo<sup>1</sup>, LI Wenwen<sup>1</sup>, CHEN Qianqian<sup>1</sup>, MA Wanshan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University & Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Shandong Medicine and Health Key Laboratory of Laboratory Medicine, Jinan 250014, China; <sup>2</sup>Department of Nephrology, Fifth People's Hospital of Jinan, Jinan 250022, China

**Abstract: Objective** To explore the expression patterns, prognostic implications, and biological role of leukotriene B4 receptor (LTBR) in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** We collected the data of mRNA expression levels and clinical information of patients with AML from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus (GEO) database for mRNA expression analyses, survival analyses, Cox regression analyses and correlation analyses using R studio to assess the expression patterns and prognostic value of LTBR. The correlation of LTBR expression levels with clinical characteristics of the patients were analyzed using UALCAN. The co-expressed genes LTBR were screened from Linkedomics and subjected to functional enrichment analysis. A protein-protein interaction network was constructed using STRING. GSEA analyses of the differentially expressed genes (DEGs) were performed based on datasets from TCGA-LAML stratified by LTBR expression level. We also collected peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from AML patients and healthy donors for examination of the mRNA expression levels of LTBR and immune checkpoint genes using qRT-PCR. We also examined serum LTBR protein levels in the patients using ELISA. **Results** The mRNA expression level of LTBR was significantly increased in AML patients (4.898 $\pm$ 1.220 vs 2.252 $\pm$ 0.215,  $P < 0.001$ ), and an elevated LTBR expression level was correlated with a poor overall survival (OS) of the patients ( $P = 0.004$ , HR=1.74). LTBR was identified as an independent prognostic factor for OS ( $P = 0.019$ , HR=1.66) and was associated with FAB subtypes, cytogenetic risk, karyotype abnormalities and NPM1 mutations. The co-expressed genes of LTBR were enriched in the functional pathways closely associated with AML leukemogenesis, including neutrophil inflammation, lymphocyte activation, signal transduction, and metabolism. The DEGs were enriched in differentiation, activation of immune cells, and cytokine signaling. Examination of the clinical serum samples also demonstrated significantly increased expressions of LTBR mRNA ( $P = 0.044$ ) and protein ( $P = 0.008$ ) in AML patients, and LTBR mRNA expression was positively correlated with the expression of the immune checkpoint HAVCR2 ( $r = 0.466$ ,  $P = 0.040$ ). **Conclusion** LTBR can serve as a novel biomarker and independent prognostic indicator of AML and its expression patterns provide insights into the crosstalk of leukemogenesis signaling pathways involving tumor immunity and metabolism.  
**Keywords:** acute myeloid leukemia; leukotriene B4 receptor; bioinformatics; prognosis; functional enrichment; immune infiltration.

收稿日期:2021-12-30

基金项目:国家自然科学基金(81602087);山东省自然科学基金(ZR2021MH222)

Supported by National Nature Science Foundation of China (81602087).

作者简介:张晓宁,副主任技师,硕士生导师,E-mail: xiaoning.cheung@163.com;张晓瑜,主治医师,硕士,E-mail: 292502025@qq.com。张晓宁、张晓瑜共同为第一作者

通信作者:马万山,教授,博士生导师,E-mail: mwsqianyi@163.com

急性髓系白血病(AML)是一种以原始造血细胞无序增殖为特征的骨髓恶性肿瘤,发病率和死亡率随着年龄的增长而增加。由于该疾病的遗传学复杂性,世界卫生组织(WHO)分类和诊断标准(2016版)除临床特征、形态学和免疫表型外,还纳入了多种重现性细胞遗传学和分子遗传学特征,如PML-RAR $\alpha$ 、RUNX1-RUNX1T1、FLT3-ITD、TP53、DNMT3A和NPM1突变等<sup>[1]</sup>。目前,临床工作者主要通过年龄、细胞遗传学异常和特定基因突变来评估AML患者的预后。然而,大约有40% AML患者被归类为中危患者,其中大多数未携带常见的核型异常或基因改变。随着医疗技术的进步,近10年来,AML治疗方案也有较大改观。AML风险分层策略和预后评估方案已不能满足临床需要。二代测序技术的广泛应用,肿瘤公共数据库海量的测序和临床信息为基因标志物筛选提供了技术基础。国内外科学家已经进行了多项研究来寻找新型预后生物标志物并改善不同AML亚组的风险分层和预后评估<sup>[2]</sup>。肿瘤发生、进展相关重要信号通路,比如免疫微环境、铁死亡、脂质和能量代谢、DNA修复和损伤有关的基因组经过生物信息学模型处理可以作为预后判断的工具<sup>[3-5]</sup>。HMGA2<sup>[6]</sup>、FHL1、HOPX和FAM124B<sup>[7]</sup>等基因特征被证实为有效的单个预后分子指标。但是这些基因标志物的临床应用比较局限。由于参与肿瘤发生的信号通路基因之间相互调节、影响,有必要挖掘潜在的AML新型基因标志物,完善肿瘤调控信号通路网络机制。我们前期利用公共数据库筛选了TCGA-AML队列中的多个预后相关基因,这些基因大部分未见诸报道,其预测准确性和有效性也未经过临床实验验证。本项研究中,我们通过生物信息学分析探讨了AML肿瘤患者骨髓组织白三烯B4受体(LTB4R)的异常表达水平、预后价值和潜在生物学功能,并收集临床标本进行了初步验证。LTB4R,又称BLT1,是LTB4的高亲和力受体,二者相互作用不仅可募集不同类型的炎症细胞、激活炎症反应,也可作用于非免疫细胞启动和/或放大各种组织中的病理性炎症,在肿瘤组织中二者作用于不同的靶细胞呈现出更为复杂的抑癌或促癌效应<sup>[8]</sup>。已有研究报道LTB4R与实体肿瘤预后的相关性及其作为治疗靶点的潜力,如LTB4R在胰腺癌<sup>[9]</sup>、表皮肿瘤<sup>[10]</sup>、结肠癌<sup>[11]</sup>组织过表达,促进肿瘤细胞增殖,调控细胞周期、诱导凋亡。另外,也可通过MMP-2途径增强乳腺癌细胞的侵袭性<sup>[12]</sup>,小鼠皮下肿瘤模型中证实LTB4R介导CTL细胞在肿瘤组织中的浸润<sup>[13]</sup>。肿瘤免疫微环境在肿瘤发生、发展、转移、侵袭过程中发挥重要作用,因此调控免疫功能可能是预防和治疗肿瘤的手段之一。针对AML患者的免疫治疗手段也在不断发展。目前,LTB4R在AML中的表达模式、预后价值,及其是否或如何影响AML患者

的免疫微环境尚未见报道。本研究运用生物信息学工具分析了LTB4R在AML患者中的表达模式、预后价值和潜在生物学功能。

## 1 资料和方法

### 1.1 资料

1.1.1 样本及试剂 本研究分析的数据集由美国国家癌症研究所(NCI)TCGA癌症(TCGA-LAML)<sup>[14]</sup> <https://portal.gdc.cancer.gov/>、GTEx(正常组织)<sup>[15]</sup> <https://gtexportal.org/home/datasets>和Gene Expression Omnibus(GEO: GSE12417)<sup>[16]</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>下载。数据集TCGA-LAML于2020年1月更新,纳入173例AML患者,包含高通量测序(RNA-Seq)数据,其中151例含详细的临床信息(140例含预后信息)、细胞遗传学和分子突变信息,以上数据集执行R studio数据清洗“dplyr”包删失信息不全的病例后纳入生存分析和Cox回归分析。

AML患者( $n=30$ )及健康对照者( $n=21$ )外周血样本2020年2月~2022年1月于山东第一医科大学第一附属医院收集,EDTA-K2抗凝血用于分离外周血单个核细胞,促凝血1500 r/min离心5 min后分离血清保存至 $-80^{\circ}\text{C}$ 备用。AML外周血样本经人工镜检分类筛选,白血病原始细胞比例 $\geq 20\%$ 或 $>2000/\mu\text{L}$ 的样本( $n=19$ )纳入本研究<sup>[17]</sup>。实验前均获得患者知情同意。本研究经山东第一医科大学第一附属医院伦理委员会批准,批号为:2021[伦审字(S092号)]。

Ficoll淋巴细胞分离液(天津灏洋), Trizol (Invitrogen), ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo), SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒 (Toyobo), 实时荧光定量PCR扩增仪ABI QuantStudio 5 (ABI)。 $\beta$ -actin、LTB4R、HAVCR2、PDCD1引物由上海生工合成,序列如下: $\beta$ -actin\_180 bp: F: 5'-CTCAC GAACTGGAATAAGC-3'; R: 5'-AAGCCACACGTA CTAAAGGT-3'; LTB4R\_162 bp: F: 5'-AGCTTTGTG GTGTGGAGTATCC-3', R: 5'-GCAACCAGCCAGTC CAAAAC-3'; HAV-CR2\_75 bp: F: 5'-CTGCTGCTAC TACTTACAAGGTC-3', R: 5'-GCAGGGCAGATAGG CATTCT-3'; PDCD1\_137 bp: F: 5'-CCAGGATGGTTC TTAGACTCCC-3', R: 5'-TTTAGCACGAAGCTCTCC GAT-3'。人LTB4R酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒购自上海凡科维公司,检测范围1~55 pg/mL。酶标仪为Thermo Multiskan Go。

1.1.2 数据库 利用基于网络生物信息学平台,如Prognoscan<sup>[18]</sup>、Linkedomics<sup>[19]</sup>、UALCAN<sup>[20]</sup>和WebGestalt<sup>[21]</sup>和STRING<sup>[22]</sup>(<https://string-db.org/>)进行生存分析、相关性分析、共表达基因筛选、功能富集分析



和蛋白相互作用PPI(protein-protein interaction)网络构建。利用R包“UpSetR”绘制Upset图可视化共表达基因与免疫浸润、DNA损伤修复、能量代谢、EMT相关基因的交集情况。采用R包“GSVA”内置ssGSEA算法分析TCGA-LAML数据集中LTB4R与24种免疫细胞标志、免疫检查点基因相关性<sup>[23]</sup>。

## 1.2 方法

1.2.1 生存分析 通过数据清洗纳入了TCGA-LAML数据集中140名具有高通量测序(RNA-Seq)和完整预后信息的AML患者。生存分析结果由Kaplan-Meier曲线显示。TimeROC(v 0.4)分析用以比较单个基因或基因组的预测特异性及灵敏性。以上利用R包“survival”、“survminer”、“pROC”和“ggplot2”分析绘图。

1.2.2 单因素和多因素Cox回归分析 采用Cox回归分析来筛选TCGA-LAML队列( $n=140$ )中的预后候选基因。使用“survival”、“survminer”、“forestplot”R包绘制森林图。年龄、细胞遗传风险和基因突变被视为分类变量,而白细胞计数和原始细胞百分比视为连续变量。采用每个基因的表达水平中位数为介值分组。

1.2.3 基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析 我们利用(<http://www.webgestalt.org/option.php>)平台对LTB4R及Top200共表达基因进行功能富集分析。选择内置的参考人类蛋白质编码基因组作为背景参数。通过“ggplot”和“dplyr”R包生成气泡图。 $(-\log_{10})P$ 值 $>1.3$ 被认为富集到有意义的信号通路。

1.2.4 基因集富集分析(GSEA)分析 TCGA-LAML数据集基于LTB4R表达中位数分为两组,采用R包“DESeq2”筛选差异基因。对所有差异基因进行GSEA功能富集分析, $P<0.05$ ,FDR $<0.25$ 认为富集到有意义的信号通路。

1.2.5 实时荧光定量PCR Ficoll淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,Trizol法提取总RNA,使用ReverTra Ace qPCR RT kit获得互补cDNA。使用SYBR Green Realtime PCR Master Mix试剂盒在ABI QuantStudio 5PCR仪上进行PCR扩增。设阴性对照2复孔,每个样本设2个复孔,内对照为 $1\times$ ROX,PCR循环条件如下:预变性 $95^{\circ}\text{C}$  60 s,40个循环 $95^{\circ}\text{C}$  15 s, $60^{\circ}\text{C}$  15 s, $72^{\circ}\text{C}$  45 s。mRNA表达水平半定量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。

1.2.6 酶联免疫吸附实验(ELISA) 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。每孔加 $50\mu\text{L}$ 样本(血清1:5稀释)。用酶标仪测定吸光度( $A_{450\text{nm}}$ ),通过标准曲线计算样品中人白三烯B4受体(LTB4R)浓度。每孔读取3次取平均值。

1.2.7 统计学分析 基因表达TPM(每千碱基百万读数的转录本)格式的RNAseq数据通过UCSC XENA(<https://xenabrowser.net/datapages/>)中的Toil流程进行

处理<sup>[24]</sup>。定量数据经过正态检验,非正态分布数据用中位数和四分位距表示(mean $\pm$ IQR)。Mann-Whitney U检验用于评估两个独立样本中 $\log_2(\text{TPM}+1)$ 水平的差异。散点图是通过R studio(3.6.3)中的“ggplot2”R包绘制。生存分析 $P$ 值和风险系数(HR)由单因素Cox风险回归和对数秩检验生成。临床资料基线分析将数据集TCGA-LAML( $n=140$ )基于LTB4R表达水平的中值作为临界值分为高表达组和低表达组,基因表达与临床特征之间的关系采用Chi-square检验,Wilcoxon rank sum检验或Fisher精确检验。正态分布数据以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间比较采用Student  $t$ 检验。相关性分析采用Spearman检验。使用R studio 3.6.3和Excel软件进行统计学分析和可视化。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LTB4R mRNA在AML患者中的表达水平及预后价值

利用R studio分析TCGA数据库来源的泛癌组织中LTB4R基因的转录水平(图1A)。散点图显示AML患者骨髓样本(TCGA-LAML, $n=173$ )中LTB4R转录水平显著高于正常组织(GTEX, $n=70$ )( $4.898\pm 1.220$  vs  $2.252\pm 0.215$ , $P<0.001$ )。我们对基因表达数据和生存期进行了单变量Cox比例风险回归分析筛选出TCGA-LAML数据集( $n=140$ )中2563个预后相关基因(Cox  $P<0.01$ ),其中LTB4R mRNA高表达与总生存期(OS)显著相关(HR=1.42,95% CI: 1.13-1.79;Cox  $P=0.003$ )。随后利用R studio(图1B)和PrognoScan平台(图1C)不同数据处理算法评估LTB4R基因在AML患者中的预后价值。Kaplan-Meier(KM)曲线图显示在TCGA-LAML数据集(数据清洗后 $n=140$ )中LTB4R异常表达与总生存期(OS)相关(HR=1.74,95% CI: 1.14-2.67;  $P=0.011$ ),LTB4R高表达组的中位生存时间为11.2月,低表达组为27.4月。LTB4R的预后价值用PrognoScan平台进行了验证,Cox风险回归分析显示在细胞遗传学正常的AML数据集GSE12417[(AMLCG(2004), $n=79$ ,HR=1.72,95% CI: 1.06-2.77;  $P=0.027$ ,图1C)中LTB4R过表达是OS的危险因素。利用时间操作特征(TimeROC)分析确定预测准确性。曲线下面积(AUC)分别为1年AUC=0.613、3年AUC=0.675、5年AUC=0.748(图1D)。

### 2.2 LTB4R可作为AML的独立预后指标

多种临床特征如年龄、白细胞计数、原始细胞百分比和细胞遗传学异常,都可能会影响AML患者的预后。既往有多项基于全基因组测序的AML预后相关变量的筛选研究,FHL1、HOPX、HMGA2和FAM124B被证实为预后候选基因<sup>[6,7]</sup>。本研究在此基础上运用单因素

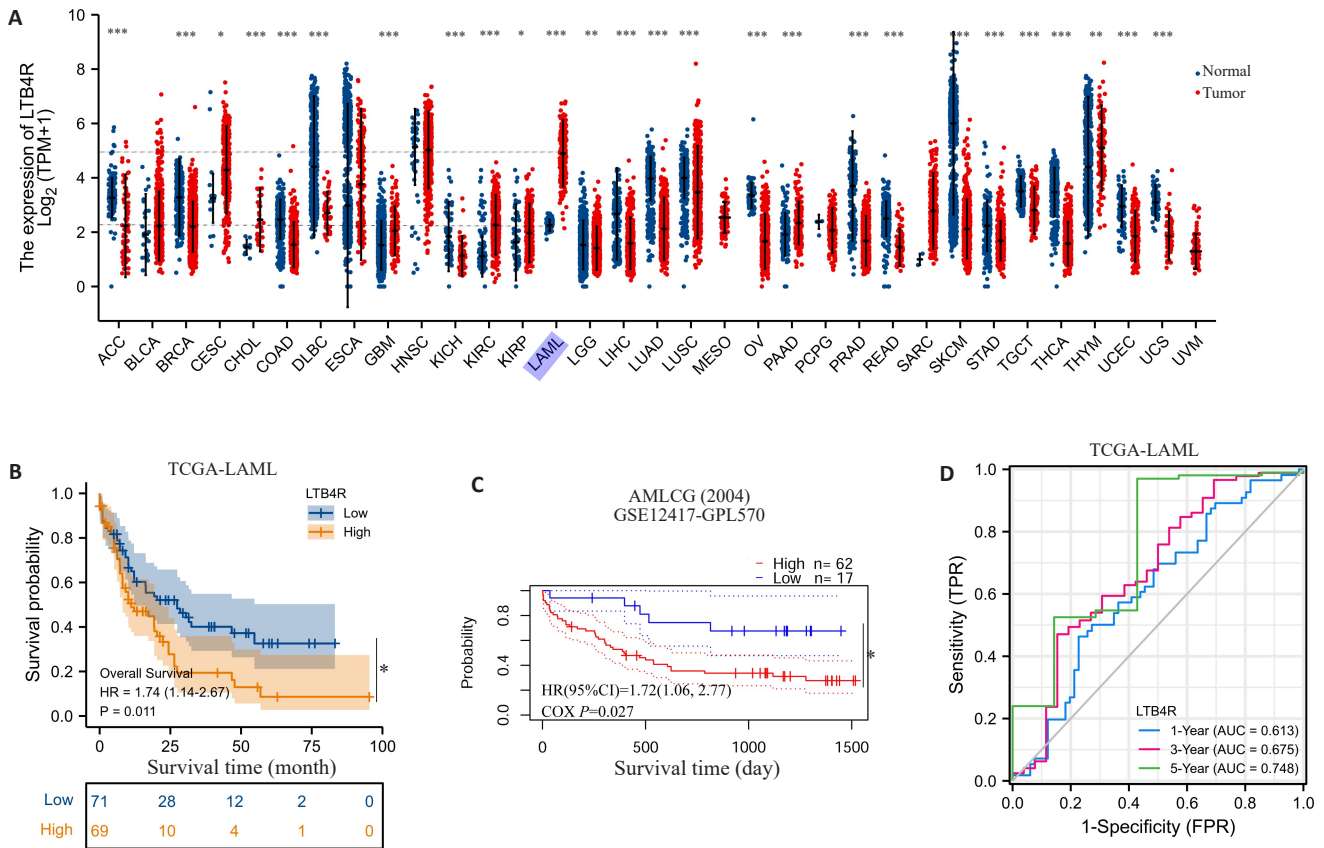


图1 LTB4R表达模式及预后分析

Fig.1 Expression patterns and prognostic implications of LTB4R. **A:** LTB4R expression profile in pan-cancer from TCGA. LTB4R mRNA levels were analyzed in RNA-Seq datasets from TCGA and GTEx. Transcriptional levels were normalized by log<sub>2</sub>(TPM+1). Mann-Whitney U test was used to compare the expression levels between tumors and normal tissues, with error bars indicating median values±IQR. The gray dot line represents the median mRNA level in AML and normal samples. **B:** Prognostic Kaplan-Meier (KM) curve of LTB4R in TCGA-LAML (n=140). **C:** Prognostic value of LTB4R in the AML CG (1999-2003) cohort (n=79, GSE12417-GPL97) analyzed by the Prognoscan platform. **D:** Prognostic prediction accuracy of LTB4R evaluated by TimeROC analysis. TPM: Transcription per thousand bases per million maps read; IQR: Quartile; OS: Overall survival; HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval; ROC: Subject work characteristic curve; AUC: Area under the curve; \*P<0.05.

和多因素 Cox 风险回归分析,以确定 LTB4R 是否可作为 AML OS 独立预后因子。联合 LTB4R 纳入分析的变量包括年龄(≥60 岁)、外周血白细胞计数和原始细胞百分比、常见细胞遗传学异常或治疗靶点 (FLT3 突变、DNMT3A 突变和 TP53 突变)、预后基因指标 (HMGA2、FHL1、HOPX 和 FAM124B) (图 2)。图 2A 森林图显示年龄、FAB 分型、细胞遗传学风险、LTB4R (HR=1.825; 95% CI: 1.188-2.802; P=0.006)、FHL1、HOPX、FAM124B 均表现出风险预测价值,多因素分析则证实 LTB4R、年龄和 FAM124B 为独立预后风险因子,其中 LTB4R 显示出较强的独立风险预测价值(P=0.019,HR=1.864,95% CI: 1.107-3.136,图 2B)。

### 2.3 LTB4R 表达水平与临床指标相关性分析

1970~80 年代沿用的急性髓系白血病 FAB 分型 (M0-M7) 主要基于形态学和细胞化学染色<sup>[25]</sup>。随着分子生物学技术的发展,世界卫生组织(WHO)分类标准

纳入了一系列与癌基因、抑癌基因、细胞功能相关的重现性遗传学异常,如 t(15;17)(q22;q12)、PML-RARα、t(8;21)(q22;q22)、RUNX1-RUNX1T1、FLT3-ITD 突变和 NPM1 突变<sup>[1]</sup>。目前临床上采用这些细胞遗传学异常与临床特征做为风险分层指标。为研究 LTB4R 是否能辅助 AML 疾病风险分层,取 LTB4R 表达水平中位数为介值,结合各项临床指标将 TCGA-LAML 队列分组进行相关性分析,表 1 显示 LTB4R 过表达水平与细胞遗传学风险(P<0.001)、FAB 分型(P<0.001)、染色体异常(P<0.001)和 NPM1 突变(P=0.023)相关。LTB4R 低表达组的重现性细胞遗传学异常具有更好的临床预后,例如全部 t(15;17)(11/11, 100%) 和 t(8;21)(7/7, 100%) 患者均为 LTB4R 低表达。LTB4R 表达水平在 FAB 各亚型中显示出不同的分布特征, M1 (22/35, 62.9%)、M4 (18/29, 62.1%) 和 M5 (13/15, 86.7%) 患者 LTB4R 表达更高,相反,大多数 M2 (60.5%) 和 M3 (急性早幼粒细胞

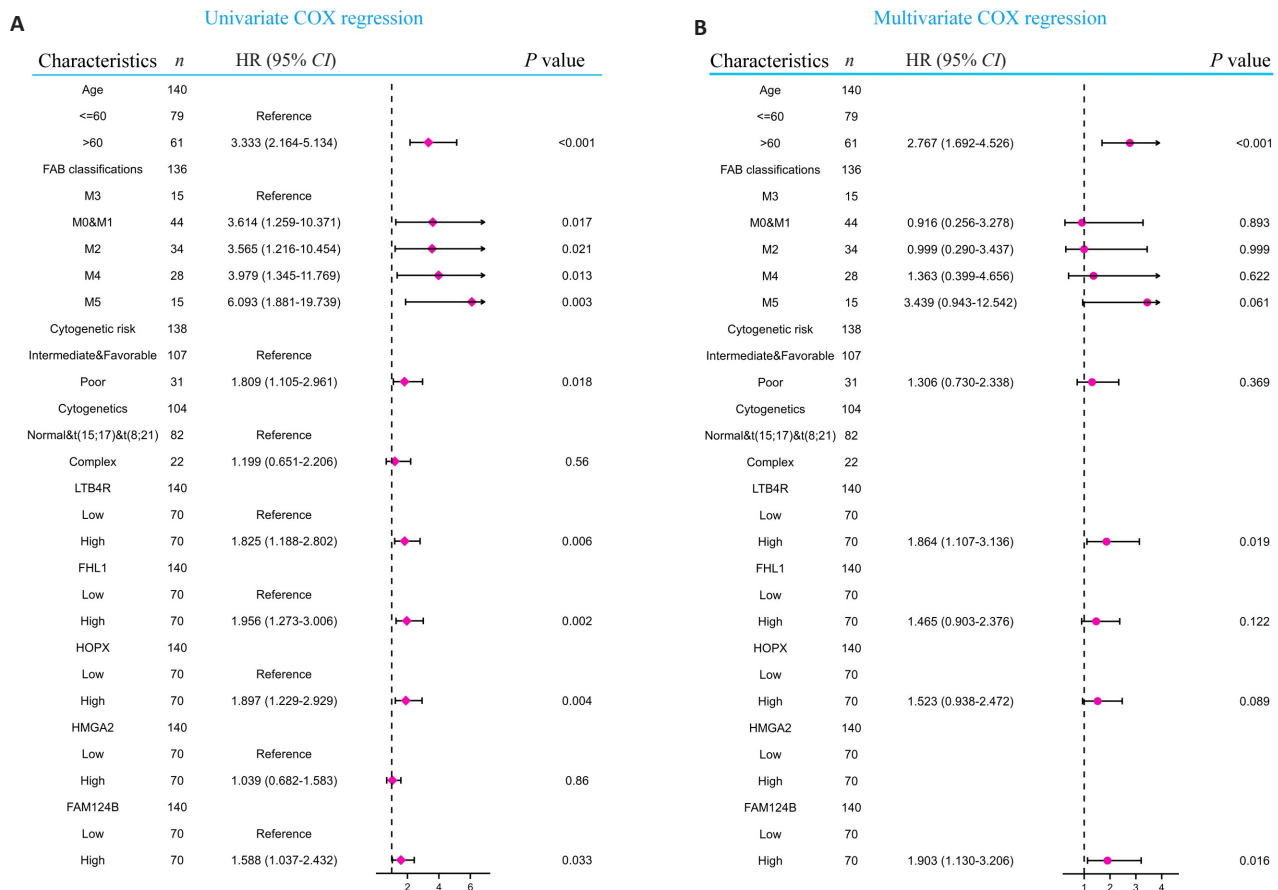


图2 LTB4R 在TCGA-LAML 患者中的预后能力评估

Fig.2 Prognostic capacity of LTB4R in TCGA-LAML dataset. A: Univariate Cox regression analysis of prognostic risk factors in the TCGA-LAML cohort. B: Multivariate Cox regression analysis. Forest plots were generated from the "forestplot" R package.

白血病, APL, 80.0%)呈 LTB4R 低表达。另一方面, 利用 UALCAN 平台分析了不同 FAB 分型、年龄、性别、FLT3 突变、PML/RAR 融合和 RAS 激活状态亚组的 LTB4R 表达水平(图 3)。柱状图显示, M3 占 AML 的 9%~12%, 与 M3 相比, M0、M1、M2、M4 和 M5 中 LTB4R 表达水平升高( $P<0.001$ , 图 3A)。LTB4R 在其他亚组之间未显示明显差异(图 3B~F)。

#### 2.4 LTB4R 共表达基因筛选 及功能富集分析

为了进一步探索 LTB4R 基因在 AML 中的潜在功能和分子途径, 我们利用 LinkedOmics 数据库分析了 TCGA-LAML 数据集中 173 例患者的 mRNA 测序数据, 共筛选出与 LTB4R 相关的 10 477 个基因( $P<0.01$ )。共表达热图显示了与 LTB4R 表达呈正相关或负相关的 Top10 基因(图 4), 参与炎症反应、代谢、胞膜运输、细胞凋亡等一系列生物学功能。我们通过 GO 和 KEGG 分析在 TCGA-LAML 数据集中富集了 LTB4R 共表达基因簇的功能和信号途径。气泡图显示基因簇富集于生物学进程(BP)免疫反应相关的中性粒细胞活化、T 细胞活化、细胞活性正向调节、白细胞粘附正向调节等生物

学过程中(图 5A); 这些基因簇在细胞成分(CC)方面是分泌性颗粒膜、溶酶体和细胞粘附蛋白复合体的推定结构成分(图 5B); 在分子功能(MF)方面, 它们涉及肌动蛋白及骨架绑定、SH2 结构域绑定和 NADPH 氧化酶活性等(图 5C)。KEGG 分析富集了与共表达基因簇相关的 7 条通路( $P<0.05$ ), 如 B 细胞受体信号途径、FcγR 介导的吞噬作用、肿瘤中心碳代谢(图 5D)。另一方面, 肿瘤发生涉及免疫微环境、能量代谢、缺氧、铁死亡、N6-甲基腺苷(m6A)等关键信号通路, UPSET 交集图显示, LTB4R 共表达基因簇中 132 个为免疫相关基因, 34 个脂代谢相关基因, 34 个 EMT 相关基因, 22 个代谢调控分子和 8 个 DNA 损伤、修复调控分子(图 5E)。肿瘤在发生发展过程中可逃避免疫监视、诱导免疫耐受, 因此我们继续分析了 LTB4R 与免疫浸润细胞和免疫检查点分子的相关性。图 6A 显示, LTB4R 与免疫抑制细胞 Treg、Th17、iDC、Tem 细胞呈正相关, 而与 T helper、CD8+T、Tcm、NK 细胞呈负相关; 图 6B 显示 LTB4R 与 HAVCR2、PDCD1 呈显著正相关。PPI 网络分析结果显示在 AML 中与 LTB4R 信号通路关联密切前 15 位的蛋



表1 TCGA-LAML 急性髓系白血病患者临床基线资料表

Tab.1 Clinical characteristics of AML patients in TCGA-AML

Characteristic	Low expression of LTB4R	High expression of LTB4R	P
<i>n</i>	75	76	
Cytogenetic risk, <i>n</i> (%)			<0.001
Favorable	26 (17.4%)	5 (3.4%)	
Intermediate	29 (19.5%)	53 (35.6%)	
Poor	19 (12.8%)	17 (11.4%)	
FAB classifications, <i>n</i> (%)			<0.001
M0	8 (5.3%)	7 (4.7%)	
M1	13 (8.7%)	22 (14.7%)	
M2	23 (15.3%)	15 (10%)	
M3	14 (9.3%)	1 (0.7%)	
M4	11 (7.3%)	18 (12%)	
M5	2 (1.3%)	13 (8.7%)	
M6	2 (1.3%)	0 (0%)	
M7	1 (0.7%)	0 (0%)	
Cytogenetics, <i>n</i> (%)			<0.001
Normal	22 (16.3%)	47 (34.8%)	
+8	4 (3%)	4 (3%)	
del (5)	0 (0%)	1 (0.7%)	
del (7)	5 (3.7%)	1 (0.7%)	
inv (16)	5 (3.7%)	3 (2.2%)	
t (15;17)	11 (8.1%)	0 (0%)	
t (8;21)	7 (5.2%)	0 (0%)	
t (9;11)	0 (0%)	1 (0.7%)	
Complex	13 (9.6%)	11 (8.1%)	
NPM1 mutation, <i>n</i> (%)			0.023
Negative	64 (42.7%)	53 (35.3%)	
Positive	10 (6.7%)	23 (15.3%)	

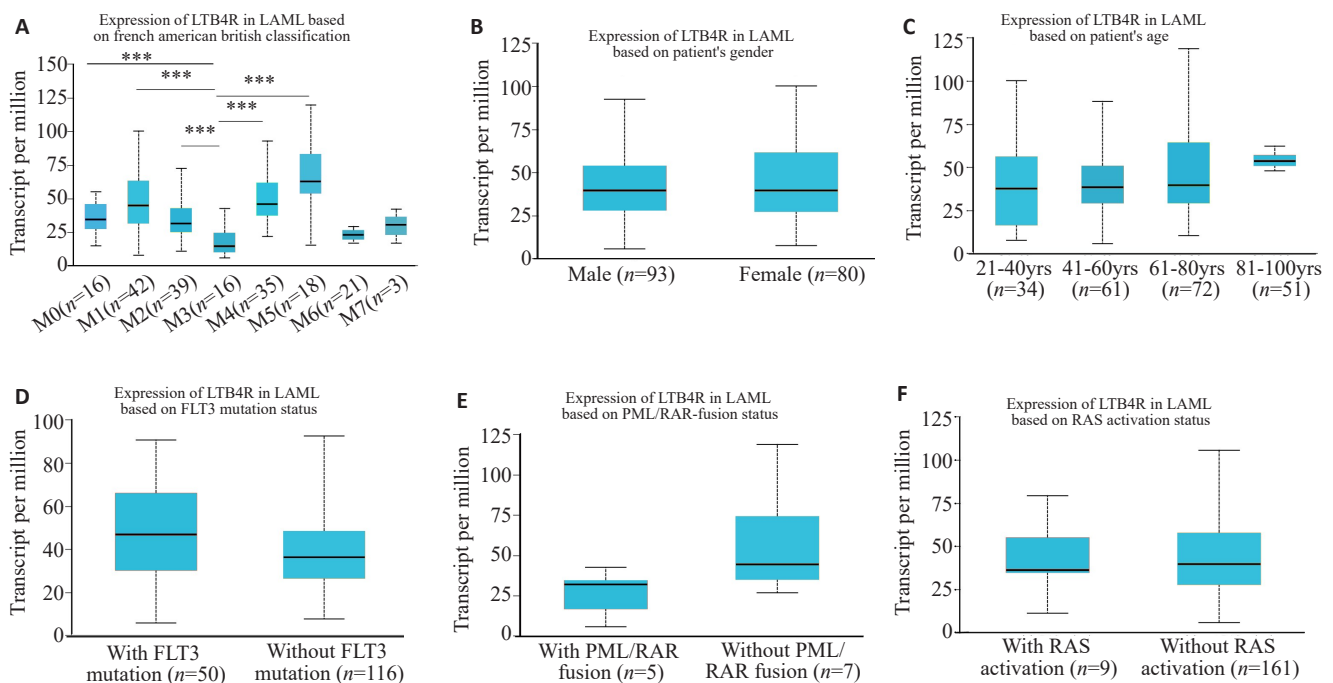


图3 AML亚组中LTB4R的mRNA表达水平(UALCAN)

Fig.3 LTB4R mRNA expression levels in AML subtypes (UALCAN). **A**: LTB4R expression level in FAB subtype M0-M7. **B-F**: LTB4R expression levels in a group based on age (**B**), gender (**C**), FLT3 mutation (**D**), PML/RAR fusion (**E**), and RAS activation status (**F**). The TPM value was used for comparisons between different subgroups. \*\*\**P*<0.001.

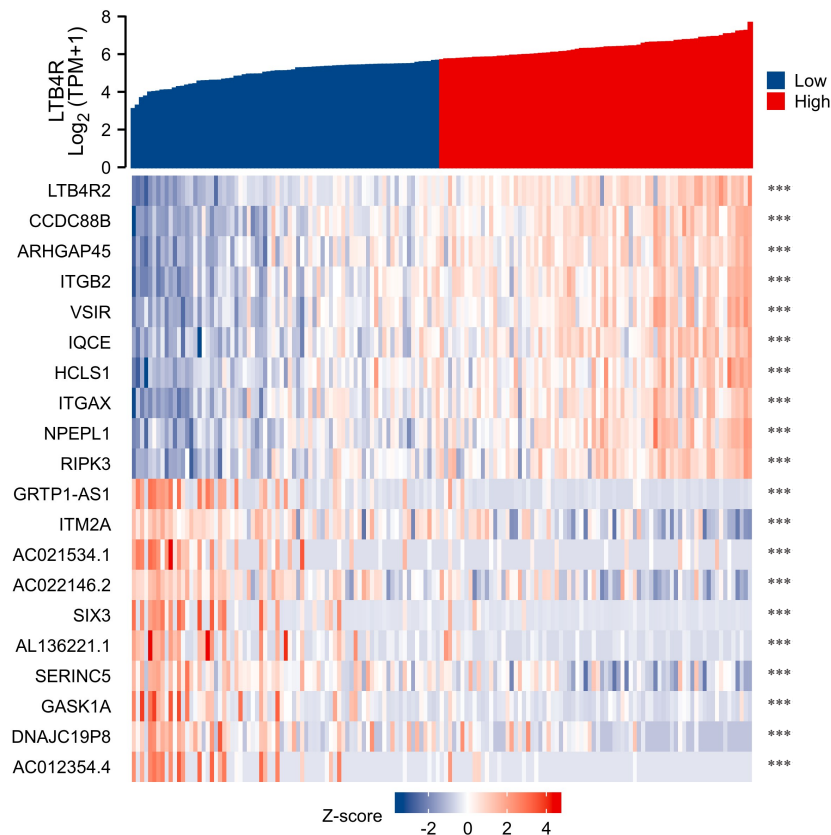


图4 热图显示LTB4R共表达基因(LinkedOmics)

Fig.4 Heat map (LinkedOmics) of LTB4R co-expressed genes. The top 10 positively correlated genes and top 10 negatively correlated genes are displayed. Red bands indicate increased expression levels, and blue bands decreased expression levels. \*\*\* $P < 0.001$ .

白包括 LTB4R2、ALOX5、APALOX5、GPK6、GNAQ 等,分别涉及肿瘤相关T细胞活化、炎症反应、Wnt信号通路、肿瘤相关跨膜信号转导、G蛋白信号转导复合体和能量代谢。

### 2.5 基于LTB4R的差异基因筛选及GSEA分析

TCGA-LAML数据集基于LTB4R表达水平分为两组,应用R语言筛选出313个差异基因(或lncRNA)( $|\log_2\text{FoldChange}| > 2, P < 0.05$ ),火山图(图7A)显示其中58个红色散点为表达上调基因,255个蓝色散点为表达下调基因,Top5代表基因为:SLC10A2、HMX3、KCNN2、LINC00482、LAMP5-AS1、PDPN、AL117190.1、MEG9、RASL12、MEG8,其余基因以灰色散点表示。继而针对总差异基因进行GSEA功能富集分析,结果如图7B显示,基于LTB4R的差异基因富集于CD4+ $\alpha\beta$ T细胞分化、 $\alpha\beta$ T细胞活化,免疫相关的T细胞活化、II型免疫反应、免疫递呈突触、TNF受体绑定、IL-2/STAT5、TGF- $\beta$ 信号途径。

### 2.6 临床实验验证LTB4R、免疫检查点基因表达水平及相关性

为进一步在临床样本中验证LTB4R在AML中的

表达水平及其与相关免疫检查点基因表达的相关性,我们收集了白血病原始细胞比例 $\geq 20\%$ 或 $> 2000/\mu\text{L}$ 的AML患者外周血样本,分离PBMC进行RT-PCR实验,检测各基因mRNA表达水平,ELISA实验检测血清LTB4R蛋白表达水平。图8显示在19例AML患者样本中,LTB4R mRNA表达量高于对照样本( $n=21$ ),同时LTB4R mRNA表达量与HAVCR2呈显著正相关( $P < 0.05$ ),与PDCD1正相关,但无统计学意义。AML患者血清LTB4R表达水平显著高于正常对照样本[( $15.93 \pm 3.28$ ) pg/mL vs ( $6.71 \pm 1.05$ ) pg/mL,  $P=0.0083$ ]。

## 3 讨论

我国白血病发病率约为3~4/10万,其中AML占1.62/10万,目前病因尚不完全清楚,已知的有病毒感染、免疫功能异常、物理、化学、遗传因素等。除M3外,其他类型的AML治疗手段以化疗和造血干细胞移植为主,5年死亡率达50%。以肿瘤疫苗、细胞治疗和细胞信号通路调节剂为代表的选择性免疫治疗和分子靶向治疗是新兴的治疗措施,而个体化的治疗方案要求全面检查各种预后分层相关的预后指标<sup>[26]</sup>。迄今,临床和科研

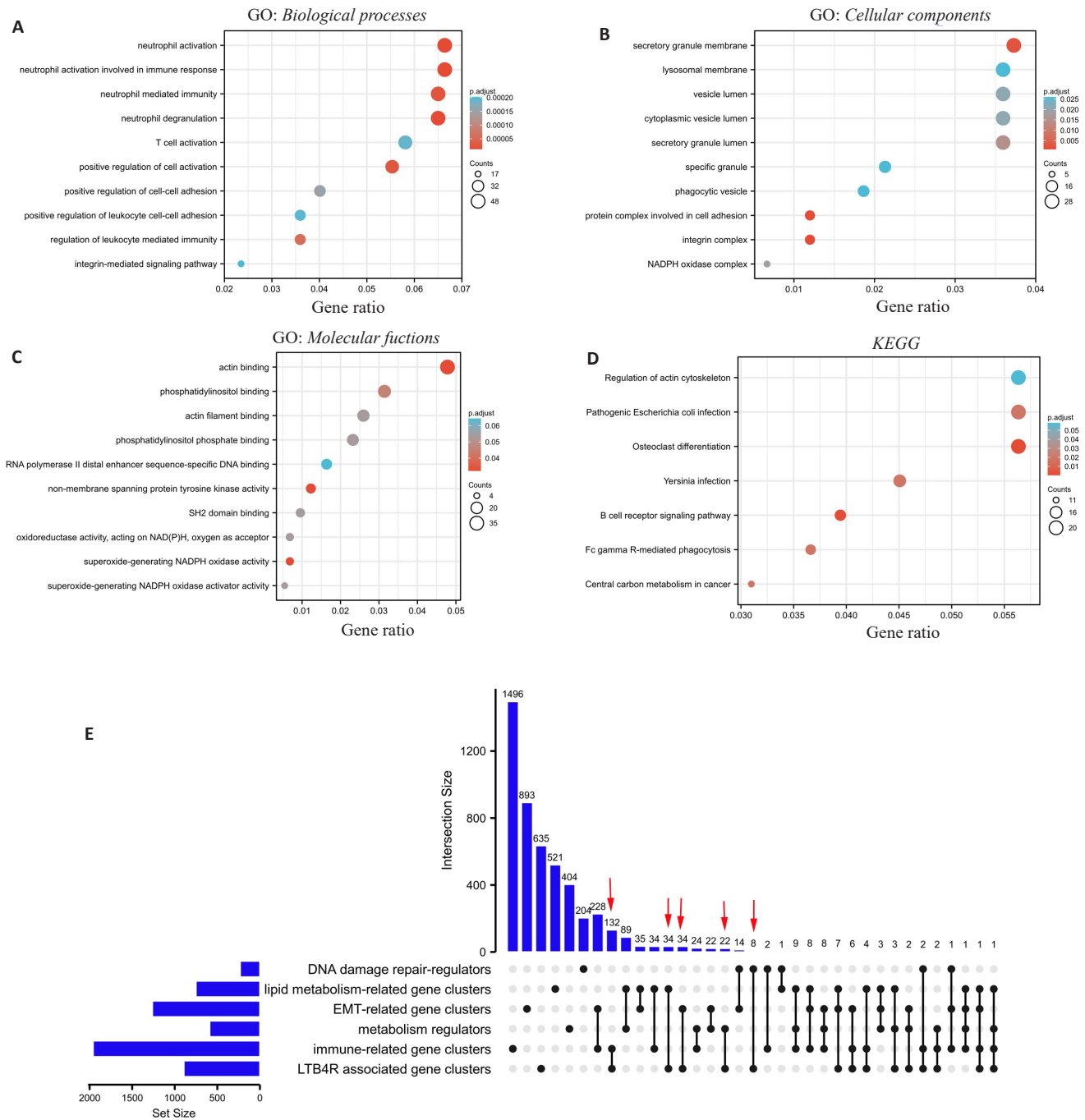


图5 LTB4R 共表达基因功能富集分析

Fig.5 Functional enrichment analyses of LTB4R co-expressed genes. The bubble plot shows the functional enrichment results of GO analysis in biological progress (BP; A), cellular component (CC; B), molecular function (MF; C), and KEGG signaling pathways (D). The  $(-\log_{10}) P$ -value  $>1.3$  is statistically significant. FDR: False discovery rate. E: Upset intersection diagram of LTB4R co-expression genes and regulators of tumor-related signaling pathways. The red arrows indicate the number of overlapping genes.

工作者筛选了大量新型的 AML 生物标志物和预后指标。在此基础上,本研究利用多种生物信息学分析工具,借助公共数据库平台,试图筛选更简单、有效的预后指标。前期我们已通过 Cox 风险回归分析筛选出多个预后基因,如 RHOBTB2<sup>[27]</sup>、FHL1、HIVEP3、ARHGAP9 和 PSMB8,这些基因的潜在功能和预后价值有待验证。

证。本项研究中,我们探讨了 LTB4R 基因在 AML 中的表达谱和预后意义。

TCGA 泛癌数据集基因表达分析显示 AML 患者骨髓组织中 LTB4R 转录水平显著升高,并且在泛癌组织中表达水平差异明显,呈现出器官特异性。急性髓系白血病患者骨髓样本中白血病细胞的比例为 20%~100%,



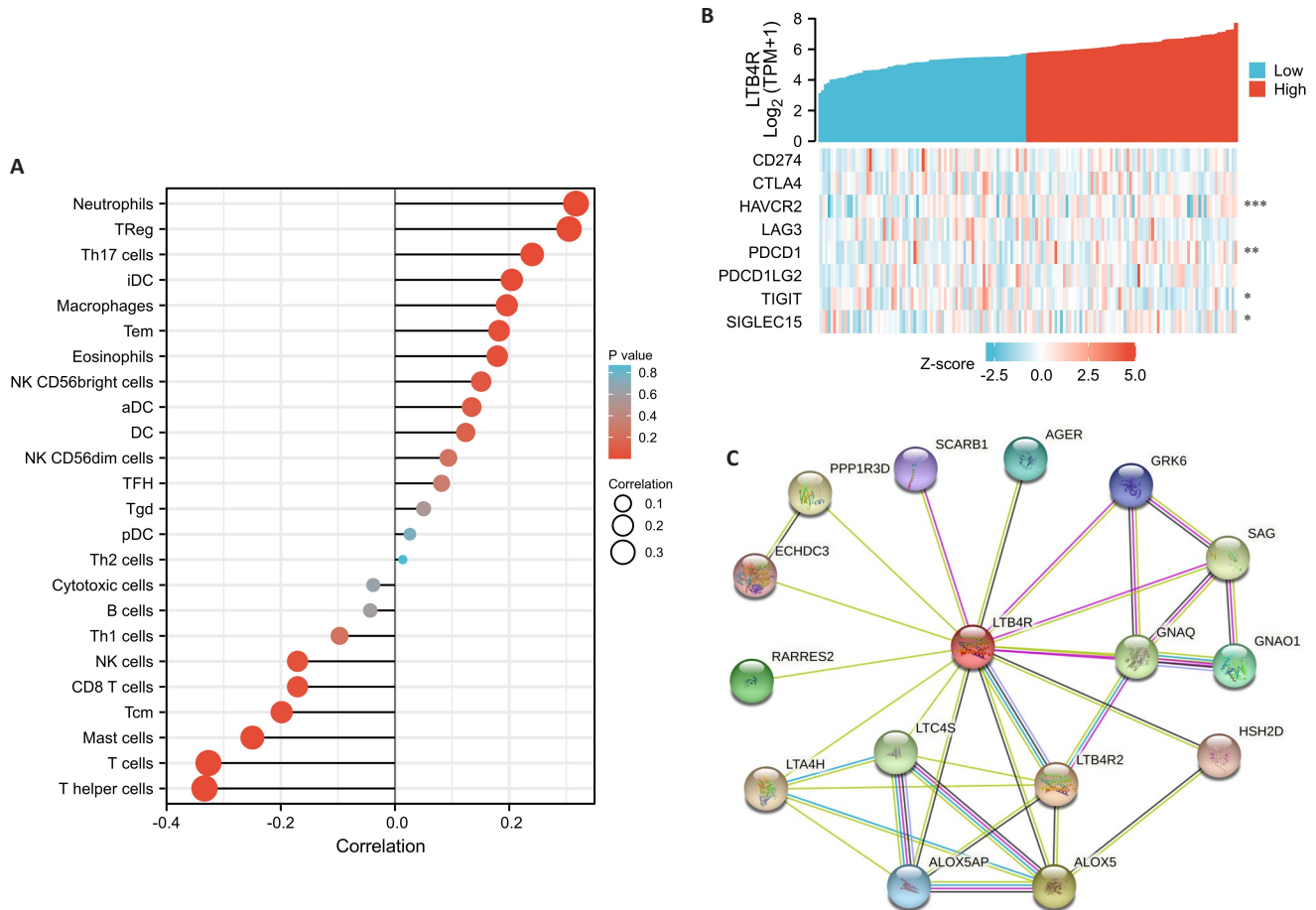


图 6 LTB4R 与免疫浸润相关性和蛋白相互作用网络

Fig.6 Association of LTB4R and immune infiltration and construction of protein-protein interaction network. **A:** Correlation analysis of LTB4R with 24 immune cells in the TCGA-LAML cohort. **B:** Genetic correlation analysis of LTB4R and immune checkpoints. **C:** PPI network of LTB4R was built through the String platform. Local clustering coefficient: 0.879, PPI enrichment *P*-value: 0.000136. \**P*<0.05. \*\**P*<0.01. \*\*\**P*<0.001.

这可能决定基因表达水平的分布情况。急性髓系白血病患者骨髓中 LTB4R 异常表达促使我们进一步探索其是否具有预后价值。

我们利用 R studio 和 PrognoScan 在两个不同的 AML 数据集中分析并验证了 LTB4R 基因对 AML 患者预后的影响,结果显示 LTB4R 过表达与 AML 患者的不良预后相关。TimeROC 分析显示 LTB4R 的 AUC 大于 0.6,尤其是 5 年 AUC=0.748,显示出较强的预后评估性能。我们前期收集了一组与 AML 预后相关的风险因素,包括年龄、白细胞计数、原始细胞比例、重现性遗传学异常等,均纳入 Cox 风险回归分析,多因素回归结果证实 LTB4R 是 AML 不良预后的独立预测基因。

目前 AML 患者的风险分层策略包括临床病理特征、染色体和基因异常<sup>[2]</sup>。我们利用 R studio 和 UALCAN 平台研究了 LTB4R 表达水平与 AML 临床资料之间的关系,结果显示在 M0、M1、M4、M5 亚组中,LTB4R 表达水平增强,在 M2、M3 或 t(15; 17)、t(8; 21) 组 LTB4R 表达水平降低,这与基于风险分层的预后结果一致。LTB4R 表达水平与 FLT3 突变、IDH、RAS 突变未呈现显

著相关性,可能与样本量过小有关。以上结果提示 LTB4R 可以作为特定 AML 亚组,尤其是 M0、M1、M4、M5 的风险评估指标,并显示出与当前风险分层策略的协同性。

LTB4R 属于 G 蛋白偶联受体(GPCRs)超家族,特异性表达于白细胞<sup>[28]</sup>,在胰腺癌、表皮肿瘤、结肠癌中的表达水平异常,并可发挥调控免疫微环境、促进肿瘤增殖和侵袭的功能生物学功能。然而,LTB4R 能否以及如何调控肿瘤免疫并影响白血病的发生发展尚不清楚。

为进一步探索 LTB4R 在 AML 肿瘤发生发展中的潜在功能,我们首先通过 LinkedOmics 数据库筛选出 LTB4R 共表达基因集合,包含多个免疫微环境、EMT 转化、DNA 损伤修复和能量代谢相关基因<sup>[23, 29, 30]</sup>,反映了 LTB4R 对疾病调控分子网络的重要影响。运用 GO 和 KEGG 分析发现这些共表达基因富集到数条肿瘤相关的功能和信号通路,涉及免疫细胞分化、活化、吞噬功能和能量代谢。其次,我们基于 LTB4R 表达水平将 TCGA-LAML 分组筛选出差异基因集合,GSEA 分析显示这些差异基因功能主要富集到免疫细胞活化、分化,

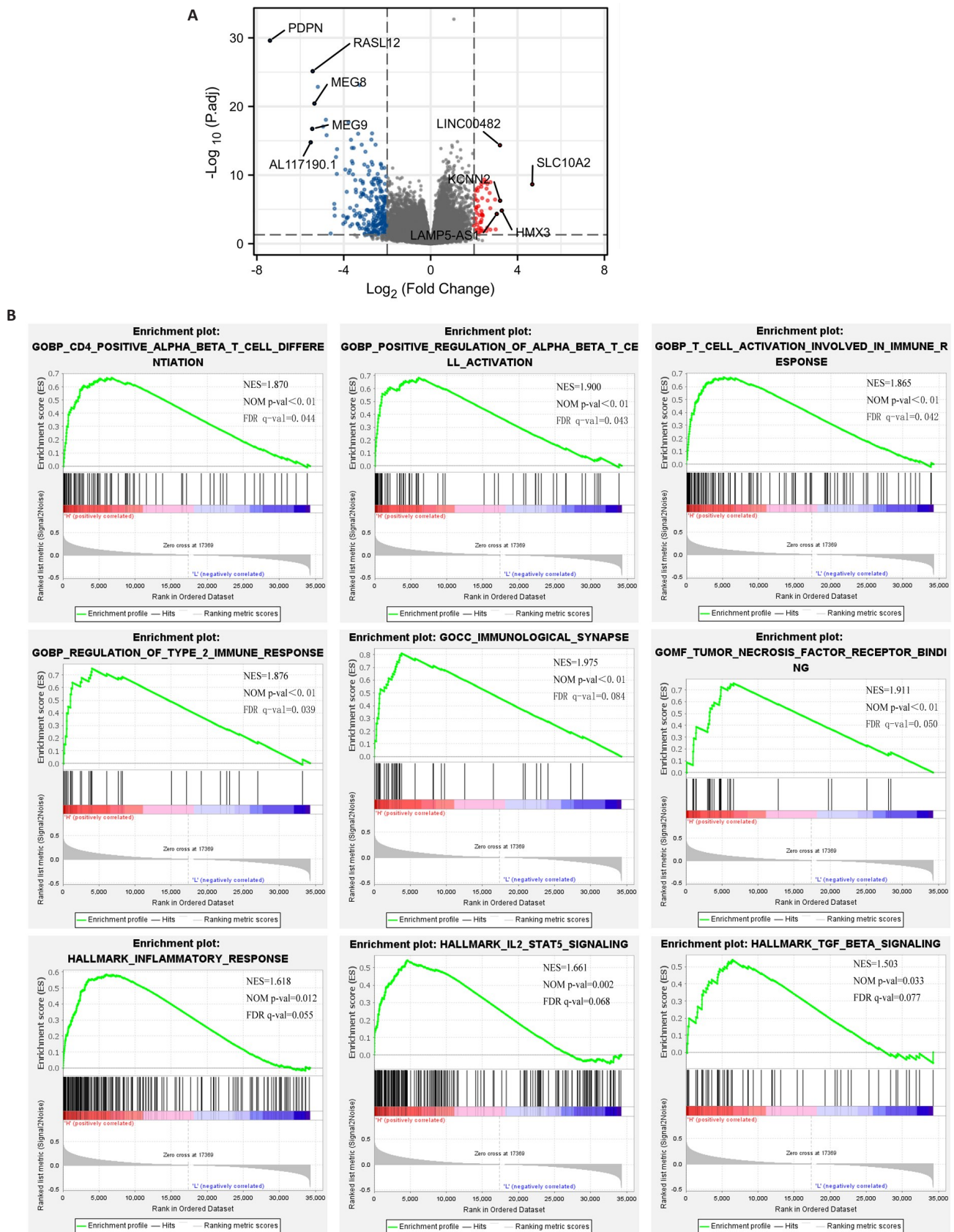


图7 基于LTB4R的差异基因GSEA分析

Fig.7 GSEA analyses of differentially expressed genes (DEGs) based on LTB4R. **A:** Volcano map of the DEGs based on LTB4R in the TCGA-LAML cohort. The red spots represent the enhanced genes, and the blue dots reduced genes.  $\text{Log}_2|\text{FC}|>2$ ,  $P_{\text{adj}}<0.05$ . **B:** GSEA analysis for DEGs. The BP, CC, MF, and Hallmark functional categories are displayed in 9 modules. Gene sets in the signaling pathways with  $|\text{NES}|>1$ ,  $\text{NOM } P\text{-val}<0.05$ , and  $\text{FDR } q\text{-val}<0.25$  are considered statistically significant.

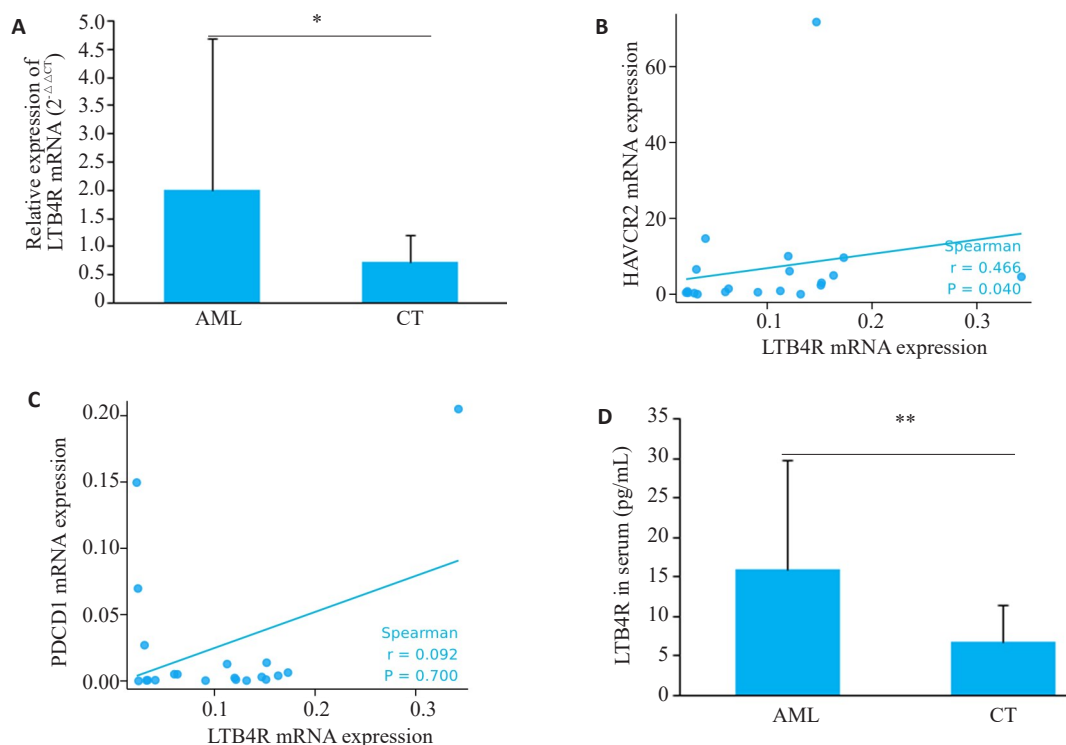


图8 AML患者临床样本中LTB4R表达量验证

Fig.8 Validation of LTB4R expression levels in AML samples. **A:** The column chart shows that the LTB4R mRNA expression in the clinical samples of AML patients ( $n=19$ ) is higher than that in the control group ( $n=21$ ) ( $P=0.0437$ ). **B:** Spearman correlation analysis of LTB4R mRNA and HAVCR2 mRNA. **C:** LTB4R mRNA and PDCD1 mRNA expression in clinical samples of AML patients. **D:** The results of the ELISA show that the concentration of LTB4R protein in serum of AML patients is higher than that in the control group ( $P=0.008$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

信号传导,免疫递呈,免疫反应,细胞因子信号通路。再次,通过与24种免疫细胞标志的相关性研究我们发现LTB4R与肿瘤免疫浸润呈显著相关性。最后,通过STRING平台构建的PPI网络揭示了在AML肿瘤发生发展过程中与LTB4R功能密切相关的15个功能蛋白。以上结果显示LTB4R介导的信号通路与免疫微环境、能量代谢之间可能存在协同或交互作用。临床实验验证了生信分析的结论,LTB4R在AML患者中表达水平增高,并且与免疫检查点基因HAVCR2呈显著正相关,而受到样本量的影响,LTB4R与PDCD1表达相关性分析未显示统计学意义,扩增结果显示PDCD1扩增曲线CT值均在32左右,表明该基因在样本中表达量均较低,可能会掩盖组间表达差异,考虑下一步扩大样本量继续验证。

综上所述,本研究利用公共数据库综合分析了LTB4R在AML患者的特异性表达模式,评估了预后价值和临床特征相关性,进一步预测了其潜在功能,同时收集临床样本进行了实验验证。目前临床上采用的AML分型标准主要是FAB分型和WHO分型,前者主要基于形态学改变,后者侧重重现性遗传学异常。除M3外,其他AML分型的治疗方案区别不大,FLT3、

IDH、NPM1的预后价值尚待进一步证实,靶向药物临床研究并未显示出患者显著获益。因此现有的AML临床预后风险评估策略尚需进一步优化。

LTB4R表达水平在AML患者,特别是在预后不良的高危亚组中显著升高,可作为肿瘤标志物和预后因素之一。TimeROC实验验证了LTB4R预后预测的特异性和灵敏性。多因素COX回归分析研究也证实纳入临床上现有的风险因素和预后指标,包括年龄、分型、细胞遗传学异常和预后基因后,LTB4R也是一个有效的独立预后基因。LTB4R可辅助临床进行AML疾病风险分层,并可能参与或协同肿瘤免疫、能量代谢等信号通路,在白血病发生中发挥重要作用。

临床实验验证选取了白血病原始细胞 $\geq 20\%$ 或 $>2000/\mu\text{L}$ 的AML外周血样本,可与TCGA、GEO数据集分析的结果相互验证、互为补充,有利于收集患者综合诊断和预后评估信息<sup>[17]</sup>,受限于经济原因,并不是所有AML患者都能接受二代测序检查,本文证实LTB4R可采用外周血单个核细胞标本检测mRNA水平,外周血清/血浆检测蛋白水平,标本易于获得,临床实验室大多配备了分子诊断平台和免疫学实验流水线,有望开发检测试剂盒,便于临床应用。



## 参考文献:

- [1] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-405.
- [2] Estey E. Acute myeloid leukemia: 2016 Update on risk-stratification and management[J]. *Am J Hematol*, 2016, 91(8): 824-46.
- [3] Zhu R, Tao H, Lin W, et al. Identification of an immune-related gene signature based on immunogenomic landscape analysis to predict the prognosis of adult acute myeloid leukemia patients [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 574939.
- [4] Huang X, Zhou D, Ye X, et al. A novel ferroptosis-related gene signature can predict prognosis and influence immune microenvironment in acute myeloid leukemia[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2021, ADVANCED ONLINE.
- [5] Zhong F, Yao F, Cheng F, et al. m6A-related lncRNAs predict prognosis and indicate immune microenvironment in acute myeloid leukemia[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 1759.
- [6] Minervini A, Coccaro N, Anelli L, et al. HMGA proteins in hematological malignancies[J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1456.
- [7] Fu Y, Xu M, Cui ZL, et al. Genome-wide identification of FHL1 as a powerful prognostic candidate and potential therapeutic target in acute myeloid leukaemia[J]. *EBioMedicine*, 2020, 52: 102664.
- [8] Saeki K, Yokomizo T. Identification, signaling, and functions of LTB4 receptors[J]. *Semin Immunol*, 2017, 33: 30-6.
- [9] Tong WG, Ding XZ, Talamonti MS, et al. Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 induces S-phase cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells [J]. *Anti Cancer Drugs*, 2007, 18(5): 535-41.
- [10] 张 瑛, 郝 飞, 钟白玉, 等. 白三烯B4受体在表皮肿瘤中的表达[J]. *临床皮肤科杂志*, 2008, 37(1): 20-2.
- [11] Bortuzzo C, Hanif R, Kashfi K, et al. The effect of leukotrienes B and selected HETEs on the proliferation of colon cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Lipids Lipid Metab*, 1996, 1300(3): 240-6.
- [12] Taylor PM, Woodfield RJ, Hodgkin MN, et al. Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A2 and 5-lipoxygenase catalyzed pathway [J]. *Oncogene*, 2002, 21(37): 5765-72.
- [13] Chheda ZS, Sharma RK, Jala VR, et al. Chemoattractant receptors BLT1 and CXCR3 regulate antitumor immunity by facilitating CD8+ T cell migration into tumors [J]. *J Immunol*, 2016, 197(5): 2016-26.
- [14] Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(22): 2059-74.
- [15] Moore HM. Acquisition of normal tissues for the GTEx program[J]. *Biopreserv Biobank*, 2013, 11(2): 75-6.
- [16] Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, et al. An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2008, 112(10): 4193-201.
- [17] Percival ME, Lai C, Estey E, et al. Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia[J]. *Blood Rev*, 2017, 31(4): 185-92.
- [18] Mizuno H, Kitada K, Nakai KT, et al. PrognoScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes [J]. *BMC Med Genomics*, 2009, 2: 18.
- [19] Vasaikar SV, Straub P, Wang J, et al. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D956-63.
- [20] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-58.
- [21] Liao YX, Wang J, Jaehnig EJ, et al. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W199-205.
- [22] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-12.
- [23] Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. *Immunity*, 2013, 39(4): 782-95.
- [24] Vivian J, Rao AA, Nothhaft FA, et al. Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 314-6.
- [25] Huhn D, Twardzik L. Acute myelomonocytic leukemia and the French-American-British classification[J]. *Acta Haematol*, 1983, 69(1): 36-40.
- [26] Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management[J]. *Am J Hematol*, 2018, 93(10): 1267-91.
- [27] Liu P, Ma QH, Chen HX, et al. Identification of RHOBTB2 aberration as an independent prognostic indicator in acute myeloid leukemia[J]. *Aging*, 2021: 15269-84.
- [28] Kato K, Yokomizo T, Izumi T, et al. Cell-specific transcriptional regulation of human leukotriene B4 receptor gene [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(3): 413-20.
- [29] Iglesia MD, Parker JS, Hoadley KA, et al. Genomic analysis of immune cell infiltrates across 11 tumor types[J]. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(11): djw144.
- [30] Karasinska JM, Topham JT, Kalloger SE, et al. Altered gene expression along the glycolysis-cholesterol synthesis axis is associated with outcome in pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(1): 135-46.

(编辑:余诗诗)