

ENPP6在乳腺癌中的表达特征和临床意义

马莉, 曹东升*

安徽医科大学第二附属医院整形与创面修复外科, 安徽 合肥

收稿日期: 2023年4月28日; 录用日期: 2023年5月21日; 发布日期: 2023年5月29日

摘要

目的: 探究ENPP6在乳腺癌中的表达情况和预后意义。方法: 我们使用TIMER数据库计算ENPP6在泛癌中的表达情况和每种乳腺癌亚型中ENPP6表达与多种免疫细胞浸润之间的关系。根据ENPP6表达将所有乳腺癌患者分成高表达组和低表达组, 比较二者的总体生存上的差异。绘制1年、3年和5年预后的ROC曲线。结果: ENPP6在多种癌症中下调表达。K-M分析显示ENPP6高表达组预后比低表达组较好。免疫浸润分析显示ENPP6对basal和luminal乳腺癌中多种免疫细胞浸润水平呈正相关。ROC曲线下面积大小(AUC)分别为0.61 (1年)、0.60 (3年)和0.60 (5年)。结论: ENPP6表达水平与乳腺癌的发生、预后和免疫浸润水平相关, 表明它可以用作乳腺癌的生物标志物。

关键词

乳腺癌, ENPP6, 免疫浸润, 总体生存

The Expression Characteristics and Clinical Significance of ENPP6 in Breast Cancer

Li Ma, Dongsheng Cao*

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: Apr. 28th, 2023; accepted: May 21st, 2023; published: May 29th, 2023

Abstract

Objective: To investigate the expression and prognostic significance of ENPP6 in breast cancer.

*通讯作者。

Methods: We used the TIMER database to calculate the expression of ENPP6 in pan-cancer and the relationship between ENPP6 expression and multiple immune cell infiltration in each breast cancer subtype. All breast cancer patients were divided into high and low expression groups according to ENPP6 expression, and the differences in overall survival between the two were compared. ROC curves were plotted for 1-, 3-, and 5-year prognoses. **Results:** ENPP6 was down-regulated in a variety of cancers. K-M analysis showed that the ENPP6 high expression group had a better prognosis than the low expression group. Immune infiltration analysis showed a positive correlation between ENPP6 on the level of multiple immune cell infiltration in basal and luminal breast cancers. The area under the ROC curve size (AUC) was 0.61 (1 year), 0.60 (3 years) and 0.60 (5 years), respectively. **Conclusion:** ENPP6 expression levels correlated with breast cancer development, prognosis and immune infiltration levels, indicating that it can be used as a biomarker for breast cancer.

Keywords

Breast Cancer, ENPP6, Immune Infiltration, Overall Survival

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

乳腺癌是影响全世界妇女的最普遍的癌症之一,也是女性癌症相关死亡的主要原因。根据美国癌症协会的数据,在美国,每8名妇女中就有1人在其一生中被诊断为浸润性乳腺癌,每39人中就有1人最终死于此病。根据雌激素受体(ER)或孕激素受体表达状态和人类表皮生长因子2(HER2)基因扩增情况,乳腺癌被分为三个主要亚组:激素受体⁺/HER2⁻、HER2⁺和三阴性乳腺癌。由于乳腺癌患者的分子水平上具有异质性,不同亚组之间的治疗和结果有很大的不同。目前乳腺癌的治疗方案通常是将手术与多种辅助治疗相结合,如化疗、放疗、内分泌治疗、靶向治疗和免疫治疗。对早期乳腺癌,手术是主要的治疗手段,可采取保乳手术或全乳房切除手术。对于晚期乳腺癌,手术常作为其综合治疗方案中的一个组成部分。放疗可以减少癌细胞的生长和扩散,常常用于手术后的辅助治疗,或用于晚期乳腺癌的症状缓解。化疗利用化学药物杀灭癌细胞,可在手术前、手术后或单独使用,可有效减少乳腺癌的复发和转移。对于雌激素受体⁺的乳腺癌,内分泌治疗可通过阻止雌激素的作用来抑制癌细胞的生长。靶向治疗针对乳腺癌细胞表面的分子靶点,通过抑制或阻断细胞生长和扩散来治疗乳腺癌。尽管包括手术、放疗和抗癌药物以及诊断在内的治疗方法取得了重大进展,降低了癌症相关的死亡率,但临床医生仍然面临治疗耐药引起的癌症复发、转移和死亡的挑战。而且,大多数患者在一定时间内对初始治疗有反应,但仍有一些乳腺癌,特别是三阴性乳腺癌,会发展成侵袭性更强的肿瘤形式,导致预后不良[1][2][3][4][5]。因此,有必要确定与乳腺癌异质性相关的预后因素,以准确预测患者生存。

肿瘤微环境(TME)主要由周围血管、炎症细胞、免疫细胞、淋巴细胞、成纤维细胞和细胞外基质组成[6]。到目前为止,越来越多的证据表明TME与肿瘤发生、癌细胞增殖、侵袭和转移密切相关。然而,这种联系也证明了一种很有前景的靶点,可用于癌症治疗。多项研究显示TME中的免疫细胞可以影响肿瘤生长,这为TME中的肿瘤浸润免疫细胞(TIC)提供了一种有希望的治疗方案[7]。例如,肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)已被报道为胃癌患者的预后因素[8][9][10]。

外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 6 (ENPP6)是 ENPP 家族的一员。该家族与许多关键的生物学和病理生理过程有关, 包括核苷酸和磷脂信号、骨矿化、纤维化疾病和肿瘤相关免疫细胞浸润[11] [12]。目前 ENPP6 在乳腺癌中的作用尚不明确。因此, 本研究使用生物信息学分析探索 ENPP6 在乳腺癌中的表达情况, 同时分析其与免疫细胞浸润的关系。

2. 材料和方法

2.1. 基于 GEPIA 数据库的分析

GEPIA 数据库是由北京大学张泽民教授团队开发的 RNA-seq 数据库, 收录 TCGA 和 GTEx 数据库中的转录组数据、临床信息和生存数据。该数据库包括 9736 个肿瘤样本和 8587 个正常样本。我们使用 GEPIA 中的 RNA-seq 数据进行分析。首先, 我们比较正常组织和乳腺癌组织中的 ENPP6 基因的表达。我们使用箱线图来进行可视化。

2.2. 基于 TIMER 数据库的分析

TIMER 数据库可以提供免疫细胞浸润的在线分析, 其提供的免疫细胞包括 B 细胞、CD4⁺T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞。我们使用散点图来表示样本中免疫细胞丰度与基因表达量之间的关系。除此之外, TIMER 数据库还支持泛癌分析。我们使用箱线图来表示 ENPP6 在每种癌症和正常组织的表达情况。

2.3. 通过 TCGA 数据库的分析

我们下载了 TCGA 数据库中所有乳腺癌和正常组织的 RNA-seq 数据。使用“tinyarray”R 包可视化肿瘤患者和正常患者的 ENPP6 基因的表达差异。根据 ENPP6 的表达将所有乳腺癌患者分成高 ENPP6 组和低 ENPP6 患者。对两组患者进行总体生存的分析, 并通过 Kaplan-Meier 曲线绘制来可视化两组的预后上的差异。

2.4. 数据分析

本研究的统计学分析都是使用 R 软件进行(4.1.3 版本)。 $p < 0.05$ 被定义为有统计学意义。Kaplan-Meier 曲线绘制使用“survminer”和“survival”R 包进行。计量资料比较使用独立样本 t 检验。

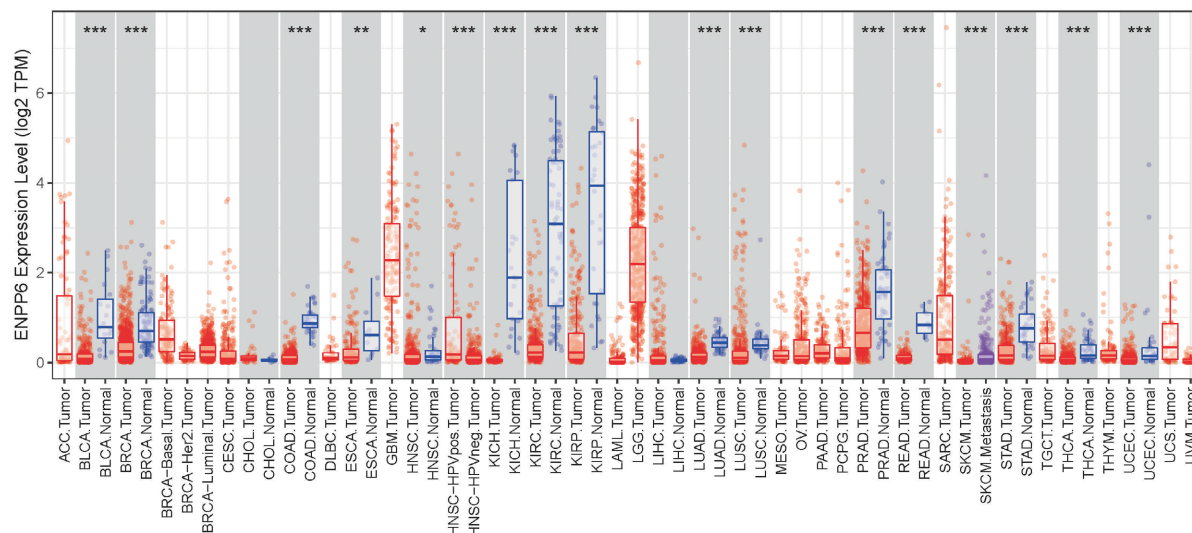
3. 结果

3.1. ENPP6 在泛癌中的表达情况

我们使用 TIMER 数据库来评估 ENPP6 在不同种类癌症和正常组织中的表达情况。如图 1, ENPP6 在 14 种癌症中表达与正常组织有差异, 包括膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、食管癌、头颈鳞癌、胆管癌、肾乳头状细胞癌、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、前列腺腺癌、直肠癌、胃癌、甲状腺癌和子宫内膜样癌。有趣的是, 在这 14 种癌症中 ENPP6 的表达均低于正常组织。随后, 我们下载了 TCGA 中所有乳腺癌患者的基因表达数据、临床特征数据和生存数据。在排除生存信息缺失、临床特征数据和基因表达数据中任意一组数据缺失的样本后, 我们分析了乳腺癌患者 ENPP6 的表达情况。如图 2 所示, ENPP6 在乳腺癌中的表达较正常组织较高。

为了进一步探索 ENPP6 与乳腺癌预后之间的关系, 我们使用“survminer”R 包计算出患者的 ENPP6 表达最佳截断值, 为 0.325。表达高于截断值的患者被定义为 ENPP6 高表达患者, 表达低于截断值的患者被定义为 ENPP6 低表达患者。K-M 分析显示, ENPP6 低表达患者预后较 ENPP6 高表

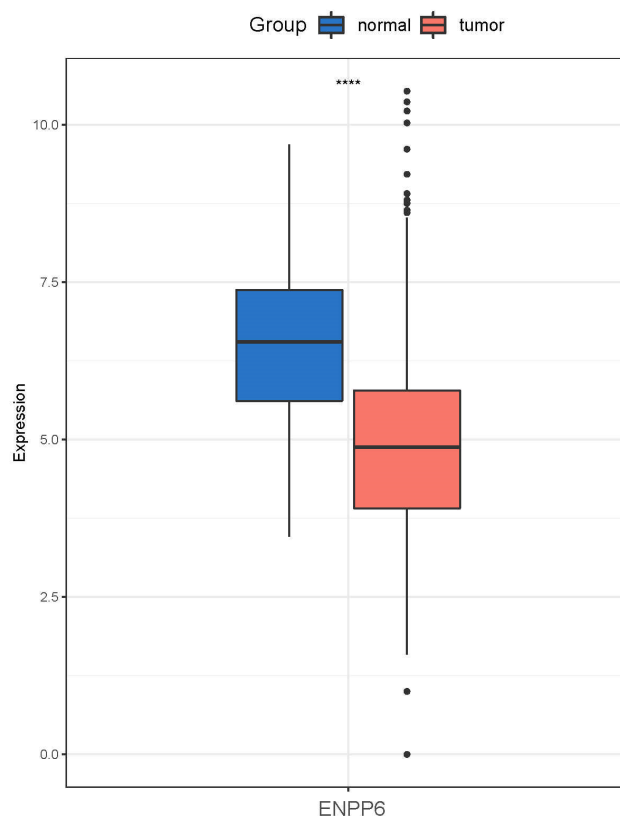
达患者好(图 3)。



注: 该柱状图中红色代表肿瘤组织中 ENPP6 的表达量, 蓝色组织代表正常样本中 ENPP6 的表达量。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。

Figure 1. Expression of ENPP6 in different types of cancer and normal tissues

图 1. ENPP6 在不同种类癌症和正常组织的表达情况



注: 该柱状图中红色代表乳腺癌中 ENPP6 的表达量, 蓝色组织代表正常乳腺组织中 ENPP6 的表达量。****: $p < 0.0001$ 。

Figure 2. Expression of ENPP6 in breast cancer and normal tissues

图 2. ENPP6 在乳腺癌和正常组织的表达情况

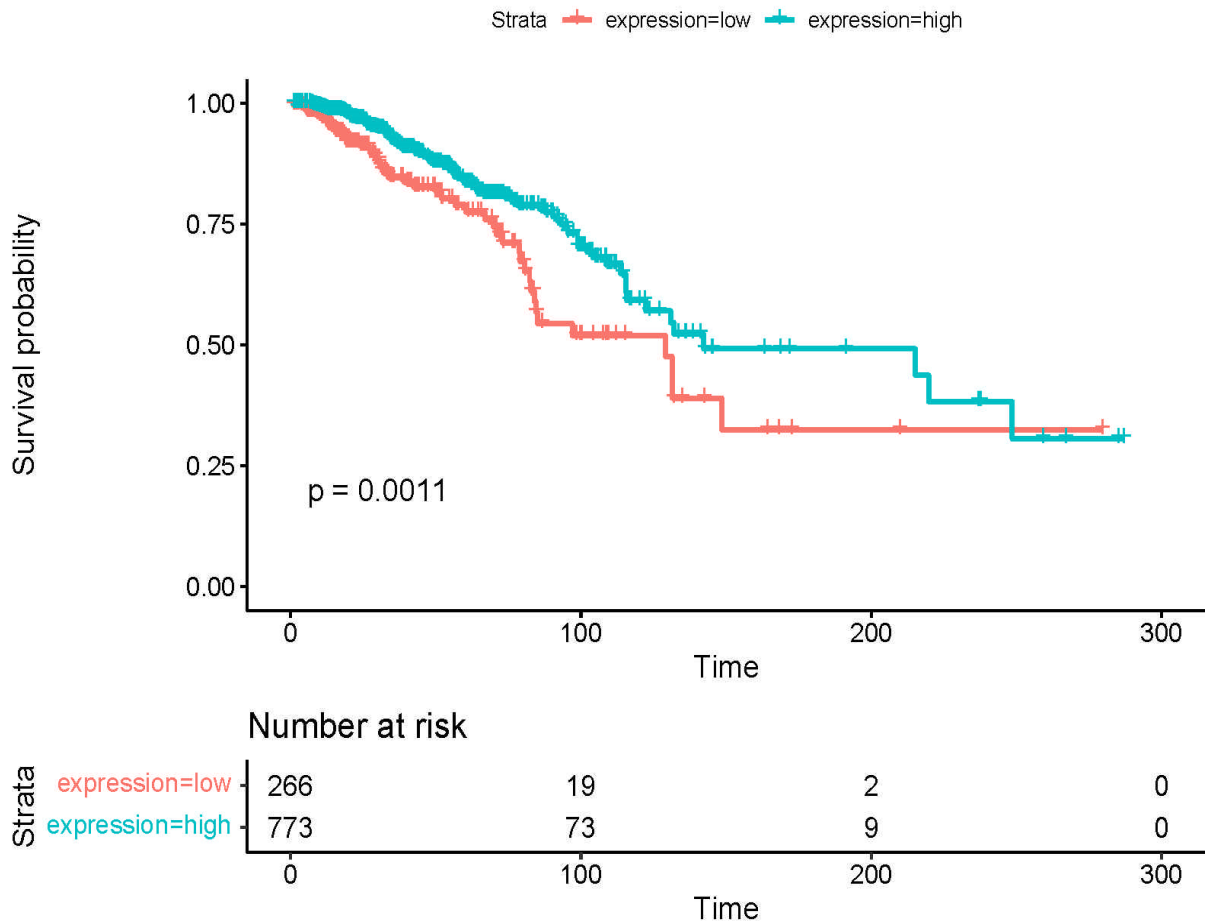


Figure 3. Overall survival in patients with high and low expression of ENPP6
图 3. ENPP6 高表达患者和低表达患者总体生存率的比较

3.2. 免疫浸润分析

通过 TIMER 数据库, 我们分析了 ENPP6 在乳腺癌中表达水平与样本的免疫细胞浸润水平之间的关系。如图 4 所示, 在乳腺癌中 ENPP6 表达与 B 细胞(partial.cor = 0.144, p = 5.90e-06)、CD8⁺T 细胞(partial.cor = 0.284, p = 1.46e-19)、CD4⁺T 细胞(partial.cor = 0.346, p = 1.98e-28)、巨噬细胞(partial.cor = 0.21, p = 2.88e-11)、中性粒细胞(partial.cor = 0.319, p = 5.53e-24)、树突状细胞(partial.cor = 0.314, p = 3.51e-23)的浸润程度。basal 乳腺癌中 ENPP6 表达与 B 细胞(partial.cor = 0.273, p = 2.17e-03)、CD4⁺T 细胞(partial.cor = 0.292, p = 1.12e-03)、中性粒细胞(partial.cor = 0.3, p = 1.47e-03)、树突状细胞(partial.cor = 0.309, p = 8.28e-04)成正相关(p < 0.05)。HER-2 乳腺癌中 ENPP6 表达与巨噬细胞(partial.cor = 0.356, p = 6.04e-03)成正相关(p < 0.05)。luminal 乳腺癌中 ENPP6 表达与 B 细胞(partial.cor = 0.127, p = 3.01e-03)、CD8⁺T 细胞(partial.cor = 0.353, p = 3.22e-17)、CD4⁺T 细胞(partial.cor = 0.389, p = 8.37e-21)、巨噬细胞(partial.cor = 0.369, p = 6.46e-19)、中性粒细胞(partial.cor = 0.33, p = 4.55e-15)、树突状细胞(partial.cor = 0.319, p = 4.29e-14)成正相关(p < 0.05)。

3.3. ENPP6 对于乳腺癌患者预后的预测

我们进一步使用 timeROC R 包来绘制 ENPP6 对于乳腺癌 1 年、3 年和 5 年的预后预测的 ROC 曲线。如图 5 所示, ROC 曲线下面积大小(AUC)分别为 0.61 (1 年)、0.60 (3 年)和 0.60 (5 年)。

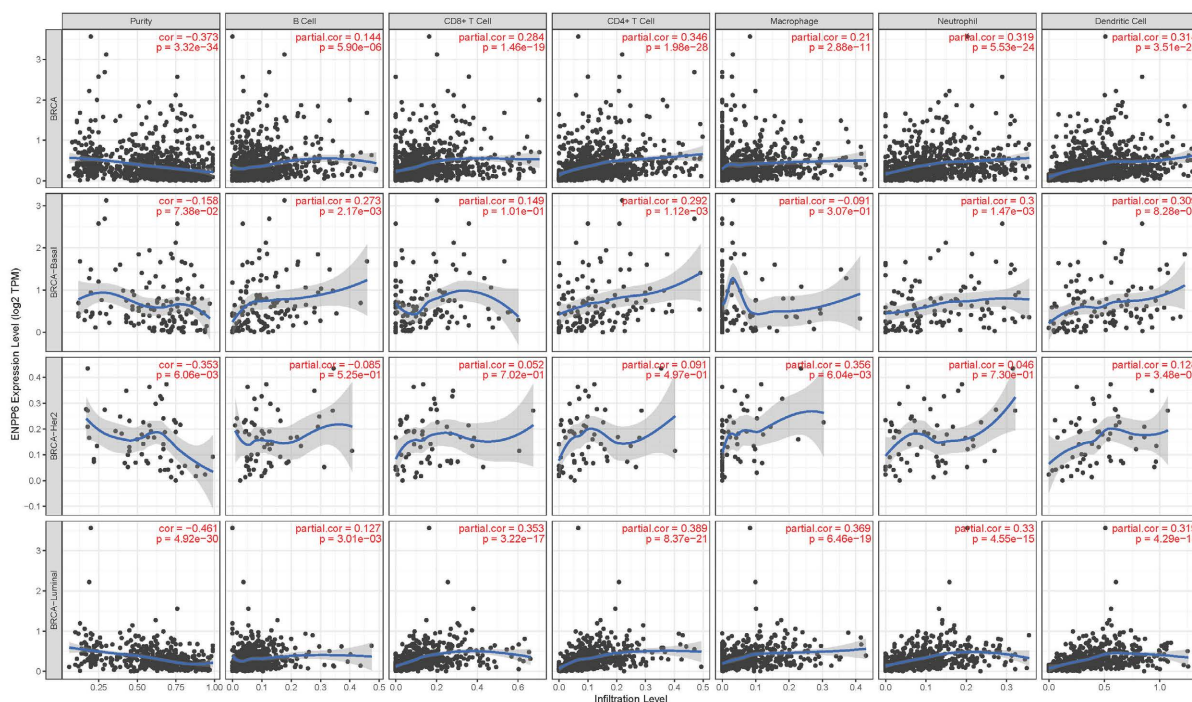


Figure 4. Relationship between ENPP6 expression and the level of immune infiltration in breast cancer (BRCA), BRCA-Basal, BRCA-HER2 and BRCA-luminal

图 4. 在乳腺癌、Basal 乳腺癌、HER2 乳腺癌和 luminal 乳腺癌中 ENPP6 表达量与免疫细胞浸润水平的关系

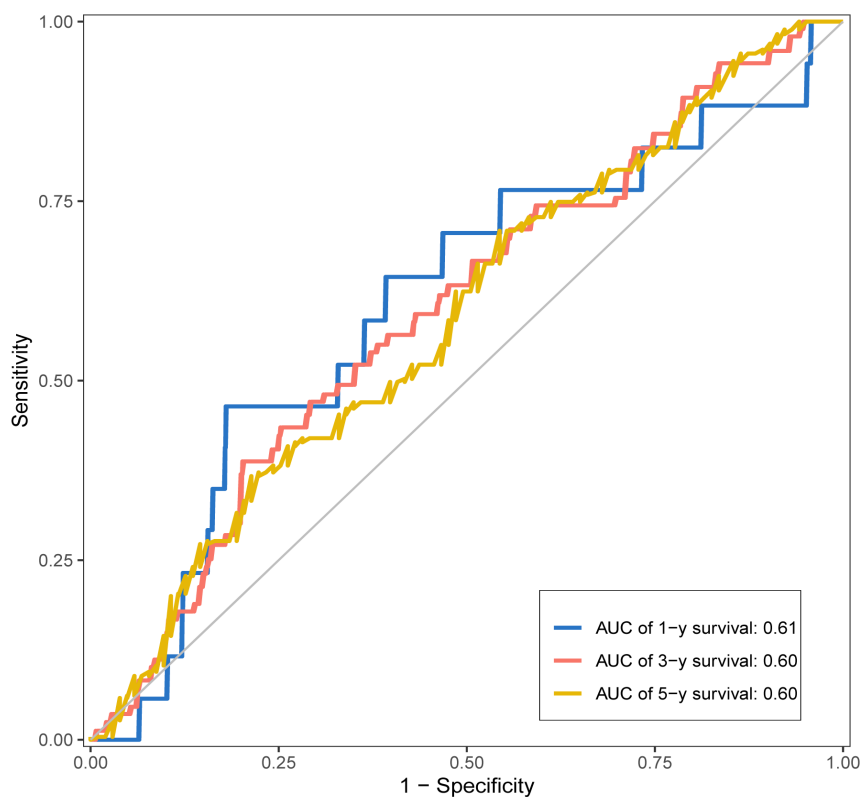


Figure 5. ENPP6 ROC curves for predicting 1-year, 3-year and 5-year prognosis of breast cancer

图 5. ENPP6 预测乳腺癌 1 年、3 年、5 年预后的 ROC 曲线

4. 讨论

早期乳腺癌患者 5 年生存率明显高于发生邻近器官及淋巴结侵犯的患者, 这说明早期发现乳腺癌为患者预后的提升十分有意义。但是, 目前很少有方法可以精准预测乳腺癌的发生。因此, 急需一个稳定的标志物来预测乳腺癌的发生。

在本研究中, 我们首先评估了 ENPP6 在泛癌中的表达, 结果显示在 14 种癌症中 ENPP6 在肿瘤组织中相比正常组织中均较低, 差异具有统计学意义。该结果表明, ENPP6 有作为区分正常组织和乳腺癌组织的分子标志物的潜力。此外, 为了进一步发现 ENPP6 在乳腺癌中的意义, 我们将 TCGA 数据库中所有乳腺癌患者的 ENPP6 基因进行生存分析, 以发现 ENPP6 与总体生存率之间的关系。结果显示 ENPP6 高表达患者的总体生存较 ENPP6 低表达患者好($p < 0.05$)。提示 ENPP6 可能具有抑制肿瘤发生、发展的特征。

本研究的另一个重要方面是 ENPP6 与不同的免疫细胞浸润水平相关。通过公共数据库分析, 我们观察到 ENPP6 在所有分类的乳腺癌中和免疫细胞之间都具有相关性。其中 Luminal 亚型与免疫细胞浸润关联最密切, 在分析的细胞中均可见相关性。其次是 basal 亚型, ENPP6 表达与 B 细胞、CD4⁺T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞呈相关。而 HER2 乳腺癌中 ENPP6 表达只与巨噬细胞浸润相关, 说明 ENPP6 在不同亚型乳腺癌中与免疫细胞浸润关系各不相同。而且, 我们可以发现 ENPP6 与 basal 乳腺癌和 luminal 乳腺癌中与免疫细胞大多呈正相关。因此, 我们推测 ENPP6 可能通过影响肿瘤免疫细胞浸润来对患者预后产生影响。但确定 ENPP6 如何影响各种免疫细胞和抗肿瘤活性是未来研究的一个重要领域。

准确预测乳腺癌患者的预后对患者病情的评估和指导个体化治疗非常有意义。而目前很少有能精准评估患者生存的分子标志物。因此, 我们使用 ENPP6 在乳腺癌患者中的表达水平来预测 1 年、3 年和 5 年的总体生存。ROC 曲线显示 ENPP6 具有较好的预测能力。ENPP6 具有作为预测乳腺癌患者预后的标志物的潜力。

综上所述, 我们的研究为理解 ENPP6 在肿瘤免疫学中的潜在作用及其预后价值提供了见解。ENPP6 mRNA 水平与乳腺癌的预后和免疫浸润水平相关, 表明它有用作预后生物标志物的潜力。应评估 ENPP6 抑制剂干扰免疫细胞的可能性。

参考文献

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2019) Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **69**, 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- [2] Chen, B., Wei, W., Huang, X., Xie, X., Kong, Y., Dai, D., Yang, L., Wang, J., Tang, H. and Xie, X. (2018) circEPSTII as a Prognostic Marker and Mediator of Triple-Negative Breast Cancer Progression. *Theranostics*, **8**, 4003-4015. <https://doi.org/10.7150/thno.24106>
- [3] van't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., et al. (2002) Gene Expression Profiling Predicts Clinical Out-Come of Breast Cancer. *Nature*, **415**, 530-536. <https://doi.org/10.1038/415530a>
- [4] Chen, B., Tang, H., Chen, X., Zhang, G., Wang, Y., Xie, X. and Liao, N. (2018) Transcriptomic Analyses Identify Key Differentially Expressed Genes and Clinical Outcomes between Triple-Negative and Non-Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Management and Research*, **11**, 179-190. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S187151>
- [5] Tang, H., Huang, X., Wang, J., Yang, L., Kong, Y., Gao, G., Zhang, L., Chen, Z.S. and Xie, X. (2019) circKIF4A Acts as a Prognostic Factor and Mediator to Regulate the Progression of Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular Cancer*, **18**, Article No. 23. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0946-x>
- [6] Zarrilli, G., Businello, G., Dieci, M.V., et al. (2020) The Tumor Microenvironment of Primitive and Metastatic Breast Cancer: Implications for Novel Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 8102. <https://doi.org/10.3390/ijms21218102>
- [7] Hanker, A.B., Sudhan, D.R. and Arteaga, C.L. (2020) Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer*

-
- Cell*, **37**, 496-513. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.009>
- [8] Zhuang, Y., Peng, L.S., Zhao, Y.L., Shi, Y., Mao, X.H., Chen, W., *et al.* (2012) CD8⁺ T Cells That Produce Interleukin-17 Regulate Myeloid-Derived Suppressor Cells and Are Associated with Survival Time of Patients with Gastric Cancer. *Gastroenterology*, **143**, 951-962.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.010>
- [9] Kim, J.W., Nam, K.H., Ahn, S.H., Park, D.J., Kim, H.H., Kim, S.H., *et al.* (2016) Prognostic Implications of Immunosuppressive Protein Expression in Tumors as Well as Immune Cell Infiltration within the Tumor Microenvironment in Gastric Cancer. *Gastric Cancer*, **19**, 42-52. <https://doi.org/10.1007/s10120-014-0440-5>
- [10] Thompson, E.D., Zahurak, M., Murphy, A., Cornish, T., Cuka, N., Abdelfatah, E., *et al.* (2017) Patterns of PD-L1 Expression and CD8 T Cell Infiltration in Gastric Adenocarcinomas and Associated Immune Stroma. *Gut*, **66**, 794-801. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310839>
- [11] Borza, R., Salgado-Polo, F., Moolenaar, W.H. and Perrakis, A. (2022) Structure and Function of the Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (ENPP) Family: Tidying up Diversity. *Journal of Biological Chemistry*, **298**, 101526. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101526>
- [12] Dillon, S., Suchacki, K., Hsu, S.N., Stephen, L.A., Wang, R., Cawthorn, W.P., Stewart, A.J., Nudelman, F., Morton, N.M. and Farquharson, C. (2020) Ablation of Enpp6 Results in Transient Bone Hypomineralization. *JBMR Plus*, **5**, e10439. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10439>