

# MEOX2 基因在结直肠癌肿瘤微环境中的作用及其调控机制研究

宋云涛

哈尔滨医科大学大庆分校, 黑龙江大庆市, 163319;

**摘要:** 本研究通过多组学数据分析, 探讨了 MEOX2 基因在结直肠癌 (CRC) 肿瘤微环境 (TME) 中的表达特征、调控模式及其在免疫逃逸中的作用。研究发现, MEOX2 在 CRC 中异常高表达, 并与患者预后不良相关。通过富集分析, 发现 MEOX2 与 TGF- $\beta$  信号通路相关, 该通路是肿瘤免疫逃逸的关键调控因素。单细胞分析显示, MEOX2 主要在基质细胞中表达, 并通过影响基质细胞与髓细胞的细胞间通讯, 间接影响免疫逃逸。此外, 研究还发现 MEOX2 基因的表达水平与增强子活性密切相关, 其表达改变可能与肿瘤微环境中的表观遗传重编程有关。本研究为 CRC 的预防和治疗提供了新的分子靶点。

**关键词:** 结直肠癌; 肿瘤微环境; MEOX2; 免疫逃逸

**DOI:**10.69979/3029-2808.24.10.005

## 1 材料与方法: 一般资料或材料

从 GEO 数据库获取了结直肠癌相关的多组学数据, 包括 ChipSeq 原始数据 (GSE166254) (H3k27ac)、RNAseq 原始数据 (GSE166254) 和单细胞测序数据 (GSE132465)。从 TCGA 数据库收集结直肠癌 (COAD) 和直肠癌 (READ) 的临床样本数据与原始计数数据。

### 1.1 方法

#### 1.1.1 数据制取

Chip-Seq 数据使用 Bowtie2 将 fastq 数据比对到 hg19 基因组, Samtools 处理成 bam 格式, Picard 去除 PCR 重复。用 MACS2 进行 peak calling, 使用 `--broad` 参数并设 P 值  $1e-10$  来获得富集区并用其 `bdgcmp` 模块去噪。用 bedtools 排除黑名单区域后用 ROSE 进行位点识别。用 deepTools 的 `bamCoverage` 工具计算 RPKM。用 IGC 可视化增强子区域。

RNA-seq 数据利用 hisat2 将 fastq 格式的测序数据给比对到 hg38 基因组。Samtools 处理成 bam 格式, 并用其进行排序、去重, 为排序后的 bam 文件建立索引。最后采用 featureCounts 工具, 根据 hg38 基因组对每个样本的基因表达水平进行定量计数并输出。

#### 1.1.2 差异分析及高变基因筛选

使用 DESeq2 软件包来评估基因表达的差异性。设置 P 值 ( $<0.05$ ) 还有 Fold Change 阈值 ( $|\log_2FC|>1$ ), 来筛选出在结直肠癌组织中异常表达的基因。

为了筛选在结直肠癌样本中差异性更大的基因, 我们计算了 RNAseq 与 TCGA 数据方差, 选择方差大于 75% 分位数的基因, 从而提取那些差异性较大的基因用于后

续分析。

#### 1.1.3 富集分析及生存分析

采用了 GO 与 KEGG 富集分析。在富集分析中, 我们设置了以下统计学阈值: P 值 ( $p < 0.05$ ) 和 q 值 ( $q < 0.05$ )。

为了探究特定基因表达与结直肠癌患者预后之间的关联, 我们利用了 TCGA 数据库中的临床数据进行生存分析。选择 P 值小于 0.05 的基因作为与预后显著相关的候选基因。并使用 Kaplan-Meier 生存曲线来可视化不同表达水平的基因与患者的生存率之间的关系。

#### 1.1.4 ESTIMATE 评分分析

通过计算预后相关基因表达与 ESTIMATE 评分的 Pearson 相关系数, 筛选出与 TME 比较相关的基因 ( $r > 0.6$ ), 以探究基因与 TME 的相互关联。

#### 1.1.5 单细胞分析

利用 seurat 绘制了 umap 图 (`dims=40`) 并使用 `findallmarkers` 函数找到表达 MEOX2 基因显著上调的细胞。之后我们使用 `cellchat` 构建了细胞间通讯网络构建, 并通过分析 CellChat 构建的网络, 探索了结直肠癌微环境中不同细胞群体间的相互作用。

## 2 结果

### 2.1 多组学数据整合

首先对 GEO 数据库中的 ChIP-Seq 和 RNA-Seq 数据进行差异分析, 选出正常与癌症组织间表达异常的位点与基因, 并利用方差从 RNA-Seq 数据中筛选出高差异基因。合并两数据集找出在增强子活性和基因表达方面均异常的基因集。

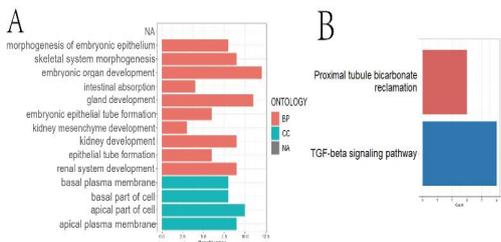
对于 TCGA 的 COAD 和 READ 数据也执行差异分析,

并利用方差筛选出高差异基因。合并 COAD 和 READ 两癌症数据以筛选在结直肠癌中均表现出显著差异性的基因。

最后合并了 GEO 数据库的交集基因和来自 TCGA 数据库的交集基因。得到了两个数据库共有的 134 个基因，这些基因在不同组学上均表现出异常，且在两个数据库的样本中均表现出显著差异，表明它们在结直肠癌中可能有重要意义。

## 2.2 通路富集分析

图一：



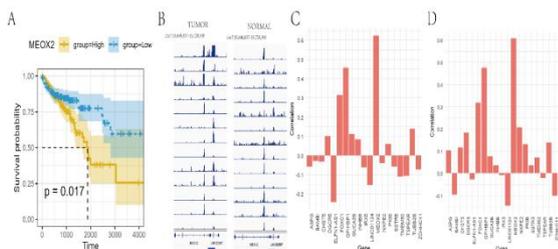
(A) GO 富集 (B) KEGG 富集

通过 GO 富集分析，我们发现在 BP 层面主要涉及生长发育及吸收等生理活动。在 CC 层面上，富集分析突出了细胞膜部分、细胞顶端和基部的部分。表明所研究的基因集中的基因可能在调控细胞的吸收功能、细胞的生长与分化，以及细胞间通讯中发挥着作用。

KEGG 富集分析包括近端小管盐回收和 TGF-β 信号通路。这些通路表明我们所关注的基因集与吸收过程、细胞生长发育以及免疫调节相关。

## 2.3 特异性基因筛选

图二：



(A) MEOX2 的 K-M 曲线图。(B) MEOX2 基因的信号强度与增强子区域 (C) COAD 基因表达与 estimate 评分的 Pearson 相关性图 (D) READ 基因表达与 estimate 评分的 Pearson 相关性图

首先我们发现，在富集到的条目与通路中有促进肿瘤生长扩散与免疫逃逸的相关条目与通路。利用 TCGA 的 COAD 与 READ 的临床数据和表达数据，对先前识别的 134 个基因做生存分析。筛选出了 19 个与结直肠癌预后显著相关 ( $p < 0.05$ ) 的基因。

接下来我们发现在富集到的相关条目与通路中有

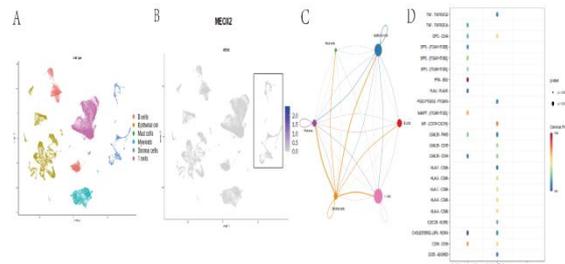
对免疫微环境产生影响的通路和条目。计算 ESTIMATE 评分，并进一步分析了这 19 个基因与 ESTIMATE 评分的 Pearson 相关系数。通过设置阈值 ( $r > 0.6$ )，筛选出了与肿瘤微环境相关较强的基因，其中 MEOX2 基因因其与 ESTIMATE 评分的较高相关性还有显著相关的预后而被选为进一步研究的对象。其中 MEOX2 基因在 COAD 样本基质评分相关性为 0.7376，免疫评分相关性为 0.3714，在 READ 样本基质评分相关性为 0.7149，免疫评分相关性为 0.3578。说明其主要对基质细胞产生影响。

为进一步了解 MEOX2 基因在结直肠癌中的调控机制，使用 IGV 工具可视化了 MEOX2 基因的信号强度和增强子区域。可以看到在增强子区域，tumor 与 normal 样本呈现出显著差异。通过观察可以发现，在 tumor 样本中，增强子位点对应的峰值更高

## 2.4 单细胞分析

前面发现基因 MEOX2 表达水平与基质评分有较强相关，利用单细胞数据对该现象进行进一步验证。在 GO 富集中，我们发现一些基因在细胞间通讯中发挥着作用。利用单细胞分析查询相关的细胞通讯过程并查询相关文献探寻 MEOX2 在细胞通讯过程中的作用。

图三：



(A) 单细胞 umap 图 (B) 基因 MEOX2 高表达的 umap 细胞群系图 (C) 细胞通讯 weight 图, 红色为 B 细胞, 绿色为肥大细胞, 紫色为纤维细胞, 橙色为基质细胞, 粉色为 T 细胞 (D) 细胞通讯气泡图

通过 UMAP 图可视化单细胞数据的聚类结果。MEOX2 的细胞群系图显示了 MEOX2 主要在基质细胞中表达，与前面结果一致。细胞通讯 weight 图表明基质细胞与其他所有细胞类型都有通讯且权重较高，表现基质细胞在 CRC 肿瘤微环境中的重要性。细胞通讯气泡图揭示了基质细胞与髓细胞在多个分子上的相互作用，基质细胞与髓细胞的细胞通讯密切。通过有关文献查询到 MEOX2 对于查询到的细胞通讯有间接影响。

## 3 讨论

本研究探讨了 MEOX2 基因在结直肠癌 (CRC) 肿瘤微环境中的表达特征、调控模式及其在免疫逃逸中的作用。为 CRC 预防和治疗提供新的分子靶点。

通过差异分析发现,在CRC中MEOX2异常高表达。通过生存分析,又发现MEOX2表达水平较高的肿瘤样本与患者预后不良相关并通过后续分析发现MEOX2的表达水平与肿瘤免疫微环境有较强相关性,表明MEOX2基因对于肿瘤免疫微环境有较重要影响。根据有关文献我们发现,MEOX2的上调会促进肿瘤细胞的增殖及迁移<sup>[6]</sup>,促进肿瘤的生长与扩散。此外,在KEGG富集分析中发现的TGF- $\beta$ 通路是促进肿瘤免疫逃逸的关键调控因素<sup>[7]</sup>。Meox2的上调可以影响细胞分化,将肌成纤维细胞转变为成纤维细胞<sup>[8]</sup>,使结肠纤维化影响吸收,且纤维细胞会促进TGF- $\beta$ 通路<sup>[9]</sup>。上述支持了MEOX2在结肠癌中的免疫逃逸中的作用。

根据单细胞分析,MEOX2在基质细胞群系中上调且基质细胞与髓细胞细胞间的通讯密切,侧面验证了前面相应的分析。通过以往研究得知MEOX2可通过TGF- $\beta$ 通路来影响SPP1分子从而对肿瘤微环境中的细胞间通讯产生影响来影响免疫逃逸<sup>[10]</sup>。SPP1分子在基质细胞与髓细胞间的多个通讯过程发挥作用。即MEOX2可以通过间接影响SPP1分子从而基质细胞与髓细胞的细胞通讯继而影响免疫逃逸。

基因的表达水平与增强子的活性密切相关<sup>[11]</sup>,而增强子的活性又受到肿瘤微环境的调控<sup>[12]</sup>。这些发现表明MEOX2基因表达的改变与肿瘤微环境中的表观遗传重编程可能有关。

### 参考文献

[1]周海军,白铁成,刘涛,等.结肠直肠癌的诊断与治疗新进展[J].临床医学进展,2021,11(4):1747-1754.

[2]Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[3] Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy[J]. Nat Med, 2018, 24: 541-550.

[4]Sur I, Taipale J. The role of enhancers in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16: 483-493.

[5] Wang J, Chen Y, Wang Q, et al. MEOX2-mediated regulation of Cathepsin S promotes cell proliferation and motility in glioma[J]. Cell Death & Disease, 2022, 13(4): 360.

[6] SchÖnrock A, Heinzemann E, Steffl B, et al. MEOX2 homeobox gene promotes growth of malignant gliomas[J]. Neuro-Oncology, 2022, 24(11): 19

11-1924.

[7]Lainé A, Labiad O, Hernandez - Vargas H, et al. Regulatory T cells promote cancer immune - escape through integrin  $\alpha v \beta 8$  - mediated TGF -  $\beta$  activation[J]. Nat Commun, 2021, 12: 6228.

[8] Cunnington RH, Northcott JM, Ghavami S, et al. The Ski - Zeb2 - Meox2 pathway provides a novel mechanism for regulation of the cardiac myofibroblast phenotype[J]. Journal of Cell Science, 2014, 127: 40-49.

[9] Yang M, Li D, Jiang Z, et al. TGF- $\beta$ -Induced FLRT3 Attenuation Is Essential for Cancer-Associated Fibroblast-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer[J]. Molecular Cancer Research, 2022, 20(8): 1247-1259.

[10]Qi J, Sun H, Zhang Y, et al. Single - cell and spatial analysis reveal interaction of FAP + fibroblasts and SPP1 + macrophages in colorectal cancer[J]. Nat Commun, 2022, 13: 1742.

[11]Barral A, Déjardin J. The chromatin signatures of enhancers and their dynamic regulation[J]. Nucleus (Austin, Tex.), 2023, 14(1): 216-251.

[12]Zhou R W, Xu J, Martin T C, et al. A local tumor microenvironment acquired super - enhancer induces an oncogenic driver in colorectal carcinoma[J]. Nat Commun, 2022, 13: 6041.

基金项目:黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(项目编号:S20240226D043)。

直肠癌(CRC)是全球常见恶性肿瘤,2020年新发病例超190万且死亡超93万[1]。因此,寻找新治疗靶点和预防策略,具有重要临床意义。

肿瘤微环境(TME)在近些年受到大量关注,其影响肿瘤的生长、侵袭和转移[2]等。肿瘤免疫微环境已经成为研究新热点[3]。增强子是重要的基因表达调控元件[4]。MEOX2基因是多种肿瘤中异常表达的转录因子,其在肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭中的作用在最近的研究中被逐渐揭示[5]。但MEOX2在CRC中的作用及调控机制仍不清楚。

本研究探讨CRC肿瘤微环境中MEOX2基因的表达和调控模式,分析其增强子区域重编程现象及其在免疫逃逸中的作用。有望为CRC预防和治疗提供新的分子靶点。