

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.05.0391

论著

## 外阴鳞状细胞癌关键基因的筛选及免疫浸润分析

申杨<sup>1</sup>, 段子博<sup>1</sup>, 谭展望<sup>2</sup>, 楚健子<sup>1</sup>, 祝佩芹<sup>1</sup>, 李艳青<sup>1</sup>, 李国雷<sup>1</sup>, 林晓华<sup>1,3,4</sup>

(1. 河北中医药大学第一附属医院妇科, 石家庄 050011; 2. 河北医科大学中西医结合学院中医经典教研室, 石家庄 050031; 3. 河北省中西医结合肝肾病证研究重点实验室, 石家庄 050091; 4. 河北省浊毒证重点实验室, 石家庄 050011)

**摘要** 目的: 利用生物信息学方法筛选外阴鳞状细胞癌(VSCC)的关键基因及分析免疫浸润特征。方法: 从 GEO 数据库中下载 VSCC 相关基因表达数据, 应用差异表达基因(DEGs)分析和加权基因共表达网络分析筛选出共同的 DEGs, 对 DEGs 进行富集分析。采用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建蛋白互作(PPI)网络, 并通过 4 种算法筛选出关键基因, 进行关键基因 GSEA 分析。应用 CIBERSORT 分析 VSCC 相关免疫细胞浸润特征及关键基因与免疫细胞的相关性。结果: 共筛选出 182 个 DEGs, DO 富集主要涉及生殖器官良性肿瘤、结缔组织癌等疾病; GO 和 KEGG 富集结果主要与表皮发育、角质化包膜、氧化应激、免疫细胞迁移等有关; PPI 网络中有 65 个节点, 90 条边, 筛选出 6 个关键基因, *SI00A7*、*SPRR2B*、*SPRR2G*、*CASPI4*、*CDSN*、*ESR1*, 共同富集到了细胞周期、蛋白酶体信号通路。免疫浸润分析结果显示, 与对照组相比, VSCC 组初始 B 细胞、静息 CD4<sup>+</sup>T 记忆细胞下调(均  $P < 0.05$ ), 记忆 B 细胞、调节性 T 细胞、活化的 NK 细胞、巨噬细胞 M0 型、静息肥大细胞、活化的肥大细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞上调(均  $P < 0.05$ )。Spearman 相关性分析显示, *SI00A7*、*SPRR2G*、*CASPI4*、*CDSN* 均与  $\gamma\delta$ T 细胞呈负相关(均  $P < 0.05$ ), 与巨噬细胞 M0 型呈正相关(均  $P < 0.05$ ); *ESR1* 与巨噬细胞 M0 型呈负相关( $P < 0.05$ ), 与静息 CD4<sup>+</sup>T 记忆细胞呈正相关( $P < 0.05$ ); *SI00A7*、*CASPI4* 与静息 CD4<sup>+</sup>T 记忆细胞呈负相关(均  $P < 0.05$ ); *SPRR2G*、*CDSN* 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞呈负相关(均  $P < 0.05$ )。结论: *SI00A7*、*SPRR2B*、*SPRR2G*、*CASPI4*、*CDSN*、*ESR1* 可能是 VSCC 潜在的生物标志物, 长期慢性炎症刺激导致表皮终末分化过程异常可能是 VSCC 发生、发展的关键因素。

**关键词** 外阴鳞状细胞癌; 加权基因共表达网络分析; 差异表达基因; 富集分析; 免疫浸润

中图分类号 R711.72

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)05-0391-08

### Screening and immunoinfiltration analysis of key genes in vulvar squamous cell carcinoma

SHEN Yang<sup>1</sup>, DUAN Zibo<sup>1</sup>, TAN Zhanwang<sup>2</sup>, CHU Jianzi<sup>1</sup>, ZHU Peiqin<sup>1</sup>, LI Yanqing<sup>1</sup>, LI Guolei<sup>1</sup>, LIN Xiaohua<sup>1,3,4</sup>

(1. Department of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China; 2. Traditional Chinese Medicine Classics Teaching and Research office, College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China; 3. Hebei Key Laboratory of Liver and Kidney Disease Research of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 4. Hebei Key Laboratory of Turbidity Toxin Syndrome, Shijiazhuang 050011, China)

**Abstract** **Objective:** The key genes and immunoinfiltration characteristics of vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) were screened by bioinformatics methods. **Methods:** The gene expression data related to VSCC were downloaded from GEO database. Differentially expressed genes (DEGs) analysis and weighted gene co-expression network analysis were used to screen out common DEGs, and enrichment analysis of DEGs was performed. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed using STRING database and Cytoscape software, and the key genes were selected by four algorithms, and the key genes were analyzed by GSEA. CIBERSORT was used to analyze the infiltration characteristics of VSCC-related immune cells and the correlation between key genes and immune cells. **Results:** A total of 182 DEGs were selected, and DO enrichment mainly involved benign tumors of reproductive organs, connective tissue cancer and other diseases. The results of GO and KEGG enrichment were mainly related to epidermal development, keratinized envelope, oxidative stress and immune cell migration. There were 65 nodes and 90 edges in the PPI network, and six key genes were screened out, including *SI00A7*, *SPRR2B*, *SPRR2G*, *CASPI4*, *CDSN*, *ESR1*. Cell cycle and proteasome signaling pathways were enriched. Compared with the control group, the initial B cells and resting CD4<sup>+</sup>T memory cells in the VSCC group were downregulated (all  $P < 0.05$ ), while memory B cells, regulatory T cells, activated NK cells, macrophage M0 type, resting mast cells, activated mast cells, eosinophils, and neutrophils were upregulated (all  $P < 0.05$ ). Spearman correlation analysis revealed that *SI00A7*, *SPRR2G*, *CASPI4*, and *CDSN* were all negatively associated with  $\gamma\delta$ T cells (all  $P < 0.05$ ), and positively correlated with macrophage M0 type

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目(81403428); 河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(ZF2023156); 河北省中医药管理局科研计划项目(2024019)

作者简介 申杨(2000-), 女, 硕士在读, 研究方向: 妇科疾病的基础与临床研究; 通信作者: 林晓华, E-mail: linxiaohua1999@sina.com。

(all  $P < 0.05$ ). *ESR1* was negatively correlated with macrophage M0 type ( $P < 0.05$ ) and positively correlated with resting CD4<sup>+</sup>T memory cells ( $P < 0.05$ ). *SI00A7* and *CASPI4* were negatively correlated with resting CD4<sup>+</sup>T memory cells (all  $P < 0.05$ ). *SPRR2G*, *CDSN* were negatively correlated with CD8<sup>+</sup>T cells (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** *SI00A7*, *SPRR2B*, *SPRR2G*, *CASPI4*, *CDSN*, *ESR1* may be potential biomarkers of VSCC, and the abnormal process of epidermal terminal differentiation caused by long-term chronic inflammatory stimulation may be a key factor in the occurrence and development of VSCC.

**Key words** vulvar squamous cell carcinoma; weighted gene co-expression network analysis; differentially expressed genes; enrichment analysis; immunoinfiltration

据全球癌症统计数据显示,外阴癌的发病率逐年增加,2020 年在全球范围内有 45 240 例新发病例和 17 427 例死亡病例<sup>[1]</sup>。外阴鳞状细胞癌(vulvar squamous cell carcinoma, VSCC) 是外阴癌中最常见的亚型,主要发生于绝经后的妇女,其病因未完全阐明,可能与外阴硬化性苔藓、人乳头瘤病毒(HPV)感染、淋病、梅毒、外阴炎症等有关<sup>[2]</sup>。

生物信息学是一门整合数学、物理、计算机和生命科学、医学、药学等学科的新兴交叉学科,近年来被广泛应用于探索疾病病理机制、发掘关键基因、分析药物靶点等领域,推动了医学研究的发展。加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)用于描述微阵列样品中基因之间的相关模式,根据基因的表达模式进行聚类,形成模块,并分析模块与特定特征之间的关系,以此来识别候选生物标志物或治疗靶点<sup>[3]</sup>,目前已广泛应用于各种疾病的研究中<sup>[4]</sup>。CIBERSORT 是一种用于评估复杂混合组织样本中不同细胞类型相对丰度的计算方法,可通过计算获得的样本中 22 种免疫细胞的相对比例,以此来探究疾病免疫浸润的机制<sup>[5]</sup>。

为探索 VSCC 病理过程中潜在的生物标志物及病理机制,本研究应用生物信息学方法对 VSCC 相关基因数据进行分析,挖掘与 VSCC 发病相关的关键基因及免疫浸润特征,以期对 VSCC 的诊断和治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 数据获取及预处理** 从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载 GSE38228 (平台 GPL10558)的表达矩阵和平台信息。GSE38228 包含 13 例 VSCC 样本,5 例正常对照样本。使用 R 语言对原始数据进行背景校正及归一化等预处理,删除重复和未识别的基因,并利用 GPL10558 平台注释信息进行探针注释,将原始数据转换成基因表达矩阵。

**1.2 差异表达基因(DEGs)的筛选** 运用 R 软件 limma 包进行 DEGs 分析,以  $|\log_{2}FC| > 1$  且校正  $P(\text{adj.}P\text{-Val}) < 0.05$  为筛选阈值,获得 VSCC 组与对照组之间的

DEGs。同时,绘制火山图及热图将结果进行可视化。

**1.3 WGCNA** 运用 R 软件 WGCNA 包构建基因共表达网络,首先按照中位数绝对偏差进行排序,获取前 5 000 个基因进行后续分析。选择适合的加权系数  $\beta$  即最佳软阈值构建无尺度网络,采用动态剪切算法构建基因聚类树状图,将表达相似的基因聚类成不同颜色的功能模块,设置模块最小基因数为 30。计算基因模块与组别信息之间的相关系数及  $P$  值,选出与 VSCC 相关性最强的基因模块。最后将该模块中的基因与差异分析得出的 DEGs 取交集,得到最终的 DEGs,用以后续分析。

**1.4 疾病本体(disease ontology, DO)和基因功能富集分析** 运用 R 软件中 DOSE 包<sup>[6]</sup>、clusterProfiler 包<sup>[7]</sup>对筛选出最终的 DEGs 进行 DO 富集分析、基因本体论(gene ontology, GO)富集分析、京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**1.5 蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)网络的构建与分析** 利用 STRING 网站(<https://string-db.org/>)对最终的 DEGs 构建 PPI 网络,选择物种为“Homo sapiens”,设置最低交互分数  $> 0.4$ ,去除游离节点后下载 PPI 网络数据,使用 Cytoscape3.9.0 软件进行可视化,并通过 cytoHubba 插件中的 MCC、DMNC、MNC、Degree 共 4 种算法计算前 10 个 hub 基因,利用韦恩图<sup>[8]</sup>取 4 种算法的共有基因为关键基因。

**1.6 关键基因表达水平及单基因 GSEA 分析** 运用 R 软件提取关键基因的表达量,比较其在 VSCC 组与对照组的表达水平;同时,为了确定关键基因相关信号通路,计算其他基因与关键基因表达之间的相关性,将显著相关的基因作为一个集合,进行富集分析,以  $P < 0.05$  为阈值筛选阳性基因集,对排名前 5 的基因集进行可视化。

**1.7 免疫浸润分析** 从 Cibersort 网站(<https://cibersort.stanford.edu/>)下载 22 个免疫细胞的基因表达矩阵。通过 CIBERSORT 算法,计算所有样本中免疫细胞的相对比例,分析各样本中免疫细胞浸润情

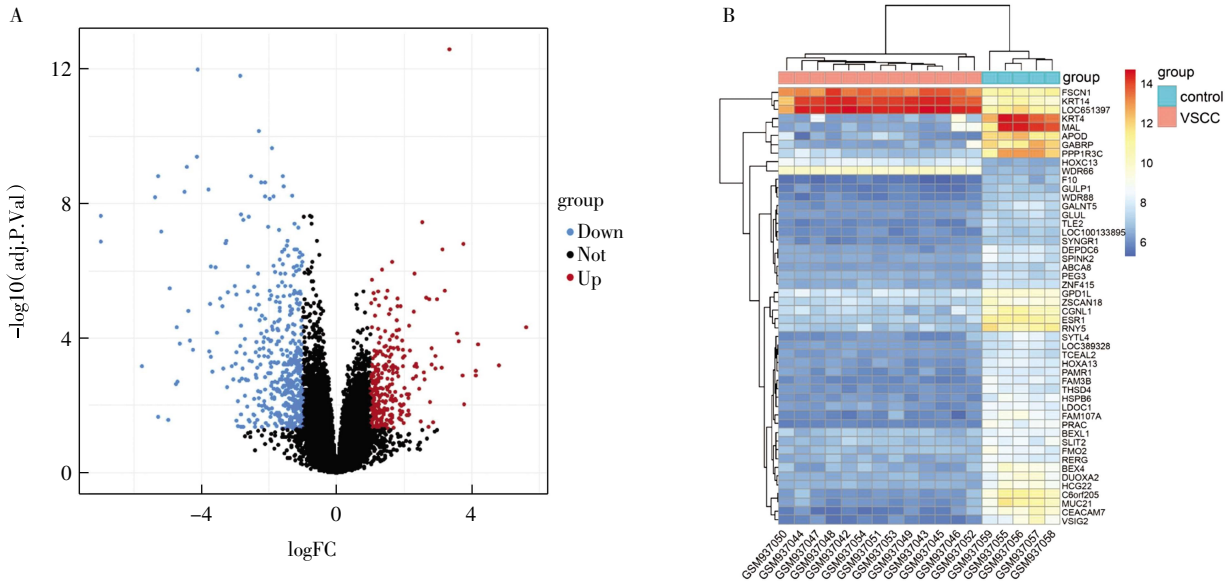
况、对照样本与 VSCC 患者间免疫细胞的差异,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义,并使用 *Spearman* 相关性系数对关键基因与免疫细胞进行相关性分析。

## 2 结果

**2.1 DEGs 的筛选** 差异分析共筛选出 751 个 DEGs,其中上调基因 291 个,下调基因 460 个(图 1A),取差异前 50 个基因绘制热图(图 1B)。

**2.2 WGCNA** 计算得到的软阈值为 12 构建基因

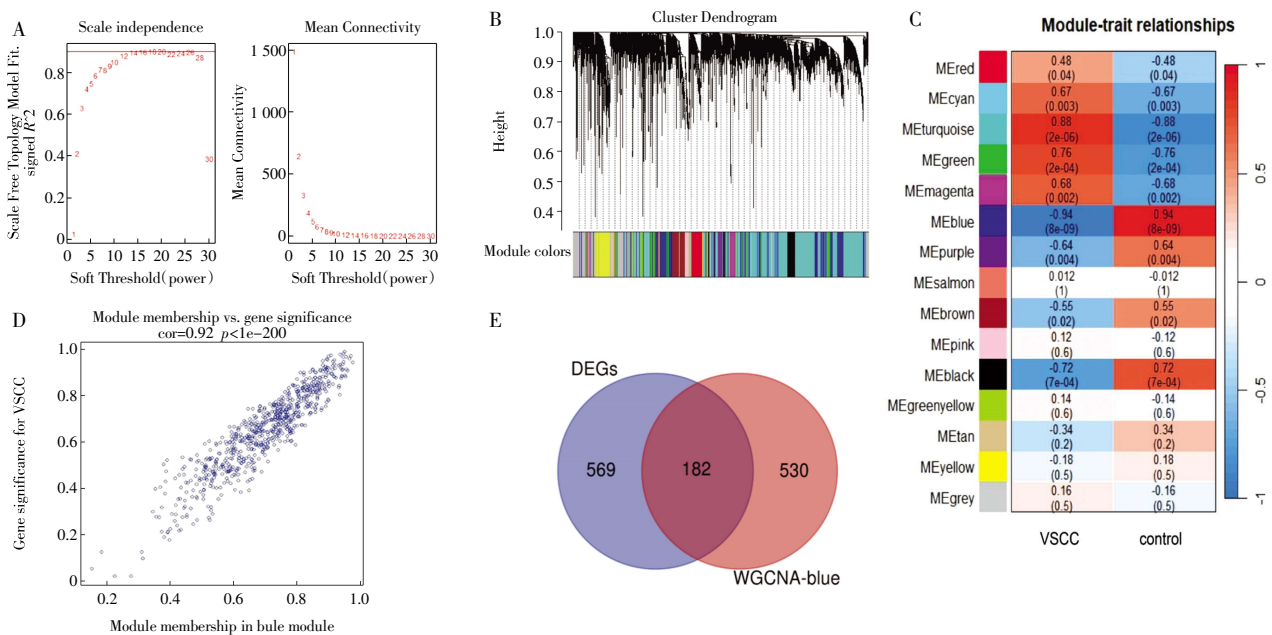
共表达网络(图 2A),利用动态剪切树法得到 15 个基因模块(图 2B)。计算各个共表达模块与临床特征之间的关系,绘制模块与临床特征的相关性热图(图 2C),与 VSCC 最显著相关的 blue 模块包括 712 个基因,该模块的模块基因与 VSCC 的基因显著性高度相关( $\text{cor}=0.92, P<1e-200$ ,图 2D)。将 blue 模块内的基因与 GEO 的 DEGs 取交集,最终得到 182 个 DEGs,进行后续分析(图 2E)。



注:A:DEGs 火山图,红色代表上调基因,蓝色代表下调基因,黑色代表差异不显著基因;B:前 50 个 DEGs 热图,红色代表高表达,蓝色代表低表达;VSCC:外阴鳞状细胞癌;DEGs:差异表达基因

图 1 DEGs 的火山图和热图

Fig.1 Volcano map and heat map of DEGs



注:A:最佳软阈值的确定;B:基因聚类树;C:模块—性状相关性热图,红色代表正相关,蓝色代表负相关;颜色越深表示相关性越强;D:蓝色模块中基因显著性散点图, $\text{cor}=0.92, P<1e-200$ ;E:筛选共同 DEGs 维恩图;DEGs:差异表达基因;WGCNA-blue:蓝色模块内基因

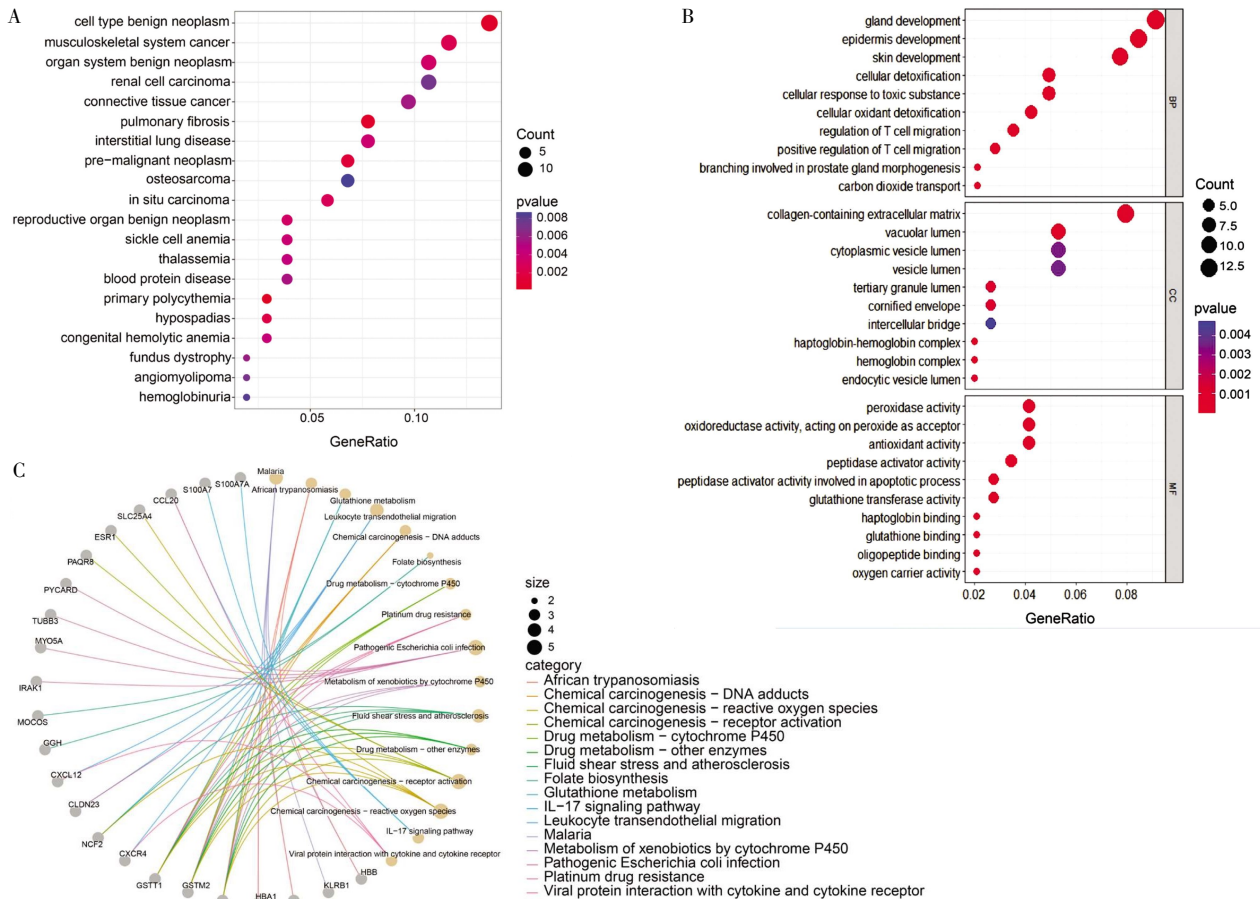
图 2 WGCNA 结果

Fig.2 WGCNA results

2.3 DO 和基因功能富集分析 DO 分析结果显示,涉及生殖器官良性肿瘤、结缔组织癌、细胞类型良性肿瘤、原位癌等疾病(图 3A)。GO 富集结果显示,在生物过程(BP)方面,主要集中在表皮发育、皮肤发育、T 细胞迁移的调节等过程;在细胞成分(CC)方面,主要与含胶原蛋白的细胞外基质、囊泡腔、角质化包膜等密切相关;在分子功能(MF)方面,主要

影响过氧化物酶活性、抗氧化活性、谷胱甘肽结合等(图 3B)。KEGG 富集结果显示,基因主要集中在化学致癌-DNA 加合物、白细胞跨内皮迁移、IL-17 信号通路、致病性大肠杆菌感染等途径(图 3C)。

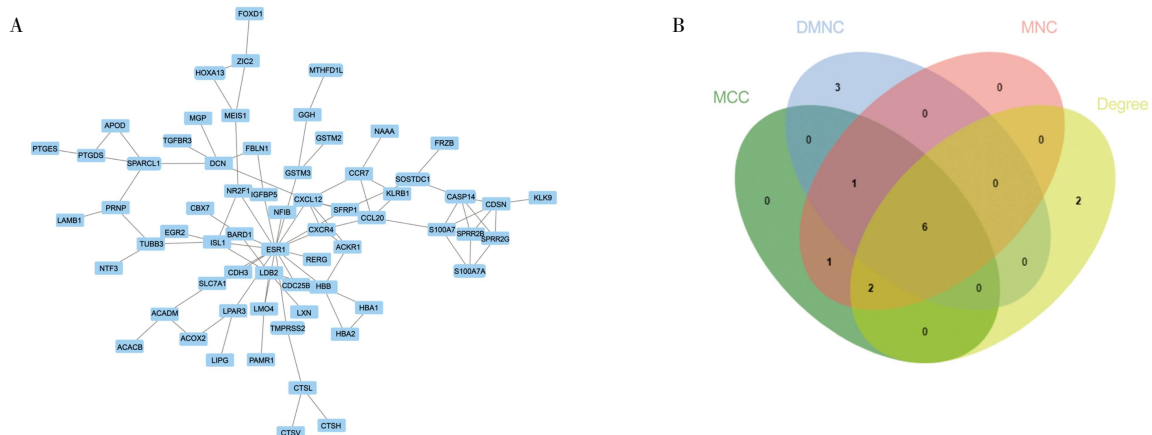
2.4 PPI 网络的构建与分析 PPI 网络由 65 个节点和 90 条边组成(图 4A),采用 MCC、DMNC、MNC、Degree 算法,得出每种算法的前 10 个基因(表1),



注:A:最终 DEGs 的 DO 富集气泡图;B:最终 DEGs 的 GO 富集气泡图;C:最终 DEGs 的 KEGG 通路网络

图 3 DO、GO 和 KEGG 富集分析结果

Fig.3 DO, GO and KEGG enrichment analysis results



注:A:最终 DEGs 的 PPI 网络;B:MCC、DMNC、MNC、Degree 共 4 种算法筛选关键基因维恩图;PPI:蛋白质互作

图 4 PPI 网络及筛选关键基因维恩图

Fig.4 Venn diagram of PPI network and key genes for screening



最终取交集得到 6 个关键基因:*S100A7*、*SPRR2B*、*SPRR2G*、*CASP14*、*CDSN*、*ESR1*(图 4B)。

表 1 4 种算法的前 10 个基因

Tab.1 Top 10 genes of the four algorithms

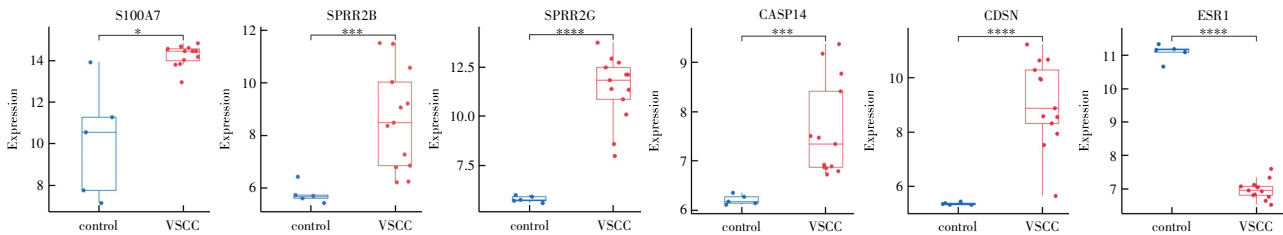
MCC	DMNC	MNC	Degree
<i>S100A7</i>	<i>CASP14</i>	<i>CXCL12</i>	<i>ESR1</i>
<i>SPRR2G</i>	<i>CDSN</i>	<i>S100A7</i>	<i>CXCL12</i>
<i>SPRR2B</i>	<i>S100A7</i>	<i>SPRR2G</i>	<i>S100A7</i>
<i>CASP14</i>	<i>SPRR2G</i>	<i>SPRR2B</i>	<i>LDB2</i>
<i>CDSN</i>	<i>SPRR2B</i>	<i>CASP14</i>	<i>DCN</i>
<i>ESR1</i>	<i>S100A7A</i>	<i>CDSN</i>	<i>CASP14</i>
<i>CXCL12</i>	<i>ESR1</i>	<i>CCL20</i>	<i>SPRR2G</i>
<i>CCL20</i>	<i>CCR7</i>	<i>CXCR4</i>	<i>SPRR2B</i>
<i>S100A7A</i>	<i>NR2F1</i>	<i>ESR1</i>	<i>CDSN</i>
<i>CXCR4</i>	<i>APOD</i>	<i>S100A7A</i>	<i>CCL20</i>

2.5 关键基因表达水平及单基因 GSEA 分析与对照组相比,VSCC 组 *S100A7*、*SPRR2B*、*SPRR2G*、*CASP14*、*CDSN* 表达量显著上调(均  $P<0.05$ ),*ESR1* 表达量显著下调( $P<0.05$ )(图 5)。单基因 GSEA 分析结果显示,6 个关键基因均富集到细胞周期、蛋白酶体信号通路;5 个关键基因富集到单纯疱疹病毒 1 型感染、真核生物中核糖体生物发生信号通路;

3 个关键基因富集到缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解信号通路(图 6)。

2.6 免疫浸润分析 通过评估基因集中免疫细胞的浸润丰度,得到了各样本中免疫细胞比例分布图,其中初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞状态缺失,因此后续主要研究 21 种免疫细胞。进一步分析比较 VSCC 组与对照组免疫细胞分布差异,结果显示,与对照组相比,VSCC 组初始 B 细胞、静息 CD4<sup>+</sup>T 记忆细胞下调(均  $P<0.05$ ),记忆 B 细胞、调节性 T 细胞、活化的 NK 细胞、巨噬细胞 M0 型、静息肥大细胞、活化的肥大细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞上调(均  $P<0.05$ ),见图 7。

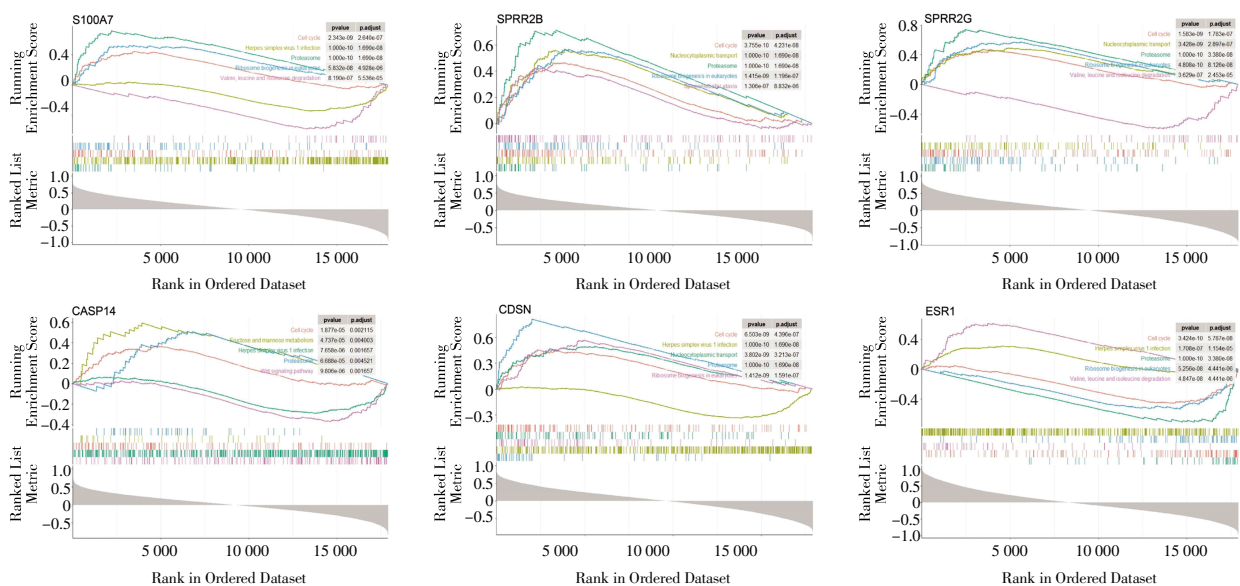
通过进行 *Spearman* 相关性分析,得出 *S100A7*、*SPRR2G*、*CASP14*、*CDSN* 均与  $\gamma\delta$ T 细胞呈负相关(均  $P<0.05$ ),与巨噬细胞 M0 型呈正相关(均  $P<0.05$ );*ESR1* 与巨噬细胞 M0 型呈负相关( $P<0.05$ ),与静息 CD4<sup>+</sup>T 记忆细胞呈正相关( $P<0.05$ );*S100A7*、*CASP14* 与静息 CD4<sup>+</sup>T 记忆细胞呈负相关(均  $P<0.05$ );*SPRR2G*、*CDSN* 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞呈负相关(均  $P<0.05$ ),见图 8。



注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$

图 5 关键基因表达水平

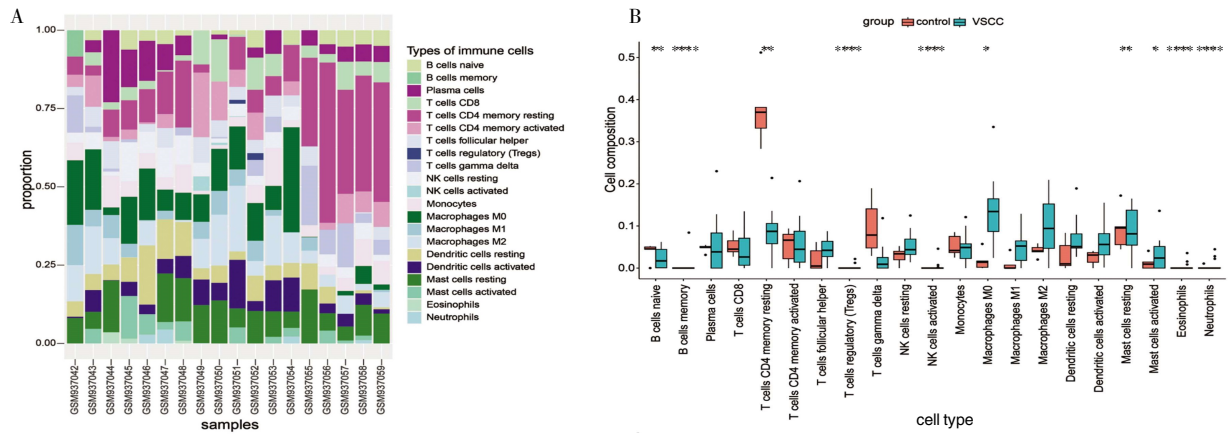
Fig.5 Expression levels of key genes



注:每个关键基因富集到的前 5 个阳性基因集

图 6 单基因 GSEA 分析结果

Fig.6 Results of single-gene GSEA analysis



注:A:各基因集免疫细胞浸润分布情况;不同的颜色代表不同的免疫细胞;B:VSCC 组和 control 组免疫细胞浸润差异箱式图,与control 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$ ;VSCC:外阴鳞状细胞癌

图7 免疫浸润分析结果

Fig.7 Results of immunoinfiltration analysis

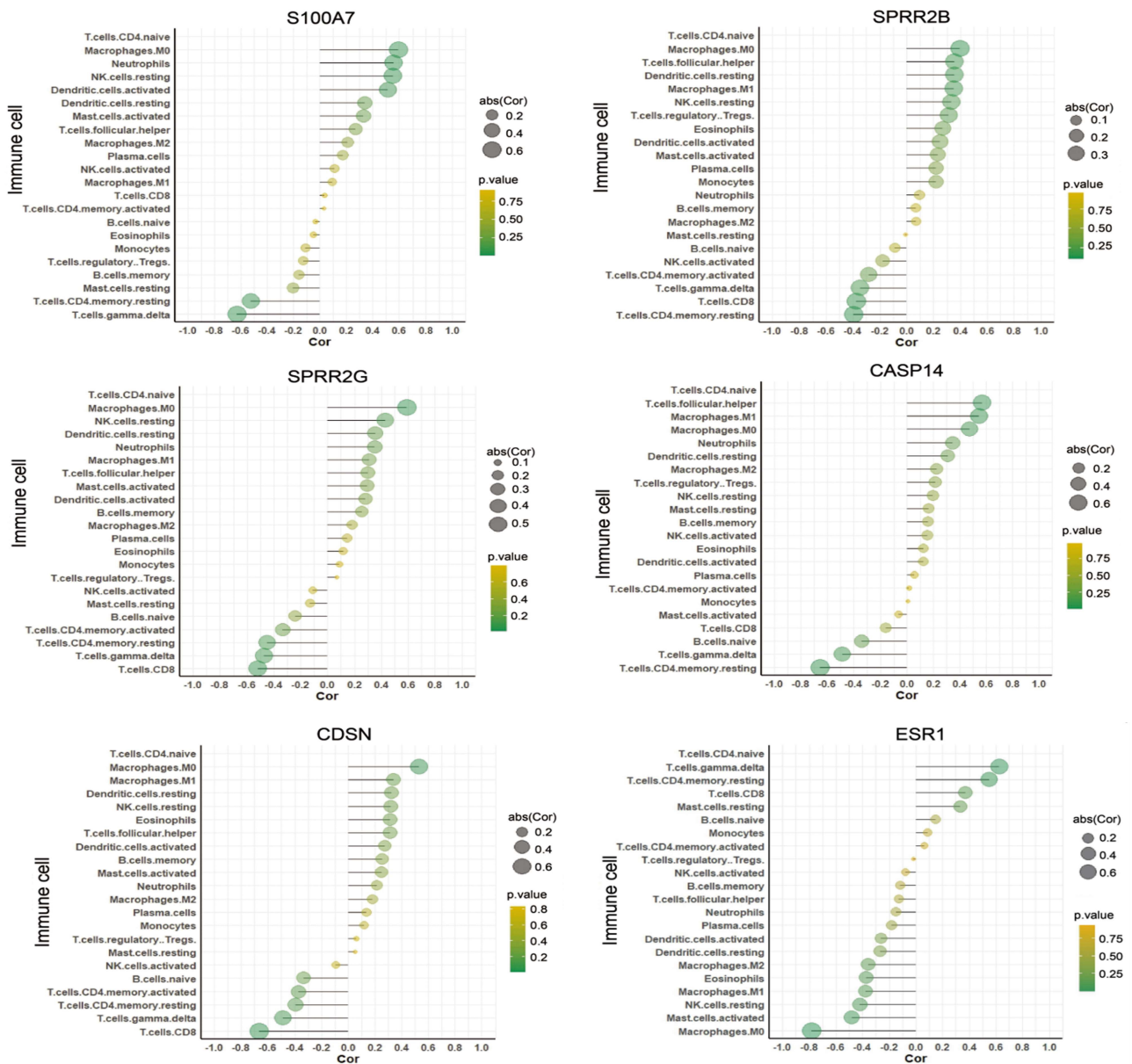


图8 关键基因与免疫细胞的相关性分析

Fig.8 Correlation analysis between key genes and immune cells

### 3 讨论

外阴癌是第四大最常见的妇科肿瘤,超过 90% 的外阴癌为鳞状细胞癌<sup>[2]</sup>。近年来,VSCC 发病率和死亡率不断上升,且逐渐呈年轻化趋势,因此,寻找可以用于 VSCC 诊断及治疗靶点的生物标志物具有重要意义。

本研究对 GSE38228 数据集进行了生物信息学分析,基于差异基因筛选与 WGCNA 共鉴定出 182 个 DEGs,对其进行 DO、GO、KEGG 富集分析发现主要涉及生殖器官良性肿瘤、结缔组织癌、细胞类型良性肿瘤、原位癌等疾病,可通过调控表皮发育、角质化包膜、氧化应激、免疫细胞迁移等生物学过程和途径介导 VSCC 的病理过程,与既往文献研究结果存在部分吻合<sup>[9-10]</sup>。

通过构建并分析 PPI 网络筛选出 6 个关键基因,即 *S100A7*、*SPRR2B*、*SPRR2G*、*CASPI4*、*CDSN*、*ESR1*。其中,*S100A7*、*SPRR2B*、*SPRR2G* 均属于表皮分化复合体。表皮分化复合体是位于人类染色体 1q21 的 2 Mb 区域内的基因簇,与表皮终末分化密切相关<sup>[11]</sup>。VSCC 是一种发生于表皮的肿瘤,表皮是一种复层鳞状上皮,主要由角质形成细胞构成,表皮终末分化过程的有序进行是维持皮肤屏障功能正常的关键因素。*S100A7* 也叫银屑素,最初是从银屑角质形成细胞中发现的,其在多种类型鳞状细胞癌中呈高表达,可促进鳞状细胞癌细胞增殖和存活<sup>[12]</sup>,可能参与鳞状细胞癌的发生、进展、侵袭等过程。赵云霞等<sup>[9]</sup>发现 *S100A7* 蛋白高表达与 VSCC 的发生、发展有关,与本研究结果一致。*SPRR2B* 和 *SPRR2G* 同属 *SPRRs* 基因家族,在角质形成细胞终末分化中参与角质包膜的形成,作为角质包膜的交叉连接蛋白发挥作用<sup>[13]</sup>,并且参与多种皮肤疾病和肿瘤的发生、发展过程<sup>[14]</sup>。*CASPI4* 属于编码半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶家族,主要存在于角化上皮中,同样参与角质形成细胞终末分化<sup>[15]</sup>。有研究报道 *CASPI4* 在人肺鳞状细胞癌和宫颈癌的高度分化区域表达增加,并且其高表达与乳腺癌细胞的增殖、癌变有关<sup>[16]</sup>。*CDSN* 编码角质桥粒蛋白,是角质形成细胞颗粒细胞分泌的一种黏附糖蛋白,存在于角质层桥粒中,对角质层的黏附起关键作用,与口腔鳞状细胞癌、头颈部鳞状细胞癌等有较强的相关性<sup>[17]</sup>。*ESR1* 是编码 ER $\alpha$  蛋白的基因,能够调节众多雌激素诱导基因的转录。研究表明,VSCC 可能与绝经后妇女的低雌激素水平会引起外阴干燥和瘙痒,导致皮肤受损,从而损害其有效屏障的功能有关<sup>[18]</sup>,与本研究结果相契合。同时,Verma 等<sup>[19]</sup>发现 *ESR1* 的低表达与喉部鳞状细胞癌不良预后有关,故推测

*ESR1* 的低表达与 VSCC 的发生及进展有关。通过以上分析可以得出,表皮终末分化异常使皮肤屏障功能受损可能是导致 VSCC 的关键。

为充分探索关键基因的生物学功能,本研究对 6 个关键基因分别进行了 GSEA 分析,结果显示关键基因主要参与了细胞周期、蛋白酶体、真核生物中核糖体生物发生等过程。既往文献中有报道指出,细胞周期失调是 VSCC 的重要机制,细胞周期蛋白在外阴疾病的恶性转化中发挥重要作用,并且发现表皮生长因子受体(EGFR)过表达亦与恶性转化相关<sup>[20]</sup>。EGFR 属酪氨酸激酶型受体,广泛分布于角质细胞表面,与皮肤鳞状细胞癌密切相关。Cataisson 等<sup>[21]</sup>发现角质形成细胞中的上皮间充质转化信号可激活 EGFR 并启动鳞状癌变。Mascia 等<sup>[22]</sup>发现 EGFR 可调节角质形成细胞分泌的粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子表达,在慢性炎症性皮肤病、肿瘤进展和侵袭中可能起重要作用。核糖体生物发生在细胞增殖、分化、凋亡、转化中起着至关重要的作用,诸多研究表明核糖体生物发生的异常与众多肿瘤的发展密切相关,同时,也是多种肿瘤的治疗靶点<sup>[23]</sup>。本研究结果与既往文献报道存在一定吻合,进一步证实表皮终末分化异常是 VSCC 重要病理过程。

本研究通过免疫浸润分析发现,与对照组相比,巨噬细胞 M0 型、静息肥大细胞、活化的肥大细胞、中性粒细胞等表现出显著差异,提示炎症在 VSCC 中扮演重要角色。巨噬细胞是炎症的中心,巨噬细胞 M0 型通常被认为是巨噬细胞的静息状态,在极化前没有特定的功能,但近期部分报道指出,巨噬细胞 M0 型与乳腺癌等恶性肿瘤预后不良密切相关<sup>[24]</sup>,表明巨噬细胞 M0 型在肿瘤微环境中具有重要作用。肥大细胞是固有免疫细胞的重要组成部分,在炎症中起关键作用,还可以招募其他免疫细胞到皮肤炎症部位,进一步放大炎症反应,导致更严重的皮肤症状<sup>[25]</sup>。中性粒细胞是首先对炎症或感染性疾病做出反应的细胞,研究发现,中性粒细胞在 VSCC 中允许肿瘤内细菌定植并促进肿瘤的进展<sup>[26]</sup>。此前有研究指出,慢性炎症是导致 VSCC 发生及进展的关键因素<sup>[27]</sup>,与本研究结果一致。通过以上分析可以发现,长期慢性炎症刺激是 VSCC 发生、发展的重要因素,同时提示控制炎症在预防及治疗 VSCC 中具有重要作用。

既往研究表明,炎症可导致多种慢性皮肤病,其机制与表皮终末分化异常有关<sup>[28]</sup>,并且持续的慢性炎症会促进癌变<sup>[27]</sup>,加之角质形成细胞增殖和终末分化平衡的破坏会导致鳞状细胞癌的发生<sup>[29]</sup>。因此,本研究推测长期慢性炎症刺激可能会导致表皮

终末分化过程异常使皮肤屏障功能受损,屏障受损后又加剧炎症,二者相互促进,是VSCC发生、发展的关键因素。

但本研究仍存在一些不足,目前在GEO数据库中研究疾病为VSCC的样本偏少,且数据集单一,导致本研究纳入分析的样本量较少,分析存在偏倚和误差,后续仍需大量样本进行进一步基础和临床研究及验证。

综上所述,*S100A7*、*SPRR2B*、*SPRR2G*、*CASPI4*、*CDSN*、*ESR1*可能为VSCC潜在的生物标志物,长期慢性炎症刺激导致表皮终末分化过程异常可能是VSCC发生、发展的关键因素。本研究为后续进一步深入探索VSCC的病理机制、开发新型生物标志物及治疗方案提供了新思路。

#### 参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] PEDRAO P G, GUIMARAES Y M, GODOY L R, et al. Management of early-stage vulvar cancer[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(17): 4184.
- [3] LANGFLDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9(1): 559.
- [4] LIN W W, WANG Y X, CHEN Y S, et al. Role of calcium signaling pathway-related gene regulatory networks in ischemic stroke based on multiple WGCNA and single-cell analysis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 8060477.
- [5] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles[J]. Nat Methods, 2015, 12(5): 453–457.
- [6] YU G C, WANG L G, YAN G R, et al. DOSE: an R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis[J]. Bioinformatics, 2015, 31(4): 608–609.
- [7] WU T Z, HU E, XU S, et al. ClusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. Innovation (Camb), 2021, (3): 100141.
- [8] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIE F, et al. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 293.
- [9] 赵云霞, 陈雪, 刘畅, 等. *S100A7* 和 *S100A4* 在外阴鳞癌与外阴硬化性苔藓中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(10): 1573–1576.
- [10] 卢烨. 过氧化酶与 NF- $\kappa$ B 在外阴硬化性苔藓及外阴鳞癌中的表达及意义[D]. 中国医科大学, 2020.
- [11] KYPRIOTOU M, HUBER M, HOHL D. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family[J]. Exp Dermatol, 2012, 21(9): 643–649.
- [12] QI Z, LI T, KONG F, et al. The Characteristics and function of *S100A7* induction in squamous cell carcinoma: heterogeneity, promotion of cell proliferation and suppression of differentiation[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128887.
- [13] ZHANG C L, HU Z H, LONE A G, et al. Small proline-rich proteins (SPRRs) are epidermally produced antimicrobial proteins that defend the cutaneous barrier by direct bacterial membrane disruption[J]. Elife, 2022, 11: e76729.
- [14] BARBERO G, CASTRO M V, QUEZADA M J, et al. Bioinformatic analysis identifies epidermal development genes that contribute to melanoma progression[J]. Med Oncol, 2022, 39(10): 141.
- [15] 胡燕, 杨海晶, 李函, 等. 常染色体隐性遗传性鱼鳞病致病基因研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2022, 51(8): 504–508.
- [16] KOENIG U, SOMMERGRUBER W, LIPPENS S. Aberrant expression of caspase-14 in epithelial tumors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(2): 309–313.
- [17] DI Y B, BAO Y, GUO J, et al. Corneodesmosin as a potential target of oral squamous cell carcinoma[J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101(39): e28397.
- [18] SANTEGOETS L A, SETERS M V, HELMERHORST T J, et al. HPV related VIN: highly proliferative and diminished responsiveness to extracellular signals[J]. Int J Cancer, 2007, 121(4): 759–766.
- [19] VERMA A, SCHWARTZ N, COHEN D J, et al. Loss of estrogen receptors is associated with increased tumor aggression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4227.
- [20] ZIEBA S, CHENCLINSKA M, KOWALIK A, et al. Genes, pathways and vulvar carcinoma – new insights from next-generation sequencing studies[J]. Gynecol Oncol, 2020, 158(2): 498–506.
- [21] CATAISSON C, MICHALOWSKI A M, SHIBUYA K, et al. MET signaling in keratinocytes activates EGFR and initiates squamous carcinogenesis[J]. Sci Signal, 2016, 9(433): ra62.
- [22] MASCIA F, CATAISSON C, LEE T C, et al. EGFR regulates the expression of keratinocyte-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor *in vitro* and *in vivo*[J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(3): 682–693.
- [23] ELHAMAMSY A R, METGE B J, ALSHEIKH H A, et al. Ribosome biogenesis: a central player in cancer metastasis and therapeutic resistance[J]. Cancer Res, 2022, 82(13): 2344–2353.
- [24] ALI H R, CHLON L, PHAROAH P D, et al. Patterns of immune infiltration in breast cancer and their clinical implications: a gene-expression-based retrospective Study [J]. PLoS Med, 2016, 13(12): e1002194.
- [25] 朱玉珍. 通过生物信息学和机器学习的方法鉴定特异性皮炎的生物标志物及免疫浸润分析[D]. 浙江科技学院, 2023.
- [26] RUSTETSKA N, SZCZEOANIAK M, GORYCA K, et al. The intra-tumour microbiota and neutrophilic inflammation in squamous cell vulvar carcinoma microenvironment[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 285.
- [27] FATALSKA A, RUSETSKA N, BAKULA-ZALEWSKA E, et al. Inflammatory proteins HMGA2 and PRTN3 as drivers of vulvar squamous cell carcinoma progression[J]. Cancers (Basel), 2020, 13(1): 27.
- [28] ANDERTON H, ALQUDAH S. Cell death in skin function, inflammation, and disease[J]. Biochem J, 2022, 479(15): 1621–1651.
- [29] MOSES M A, GEORGE A L, SAKAKIBARA N, et al. Molecular mechanisms of p63-mediated squamous cancer pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3590.