DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20240409

·论　　著·

*CLDN1*的泛癌分析及其在胃癌中的功能研究

祝唯敬[1]，张嘉星[1]，魏育才[2]，杨生瑞[1]，王文轩[1]，李玉民[1,2,3,4]*

［1.兰州大学第二医院（第二临床医学院）普通外科，甘肃 兰州 730030；
2.兰州大学第二医院（第二临床医学院）肿瘤外科，甘肃 兰州 730030；
3.兰州大学环境肿瘤学中心，甘肃 兰州 730030；
4.甘肃省环境肿瘤学重点实验室，甘肃 兰州 730030］

【摘要】目的 通过生物信息学方法，分析紧密连接蛋白1（CLDN1）基因在泛癌中的表达情况及其在胃癌中的功能。**方法** 利用癌症基因组图谱（TCGA）和基因型-组织表达（GTEx）数据库，评估了*CLDN1*在多种癌症中的表达特点及其与临床病理、患者预后及免疫特征的关系；利用Western blotting、PCR和细胞功能试验分析*CLDN1*在胃癌细胞中的表达和功能。**结果** *CLDN1*在13种肿瘤中显著上调，在7种肿瘤中显著下调，且与分期和分级密切相关。在8种肿瘤中具有良好的诊断能力并与不良预后相关，且在肺鳞状细胞癌中突变频率最高。免疫分析表明，*CLDN1*与大多数癌种的免疫浸润、免疫检查点基因、肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性呈现显著相关性。*CLDN1*在MKN45细胞中表达较高，敲减*CLDN1*后，MKN45细胞的增殖和迁移能力显著降低。**结论** *CLDN1*在泛癌中存在显著的表达异质性，其与肿瘤的诊断、预后、临床相关性及免疫特征密切相关，是一个潜在的肿瘤诊断标志物和治疗靶点。

【关键词】紧密连接蛋白1；泛癌分析；表达水平；免疫浸润；胃癌

中图分类号：R735.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-8965（2024）04-0070-12

Pan-cancer analysis of *CLDN1* and its functional study in gastric cancer

Zhu Weijing[1], Zhang Jiaxing[1], Wei Yucai[2], Yang Shengrui[1], Wang Wenxuan[1], Li Yumin[1, 2, 3, 4]*

(1. Department of General Surgery, The Second Hospital & Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China;
(2. Department of Surgical Oncology, The Second Hospital & Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China;
3. Environmental Oncology Center, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China;
4. Gansu Provincial Key Laboratory of Environmental Oncology, Lanzhou 730030, Gansu, China)

【Abstract】Objective This study employs bioinformatics methods to analyze the expression of Claudin 1 (*CLDN1*) across various types of cancer and its functional role in gastric cancer. **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases were used to evaluate the expression patterns of *CLDN1* in various cancer types and their association with clinical pathology, patient prognosis, and immune

收稿日期：2024-11-20；**修回日期：**2024-11-28

基金项目：甘肃省重大科技专项项目（22ZD6FA050，22JR9KA002）；甘肃省自然科学基金项目（23JRRA1001）

通信作者：李玉民（1962-），男，主任医师，教授，博士研究生导师，主要从事消化道肿瘤、普通外科、环境肿瘤方面的研究，E-mail: liym@lzu.edu.cn

characteristics. Western blotting, Polymerase Chain Reaction(PCR), and cell function assays were used to examine the expression and function of *CLDN1* in gastric cancer cells. **Results** *CLDN1* was significantly upregulated in 13 types of tumors and downregulated in 7, with a strong correlation to tumor stage and grade. It demonstrated good diagnostic potential and was associated with poor prognosis in 8 cancer types. Additionally, *CLDN1* showed the highest mutation rate in lung squamous cell carcinoma. Immune analysis revealed significant correlations between *CLDN1* expression and immune infiltration, immune checkpoint gene expression, tumor mutation burden, and microsatellite instability across most cancer types. *CLDN1* was highly expressed in MKN45 cells, and its knockdown significantly reduced cell proliferation and migration. **Conclusion** *CLDN1* exhibits significant expression heterogeneity across various cancers, with strong associations with diagnosis, prognosis, clinical characteristics, and immune profiling. It represents a potential diagnostic marker and therapeutic target in cancer treatment.

【**Keywords**】Claudin 1; Pan-cancer analysis; Expression level; Immune infiltration; Gastric cancer

恶性肿瘤是威胁人类健康的主要疾病之一，2022年全球新发癌症病例近2 000万例，死亡人数约970万人[1]。其中，胃癌作为全球第五大最常见癌症，发病率和死亡率居高不下，特别在亚洲地区尤为严重[1]。尽管癌症的诊断和治疗技术不断进步，如分子靶向药物和免疫疗法的应用，但现有方法仍面临靶向药物疗效受限、副作用显著和肿瘤耐药性等问题。因此，开发精准诊断工具和高效治疗策略尤为重要。

紧密连接蛋白1（Claudin 1，CLDN1）是紧密连接蛋白家族的重要成员，通过调节上皮细胞间的紧密连接维持细胞屏障功能[2]。*CLDN1*还在细胞增殖、迁移和分化等过程中发挥关键作用，异常表达与上皮–间质转化密切相关，而上皮–间质转化是癌症转移的重要机制[3-6]。*CLDN1*在不同癌症中的表达与预后存在差异，其过表达与口腔鳞状细胞癌、肺腺癌、甲状腺癌和胃癌的不良预后相关[7-10]，而低表达则与结直肠癌的不良预后相关[11]。研究[12]发现，*CLDN1*通过AMPK/STAT1/ULK1信号促进食管鳞状癌增殖和转移；在结直肠癌中，通过调控*CLDN1*和激活*NOTCH3*信号增强癌细胞侵袭性[13]；*CLDN1*还通过调节TNF-α诱导的胃癌细胞基因表达和迁移，及增强细胞对失巢凋亡的抗性，促进胃癌的增殖和转移[10,14]。这些发现为*CLDN1*作为潜在治疗靶点提供了新思路。

然而，现有的研究多集中于单一癌症类型，*CLDN1*在多种癌症中与免疫细胞浸润及预后的关系尚不明确，尤其在胃癌中，*CLDN1*的作用需深入探讨。本研究通过生物信息学分析，探讨*CLDN1*在泛癌中的表达模式、临床相关性及其与免疫浸润和功能通路的关联，为其在癌症诊断、靶向治疗及免疫治疗中的应用提供理论依据。同时，还通过免疫组织化学，Western blotting、siRNA验证*CLDN1*在胃癌中的表达和功能，为胃癌的临床研究和精准治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 数据获取

从加利福尼亚大学圣克鲁兹分校基因组浏览器（University of California Santa Cruz，UCSC）数据库下载统一标准化的泛癌数据集癌症基因组图谱泛癌种研究（TCGA Pan-Cancer）和癌症基因组图谱治疗相关基因组学研究项目与基因型–组织表达联合数据集（TCGA TARGET GTEx）[15]。通过UCSC XENA数据库获取经过Toil流程[16]统一处理的癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）和基因型–组织表达计划（The Genotype-Tissue Expression Project，GTEx）的每百万转录本数（Transcripts Per Million，TPM）格式的RNA测序数据（RNAseq）。

1.2 基因表达水平

从泛癌数据集中提取*CLDN1*表达数据，筛选正常组织和肿瘤样本，并剔除样本数<3的癌种。表达值经$\log_2$(x+0.001）转换后，用R（4.2.1）进行分析。RNAseq数据提取癌旁和癌样本后，进一步进行$\log_2$（表达值+1）转换，并用ggplot2（3.3.6）包可视化结果。

1.3 诊断价值分析和预后分析

整合TCGA和GTEx的RNAseq数据，用pROC（1.18.0）包进行受试者工作特征曲线（Recelver Operating Characteristic Curve，ROC）分析，结果通过ggplot2（3.3.6）可视化。结合*CLDN1*表达及相关预后信息：总生存期（Overall Survival，OS）、疾病特异性生存期（Disease-Specific Survival，DSS）、无病间隔（Disease-Free Interval，DFI）、无进展间隔（Progression-Free Interval，PFI），通过survival包的coxph函数进行Cox比例风险回归分析，使用survival包进行比例风险假设检验并拟合生存回归模型；胃癌KM曲线分别使用survminer、ggplot2（3.3.6）包和http://gepia2.cancer-pku.cn/中的结果可视化。

1.4 临床病理特征相关性分析

采用R（4.2.1）的ggplot2（3.3.6）进行可视化，stats（4.2.1）和car（3.1-0）进行统计分析。根据数据特征选择合适的统计方法。采用Wilcoxon秩和检验评估*CLDN1*在不同样本组间的差异。表达数据和临床数据均来自TCGA数据库，RNA-seq数据为TPM格式。预处理阶段过滤了正常样本和缺乏临床信息的样本，并对数据进行$\log_2$（表达值+1）转换以尽量满足统计假设。

1.5 基因突变分析

使用cBio癌症基因组门户（cBioPortal）数据库分析*CLDN1*基因突变，评估其在不同肿瘤中的改变频率和类型，比较突变分布差异，并在“Mutations”模块展示主要突变位点和类型。

1.6 免疫特征及基因修复机制分析

从泛癌数据集TCGA Pan-cancer中提取了与*CLDN1*、免疫标记基因、免疫检查点基因、肿瘤突变负荷（Tumor Mutational Burden，TMB）和微卫星不稳定性（Microsatellite Instability，MSI）相关的数据，并对所有基因表达数据进行$\log_2$（x+0.001）转换，以保持数据一致性。筛选时排除正常样本，仅保留Primary Blood Derived Cancer-Peripheral Blood和Primary Tumor样本。

1.6.1 免疫细胞浸润分析

利用TIMER软件包[17]分析B细胞、$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞等免疫细胞在肿瘤微环境中的浸润情况。此外，采用deconvo_xCell方法[18]评估免疫细胞（如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞）和非免疫细胞（如成纤维细胞、脂肪细胞、神经元）的浸润比例。

1.6.2 免疫检查点途径分析（Immune Checkpoint Pathway Analysis，ICP）

提取24个抑制性基因和36个刺激性基因[19]的表达数据，计算*CLDN1*与这些基因之间的Spearman相关性，探讨其潜在关系。

1.6.3 TMB、MSI分析

从癌症数据共享平台数据库[20]下载Level 4 Simple Nucleotide Variation数据，使用MuTect2计算TMB值，整合*CLDN1*表达数据分析其与TMB的关系，剔除样本数量<3的癌种。结合先前研究提供的MSI评分[21]，与*CLDN1*基因表达数据进行整合，探讨*CLDN1*与MSI状态的关联。

1.6.4 错配修复（Mismatch Repair，MMR）相关基因分析

提取*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*和*EPCAM*等MMR基因的表达数据，并使用R语言pheatmap包绘制热图，展示不同样本间的表达差异。

1.7 基因富集分析

使用DESeq2、clusterProfiler、msigdbr和ggplot2等R包。在单基因差异分析中，从公共数据集中提取目标基因表达数据，并根据实验设计直接分组，避免人为分组的偏差。使用DESeq2对原始Counts矩阵进行差异分析，自动过滤低丰度分子，并通过内建方法标准化数据以确保样本间可比性。使用clusterProfiler对数据进行富集分析，评估目标基因集的富集情况。分析前将基因标识符转换为与数据库一致的格式，所用数据库包括KEGG Pathway和Gene Ontology（GO）。最终，使用ggplot2（3.3.6）对基因集富集分析（Gene Set Enrichment Analysis，GSEA）结果进行可视化。

1.8 实验方法

1.8.1 免疫组织化学

从胃癌及癌旁组织获取石蜡切片，进行脱蜡和水化处理。切片置于柠檬酸缓冲液中，经过抗原修复后，室温冷却并用磷酸盐缓冲盐水（Phosphate Buffered Saline，PBS）洗涤。用3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性，室温孵育10 min，再次用PBS洗涤。使用封闭液封闭非特异性位点，室温孵育30 min。滴加Abcam公司的CLDN1抗体（1∶250稀释），4℃过夜孵育，次日PBS洗涤后加入二抗，室温孵育30 min。洗涤后加入DAB显色剂，显色时间4 min。最后用苏木素复染、脱水、透明后封片，显微镜下观察和记录。

1.8.2 细胞培养

正常胃黏膜上皮细胞GES-1及胃癌细胞系MKN45、MKN74、MKN28、AGS和HGC27均来源于兰州大学第二医院消化肿瘤重点实验室。细胞复苏后，分别转移至含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI-1640完全培养基中，放置于37℃、5% CO_2培养箱中培养。胎牛血清、0.25%胰酶、青霉素/链霉素、RPMI-1640培养基、细胞培养瓶和6孔板均来自武汉塞维尔生物科技有限公司。培养过程中，每隔2 d更换1次培养基，直至细胞达到对数生长期。当细胞融合度约为80%时，进行传代培养，继续培养至所需密度。

1.8.3 细胞总蛋白提取与Western blotting实验

将上述6组细胞培养至对数生长期，融合度达80%时，用索莱宝放射免疫沉淀裂解液和苯基甲基硫酰氟裂解细胞，离心收集上清，测定并统一蛋白浓度。加入上样缓冲液，95℃变性5 min后，在10%聚丙烯酰胺凝胶上进行SDS-PAGE电泳并转膜至PVDF膜。封闭1 h后，4℃孵育CLDN1一抗

过夜。次日洗膜，孵育HRP标记的二抗1 h，用ECL试剂显色并记录。实验重复3次确保结果可靠。

1.8.4 细胞转染

培养MKN45细胞至对数生长期，细胞融合度达到50%~60%时，使用上海吉凯基因医学科技股份有限公司购买的*CLDN1*目标小干扰RNA（si1、si2、si3）以及对照小干扰RNA（NC组）进行转染。取合适数量的MKN45细胞接种至6孔板中，确保每孔细胞密度为30%~40%。根据Lipofectamine™ 2 000转染试剂的说明书，将siRNA与转染试剂按推荐比例混合，静置5 min后，将混合溶液加入细胞培养孔中。转染6~8 h后，更换完全培养基，继续培养48 h。

1.8.5 敲减效果验证

转染后48 h，使用TRIzol试剂提取细胞总RNA，并通过赛文创新（北京）生物科技有限公司提供的cDNA试剂盒进行反转录合成cDNA。采用北京擎科生物科技股份有限公司提供的特定引物对cDNA进行荧光实时定量PCR（qRT-PCR）分析，验证*CLDN1*是否成功敲减。PCR引物序列为：前向引物：TTGGGCTTCATTCTCGCCTT，反向引物：GAGGATGCCA肾上腺皮质癌肾上腺皮质癌ATCA。qRT-PCR反应体系及程序按照赛文创新（北京）生物科技有限公司提供的说明书操作。实验重复3次，记录各组Ct值，并通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算相对表达量。

1.8.6 细胞增殖实验

将经过*CLDN1*敲减验证的MKN45细胞siCLDN1-1、siCLDN1-2和siNC接种于96孔板（每孔约2×10^3个细胞），培养至对数生长期。在24、48、72和96 h加入10 μL CCK-8试剂，孵育2~4 h后于450 nm测定吸光度（光密度），绘制细胞增殖曲线。实验重复3次以确保数据的可靠性。

1.8.7 划痕实验

选取经*CLDN1*敲减验证的MKN45细胞si*CLDN1-1*、si*CLDN1-2*和siNC接种至6孔板（每孔约2×10^5个细胞）。细胞长至单层后，用无菌移液管头划出直线缺口，清洗脱落细胞后加入无血清RPMI-1640培养基。分别于0 h、24 h和48 h拍摄相同区域的细胞迁移情况，并使用图像分析软件测量缺口闭合距离进行定量比较。实验重复3次以确保结果的可靠性。

1.9 统计学分析

*CLDN1*在泛癌中的表达及其与临床病理特征的关系采用Wilcoxon秩和检验进行比较；*CLDN1*与免疫细胞浸润水平、ICP、TMB、MSI及MMR相关基因的关联性采用Spearman相关性分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *CLDN1*在泛癌中的表达水平

基于TCGA数据库分析，*CLDN1*在正常组织与肿瘤组织之间的表达差异显示，在13种肿瘤类型（如肺腺癌、结肠癌、食管癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌等）中显著上调（见图1A），而在7种肿瘤类型（如胶质瘤、脑低级别胶质瘤、乳腺浸润癌、前列腺癌等）中显著下调（见图1B）。TCGA和GTEx联合数据库的分析结果与此基本一致。在癌和癌旁表达差异的具体分析中，*CLDN1*在结肠癌、头颈鳞状细胞癌、肾乳头状细胞癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、直肠腺癌、胃癌和甲状腺癌的肿瘤组织中显著上调，而在肾嫌色细胞癌、前列腺癌和子宫内膜癌中显著下调（见图1C）。

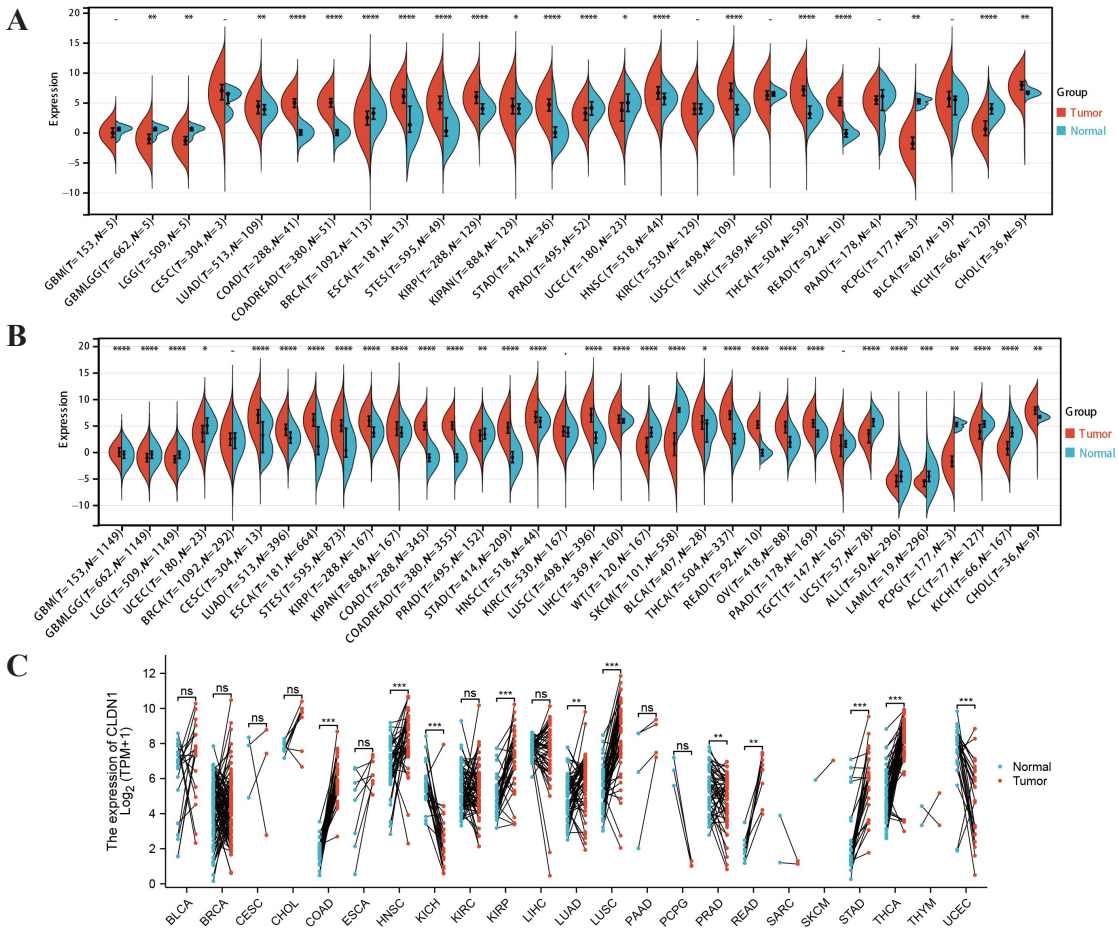
2.2 *CLDN1*在泛癌患者中的预后和诊断价值

在OS分析中，*CLDN1*高表达与胶质瘤、脑低级别胶质瘤、胰腺癌和多形成性胶质细胞瘤患者的不良预后显著相关（见图2A）；在DSS分析中，*CLDN1*高表达同样与胶质瘤、脑低级别胶质瘤、肺腺癌、多形成性胶质细胞瘤和胰腺癌的不良预后显著相关，而肺鳞状细胞癌和甲状腺癌中，*CLDN1*低表达与较差的DSS显著相关（见图2B）。在DFI分析中，*CLDN1*高表达与胰腺癌的复发风险显著相关，低表达则与肺鳞状细胞癌患者较差的DFI相关（见图2C）。在PFI分析中，*CLDN1*高表达与胶质瘤、胃癌、多形成性胶质细胞瘤、胰腺癌和肾上腺皮质癌患者疾病进展风险显著相关，而低表达则与肺鳞状细胞癌患者较差的PFI显著相关（见图2D）。

ROC曲线分析显示，*CLDN1*在肺鳞状细胞癌、宫颈鳞癌和腺癌、甲状腺癌、结肠癌、肾乳头状细胞癌、肾嫌色细胞癌、胃癌和胰腺癌中的曲线下面积>0.8，表明其在这些癌症类型中具有较高的诊断能力（见图2E）。

2.3 *CLDN1*在泛癌中临床病理特征相关性分析

在T分期中，前列腺癌中*CLDN1*表达随T分期升高，而乳腺浸润癌中表达依次降低。在N分期中，甲状腺癌、肾乳头状细胞癌和胰腺癌中*CLDN1*表达随淋巴结转移显著升高。在M分期中，肺腺癌和肺鳞状细胞癌中M0患者*CLDN1*表达显著高于M1。在整体临床分期中，子宫内膜癌和睾丸癌晚期分期*CLDN1*表达显著高于早期。在病理分期中，甲状腺癌的Ⅰ期高于Ⅱ期，Ⅲ期&Ⅳ期高于Ⅱ期；乳腺浸润癌晚期低于早期。在组织学分级中，食管癌中高



A：*CLDN1*的表达水平在26种癌症中的分布情况（基于TCGA数据库）；B：*CLDN1*的表达水平在34种癌症中的分布情况（基于TCGA和GTEx数据库）；C：*CLDN1*在配对的肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达差异（基于TCGA数据库）（*P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001，N：正常组样本数量；T：肿瘤组正常数量）。

图1 *CLDN1*在泛癌中的表达水平

Figure 1 Expression level of *CLDN1* in Pan-cancer

分化高于低分化，而头颈鳞状细胞癌、胰腺癌和子宫内膜癌中低分化显著高于高分化；胰腺癌和胶质瘤表达随分级增高显著升高。此外，结直肠癌中男性患者*CLDN1*表达显著高于女性（见图3）。

2.4 *CLDN1*在泛癌中的基因突变分析

基于TCGA泛癌数据集，使用cBioPortal数据库检查*CLDN1*的突变状态。肺鳞状细胞癌突变频率最高，突变率为30%。扩增是最常见的改变类型（见图4A）。*CLDN1*的突变主要以错义突变为主，大部分突变集中在PMP22_Claudin功能结构域内，提示这些突变可能直接影响蛋白功能（见图4B）。

2.5 *CLDN1*在泛癌中免疫细胞浸润及ICP分析

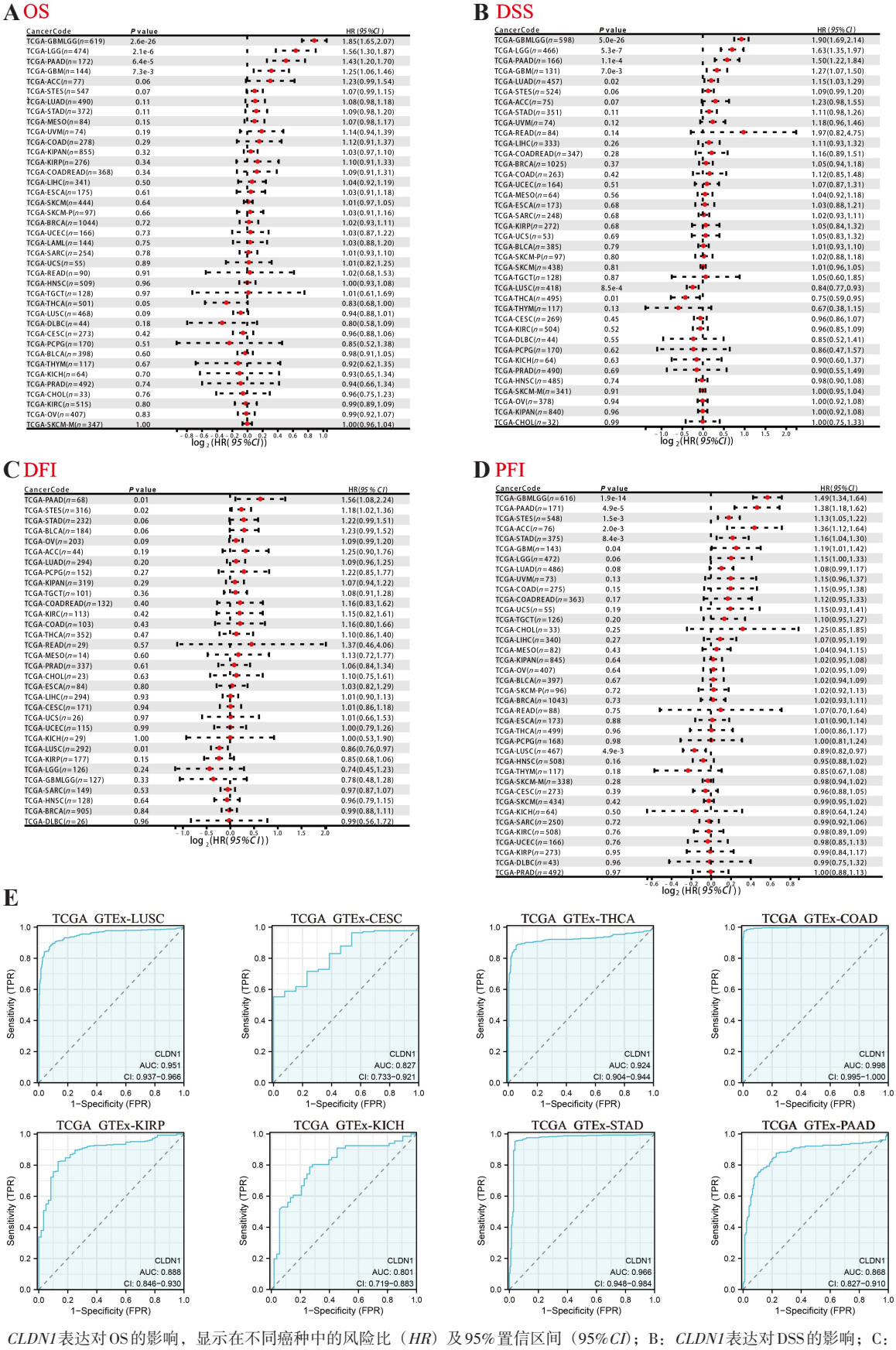
Timer分析显示，*CLDN1*在甲状腺癌、前列腺癌、肾透明细胞癌和乳腺浸润癌等肿瘤中表达与B细胞、$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞、中性粒细胞等免疫细胞的浸润密度呈显著正相关关系，而在睾丸癌中，除$CD4^+$ T细胞外，与其他免疫细胞的浸润密度呈显著负相关关系（见图5A）。

xCELL分析显示，*CLDN1*在大多数癌症中与上皮细胞的浸润水平呈显著正相关关系，但在睾丸癌、肾上腺皮质癌和胸腺瘤中，其表达与免疫评分呈负相关关系，提示*CLDN1*可能与这些癌症中的抑制性免疫微环境相关，进一步表明*CLDN1*在不同癌症中具有异质性免疫调控机制（见图5B）。

ICP基因分析显示，*CLDN1*在前列腺癌、胶质瘤、肾嫌色细胞癌和肺腺癌等肿瘤中与大多数ICP基因呈显著正相关关系，提示其可能与免疫检查点活性相关。尤其是*CXCL9*和*CXCL10*在多种肿瘤中呈显著正相关关系，提示*CLDN1*可能调控免疫抑制微环境。此外，*C10orf54*在睾丸癌、子宫内膜癌、宫颈鳞癌和腺癌、卵巢浆液性囊腺瘤等23种癌症中显著正相关关系，进一步说明*CLDN1*与ICP基因密切相关，可能通过调控ICP基因参与肿瘤免疫调控（见图5C）。

2.6 *CLDN1*在泛癌中TMB、MSI和MMR分析

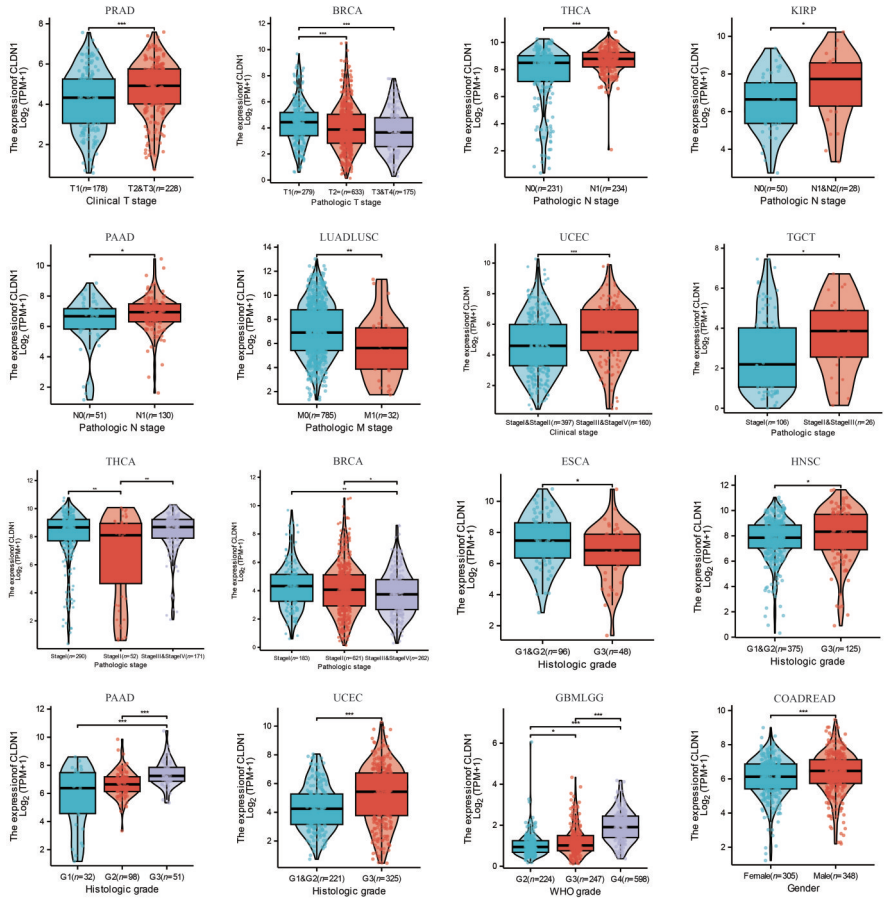
TMB分析表明，*CLDN1*与11种癌症的TMB显著相关，其中胶质瘤、肾乳头状腺癌和胸腺瘤呈显著正相关关系，肺腺癌、结肠癌、结肠癌直肠腺癌、



A：*CLDN1*表达对OS的影响，显示在不同癌种中的风险比（*HR*）及95%置信区间（95%*CI*）；B：*CLDN1*表达对DSS的影响；C：*CLDN1*表达对无病间隔DFI的影响；D：*CLDN1*表达对PFI的影响。红色标记表示显著性差异的结果；E：ROC曲线显示*CLDN1*在肺鳞状细胞癌、宫颈鳞癌和腺癌、甲状腺癌、结肠癌、肾乳头状细胞癌、肾嫌色细胞癌、胃癌和胰腺癌中的诊断价值（基于TCGA和GTEx数据库）。

图2　*CLDN1*表达与不同肿瘤类型患者预后及其诊断价值

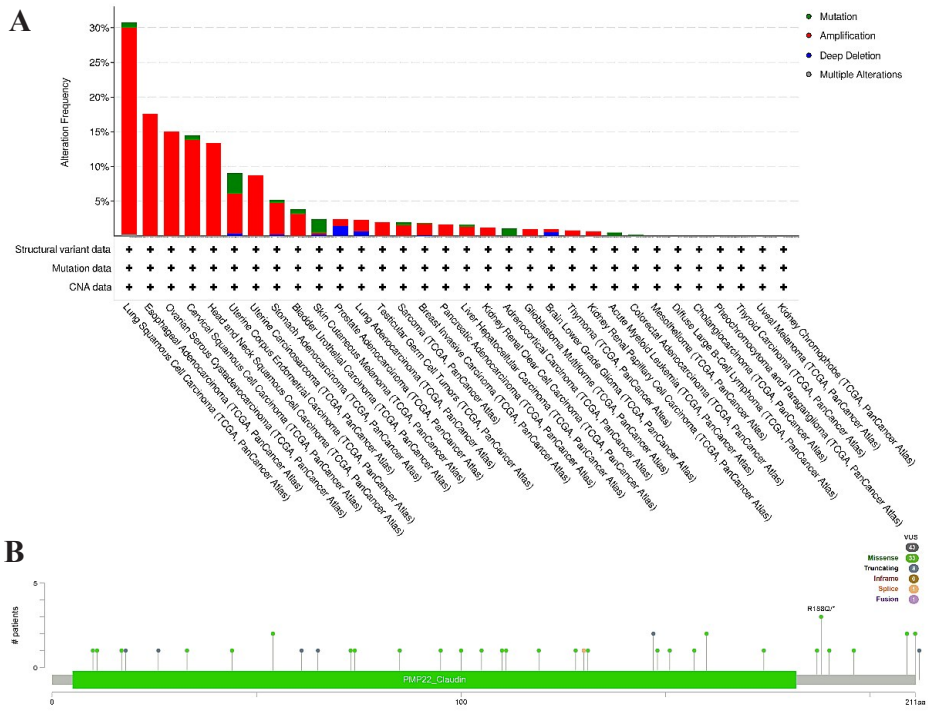
Figure 2　*CLDN1* expression and prognosis of patients with different tumor types and its diagnostic value



*CLDN1*表达在不同肿瘤临床相关性分组中的差异（$*P<0.05$，$**P<0.01$，$***P<0.001$）。

图3　*CLDN1*表达与不同肿瘤临床特征的相关性分析

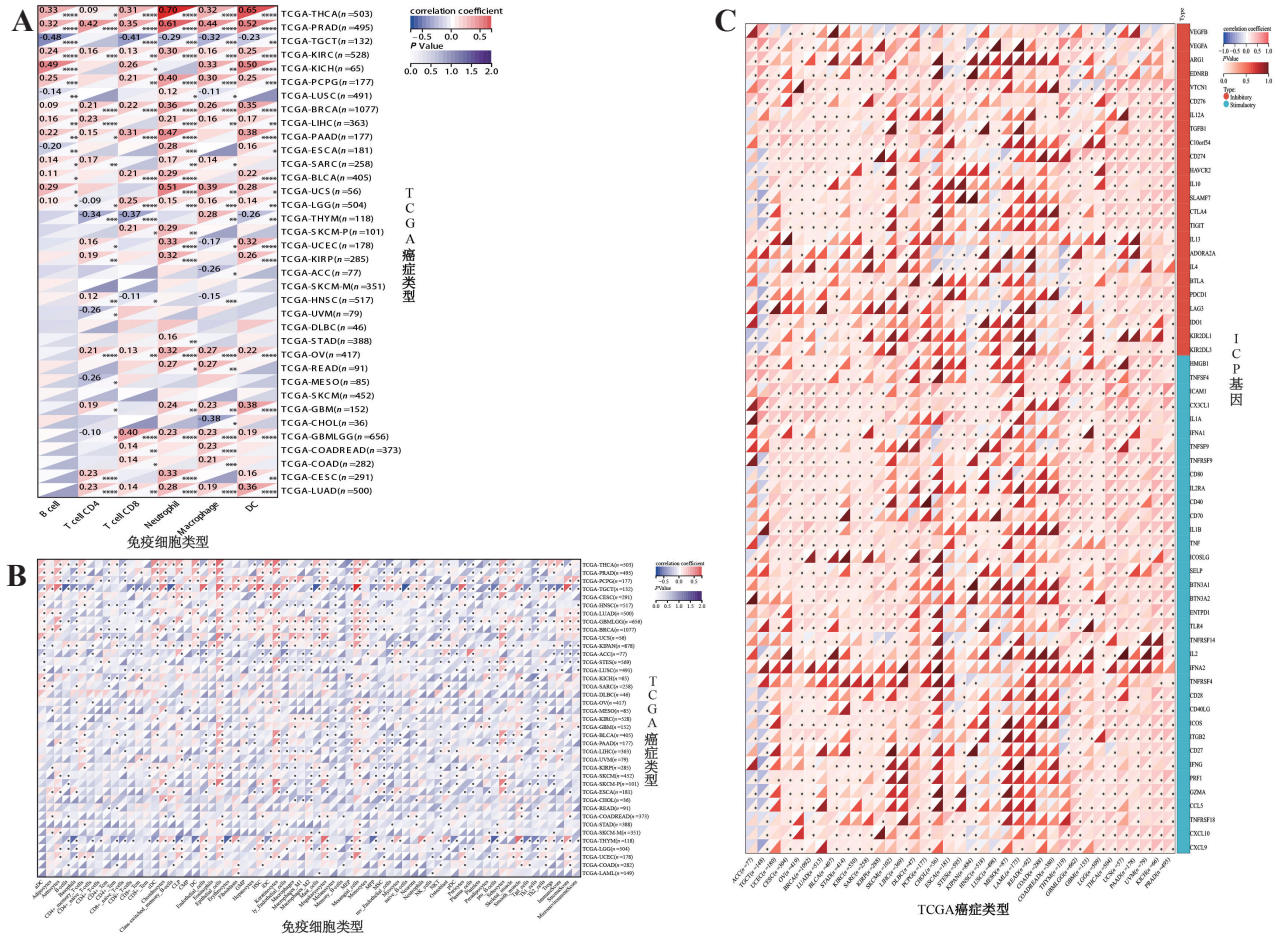
Figure 3　Correlation analysis between *CLDN1* expression and clinical characteristics of various tumors



A：*CLDN1*在不同癌症类型中的基因改变频率，显示突变（绿色）、扩增（红色）、深度缺失（蓝色）和多种改变（灰色）的分布情况；B：*CLDN1*基因突变分布图，展示蛋白结构域内不同类型突变的具体位置及频率。

图4　*CLDN1*在泛癌中的基因突变

Figure 4　*CLDN1* gene mutation in Pan-cancer



A：*CLDN1*表达与免疫细胞浸润的相关性（TIMER分析），颜色表示相关系数，红色为正相关，蓝色为负相关；B：*CLDN1*表达与免疫细胞浸润的相关性（xCELL分析），颜色表示相关系数；C：*CLDN1*表达与免疫检查点（ICP）基因的相关性分析。

图5　*CLDN1*在泛癌中免疫细胞浸润及ICP相关性分析

Figure 5　Analysis of immune cell infiltration and ICP correlation of *CLDN1* in Pan-cancer

眼部黑色素瘤等则呈显著负相关关系（见图6A）。

MSI分析显示，*CLDN1*在肾透明细胞癌和睾丸癌中与MSI显著正相关关系，而在胶质瘤、结肠癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤中呈显著负相关关系。此外，*CLDN1*与MMR相关基因的表达在多种癌症中呈显著正相关关系，特别是在子宫内膜癌、肝细胞肝癌、前列腺癌、肾乳头状细胞癌、肾透明细胞癌和胃癌中，提示*CLDN1*可能通过影响DNA修复和基因稳定性维持发挥作用（见图6B）。

MMR分析显示，在大多数癌症中，*CLDN1*表达与MMR基因呈显著正相关关系，尤其在子宫内膜癌、肝细胞肝癌、胃癌和胸腺瘤中，与所有MMR基因均呈显著正相关关系，表明*CLDN1*可能在这些癌症的基因稳定性和DNA修复中发挥重要作用（见图6C）。

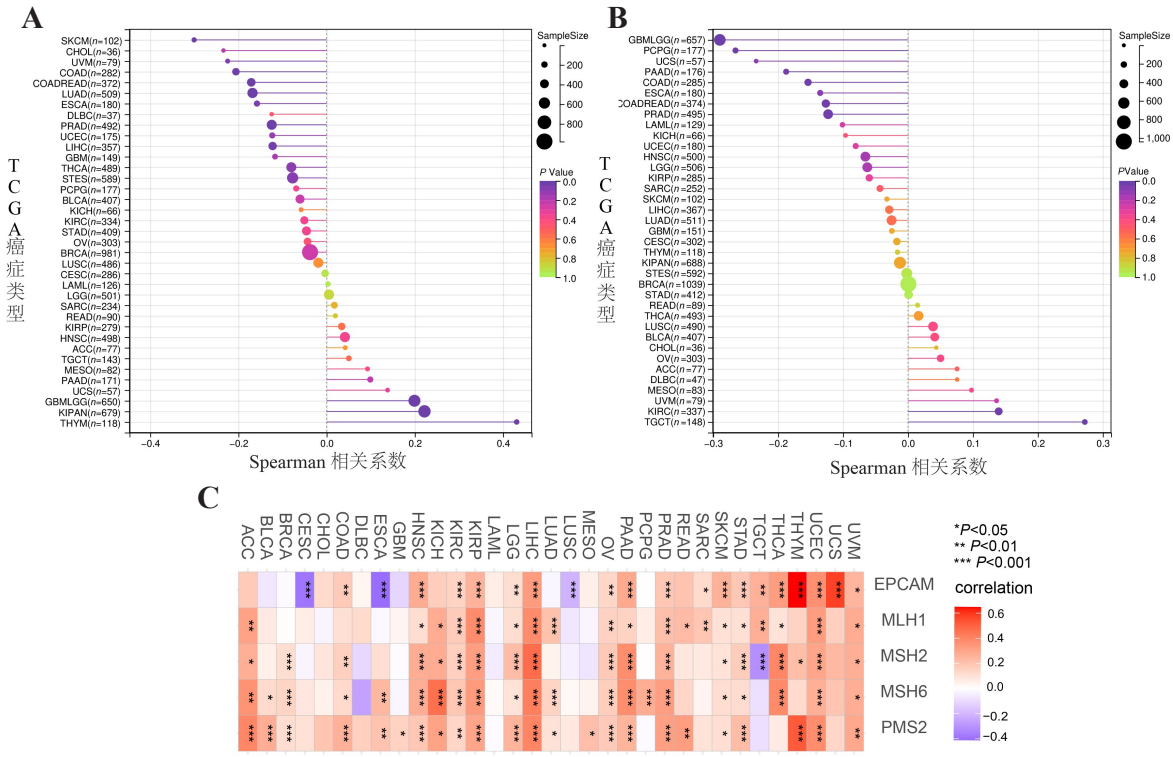
2.7　*CLDN1*在泛癌中的基因富集分析

GO功能富集显示：*CLDN1*高表达相关基因在不同癌症中呈现特异性功能富集。在食管鳞状细胞癌中，与染色质重塑和DNA复制相关；在乳腺浸润癌中，显著富集于角化和上皮细胞分化；在甲状腺癌中，与T细胞介导免疫和代谢调控相关；在结肠癌和直肠腺癌中，分别富集于神经递质调控和免疫反应相关通路；在食管癌中，涉及嗅觉感知和免疫球蛋白受体结合（见图7A）。

KEGG通路分析，在脑低级别胶质瘤中，与钙信号通路和JAK-STAT信号通路相关，提示其可能参与信号传递和细胞调控；在肾嫌色细胞癌中，与NOD样受体信号通路和肠道免疫网络相关；在肝细胞肝癌和胃癌中，分别富集于TGF-β信号通路和氧化磷酸化通路；在肺腺癌/肺鳞状细胞癌和胰腺癌中，显著富集于细胞周期、DNA复制和蛋白质合成相关通路（见图7B）。

2.8　*CLDN1*与胃癌预后、临床病理特征的关系及其功能验证

进一步验证*CLDN1*对胃癌预后、病理特征的影响及其表达和功能。KM生存曲线表示，在无病生存率和无进展生存期分析中，*CLDN1*高表达组



A：*CLDN1*表达与TMB的相关性，气泡大小表示样本量，颜色表示*P*值；B：*CLDN1*表达与MSI的相关性，气泡大小表示样本量，颜色表示*P*值；C：*CLDN1*表达与MMR基因的相关性，热图显示*CLDN1*与*EPCAM*、*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*在不同癌症中的相关性，颜色表示相关系数，星号表示显著性水平（*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001）。

图6 *CLDN1*在泛癌中的TMB、MSI及MMR基因相关性分析

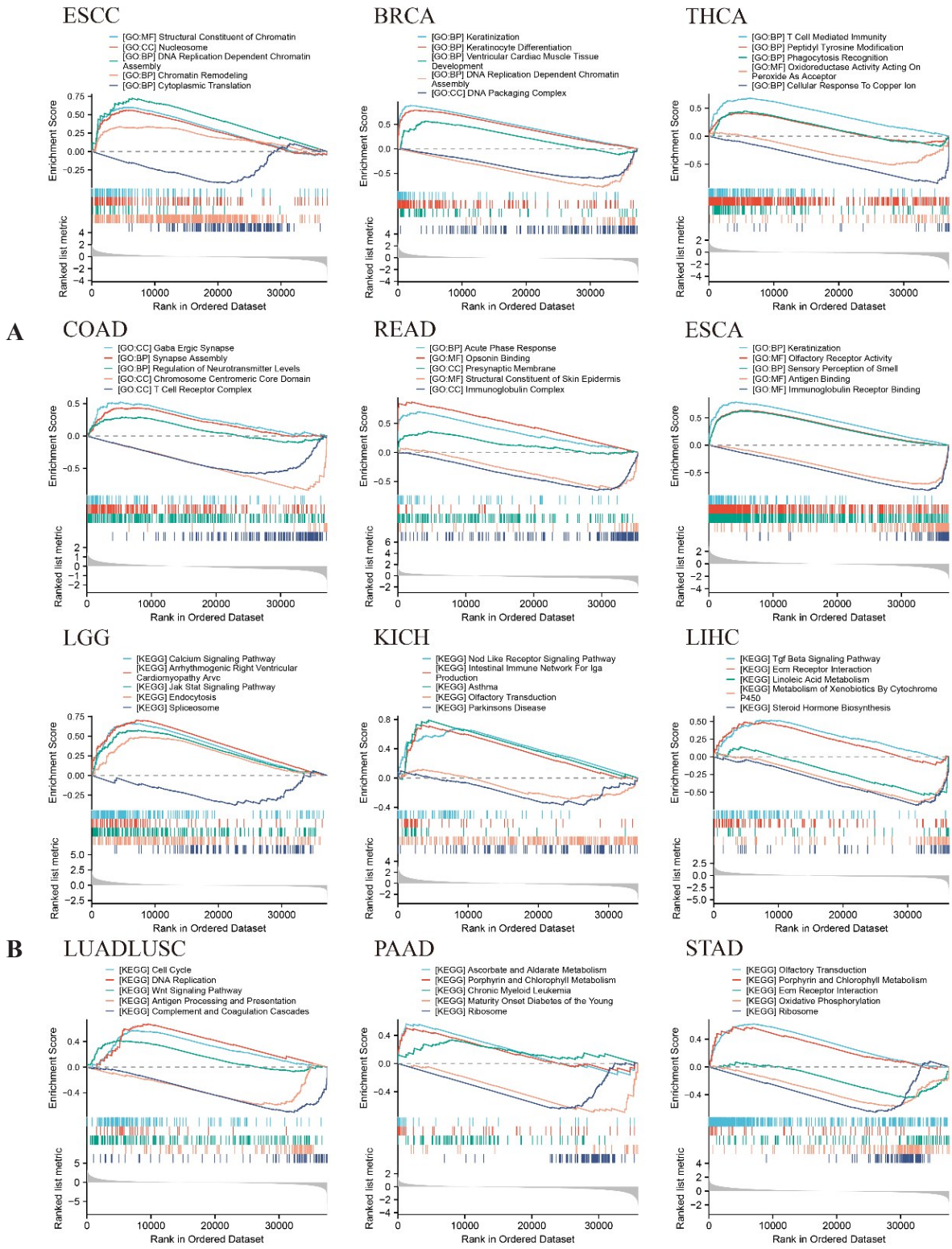
Figure 6 Correlation analysis of *CLDN1* with TMB, MSI and MMR genes in Pan-cancer

的生存期明显低于低表达组（见图8A，8B）；*CLDN1*的表达水平随着T分期的升高而逐步增加，且在总分期中也呈现出类似的升高趋势（见图8C，8D）；进而通过表达和功能试验，免疫组织化学结果显示，CLDN1蛋白在胃癌组织中的表达显著高于癌旁组织（见图8A）。Western blotting分析表明，CLDN1蛋白在胃癌细胞系MKN45和MKN74中的表达高于正常胃上皮细胞GES-1（见图8C）。qRT-PCR验证显示，si*CLDN1-1*和si*CLDN1-2*显著降低了MKN45细胞中*CLDN1*的mRNA水平（见图8D）。CCK8实验和划痕实验结果表明，*CLDN1*敲低显著抑制了MKN45细胞的增殖和迁移能力（见图8E，8F）。这些结果表明，*CLDN1*可能在胃癌细胞的生长和侵袭中发挥重要作用。

3 讨论

本研究基于TCGA和GTEx数据库发现，*CLDN1*在13种癌症中的显著上调，特别是在头颈鳞状细胞癌和结肠癌中，*CLDN1*的表达同样升高，这与研究[3,22-23]结果一致。另外，本研究Western blotting结果显示，*CLDN1*在胃癌细胞中表达升高，这与数据库分析结果一致，也与研究[24]结果一致。与此相对，*CLDN1*在胶质瘤、乳腺浸润癌等7种癌症中显著下调，与研究[25-26]结果一致，且上调和下调与预后高度相关。这一现象提示*CLDN1*在不同癌症中的功能并非单一的，而是呈现出明显的癌症类型特异性。ROC曲线分析显示，*CLDN1*在肺鳞状细胞癌、宫颈鳞癌和腺癌、甲状腺癌等多种肿瘤中AUC>0.8，具有潜在的诊断标志物价值[27]。此外，*CLDN1*表达与肿瘤的T、N、M分期及临床分期显著相关，支持其在肿瘤局部扩散和转移中的作用。

研究[28-29]发现，MMR基因异常通常导致MSI发生，而高MSI水平的肿瘤往往伴随较高的TMB。TMB可反映肿瘤抗原产生能力，并预测免疫治疗反应，且高MSI和TMB的患者通常在免疫治疗中疗效更佳[30]。*CLDN1*与*TMB*、*MSI*和*MMR*基因显著相关，提示其可能通过影响DNA修复和基因稳定性调控促进癌症的发生与耐药性。在子宫内膜癌、肝细胞肝癌和胃癌等癌症中，高*MSI*和*TMB*水平可能与更好的免疫治疗疗效相关。免疫微环境与胃瘤的发生发展密切相关[31]，泛癌的免疫微环境的分析进一步揭示了*CLDN1*与免疫细胞浸润及免疫检查点基因的密切关联，提示其在肿瘤免疫逃逸

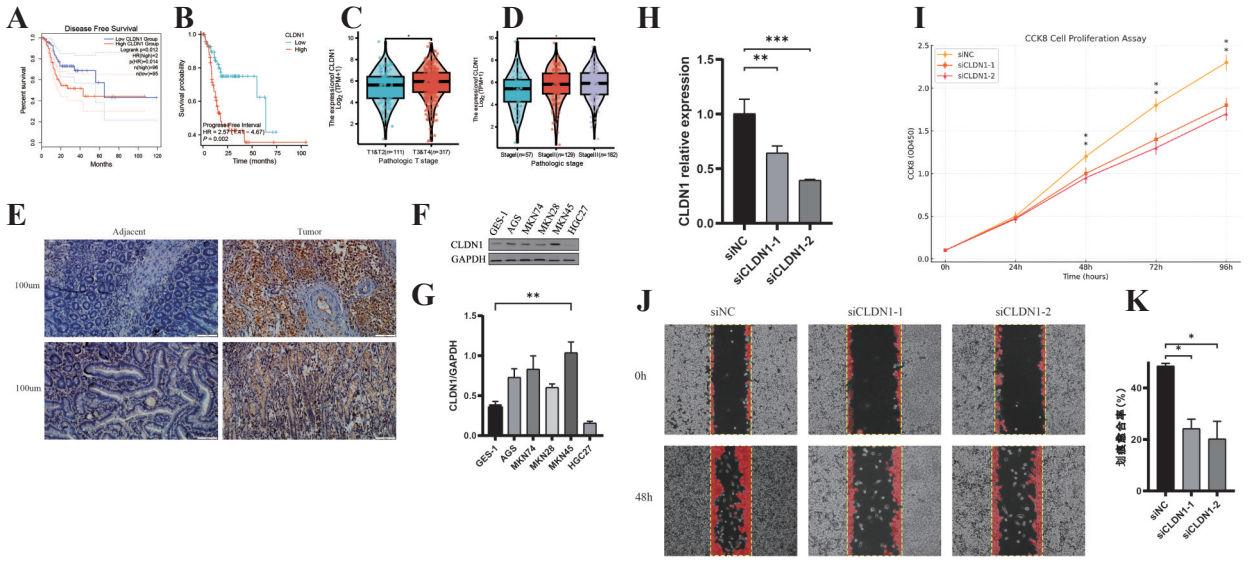


A：*CLDN1*在食管鳞状细胞癌、乳腺浸润癌、甲状腺癌、结肠癌、直肠腺癌和食管癌中的GO功能注释分析；B：*CLDN1*在脑低级别胶质瘤、肾嫌色细胞癌、肝细胞肝癌、肺腺癌肺鳞状细胞癌、胰腺癌和胃癌中的KEGG通路分析。不同颜色表示不同的功能和通路，曲线向上的峰值表示正向调控，向下的峰值表示负向调控。

图7　*CLDN1*在泛癌中的GSEA富集分析

Figure 7　GSEA enrichment analysis of *CLDN1* in pan-cancer

中的潜在作用。通过对*CLDN1*的GO和KEGG分析，发现*CLDN1*在食管鳞状细胞癌中与DNA复制和染色质重塑相关，提示其可能通过促进基因组不稳定性，推动肿瘤的发展[32]；在乳腺浸润癌中与上皮细胞分化和角化相关，暗示其可能与上皮–间质转化及肿瘤转移相关[33]；在脑低级别胶质瘤中，*CLDN1*相关基因富集于JAK-STAT通路，表明*CLDN1*可能通过JAK-STAT通路，参与胶质瘤的增



A：*CLDN1*在胃癌中的表达与无病生存率的关系；B：*CLDN1*在胃癌中的表达与无进展生存期的关系；C：*CLDN1*的表达与胃癌病理T分期的关系；D：*CLDN1*的表达与胃癌总体病理分期的关系。E：胃癌患者癌组织与癌旁组织中CLDN1蛋白的免疫组化染色结果，显示CLDN1蛋白在癌组织中高表达（放大倍数：100倍）；F：CLDN1蛋白在正常胃上皮细胞（GES-1）及胃癌细胞系（AGS、MKN28、MKN45、MKN74、HGC27）中的表达检测结果（Western blotting）；G：CLDN1蛋白在不同胃癌细胞系中相对蛋白表达量的统计分析（以GAPDH为内参）；H：转染si*CLDN1*后*CLDN1* mRNA相对表达量的qRT-PCR结果，显示si*CLDN1-1*和si*CLDN1-2*显著下调*CLDN1*表达；I：CCK8细胞增殖实验显示，转染si*CLDN1*后胃癌细胞增殖能力显著下降；J：划痕实验显示，转染si*CLDN1*后胃癌细胞的迁移能力显著下降（观察时间：0 h和48 h）；K：划痕实验统计分析结果，转染si*CLDN1*后迁移愈合率显著降低（*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001）。

图8　*CLDN1*与胃癌预后、临床病理特征的关系及其功能验证

Figure 8　Relationship of *CLDN1* with prognosis, clinicopathologic features of gastric cancer and its functional validation

殖、存活及侵袭[34]。*CLDN1*高表达相关基因在不同类型癌症中呈现特异性功能富集，涉及细胞增殖、免疫逃逸、代谢重编程等关键生物学过程，揭示了*CLDN1*作为潜在肿瘤标志物和治疗靶点的前景。胃癌预后和临床病理特征提示，*CLDN1*的高表达可能与胃癌较差的预后相关，在进展过程中起到重要作用。敲低*CLDN1*后，胃癌细胞的增殖迁移显著降低，提示*CLDN1*可能通过影响细胞黏附、信号传递或细胞骨架重塑等机制，促进细胞迁移和增殖[35]。

综上所述，*CLDN1*在多种癌症的诊断、预后、临床相关性中具有重要作用，在胃癌中，*CLDN1*促进了肿瘤细胞的增殖和转移，有望成为一种有前景的生物标志物和治疗靶点。

参考文献

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] HANA C, THAW DAR N N, GALO VENEGAS M, et al. Claudins in Cancer: A current and future therapeutic target [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25 (9): 4634.

[3] CHANG J W, SEO S T, IM M A, et al. Claudin-1 mediates progression by regulating EMT through AMPK/ TGF-β signaling in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Translational Research , 2022, 247: 58-78.

[4] KWON M J. Emerging roles of claudins in human cancer [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14 (9): 18148- 18180.

[5] LV J, SUN B, MAI Z, et al. CLDN-1 promoted the epithelial to migration and mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells via Notch pathway[J]. Molecular And Cellular Biochemistry, 2017, 432(1/2): 91-98.

[6] KYUNO D, YAMAGUCHI H, ITO T, et al. Targeting tight junctions during epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic cancer[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(31): 10813-10824.

[7] ARABI T Z, ALGHERYAFI L A, ALODAH N A, et al. Aberrant Expression of claudins in head and neck carcinomas and their prognostic and therapeutic value: A narrative review[J]. Cancers, 2023, 15(17): 4208.

[8] BOROWCZAK J, ŁASZCZYCH D, OLEJNIK K, et al. Tight junctions and cancer: Targeting claudin-1 and claudin-4 in thyroid pathologies[J]. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 2024, 17(10): 1304.

[9] SUN B S, YAO Y Q, PEI B X, et al. Claudin-1 correlates with poor prognosis in lung adenocarcinoma[J]. Thoracic Cancer, 2016, 7(5): 556-563.

[10] HUANG J, ZHANG L, HE C, et al. Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell

anoikis in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(3): 1652-1665.

[11] JIANG L, YANG L, HUANG H, et al. Prognostic and clinical significance of claudin-1 in colorectal cancer: A systemic review and Meta-analysis[J]. International Journal of Surgery (London, England), 2017, 39: 214-220.

[12] WU J, GAO F, XU T, et al. CLDN1 induces autophagy to promote proliferation and metastasis of esophageal squamous carcinoma through AMPK / STAT1 / ULK1 signaling[J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(3): 2245-2259.

[13] SUGIURA K, MASUIKE Y, SUZUKI K, et al. LIN28B promotes cell invasion and colorectal cancer metastasis via CLDN1 and NOTCH3[J]. JCI Insight, 2023, 8(14): e167310.

[14] SHIOZAKI A, SHIMIZU H, ICHIKAWA D, et al. Claudin 1 mediates tumor necrosis factor alpha-induced cell migration in human gastric cancer cells[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(47): 17863-17876.

[15] GOLDMAN M J, CRAFT B, HASTIE M, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(6): 675- 678.

[16] VIVIAN J, RAO A A, NOTHAFT F A, et al. Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses [J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(4): 314-316.

[17] LI T, FAN J, WANG B, et al. TIMER: A web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells [J]. Cancer Research, 2017, 77(21): e108-e110.

[18] ARAN D, HU Z, BUTTE A J. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape[J]. Genome biology, 2017, 18(1): 220.

[19] THORSSON V, GIBBS D L, BROWN S D, et al. The immune landscape of cancer[J]. Immunity, 2018, 48(4): 812-830.e14.

[20] BEROUKHIM R, MERMEL C H, PORTER D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers[J]. Nature, 2010, 463(7283): 899-905.

[21] BONNEVILLE R, KROOK M A, KAUTTO E A, et al. Landscape of microsatellite instability across 39 cancer types[J]. JCO Precision Oncology, 2017 (2017): 1700073.

[22] NELHŰBEL G A, KÁROLY B, SZABÓ B, et al. The prognostic role of claudins in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Pathology Oncology Research: POR, 2014, 20(1): 99-106.

[23] COX K E, LIU S, HOFFMAN R M, et al. The expression of the claudin family of proteins in colorectal cancer[J]. Biomolecules, 2024, 14(3): 272.

[24] RESNICK M B, GAVILANEZ M, NEWTON E, et al. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: A tissue microarray study with prognostic correlation[J]. Human Pathology, 2005, 36(8): 886-892.

[25] KARNATI H K, PANIGRAHI M, SHAIK N A, et al. Down regulated expression of Claudin-1 and Claudin-5 and up regulation of β - catenin: Association with human glioma progression[J]. CNS & Neurological Disorders Drug Targets, 2014, 13(8): 1413-1426.

[26] ZHOU B, MOODIE A, BLANCHARD A A, et al. Claudin 1 in breast cancer: New insights[J]. Journal of Clinical Medicine, 2015, 4(12): 1960-1976.

[27] NAHM F S. Receiver operating characteristic curve: Overview and practical use for clinicians[J]. Korean Journal of Anesthesiology, 2022, 75(1): 25-36.

[28] YAMAMOTO H, WATANABE Y, ARAI H, et al. Microsatellite instability: A 2024 update[J]. Cancer Science, 2024, 115(6): 1738-1748.

[29] PALMERI M, MEHNERT J, SILK A W, et al. Real-world application of tumor mutational burden-high (TMB-high) and microsatellite instability (MSI) confirms their utility as immunotherapy biomarkers[J]. ESMO Open, 2022, 7 (1): 100336.

[30] LUCHINI C, BIBEAU F, LIGTENBERG M J L, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: A systematic review-based approach[J]. Annals of Oncology, 2019, 30(8): 1232-1243.

[31] MOU P, GE Q H, SHENG R, et al. Research progress on the immune microenvironment and immunotherapy in gastric cancer[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1291117.

[32] CHEN X, AGUSTINUS A S, LI J, et al. Chromosomal instability as a driver of cancer progression[J]. Nature Reviews. Genetics, 2024.

[33] HAO Y, BAKER D, TEN DIJKE P. TGF - β - mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis [J]. international Journal of Molecular Sciences, 2019, 20 (11): 2767.

[34] VALLE-MENDIOLA A, GUTIÉRREZ-HOYA A, SOTO-CRUZ I. JAK/STAT signaling and cervical cancer: From the cell surface to the nucleus[J]. Genes, 2023, 14(6): 1141.

[35] FRIEDL P, ALEXANDER S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity[J]. Cell, 2011, 147(5): 992-1009.