

基于生物信息学筛选的胰腺癌差异基因及免疫浸润机制预测靶向中药

龙思丹^{1,2}, 季双双², 陈美池^{1,2},
袁张君², 马银杰¹, 薛鹏¹, 朱世杰^{1*}

¹中国中医科学院望京医院肿瘤科, 北京 100102; ²北京中医药大学研究生院, 北京 100029

摘要:本研究首先通过生物信息学方法得到胰腺癌差异基因 2 653 个, 进一步筛选得到 COL1A2 等 10 个核心差异基因, 涉及蛋白质消化与吸收等信号通路。然后生存分析表明核心差异基因对胰腺癌患者的无复发生存率具有显著影响, 进一步免疫细胞浸润矩阵分析发现胰腺癌组织中 CD4⁺ 记忆 T 细胞、M2 巨噬细胞、树突状细胞等浸润程度高, 而 CD8⁺ T 细胞浸润程度低, 不同免疫细胞的分布之间存在一定相关性。最后, 本研究预测的有效中药多属于清热、补益和祛风湿类, 归肝经, 其中葶苈子、姜黄等中药与核心基因和相关免疫途径最为密切。

关键词:胰腺癌; 生物信息学; 免疫浸润; 生存分析; 中药预测

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)2-0319-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.2.016

Bioinformatics-based screening of pancreatic cancer differential genes and immune infiltration mechanisms to predict targeting of traditional Chinese medicine

LONG Si-dan^{1,2}, JI Shuang-shuang², CHEN Mei-chi^{1,2},
YUN Zhang-jun², MA Yin-jie¹, XUE Peng¹, ZHU Shi-jie^{1*}

¹Department of Oncology, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

²Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: In this study, we first obtained 2 653 differential genes of pancreatic cancer by bioinformatics. Further screening yielded 10 core differential genes, including COL1A2, involved in signaling pathways such as protein digestion and absorption. Survival analysis revealed that core difference genes had a significant effect on recurrence-free survival in pancreatic cancer patients. Immune cell infiltration matrix analysis in pancreatic cancer tissues revealed high levels of CD4⁺ memory T cells, M2 macrophages, and dendritic cells, but low levels of CD8⁺ T cells, with some correlation between the distribution of various immune cells. Finally, the majority of the effective herbal remedies identified in this study were associated with the liver meridians and were classified as clearing heat, tonifying, and dispelling wind-dampness. Among them, Curcumae Longae Rhizoma and Descurainiae Semen Lepidii Semen had the strongest connections to the immune pathways and key genes.

Key words: pancreatic cancer; bioinformatics; immune infiltration; survival analysis; herbal prediction

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 的全球负担在过去 25 年中增加了一倍以上, 预计 2030 年, PDAC 将成为癌症相关死亡的第 2 大原因^[1]。PDAC 患者五年的平均生存率仅 8%, 并且高达 71% 患者即使手术完全切除后也面

临复发的风险^[2]。这种高致死率和高复发率的肿瘤特性是由 PDAC 紧密的基质成分 (物理屏障) 决定的^[3], 其防止免疫效应细胞浸润到肿瘤中, 使胰腺癌细胞能够逃避免疫监视。目前, 许多临床试验尝试通过免疫治疗改善 PDAC 患者的整体疗效, 包括免疫检查点抑制剂、癌症疫苗、过继细胞转移等^[4], 单抗治疗的临床效果不佳, 仍未取得突破性进展。

随着高通量遗传分析的出现, 基因表达谱分析

收稿日期: 2022-06-06

接受日期: 2022-10-09

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程 (CI2021B009); 中国中医科学院望京医院院级课 (WJYY2020-02)

* 通信作者 Tel: 86-10-84739132; E-mail: zhushij@hotmail.com

成为了鉴定各种疾病差异表达基因的有效方法。CIBERSORT 是一种分析工具,它使用微阵列数据或 RNA 测序数据来评估样本中免疫细胞的表达,并获得各种免疫细胞比率^[5]。虽然目前已有多篇生物信息学针对 PDAC 差异基因进行了分析^[6,7],但缺乏进一步对于免疫机制和治疗靶向预测的深入研究,尤其是在植物药的治疗潜力方面,中医已对于 PDAC 常伴见的黄疸、腹水等病症已形成系统认识,同时中药以多靶点的天然优势能有效干预复杂的免疫微环境,值得深入挖掘。因此,本研究利用基因芯片数据库(gene expression omnibus, GEO),选择 PDAC 患者配对组织样本进行相关分析,从基因水平挖掘疾病机制,进行生存差异和免疫相关分析,通过 CIBERSORT 反卷积算法描绘 PDAC 组织中的免疫细胞浸润模式,最后综合预测和筛选潜在的有效中药,为临床药物的选择、研发提供依据。

1 资料与方法

1.1 差异基因筛选

以“Pancreatic Cancer”为关键词检索 GEO 基因表达综合数据库,筛选条件:(1)“Expression profiling by array”(2)“Homo sapien”(3)PDAC 和癌旁组织。(4)组织来自同一患者的成对匹配样本。(5)全基因表达谱。(6)数据详细,包括 Gene Symbol 等信息。最终筛选得到 GSE15471 基因芯片为本次研究分析的对象。GSE15471 数据集的处理过程:在 Affymetrix U133 plus 2.0 全基因组微阵列上分析,并且进行了重复的微阵列杂交,以测量技术测量误差,因此总共进行了 78 次基因芯片杂交。其中一个样本不符合质量控制被排除,随后使用 RMA 算法对微阵列数据进行标准化。应用 GEO2R (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) 在线工具及 Excel 软件筛选芯片胰腺癌组织与正常组织的差异表达基因,筛选条件 $|\log_2 FC| \geq 1$ 和校正 $P < 0.05$ 进行差异基因分析。

1.2 蛋白网络互作及功能注释

核心差异基因通过 STRING 数据库获取蛋白网络互作(protein-protein interaction, PPI)网络模型,并将结果导入 Cytoscape 软件中,采用 Cytoscape 插件工具 cyto Hubba 中的 MCC 方法识别重要基因,将重要基因进行可视化运用 R 语言程序中的“cluster Profiler”插件包进行差异基因的本体论(gene ontology, GO)与京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析,包括

生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)。

1.3 核心基因表达水平差异

利用 GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)明确核心差异基因在胰腺癌中的表达水平,匹配的正常数据来自 TCGA 和 GTEx 数据。免疫组化(immunohistochemistry, IHC)通过利用抗体-抗原结合的高特异性,可以揭示蛋白质的相对分布和丰度。免疫组化数据来自人类蛋白质图谱(<https://www.proteinatlas.org/>),比较了正常和癌症组织中目标基因在蛋白水平的表达差异。

1.4 核心差异基因与胰腺癌患者生存时间、组织免疫浸润的相关性

Kaplan-Meier Plotter 数据库(<http://kmplot.com/analysis/>)中 Kaplan-Meier 曲线对排名前五位的核心差异基因进行总生存率(overall survival, OS)和无复发生存率(relapse-free survival, RFS)分析;利用 TIMER 数据库(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>),调整 PC 的肿瘤纯度后,探索前五位核心差异基因与 B 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、树突状细胞、巨噬细胞等免疫细胞浸润程度的相关性。

1.5 获取免疫浸润矩阵、免疫细胞间相关性及组间差异分析

采用 R 语言程序并链接 CIBERSORT 反卷积算法进行 22 种免疫细胞转录特征的模拟计算。设定模拟次数为 1000 次,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验对 $P < 0.05$ 的数据进行后续分析。

对 CIBERSORT 反卷积算法以 $P < 0.05$ 基础上筛选的可信样本数据中进行不同免疫细胞间 Pearson 相关系数计算,并采用秩和检验比较胰腺癌组与对照组差异。

1.6 免疫细胞特征分析

对纳入样本中 PC 患者不同胰腺组织区域来源的肿瘤组织及正常组织样本进行免疫细胞差异分析,获得癌组织的免疫细胞浸润情况及特征。

1.7 潜在有效中药的预测

Coremine Medical (<https://coremine.com/medical/>)数据库是一个开放的生物医学数据分析平台,记录了大量生物医学术语间的关系。将两组差异的核心靶基因和 GO 富集与免疫相关 BP 导入 Coremine Medical 数据库,分别筛选具有潜在效应机制的中药。设置筛选条件 $P < 0.01$,筛选可用于胰腺癌治疗的中药。

2 结果

2.1 胰腺癌差异基因

选取 GEO 数据库中的 GSE15471 基因芯片进行分析,该芯片来自 36 位 PC 患者,病理类型为最常见的 PDAC,以其肿瘤组织和自身匹配的正常胰

腺组织为样本,并且为减少技术误差共进行了 78 次基因芯片杂交。筛选获得差异基因 2 653 个,其中上调基因 2 305 个,下调基因 348 个,前 20 个上下调基因的表达分布情况(见图 1A),差异基因整体表达情况(见图 1B)。

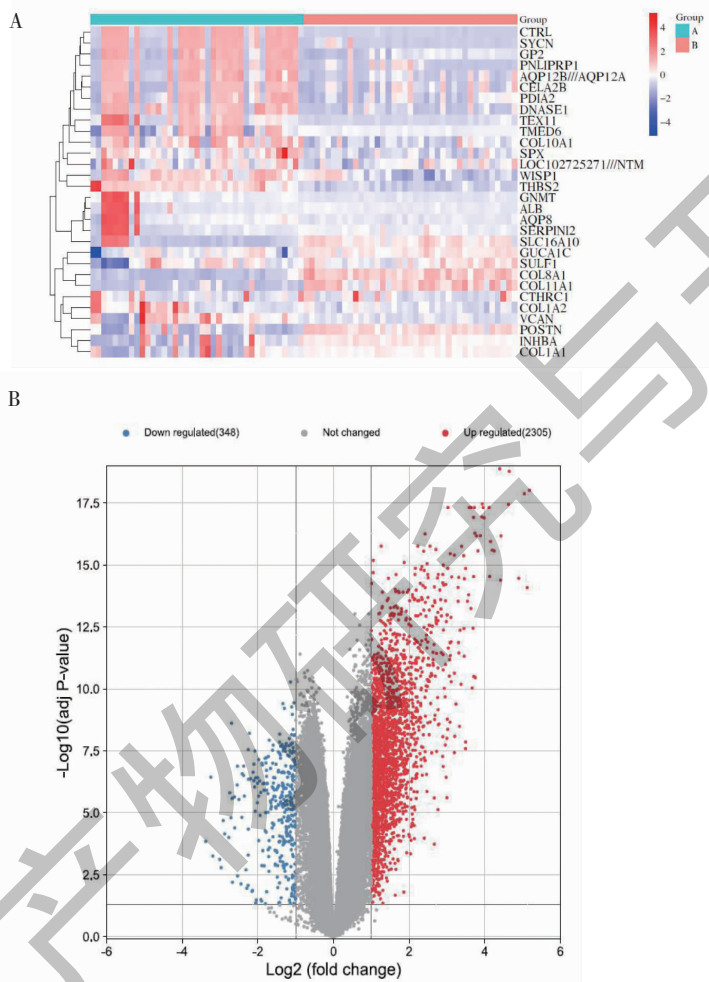


图 1 PDAC 基因差异表达热图及火山图分析

Fig. 1 Heat map and volcano map of differential gene expression in PDAC

注:A:Group A 为正常组织;Group B 为肿瘤组织;B:差异基因分布,蓝色、灰色、红色分别表示下调、无差异、上调。Note:A,Group A is normal tissue;Group B is tumor tissue;B:Blue, grey and red indicate down-regulation, no difference, and up-regulation, respectively.

2.2 核心基因、PPI 及功能注释

将 2 653 个差异表达基因导入 STRING,选择最高置信值 0.9,去除无连接的基因后得到 PPI。将分析结果文件导入 Cytoscape 软件进行可视化显示共有 94 个节点,160 条边(见图 2)。经 cyto Hubba 计算列取前 10 位作为核心基因,表达均呈现上调(见图 3),按重要程度依次排序为 I 型胶原蛋白 a-2 (collagen type I alpha 2 chain, COL1A2)、I 型胶原蛋白 a-1 (collagen type I alpha 1 chain, COL1A1)、III 型

胶原蛋白 a-1 (collagen tpe III alpha 1 chain, COL3A1)、V 型胶原蛋白 a-1 (collagen type V alpha 2 chain, COL5A1)、V 型胶原蛋白 a-2 (collagen type V alpha 2 chain, COL5A2)、具有血小板反应蛋白基序的去整合素和金属蛋白酶 2 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 2, ADAMTS2)、基膜聚糖 (lumican, LUM)、整合素 A2 (integrin alpha 2, ITGA2)、纤维粘黏蛋白 1 (matrix metallopeptidase 2, MMP2)。

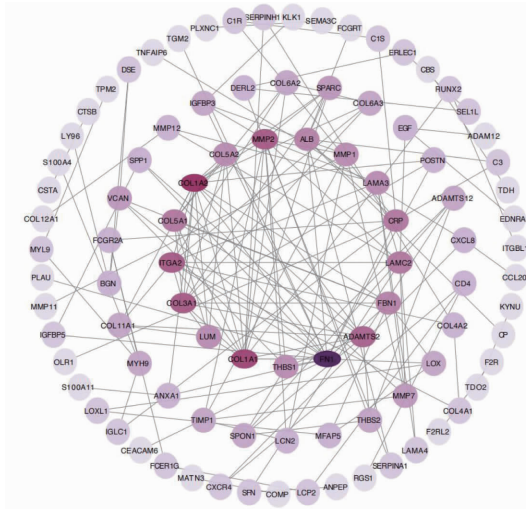


图2 差异基因 PPI

Fig. 2 Differential gene PPI

注:颜色越深代表该节点的度值越大,重要程度越高。Note: The darker the color means the greater the degree value of the node, the higher the importance.

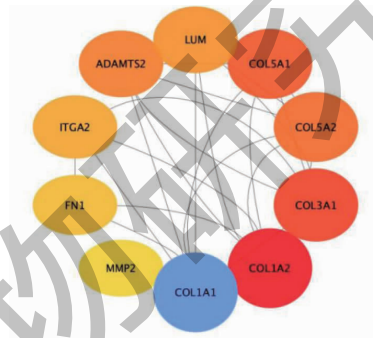


图3 核心蛋白基因模块

Fig. 3 Core protein gene module

注:颜色越深代表该节点的度值越大,重要程度越高。Note: The darker the color means the greater the degree value of the node, the higher the importance.

2.3 核心基因表达水平差异

为了验证以上筛选出来的核心基因是否具有代表性和是否具有作为治疗目标的潜力,我们分析了核心基因在癌症和癌症邻近组织中的差异性表达。GEPIA 数据库的分析结果显示,前五位核心基因 COL1A2、COL1A1、COL3A1、COL5A1、COL5A2 在 PDAC 组织中的表达水平明显高于正常胰腺组织(见图 4A~4E),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。HPA 数据库的 IHC 结果显示,在蛋白表达水平, COL1A2、COL1A1、COL3A1、COL5A1 在胰腺癌中的表达高于正常胰腺组织(见图 4F~4I), COL5A2 缺乏相关数据。该部分结果一定程度上验证了以上生信分析的结果。

2.4 核心差异基因介导的生存分析、免疫浸润

将前 5 个核心差异基因进行胰腺癌生存分析,结果显示(见图 5) COL1A2、COL1A1、COL3A1、COL5A1、COL5A2 基因上调表达的患者均表现出较差的 OS(排列在前)和 RFS(排列在后),并且以上基因对于患者 RFS 均具有显著的影响($P < 0.05$),但是对于患者 OS 并没有统计学意义,说明针对 PDAC 患者 OS 的影响,核心差异基因表达水平的改变并非独立的影响因素。

进一步探讨核心差异基因是否通过介导免疫浸润模型改变肿瘤微环境,从而影响最终生存率,结果显示(见图 6),该 5 个核心差异基因与肿瘤纯度均呈现负相关($P < 0.05$),然而除了 COL5A1 和

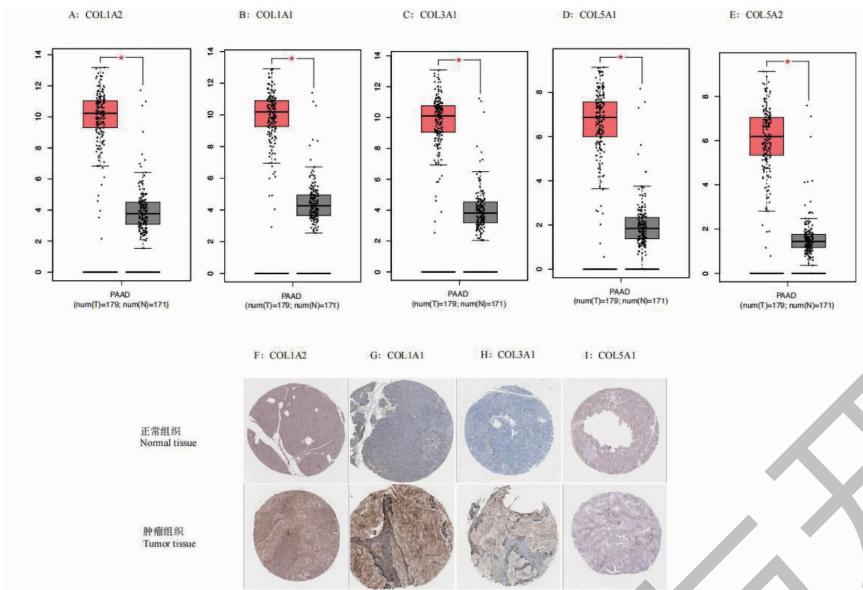


图 4 关键基因在胰腺癌组织和正常胰腺组织中的差异性表达

Fig. 4 Differential expression of key genes in PDAC tissues and normal pancreatic tissues

COL5A2 与 CD4⁺T 细胞无显著相关,其余基因与常

见六种免疫浸润细胞均呈显著正相关。

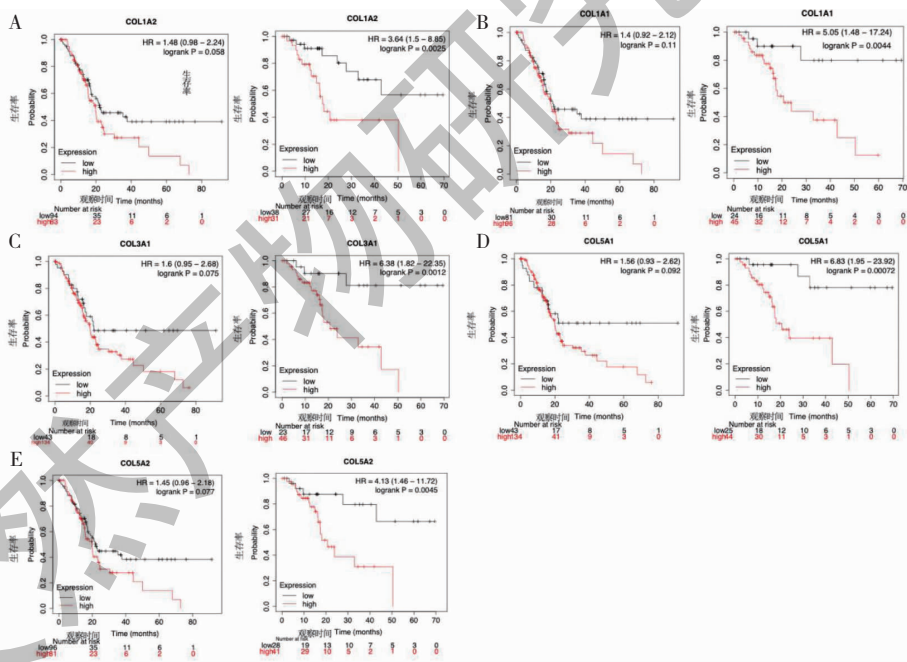


图 5 核心差异基因与生存分析

Fig. 5 Core differential genes and survival analysis

2.5 GO 及 KEGG 富集分析结果

为了更加全面了解疾病发病机制中差异基因的功能及其相关免疫过程,利用 R 语言程序对差异基因进行生物学功能及通路富集分析。差异基因的 GO 分析(见图 7A)。其中,获取 BP 2 950 条,与免疫相关的生物学过程主要涉及中性粒细胞激活与脱

颗粒、血小板脱颗粒、趋化因子介导的信号通路、T 辅助细胞的分化、免疫系统过程的负向调节、体液免疫反应等,详见表 1。KEGG 富集的相关通路主要涉及蛋白质消化与吸收、细胞外基质受体相互作用、PI3K/Akt 信号传导、衰老等相关信号通路(见图 7B)。

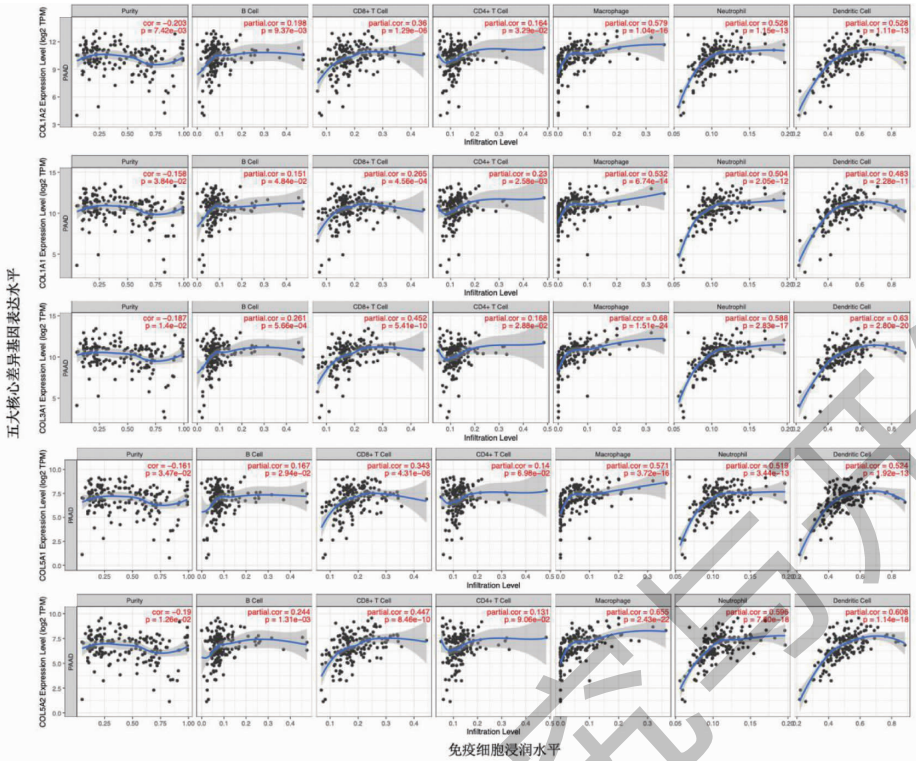


图 6 核心差异基因与免疫细胞浸润的相关性分析

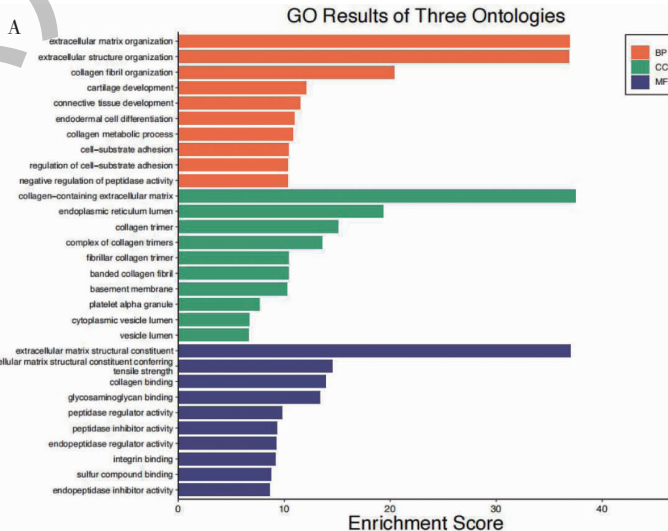
Fig. 6 Correlation analysis of core difference genes and immune cell infiltration

2.6 免疫浸润细胞分布特征及关联性分析

采用 CIBERSORT 反卷积法以 $P < 0.05$ 为筛选条件对芯片进行筛选,共得到 77 个可信样本,热图左侧 35 个为正常胰腺组织,右侧 42 个为 PDAC 组织。结果显示(见图 8),与正常胰腺组织相比,胰腺癌组织中 $CD8^+$ T 细胞浸润程度低,而 $CD4^+$ 记忆 T 细胞、M2 巨噬细胞、树突状细胞等浸润程度较高。进一步分析了 22 种免疫细胞在样本中的分布变化

特征(见图 9)。

NK 细胞与 $CD8^+$ T 细胞($r = 0.73$)、活化树突状细胞与 $CD8^+$ T 细胞($r = 0.75$)、调节 T 细胞与活化树突状细胞($r = 0.71$)、肥大细胞与 $CD8^+$ T 细胞($r = 0.64$)等呈现较强正相关;M1 巨噬细胞和记忆 T 细胞分别与活化树突状细胞($r = -0.59$; $r = -0.64$)、活化肥大细胞与未活化肥大细胞($r = -0.62$)之间呈现较强负相关(见图 10)。



续图 7 (Continued Fig. 7)

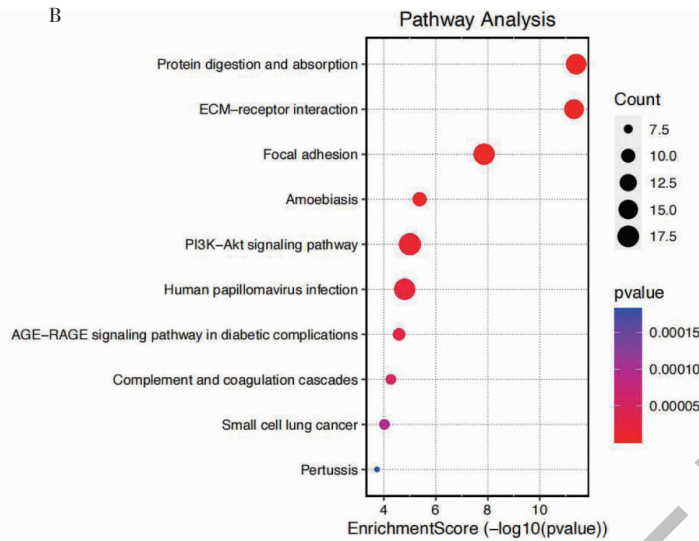


图7 GO 及 KEGG 富集分析

Fig. 7 GO and KEGG enrichment analysis

注:圆形越大占比越高,颜色越深则差异越大。Note:The larger the circle the higher the percentage,and the darker the color the greater the difference.

表1 胰腺癌差异基因免疫浸润相关 GO 富集分析列表

Table 1 List of GO enrichment analysis associated with immune infiltration of differential genes in pancreatic cancer

ID	GO 类型 GO type	校正 P 值 Corrected P-value	富集基因 Enriched gene
GO:0002283	中性粒细胞激活 involved in immune response	3.785E-05	DNASE1、NPEP、LYZ、PLAU、FCGR2A、VNN1、CTSB、S100A11、SLC2A3、CHI3L1、FCER1G、SERPINA1、C3、TNFAIP6、OLFM4、SLPI、RAB31、LCN2、TCN1、OLR1、CEACAM6、S100P
GO:0002576	血小板脱颗粒 Platelet degranulation	8.184E-05	ALB、EGF、THBS1、FCER1G、SPARC、SERPINA1、CD109、FN1、ISLR、PCDH7、TIMP1
GO:0043312	中性粒细胞脱颗粒 Neutrophil degranulation	0.0001182	ANPEP、LYZ、PLAU、FCGR2A、VNN1、CTSB、S100A11、SLC2A3、CHI3L1、FCER1G、SERPINA1、C3、TNFAIP6、OLFM4、SLPI、RAB31、LCN2、TCN1、OLR1、CEACAM6、S100P
GO:0030595	白细胞趋化性 Leukocyte chemotaxis	0.01689465	CXCL6、ANXA1、THBS1、CCL19、CXCR4、CCL20、FCER1G、CXCL5、CXCL8、GREM1
GO:0070098	趋化因子介导信号通路 Chemokine-mediated signaling pathway	0.01829433	CXCL6、CCL19、CXCR4、CCL20、CXCL5、CXCL8
GO:1990266	中性粒细胞迁移 Neutrophil migration	0.01917358	GP2、CXCL6、CCL19、CCL20、FCER1G、CXCL5、CXCL8
GO:0045063	Th1 细胞分化 T-helper 1 cell differentiation	0.02826047	ANXA1、CCL19、LEF1
GO:0030593	中性粒细胞趋化 Neutrophil chemotaxis	0.03318865	CXCL6、CCL19、CCL20、FCER1G、CXCL5、CXCL8
GO:0002683	免疫细胞的负调节过程 Negative regulation of immune system process	0.03866861	IFI16、CLDN18、ANXA1、THBS1、GBPI、FBN1、FCER1G、SAMSN1、THY1、GPNMB、MMP12、COL3A1、GREM1、INHBA
GO:0006959	体液免疫反应 Humoral immune response	0.04540678	LYZ、C1R、C1S、CXCL6、IGLC1、IGLV1-44、CRP、C3、CXCL5、CXCL8、SLPI、LCN2

2.7 免疫细胞浸润差异性分析

通过小提琴图(见图11)对不同组织样本免疫浸润细胞差异分析进行可视化,发现肿瘤组织中活化的记忆 CD4⁺ T 细胞、未活化 NK 细胞、M0/M1/M2 巨噬细胞、未活化树突状细胞、中性粒细胞的浸

润程度显著增多($P < 0.05$);同时,初始 B 淋巴细胞、血小板、CD8⁺ T 细胞、未活化记忆 CD4⁺ T 细胞、辅助 T 细胞、调节 T 细胞、活化 NK 细胞、单核细胞、活化树突状细胞的浸润程度显著减少($P < 0.05$)。

进一步筛选获得 38 组符合要求的配对样本,样

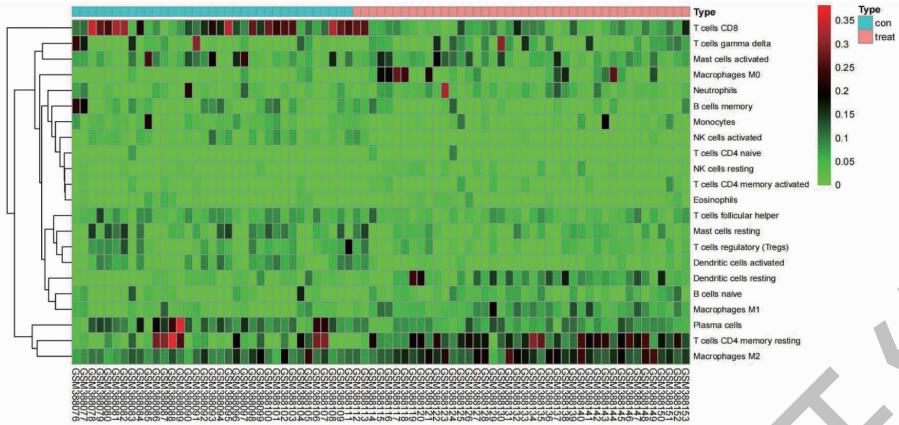


图 8 正常胰腺组织与胰腺癌组织的免疫细胞分布热图

Fig. 8 Heat map of immune cell distribution between normal pancreatic tissue and pancreatic cancer tissue

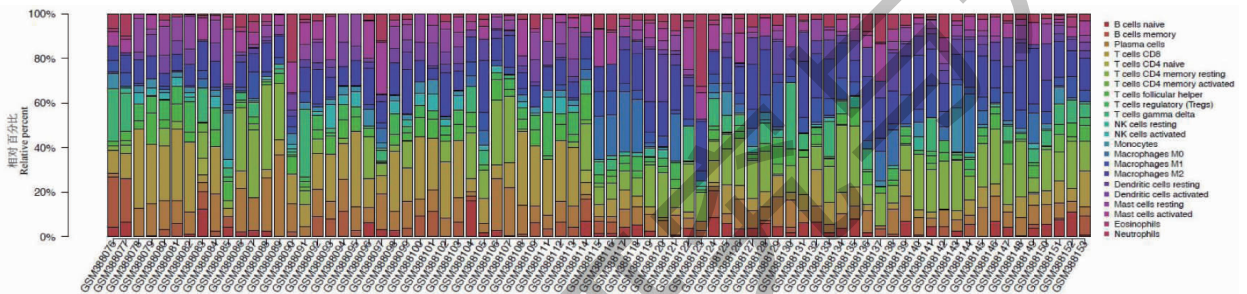


图 9 22 种免疫细胞浸润比例柱状图

Fig. 9 Histogram of the proportion of 22 types of immune cell infiltration

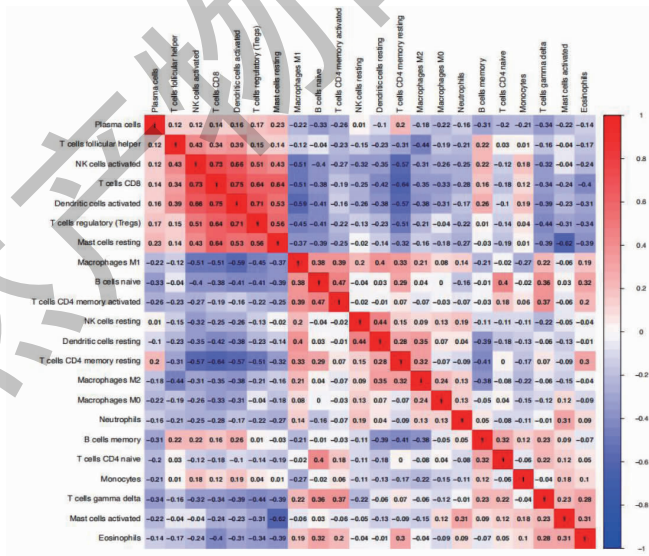


图 10 22 种免疫细胞相关性热图

Fig. 10 Heat map of 22 immune cell correlations

本中各种免疫细胞改变趋势进行分析的结果表明 (见图 12), 在 PDAC 发病过程中个体免疫细胞变化趋势不尽完全一致, 但可以观察到 M0 巨噬细胞多呈上升趋势 ($P = 0.001$)、活化的 NK 和 DC 细胞多

呈下降趋势 ($P = 0$)。

2.8 中药预测分析

通过 Coremine Medical 预测具有潜在治疗 PDAC 的中药, 输入前十名核心差异基因及筛选得

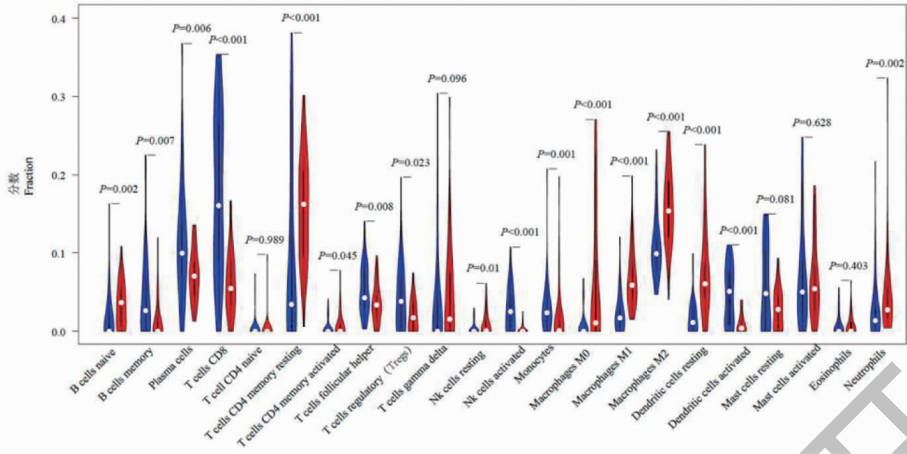


图 11 正常组织与肿瘤组织之间的免疫浸润差异

Fig. 11 Differences in immune infiltration between normal and tumor tissues

注:蓝色代表正常胰腺组织,红色代表胰腺癌组织。Note:Blue represents normal pancreatic tissue,red represents pancreatic cancer tissue.

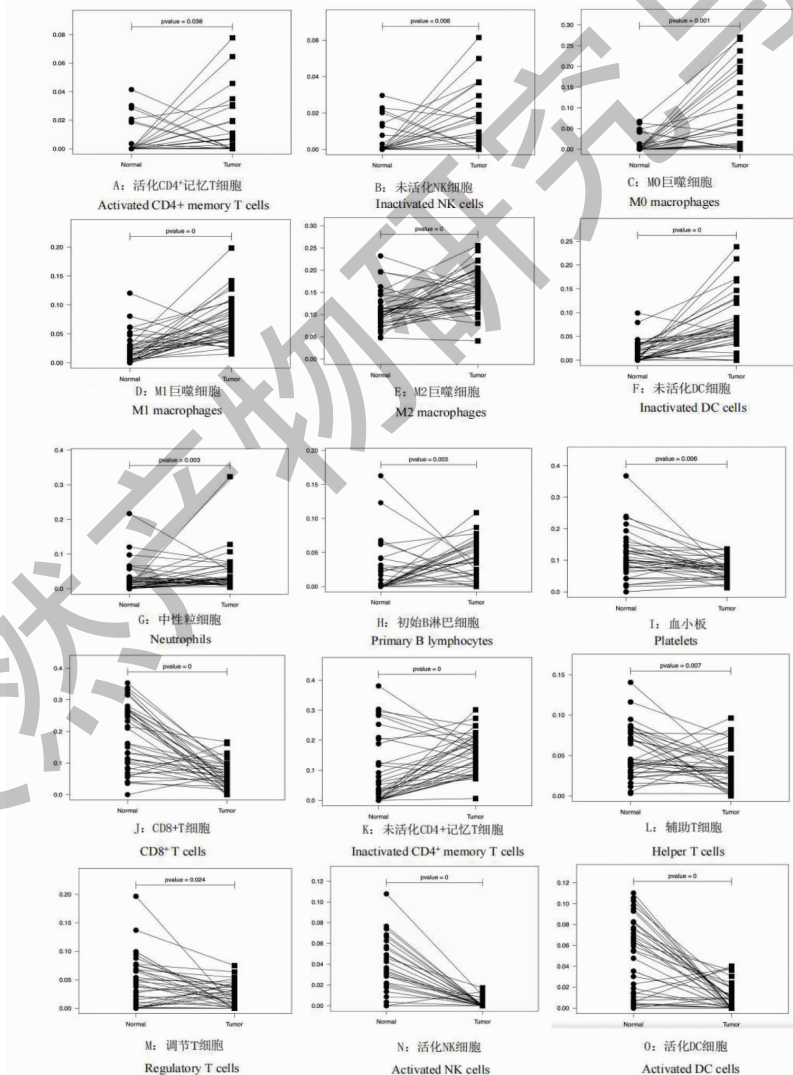


图 12 胰腺癌配对样本免疫浸润特征组合

Fig. 12 Immune infiltration characteristics of paired samples of pancreatic cancer

到的免疫相关生物过程名称。若以 $P < 0.05$ 为筛选标准获得不同靶点的中药 227 味,删除重复的 53 味中药后获得 174 味中药。为更加精准选择用药,最终确定以 $P < 0.01$ 为筛选标准,规范中药名称后,进行整理共获得 77 种中药,其中某些基因及生物学过程缺乏符合要求的中药,最终结果详见表 2。

将最终得到的中药输入 Cytoscape,出现 2 次以上为高频中药,葶苈子、姜黄、皂荚、白附子、桂枝、杜仲、人参、雷丸、香椿、鹿角、三七的度值较高(见图 13)。整体预测中药的功效分布以清热类(22 味)、补益类(10 味)、祛风湿(9 味)为主,多归肝经(见图 14A、14B)。

表 2 中药靶向核心差异基因及免疫相关生物学过程的预测结果

Table 2 Predicted results of Chinese medicine targeting core differential genes and immune-related biological processes

序号 Number	靶向 Target	预测中药名称(简称) Name of Chinese medicine (Abbreviation)
1	COL1A1	葶苈子(TLZ)、党参(DS1)、红娘子(HNZ)、阿胶(EJ)
2	COL1A2	紫草(ZC)、鹿角(LJ)、沙苑子(SYZ)、仙茅(XM)、龟甲(GJ)、木槿(MJ)、蔷薇花(QWH)、丝瓜络(SGL)、黄树葵花(HSKH)、铁扫帚(TSZ)
3	COL3A1	葶苈子、杜仲(DZ)、猫爪草(MZC)、三七(SQ)、三七叶(SQY)、三七花(SQH) 鹿角、桂枝(GZ)、黄药子(HYZ)、飞扬草(FYC)、糯稻根(NDG)、茺蔚子(CWZ)
4	FN1	木香(MX)、蕲蛇(QS)
5	ITGA2	喜树(XS)
6	LUM	千层塔(QCT)、燕窝(YW)
7	MMP2	黄芩(HQ)、白花蛇舌草(BHSSC)、姜黄(JH)、七叶一枝花(QYYZH)、人参(RS)、人参叶(RSY)、人参花(RSH)、桂枝、山慈姑(SCG)、豨莶草(XXC)、蛇莓(SM)、蟾酥(CS)、皂荚(ZJ)、穿山龙(CSL)、防己(FJ)、香椿(XC)、丹参(DS2)、青风藤(QFT)、雷丸(LW)、肉桂(RG)、茶树根(CSG)、头顶一颗珠(TDYKZ)、白附子(BFZ)、半枫荷(BFH)、重楼(CL)、地胆草(DDC)、老鹳草(LGC)
8	血小板脱颗粒	牡丹皮(MDP)
9	中性粒细胞脱颗粒	金钱草(JQC)
10	中性粒细胞迁移	葶苈子、天南星(TNX)、白附子、雷丸、铁海棠(THT)、杜鹃花(DJH)
11	中性粒细胞趋化	山苍子(SCZ)
12	体液免疫反应	落新妇(LXF)、眼镜蛇(YJS)

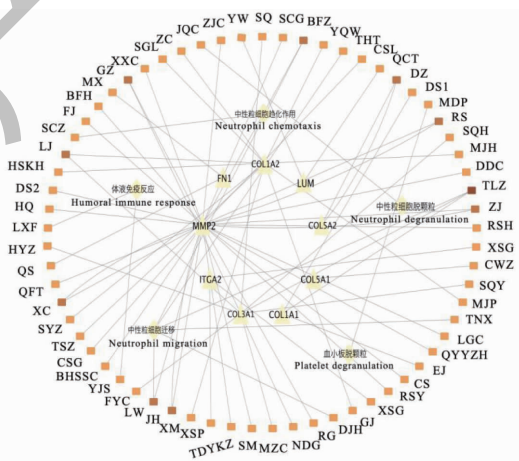


图 13 靶向关键基因和免疫相关通路的中药预测

Fig. 13 Traditional Chinese medicines predicted by key genes and immune-related pathways

注:图 13 中黄色菱形、三角形、圆形节点分别表示免疫相关生物学过程、核心基因、预测中药;颜色越深代表关联性越强;Note: The yellow prism, triangle and circle nodes in Figure 13 indicate immune-related biological processes, core genes, and predicted herbal medicines, respectively; the darker the color represents the stronger the association.

第一个分子事件,随后发生迁移向肿瘤组织趋化。已经明确的是 PDAC 癌细胞可以将多形核中性粒细胞募集到肿瘤附近,但大多无法产生抗肿瘤反应,通常高丰度的中性粒细胞数量会促进 PDAC 的进展,与预后不良有关^[12];最近体外实验表明,胰腺癌细胞诱导中性粒细胞胞外陷阱形成,从而促进 PDAC 肝脏微转移的发生^[13];同时高度纤维化导致的局部缺氧变化决定了免疫环境,活性氧的持续释放导致局部缺氧,从而增强中性粒细胞浸润,因此,中性粒细胞在胰腺癌微环境中至关重要^[14]。并且,本次研究结果提示差异基因直接参与了 T 细胞的分化和体液免疫的调节。

为深入探索免疫浸润在 PDAC 发病中的作用,本研究利用 CIBERSORT 反卷积法对总体肿瘤样本进行分析,与正常胰腺组织相比,肿瘤组织中 M2 巨噬细胞、静息记忆 CD4⁺ T 细胞显著增高,而 CD8⁺ T 细胞显著下降,在配对样本中观察到了同样趋势。M2 巨噬细胞产生促进肿瘤进展的抗炎信号,经确认是胰腺癌预后不良的标志之一。2013 年,一项通过 IHC 观察 PDAC 患者免疫细胞浸润程度的研究表明,较高水平的肿瘤浸润性巨噬细胞 M2、Tregs 与 CD4⁺ T 与较短的生存期显著相关^[15]。在 PDAC 小鼠模型中已经证明肿瘤相关巨噬细胞通过释放细胞因子、蛋白酶和生长因子介导免疫抑制和血管生成并促进肿瘤进展^[16],并且,抑制 CCR2 已被证明可通过阻断单核细胞募集到肿瘤微环境中来提高化疗效果、抑制转移、增强放疗效果并增加 T 细胞免疫浸润^[17,18]。因此,巨噬细胞极可能成为人类 PDAC 新治疗策略的潜在目标。既往认为由成纤维细胞和促纤维母细胞组成的 PDAC 免疫抑制微环境会限制 T 细胞浸润,但最近的研究揭示了 T 细胞的特定空间分布,正如相关性热图显示胰腺癌组织中静息的记忆 CD4⁺ T 细胞与 CD8⁺ T 细胞之间存在显著负相关($r = -0.64$),这已被证明是预后不佳的标志之一,尤其是 PDAC,CD8⁺ T 细胞在肿瘤组织中的浸润与肿瘤细胞紧密接近和患者存活率紧密相关^[19]。最近有学者强调在长期幸存者中建立成功的免疫更需要高丰度的肿瘤内 CD8⁺ T 细胞,了解 CD8⁺ T 细胞的驱动因素以及 CD8⁺ T 细胞的浸润机制,对于进一步开发 PDAC 治疗方案至关重要^[14]。目前,PDAC 免疫浸润细胞之间的关联尚缺乏大规模的验证,本预测具有一定参考意义。

PDAC 在中医属于“脾积”“癥瘕”“积聚”“痞

气”“伏梁”等范畴。病例系列文献研究和 Meta 分析结果提示联合中医药治疗 PDAC 能够有效降低患者死亡率,改善远期预后^[20]。最近基础研究揭示中草药治疗 PDAC 的机制多通过改善肿瘤微环境而间接改善医疗结局^[21],故探索肿瘤免疫微环境对寻找有效中药十分重要。目前,PDAC 中医病机多认为是“本虚标实”,以湿热蕴毒为著,而本研究预测中药的功效多属于清热类(黄芩、山慈姑、牡丹皮、紫草等),其次为补益药(人参、杜仲、仙茅、龟甲、阿胶等),符合中医病机。从病位而言,对比中医古籍中关于解剖位置和生理功能的描述,多数学者支持将胰归属于五脏中的脾,但本次研究显示绝大多数有效预测中药归属肝经,其次是肺、肾经,提示我们或许从肝论治湿热,结合扶助脾虚能够进一步提高治疗有效率,经检索发现该理论已有散在经验^[22]和综述报道^[23],值得深入探讨形成系统认识。此外,本研究利用反向预测的方法获得了数味中药,在关联度较高的中药队列中,研究发现人参皂苷能够通过下调 MMP2 等表达从而减少血管生成,降低肿瘤细胞营养供给^[24];姜黄素通过 Wnt/ β -Catenin 信号通路活性抑制 PDAC 干细胞的自我更新^[25],并可改善 PDAC 皮下移植瘤模型组织的局部微循环,增加肿瘤微环境中的供血供氧,抑制肿瘤细胞和间质细胞的低氧应激反应^[26];以上文献支持了本研究的部分预测结果,但有关中药治疗 PDAC 相关免疫机制的研究开展仍十分不足。

本研究在筛选基因芯片时考虑到免疫机制分析的个体差异,严谨筛选了采用配对样本分析的 PDAC 实验数据,同时考虑到本研究本质上是对既往单个 GSE 数据的二次挖掘,采用了不同水平来验证核心差异基因的表达,降低了风险。但是本研究仍存在以下不足:(1)由于样本量过少导致数据分析具有一定偏倚,后期纳入更多符合要求的数据集来进行分析;(2)CIBERSORT 反卷积算法分析是基于有限的遗传数据,这些数据可能会偏离细胞异型相互作用、疾病的诱发因素以及疾病表型的可塑性,临床和基础试验可以更加全面、客观地反映个体免疫情况。总之,本研究首次利用生物信息技术结合 CIBERSORT 反卷积算法探索了 PDAC 的免疫浸润机制,并预测潜在可能有效的中药,对未来该领域的研究具有一定价值。

参考文献

1 Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the

- role of lifestyle and inherited risk factors [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18:493-502.
- 2 Shen SS, Li HZ, Yu YY. Consensus opinion on early screening and surveillance for high-risk groups of pancreatic cancer in China (Nanjing, 2021) [J]. *J Clin Hepatol (临床肝胆病杂志)*, 2022, 38:1016-1022.
 - 3 Hessmann E, Buchholz SM, Demir IE, et al. Microenvironmental determinants of pancreatic cancer [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100:1707-1751.
 - 4 Schizas D, Charalampakis N, Kole C, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: a 2020 update [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 86:102016.
 - 5 Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. *Nat Methods*, 2015, 12:453-457.
 - 6 Zhou R, Yu YL, Jiao X, et al. Bioinformatics-based differential gene expression and prognostic value of CCL2-related chemokines in pancreatic cancer tissues [J]. *Chin J Pancreat (中华胰腺病杂志)*, 2022, 22:208-210.
 - 7 Tian L, Hu YM. Screening of differentially expressed genes in pancreatic cancer and their functional analysis [J]. *Shandong Med J (山东医药)*, 2021, 61:67-70.
 - 8 Lv K, Yang J, Sun J, Guan J. Identification of key candidate genes for pancreatic cancer by bioinformatics analysis [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18:451-458.
 - 9 Xiao X., Wu X. Screening of key genes in the "inflammation-cancer" transformation of pancreatic cancer and predictive analysis of intervening traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53:4795-4806.
 - 10 Qiu S, Deng L, Liao X, et al. Tumor-associated macrophages promote bladder tumor growth through PI3K/AKT signal induced by collagen [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110:2110-2118.
 - 11 Wu J, Liu J, Wei X, et al. A feature-based analysis identifies COL1A2 as a regulator in pancreatic cancer [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, 34:420-428.
 - 12 Shau ME, Levy L, Sun J, et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct NI profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5:e1232221.
 - 13 Zhang J, Xu X, Shi M, et al. CD13(hi) Neutrophil-like myeloid-derived suppressor cells exert immune suppression through arginase 1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6:e1258504.
 - 14 Huber M, Brehm CU, Gress TM, et al. The immune microenvironment in pancreatic cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21:7307.
 - 15 Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108:914-923.
 - 16 Griesmann H, Drexel C, Milosevic N, et al. Pharmacological macrophage inhibition decreases metastasis formation in a genetic model of pancreatic cancer [J]. *Gut*, 2017, 66:1278-1285.
 - 17 Liou GY, Doppler H, Necela B, et al. Mutant KRAS-induced expression of ICAM-1 in pancreatic acinar cells causes attraction of macrophages to expedite the formation of precancerous lesions [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(1):52-63.
 - 18 Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, et al. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19:3404-3415.
 - 19 Balli D, Rech AJ, Stanger BZ, et al. Immune cytolytic activity stratifies molecular subsets of human pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23:3129-3138.
 - 20 Wong W, Chen BZ, LEE AKY, et al. Chinese herbal medicine effectively prolongs the overall survival of pancreatic cancer patients: a case series [J]. *Integr Cancer Ther*, 2019, 18:1534735419828836.
 - 21 Chen L, Qu C, Chen H, et al. Chinese herbal medicine suppresses invasion-promoting capacity of cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9:e96177.
 - 22 Luo Y, Hu LJ. Two experimental cases of pancreatic cancer treated by Hu Lingjing from liver and spleen theory [J]. *Clin Res in Chin Med (中医临床研究)*, 2021, 13:71-72.
 - 23 Ruan SH, Shu P. Staging and treatment of pancreatic cancer by the method of simultaneous regulation of liver and spleen [J]. *Jiangsu Tradit Chin Med (江苏中医药)*, 2022, 54:43-46.
 - 24 Guo JQ, Lin SZ. Study on the effect of ginsenoside Rg₃ on the angiogenic mimicry of pancreatic cancer SW-1990 cells subcutaneously transplanted tumors [J]. *Zhejiang Med (浙江医学)*, 2016, 38:1322-1325.
 - 25 Ning XY, Liu QY, Chen XW, et al. Effect of curcumin on pancreatic cancer stem cell self-renewal and its Wnt/ β -Catenin signaling pathway activity [J]. *Heilongjiang Med (黑龙江医药)*, 2020, 33:738-741.
 - 26 Fang Y, Lai MG, Ge YQ, et al. Current status and outlook of drug therapy for pancreatic cancer [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2019, 44:1509-1516.