

胰腺癌“炎-癌”转化关键基因筛选及干预中药的预测分析

肖 祥, 吴宣谕*

成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072

摘要:目的 通过生物信息学技术筛选胰腺癌(pancreatic cancer)与慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)组织的差异基因, 预测能够干预胰腺癌“炎-癌”转化进程的中药及其潜在治疗靶点及机制。方法 从基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)获取 GSE151945、GSE30134 基因芯片, 应用 R 软件进行数据标准化、差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)筛选, 并进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析; 通过 STRING 数据库构建蛋白-蛋白互作网络, 应用 Cytoscape 构建蛋白互作网络图, 应用 CytoHubba 插件筛选关键基因; 使用 R 软件对关键基因进行生存分析, 筛选显著影响胰腺癌预后的基因, 通过 Kaplan-Meier 曲线进行可视化展示; 将上述基因与 Coremine Medical 数据库相互映射, 预测潜在治疗作用的中药。从 TCMSP 和 TCMID 数据库获取中药化学成分, 利用 Cytoscape 构建“中药-成分-靶点”网络图, 并使用 CytoHubba 插件筛选关键靶点。结果 共筛选出 178 个 DEGs, 其中 88 个上调基因, 90 个下调基因; DEGs 主要参与病毒生命周期、细胞外结构组织、细胞外基质组织、染色质的共价修饰等生物功能; KEGG 通路分析显示 DEGs 主要富集在人乳头瘤病毒感染、志贺菌病、亨廷顿病、癌症蛋白多糖和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路; 共得出 20 个关键基因, 生存分析提示黏附连接相关蛋白纽蛋白(vinculin, *VCL*)、核不均一性核糖核蛋白 L(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, *HNRNPL*)、小泛素样修饰物 3(small ubiquitin like modifier 3, *SUMO3*)、整合素 $\alpha 3$ (integrin subunit alpha 3, *ITGA3*)、整合素 $\beta 5$ (integrin subunit beta 5, *ITGB5*)、黏结蛋白聚糖 1(syndecan 1, *SDC1*)和神经细胞黏附分子 1(neural cell adhesion molecule 1, *NCAM1*)显著影响胰腺癌预后; 筛选得到干预胰腺癌“炎-癌”转化进程的潜在中药有夏枯草、金钱草、紫苏、生地、赤芍、菟丝子等。结论 胰腺癌“炎-癌”转化机制复杂, 中药可通过多靶点干预胰腺癌“炎-癌”转化, 该研究将为胰腺癌发生机制和治疗药物的研究提供参考方向。

关键词: 慢性胰腺炎; 胰腺癌; 生物信息学; 中药预测; 夏枯草; 金钱草; 紫苏; 生地; 赤芍; 菟丝子

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4795-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.023

Screening of key genes for “inflammation-cancer” transformation of pancreatic cancer and predictive analysis of intervening traditional Chinese medicine

XIAO Xiang, WU Xuan-yu

Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

Abstract: Objective To screen the differentially expressed genes (DEGs) between pancreatic cancer (PC) and chronic pancreatitis (CP) tissues through bioinformatics techniques, in order to predict the traditional Chinese medicine (TCM) that can interfere with the “inflammation-cancer” transformation process and their the potential therapeutic targets and mechanisms. **Methods** GSE151945 and GSE30134 gene chips were obtained from Gene Expression Omnibus (GEO), and R software was applied to normalize the data, screen DEGs, and perform gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. The protein-protein interaction network was constructed by STRING database, the protein-protein interaction network map was created by Cytoscape, and the hub genes were screened by CytoHubba plug-in. R software was used to analyze the effect of the hub gene on the survival analysis of pancreatic cancer and screen for genes that significantly affect the prognosis of pancreatic cancer, visualized by Kaplan-Meier curves. The above genes were mapped with Coremine Medical database to predict potential therapeutic TCM. The

收稿日期: 2022-02-18

基金项目: 成都中医药大学大学生科研实践创新课题(ky-2021049, ky-2022004)

作者简介: 肖 祥, 男, 本科在读, 研究方向为中医学。E-mail: xxiangtcm@163.com

*通信作者: 吴宣谕, 女, 研究方向为中医学。E-mail: w_syuanu@163.com

chemical components of the TCM were obtained from TCMS and TCMID databases. The network diagram of “TCM-component-target” was constructed by Cytoscape, and the key targets were screened by CytoHubba plug-in. **Results** A total of 178 DEGs were screened, including 88 up-regulated and 90 down-regulated genes. DEGs were mainly involved in biological functions such as virus life cycle, extracellular structure, extracellular matrix organization, and covalent modification of chromatin. KEGG pathway analysis showed that DEGs were mainly enriched in human papillomavirus infection, shigellosis, Huntington’s disease, cancer proteoglycan, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. A total of 20 hub genes were obtained, and survival analysis showed that adhesion-linkage-associated protein nucleoprotein vinculin (*VCL*), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (*HNRNPL*), small ubiquitin like modifier 3 (*SUMO3*), integrin subunit alpha 3 (*ITGA3*), integrin subunit beta 5 (*ITGB5*), syndecan 1 (*SDC1*), and neural cell adhesion molecule 1 (*NCAM1*) significantly affected the prognosis of PC. The potential TCMs that can interfere with the “inflammation-cancer” transformation process of PC include Xiakucao (*Prunellae Spica*), Jinqiancao (*Lysimachiae Herba*), Zisu (*Perilla frutescens*), Shengdi (*Rehmanniae Radix*), Chishao (*Paeoniae Radix Rubra*), Tusizi (*Cuscutae Semen*). **Conclusion** The transformation mechanism of “inflammation-cancer” of PC is complex, and TCM can interfere with the “inflammation-cancer” transformation process of PC through multiple targets. This study will provide a reference direction for the study of the pathogenesis and therapeutic agents of PC.

Key words: chronic pancreatitis; pancreatic cancer; bioinformatics; prediction of traditional Chinese medicine; *Prunellae Spica*; *Lysimachiae Herba*; *Perilla frutescens* (L.) Britt.; *Rehmanniae Radix*; *Paeoniae Radix Rubra*; *Cuscutae Semen*

胰腺癌 (pancreatic cancer) 是由于胰腺内细胞发生 DNA 的异常突变引起细胞的增殖、生长失控从而形成的肿瘤, 是恶性程度最大的肿瘤之一^[1]。据国际癌症研究机构报道, 胰腺癌的病死率位于所有恶性肿瘤的第 7 位^[2]。我国胰腺癌的发病率位于所有恶性肿瘤的第 10 位, 而其病死率位于第 6 位^[3]。胰腺癌的危险因素包括遗传、衰老、吸烟、饮酒、肥胖、饮食以及慢性胰腺炎^[4]。其中慢性胰腺炎 (chronic pancreatitis, CP) 是胰腺癌的重要危险因素之一, 这对胰腺癌的预防和早期干预提供了一定的思路, 国际胰腺癌病例与对照联盟指出预防 CP 有助于避免胰腺癌的发生^[5]。现有研究表明 CP 主要通过内源性和外源性途径引起胰腺癌的发生, 其机制可能与胰腺纤维化有关^[6-7], 其中 *LCN2*、*IGF2BP3*、*MAPRE2*、*MIF*、*SPARC* 和 *ICAM-1* 等基因的异常表达可能促进由 CP 向胰腺癌的进展^[8-13], 但其具体机制仍不清楚。因此, 深入探索胰腺癌“炎-癌”转化关键基因和重要生物途径, 对于胰腺癌的预防、早期诊断和靶向治疗具有重要意义。

随着社会对精准医学重视度的提高, 生物信息技术凭借其高通量数据处理优势而受到广泛运用^[14]。关于治疗胰腺癌新药的研究仍是当下的热点话题^[15], 具有数千年历史的中医药, 对于胰腺癌的防治具有一定优势^[16-18]。本研究基于生物信息学探索胰腺癌“炎-癌”发展过程中的关键基因, 并对其展开进一步研究, 探索其对于胰腺癌生存率的影响, 进一步预测治疗胰腺癌的潜在中药, 并构建“中

药-成分-靶点”网络图, 揭示其作用机制, 以期胰腺癌的临床诊治提供新的思路 and 方向。

1 资料和方法

1.1 数据来源

从基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库下载包含胰腺癌与 CP 患者的基因芯片 (GSE151945、GSE30134) 数据, 下载数据格式为 MINiML。其中 GSE151945 芯片包括胰腺癌组织 3 例, CP 组织 3 例, GSE30134 芯片包括胰腺癌组织 15 例, CP 组织 8 例。2 种芯片平台分别来自 GPL17077、GPL3985, 种属为 “homo sapiens”。

1.2 数据标准化处理

采用 R 3.40.2 软件 preprocessCore 软件包中的 normalize.quantiles 函数进行数据标准化处理, 将探针 ID 转换为 gene symbol, 剔除有多个基因的探针, 计算多个探针对应基因的平均值。提取 2 个数据集共有 gene symbol。不同数据集标记为不同批次, 采用 R 软件 limma 包中的 removeBatchEffect 函数去除批次效应, 针对数据预处理结果, 通过箱线图评估数据标准化情况; 通过对比批次去除前后可视化主成分分析 (principal component analysis, PCA) 图评估数据批次效应情况, 箱线图和 PCA 图分别通过 R 软件包 ggplot2 和 ggor 绘制。

1.3 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 筛选

使用 R 软件的 limma 软件包研究胰腺癌与 CP 样本之间 mRNA 的 DEGs。以 $P < 0.05$ 且

$\log_2(\text{FC}) > 1$ 或 $\log_2(\text{FC}) < -1$ 为条件筛选 DEGs。FC 为差异倍数, 代表 2 组样本间表达量的比值。其中 $\log_2(\text{FC}) > 1$ 代表基因表达上调, $\log_2(\text{FC}) < -1$ 代表基因表达下调, 表达热图通过 R 软件包 pheatmap 进行展示。

1.4 基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析

为进一步确认上述 DEGs 的潜在功能, 进行功能丰富分析。GO 是一种广泛使用的工具, 用于注释具有功能的基因, 包括分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 和细胞成分 (cell component, CC)。KEGG 可用于分析基因功能以及相关的高级基因组功能信息。使用 R 软件中的 ClusterProfiler 程序包进行 GO 及 KEGG 分析。

1.5 蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析与关键基因筛选

将上述 DEGs 导入 STRING 数据库进行 PPI 分析, 物种设置为 “homo sapiens”, 选取相互作用得分大于 0.4 的基因输入 Cytoscape 进行可视化, 用 CytoHubba 插件筛选 PPI 网络中度 (degree) 值前 20 个基因作为 CP 癌变关键基因。

1.6 关键基因的生存分析

从癌症基因组图谱 (TCGA) 数据集获得了 178 个胰腺癌的 RNA 测序数据 (第 3 级) 的原始计数和相应的临床信息, 通过 R 软件 survival 和 survminer 软件包对 20 个关键基因与胰腺癌总体生存率 (overall survival, OS) 和无病生存率 (disease free survival, DFS) 的相关性进行分析, 绘制预后显著性差异基因的 Kaplan-Meier 曲线。

1.7 潜在治疗中药的预测

参照张君等^[19]的研究, 将显著影响胰腺癌预后的基因导入 Coremine Medical 数据库映射出具有潜在干预作用的中药, 以 $P < 0.05$ 为标准筛选, 若药物数量过多, 则根据中医药理论知识和临床常用为原则进一步筛选^[20]。从 TCMSP 数据库中根据生物口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 筛选预测中药的有效成分, 提取相应成分的作用靶点, TCMSP 数据库未收录的药物成分通过 TCMID 数据库进行检索^[21-22]。运用 Uniprot 数据库对获得的有效靶点进行去重、规范化, 将处理后的数据导入 Cytoscape 中构建 “中药-成分-靶点” 网络图, 利

用 CytoHubba 插件中 degree 算法对排名前 25 的靶点进行筛选并进行可视化处理^[21]。

2 结果

2.1 芯片数据标准化和预处理结果

根据数据预处理方案, 得到处理后的数据符合预期要求, 见图 1-A; 通过对比批次去除前后可视化 PCA 图见图 1-B、C, 认为数据批次去除效应良好。

2.2 DEGs 筛选

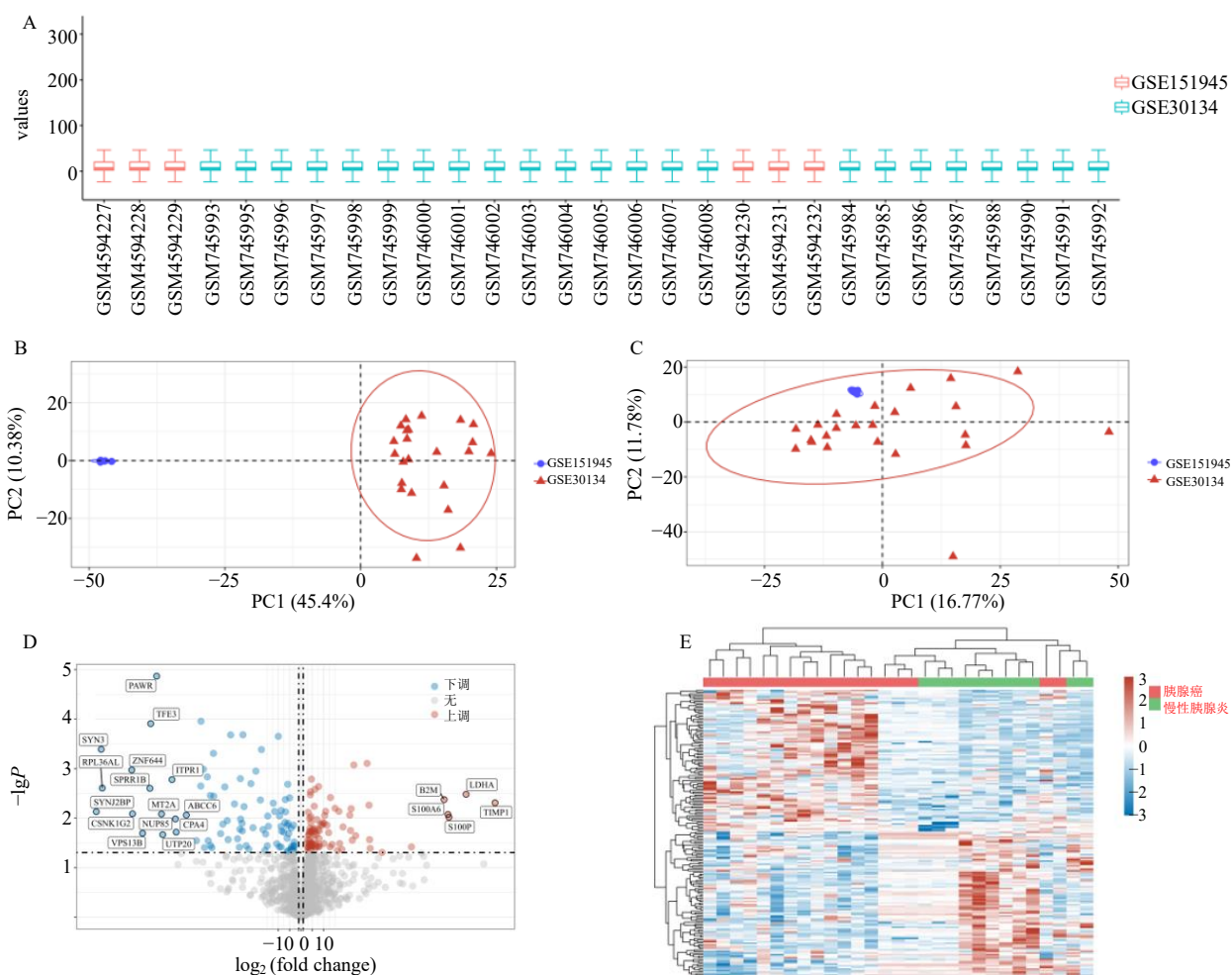
根据筛选条件, 发现胰腺癌组和 CP 组之间有 178 个 DEGs, 其中上调基因 88 个, 下调基因 90 个, DEGs 火山图见图 1-D; 下调和上调最显著的前 50 个基因表达热图见图 1-E。

2.3 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

使用 R 软件的 ClusterProfiler 程序包, 分析上述 DEGs 的 GO 功能并富集 KEGG 通路, 见图 2。GO 分析结果显示, 上调基因主要参与病毒生命周期 (viral life cycle)、细胞外结构组织 (extracellular structure organization)、细胞外基质组织 (extracellular matrix organization) 等生物功能; 下调基因主要参与组蛋白变性 (histone modification)、染色质的共价修饰 (covalent chromatin modification) 等生物功能。KEGG 通路富集分析结果显示, 上调基因主要富集在人乳头瘤病毒感染 (human papillomavirus infection)、志贺菌病 (Shigellosis)、亨廷顿病 (Huntington disease) 和癌症蛋白多糖 (proteoglycans in cancer) 通路; 下调基因主要富集在丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路。

2.4 PPI 网络分析与关键 DEGs 筛选

将上述 DEGs 导入 STRING 数据库进行 PPI 网络分析, 以 TSV 文件格式导出数据, 再导入 Cytoscape 进行 PPI 网络图的构建, 见图 3; 利用 CytoHubba 插件, 根据度值降序筛选网络图中相互作用程度较高的前 20 个基因作为关键基因, 得到胰腺癌和 CP 的关键基因分别为钙离子依赖的细胞黏附素 1 (cadherin 1, CDH1)、小泛素样修饰蛋白-E2 连接酶 I (ubiquitin conjugating enzyme E2 I, UBE2I)、信号传导转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)、黏附连接相关蛋白纽蛋白 (vinculin, VCL)、转化生长因子 B 受体 2 (transforming growth factor beta receptor 2, TGFBR2)、环磷酸腺苷应答元件结合蛋白 1 (cAMP responsive element binding protein 1, CREB1)、染色



A-数据标准化后箱线图 B-去批次前 PCA 图 C-去批次后 PCA 图 D-DEGs 火山图 E-下调和上调最显著的前 50 个基因表达热图

A-box plot of the normalized data B-PCA results before batch removal for multiple datasets C-PCA results after batch removal D-DEGs volcano plot

E-heatmap of the expression of the top 50 genes with the most significant downregulation and upregulation

图 1 数据标准化及 DEGs 筛选

Fig. 1 Standardisation of data and screening of DEGs

质域解旋酶 DNA 结合蛋白 4 (chromodomain helicase DNA binding protein 4, CHD4)、 β -2 微球蛋白 (beta-2-microglobulin, B2M)、组织抑制剂金属蛋白酶-1 (tissue inhibitor metalloproteinase-1, TIMP-1)、伴侣素包含 T 复合蛋白 1 ϵ 亚基 (chaperonin containing TCP1 subunit 5, CCT5)、RAS 癌基因家族成员 (member RAS oncogene family, RAN)、黏结蛋白聚糖 1 (syndecan 1, SDC1)、神经细胞黏附分子 1 (neural cell adhesion molecule 1, NCAM1)、苯丙氨酰-tRNA 合成酶 β (phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta, FARSB)、核不均一性核糖核蛋白 L (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, HNRNPL)、溶酶体相关膜蛋白 3 (lysosomal-associated membrane protein 3, CD63)、基质金属蛋

白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2)、小泛素样修饰物 3 (small ubiquitin like modifier 3, SUMO3)、整合素 α 3 (integrin subunit alpha 3, ITGA3)、整合素 β 5 (integrin subunit beta 5, ITGB5)。其中 *CDH1*、*UBE2I*、*STAT1*、*VCL*、*CREB1*、*CHD4*、*B2M*、*TIMP1*、*RAN*、*SDC1*、*CD63*、*SUMO3*、*ITGA3*、*ITGB5* 为上调基因；*TGFBR2*、*CCT5*、*NCAM1*、*FARSB*、*HNRNPL*、*MMP2* 为下调基因。

2.5 关键基因的生存分析

对上述关键基因与胰腺癌的 OS 和 DFS 的相关性进行分析，以下 7 个基因 (*VCL*、*HNRNPL*、*SUMO3*、*ITGA3*、*ITGB5*、*SDC1* 和 *NCAM1*) 显著影响胰腺癌预后。其中 *VCL*、*HNRNPL*、*SUMO3*、*ITGA3*、*ITGB5* 高表达为 OS 的危险因素，*NCAM1*

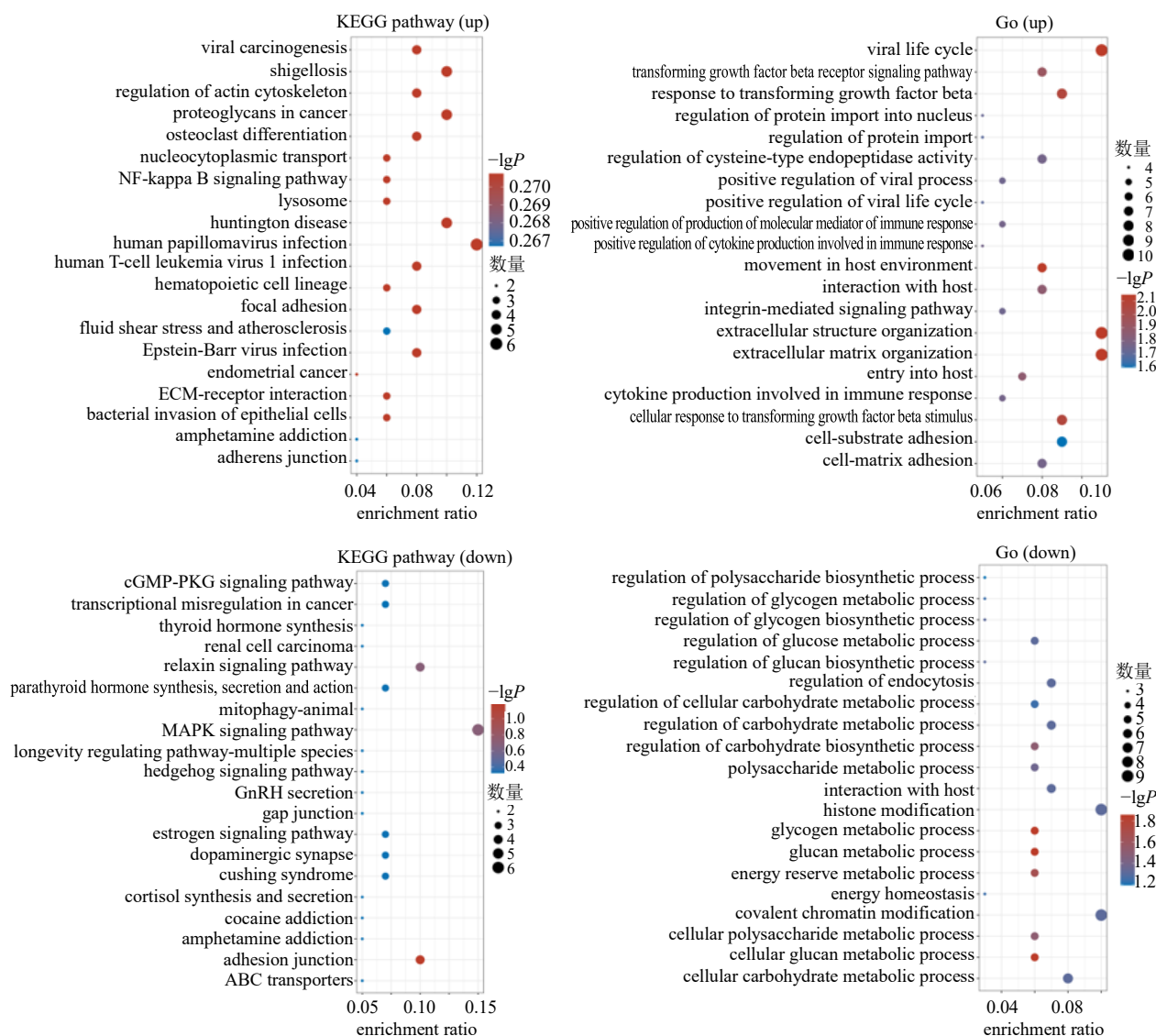


图 2 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析

Fig. 2 GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis

高表达为 OS 的保护因素；*VCL*、*SDC1*、*ITGA3*、*ITGB5* 高表达为 DFS 的危险因素。上述基因对胰腺癌患者 OS 的 Kaplan-Meier 曲线见图 4，对胰腺癌患者 DFS 的 Kaplan-Meier 曲线见图 5。

2.6 潜在治疗中药的预测

将以上 7 个基因与 Coremine Medical 数据库映射，以 $P < 0.05$ 为标准，得到潜在治疗中药，见表 1。基于中医药理论分析，夏枯草、金钱草、生地、赤芍具有清热燥湿、泻火解毒、活血消癥的功效；紫苏具有行气宽中、止呕的功效；菟丝子补益肝肾，兼走脾经，上述药物在中医临床中常用于 CP 与胰腺癌的治疗，故用于进一步分析^[23-28]。从 TCMSP 数据库中获取上述 6 味中药活性成分和作

用靶点，得到 85 种有效成分，1439 个作用靶点。在 Uniprot 数据库中对上述成分作用靶点进行基因去重、规范化，并绘制“中药-成分-靶点”网络图，见图 6。使用 CytoHubba 插件 degree 算法筛选出排列前 25 的靶点，并以不同色阶进行展示，上述 6 味中药的活性成分主要参与调控前列腺素氧化环化酶 1（prostaglandin-endoperoxide synthase 1，PTGS1）、前列腺素氧化环化酶 2（prostaglandin-endoperoxide synthase 2，PTGS2）、核受体辅激活因子 2（nuclear receptor coactivator 2，NCOA2）、孕酮受体（progesterone receptor，PGR）等基因，可能成为干预胰腺癌“炎-癌”发展过程的潜在中药，见图 7。

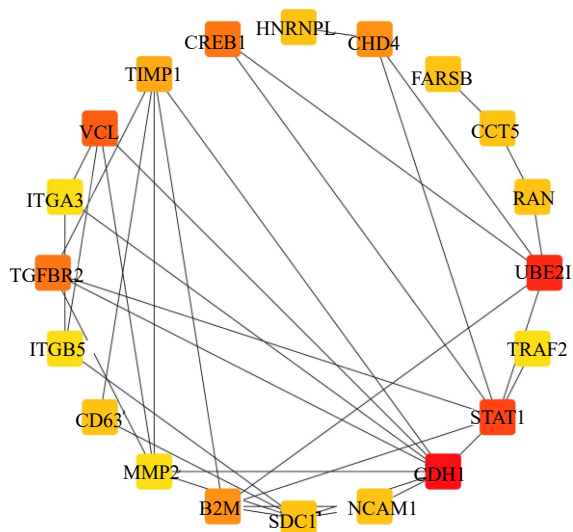


图 3 前 20 位关键基因编码蛋白 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of top 20 key genes

3 讨论

胰腺癌是恶性程度最高的肿瘤之一，是一种典型的炎症驱动型癌症，CP 是其主要危险因素之一^[29]。研究表明 CP 患者群体发生胰腺癌的概率较一般人群增加 2.3~18.5 倍，其中遗传性胰腺炎是已知的最重要的胰腺癌危险因素^[30-31]。最近在欧洲的一项队列研究中，581 名 CP 患者在 5 年随访中有 6 名确诊胰腺癌，从诊断 CP 到胰腺癌发生的平均时间为 5 年^[32]。CP 癌变具体机制尚不明了，本研究通过 GEO 数据库下载胰腺癌与 CP 患者基因芯片，通过 R 软件分析 DEGs，得到 88 个上调基因，90 个下调基因。

通过 GO 和 KEGG 富集分析对 DEGs 进行功能注释，分析其生物学过程，GO 富集分析显示，上调基因主要涉及病毒生命周期、细胞外结构组织、细

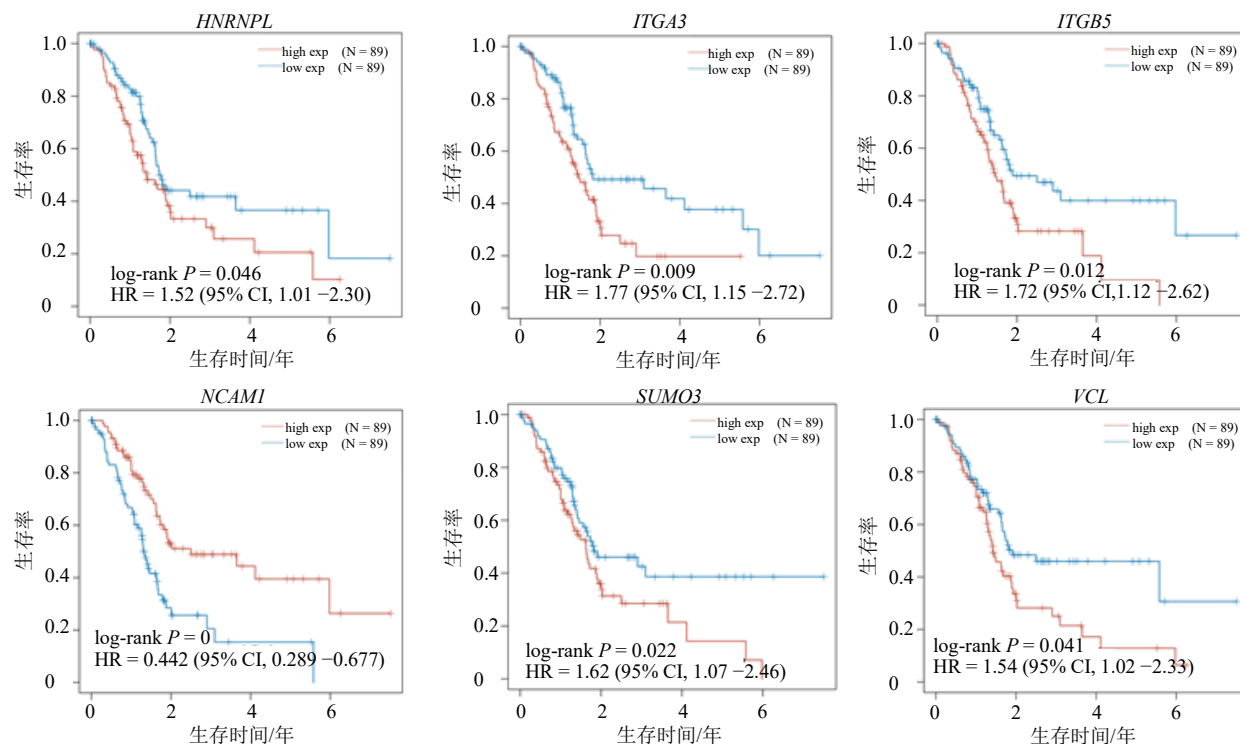


图 4 关键基因对胰腺癌 OS 的影响

Fig. 4 Effects of critical genes on OS of pancreatic cancer

胞外基质组织。溶瘤腺病毒被认为是胰腺癌治疗的理想疗法之一，其具有特异性感染并裂解肿瘤细胞的作用，具有靶向性好，不良反应少等优点^[33]，慢病毒载体在胰腺癌的抗肿瘤研究中广为运用^[34]。目前也有研究提出胰腺癌的发生可能与乙型肝炎病毒 (hepatitis B, HBV) 感染相关^[35]，且 HBV 感染者患胰腺癌的可能性增加 24%^[36]，可能机制为 HBV-X

蛋白在胰腺组织内表达并通过磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路促进胰腺癌的增殖与转移^[37]。因此，上调基因可能通过调节病毒感染介导的通路促进肿瘤的发生、增殖与转移。下调基因主要参与组蛋白变性、染色质的共价修饰。组蛋白赖氨酸甲基转移酶 2D (lysine methyltransferase

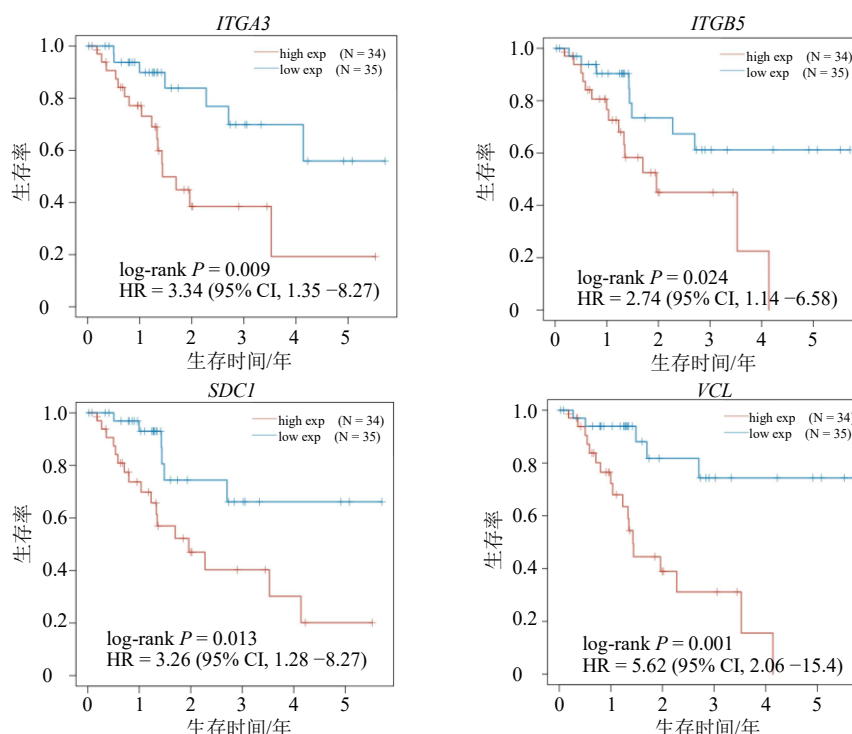


图 5 关键基因对胰腺癌 DFS 的影响

Fig. 5 Effects of critical genes on DFS of pancreatic cancer

表 1 关键基因中药预测

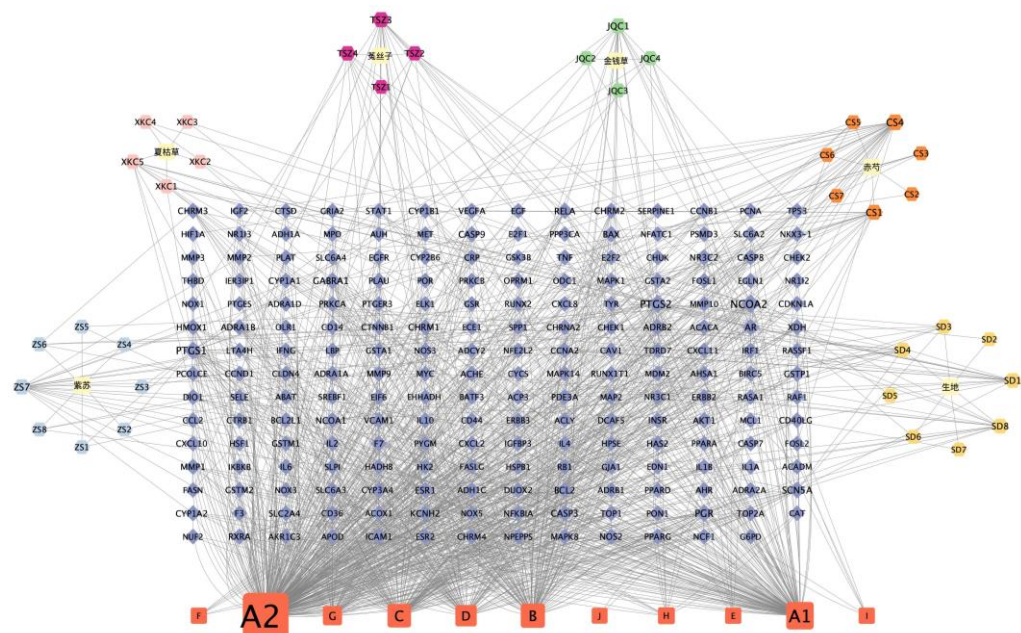
Table 1 Traditional Chinese medicines predicted by key genes

基因	中药
VCL	鼠妇虫、蒺藜
SDC1	枳椇子、蟾酥
NCAM1	沙苑子、绿丝郁金、莪术、魔芋、天麻、灵芝、菟丝子
HNRNPL	夏枯草、麝香、石榴花、石榴皮、石榴籽
SUMO3	茺菁
ITGA3	金钱草、猕猴桃根、冬菇
ITGB5	白苏子、苏头、白苏梗、生地黄、地黄、赤芍、紫苏

2D, KMT2D) 下调可促进胰腺癌细胞生长, 抑癌基因含有 WW 结构域的氧化还原酶 (WW domain containing oxidoreductase, *WWOX*) 甲基化导致其表达下调, 也是胰腺癌发生的机制之一^[38-39]。因此, 下调基因可能通过诱导组蛋白变性使 DNA 构象改变, 导致转录异常而引起胰腺癌的发生。

KEGG 通路富集分析结果显示, 上调基因主要富集在人乳头瘤病毒感染、志贺菌病, 亨廷顿病和癌症蛋白多糖通路。人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 与全球 5.5% 的癌症相关, HPV 感染后基因插入宿主细胞 DNA 为其主要机制, 据报道, PC 的发生可能与 HPV 的感染有关^[40-42]。志

贺菌是一种革兰阴性菌, 感染后易引起人体出现腹泻、发烧、胃部痉挛等症状^[43], 据 Khodavirdipour 等^[44]报道, Flexneri 志贺菌在胰腺癌中具有潜在的抗细胞增殖作用, 其可能机制为上调 Bcl-2-相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 及下调 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 表达。研究表明, 人亨廷顿相互作用蛋白可选择性表达于人胰岛中, 对胰岛分泌功能起着一定的调节作用^[45-47]。蛋白多糖 (proteoglycans, PGs) 是一种含有长而不分硫支共价结合重复二糖长链的糖蛋白, 在细胞中和细胞外基质中含量丰富, 并在发育和病理生理学中发挥多种作用^[48]。PGs 与肿瘤发生过程相关, 主要影响肿瘤细胞增殖、黏附、迁移和侵袭能力, 同时对肿瘤血管生成具有促进或抑制作用^[49]。研究表明, 在胰腺癌的发生中, 硫酸软骨素蛋白多糖 4 (chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4) 和磷脂酰肌醇蛋白多糖-1 (glypican-1, GPC-1) 起着重要作用^[50-52]。差异下调基因主要富集在 MAPK 信号通路, 该通路是真核生物信号传递网络中的重要途径之一, 在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用^[53]。鼠类肉瘤病毒癌基因 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS) 突变激活 MAPK 通路, 是胰



六边形-各中药独有成分 正方形-2 种及以上中药的共同成分 菱形-靶点, 图 7 同

hexagon-unique ingredients of each TCM square-common component of two or more TCMs diamond-target, same as fig. 7

图 6 “中药-成分-靶点”网络图

Fig. 6 Network diagram of “TCM-component-target”

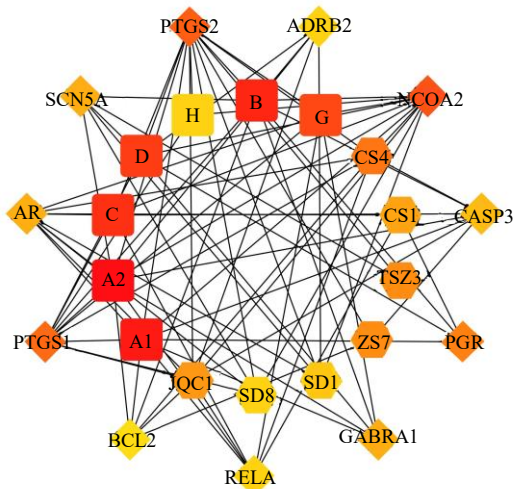


图 7 预测中药干预胰腺癌“炎-癌”进展的关键靶点

Fig. 7 Critical targets of predicted TCM in intervene of “inflammation to cancer” progress

腺癌起始和进展的关键遗传驱动因素^[54-55], 通路上的鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 (V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, RAF)、丝裂原活化的蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase, MEK)、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino terminal kinase, JNK) 等信号的激活对

于胰腺癌的发生具有促进作用^[56-58]。

为了进一步研究 DEGs 与胰腺癌之间的关系, 通过 PPI 分析筛选出 20 个关键基因, 对上述关键基因与胰腺癌的 OS 和 DFS 的相关性进行分析, 结果发现 *VCL*、*HNRNPL*、*SUMO3*、*ITGA3*、*ITGB5* 高表达为 OS 的危险因素, *NCAM1* 高表达为 OS 的保护因素; *VCL*、*SDC1*、*ITGA3*、*ITGB5* 高表达为 DFS 的危险因素, 这与其他研究结果基本一致, 互相印证, 从侧面体现了本研究具有较高的可信度^[59-64]。其中 *NCAM1* 可能是胰腺癌的保护因素, 但有待进一步验证, 可以确定的是, *NCAM1* 是一种神经细胞黏附分子, 在细胞黏附和发育过程中具有调节作用。近期的一项研究表明成釉细胞瘤组织中高表达的 *NCAM1* 可抑制细胞迁移, 从而起到抗成釉细胞瘤作用^[65]。 *VCL* 的过度表达通过抑制长链非编码 RNA1060 (long intergenic non-protein coding RNA 1060, Linc01060) 的表达来促进胰腺癌细胞的增殖和侵袭, 同时可通过上调 ERK 的表达来加速胰腺癌细胞增殖^[66]。 *HNRNPL* 表达上调可促进上皮间充质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 过程, 从而提高胰腺癌细胞迁移率^[67]。 *SUMO* 信号通路与原癌基因 *MYC* 相连接, 可以导致低分化程度胰腺癌的发生, 但其具体机制仍不明确^[68]。 *ITGA3*

和 *ITGB5* 是细胞表面基质受体,与细胞外基质一同介导致癌信号传导,其表达增高可促进胰腺癌细胞的迁移和侵袭能力^[69-70]。*SDCI* 的高表达可上调成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 的表达,从而促进胰腺癌细胞的侵袭和转移^[71]。众多基因显著影响胰腺癌的预后,进一步说明胰腺癌的致病分子具有复杂性和多样性,未来的研究任重而道远。

中医药作为我国的传统医学,经历了数千年的实践检验,对于胰腺癌的治疗具有一定的特色。鉴于此,将上述显著影响胰腺癌预后的基因输入 Coremine Medical 数据库,按照临床常用原则筛选出夏枯草、金钱草、赤芍、生地、紫苏、菟丝子 6 味中药。为了进一步探索这 6 味中药治疗胰腺癌的机制,进行了网络药理学分析,结果发现这些中药主要通过调控 *PTGS1*、*PTGS2*、*NCOA2*、*PGR* 等基因发挥作用。胰腺癌的发生与中焦脾胃关系密切,其证候特征是本虚标实,本虚为脏腑元气虚弱,以脾虚为主;标实为肝郁、湿热、痰瘀^[72]。临床治疗以疏肝健脾、活血化瘀、清热燥湿为主。夏枯草、金钱草、赤芍、紫苏、生地和菟丝子均属于上述治则范畴,现代药理研究表明,这些药物的有效成分具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化的作用^[73-77]。宋玮等^[78]发现夏枯草注射液可以通过调控胰腺癌的 Bcl-2 家族基因表达,使人胰腺癌 PANC-1 细胞 Bax 表达上调和 Bcl-2 表达下调,从而促进胰腺癌细胞凋亡并抑制其增殖。Matos 等^[79]发现紫苏的有效成分紫苏醇能促进胰腺癌患者肿瘤细胞凋亡。黄巍等^[80]发现赤芍的有效成分芍药苷可通过激活 Caspase 途径抑制 Panc-1 细胞的增殖并促进其凋亡,从而达到抗胰腺癌效果。叶春林等^[77]发现菟丝子多糖能抑制 PANC-1 细胞生长,且呈浓度相关性。进一步说明了本研究的药物预测结果符合中医对胰腺癌的认识,符合临床实际,具有较高的可信度。然而其具体机制仍不明确,有待深入挖掘,而本研究通过网络药理学预测出来中药通过调节 *PTGS1*、*PTGS2*、*NCOA2*、*PGR* 等靶点从而达到防治胰腺癌的作用,不失为一个有意义的研究方向。

4 结论

本研究通过对胰腺癌及 PC 基因芯片的数据挖掘及生物信息学分析,筛选出胰腺癌“炎-癌”转化的 20 个关键基因,发现病毒生命周期、细胞外结构组织、细胞外基质组织、染色质的共价修饰、癌症

蛋白多糖和 MAPK 等生物过程和信号通路等在胰腺癌癌变中起着关键作用。夏枯草、金钱草、生地、赤芍、紫苏、菟丝子及其活性成分可能通过多靶点实现抗胰腺癌作用。为后续胰腺癌发生发展机制及其潜在治疗药物的研究提供了新的研究方向。基因芯片技术和网络药理学的出现为中医药的发展带来了新的契机,通过生物信息学技术挖掘疾病潜在靶点,通过网络药理学提取中药作用靶点,为中医药现代化发展提供了新的思路 and 方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Moore A, Donahue T. Pancreatic cancer [J]. *JAMA*, 2019, 322(14): 1426.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] 杨军, 李贺, 郑荣寿, 等. 2014 年中国胰腺癌发病与死亡分析 [J]. *中国肿瘤*, 2018, 27(6): 420-425.
- [4] 杨欢, 王晓坤, 范金虎. 中国胰腺癌流行病学、危险因素及筛查现状 [J]. *肿瘤防治研究*, 2021, 48(10): 909-915.
- [5] Duell E J, Lucenteforte E, Olson S H, et al. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: A pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4) [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(11): 2964-2970.
- [6] Huang C, Iovanna J, Santofimia-Castaño P. Targeting fibrosis: The bridge that connects pancreatitis and pancreatic cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4970.
- [7] 李春艳, 胡勇, 崔云峰. 慢性炎症与胰腺导管腺癌关系的研究进展 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2019, 25(8): 636-640.
- [8] Gumper K, Dangel A W, Pita-Grisanti V, et al. Lipocalin-2 expression and function in pancreatic diseases [J]. *Pancreatology*, 2020, 20(3): 419-424.
- [9] Schaeffer D F, Owen D R, Lim H J, et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma correlates with poor survival [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 59.
- [10] Abiatari I, Gillen S, DeOliveira T, et al. The microtubule-associated protein MAPRE2 is involved in perineural invasion of pancreatic cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(5): 1111-1116.
- [11] Tan L P, Ye X, Zhou Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor is overexpressed in pancreatic cancer

- tissues and impairs insulin secretion function of β -cell [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 92.
- [12] Gao J, Song J, Huang H J, *et al.* Methylation of the *SPARC* gene promoter and its clinical implication in pancreatic cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 28.
- [13] Mohamed A, Saad Y, Saleh D, *et al.* Can Serum ICAM 1 distinguish pancreatic cancer from chronic pancreatitis? [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(10): 4671-4675.
- [14] 吴小倩, 黄伟芳, 孔德松, 等. 基于生物信息学探讨丹参酮 II_A 治疗溃疡性结肠炎及其机制 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(12): 1750-1756.
- [15] 李勇. 胰腺癌新药再次败北 后来者越挫越勇 [N]. 医药经济报, 2021-11-22(F03).
- [16] 徐晓青, 余亚萍, 王炳淑, 等. 基于网络药理学的党参抗胰腺癌机制研究 [J]. 海南医学院学报, 2022, 28(12): 939-948.
- [17] 卢丹, 彭小兰, 熊珊, 等. 高良姜素促进胰腺癌 PCNA-1 细胞凋亡和自噬并抑制移植瘤生长 [J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(9): 1963-1971.
- [18] 刘福栋, 庞博, 花宝金. 基于中医经典与人用经验构建胰腺癌防治方药发掘体系思路探析 [J]. 北京中医药, 2021, 40(9): 929-933.
- [19] 贡张君, 王慧静, 俞仪萱, 等. 基于生物信息学技术筛选结直肠癌的差异基因和中药预测研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1666-1676.
- [20] 周宙, 王震, 刘杨, 等. 心肌纤维化关键基因与通路的研究及有效中药预测 [J]. 海南医学院学报, doi: 10.13210/j.cnki.jhmu.20210516.001.
- [21] 张道平, 刘起立, 姚鲲鹏, 等. 基于生物信息学分析肝癌差异基因及潜在的中药干预 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 788-798.
- [22] 王伟, 郭媛媛, 连雅君, 等. 基于网络药理学探讨枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的作用机制 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(3): 262-268.
- [23] 许欣欣. 消化道恶性肿瘤的用药规律研究及典型案例介绍 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- [24] 张燕娜, 左明焕, 王子卿, 等. 基于数据挖掘探讨王沛治疗胰腺癌的用药规律 [J]. 世界中医药, 2021, 16(06): 924-928.
- [25] 纪晓丹. 蒋健教授基于“治未病”理念对“胰腺炎、胆囊炎胆石症、尿路感染以及复发性口腔溃疡”防治策略探讨 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [26] 丁锐. 基于数据挖掘技术探讨胰腺癌临床用药规律的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [27] 黄蓉, 张培彤, 李凤杰. 基于数据挖掘的中药汤剂联合化疗治疗胰腺癌的用药规律分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(10): 3719-3726.
- [28] 刘二委, 郑功泽, 丁世芹. 益气活血解毒方联合 GEMOX 方案治疗晚期胰腺癌 46 例 [J]. 中医研究, 2021, 34(4): 32-37.
- [29] Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development [J]. *Front Immunol*, 2011, 2: 98.
- [30] Kong X Y, Sun T, Kong F Y, *et al.* Chronic pancreatitis and pancreatic cancer [J]. *Gastrointest Tumors*, 2014, 1(3): 123-134.
- [31] Schneider A, Whitcomb D C. Hereditary pancreatitis: A model for inflammatory diseases of the pancreas [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002, 16(3): 347-363.
- [32] Vujasinovic M, Dugic A, Maisonneuve P, *et al.* Risk of developing pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(11): E3720.
- [33] 邹秀文, 沈艺南, 郭成祥, 等. 溶瘤病毒治疗胰腺癌新进展 [J]. 中华消化外科杂志, 2020, 19(8): 892-896.
- [34] 卫海燕, 郑新宇, 王国洲, 等. 维甲酸诱导 2 基因表达上调抑制胰腺癌 SW1990 细胞裸鼠皮下移植瘤的生长 [J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(8): 1527-1529.
- [35] Liu T, Song C H, Zhang Y C, *et al.* Hepatitis B virus infection and the risk of gastrointestinal cancers among Chinese population: A prospective cohort study [J]. *Int J Cancer*, 2022, 150(6): 1018-1028.
- [36] Desai R, Patel U, Sharma S, *et al.* Association between hepatitis B infection and pancreatic cancer: A population-based analysis in the United States [J]. *Pancreas*, 2018, 47(7): 849-855.
- [37] Chen Y W, Bai X L, Zhang Q, *et al.* The hepatitis B virus X protein promotes pancreatic cancer through modulation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2016, 380(1): 98-105.
- [38] 赵玉, 潘新宇, 于建渤. 赖氨酸甲基转移酶 2D 与人类肿瘤的关系 [J]. 诊断病理学杂志, 2020, 27(3): 209-211.
- [39] 陈广, 魏东, 王滔, 等. 抑癌基因 WWOX 甲基化与肿瘤的研究进展 [J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(1): 5-9.
- [40] Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J L. Advances in cancer epidemiology: Understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions [J]. *Annu Rev Public Health*, 2005, 26: 37-60.
- [41] Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3878-3884.
- [42] Sohrabi E, Rezaie E, Heiat M, *et al.* An integrated data analysis of mRNA, miRNA and signaling pathways in pancreatic cancer [J]. *Biochem Genet*, 2021, 59(5): 1326-

- 1358.
- [43] Kotloff K L, Riddle M S, Platts-Mills J A, *et al.* Shigellosis [J]. *Lancet*, 2018, 391(10122): 801-812.
- [44] Khodavirdipour A, Jamshidi F, Nejad H R, *et al.* To study the anti-cancer effects of *Shigella flexneri* in AspC-1 pancreatic cancer cell line in approach to bax and bcl-2 genes [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2021, 52(2): 593-599.
- [45] 胡志为, 黄婷, 刘艳霞, 等. 人亨廷顿相互作用蛋白 14 在 1 型糖尿病发病中的作用 [J]. 河南医学研究, 2014, 23(4): 6-8.
- [46] 刘晶晶, 陈樱花, 陈小伟, 等. 链脉佐菌素敏感的胰岛细胞表达亨廷顿蛋白相关蛋白 1 [J]. 解剖学报, 2006, 37(3): 299-302.
- [47] Liao M, Chen X X, Han J H, *et al.* Selective expression of Huntingtin-associated protein 1 in β -cells of the rat pancreatic islets [J]. *J Histochem Cytochem*, 2010, 58(3): 255-263.
- [48] 曹峻岭. 蛋白聚糖与软骨结构、功能及骨关节病的关系 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2012, 33(2): 131-136.
- [49] 樊江浩, 刘揆亮, 吴静. 蛋白多糖在肿瘤血管生成中的作用 [J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(4): 515-519.
- [50] 孙靖, 卢乐乐, 赖洁娟, 等. 胰腺癌组织中硫酸软骨素蛋白多糖 4 的表达及其临床意义 [J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(8): 787-791.
- [51] 张泉东, 金政锡, 郝迪斯. 磷脂酰肌醇蛋白多糖-1 与趋化因子受体 CXCR7 在胰腺癌中的表达及临床意义 [J]. 国际免疫学杂志, 2014, 37(2): 157-160.
- [52] Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177-182.
- [53] Qi M, Elion E A. MAP kinase pathways [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(16): 3569-3572.
- [54] Hingorani S R, Petricoin E F, Maitra A, *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(6): 437-450.
- [55] Luchini C, Paolino G, Mattiolo P, *et al.* KRAS wild-type pancreatic ductal adenocarcinoma: Molecular pathology and therapeutic opportunities [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 227.
- [56] Hanrahan A J, Solit D B. RAF/MEK dependence of KRAS-mutant pancreatic ductal adenocarcinomas [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(8): 666-669.
- [57] Liu Y, Li F, Gao F, *et al.* Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40148-40159.
- [58] Liu L, Aleksandrowicz E, Schönsiegel F, *et al.* Dexamethasone mediates pancreatic cancer progression by glucocorticoid receptor, TGF β and JNK/AP-1 [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3064.
- [59] Islam S, Kitagawa T, Azuma T, *et al.* The expression levels of vinculin in pancreatic cancer tissues significantly correlates with patient survival [J]. *Anticancer Res*, 2021, 41(10): 4979-4984.
- [60] Pan L, Huang X D, Liu Z X, *et al.* Inflammatory cytokine-regulated tRNA-derived fragment tRF-21 suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma progression [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(22): e148130.
- [61] Biederstädt A, Hassan Z, Schneeweis C, *et al.* SUMO pathway inhibition targets an aggressive pancreatic cancer subtype [J]. *Gut*, 2020, 69(8): 1472-1482.
- [62] Liu M Y, Zhang Y Q, Yang J X, *et al.* ZIP4 increases expression of transcription factor ZEB1 to promote integrin $\alpha 3 \beta 1$ signaling and inhibit expression of the gemcitabine transporter ENT1 in pancreatic cancer cells [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(3): 679-692.
- [63] Zhuang H K, Zhou Z X, Ma Z Y, *et al.* Characterization of the prognostic and oncologic values of ITGB superfamily members in pancreatic cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(22): 13481-13493.
- [64] Yao W T, Rose J L, Wang W, *et al.* Syndecan 1 is a critical mediator of macropinocytosis in pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2019, 568(7752): 410-414.
- [65] Guan G Y, Niu X, Qiao X, *et al.* Upregulation of neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1) by hsa-miR-141-3p suppresses ameloblastoma cell migration [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e923491.
- [66] Shi X H, Guo X J, Li X, *et al.* Loss of Linc01060 induces pancreatic cancer progression through vinculin-mediated focal adhesion turnover [J]. *Cancer Lett*, 2018, 433: 76-85.
- [67] Qiao L, Xie N, Bai Y R, *et al.* Identification of upregulated HNRNPs associated with poor prognosis in pancreatic cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5134050.
- [68] Biederstädt A, Hassan Z, Schneeweis C, *et al.* SUMO pathway inhibition targets an aggressive pancreatic cancer subtype [J]. *Gut*, 2020, 69(8): 1472-1482.
- [69] Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, *et al.* Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(1): 84-94.
- [70] Idichi T, Seki N, Kurahara H, *et al.* Involvement of anti-tumor miR-124-3p and its targets in the pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: Direct regulation of ITGA3 and ITGB1 by miR-124-3p [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(48): 28849-28865.
- [71] Chen X D, Zhao H C, Chen C Z, *et al.* The HPA/SDC1 axis

- promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells by activating EMT via FGF2 upregulation [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 211-220.
- [72] 关紫, 黄学武, 颜培宇. 中医药治疗胰腺癌研究进展 [J]. 四川中医, 2020, 38(4): 217-221.
- [73] 王君明, 代永霞, 陈玉龙, 等. 雷公藤与金钱草配伍抗食管癌作用的组成配比及其剂量效应关系研究 [J]. 中国全科医学, 2015, 18(36): 4496-4500.
- [74] 张金华, 邱俊娜, 王路, 等. 夏枯草化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3432-3440.
- [75] 唐瑰琦, 严东, 夏伯侯, 等. 夏枯草不同药用部位抗炎活性的比较及其有效部位的筛选 [J]. 中药与临床, 2021, 12(1): 19-21.
- [76] 陆小华, 马骁, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.
- [77] 叶春林, KHUDOYBERDIEV Ilkhonjon, 陈颖, 等. 菟丝子多糖的抗氧化活性和抑制肿瘤细胞增殖的研究 [J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2020, 41(5): 73-78.
- [78] 宋玮, 张炳太, 万云杰, 等. 夏枯草注射液对胰腺癌细胞 PANC-1 凋亡的影响及机制研究 [J]. 中外医疗, 2012, 31(24): 26.
- [79] Matos J M, Schmidt C M, Thomas H J, *et al.* A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer [J]. *J Surg Res*, 2008, 147(2): 194-199.
- [80] 黄巍, 孙诚谊, 喻超, 等. 芍药苷对人胰腺癌 Panc-1 细胞系增殖和凋亡的影响 [J]. 贵州医科大学学报, 2018, 43(8): 874-878.

[责任编辑 潘明佳]