

皮肤黑色素瘤差异表达基因的生物信息学分析及调控中药预测

王梓霞¹, 黄羽欣², 谢锦楠², 王沐瑶¹, 王文辉^{3*}

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510499

3. 广州中医药大学东莞医院, 广东 东莞 523000

摘要: **目的** 通过生物信息学技术分析皮肤黑色素瘤患者皮肤组织与非癌皮肤组织的基因表达微阵列数据, 筛选出皮肤黑色素瘤的差异表达基因, 预测可用于诊断和治疗皮肤黑色素瘤的生物标志物及潜在中药。**方法** 从基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 提取 GSE3189、GSE114445、GSE46517 基因芯片, 使用 GEO2R 工具筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。利用 DAVID 数据库对 DEGs 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) 分析; 使用 String 数据库构蛋白-蛋白互作网络, 应用 Cytoscape 软件及其插件筛选 PPI 网络中关键基因, 应用 GSCA 数据库进行关键基因的突变分析。通过 Gepia 2.0 数据库结合癌症基因组图谱数据集 (Cancer Genome Atlas, TCGA) 对关键基因进行生存分析。根据度 (degree) 值和生存分析结果综合筛选出核心基因 (集), 应用 GSCA 数据库对核心基因 (集) 进行泛癌分析和免疫浸润分析, 并使用 TIMER 2.0 数据库对核心基因分别进行免疫浸润分析。使用 Coremine Medical 数据库预测作用于关键基因的潜在中药。**结果** 共筛选出 DEGs 114 个, 其中上调基因 36 个, 下调基因 78 个。上调 DEGs 主要富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用、Toll 样受体信号等通路, 下调 DEGs 主要富集在细胞黏附、细胞增殖的正调控等方面。15 个关键基因为 *EGFR*、*KPNA2*、*GATA3*、*AURKA*、*TYMS*、*PKP1*、*SPPI*、*MMP1*、*KLF4*、*EPCAM*、*KIF23*、*DTL*、*CLDN1*、*LCP2*、*FGFR2*, 其中共 3 个基因 *KPNA2*、*AURKA*、*DTL* 被视为核心基因 (集)。潜在治疗中药有丹参、人参、构皮、高良姜、甘草、蓖麻子、油桐叶等。**结论** 皮肤黑色素瘤中关键基因的突变以 *FGFR2* 的错义突变为主, 突变方式多为胞嘧啶 (C) 向胸腺嘧啶 (T) 的转换。*EGFR*、*KPNA2*、*GATA3*、*AURKA*、*PKP1*、*DTL*、*LCP2* 对皮肤黑色素瘤的生存预后存在显著影响。核心基因集在多种癌症中显著上调, 并与自然调节性 T 细胞 (natural regulatory T-cells, nTreg) 细胞、树突状细胞、单核细胞等免疫细胞的浸润有关。潜在调控中药包括补虚药、清热解毒药、拔毒生肌药、消肿拔毒药、温里药、健脾利湿药、利水渗湿药、活血化瘀药、安神药 9 类, 在相关古籍中存在对应的中医内外治经验记载, 其中药活性成分亦被证明对皮肤黑色素瘤存在一定的调控和抑制作用。

关键词: 皮肤黑色素瘤; 差异表达基因; 核心基因; 中药预测; 生物信息学; 丹参; 人参; 构皮; 高良姜; 甘草; 蓖麻子; 油桐叶

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)02-0551-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.021

Bioinformatics analysis of differentially expressed genes in cutaneous melanoma and prediction of traditional Chinese medicine regulation

WANG Zixia¹, HUANG Yuxin², XIE Jinnan², WANG Muyao¹, WANG Wenhui³

1. The Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. The First Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510499, China

3. Dongguan Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523000, China

Abstract: Objective To screen and analyze the differentially expressed genes (DEGs) between cutaneous melanoma tissues and non-tumor tissues with bioinformatics techniques and to predict biomarkers and traditional Chinese medicines (TCMs) for diagnosing and treating cutaneous melanoma. **Methods** The microarray data sets GSE3189, GSE114445 and GSE46517 were downloaded from the

收稿日期: 2023-09-20

基金项目: 王文辉东莞市名中医药专家传承工作室项目 (5000164); 东莞市何炎燊经典内科学术流派传承工作室 (5000075)

作者简介: 王梓霞 (2002—), 女, 研究方向为中医学、临床医学及循证医学。E-mail: 1712483642@qq.com

*通信作者: 王文辉, 男, 主任医师。E-mail: 1533739929@qq.com

Gene Expression Omnibus (GEO), and GEO2R was used to screen the DEGs. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis and gene ontology (GO) analysis were performed on DEGs based on the DAVID database. The protein-protein interaction network was constructed by String, Cytoscape and related plug-ins were used to screen the hub genes in the network. GSCA, Gepia 2.0 and Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets were used for mutation analysis and survival analysis of hub genes. Core genes (set) were comprehensively screened according to degree value and survival analysis results. The GSCA and TIMER 2.0 databases were used for pan-cancer and immune infiltration analyses of core genes (set). Coremine Medical was applied to predict the TCMs acting on hub genes. **Results** A total of 114 DEGs were screened out, with 36 up-regulated and 78 down-regulated. The up-regulated genes were mainly involved in cytokine-cytokine receptor interaction and toll-like receptor signaling, while down-regulation genes were mainly concentrated in cell adhesion and positive regulation of cell proliferation. The 15 hub genes were *EGFR*, *KPNA2*, *GATA3*, *AURKA*, *TYMS*, *PKP1*, *SPP1*, *MMP1*, *KLF4*, *EPCAM*, *KIF23*, *DTL*, *CLDN1*, *LCP2*, *FGFR2*, among which *KPNA2*, *AURKA* and *DTL* were regarded as core genes (set). The potentially effective TCMs against cutaneous melanoma were Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*), Renshen (*Ginseng Radix et Rhizoma*), Goupī (bark of *Broussonetia papeyriifera*), Gaoliangjiang (*Alpiniae Officinarum Rhizoma*), Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*), Bimazi (*Ricini Semen*), Youtongye (leaves of *Vernicia fordii*) and so on. **Conclusion** Mutations of hub genes in cutaneous melanoma were mainly missense mutations of *FGFR2*, which were mostly caused by cytosine (C) to thymine (T) conversion. *EGFR*, *KPNA2*, *GATA3*, *AURKA*, *PKP1*, *DTL*, and *LCP2* have significant effects on the survival prognosis of cutaneous melanoma. The core gene set was significantly up-regulated in various cancers and associated with infiltrating immune cells such as natural regulatory T-cells (nTreg), dendritic cells, and monocytes. The potential effective TCMs can be divided into nine categories, including tonic medicines, heat-clearing and toxin-removing medicines, detoxification and myogenic medicines, discutient medicines, interior-warming medicines, spleen-invigorating medicines, urination-promoting and dampness-draining medicines, blood-circulating and blood stasis-resolving medicines, mind-calming medicines. There are corresponding records of TCMs internal and external treatment experience in relevant ancient books, and the active ingredients of TCMs also prove that they have certain regulation and inhibition on cutaneous melanoma in the pharmacological mechanism.

Key words: cutaneous melanoma; differentially expressed gene; core genes; prediction of traditional Chinese medicine; bioinformatics; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Ginseng Radix et Rhizoma*; bark of *Broussonetia papeyriifera*; *Alpiniae Officinarum Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; *Ricini Semen*; leaves of *Vernicia fordii*

皮肤黑色素瘤 (cutaneous melanoma) 是一种高度恶性的皮肤肿瘤。2020 年, 全球约共有 325 000 例新增黑色素瘤病例和 57 000 例黑色素瘤死亡病例, 占新增肿瘤发病率的 1.7% 和肿瘤死亡病例的 0.7%^[1-2]。皮肤黑色素瘤的诊断通常由皮肤科医生在临床检查中发现, 辅助以皮肤镜检查, 确诊比例可达到 90%, 但仍有 10% 的皮肤黑色素瘤需要进一步分子分型确诊^[3]。皮肤黑色素瘤的临床治疗包括手术切除、放化疗、靶向治疗和免疫疗法等。然而, 这些治疗方法大多都具有不同程度的毒副作用, 加之肿瘤组织的原发、继发耐药等, 在一定程度上限制了其临床应用^[4]。因此, 探索新的皮肤黑色素瘤治疗手段, 对提高患者的生存率, 改善患者的生存质量具有重要意义^[5-6]。

在中医研究领域内, 皮肤黑色素瘤常归属于“恶疮”“黑痣”“黑疗”“失荣”等范畴, 如《外科正宗》中记载“黑子, 痣名也。此肾中浊气混滞于阳, 阳气收束, 结成黑子, 坚而不散。”长期以来, 中医药在与化疗药物的联合应用防治肿瘤中表现出较大的

临床价值, 其不良反应轻微且耐药性低^[7]。目前研究表明, 中药及其活性成分在促进黑色素瘤细胞凋亡、调控黑色素瘤细胞周期、抑制黑色素瘤的血管生成及对受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 传导通路的调节均起到积极作用^[8]。因此, 本研究拟利用生物信息学角度分析皮肤黑色素瘤的相关生物标志物, 以期为皮肤黑色素瘤的干预治疗提供潜在靶点, 并为中药治疗皮肤黑色素瘤提供相应理论依据。

1 资料与方法

1.1 皮肤黑色素瘤数据获取

从 GEO 数据库下载编号分别为 GSE3189、GSE114445、GSE46517 的 3 个基因表达微阵列数据集。GSE3189 采用美国昂飞公司人基因组 U133A Array 表达芯片 GPL96 平台, 包括 7 例正常组织, 18 例正常痣组织和 45 例恶性皮肤黑色素瘤组织样本。GSE114445 采用美国昂飞公司人基因组 U133 Plus 2.0 Array 表达芯片 GPL570 平台, 包括 5 例普通黑素细胞痣组织、7 例发育不良痣组织和 16 例原

发性皮肤黑色素瘤组织样本。GSE46517 采用美国昂飞公司人基因组 U133A Array 表达芯片 GPL96 平台, 包括 31 例原发性皮肤黑色素瘤组织、73 例转移性皮肤黑色素瘤组织、9 例正常痣组织、7 例正常皮肤组织和 1 例正常黑素细胞上皮组织样本。

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

通过 GEO2R 在线工具 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/) 分别对 3 个皮肤黑色素瘤相关的 GEO 数据集进行皮肤黑色素瘤癌症组和正常对照组分类, 下载分类数据集后删除没有相应基因符号的探针集。最后通过本地 Excel 软件, 对皮肤黑色素瘤样本和非瘤样本进行 DEGs 的筛选。DEGs 的纳入标准为 $P_{\text{adj}} < 0.01$, $|\log_2 \text{FC}| > 1$ [FC 表示差异倍数 (fold change)], 使用 Venny2.1 在线工具绘制最终纳入 DEGs 的韦恩图。

1.3 基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析

将 DEGs 导入 DAVID 数据库分别进行 KEGG 通路和 GO 功能富集分析, 其中 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

1.4 构建蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络

将 DEGs 导入 String 数据库以构建 PPI 网络, 同时分析 DEGs 对应蛋白之间的相互作用, 设置标准为 Settings > 0.7 。将蛋白互作文件导入 Cytoscape 3.9.0 软件, 进行 PPI 网络的优化。

1.5 关键基因选择与分析

通过 CytoHubba 插件筛选度 (degree) 值位于前 15 的基因为关键基因。分别通过 GSCA 数据库和基因表达谱交互分析网站 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA, Gepia 2.0), 对关键基因进行突变分析与总体生存率分析。

1.6 核心基因 (集) 的选择与分析

从关键基因在皮肤黑色素瘤相关的癌症基因组图谱数据集 (Cancer Genome Atlas, TCGA) 的生存分析结果中, 选取对皮肤黑色素瘤患者总体生存率存在显著影响的基因, 结合 GEO 数据集选取其中上调基因, 筛选出多个核心基因并构建核心基因集。使用 GSCA 数据库对核心基因集进行基因集变异分析 (GSVA 分析), 通过 GSVA 评分探究基因集在皮肤黑色素瘤中免疫浸润的特点和泛癌分析中的表达

程度。使用 TIMER 2.0 数据库分别对核心基因进行免疫浸润分析。

1.7 中药预测分析

应用 Coremine Medical 数据库, 将关键基因与具有潜在治疗作用的中药进行映射, 选取其中 $P < 0.05$ 的中药予以汇总分析。

2 结果

2.1 DEGs 的获取

从 GSE3189、GSE114445、GSE46517 芯片中分别获得 2802、521、814 个 DEGs, 3 个数据集的共同 DEGs 共 114 个, 如图 1 所示, 其中包括 36 个上调基因和 78 个下调基因。

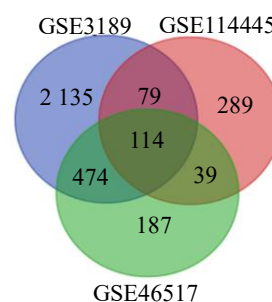


图 1 差异表达基因 Venn 图

Fig. 1 Venn map of differentially expressed genes

2.2 DEGs 的 GO 功能和 KEGG 通路分析

运用 DAVID 数据库对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 得出 28 个 GO 分析条目和 7 个 KEGG 分析条目, 如图 2。GO 功能富集分析表明, 在生物过程 (biological process, BP) 中主要富集在跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、细胞黏附、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、多细胞生物发育等方面; 在细胞组成 (cellular component, CC) 中富集在基底外侧质膜、双细胞紧密连接、细胞表面、细胞基膜、质膜、细胞外区域等部位; 在分子功能 (molecular function, MF) 中富集在整合素结合、蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性等方面。KEGG 通路富集分析显示, 上调基因主要富集在病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、细胞因子-细胞因子受体相互作用、Toll 样受体信号通路等方面, 而下调基因未显示富集途径。

2.3 PPI 网络的构建

应用 Cytoscape 3.9.0 软件对 DEGs 进行分析, 构建 PPI 网络, 其中浅绿色代表上调基因, 浅红色代表下调基因, 见图 3。

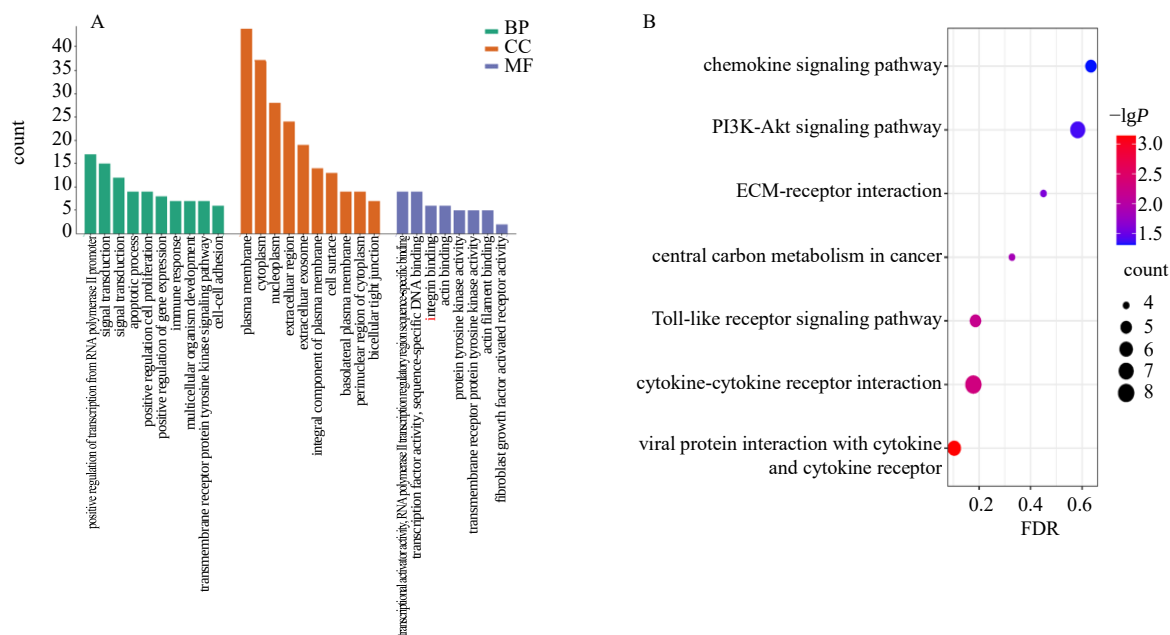


图 2 差异表达基因的 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析结果

Fig. 2 Enrichment analysis results of GO function (A) and KEGG pathway (B) of differentially expressed genes

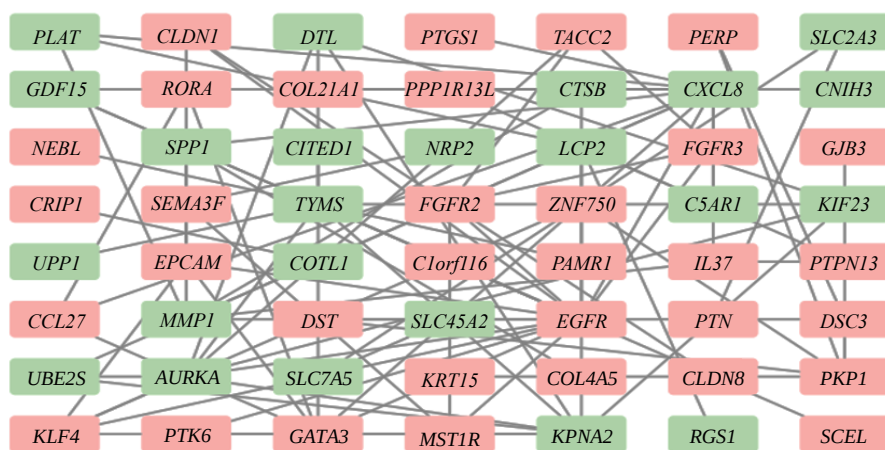


图 3 差异表达基因的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of differentially expressed genes

2.4 关键基因的筛选和突变分析

将度值位于前 15 的基因筛选为关键基因,分别为 *EGFR*、*KPNA2*、*GATA3*、*AURKA*、*TYMS*、*PKP1*、*SPP1*、*MMP1*、*KLF4*、*EPCAM*、*KIF23*、*DTL*、*CLDN1*、*LCP2*、*FGFR2*。关键基因的基因全名和功能注释见表 1。

利用 GSCA 数据库对关键基因进行突变分析,具体突变情况如图 4、5 所示。结果显示, *FGFR2*、*EGFR* 和 *MMP1* 分别为突变率最高的前 3 位基因,并均以有害突变为主,其中错义突变为主要的突变形式。此外,15 个关键基因中在皮肤黑色素瘤样

本集中,突变形式以转换 (transitions, Ti) 为主,并以胞嘧啶 (C) 转换为胸腺嘧啶 (T) 的情况最多。

2.5 皮肤黑色素瘤临床生存分析

通过 Gepia 2.0 网站,对其收录的 481 例来自 TCGA 的皮肤黑色素瘤患者数据与关键基因进行总体生存率分析,并以 Kaplan-Meier 曲线展现,如图 6 所示。结果显示,共有 4 个基因 (*KPNA2*、*GATA3*、*AURKA*、*DTL*) 的差异表达对患者的生存预后存在显著影响。其中 *KPNA2*、*AURKA*、*DTL* 为皮肤黑色素瘤的风险因子 (风险比 > 1),其高表达的皮肤黑色素瘤患者总体生存率较低; *GATA3* 为皮肤黑色素

表 1 关键基因名称和功能作用 (度值前 15)

Table 1 Names and functional roles of key genes (top 15 degrees)

基因	全称	功能	度值
<i>EGFR</i>	表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor)	调节转录因子激活基因的转录, 指导细胞迁移、黏附、增殖、分化、凋亡, 与肿瘤的形成和恶化有关	18
<i>KPN2</i>	核转运蛋白基因 2 (karyopherin alpha 2)	参与细胞分化、增殖凋亡、转录调节、免疫反应、病毒感染和细胞的恶性转化	8
<i>GATA3</i>	GATA 结合蛋白 3 (GATA binding protein 3)	是 T 细胞发育的重要调节因子, 在多种恶性肿瘤细胞的生长调节和分化起作用	8
<i>AURKA</i>	极光激酶 A (aurora kinase A)	有丝分裂丝氨酸/苏氨酸激酶, 有助于调节细胞周期进程	8
<i>TYMS</i>	胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase)	参与 DNA 复制和修复, 与肿瘤形成的病因和对化疗的反应有关	6
<i>PKP1</i>	斑菲素蛋白 1 (plakophilin 1)	参与桥粒形成过程中的分子募集和稳定	6
<i>SPP1</i>	分泌磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1)	促进细胞的黏附和迁移	6
<i>MMP1</i>	基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1)	参与细胞外基质的分解	6
<i>KLF4</i>	转录因子 KLF4 (kruppel-like factor 4)	调节细胞的增殖、分化, 并参与局部炎症反应	5
<i>EPCAM</i>	上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule)	参与调节细胞间黏附, 介导信号转导、细胞迁移、增殖和分化等	5
<i>KIF23</i>	驱动蛋白超家族 23 (kinesin family member 23)	参与细胞运动过程中骨架的改变和细胞分裂过程中纺锤体的形成	4
<i>DTL</i>	E3 泛素连接酶 (denticless homolog)	调节 DNA 复制和细胞周期过程	4
<i>CLDN1</i>	紧密连接蛋白 1 (claudin 1)	在肿瘤中异常表达, 与肿瘤发生、发展密切相关	4
<i>LCP2</i>	淋巴细胞胞浆蛋白 2 (lymphocyte cytosolic protein 2)	参与 T 细胞信号通路活化	4
<i>FGFR2</i>	成纤维细胞生长因子受体 2 (fibroblast growth factor receptor 2)	与肿瘤血管的形成、肿瘤的分期、转移、预后及化疗疗效相关	4

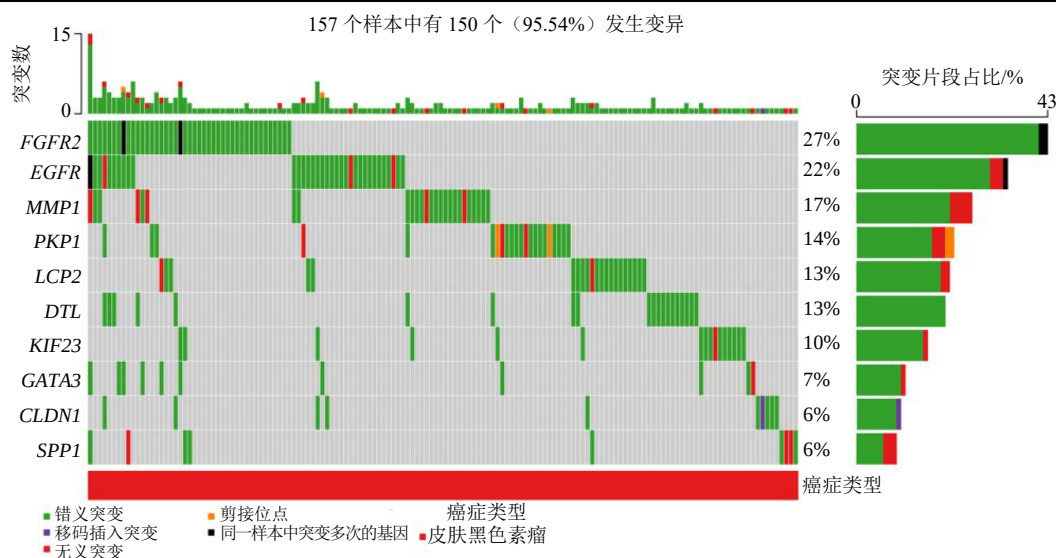


图 4 排名前 10 的突变基因瀑布图

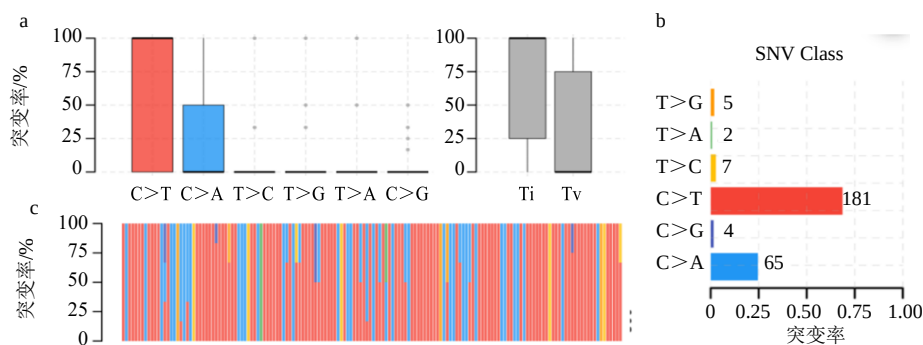
Fig. 4 Waterfall diagram of top 10 mutated genes

瘤的保护因子(风险比 <1),其低表达的皮肤黑色素瘤患者总体生存率与正常人群相比较低。以上结果均具有统计学意义($P<0.05$)。

2.6 核心基因（集）的筛选和分析

结合关键基因在皮肤黑色素瘤相关的TCGA数

据集的生存分析结果, 选取对皮肤黑色素瘤患者总体生存率存在显著影响的基因, 并结合 GEO 数据集中表达水平上调的基因, 筛选出 3 个核心基因 *KPNA2*、*AURKA*、*DTL* 并构建核心基因集。利用 GSCA 数据库和 TIMER 2.0 数据库, 进行基因集变

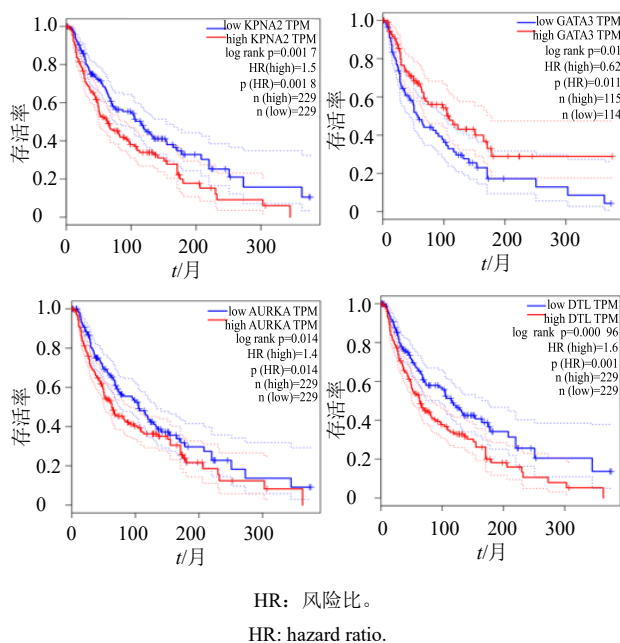


a: 表示关键基因集的碱基变异和突变方式在皮肤黑色素瘤样本集中的分布; b: 表示单核苷酸变异 (SNV) 中具体突变情况统计; c: 表示每个样本中转化率的堆叠式直方图; T: 胸腺嘧啶; C: 胞嘧啶; A: 腺嘌呤; G: 鸟嘌呤; Ti: 转换; Tv: 颠换。

a: represents the distribution of base variation and mutation modes of key gene sets in the sample set of cutaneous melanoma; b: represents the statistics of specific mutations in single nucleotide variation (SNV); c: represents a stacked histogram of conversion rates in each sample; T: thymidine; C: cytimidine; A: adenine; G: guanine; Ti: transitions; Tv: transversions.

图 5 关键基因集的突变情况分布

Fig. 5 Distribution of mutations in key gene sets



HR: 风险比。
HR: hazard ratio.

图 6 关键基因的生存分析曲线

Fig. 6 Survival analysis curve of key genes

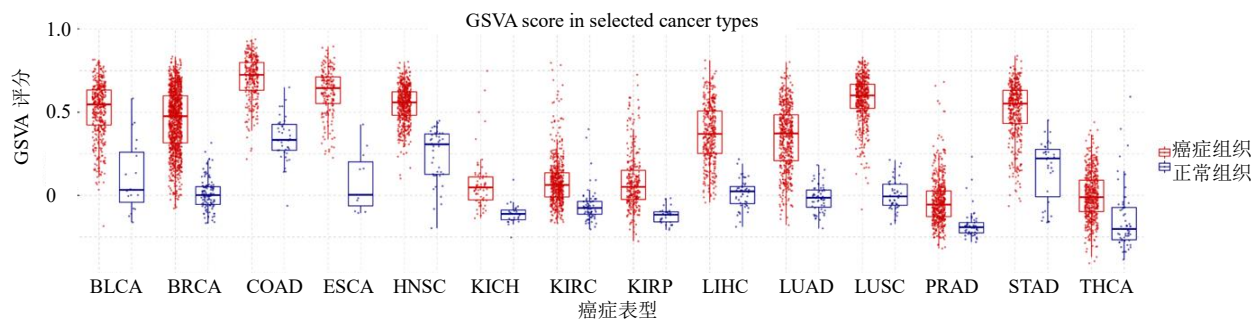
异分析 (GSVA 分析), 以探究核心基因 (集) 在皮肤黑色素瘤中免疫浸润的特点和泛癌分析中的表达程度。

2.6.1 核心基因集的泛癌分析 应用 GSCA 数据库对核心基因集进行泛癌分析, 并以 GSVA 评分代表核心基因集的表达程度。该数据库共有 14 种可供分析的癌症表型, 包括膀胱尿路上皮癌、结肠腺癌、食管癌、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、肺腺癌、胃腺癌、甲状腺癌、乳腺癌浸润癌、肾嫌色细胞癌、

肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、前列腺癌。结果显示, 与正常组织相比, 核心基因集的表达均在癌症组织显著上调 ($P < 0.01$), 如图 7 所示。表明选取的核心基因集在人体多种癌症的发生进展中, 均表现出基因的显著高表达, 或为后续从基因层面对癌症发生机制共性的探讨提供一定的借鉴意义。

2.6.2 核心基因集的免疫浸润分析 通过 GSCA 数据库以热图形式呈现皮肤黑色素瘤中免疫细胞浸润与基因集 GSVA 富集评分之间的联系, 并通过 Spearman 相关性分析计算核心基因集与免疫细胞浸润二者之间的相关性, 如图 8 所示。结果显示, 在皮肤黑色素瘤组织中, 核心基因集的表达与 $CD4^+T$ 细胞、初始 $CD4^+T$ 细胞 ($CD4$ naive)、 $CD8^+T$ 细胞、Th17 细胞、Th2 细胞、黏膜相关恒定 T 细胞 (mucosal-associated invariant T cells, MAIT)、滤泡辅助性 T 细胞 (follicular helper T cell, Tfh) 的浸润呈显著负相关, 与自然调节性 T 细胞 (natural regulatory T cells, nTreg)、中性粒细胞 (neutrophil)、树突状细胞 (dendritic cell, DC)、单核细胞 (monocyte) 呈显著正相关。

2.6.3 核心基因的免疫浸润分析 应用 TIMER 2.0 数据库, 选择免疫浸润细胞为 B 细胞、 $CD4^+T$ 细胞、 $CD8^+T$ 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞 6 种, 分别对 3 个核心基因 *KPNA2*、*AURKA*、*DTL* 进行分析, 如图 9 所示。由 P 值可知, 3 种核心基因与所选免疫细胞浸润均显著相关。Spearman 相关系数结果显示, *KPNA2*、*AURKA* 均分别与 $CD8^+T$



BLCA: 膀胱尿路上皮癌; COAD: 结肠腺癌; ESCA: 食管癌; HNSC: 头颈部鳞状细胞癌; LIHC: 肝细胞癌; LUAD: 肺腺癌; STAD: 胃腺癌; THCA: 甲状腺癌; BRCA: 乳腺癌浸润癌; KICH: 肾嫌色细胞癌; KIRC: 肾透明细胞癌; KIRP: 肾乳头状细胞癌; PRAD: 前列腺癌。
BLCA: bladder urothelial carcinoma; COAD: colon adenocarcinoma; ESCA: esophageal carcinoma; HNSC: head and neck squamous cell carcinoma; LIHC: liver hepatocellular carcinoma; LUAD: lung adenocarcinoma; STAD: stomach adenocarcinoma; THCA: thyroid carcinoma; BRCA: breast invasive carcinoma; KICH: kidney chromophobe cell carcinoma; KIRC: renal clear cell carcinoma; KIRP: renal papillary cell carcinoma; PRAD: prostate adenocarcinoma.

图 7 核心基因集的泛癌表达分析
Fig. 7 Expression analysis of core gene set in pan-cancer

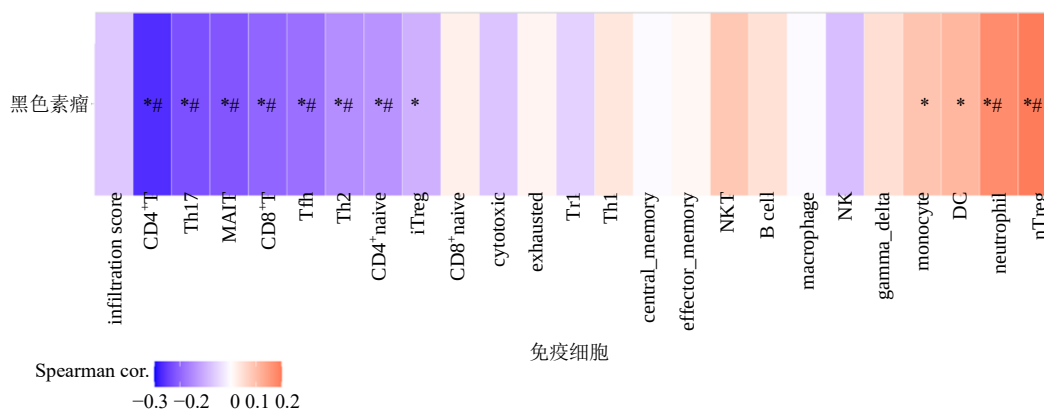


图 8 核心基因在皮肤黑色素瘤中的免疫浸润表达
Fig. 8 Immunoinvasive expression of core genes in cutaneous melanoma

细胞和树突状细胞呈正相关, *DTL* 则与 $CD4^+T$ 细胞、中性粒细胞呈正相关。

2.7 潜在调控中药预测分析

应用 Coremine Medical 数据库, 将 3 个核心基因与具有潜在治疗作用的中药进行映射, 选取其中具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的药物进行分析, 可以得到对核心基因具有潜在治疗作用的一系列中药, 如油桐叶、猪苓、云芝、构皮、高良姜、甘草、丹参、人参等, 如表 2 所示。

3 讨论

3.1 免疫相关的肿瘤微环境 (tumor micro-environment, TME) 与皮肤黑色素瘤密切相关

对于皮肤黑色素瘤免疫机制的研究涉及 TME、抗原呈递和检测、淋巴细胞和免疫细胞亚群、免疫检查点等多个方面^[9]。皮肤黑色素瘤的发生与 TME

密切相关, TME 包括肿瘤细胞、免疫细胞、血管和基质成分等, 它们的相互作用对于肿瘤的发展起着至关重要的作用^[10]。研究表明, 黑色素瘤细胞可通过分泌细胞因子和化学物质来抑制免疫细胞的功能, 从而促进免疫逃逸^[11]。此外, 免疫细胞的浸润程度和类型也会影响皮肤黑色素瘤的发生和发展。在皮肤黑色素瘤中, 肿瘤浸润淋巴细胞数量较少, 且其免疫耐受性较强, 说明 TME 抑制免疫反应的能力是导致皮肤黑色素瘤逃逸的重要因素^[12]。皮肤黑色素瘤的发生还与人类白细胞抗原系统 (human leukocyte antigen, HLA) 和肿瘤抗原有关, HLA 与 T 细胞受体结合后可引发 T 细胞免疫反应, 从而杀伤肿瘤细胞^[13]。同时, 在皮肤黑色素瘤中 T 细胞和 B 细胞都受到不同程度的影响^[14]。T 细胞在体内的主要作用是杀伤肿瘤细胞, 然而, 在皮肤黑色素瘤

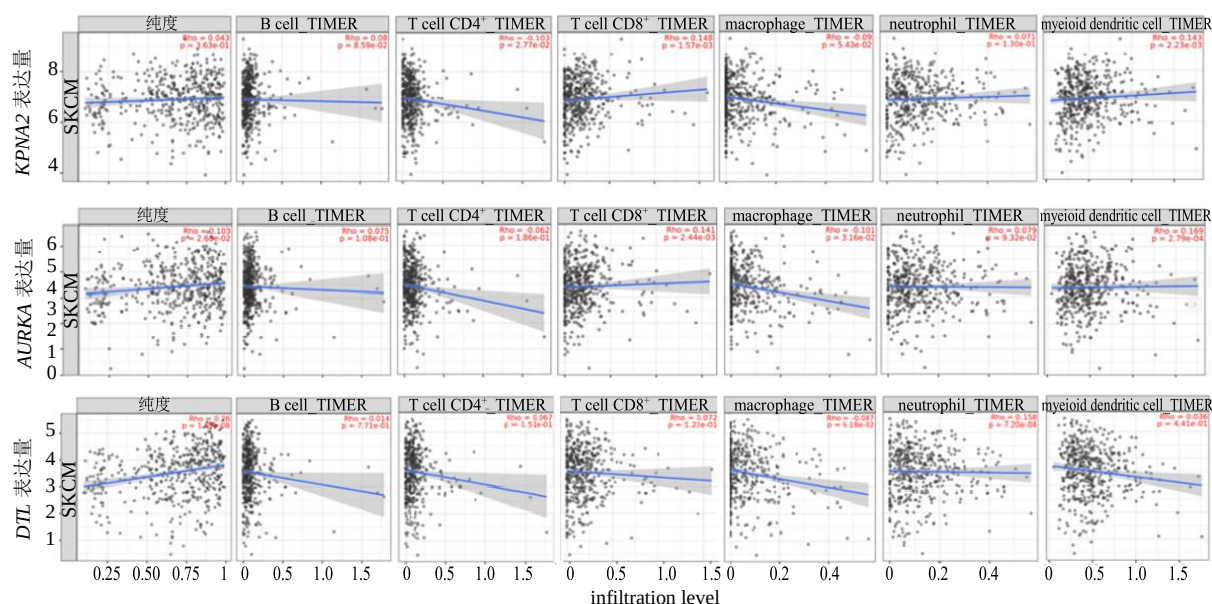


图 9 3 种核心基因与皮肤黑色素瘤肿瘤纯度及 6 种免疫细胞的浸润分析

Fig. 9 Tumor purity of three core genes in cutaneous melanoma and infiltration analysis of three core genes in six immune cells

表 2 基于核心基因的中药预测

Table 2 Traditional Chinese medicines prediction based on core genes

基因	中药
KPNA2	油桐叶、猪苓、云芝、木薯、灵芝、蓖麻子、蚕豆
AURKA	构皮、高良姜、甘草
DTL	丹参、人参

只展示具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的中药药物。

Only traditional Chinese medicines with statistical significance ($P < 0.05$) were shown.

中肿瘤抑制 T 细胞的功能是导致其免疫逃逸的主要机制之一。但是 B 细胞在皮肤黑色素瘤中的作用尚不清楚，其在肿瘤免疫治疗中的作用亦有待进一步研究和探讨，本研究对于 B 细胞免疫浸润趋势分析结果也无明显特异性改变。此外，免疫细胞亚群的存在也会影响皮肤黑色素瘤的发生和发展。在皮肤黑色素瘤患者中，调节性 T 细胞 (regulatory cells, Tregs) 数量增加，自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞活性降低，这些因素都可能导致免疫逃逸，且与本研究分析的结果相符，即 Treg 细胞免疫浸润趋势与疾病呈正相关^[15]。

3.2 细胞周期异常和细胞侵袭是皮肤黑色素瘤的潜在机制

皮肤黑色素瘤的形成主要包括黑素细胞的增殖、细胞周期和凋亡失控、细胞浸润和侵袭、血管生成、免疫逃逸等生物过程。正常情况下，黑素细

胞仅会在皮肤、眼睛等部位分散分布，而遗传基因突变、线粒体损伤等会导致黑素细胞的恶性增殖，进而形成黑色素瘤。另外，黑色素瘤细胞的细胞周期和凋亡过程受到了调节失控的影响：多数黑色素瘤患者的细胞周期调控基因存在突变，这种突变会使得细胞周期 G₁/S 检查点失调，从而促进黑色素瘤细胞的增殖和生长；黑色素瘤细胞中许多细胞周期调节蛋白 cyclin-dependent kinase (CDK) 抑制剂 p16^{INK4a} 的基因缺失或基因突变会导致细胞周期蛋白 D1-周期蛋白依赖性激酶 4/6 复合物活性上调，促进细胞进入 DNA 复制和细胞分裂期^[16]；黑色素瘤细胞的凋亡受到抑制，导致细胞周期过程不被中断，进而导致细胞过度增殖和扩散。黑色素瘤细胞还可以穿透正常组织，进入血管和淋巴系统，并在其他部位进行扩散形成转移灶，这一过程与黑色素瘤细胞表面的特定黏附分子和基质金属蛋白酶等相关因素有密切关系^[17]。此外，黑色素瘤细胞能够通过表面分子的改变、免疫细胞浸润抑制等，逃避身体免疫系统的攻击，并促进皮肤黑色素瘤的生长和扩散。

本研究通过分析 3 个数据集得出 114 个皮肤黑色素瘤组织与正常组织的 DEGs，其中包括上调基因 36 个、下调基因 78 个。GO 功能和 KEGG 通路富集分析显示，皮肤黑色素瘤的发生发展与信号转导、凋亡过程、基因表达的正调控、细胞因子与细胞因子受体相互作用、Toll 样受体信号通路等密切

相关。在信号转导方面, Malekan 等研究表明, 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1- α , HIF-1 α) 能够通过 RAS/RAF/MEK/ERK 信号级联通路、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等常见通路影响皮肤黑色素瘤进程中细胞增殖、转移、血管生成和有关代谢^[18-19]。其中, 作为皮肤黑色素瘤发病机制的核心, RAS/RAF/MEK/ERK 信号通路通常由致癌突变 (如 B-RAF、N-RAS) 和上游膜受体突变 (例如 KIT) 激活^[20]。其中, 部分致癌突变会激活 PI3K/Akt/mTOR 通路, 从而通过一系列信号转导使得 Akt 磷酸化和活性增加, 导致细胞凋亡减少和增殖信号增加, 促进肿瘤的生成^[21]。在细胞因子方面, 研究表明细胞因子可以通过抑制增殖和促进凋亡 2 个方面来直接抑制肿瘤细胞的生长。在临床前癌症模型中, 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子已被证明可以介导有效的抗肿瘤免疫^[22]。此外, 细胞因子通过信号通路可对皮肤黑色素瘤中的细胞浸润侵袭起到促进作用。Rathore 等^[23]研究表明, 肿瘤来源的正五聚蛋白 3 (pentraxin 3, PTX3) 通过可靶向的炎症相关途径促进黑色素瘤细胞侵袭, 并通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/NF- κ B 信号通路促进黑色素瘤细胞迁移。总体而言, 以上研究结果均与本研究的结果一致。

3.3 核心基因可能成为皮肤黑色素瘤潜在治疗靶点

本研究共筛选得到 15 个关键基因, 包括 *EGFR*、*KPNA2*、*GATA3*、*AURKA*、*TYMS*、*PKP1*、*SPPI*、*MMP1*、*KLF4*、*EPCAM*、*KIF23*、*DTL*、*CLDN1*、*LCP2*、*FGFR2*, 其中 *KIF23*、*KPNA2*、*DTL*、*TYMS*、*MMP1*、*AURKA*、*LCP2*、*SPPI* 表达上调, *EGFR*、*GATA3*、*EPCAM*、*CLDN1*、*KLF4*、*FGFR2*、*PKP1* 表达下调。此外, 继续优化关键基因筛选, 得到 3 个核心基因 *KPNA2*、*AURKA*、*DTL* 并构建核心基因集。*KPNA2* 是在核质运输中发挥重要作用的蛋白, 在介导肿瘤抑制因子的核转运方面, 可通过影响细胞分化、增殖和凋亡促进肿瘤形成和进展。已有研究表明, *KPNA2* 在黑色素瘤组织和细胞系中呈高表达状态, 其过表达可以通过 NF- κ B-p65 信号通路促进皮肤黑色素瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 对预后有明显不良影响^[24-25]。*AURKA* 作为 AURK 家族的代

表性成员, 对有丝分裂过程以及维持基因组完整性具有重要作用。其在肿瘤细胞中作为转录因子可促进细胞迁移与入侵, 并定位于线粒体调节线粒体动态和三磷酸腺苷生产^[26-27]。另有研究表明, *AURKA* 下调可促进皮肤黑色素瘤细胞凋亡并诱导细胞周期阻滞^[28]。而 *DTL* 可以通过调节参与细胞周期的调节蛋白的表达, 影响 DNA 复制和修复的完整性^[29]。有研究表明, *DTL* 连同细胞因子受体 4 (Cullin-RING ligase 4, CRL4) 形成 CLN4^{Cdt2} 连接酶, 抑制其活性可以阻滞黑色素瘤在体内外生长增殖^[30]。此外, 有数据显示 *DTL* 高表达的皮肤黑色素瘤患者, 其无病生存期和总生存期均较短^[29]。

此外, *FGFR2* 基因的突变对皮肤黑色素瘤的产生和进展也存在相关影响。正常生理状态下, 由 *FGFR* 介导的信号传导通路参与新血管生成、细胞增殖和迁移、调节器官发育、伤口愈合等过程。然而, 当 *FGFR* 发生突变或者过表达时, 会引起 *FGFR* 信号通路的过度激活, 并进一步诱发正常细胞癌变^[31]。*FGFR* 常见的变异情况有以下 5 种^[32-33]: (1) 由于基因扩增导致 *FGFR* 过表达; (2) EC 区域 (胞外结构域) 的 *FGFR* 突变 (SNV 与 indel); (3) TK 区域 (激酶结构域) 的 *FGFR* 突变 (SNV 与 indel); (4) *FGFR* 融合 I 型: *FGFRs* 的 TK 区域前与另一个基因 5' 端发生基因融合; (5) *FGFR* 融合 II 型: *FGFRs* 的 TK 区域后与另一个基因的 3' 端发生基因融合。有研究显示, 功能丧失的 *FGFR2* 突变发生在黑色素瘤的 1 个亚群中, 突变谱显示其 70% 的突变方式为转换, 与本研究结果相符合。其中 A648T 突变消除了 *FGFR2* 的酪氨酸激酶活性, 但黑色素瘤中 *FGFR2* 功能丧失的生物学后果仍未有研究发现^[30]。

3.4 相关中药可能是皮肤黑色素瘤治疗的潜在药物

本研究筛选出作用于皮肤黑色素瘤关键基因的中药可分为以下 9 类: 补虚药 (人参、甘草)、清热解毒药 (油桐叶)、拔毒生肌药 (木薯)、消肿拔毒药 (蓖麻子)、温里药 (高良姜)、健脾利湿药 (蚕豆、云芝)、利水渗湿药 (猪苓、构皮)、活血化瘀药 (丹参)、安神药 (灵芝)。

皮肤黑色素瘤在中医范畴虽无明确病名对应, 但根据发病特点可归属“黑痣”“黑疔”“恶疮”“失荣”等, 亦与“脱痈”“厉痈”“翻花”等发病形式极为类似^[34]。其形成机制多以正气虚损为基础, 进而阳气束结, 或外邪搏于血气, 致气血

瘀滞形成乌黑肿块。此外,血癖气滞、湿毒淤滞、外感六淫等病因皆可变生恶疮导致本病。上述补虚药中,人参性平、味甘,属微苦微温之品,既能大补元气,又能益血生津、安神定魄,为补药之良品,虚证之要药。《圣济总录》所载“人参丸”,以人参 1 分为末入药,主治小儿疮子黑色。甘草味甘性平、气薄味厚,既能补脾胃之不足,益三焦之元气,又能调和诸药。“人参-甘草”作为经方常见药对,相须为用,共同补益脾肺之气,使气血津液得生,虚损诸证自解。故而上述补虚药的使用及配伍,辅以补气安神之灵芝,可针对皮肤黑色素瘤起病的前提基础“虚损内生”起到对证治疗作用。此外,高良姜作为辛热之品,有温中止呕、散寒止痛之功,可针对寒湿停聚型皮肤黑色素瘤患者起温化水湿之效;丹参活血止痛、祛瘀生新,可有效缓解皮肤黑色素瘤中由于气血瘀滞所致的乌黑肿块;猪苓、构皮、蚕豆、云芝均有祛湿之功,可用于湿毒瘀滞型皮肤黑色素瘤。

中药外治法亦在一定程度上有助于皮肤黑色素瘤的治疗,如蓖麻子善祛风活络、消肿拔毒,《本草经疏》载其可“追脓取毒,能出有形之滞物”,外用能“退消阳毒红肿,及发颐、瘰癧、乳痈等症”。《慈禧光绪医方选议》曾载有蓖麻子膏一方,以蓖麻子 1 两“摊布光上,贴面跳动处,或搽于大肥皂内贴之”,可治手臂风疾及痈疽肿毒。对于血瘀日久化热,致使皮肤红肿焮痛的皮肤黑色素瘤患者或有一定疗效。此外,油桐叶清热解毒、杀虫消肿,木薯消肿解毒,均可捣烂或绞汁敷抹于患处,用以缓解痈疽疮疡、瘀肿疼痛等皮肤病症,对于患处破溃、出血的皮肤黑色素瘤病灶或有一定疗效。

目前多项研究^[35-36]表明人参活性成分对皮肤黑色素瘤细胞有诱导凋亡、抑制转移的作用,人参皂苷 Rh₂ 可以诱导人皮肤黑色素瘤细胞 A375-S2 凋亡,人参皂苷 Rg₃ 可明显抑制 B16 皮肤黑色素瘤肺转移等。此外,丹参提取液可能通过抑制皮肤黑色素瘤细胞对基底膜的侵袭能力以及降低其运动能力显著减轻皮肤黑色素瘤肺转移程度^[37]。丹参的主要成分丹参酮 I、丹参酮 II_A 和隐丹参酮可以抑制皮肤黑色素瘤细胞的增殖活性,促进其凋亡^[38]。同时,丹参-人参可协同抑制髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)在转移灶中的浸润,从而重塑转移灶局部免疫抑制的微环境,达到抑制肿瘤转移的目的^[39]。另有研究表明,高良姜素

可以抑制人皮肤黑色素瘤 A375 细胞的生长和转移,同时降低 A375 细胞内酪氨酸酶的活性^[40]。猪苓多糖可以通过促进巨噬细胞释放 NO 抑制皮肤黑色素瘤细胞生长^[41]。灵芝多糖可促进黑色素瘤和骨肉瘤抗原诱导巨噬细胞 CD86 和主要组织相容性复合体 II 类(major histocompatibility complex-II, MHC-II)(I-A/I-E)表达,促进巨噬细胞对肿瘤抗原的提呈作用^[42]。云芝多糖可诱导细胞凋亡,并抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞的生长^[43]。多项研究表明,甘草的活性成分甘草查耳酮 A 和光甘草定可以通过抑制皮肤黑色素瘤细胞糖酵解表型诱导细胞凋亡,异甘草素可以通过抑制酪氨酸酶的活性抑制皮肤黑色素瘤细胞的生长^[44-47]。这表明中药及其活性成分在延缓皮肤黑色素瘤进展方面扮演重要角色。这些结果可为中医药治疗皮肤黑色素瘤组方配伍提供一定参考价值。

4 结论

本研究通过生物信息学方法说明皮肤黑色素瘤的发生进展是一个多基因异常表达的复杂过程,主要与细胞周期调控、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、细胞黏附等生物过程及 Toll 样受体信号通路等有关,同时如 nTreg 等免疫细胞的浸润及相关 TME 对皮肤黑色素瘤发生发展也密切相关。此外,本研究从基因层面挖掘出皮肤黑色素瘤的关键基因和优化核心基因(集),有望成为疾病诊断和预后的潜在生物标志物和药物作用靶点。丹参、人参、构皮、高良姜、甘草、蓖麻子、油桐叶等可作为皮肤黑色素瘤治疗的潜在中药,为中医药防治皮肤黑色素瘤提供新的思路。由于本研究只是基于公共数据集进行挖掘,其结果及机制仍需为基础实验与临床研究中进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Arnold M, Singh D, Laversanne M, *et al.* Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040 [J]. *JAMA Dermatol*, 2022, 158(5): 495-503.
- [2] Brożyna A A, Jóźwicki W, Roszkowski K, *et al.* Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 17844-17853.
- [3] Schadendorf D, van Akkooi A C J, Berking C, *et al.* Melanoma [J]. *Lancet*, 2018, 392(10151): 971-984.
- [4] 林千里, 张文俊, 汪汇, 等. 皮肤黑色素瘤流行病学及防治研究进展 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(3): 28-32.
- [5] 陈珂欣, 吴敏靓, 王宇翀, 等. 黑色素瘤的治疗进展 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2021, 32(1): 60-63.

- [6] 吴昊. 恶性黑色素瘤的治疗研究进展 [J]. 浙江创伤外科, 2015, 20(6): 1259-1262.
- [7] 茅婧怡, 周洁, 张明, 等. 恶性黑色素瘤的中医药治疗及研究进展 [J]. 世界临床药物, 2017, 38(6): 428-434.
- [8] 邓福临, 郭宇晗, 吕大伦. 黑色素瘤的中药治疗研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2022, 43(13): 1259-1264.
- [9] Brea E J, Oh C Y, Manchado E, *et al.* Kinase regulation of human MHC class I molecule expression on cancer cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(11): 936-947.
- [10] Liu Y Y, Liang X Y, Dong W Q, *et al.* Tumor-repopulating cells induce PD-1 expression in CD8⁺ T cells by transferring kynurenine and AhR activation [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3): 480-494.e7.
- [11] Kuczynski E A, Sargent D J, Grothey A, *et al.* Drug rechallenge and treatment beyond progression: Implications for drug resistance [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(10): 571-587.
- [12] Salama A K S, Postow M A, Salama J K. Irradiation and immune checkpoint inhibitors for melanoma [J]. *Semin Oncol*, 2018, 45(3): 201-205.
- [13] van Allen E M, Miao D A, Schilling B, *et al.* Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma [J]. *Science*, 2015, 350(6257): 207-211.
- [14] Schadendorf D, Wolchok J D, Hodi F S, *et al.* Efficacy and safety outcomes in patients with advanced melanoma who discontinued treatment with nivolumab and ipilimumab because of adverse events: A pooled analysis of randomized phase II and III trials [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(34): 3807-3814.
- [15] Tey S K, Dotti G, Rooney C M, *et al.* Inducible caspase9 suicide gene enhances the safety of T cell therapy of cancer [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(5): 503-510.
- [16] 吴晓雯, 闫君雅, 代杰, 等. 中国 134 例黑色素瘤患者 P16^{INK4a}、CDK4 和 CCND1 基因突变及其临床意义 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38(2): 153-157.
- [17] 程英. MicroRNA-222 介导 PI3K/Akt/MMP-9 信号通路参与调控 HMGA1 对葡萄膜黑色素瘤生物学功能的影响 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [18] Malekan M, Ebrahimzadeh M A, Sheida F. The role of hypoxia-inducible factor-1 α and its signaling in melanoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111873.
- [19] Zhang Q, Han Z Z, Zhu Y B, *et al.* Role of hypoxia inducible factor-1 in cancer stem cells (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(1): 17.
- [20] McCubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1263-1284.
- [21] Tsao H, Zhang X, Benoit E, *et al.* Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines [J]. *Oncogene*, 1998, 16(26): 3397-3402.
- [22] Bentebibel S E, Diab A. Cytokines in the treatment of melanoma [J]. *Curr Oncol Rep*, 2021, 23(7): 83.
- [23] Rathore M, Girard C, Ohanna M, *et al.* Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B signaling pathway [J]. *Oncogene*, 2019, 38(30): 5873-5889.
- [24] Geng X R, Qiu X J, Gao J, *et al.* CREB1 regulates KPNA2 by inhibiting mir-495-3p transcription to control melanoma progression: The role of the CREB1/miR-495-3p/KPNA2 axis in melanoma progression [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 57.
- [25] 杨帆. KPNA2 调控黑色素瘤细胞生长功能及分子机制研究 [D]. 南京: 中国医科大学, 2021.
- [26] Bertolin G, Tramier M. Insights into the non-mitotic functions of Aurora kinase A: More than just cell division [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(6): 1031-1047.
- [27] Guarino Almeida E, Renaudin X, Venkitaraman A R. A kinase-independent function for AURORA-a in replisome assembly during DNA replication initiation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(14): 7844-7855.
- [28] 彭茜, 汤业珍, 张玲, 等. 恶性黑色素瘤组织 AURKA 表达对细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, 29(6): 400-407.
- [29] Tímár J, Vizkeleti L, Doma V, *et al.* Genetic progression of malignant melanoma [J]. *Cancer Metast Rev*, 2016, 35(1): 93-107.
- [30] Gartside M G, Chen H B, Ibrahimi O A, *et al.* Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(1): 41-54.
- [31] Katoh M. FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(1): 3-15.
- [32] Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2): 116-129.
- [33] Katoh M. Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(2): 105-122.
- [34] 谢超群, 苗秀明, 宋业强. 黑色素瘤的中西医研究进展 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(6): 99-102.
- [35] Fei X F, Wang B X, Tashiro S, *et al.* Apoptotic effects of ginsenoside Rh₂ on human malignant melanoma A375-S2 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(4): 315-322.

- [36] 辛颖, 倪劲松, 王心蕊, 等. 20(S)-人参皂苷 Rg₃ 抗 B16 黑色素瘤转移的作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2004, 30(4): 540-542.
- [37] 徐建亚, 顾勤, 夏卫军, 等. 丹参对小鼠黑色素瘤细胞株 B16-BL6 侵袭和转移能力的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(6): 26-28.
- [38] 单云岗, 俞忠明, 傅跃青. 丹参不同有效成分对黑色素瘤细胞增殖活力和细胞周期影响的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2): 435-440.
- [39] 杨葛俊, 邹珏瑶, 赵涵, 等. 丹参-人参配伍调控 MDSCs 重塑黑色素瘤免疫微环境的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(8): 717-726.
- [40] 霍仕霞, 彭晓明, 高莉, 等. 不同质量分数高良姜素对人黑色素瘤 A375 细胞黑素合成及相关基因表达的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 244-249.
- [41] 梅玉屏, 曾星, 黄羽, 等. 重组卡介苗及猪苓多糖对荷瘤小鼠巨噬细胞 NO 释放量的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(3): 292-295.
- [42] 杨玉霞. 灵芝多糖对肿瘤抗原诱导巨噬细胞协同刺激分子及 MHC 分子表达的影响 [D]. 承德: 承德医学院, 2023.
- [43] 魏士杰, 陈文强. 云芝多糖对小鼠黑色素瘤 B16 细胞体外增殖和凋亡的影响及其机制 [J]. 中国药房, 2016, 27(31): 4363-4366.
- [44] 王艳明, 刘瑛, 阎新燕, 等. 甘草查尔酮 A 抑制小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞糖酵解表型和诱导凋亡 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2015, 33(4): 459-464.
- [45] 高彩霞, 王艳明, 李德芳, 等. 光甘草定诱导小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞凋亡的机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(5): 836-842.
- [46] 庞得全, 王英曼, 郑维国, 等. 抗黑色素瘤药物异甘草素对酪氨酸酶抑制机理的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(3): 45-47.
- [47] 李媛, 马冲, 马蕾, 等. 甘草次酸通过 Wnt/ β -catenin 通路抑制黑色素瘤恶性生物学行为的机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(3): 392-397.

[责任编辑 潘明佳]