

研究论文

Research Article

肺腺癌转移相关的免疫特征开发及潜在中药预测

关双¹ 刘溪¹ 王念¹ 陈亚飞¹ 俞成诚¹ 李兵² 刘骏¹ 王忠^{1*}

1 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京, 100700; 2 中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700

* 通信作者, zhonw@vip.sina.com

摘 要 本研究旨在确定具有免疫相关基因的可靠预后特征, 该特征可以预测预后并对肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 患者的个体化管理提供帮助。从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库下载 LUAD 患者的 mRNA 表达谱和相应的临床数据; 使用单因素 COX 和 LASSO 模型来构建预后模型; 使用基于风险评估的方法开发预后特征; 通过 Kaplan-Meier 分析比较高风险患者和低风险患者之间的总生存期 (overall survival, OS), OS 的独立预测因子通过单变量和多变量 COX 分析确定; 单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 用于评估免疫细胞浸润程度; 通过 LASSO 和 COX 回归分析构建生存预后特征。根据预后特征, 在 OS 方面将患者显著分层为高风险组和低风险组, 与低风险组相比, 高风险组的 LUAD 患者 OS 显著降低。通过 ROC 曲线分析证实了预后基因标记的预测能力。多因素 COX 分析显示, 风险评估是 OS 的独立预测因子。通过免疫分析, 发现了肺腺癌转移组与未转移组的不同免疫特征。与 Coremine Medical 数据库相互映射筛选出牛黄 (*Bovis Calculus*)、罗汉果 (*Siraitiae Fructus*) 等 15 种中药。本研究提出了一种新的肺腺癌预后特征, 用于估计 LUAD 的 OS。此外, 本研究发现了肺腺癌转移组和未转移组之间的免疫特征差异, 这可能有助于对 LUAD 患者进行更准确的生存风险分层和个体化临床管理。

关键词 肺腺癌; 差异表达; 预后特征; 免疫特征; 中药

Development of Immune-related Signature Related to Lung Adenocarcinoma Metastasis and Potential Herbal Medicine Prediction

GUAN Shuang¹ LIU Xi¹ WANG Nian¹ CHEN Yafei¹ YU Chengcheng¹ LI Bing² LIU Jun¹ WANG Zhong^{1*}

1 Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700

* Corresponding author, zhonw@vip.sina.com

DOI: 10.13417/j.gab.043.000548

Abstract The study aimed to identify reliable prognostic features with immune-related genes that could predict prognosis and aid in the individualized management of patients with LUAD. The mRNA expression profiles of LUAD patients and corresponding clinical data were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. One-way COX and LASSO regression models were used to identify prognostic genes. Prognostic features were developed using a risk score-based approach. Overall survival (OS) was compared between high- and low-risk patients by Kaplan-Meier analysis. Independent predictors of OS were determined by univariate and multivariate COX analyses. Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) was used to assess the degree of immune cell infiltration. Prognostic characteristics were constructed by LASSO and COX regression analysis. Prognostic characteristics significantly stratified

基金项目: 本研究由重大新药创制课题 (2017ZX09301059) 和中国中医科学院科技创新工程课题 (CI2021A05052, CI2021A05033) 共同资助。

引用格式: 关双, 刘溪, 王念, 等, 2024. 肺腺癌转移相关的免疫特征开发及潜在中药预测. 基因组学与应用生物学, 43(3): 548-560. [GUAN S, LIU X, WANG N, et al., 2024. Development of immune-related signature related to lung adenocarcinoma metastasis and potential herbal medicine prediction. Genomics and Applied Biology, 43(3): 548-560.]

通信作者简介: 王忠, 研究员, 从事中药临床药理研究。

收稿日期: 2023-07-10; 接受日期: 2023-11-21

patients into high- and low-risk groups in terms of OS, with significantly lower OS in LUAD patients in the high-risk group compared with the low-risk group. The predictive power of prognostic genetic markers was confirmed by ROC curve analysis. Multifactorial COX analysis showed that risk score was an independent predictor of OS. Immunological analysis revealed different immune profiles in the metastatic and non-metastatic groups of lung adenocarcinoma. Inter-mapping with the Coremine Medical database screened 15 herbal medicines such as Niu Huang (*Bovis Calculus*) and Luohanguo (*Siraitia Fructus*). Our study proposed a new prognostic profile of lung adenocarcinoma for estimating overall survival in LUAD. In addition, identified differences in immune profiles between the metastatic and non-metastatic groups of lung adenocarcinoma. This study may be useful for more accurate survival risk stratification and individualized clinical management for patients with LUAD.

Keywords Lung adenocarcinoma; Differential expression; Prognostic features; Immunological features; Traditional Chinese medicine

肺癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤，其发病率和死亡率位居肿瘤前列 (Siegel et al., 2023)。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占近 90% 的肺癌病例，其中肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 是 NSCLC 最常见的组织学亚型。尽管早期 LUAD 患者预后较好，但这些患者中仍有近 10% ~ 44% 在手术干预后 5 年内死亡 (Wu et al., 2020; Zhao et al., 2020)。近十年来，随着高通量测序的快速发展，基因集在个体化治疗中显示出巨大的潜力 (Herbst et al., 2018)。与单一生物标志物相比，特定的基因集使人们更好地了解癌症的生物学表型。尽管研究取得了丰硕的成果，并且目前在研免疫治疗药物数量激增，但手术仍然是 LUAD 患者的主要治疗方法 (Shi et al., 2023)。有研究报道了免疫相关基因特征，其可以预测 LUAD 患者的预后，并为免疫治疗提供潜在的靶点 (Zhang et al., 2023)。由于 LUAD 是一种具有复杂分子机制的高度异质性恶性肿瘤，许多靶向分子药物对某些患者无效，因此 LUAD 的治疗和预后预测仍然非常具有挑战性。与此同时，很少有预后模型关注发生转移的 LUAD 的免疫特征以及相关基因的变化 (Wu et al., 2020)。

中医认为，肺癌是由于机体正气不足，邪毒侵袭，热毒内蕴，痰瘀气滞，癥瘕积于内而成，属于“肺积”“息贲”“劳嗽”的范畴 (于弘等, 2022)，其主要证型有气阴两虚证、痰瘀互阻证。目前，在 NSCLC 的各个发展阶段，中医药联合西医、西药——中西医结合，有协同治疗优势。相关研究发现中医药通过影响机体免疫机制，参与肿瘤微环境等多方面治疗 NSCLC (赵亚茜等, 2023)。肺癌转移的预防

及治疗以益气养阴及化痰活血祛瘀联合应用，攻补兼施，不仅能调节肺癌患者的细胞免疫功能，增强机体的免疫防御机制，控制肿瘤的复发与转移，同时能改善肺癌患者血液黏稠度，减少促血管生成因子的释放及血栓形成，全面控制肺癌转移，充分发挥中医药治疗特色 (张晶和舒琦瑾, 2010)。

1 结果

1.1 肺腺癌患者特征基因与富集分析

从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 中获得 58 例正常组织以及 513 例 LUAD 组织的转录组分析数据。共鉴定出 2 077 个差异表达基因 (differential expressed genes, DEGs) (图 1A)。其中 571 个基因表达量在肿瘤组织中下调，1 506 个基因上调。利用单因素 COX 回归分析得到与生存时间相关的 178 个基因，其中有 24 个免疫基因。LASSO 回归模型显示 4 个是非零显著基因，其中 2 个是免疫基因 (图 1B)。

为了研究预后基因在 LUAD 中的功能和作用途径，进一步探讨该疾病的发病机制，利用在线数据库 MetaScape 对获得的 178 个预后相关基因进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析 (图 1C)。KEGG 通路分析共获得 25 条显著通路，包括 PI3K-Akt 信号传导通路、癌症的途径、趋化因子信号通路、细胞因子-细胞因子受体的相互作用等。根据 GO 富集分析，这些预后基因也显示出在生物过程中的重要作用，包括调节体液水平、细胞-细胞黏附、对内皮细胞增殖的正向调节等可能涉及肺腺癌的疾病作用机制。

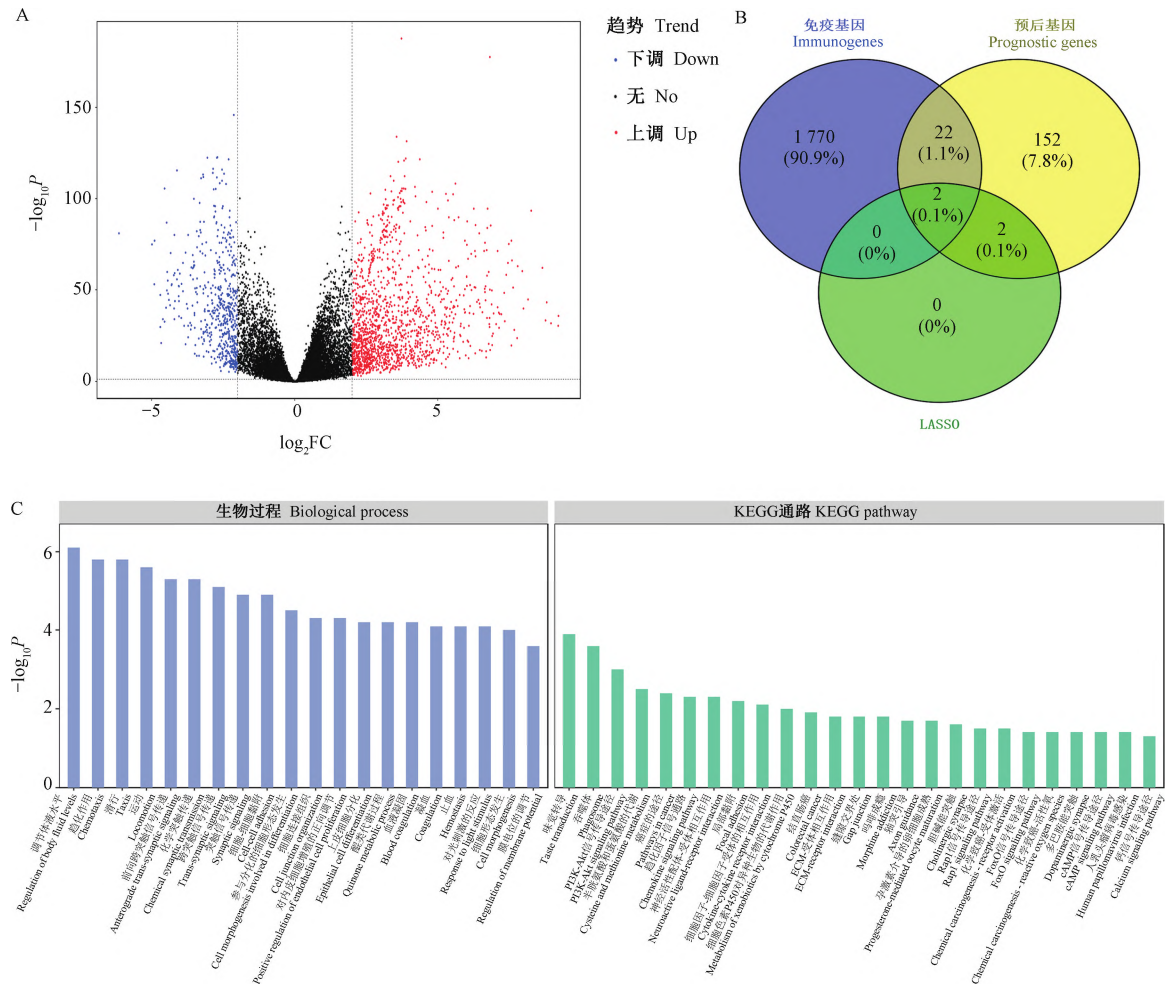


图 1 肺腺癌差异表达基因和生物富集分析

(A) LUAD 与正常样本之间的 DEGs 的火山图; (B) 单因素 COX 回归分析结果与 LASSO 回归分析结果和免疫基因比较的韦恩图; (C) 预后基因的 GO 富集分析和 KEGG 富集分析

Figure 1 Analysis of differentially expressed genes and gene enrichment in lung adenocarcinoma
(A) Volcano plot of DEGs between LUAD and normal samples; (B) Venn diagram comparing the results of one-way COX regression analysis with LASSO regression analysis results and immunogenes; (C) GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis of prognostic genes

1.2 基于 TCGA 数据建立预测模型

采用单因素 COX 和 LASSO 模型分析以建立预后模型。鉴定出 4 个特征基因, 分别是 *PRR5-ARHGAP8*、*PLXNB3*、*CLPSL2* 和 *AGTR1* (图 2A), 其风险系数分别是 0.072 8、0.019 0、-0.308 0 和 0.314 8。风险评分的值为各基因的风险系数与基因表达水平的乘积之和。根据风险评分的中位数临界

值, 将患者分为高风险组和低风险组。用散点图观察不同危险组患者的生存状态(图 2B, 图 2C)。根据 Kaplan-Meier 分析, 高风险组的生存率明显低于低风险组的(图 3A)。预后模型预测生存的能力采用时间依赖性 ROC 曲线确定, 曲线下面积(area under curve, AUC)在 1 年为 0.570, 3 年为 0.702, 5 年为 0.705(图 3B)。

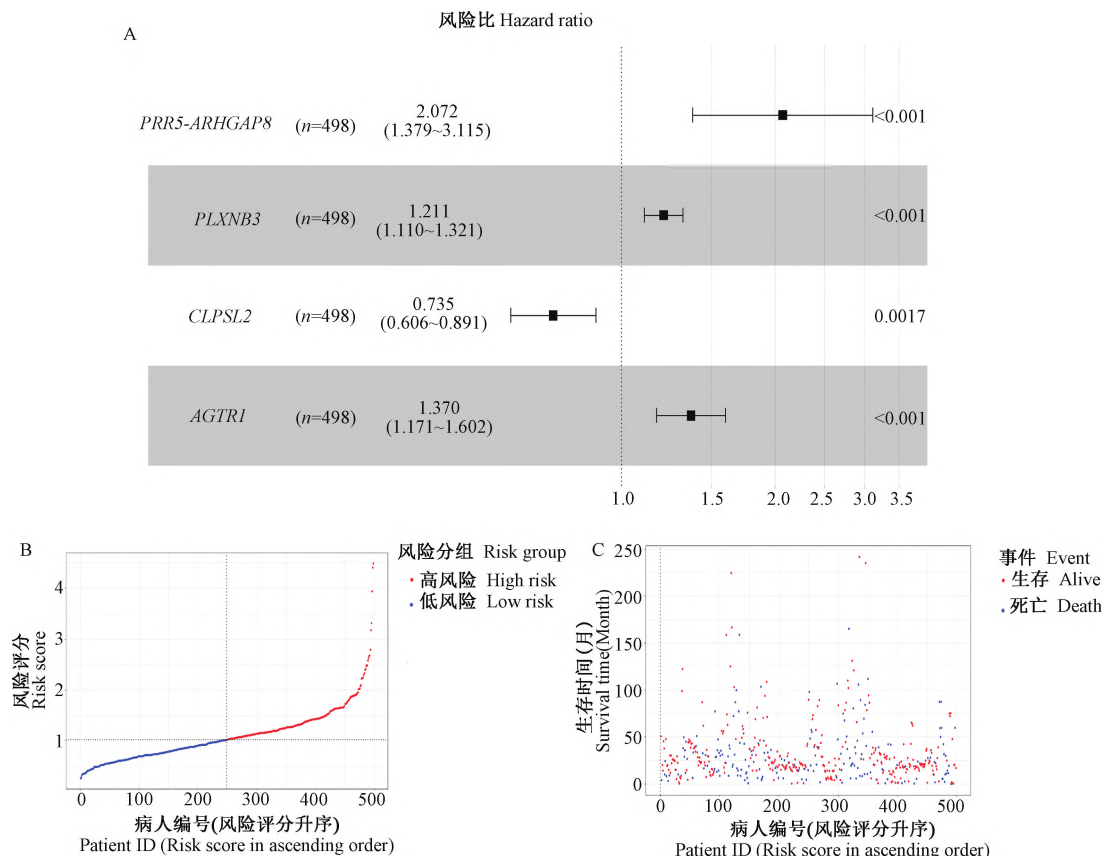


图2 利用TCGA-LUAD数据构建肺腺癌预后模型

(A) 通过单变量COX回归识别的预后相关基因的森林图；(B) 风险评分中位数和风险评分分布；(C) LUAD患者总体生存状态的分布

Figure 2 Construction of a prognostic model for lung adenocarcinoma using TCGA-LUAD data

(A) Forest plot of prognosis-related genes identified by univariate COX regression; (B) Median risk score and distribution of risk scores; (C) Distribution of overall survival status of LUAD patients

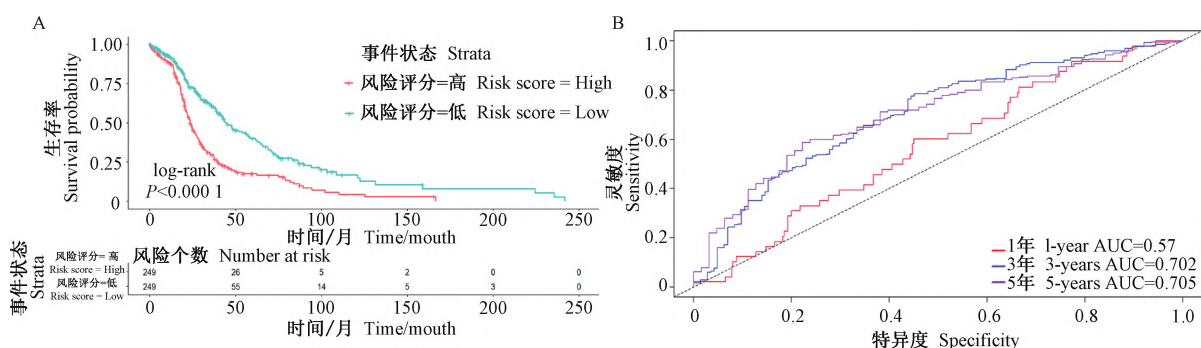


图3 LUAD高、低风险组患者预后分析

(A) LUAD高、低风险组患者总生存期的Kaplan-Meier曲线；
(B) LUAD患者总生存率的时间依赖性ROC曲线和AUC值

Figure 3 Analysis of LUAD patient survival outcomes in the high- and low-risk groups

(A) Kaplan-Meier curves of overall survival of LUAD patients in high- and low-risk groups;
(B) Time-dependent ROC curves and AUC values of overall survival of LUAD patients

1.3 风险评分的独立预后价值

采用多因素COX回归分析，确定风险评分是否为LUAD患者OS的预后因素。结果显示，风险评分

是TCGA-LUAD患者OS的独立预后因素(Hazard ratio, HR: 0.497, 95% Confidence interval, CI: 0.394 ~ 0.626; $P < 0.001$) (图4)，显示出了良好的预后价值。

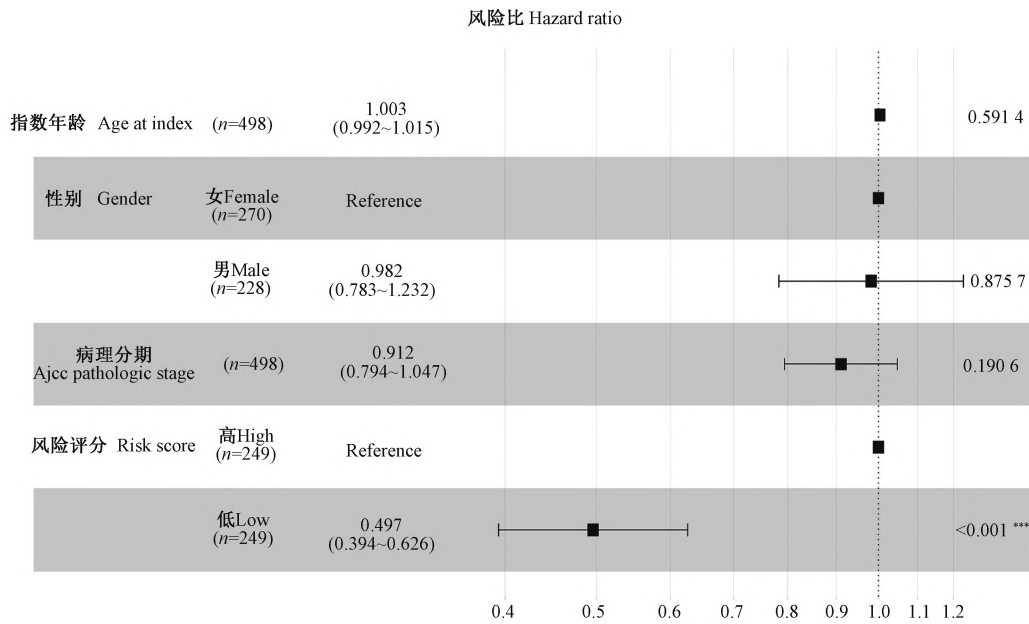


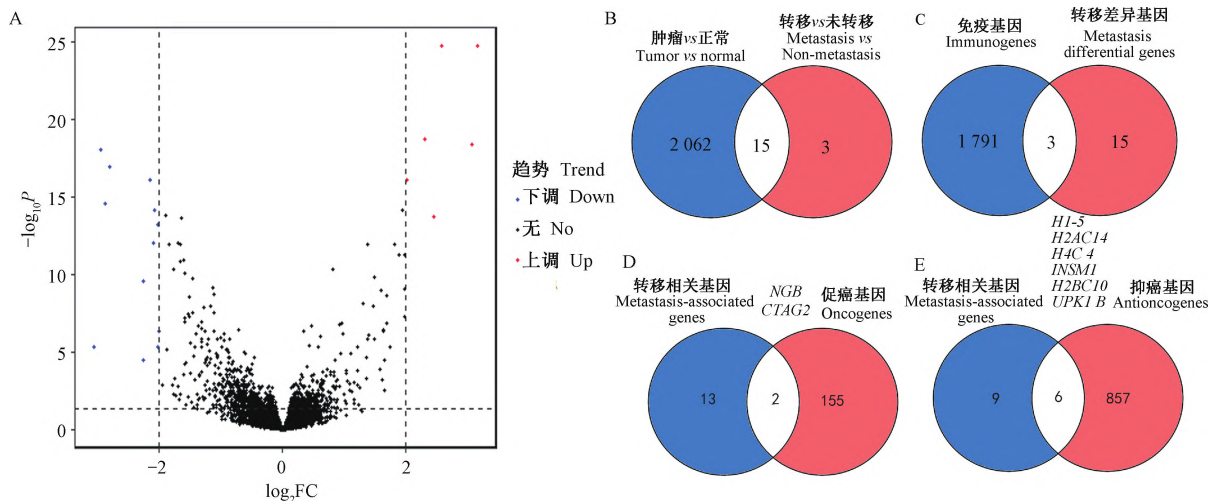
图 4 通过多因素 COX 回归分析确定的 LUAD 患者的总体生存相关因素
Figure 4 Overall survival-related factors of LUAD patients identified by multifactorial COX regression analysis

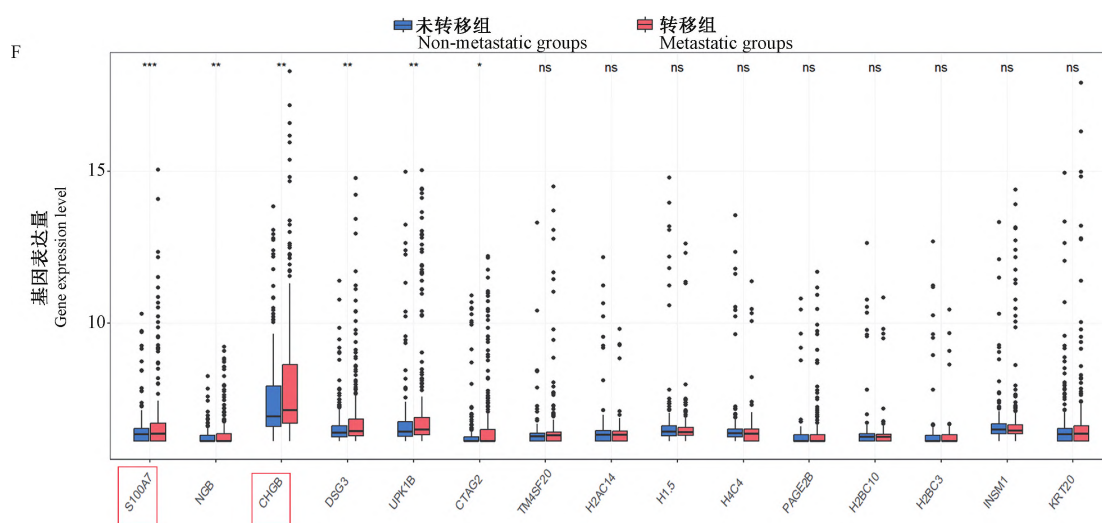
1.4 肺腺癌转移相关基因、促癌基因和抑癌基因的筛选

根据 TNM 分期, 将 513 例患者分为转移组 (293 例) 和未转移组 (218 例)。共筛选出两组间差异表达基因 18 个, 其中上调 6 个, 下调 12 个 (图 5A)。选取与肺腺癌差异表达基因的交集, 共得到 15 个基因, 其中有 3 个免疫相关基因 (*S100A7*、*CHGB*、*PGC*) (图 5B, 图 5C)。使用 R 包 (Moon-

lightR) 筛选出 157 个促癌基因, 853 个抑癌基因, 分别与 15 个关键基因取交集后, 发现有 2 个促癌基因 (*NGB*、*CTAG2*) 和 6 个抑癌基因 (*H1-5*、*H2AC14*、*H4C4*、*INSM1*、*H2BC10*、*UPK1B*) (图 5D, 图 5E)。

观察 15 个基因在两组间的表达情况, 有 6 个基因的表达存在显著差异 (图 5F)。其中 2 个基因 (*S100A7*、*CHGB*) 属于免疫基因, 且在转移组高表达。





*** 表示 $P < 0.001$, ** 表示 $P < 0.01$, * 表示 $P < 0.05$, ns 表示差异不显著。

*** means $P < 0.001$, ** means $P < 0.01$, * means $P < 0.05$, ns means no significant difference.

图 5 肺腺癌转移相关基因

(A) 转移组 vs 未转移组差异基因火山图; (B) 肺腺癌转移相关基因; (C) 免疫基因; (D) 肺腺癌转移基因与抑癌基因的比较; (E) 肺腺癌转移基因与促癌基因的比较; (F) 肺腺癌转移相关基因在两组中的表达量

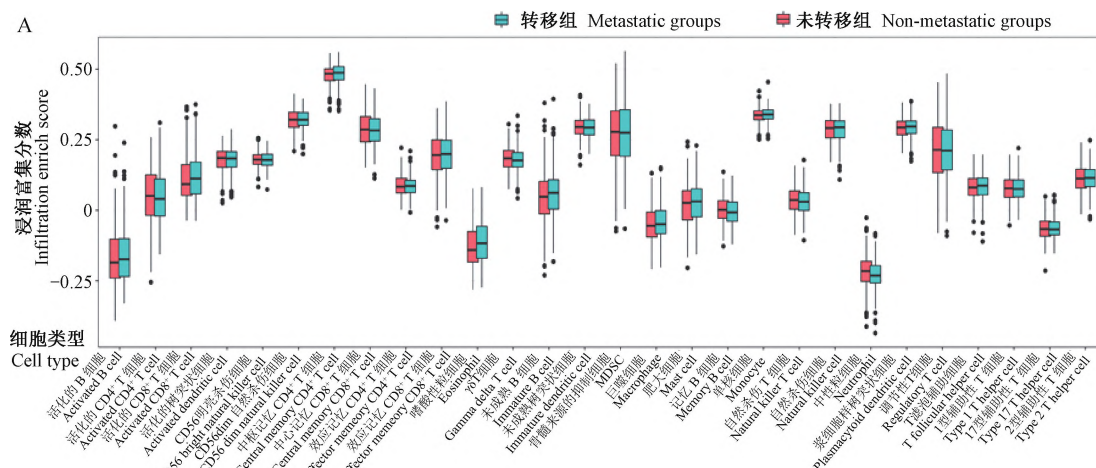
Figure 5 Genes associated with lung adenocarcinoma metastasis

(A) Volcano plot of differential genes in metastatic group vs non-metastatic group; (B) Lung adenocarcinoma metastasis-associated genes; (C) Immunogenes; (D) Comparison of lung adenocarcinoma metastasis genes with antioncogenes; (E) Comparison of lung adenocarcinoma metastasis genes with oncogenes; (F) Expression of lung adenocarcinoma metastasis-associated genes in both groups

1.5 肺腺癌转移组的免疫特征

采用单样本基因集富集分析(single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)比较 TCGA-LUAD 中转移

组和未转移组之间 28 种免疫细胞的评分(图 6A)。结果显示嗜酸性粒细胞在转移组中较高($P = 0.0091$),中性粒细胞在转移组中较低($P = 0.011$)(图 6B)。



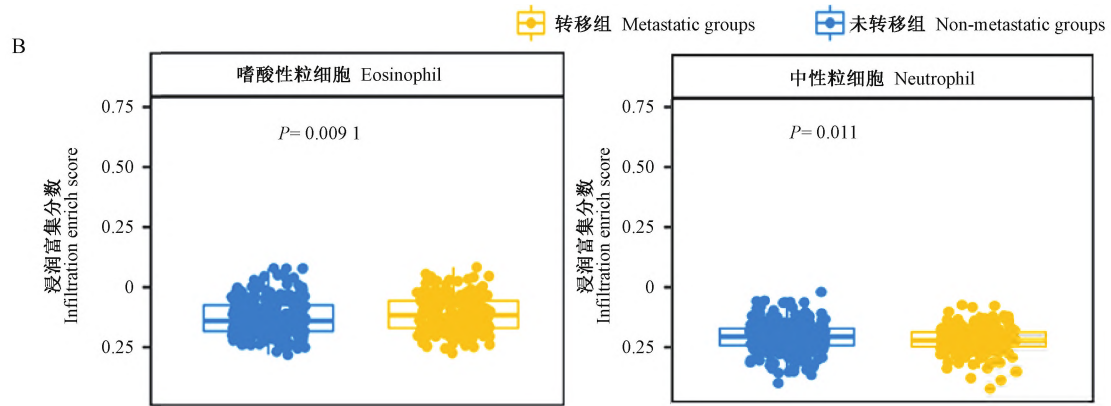


图6 TCGA-LUAD 的免疫谱

(A) 两组中的免疫细胞评分箱形图; (B) 中性粒细胞和嗜酸性粒细胞在两组中的评分

Figure 6 Immunological profile in the TCGA-LUAD

(A) Box plot of immune cell scores in two groups; (B) Neutrophil and eosinophil scores in two groups

1.6 LUAD 转移相关基因的中药预测与文献验证

将筛选到的 15 个关键基因映射到 Coremine Medical 数据库,共筛选出可能治疗肺腺癌转移的中药 31 种,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,共筛选出靶向中药 15 种。根据《中华本草》(国家中医药管理局《中华本草》编委会,1998)对药物的四气五味归经进行统计,四气统计中凉性频数最高,寒性次之;五味统计中甘居多;归经统计以归肝经、肾经、

肺经为主,见图 7。其中魔芋(0.001)、水牛角(*Bubali Cornu*)(0.039)由基因 *CHGB* 映射;鳖甲(*Trionycis Carapax*)(0.009)、鳖甲胶(*Colla Carapacis Trionycis*)(0.006)由基因 *NGB* 映射,具体见表 1。以中药名称和肺癌为关键词,进行文献检索,验证药物对肺癌是否有治疗效果(李甜甜等,2014;刘灿等,2015;许飞等,2021;张钰欣等,2022;柳金可等,2023)。

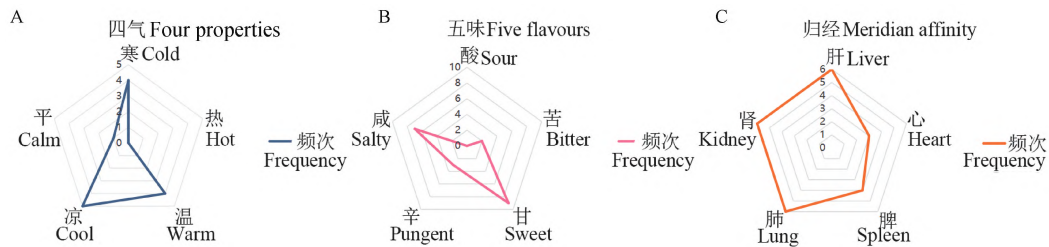


图7 预测中药性味归经的统计雷达图

(A) 预测药物的四气统计; (B) 预测药物的五味统计; (C) 预测药物的归经统计

Figure 7 Statistical radar chart for predicting the sexual flavor meridian of Chinese medicine

(A) The four properties statistics of predicting drug; (B) The five flavours statistics of predicting drug; (C) The meridian affinity statistics of predicting drug

表 1 肺腺癌转移相关基因与中药预测
Table 1 Genes related to metastasis of lung adenocarcinoma and prediction of Chinese medicine

基因 Gene	中药 Herbal	功效 Efficacy	性味归经 Sexual flavor meridian	P 值 P value	基因 类别 Gene class	肺癌 相关 Lung cancer related	参考文献 Reference
CHGB	魔芋 Moyu	化痰消积, 解毒散结, 行瘀止痛 Resolving phlegm to resolve accumulation, removing toxin and dissipating bind, resolving stasis to stop pain	辛、苦、寒; 有毒 Pungent, bitter, cold; toxic	0.001	*	✓	许飞 等, 2021
	水牛角 Shuiniujiao (<i>Bubali Cornu</i>)	清热凉血, 解毒, 定惊 Clearing heat and cooling blood, removing toxin, stabilize fright	苦、寒; 归心、肝经 Bitter, cold; heart, liver	0.039	NA	×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998
S100A7	哈士蟆 Hashima(<i>Rana chensinensis</i>)	补肺滋肾, 利水消肿 Enriching and tonifying the lung and kidney, disinhibiting water and dispersing edema	咸、凉; 归肺、肾经 Salty, cool; kidney, lung	0.001	*	×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998
	鹿茸 Lurong(<i>Cervi Cornu Pantotrichum</i>)	壮肾阳, 益精血, 强筋骨, 调冲任, 托疮毒 Tonifying kidney yang, replenishing blood and essence, strengthening sinews and invigorating bones, regulating thoroughfare vessel and conception vessel, expelling sores	甘、咸、温; 归肾、肝经 Sweet, salty, warm; kidney, liver	0.003		×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998
	鹿角 Lujiao(<i>Cervi Cornu</i>)	温肾补虚, 行血消肿, 强筋健骨 Warming kidney to tonify deficiency, activating blood and dispersing edema, strengthening sinews and invigorating bones	咸、温; 归肝、肾经 Salty, warm; kidney, liver	0.004		×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998
	檀香 Tanxiang(<i>Santalum Albi Lignum</i>)	行气温中, 开胃止痛 Activating qi and warming the middle, increase the appetite and relieve pain	辛、温; 归脾、胃、心、肺经 Pungent, warm; spleen, stomach, heart, lung	0.006		×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998
	稻芽 Daoya	消食和中, 健脾开胃 Promoting digestion to harmonize the middle, fortifying the spleen to increase the appetite	甘、温; 归脾、胃经 Sweet, warm; spleen, stomach	0.012		×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998
	牛黄 Niuhuang(<i>Bovis Calculus</i>)	清心, 豁痰, 开窍, 凉肝, 息风, 解毒 Clearing heart, resolving phlegm, inducing resuscitation orifices, clearing the liver to extinguish wind, removing toxin	甘、凉; 归心、肝经 Sweet, cool; heart, liver	0.034	-	×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998
INSM1	罗汉果 Luohanguo(<i>Siraitiae Fructus</i>)	清热润肺, 利咽开音, 滑肠通便 Clearing heat and moistening the lung, disinhibiting the pharynx and restoring voice, moistening dryness to relax bowels	甘、凉; 归肺、大肠经 Sweet, cool; lung, large intestine	0.004	-	✓	刘灿 等, 2015
NGB	鳖甲胶 Biejiajiao(<i>Colla Carapacis Trionycis</i>)	滋阴退热, 软坚散结 Nourishing yin and clearing heat, softening hardness and dissipating bind	咸、寒; 归肺、肝、肾经 Salty, cold; lung, liver, kidney	0.006	-	×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998
	鳖头 Bietou	补气助阳 Benefiting qi and assisting yang	甘、咸、平; 归脾、大肠经 Sweet, salty, calm; spleen, large intestine	0.006		×	国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998

续表
Continuing table

基因 Gene	中药 Herbal	功效 Efficacy	性味归经 Sexual flavor meridian	P 值 P value	基因 类别 Gene class	肺癌 相关 Lung cancer related	参考文献 Reference
	鳖甲 Biejia (<i>Trionycis Carapax</i>)	滋阴潜阳, 退热除蒸, 软坚散结 Nourishing yin and subduing yang, clearing heat and eliminating steaming, softening hardness and dissipating bind	咸、微寒; 归肝、肾经 Salty, slightly cold; liver, kidney	0.009		✓	柳金可 等, 2023
	葛花 Gehua	解酒醒脾, 止血 Antialcoholism and harmonize the middle, stanch bleeding	甘、凉; 归胃经 Sweet, cool; stomach	0.016		×	国家中医药管理 局《中华本草》编 委会, 1998
	葛根 Gegen (<i>Puerariae Lobatae Radix</i>)	解肌退热, 发表透疹, 生津止渴, 升阳止泻 Releasing the flesh and clearing heat, effu- sing the external and and outthrusting rashes, producing fluid to quench thirst, rising yang to stop diarrhea	甘、辛、凉; 归脾、胃、肺经 Sweet, pungent, cool; spleen, stomach, lung	0.016		✓	张钰欣 等, 2022
	海参 Haishen (<i>Sticho- pus japonicus</i>)	补肾益精, 养血润燥, 止血 Tonifying the kidney and replenishing es- sence, nourishing blood to moisten dryness, stopping bleeding	甘、咸、平; 归肾、肺经 Sweet, salty, calm; kidney, lung	0.029		✓	李甜甜 等, 2014

注: * 表示免疫基因、+ 表示促癌基因, -表示抑癌基因, NA 表示无类别。√表示相关, ×表示不相关。
Note: * means immunogenes, + means oncogenes, - means tumor suppressor genes, NA means no category. √ means related, × means unrelated.

2 讨论与结论

肺腺癌是肺癌中最常见的一种亚型, 由于早期转移和不良预后, 导致其成为癌症死亡的主要原因之一(Wang et al., 2021)。本研究从 TCGA-LUAD 数据库中鉴定出 2 077 个与肺腺癌相关的 DEGs, 单因素 COX 分析显示其中 178 个基因与 OS 相关。基于 LASSO 回归方法鉴定了 4 个基因用于构建预后模型, 并根据中位数风险评分把 LUAD 患者分为高风险组和低风险组。独立预后分析显示风险评分是 LUAD 患者 OS 的独立预后指标。

从在线数据库中检索的免疫相关基因 1 794 个(Li et al., 2022), 其中预后相关基因 24 个。在预后模型中, 2 个基因是免疫相关基因(*PLXNB3*, *AGTR1*) 且单因素 COX 结果显示 *PLXNB3* 和 *AGTR1* 是 LUAD 患者死亡的危险因素。通路富集结果显示 *AGTR1* 和 *PLXNB3* 与内皮细胞增殖、免疫、炎症等机制相关。Zhang 等(2020) 通过使用 TCGA 泛癌症数据, 在所有癌症肿瘤中鉴定出 6 种类型的免疫浸润, 对应于肿瘤促进至肿瘤抑制, 分别是 C1(伤口愈合)、C2(*INF-r* 占优势)、C3(炎症)、C4(淋巴细

胞耗竭)、C5(免疫静息) 和 C6(*TGFβ* 占优势)。在 6 种免疫浸润亚型中, C3 和 C5 免疫亚型患者的存活率明显高于其他免疫亚型, C4 和 C6 亚型患者存活率最低。同时也发现 *PLXNB3* 在 C4 和 C5 中表达增加, 表明 *PLXNB3* 可能发挥肿瘤抑制作用(Zhang et al., 2020)。Xiong 等(2021) 通过研究发现 *AGTR1* 的高表达与抗肿瘤免疫微环境有关, 并通过富集分析和体外验证, 发现 *AGTR1* 很可能通过 *PI3K/Akt3* 途径在 LUAD 中发挥作用。*AGTR1* 是泛癌中潜在的肿瘤抑制基因, *AGTR1* 的表达与 B 细胞、髓样树突状细胞(DC)、单核细胞的浸润呈正相关, 这些细胞的高浸润与 LUAD 的较好预后有关。此外, 还观察到 *AGTR1* 表达与骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC) 的免疫浸润呈负相关, 而 MDSC 的高浸润与 LUAD 的不良预后有关(Xiong et al., 2021)。结合已有研究和本研究的结果, 提示 *AGTR1* 和 *PLXNB3* 可能是 LUAD 潜在的预后标志物和新的免疫治疗靶点, 为后续的肺腺癌机制研究和靶点药物研发提供新的思路。

本研究还发现了肺腺癌转移相关基因, 前期研究发现这些基因与肿瘤转移、抑制细胞周期和抗凋

亡相关(Brittain et al., 2010; Weisbrod et al., 2013; Zhang et al., 2014; Rosenbaum et al., 2015)。Yao 等(2020)发现 *CHGB* 与 LUAD 的转移密切相关, 且与 LUAD 患者预后相关(Yao et al., 2020)。*INSM1* 是一种参与发育途径末端步骤的转录因子, 人类 *INSM1* 蛋白通过结合细胞周期蛋白 D1, 可以直接阻止细胞周期的进展(Rosenbaum et al., 2015)。*NGB* 可通过重置线粒体细胞色素 c 释放的触发水平来发挥其抗凋亡活性(Brittain et al., 2010)。这为后续的抑制肺腺癌转移的靶点药物研发提供了方向。

中医在肺癌的治疗中发挥重要作用, Cang 等(2021)研究表明, 中药联合西医治疗在延长患者生存期, 减轻放化疗毒副反应, 提高生活质量等方面有良好疗效。中医药在防治肺癌转移中疗效显著。与现代医学相比, 中医在调节人体免疫方面具有独特优势, 因为中医强调整体观和阴阳平衡, 中医以扶正为原则, 拟定治疗方案, 增强人体正气和机体抗邪能力, 治法实质是改善人体的免疫功能, 激发机体自身的抗病能力, 也使患者对传统放化疗的耐受性提高(Wang et al., 2020; Zhang et al., 2021)。

基于关键基因预测得到的中药可能具有防治肺腺癌转移的潜在功效。本研究结果显示预测中药的药物类型中补益药使用频次最高。现代研究表明补益类中药可以增强人体的免疫功能, 促进淋巴细胞、巨噬细胞发挥其生理功能和调节肿瘤免疫微环境。脾肾与免疫细胞的发育成熟及免疫功能的正常发挥等密切相关, 脾虚可致患者细胞免疫功能降低, 肾气不足可致正气亏虚, 故治疗时应佐以健脾补肾之法(陈燕妮等, 2020)。本研究发现的转移组免疫特征基因 *SI00A7* 预测中药功效以补肾健脾为主, 佐以行气活血。《中华本草》(国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998)中记载的魔芋现代药理机制中具有抑制肺癌的功效, 且魔芋精粉对 MNNG 诱导的肺癌小鼠有不同程度的预防作用(许飞等, 2021)。水牛角煎煮液免疫活性研究发现, 水牛角对人体红细胞变形能力产生了较明显的增强作用(王昌亚, 2020)。罗汉果醇及部分罗汉果皂苷经大鼠代谢而获得的苷元衍生物对鼻咽癌、肺癌、宫颈癌、肝癌等肿瘤细胞生长有一定的抑制作用(李炳辰, 2017)。研究发现罗汉果醇对非小细胞肺癌 A549 细胞株表现出显著的抑制活性, 能够诱导 A549 细胞凋亡与 G0/G1 期阻滞(李娜, 2020)。鳖甲水提取物可以抑制血管生成, 与 VEGF 通路和 Notch-D114 通

路之间复杂的反馈调节有关(高建中, 2016)。葛根中的葛根素可以影响癌细胞凋亡, 多项研究表明, 葛根素在肺癌细胞 A549 及结肠癌细胞 SW480、HT-29 中均表现出抗肿瘤活性, 葛根素还可以通过 PI3K-Akt 和 MAPK-ERK1/2 通路诱导非小细胞肺癌细胞自噬(Gan and Yin, 2015; Chen et al., 2016; Zhou et al., 2020)。本研究最终筛选的药物与抑制肺腺癌转移紧密切合, 具有应用意义, 为中药抗肿瘤药物的研发提供了宝贵方向。

综上所述, 本研究通过生物信息学方法对 TCGA 数据库中肺腺癌相关的芯片数据集进行分析, 筛选出肺腺癌与正常样本之间以及转移与未转移肺腺癌组织之间的 DEGs, 通过差异基因分析、COX 回归分析和 LASSO 分析构建了能够稳健预测 LUAD 患者预后的模型。并通过免疫分析发现了转移组与未转移组之间的差异免疫特征。这些发现可能提供新的治疗靶点, 并用于个体化管理, 有望提高 LUAD 患者的生存率。然而研究存在以下不足: 研究结果完全基于生物信息学分析对公共数据库的挖掘, 仍需通过更深入的实验来进一步研究证实。

3 材料与方法

3.1 数据采集和数据预处理

使用 R 语言的 TCGAblinks 包从 TCGA 数据库下载肺腺癌(TCGA-LUAD)的转录组分析数据、临床数据。主要排除标准: 临床资料和预后数据缺失的患者。对获取到的基因表达数据进行预处理。去除表达量在 80% 的样本中均小于 1 的基因。从 ImmPort 网站(<https://www.immport.org/>)获得了 2 483 个免疫相关基因(imune-related genes, IRGs), 去重后得到 1 794 个 IRGs。

3.2 筛选差异基因与预后分析

从临床样本中选取 TNM 分期、美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)分期作为肺腺癌临床特征指标, 根据 TNM 分期将肺腺癌患者分为转移组和未转移组。利用 R version 4.0.2(<https://www.r-project.org/>)及其附带的“DESeq2”包、筛选出肺腺癌组织与正常组织, 转移和未转移肺癌的差异表达基因, 筛选标准为 $\log_2FC > 1.0$ 和 $P_{adj} < 0.05$ 。并通过单变量 COX 分析进行生存分析。使用 R 语言中的“glmnet”包的最小绝对收

缩和选择算法 (least absolute shrinkage and selection operator, LASSO), 选择完全收缩的变量, 使用非零系数的显著基因建立预后模型。根据预后基因的表达水平及其相应的风险系数计算 LUAD 患者的风险评分。用 R 语言的“ggplot2”包对差异分析结果和生存分析结果进行可视化。

3.3 GO 和 KEGG 通路的富集分析

为了研究预后基因在 LUAD 中的功能和作用途径, 进一步探讨该疾病的发病机制, 利用在线数据库 MetaScape (Zhou et al., 2019) 对筛选获得的预后基因进行 KEGG 通路和 GO 功能富集分析, 并使用 R 包 ggplot2 可视化。

3.4 免疫细胞浸润分析

从 ImmPort 网站 (<https://www.immport.org/>) 中获得了 1 794 个免疫相关基因并用单样本基因集富集分析 (ssGSEA) 评估免疫细胞浸润评分。

3.5 促癌基因和抑癌基因的识别

使用 R 语言的“MoonlightR”包 (Nourbakhsh et al., 2023) 中的 PRA 函数对筛选出的差异基因进行分析。选定 GO-生物过程中的“凋亡”和“细胞增殖”用来识别肿瘤抑制基因和促癌基因。PRA 函数完成的是根据预定义的生物学过程或者机器学习的方式识别候选肿瘤抑制基因和促癌基因, 即一组被归类为促癌基因的基因共享相似的生物过程作为凋亡 (下调) 和增殖 (上调), 而被归类为肿瘤抑制基因的基因共享凋亡 (上调) 和增殖 (下调)。

3.6 中药预测

Coremine Medical 数据库是一个集中药、基因本体论、蛋白质表达、解剖等医学综合信息的开放检索平台。将筛选的关键基因分别映射到 Coremine Medical (<http://www.coremine.com/>) 中, 筛选出与关键基因相关的中药, $P < 0.05$ 被视为差异具有统计学意义。

作者贡献

关双完成论文的数据分析和文章初稿的撰写工作; 刘溪、王念参与数据整理和图表处理工作; 陈亚飞、俞成诚、李兵完成论文修改和定稿; 王忠、刘骏是本研究方案的设计者及研究工作的负责人。全体作者都阅读并同意最终的文本。

参考文献

- 陈燕妮, 王兰兰, 查青, 等, 2020. 中医药在肿瘤免疫治疗方面的研究进展. 辽宁中医杂志, 47(4): 201-203. [CHEN Y N, WANG L L, ZHA Q, et al., 2020. Research progress on traditional Chinese medicine in immunotherapy of tumor. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 47(4): 201-203.]
- 高建中, 2016. 抗斑马鱼血管生成中药鳖甲、青皮对 VEGF、Notch/D114 通路的调控作用, 博士学位论文. 成都: 成都中医药大学. (GAO J Z, 2016. *Turtle shell, green husk which inhibit the zebrafish anaioaenesis regulate the VEGF, notch/D114 pathways*, Dissertation for Ph. D. Chengdu: Chengdu University of TCM.)
- 国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998. 中华本草: 精选本. 上海: 上海科学技术出版社: 238-708. (Chinese Materia Medica Editorial Committee of the State Administration of Traditional Chinese Medicine, 1998. Chinese Materia Medica: Selected Edition. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers: 238-708.)
- 李炳辰, 2017. 罗汉果醇衍生物的合成及其抗癌活性研究, 硕士学位论文. 南宁: 广西中医药大学. (LI B C, 2017. *Synthesis and anticancer activities of mogrol derivatives*, Thesis for M.S. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine.)
- 李娜. 2022. 罗汉果醇的结构修饰及其抗非小细胞肺癌活性评价, 硕士学位论文. 桂林: 桂林医学院. (LI N, 2022. *Structural modification of mogrol and antiproliferative activity evaluation against non-small cell lung cancer*, Thesis for M.S. Guilin: Guilin Medical University.)
- 李甜甜, 王相海, 林存智, 等, 2014. 海参多糖抗肺癌活性及对 T 细胞免疫功能调节研究进展. 中华临床医师杂志 (电子版), 8(10): 1945-1948. (LI T T, WANG X H, LIN C Z, et al., 2014. Research and progression on anti-lung neoplasm activity and the regulation of T cellular immunefunction by polysaccharide from sea cucumber. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 8(10): 1945-1948.)
- 刘灿, 蔡天宇, 赵晓萌, 等, 2015. 罗汉果提取物诱导肺癌细胞 A549 凋亡的研究. 中国药理学通报, 31(9): 1310-1314. [LIU C, CAI T Y, ZHAO X M, et al., 2015. Apoptosis effect of *Siraitia grosvenorii* extracts on lung cancer cells A549 and its mechanisms. Chinese Pharmacological Bulletin, 31(9): 1310-1314.]
- 柳金可, 周珊珊, 吴神佳, 等, 2023. 鳖甲水提物和醇提物对人肺癌 H446 及 H460 细胞株的体外抑制作用研究. 阜阳师范大学学报 (自然科学版), 40(1): 19-26. [LIU J K, ZHOU S S, WU S J, et al., 2023. *In vitro* inhibitory effects of water and alcohol extracts of turtle shell on human lung cancer H446 and H460 cell lines. Journal of Fuyang Normal

- University(Natural Science), 40(1): 19-26.]
- 王昌亚, 2020. 对水牛角煎煮液免疫活性研究. 临床医药文献电子杂志, 7(21): 150. [WANG C Y, 2020. Study on immune activity of buffalo horn decoction. Electronic Journal of Clinical Medical Literature, 7(21): 150.]
- 许飞, 李学军, 刘言凤, 等, 2021. 蛇六谷在肺癌治疗中的应用探究. 湖北中医药大学学报, 23(5): 119-122. [XU F, LI X J, LIU Y F, et al., 2021. Application of *Amor-phophallus rivieri* Durieu in treatment of lung cancer. Journal of Hubei University of Chinese Medicine, 23(5): 119-122.]
- 于弘, 胡倩, 周光飏, 2022. 肺癌中医证型与用药规律的研究. 中成药, 44(7): 2273-2278. [YU H, HU Q, ZHOU G B, 2022. Study on TCM syndrome types and medication rules of lung cancer. Chinese Traditional Patent Medicine, 44(7): 2273-2278.]
- 张晶, 舒琦瑾, 2010. 肺癌转移与中医证型相关性的探讨. 中华中医药学刊, 28(10): 2176-2178. [ZHANG J, SHU Q J, 2010. Discussion of the relationship between tumor metastasis and syndrome types of TCM in lung neoplasm patients. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 28(10): 2176-2178.]
- 张钰欣, 张臻臻, 赵利刚, 等, 2022. 葛根素通过 miR-490/E3 泛素连接酶抑制非小细胞肺癌细胞生长、侵袭和迁移. 中国医学科学院学报, 44(1): 91-101. [ZHANG Y X, ZHANG Z Z, ZHAO L G, et al., 2022. Puerarin inhibits the proliferation, invasion, and migration of non-small cell lung cancer cells through regulating miR-490/denticleless E3 ubiquitin protein ligase. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 44(1): 91-101.]
- 赵亚茜, 王琦, 谌晓莉, 等, 2023. 中医药通过调节免疫治疗非小细胞肺癌的研究进展. 云南中医中药杂志, 44(5): 116-121. [ZHAO Y Q, WANG Q, CHEN X L, et al., 2023. Research progress of traditional Chinese medicine in treating non-small cell lung cancer by regulating immunity. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 44(5): 116-121.]
- BRITTAI T, SKOMMER J, HENTY K, et al., 2010. A role for human neuroglobin in apoptosis. IUBMB Life, 62(12): 878-885.
- CANG S, LIU R, JIN W, et al., 2021. Integrated DIA proteomics and lipidomics analysis on non-small cell lung cancer patients with TCM syndromes. Chin. Med., 16(1): 126.
- CHEN T, CHEN H, WANG Y, et al., 2016. *In vitro* and *in vivo* antitumour activities of puerarin 6"-O-xyloside on human lung carcinoma A549 cell line via the induction of the mitochondria-mediated apoptosis pathway. Pharm. Biol., 54(9): 1793-1799.
- GAN M Z, YIN X D, 2015. Puerarin induced in mantle cell lymphoma apoptosis and its possible mechanisms involving multi-signaling pathway. Cell Biochem. Biophys., 71(1): 367-373.
- HERBST R S, MORGENZSTERN D, BOSHOF C, 2018. The biology and management of non-small cell lung cancer. Nature, 553(7689): 446-454.
- LI H, GE Y, FEI G Q, et al., 2022. Development and validation of a combined ferroptosis and immune prognostic signature for lung adenocarcinoma. Transl. Cancer Res., 11(10): 3620-3633.
- NOURBAKHSH M, SAKSAGER A, TOM N, et al., 2023. A workflow to study mechanistic indicators for driver gene prediction with Moonlight. Brief. Bioinform., 24(5): bbad274.
- ROSENBAUM J N, GUO Z Y, BAUS R M, et al., 2015. IN-SM1: a novel immunohistochemical and molecular marker for neuroendocrine and neuroepithelial neoplasms. Am. J. Clin. Pathol., 144(4): 579-591.
- SHI T D, HU Z X, TIAN L, et al., 2023. Advances in lung adenocarcinoma: a novel perspective on prognoses and immune responses of CENPO as an oncogenic superenhancer. Transl. Oncol., 34: 101691.
- SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al., 2023. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J. Clin., 73(1): 17-48.
- WANG S M, LONG S Q, DENG Z Y, et al., 2020. Positive role of Chinese herbal medicine in cancer immune regulation. Am. J. Chin. Med., 48(7): 1577-1592.
- WANG Z H, EMBAYE K S, YANG Q, et al., 2021. Establishment and validation of a prognostic signature for lung adenocarcinoma based on metabolism-related genes. Cancer Cell Int., 21(1): 219.
- WEISBROD A B, ZHANG L S, JAIN M, et al., 2013. Altered PTEN, ATRX, CHGA, CHGB, and TP53 expression are associated with aggressive VHL-associated pancreatic neuroendocrine tumors. Horm. Cancer, 4(3): 165-175.
- WU P C, ZHENG Y, WANG Y Y, et al., 2020. Development and validation of a robust immune-related prognostic signature in early-stage lung adenocarcinoma. J. Transl. Med., 18(1): 380.
- XIONG L C, WEI Y H, ZHOU X, et al., 2021. AGTR1 inhibits the progression of lung adenocarcinoma. Cancer Manag. Res., 13: 8535-8550.
- YAO X J, ZHANG H W, TANG S J, et al., 2020. Bioinformatics analysis to reveal potential differentially expressed long non-coding RNAs and genes associated with tumour metastasis in lung adenocarcinoma. Onco. Targets Ther., 13: 3197-3207.
- ZHANG N, XIAO X H, 2021. Integrative medicine in the era of cancer immunotherapy: challenges and opportunities. J. In-

- tegr. Med., 19(4): 291-294.
- ZHANG W, ZANG Z L, SONG Y C, et al., 2014. Co-expression network analysis of differentially expressed genes associated with metastasis in prolactin pituitary tumors. Mol. Med. Rep., 10(1): 113-118.
- ZHANG X L, SHAO S A, LI L, 2020. Characterization of class-3 semaphorin receptors, neuropilins and plexins, as therapeutic targets in a pan-cancer study. Cancers, 12(7): 1816.
- ZHANG X, ZHANG X Y, JIANG D Z, et al., 2023. INHA acts as a novel and potential biomarker in lung adenocarcinoma and shapes the immune-suppressive tumor microenvironment. Transl. Oncol., 33: 101679.
- ZHAO J, GUO C, MA Z M, et al., 2020. Identification of a novel gene expression signature associated with overall survival in patients with lung adenocarcinoma: a comprehensive analysis based on TCGA and GEO databases. Lung Cancer, 149: 90-96.
- ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al., 2019. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. Nat. Commun., 10(1): 1523.
- ZHOU Y, XUE R F, WANG J L, et al., 2020. Puerarin inhibits hepatocellular carcinoma invasion and metastasis through miR-21-mediated PTEN/AKT signaling to suppress the epithelial-mesenchymal transition. Braz. J. Med. Biol. Res., 53(4): e8882.

(责任编辑 宋雷)

(责任执行主编 陈玲玲)