

吉西他滨耐药关键基因分析及其泛癌表达、免疫浸润和生存关联研究



沈瑞博¹, 杨宇琳², 张馨², 梁馨艺², 杨环², 杜娟³

1. 甘肃中医药大学第一临床医学院 (兰州 730000)
2. 甘肃中医药大学中医临床学院 (兰州 730000)
3. 甘肃中医药大学护理学院 (兰州 730000)

【摘要】目的 探讨吉西他滨的关键耐药基因在泛癌中的表达、免疫浸润、生存关联及药物敏感性, 进而寻找新的临床替代疗法。**方法** 通过 GEO 数据库获取吉西他滨耐药数据集, 进行差异表达基因筛选, 并整合分析获得核心差异表达基因。基于 cProSite、TIMER 2.0 和 GSCA 平台分析关键基因在泛癌中的表达、免疫浸润、生存关联及药物敏感性。**结果** 吉西他滨耐药关键差异基因为 *SERPINB2* 和 *CALB1*。其中 *SERPINB2* 在结肠癌、肺鳞状细胞癌和皮肤黑色素瘤中的表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 而在乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌、肾嗜铬细胞癌、肝细胞癌和肺腺癌中的表达水平显著降低 ($P < 0.001$); *CALB1* 在头颈部鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌和子宫内膜癌中的表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 在乳腺癌、肾嗜铬细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌和甲状腺癌中的表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。 *SERPINB2* 和 *CALB1* 的表达与多种癌症中的 B 淋巴细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、CD4⁺T 细胞等的浸润水平呈负相关; 而与多种癌症中的诱导性调节性 T 细胞、自然调节性 T 细胞、巨噬细胞等的浸润水平呈正相关。相较于 *CALB1*, *SERPINB2* 在泛癌中的差异表达对癌症患者的生存有显著的影响。基因表达与药物敏感性的相关性分析结果显示, *SERPINB2* 与 belinostat 呈显著正相关关系 ($r=0.186$, $FDR < 0.001$); *CALB1* 与 BRD-K99006945 的正相关程度最高 ($r=0.137$, $FDR < 0.05$), 与 PD 153035 的负相关程度最高 ($r=-0.246$, $FDR < 0.001$)。**结论** 吉西他滨耐药的关键基因 *SERPINB2* 和 *CALB1* 的异常表达与多种癌症的发生发展密切相关; 二者的表达与癌症患者的不良预后有关。此外, 小分子 belinostat、BRD-K99006945 与吉西他滨耐药关键基因表达水平呈显著正相关, 可能是具有拮抗潜力的候选药物, 仍有待进一步研究。

【关键词】 吉西他滨; 耐药; 关键基因; 泛癌; 免疫浸润; 生存关联

【中图分类号】 R 73 **【文献标识码】** A

Analysis of key genes for gemcitabine resistance and their pan-cancer expression, immune infiltration and survival associations

SHEN Ruibo¹, YANG Yulin², ZHANG Xin², LIANG Xinyi², YANG Huan², DU Juan³

1. First School of Clinical Medical, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Clinical College of Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

3. School of Nursing, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: DU Juan, Email: yyl20051118@foxmail.com

【Abstract】Objective To explore the pan-cancer expression, immune infiltration,

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202504096

通信作者: 杜娟, 硕士研究生导师, Email: yyl20051118@foxmail.com

survival associations and drug sensitivity of key gemcitabine resistance genes, and to seek new alternative clinical therapies. **Methods** The gemcitabine resistance dataset was obtained through the GEO database. Differently expressed genes were screened, and the core differentially expressed genes were obtained through integrated analysis. The expression, immune infiltration, survival associations and drug sensitivity of key genes in pan-cancer were analyzed based on the cProSite, TIMER 2.0 and GSCA platforms. **Results** The key differential genes for gemcitabine resistance were *SERPINB2* and *CALB1*. The expression of *SERPINB2* was significantly increased in colon adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma, and skin cutaneous melanoma ($P < 0.001$), and significantly decreased in breast invasive carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, kidney chromophobe, liver hepatocellular carcinoma, and lung adenocarcinoma ($P < 0.001$). The expression of *CALB1* was significantly increased in head and neck squamous cell carcinoma, lung squamous cell carcinoma and uterine corpus endometrial carcinoma ($P < 0.001$), and significantly decreased in breast invasive carcinoma, kidney chromophobe, kidney renal clear cell carcinoma, kidney renal papillary cell carcinoma and thyroid carcinoma ($P < 0.001$). The expressions of *SERPINB2* and *CALB1* were negatively correlated with the infiltration levels of B cell, Gamma_delta T cell, CD4_T, etc., in various cancers; and were positively correlated with the infiltration levels of iTreg, nTreg, macrophage, etc. Compared to *CALB1*, the differential expression of *SERPINB2* had a greater impact on the survival of cancer patients in pan-cancer. The correlation analysis results between gene expression and drug sensitivity showed that *SERPINB2* was significantly positively correlated with belinostat ($r = 0.186$, $FDR < 0.001$). *CALB1* had the highest positive correlation with BRD-K99006945 ($r = 0.137$, $FDR < 0.05$), and the highest negative correlation with PD 153035 ($r = -0.246$, $FDR < 0.001$). **Conclusion** The abnormal expressions of key gemcitabine resistance genes *SERPINB2* and *CALB1* were closely related to the occurrence and development of various cancers. The expressions of *SERPINB2* and *CALB1* were associated with the poor prognosis of cancer patients. The expression levels of small molecules belinostat and BRD-K99006945 were significantly positively correlated with the key genes of gemcitabine resistance, and they might be candidate drugs with antagonistic potential, which required further research.

【Keywords】 Gemcitabine; Drug resistance; Key genes; Pan-cancer; Immune infiltration; Survival associations

吉西他滨 (gemcitabine, GCB) 是一种胞嘧啶核苷类似物。自 1996 年获美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准以来, GCB 一直广泛应用于包括乳腺癌、胆管癌、胃癌等在内的多种实体肿瘤的治疗^[1]。在细胞水平上, GCB 需要通过核苷转运体进入细胞, 在细胞内被磷酸化为多种形式并参与细胞复制, 通过抑制 DNA 合成发挥其细胞毒作用^[2]。细胞耐药分为原发性耐药和获得性耐药, 由于原发性耐药在治疗初期就不存在临床疗效, 故目前临床治疗多关注 GCB 的获得性耐药。虽然 GCB 一直是多种癌症一线治疗的药物, 与其他药物联用也有不错的临床效果, 但由于耐药问题, GCB 并未显著改善各类癌症患者的总体预后和生存率^[3-7]。肿瘤的发生发展是一个复杂的过程, 其间伴随着癌细胞的增殖、突变、免疫逃避和抗凋亡等多种

活动^[8]。因此, GCB 耐药的关键基因在泛癌中的表达、免疫浸润和预后十分重要。本研究通过探讨 GCB 的耐药机制, 筛选相关差异基因, 并对关键差异基因进行泛癌研究, 有助于寻找新的治疗靶点、改善患者的预后及生存质量, 为不同癌症的临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 GCB 耐药关键基因

从公共基因芯片数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO)^[9] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中下载 GCB 耐药相关数据集。采用 GEO 数据库的在线差异基因分析包 GEO2R 筛选差异表达基因 (differential expressed gene, DEG), 以 $P < 0.05$ 和 $|\log_{2}FC| \geq 2$ 为筛选标准。利用 R 4.3.3 软件和 jvenn Web 平台^[10] (<http://jvenn.toulouse>。

inra.fr/app/example.html) 对各数据集的差异基因进行合并, 删除重复基因, 获得交集基因, 并绘制 Venn 图。

1.2 关键基因表达情况

基于 Cancer Proteogenomic Data Analysis Site (cProSite) 数据库^[11] (<http://cprosite.ccr.cancer.gov/>) 和肿瘤免疫估计资源数据库 2.0 (Tumor Immune Estimation Resource 2.0, TIMER 2.0)^[12] (<http://timer.cistrome.org/>), 分析交集 DEG 在肿瘤和正常组织中的表达差异。cProSite 数据库提供美国国家癌症研究所临床蛋白质组肿瘤分析联盟 (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, CPTAC) 和国际癌症蛋白质基因组联盟 (International Cancer Proteogenome Consortium, ICPC) 数据集的蛋白质组学与 RNA 表达水平等数据。相较于 cProSite 数据库, TIMER 2.0 纳入了更多的泛癌表达数据。

1.3 免疫浸润和基因集水平的相关性

应用癌症基因组数据分析集成平台 (Gene Set Cancer Analysis, GSCA)^[13] (<https://github.com/chunjie-sam-liu/GSCA>) 评估关键基因在泛癌中的表达水平的免疫相关性。GSCA 是一个整合了癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>)、癌症药物敏感性基因组学 (Genomics of Drug Sensitivity in Cancer, GDSC) (<https://www.cancerrxgene.org/>) 和癌症治疗响应门户 (Cancer Therapeutics Response Portal, CTRP) 数据库 (<http://portals.broadinstitute.org/ctrp/>) 的集成平台。对于基因组学、药物基因组学和免疫基因组学基因集癌症分析方面具有较好的响应。

1.4 关键基因的生存关联

应用 GSCA 平台分析泛癌样本的生存信息数据, 主要分析指标为总生存期 (overall survival, OS)、疾病特异性生存期 (disease-specific survival, DSS)、无病间隔期 (disease-free interval, DFI) 和无进展间隔期 (progression-free interval, PFI)。其中 OS 指研究开始或治疗开始到患者因任何原因死亡的时间, 是衡量治疗效果和患者生存受益的常用指标; DSS 指从治疗开始到患者因特定疾病 (如癌症) 死亡的时间, 其统计时排除了非疾病原因的死亡, 强调疾病本身的致命性; DFI 指从治疗结束到肿瘤复发或新肿瘤

发生的时间, 主要用于衡量治疗后患者没有疾病活动的时间; PFI 指从治疗开始到肿瘤进展或患者死亡的时间, 不考虑死亡的具体原因, 主要用于评估治疗控制疾病进展的效果。以关键基因的 mRNA 表达水平中值为二分法分界点^[14], 将患者分为高表达组和低表达组, 并绘制气泡图。

1.5 基因表达与药物敏感性相关性

应用 GSCA 平台分析关键基因表达与药物敏感性的相关性。药物来源为 CTRP 中从 1 001 个细胞系收集到的 481 个小分子, 同时使用 GSCA 算法依据预设相关性阈值并自动绘制药物敏感性气泡图。

1.6 分子对接

选取药物敏感性分析中与关键基因有高关联性的 3 个小分子进行分子对接。通过 Pubchem 数据库^[15] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 PDB 数据库^[16] (<https://www.rcsb.org/>) 收集结构文件, 并于 CB-Dock2 平台进行基于结构的分子对接。根据亲和力和匹配得分情况选取结合能最低的位点为最佳对接模式。

1.7 统计学方法

使用 GEO2R 工具对基因表达量进行 log₂ 转换与标准化处理, 以鉴定上调和下调的 DEG。通过 GSCA 平台的 Wilcoxon 检验分析获得关键基因在泛癌中的表达, 采用 Pearson 相关性分析对其免疫浸润和基因集水平的相关性、基因表达与药物敏感性的相关性进行分析, *P* 值由 FDR 调整计算。关键基因的生存关联分析通过绘制 Kaplan-Meier 曲线获得。

2 结果

2.1 GCB的关键耐药基因

本研究系统性检索了 GEO 数据库, 综合考虑样本质量和数量选取了 GSE116118^[17]、GSE58118^[18] 和 GSE140077^[19] 基因芯片, 共得到并集显著差异基因 1 220 个, 其中 696 个基因上调、524 个基因下调; 交集显著差异基因 2 个, 均为下调基因, 分别为 *SERPINB2* 和 *CALB1*, 详见表 1、图 1 和图 2。

2.2 *SERPINB2*和*CALB1*的泛癌表达情况

对 *SERPINB2* 和 *CALB1* 在 33 种癌症的肿瘤组织和正常组织中的表达差异进行分析和评估。结果显示, *SERPINB2* 在结肠癌、肺鳞状细

胞癌 (lung squamous cell carcinoma, LUSC) 和皮肤黑色素瘤中的表达显著升高 ($P < 0.001$), 在乳腺癌 (breast invasive carcinoma, BRCA)、头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)、肾嗜铬细胞瘤 (kidney chromophobe, KICH)、肝细胞癌和肺腺癌中的表达显著降低 ($P < 0.001$)。CALBI 在 HNSC、LUSC 和子宫内膜癌中的表达显著升高 ($P < 0.001$), 而在 BRCA、KICH、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌和甲状腺癌中的表达显著降低 ($P < 0.001$), 详见图 3。

基于 CPTAC 数据库分析 SERPINB2 和 CALBI 在 11 个癌症中的 RNA 表达情况, 结果显示, SERPINB2 在头颈癌、肝癌、肺腺癌的 RNA 表达显著降低 ($P < 0.001$), 在 LUSC、胰腺导管腺癌的 RNA 表达显著升高 ($P < 0.001$); CALBI 在肾癌的 RNA 表达显著降低 ($P < 0.001$), 在头颈癌、肺腺癌的 RNA 表达显著升高 ($P < 0.001$), 详见图 4。

2.3 免疫浸润和基因集水平的相关性分析

本研究使用 GSEA 对 SERPINB2 和 CALBI 进行了免疫浸润和基因集变异分析 (Gene Set Variation Analysis, GSVA) 评分、基因集拷贝数变异 (copy number variation, CNV) 与基因集单核苷酸变异 (single nucleotide variation, SNV) 之间的相关性分析。

免疫浸润与 GSVA 评分的相关性分析结果显示, SERPINB2 和 CALBI 的表达与多种癌症中的 B 淋巴细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、T 滤泡辅助细胞、自然杀伤细胞、中央记忆 T 细胞

表1 吉西他滨耐药差异基因筛选分组

Table 1. Screening and grouping of genes with differential resistance to gemcitabine

数据集	癌症类型	耐药组	对照组
GSE116118	肝内胆管癌	GSM3209137	GSM3209135
		GSM3209138	GSM3209136
GSE58118	胃癌	GSM1401007	GSM1401005
		GSM1401008	GSM1401006
GSE140077	胰腺癌	GSM4153739	GSM4153736
		GSM4153741	GSM4153738
		GSM4153746	GSM4153743
		GSM4153740	GSM4153737
		GSM4153745	GSM4153742
		GSM4153747	GSM4153744

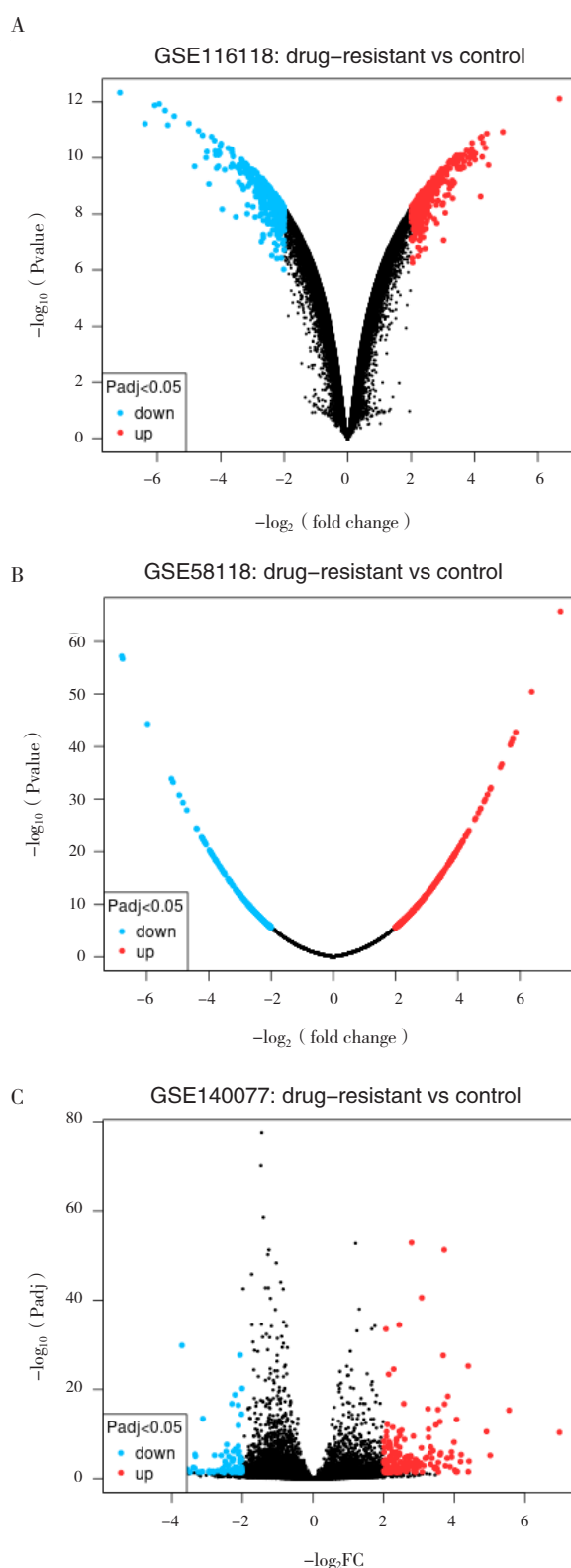


图1 吉西他滨耐药差异基因筛选火山图

Figure 1. Volcano plot of differentially expressed genes in gemcitabine-resistant screening

注: A. 肝内胆管癌; B. 胃癌; C. 胰腺癌。

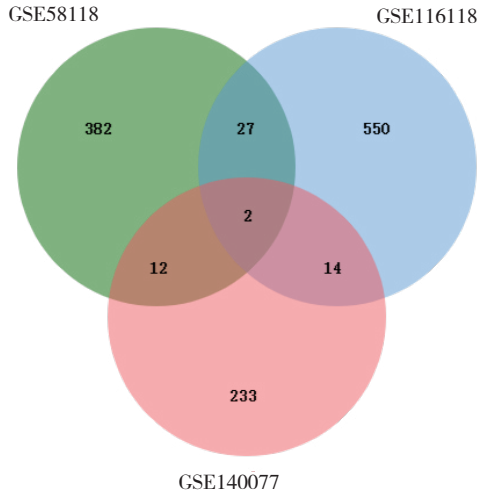


图2 差异基因Venn图

Figure 2. Venn Diagram of differential genes

的浸润水平呈负相关关系；与多种癌症中的诱导性调节性 T 细胞、自然调节性 T 细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞的浸润水平呈正相关关系，详见图 5。

免疫浸润与基因集 CNV 的相关性分析结果显示，SERPINB2 和 CALB1 高拷贝变异在泛癌中多与自然调节性 T 细胞、诱导性调节性 T 细胞、树突状细胞、B 淋巴细胞等免疫细胞有关，而低拷贝变异在泛癌中多与调节性 T 细胞 1、未激活的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞、辅助性 T 细胞 17 等免疫细胞相关。免疫浸润与基因集 SNV 的相关性分析结果显示，SERPINB2 和 CALB1 高单核苷酸位点变异与 CD4_{naive}、树突状细胞、γδ T 细胞等相关，其低单核苷酸位点变异与 CD4_T、黏膜相关不变

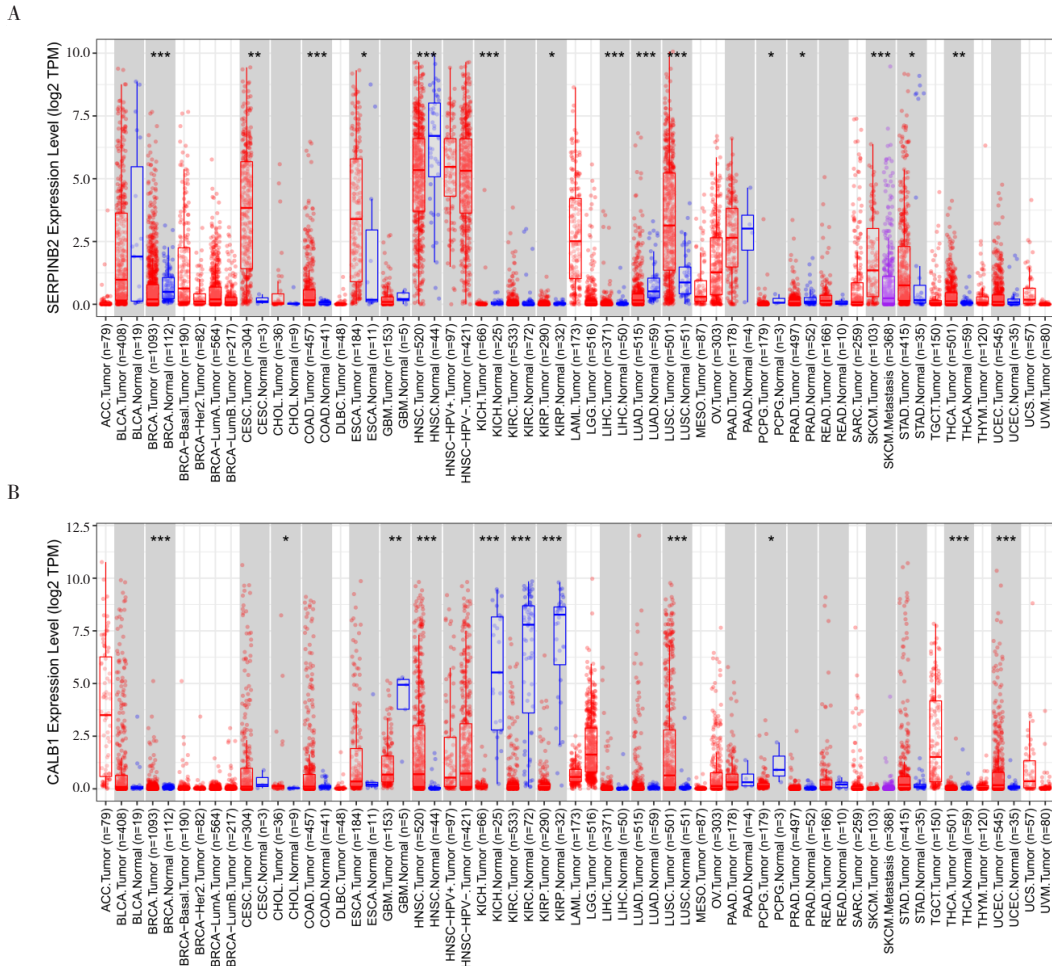


图3 SERPINB2和CALB1泛癌表达箱线图

Figure 3. Box plot of SERPINB2 and CALB1 pan cancer expression

注：A. SERPINB2 的差异表达情况；B. CALB1 的差异表达情况；*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. ACC, adrenocortical carcinoma, 肾上腺皮质癌；BLCA, bladder urothelial carcinoma, 膀胱尿路上皮癌；BRCA, breast invasive carcinoma, 乳腺癌；CESC, cervical squamous cell carcinoma, 宫颈鳞状细胞癌；CHOL, cholangiocarcinoma, 胆管癌；COAD, colon adenocarcinoma, 结肠癌；DLBC, diffuse large B-cell lymphoma, 弥漫性大B细胞淋巴瘤；ESCA, esophageal carcinoma, 食管癌；GBM, Glioblastoma Multiforme, 多形性胶质母细胞瘤；HNSC, head and neck squamous cell carcinoma, 头颈部鳞状细胞癌；KICH, kidney chromophobe, 肾嗜铬细胞癌；KIRC, kidney renal clear cell carcinoma, 肾透明细胞癌；KIPAN, kidney renal papillary cell carcinoma, 肾乳头状细胞癌；LAML, acute myeloid leukemia, 急性髓系白血病；LGG, Low-Grade Glioma, 低级别胶质瘤；LIHC, liver hepatocellular carcinoma, 肝细胞癌；LUAD, lung adenocarcinoma, 肺腺癌；LUSC, lung squamous cell carcinoma, 肺鳞状细胞癌；MESO, mesothelioma, 间皮瘤；OV, ovarian cancer, 卵巢癌；PAAD, pancreatic adenocarcinoma, 胰腺腺癌；PCPG, pheochromocytoma and paraganglioma, 嗜铬细胞瘤与副神经节瘤；PRAD, prostate adenocarcinoma, 前列腺腺癌；READ, rectal adenocarcinoma, 直肠腺癌；TGCT, testicular germ cell tumor, 睾丸生殖细胞瘤；THCA, thyroid carcinoma, 甲状腺癌；THYM, Thymoma, 胸腺瘤；UCEC, uterine corpus endometrial carcinoma, 子宫内腺癌；UCS, uterine carcinosarcoma, 子宫癌肉瘤；UVM, uveal melanoma, 眼葡萄膜黑色素瘤。

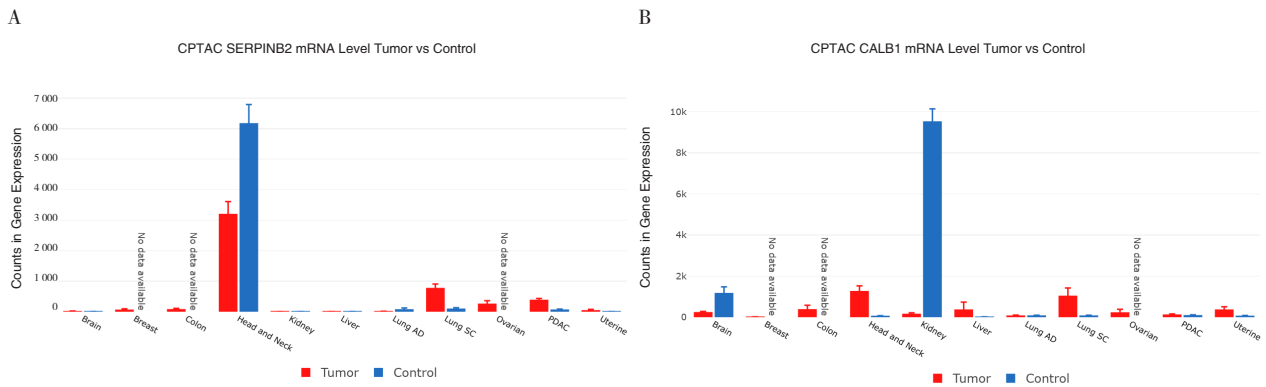


图4 SERPINB2、CALB1的泛癌RNA表达柱状图

Figure 4. Histogram of pan-cancer RNA expression of SERPINB2 and CALB1

注：A. SERPINB2的差异表达情况；B. CALB1的差异表达情况。Tumor, 肿瘤；Contol, 对照；Brain, 脑；Breast, 乳腺；Colon, 结肠；Head and Neck, 头颈；Kidney, 肾；Liver, 肝；Lung AD, 肺腺癌；Lung SC, 肺鳞状细胞癌；Ovarian, 卵巢；PDAC, 胰腺导管腺癌；Uterine Cancer, 子宫癌。

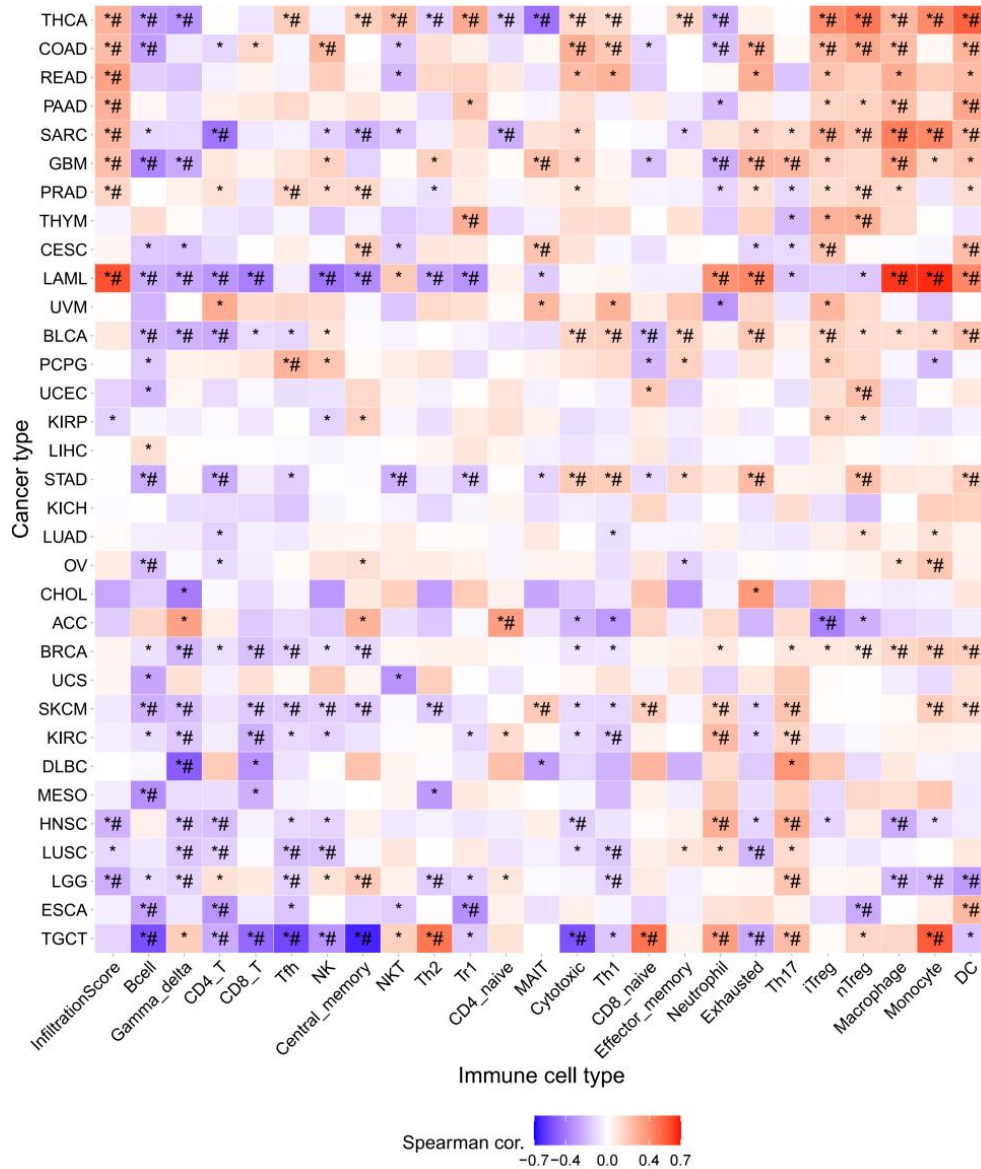


图5 免疫浸润与基因集变异分析评分相关性分析热图

Figure 5. Heat map of correlation analysis between immune infiltration and Gene Set Variation Analysis scores

注：*P < 0.05；#FDR < 0.05。

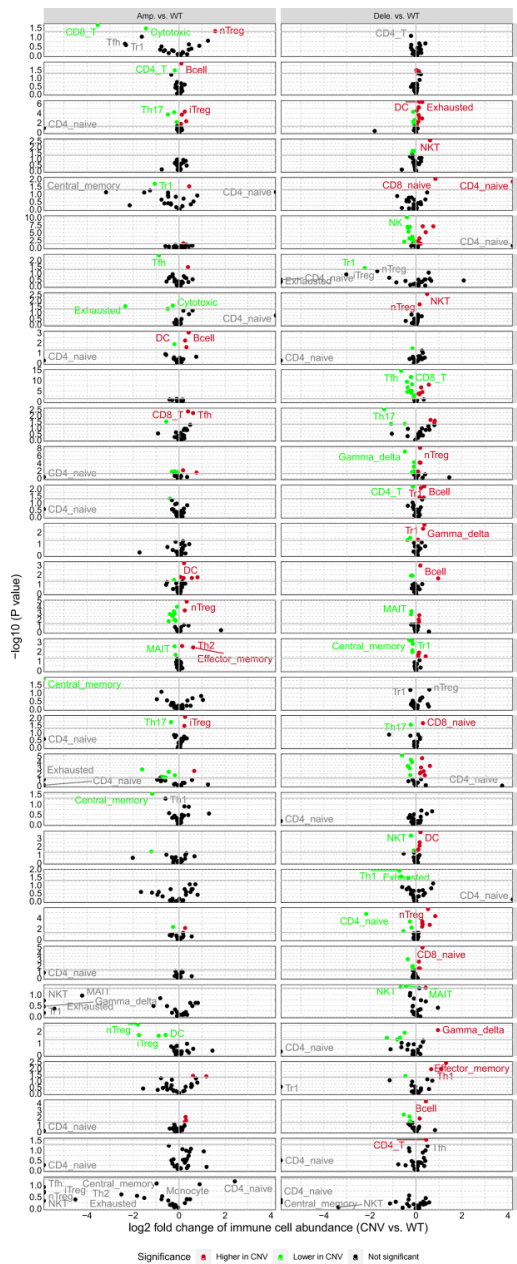
T 细胞、辅助性 T 细胞 2、CD8_naive 等有关，详见图 6。

2.4 关键基因的生存关联分析

使用 GSCA 数据库分析不同癌症中 *SERPINB2* 和 *CALB1* 的表达差异对患者预后不同的影响，通过单变量 COX 回归分析，明确 *SERPINB2* 和 *CALB1* 表达与泛癌患者生存的关联。生存分析气泡图显示，相较于 *CALB1*，*SERPINB2* 在泛癌中的差异表达对癌症患者的

生存有更大的影响。在泛癌 DFI 中，*SERPINB2* 对患者的生存情况无显著影响；而 *CALB1* 会显著提高膀胱尿路上皮癌、卵巢癌患者的生存风险 ($P < 0.05$)。在 DSS 阶段，*SERPINB2* 对各类癌症患者生存威胁最大的是眼葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UVM) ($HR=4.530$, $P < 0.05$)，生存保护最大的是 LUSC ($HR=0.643$, $P < 0.05$)；而 *CALB1* 仅与 UCS 生存风险有显著关联 ($HR=2.117$, $P < 0.05$)。在 OS 中，

A



B

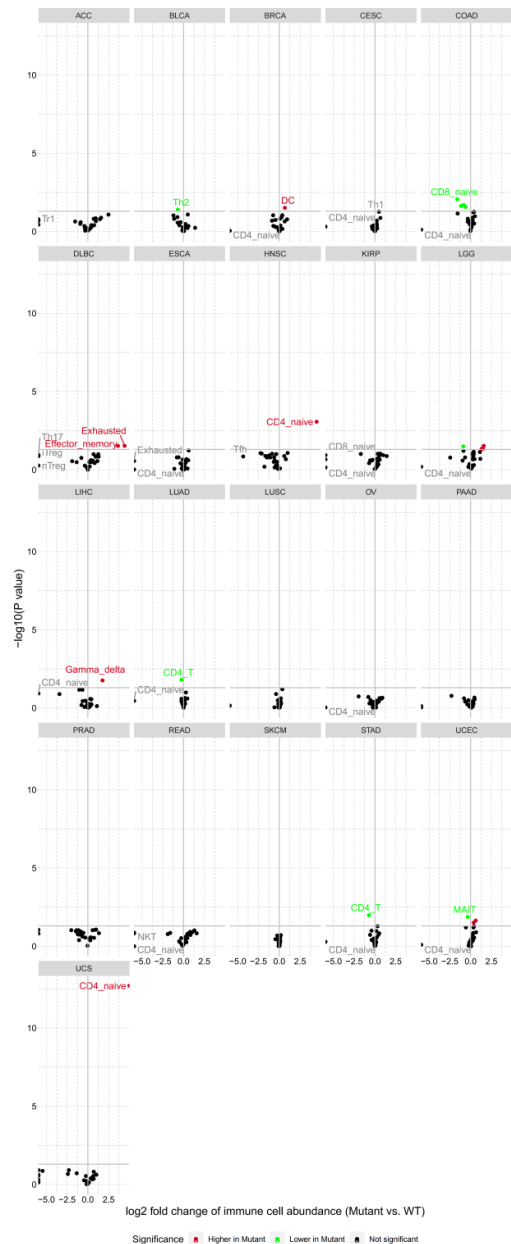


图6 免疫浸润与基因集单核苷酸变异、基因集拷贝数变异差异散点图

Figure 6. Scatter-plot of immune infiltration and differences in single nucleotide variation and copy number variation

注：A. 基因集拷贝数变异 (copy number variation, CNV)；B. 基因集单核苷酸变异 (single nucleotide variation, SNV)。

SERPINB2 对各类癌症患者生存威胁最大的仍是 UVM (HR=4.981, $P < 0.05$), 无显著关联的生存保护癌种; *CALB1* 仅与 UCS 生存风险有显著关联 (HR=2.445, $P < 0.05$)。在 PFS 中, *SERPINB2* 对各类癌症患者生存威胁最大的仍是 UVM (HR=2.887, $P < 0.05$), 无显著关联的生存保护癌种; *CALB1* 仅与 LCG 生存风险有显著关联 (HR=0.746, $P < 0.05$), 发挥生存保护作用。进一步对 *SERPINB2* 和 *CALB1* 的 GSVA 评分和癌症患者生存关联的分析, 研究结果与单基因生存分析结果基本相符, 其主要影响 LUSC、膀胱尿路上皮癌患者生存风险, 详见图 7、图 8。

2.5 基因表达与药物敏感性相关性分析

与基因表达水平呈正相关关系的药物可能减弱肿瘤细胞对吉西他滨的耐药性, 呈负相关关系的药物可能增强肿瘤细胞对吉西他滨的耐药性。结果显示, *SERPINB2* 与 belinostat 呈显著正相关关系 ($r=0.186$, $FDR < 0.001$); *CALB1* 与 BRD-K99006945 的正相关程度最高 ($r=0.137$, $FDR < 0.05$), 与 PD 153035 的负相关程度最高 ($r=-0.246$, $FDR < 0.001$), 详见图 9。

2.6 分子对接

根据药物敏感性分析结果, 选择 belinostat、BRD-K99006945、PD 153035 小分子分别与关键基

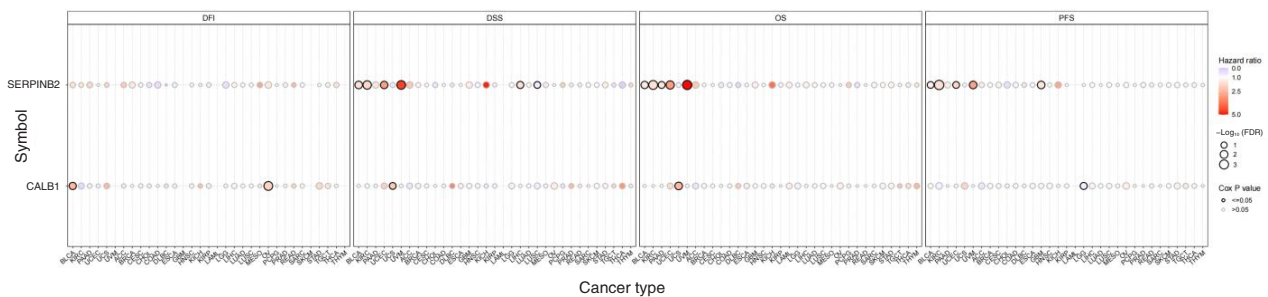


图7 *SERPINB2*和*CALB1*的表达差异对患者预后的影响

Figure 7. Bubble-diagram of impact of differential expression of *SERPINB2* and *CALB1* on patient prognosis

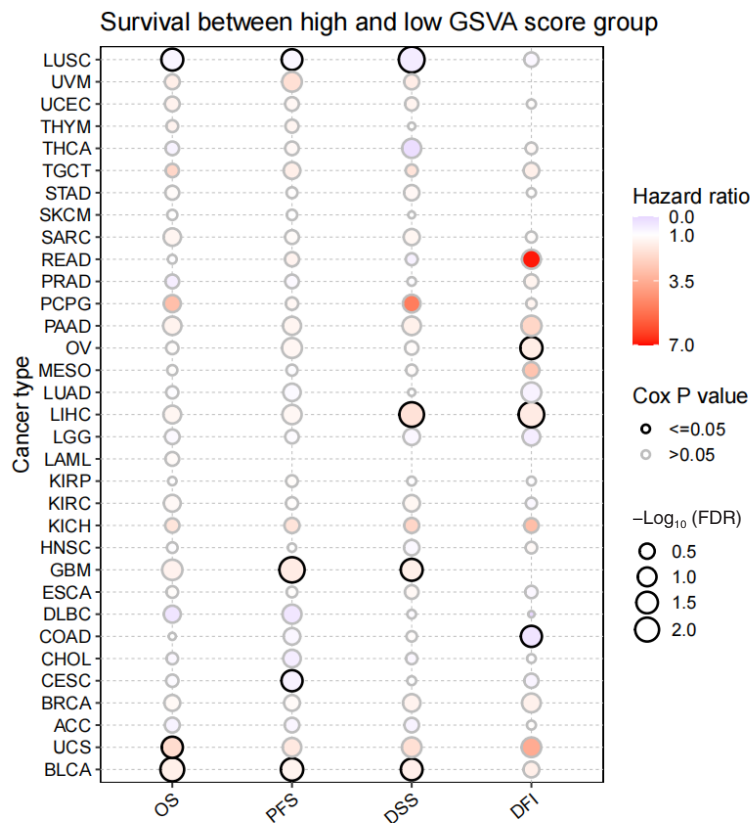


图8 基因集变异分析评分的泛癌关联性分析

Figure 8. Bubble-diagram of pan-cancer correlation analysis of Gene Set Variation Analysis scores

因 *SERPINB2*、*CALB1* 进行分子对接。从 Pubchem 数据库和 PDB 数据库收集其 SDF、PDB 文件，选取 *SERPINB2* 的 1JRR^[20] 蛋白文件和 *CALB1* 的

6FIE^[21] 蛋白文件，详见表 2、表 3。各分子结合能均小于 -5.0 kcal/mol，说明结合亲和力良好，并对药物敏感性分析进行了初步验证，见表 4、图 10。

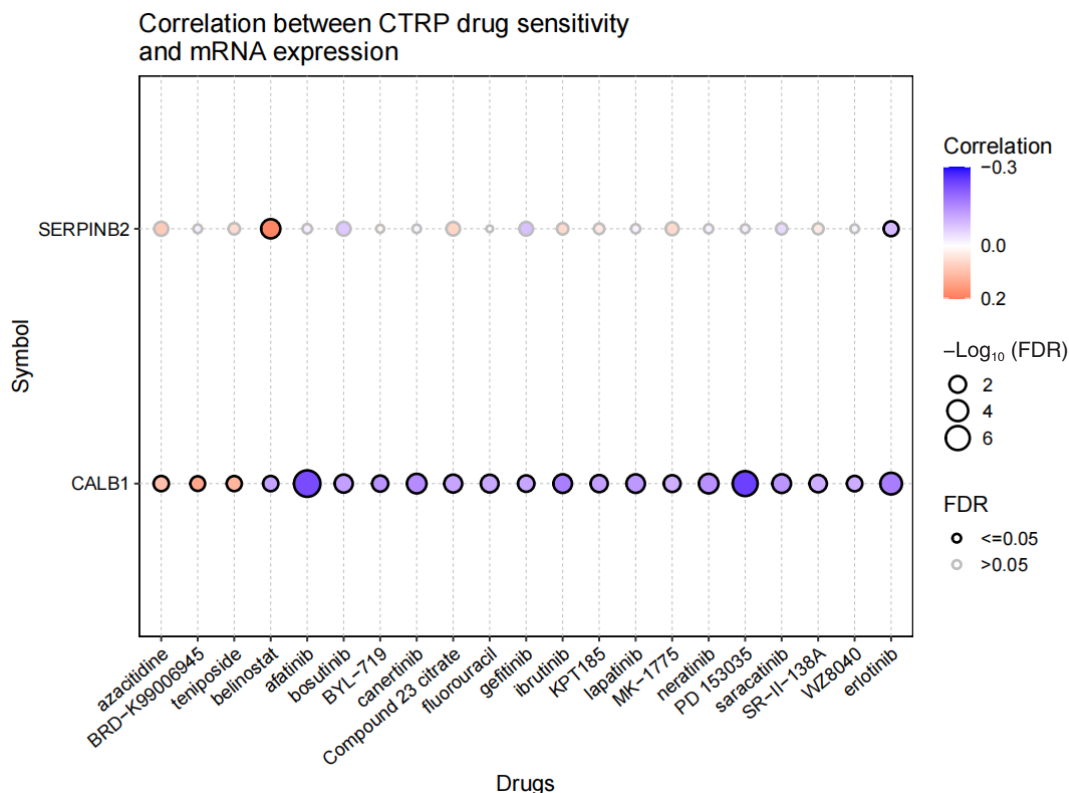


图9 基因表达与药物敏感性相关性分析气泡图

Figure 9. Bubble diagram of analysis of correlation between gene expression and drug sensitivity

表2 小分子指标

Table 2. Small molecule biomarkers

药物	分子式	平均分子量 (g/mol)	数据库编号
belinostat	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	318.30	CHEMBL408513
BRD-K99006945	$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$	259.35	CHEMBL5278925
PD 153035	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{O}_2$	360.20	CHEMBL29197

表3 关键基因蛋白指标

Table 3. Protein indicators of key genes

编号	分类	分辨率	整体对称性	整体化学计量比
1JRR	PEPTIDE BINDING PROTEIN	1.60Å	Asymmetric-C1	Hetero 2-mer-A1B1
6FIE	METAL BINDING PROTEIN	1.51Å	Asymmetric-C1	Monomer-A1

表4 分子对接指标

Table 3. Molecular docking metrics

药物	Vina评分	空腔体积 (\AA^3)	中心坐标 (x,y,z)	对接尺寸 (x,y,z)
belinostat	-6.9	234	39,1,-5	20,20,20
BRD-K99006945	-5.5	234	39,1,-5	21,21,21
PD 153035	-6.4	234	39,1,-5	21,21,21
belinostat	-7.7	340	-13,8,-19	20,20,20
BRD-K99006945	-6.5	395	-33,3,-21	21,21,21
PD 153035	-7.2	395	-33,3,-21	21,21,21

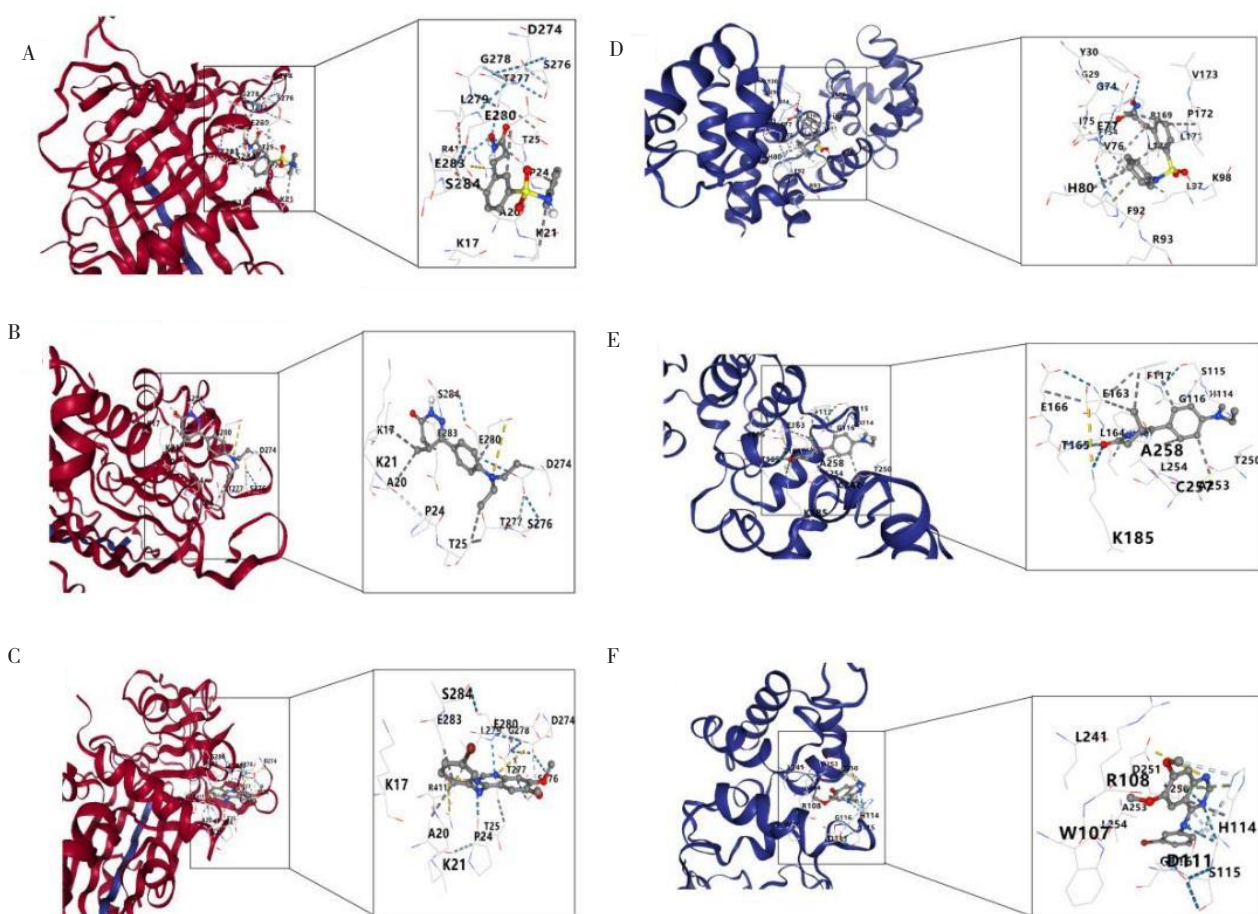


图10 分子对接模式

Figure 10. Molecular docking pattern

注：A. belinostat对接SERPINB2；B. BRD-K99006945对接SERPINB2；C. PD 153035对接SERPINB2；D. belinostat对接CALB1；E. BRD-K99006945对接CALB1；F. PD 153035对接CALB1。

3 讨论

本研究对多种癌症的吉西他滨耐药相关基因进行分析，通过对从不同基因芯片所获得的差异基因进行交集处理，获取了吉西他滨关键耐药基因 *SERPINB2* 和 *CALB1*，并对其进行了泛癌分析，以探讨吉西他滨临床耐药性的处理方法，明确其关键耐药基因对不同癌症患者预后的影响。

研究结果显示，吉西他滨关键耐药基因为 *SERPINB2* 和 *CALB1*。*SERPINB2* 又称 Plasminogen Activator Inhibitor Type 2 (PAI-2)，是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 B 成员 2，属于 serpin 超家族。既往研究表明，*SERPINB2* 是衰老的生物标志物，其过表达会结合并稳定 p21 蛋白的水平，以维持细胞衰老^[22-23]。*SERPINB2* 在各类肿瘤吉西他滨耐药基因集中下调，其低表达可能影响其与 p21 蛋白的结合，使其细胞衰老机制失效，肿瘤细胞

得以逃避生长停滞，进而产生耐药性，并导致预后不良。*CALB1* 是一种钙结合蛋白，其表达在衰老细胞中被诱导，并控制细胞内的钙离子 (Ca^{2+}) 水平^[24]。研究团队在卵巢癌细胞实验中，敲低 *CALB1* 会抑制卵巢癌细胞的增殖和集落形成，而过表达则相反，并且会通过调节 p21 的表达水平抑制衰老^[25]。但是，下调 *CALB1* 会导致 p21 蛋白水平升高，下调 *SERPINB2* 却会导致 p21 减少。这种相反的蛋白表达在两基因共同下调时的具体表现需要进一步实验探究。

本研究关于 *SERPINB2* 和 *CALB1* 的泛癌表达情况与既往研究基本相符。PAI-2 是一种由 *SERPINB2* 基因编码的丝氨酸蛋白酶抑制剂。研究表明，肿瘤中较低的 PAI-2 水平与 BRCA、肺癌、卵巢癌的不良预后之间存在显著相关性^[26]，而 PAI-2 高表达与头颈癌、口腔癌、胃癌、肺癌、和胰腺癌的生存率提高相关^[27]。有研究^[28]使用

敲除 PAI-1 的小鼠进行实验, 当癌蛋白 PAI-1 缺失时, PAI-2 过表达会促进膀胱癌的恶性发展, 这可能体现了 PAI-2 在膀胱癌发生过程中的潜在作用。另一方面, *CALB1* 在卵巢癌^[25]的表达增加, 可以直接或间接参与 LUSC 的形成和转移^[29], 因此可以被视为药物治疗的靶基因。研究指出, 人类内源性逆转录病毒 *CALB1* 可以转录激活体内外诱导癌细胞生长的钙结合蛋白活性。但总体来看, *CALB1* 表达与 LUSC 的较好预后显著相关, 它还与宫颈鳞状细胞癌和胰腺癌的预后较好相关, 但与卵巢浆液性囊腺癌和子宫体子宫内膜癌的预后较差相关。此外, *CALB1* 已被证实可以作为结肠癌预后的独立危险因素, 其表达增加表明患者预后不良^[30], 与本研究结果基本相符。

实验免疫组化显示, *SERPINB2* 在具有三阴性亚型的侵袭性乳腺肿瘤组织的肿瘤细胞中高度表达, 并且与 BRCA 患者的短总生存期相关^[31]。高 *SERPINB2* 水平与 BRCA 患者生存率降低和淋巴结转移增加相关^[32]。*SERPINB2* 过表达在体内和体外抑制鼻咽癌的迁移和侵袭, 而在头颈部鳞状细胞癌中 *SERPINB2* 下调预示 HNSC 预后不良。Piao 等的研究结果进一步表明, *SERPINB2* 在免疫、炎症、趋化性和细胞外基质调节中发挥重要作用, *SERPINB2* 缺陷型小鼠表现出与免疫、炎症、趋化性、细胞黏附、细胞外基质调节、肽酶活性和细胞增殖等多方面相关的多个基因的表达改变, 表明基因缺陷延缓了 BRCA 的发展和转移^[33]。

本研究的免疫浸润与 GSVA 评分相关性分析结果显示, *SERPINB2* 和 *CALB1* 的表达与多种癌症中的 B 淋巴细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、T 滤泡辅助细胞、NK 和中央记忆 T 细胞的浸润水平呈负相关关系, 这提示 *SERPINB2* 和 *CALB1* 可能通过促进免疫逃逸导致肿瘤的进展。*SERPINB2* 和 *CALB1* 的表达与多种癌症中的诱导性调节性 T 细胞、自然调节性 T 细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞的浸润水平呈正相关关系, 说明 *SERPINB2* 和 *CALB1* 可以抑制肿瘤细胞的免疫逃逸。肿瘤细胞相关的 *SERPINB2* 高表达通过增强巨噬细胞向肿瘤组织的募集来促进 BRCA 细胞的存活和转移^[27]。此外, *SERPINB2* 和 *CALB1* 还与众多免疫相关功能和通路密切相关, 进一步凸显了 *SERPINB2* 和 *CALB1* 在免疫调控中具有重要功能^[34-36]。

SERPINB2 和 *CALB1* 的药物敏感性相关分析初步揭示了其表达与多种小分子物质的药物敏感性情况, 同时通过分子对接初步验证了其结果的可靠性。belinostat 是一种用于一种组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂, 多用于治疗复发或难治性的外周 T 细胞淋巴瘤^[37], 且与其他化疗药物联用时不会引起脊髓毒性^[38]。在多种使用患者肿瘤构建的模型中, GCB 耐药的患者表现出 HDAC6 和 HDAC7 的上调, 转录组学和临床模型初步推测 belinostat 能够成为一线化疗失败后立即实行的有效替代疗法^[39]。本研究中 belinostat 与关键基因蛋白的亲合力也最高, 与上述研究结果相符。BRD-K99006945 是一种小分子抑制剂, 目前缺少其与 GCB 耐药相关性的研究, 有待进一步深入研究。PD 153035 是一种表皮生长因子 (EGFR) 抑制剂, 能够通过抑制 EGFR 受体的酪氨酸激酶活性来阻断肿瘤细胞生长和扩散^[40], 与其他抗肿瘤药物联用展示出了较好的抑制细胞增殖和分化的能力^[41]。本研究通过药物敏感性分析和分子对接初步探讨了 GCM 耐药后可能的替代用药。但耐药机制的产生是复杂的, 临床替代疗法和联合用药也须谨慎, 相关疗法的确定需要进一步研究证明。尽管药物敏感性分析结果具有统计学显著性, 但是由于相关性系数较小, 可能缺少一定的生物学显著性, 其临床应用价值有待后续实验验证。

本研究存在一定局限性: 研究结果仅基于生物信息学, 缺少体内实验验证, 未来需要进一步的实验验证。

综上, 本研究初步探讨了吉西他滨耐药的关键基因, 并对关键基因 *SERPINB2*、*CALB1* 进行了泛癌研究, 探究了其对癌症患者的预后及生存质量干预。明确其表达多与不良预后有关, 并确定了具有潜在治疗可能的小分子 belinostat、BRD-K99006945 等, 其疗效有待进一步开展临床前研究。

参考文献

- 1 Pandit B, Royzen M. Recent development of prodrugs of gemcitabine[J]. *Genes(Basel)*, 2022, 13(3): 466. DOI: 10.3390/genes13030466.
- 2 Miao H, Chen X, Luan Y. Small molecular gemcitabine prodrugs for cancer therapy[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(33): 5562-5582. DOI: 10.2174/0929867326666190816230650.
- 3 van der Heijden MS, Sonpavde G, Powles T, et al. Nivolumab plus gemcitabine-cisplatin in advanced urothelial carcinoma[J]. *N Engl*

- J Med, 2023, 389(19): 1778–1789. DOI: [10.1056/NEJMoa2309863](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2309863).
- 4 McElree IM, Steinberg RL, Mott SL, et al. Comparison of sequential intravesical gemcitabine and docetaxel vs bacillus calmette–gu é rin for the treatment of patients with high–risk non–muscle–invasive bladder cancer[J]. JAMA Netw Open, 2023, 6(2): e230849. DOI: [10.1001/jamanetworkopen.2023.0849](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.0849).
 - 5 Coleman JA, Yip W, Wong NC, et al. Multicenter phase II clinical trial of gemcitabine and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy for patients with high–grade upper tract urothelial carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2023, 41(8): 1618–1625. DOI: [10.1200/JCO.22.00763](https://doi.org/10.1200/JCO.22.00763).
 - 6 Kim MJ, Kim HS, Kang HW, et al. SLC38A5 modulates ferroptosis to overcome gemcitabine resistance in pancreatic cancer[J]. Cells, 2023, 12(20): 2509. DOI: [10.3390/cells12202509](https://doi.org/10.3390/cells12202509).
 - 7 Natu J, Nagaraju GP. Gemcitabine effects on tumor microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma: special focus on resistance mechanisms and metronomic therapies[J]. Cancer Lett., 2023, 573: 216382. DOI: [10.1016/j.canlet.2023.216382](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216382).
 - 8 Cordani M, Dando I, Ambrosini G, et al. Signaling, cancer cell plasticity, and intratumor heterogeneity[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 255. DOI: [10.1186/s12964-024-01643-5](https://doi.org/10.1186/s12964-024-01643-5).
 - 9 Clough E, Barrett T, Wilhite SE, et al. NCBI GEO: archive for gene expression and epigenomics data sets: 23–year update[J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(D1): D138–D144. DOI: [10.1093/nar/gkad965](https://doi.org/10.1093/nar/gkad965).
 - 10 Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al. jvenn: an interactive Venn diagram viewer[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 293. DOI: [10.1186/1471-2105-15-293](https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293).
 - 11 Wang D, Qian X, Du YN, et al. cProSite: a web based interactive platform for online proteomics, phosphoproteomics, and genomics data analysis[J]. J Biotechnol Biomed, 2023, 6(4): 573–578. DOI: [10.26502/jbb.2642-91280119](https://doi.org/10.26502/jbb.2642-91280119).
 - 12 Li T, Fu J, Zeng Z, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor–infiltrating immune cells[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(W1): W509–W514. DOI: [10.1093/nar/gkaa407](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa407).
 - 13 Liu CJ, Hu FF, Xie GY, et al. GSCA: an integrated platform for gene set cancer analysis at genomic, pharmacogenomic and immunogenomic levels[J]. Brief Bioinform, 2023, 24(1): bbac558. DOI: [10.1093/bib/bbac558](https://doi.org/10.1093/bib/bbac558).
 - 14 Landau J, Tsaban L, Yaacov A, et al. Shared cancer dataset analysis identifies and predicts the quantitative effects of pan–cancer somatic driver variants[J]. Cancer Res, 2023, 83(1): 74–88. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-22-1038](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-1038).
 - 15 Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem 2023 update[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(D1): D1373–D1380. DOI: [10.1093/nar/gkac956](https://doi.org/10.1093/nar/gkac956).
 - 16 Rose AS, Bradley AR, Valasatava Y, et al. NGL viewer: web–based molecular graphics for large complexes[J]. Bioinformatics, 2018, 34(21): 3755–3758. DOI: [10.1093/bioinformatics/bty419](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty419).
 - 17 Varamo C, Peraldo–Neia C, Ostano P, et al. Establishment and characterization of a new intrahepatic cholangiocarcinoma cell line resistant to gemcitabine[J]. Cancers(Basel), 2019, 11(4): 519. DOI: [10.3390/cancers11040519](https://doi.org/10.3390/cancers11040519).
 - 18 Nakano T, Saiki Y, Kudo C, et al. Acquisition of chemoresistance to gemcitabine is induced by a loss–of–function missense mutation of DCK[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(4): 1084–1089. DOI: [10.1016/j.bbrc.2015.07.080](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.080).
 - 19 Zhou J, Zhang L, Zheng H, et al. Identification of chemoresistance–related mRNAs based on gemcitabine–resistant pancreatic cancer cell lines[J]. Cancer Med, 2020, 9(3): 1115–1130. DOI: [10.1002/cam4.2764](https://doi.org/10.1002/cam4.2764).
 - 20 Jankova L, Harrop SJ, Saunders DN, et al. Crystal structure of the complex of plasminogen activator inhibitor 2 with a peptide mimicking the reactive center loop[J]. J Biol Chem, 2001, 276(46): 43374–43382. DOI: [10.1074/jbc.M103021200](https://doi.org/10.1074/jbc.M103021200).
 - 21 Noble JW, Almalki R, Roe SM, et al. The X–ray structure of human calbindin–D28K: an improved model[J]. Acta Crystallogr D Struct Biol, 2018, 74(Pt 10): 1008–1014. DOI: [10.1107/S2059798318011610](https://doi.org/10.1107/S2059798318011610).
 - 22 Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(7): 397–408. DOI: [10.1038/nrc3960](https://doi.org/10.1038/nrc3960).
 - 23 Hsieh HH, Chen YC, Jhan JR, et al. The serine protease inhibitor serpinB2 binds and stabilizes p21 in senescent cells[J]. J Cell Sci, 2017, 130(19): 3272–3281. DOI: [10.1242/jcs.204974](https://doi.org/10.1242/jcs.204974).
 - 24 Raynard C, Tessier N, Huna A, et al. Expression of the calcium–binding protein CALB1 is induced and controls intracellular Ca²⁺ levels in senescent cells[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9376. DOI: [10.3390/ijms23169376](https://doi.org/10.3390/ijms23169376).
 - 25 Cao LQ, Wang YN, Liang M, et al. CALB1 enhances the interaction between p53 and MDM2, and inhibits the senescence of ovarian cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(6): 5097–5104. DOI: [10.3892/mmr.2019.10212](https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10212).
 - 26 Westrick RJ, Røjkjaer LP, Yang AY, et al. Deficiency of plasminogen activator inhibitor–2 results in accelerated tumor growth[J]. J Thromb Haemost, 2020, 18(11): 2968–2975. DOI: [10.1111/jth.15054](https://doi.org/10.1111/jth.15054).
 - 27 Kumar AA, Buckley BJ, Ranson M. The urokinase plasminogen activation system in pancreatic cancer: prospective diagnostic and therapeutic targets[J]. Biomolecules, 2022, 12(2): 152. DOI: [10.3390/biom12020152](https://doi.org/10.3390/biom12020152).
 - 28 Furuya H, Hayashi K, Shimizu Y, et al. Plasminogen activator inhibitor–2 (PAI–2) overexpression supports bladder cancer development in PAI–1 knockout mice in N–butyl–N–(4–hydroxybutyl)–nitrosamine– induced bladder cancer mouse model[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 57. DOI: [10.1186/s12967-020-02239-6](https://doi.org/10.1186/s12967-020-02239-6).
 - 29 Qi L, Gao C, Feng F, et al. MicroRNAs associated with lung squamous cell carcinoma: New prognostic biomarkers and therapeutic targets[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(11): 18956–18966. DOI: [10.1002/jcb.29216](https://doi.org/10.1002/jcb.29216).
 - 30 Yang W, Lu S, Peng L, et al. Integrated analysis of necroptosis–related genes for evaluating immune infiltration and colon cancer prognosis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1085038. DOI: [10.3389/fimm.2022.1085038](https://doi.org/10.3389/fimm.2022.1085038).

- fimmu.2022.1085038.
- 31 Piao YJ, Kim HS, Kim H, et al. SerpinB2 deficiency is associated with delayed mammary tumor development and decreased pro-tumorigenic macrophage polarization[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 792. DOI: [10.1186/s12885-024-12473-6](https://doi.org/10.1186/s12885-024-12473-6).
- 32 Jin T, Suk Kim H, Ki Choi S, et al. microRNA-200c/141 upregulates SerpinB2 to promote breast cancer cell metastasis and reduce patient survival[J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 32769-32782. DOI: [10.18632/oncotarget.15680](https://doi.org/10.18632/oncotarget.15680).
- 33 Piao YJ, Kim HS, Han W, et al. Transcriptome analysis of SerpinB2-deficient breast tumors provides insight into deciphering SerpinB2-mediated roles in breast cancer progression[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 479. DOI: [10.1186/s12864-022-08704-4](https://doi.org/10.1186/s12864-022-08704-4).
- 34 Cirillo F, Spinelli A, Talia M, et al. Estetrol/GPER/SERPINB2 transduction signaling inhibits the motility of triple-negative breast cancer cells[J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 450. DOI: [10.1186/s12967-024-05269-6](https://doi.org/10.1186/s12967-024-05269-6).
- 35 Shang S, Yang C, Chen F, et al. ID1 expressing macrophages support cancer cell stemness and limit CD8⁺ T cell infiltration in colorectal cancer[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 7661. DOI: [10.1038/s41467-023-43548-w](https://doi.org/10.1038/s41467-023-43548-w).
- 36 Singh M, Kondraskhina AM, Hurst LD, et al. Staring at the onco-exaptation: the two-faced medley of an ancient retrovirus, HERVH[J]. J Clin Invest, 2023, 133(14): e172278. DOI: [10.1172/JCI172278](https://doi.org/10.1172/JCI172278).
- 37 El Omari N, Bakrim S, Khalid A, et al. Anticancer clinical efficiency and stochastic mechanisms of belinostat[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115212. DOI: [10.1016/j.biopha.2023.115212](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115212).
- 38 Tollefsbol T. Handbook of epigenetics (3rd edition)[M]. Cambridge: Academic Press, 2023: 821-840.
- 39 Thorel L, Morice PM, Paysant H, et al. Comparative analysis of response to treatments and molecular features of tumor-derived organoids versus cell lines and PDX derived from the same ovarian clear cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 260. DOI: [10.1186/s13046-023-02809-8](https://doi.org/10.1186/s13046-023-02809-8).
- 40 Ronellenfitsch MW, Zeiner PS, Mittelbronn M, et al. Akt and mTORC1 signaling as predictive biomarkers for the EGFR antibody nimotuzumab in glioblastoma[J]. Acta Neuropathol Commun, 2018, 6(1): 81. DOI: [10.1186/s40478-018-0583-4](https://doi.org/10.1186/s40478-018-0583-4).
- 41 Mehus AA, Bergum N, Knutson P, et al. Activation of PPAR γ and inhibition of cell proliferation reduces key proteins associated with the basal subtype of bladder cancer in As3+-transformed UROtsa cells[J]. PLoS One, 2020, 15(8): e0237976. DOI: [10.1371/journal.pone.0237976](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237976).

收稿日期: 2025 年 04 月 26 日 修回日期: 2025 年 11 月 17 日
本文编辑: 张 苗 黄 笛

引用本文: 沈瑞博, 杨宇琳, 张馨, 等. 吉西他滨耐药关键基因分析及其泛癌表达、免疫浸润和生存关联研究[J]. 数理医药学杂志, 2025, 38(12): 936-948. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202504096](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202504096).
Shen RB, Yang YL, Zhang X, et al. Analysis of key genes for gemcitabine resistance and their pan-cancer expression, immune infiltration and survival associations[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2025, 38(12): 936-948. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202504096](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202504096).