

## CHRNA5在胰腺癌发生发展过程中的作用及其机制

戴大有, 张志刚, 李 慧

(上海交通大学医学院附属仁济医院 上海市肿瘤研究所, 肿瘤系统医学全国重点实验室, 上海 200240)

**[摘要]** **目的:** 通过生物信息学方法和细胞实验探讨烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 5$ 亚基(*CHRNA5*)对胰腺导管腺癌(PDAC)侵袭和增殖的影响, 并分析其调控通路, 为寻找新的胰腺癌治疗靶点提供依据。**方法:** 自癌症基因组图谱(TCGA)和基因型组织表达(GTEX)数据库等公共数据库下载泛肿瘤和正常组织的转录组、基因变异和临床数据, 利用Wilcoxon检验比较*CHRNA5* mRNA在泛肿瘤患者与健康个体中的表达水平。通过基因表达综合数据库(GEO)中的数据集进一步比较胰腺癌和癌旁组织中*CHRNA5* mRNA的表达水平, 并采用三分法按照*CHRNA5* mRNA的不同表达量将数据分为*CHRNA5*高表达、中表达和低表达组, 对*CHRNA5*高表达和低表达组样本进行生存分析, 以评估*CHRNA5*对胰腺癌预后的影响。采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和免疫组织化学法检测*CHRNA5*在肿瘤组织、癌旁组织、肿瘤细胞和正常细胞中mRNA和蛋白表达情况。对转录组数据进行差异分析和标志基因(Hallmark)与反应组数据库(Reactome)富集分析。基于转录组数据对PDAC进行免疫细胞浸润分析, 同时进行肿瘤突变负荷(TMB)分析、单核苷酸变异(SNV)和拷贝数变异(CNV)分析。将小干扰RNA(si)-NC和si-*CHRNA5*转染至MIA PaCa-2和Capan-2细胞, 作为NC组、siRNA-1组和siRNA-2组, 采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)法检测在乙酰胆碱(ACh)( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和非ACh条件下各组细胞的增殖活性, 采用Western blotting法检测各组细胞中c-Myc蛋白表达情况。**结果:** 与正常组织比较, 包括胰腺癌在内的28种肿瘤组织中*CHRNA5* mRNA表达水平升高(校正后 $P < 0.05$ )。RT-qPCR和免疫组织化学法检测, 与癌旁组织和正常胰腺导管细胞比较, *CHRNA5*在肿瘤组织和PDAC细胞中高表达。生存分析, 高表达*CHRNA5*的PDAC患者较低表达患者预后差。在PDAC和对照样本中鉴定出994个差异表达基因(DEGs), 其中上调基因381个, 下调基因613个。基因集富集分析(GSEA), *CHRNA5*与氧化磷酸化、细胞增殖、免疫浸润和细胞周期高度有关。免疫分析, 高表达*CHRNA5*的样本较低表达*CHRNA5*的样本免疫浸润更差。与*CHRNA5*低表达组比较, *CHRNA5*高表达组胰腺癌进展相关基因*KRAS*、*TP53*和*SMAD4*基因突变率更高。细胞实验, 与NC+ACh组比较, siRNA-1+ACh组和siRNA-2+ACh细胞增殖活性明显降低( $P < 0.05$ )。Western blotting法检测, 与NC组比较, siRNA-1组和siRNA-2组细胞中c-Myc蛋白表达量降低。**结论:** *CHRNA5*通过髓细胞瘤病毒癌基因(MYC)家族调控细胞周期, 从而影响胰腺肿瘤细胞的增殖, 促进PDAC的进展, 表明*CHRNA5*是治疗胰腺癌的潜在靶点。

**[关键词]** 胰腺导管腺癌; 烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 5$ 亚基; 神经递质; 细胞周期; 肿瘤进展

**[中图分类号]** R735.9 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-12-30 [录用日期] 2025-02-06

[基金项目] 上海市卫健委卫生行业临床研究专项面上项目(202340202)

[作者简介] 戴大有(1999-), 男, 吉林省长春市人, 在读硕士研究生, 主要从事外周神经调控肿瘤微环境方面的研究。

[通信作者] 张志刚, 研究员, 博士研究生导师(E-mail: z Zhang@shsci.org);

李 慧, 助理研究员(E-mail: huili@shsci.org)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

## Effect of *CHRNA5* in occurrence and development of pancreas cancer and its mechanism

DAI Dayou, ZHANG Zhigang, LI Hui

(State Key Laboratory of Systems Medicine for Cancer, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit (*CHRNA5*) on the invasion and proliferation of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) using bioinformatics approaches and cellular experiments, and to analyze its regulatory pathways and provide foundation for the identification of novel therapeutic targets for pancreatic cancer. **Methods:** Transcriptome, gene variation, and clinical data of pan-tumor and normal tissues were downloaded from public databases including The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx). The expression levels of *CHRNA5* mRNA between pan-tumor patients and healthy individuals were compared using Wilcoxon test. The expression levels of *CHRNA5* mRNA between PDAC and para-cancer tissues were further compared using datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. The data were divided into three groups according to the different expression levels of *CHRNA5* mRNA using tertile method: *CHRNA5* high expression group, *CHRNA5* medium expression group, and *CHRNA5* low expression group. Survival analysis was performed in *CHRNA5* high expression and low expression groups to assess the impact of *CHRNA5* in prognosis of pancreas cancer. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and immunohistochemistry methods were used to detect the expressions of *CHRNA5* mRNA and protein in tumor tissue, paracancer tissue, tumor cells and normal cells. Differential analysis of the transcriptome data and enrichment analysis of Hallmark genes and Reactome pathways were then conducted. Immune cell infiltration analysis was performed on PDAC based on transcriptome data. Tumor mutation burden (TMB) analysis, single nucleotide variation (SNV), and copy number variation (CNV) analysis were also conducted. The small interfering RNA (si)-NC and si-*CHRNA5* were transfected into the MIA PaCa-2 and Capan-2 cells, and the samples were divided into NC, siRNA-1 and siRNA-2 groups according to the transfected siRNA. The proliferation activities of the cells in various groups under acetylcholine (ACh) and non-ACh conditions were detected using cell counting kit-8 (CCK-8) method, and the expression of c-Myc protein in the cells in various groups were detected using Western blotting method. **Results:** Compared with normal tissue, the expression levels of *CHRNA5* mRNA were elevated in 28 types of tumor tissues, including pancreatic cancer (adjusted  $P < 0.05$ ). The results of RT-qPCR and immunohistochemistry revealed that *CHRNA5* was highly expressed in tumor tissue and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells compared with paracancer tissue and normal pancreatic ductal cells. The survival analysis showed that the PDAC patients with high expression of *CHRNA5* had worse prognosis compared with those with low expression of *CHRNA5*. A total of 994 differentially expressed genes (DEGs) were identified between PDAC and control samples, with 381 up-regulated genes and 613 down-regulated genes. The gene Set Enrichment Analysis (GSEA) results indicated that *CHRNA5* was highly associated with oxidative phosphorylation, cell proliferation, immune infiltration, and cell cycle. The immune analysis results showed that the samples with high expression of *CHRNA5* had poorer immune infiltration compared with those with low expression of *CHRNA5*. Compared with *CHRNA5* low expression group, the mutation rates of pancreatic cancer progression-related genes *KRAS*, *TP53*, and *SMAD4* in *CHRNA5* high expression group were increased. In cell experiments, compared with NC+ACh group, the proliferation activities of the cells in siRNA-1+ACh group and siRNA-2+ACh group were

significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The results of Western blotting revealed that the expression amounts of c-Myc protein in siRNA-1 and siRNA-2 groups were significantly lower than those in NC group.

**Conclusion:** *CHRNA5* modulates the cell cycle via myelocytomatosis viral oncogene (MYC) family, thereby influencing the proliferation of pancreas cancer cells and promoting the progression of PDAC, suggesting that *CHRNA5* is a potential therapeutic target for pancreas cancer.

**KEYWORDS** Pancreatic ductal adenocarcinoma; Cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit; Neurotransmitter; Cell cycle; Tumour progression

胰腺癌是一种恶性程度极高的消化道肿瘤,以其隐匿的起病和较强的侵袭性而著称。近年来,胰腺癌的发病率逐渐上升,位于肿瘤相关死亡率排名的第三位,其中胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)占有胰腺癌的90%以上,是胰腺癌的主要病理类型<sup>[1]</sup>。目前对于PDAC有效的主要治疗方法是手术切除,但由于其起病隐匿,80%~85%的患者在确诊时已失去手术机会<sup>[2]</sup>。此外,PDAC肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)高度纤维化和异质性强的特征限制了治疗药物的渗透和免疫治疗的效果<sup>[3]</sup>。在我国,PDAC患者5年生存率仅为7.2%<sup>[4]</sup>。因此,深入研究PDAC发生发展的分子机制,并开发新的诊断方法和有效的治疗策略至关重要。

随着癌症神经学这一新兴学科的发展,研究者发现神经系统与肿瘤之间存在着复杂的相互作用。中枢神经系统通过下丘脑-垂体-肾上腺轴释放糖皮质激素,影响肿瘤细胞和免疫系统,促进肿瘤生长<sup>[5]</sup>。此外,交感神经系统通过释放肾上腺素和去甲肾上腺素,调节免疫反应或直接影响肿瘤细胞,影响肿瘤的发生发展过程<sup>[6]</sup>。周围神经浸润(perineural invasion, PNI)指肿瘤细胞侵入神经空间或者包围神经周径三分之一以上的现象,其在PDAC中发生率极高<sup>[7]</sup>。神经细胞释放的趋化因子招募肿瘤细胞,而肿瘤细胞通过轴突生长因子刺激神经轴突向肿瘤组织内生长,为肿瘤提供物质支持,促进肿瘤细胞的增殖和扩散<sup>[8-9]</sup>。目前,针对神经递质及其受体的靶向治疗策略在PDAC治疗领域中逐渐显露其研究潜力。

烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)是一种重要的神经递质受体,属于配体门控离子通道家族,位于细胞膜上,通过调节乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)的释放和信号传递,影响神经兴奋性和肌肉收缩<sup>[10]</sup>。烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 5$ 亚基(cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit, *CHRNA5*)基因编码nAChR的

$\alpha 5$ 亚基,在多种细胞中发挥作用,其在神经系统中的作用是多方面的,包括神经信号传递、调节认知功能和神经保护等<sup>[11-12]</sup>。而*CHRNA5*的功能不仅限于神经系统,其在肿瘤发展中的作用也日益受到关注。*CHRNA5*通过Notch1信号通路促进黑色素瘤的形成<sup>[13]</sup>,并在肺癌中通过介导 $Ca^{2+}$ 内流激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路,促进肿瘤的进展<sup>[14-15]</sup>。另有研究<sup>[16]</sup>发现:利用ACh激动剂多杀菌素阻断*CHRNA5*与上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的相互作用,有效抑制了肺癌细胞的增殖。此外,有研究者<sup>[17]</sup>发现:肝内胆管癌细胞中*CHRNA5*通过调控细胞内 $Ca^{2+}$ 水平影响细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的释放,从而影响细胞的侵袭能力和肿瘤神经微环境。然而,针对*CHRNA5*在PDAC中作用和机制的研究还相对有限。

本研究利用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库和基因型组织表达(Genotype-Tissue Expression, GTEx)数据库,比较*CHRNA5*在泛肿瘤和健康样本中的表达情况,探讨了该基因对预后生存、TME和突变特征的影响,旨在研究*CHRNA5*促进PDAC进展的分子机制,为胰腺癌患者的治疗提供新的靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 公共数据来源** 从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)下载泛肿瘤转录组、基因变异和生理指标数据,从GTEx数据库(<https://gtexportal.org/home>)下载健康对照样本的转录组数据。从基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)(<https://www.ncbi.nlm.nih>

gov/geo/) 下载 4 个胰腺癌 GEO 数据集 (GEO Series, GSE) (GSE16515、GSE28735、GSE62165 和 GSE71729)。

**1.2 细胞、主要试剂和仪器** 人胰腺癌细胞 AsPc-1、BxPC-3、Capan-1、Capan-2、MIA PaCa-2、PANC-1、Patu-8988 和 SW1990 以及正常人胰腺导管细胞 hTERT-HPNE 来源于中国科学院细胞库。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、马血清、1% 青-链霉素、DMEM 培养基以及 RPMI 1640 培养基购自美国 ThermoFisher 公司, TRIzol、PrimeScript™ RT Master Mix 和 SYBR Green 定量检测试剂盒购于日本 TaKaRa 公司, RIPA 裂解液、超敏 ECL 试剂液、3, 3'-二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB)、苏木素和 5×SDS 上样缓冲液购于苏州新赛美生物科技有限公司, 转染试剂 jetPRZME Buffer 和 jetPRIME Reagent 购自法国 PolyPlus-transfection 公司, 4% 多聚甲醛、EDTA 盐、Tris 缓冲的 Tween-20 缓冲液 (Tris buffered saline with Tween 20, TBST)、过氧化氢和脱脂奶粉购于武汉塞维尔生物科技有限公司, 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 溶液购自上海圣尔生物科技有限公司, ACh 购于美国 MCE 公司, 鼠抗 *CHRNA5* 单克隆抗体和鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体购于武汉三鹰生物科技有限公司, 兔抗 c-Myc 购于美国 Abcam 公司, 山羊抗鼠二抗和山羊抗兔二抗购自美国 Immunoway 公司。引物序列和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 由和元 (上海) 生物科技有限公司合成和构建。蛋白电泳仪和成像系统购于美国伯乐公司, LEICA Aperio GT450 智能数字病理扫描仪购于德国 LEICA 公司。

**1.3 细胞培养** 本研究细胞培养标准遵循美国模式菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 的要求, 其中 AsPc-1 和 BxPC-3 细胞采用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基培养, MIA PaCa-2 采用含 2.5% 马血清、10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基培养, Capan-1、Capan-2、hTERT-HPNE、PANC-1、Patu-8988 和 SW1990 细胞采用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 DMEM 培养基培养。培养箱内 CO<sub>2</sub> 浓度为 5%, 温度设置为 37 °C。

**1.4 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 鉴定** 对 TCGA 和 GTEX 数据库以及 GEO

数据库的基因表达数据, 利用 Wilcoxon test 检验 *CHRNA5* 高和低表达组中每个基因的差异, 并对 *P* 值进行多重检验校正错误发现率 (false discovery rate, FDR), 采用 ggplot2 3.4.2 绘制箱线图。差异倍数 (fold change, FC) 变化 > 2 且差异检验校正后 *P* < 0.05 的基因作为 DEGs, 用于后续分析。

**1.5 基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)** 将 TCGA 数据库中 PDAC 患者根据 *CHRNA5* 表达中位值分为高和低表达组, 并计算 2 组中每个基因的 FC, 采用 ClusterProfiler 4.7.1.3 和 GseaVis 0.0.9 进行 GSEA 分析及结果可视化, 参考数据库为 Hallmark 和 Reactome。

**1.6 生存分析** 基于 TCGA 数据库中 PDAC 患者的转录组数据, 根据 *CHRNA5* mRNA 的表达值分为高、低和中表达组, 结合高表达组和低表达组患者的临床数据, 采用 R 包 survminer 0.4.9 进行预后生存分析。

**1.7 免疫浸润分析** 根据免疫细胞基因集并采用 R 包 GSVA 1.46.0 对 TCGA 数据库中 PDAC 转录组数据进行免疫浸润分析, 计算各个免疫细胞单样本基因集富集分析 (Single-Sample Gene Set Enrichment Analysis, ssGSEA) 评分, 并对 *CHRNA5* 高表达和低表达组进行差异检验和多重检验校正。

**1.8 单核苷酸变异 (single nucleotide variant, SNV) 分析** 采用 R 包 maftools 2.16.0 处理从 TCGA 下载的 PDAC 患者的 SNV 数据, 并进行数据可视化。肿瘤突变负荷 (tumor mutation burden, TMB) 采用 maftools 2.16.0 提取数据, 并用 R 包 ggplot2 3.4.2 绘制小提琴图。

**1.9 拷贝数目变异 (copy number variant, CNV) 分析** 采用软件 GISTIC2 2.0.23 处理从 TCGA 下载的 PDAC 患者 CNV 数据, 并进行数据可视化。

**1.10 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 检测胰腺癌细胞和正常人胰腺导管细胞中 *CHRNA5* mRNA 表达水平**

使用 TRIzol 试剂从各种细胞中提取总 RNA, 使用 PrimeScript™ RT Master Mix 合成 cDNA 后进一步通过 RT-qPCR 检测 *CHRNA5* 表达水平。以 GAPDH 作为内参对照, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法计算 *CHRNA5* mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

**1.11 免疫组织化学法检测胰腺癌和癌旁组织切片中 *CHRNA5* 蛋白表达情况** 胰腺癌和癌旁组织样

表1 RT-qPCR的引物序列  
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
CHRNA5	CGTGTTCCCTTCAGACTCTGTCTG	GAGTCCAGGTGACAGTGCCATT
GAPDH	GTCTTCACCACCATGGAGAA	TAAGCAGTTGGTGGTGCAG

本收集自2021年9月—12月上海交通大学医学院附属仁济医院治疗的6例PDAC患者的肿瘤组织及相应癌旁组织标本。所有患者签署知情同意书。胰腺癌和癌旁组织标本经4%多聚甲醛固定后,进行石蜡包埋与切片处理。对包埋好的石蜡切片通过脱蜡、复水, pH=8.0的EDTA溶液水浴锅95℃水浴20 min修复。随后利用0.3%过氧化氢浸泡15 min封闭内源性过氧化物酶,采用TBST混合的10%山羊血清室温封闭1 h,甩去封闭液后CHRNA5一抗4℃孵育6 h。孵育完成后TBST洗片3次,每次10 min,洗去一抗后用山羊抗鼠二抗室温孵育2 h。DAB显色2 min后洗去DAB,苏木素复染,随后自来水冲洗返蓝。脱水、透明后使用

LEICA Aperio GT450智能数字病理扫描仪进行扫描,用LEICA分析软件LAS X Office分析图像。

**1.12 siRNA瞬时转染MIA PaCa-2和Capan-2细胞干扰CHRNA5表达** 在6孔细胞培养板中接种对数生长期的MIA PaCa-2和Capan-2细胞。待细胞生长至60%~70%融合度时,分别用阴性对照(NC-siRNA)、CHRNA5-siRNA-1和CHRNA5-siRNA-2转染MIA PaCa-2和Capan-2细胞(作为NC组、siRNA-1组和siRNA-2组),利用jetPRIME Buffer溶解稀释的siRNA,混匀后加入jetPRIME Reagent,室温放置15 min后,将混合物加入细胞培养液并混匀,48 h后采用RT-qPCR检测干扰效率。siRNA和阴性对照序列见表2。

表2 siRNA和阴性对照序列  
Tab. 2 Sequences of siRNA and NC-siRNA

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
NC-siRNA	CCCUGUAUUGGGCUCUCAUTT	AUGAGAGCCCAAUACAGGGTT
CHRNA5-siRNA1	GCCUUUGGUCCGAAGAUATT	UAUCUUGCGGACCAAAGGCTT
CHRNA5-siRNA2	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGAGAATT

**1.13 CCK-8法检测干扰CHRNA5表达后胰腺癌细胞增殖活性** 细胞经干扰48 h,将MIA PaCa-2和Capan-2细胞按照每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞的密度铺于96孔板中,置于37℃和5%CO<sub>2</sub>浓度条件下培养,每组设置3个平行孔。待细胞贴壁弃去培养液,按实验分组(表3)添加培养基和ACh处理8 h。随后,在每孔添加10 μL的CCK-8溶液,孵育1 h后采用酶标仪检测450 nm波长处吸光度(A)值,分别在24和48 h检测,并绘制增殖曲线,以A值代表细胞增殖活性。

**1.14 Western blotting法检测CHRNA5干扰效率和干扰CHRNA5后胰腺癌细胞中c-Myc蛋白表达情况** 将转染前和转染后的MIA PaCa-2和Capan-2细胞置于冰上,大皿加入500 μL RIPA缓冲液,6孔细胞培养板每孔加入100 μL RIPA蛋白裂解液,冰上裂解10 min后用细胞刮刀快速刮下细胞,收集在EP管中,于4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,

表3 CCK-8实验分组信息

Tab. 3 Group informations for CCK-8 assay

Group	ACh	DMEM
NC	0 μmol·L <sup>-1</sup>	100 μL
NC+ACh	10 μmol·L <sup>-1</sup>	100 μL
SiRNA-1	0 μmol·L <sup>-1</sup>	100 μL
SiRNA-1+ACh	10 μmol·L <sup>-1</sup>	100 μL
SiRNA-2	0 μmol·L <sup>-1</sup>	100 μL
SiRNA-2+ACh	10 μmol·L <sup>-1</sup>	100 μL

收集上清液。加入5×SDS上样缓冲液混匀后,100℃水浴变性10 min。用10% PAGE凝胶分离水浴后的蛋白样品,随后冰上恒定电流200 mA转膜70 min。5%脱脂奶粉常温封闭1 h, TBST洗净,一抗60 r·min<sup>-1</sup>摇床4℃孵育6 h(CHRNA5、c-Myc和β-actin),随后用TBST在60 r·min<sup>-1</sup>摇床上清洗3次,每次10 min,加入二抗,室温孵育2 h,

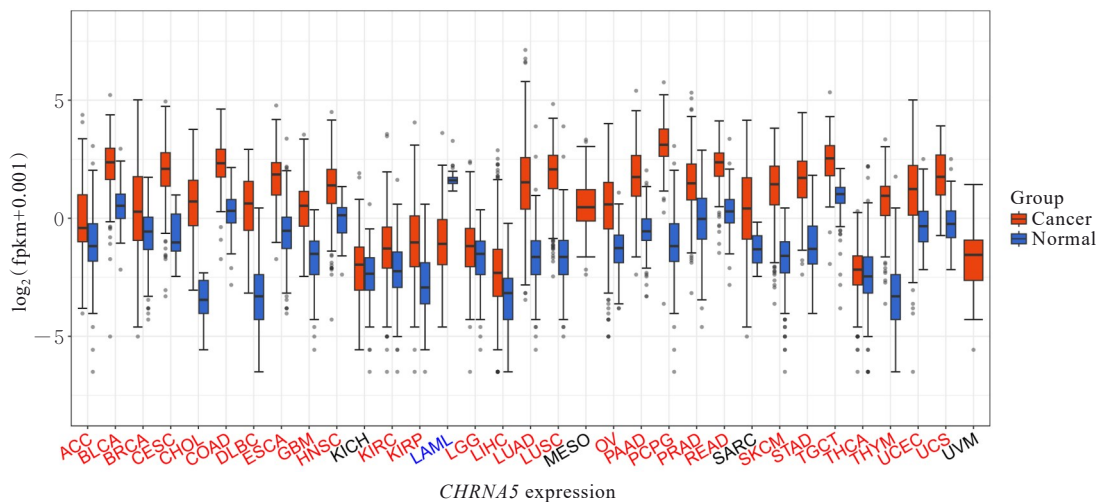
随后在  $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床上清洗 5 次, 每次 5 min。在成像前取  $200 \mu\text{L}$  超敏 ECL 滴加于膜上, 用伯乐凝胶成像仪成像, 图像由 Image Lab 软件分析。

**1.15 统计学分析** 采用 R 4.2.3 软件进行统计学分析。生物信息学分析部分采用 Wilcoxon 检验分析实验组和对照组的差异, 包括基因表达、免疫细胞浸润评分以及 TMB, 并对  $P$  值进行 FDR 校正, 校正后  $P < 0.05$  认为 2 组有明显差异。实验部分采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计学分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 33 种肿瘤组织中 *CHRNA5* mRNA 表达水平与正常组织比较, 在 33 种肿瘤中, 28 种肿瘤组织

中 *CHRNA5* mRNA 表达水平升高 (adjusted  $P < 0.05$ ), 包括肾上腺皮质癌 (adrenocortical carcinoma, ACC)、膀胱尿路上皮癌 (bladder urothelial carcinoma, BLCA)、乳腺浸润性癌 (breast invasive carcinoma, BRCA)、宫颈鳞状细胞癌和宫颈内腺癌 (cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma, CESC)、胆管癌 (cholangio carcinoma, CHOL)、结肠腺癌 (colon adenocarcinoma, COAD)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBC)、食管癌 (esophageal carcinoma, ESCA)、肺鳞状细胞癌 (lung squamous cell carcinoma, LUSC)、多形性胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM)、卵巢浆液性囊腺瘤 (ovarian serous cystadenocarcinoma, OV) 和肾透明细胞癌 (kidney clear cell carcinoma, KIRC) 等。见图 1。



Red: Cancers positively correlated with *CHRNA5* expression ( $P < 0.05$ ); Blue: Cancers negatively correlated with *CHRNA5* expression ( $P < 0.05$ ). HNSC: Head and neck squamous cell carcinoma; KICH: Kidney chromophobe; KIRP: Kidney renal papillary cell carcinoma; LAML: Acute myeloid leukemia; LGG: Brain lower grade glioma; LIHC: Liver hepatocellular carcinoma; LUAD: Lung adenocarcinoma; MESO: Mesothelioma; PAAD: Pancreatic adenocarcinoma; PCPG: Pheochromocytoma and paraganglioma; PRAD: Prostate adenocarcinoma; READ: Rectum adenocarcinoma; SARC: Sarcoma; SKCM: Skin cutaneous melanoma; STAD: Stomach adenocarcinoma; TGCT: Testicular germ cell tumors; THCA: Thyroid carcinoma; THYM: Thymoma; UCEC: Uterine corpus endometrial carcinoma; UCS: Uterine carcinosarcoma; UVM: Uveal melanoma.

图 1 33 种肿瘤组织中 *CHRNA5* mRNA 表达水平

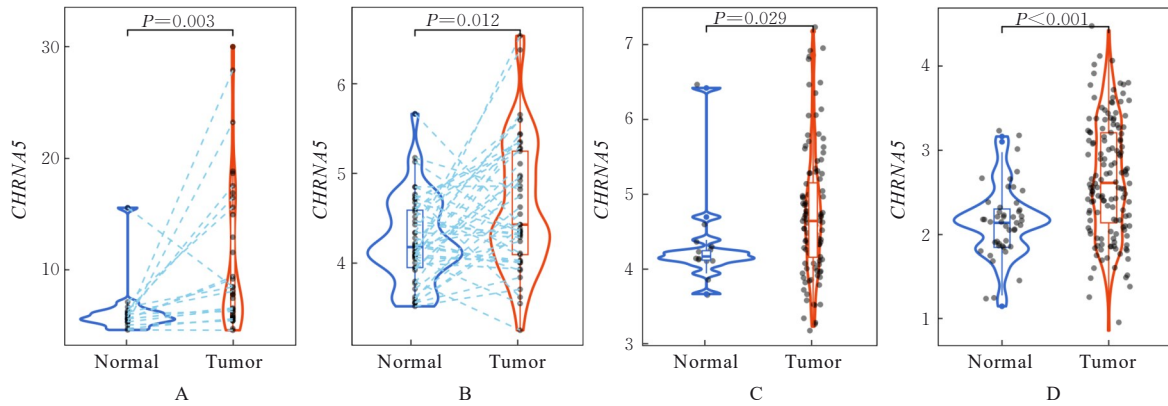
Fig. 1 Expression levels of *CHRNA5* mRNA in 33 types of tumor tissues

### 2.2 *CHRNA5* mRNA 在胰腺癌中的表达情况

在 GSE16515、GSE28735、GSE62165 和 GSE71729 中分析 *CHRNA5* mRNA 的表达情况, 与正常组织比较, PDAC 组织中 *CHRNA5* mRNA 表达水平明显升高 (adjusted  $P < 0.05$ )。见图 2。

### 2.3 PDAC 细胞和组织中 *CHRNA5* mRNA 和蛋白表达

RT-qPCR 法结果显示: 与正常胰腺导管细胞 hTERT-HPNE 比较, 在多种 PDAC 细胞中 *CHRNA5* mRNA 表达水平升高, 在 MIA PaCa-2、Capan-2 和 PANC-1 细胞中 *CHRNA5* mRNA 表达



A:GSE16515; B:GSE28735; C:GSE62165; D:GSE71729.

图2 4个GSE中CHRNA5 mRNA表达水平

Fig. 2 Expression levels of CHRNA5 mRNA in four GSE

水平明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。见图3。免疫组织化学染色结果显示:与癌旁组织比较,PDAC组织中CHRNA5蛋白表达量增加。见图4。

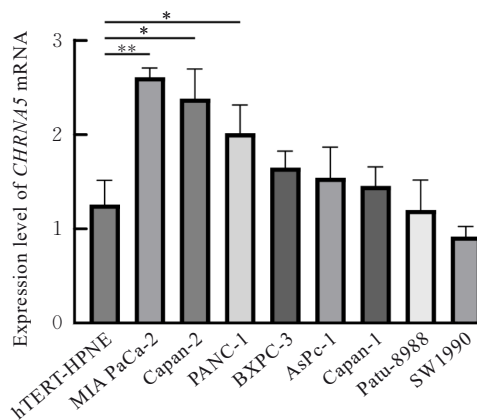
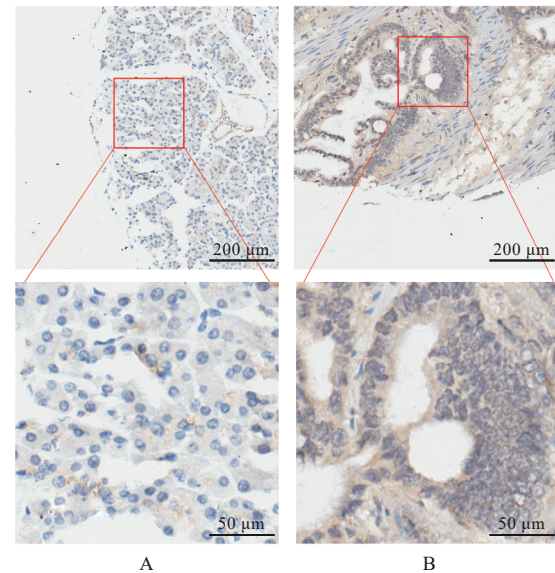
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图3 RT-qPCR法检测胰腺癌和正常胰腺导管细胞中CHRNA5 mRNA水平

Fig. 3 Expression levels of CHRNA5 mRNA in pancreas cancer cells and normal pancreatic ductal cells detected by RT-qPCR method

**2.4 胰腺癌组织中高表达CHRNA5对预后的影响** 生存分析结果显示:与CHRNA5低表达组比较,CHRNA5高表达组患者无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 明显降低 ( $P<0.05$ ), 总生存期 (overall survival, OS) 降低 ( $P=0.063$ ), CHRNA5高表达PDAC患者预后生存较差。见图5。

**2.5 DEGs分析** 在TCGA数据库PDAC分成的CHRNA5高表达组和CHRNA5低表达组中共检



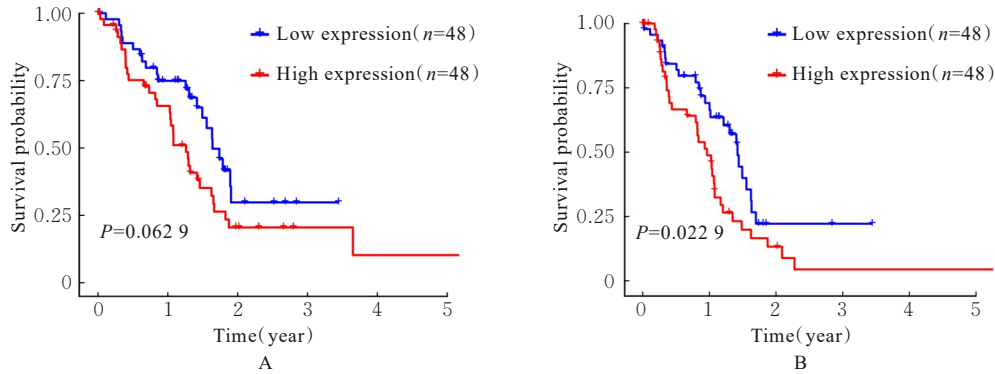
A:Paracancer tissue; B:PDAC tissue.

图4 免疫组织化学法检测癌旁组织和PDAC组织中CHRNA5蛋白表达情况

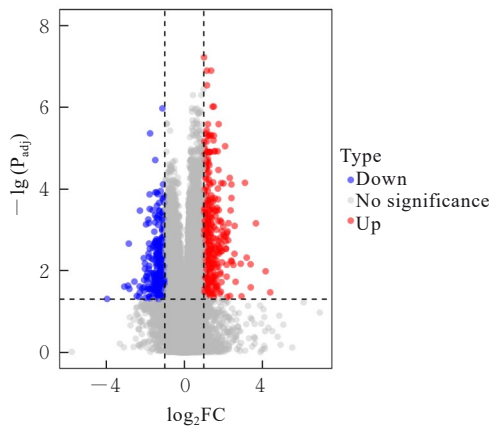
Fig. 4 Expressions of CHRNA5 protein in paracancer tissue and PDAC tissue detected by immunohistochemistry

出994个DEGs (校正后  $P<0.05$  且  $|\log_2FC|>1$ ), 其中上调的基因有381个, 下调的基因有613个。见图6。

**2.6 CHRNA5的生物学功能** 基于Reactome数据库GSEA的结果显示:CHRNA5的表达与多个关键生物学通路有关联, 包括DNA replication preinitiation、Chromosome Maintenance、Cell cycle checkpoint和DNA replication。见图7。此外, 基于Hallmark数据库GSEA的结果显示:CHRNA5的表



A: OS; B: PFS.

图5 胰腺癌组织中*CHRNA5*表达水平与预后的关系Fig. 5 Relationship between *CHRNA5* expression level in pancreas cancer tissue and prognosis图6 TCGA数据库PDAC中*CHRNA5*高表达组和低表达组检出的DEGsFig. 6 DEGs detected in *CHRNA5* high expression group and low expression group in PDAC in TCGA database

达与E2F targets、G2M checkpoint、MYC targets v1和Oxidative phosphorylation等途径有密切关联。见图8。

**2.7 *CHRNA5*对TME中免疫细胞的影响** 免疫浸润分析结果显示：*CHRNA5*高表达组中央记忆型T细胞、记忆B细胞、 $\gamma$ - $\Delta$ T细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞和辅助T细胞等细胞浸润水平明显高于*CHRNA5*低表达组（校正后 $P < 0.05$ ）。自然杀伤细胞和中性粒细胞在高表达*CHRNA5*的样本中浸润更多，而巨噬细胞、非成熟B细胞和活化B细胞的浸润明显下降。见图9。

**2.8 *CHRNA5*对肿瘤细胞变异的影响** 基于SNV数据进行TMB评分分析，结果表明*CHRNA5*高表达的PDAC样本中具有更高的TMB（ $P < 0.01$ ）。

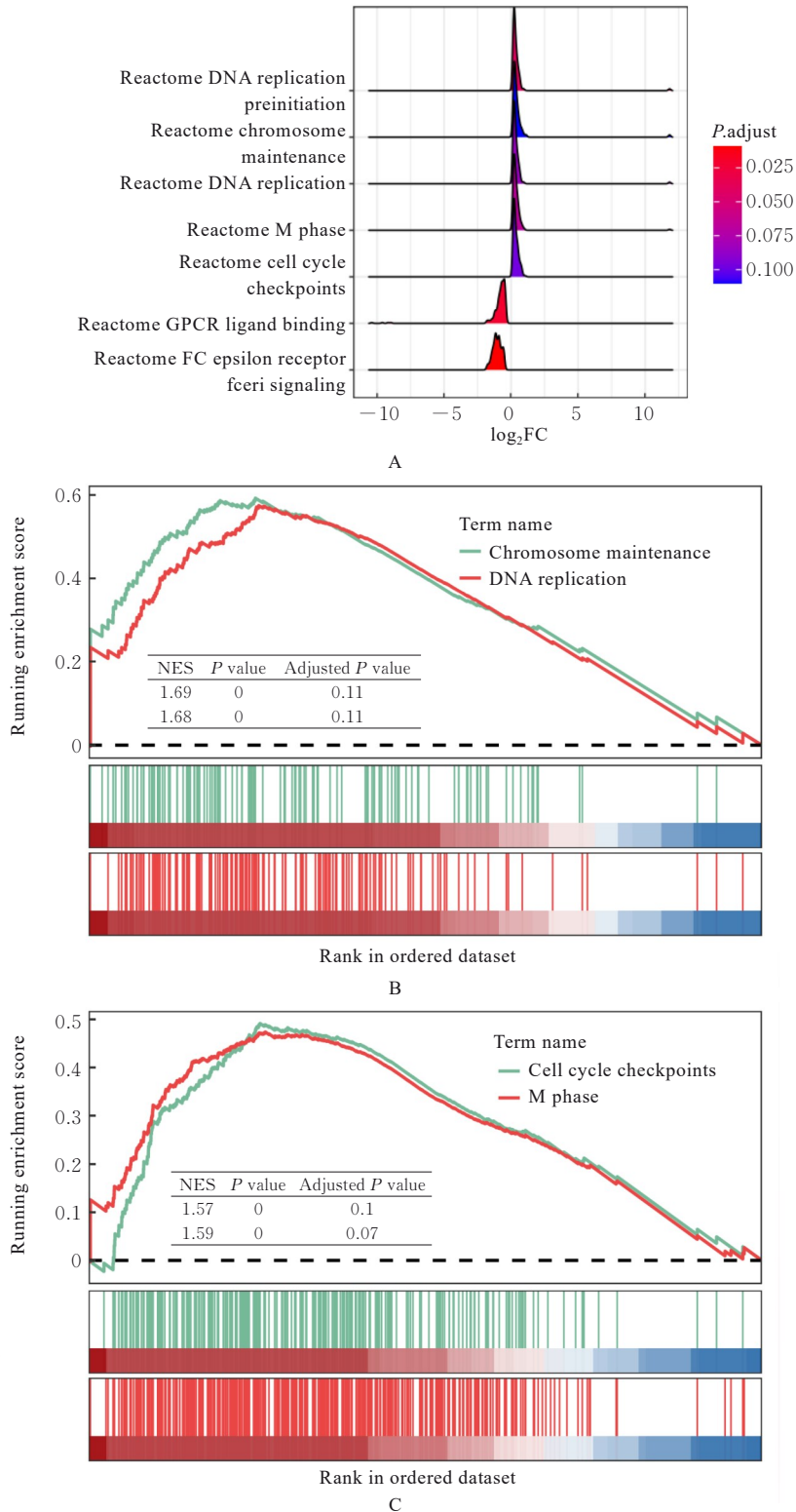
见图10A。SNV的分析结果显示：与*CHRNA5*低表达组比较，*CHRNA5*高表达组*KRAS*、*TP53*和*SMAD4*基因的变异率更高。见图10B。CNV的分析结果也显示*CHRNA5*高表达样本具有较高的变异拷贝。见图11。

**2.9 siRNA干扰后胰腺癌细胞增殖活性** 采用siRNA干扰MIA PaCa-2和Capan-2细胞后，与NC组比较，siRNA-1组和siRNA-2组细胞中*CHRNA5* mRNA表达明显降低（ $P < 0.001$ ），见图12。CCK-8法检测结果显示：与NC组比较，siRNA-1组和siRNA-2组Capan-2细胞增殖活性无明显变化，siRNA-1组MIA PaCa2细胞增殖活性明显降低（ $P < 0.05$ ）。ACh处理后，与NC+ACh组比较，siRNA-1+ACh和siRNA-2+ACh组细胞增殖活性明显降低（ $P < 0.05$ ）。见图13。

**2.10 siRNA干扰后胰腺癌细胞中c-Myc蛋白表达情况** 与NC组比较，siRNA-1组和siRNA-2组MIA PaCa-2和Capan-2细胞中c-Myc蛋白表达量降低。见图14。

### 3 讨论

胰腺癌以其高度侵袭性、早期诊断的复杂性及较差的预后而著称。目前，胰腺癌的发病机制尚不明晰，深入探讨其分子机制对于推动胰腺癌的早期筛查和开发新型有效的治疗手段至关重要。近年来，TME中的神经-肿瘤相互作用成为研究热点，特别是神经递质如5-羟色胺、去甲肾上腺素及ACh，其在调控肿瘤生物学行为中的角色日益受到关注<sup>[18]</sup>。神经递质受体可能成为PDAC治疗的新靶点，对其防治策略具有深远影响。本研究探讨*CHRNA5*在PDAC中的生物学功能，通过系统性



A: Ridge plot; B: DNA replication and chromosome maintenance; C: M phase and cell cycle checkpoints.

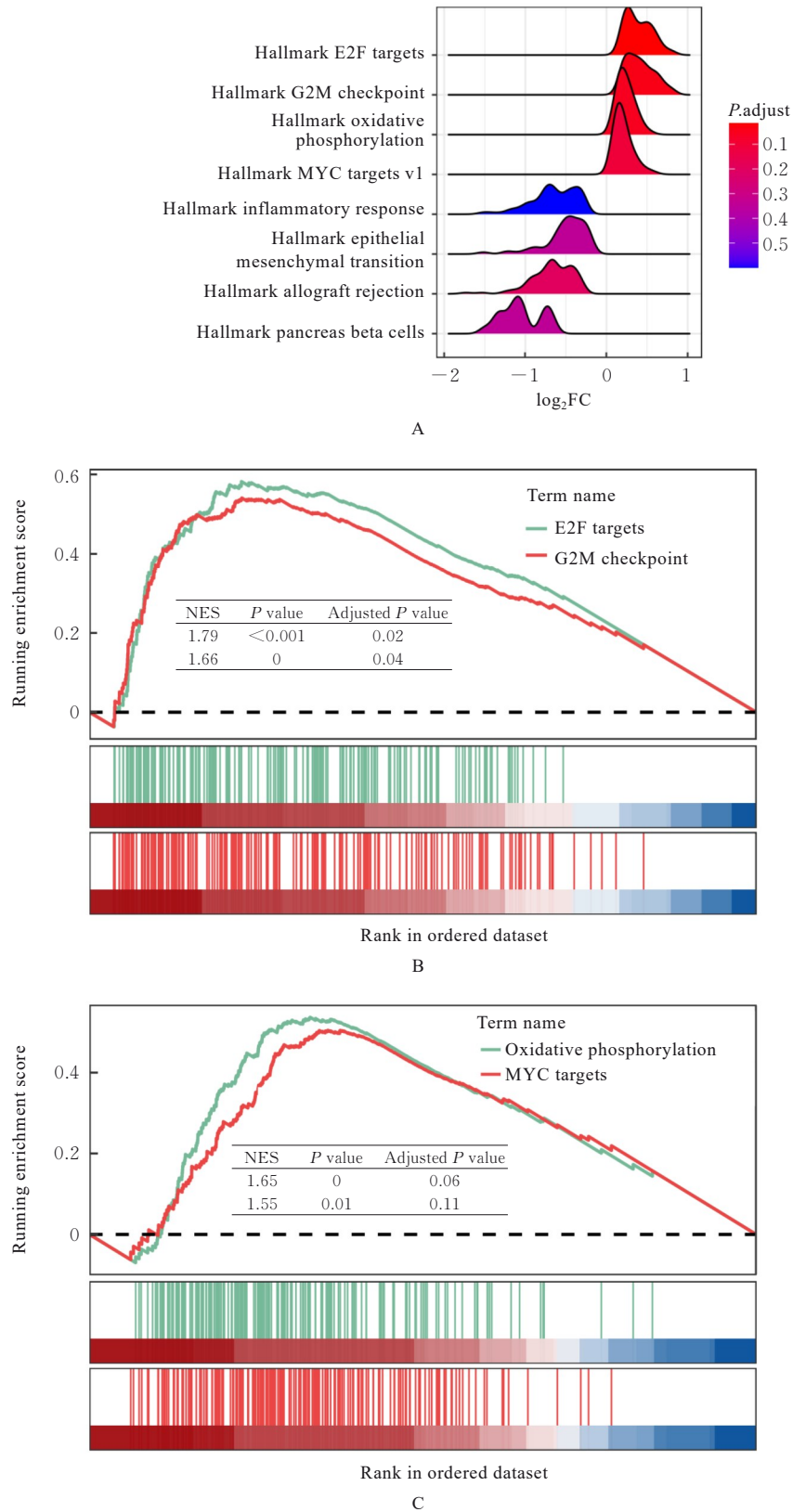
图7 CHRNA5的Reactome富集分析

Fig. 7 Reactome enrichment analysis on CHRNA5

分析, 阐明了 *CHRNA5* 与 PDAC 发病的内在联系和潜在分子机制, 为 PDAC 的靶向治疗提供了新思路。

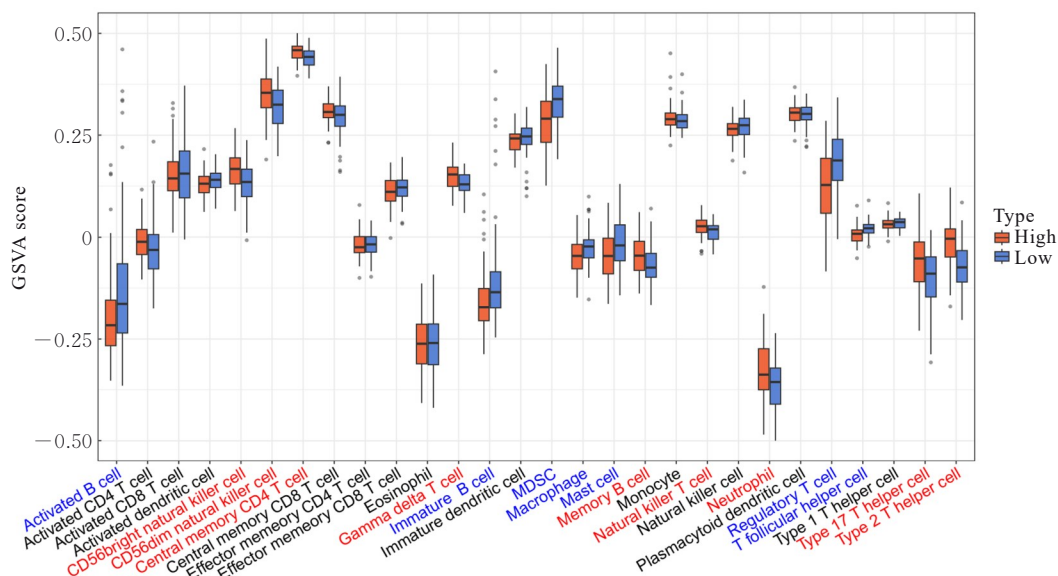
*CHRNA5* 基因具有神经信号传递、调节认知

功能以及保护神经等作用<sup>[11-12]</sup>, 近年来研究<sup>[13]</sup>发现 *CHRNA5* 与肿瘤的发生也有密切关系。本研究通过数据分析发现 *CHRNA5* 在 PDAC 中高表达,



A: Ridge plot; B: E2F targets and G2M checkpoint; C: Oxidative phosphorylation and MYC targets.

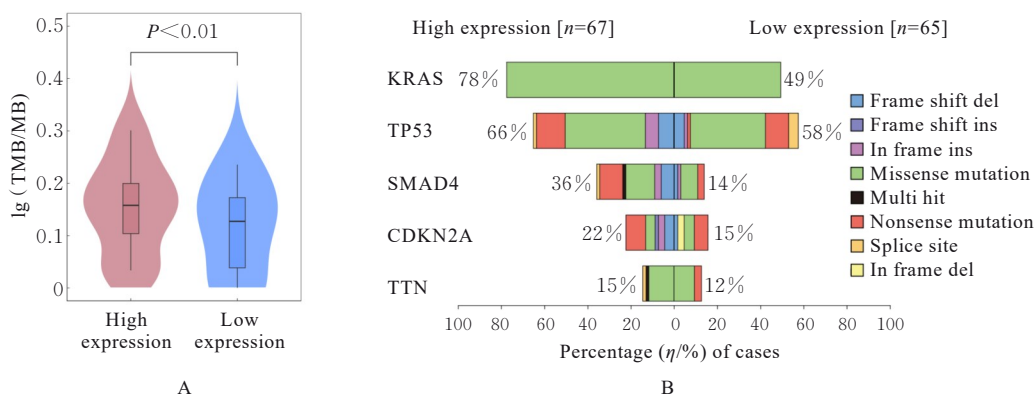
图8 *CHRNA5*的Hallmark富集分析Fig. 8 Reactome enrichment analysis on *CHRNA5*



Red: Immune cells positively correlated with *CHRNA5* expression ( $P < 0.05$ ); Blue: Immune cells negatively correlated with *CHRNA5* expression ( $P < 0.05$ ).

图9 PDAC中*CHRNA5*高表达组和低表达组免疫浸润情况

Fig. 9 Immune infiltration in *CHRNA5* high expression group and low expression group in PDAC



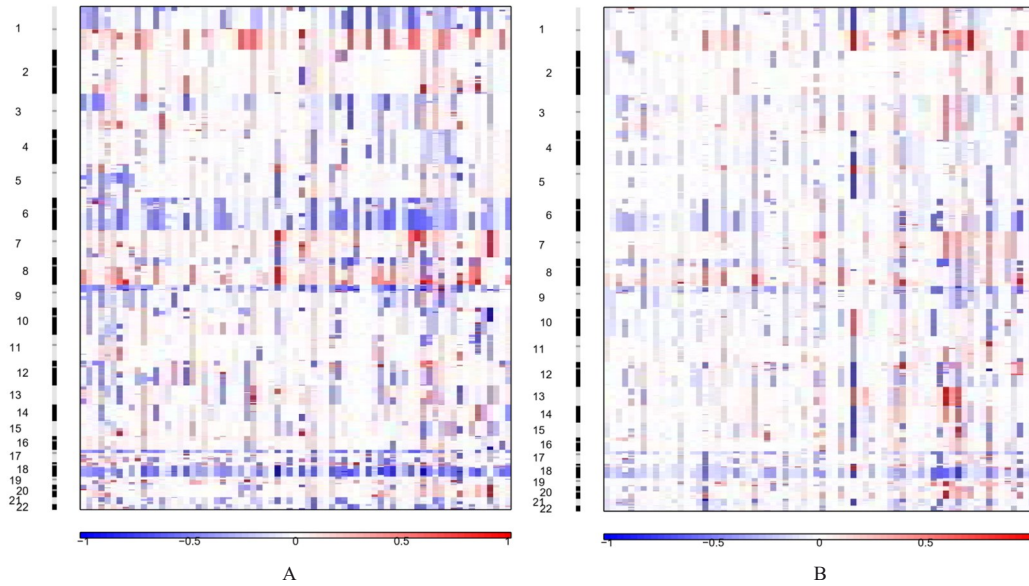
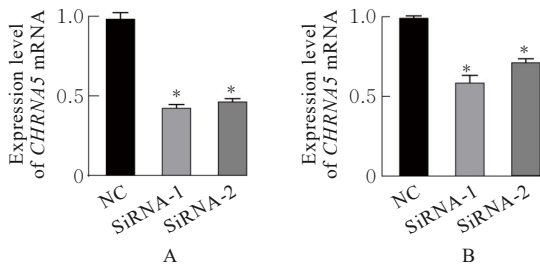
A: TMB analysis based on SNV data; B: SNV analysis.

图10 基于SNV数据的TMB评分分析和SNV分析

Fig. 10 TMB score analysis and SNV analysis based on SNV data

且与预后不良有关,提示 *CHRNA5* 可能促进了PDAC的进展。本实验结果显示:单独干扰 *CHRNA5* 对PDAC细胞增殖有明显影响,但在ACh处理下,干扰 *CHRNA5* 可使细胞增殖活性明显降低,这提示 *CHRNA5* 可能与ACh相互作用,共同调节PDAC细胞的增殖。另有研究<sup>[17]</sup>显示ACh通过 *CHRNA5* 促进肝内胆管癌的EMT并促进其转移,nAChR激活能够促进肿瘤增长<sup>[19]</sup>。本研究结果为 *CHRNA5* 通过ACh参与肿瘤发生发展增加了新证据,为阐明胰腺癌发生的分子机制提供了依据。

本研究发现 *CHRNA5* 与肿瘤免疫微环境存在密切关系。*CHRNA5* 可能与PDAC的TME中巨噬细胞和活化状态B细胞的浸润减少以及中性粒细胞浸润的增加有关联。在TME中,巨噬细胞扮演着复杂的角色,能够根据微环境中的信号响应而采取不同的激活状态,即M1型(促炎)和M2型(抗炎或促肿瘤)<sup>[20]</sup>。M1型巨噬细胞倾向于发挥抗肿瘤效应,而M2型巨噬细胞则可能促进肿瘤发展<sup>[21]</sup>。活化B细胞在抗原呈递过程中起到关键作用,通过其独特的机制招募T细胞,参与形成具有

A: *CHRNA5* high expression group; B: *CHRNA5* low expression group.图 11 *CHRNA5*高表达和*CHRNA5*低表达组的CNV分析Fig. 11 CNV analysis on *CHRNA5* high expression and *CHRNA5* low expression groupsA: Capan-2 cells; B: MIA PaCa-2 cells. \* $P < 0.001$  compared with NC group.图 12 RT-qPCR法检测 siRNA 干扰后各组 Capan-2 和 MIA PaCa-2 细胞中 *CHRNA5* mRNA 表达水平Fig. 12 Expression levels of *CHRNA5* mRNA in Capan-2 and MIA PaCa-2 cells in various groups after intervened by siRNA detected by RT-qPCR method

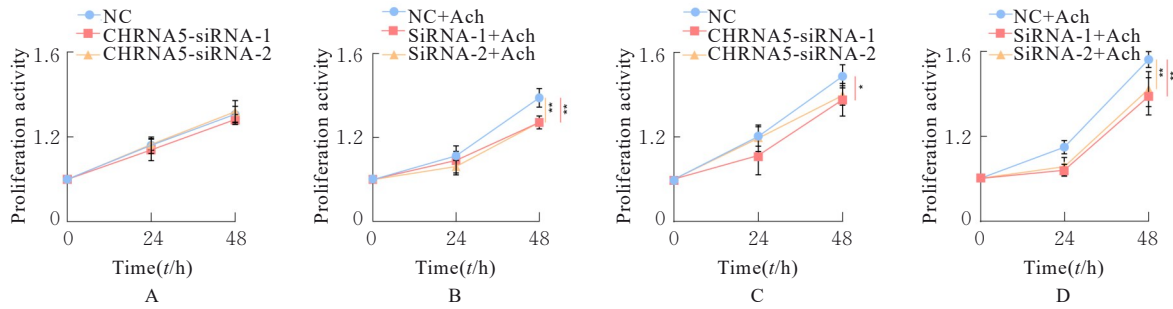
免疫激活特性的“热”肿瘤微环境。中性粒细胞通过形成中性粒细胞细胞外陷阱锚定循环肿瘤细胞, 促进其转移, 促进肿瘤的进展<sup>[23-24]</sup>。本研究结果表明 *CHRNA5* 的高表达增加了炎症相关免疫细胞如中性粒细胞的浸润, 同时减少了免疫监视相关免疫细胞活化 B 细胞的浸润, 而 *CHRNA5* 如何影响 PDAC 肿瘤免疫微环境并促进肿瘤进展还需要深入研究。

髓细胞瘤病毒癌基因 (myelocytomatosis viral oncogene, MYC) 家族癌蛋白是癌细胞代谢重组

过程中的关键调控因子, 在多种恶性肿瘤中均被激活<sup>[25]</sup>。作为 MYC 家族成员之一, c-Myc 在部分肿瘤细胞中过表达并参与调节细胞周期、细胞衰老、细胞分化和细胞凋亡等许多生理过程<sup>[26]</sup>。本研究首先通过数据分析发现 *CHRNA5* 与细胞周期相关的通路 DNA replication preinitiation、Cell cycle checkpoint、E2F targets、G2M checkpoint、MYC targets V1 和 DNA replication 有关联, 并通过实验验证了 *CHRNA5* 影响了 c-Myc 蛋白的表达, 这表明 *CHRNA5* 可能通过调控 c-Myc 蛋白, 促进肿瘤细胞的增殖。

*CHRNA5* 基因可能通过促进肿瘤细胞的基因变异促进了肿瘤的进展。本研究发现 *CHRNA5* 与 TMB 呈正相关, 表明 *CHRNA5* 高表达的 PDAC 样本中具有更多的肿瘤突变负荷。此外, *CHRNA5* 高表达与 *KRAS*、*TP53* 和 *SMAD4* 基因的变异率显著增加有关, 而这些基因的变异与 PDAC 的分期进展高度相关<sup>[27-28]</sup>。这表明 *CHRNA5* 可能通过影响肿瘤驱动基因的变异, 进而促进了 PDAC 的进展。

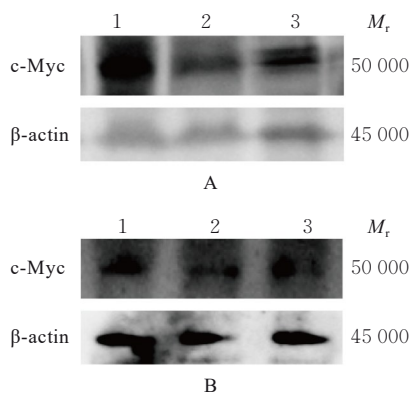
综上所述, 本研究不仅确认了 *CHRNA5* 在 PDAC 及其他肿瘤中的重要性, 还对其在 PDAC 进展中的作用机制进行了初步探讨, 为 PDAC 的治疗提供了潜在靶点和理论依据。未来的研究应进一步探索 *CHRNA5* 与其他信号通路的交互作用, 以及其在临床实践中作为预后标志物和治疗靶点的可行



A, B: Capan-2 cells; C, D: MIA PaCa-2 cells; A, C: Before treatment of Ach; B, C: After treatment of Ach. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图13 CCK-8法检测各组MIA PaCa-2和Capan-2细胞增殖活性

Fig. 13 Proliferation activities of MIA PaCa-2 and Capan-2 cells in various groups detected by CCK-8 assay



A: MIA PaCa-2 cells; B: Capan-2 cells. Lane 1: NC group; Lane 2: SiRNA-1 group; Lane 3: SiRNA-2 group.

图14 siRNA干扰后各组MIA PaCa-2和Capan-2细胞中c-Myc蛋白表达电泳图

Fig. 14 Electrophoregram of expressions of c-Myc protein in MIA PaCa-2 and Capan-2 cells in various groups after intervened by siRNA

性。此外,开发针对 $CHRNA5$ 的特异性抑制剂,结合现有的抗癌策略,可能会为PDAC患者提供新的治疗策略。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

戴大有参与实验操作、数据分析和论文撰写,张志刚和李慧参与研究方案设计及论文修改。

#### [参考文献]

- [1] REBECCA L S, KIMBERLY D, NIKITA S W, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] MIZRAHI J D, SURANA R, VALLE J W, et al. Pancreatic cancer[J]. Lancet, 2020, 395(10242): 2008-2020.

- [3] SHERMAN M H, BEATTY G L. Tumor microenvironment in pancreatic cancer pathogenesis and therapeutic resistance[J]. Annu Rev Pathol, 2023, 18: 123-148.
- [4] CHY Y, MILLY M, ALBERT D, et al. Temporal changes in cause of death among adolescents and adults in six countries in eastern and southern Africa in 1995-2019: a multi-country surveillance study of verbal autopsy data[J]. Lancet Glob Health, 2024, 12(8): e1278-e1287.
- [5] JIANG S H, Hu L P, WANG X et al. Neurotransmitters: emerging targets in cancer [J]. Oncogene, 2020, 39(3): 503-515.
- [6] LUTGENDORF S K, SOOD A K, ANTONI M H, Host factors and cancer progression: biobehavioral signaling pathways and interventions[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(26): 4094-4099.
- [7] YANG Y H, LIU J B, GUI Y, et al. Relationship between autophagy and perineural invasion, clinicopathological features, and prognosis in pancreatic cancer[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(40): 7232-7241.
- [8] SALOMAN J L, ALBERS K M, LI D J, et al. Ablation of sensory neurons in a genetic model of pancreatic ductal adenocarcinoma slows initiation and progression of cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(11): 3078-3083.
- [9] WANG X B, ROUZANNA I, YE L H, et al. Phenotype screens of murine pancreatic cancer identify a Tgf- $\alpha$ -Ccl2-paxillin axis driving human-like neural invasion[J]. J Clin Invest, 2023, 133(21): e166333.
- [10] KRAIS A M, HAUTEFEUILLE A H, CROS M P, et al. CHRNA5 as negative regulator of nicotine signaling in normal and cancer bronchial cells: effects on motility, migration and p63 expression [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(9): 1388-1395.

- [11] WALTERS I B, BURACK L H, T RCOVENet al. Suberythemogenic narrow-band UVB is markedly more effective than conventional UVB in treatment of psoriasis vulgaris[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1999, 40(6): 893-900.
- [12] MENTER A, KORMAN N J, ELEMENTS C A, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2009, 61(3): 451-85.
- [13] MENTER A, FELDMAN S R, WEINSTEIN G D, et al. A randomized comparison of continuous *vs.* intermittent infliximab maintenance regimens over 1 year in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2007, 56(1): 31.e1-31.e15.
- [14] KAUR-KNUDSEN D, BOJSEN S E, TYBJARG-HANSEN A, et al. Nicotinic acetylcholine receptor polymorphism, smoking behavior, and tobacco-related cancer and lung and cardiovascular diseases: a cohort study[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(21): 2875-2882.
- [15] EMOKE R, DE LEEUW J, BAERVELDT E Met al. Cellular and molecular effects of pulsed dye laser and local narrow-band UVB therapy in psoriasis [J]. *Lasers Surg Med*, 2010, 42(3): 201-210.
- [16] ZOU H L, CHEN Y, ZHU X P, et al. Spinosad blocks *CHRNA5* mediated EGFR signaling pathway activation to inhibit lung adenocarcinoma proliferation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 117105.
- [17] FU Y, SHEN K Y, WANG H, et al. Alpha5 nicotine acetylcholine receptor subunit promotes intrahepatic cholangiocarcinoma metastasis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 63.
- [18] ZAHALKA A H, FRENETTE P S, Nerves in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(3): 143-157.
- [19] ZHANG Y, JIA Y F, LI P, et al. Reciprocal activation of  $\alpha 5$ -nAChR and STAT3 in nicotine-induced human lung cancer cell proliferation [J]. *J Genet Genomics*, 2017, 44(7): 355-362.
- [20] RUFFELL B, AFFARA N I, Coussens Lisa M, Differential macrophage programming in the tumor microenvironment[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(3): 119-126.
- [21] ZHANG W R, WANG M M, JI C H, et al. Macrophage polarization in the tumor microenvironment: Emerging roles and therapeutic potentials [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 116930.
- [22] LAUMONT C M, BANVILLE A C, GILARDIM, et al. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7): 414-430.
- [23] JIN L, Kim H S, SHI J Q, Neutrophil in the Pancreatic Tumor Microenvironment [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1170.
- [24] SILVESTRE-ROIG C, KALAFATI L, CHAVAKIS T, Neutrophils are shaped by the tumor microenvironment: novel possibilities for targeting neutrophils in cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 77.
- [25] RENUMATHY D, ANJA, MAHAUAD-FERNANDEZ W D, et al. The MYC oncogene-the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(1): 23-36.
- [26] ARIANNA G, SARA T, GIORGIA G, et al. The FGF/FGFR/c-Myc axis as a promising therapeutic target in multiple myeloma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 294.
- [27] MCINTYRE C A, ADRIEN G, JIWOON P, et al. Distinct clinical outcomes and biological features of specific KRAS mutants in human pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(9): 1614-1629.e5.
- [28] MASUGI Y, TAKAMATSU M, TANAKA M, et al. Post-operative mortality and recurrence patterns in pancreatic cancer according to KRAS mutation and CDKN2A, p53, and SMAD4 expression [J]. *J Pathol Clin Res*, 2023, 9(5): 339-353.