·论　著·

PD-1 与其他蛋白质的互作网络分析及验证*

姜　茹，姜　杰，谭宏伟，修　燕，王国艳△

（滨州医学院烟台附属医院检验科，山东烟台 264100）

摘　要：目的　构建程序性死亡-1（PD-1）及其配体与其他蛋白质的相互作用网络，加深对 PD-1 信号通路研究的认识，为 PD-1 及其相关配体的基础及临床应用研究提供理论资料。**方法**　通过 PubMed 检索 PD-1 及其配体的研究文献，基于文献挖掘对已报道的与 PD-1 及其配体存在相互作用的蛋白质进行统计，并以这部分蛋白质进行二次检索及文献挖掘统计，最后用软件 Cytoscape 构建相互作用网络并进行分析；寻找网络中与细胞迁移有关的分子及其与 PD-L1 之间的关系，并利用荧光定量 PCR 及迁移试验进行验证。**结果**　在构建出的 PD-1/PD-L1 及 PD-1/PD-L2 分子互作网络中分别共计 122 个、126 个分子，这些分子在 T 细胞受体信号通路、细胞黏附、JAK-STAT 信号通路及细胞因子间相互作用等众多生物过程中起到重要作用；基于互作网络显示，PD-L1 会间接影响到 CXCR4 的表达，这一推测被荧光定量 PCR 及迁移试验结果所支持。**结论**　通过生物信息学手段对互作网络蕴含的信息进行挖掘发现，PD-1/PD-L1 通路与 PD-1/PD-L2 通路的作用机制存在差异。同时，利用基于文献挖掘及生物信息学的方法研究 PD-1 信号通路是 1 种可以合理利用生物文献数据，为实际试验提供指导的好方法。

关键词：文献挖掘；　生物信息学；　PD-1；　PD-L1；　PD-L2

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2017.02.008　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2017)02-0166-06

Analysis and experimental evidence on interaction networks among PD-1 and other proteins*

JIANG Ru, JIANG Jie, TAN Hongwei, XIU Yan, WANG Guoyan△

(*Department of Clinical Laboratory, Yantai Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong* 264100, *China*)

Abstract: Objective　An interaction network among PD-1-ligands and other proteins were built to add deeper understanding of PD-1 signal pathway and to supply the theoretical data on the clinical application study of PD-1 and its ligands. **Methods**　Searching the literature about PD-1 and its ligands in the PubMed, the result of which would be used to summarize the proteins that had been reported to have interactions with PD-1 and its ligands, and then, quadratic search would be performed on these proteins. Finally, the software Cytoscape would be used to build and analyze the interaction network and verified by PCR. **Results**　There were 122 and 126 nodes in the PD-1/PD-L1 network and PD-1/PD-L2 network respectively. These proteins were involved in TCR signal pathway, cell adhesion, JAK-STAT signal pathway and interaction between cytokines. Meanwhile, a perspective that PD-L1 may influence on CXCR4 through JAK-STAT pathway based on the network which had been supported by qPCR. **Conclusion**　The bioinformatics suggested that there are differences between the mechanism of PD-1/PD-L1 and PD-1/PD-L2. Additionally, the method, which was based on the literature mining and bioinformatics, is good to put the biological literature to rational utilization and to provide guidance for experiments.

Key words: literature mining;　bioinformatics;　PD-1;　PD-L1;　PD-L2

程序性死亡-1（PD-1）是由 288 个氨基酸组成的免疫球蛋白超家族Ⅰ型跨膜糖蛋白，属于 B7/CD28 家族共刺激分子。PD-L1 和 PD-L2 是 PD-1 的 2 个配体，同属于 B7 家族[1]。目前 PD-1 信号通路尚没有清晰完整的了解，研究人员运用各种技术已发现了大量可以直接或间接与 PD-1 及其配体相互作用的蛋白质及其基因。传统的生物学研究基于还原论，试图在分子水平上解释单个 DNA、RNA 和蛋白质在生命机制中发挥的具体功能，但这种研究的缺点为仅能对生物系统的微观或者局部现象做出解释，无法对生物系统的整体行为进行深入了解。因此，作者通过基于文献挖掘的方法从 PubMed 中挖掘出可以与 PD-1 及其配体直接或间接相互作用的蛋白质分子及其基因，用 Cytoscape 软件构建互作网络并进行生物信息学分析，进一步整理总结 PD-1 可能参与的生理活动，以形成对 PD-1 信号通路系统的认识。

此外，为进一步明确文献挖掘结果对试验的前瞻性作用，作者以细胞迁移为例进行初步探究。细胞迁移参与机体的多种生理病理过程，目前关于 PD-L1 对细胞迁移影响的机制尚不明确，希望可以通过上述方式达到指导试验的目的。

1　材料与方法

1.1　检索策略　在 PubMed 中以（programmed death 1[All Fields] OR programmed death ligand 1[All Fields] OR CD274 [All Fields] OR programmed death ligand 2[All Fields] OR CD273[All Fields]）AND "humans"[MeSH Terms]为检索条件进行检索，在 CNKI 中以"[关键词]PD-1 或者[关键词]PD-L1 或者[关键词]PD-L2"为检索条件进行跨库检索，将上述两者检索结果（包含摘要及关键词信息）导入文献管理工具 End-

*　**基金项目：**山东省烟台市科技发展计划资助项目（2014WS047）；滨州医学院科技发展计划资助项目（BY2013KL42）。

作者简介：姜茹，女，主管技师，主要从事临床免疫检验、临床检验等方面的相关研究。　△　**通信作者**，E-mail：wgy1201@163.com。

note X7(http://endnote.com/),再以 xml 格式文件将文献信息导出,利用 R 软件包 XML(http://cran.rstudio.com/bin/windows/contrib/3.1/XML_3.98-1.1.zip)对其中的关键词及摘要信息进行抓取后另存为文档,用于后续筛选分析。

1.2　筛选条件　通过对摘要及关键词的归纳总结分析寻找与 PD-1 及其配体 PD-L1/PD-L2 直接相关的分子;研究的分子与 PD-1 或 PD-L1 或者 PD-L2 的关系至少有 2 篇以上的报道,同时剔除重复分子,整理所得分子并将其归为直接相关分子组。

1.3　二次检索　以直接相关分子组为目的分子,进行二次检索,策略及筛选条件同上,归为间接相关分子组。

1.4　相关分子的分析整理　根据文献及其摘要,将分子按其相关性分成 3 组:PD-1 组、PD-L1 组、PD-L2 组,并整理成表。

1.5　互作网络的构建及分析　互作网络分为 2 组:PD-1/PD-L1 组及 PD-1/PD-L2 组。根据文献信息确定分子间是否存在或可能存在相互作用,利用 Cytoscape 软件(http://www.cytoscape.org/)构建互作网络并分析关键节点,随后进行 KEGG 通路分析。

1.6　关于 PD-L1 对细胞迁移影响的推测及相关试验验证　基于网络,作者发现 PD-L1 可能通过 STAT1 分子间接影响到细胞迁移相关分子 CXCR4,因此作者设计以下试验进行验证。

1.6.1　qPCR 试验　以 hPMSCs(分离于足月健康胎盘,滨州医学院烟台附属医院提供,供者知情同意)为研究对象,主要试剂:Ⅳ型胶原酶购自美国 Sigma 公司,PD-L1 siRNA 购自南通百奥迈科公司,脂质体转染试剂 Lipofectamine™2000 购自 Invatrigen 公司、Trizol 试剂为上海生工产品,逆转录试剂盒为加拿大 Fermentas 公司产品,培养瓶、培养板和 Transwell 细胞培养板购自美国 Corning 公司,荧光定量 PCR 试剂盒购自北京全式金公司。试验分组:正常培养 hPMSCs 组;NC siRNA 转染组;PD-L1 siRNA 转染组。

收集正常培养的 hPMSCs、转染 NC siRNA、转染 PD-L1 siRNA 48 h 后的 hPMSCs,采用 Trizol 一步法抽提细胞总 RNA,加入引物和逆转录酶,利用常规方法合成 cDNA。取 1 μL cDNA 加入含有 PD-L1 引物正义链:5′-CTC TGG CAC ATC CTC CAA AT-3′,反义链:5′-TCA CAT CCA TCA TTC TCC CTT T-3′(或 CXCR4 引物正义链:5′-TCA TCC TCA TCC TGG CTT TC-3′,反义链:5′-CAA ACT CAC ACC CTT GCT TG-3′,内参基因 β-actin 引物正义链:5′-ATG GGT CAG AAG GAC TCC TAT G-3′,反义链:5′-ATC TCC TGC TCG AAG TCT AGA G-3′)和 SYBR-green Ⅰ Ex Taq 酶的 20 μL 反应体系中,于荧光定量 PCR 仪(ABI-7500)进行扩增,反应程序为:95 ℃ 15 s 预变性;95 ℃ 30 s;60 ℃ 30 s;72 ℃ 30 s 反应进行 40 个循环;溶解曲线分析程序为:95 ℃ 30 s;60 ℃ 1 min;95 ℃ 30 s;60 ℃ 15 s。所有样本设 3 个复孔。根据方法 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 处理数据,使用方差分析进行差异性检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.6.2　迁移试验　收集正常培养的 hPMSCs、转染 NC siRNA、转染 PD-L1 siRNA 48 h 后的 hPMSCs,1 200 r/min 离心 5 min,用无血清 DMEM-LG 培养基调整细胞密度为 1×10^7/mL,接种于 Transwell 板上室,每孔 100 μL,Transwell 板下室分别加入 600 μL DMEM-LG 完全培养基、600 μL 含 SDF-1α(10 ng/mL)的 DMEM-LG 完全培养基、600 μL hPMSCs 正常培养上清液,每组设 3 个复孔。置 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 6 h 后观察细胞、收集下室中 hPMSCs,入相应流式管中,1 200 r/min离心 5 min,每管加入 500 μL 固定液,重悬起细胞,流式细胞仪计数。按照下列公式计算细胞迁移率,迁移率=下室细胞数/接种细胞总数×100%。

2　结　　果

2.1　相关分子的分析整理结果及互作网络的构建　共找到 56 个与 PD-1 相关基因,80 个与 PD-L1 相关基因以及 89 个与 PD-L2 相关基因,其中有直接试验证据的分子分别为 35 个、36 个及 42 个,具体见表 1。

2.2　网络分析　为了更好地分析相关分子所揭示的内容,利用 Cytoscape 软件分别构建 PD-1/PD-L1 及 PD-1/PD-L2 互作网络,并分析节点的中间中心度(BC)。BC 是对网络中 1 个节点中心度的测量,衡量 1 个节点是否是 1 个网络的中心。BC 表示所有的网络连接中通过某个节点的最短路径数。它很好地描述了网络中 1 个节点可能需要承载的流量。1 个节点的 BC 值越大,流经它的数据分组越多,意味着该节点在网络中越容易成为连接不同部分的桥梁,该节点也就越重要。同时,该节点也就越容易成为网络的限速节点[2]。

表 1　文献数据挖掘结果

分组	目标分子	相互作用分子	
		有直接试验证据的分子	无直接证据但推测可能存在直接或间接相互作用的分子
PD-1 组	PD-1	PD-L1、PD-L2、PTPN11、PTPN6	CD4、HLA-DR4、HLA-DRB5、HLA-DR15、DRB52、TCRA
	PTPN11	GAB1、GAB2、GRB2、PDGFRB、IRS1、JAK2、EGFR、INSR、IGF1R、FRS2	—
	PTPN6	CD22、CD72、LCK、LCP2、LAIR1、EPOR、JAK2、SYK、EGFR、KDR	—
	CD4	LCK、HLA-DR15、HLA-DR4、UBC、CCR5、CXCR4、PTPRC、CD8A、IL2RA、CD44	—
	HLA-DR4	CD4、MLRW	CⅡTA、CD74、PTPN11、ICAM1、IRF5、CTSS、HLA-A、HLA-B41
	HLA-DRB5	MLRW	CD4、CD74、CⅡTA、PTPN11、IRF5、ICAM1、HLA-A、HLA-B41、PRKCQ
	HLA-DR15	CD4、MLRW、DMA	IFNG、CD74、CD80、PTPN11、CⅡTA、SP100、IRF5

续表 1　文献数据挖掘结果

分组	目标分子	相互作用分子	
		有直接试验证据的分子	无直接证据但推测可能存在直接或间接相互作用的分子
	DRB52	MLRW	CD4、CⅡTA、CD74、ICAM1、PTPN11、CTSS、IRF5、NCAM1、PTPRC
	TCRA	HLA-A	TRAC、CD4、CD3E、CD3D、CD3G、HLA-B、CD8A、LCP2、GRAP2
	PD-L1	见 PD-L1 组	
	PD-L2	见 PD-L2 组	
PD-L1 组	PD-L1	PD-1、CD80	STAT1、PTEN、IRF1、GBP4、BATF、IL10RA、PARP14、GBP1
	CD80	CTLA4、CD28、CD86	CD4、IFNG、CSF2、PRF1、B2M、HLA-DR15、ICAM1
	STAT1	IFNGR1、JAK2、CREBBP、IRF1、IRF9、TYK2、EP300、EGFR、JAK1、STAT3	—
	PTEN	AKT1、UBC、TP53、PIK3CD、PIK3CB、PIK3CA、SLC9A3R1、PIK3CG	JUN、FOS
	IRF1	STAT1、IRF8、EP300	STAT3、IFNG、CⅡTA、STAT4、IFNA2、HLA-B、IRF8、EP300、GBP1
	BATF	JUNB、JUN、IFI35、JUND、FOS、IRF4	NOTCH1、PD-1、IL22
	PARP14	STAT6、FCER2	PARP9、DTX3L、IFIH1、STAT1、RSAD2、RTP4、IRF7、XAF1
	GBP1	IRF7	IRF1、GBP2、OAS1、OAS2、IRF9、OAS3、OASL、STAT1、SP100
	GBP4	—	ENSG00000228284、ENSG00000236178、C1orf105、GPX7、GBP5、IFIT2、IFIT3、RTP4、IFIH1、CXCL10
	IL10RA	IL10、JAK1、JAK2、IL10RB	TYK2、SOCS3、ITGAM、PTPN6、SOCS2、JAK3
PD-L2 组	PD-L2	PD-1	IL4、CTLA4、BTLA、IL10RA、CD4、CD40、SLC25A30、CD46、RASGRP1
	IL4	IL4R、IL2RG、IL13RA1	STAT6、IL2、CSF2、IL5、IL13、FOS、JAK2
	CTLA4	CD86、CD80、FYN、PTPN11、LCK、AP2M1、LYN、PIK3R1	FOXP3、CD276
	BTLA	TNFRSF14、PTPN11、PTPN6、VTCN1	CD79A、CD247、CD160、TNFSF14、CTLA4、DARC
	IL10RA	IL10、JAK1、JAK2、IL10RB	TYK2、SOCS3、ITGAM、PTPN6、SOCS2、JAK3
	CD4	LCK、HLA-DR15、HLA-DR4、UBC、CCR5、CXCR4、PTPRC、CD8A、IL2RA、CD44	—
	CD40	TRAF3、CD40LG、TRAF2、TRAF6、TRAF1、BIRC3、JAK3、TDP2、BIRC2	CD86
	SLC25A30	—	CD4、IL23A、FOXP3、PD-L2、AOC3、NCAM1、IL6、CD19、IL21、CD46
	CD46	C3、MSN、SRC、YES1	CF1、CR1、C3orf55、ENSG00000235956、ENSG00000227600、ENSG00000235925
	RASGRP1	HRAS	RRAS、RAP1GAP、KRAS、APBB1IP、RAP1GAP2、ITPR3、NRAS、PLCG1、RASGRP3

注：—表示无数据。

2.3　PD-1/PD-L1 组互作网络　PD-1/PD-L1 组互作网络共有 122 个节点，1 384 条互作连线。节点中心度分析显示，互作网络的关键节点主要包括：JAK-STAT 信号通路分子（STAT1、JAK1 等），参与红系分化的鸟苷酸结合蛋白 GBP4/GBP5，干扰素调节因子（IRF、TYK 等），T 细胞及 B 细胞活化相关分子（CD4、LCK 及 SYK 等），主要组织相容性抗原 MHC（HLA-DR15、DRB52 等），原癌基因（PTPN6、PTPN11 等）及泛素蛋白 UBC 等。

2.4　PD-1/PD-L2 组互作网络　PD-L2 组互作网络共有 126 个节点，1 852 条互作连线。节点中心度分析显示，互作网络的关键节点主要包括：泛素蛋白 UBC，干扰素调节因子（CD40、ICAM1 等），T 细胞及 B 细胞活化相关分子（CD4、LCK 及 SYK 等），主要组织相容性抗原 MHC（DRB52 等）、原癌基因 PTPN6、PTPN11 等。

2.5　KEGG 通路分析　对互作网络节点分子进行 KEGG 通路分析，取包含基因数≥10%总数等于 13 个基因的通路，结果显示，PD-1/PD-L1 及 PD-1/PD-L2 互作网络均可参与 JAK-STAT 信号通路、NK 细胞介导的细胞毒性、T 细胞受体信号通路、癌症相关通路、肺结核、弓形虫病、红系分化、麻疹、破骨细胞分化、细胞黏附分子及细胞因子间相互作用，具体见表 2。不同的是，PD-1/PD-L1 互作网络还可参与 Toll 样受体信号通路、丙型肝炎、A 型流行性感冒、美洲锥虫病、前列腺癌及趋化

因子信号通路,而 PD-1/PD-L2 互作网络则可参与 B 细胞受体信号通路、Fc epsilon RI 信号通路、初级免疫缺陷、利什曼病及同种异体移植物排斥。

表 2　KEGG 通路分析结果

同源基因编号	信号通路	PD-1/PD-L1	p-value_fdr	PD-1/PD-L2	p-value_fdr
hsa04662	B 细胞受体信号通路	—	—	CD19、GRB2、NRAS、SYK、PIK3R1、CD79A、FOS、LYN、CD22、CD72、PTPN6、RASGRP3、HRAS	2.22E-15
hsa04664	Fc epsilon RI 信号通路	—	—	IL5、GRB2、IL4、NRAS、SYK、PIK3R1、LCP2、LYN、IL13、PLCG1、GAB2、FYN、CSF2、HRAS	1.27E-16
hsa04630	Jak-STAT 信号通路	IFNGR1、AKT1、PIK3CB、JAK3、JAK1、IFNA2、IL10、TYK2、CREBBP、STAT 6、IL22、JAK2、IL10RB、PIK3CA、PIK3CG、IRF9、PTPN6、GRB2、PTPN11、STAT 1、IFNG、SOCS2、SOCS3、EPOR、EP300、PIK3CD、STAT 4、IL10RA、IL2RA、CSF2、STAT 3	3.16E-38	IL6、JAK3、PIK3R1、JAK1、IL10、IL2、TYK2、STAT 6、JAK2、IL10RB、PTPN6、IL4R、IL5、GRB2、IL4、PTPN11、IFNG、SOCS2、IL13RA1、SOCS3、EPOR、IL13、IL21、IL10RA、IL2RA、CSF2、IL2RG、IL23A	8.36E-33
hsa04650	NK 细胞介导的细胞毒性	LCK、IFNGR1、PIK3CB、IFNA2、ICAM1、PRF1、PIK3CA、PIK3CG、PTPN6、GRB2、SYK、HLA-B41、PTPN11、IFNG、LCP2、PIK3CD、CSF2	9.22E-18	LCK、CD247、PIK3R1、ICAM1、PLCG1、PTPN6、FYN、HRAS、GRB2、NRAS、SYK、HLA-B41、PTPN11、IFNG、LCP2、CSF2	3.76E-16
hsa04620	Toll 样受体信号通路	AKT1、PIK3CB、CD86、IFNA2、FOS、IRF7、PIK3CA、PIK3CG、CXCL10、JUN、CD80、STAT 1、PIK3CD、IRF5	4.44E-15	—	—
hsa04660	T 细胞受体信号通路	LCK、AKT1、PIK3CB、IL10、CD8A、FOS、CTLA4、PIK3CA、PTPRC、PIK3CG、CD28、JUN、PTPN6、CD4、GRB2、GRAP2、IFNG、PRKCQ、LCP2、PIK3CD、CD3G、PDCD1、CD3D、CD3E、CSF2	1.32E-32	LCK、CD247、PIK3R1、IL10、IL2、RASGRP1、CD8A、FOS、CTLA4、PTPRC、PLCG1、PTPN6、CD4、FYN、HRAS、IL5、GRB2、IL4、NRAS、GRAP2、CD40LG、IFNG、PRKCQ、LCP2、CD3G、PDCD1、CD3D、CD3E、CSF2	1.67E-39
hsa05200	癌症相关通路	AKT1、PIK3CB、CREBBP、TP53、PIK3CG、GRB2、STAT 1、PDGFRB、EP300、JAK1、FOS、PIK3CA、JUN、IGF1R、PIK3CD、EGFR、PTEN、STAT 3	1.53E-12	IL6、TRAF6、PLCG1、GRB2、PDGFRB、BIRC2、BIRC3、PIK3R1、JAK1、TRAF2、FOS、HRAS、TRAF1、NRAS、IGF1R、EGFR、TRAF3	3.3E-11
hsa05160	丙型肝炎	AKT1、PIK3CB、JAK1、IFNA2、TYK2、TP53、IRF7、PIK3CA、PIK3CG、IRF9、GRB2、OAS3、STAT 1、IRF1、SOCS3、OAS1、PIK3CD、EGFR、STAT 3	1.26E-20	—	—
hsa05340	初级免疫缺陷	—	—	LCK、CD19、PTPRC、CD40、JAK3、CD40LG、CD3D、CIITA、CD4、CD8A、CD79A、CD3E、IL2RG	1.46E-19
hsa05152	肺结核	CTSS、IFNGR1、AKT1、JAK1、IFNA2、IL10、CREBBP、JAK2、IL10RB、CD74、SYK、STAT 1、IFNG、ITGAM、HLA-DRB5、EP300、HLA-DR15、IL10RA、CIITA	2.98E-18	CTSS、IL6、JAK1、IL10、TRAF6、JAK2、IL10RB、CD74、CR1、SYK、IFNG、SRC、ITGAM、HLA-DRB5、C3、HLA-DR15、IL10RA、CIITA、IL23A	5.63E-18
hsa05145	弓形虫病	IFNGR1、AKT1、PIK3CB、JAK1、IL10、TYK2、JAK2、IL10RB、PIK3CA、PIK3CG、STAT 1、IFNG、HLA-DRB5、HLA-DR15、PIK3CD、IL10RA、CCR5、CIITA、STAT 3	1.26E-20	PIK3R1、JAK1、IL10、TRAF6、TYK2、JAK2、IL10RB、CD40、CD40LG、IFNG、HLA-DRB5、BIRC2、HLA-DR15、IL10RA、CCR5、CIITA、BIRC3	1.92E-17
hsa04640	红系分化	CD8A、ITGAM、HLA-DRB5、CD22、EPOR、HLA-DR15、CD3G、IL2RA、CD3D、CD44、FCER2、CD4、CSF2、CD3E	7.27E-16	CD19、CR1、IL5、IL4、IL6、CD8A、ITGAM、HLA-DRB5、CD22、EPOR、HLA-DR15、CD3G、IL2RA、CD3D、CD44、CD4、IL4R、CSF2、CD3E	1.58E-23
hsa05140	利什曼病	—	—	CR1、IL4、IFNG、JAK1、IL10、ITGAM、FOS、TRAF6、HLA-DRB5、C3、JAK2、HLA-DR15、PTPN6	1.95E-15
hsa05164	流行性感冒 A	IFIH1、IFNGR1、AKT1、RSAD2、PIK3CB、JAK1、IFNA2、ICAM1、TYK2、CREBBP、JAK2、IRF7、PIK3CA、PIK3CG、CXCL10、IRF9、JUN、OAS3、STAT 1、IFNG、HLA-DRB5、SOCS3、EP300、HLA-DR15、OAS1、PIK3CD、CIITA	1E-30	—	—
hsa05162	麻疹	IFIH1、IFNGR1、AKT1、PIK3CB、JAK3、JAK1、IFNA2、TYK2、TP53、JAK2、IRF7、PIK3CA、PIK3CG、CD28、IRF9、OAS3、STAT 1、IFNG、PRKCQ、OAS1、PIK3CD、CD3G、IL2RA、CD3D、CD3E、STAT 3	5.49E-32	IL6、JAK3、PIK3R1、MSN、JAK1、IL2、TRAF6、TYK2、JAK2、FYN、IL4、IFNG、PRKCQ、CD46、IL13、CD3G、IL2RA、CD3D、CD3E、IL2RG	8.94E-22
hsa05142	美洲锥虫病	IFNGR1、AKT1、PIK3CB、IL10、FOS、PIK3CA、PIK3CG、JUN、IFNG、PIK3CD、CD3G、CD3D、CD3E	1.27E-13	—	—

续表 2　KEGG 通路分析结果

同源基因编号	信号通路	PD-1/PD-L1	p-value_fdr	PD-1/PD-L2	p-value_fdr
hsa04380	破骨细胞分化	LCK、IFNGR1、AKT1、PIK3CB、JAK1、FOS、TYK2、PIK3CA、PIK3CG、IRF9、JUN、JUNB、JUND、GRB2、SYK、STAT 1、IFNG、LCP2、SOCS3、PIK3CD、GAB2	2.18E-24	LCK、PIK3R1、JAK1、TRAF2、FOS、TRAF6、TYK2、FYN、GRB2、SYK、IFNG、LCP2、SOCS3、GAB2	8.94E-14
hsa05330	同种异体移植物排斥	—	—	CD80、HLA-DR15、IL5、IL4、CD86、CD40、CD40LG、HLA-B41、IFNG、IL10、IL2、HLA-DRB5	1.62E-17
hsa05215	前列腺癌	AKT1、PIK3CB、GRB2、IGF1R、PDGFRB、CREBBP、TP53、EP300、PIK3CD、PIK3CA、EGFR、PIK3CG、PTEN	2.39E-14	—	—
hsa04062	趋化因子信号通路	AKT1、PIK3CB、JAK3、CXCR4、JAK2、PIK3CA、PIK3CG、CXCL10、GRB2、STAT 1、PIK3CD、CCR5、STAT 3	1.59E-10	—	—
hsa04514	细胞黏附分子	CD86、CD8A、ICAM1、CTLA4、PTPRC、CD274、CD28、CD4、CD80、NCAM1、HLA-B41、ITGAM、HLA-DRB5、CD22、HLA-DR15、PDCD1	2.65E-16	CD86、CD8A、ICAM1、CTLA4、CD276、CD40、PTPRC、CD4、CD80、NCAM1、CD40LG、HLA-B41、ITGAM、HLA-DRB5、CD22、HLA-DR15、PDCD1、PDCD1LG2	6.3E-19
hsa04060	细胞因子间相互作用	IFNGR1、IL22、IL10RB、IFNG、PDGFRB、IL10RA、IFNA2、IL10、CXCR4、KDR、CXCL10、EPOR、CCR5、EGFR、IL2RA、CSF2	9.33E-12	IL6、IL2、IL10RB、CD40、CD40LG、IFNG、TNFRSF14、PDGFRB、IL10RA、IL23A、IL10、CXCR4、KDR、IL4R、IL5、IL4、IL13RA1、TNFSF14、EPOR、IL13、IL21、CCR5、EGFR、IL2RA、CSF2、IL2RG	1.59E-23

注：－表示无数据。

2.6　定量 PCR 试验结果　荧光定量 PCR 结果显示，转染 PD-L1 siRNA 组 CXCR-4 在 hPMSCs 中的表达较正常培养组及阴性对照组被明显下调，具体见图 1。

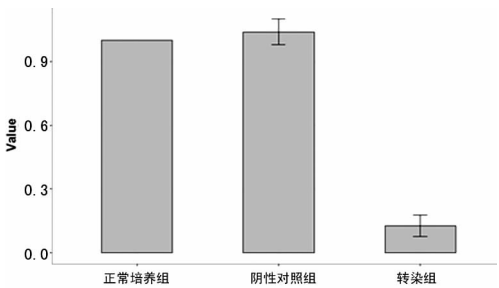

图 1　阻断 PD-L1 对 hPMSCs 表达 CXCR-4 的影响

2.7　迁移试验结果　Transwell 细胞培养体系检测结果显示，培养 6 h 后，DMEM-LG 培养基、SDF-1α、hPMSCs 培养上清液条件下，PD-L1 siRNA 阻断组细胞迁移均明显低于相同条件下未阻断组迁移率，差异具有统计学意义（$P<0.05$），具体见图 2，提示 PD-L1 阻断后，hPMSCs 的迁移能力减弱。

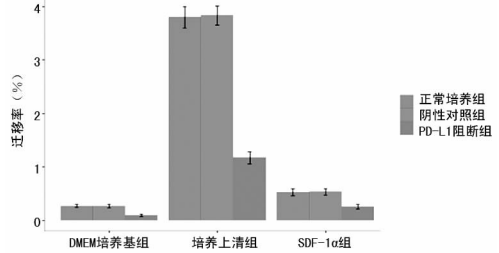

图 2　阻断 PD-L1 对 hPMSCs 迁移能力的影响

3　讨　论

生物信息学是以计算机为工具对生物信息进行存储分析的科学。生物医学文献的爆炸式增长，使得依赖手工方式掌握某领域内的研究现状及发展趋势变得愈加困难，也使得基于数据挖掘从文献中获得新知识的方法愈加重要。利用文献挖掘对文献中的信息进行提取，结合人工校验，可以将大量文献数据进行系统地整合分析。根据 Swanson[3] 报道的基于文献的知识发现理论，可以比较系统地了解本领域的研究概况、发展趋势，并有可能获得新的蕴含在大量文献中的新知识。同时，目前所能检索到的生物医学文献所报道的研究，大多数都是基于还原论，仅关心个别的蛋白质或者基因，因此不足以全面解释生物系统的整体行为。网络系统生物学利用网络研究生命系统不同组成部分的相互关系以及它们的动态关系，是目前从整体水平研究生命现象的热门手段[4]。因此，利用网络系统生物学整合分析文献挖掘得到的信息，将有利于深入理解科学问题。

PD-1 最初是在凋亡的 T 细胞杂交瘤中利用削减杂交法得到的，由于其和细胞凋亡相关而被命名为程序死亡-1 受体。人 PD-1 基因定位于染色体 2q37.3，与 CTLA-4 基因具有 23% 的同源性。PD-1 是 1 个相对分子质量为 55×10^3 的免疫球蛋白超家族Ⅰ型跨膜糖蛋白，由胞外的 1 个 IgV 样结构域和胞内 1 个免疫受体酪氨酸抑制基序组成。其中，IgV 样结构域含 4 个高度糖基化的 N 连接糖基化位点，可能在与配体的结合中发挥重要作用，胞内段的基序可使胞质段的磷酸化得到恢复，发挥拮抗抗原受体的功能。目前，PD-1 的配体被证实有 2 个，分别是 PD-L1 和 PD-L2。

目前为止，关于 PD-1 及其配体的研究方法多为利用基于还原论的分子生物学及细胞生物学手段，如本文通信作者前期工作中利用流式细胞术研究 PD-L1/PD-L2 对 T 细胞活化、增殖、周期及细胞因子分泌的影响，发现 PD-L1/PD-L2 可以抑制 T 细胞增殖，使 T 细胞周期阻滞于 G0/G1 期[5-7]。但利用文献挖掘技术及基于衍生论的系统生物学分析手段研究 PD-1 及其配体与其他免疫相关分子的相互作用尚未见报道。本文综合利用文献管理软件 Endnote 及数据分析软件 R 对 PubMed 中关于 PD-1 及其配体的报道进行文本挖掘，并结合人工校验，整理出在文献报道中与 PD-1 及其配体直接或间接相关的基因 225 个，并利用系统生物学分析软件 Cytoscape 结合人工分析构建了 PD-1 及其配体与此 225 个基因的互作网络。

在互作网络中,每个基因为 1 个网络节点,通过分析节点的 BC 发现,PD-1/PD-L1 互作网络中具有最高 BC 的是 STAT1,提示 JAK-STAT 信号通路在 PD-1/PD-L1 互作网络中具有重要的作用。资料及前期研究显示,JAK-STAT 通路在调节 PD-L1 和 PD-L2 在肿瘤细胞及间充质干细胞上的表达过程中发挥重要的作用[8]。由于具有较高 BC 的节点,多在不同的网络模体之间起到重要的连接作用,所以在已有报道 JAK-STAT 信号通路参与 T 细胞信号通路的调节、白血病及非小细胞肺癌等癌症、血细胞凋亡等生物过程的基础上推测,PD-1/PD-L1 可能直接或者通过影响 JAK-STAT 信号通路间接影响上述生物过程。而在 PD-1/PD-L2 互作网络中,同样可以推测,PD-1/PD-L2 发挥作用除了直接作用外,更可能是通过与 CD4 等分子的协同行为来发挥调节作用。

这也表明,可以利用互作网络对一些尚不清楚的影响做出一定推测。这里以 PD-L1 和细胞迁移为例,探究 PD-L1 对细胞迁移的影响。在 PD-1 与 PD-L1 互作网络中,PD-L1(CD274)通过 STAT1 与 CXCR4 间接相连,提示如果阻断 PD-L1,有可能会影响到 CXCR4 的表达。这一点得到作者定量 PCR 试验及迁移试验的验证,当阻断 PD-L1 后,CXCR4 表达下调,细胞迁移能力下降。

通过比较 PD-1 与 PD-L1 和 PD-L2 的互作网络,并结合表 1 可以发现,PD-1/PD-L1 互作网络中高 BC 节点大致可以分为 6 类,而 PD-1/PD-L2 互作网络中只有 3 类,这表明,对 PD-1/PD-L1 信号通路及 PD-1/PD-L2 信号通路的研究深度并不相同,对前者更广泛,这也提示可以适当增加对配体 PD-L2 的研究。就目前的研究而言,PD-1/PD-L1 与 PD-1/PD-L2 的作用机制存在不同,PD-1/PD-L1 更倾向于直接作用或通过多细胞因子共用途径来发挥调节作用,而 PD-1/PD-L2 更倾向于与其他共刺激分子、细胞因子等的协同作用来调节生物过程。

综上所述,PD-1/PD-L1 通路与 PD-1/PD-L2 通路的作用机制存在差异。同时,利用基于文献挖掘及生物信息学的方法研究 PD-1 信号通路是 1 种可以合理利用生物文献数据,为实际试验提供指导的好方法。

参考文献

[1] Ishida Y,Agata Y,Shibahara K,et al. Induced expression of PD-1,a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death[J]. EMBO J, 1992,11(11):3887-3895.

[2] Okazaki T,Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance[J]. Trends Immunol,2006,27(4):195-201.

[3] Swanson D. Migraine and Magnesium: eleven neglected connections[J]. Perspect Biol Med,1988,31(4):526-557.

[4] 谭璐,姜璐. 系统生物学与生物网络研究[J]. 复杂系统与复杂性科学,2015,2(4):1-9.

[5] Wang G,Zhang S,Wang F,et al. Expression and biological function of programmed death ligands in human placenta mesenchymal stem cells[J]. Cell Biol Int,2013,37(2):137-148.

[6] 王国艳,李广云,林艳华,等. PDL2 在人胎盘源间充质干细胞对外周血 T 细胞免疫调节中的作用[J]. 中华微生物和免疫学杂志,2012,32(10):879-884.

[7] 王国艳,王斐斐,李恒,等. PDLs 在人胎盘间充质干细胞调节外周血 T 细胞分泌 IL-17 中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(2):132-136.

[8] Lee SJ,Jang BC,Lee SW,et al. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-c-induced upregulation of B7-H1(CD274) [J]. FEBS Letters,2006,580(3):755-762.

(收稿日期:2016-09-21　修回日期:2016-11-10)

(上接第 165 页)

[6] 刘立朝,苏本利. 骨质疏松症影像学诊断技术评价[J]. 医学与哲学,2012,33(22):32-33.

[7] 樊微. 正常人和骨质疏松患者的肠钙吸收[J]. 中国骨质疏松杂志,1996,2(1):48.

[8] Hector FD,Mazrgherita TC. Vitamin D:its role and uses in immunology[J]. The FASEB Juarnal,2001,15(12):2579-2585.

[9] Boonen S,Bischoff-Ferrari HA,Cooper C,et al. Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D:a review of the evidence[J]. Calcified Tissue International,2006,78(5):257-270.

[10] 詹克勤,张玉红,彭卫华. 25-羟基维生素 D3、甲状旁腺素和骨钙素检测对骨质疏松的临床意义[J]. 实验与检验医学,2013,31(9):583-584.

[11] Devogelaer JP,Boutson Y,Gruson D,et al. Is there a place for bone turnover markers in the assessment of osteoporosis and it treatment[J]. Rheumatic Diseases Clinics of North America,2011,37(3):365-386.

[12] 洪维,朱汉民. 血清维生素 D 水平与骨代谢状态的相关性:附 1 389 例观察[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4(4):224-230.

[13] 曾东莲. 骨碱性磷酸酶活性测定在营养性维生素 D 缺乏症防治中的临床价值[J]. 井冈山医专学报,2008,15(6):46.

[14] 韩静,江霞. 甲状腺疾病与骨质疏松的关系研究进展[J]. 医学综述,2013,19(20):3694-3696.

(收稿日期:2016-09-23　修回日期:2016-11-12)