

基于生物信息学分析 VCAN 作为结直肠癌顺铂耐药关键靶点研究

李静娴^{1*}, 陈辉^{1,2*}, 吴建泽¹, 王德权¹, 陈志芬³, 吴清明^{1,4}

(¹ 武汉科技大学医学院感染免疫与肿瘤微环境研究所, 职业危害识别与控制湖北省重点实验室,

武汉 430081; ² 北京大学第三医院医学创新研究院, 胃肠肿瘤医-X 协同北京重点实验室,

北京 100191; ³ 武汉大学中南医院消化内科, 肠病湖北省重点实验室, 武汉 430071;

⁴ 武汉科技大学附属天佑医院消化内科, 武汉 430064)

摘要 **目的** 预测并验证结直肠癌(CRC)顺铂(DDP)耐药的关键靶点,为临床精准医学治疗提供更多方案。**方法** 通过基因表达综合数据库(GEO)筛选出正常肠黏膜和CRC之间差异表达基因(DEGs);采用STRING数据库和Cytoscape软件挖掘关键基因;采用基因本体联合数据库(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)对DEGs进行富集分析;利用高通量转录组测序鉴定、qRT-PCR、Western blot筛选、验证关键靶点;将多能蛋白聚糖(VCAN)基因过表达载体转染至人回盲部结直肠腺癌细胞(HCT8)细胞系,CKK-8检测细胞活力;流式细胞术测定细胞凋亡与细胞周期;qRT-PCR与Western blot检测基因mRNA和蛋白水平。**结果** 通过GEO数据库筛选出了118个上调的DEGs和146个下调的DEGs。DEGs主要富集于细胞外基质分解、细胞外基质和磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶(PI3K-AKT)信号通路。基于蛋白质相互作用网络分析,鉴定出20个枢纽基因。通过对比CRC细胞系HCT8亲本株与DDP耐药株的转录组测序结果,进一步筛选出VCAN基因。在CRC组织中,VCAN基因的表达水平高于正常肠黏膜组织;相对于VCAN低表达患者,VCAN高表达的患者总生存期(OS)与无复发生存时间(RFS)更短。在CRC细胞系中,过表达VCAN基因促进了细胞的增殖($P < 0.05$),提高了细胞对DDP的耐药性,减少了DDP诱导的凋亡($P < 0.05$)与G₀/G₁期阻滞($P < 0.05$);上调VCAN基因激活AKT-雷帕霉素靶蛋白1(mTOR)信号通路。**结论** 基于生物信息学和转录组测序筛选出CRC DDP耐药靶基因VCAN,VCAN基因可能通过调控AKT-mTOR通路促进CRC发展与对DDP的耐药性。

关键词 VCAN;顺铂;生物信息学;转录组测序;AKT-mTOR信号通路;化疗耐药

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0624-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.006

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)作为消化系统常见的恶性肿瘤,具有恶性程度高、发展迅速、易产生耐药等特点,已成为中国亟需解决的重大公共卫生问题^[1]。顺铂(cisplatin, DDP)作为常用化疗药物,可通过阻碍癌细胞的复制与分化来诱导其死亡^[2]。尽管铂类化合物可以改善CRC患者的预后,但耐药发生率依然较高,这极大限制了临床治疗的效果,目前这仍然是CRC治疗的首要问题。因此,利用生物信息学结合组学分析探索新的耐药靶点和

其相互作用网络,可能为临床治疗提供新的方案^[3-5]。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 人CRC亲本株回盲部结直肠腺癌细胞(human ileocecal colorectal adenocarcinoma cell, HCT8)、人结肠癌细胞(human colorectal carcinoma cells, HT29)、人结肠癌细(human colorectal carcinoma cells, HCT116),人正常结肠上皮细胞(normal human colon mucosal epithelial cell, NCM-460)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;CRC DDP耐药株(HCT8/DDP)购自湖南丰晖生物科技有限公司。培养条件为含10%的胎牛血清RPMI-1640、DMEM培养液(Gibco),HCT8/DDP的培养液中含有1 $\mu\text{g/mL}$ 的顺铂(MCE)以维持耐药性。培养环境为37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂恒温培养箱。RNA提取试剂盒购自南京挪威赞生物科技股份有限公司,SYBR Green

2024-12-09 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81573239);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:202210488001);湖北省卫生健康委员会科研项目(编号:WJ2019M256)

作者简介:李静娴,女,本科生;

吴清明,男,主任医师,教授,博士生导师,通信作者, E-mail: wuhe9224@sina.com

* 对本文具有同等贡献

Supermix 购自美国 Bio-Rad 公司,细胞增殖 - 毒性检测试剂盒 CCK-8 购自北京兰杰柯科技有限公司,人 VCAN 基因过表达质粒购自北京义翘神州科技股份有限公司,蛋白抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 差异基因的筛选与蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建和枢纽基因筛选

从 GEO 数据库中筛选并下载包含 CRC 与正常肠黏膜组织样本基因集的 GSE20916、GSE41328、GSE44076 数据集,通过 R 软件 limma 包对获取的数据进行处理,以 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1.5$ 、 $P < 0.05$ 作为阈值筛选出正常肠黏膜和 CRC 之间差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 利用 STRING 数据库与 Cytoscape 3.9.1 软件构建 PPI 并筛选出前 20 位关键基因。

1.3 功能富集分析 利用 DAVID 数据库对上述所得到的 DEGs 进行基因本体联合数据库 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

1.4 细胞毒性检测 待 CRC 细胞生长至对数生长期,消化细胞铺 96 孔板,每孔加入 100 μL 细胞悬液 (约 5 000 个细胞);次日加入 DDP 梯度浓度为 0、5、10、15、20、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,培养 72 h,每孔加入 10 μL CCK-8,孵育 4 h 后放入酶标仪中测定吸光度,波长 450 nm。

1.5 转录组测序 采用 TRIzol 法提取 HCT8 和 HCT8/DDP 细胞样本中的 RNA,提取后的 RNA 储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。通过高通量转录组测序来验证耐 DDP 细胞与亲本株细胞之间的基因 mRNA 表达差异。具体流程包括:检测 RNA 质量;进行 mRNA 富集和反转录;修复 RNA 末端并在 3' 端加 A;连接接头并选择片段;进行 PCR 富集;对文库进行质控检测。最后,使用 FPKM 值来表示各基因的表达水平,并根据 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1.5$ 和 $P < 0.05$ 的标准来确定显著差异表达的基因。

1.6 细胞转染 将 CRC 细胞株 HCT8 接种至 6 孔板中,将细胞分为 VCAN 过表达组 (OE 组) 与阴性对照组 (NC 组)。24 h 后待细胞密度达到 60% ~ 70%,用低血清培养基稀释 Lipofectamine 2000 与质粒,混合静置后转染,8 h 后换液,培养 48 h 实施后续实验。

1.7 qRT-PCR 利用 TRIzol 法提取 RNA、逆转录合成 cDNA、加入 SYBR Green 与引物 PCR 扩增。反

应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 持续 30 s,40 个循环。以 GAPDH 为内参基因。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Primer name	Primer sequences (5'-3')
GAPDH	F:CCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAG
	R:GGTCTACATGGCAACTGTGAGGAG
BGN	F:ACCTGGCTCTGAAGTCTGTGC
	R:GCTCGGAGATGTCGTTGTTCTG
COL5A1	F:CGCTCTCCCTCTTCTCTCTAC
	R:ATTCTGTGCCACTTGCCATCTG
MMP1	F:TTACAGCCAGATTGCCAAGAG
	R:TCAGAGGTGTGACATTACTCCAGAG
VCAN	F:CCTGTTATCCTACTGAACTTCCTACG
	R:ATCAACACAAGTGGCTCCATTACG

1.8 Western blot 实验 将细胞收集到 1.5 ml 离心管中,洗涤 2 次后加入 RIPA 裂解液。使用超声波破碎仪进行细胞破碎,离心后取上清液。使用 BCA 方法检测蛋白浓度,并上样 10 μg 蛋白,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。经 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转移到 PVDF 膜上,并用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。随后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育抗体过夜,加入稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次,最后用 ECL 试剂显影。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡及周期 转染 48 h 后加入 DDP 处理,药物作用 48 h 后终止培养,收集细胞,PBS 洗涤 2 遍后离心收集细胞沉淀。检测细胞凋亡采用 Annexin V-FITC/PI 法避光孵育 30 min;检测细胞周期使用 70% 乙醇固定,第 2 天 PBS 洗涤 2 遍后 PI 单染法避光孵育 30 min 检测。结果使用 Flow Jo V10 分析。

1.10 生物信息学分析 通过 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>)、cBioportal (<https://www.cbioportal.org/>) 等网站获取目的基因相关信息。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 统计软件进行实验数据统计与绘图,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两个样本的均数间差异比较使用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEGs 识别、蛋白互作网络构建与枢纽基因筛选 GSE20916 数据集包含 105 例 CRC 和正常结肠黏膜组织样本的基因表达谱,于 GSE20916 芯片筛

选出 675 个上调 DEGs 和 397 个下调 DEGs; GSE41328 数据库集包含 5 例结直肠腺癌和匹配的正常结肠组织的基因表达谱, GSE41328 芯片中筛选出 235 个上调 DEGs 和 271 个下调 DEGs; GSE44076 数据集包含 98 例 CRC 患者的结肠肿瘤和相邻配对正常黏膜组织样本以及 50 例健康个体的结肠黏膜样本的基因表达谱, 于 GSE44076 芯片中筛选出 433 个上调 DEGs 和 673 个下调 DEGs (图 1A)。进行韦恩分析得到 DEGs 交集, 共得到 118 个上调 DEGs 与 146 个下调 DEGs。将 DEGs 导入 STRING 数据库中构建差异基因 PPI 网络, 该网络包括 260 个节点, 平均节点度为 6.39 (图 1B)。使用 Cytoscape 修饰后筛选出排名前 20 的 DEGs (图 1C), 包括 VCAN、SULF1、SPP1、MMP1、MMP3、TIMP1、CTHRC1、AGT、CXCL1、COL1A1、CXCL5、COL12A1、BGN、THBS2、COL11A1、COL5A1、COL10A1、COL5A2、COL1A2 总计 19 个上调基因, 以及 1 个下调基因 CXCL12。

2.2 DEGs 相关分析 在生物学过程方面, DEGs 富集于细胞外基质降解、胶原蛋白分解代谢过程以及细胞膜破坏等过程; 在细胞成分方面, 富集于细胞外基质、基底膜及胶原蛋白三聚体等方面; 在分子功能方面, 富集于水解酶活性和寡糖结合等功能 (图 2A)。KEGG 富集分析显示, DEGs 主要富集在 PI3K-AKT、TNF 及 IL-17 等信号通路 (图 2B)。

2.3 DDP 耐药株细胞鉴定 对 HCT8 与 HCT8/DDP 进行不同浓度 DDP 处理 72 h, 结果显示, 随着 DDP 浓度的增加, HCT8/DDP 细胞的存活率显著高于 HCT8 细胞 ($P < 0.05$) (图 3A)。HCT8 及 HCT8/DDP 对 DDP 的半数抑制浓度 IC_{50} 值分别为 $(1.62 \pm 0.36) \mu\text{g/mL}$ 和 $(7.68 \pm 0.72) \mu\text{g/mL}$ (图 3B), 耐药指数为 4.74, 说明 HCT8/DDP 耐药性良好。

2.4 转录组测序与实验验证 通过转录组测序获得 HCT8 与 HCT8/DDP 的 mRNA 表达谱, 将结果与此前识别的枢纽基因进行交叉分析 (表 2)。分析显示, VCAN、COL5A1、MMP1、BGN 在 HCT8/DDP 中表达高于 HCT8, 故选择这 4 种基因进行验证。经 qRT-PCR 检测上述 mRNA 表达水平, 发现相对于正常肠黏膜细胞, CRC 细胞中 VCAN 表达增加, 且在 DDP 耐药细胞中的表达高于 CRC 亲本株细胞; Western blot 结果与 qRT-PCR 结果一致 (图 4), 因此, 选择 VCAN 基因进行后续实验。

2.5 VCAN 与临床特征 经 UALCAN 数据库查询, 显示 VCAN 的 mRNA 水平在 CRC 组织中显著高于正常肠黏膜组织 (图 5A); Kaplan-Meier 生存分析结果显示, VCAN 高表达的患者具有更差的总生存期 (overall survival, OS) 与无复发生存时间 (recurrence free survival, RFS) (图 5B、5C)。随后, 探讨了 VCAN 表达与肿瘤特征和预后的关系, 结果显示,

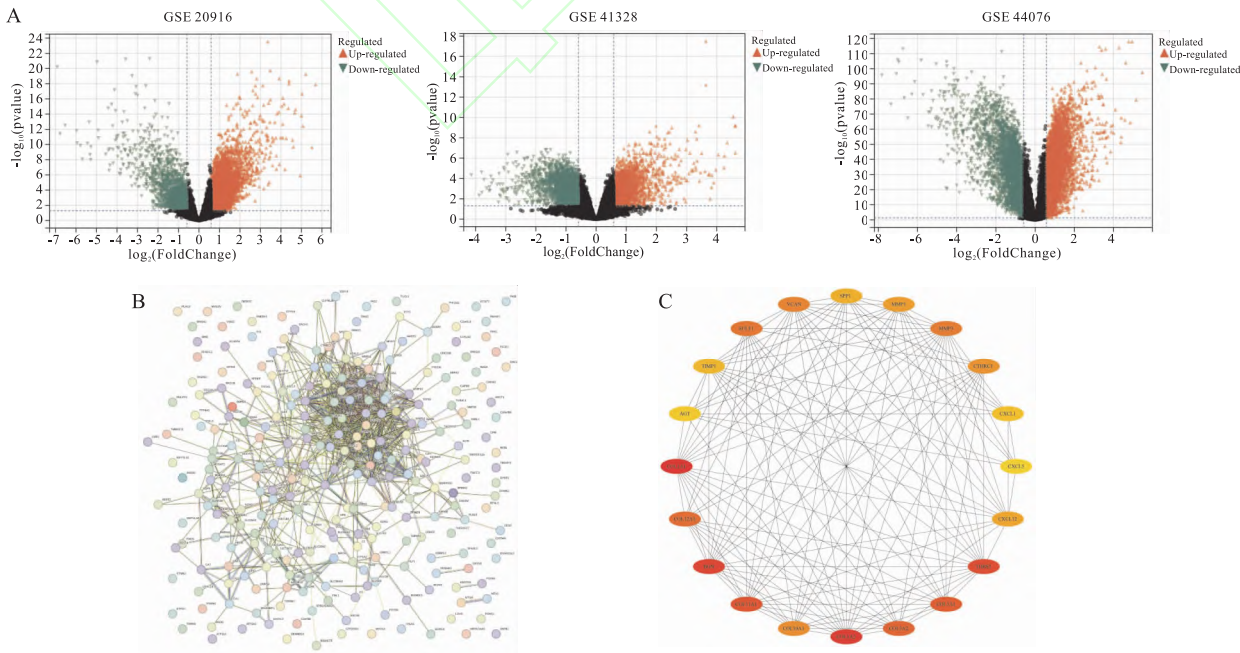


图 1 DEGs 的鉴别

Fig. 1 Identification of DEGs

A: DEGs volcano plot; B: Differential gene PPI network; C: Hub gene screening.

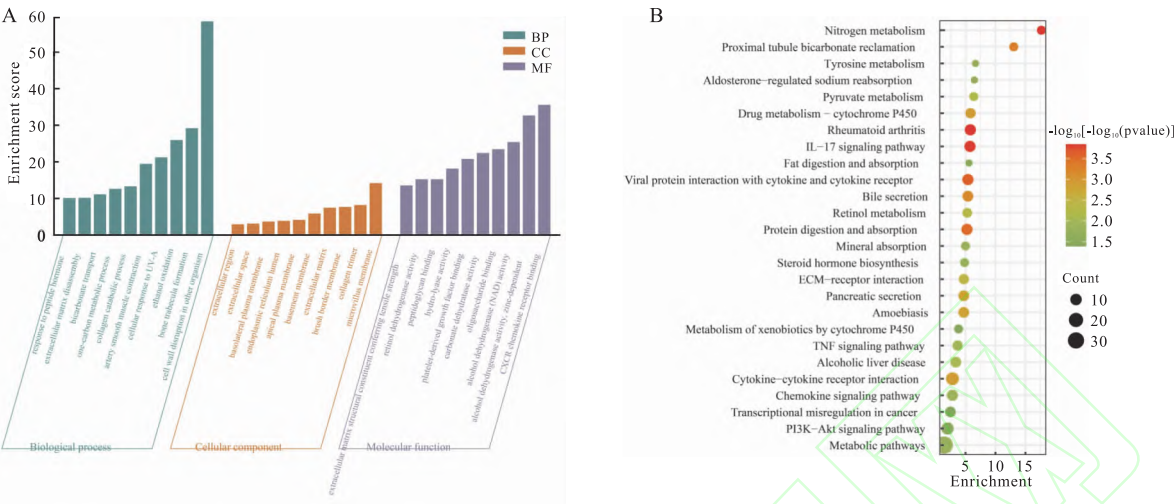


图2 GO 分析与 KEGG 分析

Fig.2 GO analysis and KEGG analysis

A: GO enrichment analysis; B: KEGG enrichment analysis.

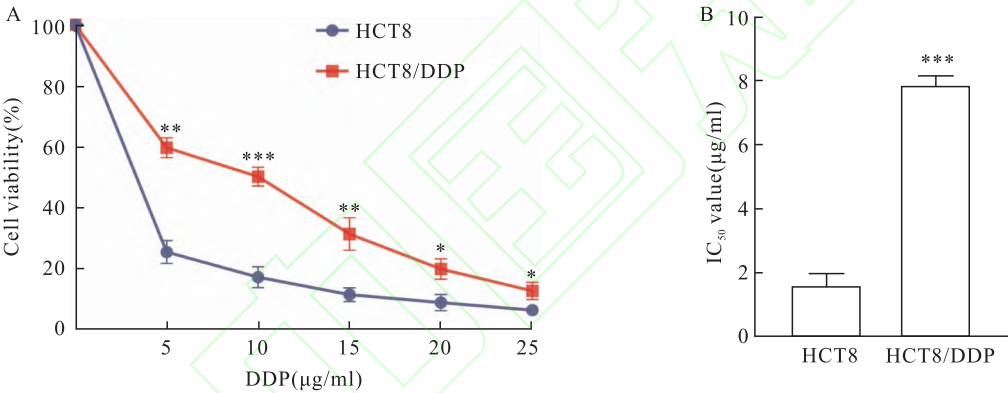


图3 结直肠癌 HCT/DDP 的耐药性检测

Fig.3 Detection of HCT/DDP resistance in colorectal cancer

A: CCK-8 examination of cell viability between drug-resistant and parental strains; B: IC₅₀ analysis of parental and drug-resistant strains; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs HCT8 group.

表2 转录组学分析中亲本细胞和耐药细胞核心基因的相对表达

Tab. 2 Relative expression of core genes between parental cells and drug-resistant cells in transcriptome analysis

Genes	$\log_2$ (Fold Change)	P value	Genes	$\log_2$ (Fold Change)	P value
SPP1	-Inf	<0.01	MMP1	4.273	<0.001
VCAN	1.788	<0.001	MMP3	-Inf	≥ 0.05
SULF1	-4.452	<0.01	CTHRC1	-3.437	≥ 0.05
TIMP1	0.607	<0.001	CXCL1	-4.974	<0.001
AGT	0.224	≥ 0.05	CXCL5	-14.482	<0.001
COL1A1	0.302	≥ 0.05	CXCL12	-Inf	≥ 0.05
COL12A1	-0.987	≥ 0.05	THBS2	Inf	≥ 0.05
BGN	1.750	<0.001	COL5A1	4.816	<0.001
COL11A1	-Inf	≥ 0.05	COL5A2	-0.235	<0.001
COL10A1	1.666	0.779	COL1A2	-0.243	≥ 0.05

Inf: Infinity; -Inf: Infinitesimal.

VCAN 的高表达与晚期、发生于直肠或左结肠等临床特征的 CRC 患者较差的 RFS 和 OS 显著相关(图

5D,5E)。
2.6 VCAN基因功能探究 通过瞬时转染的方法

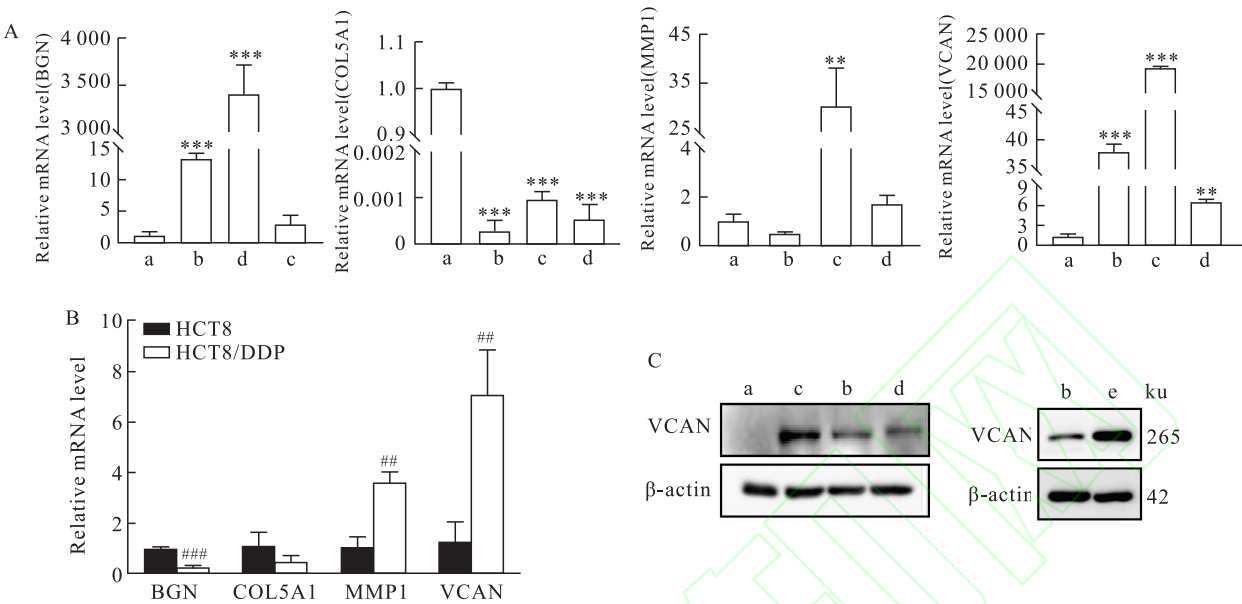


图4 筛选基因表达验证

Fig.4 Validation of the expression of screened gene

A: qRT-PCR detection of gene transcription levels in normal intestinal mucosal cells and CRC cells; B: qRT-PCR detection of gene transcription levels in CRC cell parent strains and DDP resistant strains; C: Western blot detection of VCAN expression levels in normal intestinal mucosal cells, CRC cells, and DDP resistant cells; a: NCM460; b: HCT8; c: HCT116; d: HT29; e: HCT8/DDP; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs NCM460 group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs HCT8 group.

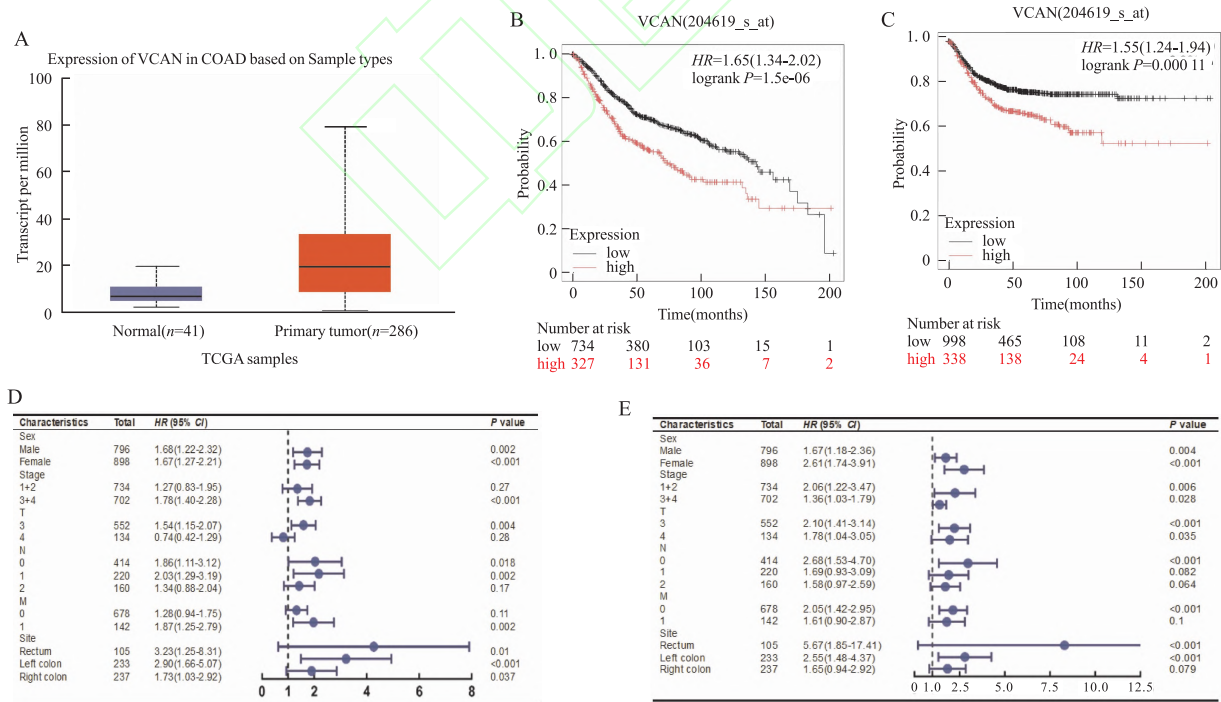


图5 VCAN 的临床价值分析

Fig.5 Clinical value analysis of VCAN

A: The transcription level of VCAN in CRC tissue was higher than that in normal mucosal tissue; B: Patients with high VCAN expression had poorer OS; C: Patients with high VCAN expression had poorer RFS; D: Forest plot of OS, HR values, and P values under different clinical variables; E: Forest plot of OS and RFS values and P values under different clinical variables.

在 HCT8 中调控 VCAN 的表达水平,转染后组别为过表达组(OE)与空载对照组(NC),Western blot 结果表明 VCAN 过表达成功(图 6A)。对成功转染的细胞分别在 0、24、48、96 h 进行增殖能力检测,结果显示 VCAN 过表达的细胞增殖能力显著增强,且差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 6B);CCK-8 法检测过表达 VCAN 后细胞的药物敏感性变化,用相同浓度 DDP 处理后,VCAN 过表达细胞耐药性明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 6C)。IC₅₀ 计算结果表明,对照组 IC₅₀ 值为(3.47 ± 0.81) $\mu\text{g/mL}$,而 VCAN 过表达组 IC₅₀ 值为(7.68 ± 0.72) $\mu\text{g/mL}$,较对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 6D)。

2.7 过表达 VCAN 对细胞凋亡的影响 使用流式细胞术检测 DDP 诱导的细胞凋亡,结果显示,过表达 VCAN 基因后,与对照组相比,VCAN 过表达细胞的凋亡率无明显变化;在高浓度 DDP(50 $\mu\text{g/mL}$)处理下,VCAN 过表达细胞的凋亡率显著降低,对照组与 VCAN 过表达组的凋亡率分别为(59.26 ± 2.51)%和(26.01 ± 2.73)%。这些结果表明,过表

达 VCAN 可明显减少 DDP 诱导的细胞凋亡,从而导致细胞耐药(图 7)。

2.8 过表达 VCAN 对细胞周期的影响 在 HCT8 细胞中过表达 VCAN 基因以检测细胞周期分布情况。结果如图 8A 所示,相较于对照组,VCAN 过表达组处于 G₀/G₁ 期细胞数显著降低,处于 S 期细胞数显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而在 DDP 作用下,相对于阴性对照组,VCAN 过表达组处于 G₀/G₁ 期的细胞数显著降低,处于 G₂/M 期的细胞数显著上升($P < 0.05$),这提示上调 VCAN 表达缓解了 DDP 诱导的 G₀/G₁ 期阻滞(图 8B)。

2.9 VCAN 激活 AKT-mTOR 通路 利用 cBio-portal 网站获取 VCAN 共表达基因,选择 Spearman's 相关系数大于 0.7 的基因,共得到 500 个共表达基因。KEGG 富集分析显示,共表达基因主要富集于 PI3K-AKT、Wnt 信号通路(图 9A)。与 DEGs 的 KEGG 富集分析进行交叉分析,结果显示 PI3K-AKT 通路被共同富集。通过 GEPIA 数据库查询 VCAN 与 AKT 相关性,结果表明在 CRC 组织中,VCAN 与 AKT 呈正相关(图 9B)。由于 AKT 信号通路与细胞

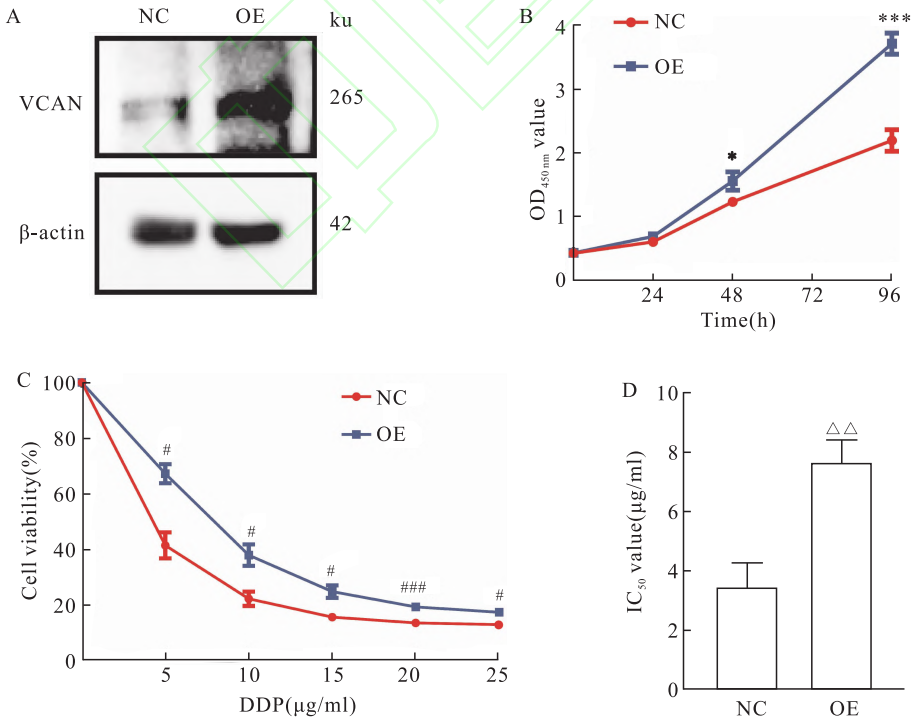


图 6 VCAN 基因功能探究
Fig. 6 Exploration of VCAN gene function

A: Western blot detection of overexpression of VCAN effect; B: CCK-8 method was used to detect cell proliferation; C: CCK-8 detection of cisplatin resistance; D: IC₅₀ analysis of NC group and OE group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs 0 h group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs 0 $\mu\text{g/mL}$ group; $\triangle\triangle$ $P < 0.01$ vs NC group.

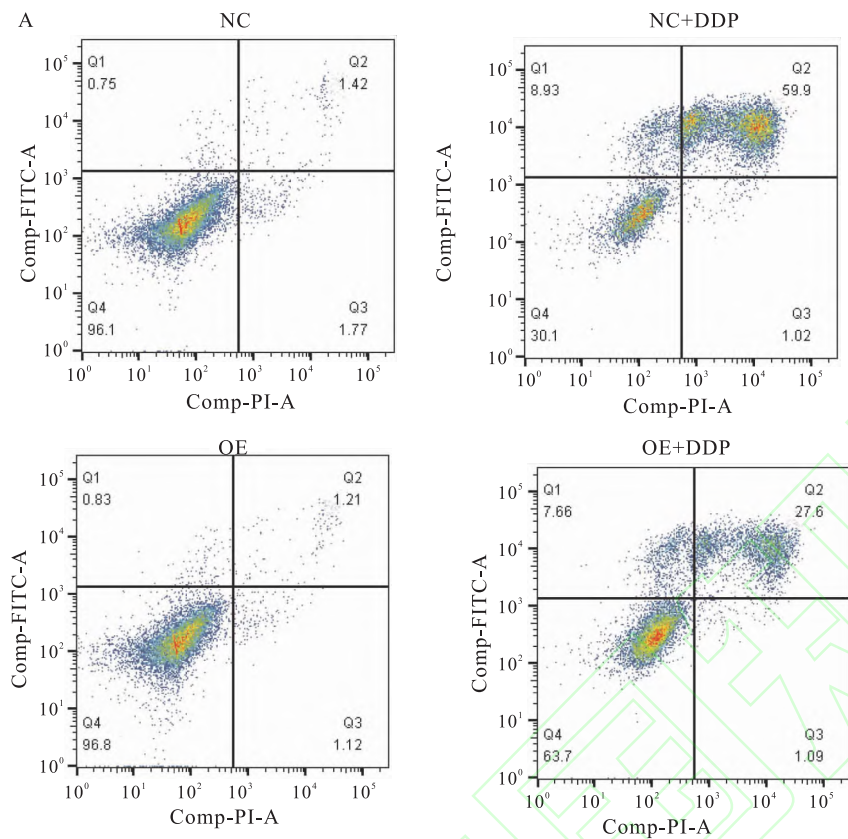


图7 过表达VCAN后对HCT8细胞凋亡的影响

Fig. 7 The effect of overexpression of VCAN on the apoptosis of HCT8 cells

A: Flow cytometry detection of DDP induced cell apoptosis; B: Apoptosis rate of VCAN overexpressing cells after DDP treatment; *** $P < 0.001$ vs NC group.

增殖、耐药和迁移多个生物学过程密切相关,故选择AKT信号通路作为后续研究。Western blot检测AKT、mTOR及其磷酸化蛋白,结果表明VCAN过表达细胞中AKT、mTOR及其磷酸化被明显激活(图9C),提示VCAN可能通过AKT-mTOR通路促进CRC细胞增殖与耐药。

3 讨论

中国CRC发病率与病死率呈现逐年上升的趋势^[6]。在临床中,CRC患者的一线治疗方案通常为以DDP为基础的化疗^[7]。然而,随着DDP治疗的进行,一些肿瘤细胞可能产生耐药性,导致治疗效果显著下降。DDP耐药性是多种机制共同作用的结果,包括非编码RNA对靶基因的调控、细胞自噬以及信号通路的异常激活等^[8-10]。

VCAN是一种大分子量的糖蛋白,在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)形成与结构中扮演着重要角色。VCAN蛋白独特的结构域使其能与其他ECM分子相互作用,调节细胞外基质的组成和结构^[11]。VCAN与肿瘤发展和转移关系密切,它可通过影响细胞的黏附来促进肿瘤细胞的迁移和浸润。

此外,VCAN也可能影响肿瘤微环境,例如通过调节炎症反应、重塑细胞外基质结构以及影响血管生成等方式参与CRC的发展和侵袭^[12-13]。因此,VCAN可能成为CRC研究的潜在治疗靶点。

前期通过生物信息学分析筛选显示,相较于正常肠黏膜组织,VCAN在CRC组织中高表达。随后,RNA-seq比对结果显示,与CRC亲本株细胞相比,CRC耐药株细胞HCT8/DDP中VCAN表达显著上调。为进一步研究VCAN在CRC发展与耐药中的作用,将VCAN过表达质粒转染至HCT8细胞中,实现在HCT8亲本株中过表达VCAN。首先采用CCK-8检测细胞增殖,发现过表达VCAN可促进HCT8细胞增殖。转染的细胞加入不同浓度DDP后,通过CCK-8检测细胞增殖,并结合流式细胞术分析细胞凋亡及细胞周期分布,研究结果显示,相较于阴性对照,VCAN过表达显著增强了CRC细胞对DDP的耐药性,并减少了DDP诱导的细胞凋亡和G₀/G₁期阻滞。

进一步通过生物信息学预测,VCAN可能通过AKT信号通路发挥生物学功能。AKT是PI3K-AKT-mTOR通路的核心组成部分,该信号通路在促进肿

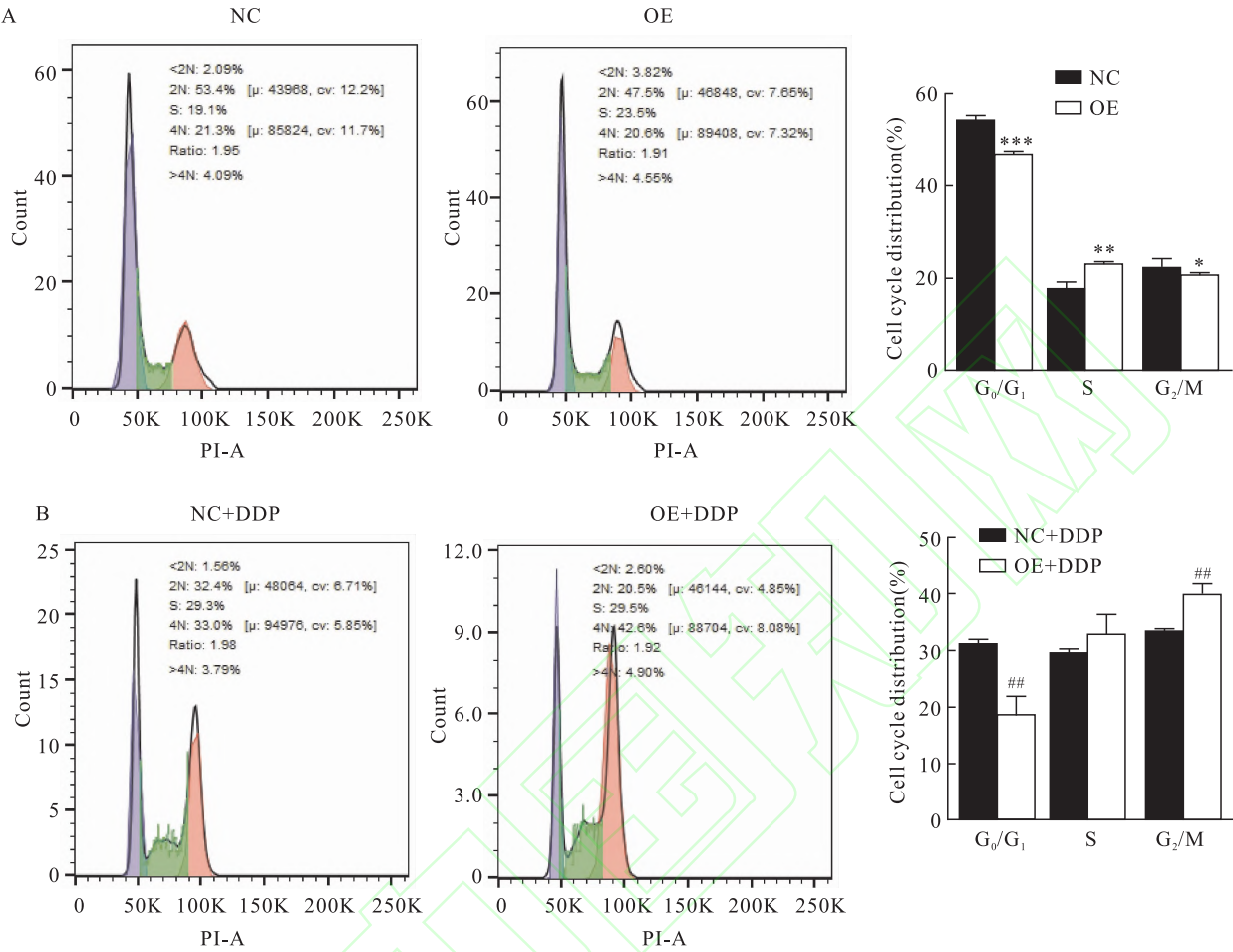


图 8 过表达VCAN后对HCT8细胞周期影响

Fig. 8 The effect of overexpression of VCAN on the cell cycle of HCT8 cells

A: No DDP treatment; B: 50 μ g/mLDDP treatment; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NC group; ## $P < 0.01$ vs NC + DDP group.

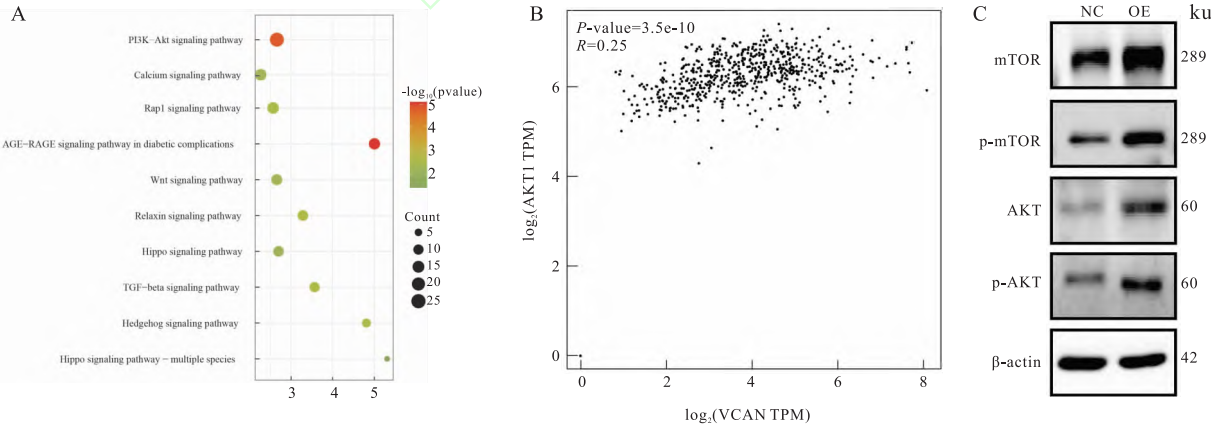


图 9 VCAN对AKT-mTOR通路影响

Fig. 9 The effect of VCAN on the AKT-mTOR pathway

A: KEGG enrichment analysis of VCAN co expressed genes; B: GEPIA database analysis of VCAN and AKT; C: VCAN regulates AKT mTOR pathway.

瘤细胞增殖、生长、抑制细胞凋亡以及促进血管生成等方面发挥重要作用,从而推动肿瘤的发展与耐药^[14]。既往研究^[15]显示,抑制 PI3K-AKT 通路可以逆转卵巢癌的 DDP 耐药性。此外,有研究^[16]表明,在心血管系统中 VCAN 的积累可激活 AKT 信号通路,从而促进心肌细胞增殖。研究表明,上调 VCAN 表达显著激活了 AKT-mTOR 通路,因此,推测 VCAN 可能通过 AKT-mTOR 信号通路促进 CRC 的进展与耐药。但 VCAN 具体的调控机制尚待进一步研究。

综上所述,基于生物信息学和转录组测序筛选出 CRC DDP 耐药靶基因 VCAN;VCAN 基因可能通过调控 AKT-mTOR 通路促进 CRC 发展与 DDP 的耐药性。

参考文献

- [1] Siegel R L, Wagle N S, Cercek A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2023, 73(3): 233 – 54. doi:10.3322/caac.21772.
- [2] Zhang C, Xu C, Gao X, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies[J]. Theranostics, 2022, 12(5): 2115 – 32. doi:10.7150/thno.69424.
- [3] Cao Y, Ke S, Gu J, et al. The value of haematological parameters and tumour markers in the prediction of intestinal obstruction in 1474 Chinese colorectal cancer patients[J]. Dis Markers, 2020, 2020: 8860328. doi:10.1155/2020/8860328.
- [4] Xie Z, Zhu R, Huang X, et al. Metabolomic analysis of gut metabolites in patients with colorectal cancer: association with disease development and outcome[J]. Oncol Lett, 2023, 26(2): 358. doi:10.3892/ol.2023.13944.
- [5] 谢竹夫, 姚 菲, 吴清明. 基于生物信息学和转录组测序分析结直肠癌 5-FU 耐药关键靶点[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(23): 4226 – 32. doi:10.3969/j.issn.1672-4992.2022.23.002.
Xie Z F, Yao F, Wu Q M. Bioinformatics and transcriptome sequencing analysis of 5-FU resistance key targets in colorectal cancer[J]. J Mod Oncol, 2022, 30(23): 4226 – 32. doi:10.3969/j.issn.1672-4992.2022.23.002.
- [6] Chen H, Li N, Ren J, et al. Participation and yield of a population-based colorectal cancer screening programme in China[J]. Gut, 2019, 68(8): 1450 – 7. doi:10.1136/gutjnl-2018-317124.
- [7] 童 瞳, 杨 阳, 余昌俊, 等. 基因组不稳定相关 LncRNA 模型预测结肠癌患者预后和顺铂药物敏感性[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(9): 1480 – 8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.008.
Tong T, Yang Y, Yu C J, et al. Construction of Genomic instability-associated LncRNA models to predict prognosis and cisplatin sensitivity in colon cancer patients[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(9): 1480 – 8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.008.
- [8] Yao F, Huang X, Xie Z, et al. LINC02418 upregulates EPHA2 by competitively sponging miR-372-3p to promote 5-Fu/DDP chemoresistance in colorectal cancer[J]. Carcinogenesis, 2022, 43(9): 895 – 907. doi:10.1093/carcin/bgac065.
- [9] Zhu X, Tian X, Ji L, et al. A tumor microenvironment-specific gene expression signature predicts chemotherapy resistance in colorectal cancer patients[J]. NPJ Precis Oncol, 2021, 5(1): 7. doi:10.1038/s41698-021-00142-x.
- [10] 姚 菲, 黄启友, 黄晓颖, 等. miR-33a-3p 通过调控 EphA2 影响结直肠癌化疗耐药[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2022, 51(1): 7 – 13. doi:10.3870/j.issn.1672-0741.2022.01.002.
Yao F, Huang Q Y, Huang X Y, et al. Effect of miR-33a-3p on chemoresistance of colorectal cancer by regulating EphA2[J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2022, 51(1): 7 – 13. doi:10.3870/j.issn.1672-0741.2022.01.002.
- [11] Cheng Y, Sun H, Wu L, et al. V up-regulation of VCAN promotes the proliferation, invasion and migration and serves as a biomarker in gastric cancer[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 8665 – 75. doi:10.2147/OTT.S262613.
- [12] Lautert-Dutra W, Melo C M, Chaves L P, et al. Identification of tumor-agnostic biomarkers for predicting prostate cancer progression and biochemical recurrence[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1280943. doi:10.3389/fonc.2023.1280943.
- [13] Nandadasa S, O'Donnell A, Murao A, et al. The versican-hyaluronan complex provides an essential extracellular matrix niche for Flk1⁺ hematoendothelial progenitors[J]. Matrix Biol, 2021, 97: 40 – 57. doi:10.1016/j.matbio.2021.01.002.
- [14] Song J, Zhang F, Wang Y, et al. Bak interacts with AKT and is involved in TNF α /CHX-induced apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477(3): 939 – 49. doi:10.1007/s11010-021-04348-2.
- [15] 舒美玲, 吴 悦, 叶映泉, 等. 华蟾素调控 PI3K/AKT 通路逆转卵巢癌 A2780/DDP 细胞顺铂耐药的作用机制[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(4): 671 – 7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.018.
Shu M L, Wu Y, Ye Y Q, et al. Mechanism of cinobufagin regulating PI3K/AKT signaling pathway to reverse cisplatin resistance in ovarian cancer A2780/DDP cells[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(4): 671 – 7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.018.
- [16] Ruiz-Rodríguez M J, Oller J, Martínez-Martínez S, et al. Versican accumulation drives Nos2 induction and aortic disease in Marfan syndrome via Akt activation[J]. EMBO Mol Med, 2024, 16(1): 132 – 57. doi:10.1038/s44321-023-00009-7.

Bioinformatics analysis of VCAN as a key target in colorectal cancer cisplatin resistance

Li Jingxian¹, Chen Huiguang^{1,2}, Wu Jianze¹, Wang Dequan¹, Chen Zhifen³, Wu Qingming^{1,4}

[¹*Institute of Infection, Immunology and Tumor Microenvironment, Wuhan University of Science and Technology, Hubei Province Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Wuhan 430081;*

²*Center of Basic Medical Research, Institute of Medical Innovation and Research, Peking University Third Hospital, Beijing Key Laboratory for Interdisciplinary Research in Gastrointestinal Oncology (BLGO), Beijing 100191;* ³*Dept of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei Clinical Center and Key Laboratory for Intestinal and Colorectal Diseases, Wuhan 430071;* ⁴*Dept of Gastroenterology, Tianyou Hospital, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064]*

Abstract Objective To predict and validate key targets for cisplatin (DDP) resistance in colorectal cancer to provide more options for precision medicine in clinical treatment. **Methods** Differentially expressed genes (DEGs) between normal colonic mucosa and colorectal cancer (CRC) were screened from the gene expression omnibus (GEO) database. Key genes were identified using the STRING database and Cytoscape software. DEGs were subjected to enrichment analysis using the gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databases. Key targets were validated through RNA-seq, qRT-PCR, and Western blot. The versican (VCAN) gene overexpression vector was transfected into human ileocecal colorectal adenocarcinoma cell line HCT8, and cell viability was assessed using the CCK-8 assay. Flow cytometry was used to assess apoptosis and cell cycle distribution. qRT-PCR and Western blot were performed to detect mRNA and protein levels of the target genes. **Results** In this study, 118 upregulated DEGs and 146 downregulated DEGs were identified from the GEO database. DEGs were mainly enriched in extracellular matrix degradation, extracellular matrix organization, and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (AKT) signaling pathway. Based on protein-protein interaction network analysis, 20 hub genes were identified. By comparing the transcriptome sequencing results of the HCT8 parental strain and DDP-resistant strain, the VCAN gene was further selected. In CRC tissues, the expression level of VCAN was higher than that in normal colonic mucosa, and patients with high VCAN expression had shorter overall survival (OS) and recurrence free survival (RFS) times. Overexpression of VCAN in CRC cells promoted cell proliferation ($P < 0.05$), increased resistance to DDP, reduced DDP-induced apoptosis ($P < 0.05$), and G₀/G₁ phase arrest ($P < 0.05$); upregulation of VCAN activated the protein kinase B (AKT)-mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Conclusion** Bioinformatics and transcriptome sequencing identified VCAN as a key target gene for DDP resistance in CRC, potentially promoting CRC progression and DDP resistance by regulating the AKT-mTOR pathway.

Key words VCAN; cisplatin; bioinformatics; transcriptomic sequencing; AKT-mTOR signaling pathway; chemotherapy resistance

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81573239); National College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (No. 202210488001); Scientific Research Project of Hubei Provincial Health Commission (No. WJ2019M256)

Corresponding author Wu Qingming, E-mail: wuq9224@sina.com