高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

结直肠癌野生型和耐药型细胞系之间基因表达状态的比较分析

于成鲲[1,2]，周海超[3,4]，张聪敏[4]，任　艳[2,5]，刘斯奇[2,4]

（1. 浙江工业大学药学院，杭州 310000；
2. 中国科学院杭州医学所，杭州 310000；
3. 中国科学院大学生命科学学院，北京 100049；
4. 华大基因科技有限公司，深圳 518000；
5. 上海中医药大学科技实验中心，上海 200120）

摘要　对3种结直肠癌细胞系(HCT116，LoVo及HT29)的野生株和Oxaliplatin/SN38耐药株的转录组和蛋白质组分别进行了检测，通过分析野生株与耐药株基因表达的差异发现，在Oxaliplatin耐药细胞系中，3种细胞系的转录组响应较为一致；但在SN38耐药细胞系中，HT29细胞系转录组响应模式与其它2个细胞系显著不同. 野生株和耐药株之间的蛋白质组比较分析显示，发生变化的蛋白质与转录本有较大程度的重合；与转录组数据不同的是，LoVo和HT29的蛋白质丰度受药物的影响较大，但从差异蛋白质功能聚类来看，LoVo和HCT116呈现相似性. 比较分析结果还表明，Oxaliplatin在3个细胞系中引发的蛋白质丰度响应明显低于SN38造成的蛋白质丰度变化. 从野生型和耐药型结肠癌细胞系的转录组和蛋白质组的整合分析出发，获得了新的候选耐药性相关蛋白. 本研究可能为结直肠癌耐药性机制研究奠定了实验基础，提供了另一种启发性的思路.

关键词　结直肠癌；奥沙利铂；SN38；耐药性

中图分类号　O657.6　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20250049

Comprehensive Analysis of the Gene Expression Status in Wild and Drug-resistance Cell Lines of Colorectal Cancer

YU Chengkun[1,2], ZHOU Haichao[3,4], ZHANG Congmin[4], REN Yan[2,5], LIU Siqi[2,4*]

(*1. College of Pharmacy Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou* 310000, *China*;
2. Hangzhou Institute of Medicine, Chinese Academy of Science, Hangzhou 310000, *China*;
3. College of Life Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, *China*;
4. Beijing Genomics Institute Technology Co., Ltd., Shenzhen 518000, *China*;
5. Science of Technology Experimental Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, *China*)

Abstract　This study examined 3 colorectal cancer cell lines, HCT116, LoVo, and HT29, each of which contained both wild-type and Oxaliplatin/SN38-resistant strains. Transcriptomic and proteomic analyses were performed. By analyzing the differential gene expression between wild-type and resistant strains, it was found that the transcriptomic patterns of HCT116 and LoVo wild-type cell line appeared similar, whereas both were different from HT29. In view of different expression genes(DEGs) of the cell lines responding to oxaliplatin or SN38, the transcriptomes of wild cell

收稿日期：2025-02-24. 网络首发日期：2025-04-21.
联系人简介：刘斯奇，男，博士，研究员，主要从事生物质谱和蛋白质组学方面的研究. E-mail：siqiliu@genomics.cn
基金项目：浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划项目(批准号：2023C03103)资助.
Supported by the "Pioneer" and "Leading Goose" Research and Development Program of Zhejiang Province, China(No.2023C03103).

lines were different from that obtained from the drug resistant cell lines. Moreover, among oxaliplatin resistant cell lines, the transcriptomic responses were consistent, but in SN38 resistant cell lines, the relevant changes were complicated, particularly in HT29 cells. Based on comparison of different expression proteins (DEPs) in these cells, DEPs were overlapped with DEGs somehow. In contrast to transcriptomes, the protein abundance in Lovo and HT29 was sensitively impacted by drugs, while the functional clustering derived from DEPs in LoVo and HCT116 was comparable. By analyzing the commonly regulated genes in both the transcriptome and proteome, we identified candidate drug resistance-related proteins. Specifically for drugs, the abundance responses of proteins in these cell lines initiated by oxaliplatin were significantly lower than these induced by SN38. Taking all analysis to gene expression status in wild and drug resistance cell lines together, this study indeed sets up a solid dataset to explore the molecular mechanism of drug resistance and provides an omic clue in colorectal cancer research.

Keywords Colorectal cancer; Oxaliplatin; SN38; Drug resistance

根据最新数据，结直肠癌(Colorectal cancer，CRC)是全球最常见的癌症之一，是全球第三大常见的癌症，同时也是相关死亡人数位列第二的癌症[1]. 结直肠癌已成为全球公共卫生的重要挑战之一. 手术切除仍然是早期结直肠癌的主要治疗手段，而化疗则是中晚期结直肠癌的一种重要治疗方法. 然而，尽管这些药物在延长患者生存期方面取得了一定成效，但药物耐受性仍然是制约其治疗效果的主要障碍之一. 最近的研究报告显示，小于50岁的人群中发病率也有所增加，约20%的结直肠癌患者会发展为转移性结直肠癌，而40%的患者在局部疾病治疗后会出现复发，表明转移性结直肠癌的预后较差，5年生存率低于20%[2].

奥沙利铂(Oxaliplatin，OxPt)[3]和伊立替康(Irinotecan)[4]是临床上较为常用的2种化疗药物，广泛应用于FOLFOX[5]和FOLFIRI[6]等化疗方案中. 其中，奥沙利铂是一种第三代铂类抗癌药物，具有强效的抗癌作用，其机制是通过与DNA产生DNA加合物并与DNA产生交联从而阻碍DNA复制以及转录进程，阻止细胞正常分裂，同时肿瘤细胞周期受到阻滞引发凋亡[7,8]. 伊立替康的活性代谢物为SN38，由肝酶羧酸酯酶促裂解侧链产生，其效力是伊立替康的100~1000倍[9]. SN38作为拓扑异构酶I(TopoisomeraseI，TopI)的强效抑制剂，在抑制TopI的同时还与TopI-DNA复合物结合阻碍DNA复制进程并造成DNA损伤[10].

在CRC发育过程中已识别到多种机制可能与CRC耐药相关，包括药物代谢及运输过程、细胞死亡途径、下游通路信号畸变及肿瘤微环境等[11]. 如Wnt/β-catenin信号通路维持CSCs干性，上调LGR5及ABC转运蛋白，以促进药物外排并增强糖酵解过程，使细胞抵抗化疗杀伤[12]. 同时，非编码RNA通过靶向Wnt配体或调控β-catenin复合体，影响细胞增值及凋亡相关基因的表达；以及癌症相关成纤维细胞(Cancer-associated fibroblasts，CAF)衍生的CCL2会使FGFR4表达上调并促进上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition，EMT)过程，进而沉默抗凋亡蛋白c-FILP[13].

Jensen等[14]建立了结直肠癌细胞系模型并重点探讨了奥沙利铂和伊利替康2种药物的抗药性机制，通过微阵列方法测定了HCT116，LoVo及HT29 3种细胞系的母本株及耐药株转录本. 其中，HCT116和LoVo同属于微卫星不稳定(Microsatellite instability，MSI)、K-Ras突变型细胞系，与HCT116不同的是LoVo细胞系来自转移灶；而HT29细胞系则为微卫星稳定(Microsatellite stable，MSS)、K-Ras野生型细胞系. 选取这3种CRC细胞系有助于覆盖结直肠癌的分子异质性. 耐药株在包括DNA修复和细胞转运等通路展示出与母本株的变化. 研究结果表明，每个细胞系的耐药株表现出不同的表达模式，奥沙利铂和SN38 2种耐药性的共同机制较为有限.

在以往研究的基础上，本文进一步使用相同来源的样本进行转录组学和蛋白质组学分析，补充并验证了上述研究结论. 通过测定这些耐药株的转录本和蛋白质组数据，期望能揭示出新的分子标记物和潜在的耐药性机制. 这些补充实验将更加全面地解释结直肠癌细胞在面对奥沙利铂和SN38这类化疗药物时的适应性变化，特别是转录本和蛋白质表达层面的变化.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

HCT116和HT29细胞，美国国家癌症研究所(NCI)；LoVo细胞，美国典型培养物保藏中心(ATCC)；Oxaliplatin，法国赛诺菲-安万特公司；SN38和iTRAQ-8plex试剂，法国Sigma-Aldrich公司；*L*-丙氨酰-*L*-谷氨酰胺溶液(GLUTAMAX)，美国USbio公司；RPMI 1640培养基，法国Sigma-Aldrich公司；TRIzol RNA提取试剂，美国Ambion公司；NanoDrop ND-1000，美国Thermo Fisher Scientific公司；Bioanalyzer 2100，美国Agilent Technologies公司；10%(100 g/L)三氯醋酸(TCA)，上海麦克林生化科技股份有限公司；磷酸缓冲溶液(PBS)，美国GIBCO公司；胰蛋白酶(Trypsin)，质谱分析级，美国Promega公司；磷酸二氢钾，色谱纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；乙腈和甲酸，色谱纯，美国Thermo Fisher Scientific公司.

人类基因表达芯片(G4112F)和Agilent DNA微阵列扫描仪，美国Agilent Technologies公司；Illumina HiSeq-2000型测序仪，美国Illumina公司；Luna 5u SCX 100A强阳离子交换色谱，美国Phenomenex公司；Prominence HPLC系统，日本Shimadzu公司；纳升级反相HPLC柱(5 μm Hypersil C_{18}，75 μm×150 mm)，Q-Exactive MS，美国Thermo Fisher Scientific公司.

1.2 实验过程

1.2.1 *细胞培养* HCT116，HT29和LoVo细胞培养使用含有Glutamax和10%胎牛血清的RPMI 1640培养基，培养条件为37 ℃和5% CO_2. 药物在使用前根据需要立即配制至适当浓度. 通过逐步递增药物浓度诱导结直肠癌细胞系产生耐药性，奥沙利铂的初始浓度为0.01~1 μmol/L，最终浓度达到10~20 μmol/L；SN38的初始浓度为0.1~1 nmol/L，最终浓度达到50~80 nmol/L. 奥沙利铂或SN38耐药变异株通过在10个月内持续暴露于逐渐增加的药物浓度环境下培养得到. 在后续实验前，细胞被维持在无药物的生长培养基中至少7 d. 通过IdentiCell(丹麦奥胡斯大学医院鉴定服务)提供的短串联重复序列(STR)DNA分析确认了非耐药和耐药细胞系.

1.2.2 *微阵列方法测定细胞系的RNA* 在RNA提取前先将细胞在不含药物的培养基中培养14 d. 随后，每个细胞系的RNA分别从独立的3次重复(3个不同的传代)中提取. 将细胞用冷PBS缓冲液洗涤后，加入TRIzol试剂，并在冰上裂解细胞. 裂解液于−80 ℃冷冻，以便稍后进行RNA纯化. 参照制造商的说明进行RNA纯化，仅做了少量修改(相分离时离心速率4500*g*，离心时间为20 min和RNA沉淀时为15 min). RNA浓度通过NanoDrop ND-1000进行测定，并利用Bioanalyzer 2100评估RNA的质量(结果为高质量). 总RNA通过逆转录单独转化为cDNA，随后通过T7 RNA聚合酶转录. 标记的cRNA使用One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis，Low Input Quick Amp Labeling(版本6.5协议，Agilent Technologies)并参照制造商的说明进行Cyanine 3-CTP荧光染料偶联. Cy3标记的cRNA与Agilent人类基因表达芯片(G4112F)杂交，并使用Agilent DNA微阵列扫描仪进行扫描.

所有微阵列数据处理和分析均按照标准方法和公开可用的软件进行. 因此，mRNA微阵列数据处理在R语言(www.r-project.org)中使用Bioconductor生物信息学软件包(www.bioconductor.org)进行. 数据通过Limma包[15]加载到R中，并使用分位数标准化[16]进行阵列间的归一化. 探针通过取中位数进行合并，表达值进行了$\log_2$转换. 通过未配对的Student's *t*检验分析野生株细胞系和耐药株细胞系之间每个mRNA的表达变化. *P*值使用BH方法[17]进行了多重检验的调整. 当调整后的*P*值<0.05且差异倍数>2或<−2($\log_2$FC>1或<−1)时，转录本被认为显著差异.

1.2.3 *RNAseq测定细胞系转录本* 使用TRIzol RNA提取试剂从培养的细胞中提取mRNA. 将来自3次独立制备的等量mRNA合并，随后使用NEBNext mRNA样本制备主混合物套件构建文库.

RNA测序使用Illumina HiSeq-2000型测序仪，测序循环数为50. RNA-seq数据首先通过SOAPnuke(http://soap.genomics.org.cn/)过滤接头序列并去除低质量读取，以生成清洁的读取数据. 所有清洁的读取数据使用Bowtie2软件[18]与以下参数比对到Ensembl人类基因组(hg19)，以生成排序的BAM文件：

“-phred64-dpad 0-gbar 99999999-mp 1,1-score-min L, 0, -0. 1-I 1 -X 1000-no-mixed-no-discordant-k 200”. 然后，使用由 Li 等[19]开发的RSEM对 BAM文件中的比对读取进行了定量分析. 通过每千碱基每百万读取数(RPKM)来评估RNA丰度，RPKM≥1的值被定义为基因鉴定的阈值.

1.2.4 LC-MS测定细胞系蛋白质组 细胞系的蛋白质提取使用裂解缓冲液. 离心后，将上清液与含10%(100 g/L)三氯醋酸(TCA)的丙酮混合，沉淀的蛋白质悬浮在5 mmol/L Tris(羧基乙基)磷烯中，随后进行还原和烷基化处理. 处理后的蛋白质与胰蛋白酶在37 ℃下孵育过夜，得到的肽段按照制造商手册的说明使用iTRAQ-8plex试剂进行标记. 所有iTRAQ实验均在生物学重复中进行，其中野生株的HCT116，LoVo和HT29细胞分别用标签113和116进行标记，奥沙利铂耐药细胞系用标签114和117进行标记，SN38耐药细胞系用标签115和118进行标记，以获得高质量数据. 来自相同细胞系的标记肽段(包括HCT116，LoVo或HT29细胞的野生株和耐药株)被合并，含有不同标签标记肽段的肽混合物通过强阳离子交换色谱(Luna 5u SCX 100A，4. 6 mm×250 mm)，在Prominence HPLC系统上进行分级. 肽段首先用SCX缓冲液A(10 mmol/L KH_2PO_4+体积分数25%的乙腈，pH=3. 0)稀释10倍，然后加载到SCX柱上，使用含SCX缓冲液B(10 mmol/L KH_2PO_4+500 mmol/L KCl+体积分数25%的乙腈，pH=3. 0)的KCl梯度洗脱：体积分数为0~5%的SCX缓冲液B，持续超过18 min，再用体积分数5%~100% SCX缓冲液B梯度洗脱，持续超过40 min，流速为1 mL/min. 预分级的肽段被脱盐、冻干并溶解于少量体积分数为0. 1%的甲酸中，用于二次液相色谱分析. 分级后的肽段通过纳升级反相HPLC柱送入Prominence Nano HPLC系统，并用乙腈梯度(5%~40%，含体积分数0. 1%的甲酸)在65 min内洗脱，流速为300 nL/min，随后采用质谱法进行肽段鉴定.

将经过HPLC分离的肽段送入Q-Exactive MS中，其参数设定为正离子模式和数据依赖模式，进行全扫描(*m/z* 350~1800)，分辨率为70000，选择用于串联质谱的前体离子数量为20，触发串联质谱的阈值为42000，分辨率为17500，分离宽度为2 Da，筛选电荷状态的参数为2+，3+，4+和5+，相对碰撞能量为30，动态排除设置为8 s.

使用Proteome Discoverer 2. 5分析iTRAQ标记MS/MS的原始文件. 蛋白质鉴定的前体质量公差为0. 001%，MS/MS的产物离子公差为0. 05 Da. PSM和蛋白质水平的假发现率(False discovery rate，FDR)均设置为1%. 蛋白质水平的FDR通过使用选择蛋白质FDR策略[20]以1%为设定值进行计算，固定修饰设定为半胱氨酸氨基甲基化，赖氨酸和肽段N末端的iTRAQ-8plex修饰，可变修饰设定为甲硫氨酸氧化和蛋白N端乙酰化. 通过R包limma[15]的分位数归一化方法对蛋白定量结果进行归一化.

2 结果与讨论

2.1 3种CRC细胞系的转录组特征

在HCT116细胞系的野生型、OxPt耐药型与SN38耐药型细胞系，LoVo细胞系的野生型、OxPt耐药型与SN38耐药型细胞系，HT29细胞系的野生型、OxPt耐药型与SN38耐药型细胞系9个与CRC相关的细胞系中应用下一代测序技术(Next generation sequencing，NGS)进行了转录组分析. 如表1所示，这些细胞系中的清洁读数大小范围为11. 9~12. 2 Mbp，而超过90%的读数能够很好地对齐到人类基因组上，每个细胞系平均识别出约14000个转录本. 此外，测序数据表明，在所有样本中随着测序数据的扩

Table 1 Quantity control results of RNA-Seq

Sample	Raw reads/M	Cleaned reads/Mbp	Reads mapped/M	Mapping rate(%)
HCT116_Par	12.2	12.2	11.4	93.77
HCT116_OxPt	12.2	12.2	11.3	92.71
HCT116_SN38	12.2	12.2	11.2	91.88
HT29_Par	12.2	12.2	11.4	93.35
HT29_OxPt	12.2	12.2	11.3	92.82
HT29_SN38	12.2	12.2	11.5	94.37
LoVo_Par	12.2	12.2	11.4	94.03
LoVo_OxPt	12.2	12.2	11.3	92.61
LoVo_SN38	11.9	11.9	11.0	92.36

展，检测到的基因达到了一个饱和平台（见本文支持信息图S1）. 根据Jensen等[14]的报道，采用微阵列检测了相同9个细胞系的转录组，结果每个细胞系检测到了19228个转录信号. 2个转录组数据集的重叠超过了13000个基因.

3种CRC野生株细胞系（HCT116-Par，HT29-Par和LoVo-Par）经过长时间的OxPt或SN38处理后，经多次筛选获得了能够耐受药物的6种细胞系，分别命名为HCT116-OxPt，HCT116-SN38，HT29-OxPt，HT29-SN38，LoVo-OxPt和LoVo-SN38. 利用RNAseq获得这些细胞系的转录组，对HCT116-Par，HT29-Par，LoVo-Par和HCT116-OxPt，HT29-OxPt，LoVo-OxPt以及HCT116-SN38，HT29-SN38，LoVo-SN38的转录组特征进行了定量聚类. 在无监督模式下，无论是母本细胞系、OxPt耐受或是SN38耐受，均显示出HCT116和LoVo 2种细胞系的转录组丰度分布模式相似，但与HT29的分布模式不同. 使用相同的方法，对利用微阵列获得的3种细胞系的9种转录组特征也进行了聚类，得出了相类似的结论，即HT29的丰度模式与其它细胞系不同（见本文支持信息图S2）. 同时，无监督分析得出的上述结果提示，药物耐受对转录过程的干扰不会实质性地改变这些CRC细胞系间的转录组丰度模式的基本差异. 根据Kaja等[21]报道的标准，有5组转录集可以区分不同的细胞系，如EMT基因、胃肠基因、TGF信号基因、MSI/MSS标记物和CSC衍生的CRC标记物. 将这些区分性基因集的转录丰度应用于聚类分析（见本文支持信息图S3），合并结果如图1（B）所示，支持了前文得出的结论，表明HCT116和LoVo的特定转录事件与HT29有显著差异. 转录组学得出的结论基本上与细胞生物学和遗传学的观察结果一致，文献[22]报道，在细胞生物学中，HCT116和LoVo被归类为具有CSC特征的未分化CRC细胞系，而HT29则不是；在遗传学上，HCT116和LoVo被描述为MSI型和超突变型，而HT29被认为是MSS型和非超突变型[23]. 因此，所有基于RNAseq的分析得出了一个明确的结论，即HCT116和LoVo共享相似的转录组特征，而HT29与其它CRC细胞系则表现出不同的特征.

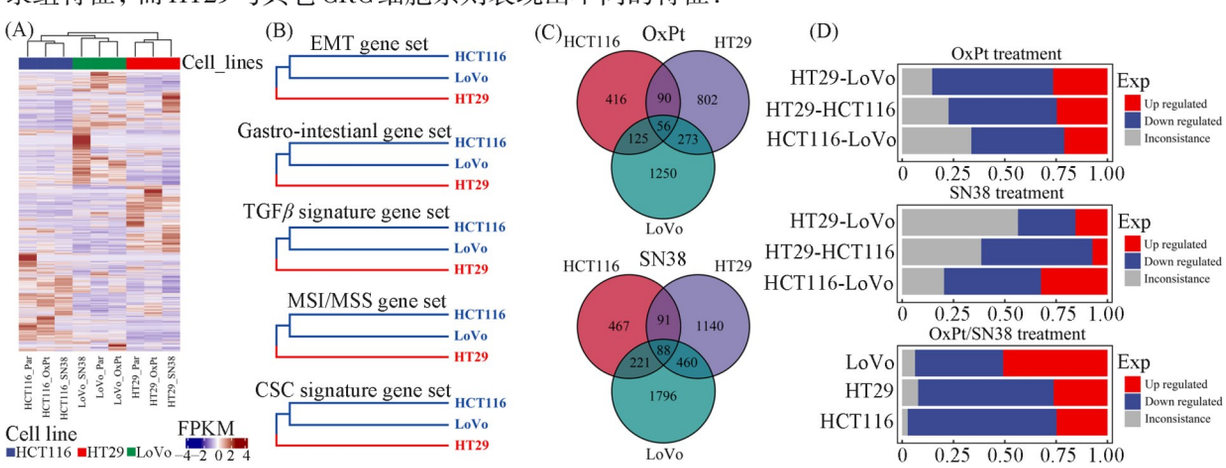


Fig. 1　Changes in transcriptional expression patterns in drug-resistant cell lines

(A) Cluster heatmap of parental and drug-resistant cell lines; (B) cluster tree of genes in 5 different gene sets; (C) overlap of DEGs in two kinds of drug-resistant groups; (D) proportion of commonly regulated DEGs across cell lines and drug treatments.

2.2　CRC细胞系对OxPt或SN38的药物耐受转录组响应

由图1（A）可见，在个体细胞系上，无论是野生型还是药物耐受型，HCT116的转录组与LoVo相似，而与HT29不同；在药物耐受细胞系的转录组响应中，LoVo和HT29细胞系中的OxPt耐受细胞系的转录组模式与相应的野生型细胞系相对一致，而SN38耐受细胞系如LoVo-SN38和HT29-SN38的转录组模式则与野生型和OxPt耐受细胞系存在较大差异. 根据以上结果推断，SN38对CRC细胞系转录的药物扰动程度似乎比OxPt更为严重.

基于基因表达的相似性，HT29在OxPt或SN38处理下都与HCT116和LoVo分开，这与其野生型样本一致. 此结果表明，RNA表达的变化更可能是细胞类型依赖性的，而不是药物依赖性的. 在LoVo和HT29细胞系中，OxPt和野生型被聚类在一起，而与SN38分开，表明SN38对基因表达的扰动更大. 而HCT116细胞系的奥沙利铂耐药株和SN38耐药株距离更近，可能是由于2种药物产生的基因扰动均较

大，且2种药物在HCT116中的耐药机制存在部分相似.

本研究中，P<0.05的基因表达水平被选为差异表达基因(Differential expressed genes，DEGs)(HCT116_OxPt：687个；HT29_OxPt：1221个；LoVo_OxPt：1704个；HCT116_SN38：867个；HT29_SN38：1779个；LoVo_SN38：2565个). 如图1(C)所示，对于每个细胞系，SN38处理导致的DEGs比OxPt多，表明SN38处理引起的变化更多. 同时，在经过OxPt和SN38处理之后，LoVo细胞系的差异表达基因相比HCT116和HT29更多. 如图1(D)所示，对这些不同细胞系或同一细胞系不同药物处理的共享基因的基因表达模式进行了比较. 总体而言，至少存在60%的共享基因在OxPt处理的细胞系中具有相同的表达模式，表明大多数共享的失调基因在各个细胞系中的变化是一致的；在SN38中比较每2个样本对，调控模式与OxPt组相比出现显著不同. HT29_SN38与HCT116_SN38和LoVo_SN38之间的变化模式不一致. HT29_SN38与其它2个样本之间的共享失调基因只有40%~60%具有相同的变化模式. 相比之下，约80%的共享调控基因模式在LoVo_SN38和HCT116_SN38中是一致的. 以上结果表明，与OxPt相比，SN38可能在HT29和HCT116/LoVo细胞系之间引发了更多不同的调控变化. 对于每个细胞系，也比较了不同药物下的基因表达模式. 在HCT116和LoVo细胞系中，超过95%的基因具有相同的调控模式，而在HT29中，相同的调控模式相对较低，这表明不同的药物导致了更多不同的变化，而HCT116/LoVo则没有. 尽管基因表达变化是细胞类型依赖的，而不是药物依赖的，但在OxPt中，耐药机制在所有细胞系中相对稳定，而在SN38处理的HT29和其它2种细胞系中则有所不同.

在RNA-seq中鉴定的DEGs远高于微阵列数据，增加了3~37倍[图2(A)]. 芯片数据中鉴定的差异

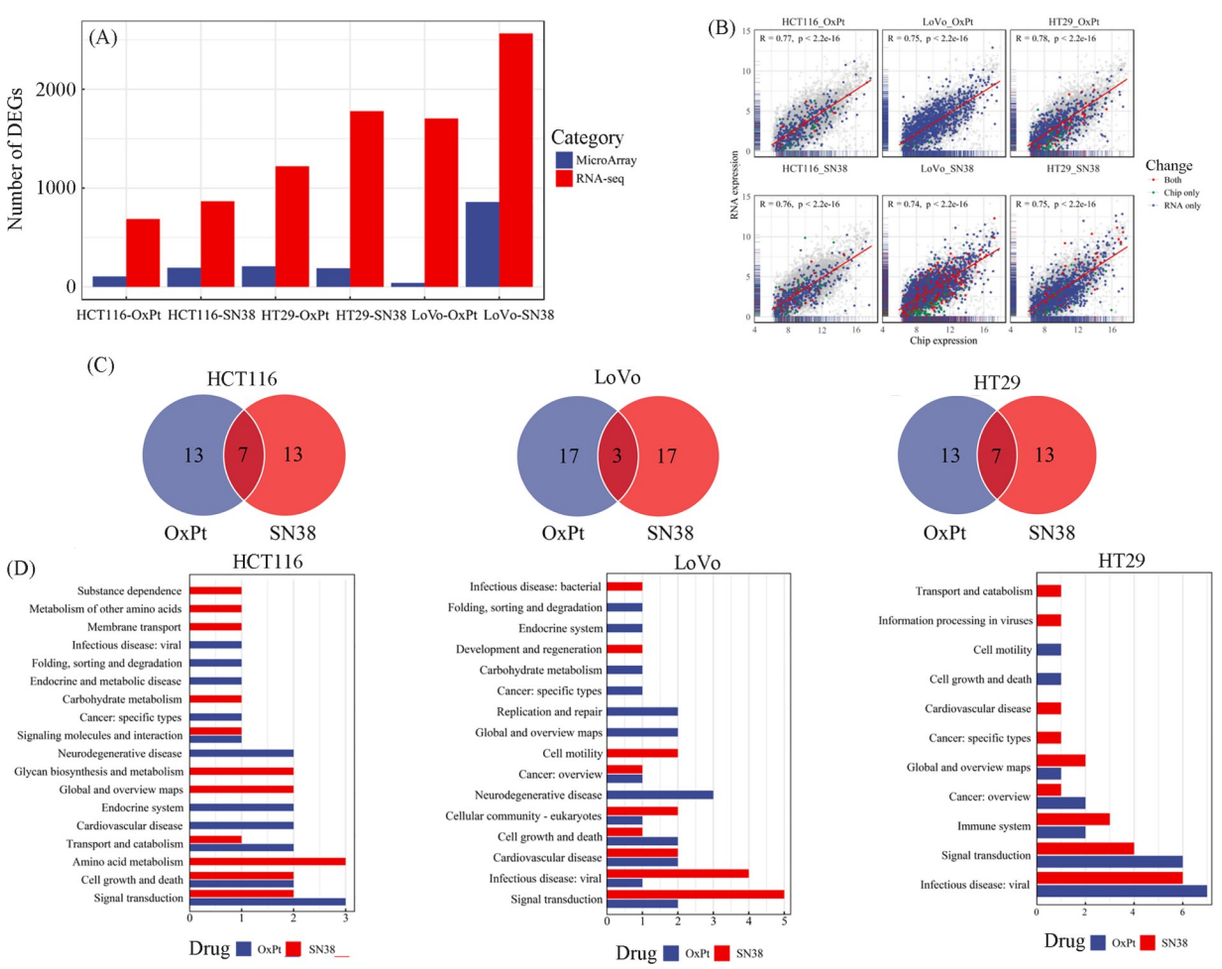


Fig. 2　Comparison of microarrays with RNAseq and pathway enrichment of DEGs

(A) Bar plot of number of DEGs in microarrays data and RNAseq data; (B) correlation of two kinds of transcriptomic data and distribution of DEGs; (C) overlap between Oxpt-resistance cell lines and SN38-resistance cell lines for KEGG pathway enrichment of DEGs; (D) counts of subcategory of KEGG pathway enrichment of DEGs.

表达基因更多地分布在低或中等表达水平，而RNA-seq数据中的基因则均匀分布在所有动态范围内[图2(B)]. RNA-seq更广泛的动态范围提供了更多机会来发现显著的DEGs. 大多数微阵列数据中的DEGs可以在RNA-seq数据中检测到. 同时，微阵列数据和RNA-seq数据相关性表现良好，表明这2种数据类型在基因表达谱的分析中提供了一致且可靠的结果. 此外，RNA-seq检测到更多在微阵列数据中未显著变化的DEGs，更多的DEGs可能有助于更清楚地找到耐药机制.

对HCT116，LoVo及HT29细胞系在不同药物处理后的差异表达基因进行了基于KEGG数据库的通路富集，并按照基因比率(Gene ratio)排序，提取了富集的Top20通路. 如图2(C)所示，在HCT116和HT29中的通路共享比例最高. 这2种细胞系在OxPt和SN38的耐药性可能存在着相似的机制. 进一步分析了不同细胞系的通路富集情况，在LoVo和HT29细胞系中信号转导(Signal transduction)类通路富集到的基因最多，而在HCT116细胞系中这类通路次之[图2(D)]. 信号转导通路可能是结直肠癌细胞系对OxPt和SN38耐药的关键机制.

2.3 药物作用对细胞系蛋白质组产生与转录组不同的影响

在基于iTRAQ-8plex标记的蛋白组学数据中共鉴定到7823个蛋白质，HCT116野生株和耐药株共鉴定到5438个蛋白质，LoVo细胞系鉴定到5990个蛋白质，HT29细胞系鉴定到7123个蛋白质. 为验证蛋白组学数据质量，对同一细胞系内部的技术重复进行了偏最小二乘判别分析[24](Partial least squares discriminant analysis，PLS-DA)(见本文支持信息图S4). PLS-DA结果显示，不同的细胞系差别明显，同时OxPt耐药株与野生株细胞系距离更近.

对差异分析在蛋白质组学水平上进行了比较. OxPt和SN38处理下的差异表达蛋白(Differential expressed proteins，DEPs)，其中HCT116_OxPt有297个，HCT116_SN38有338个，HT29_OxPt有339个，HT29_SN38有417个，LoVo_OxPt有673个，LoVo_SN38有988个. 在转录组和蛋白组同时上调和下调的基因占比最大，转录组数据和蛋白组数据基本呈现一致的变化趋势. 将所有样本的DEPs数量进行了比较，包括上调和下调蛋白质[图3(A)]. 随后联合转录组差异基因和蛋白组差异蛋白进行分析，绘制了九象限图[图3(B)]. 与转录本表达模式相似的是，在LoVo中发现了更多的DEPs，表明该细胞系中发生了较高的蛋白质扰动. 但与转录组数据组不同的是，HT29细胞系的DEPs显著减少. 这可能是由于HT29耐药株受到转录后调控及蛋白降解系统的影响所致. 在药物比较中，对于所有3种细胞系，SN38中发现的DEPs多于OxPt，表明SN38中的蛋白质表达变化大于OxPt，这与RNAseq数据一致.

通过筛选得到各比对组别(HCT116_OxPt-Par，HCT116_SN38-Par，LoVo_OxPt-Par，LoVo_SN38-Par，HT29_OxPt-Par和HT29_SN38-Par)中转录组的差异表达基因(DEGs)和蛋白质组的差异表达蛋白(DEPs)，识别出共同上调及下调的基因(表2). 其中，CLU[25]，ABCG2[26]和AKR1C1[27]3个基因已被证实与CRC的耐药相关. CALB2[28]和NQO1[29]的上调均会抑制细胞凋亡，PLS3[30]的上调则会诱导CRC的上皮-间充质转化(EMT). MSN[31,32]与乳腺癌的耐药性相关且促进细胞增殖，这些基因的上调与耐药细胞系的特性相符. 此外，UGT1A6[33]的多态性被认为可能会导致CRC风险增加，HMOX1[34]作为条件性肿瘤启动子发挥作用. 而NUDT9[35]尚未被报道与CRC耐药相关，可以作为CRC耐药的相关蛋白候选物. 在下调蛋白中，S100A4[36]和S100A14[37]同属于S100蛋白家族，S100A4是CRC的一种抗转移因子，而S100A14的高表达则会诱导细胞凋亡. KITLG下调对肿瘤有抑制作用. CASK[38]的高表达则与肿瘤的不良预后相关，ITGA2[39]被证实与CRC中的氟尿嘧啶(5-FU)耐药呈现出相关性.

实验还比较了每种治疗组的蛋白质表达模式. 结果表明，无论是在OxPt还是SN38中，近1/2的蛋白质在3种细胞系中表现出相同的调控模式[图3(C)]. 在细胞系水平上，OxPt和SN38的90%以上的DEPs在HCT116细胞系中表现出相同的模式，而在LoVo和HT29中占比逐渐减少，表明这些细胞系在OxPt和SN38中的耐药机制不同. 对于每组DEP，大多数也在RNAseq数据中得到支持，表明这2个数据集的一致性. 不同细胞系中的通路重叠也显示出细胞系之间的差异[图3(D)]. KEGG通路富集的结果显示蛋白组与转录组的不同，相比于转录组数据，蛋白组的不同细胞系呈现出不同的通路富集类别. 在LoVo和HCT116细胞系2种耐药株以及HT29的OxPt耐药株转录组数据富集到的KEGG通路中，

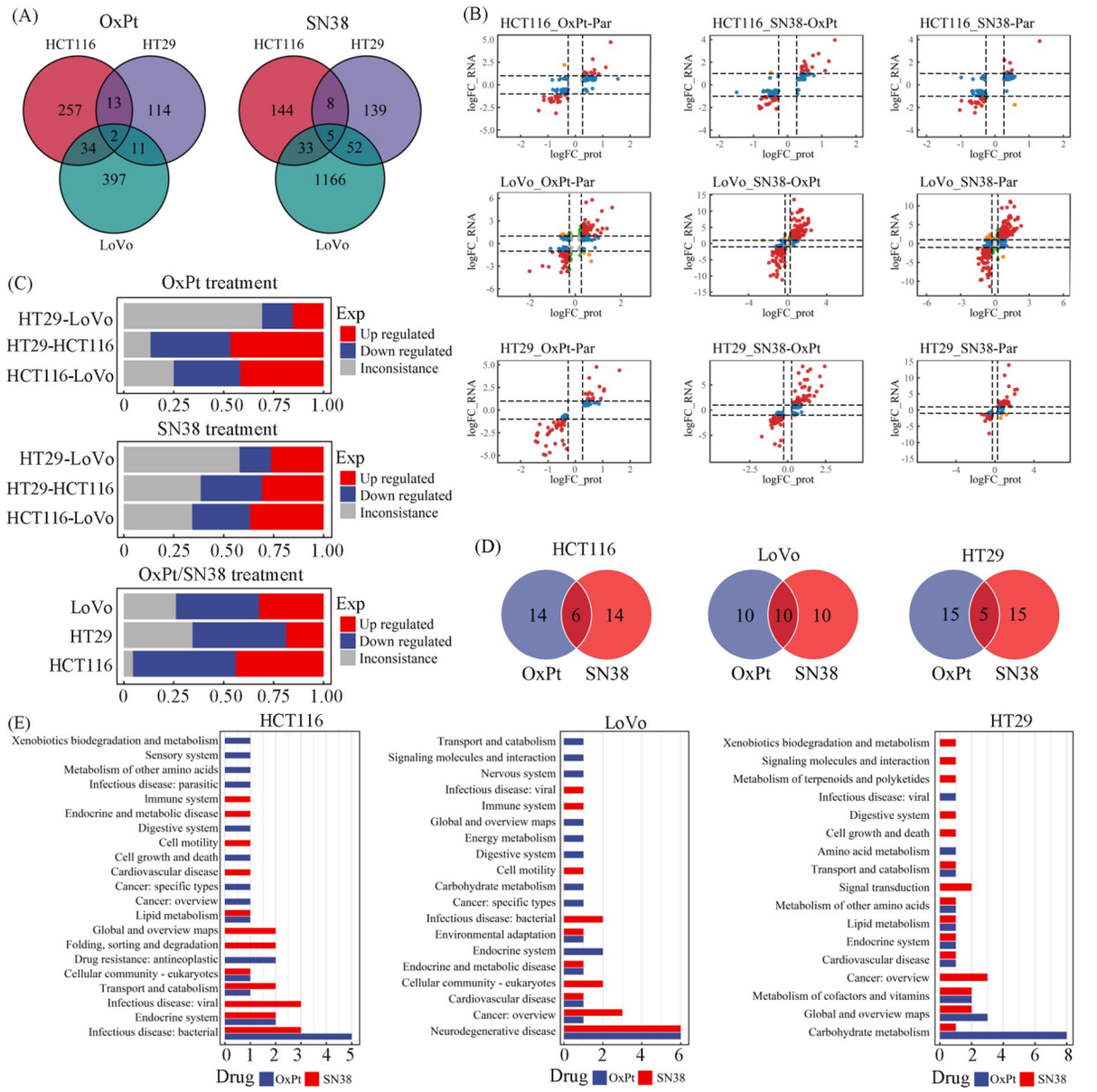


Fig. 3　Changes in protein expression patterns and pathway enrichment in drug-resistant cell lines

(A) Overlap of DEPs in two kinds of drug-resistant groups; (B) nine-quadrant plot for integrated analysis of RNAseq transcriptome and proteome data; (C) proportion of commonly regulated DEPs across cell lines and drug treatments; (D) overlap between Oxpt-resistance cell lines and SN38-resistance cell lines for KEGG pathway enrichment of DEPs; (E) counts of subcategory of KEGG pathway enrichment of DEPs.

Table 2　Commonly regulated genes in different groups

Group	Commonly up regulated genes	Commonly down regulated genes
HCT116_HT29_OxPt		S100A4, KITLG
HCT116_LoVo_OxPt	CLU, CALB2	
HT29_LoVo_OxPt		CASK
HCT116_HT29_SN38		S100A4
HCT116_LoVo_SN38		S100A14
HT29_LoVo_SN38	ABCG2, AKR1C1, MSN, NQO1, UGT1A6, PLS3, HMOX1, NUDT9	ITGA2

GeneRatio最高的均为PI3K-Akt信号通路. Akt在肿瘤细胞中起到抑制细胞凋亡、促进细胞增殖和代谢调节等作用. 类似的, MAPK3等通路也在这5种类型的细胞系中富集程度较高(见本文支持信息图S5). 因此, HT29的SN38耐药性机制可能与其它2种细胞系及HT29对OxPt的耐药性机制差异较大.

3 结　论

本文研究结果体现了不同细胞系对于OxPt和SN38的反应存在显著差异，进一步反映了其各自不同的耐药性机制，并为结直肠耐药性研究提供了新的候选蛋白NUDT9. 在技术方法层面，NGS比传统微阵列技术展现出显著优势，检测中具有更高的灵敏度和动态范围. 在转录本层面，信号转导通路在3种细胞系中均显著富集，提示其可能是结直肠癌对OxPt和SN38耐药的共同关键通路. 其中，PI3K-Akt通路在多数耐药株中基因比率最高，其通过调控细胞增殖、凋亡和代谢促进耐药；而HT29对SN38的耐药机制可能与其它细胞株存在较大差异. 而在蛋白质层面，3种细胞系在KEGG通路富集时，分化出不同的趋势，但其可能的耐药性机制受细胞系异质性影响仍大于药物依赖性. LoVo细胞系在2种耐药模型中均表现出更广泛的蛋白质扰动，可能与其较高的遗传异质性或药物靶点敏感性相关.

支持信息见http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20250049.

参　考　文　献

[1] Siegel R. L., Giaquinto A. N., Jemal A., *CA-Cancer J. Clin.*, **2024**, *74*(1), 12—49
[2] Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., Jemal A., *CA-Cancer J. Clin.*, **2024**, *74*(3), 229—263
[3] Woynarowski J. M., Chapman W. G., Napier C., Herzig M. C. S., Juniewicz P., *Mol. Pharmacol.*, **1998**, *54*(5), 770—777
[4] Hsiang Y. H., Hertzberg R., Hecht S., Liu L. F., *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*(27), 14873—14878
[5] Maindrault-Goebel F., de Gramont A., Louvet C., André T., Carola E., Gilles V., Lotz J. P., Tournigand C., Mabro M., Molitor J. L., Artru P., Izrael V., Krulik M., *Ann. Oncol.*, **2000**, *11*(11), 1477—1483
[6] André T., Louvet C., Maindrault-Goebel F., Couteau C., Mabro M., Lotz, J. P., Gilles-Amar V., Krulik M., Carola E., Izrael V., de Gramont A., *Eur. J. Cancer*, **1999**, *35*(9), 1343—1347
[7] Hashemi M., Esbati N., Rashidi M., Gholami S., Raesi R., Bidoki S. S., Goharrizi M. A. S. B., Motlagh Y. S. M., Khorrami R., Tavakolpournegari A., Nabavi N., Zou R. J., Mohammadnahal L., Entezari M., Taheriazam A., Hushmandi K., *Transl. Oncol.*, **2024**, *40*, 101846
[8] Faivre S., Chan D., Salinas R., Woynarowska B., Woynarowski J. M., *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *66*(2), 225—237
[9] Saurav S., Karfa S., Vu T., Liu Z. P., Datta A., Manne U., Samuel T., Datta P. K., *Cancers*, **2024**, *16*(20), 3491
[10] Voigt W., Matsui S., Yin M. B., Burhans W. C., Minderman H., Rustum Y. M., *Anticancer Res.*, **1998**, *18*(5A), 3499—3505
[11] Wang Q. Y., Shen X. F., Chen G., Du J. F., *Cancers*, **2022**, *14*(12), 2928
[12] Zhu G. X., Gao D., Shao Z. Z., Chen L., Ding W. J., Yu Q. F., *Mol. Med. Rep.*, **2021**, *23*(2), 105
[13] Turkington R. C., Longley D. B., Allen W. L., Stevenson L., McLaughlin K., Dunne P. D., Blayney J. K., Salto-Tellez M., van Schaeybroeck S., Johnston P. G., *Cell Death Dis.*, **2014**, *5*, e1046
[14] Jensen N. F., Stenvang J., Beck M. K., Hanáková B., Belling K. C., Do K. N., Viuff B., Nygård S. B., Gupta R., Rasmussen M. H., Tarpgaard L. S., Hansen T. P., Budinská E., Pfeiffer P., Bosman F., Tejpar S., Roth, A., Delorenzi M., Andersen C. L., Rømer M. U., Brünner N., Moreira J. M. A., *Mol. Oncol.*, **2015**, *9*(6), 1169—1185
[15] Ritchie M. E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C. W., Shi W., Smyth G. K., *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*(7), e47
[16] Bolstad B. M., Irizarry R. A., Åstrand M., Speed T. P., *Bioinformatics*, **2003**, *19*(2), 185—193
[17] Benjamini Y., Hochberg Y., *J. R. Stat. Soc. B*, **1995**, *57*(1), 289—300
[18] Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S. L., *Genome Biol.*, **2009**, *10*(3), R25
[19] Li B., Dewey C. N., *BMC Bioinformatics*, **2011**, *12*, 323
[20] Savitski M. M., Wilhelm M., Hahne H., Kuster B., Bantscheff M., *Mol. Cell. Proteomics*, **2015**, *14*(9), 2394—2404
[21] Berg K. C. G., Eide P. W., Eilertsen I. A., Johannessen B., Bruun J., Danielsen S. A., Bjørnslett, M., Meza-Zepeda L. A., Eknæs M., Lind G. E., Myklebost O., Skotheim R. I., Sveen A., Lothe R. A., *Mol. Cancer*, **2017**, *16*, 116
[22] Yeung T. M., Gandhi S. C., Wilding J. L., Muschel R., Bodmer W. F., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2010**, *107*(8), 3722—3727
[23] Kleivi K., Teixeira M. R., Eknæs M., Diep C. B., Jakobsen K. S., Hamelin R., Lothe R. A., *Cancer Genet. Cytogenet.*, **2004**, *155*(2), 119—131
[24] Wold S., Sjöström M., Eriksson L., *Chemometr. Intell. Lab.*, **2001**, *58*(2), 109—130
[25] Hlavca S., Chan W. H., Engel R. M., Abud H. E., *Cancer Metastasis Rev.*, **2024**, *43*(1), 379—391
[26] Hao J. J., Huang J. S., Hua C. Y., Zuo Y., Yu W. D., Wu X. J., Li L. R., Xue G. Q., Wan X. Y., Ru L. Y., Guo Z. Y., Han S. L., Deng W. G., Lin F., Guo W., *PLOS Biol.*, **2023**, *21*(9), e3002256
[27] Fu Z. W., Wu T. T., Gao C., Wang L. L., Zhang Y., Shi C., *Acta Pharm. Sin. B*, **2024**, *14*(12), 5305—5320

[28] Stevenson L., Allen W. L., Proutski I., Stewart G., Johnston L., McCloskey K., Wilson P. M., Longley D. B., Johnston P. G., *PLoS One*, **2011**, *6*(5), e20276
[29] Wang Y. X., Zhou H. K., Liu Y., Zhao X. Y., Wang S. H., Lin Z. H., *Cancer Cell Int.*, **2025**, *25*(1), 41
[30] Sugimachi K., Yokobori T., Iinuma H., Ueda M., Ueo H., Shinden Y., Eguchi H., Sudo T., Suzuki A., Maehara Y., Mori M., Mimori K., *Ann. Surg. Oncol.*, **2014**, *21*(11), 3680—3690
[31] Huang C. Y., Wei P. L., Batzorig U., Makondi P. T., Lee C. C., Chang Y. J., *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, *24*(13), 10951
[32] Alam F., Mezhal F., EL Hasasna H., Nair V. A., Aravind S., Saber Ayad M., El-Serafi A., Abdel-Rahman W. M., *Tumor Biol.*, **2017**, *39*(9), doi: 10.1177/1010428317714634
[33] Osawa K., Nakarai C., Akiyama M., Hashimoto R., Tsutou A., Takahashi J., Takaoka Y., Kawamura S., Shimada E., Tanaka K., Kozuka M., Yamamoto M., Kido Y., *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2012**, *13*(5), 2311—2314
[34] Singhabahu R., Gamage, S. M. K., Gopalan V., *Cancer Pathog. Ther.*, **2024**, *2*(2), 65—73
[35] Perraud A. L., Shen B., Dunn C. A., Rippe K., Smith M. K., Bessman M. J., Stoddard B. L., Scharenberg A. M., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*(3), 1794—1801
[36] He Z., Yu L. H., Luo S. Y., Li M. Z., Li J. B., Li Q., Sun Y., Wang C. B., *BMC Cancer*, **2017**, *17*, 140
[37] Min H. Y., Cho J., Sim J. Y., Boo H. J., Lee J. S., Lee S. B., Lee Y. J., Kim S. J., Kim K. P., Park I. J., Hong S. M., Zhang X. L., Zhang Z. G., Park R. W., Lee H. Y., *Clin. Transl. Med.*, **2022**, *12*(7), e986
[38] Wei J. L., Fu Z. X., Fang M., Zhou Q. Y., Zhao Q. N., Guo J. B., Lu W. D., Wang H., *Tumor Biol.*, **2014**, *35*(9), 9185—9194
[39] Qin J., Hu S. S., Lou J. W., Xu M., Gao R., Xiao Q. N., Chen Y. H., Ding M. Z., Pan Y. Q., Wang S. K., *Int. Immunopharmacol.*, **2024**, *137*, 112487

(Ed.: L, V, K)