

胃癌新辅助化疗耐药机制及治疗策略研究

刘宇佳^{1a,2}, 胡晓平^{1a}, 钟里科^{1a}, 李晶晶^{1b}, 李莉³, 黄萍^{1a,2}, 张轶雯^{1a,2*} (1.浙江省肿瘤医院, a.药剂科, b.腹部内科, 杭州 310022; 2.浙江省头颈肿瘤转化医学研究重点实验室, 杭州 310022; 3.杭州市淳安县第一人民医院, 杭州 311700)

摘要: 目的 利用生物信息学筛选影响胃癌化疗耐药的特征基因, 深入探讨化疗耐药的分子机制, 为胃癌的化疗提供新策略。方法 在 GEO 数据库筛选胃癌 DCS 方案(多西他赛+顺铂+替吉奥)耐药表达谱芯片, 利用 GEO2R 工具筛选胃癌耐药组织特征基因; 构建差异基因的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络; 并分析 PPI 网络的关键节点和稳定模块, 进而对差异基因和关键节点及模块基因进行功能富集及注释; 再对差异基因进行化合物靶点模拟, 筛选出潜在药物。结果 筛选胃癌化疗耐药差异基因共 609 个, 构建 PPI 网络的关键节点为 ACLY 和 AKT1。差异基因 GO 功能富集与 KEGG 通路富集结果显示, 主要集中在免疫及肿瘤生长相关通路。C-MAP 分析结果提示 7 个候选化合物吻合度评分>0.9。结论 本研究利用生物信息学筛选了影响胃癌化疗耐药的特征基因, 深入探讨化疗耐药的分子机制, 为胃癌的化疗提供了新策略。

关键词: 胃癌; 化疗耐药; 生物信息学; 基因功能富集及注释; PPI 网络

中图分类号: R969.4 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)15-1914-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.012

引用本文: 刘宇佳, 胡晓平, 钟里科, 等. 胃癌新辅助化疗耐药机制及治疗策略研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1914-1918.

Study on Drug Resistance Mechanism and Treatment Strategy of Neoadjuvant Chemotherapy for Gastric Cancer

LIU Yujia^{1a,2}, HU Xiaoping^{1a}, ZHONG Like^{1a}, LI Jingjing^{1b}, LI Li³, HUANG Ping^{1a,2}, ZHANG Yiwen^{1a,2*} (1.Zhejiang Cancer Hospital, a.Department of Pharmacy, b.Department of Internal Abdominal, Hangzhou 310022, China; 2.Key Laboratory of Head & Neck Cancer Translational Research of Zhejiang Province, Hangzhou 310022, China; 3.The First People's Hospital of Chun'an, Hangzhou 311700, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the microarray data of the gastric cancer patients with chemotherapy resistance to look for the differences of gene modules and key pathways. **METHODS** Gene expression profiles of the gastric cancer with the information of chemoresistance in GEO database were selected. The GEO2R tools were used to identify differential expression genes (DEGs) and String database was employed to visualization analysis for protein-protein interaction (PPI) network. Then, the PPI network was imported into the Cytoscape software to find key nodes and stabilization modules by Centiscape, MCODE. After that, DAVID database was used to enrich and annotate the pathway and key modules. Finally, the C-MAP platform was used to simulate the compounds that matched the variation trend of differential genes. **RESULTS** This study identified 609 characteristic genes of chemoresistance gastric cancer. ACLY, AKT1 were key nodal proteins for drug resistance in gastric cancer, related with immune and tumor growth signal pathway. The results of C-MAP analysis suggested that the score of 7 candidate compounds was more than 0.9. **CONCLUSION** This study employed bioinformatics method from various perspectives to define the gene expression characteristics of gastric cancer with chemoresistance. These results may facilitate the discovery of biomarkers for predicting chemotherapy responses in gastric cancer and contribute in developing personalized medicines.

KEYWORDS: gastric cancer; chemotherapy resistance; bioinformatics; gene enrichment and annotation; PPI network

胃癌是一种较为高发的高死亡率癌种, 据统计, 2015 年我国胃癌发病例数 67.91 万, 死亡例数 49.8 万, 死亡率达到了 73.3%^[1]。胃癌治疗方式以手术切除为主, 大部分患者需要围术期化疗以

及术后辅助化疗, 如新辅助化疗(DCS)。但由于广泛存在化疗耐药现象, 导致胃癌化疗患者受益有限^[2-3]。目前对于化疗耐药的大部分研究只局限于某一基因的异常表达, 针对这一点, 笔者希望以

基金项目: 国家自然科学基金项目(81503165); 浙江省医药卫生科技计划项目(2017RC001, 2018KY148)

作者简介: 刘宇佳, 女, 硕士, 药师 Tel: (0571)88122440 E-mail: vae1476@163.com *通信作者: 张轶雯, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (0571)88122440 E-mail: zhangyw@zjcc.org.cn

胃癌组织基因芯片为基础,利用生物信息学的手段,多角度筛选胃癌耐药的特征基因,从耐药的分子机制上探寻胃癌耐药的关键靶点,寻找逆转耐药的策略。

1 材料与方法

1.1 基因芯片的筛选

通过 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)筛选同时包含化疗敏感及化疗耐受的人源化胃癌基因芯片,纳入标准:①胃癌人源化高通量基因芯片;②关于胃癌化疗敏感与耐药的对照研究;③原始数据集或经过标准化处理;④化疗敏感和耐药组样本量>3。最终选取样本量为 38 的基因芯片 GSE31811 作为研究对象,下载其 martix 文件,统计样本基本信息。

1.2 差异基因的筛选与处理

利用 GEO2R 在线分析工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>),按 $P<0.05$, $2^{|\log_2 \text{fold change}|}>3.5$ 的条件,筛选出 GSE31811 基因芯片化疗敏感与耐药组的差异基因。再从显著差异基因中挑出上调、下调最明显的各 10 个基因进行后续分析。

1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI)网络构建与分析

利用 String 数据库(<https://string-db.org/>)构建上述差异基因的 PPI 网络,在 Cytoscape3.6.0 (<http://www.cytoscape.org/>)软件中通过 Centiscape 2.2 插件计算每个节点的度(Degree)、接近中心度(Closeness)和中介中心度(Between),以 Degree 阈值筛选得到关键的 PPI 节点^[4-5]。再利用 MCODE(Molecular Complex Detection, version 1.5.1 by Bader Lab, University of Toronto)插件对 PPI 网络进行 k-core 分析^[6],筛选 k-core>2 的 PPI 稳定模块。

1.4 差异基因功能富集及注释

将差异基因和 PPI 网络关键节点、稳定模块基因分别导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)中进行 GO 生物功能富集分析以及 KEGG 信号通路富集分析。

1.5 差异基因针对性化合物筛选

将差异基因分别导入 affymetrix 平台(<https://www.affymetrix.com/site/mainPage.affx>),从而把基因转换成相对应的基因探针,然后把基因探针导入 C-MAP 平台(<https://portals.broadinstitute.org/cmap/>),寻找与差异基因相匹配的化合物。

2 结果

2.1 基因芯片样本信息

从 GEO 数据库中下载基因芯片 GSE31811 的 matrix 文件,从中获取样本信息,统计结果见表 1。芯片数据共包含 19 例胃癌患者的 38 个组织,其中有 21 个为肿瘤组织,17 个为正常胃黏膜组织。化疗方案为 DCS 方案(多西他赛+顺铂+替吉奥),将 38 个组织按照患者的化疗耐药情况进行分类,来源于化疗耐药患者的肿瘤及正常组织共 16 个,其余 22 个组织来源于化疗敏感患者。

表 1 基因芯片样本信息表

Tab. 1 Sample Information of Gene chip

肿瘤组织	正常组织	特征
GSM774575	GSM774576	敏感
GSM774579	GSM774580	敏感
GSM774922	GSM774923	敏感
GSM774926	GSM774927	敏感
GSM774928	GSM774929	敏感
GSM774930	GSM774931	敏感
GSM774932	GSM774933	敏感
GSM774934	GSM774935	敏感
GSM774936	GSM774937	敏感
GSM774949	无	敏感
GSM774950	无	敏感
GSM773455	无	敏感
GSM774574	无	敏感
GSM774577	GSM774578	耐药
GSM774581	GSM774582	耐药
GSM774583	GSM774584	耐药
GSM774924	GSM774925	耐药
GSM774938	GSM774939	耐药
GSM774947	GSM774948	耐药
GSM774951	GSM774952	耐药
GSM774953	GSM774954	耐药

2.2 胃癌化疗耐药差异基因的筛选

以 GSE31811 基因芯片中胃癌化疗敏感组织样本为对照,将胃癌耐药组织样本与之对比,筛选 $P<0.05$, $2^{|\log_2 \text{fold change}|}>3.5$ 的差异基因共 609 个,绘制火山图,进行聚类分析,见图 1~2。从中挑选出上调、下调最显著各 10 个差异基因,结果见表 2。

2.3 PPI 网络构建与分析

利用 String 数据库(<https://string-db.org/>)构建上述差异基因的 PPI 网络,见图 3,计算 PPI 节点 Degree 阈值为 7.769。结合生物学功能筛选出 ACLY、AKT1 是该 PPI 网络的关键节点,其 Degree 值分别是 66, 54。

为进一步验证 ACLY、AKT1 蛋白在胃癌恶性进展中的作用,笔者通过 The Human Protein Atlas 数据库对胃癌患者临床样本进行免疫组化结果查询。与正常组织相比,胃癌患者 AKT1 和 ACLY 高表达,结果见图 4。上述免疫组化数据提示 AKT1

和 ACLY 作为胃癌耐药靶点和治疗策略的可信度较高。

2.4 差异基因功能注释富集及注释

利用 DAVID 数据库对 GSE31811 基因芯片中筛选的差异基因及 PPI 网络关键节点进行功能富集及注释。基因 GO 生物功能富集结果见图 5A: 胃癌化疗耐药关键基因可能参与调控抗原经 MHCII 类外源肽抗原加工和呈递、核小体组装、端粒组织等生物功能。基因 KEGG 通路富集结果见图 5B: 胃癌化疗耐药相关信号通路包括系统性红斑狼疮、抗原处理与表达、病毒致癌 IgA 生产的肠道免疫网络等。

表 2 胃癌化疗耐药差异基因

Tab. 2 DEGs of chemoresistance gastric cancer

基因	P	Log FC
FABP1	0.036	3.579
TNS4	0.012	3.425
COL17A1	0.022	2.873
SLC6A20	0.007	2.850
AFAP1-AS1	0.040	2.503
BTNL8	0.031	2.443
RHBDL2	0.024	2.416
F5	0.017	2.217
LOC643201	0.011	2.202
DUSP1	0.034	2.193
SRCIN1	0.005	-3.030
POTEB3	0.011	-3.037
E4F1	0.001	-3.050
SP5	0.007	-3.103
BCL9	0.003	-3.138
NBPF9	0.017	-3.152
LRRC37A4P	0.008	-3.206
ITGB8	0.002	-3.361
EYA2	0.003	-3.886
XIST	0.017	-4.724

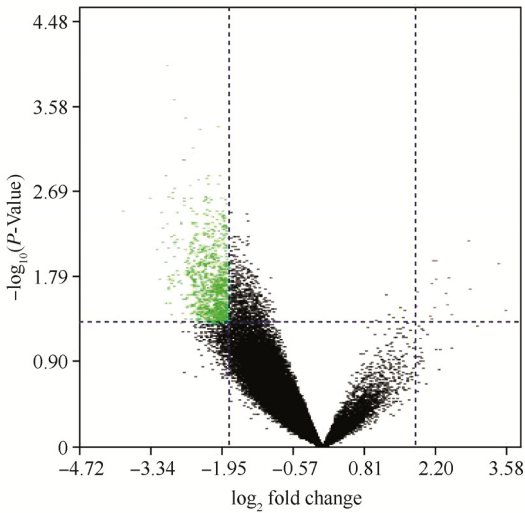


图 1 差异基因火山图

Fig. 1 Volcano plot of different genes

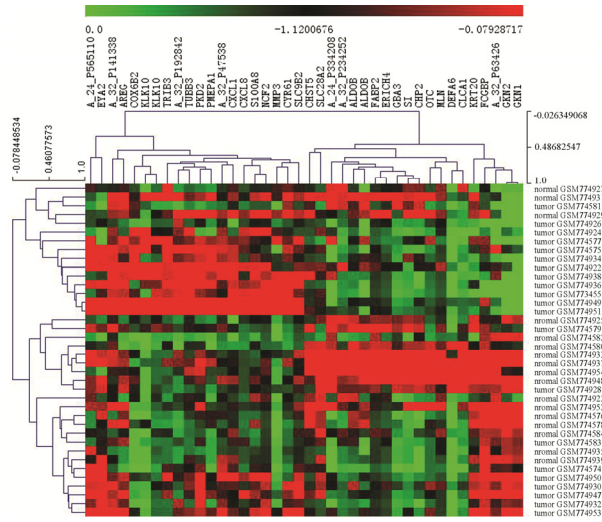


图 2 差异基因聚类热图

Fig. 2 Heatmap of different genes

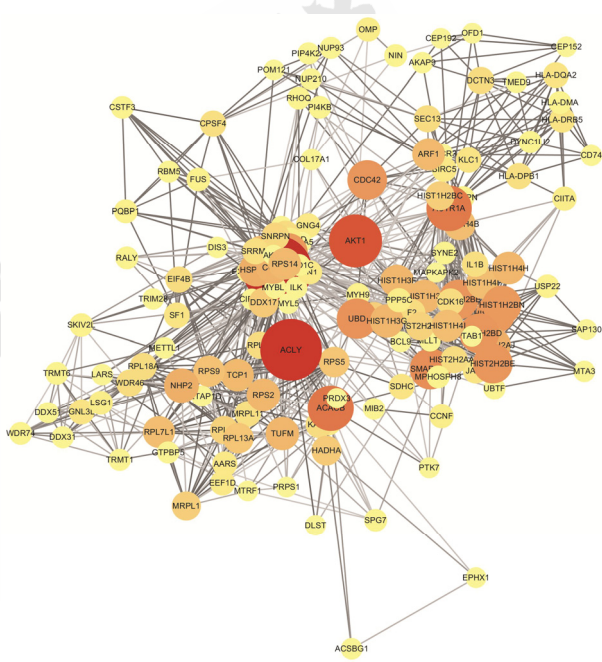


图 3 差异基因 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network of different genes

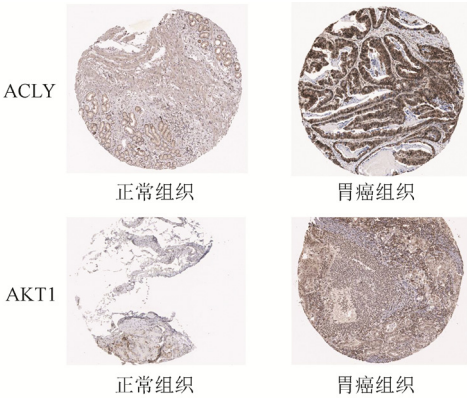


图 4 胃癌组织免疫组化图

Fig. 4 Immuno-histochemistry of gastric cancer tissue

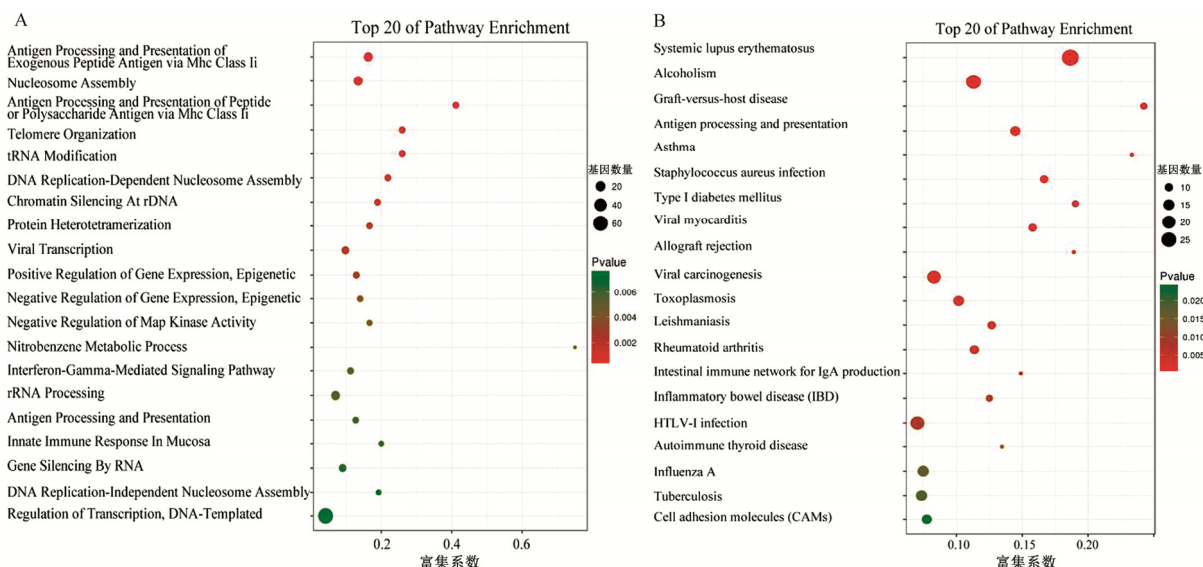


图 5 差异基因功能富集分析

Fig. 5 Functional enrichment analysis of differential genes

2.5 C-MAP 分析

将胃癌耐药差异基因对应的基因探针导入 C-MAP 平台分析后, 得到与差异基因相匹配的化合物。Score 值代表候选化合物与基因存在的潜在关联度, 越接近于 1, 则代表匹配度越高, 表 3 列出了 Score 值最高的 10 个化合物, 其中 drofenine 的 Score 值为 1。对 Score 值最高的 20 个化合物进行聚类分析(网址: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?p=clustering>), 结果见图 6。

表 3 胃癌耐药差异基因 C-MAP 分析

Tab. 3 C-MAP analysis of differential genes

化合物	分值	化合物	分值
Drofenine	1	Piperlongumine	0.906
Levonorgestrel	0.992	Tremorine	0.904
8-Azaguanine	0.926	Androsterone	0.898
Piribedil	0.909	Trioxysalen	0.895
Verteporfin	0.908	Trichostatin A	0.894

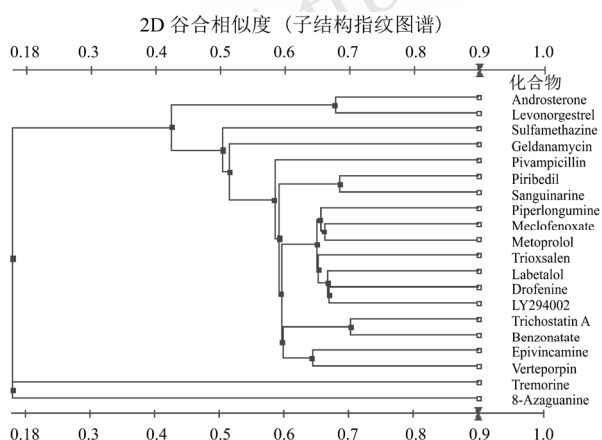


图 6 胃癌耐药差异基因 C-MAP 分析

Fig. 6 C-MAP analysis of differential genes

3 讨论

胃癌作为常见的恶性肿瘤之一, 化疗是除手术切除外最重要的临床治疗手段。而胃癌的化疗耐药则是胃癌治疗失败的主要原因之一, 深入研究胃癌化疗耐药的分子机制有重要的临床意义。以往针对胃癌化疗耐药的研究仅仅针对某一基因或某一信号通路, 对其耐药机制远未阐明。因此迫切需要更深入了解肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性的机制, 以确定新的治疗靶点, 提高患者生存率。本研究选取 GSE31811 基因芯片, 对 19 名胃癌患者组织结合其化疗敏感情况进行全基因组分析, 筛选出胃癌耐药关键基因。进一步构建 PPI 网络计算关键节点, 通过对差异基因及 PPI 网络关键节点进行功能注释及通路富集, 以期利用生物信息学对胃癌耐药的分子机制有更全面、深入的认识, 为胃癌临床治疗策略提供新思路。

首先, 以化疗敏感组作为对照, 发现在化疗耐药组有 609 个基因表达显著变化, 以这些差异基因构建 PPI 网络, 筛选出关键节点 ACLY 和 AKT1。AKT1 是 AKT 激酶家族成员, AKT 家族是抗肿瘤药物研究的热门靶点, 参与调控包括代谢、增殖、血管生成等生物学过程^[7-8]。有研究发现 AKT1 与肺癌的顺铂耐药有关, 其过度表达会降低胃癌细胞对顺铂的体外和体内化学敏感性^[9]。作用机制与激活 JAK2 信号通路以及 STAT3 蛋白有关。ACLY 为 ATP-柠檬酸裂合酶, 对细胞代谢过程十分重要, ACLY 通过影响多个下游途径, 诱

导各种癌细胞系中的增殖停滞和细胞凋亡,是潜在肿瘤治疗靶点^[10]。但 ACLY 与肿瘤化疗耐药的关系仍未被阐明,有研究指出,ACLY 在化疗耐药的结直肠癌患者中异常高表达,抑制 ACLY 可以部分逆转结直肠癌患者对伊立替康的耐受。但由于 AKT 信号通路会代偿激活 ACLY,若要完全逆转伊立替康耐受,需要同时抑制 ACLY 和 AKT 信号通路^[11]。该报道与本研究所发现胃癌耐药基因的 PPI 网络关键节点正吻合。

此外,本研究通过 GO 功能富集发现,胃癌耐药的基因,其生物学功能主要集中于为抗原经 MHC II 类外源肽抗原加工和呈递、核小体组装、端粒、tRNA 修饰、rDNA 染色质沉默、蛋白质异构化、病毒转录、MAP 激酶活性的负调控等。文献报道,MHC II 类分子表达上调,可能会影响乳腺癌患者的化疗敏感性^[12]。此外,大量研究发现,抑制 MAP 激酶活性会导致肿瘤化疗耐药^[13-15]。进一步对胃癌耐药差异基因进行 KEGG 通路富集,发现主要集中于系统性红斑狼疮等细胞免疫和炎症相关通路,这与胃癌发生机制相符,胃癌发生主要是由于免疫系统失衡,炎症相关信号网络在癌旁组织中激活^[16]。进一步通过 C-MAP 计算与差异基因相匹配的候选化合物,为后续开发新的化疗联合方案提供生物信息学基础。

综上所述,本研究利用多种生物信息学方法从不同的角度分析了胃癌化疗耐药患者的基因表达特征,探索胃癌化疗耐受的分子机制。并通过筛选潜在的化合物逆转基因的异常表达,为开发新型胃癌化疗方案提供研究基础,以期提高胃癌化疗敏感性,延长患者生存时间。

REFERENCES

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] MIAO Z F, LIU X Y, WANG Z N, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy in patients with gastric cancer: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. *Bmc Cancer*, 2018, 18(1): 118. Doi: 10.1186/s12885-018-4027-0.

- [3] REDDAVID R, SOFIA S, CHIARO P, et al. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. Is it a must or a fake [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(2): 274-289.
- [4] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [5] ZHANG T P. Centrality measures to identify influential nodes in complex networks [J]. *Value Eng(价值工程)*, 2016, 35(14): 209-210.
- [6] REN Z M, LIU J G, SHAO F, et al. Analysis of the spreading influence of the nodes with minimum K-shell value in complex networks [J]. *Acta Physica Sin(物理学报)*, 2013, 62(10): 108902-108902.
- [7] GAO F, ALWHAIBI A, SABBINENI H, et al. Suppression of Akt1- β -catenin pathway in advanced prostate cancer promotes TGF β 1-mediated epithelial to mesenchymal transition and metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2017(402): 177-189.
- [8] ZHAO Y M, ZHANG J K, CAI Z B, et al. Clinical research progress of Akt inhibitors [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2017, 34(4): 625-630.
- [9] ZHANG L L, ZHANG J, SHEN L, et al. Overexpression of AKT decreases the chemosensitivity of gastric cancer cells to cisplatin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Med Reports*, 2013, 7(5): 1387-1390.
- [10] KHWAIRAKPAM A D, SHYAMANANDA M, SAILO B L, et al. ATP citrate lyase (ACLY): a promising target for cancer prevention and treatment [J]. *Current Drug Targets*, 2015, 16(2): 156-163.
- [11] ZHOU Y, BOLLU L R, TOZZI F, et al. ATP citrate lyase mediates resistance of colorectal cancer cells to SN38 [J]. *Mol Cancer Therap*, 2013, 12(12): 2782-2791.
- [12] BALKO J M, JOHNSON D B, ERICSSONGONZALEZ P, et al. Abstract P1-08-02: Breast tumor-specific MHC-II expression drives a unique pattern of adaptive resistance to antitumor immunity through MHC-II receptor checkpoint engagement [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(4 Supplement): 180.
- [13] ZECENA H, TVEIT D, WANG Z, et al. Systems biology analysis of mitogen activated protein kinase inhibitor resistance in malignant melanoma [J]. *Bmc Systems Biol*, 2018, 12(1): 33. Doi: 10.1186/s12918-018-0554-1.
- [14] GROSSI V, PESERICO A, TEZIL T, et al. p38 α MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(29): 9744-9758.
- [15] CHAI D Y, YUAN J Q, ZHOU Y P. Research progress of MAPK signaling pathway for multidrug resistance in tumors [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2019, 28(8): 948-953.
- [16] SUBHASH V V, MEI S Y, TAN W L, et al. Strategies and advancements in harnessing the immune system for gastric cancer immunotherapy [J]. *J Immunol Res*, 2015(5): 1-14.

收稿日期: 2018-10-30

(本文责编: 蔡珊珊)