

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0703-13

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250315

## 基于补体替代途径对小鼠结直肠癌肝转移模型调控作用的生物信息学分析及实验验证

石长玉<sup>1</sup>, 李勇<sup>1</sup>, 邓静<sup>1</sup>, 朴春梅<sup>2</sup>, 金明<sup>1</sup>

(1. 延边大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 吉林 延吉 133000; 2. 首都医科大学附属北京安贞医院 北京市心肺血管疾病研究所, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:** 基于生物信息学方法分析补体替代途径对小鼠结直肠癌(CRC)肝转移模型的调控作用, 并进行实验验证。**方法:** 以“CRC肝转移”为关键词在基因表达综合(GEO)数据库中进行检索, 获取GSE81558 GEO数据集, 包括正常结肠组织样本、CRC组织样本和CRC肝转移组织样本, 采用生物信息学方法分析, 筛选差异表达基因(DEGs)。使用R和Cytoscape软件进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析并进行可视化, 利用检索相互作用基因/蛋白质(STRING)数据库对DEGs相关蛋白-蛋白相互作用(PPI)进行评估, 绘制PPI网络图。12只C57BL/6小鼠脾脏注射SL4肿瘤细胞, 并于0、7和14 d后采集小鼠肝组织, 采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测小鼠肝转移灶中补体途径相关基因表达水平。采用小鼠CRC肝转移模型验证补体信号通路, 将小鼠分为对照组、B因子(FB)敲除组(FB<sup>-/-</sup>)和C4因子敲除组(C4<sup>-/-</sup>), 每组6只, 检测各组小鼠肝脏质量, HE染色观察对照组和FB<sup>-/-</sup>组小鼠CRC肝转移灶形态表现并计算肝转移灶面积百分率, 免疫组织化学染色法观察对照组和FB<sup>-/-</sup>组小鼠肝组织中巨噬细胞浸润情况, 计算巨噬细胞浸润百分率。**结果:** 正常结肠组织样本与CRC组织样本以及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本之间距离较远, 提示样本间差异性较大, 可以对DEGs进行后续分析。在正常结肠组织样本与CRC组织样本数据集中共筛选出1 908个DEGs, 其中771个DEGs上调, 1 137个DEGs下调。在CRC与CRC肝转移数据集中共发现23个上调的DEGs及100个下调的DEGs。GO功能富集分析, 与正常结肠组织样本比较, CRC组织样本的DEGs主要集中于有丝分裂细胞周期过程、细胞分裂、对激素的反应、有丝分裂核分裂和对脂质的反应等生物学过程(BP); 与CRC组织样本比较, CRC肝转移组织样本的DEGs主要富集于凝血反应过程中, 如血小板脱颗粒、凝血调节、急性期反应、止血调节和凝血调节等BP。KEGG信号通路富集分析, 与正常结肠组织样本比较, CRC组织样本的DEGs主要富集的信号通路为细胞周期和P53信号通路; 与CRC组织样本比较, CRC肝转移组织样本的DEGs主要富集于与补体、凝血级联和代谢相关的信号通路。DEGs的PPIs网络鉴定出的枢纽基因和血液蛋白有关。RT-qPCR法检测, 与0 d组比较, 7 d组小鼠CRC肝转移组织样本中补体相关基因补体1q(C1q) mRNA表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), 补体3(C3)、补体5(C5)、FB和D因子(FD) mRNA表达水平均明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 14 d组小鼠CRC肝转移组织样本中补体通路相关基因C1q、补体2(C2)、C3、补体片段3a受体(C3aR)、C5、补体片段5a受体(C5aR)、衰变加速因子(DAF)、FB和FD mRNA表达水平均明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与对照组比较, FB<sup>-/-</sup>组小鼠肝脏质量明显降低( $P < 0.01$ ), C4<sup>-/-</sup>组小鼠肝脏质量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。HE染色观察, 与对照组比较, FB<sup>-/-</sup>组小鼠CRC肝转移灶明显减少, CRC肝转移面积百分率

[收稿日期] 2024-05-09 [录用日期] 2024-08-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82060537)

[作者简介] 石长玉(1999—), 女, 辽宁省营口市人, 在读硕士研究生, 主要从事分子肿瘤方面的研究。

[通信作者] 金明, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: jinming@ybu.edu.cn)

©《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.

明显降低 ( $P < 0.01$ )。免疫组织化学染色法观察, 与对照组比较,  $FB^{-/-}$ 组小鼠CRC肝转移灶中巨噬细胞浸润减少, 巨噬细胞浸润百分率明显降低 ( $P < 0.01$ )。**结论:** 补体级联反应与CRC肝转移有关, 替代补体通路调控CRC肝转移, 提示该通路是CRC肝转移的潜在治疗靶点。

[关键词] 结直肠癌; 肝转移; 基因表达综合数据库; 生物信息学; 差异表达基因

[中图分类号] R735.3 [文献标志码] A

## Bioinformatics analysis on adjustment effect of colorectal liver metastases model in mice based on complement alternative pathway and its experimental verification

SHI Changyu<sup>1</sup>, LI Yong<sup>1</sup>, DENG Jing<sup>1</sup>, PIAO Chunmei<sup>2</sup>, JIN Ming<sup>1</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medical Sciences, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Affiliated Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the regulatory role of complement alternative pathway in mouse colorectal cancer (CRC) liver metastasis model based on bioinformatics methods, and to clarify its mechanism through experimental verification. **Methods:** Using “CRC liver metastasis” as the keyword, the GSE81558 dataset was retrieved from Gene Expression Omnibus (GEO) database, including normal colon tissue samples, CRC tissue samples and CRC liver metastasis tissue samples. Bioinformatics methods were used to analyze and screen differentially expressed genes (DEGs). Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using R and Cytoscape software, and the results were visualized. Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) database was used to evaluate protein-protein interactions (PPIs) of DEGs and construct PPI network. Twelve C57BL/6 mice were injected with SL4 tumor cells into spleen, and the liver tissues were collected at 0, 7 and 14 d. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of complement pathway-related genes in liver metastatic foci. The CRC liver metastasis mouse model was used to verify the complement signaling pathway. The mice were divided into control group, factor B knockout group ( $FB^{-/-}$ ) and C4 factor knockout group ( $C4^{-/-}$ ), and there were 6 mice in each group. The liver weights of the mice were measured; HE staining was used to detect the percentage of metastatic area in liver tissue in control group and  $FB^{-/-}$  group; immunohistochemistry was used to detect macrophage infiltration in liver tissue in control group and  $FB^{-/-}$  group, and the percentage of macrophage infiltration was calculated. **Results:** The distances between normal colon tissue samples and CRC tissue samples, as well as between CRC tissue samples and CRC liver metastasis tissue samples were far, indicating significant differences between samples, allowing subsequent analysis of DEGs. A total of 1 908 DEGs were screened in the dataset comparing normal colon tissue samples and CRC tissue samples, including 771 up-regulated DEGs and 1 137 down-regulated DEGs. Twenty-three up-regulated DEGs and 100 down-regulated DEGs were identified in the dataset comparing CRC and CRC liver metastasis. The GO functional enrichment analysis results showed that compared with normal colon tissue samples, DEGs in CRC samples were mainly enriched in biological processes (BP) related to cell cycle and mitosis, including mitotic cell cycle process, cell division, response to hormone, mitotic nuclear division and response to lipid. Compared with CRC samples, the DEGs in CRC liver metastasis samples were mainly enriched in coagulation-related BP, including platelet degranulation, blood coagulation regulation, acute-phase response, hemostasis regulation

and coagulation regulation. The KEGG pathway enrichment analysis results showed that compared with normal colon tissue samples, the DEGs in CRC tissue samples were mainly enriched in cell cycle and p53 signaling pathways. Compared with CRC tissue samples, the DEGs in CRC liver metastasis tissue samples were mainly enriched in complement, coagulation cascade and metabolism-related signaling pathways. The Hub genes identified in PPI network were related to blood proteins. The RT-qPCR results showed that compared with 0 d group, the mRNA expression level of complement related genes complement 1q (C1q) in liver metastatic foci tissue samples in 7 d group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the mRNA expression levels of complement 3 (C3), complement 5 (C5), FB, and factor D (FD) were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), the mRNA expression levels of complement pathway-related genes C1q, complement 2 (C2), C3, complement fragment 3a receptor (C3aR), C5, complement fragment 5a receptor (C5aR), decay-accelerating factor (DAF), FB and FD in liver metastatic foci tissue samples in 14 d group were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with control group, the liver weight of the mice in FB<sup>-/-</sup> group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), while there was no significant difference was observed in C4<sup>-/-</sup> group ( $P > 0.05$ ). The HE staining results showed that compared with control group, the liver metastatic foci in FB<sup>-/-</sup> mice were significantly decreased, and the percentage of metastatic area was decreased ( $P < 0.01$ ). The immunohistochemistry results showed that compared with control group, the macrophage infiltration in liver metastatic foci of the mice in FB<sup>-/-</sup> group was reduced, and the percentage of macrophage infiltration was decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Complement cascade is associated with CRC liver metastasis, and the alternative complement pathway regulates CRC liver metastasis, suggesting this pathway may serve as a potential therapeutic target for CRC liver metastasis.

**KEYWORDS** Colorectal cancer; Liver metastasis; Gene Expression Omnibus database; Bioinformatics; Differentially expressed genes

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是目前最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均较高。2020年, 全球有超过180万例新确诊为CRC的患者, 其中915 880例患者死亡与CRC相关<sup>[1]</sup>。CRC肝转移是CRC不良预后的主要原因<sup>[2]</sup>。未进行手术切除的CRC肝转移患者的中位生存时间为7~15个月, 尽管化疗和靶向治疗可以延缓肿瘤转移, 但由于肿瘤耐药性, 相关治疗方法尚无法完全治愈<sup>[3-5]</sup>, 利用生物信息学方法研究CRC肝转移过程中的主要生物学过程 (biological process, BP)、分子功能和信号通路的作用, 可以为防治CRC肝转移提供新的治疗靶点<sup>[6]</sup>。肿瘤转移与免疫系统有关, 作为先天免疫的主要组成部分, 许多补体成分在癌症进展过程中在肿瘤微环境中发挥关键的调控作用<sup>[7]</sup>, 如补体C5可能参与CRC肝转移<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9]</sup>显示: 补体5a通过调节炎症细胞浸润促进CRC肝转移。相关研究主要集中于补体激活的特异性分子上, 目前对补体级联在肿瘤转移中的激活情况尚未完全阐明。因此, 本研究通过生物信息学方法分析及小鼠模型验证, 探讨补体级联的激活情况, 并阐

明补体替代途径与CRC肝转移间的关系, 为CRC的诊断和治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器** 选择8~10周龄12只野生型、6只B因子 (factor B, FB) 敲除和6只C4因子敲除的SPF级雄性C57BL/6小鼠 (FB为替代补体途径的经典组成部分, 而C4因子为经典补体途径和凝集素补体途径的组成部分), 体质量 (22±3) g, 购自北京唯尚立德生物科技有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0010, 动物使用许可证号: SYXK (京) 2021-0042, 所有实验动物操作经延边大学伦理委员会批准 (编号: 2310120), 符合动物实验3R原则。所有小鼠均饲养于标准笼子中, 恒温 (22±2) °C, 相对湿度为60%, 并人工进行12 h的光/暗循环。小鼠CRC肝转移细胞系SL4由北京安贞医院北京市心肺血管疾病研究所赠予。逆转录试剂盒 (美国Promega公司), RNA提取试剂盒2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix和Frezol试剂 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司), Mac3一抗和

ZSGB-BIO 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),抗Mac-3一抗(美国BD公司)。冷冻离心机(型号:5418,德国Eppendorf公司),实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪(型号:CFX96,美国Bio-Rad公司),显微镜(型号:Labophot 2,日本尼康公司),彩色相机(型号:CCD-IRIS/RGB,日本索尼公司)。

**1.2 生物信息学数据来源及处理** CRC转录组测序数据集GSE81558来源于基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>),其中包括23例散发性CRC组织样本、19例CRC肝转移组织样本和9例正常结肠组织样本。从GEO数据库中获得未处理的CEL文件,使用R软件(版本4.2.2)处理数据。使用RMA算法进行背景校正、归一化和聚合后,获得了探针表达式矩阵<sup>[10]</sup>。利用GPL15207注释包("hugene10st转录本 ptcluster. db")将探针id转换为国际标准基因名称。剔除缺少相应基因符号的探针id,对于有多个探针的基因,以最高值为基因表达值。获得的基因表达矩阵通过聚类 and 主成分分析(principal component analysis, PCA)进行质量控制<sup>[11]</sup>。

**1.3 差异表达基因(differential expression genes, DEGs)的筛选和整合** DEGs分析使用"limma"软件包进行处理<sup>[12]</sup>。基因表达值经 $\log_2$ 转换后,采用多阵列对数健壮算法(log scale robust multi-array analysis, RMA)进行归一化处理,并采用加权最小二乘法拟合线性模型。分析正常结肠组织样本与CRC组织样本及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本,以评估差异表达。Limma软件包计算每个基因调整后的错误发现率(false discovery rate, FDR)  $\log_2$ 倍变化率( $\log_2FC$ )和 $P$ 值。采用Benjamini-Hochberg法对 $P$ 值的FDR进行校正,以调整多次假阳性试验。根据调整后的 $P < 0.05$ 和 $|\log_2Fc| \geq 1.0$ 确定DEGs。

**1.4 基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路富集分析** 对正常结肠组织与CRC组织及CRC组织与CRC肝转移组织用"clusterProfiler"程序进行GO功能富集分析<sup>[13]</sup>。将DEGs导入DAVID数据库(<https://david.ncicrf.gov/>)后,

获得了DEGs最显著的KEGG信号通路<sup>[14]</sup>。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用R软件(4.2.2版)和Cytoscape软件(3.8.2版)实现分析结果的可视化。

#### 1.5 蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建和枢纽基因的识别

利用检索相互作用基因/蛋白质(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, STRING)数据库(<http://string-db.org>)构建DEGs的PPI网络。利用Cytoscape软件绘制PPI网络图,MCODE插件确定PPI网络中的重要模块,Hubba插件筛选重要通路中的关键基因,根据自由度(degree)排名选取前10位的节点作为枢纽基因(Hub基因)。

**1.6 小鼠CRC肝转移模型的制备** C57BL/6野生型小鼠CRC肝转移模型:采用崔巍等<sup>[15]</sup>的方法构建小鼠CRC肝转移模型。将12只C57BL/6野生型小鼠随机分为0、7和14 d组,每组4只。小鼠腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} 1\%$ 戊巴比妥钠麻醉后,固定呈俯卧位,于背侧中部、左侧腋中线与腋后线间,取5 mm切口进腹,显露脾脏,并拉出切口外,将 $100 \mu\text{L}$  DMEM/F12培养基中的 $5 \times 10^5$ 个SL4细胞注入脾脏。查看无出血,将脾脏放回原位,缝合腹壁。术后给予普通饲料喂养,自由饮水,第14天剖腹检查脾脏及肝脏均有肿块,可见肿瘤组织包裹整个肝脏,提示造模成功,肝转移成功率达到100%。分别于0、7和14 d后采集小鼠肝组织,采用RT-qPCR法检测各组小鼠肝转移灶中补体通路相关基因表达水平。

**FB敲除小鼠CRC肝转移模型:**实验分为对照组和FB敲除组( $\text{FB}^{-/-}$ 组),对照组为6只C57BL/6野生型小鼠, $\text{FB}^{-/-}$ 组为6只FB敲除小鼠,具体操作同上,接种后第14天处死小鼠,取肝脏,称质量并观察肿瘤转移情况。

**补体因子C4敲除小鼠CRC肝转移模型:**实验分为对照组和C4因子敲除组( $\text{C4}^{-/-}$ 组),对照组为6只C57BL/6野生型小鼠, $\text{C4}^{-/-}$ 组为6只C4因子敲除小鼠,其他操作同上。

**1.7 RT-qPCR法检测各组小鼠CRC肝转移组织样本中补体替代途径相关基因表达水平** 采用FreZOL试剂提取脾脏注射SL4细胞诱导CRC肝转移模型的小鼠肝组织总RNA。采用FastKing gDNA处理RT SuperMix法合成cDNA。采用 $2 \times$

Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix, 按照说明书进行操作。以GADPH为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算细胞中补体1q (complement 1q, C1q)、补体2 (complement 2, C2)、补体3 (complement 3, C3)、补体片段3a受体 (complement fragment 3a

receptor, C3aR)、补体5 (complement 5, C5)、补体片段5a受体 (complement fragment 5a receptor, C5aR)、衰变加速因子 (decay-accelerating factor, DAF) 和D因子 (factor D, FD) mRNA表达水平。特异性引物集序列见表1。

表1 引物序列  
Tab. 1 Sequences of primers

Primer	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
C1q	GAAGGGCGTGAAAGGCAATC	CAAGCGTCATTGGGTTCTGC
C2	AGAGTGCCGAACATCATGGTG	GGCTGAGAGGCCAAAGGTGAT
C3	ATAAAGAGCCAGCGGCTACA	GAATGAAGGGGTAAAGGGGCA
C3aR	CCCCAAGACATTGCCTCCAT	GACTGTGTTTCACGGTCGTCT
C5	TGGTTCCTTCAGCACGACTC	CAGACTGCGTCAGCCACTAA
C5aR	TCCTTCAGAAGAGTTGCTGCTG	TTCTGTGGTAACCAGCGACG
DAF	GCTCAATTAAGTGGGCTCAA	ACAGAGACAGCGACAGCAAC
FB	ATGGGGACAAGAAAGCCAGTT	TAGCCTTGGGCCTTTGTAGC
FD	TCGAAGGTGTGGTTACGTGG	TCGATCCACATCCGGTAGGA
GADPH	AATGCATCCTGCACCACC	ATGCCAGTGAGCTTCCCG

1.8 HE染色观察2组小鼠CRC肝转移灶形态表现并计算肝转移灶面积百分率 取对照组和FB<sup>-/-</sup>组小鼠肝脏组织石蜡包埋处理后切片, 按照说明书进行HE染色, 显微镜观察并拍照, 采用Image J软件分析图像。细胞核深染的部位为肝转移灶, 计算肝转移灶面积百分率。肝转移灶面积百分率=细胞核深染面积/肝脏面积×100%。

1.9 免疫组织化学染色法观察2组小鼠CRC肝转移灶中巨噬细胞浸润情况 取对照组和FB<sup>-/-</sup>组小鼠肝组织切片、脱水, 与抗Mac3一抗于4℃孵育过夜, 第2天取出后按照ZSGB-BIO试剂盒说明书进行操作, 显微镜观察并拍照, 采用Image J软件进行定量分析, 计算巨噬细胞浸润百分率。Mac3为巨噬细胞的标志物; Mac3表达阳性细胞呈棕色, 为巨噬细胞<sup>[16]</sup>。巨噬细胞浸润百分率=巨噬细胞数/各类细胞总数×100%。

1.10 统计学分析 采用GraphPad Prism 9统计软件进行统计学分析。各组小鼠补体途径相关基因表达水平、肝脏质量、肝转移灶面积百分率和巨噬细胞浸润百分率均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD-t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

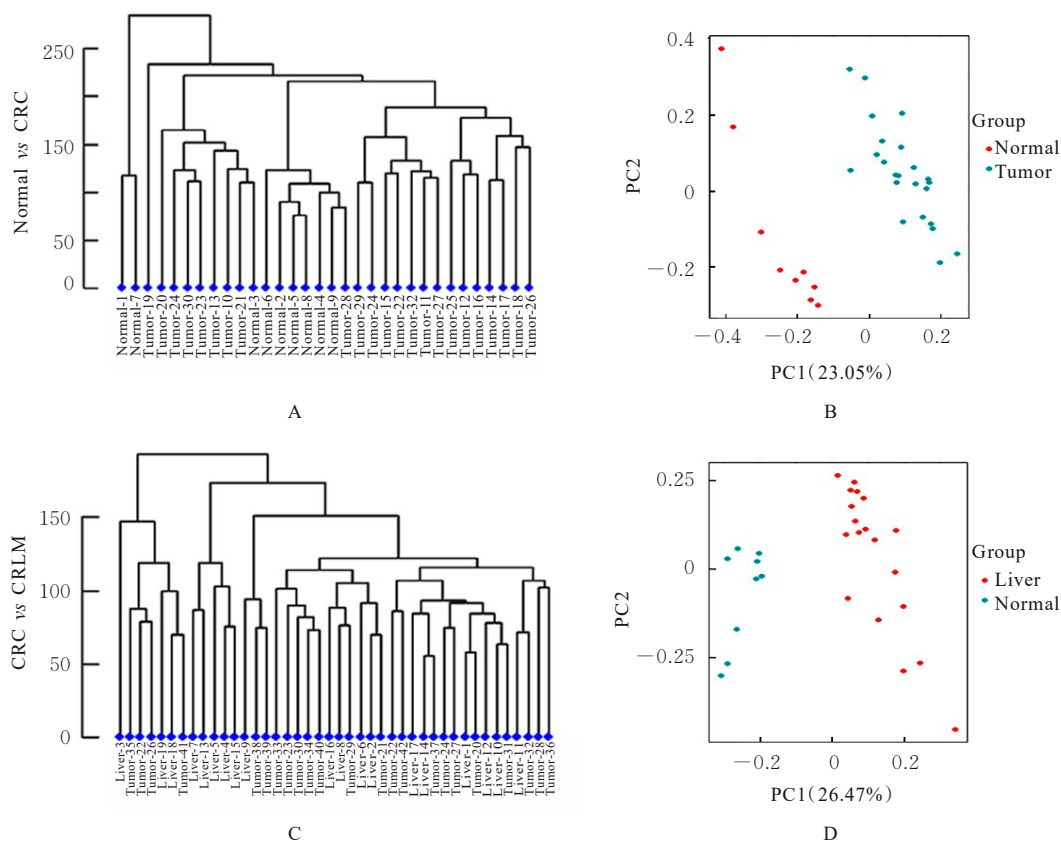
## 2 结果

2.1 转录组数据分析 通过处理GSE81558数据集识别CRC组织样本与CRC肝转移组织样本相关的DEGs。聚类分析和PCA分析结果显示: 正常结肠组织样本与CRC组织样本以及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本间距离较远, 提示样本之间差异性较大, 可以对DEGs进行后续分析。见图1。

2.2 CRC肝转移肿瘤中的DEGs 在正常结肠组织样本与CRC组织样本数据集中, 共筛选出1908个DEGs, 其中771个DEGs上调, 1137个DEGs下调。在CRC组织样本与CRC肝转移组织样本数据集中共发现23个上调的DEGs及100个下调的DEGs (图2)。其中前100个基因的热图见图3。

2.3 DEGs的GO功能富集分析 与正常结肠组织比较, CRC组织样本的DEGs主要集中于有丝分裂细胞周期过程、细胞分裂、对激素的反应、有丝分裂核分裂和对脂质的反应等BP。与CRC组织样本比较, CRC肝转移组织样本的DEGs主要富集于凝血反应过程中, 如血小板脱颗粒、凝血调节、急性期反应、止血调节和凝血调节等BP。见图4。

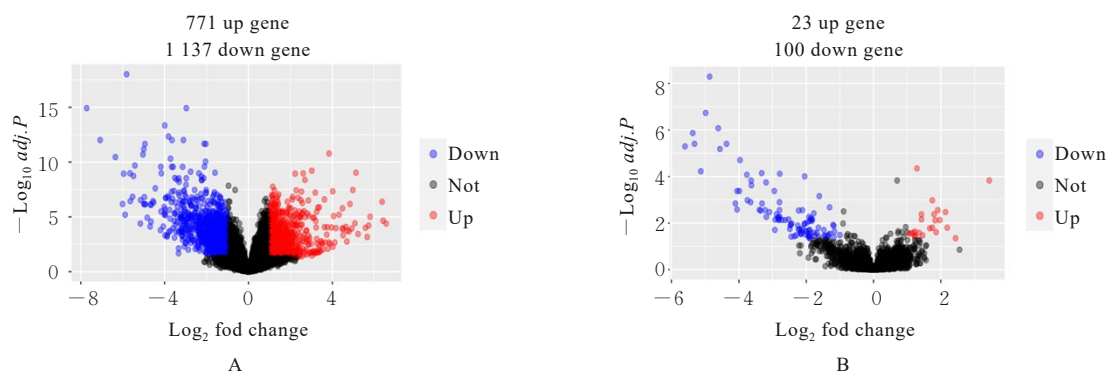
2.4 DEGs的KEGG信号通路富集分析 与正常结肠组织样本比较, CRC组织样本的DEGs主要富集的信号通路为细胞周期和P53信号通路。与



A, C: Cluster analysis; B, D: PCA analysis; A—B: Normal colon tissue samples and CRC tissue samples; C—D: CRC tissue samples and CRC liver metastases.

图1 正常结肠组织样本与CRC组织样本及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本聚类分析和PCA分析

Fig. 1 Cluster analysis and PCA analysis on normal colon tissue samples and CRC tissue samples and CRC tissue samples and CRC liver metastasis tissue samples



Red dots represented genes with adjusted  $P < 0.05$  and  $\log_2 FC \geq 1$  (upregulated); blue dots represented genes with adjusted  $P < 0.05$  and  $\log_2 FC \leq -1$  (downregulated); black dots represented genes with no significant difference. A: normal colon tissue samples and CRC samples; B: CRC samples and CRC liver metastases.

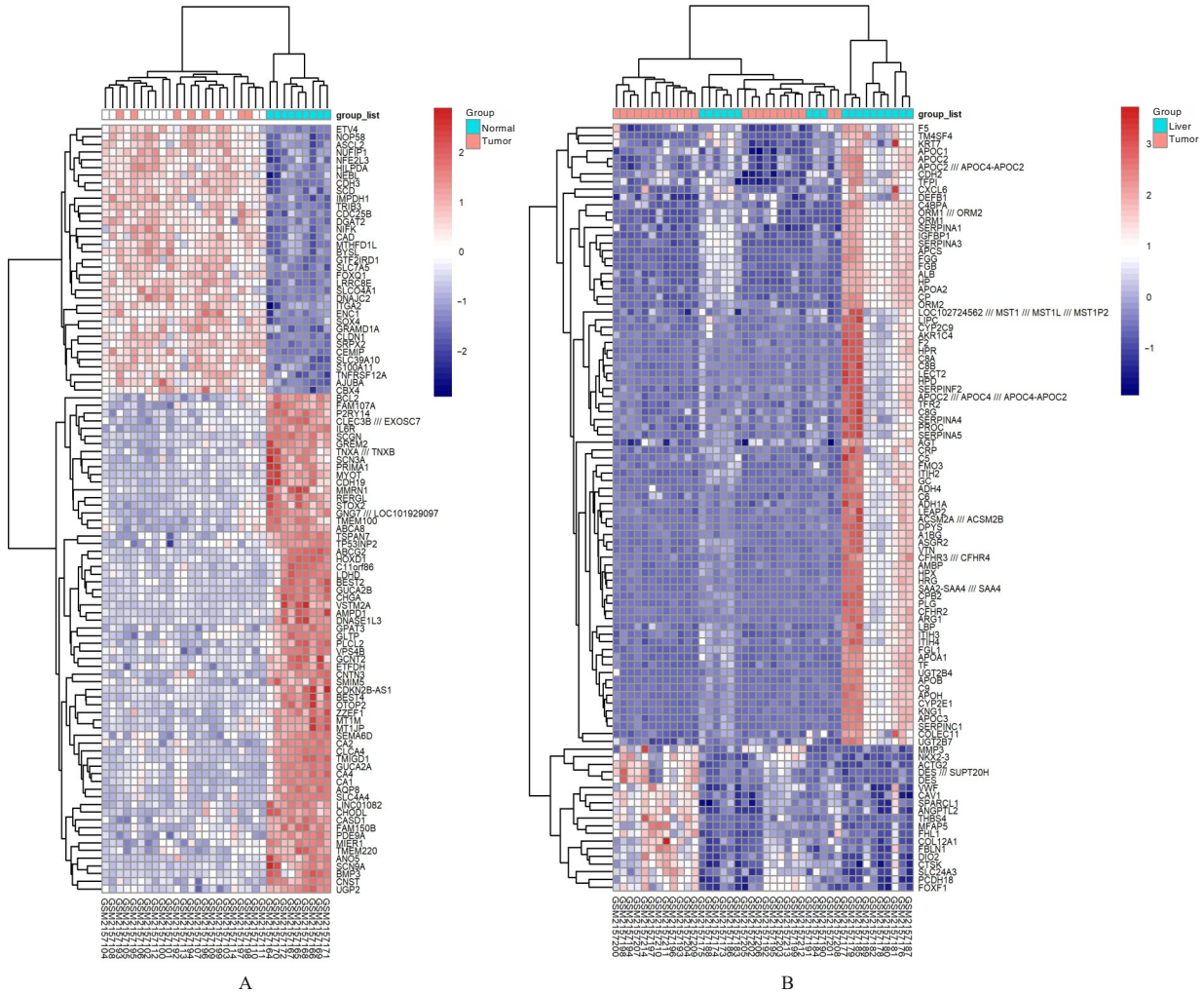
图2 正常结肠组织样本与CRC组织样本及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本火山图

Fig. 2 Volcanic maps of normal colon tissue samples and CRC tissue samples and CRC tissue samples and CRC liver metastasis tissue samples

CRC组织样本比较, CRC肝转移组织样本的DEGs主要富集于与补体、凝血级联和代谢相关的信号通路。2个数据集中富集的信号通路不同,提

示炎症补体仅在CRC肝转移组织样本中起关键作用。见图5。

## 2.5 特异性PPI网络分析和Hub基因的鉴定 PPI



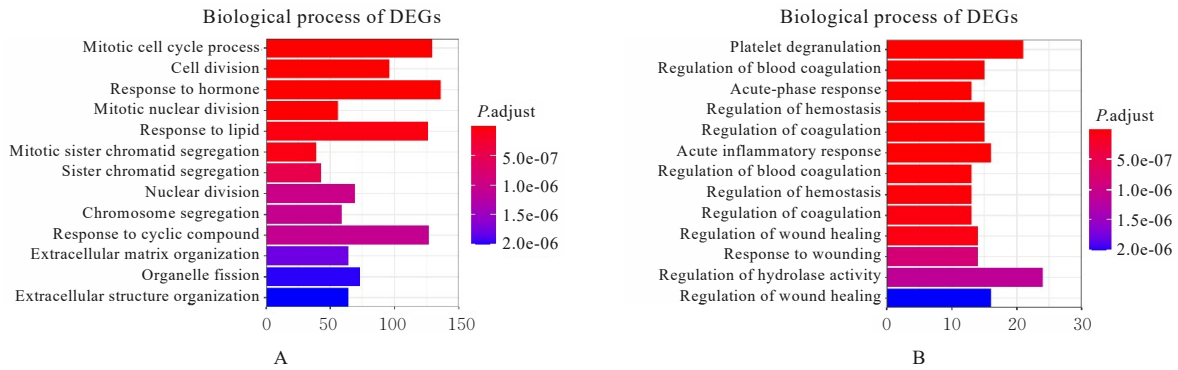
Red indicated upregulated gene expression; blue indicated downregulated gene expression, and white indicated no significant change in gene expression. A: normal colon tissue samples and CRC samples; B: CRC samples and CRC liver metastases.

图3 正常结肠组织样本与CRC组织样本及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本DEGs热图

Fig. 3 DEGs heat maps of normal colon tissue samples and CRC tissue samples and CRC tissue samples and CRC liver metastasis liver tissue samples

网络结果显示：与正常结肠组织样本比较，CRC组织样本的DEGs中排名前10位Hub基因分别为细胞周期蛋白依赖性激酶1（cyclin-dependent kinase 1, CDK1）、细胞周期蛋白A2（cyclin A2, CCNA2）、细胞周期蛋白B1（cyclin B1, CCNB1）、细胞分裂周期蛋白20（cell division cycle 20, CDC20）、有丝分裂检查点丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶BUB1 beta, BUB1B）、苯甲亚胺醇1同源物（酵母）（budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, BUB1）、Discs 大同源物关联蛋白5（Discs large homolog associated protein 5, DLGAP5）、细胞周期蛋白B2（cyclin B2,

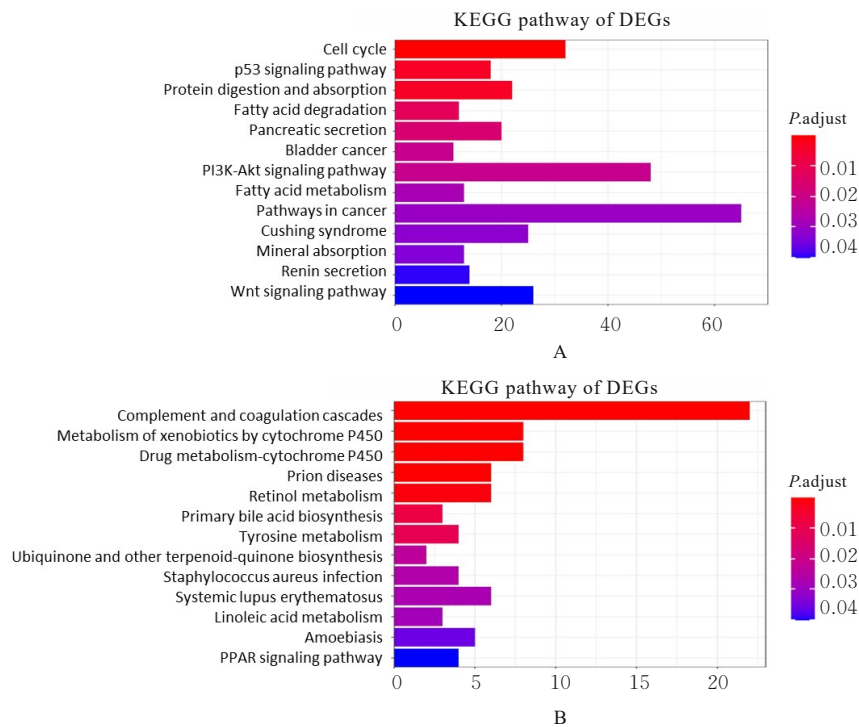
CCNB2）、驱动蛋白家族成员11（kinesin family member 11, KIF11）和驱动蛋白家族成员20A（recombinant kinesin family member 20A, KIF20A）。其中，CDK1、CCNA2、CCNB1、BUB1B、BUB1和CCNB2与细胞周期有关，DLGAP5是一种潜在的细胞周期调控因子，与细胞周期中信号通路的富集一致。与CRC组织样本比较，CRC肝转移组织样本的DEGs中前10位Hub基因为白蛋白（albumin, ALB）、纤维蛋白原γ（recombinant fibrinogen gamma, FGG）、丝氨酸蛋白酶抑制因子C1（又称抗凝血酶Ⅲ）（serine peptidase inhibitor clade C, member 1, SERPINC1）、谷胱甘肽醛酸转移酶（alpha-2-HS-glycoprotein, AHSG）、载脂



Vertical axis representd BP enrichment items of DEGs in biological processes, and horizontal axis representd number of genes enriched in each BP. A: Normal colon tissue samples and CRC samples; B: CRC samples and CRC liver metastases.

图4 正常结肠组织样本与CRC样本及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本DEGs GO功能富集图

Fig. 4 GO functional enrichment maps of DGEs of normal colon tissue samples and CRC tissue samples and CRC liver metastasis tissue samples



Vertical axis indicated pathway enrichment, and the horizontal axis indicated number of differential genes in the pathway. A: normal colon tissue samples and CRC samples; B: CRC samples and CRC liver metastases.

图5 正常结肠组织样本与CRC组织样本及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本DEGs KEGG信号通路富集图

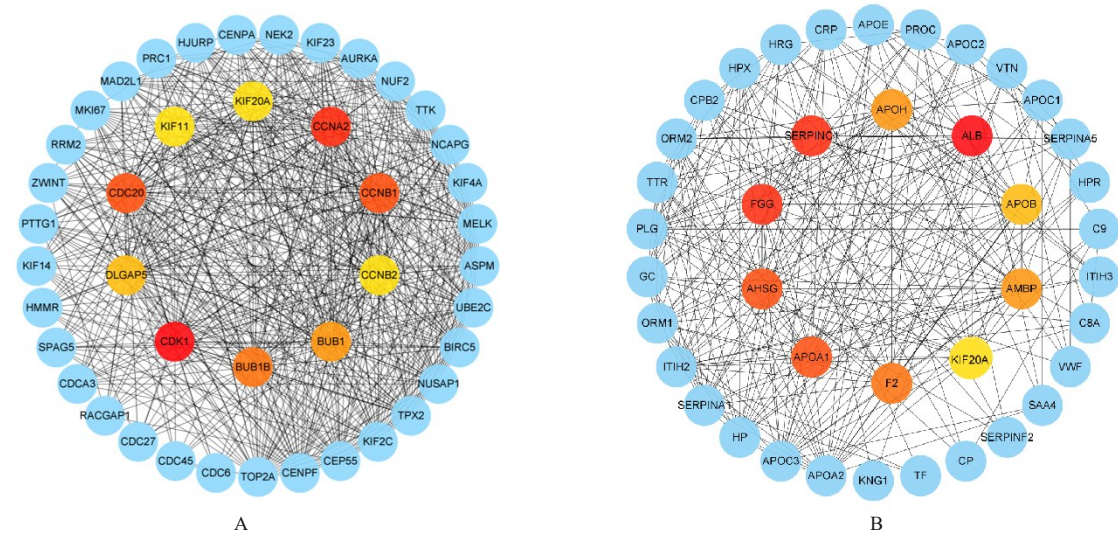
Fig. 5 KEGG enrichment map of DGEs of normal colon tissue samples and CRC tissue samples and CRC tissue samples and CRC liver metastasis tissue samples

蛋白 A1 (apolipoprotein A1, APOA1)、凝血因子 II (recombinant coagulation factor II, F2)、 $\alpha$ -1 微球蛋白 (alpha-1 microglobulin, AMBP)、载脂蛋白 H (apolipoprotein H, APOH)、载脂蛋白 B (apolipoprotein B, APOB) 和驱动蛋白家族成员 20A (kinesin family member 20A, KLF20A), 其

中大部分基因与凝血调节有关。见图6和7。

## 2.6 各组小鼠CRC肝转移组织样本中补体途径相关基因表达水平

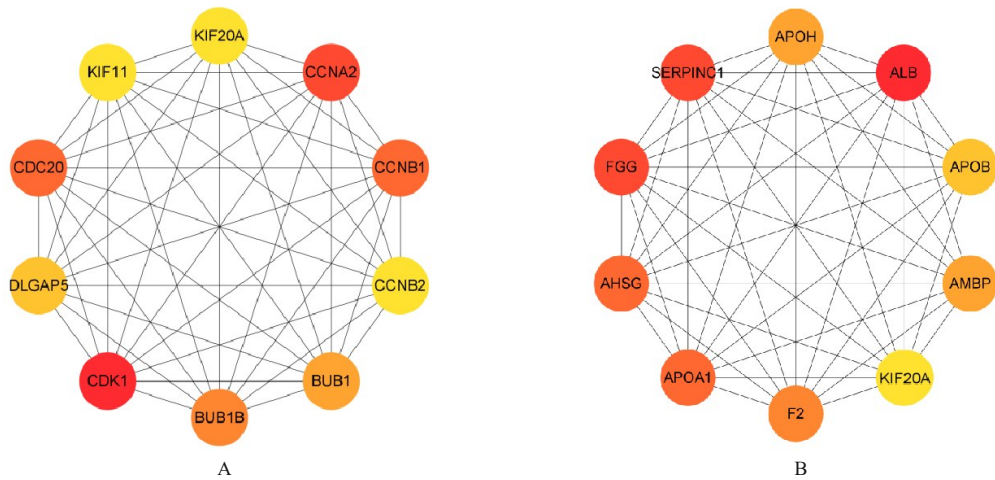
CRC肝转移组织样本数据集主要富集于补体通路, 因此对补体激活途径进行验证。RT-qPCR法检测结果显示: 与0d组比较, 7d组小鼠CRC肝转移组织样本中补体相关基因



A: Normal colon tissue sample and CRC sample; B: CRC samples and CRC liver metastases.

图6 正常结肠组织样本与CRC组织样本及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本DGEs PPI网络图

Fig. 6 PPI network diagrams of DGEs of normal colon tissue sample and CRC samples and CRC and CRC liver metastasis tissue samples



Level change of Hub gene from red to yellow representd degree of freedom.A: Normal colon tissue samples and CRC samples; B: CRC samples and CRC liver metastases.

图7 正常结肠组织样本与CRC组织样本及CRC组织样本与CRC肝转移组织样本排名前10位Hub基因

Fig. 7 Top 10 Hub genes of normal colon tissue samples and CRC tissue samples and CRC tissue samples and CRC liver metastasis tissue samples

C1q mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), C3、C5、FB 和 FD mRNA 表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 14 d 组小鼠 CRC 肝转移组织样本中补体通路相关基因 C1q、C2、C3、C3aR、C5、C5aR、DAF、FB 和 FD mRNA 表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 8。

**2.7 各组小鼠肝脏质量** 与对照组比较,  $FB^{-/-}$  组小鼠肝脏质量明显降低 ( $P < 0.01$ ),  $C4^{-/-}$  组小鼠肝脏质量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 9 和

图 10。

**2.8 2 组小鼠 CRC 肝转移灶面积百分率** 与对照组 ( $68.7\% \pm 5.0\%$ ) 比较,  $FB^{-/-}$  组小鼠 CRC 肝转移灶明显减少, CRC 肝转移灶面积百分率 ( $37.4\% \pm 5.0\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图 11。

**2.9 2 组小鼠 CRC 肝转移灶中巨噬细胞浸润情况** 与对照组 ( $53.2\% \pm 3.0\%$ ) 比较,  $FB^{-/-}$  组小鼠 CRC 肝转移灶中巨噬细胞浸润减少, 巨噬细胞浸润百分率 ( $26.8\% \pm 3.0\%$ ) 明显降低 ( $P <$

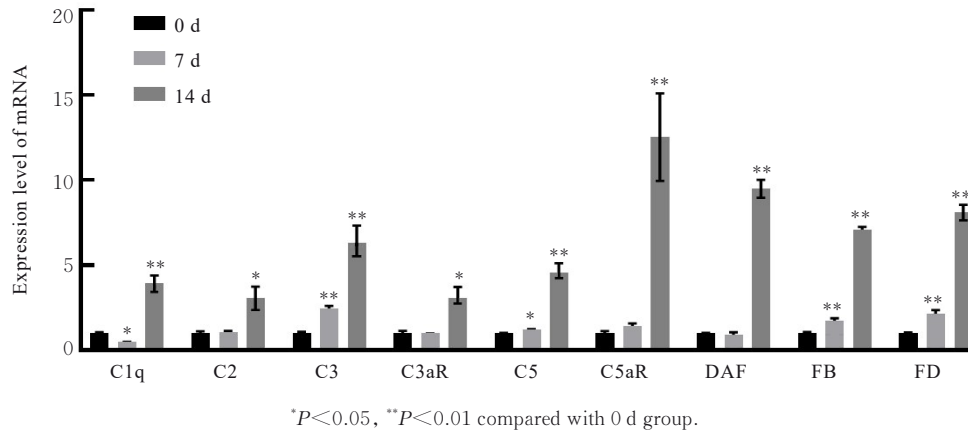
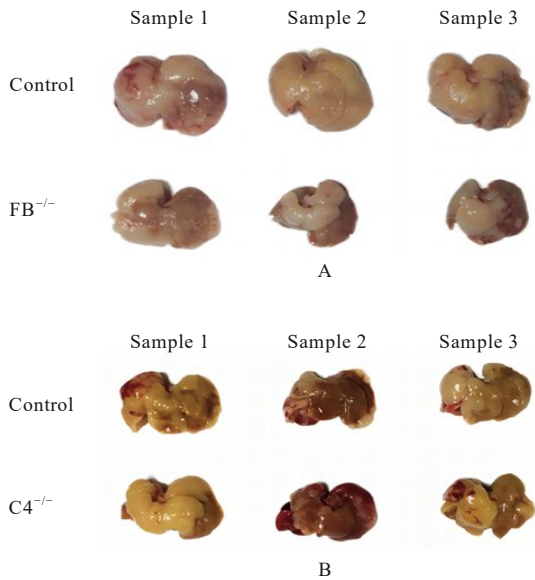


图8 RT-qPCR法检测各组小鼠CRC肝转移组织样本中补体通路相关基因表达水平

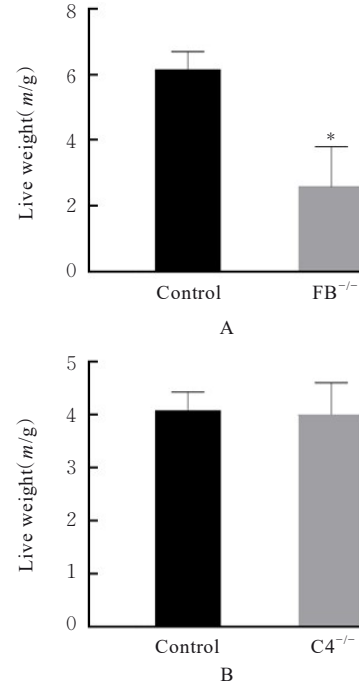
Fig. 8 Expression levels of complement pathway-related genes in CRC liver metastasis liver tissue of mice in various groups detected by RT-qPCR method



A: Control and  $FB^{-/-}$  group; B: Control and  $C4^{-/-}$  group.

图9 敲除FB和C4因子后各组小鼠肝脏大体形态表现

Fig. 9 General morphology of liver of mice after knockout of FB and C4 factors



A: Control and  $FB^{-/-}$  group; B: Control and  $C4^{-/-}$  group; \* $P < 0.01$  compared with control group.

图10 敲除FB和C4因子后各组小鼠肝脏质量

Fig. 10 Liver weights of mice after knockout of FB and C4 factors

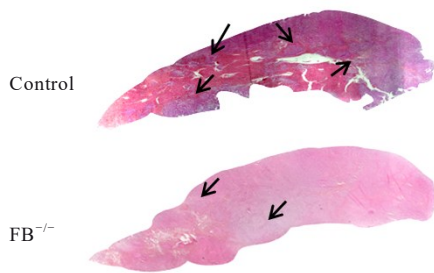
0.01)。见图12。提示补体替代途径参与小鼠CRC肝转移。

### 3 讨论

目前CRC的发病率仍在持续升高,因此确定新的治疗靶点对预防CRC肝转移、提高患者生存率和生活质量较为重要。本研究采用GEO数据库GSE81558 CRC基因芯片数据集进行生物信息学分析,探讨与CRC肝转移相关的关键信号通路和枢纽基因。

细胞周期调控紊乱是肿瘤的特征之一。HAN等<sup>[17]</sup>

发现:白桦木酚可通过诱导细胞周期阻滞、自噬和凋亡来抑制转移性结肠癌。在肿瘤细胞中,各种关键细胞周期蛋白的表达和调控异常也会导致肿瘤细胞的增殖及分裂不受控制。如在CRC中P53失活会导致细胞周期失控<sup>[18]</sup>。本研究结果显示:与正常结肠组织比较,CRC组织样本GO功能富集和KEGG信号通路富集分析结果及PPI网络图中排名



Black arrows represented liver metastasis foci in mice.

图 11 HE 染色观察敲除 FB 后 2 组小鼠 CRC 肝转移灶浸润情况

Fig. 11 Infiltration of CRC liver metastases of mice in two groups after knockout of FB observed by HE staining

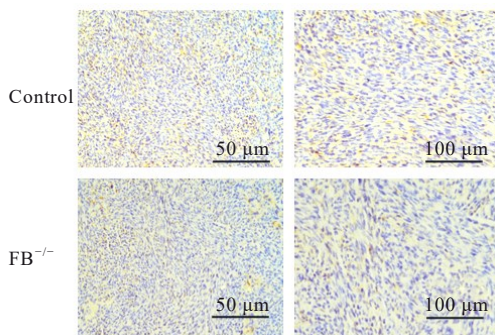


图 12 免疫组织化学染色法观察敲除 FB 后 2 组小鼠 CRC 肝转移灶中巨噬细胞浸润情况

Fig. 12 Macrophage infiltration in CRC liver metastases of mice in two groups after knockout of FB observed by immunohistochemistry staining

前 10 位的 Hub 基因均与细胞周期有关。提示 CRC 发生发展与细胞周期调控异常有关。

恶性肿瘤患者常伴有凝血功能障碍<sup>[19]</sup>。恶性肿瘤患者因癌细胞的促凝特性，凝血系统过度活跃，纤溶系统活性降低，影响了参与凝血过程的各种相关因素，最终会导致凝血异常。在此过程中，各种因子会激活相关途径导致血液达到高凝状态，使肿瘤细胞发生转移辅助相关因子逃避正常的免疫监视。如 CRC 细胞产生的肝外凝血因子 VII (extrahepatic clotting factor VII, F VII) 可通过上调基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 表达促进肿瘤的侵袭和转移<sup>[20]</sup>。本研究结果显示：与 CRC 组织样本比较，CRC 肝转移组织样本 GO 功能富集分析和 PPI 网络显示 Hub 基因均与凝血调节有关。

本研究中 KEGG 通路富集分析结果显示：补体

通路参与 CRC 转移。补体可通过 3 个典型途径激活，即经典途径、凝集素 (mannose-binding lectin, MBL) 途径和替代途径，其均有 1 个共同的末端途径<sup>[21]</sup>。经典的补体途径可以通过将特异性抗体与细胞膜表面发现的相应抗原结合，形成复合物，对肿瘤细胞发挥溶解作用<sup>[22]</sup>。MBL 途径是指由血浆中甘露聚糖结合 MBL 直接识别多种病原微生物表面的甘露糖以促进肿瘤进展<sup>[23]</sup>。经典途径与 MBL 途径均会激活 C4 因子。而替代途径或称旁路途径，其与经典途径的不同之处主要是越过 C1、C4 和 C2，直接激活补体 C3，然后完成 C5~C9 的激活过程；参与此途径的血清成分还包括 B、D、P、H 和 I 等因子。其中 FB 主要由肝细胞和巨噬细胞合成，是参与补体活化的重要成分。FB 作为替代途径的特殊蛋白参与肿瘤的发生发展<sup>[24]</sup>。路平等<sup>[25]</sup>在转移性乳腺癌模型中发现：C5aR 缺乏会导致血液和肺中调节性 T 淋巴细胞数量减少，并降低小鼠的肺转移瘤负荷。陈立颖等<sup>[26]</sup>发现：C5a/C5aR 通路能通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号途径中的 P38 信号对纤维蛋白原样蛋白 2 (fibrinogen-like protein 2, FGL2) 产生调节作用进而参与 CRC 的发病进程。本研究通过脾脏原位注射小鼠 CRC 肝转移细胞系 SL4 细胞构建了小鼠 CRC 肝转移模型，模拟了 CRC 细胞通过脾脏回流入门静脉至肝脏血行播散而发生肝转移的过程，该方法常用于 CRC 肝转移研究中。本研究结果显示：小鼠 CRC 肝转移模型中补体通路相关基因 C1q、C2、C3、C3aR、C5、C5aR、DAF、FB 和 FD mRNA 表达水平均明显升高；敲除 FB 后，小鼠 CRC 肝转移后肝脏质量明显降低；而敲除 C4 因子后，小鼠 CRC 肝转移后肝脏质量无明显变化。提示是替代途径而非经典途径或 MBL 途径影响小鼠 CRC 肝转移。

研究<sup>[27]</sup>显示：巨噬细胞作为肿瘤微环境的基本元素与肿瘤发展之间存在联系。补体系统中的 C3a 和 C5a 等成分也均被证实与肿瘤相关巨噬细胞可共同招募骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) 至肿瘤中，从而促进免疫抑制，导致细胞毒性 T 淋巴细胞的耗竭<sup>[28]</sup>。本研究结果显示：敲除 FB 会减少肝转移灶和巨噬细胞的浸润情况，提示敲除 FB 会减轻炎症反应。

综上所述，本研究采用开源数据分析 CRC 组

织样本与CRC肝转移组织样本间的DEGs,发现补体通路在CRC肝转移数据集中高度富集,并证实了补体级联的替代途径促进小鼠CRC肝转移。补体级联的替代途径可能是CRC肝转移的有效治疗靶点。

#### 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:

石长玉参与动物实验操作、论文撰写和修改,李勇和邓静参与生物信息学数据获取及分析,朴春梅参与实验设计,金明参与论文修改和审阅。

#### [参考文献]

- [1] BENSON A B, VENOOK A P, AL-HAWARY M M, et al. Colon cancer, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2021, 19(3): 329-359.
- [2] TSAI M S, SU Y H, HO M C, et al. Clinicopathological features and prognosis in resectable synchronous and metachronous colorectal liver metastasis [J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(2): 786-794.
- [3] MAURI G, BONAZZINA E, AMATU A, et al. The evolutionary landscape of treatment for *BRAF*<sup>V600E</sup> mutant metastatic colorectal cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(1): 137.
- [4] RUFFINELLI J C, SANTOS VIVAS C, SANZ-PAMPLONA R, et al. New advances in the clinical management of RAS and BRAF mutant colorectal cancer patients [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 15(1): 65-79.
- [5] LUO Q X, CHEN D K, FAN X J, et al. KRAS and PIK3CA bi-mutations predict a poor prognosis in colorectal cancer patients: a single-site report [J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(12): 100874.
- [6] WANG D W, SU F, YANG L J, et al. Bioinformatics analysis and identification of potential genes associated with pathogenesis and prognosis of gastric cancer [J]. *Curr Med Sci*, 2022, 42(2): 357-372.
- [7] TALAAT I M, ELEMAM N M, SABER-AYAD M. Complement system: an immunotherapy target in colorectal cancer [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 810993.
- [8] CHANG H L, JIN L, XIE P Y, et al. Complement C5 is a novel biomarker for liver metastasis of colorectal cancer [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2022, 13(5): 2351-2365.
- [9] PIAO C M, CAI L, QIU S L, et al. Complement 5a enhances hepatic metastases of colon cancer *via* monocyte chemoattractant protein-1-mediated inflammatory cell infiltration [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(17): 10667-10676.
- [10] IRIZARRY R A, HOBBS B, COLLIN F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data [J]. *Biostatistics*, 2003, 4(2): 249-264.
- [11] WEI R Q, ZHANG W M, LIANG Z, et al. Identification of signal pathways and hub genes of pulmonary arterial hypertension by bioinformatic analysis [J]. *Can Respir J*, 2022, 2022: 1394088.
- [12] RITCHIE M E, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [13] YOUNG A, WHITEHOUSE N, CHO J, et al. OntologyTraverser: an R package for GO analysis [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(2): 275-276.
- [14] KANEHISA M. The KEGG database [J]. *Novartis Found Symp*, 2002, 247: 91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-252.
- [15] 崔巍, 杜杰, 杨敏, 等. 小鼠结直肠癌肝转移模型的建立及其炎症微环境分析 [J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22(8): 566-572, 582.
- [16] SCHILLING J D, MACHKOVECH H M, KIM A H J, et al. Macrophages modulate cardiac function in lipotoxic cardiomyopathy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(11): H1366-H1373.
- [17] HAN Y H, MUN J G, JEON H D, et al. Betulin inhibits lung metastasis by inducing cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis of metastatic colorectal cancer cells [J]. *Nutrients*, 2019, 12(1): 66.
- [18] MAREI H E, ALTHANI A, AFIFI N, et al. p53 signaling in cancer progression and therapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 703.
- [19] ADMASU F T, DEJENIE T A, AYEHEU G W, et al. Evaluation of thromboembolic event, basic coagulation parameters, and associated factors in patients with colorectal cancer: a multicenter study [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1143122.
- [20] KROONE C, TIEKEN C, KOCATÜRK B, et al. Tumor-expressed factor VII is associated with survival and regulates tumor progression in breast cancer [J]. *Blood Adv*, 2023, 7(11): 2388-2400.
- [21] DAHA M R, SEELEN M. Novel approaches to control of the alternative complement pathway for the treatment of C3 glomerulopathies [J]. *J Am Soc Nephrol*,

- 2018, 29(8): 2032-2033.
- [22] COSS S L, ZHOU D L, CHUA G T, et al. The complement system and human autoimmune diseases[J]. *J Autoimmun*, 2023, 137: 102979.
- [23] AYKUT B, PUSHALKAR S, CHEN R N, et al. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis *via* activation of MBL[J]. *Nature*, 2019, 574(7777): 264-267.
- [24] 郭楠楠, 王兴智. 补体B因子的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2022, 45(1): 6.
- [25] 路平, 魏少忠, 梁新军. 补体系统与肿瘤免疫的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2021, 48(13): 681-685.
- [26] 陈立颖, 朱莹, 封奕, 等. 结肠癌组织中补体C5a/C5aR通路活化上调FGL2的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(6): 575-579.
- [27] WU P, SHI J Y, SUN W, et al. The prognostic value of plasma complement factor B (CFB) in thyroid carcinoma [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 12854-12866.
- [28] MANTOVANI A, ALLAVENA P, MARCHESI F, et al. Macrophages as tools and targets in cancer therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(11): 799-820.