

·结直肠癌专题·

[编者按] 南京中医药大学中医药防治肿瘤团队主要从事中医药防治肿瘤的临床与基础研究,在传承国医大师周仲瑛教授“癌毒”学术思想的基础上,创建癌毒病机理论体系,确立癌毒病机辨治方法,创新提出癌毒病机分类辨证与“抗癌解毒、扶正固本”治法,为中医药辨治恶性肿瘤提供新理论、新方法。在癌毒病机理论指导下,该团队提出结直肠癌的核心病机证为“湿热瘀毒、脾气亏虚”,结合长期临床实践,研制了防治结直肠癌的中药复方制剂—仙连解毒方,该方主要由仙鹤草、黄连、炙黄芪、莪术等组成,共奏“清热化湿、祛瘀散结、抗癌解毒、健脾益气”之功。临床研究方面,开展仙连解毒方防治结直肠癌的临床研究,研制中医药防治结直肠癌的专家共识,同时开展仙连解毒方的院内制剂申报,为临床防治结直肠癌提供有效方药。基础研究方面,以结直肠癌“湿热瘀毒证”患者为研究对象,采集临床样本,采用单细胞测序、代谢组测序、转录组测序等多组学测序技术联合生物信息学分析,探究结直肠癌核心病机证候的特异性分子标志物及分子调控网络,初步揭示结直肠癌“湿热瘀毒证”的生物学基础;设计动物、细胞实验,采用多组学测序、微流控芯片等实验技术,阐明仙连解毒方调控肿瘤微环境防治结直肠复发转移的作用机制。近年来,该团队通过转录组测序研究发现仙连解毒方对CYP2C40、Nek7、Reg3g等多种结直肠癌相关基因具有调控作用,可能通过影响细胞色素P450酶对外源性药物的代谢作用发挥抗结直肠癌功效;细胞实验结果显示,仙连解毒方可有效抑制结直肠癌细胞糖酵解中的Warburg效应,通过调控血管紧张素2表达,抑制肿瘤血管生成,维持内皮细胞稳态,还可干预缺氧状态下结直肠癌细胞增殖,表明仙连解毒方可通过影响酸性微环境、缺氧微环境等多种肿瘤微环境发挥防治结直肠癌的作用。

仙连解毒方干预“湿热瘀毒证”小鼠结直肠肿瘤的转录组学分析

陈桐庆¹, 余成涛^{1,2*}, 许惠琴^{1*}, 程海波^{1,2}, 沈卫星^{1,2}, 谭佳妮^{1,2}, 徐长亮^{1,2},
赖岳阳^{1,3}, 范旻旻^{1,2}

1. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023;
2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023;
3. 南京中医药大学医学院·整合医学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:通过转录组测序技术(RNA-seq)分析仙连解毒方干预“湿热瘀毒证”小鼠结直肠肿瘤的转录组学特征。方法:将90只C57BL/6(雄性)小鼠随机分为正常组、“湿热瘀毒证”结直肠肿瘤模型组及仙连解毒方组,每组30只。模型组和仙连解毒方组予以高脂饲料喂养,以经典氧化偶氮甲烷(AOM)/葡聚糖硫酸钠(DSS)方式构建结直肠癌模型,仙连解毒方组从造模当天开始给药($12.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),共给药112 d。末次给药结束4 h后,取各组小鼠结直肠组织,苏木素-伊红(HE)染色和亚甲基蓝染色观察小鼠结直肠的组织病理形态;提取结直肠组织总RNA,采用RNA-seq技术进行转录组学测序,进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,并筛选、验证差异基因。结果:与模型组比较,仙连解毒方可显著改善小鼠结直肠充血水肿情况,减少小鼠结直肠肿瘤数量、体积;亚甲基蓝染色结果表明仙连解毒方可以显著抑制畸形隐窝灶(ACF)的发生($P<0.01$);HE染色显示仙连解毒方可显著减轻结直肠组织的损伤、异型增生;RNA-seq测序结果显示,模型组与正常组差异表达的基因共615个,上调基因446个,下调基因169个。仙连解毒方组与模型组差异表达的基因共54个,上调基因29个,下调基因25个。RNA-seq测序分析发现仙连解毒方主要调控NIMA相关蛋白激酶7(Nek7, $P<0.01$),黏蛋白16(Muc16, $P<0.01$),SiahE3泛素蛋白连接酶家族成员3(Siah3, $P<0.01$),胰岛再生基因3g(Reg3g, $P<0.01$),RNA聚合酶2延长因子相关因子2(Eaf2, $P<0.01$),转化生长因子- α (TGF- α , $P<0.05$),分泌珠蛋白家族1A成员1(Scgb1a1, $P<0.05$),序列相似家族227成员B(Fam227B, $P<0.05$),细胞色素P450家族2亚家族c多肽40(Cyp2c40, $P<0.01$),锚蛋白重复及EF手结构域蛋白1(Ankef1, $P<$

[收稿日期] 2021-08-17

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81930117);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD);江苏省自然科学基金青年项目(BK20190236);张家港市卫健委青年科技项目(ZJGQNKJ201902)

[第一作者] 陈桐庆, 硕士, 从事中医药防治肿瘤研究, E-mail: C18861013153@163.com

[通信作者] *余成涛, 博士, 从事中医药防治肿瘤研究, E-mail: 260306@njucm.edu.cn;

*许惠琴, 博士, 教授, 从事中药药理学研究, E-mail: 300008@njucm.edu.cn

0.05)等基因的表达,并且肠上皮细胞增殖等生物过程、细胞色素P450酶对外源性药物的代谢作用,花生四烯酸代谢等信号通路被显著富集。**结论:**仙连解毒方具有干预“湿热瘀毒证”小鼠结肠肿瘤发生、发展的作用,转录组学分析提示可能与干预代谢相关通路密切相关。

[关键词] 转录组学; 仙连解毒方; 结肠肿瘤; 细胞代谢

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)08-0063-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212322

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211015.1620.006.html>

[网络出版日期] 2021-10-18 10:39

Transcriptome Analysis of Xianlian Jiedu Prescription in Intervention of Colorectal Carcinoma Due to Dampness, Heat, Stasis, and Toxin in Mice

CHEN Tong-qing¹, YU Cheng-tao^{1,2*}, XU Hui-qin^{1*}, CHENG Hai-bo^{1,2}, SHEN Wei-xing^{1,2}, TAN Jia-ni^{1,2},
XU Chang-liang^{1,2}, LAI Yue-yang^{1,3}, FAN Min-min^{1,2}

- (1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023, China;
2. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
3. School of Medicine and Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] Objective: To analyze the transcriptome characteristics of Xianlian Jiedu prescription (XLJDP) in the intervention of colorectal carcinoma by high-throughput cDNA-sequencing (RNA-seq). **Method:** Ninety male C57BL/6 mice were randomly divided into the control group, colorectal carcinoma due to dampness, heat, stasis, and toxin model group, and XLJDP group, with 30 mice in each group. Mice in the model group and XLJDP group were fed a high-fat diet and provided with azoxymethane and dextran sodium sulfate (AOM/DSS) for inducing colorectal carcinoma. Those in the XLJDP group were further treated with intragastric administration of 12.9 g·kg⁻¹ XLJDP since the day of modeling for 112 days. The colorectal tissues were collected from each group 4 h after the last drug treatment and stained with hematoxylin-eosin (HE) and methylene blue for observing the pathological changes. The total RNA was extracted from colorectal tissues for RNA-Seq-based transcriptome profiling, followed by gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis and the screening and verification of differentially expressed genes. **Result:** Compared with the model group, XLJDP significantly relieved the colorectal congestion and edema and decreased tumor number and volume in mouse colorectal tissues. The methylene blue staining results indicated that XLJDP significantly suppressed the development of aberrant crypt foci (ACF, $P<0.01$). As revealed by HE staining, XLJDP significantly alleviated the injury and dysplasia of colorectal tissues. Transcriptome analysis identified 615 differentially expressed genes (446 up-regulated and 169 down-regulated) between the model group and the blank group and 54 differentially expressed genes (29 up-regulated and 25 down-regulated) between the XLJDP group and model group. XLJDP mainly affected the expression of NIMA-related protein kinase 7 gene (Nek7, $P<0.01$), Mucin 16 (Muc16, $P<0.01$), SiahE3 ubiquitin protein ligase family member 3 (Siah3, $P<0.01$), regenerating islet-derived protein 3-gamma (Reg3g, $P<0.01$), RNA polymerase II elongation factor-associated factor 2 (Eaf2, $P<0.01$), transforming growth factor- α gene (TGF- α , $P<0.05$), secretoglobin family 1A member 1 (Scgb1a1, $P<0.05$), family with sequence similarity 227 member B (Fam227B, $P<0.05$), cytochrome P450 family 2 subfamily c polypeptide 40 (Cyp2c40, $P<0.01$), and ankyrin repeat and EF-hand domain containing protein 1 (Ankef1, $P<0.05$). Enrichment analysis showed

that intestinal epithelial cell proliferation, metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, and arachidonic acid metabolism signaling pathway were significantly enriched. **Conclusion:** XLJDP is able to interfere with colorectal tumorigenesis and development due to dampness, heat, stasis, and toxin in mice, which has been proved by transcriptome analysis to be related to the regulation of metabolism-related pathways.

[Keywords] transcriptomics; Xianlian Jiedu prescription; colorectal carcinoma; cell metabolism

根据2020年世界卫生组织发布的消息,全球结直肠癌(CRC)死亡的人数高达94万,占全球癌症总死亡人数的9.4%。2020年全球结直肠肿瘤新发病例193万人,在全球癌症发病率负担中占比10%,是最常确诊的癌症之一^[1]。在我国,结直肠癌的发病率呈明显上升的趋势,死亡率居恶性肿瘤第2位^[2]。结直肠癌早期无症状或症状不明显,大部分确诊患者已处于中晚期,复发转移是结直肠癌死亡的主要原因。目前结直肠癌的治疗主要包括手术、放化疗等多种手段,虽然可以相对控制肿瘤的复发转移,但其毒副作用导致患者的生存质量明显下降^[3]。

中医药在肿瘤的预防与治疗中具有其独特的优势。国医大师周仲瑛教授根据60余年的临床经验,提出“癌毒”学说,并创制了抗肿瘤验方-消癌解毒方。本实验室所在的名医验方研究中心长期聚焦于癌毒病机理论及消癌解毒方的研究。前期临床研究表明,消癌解毒方配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤,可以减轻化疗不良反应,抑制复发转移^[4]。实验研究发现消癌解毒方具有抑制结肠癌CT26细胞荷瘤小鼠肿瘤增殖的作用,其作用机制与抑制肿瘤细胞增殖、促进结肠癌细胞凋亡^[5-6],减少血清中血管内皮生长因子(VEGF)含量^[7],同时减少外周血及脾脏内Treg细胞的分布有关^[8]。本团队在传承国医大师周仲瑛“癌毒”学说的基础上,进一步凝练提升,创建了具有中医理论特色、反映中医辨证优势、符合原始创新特质的癌毒病机理论体系。仙连解毒方是岐黄学者程海波教授基于癌毒病机理论指导下的临床经验方,是在“清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气”治法指导下形成的有效验方,主要由仙鹤草、黄连、炙黄芪、生薏苡仁等药物组成,用来治疗大肠癌湿热瘀毒证。转录组学测序能够从整体水平上探索细胞中全部的基因的表达水平,通过不同组间的差异性基因比较分析,筛选出药物的主要靶点。本文基于转录组学测序技术,分析仙连解毒方干预“湿热瘀毒证”小鼠结直肠癌模型的转录组学特征。

1 材料

1.1 动物 雄性C57BL/6小鼠,6~8周龄,体质量18~22 g,共90只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号SCXK(京)2016-0006。饲养环境温度(22~26)°C,自由进食进水,空气相对湿度控制在40%~60%,采用12 h光照/12 h黑夜模拟标准昼夜系统。实验中所有操作均通过南京中医药大学实验动物中心伦理审查,批准号为201911A027。

1.2 药物与试剂 仙连解毒方主要由仙鹤草、黄连、炙黄芪、生薏苡仁等药物组成,方中所需饮片均来自江苏省中医院,经南京中医药大学邹立思教授鉴定均为正品。高脂饲料(配方号D12451,购自江苏省协同江苏省协同医药生物工程有限责任公司),偶氮甲烷(AOM,上海Aladdin公司,批号A2107153),葡聚糖硫酸钠(DSS,美国Mpbio公司,批号SR01606),TRIzol(美国Ambion公司,批号2657303),三氯甲烷(上海凌峰化学试剂有限公司,批号20161025),RNA later(美国Invitrogen公司,批号00833282),异丙醇(上海久亿化学试剂有限公司,批号20200312),RNA逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,批号分别为A3A0289、A3A0690),无毒环保苏木素-伊红(HE)染液(南京建成科技有限公司,批号20190404)。

1.3 仪器 NanoPhotometer[®]型分光光度计(德国Implen公司),Qubit[®] 2.0型RNA荧光仪(美国Life Technologies公司),2100型生物分析仪(美国Agilent公司),HiSeq 2000基因分析系统(美国Illumina公司),CFX96型Real-time PCR仪(美国Bio Rad公司),JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司),RM2016型石蜡切片机(上海徕卡仪器有限公司),Ti-SR型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 仙连解毒方的制备^[9] 将药材置于清水中浸泡2 h,加水煎煮2次。第1次加入10倍量的水煎煮2 h,第2次加入8倍量的水煎煮2 h,收集合并2次滤液,浓缩至生药量为1.2 g·mL⁻¹,加入60%乙醇醇沉

1 h后进行抽滤。低温减压浓缩至 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存待用。参考仙连解毒方前期临床实验研究所得的安全有效剂量,按照人与小鼠给药等效剂量比值得出给药量为 $12.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.2 动物模型的制备、分组与给药 小鼠适应性喂养1周,随机分为正常组、模型组、仙连解毒方组,每组30只。以AOM/DSS经典造模方法结合高脂饲料及条件培养箱建立小鼠湿热瘀毒证结肠直肠癌模型,AOM以及DSS的药物剂量参照相关文献^[10-12],具体方法:模型组和仙连解毒方组小鼠腹腔注射AOM液($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),正常组小鼠腹腔注射等量生理盐水,AOM给药1周,以饮水方式给予2%DSS溶液,持续7 d,每只小鼠保证每天饮用DSS溶液5 mL,然后连续正常饮水14 d。以上给予DSS的步骤为1个循环,共进行3个循环。以结肠中下段及肛门处黏膜充血水肿、出现多个隆起赘生物为造模成功标准。模型组和仙连解毒方组每天给予高脂饲料喂养,DSS饮水期间同时将小鼠置于造模箱($33\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $(93\pm 2)\%$,持续8 h,连续7 d。每日观察小鼠的活动状态,饮食量,便血情况等。DSS饮水后,仙连解毒方组开始给予药物灌胃干预($12.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),正常组及模型组给予等体积的生理盐水,每天1次,每连续灌胃6 d后停1 d。

2.3 HE染色 给药结束后,小鼠麻醉脱颈椎处死。解剖取出小鼠结肠,4%多聚甲醛固定。用梯度乙醇逐步脱去组织中的水分,二甲苯透明组织后用石蜡包埋。石蜡切片, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱过夜烤片,苏木素染细胞核,伊红染细胞质,中性树胶封片,光学显微镜下进行观察。

2.4 畸形隐窝灶(ACF) 取出小鼠结肠,排去粪便,纵向剖开,平铺于塑料板上,用预冷的生理盐水冲洗干净。4%多聚甲醛固定4~6 h,然后用0.2%亚甲基蓝浸泡30 s,40倍光学显微镜下计数ACF的个数。ACF判定的标准:肉眼可见黏膜增厚,但无明显隆起和息肉形成。

2.5 RNA-seq转录组学测序分析 小鼠麻醉后脱颈椎处死,解剖取出小鼠结肠。去除粪便,取靠近肛门处2~3 cm结肠,用RNA later保存,委托北京诺禾致源生物科技有限公司进行RNA提取和RNA-seq测序。RNA提取:取小鼠结肠组织,液氮研磨,加入TRIzol 1 mL提取总RNA。建库测序流程,①样品检测:琼脂糖凝胶电泳,分析样品RNA完整性及是否存在DNA污染;分光光度计进行初步定量,检测RNA浓度及纯度(吸光度 A_{260}/A_{280} 及 $A_{260}/$

A_{230}); Agilent 2100 bioanalyzer:精确检测RNA完整性。②文库构建:北京诺禾致源公司采用去除核糖体RNA的方法构建链特异性文库^[13]。从总RNA中去除核糖体RNA,随后将RNA打断成250~300 bp的短片段,以片段化的RNA为模板,随机寡核苷酸为引物合成cDNA第一条链,随后用RNase H降解RNA链,并在DNA polymerase I体系下,以dNTPs为原料合成cDNA第二条链。纯化后的双链cDNA经过末端修复,加A尾并连接测序接头,用AMPure XP beads筛选350~400 bp的cDNA。使用USER酶降解含U的cDNA第二链,最后进行PCR扩增并获得文库。③库检:先用Qubit初步定量,稀释文库至 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;再用Agilent 2100 bioanalyzer检测对文库的插入片段长度(insert size)进行检测,insert size分布在250~300 bp符合预期。Insert size符合预期后,使用Real-time PCR对文库的有效浓度进行准确定量,文库的有效浓度为 $>2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,保证了样本文库的质量。④库检合格后,根据文库的有效浓度及数据产出需求pooling后进行Illumina PE150测序。

2.6 基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 对转录组学测序所得的原始数据进行过滤筛选,设定阈值为显著性水平 $P<0.05$ 和差异倍数fold change ≥ 2 ,对9个样品中的mRNA进行差异基因的筛选。通过GO和KEGG对差异表达基因进行富集分析。

2.7 Real-time PCR验证 取出小鼠结肠,液氮速冻,然后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。取靠近肛门处小鼠结肠组织1~2 cm,液氮研磨。加入TRIzol 1 mL取总RNA,根据反转录试剂盒进行反转录获取cDNA,用PCR验证筛选出的差异表达基因。反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$,5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,30 s,40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析mRNA表达水平。引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成,见表1。

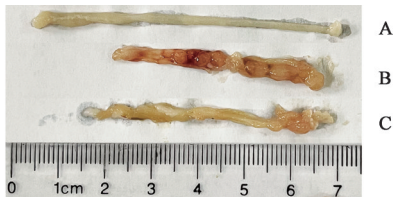
3 结果

3.1 仙连解毒方对“湿热瘀毒证”小鼠结肠形态及其组织病理学的影响 小鼠结肠形态学观察结果显示,正常组结肠长度最长,质地柔软,肠黏膜光滑,无充血水肿,无明显增生。模型组小鼠结肠长度明显最短,肠管柔韧性降低,肠黏膜表面粗糙,充血水肿明显,局部可见出血点,结肠中下段及近肛门处黏膜可见多个隆起赘生物。仙连解毒方组与模型组比较发现,充血水肿情况明显减轻,瘤体数量明显减少。见图1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)	上游 CTCCTGCACCACCAACTGCT	123
	下游 GGGCCATCCACAGTCTTCTG	
NIMA 相关蛋白激酶7(Nek7)	上游 TGTGCCTGTGAATGTCGATATTGT	124
	下游 CGGGAATGCTGCTCTTGAA	
黏蛋白16(Muc16)	上游 GTCAGCCAGATACTCAAGCAACA	82
	下游 GGTGAAGTGGAGGTAGGTAGAACT	
SiahE3 泛素蛋白连接酶家族成员3(Siah3)	上游 GCAGAGCAAGGTAGCTTCCAC	153
	下游 CGGGCATATACAGGGTGTCCAC	
胰岛再生基因3g(Reg3g)	上游 AGCTTCCTTCTGTCTCCAT	116
	下游 TCCACTCCCATCCACCTCTG	
RNA 聚合酶2 延长因子相关因子2(Eaf2)	上游 ACTCCTCGAACCTGTGTGTCT	82
	下游 CCTGGCAATGGCTTCATCA	
转化生长因子- α (TGF- α)	上游 GCAGCAGCCAGTACCATCC	119
	下游 GTCTCAACCTAGTCTCAGCCTCT	
分泌珠蛋白家族1A成员1(Scgb1a1)	上游 TCCCACAAGAGACCAGGATAAACA	156
	下游 CGAGGAGCCGAGGAGACA	
序列相似家族227成员B(Fam227B)	上游 AGGTATTCCGTCACTCACAATCC	92
	下游 TGATGATGTCGCAGTATGTTGGA	
细胞色素P450家族2亚家族c多肽40(Cyp2c40)	上游 CCAAGGGAACACAGGTAATGACAT	145
	下游 GCTGAGAAAGGCACGAAGTAGT	
锚蛋白重复及EF手结构域蛋白1(Ankfl1)	上游 CCCACTAAGCGGCACTATCG	137
	下游 GTCAGGCACATATCCTTCACATCA	



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 仙连解毒方组(图2同)

图1 仙连解毒方对小鼠结直肠形态的影响

Fig. 1 Effect of Xianlian Jiedu prescription (XLJDP) on colorectal morphology in cancer model

ACF是在结直肠肿瘤的发生发展过程中能观察到的早期病变。小鼠结直肠亚甲基蓝染色结果显示,与正常组比较,模型组ACF的个数显著增加($P<0.01$),给予仙连解毒方后,ACF数量显著降低($P<0.01$)。见表2。

HE染色结果显示,正常组小鼠结肠腺体排列规则,细胞核位于基底部,呈扁平或立方状,间质少量淋巴细胞浸润。模型组上皮细胞极性消失、互相融合,呈现巢状、筛孔状,中央见坏死,上皮黏液层消失,细胞核质比增大,核染色深,核仁明显,核分

表2 仙连解毒方对小鼠结直肠组织ACF数量的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of XLJDP on numbers of ACF in colorectal tissue of mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	ACF/个
正常组		0.00 \pm 0.00
模型组		14.57 \pm 1.84 ¹⁾
仙连解毒方组	12.9	5.57 \pm 1.50 ²⁾

注:正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$

裂现象易见。与模型组比较,仙连解毒方组上述情况得到明显改善。见图2。

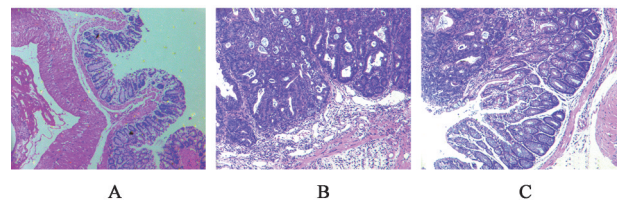


图2 仙连解毒方对“湿热瘀毒证”小鼠病理组织学的影响(HE, $\times 40$)

Fig. 2 Effect of XLJDP on histopathology in dampness, heat, stasis syndrome colorectal cancer model (HE, $\times 40$)

3.2 碱基质量分析 由 cDNA 文库测序数据结果显示,9 个结直肠样本的 reads 差异较小,质量值≥20

(Q20)和质量值≥30(Q30)均在 96% 以上,见表 3。说明碱基质量较好,可以用于后续分析。

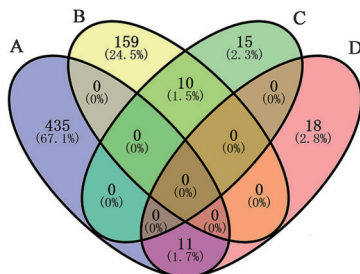
表 3 各样本 cDNA 文库测序数据

Table 3 Sequencing data of each sample cDNA library

样品名称	Reads 数	碱基数	错误率/%	Q20 占比/%	Q30 占比/%	GC 占比/%
正常组 1	14309879	0.715G	0.01	99.23	97.25	49.98
正常组 2	11883425	0.594G	0.01	99.23	97.30	49.58
正常组 3	13956610	0.698G	0.01	99.12	96.87	50.27
模型组 1	15881460	0.794G	0.01	99.13	96.83	50.93
模型组 2	14062369	0.703G	0.01	99.20	97.28	49.06
模型组 3	10610928	0.531G	0.01	98.93	96.84	49.61
仙连解毒方组 1	14068426	0.703G	0.01	99.27	97.31	48.82
仙连解毒方组 2	13311341	0.666G	0.01	99.27	97.11	48.95
仙连解毒方组 3	13216456	0.661G	0.01	99.26	97.42	49.20

3.3 仙连解毒方组与模型组差异表达基因的比较 RNA-seq 测序结果表明,模型组与正常组比较,筛选出的显著性差异基因共有 615 个,其中上调基因 446 个,下调基因 169 个。仙连解毒方组与模型组比较,筛选出的显著性差异基因共有 54 个,其中上调基因 25 个,下调基因 29 个,差异基因火山图见增强出版材料。

3.4 仙连解毒方对“湿热瘀毒证”模型小鼠靶基因的筛选 为了准确筛选出仙连解毒方对“湿热瘀毒证”模型小鼠的靶基因。采用了韦恩图法分析差异表达的基因,见图 3。共筛选出 21 个差异表达的基因。其中,在“湿热瘀毒证”模型组中高表达,同时在仙连解毒方中低表达的基因,共 10 个基因。在“湿热瘀毒证”模型组中低表达,同时在仙连解毒方高表达的基因,共 11 个。



注:A. 与正常组比较,在模型组中上调的基因;B. 与正常组比较,在模型组中下调的基因;C. 与模型组比较,在仙连解毒方中上调的基因;D. 与模型组比较,在仙连解毒方中下调的基因

图 3 仙连解毒方靶基因韦恩

Fig. 3 Venn diagram of target genes of XLJDP

3.5 仙连解毒方组与模型组 GO 功能的比较 对模型组与正常组筛选出来的差异基因进行 GO 富集分

析,以 $P < 0.05$ 为筛选标准。GO 富集分析主要包括分子功能、生物过程和细胞组成。通过 GO 富集分析可以看出,模型组与正常组的差异基因功能主要集中在生物过程部分,具体见增强出版材料。通过 GO 富集分析可以看出,仙连解毒方组与模型组的差异基因功能主要集中在生物过程,分子功能部分具体见增强出版材料。其中,上皮细胞增殖,脂肪酶抑制剂活性富集的基因数最多。

3.6 仙连解毒方与模型组 KEGG 功能比较 KEGG 富集结果显示,模型组与正常组差异基因主要富集在 pathway in cancer, cytokine-cytokine receptor interaction 等信号通路。仙连解毒方组与模型组差异基因主要富集在 linoleic acid metabolism, metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, drug metabolism-cytochrome P450, arachidonic acid metabolism 等信号通路。KEGG 富集分析具体见增强出版材料。

3.7 仙连解毒方对湿热瘀毒结直肠肿瘤模型小鼠关键基因表达的影响 为了准确筛选出仙连解毒方的靶基因,采用了韦恩图法分析差异表达基因。筛选出在模型组中高表达,同时在仙连解毒方组中低表达的基因,共 11 个基因;筛选出在模型组中低表达,同时在仙连解毒方组中高表达的基因,共 10 个基因,见表 4。提取同批次小鼠结直肠组织 RNA,进行 PCR 验证,与正常组比较,模型组 Nek7、Muc16、Siah3、Reg3g、Eaf2、TGF- α 、Scgb1a1 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$), Fam227B、Cyp2c40、Ankef1 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,仙连解毒方组 Nek7、Muc16、Siah3、Reg3g、Eaf2、TGF- α 、Scgb1a1 mRNA 水平明显降低 ($P < 0.05$, $P <$

表4 仙连解毒方对湿热瘀毒模型小鼠差异表达基因的影响($n=3$)

Table 4 Effect of XLJDP on differential genes in Damp-heat and blood stasis model mice ($n=3$)

组别	基因标识号/ ENSMUSG	基因名称	log ₂ FC	P	组别	基因标识号/ ENSMUSG	基因名称	log ₂ FC	P
模型组与正常组比较	00000105835	Gm43552	13.182 589 44	0.000 174 621	仙连解毒方组与模型组比较	00000105835	Gm43552	-13.379 445 96	0.000102962
	00000078881	Gm14434	11.683 006 04	1.52×10 ⁻⁵		00000078881	Gm14434	-11.879 842 75	6.11×10 ⁻⁶
	00000026609	Ush2a	10.043 529 38	0.000249564		00000026609	Ush2a	-10.240 111 72	9.92×10 ⁻⁵
	00000091722	Siah3	8.153 435 641	0.000174231		00000091722	Siah3	-8.349 542 544	6.34×10 ⁻⁵
	00000030017	Reg3g	7.502 217 445	2.68×10 ⁻¹⁸		00000030017	Reg3g	-2.540 817 742	1.26×10 ⁻⁵
	00000032083	Apoa1	7.054 057 532	0.000284644		00000032083	Apoa1	-6.967 153 164	7.13×10 ⁻⁵
	00000032068	Plet1	6.478 792 265	2.34×10 ⁻²²		00000032068	Plet1	-1.781 519 9	2.33×10 ⁻⁵
	00000109564	Muc16	4.604 656 439	0.000 217 912		00000109564	Muc16	-5.073 894 931	2.08×10 ⁻⁵
	00000022838	Eaf2	2.400 585 797	5.25×10 ⁻⁵		00000022838	Eaf2	-2.863 293 907	2.51×10 ⁻⁸
	00000026393	Nek7	1.671 571 555	0.000 358 831		00000026393	Nek7	-1.659 714 81	4.80×10 ⁻⁵
	00000029999	TGF-α	1.581 870 682	0.001 113 26		00000029999	TGF-α	-2.534 255 193	1.05×10 ⁻⁹
	00000074771	Ankef1	-3.385 506 084	0.001 251 279		00000074771	Ankef1	3.447 803 177	0.000 161 931
	00000116121	Gm49486	-4.675 306 496	0.000 172 754		00000116121	Gm49486	4.675 139 939	1.42×10 ⁻⁷
	00000024653	Scgb1a1	-9.386 168 042	0.000 910 426		00000024653	Scgb1a1	10.063 942 91	1.64×10 ⁻⁷
	00000025013	Tll2	-9.609 815 336	2.05×10 ⁻⁶		00000025013	Tll2	9.002 458 1	5.78×10 ⁻⁶
	00000027209	Fam227B	-9.741 073 258	0.000 379 34		00000027209	Fam227B	10.380 503 28	3.19×10 ⁻⁷
	00000092544	Gm20422	-10.715 286 54	5.16×10 ⁻⁵		00000092544	Gm20422	10.224 696 83	7.48×10 ⁻⁵
	00000051777	Iqej	-10.912 060 33	0.001 218 935		00000051777	Iqej	11.701 862 92	1.09×10 ⁻¹³
	00000115423	AL731706.1	-10.993 379 04	1.91×10 ⁻⁵		00000115423	AL731706.1	10.739 673 66	2.48×10 ⁻⁸
	00000037196	Pacrg	-15.124 979 41	2.47×10 ⁻⁴⁰		00000037196	Pacrg	12.486 837 18	6.43×10 ⁻⁷
00000025004	Cyp2c40	-15.271 224 13	4.87×10 ⁻¹⁷	00000025004	Cyp2c40	10.096 063 6	9.46×10 ⁻⁵		

0.01), Fam227B、Cyp2c40、Ankef1 mRNA水平明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

表5 仙连解毒方对湿热瘀毒模型小鼠相关mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of XLJDP on expressed mRNA in damp-heat and blood stasis mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nek7	Muc16	Siah3	Reg3g	Eaf2
正常组		0.96±0.05	1.00±0.02	1.00±0.04	1.01±0.12	1.00±0.02
模型组		2.15±0.12 ¹⁾	3.86±0.35 ¹⁾	4.03±0.27 ¹⁾	706.42±20.40 ¹⁾	2.65±0.05 ¹⁾
仙连解毒方组	12.9	1.60±0.11 ³⁾	1.65±0.23 ³⁾	1.34±0.35 ³⁾	64.21±1.29 ³⁾	1.40±0.05 ³⁾
组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-α	Scgb1a1	Fam227B	Cyp2c40	Ankef1
正常组		1.00±0.02	1.00±0.04	1.00±0.01	1.00±0.02	1.00±0.08
模型组		1.53±0.07 ¹⁾	3.09±0.34 ¹⁾	0.21±0.03 ¹⁾	0.57±0.02 ¹⁾	0.42±0.03 ¹⁾
仙连解毒方组	12.9	1.16±0.09 ²⁾	1.52±0.08 ²⁾	0.80±0.30 ²⁾	0.81±0.01 ³⁾	0.94±0.17 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

4 讨论

结直肠肿瘤是一种常见的恶性肿瘤,国医大师周仲瑛教授的“癌毒”理论认为,结直肠肿瘤是在人体肠腑功能失常、气滞血瘀的基础上,受湿邪侵袭、饮食不节、情志不畅、正气不足等多种因素影响,致

使湿浊、瘀血相互搏结,酿生癌毒,湿毒瘀阻而形成恶性病变^[14]。癌肿阻于局部,肠腑通降失司,湿热瘀毒胶结则脾失健运,致气血生化不足、正气耗损,无力抗邪,癌毒湿邪留着肆虐,致使脏腑气血阴阳失衡^[15]。气机阻滞,津液失布,瘀血内生。癌毒与

湿、瘀之邪相互搏结,郁而化为热邪。癌毒与诸邪兼夹日久,正气亏虚,正虚邪盛,最终形成结直肠癌“湿、热、瘀、毒、虚”的病机特点。本团队在岐黄学者程海波教授带领下,传承“癌毒”学术思想,创建了癌毒病机理论体系^[16],癌毒病机理论认为,湿热瘀毒证是晚期大肠癌的主要证候。仙连解毒方是岐黄学者程海波教授临床经验方,主要由仙鹤草、黄连、炙黄芪、生薏苡仁等药物组成,仙鹤草、黄连抗癌解毒,炙黄芪健脾益气,生薏苡仁清热化湿。全方共奏“清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气”之功。

本实验研究了仙连解毒方对湿热瘀毒结直肠癌模型小鼠的作用,HE染色和亚甲基蓝染色结果显示,仙连解毒方可以显著改善湿热瘀毒结直肠癌小鼠结直肠的病理状态。本实验对正常组、模型组以及仙连解毒方组结直肠组织进行转录组测序。通过对转录组数据的深入比较分析,模型组与正常组比较,共筛选出615个显著差异基因,其中上调基因446个,下调基因169个。仙连解毒方组与模型组比较,共筛选出54个差异基因,其中上调基因25个,下调基因29个。通过对差异基因的GO富集分析和KEGG富集分析的结果显示,这些基因主要集中在亚油酸代谢、细胞色素P450对外源性药物的代谢作用、花生四烯酸代谢等相关过程。

根据全球流行病学和科学研究显示^[17-18],饮食、微生物及其代谢产物与结直肠癌的发生发展密切相关,各种食品成分通过影响结直肠微生物代谢影响结直肠健康和患癌症的风险。细胞色素P450(CYP450)是参与人类药物代谢最重要的酶之一,在结直肠上皮细胞中含量丰富,主要参与内源性物质和外源性物质的代谢。CYP450与结直肠癌的发生发展是密切相关的。相关研究表明,CYP1B1在结直肠癌患者中呈高表达,且与患者的不良预后相关^[19]。CYP2C40,一种CYP450单加氧酶,在肠道花生四烯酸的代谢中发挥重要作用。相关研究表明^[20],CYP2C40的启动子区域存在功能性过氧化物酶体增殖反应元件(PPRE),而与糖脂代谢相关的PPAR α 的激活会导致CYP2C40的表达显著增加,可以说CYP2C40可能是未来结直肠癌治疗的重要靶点。由上述转录组学测序结果表明,CYP2C40在模型组中低表达,而仙连解毒方可以逆转CYP2C40的表达,提示CYP450酶代谢通路是结直肠癌发生发展的重要信号通路,而仙连解毒方可以调整这一信号通路抑制结直肠癌的发生与发展。

炎症性肠病是导致结直肠癌的主要原因之一。通过诱变剂AOM和致炎剂DSS诱导小鼠结肠癌模型已经被广泛应用于炎症性肠病向结直肠癌转化的机制研究、预防结肠癌化学药物研究,以及肿瘤转移风险等的研究^[21]。本实验采用AOM/DSS诱导的湿热瘀毒结直肠癌原发模型,能够很好模拟肠道炎症诱发癌症的病理过程,广泛应用于肠炎相关性癌症发生发展的研究中^[22]。同时给予高脂饲料喂养能够加速结直肠癌的发生发展^[18],制作简便,重复性好。但是本实验尚有很多不足之处。其一,在动物模型的选择中,未能全面考虑到结直肠癌的转移模型,测序的结果具有一定的狭隘性。其二,本实验单一的选择了转录组学测序作为主要的研究方法,实验方法单一。后续应结合代谢组学、单细胞测序等多种测序技术,更加完整的阐述结直肠癌的发生发展过程以及仙连解毒方的潜在靶点。

综上所述,仙连解毒方能够通过影响CYP2C40、Nek7、Reg3g等基因及CYP450酶对外源性药物的代谢作用等信号通路发挥干预结直肠癌的作用。由此说明,CYP450对外源性药物的代谢作用通路的激活可能是仙连解毒方防治湿热瘀毒结直肠癌的潜在作用机制,尤其是CYP2C40这一重要靶点。但是仙连解毒方对上述基因、信号通路的影响仍需要进一步研究与验证。本研究从转录因子的角度为仙连解毒方干预湿热瘀毒结直肠癌的机制提供了线索,同时也为下一步仙连解毒方的临床应用与新药研发提供了理论指导。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] ZHANG L, CAO F, ZHANG G, et al. Trends in and predictions of colorectal cancer incidence and mortality in China from 1990 to 2025 [J]. Front Oncol, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00098.
- [3] BEETS G. Improving quality of life after treatment for rectal cancer [J]. Lancet, 2017, 390(10093): 432-434.
- [4] 周红光,陈海彬,吴勉华,等. 消癌解毒方配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志

- 志, 2010, 25(7): 1140-1143.
- [5] 石文静, 谭佳妮, 沈卫星, 等. 消癌解毒方对CT26荷瘤小鼠IL-6/STAT3信号通路的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(6): 1289-1292, 1345.
- [6] 石文静, 谭佳妮, 沈卫星, 等. 消癌解毒方含药血清对人结肠癌细胞增殖及糖酵解过程的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 120-125.
- [7] 陈海彬, 沈波, 李黎, 等. 消癌解毒方抑制肝癌H22移植瘤的生长及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 28-32.
- [8] 谭佳妮, 石文静, 沈卫星, 等. 消癌解毒方对结肠癌的抑制作用及对Treg细胞的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(5): 515-518.
- [9] 谭佳妮, 刘文豪, 沈卫星, 等. 消癌解毒方对结直肠癌细胞增殖的抑制作用及其机制研究[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(2): 311-316.
- [10] 刘宣, 季青, 柴妮, 等. 湿热因素对结肠癌血管新生与肝转移的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(6): 1934-1937.
- [11] PARANG B, BARRETT C W, WILLIAMS C S. AOM/DSS model of colitis-associated cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 297-307.
- [12] THAKER A I, SHAKER A, RAO M S, et al. Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS) [J]. *J Vis Exp*, 2012, doi: 10.3791/4100.
- [13] PARKHOMCHUK D, BORODINA T, AMSTISLAVSKIY V, et al. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(18): e123.
- [14] 程海波, 李柳, 吴勉华, 等. 癌毒病机理论辨治肠癌探讨 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2487-2488.
- [15] 查鸯岚, 程海波. 程海波运用癌毒病机理论辨治肿瘤转移经验 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(5): 381-384.
- [16] 程海波. 癌毒病机理论探讨 [J]. 中医杂志, 2014, 55(20): 1711-1714.
- [17] O'KEEFE, KEEFE S J. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(12): 691-706.
- [18] LI R, GRIMM S A, MAV D, et al. Transcriptome and DNA methylome analysis in a mouse model of diet-induced obesity predicts increased risk of colorectal cancer - ScienceDirect [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3): 624-637.
- [19] LIU X, WANG F, WU J, et al. Expression of CYP1B1 and B7-H3 significantly correlates with poor prognosis in colorectal cancer patients [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(5): 2654-2664.
- [20] ALBERT M, BENNETT A. PWE-089 The roles of CYP2C40 and CYP2C55 in preventing colon cancer [J]. *Gut*, 2012, 61(Suppl 2): A333.
- [21] DE ROBERTIS M, MASSI E, POETA M L, et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies [J]. *J Carcinog*, 2011, doi: 10.4103/1477-3163.78279.
- [22] 张华月, 李琦, 付晓伶. 结直肠相关癌前病变动物模型的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(5): 27-31, 36.

[责任编辑 张丰丰]