

# 基于 RNA-seq 技术的活血化瘀法治疗乳腺癌关键基因的筛选和验证

赵利南<sup>1</sup>, 赵益<sup>2\*</sup>, 孙有智<sup>2\*</sup>

(1. 濮阳市中医院, 河南 濮阳 457001; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**研究活血化瘀法(the medicine group of promoting blood circulation and removing stasis, PBCRS)对7,12-二甲基苯蒽[7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMBA]诱发性大鼠乳腺癌的抑制作用,及运用转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)和信号网络分析(ingenuity pathway analysis, IPA)软件筛选关键基因和验证。**方法:**将96只SD大鼠随机分为空白组,DMBA模型组,枸橼酸他莫昔芬(Tamoxifen, TAM)组(1.9 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),PBCRS高、中、低剂量组(12.96, 6.48, 3.24 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。药物干预1周后,除空白组外,采用DMBA诱导大鼠乳腺癌模型(灌服2次,间隔1周,剂量100 mg·kg<sup>-1</sup>)。给药10周后,观察大鼠荷瘤重、荷瘤体积变化,用总RNA提取试剂盒提取总RNA,从DMBA模型组和PBCRS中剂量组各取3个RNA样品进行基因检测,筛选出关键差异基因,用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)验证关键基因。**结果:**与DMBA模型组比较,PBCRS中剂量组荷瘤重和荷瘤体积均明显降低( $P < 0.05$ ),PBCRS高、低剂量组荷瘤重和荷瘤体积虽有降低,但与DMBA模型组比较差异均无统计学意义;基于RNA-seq技术及IPA分析软件筛选出果糖1,6二磷酸酶1(fructose-1,6-bisphosphatase1,FBP1),浦肯野细胞蛋白4(purkinje cell protein 4,PCP4),肌红蛋白(myoglobin,MB)3个关键基因;与DMBA模型组比较,PBCRS高、中剂量组FBP1 mRNA表达均明显升高( $P < 0.05$ ),PBCRS低剂量组FBP1 mRNA表达升高,但差异无统计学意义,PBCRS高、中、低剂量组PCP4 mRNA的表达增高,但无统计学差异,PBCRS低剂量组MB mRNA的表达虽降低,差异无统计学意义。**结论:**PBCRS可能通过干预乳腺癌组织中FBP1的表达,抑制乳腺癌的发生。

**[关键词]** 乳腺癌; RNA-seq; 活血化瘀法; 果糖1,6二磷酸酶1(FBP1); 浦肯野细胞蛋白4(PCP4); 肌红蛋白(MB)

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R278;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)04-0101-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190219

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.0726.009.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-02 11:21

## Screening and Verification of RNA-seq-based PBCRS for Treating Key Genes of Breast Cancer

ZHAO Li-nan<sup>1</sup>, ZHAO Yi<sup>2\*</sup>, SUN You-zhi<sup>2\*</sup>

(1. Chinese Medicine Hospital of Puyan, Puyang 457001, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the inhibitory effect of the medicine group of promoting blood circulation and removing stasis (PBCRS) on breast cancer induced by 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) in rats, and screen out and verify key genes based on RNA Sequencing (RNA-seq) technology and Ingenuity Pathway Analysis (IPA). **Method:** Totally 96 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into blank group, DMBA

**[收稿日期]** 20180622(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360513);江西省自然科学基金项目(20151BAB205067);江西省卫生厅项目(2012A062)

**[第一作者]** 赵利南,硕士,从事乳腺癌有效方药的防治研究, E-mail:281866537@qq.com

**[通信作者]** \*赵益,博士,副教授,从事肿瘤病因学研究, Tel:0791-87142859, E-mail:zhysyz2008@163.com;

\*孙有智,博士,副教授,从事乳腺癌中医病因病机及有效方药的防治研究, Tel:0791-87118796, E-mail:254051136@qq.com

model control group, tamoxifen (TAM) group ( $1.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), high-dose, middle-dose and low-dose PBCRS groups ( $12.96, 6.48, 3.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). One week after drug intervention, except for the blank group, the DMBA was used to induce the rat model of breast cancer (with an interval of a week, irrigation for two times at the dose of  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). After 10 weeks, the changes in tumor weight and tumor volume were observed. The total RNA was extracted by total RNA extraction kit, and three RNA samples were collected from the DMBA model control group and the middle-dose PBCRS group for genetic testing. Based on RNA-seq, key differential genes were screened out and verified by Real-time PCR. **Result:** Comparing with the DMBA model control group, the tumor volume and tumor weight in middle-dose PBCRS group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Although the tumor weight and tumor volume in high and low-dose PBCRS groups were decreased, there was no statistically significant difference. Based on RNA-seq technology and IPA analysis software, fructose-1, 6-bisphosphatase1 (FBP1), purkinje cell protein 4 (PCP4), myoglobin (MB) key genes were screened out. Compared with the DMBA model control group, the mRNA expressions of FBP1 in the high and middle-dose PBCRS groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Although the mRNA expressions of PCP4 in the high, middle and low-dose PBCRS groups were increased, there was no statistical significance. The mRNA expression of MB in the low-dose group was decreased, but there was no statistical significance. **Conclusion:** PBCRS may inhibit the occurrence of breast cancer by interfering with the expression of FBP1 in breast cancer tissue.

[**Key words**] breast cancer; RNA-seq; promoting blood circulation and removing stasis; fructose-1, 6-bisphosphatase1 (FBP1); purkinje cell protein 4 (PCP4); myoglobin (MB)

乳腺癌是发生在乳房部的恶性病理变化,最常见的恶性肿瘤之一。据全球疾病负担 2013 数据库癌症数据分析显示,全球每 18 位女性就有 1 位将是乳腺癌患者,乳腺癌的致病率位居女性所有肿瘤致病率之首<sup>[1]</sup>。中国乳腺癌发展趋势也令人担忧。有调查显示,在我国乳腺癌的发病率和死亡率每年呈逐步增长状态,尤其导致死亡的速度快<sup>[2-3]</sup>。

目前对于乳腺癌的发病机制尚未明确,现代医学对乳腺癌发病诱因主要从遗传性、内分泌等方面研究。乳腺癌遗传相关基因中抑癌基因乳腺癌 1 号基因(BRCA1)和乳腺癌 2 号基因 BRCA2 研究较多,我国乳腺癌患者 BRCA2 突变较常见,国外乳腺癌患者与之相反<sup>[4-5]</sup>。大量研究显示,初潮年龄 < 14 岁的女性易患乳腺癌<sup>[6-7]</sup>,但徐雅莉等<sup>[8]</sup>研究与之相反。目前虽有大量现代医学关于乳腺癌诱因素研究文献,但还是存在很大争议,因此无法有效预防乳腺癌发病。而中医很早就有预防疾病的文献,所以从中医角度探讨乳腺癌的发病,可能会找到有效的预防手段。

近年来,中医学在医治乳腺癌方面显示出卓越的优势,并取得了一定的成就。虽然乳腺癌的发病原因复杂多变,但中医认为瘀血为有形之邪,其会影响气血运行或者正气不足,机体无力达邪,邪毒入里,抑制气血运行,最后出现气滞血瘀,久聚成乳岩<sup>[9]</sup>。血瘀证存在于乳腺癌疾病的各个发病

阶段<sup>[10]</sup>,因此血瘀证被中医学认为是乳腺癌最为重要的发病原因。目前活血化瘀治法以提高化疗疗效,降低副作用,降低术后并发症为主。虽也有活血化瘀治法抑制肿瘤细胞生长相关研究,但主要以单味药物及其提取物为主,即丹参酮是从丹参根部得到重要有效物质,丹参酮 II<sub>A</sub> 是其中成分之一,丹参酮 II<sub>A</sub> 对很多肿瘤有阻碍作用<sup>[11]</sup>。周瑞芳<sup>[12]</sup>研究表明,丹参注射液对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖调节作用有 2 个,高剂量能促进癌细胞增殖,反之药物低剂量抑制增殖。其疗效仍存在争议,未有明确的相关分子机制研究。

RNA-seq 技术可以获得所有 RNA 丰富的准确性较高的转录本信息,随着测序技术的发展 RNA-seq 技术逐渐成熟,其被越来越多的用于肿瘤的研究。对于肿瘤的研究有助于找出具有主要调控作用的靶基因和相关通路机制,为临床预防和治疗肿瘤提供有效信息,是现在研究的热点<sup>[13]</sup>。ingenuity pathway analysis (IPA)是基于云计算的一体化生物通路分析,涵盖的数据、文献等均为生命科学领域的专家们从各大大专业的杂志与期刊中人工摘取的,每周更新,可以检索基因的最新研究信息。因此本文采用 7,12-二甲基苯蒽 (DMBA) 诱发大鼠乳腺癌模型,造模同时灌胃给予活血化瘀治法药组 (PBCRS) 进行干预,最终通过分析乳腺癌大鼠荷瘤重和荷瘤体积及基于 RNA-seq 技术和 IPA 分析软件筛选

关键基因的和验证,探讨活血化瘀法对乳腺癌防治作用及其可能机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 雌性大鼠,体质量 60~80 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2013-0004。本文所涉及的动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准,批准号 JZLLSC2017016。

**1.2 药材** PBCRS 由川芎、红花、酒丹参组成,中药饮片经江西中医药大学药学院邓可众副教授鉴定,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎,红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* 的干燥花,酒丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* 的干燥根和根茎的酒炙品。药物比例为 1:1:1,第 1 次加 10 倍水,浸泡 30 min,煎煮 2 h,第 2 次加 8 倍水,煎煮 1 h,合并 2 次滤液,浓缩至 PBCRS 高质量浓度  $1.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,分装放  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱备用(江西本草天工科技有限责任公司)。枸橼酸他莫西芬片(扬子江药业集团有限公司,批号 16041211)。

**1.3 试剂** DMBA(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 SLBM4575V),戊巴比妥钠(南昌平海生物发展有限公司,批号 922L031),RNAstore 样本保存液(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 03935/60125),Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司,批号 0000278076),PrimeScript RT reagent Kit with cDNA Eraser(日本 Takara 生物公司,批号 AK4401),FastStart Essential DNA Green Master(瑞士 Roche 公司,批号 27122300)。

**1.4 仪器** MNT-150 型电子数显卡尺(上海美耐特实业有限公司);JD1000-3 型千分之一天平(沈阳龙腾电子有限公司);Veriti 型梯度 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);Mini-P25 型 96 孔 PCR 板离心机(杭州奥盛仪器有限公司);Lightcycle96 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(瑞士 Roche 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组和诱发性乳腺癌模型的建立** 大鼠适应性喂养 3 d,按照体质量随机分为空白组,DMBA 模型组,TAM 组,PBCRS 高、中、低剂量组,每组 16 只。按 2015 年版《中国药典》药物用量均取 6 g,根据 70 kg 人与大鼠的换算系数 0.018,折算成大鼠用量的 8,4,2 倍。PBCRS 高、中、低剂量分别是  $12.96, 6.48, 3.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,TAM 组

$1.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,其他组灌服相同体积的生理盐水,灌胃体积  $12 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。连续灌胃 1 周后,除空白组外,参考文献[14]方法,在第 2,3 周首日以  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  DMBA 剂量建立大鼠乳腺癌模型,DMBA 溶液第 1 次灌胃后第 30 天开始,每天用手摸乳腺部位的方式检测 DMBA 模型组,TAM 组,PBCRS 高、中、低剂量组大鼠乳腺肿瘤的产生情况,以乳腺部位出现乳腺肿块为该模型诱发成功,每组连续灌服相应溶液 10 周。

**2.2 荷瘤重和荷瘤体积的测量** 10 周后,用戊巴比妥钠溶液以  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  对大鼠进行腹腔注射麻醉。剥离乳腺部位肿瘤,用电子数显卡尺测量乳腺肿瘤的最短径  $b$  和最长径  $a$ ,以荷瘤体积  $= 1/2ab^2$  为公式计算乳腺癌大鼠的荷瘤体积,如果 1 只大鼠有多个肿瘤,则荷瘤体积为该大鼠所有乳腺癌肿瘤体积之和。以千分之一天平称量每只大鼠所有乳腺肿瘤的质量,即为大鼠荷瘤重。

## 2.3 RNA-seq 测序情况

**2.3.1 测序样品** 从 DMBA 模型组和 PBCRS 中剂量组中分别取 3 个样品(标记为 DM1,DM2,DM3,PB1,PB2,PB3),提取样品总 RNA 测序。

**2.3.2 测序操作流程** RNA 测序由武汉华大基因科技有限公司完成。主要操作流程,用试剂盒提取总 RNA,对样品进行质量检测,用带有 Oligo dT 磁珠富集带有 poliA 尾巴的 mRNA,将所获得的 mRNA 用打断 buffer 打断,即 mRNA 片段化,用随机的 N6 引物对其逆转录成单链 cDNA 后,再将单链 cDNA 合成双链。将双链的 cDNA 进行 5'端磷酸化,对形成“A”的黏末端的 3'端连接一个 3'端有突出“T”的鼓泡状接头,通过使用特异性引物用 PCR 进行扩增。最后在桥式引物作用下构成 DNA 文库,执行上机测序操作。

**2.3.3 信息分析流程** 首先对原始序列进行质量评估,以下面标准剔除不合格的序列,①剔除含接头(adaper)的序列;②去掉不明确碱基之比 > 10% 的序列;③剔除质量值(每个碱基对应一个质量值,该值越高,则表示测序错误率越低) < 5 的碱基数占全部序列的之比 > 50%。剔除后,剩余的原始序列即为干净序列;然后用 Bowtie2 软件与参考基因组比对,与参考基因组位点对应的干净序列(总匹配序列)与干净序列的百分比称为总匹配率,仅与参考基因组的一个位点匹配的干净序列(唯一匹配)占干净序列的百分比称为唯一匹配率,正常情况下,总匹配率会 > 70%,其中唯一匹配率 > 60%。利用

FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped) 计算基因的表达量。基于 FPKM 定量结果, 计算出 6 种样品两两之间的相关性, 相关系数越接近于 1, 表示样品间的越相似, 实验可靠性和样本选择越合理。利用 NOISeq 软件可以对全部样品建立 2 个背景数据集又称噪音背景(可以降低由于测序深度影响带来的假阳性结果), 由 2 个样品间的差异倍数 (M) 和绝对值 (D) 组成。P 表示 M 和 D 同时大于相应数据集的概率。比如基因 C,  $M_c = \log_2 [ \text{FPKM}(\text{PB}) / \text{FPKM}(\text{DM}) ]$  和  $D_c = | \text{FPKM}(\text{PB}) - \text{FPKM}(\text{DM}) |$ ,  $P_c = (M_c \geq \{M\} \& D_c \geq \{D\})$ ,  $\log_2 [ \text{FPKM}(\text{PB}) / \text{FPKM}(\text{DM}) ] > 0$  为基因上调, 反之下调。本实验以  $| \log_2 [ \text{FPKM}(\text{PB}) / \text{FPKM}(\text{DM}) ] | > 2$ , 并且  $P_c > 0.8$  为筛选差异基因标准。最后用 IPA 软件对差异基因进行功能属性分析, 进一步筛选出关键基因。

**2.4 总 RNA 提取和转录** 实验结束后, 将取的乳腺肿瘤组织, 放入生理盐水中清洗, 放置冰袋上切成大小为 1 cm × 1 cm × 0.3 cm 的 6 ~ 8 块放入装有 RNastore 样本保存液的离心管中, 放在 4 °C 冰箱过夜。用 Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用 PrimeScript RT reagent Kit with cDNA Eraser 转录试剂盒将总 RNA 转录成 cDNA, 具体步骤按照试剂盒说明书操作。

**2.5 Real-time PCR 检测相关 mRNA 表达** 运用 NCBI 数据库的引物设计和特异性检验工具 Primer-BLAST 对大鼠果糖 1, 6 二磷酸酯 1 (FBP1), 浦肯野细胞蛋白 4 (PCP4), 肌红蛋白 (MB),  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 基因引物进行设计, 并由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。FBP1 上游 5'-CCACCAGAAGGCACCAGTTATC-3', 长度 22 bp, 溶解温度 (melting temperature, Tm) 58.29 °C; 下游 5'-AACTCCTGCACGTCTTCGGT-3', 长度 20 bp, Tm 59.28 °C; PCP4 上游 5'-CGGAGTCAGGCCAACA TGAG-3', 长度 20 bp, Tm 58.90 °C; 下游 5'-TGAATGGCCACAGCTGCAC-3', 长度 19 bp, Tm 59.30 °C; MB 上游 5'-GACAACATGCTGCTG AGATCCA-3', 长度 22 bp, Tm 57.60 °C; 下游 5'-TTGACCGGGATCTTGTGCTT-3', 长度 20 bp, Tm 56.74 °C;  $\beta$ -actin: 上游 5'-CCCATCTATGAGGG TTACGC-3', 长度 20 bp, Tm 55.30 °C; 下游 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3', 长度 21 bp, Tm 50.73 °C。用 FastStart Essential DNA Green Master 试剂盒, 以 DMBA 模型组为对照,  $\beta$ -actin 为内参。

20  $\mu$ L 的反应体系 (Master Mix, 2 × conc 10  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, Water, PCR grade 6  $\mu$ L), 每个反应重复 3 次, 反应条件见表 1。

表 1 Real-time PCR 反应条件

Table 1 Reaction conditions of Real-time PCR

反应步骤	循环数	温度/°C	时间
预变性	1	95	10 min
热循环	45	95	10 s
		56	10 s
		72	10 s
		95	10 s
熔解曲线	1	65	60 s
		97	1 s

**2.6 统计学方法** 运用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行分析, 组间比较用 t 检验, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对荷瘤重和荷瘤体积的影响** 因 TAM 组仅有一只大鼠发瘤, 在统计学上无法比较, 故不作分析。与 DMBA 模型组比较, PBCRS 中剂量组荷瘤重和荷瘤体积均降低 ( $P < 0.05$ ), PBCRS 高、低剂量组荷瘤重和荷瘤体积虽有降低, 但与 DMBA 模型组比较差异均无统计学意义。见表 2。

表 2 PBCRS 对乳腺癌大鼠荷瘤重和荷瘤体积的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of PBCRS on tumor volume and weight of tumor-burdened rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	荷瘤重 /g	荷瘤体积 /mm <sup>3</sup>
DMBA 模型	-	7	9.96 ± 6.27	9 102.31 ± 6 913.22
PBCRS	12.96	6	4.53 ± 4.25	3 061.33 ± 3 096.30
	6.48	8	1.97 ± 1.37 <sup>1)</sup>	2 053.30 ± 2 257.98 <sup>1)</sup>
	3.24	6	7.80 ± 5.71	8 731.17 ± 7 005.88

注: 与 DMBA 模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (表 6 同)。

**3.2 RNA-seq 测序结果**

**3.2.1 测序数据质量评估** 干净序列率均在 99.6% 以上, 仅干净序列用于后续的分析。见表 3。

**3.2.2 干净序列与参考基因组比对** 总匹配率为 93.04% ~ 94.15%; 唯一匹配率为 67.01% ~ 69.45%; 干净序列与参考基因组的多个位点匹配 (多为点匹配) 所占百分比即多位点匹配率为 24.21% ~ 26.43%。见表 4。

表 3 肿瘤组织测序质量统计

Table 3 Statistical table of tumor tissue sequencing

样品编号	原始序列大小/bp	原始序列数量/个	干净序列大小/bp	干净序列数量/个	干净序列率/%
DM1	1 206 924 400	24 138 488	1 204 027 050	24 080 541	99.75
DM2	1 206 955 150	24 139 103	1 204 613 650	24 092 273	99.80
DM3	1 206 935 000	24 138 700	1 204 156 100	24 083 122	99.76
PB1	1 172 332 650	23 446 653	1 168 238 800	23 364 776	99.65
PB2	1 169 471 500	23 389 430	1 165 590 350	23 311 807	99.66
PB3	1 169 218 000	23 384 360	1 164 843 050	23 296 861	99.62

注:原始序列,运用碱基识别技术测序得到的序列;原始序列大小=原始序列数量×长度;干净序列大小=干净序列数量×长度;干净序列率=干净序列数量/原始序列数量×100%。

表 4 样品干净序列与参考基因组的比对情况统计

Table 4 Comparison between clean sequence and reference genome group

样品编号	干净序列数量/个	总匹配率/%	唯一匹配率/%	多位点匹配率/%	总未匹配率/%
DM1	24 080 541	93.23	67.01	26.22	6.77
DM2	24 092 273	94.13	67.70	26.43	5.87
DM3	24 083 122	93.04	68.83	24.21	6.96
PB1	23 364 776	94.13	69.02	25.11	5.88
PB2	23 311 807	94.15	69.45	24.70	5.85
PB3	23 296 861	93.80	68.08	25.72	6.20

3.2.3 差异基因筛选 基于 FPKM 定量结果,本实验 6 个样品获得相关系数均 >0.8,并对相关性系数作热图。见图 1。筛选出 DMBA 组与 PBCRS 中剂量组差异基因 145 个,其中上调 90 个,下调 55 个,用散点图表示,橙色代表基因上调,蓝色代表基因下调。见图 2。

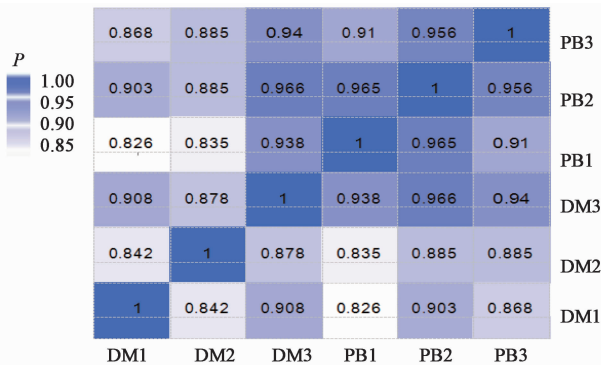


图 1 6 个样品之间相关性热效应

Fig.1 Correlation heat map in 6 samples

3.3 IPA 分析 通过对 145 个差异基因功能属性分析进一步筛选出 FBP1,PCP4,MB 表达量与本实验作用趋势一致的 3 个关键基因。见表 5。

3.4 PBCRS 对 FBP1,PCP4,MB mRNA 表达的影响

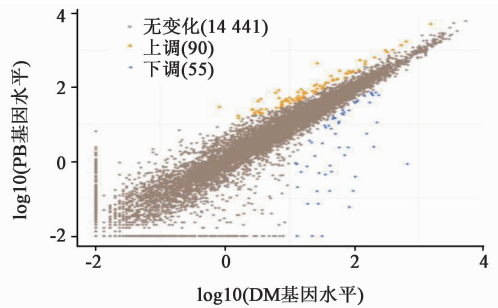


图 2 DMBA 模型组与 PBCRS 中剂量组差异基因

Fig.2 Scatter plot of differential genes in DMBA model control group and middle-dose PBCRS group

表 5 3 个关键基因信息

Table 5 Information of three key genetic

$\log_2$ [FPKM(PB) /FPKM(DM)]	基因 ID	基因	基因全称	致癌基因 /抑癌基因
2.705	24362	FBP1	fructose-bisphosphatase 1	抑癌
-2.303	25510	PCP4	purkinje cell protein 4	致癌
-8.007	59108	MB	myoglobin	致癌

与 DMBA 模型组比较,PBCRS 高、中剂量组 FBP1 mRNA 的表达均明显升高 ( $P < 0.05$ ),PBCRS 低剂量组 FBP1mRNA 的表达虽升高,但无统计学差异,PBCRS 高、中、低剂量组 PCP4 mRNA 的表达虽增高,但与 DMBA 模型组比较差异无统计学意义,PBCRS 低剂量组 MB mRNA 的表达虽降低,但无统计学差异。见表 6。

#### 4 讨论

乳腺癌在中医归属于乳岩,其主要病机为肝失疏泄,导致气机运行不畅,影响血液运行,形成血瘀证。中国抗癌协会中医诊断协会组研究发现,癌症患者多表现血瘀<sup>[14-15]</sup>。本课题组前期研究发现,血瘀与乳腺癌发病有着重要联系,有学者也认为血瘀

表 6 PBCRS 对 FBP1,PCP4,MB mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 6 Effect of PBCRS on expressions of FBP1, PCP4, MB mRNA( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	FBP1	PCP4	MB
DMBA 模型	-	1.29 ± 0.46	1.10 ± 0.82	10.61 ± 13.30
PBCRS	12.96	4.54 ± 1.79 <sup>1)</sup>	40.90 ± 56.53	17.16 ± 25.52
	6.48	7.28 ± 6.27 <sup>1)</sup>	14.03 ± 18.81	14.63 ± 17.14
	3.24	2.17 ± 1.07	23.70 ± 46.05	0.65 ± 0.50

存在于乳腺癌疾病的各个发病阶段,并做了相关研究。吴珊珊等<sup>[16]</sup>通过对裸鼠接种人乳腺癌 LCC2 细胞建造大鼠乳腺癌模型,经过药物干预发现,三七的提取物三七总皂苷,其联合三苯氧胺组相比其他组能明显抑制肿瘤生长。从现代医学角度讲,乳房微循环血流灌注量可直接反映乳房部位血液运行情况。宋爱莉等<sup>[17]</sup>研究发现,DMBA 诱导的乳腺癌癌前病变大鼠血液黏稠度较高,乳房部微循环受到阻碍,认为血瘀是乳腺增生向癌变发展的重要过程,而莪术油可明显改善上述情况。王玉祥等<sup>[18]</sup>通过用 Walker-256 肿瘤细胞接种构建大鼠乳腺癌模型,相比其他组,给予疏肝化痰祛瘀方组可明显改善乳癌大鼠的乳房微循环,血液黏稠度。因此血瘀与乳腺癌的发生、发展有着重要联系,中医药治疗疗效得到体现。

本文选择川芎、红花、酒丹参 3 种中医常用的人肝经的活血化瘀药组成药组。川芎辛、温,归肝、胆、心包经,具有活血行气、祛风止痛之功效,为血中气药。川芎嗪是川芎的主要有效成分,现代研究表明,川芎嗪具有扩张血管、抑制血小板聚集、降低血液黏稠度、抗癌作用<sup>[19-20]</sup>。红花辛、温,归心、肝经,具有活血通经、祛瘀止痛之功效。红花黄色素是红花发挥药效的基础,是其主要的有效物质。现代研究表明,红花黄色素具有抗血凝、抗血小板聚集、抗肿瘤的作用<sup>[21-22]</sup>。丹参苦、微寒,归心、心包、肝经,具有活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、除烦安神之功效,为妇科调经之常用药。丹参酮是丹参脂溶性的有效成分,现代研究表明,丹参酮具有抗血凝、抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[23-24]</sup>。酒丹参可以缓和丹参的寒凉之性,降低血小板的聚集和黏附作用较生丹参强,从而增强了活血化瘀的作用<sup>[25]</sup>。故选择上述 3 种活血化瘀药物组成药组用于本实验活血化瘀治法对乳腺癌影响的研究。

DMBA 诱导的大鼠乳腺癌癌变过程,与人体

乳腺癌腺上皮组织增生-不典型增生-癌变-浸润性乳腺癌的癌变过程相似<sup>[26]</sup>,SD 大鼠的化学性乳腺癌的发病成功率强于 Wistar 大鼠<sup>[27]</sup>,从而选择 DMBA 诱发的乳腺癌 SD 大鼠作为材料,为下一步研究做准备。本实验利用此模型,通过观察大鼠荷瘤重和荷瘤体积分析活血化瘀治法对大鼠乳腺癌的影响。结果显示 PBCRS 中剂量明显减小了荷瘤重和荷瘤体积,抑制了乳腺癌发展,和祁艳波等<sup>[28]</sup>血府逐瘀汤抑制荷瘤小鼠瘤重的生长结果相一致。这与王文杰<sup>[29]</sup>用红花水煎剂中剂量抑制乳腺癌生长的结果相互印证。

RNA-seq 是近年来兴起的一项最新研发的测序手段,与基因芯片等别的技术对比,RNA-seq 可进行对全部转录组或基因组水平的基因表达差异研究,具有定量更准确,检测范围更广,分析更加可靠的优势<sup>[30-31]</sup>。运用 IPA 分析软件可以获得基因的最新研究进展。本实验基于以上两种手段,筛选出 3 个关键基因 FBP1,PCP4,MB。

PCP4 也称为 Peptide19 (PEP19) 首次被检测到在中枢神经系统表达,是一种相对分子质量为 7.6 kDa 的多肽,其主要功能是通过调节钙/钙调素依赖性激酶的活性影响神经细胞的各种进程<sup>[32-33]</sup>。随着对 PCP4/PEP19 不断研究发现,其会促进人类乳腺癌细胞的迁移、侵袭和依附<sup>[34]</sup>,从而阻碍人乳腺癌细胞的死亡<sup>[35]</sup>。使用 7,2-二甲苯萘诱导大鼠乳腺癌后,乳腺组织中 PCP4/PEP19 表达增加<sup>[36]</sup>。但其分子机制尚未明确。本实验结果显示,PBCRS 会促进乳腺癌大鼠的 PCP4 mRNA 的表达,但差异不明显,与上述研究结果不一致。

MB 主要分布在心肌和骨骼肌,是肌肉内储蓄氧的蛋白质,对于氧运输和自由基清除功能扮演者重要的角色<sup>[37]</sup>。目前 MB 主要作为诊断急性心肌梗死早期最灵敏的指标<sup>[38]</sup>。有研究显示,在正常的乳腺上皮细胞中未检测到 MB 的表达,但在乳腺癌细胞中,MB mRNA 表达量较高<sup>[39]</sup>。目前也尚未有明确的分子机制。本实验结果显示,PBCRS 低剂量会抑制 MB mRNA 表达,但差异不明显。其可能与在 RNA-seq 测序分析中,PCP4,MB 基因 FPKM 表达量在每个样品中,出现太大或太小数据影响分析结果,从而影响基因分析。

FBP1 是 FBP 酶的一个亚型,是糖异生过程中一个关键的限速酶<sup>[40-41]</sup>,在它的催化作用下,1,6 二磷酸果糖不能逆转地变为 6-磷酸果糖,此阶段是与糖酵解中,6-磷酸果糖在磷酸果糖激酶 PFK 的催化

下不能逆转地变为 1,6 二磷酸果糖相反,因此 FBPI 被称为糖酵解的抑制剂。即便在氧气含量充足的条件下,肿瘤细胞也主要通过糖酵解途径产生所需能量,并出现大量乳酸,这就是有名的瓦伯格效应(Warburg effect)<sup>[42]</sup>。越来越多的研究发现 FBPI 在肿瘤的发生发展中有着重要的作用,在肝癌、胃癌、结肠癌研究中发现,FBPI 表达缺失,加速了糖元吸收和糖酵解的过程<sup>[43-44]</sup>。在人乳腺癌细胞中,FBPI 的过表达通过调节缺氧诱导因子 1 $\alpha$  阻碍肿瘤的生长和糖酵解过程<sup>[45]</sup>。FBPI 缺失会增加管腔乳腺癌细胞的代谢<sup>[46]</sup>。本实验结果显示,PBCRS 高、中剂量会明显促进 FBPI mRNA 的表达,说明 PBCRS 可能通过促进 FBPI 的表达抑制乳腺癌的发生,但 FBPI 调节的糖酵解途径需要进一步探讨,以期对乳腺癌的防治提供方向。

[参考文献]

[1] 胡凯敏. 全球女性乳腺癌疾病负担分析及其与社会经济水平和医疗质量关系的初步探讨[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

[2] Kolberg H C, Lufter D, Lux M P, et al. Breast cancer 2012-new aspects [J]. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2012, 72(7): 602-615.

[3] 吴菲, 林国桢, 张晋昕. 我国恶性肿瘤发病现状及趋势[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(2): 81-85.

[4] 刘笑然, 李惠平. BRCA1, BRCA2 基因突变与乳腺癌风险预测及治疗[J]. 癌症进展, 2015, 13(2): 114-119.

[5] Roy R, Chun J, Powell S N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 12(1): 68-78.

[6] 于春梅, 纪凤颖, 付登科. 女性乳腺癌影响因素病例对照研究 [J]. 中国公共卫生, 2009, 25(7): 772-773.

[7] 刘专科. 某市 2011~2014 年乳腺癌发病机制及危险因素分析[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(1): 96-97.

[8] 徐雅莉, 孙强, 单广良, 等. 中国女性乳腺癌发病相关危险因素: 病例对照研究[J]. 协和医学杂志, 2011, 2(1): 7-14.

[9] 宗嘉宝. 李全教授运用中医药治疗乳腺癌经验初探[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[10] 张书娟, 王莘. 活血化瘀中药防治乳腺癌的研究近况[J]. 福建中医学院学报, 2005, 15(S1): 42-44.

[11] YUAN S, SONG Y, WANG X, et al. The inhibiting effect of tanshinone II A on the growth of tumor cell lines *in vitro* [J]. West China J Pharm Sci, 2003, 17(5): 327-329.

[12] 周瑞芳. PE 相关中药黄芪、丹参对人乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞增殖凋亡的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.

[13] 郭朋. 基于 RNA-seq 技术的宫颈鳞癌转录组学研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.

[14] 尚广彬, 曾莉萍, 赵益, 等. 二至丸对诱发性乳腺癌组织中 VEGF 和 MMP-9 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 270-273.

[15] 范刚启, 宋祥龙, 王辉, 等. 活血化痰治疗癌及癌前病变效应的两重性与血管生成的关系[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(8): 624-626.

[16] 吴珊珊, 杨宝丽, 关慧. 三七总皂苷联合三苯氧胺对人乳腺癌细胞的抑制作用及对 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6): 84-89.

[17] 宋爱莉, 张敬涛, 李静蔚, 等. 莪术油对乳腺癌癌前病变造模大鼠血液流变学及乳房微循环的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 458-460.

[18] 王玉祥, 杨洁, 杨超, 等. 疏肝化痰祛瘀方联用紫杉醇对乳腺癌大鼠乳房微循环的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(22): 5539-5542.

[19] 张淑娟, 王振涛, 韩丽华, 等. 川芎嗪注射液对梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF-mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 170-173.

[20] 王国峰, 陆峰, 赵霞, 等. 川芎嗪抗家兔动脉粥样硬化作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 202-205.

[21] 赵金明, 秦文艳, 齐越, 等. 红花黄色素抗凝血作用及对血小板聚集影响的研究[J]. 实验动物科学, 2009, 26(6): 30-32.

[22] 韩海玲, 孙玉芹, 宋文刚, 等. 红花黄色素对内皮细胞增殖及凋亡的保护作用[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(1): 51-54.

[23] 朱业靖. 丹参酮对晚期非小细胞肺癌患者凝血指标与临床效果的影响研究[J]. 中国医药指南, 2016, 14(6): 1-3.

[24] JING J, ZHENG H, WANG J, et al. Growth inhibition and multidrug resistance-reversing effect of tanshinone I A on human breast cancer cell with estrogen receptor negative [J]. J Sichuan Univ, 2007, 38(3): 391-395.

[25] 刘江亭, 李慧芬, 崔伟亮, 等. 酒丹参研究进展[J]. 山东中医杂志, 2018, 37(5): 432-434.

[26] 魏玺, 黄焰. DMBA 诱导大鼠乳腺癌模型及乳腺癌化学预防实验研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(3): 454-456.

[27] 李静蔚, 宋爱莉, 张敬涛, 等. DMBA 诱导大鼠乳腺癌癌前病变的组织病理学研究[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 505-508.

- [28] 祁艳波, 吴嘉慧, 刘柏杨, 等. 血府逐瘀汤对荷瘤小鼠的抑瘤作用[J]. 现代预防医学, 2005, 32(5): 446-448.
- [29] 王文杰. 红花水煎剂对肿瘤组织病理学改变及血管生成的影响[J]. 山西中医, 2007, 23(6): 59-60.
- [30] Raz T, Kapranov P, Lipson D, et al. Protocol dependence of sequencing-Based gene expression measurements[J]. PLoS One, 2011, 6(5): 1-13.
- [31] 廖钦洪, 邹勇, 李洪雷, 等. 基于 RNA-seq 数据的生姜 NAC 转录因子家族鉴定及分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 493-501.
- [32] Harashima S, WANG Y, Horiuchi T, et al. Purkinje cell protein 4 positively regulates neurite outgrowth and neurotransmitter release[J]. J Neurosci Res, 2011, 89(10): 1519-1530.
- [33] Kanazawa Y, Makino M, Morishima Y, et al. Degradation of PEP-19, a calmodulin-binding protein, by calpain is implicated in neuronal cell death induced by intracellular  $Ca^{2+}$  overload[J]. Neuroscience, 2008, 154(2): 473-481.
- [34] Yoshimura T, Hamada T, Hijioka H, et al. PCP4/PEP19 promotes migration, invasion and adhesion in human breast cancer MCF-7 and T47D cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49065-49074.
- [35] Hamada T, Souda M, Yoshimura T, et al. Anti-apoptotic effects of PCP4/PEP19 in human breast cancer cell lines: a novel oncotarget[J]. Oncotarget, 2014, 5(15): 6076-6086.
- [36] Souda M, Umekita Y, Abeyama K, et al. Gene expression profiling during rat mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene[J]. Int J Cancer, 2009, 125(6): 1285-1297.
- [37] Wittenberg J B, Wittenberg B A. Myoglobin function reassessed [J]. J Exp Biol, 2003, 206(12): 2011-2020.
- [38] 袁瑾, 李娜娜, 李文花, 等. cTnI、Mb 联合应用评价异丙肾上腺素诱导的心肌缺血损伤及凋亡发生[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(9): 1455-1457.
- [39] Flonta S E, Arena S, Pisacane A, et al. Expression and functional regulation of myoglobin in epithelial cancers [J]. Am J Pathol, 2009, 175(1): 201-206.
- [40] Mizunuma H, Tashima Y. Fructose-1,6-biphosphatase of the small intestine. Purification and comparison with liver and muscle fructose-1,6-bisphosphatases [J]. J Biochem, 1978, 84(2): 327-336.
- [41] Tillmann H, Eschrich K. Isolation and characterization of an allelic cDNA for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase[J]. Gene, 1998, 212(2): 295-304.
- [42] Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. Science, 1956, 123(3191): 309-314.
- [43] CHEN M, ZHANG J, LI N, et al. Promoter hypermethylation mediated downregulation of FBP1 in human hepatocellular carcinoma and colon cancer [J]. PLoS One, 2011, 6(10): 1-8.
- [44] LIU X, WANG X, Lam E K, et al. Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis [J]. Oncogene, 2010, 29(3): 442-450.
- [45] SHI L, HE C, LI Z, et al. FBP1 modulates cell metabolism of breast cancer cells by inhibiting the expression of HIF-1 $\alpha$  [J]. Neoplasia, 2017, 64(4): 535-542.
- [46] ZHANG B, QIN Y, SHI S, et al. FBP1, A tumor suppressor and negative regulator of glycolysis, was epigenetically silenced in pancreatic cancer [J]. Curr Signal Transduct Ther, 2014, 9(3): 156-163.

[责任编辑 张丰丰]