

· 药理 ·

麦门冬汤合千金苇茎汤对小鼠 Lewis 原位肺癌 lncRNA, mRNA 表达谱的影响

姜泽群, 马艳霞, 陆烨, 陈浩, 孙妍, 田甜, 李黎, 吴勉华*

(南京中医药大学, 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] **目的:**通过对 Lewis 肺癌原位移植小鼠肿瘤组织长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)和 mRNA 表达谱的检测,探讨麦门冬汤合千金苇茎汤(金方)抗肺癌的作用机制。**方法:**C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组、金方组(20 g·kg⁻¹·d⁻¹),构建小鼠 Lewis 原位肺癌模型成功后,次日用金方灌胃开始治疗。应用基因芯片技术,检测与金方抗肺癌作用密切相关的差异 lncRNA, mRNA, 进行聚类分析,并利用 *t* 检验和差异表达的倍数变化,筛选出关键 lncRNA, mRNA。运用生物信息学方法预测差异 lncRNA 调控的靶基因,并对其进行功能和通路分析。应用病理组织学技术,检测各组小鼠肿瘤组织光镜下的差异表现。**结果:**lncRNA, mRNA 芯片杂交结果显示,金方调控了 887 个 lncRNA 差异表达,其中上调 442 个,下调 445 个($P < 0.05$)。差异表达的 mRNA 共 610 个,其中上调 376 个,下调 234 个($P < 0.05$)。使用 GO 分析方法,发现下调或上调的靶基因主要参与了细胞代谢调控、信号通路调控等生物学过程(biological process, BP)。靶基因分子功能(molecular function, MF)分析显示,下调或上调的靶基因主要具有 DNA 结合、蛋白质结合、受体结合和转录因子活性等功能。信号通路预测显示金方可调控 Janus 激酶/信号转导与转录激活因子(JAK/STAT)等与肺癌的发生发展密切相关的信号通路。病理组织学检查结果证实,与模型组比较,金方能明显改善小鼠肺组织的病理改变。**结论:**金方可能通过调控多种 lncRNA 和 mRNA 的表达及下游相关信号通路来发挥其抗肺癌的作用。

[关键词] 麦门冬汤合千金苇茎汤(金方); Lewis 肺癌原位模型; 长链非编码 RNA(lncRNA); 信使 RNA(mRNA)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0014-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191022

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190211.2001.002.html>

[网络出版时间] 2019-02-12 10:59

Effect of Maimendong Tang and Qianjin Weijingtang on Expression Profiles of lncRNA and mRNA in Mouse Orthotopic Lewis Lung Carcinoma

JIANG Ze-qun, MA Yan-xia, LU Ye, CHEN Hao, SUN Yan, TIAN Tian, LI Li, WU Mian-hua*

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-lung cancer mechanism of Maimendong Tang and Qianjin Weijingtang (Jin Fang) by detecting the expression profiles of long noncoding RNA (lncRNA) and mRNA in mice tumor tissues of orthotopic Lewis lung cancer model. **Method:** C57BL/6 mice were randomly divided into normal group, model group and Jin Fang group (20 g·kg⁻¹·d⁻¹). After successful establishment of Lewis lung cancer model in situ in mice, Jin Fang was given orally the next day after treatment. Using gene chip technology, differential lncRNA and mRNA closely related with Jin Fang's anti-lung cancer effect were detected, and cluster analysis was performed. The key lncRNA and mRNA were screened out by *t*-test and fold change of differential expression. Bioinformatic methods were used to predict target genes regulated by differential lncRNA, and

[收稿日期] 20181011(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603584)

[第一作者] 姜泽群, 博士, 副教授, 从事抗肿瘤中药分子药理学研究, E-mail: 290343@njucm.edu.cn

[通信作者] * 吴勉华, 博士, 教授, 从事中医药防治肿瘤的理论、临床和基础研究, E-mail: wmh7001@163.com

functional and pathway analysis was performed. The histopathological technique was used to detect the differences in the tumor tissue of each group under light microscope. **Result:** lncRNA and mRNA chip hybridization results showed that Jin Fang regulated differential expressions of 887 lncRNA, in which 442 were up-regulated and 445 were down-regulated ($P < 0.05$). There were 610 differential mRNA expressions, in which 376 were up-regulated and 234 were down-regulated ($P < 0.05$). GO analysis showed that down-regulated or up-regulated target genes were mainly involved in biological processes (BP), such as cell metabolism regulation and signal pathway regulation. Molecular function (MF) analysis showed such functions DNA binding, protein binding, receptor binding and transcription factor activity in down-regulated or up-regulated target genes. Target genes were involved in multiple biological processes, cellular components and molecular functions. Signal pathway predictions indicated that Jin Fang can regulate the Janus kinase/signal transducer and activator of trans-ions (JAK/STAT) and other signaling pathways closely related to the development of lung cancer. The results of histopathological examination confirmed that Jin Fang could significantly improve the pathological changes of lung tissues in the mice compared with the model group. **Conclusion:** Jin Fang may exert its anti-lung cancer effect by regulating the expressions of multiple lncRNAs and mRNAs, and down-regulating related signaling pathways.

[**Key words**] Maimendong Tang and Qianjin Weijintang (Jin Fang); Lewis lung cancer model in situ; lncRNA; mRNA

2018 全球癌症统计报告显示,肺癌是目前全世界范围内发病率最高的癌症类型之一(占整体的 11.6%),也是癌症死亡的主要原因(占癌症总死亡数的 18.4%)^[1]。近年来,大量的临床与基础研究表明,中医药治疗肺癌效果显著,尤其是在传统经方基础上结合长期临床经验加减化裁而成的效验经方,既可增加抗肿瘤效果,又可减少不良反应的发生,在提高患者的生活质量、延长其生存期方面具有巨大优势^[2-4]。国医大师周仲瑛教授认为肺癌的基本病机是“痰瘀郁肺,毒耗气阴”^[5],在该理论指导下,确立了“化痰散结,祛瘀解毒,益气养阴”的基本治法,并在长期临床实践过程中,将麦门冬汤和千金苇茎汤两个经典名方组合化裁而成麦门冬汤合金钱苇茎汤(周老称之为“金方”)^[6-7]。麦门冬汤始载于张仲景的《金匱要略·肺痿肺癰咳嗽上气病脉证治第七》第 10 条:“火逆上气,咽喉不利,止逆上气者,麦门冬汤主之。”千金苇茎汤出自于孙思邈《千金要方·肺癰第七》,能清肺化痰,逐瘀排脓,主治肺癰。课题组的前期实验研究发现,金方可以显著延长 Lewis 肺癌荷瘤小鼠(皮下模型)的生存期,提高该鼠生存质量,保护该鼠免疫器官,抑制肿瘤生长^[8],但其确切机制至今尚未清楚。越来越多的证据表明,肺癌的诊断、治疗和预后与长链非编码 RNA (lncRNA) 有着密切的关系,lncRNA 可通过表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等多个层面参与肿瘤的发生发展过程^[9-10]。中医药围绕 lncRNA 为靶点治疗肺癌的研究目前尚处于起步阶段,通过新

一代基因芯片技术揭示中药治疗前后肺癌相关 lncRNA 的表达变化,研究中药如何通过对特异性 lncRNA 的调控来抑制肺癌的发生、发展过程,将会促进今后临床治疗的发展和新药的开发。C57BL/6 小鼠的原位 Lewis 肺癌移植模型比较皮下模型更能够模拟肺癌生长及发展的微环境,本研究在 Lewis 肺癌原位模型上重新证实金方的抗肿瘤作用,并通过观察金方对 lncRNA 和 mRNA 表达谱的影响,探讨其可能的抗癌机制。

1 材料

1.1 细胞系和动物 小鼠 Lewis 肺癌细胞 LLC,购自南京凯基生物科技发展有限公司(批号 KG244)。雄性清洁级 C57BL/6 小鼠 50 只,体质量 18~22 g,由常州卡文斯实验动物有限责任公司提供,合格证号 SCXK(苏)2016-0010。本研究所涉及的实验均得到南京中医药大学动物伦理委员会的批准,并按照相关要求严格执行,编号 ACU171201。

1.2 药物制备和试剂 麦门冬汤合金钱苇茎汤中各类药(麦冬、法半夏、人参片、甘草片、芦根、薏苡仁、冬瓜子、桃仁等),购自南京中医药大学百草堂中医门诊部,由南京中医药大学第一临床医学院吴勉华教授鉴定为正品。将称取的药材加 10 倍量水加热回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩成稠膏,质量浓度为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; RPMI 1640 培养基(Gibco 公司,批号 11875093);胎牛血清(杭州四季青公司,批号 11012-8611);trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596026);RNeasy Mini Kit

(美国 Qiagen 公司, 批号 74104); Arraystar 小鼠 lncRNA 芯片 v3.0 (美国 Arraystar 公司, 批号 AS-LNC-M-V3.0); 苏木精-伊红 (HE) 染液 (广州鸿泉生物科技有限公司, 批号 HQ6001)。

1.3 仪器 ND-1000 型 NanoDrop 紫外分光光度计, 2100 型生物分析仪, G2505C 型基因芯片扫描仪 (美国 Agilent 公司); CX41 型正置显微镜 (日本 Olympus 公司); D5100 型数码相机 (Nikon 公司); 5417R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 将 Lewis 肺癌细胞培养扩大到一定数量, 将 1×10^7 个/mL 细胞悬液和 matrigel 基质胶按 1:1 混匀, 接种于所有模型组和金方组 C57BL/6 小鼠左肺内, 每只 50 μ L, 建立原位肺癌小鼠模型, 以接种后第 21 天对小鼠进行解剖左肺可见肿瘤结节为模型成功^[11]。

2.2 分组及给药 造模后将 C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组、金方组, 每组 10 只。造模次日开始给药, 各组给药方式及剂量参考本课题组前期实验研究^[8], 正常组和模型组小鼠给予生理盐水, 金方组按 20 g·kg⁻¹ 体质量给药。每日 1 次, 连续 21 d。

2.3 lncRNA 和 mRNA 芯片分析主要实验流程

2.3.1 总 RNA 提取和质量控制 取各组瘤组织各 100 mg, 使用 trizol 法提取 RNA, 并用 RNasey Mini Kit 纯化, 使用紫外分光光度计检测吸光度 A, 测量纯化后的 RNA 浓度, 电泳检测 RNA 的完整性。

2.3.2 RNA 标记和芯片杂交 抽提的 RNA 通过质检后, 将 RNA 样本提交给上海康成生物工程有限公司, 委托其协助进行芯片的杂交、数据读取和正态化工作。检测步骤, 从总 RNA 中移除 rRNA, 得到 mRNA, 使用随机引物方法将每个样品放大并转录成带荧光的 cRNA, 使用 RNeasy Mini Kit 纯化标记的 cRNAs, 并用紫外分光光度计检测浓度和活性后进行芯片杂交, 洗涤、固定并使用基因芯片扫描仪扫描杂交芯片。

2.3.3 数据采集和处理 使用 Agilent Feature Extraction 软件 (v11.0.0.1.1) 获得芯片图, 并读值, 得到原始数据。使用 GeneSpring GX v12.1 软件 (Agilent Technologies) 对原始数据进行 Quantile 标准化和随后的数据处理。原始数据标准化后经过筛选高质量探针 (某探针在 9 个样品中至少有 3 个被标记为 Present 或 Marginal) 进行进一步分析。两组样品间具有统计学意义的差异表达 lncRNA 或

mRNA 通过 P-value/FDR 筛选, 2 个样品间差异表达的 lncRNAs 或 mRNAs 通过 Fold Change 筛选。使用编写脚本进行层次聚类和关联分析。

2.3.4 生物信息学功能分析 使用 GeneSpring GX v12.1 软件对差异表达 mRNAs 进行基因本体论 (GO) 富集分析, 以了解基因参与的生物学过程。使用京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库进行通路分析以鉴定有意义的通路, 使用 Fisher's exact test 计算 P, 使用 FDR 值对 P 进行校对。

2.4 HE 染色观察瘤组织病理学改变 取瘤组织经 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片厚 4~5 μ m, HE 染色, 60 $^{\circ}$ C 脱蜡 30 min, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇至水; 放入苏木精水溶液中染色; 氨水返蓝, 流水冲洗, 入 70%、90% 乙醇脱色; 伊红染细胞质, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察、拍照。

2.5 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计学软件对实验数据进行处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据间比较采用独立样本 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RNA 抽提 使用紫外分光光度计检测抽提的总 RNA, A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.1, 且接近 2.0, 说明抽提得到的总 RNA 无 DNA 污染、纯度高、完整性好, 可用于后续实验。

3.2 lncRNA 芯片检测

3.2.1 散点图和火山图 lncRNA, mRNA 散点图演示了金方组与模型组之间的差异, 用软件进行对比分析后发现, Pearson 相关系数分别为 0.974 7, 0.982 1, 接近 1, 重复性好。火山图显示, 金方治疗后, 上调 ≥ 2 倍的 lncRNA 有 442 个, 下调的 ≥ 2 倍的有 445 个; 上调 ≥ 2 倍的 mRNA 有 376 个, 下调 ≥ 2 倍的有 234 个。见图 1, 2。

3.2.2 各组聚类图 通过聚类分析验证了以上表达模式的正确性, 红色代表高的相对表达量, 绿色代表低的相对表达量, 这些 lncRNA 和 mRNA 遍布整个基因组并覆盖所有染色体。见图 3。

3.2.3 lncRNA 和 mRNA 芯片杂交 取 3 个模型组肺组织和 3 个金方治疗组的肺组织, 采用芯片杂交方法对差异表达的 lncRNA 进行筛选, 筛选结果, 差异表达的 lncRNA 共 887 条, 其中 2 倍以上上调的有 442 条, 下调的有 445 条; 差异表达的 mRNA 共 610 条, 其中 2 倍以上上调的有 376 条, 下调的有 234 条; 上调和下调最显著的 lncRNA 和 mRNA 见表 1, 2。

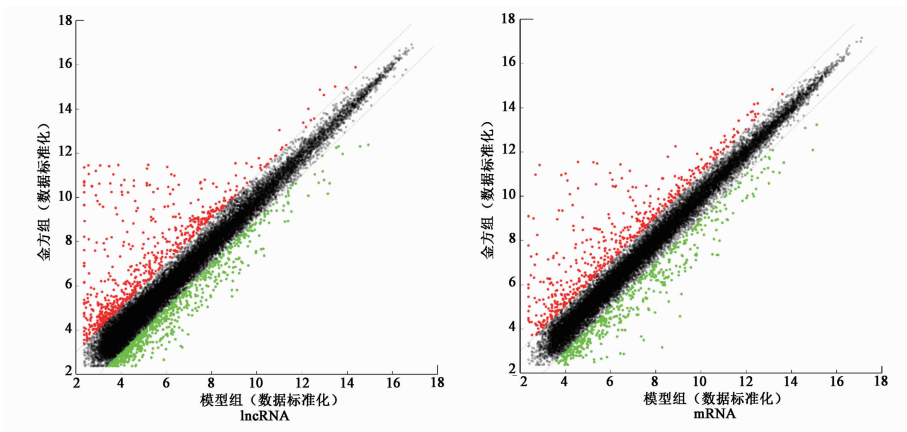


图 1 金方组与模型组差异表达的 lncRNA, mRNA 散点

Fig. 1 Scatter-plot results represent variation of lncRNAs and mRNAs differential expressed in Jin Fang group compared with model group

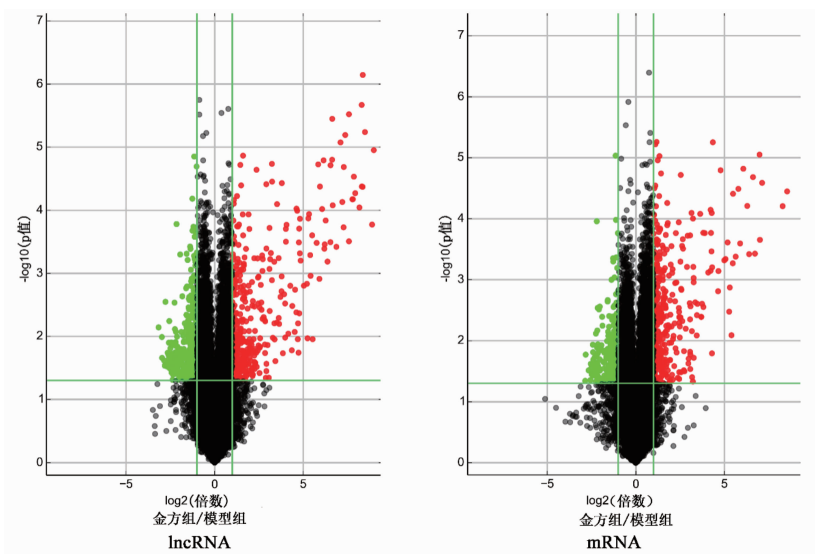


图 2 金方组与模型组比较差异表达的 lncRNA 和 mRNA 火山

Fig. 2 Volcano-plot results represent variation of lncRNAs and mRNAs differential expressed in Jin Fang group compared with model group

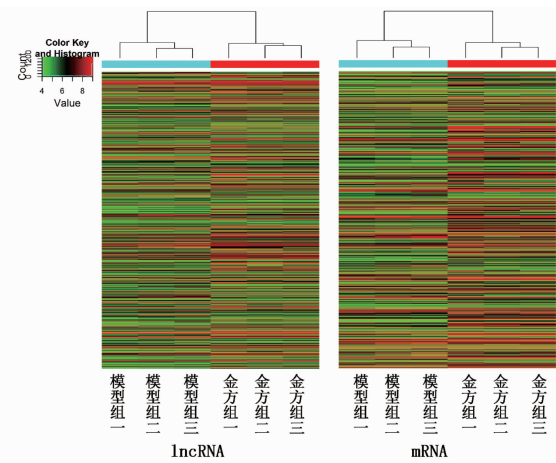


图 3 金方组与模型组比较差异表达的 lncRNA 和 mRNA 聚类

Fig. 3 Hierarchical clustering results represent variation of lncRNAs and mRNAs differential expressed in Jin Fang group compared with model group

3.2.4 靶基因预测、生物信息学分析 使用 GO 分析方法,发现下调的靶基因主要参与了细胞代谢正调控、初级代谢过程调控、高分子正调控等生物学过程 (biological process, BP)。上调的靶基因主要参与了单细胞生物过程、多细胞生物过程、信号通路等生物学过程。靶基因细胞组分 (cellular component, CC) 分析显示,下调的靶基因可能主要来源于细胞表面和细胞内细胞器,而上调的靶基因可能主要来源于细胞外区域、细胞膜和细胞外周。靶基因分子功能 (molecular function, MF) 分析显示,下调的靶基因主要具有 DNA 结合、蛋白质结合和转录因子活性等功能,而上调的靶基因主要具有蛋白质结合、受体结合和离子结合等功能。见图 4,5。

3.2.5 靶基因信号转导通路分析 利用 KEGG 数据库分析发现,下调的靶基因主要和环磷酸鸟苷/

表 1 金方组与模型组基因芯片发生下调或上调的 lncRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Compared with model group, lncRNAs up-regulated or down-regulated by microarray in Jin Fang Group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

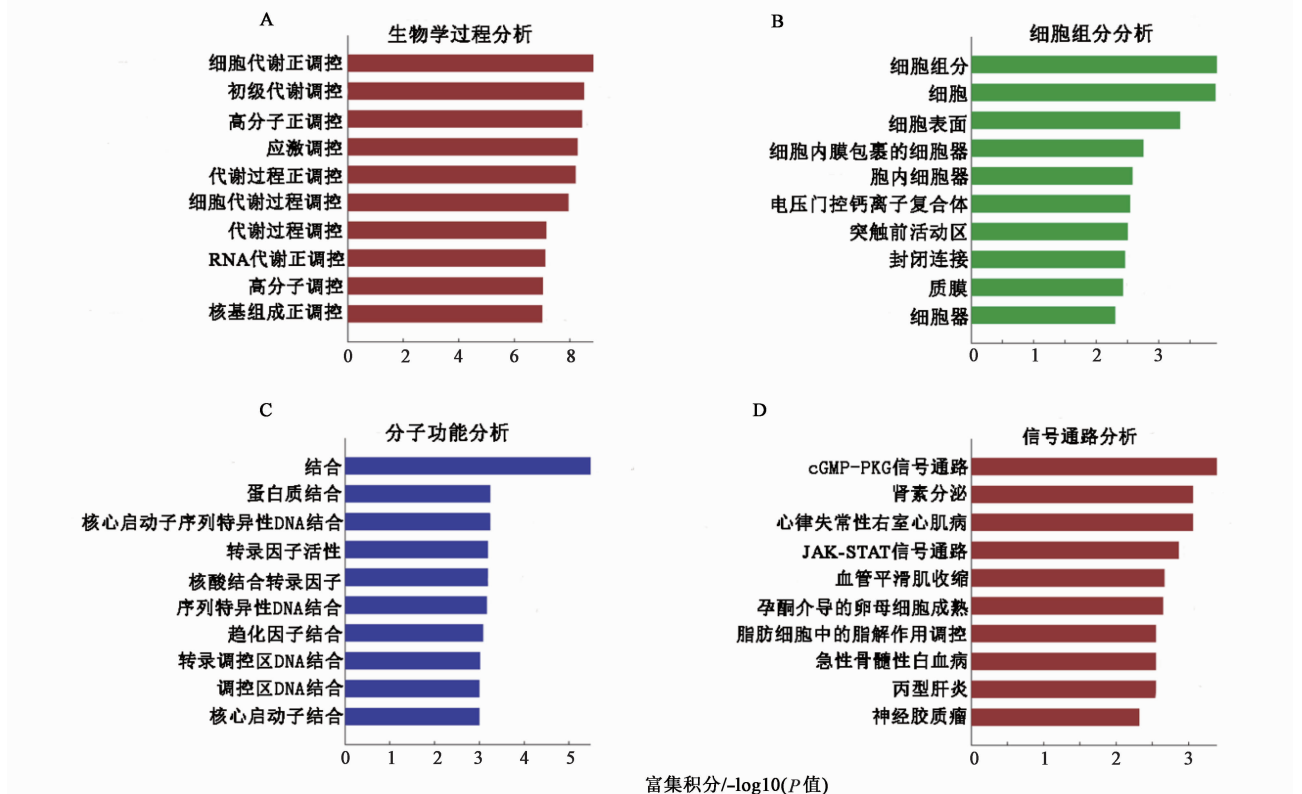
lncRNA ID	差异倍数	P
ENSMUST00000148244	474.26 ↓	0.000 2
AK144424	191.63 ↓	0.000 3
TCONS_00002492	155.35 ↓	0.000 2
ENSMUST00000118345	117.22 ↓	0.000 4
BY012341	92.98 ↓	0.000 3
ENSMUST00000118925	82.79 ↓	0.000 6
uc007yaz.1	73.27 ↓	0.000 4
AK047151	60.47 ↓	0.001 2
ENSMUST00000163574	13.76 ↑	0.034 4
ENSMUST00000150920	8.97 ↑	0.007 2
AK089422	7.88 ↑	0.010 2
AK040064	7.83 ↑	0.021 9
NSMUST00000126728	6.86 ↑	0.002 8
AK135913	6.60 ↑	0.027 7
NR_028280	6.52 ↑	0.027 0
ENSMUST00000143328	6.29 ↑	0.018 2

注: ↓. 下调; ↑. 上调(表 2 同)。

表 2 金方组与模型组比较, 基因芯片发生下调或上调的 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Compared with model group, mRNAs up-regulated or down-regulated by microarray in Jin Fang group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

mRNA ID	Symbol	差异倍数	P
ASMM10P037055	Adam12	372.65 ↓	0.000 04
ASMM10P017334	Lrfn2	312.83 ↓	0.000 1
ASMM10P005506	Smpd4	140.08 ↓	0.000 03
ASMM10P005505	Smpd4	128.46 ↓	0.000 2
ASMM10P000545	Dos	126.46 ↓	0.000 009
ASMM10P039120	Defb38	105.75 ↓	0.000 4
ASMM10P048140	Vwc2	84.11 ↓	0.000 4
ASMM10P000192	Slc39a11	78.22 ↓	0.000 1
ASMM10P006747	Mast2	7.26 ↑	0.045 4
ASMM10P007875	Prl2b1	6.35 ↑	0.030 6
ASMM10P027359	Ifna2	5.91 ↑	0.044 2
ASMM10P040286	Tex24	5.84 ↑	0.024 0
ASMM10P006559	Grip1	5.70 ↑	0.027 6
ASMM10P053702	Gpr174	5.67 ↑	0.035 3
ASMM10P053275	Lsp1	5.42 ↑	0.031 6
ASMM10P046933	Kdm6b	5.39 ↑	0.037 2



A. 生物学过程分析; B. 细胞组分分析; C. 分子功能分析; D. 信号通路分析(图 5 同)

图 4 下调的靶基因生物信息学分析

Fig. 4 Down-regulated target genes bioinformatics enrichment bar graph

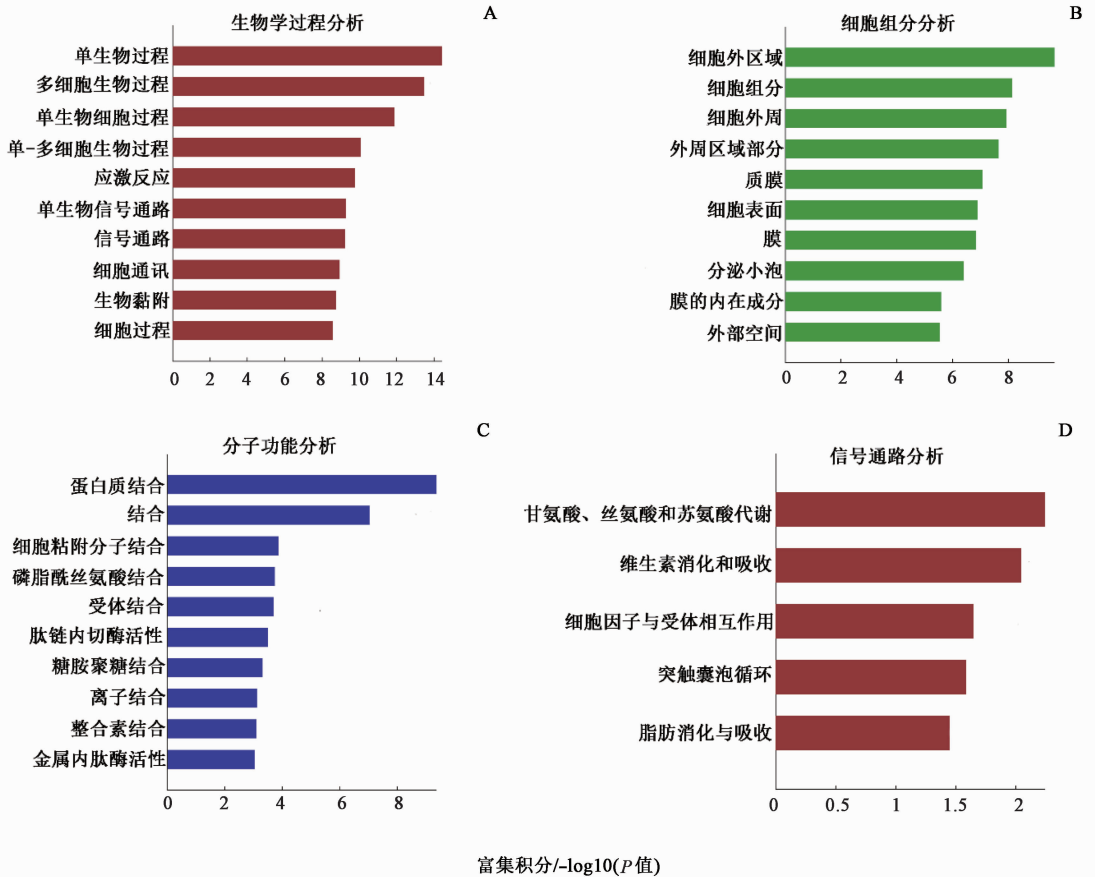
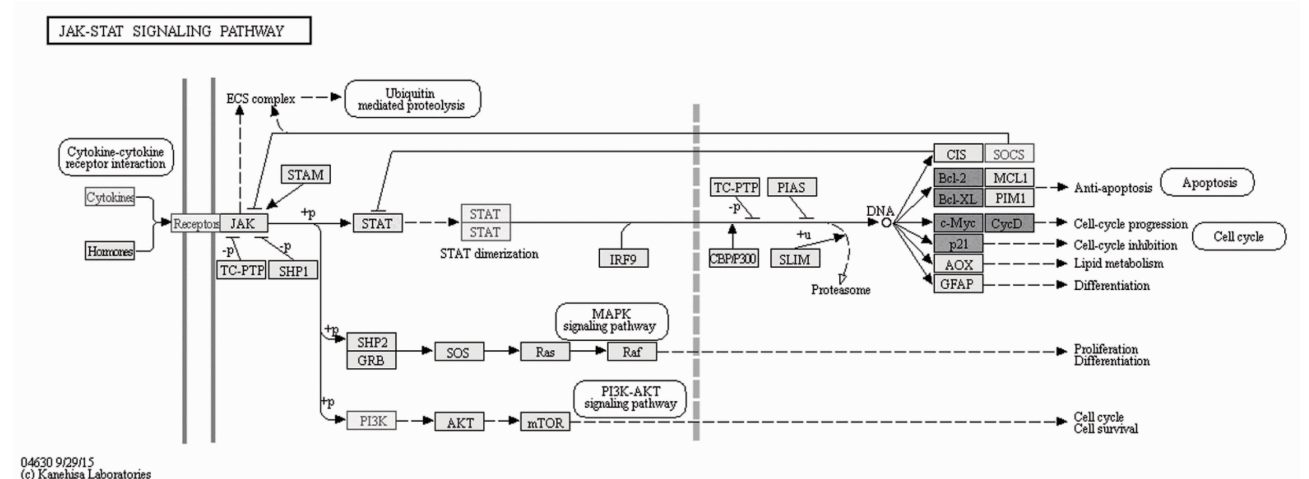


图 5 上调的靶基因生物信息学分析
Fig. 5 Up-regulated target genes bioinformatics enrichment bar graph

cGMP 依赖蛋白激酶 G (cyclic guanosine monophosphate/cGMP-dependent protein kinase G, cGMP/PKG) 信号通路, 肾素分泌, Janus 激酶/信号转导与转录激活因子 (janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 等信号通路

密切相关,而上调的靶基因主要和甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路、维生素消化和吸收通路、细胞因子与受体互作等信号通路密切相关。见图 4,5。其中下调的 JAK/STAT 信号通路显著富集,通路图见图 6。

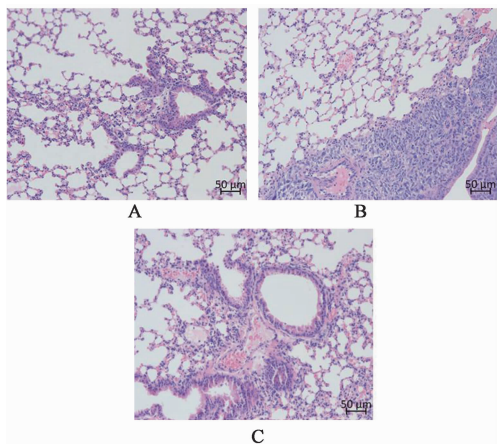


黑色背景所示基因为本研究相关的潜在靶基因

图 6 JAK/STAT 信号转导通路示意

Fig. 6 Sketch map of JAK/STAT signaling pathway

3.3 对小鼠肺组织病理学的影响 正常组小鼠肺部切片未见明显的癌变组织,结构排列整齐。模型组可见明显的癌变组织区,病变区细胞核密集,核浆比例失调、细胞核核增大、深染,无明显的肺泡结构,与正常组织形态结构对比明显。金方组肿瘤细胞密度较模型组下降,细胞核明显小于模型组,说明金方能明显改善小鼠 Lewis 原位肺癌模型肺组织的病理变化。见图 7。



A. 正常组; B. 模型组; C. 金方组

图 7 金方对各组小鼠肺组织的病理形态的影响(HE, ×200)

Fig. 7 Pathological results of lung tissue in each group of mice (HE, ×200)

4 讨论

中医药在治疗肺癌方面具有自己独特的优势,在稳定病灶、延长生存时间、改善生存质量、减轻化疗毒副作用等方面发挥了显著的疗效,而且副作用小,价格相对便宜,因此已经成为肺癌综合治疗的重要组成部分^[12]。但中药成分复杂,作用层次不明,靶点众多,是目前制约中药作用机制研究的瓶颈所在。随着大数据时代的到来,基因芯片和生物信息学技术蓬勃发展,提供了从基因水平上系统全面认识中药分子机制的可能性。

中医学认为,肺癌的形成是由于正气虚损,阴阳失调,于是痰气瘀毒胶结,久而久之形成肺部积块^[13]。近年来周仲瑛教授提出肺癌的基本病机是“痰瘀郁肺、毒耗气阴”,因此化痰散结、祛瘀解毒、益气养阴是其主要的治疗策略。金方为周仲瑛教授临床常用方,麦门冬汤方中重用麦冬,甘寒清润,入肺胃两经,养阴生津,滋液润燥,以清虚热,为君药。臣以人参片、甘草片、粳米、大枣益胃气、养胃阴,中气充盛,则津液自能上归于肺。肺胃气逆,故佐以少量半夏降逆下气,化其痰涎,虽属辛温之性,但与大

量麦门冬配伍则其燥被制,且麦冬得半夏则滋而不膩,相反相成。其中甘草片还能润肺利咽,调和诸药,以为使。药仅 6 味,主从有序,润降得宜,生胃阴而润肺燥,下逆气而止浊唾,亦补土生金,虚则补母之法^[14]。诸药合用,具有补气生津、润燥降逆的功效。千金苇茎汤方中苇茎(现多以芦根代替)甘寒轻浮,善清肺热,为肺病必用之品,故用以为君。冬瓜子清热化痰,利湿排脓,能清上彻下,肃降肺气,与芦根配合则清肺宣壅,涤痰排脓;薏苡仁甘淡微寒,上清肺热而排脓,下利肠胃而渗湿,二者共为臣药。桃仁活血逐瘀,可助消痈,是为佐药。方仅 4 药,结构严谨,药性平和,共具清热化痰、逐瘀排脓之效^[15]。上述两方合用,共奏益气养阴、清热解毒、祛瘀涤痰之功。周老经过临床多年的使用观察,证实了金方对于治疗肺癌效果明显,因此,对该方深入的分子机制研究具有重要理论和应用价值。

lncRNA 是一类转录本长度 > 200 个核苷酸的非编码 RNA,虽然不编码蛋白质,但可以通过与靶 mRNA 3' 非翻译区部分互补配对来调节特定基因的表达,在表观遗传学、转录后水平调控癌基因和抑癌基因的表达,影响肿瘤形成和癌症进程,因此已成为肿瘤诊断、治疗及预后的潜在生物学标记物^[16-17]。通过 lncRNA 芯片技术可以快速、准确地分析数以万计的 lncRNA 基因组信息,开发疾病诊断、治疗和预后评估的新靶点。近年来有研究证据表明,一些长链非编码 lncRNA 参与了肺癌的发病进程,与肿瘤细胞的增殖分化、侵袭转移、凋亡和耐药性密切相关^[18-19]。如 YANG 等^[20]对亲本 A549 细胞和 A549/DDP 细胞进行了 lncRNA 的芯片表达谱分析,筛选出含 lncRNA AK126698 在内 1 380 条 lncRNAs 存在差异表达。TANG 等^[21]利用 lncRNA 芯片分析发现,3 种循环 lncRNA (RP11-397D12.4, AC007403.1, ERICH1-AS1) 在非小细胞肺癌(NSCLC)患者血液中的表达显著上调,可作为 NSCLC 潜在的诊断生物标志物。

课题组的前期实验研究发现,金方除了可以抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠(皮下模型)的肿瘤生长外,对非小细胞肺癌 H460 细胞也有明显的细胞毒作用,但对人体正常细胞无影响^[8, 22]。本实验在 Lewis 肺癌原位模型上再次验证了金方对肺癌的改善效果,通过检测 lncRNA, mRNA 差异表达,筛选金方抑制肺癌的相关靶点,进一步探究其抗癌的分子机制。

实验结果表明,金方治疗组和模型组共有 887

个差异表达的 lncRNA, 其中 442 个表达升高, 445 个表达降低。差异表达的 mRNA 共 610 条, 其中 376 个表达升高, 234 个表达降低。其中差异表达最明显的 lncRNA 和 mRNA 分别是 lncRNA ENSMUST00000148244 和 ASMM10P037055 (Adam12)。lncRNA ENSMUST00000148244 目前尚无报道, 有待验证。Adam12 属于去整合素-金属蛋白酶家族(a disintegrin and metalloprotease, ADAMs) 家族, 其家族成员高表达于多种恶性肿瘤组织中, 参与肿瘤的发生、发展和侵袭转移^[23]。有研究发现, 其同家族成员 Adam17 和 Adam28 在非小细胞肺癌组织中表达明显上调^[24], 本实验中肺癌原位模型经金方作用后显著下调的 Adam12 是否可作为肺癌潜在治疗的分子靶点, 仍需后续实验进一步验证。

本研究进一步进行了 lncRNA 靶基因鉴定及其功能富集分析, 结果表明, 其发挥作用的生物学过程主要包括细胞代谢正调控、初级代谢调控、高分子正调控、单细胞和多细胞生物过程、信号通路调控等。细胞组分析显示, 靶基因主要位于细胞表面和胞内细胞器。KEGG 通路分析显示, 靶基因的功能主要涉及 cGMP/PKG, 肾素分泌, JAK/STAT, 氨基酸代谢, 维生素消化和吸收, 细胞因子与受体互作等信号通路, 其中 JAK/STAT 信号通路被显著富集。JAK/STAT 信号转导通路的激活与肺癌的发生、发展密切相关, 大量研究证据表明, 该通路在调节肿瘤细胞增殖、分化、凋亡、炎症反应、侵袭转移等多种病理生理过程中均发挥着重要作用^[25-26]。张宏方等^[27]报道, 中药方“调衡方”的含药血清可以通过干预 JAK/STAT3 通路进而抑制 Lewis 肺癌细胞增殖, 促进其凋亡。在本研究中, 金方作用后, JAK/STAT 通路被显著下调, 提示其可能是金方抑制肺癌增殖的作用机制之一。

综上所述, 本研究采用基因芯片技术在全基因组水平上成功筛选出了金方干预 Lewis 肺癌原位小鼠模型后大量差异表达的 lncRNA, mRNA, 通过生物信息学手段预测并揭示了其关键的靶点, 同时利用 KEGG 数据库对预测靶点进行了通路分析, 富集到了变化较显著的通路如 JAK/STAT 信号通路, 以上工作有望为金方防治肺癌的分子机制研究提供新思路。下一步本课题组将对筛选出的关键 lncRNA 如 ENSMUST00000148244 进行功能学验证, 并在体内外进行靶基因和信号通路相关性验证, 进一步为临床应用金方治疗肺癌提供实验依据。

[参考文献]

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 68(6):394-424.

[2] 韩荣龙, 周家明, 胡陵静. 癌康宁合剂对晚期非小细胞肺癌化疗后患者维持治疗的临床评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 201-206.

[3] 李白坤, 湛宇灿, 李庆林, 等. 中医药治疗肺癌作用机制研究进展[J]. 安徽中医药大学学报, 2018, 37(3): 90-93.

[4] 朱赛君, 许允琪. 中药复方治疗肺癌作用机理的实验研究进展[J]. 中医药导报, 2018, 24(12): 57-61.

[5] 王珊珊, 郭茗, 朱垚, 等. 国医大师周仲瑛教授辨治肺癌经验[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12): 4332-4335.

[6] 高浩学. 麦门冬合千金苇茎汤抗肺癌效应物质基础及其苇茎的化学成分研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2009.

[7] 李炜, 唐于平, 高浩学, 等. 麦门冬合千金苇茎汤效应部位的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 78-81.

[8] 熊飞, 周宗剑, 姜森, 等. 麦门冬汤合苇茎汤抑制小鼠 Lewis 肺癌生长的体内实验研究[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(2): 144-147.

[9] 王金辉, 高然, 明超, 等. 长链非编码 RNA 在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(17): 2819-2822.

[10] 樊黎明, 胡志东. LncRNA 在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(2): 108-112.

[11] 马雪曼, 王笑民, 于明薇, 等. 小鼠 lewis 肺癌原位移植瘤和异位皮下移植瘤模型的对比研究[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(4): 523-526.

[12] 姜雪莲, 姚逸临, 罗斌, 等. 低剂量化疗联合中医药治疗肺癌[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(2): 381-383.

[13] 杨金坤. 现代中医肿瘤学[M]. 上海:上海中医药大学出版社, 2004: 365.

[14] 李炳照, 陈海霞, 李丽萍, 等. 实用中医方剂双解与临床[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2008: 508.

[15] 连建伟. 方剂学[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 2005: 113.

[16] Reddy K B. MicroRNA (miRNA) in cancer [J]. Cancer Cell Int, 2015, 15(1): 1-6.

[17] YANG G, LU X, YUAN L. LncRNA: a link between RNA and cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839(11): 1097-1109.

- [18] NIE W, GE H J, YANG X Q, et al. LncRNA-UCA1 exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer by targeting miR-193a-3p[J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(1): 99-106.
- [19] TAO H, YANG J J, ZHOU X, et al. Emerging role of long noncoding RNAs in lung cancer: current status and future prospects [J]. *Respir Med*, 2016, 110(1): 12-19.
- [20] YANG Y, LI H, HOU S, et al. The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA AK126698 on cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): 1-12.
- [21] TANG Q, NI Z, CHENG Z, et al. Three circulating long non-coding RNAs act as biomarkers for predicting NSCLC [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(3): 1002-1009.
- [22] 郑璐玉, 熊飞, 詹臻, 等. 麦门冬汤合金钱苇茎汤提取部位对非小细胞肺癌 H460 细胞毒作用的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(3): 60-63.
- [23] 施文, 李俊生. ADAM 家族与肿瘤关系的研究现状 [J]. *实用癌症杂志*, 2008, 23(6): 671-673.
- [24] ZHOU B B, Fridman J S, LIU X, et al. ADAM proteases, ErbB pathways and cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005, 14(6): 591-606.
- [25] Groner B, Von M V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 451(1): 1-14.
- [26] Harada D, Takigawa N, Kiura K. The role of STAT3 in non-small cell lung cancer [J]. *Cancers*, 2014, 6(2): 708-722.
- [27] 张宏方, 吴芳, 环诚, 等. 调衡方对 Lewis 肺癌细胞增殖及 JAK-STAT 信号通路的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(3): 16-19.

[责任编辑 张丰丰]