

基于高通量测序技术探讨补骨脂宁治疗肺癌的潜在机制

蔡硕¹, 陈思敏², 王媛媛^{1,3}, 刘华桢¹, 李芳¹, 张忠德^{1*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院/第二附属医院, 广州 510405;

2. 重庆市垫江县中医院, 重庆 408300;

3. 卡罗林斯卡医学院全球公共卫生系, 斯德哥尔摩 SE-10435)

[摘要] 目的:探索补骨脂宁治疗肺癌的潜在分子机制。方法:利用不同浓度的补骨脂宁干预 A549 细胞,采用噻唑蓝 (MTT)法、高通量测序技术、趋势分析、基因本体 (GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG)通路富集分析的方法分别检测 A549 细胞的增殖能力,筛选补骨脂宁抑制 A549 细胞增殖的关键基因以及关键通路,并利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR)对测序的结果进行验证,探讨补骨脂宁治疗肺癌的潜在机制。结果:补骨脂宁可明显抑制 A549 细胞的增殖,并调节细胞内 4 364 个基因的表达。通过趋势分析发现这些差异基因分别聚类在 20 个基因表达模式中,其中前 4 个基因表达模式具有统计学意义,且均为显著下调趋势,说明补骨脂宁主要通过抑制某些基因的表达,发挥抗增殖的作用;通过组间差异基因的比较,笔者发现随着补骨脂宁浓度的增加,下调基因也随之增加,细胞增殖趋势越加减弱,与趋势分析结果一致,因此,笔者着重分析高浓度补骨脂宁干预组的 278 个差异基因,GO 分子功能结果显示,补骨脂宁主要改变细胞和代谢的过程,KEGG 通路富集结果显示,补骨脂宁主要通过影响类固醇生物合成、脂肪酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、酮体的合成与降解和类固醇激素的合成等通路发挥作用,因此选取显著富集于脂质代谢通路并且 $P < 0.01$ 的差异表达基因 LSS,硬脂酰基辅酶 A 脱氢酶 (SCD),3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶基因 (HMGCS1),血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4)进行验证,Real-time PCR 显示补骨脂宁可以抑制 LSS,SCD,HMGCS1 的 mRNA 表达,升高 ANGPTL4 的 mRNA 表达,与测序结果基本一致。结论:补骨脂宁主要通过靶向脂质代谢途径相关的代谢因子,抑制 A549 细胞增殖,从而达到治疗肺癌的作用。

[关键词] 补骨脂宁; A549; 脂质代谢; 高通量测序; 肿瘤

[中图分类号] R734.2; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)14-0183-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210712

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210326.1031.001.html>

[网络出版日期] 2021-03-28 10:08

Exploration of Potential Mechanisms of Corylin Against Lung Cancer By High-throughput Sequencing

CAI Shuo¹, CHEN Si-min², WANG Yuan-yuan^{1,3}, LIU Hua-zhen¹, LI Fang¹, ZHANG Zhong-de^{1*}

(1. The Second Clinical College/The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Traditional Chinese Medicine Hospital Dianjiang Chongqing, Chongqing 408300, China;

3. Department of Global Public Health, Karolinska Institutet, Stockholm SE-10435, Sweden)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential molecular mechanism of corylin in the treatment of lung cancer. **Method:** A549 cells were treated with different concentrations of corylin, and their proliferation was detected using methye thiazolye telrazlium (MTT) reagent. Then the trend analysis and gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were conducted to screen the

[收稿日期] 20201227(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673901)

[第一作者] 蔡硕,在读博士,从事中医药治疗呼吸系统急症及传染病方向工作,E-mail:caishuocs@163.com

[通信作者] *张忠德,主任医师,博士生导师,从事中医药治疗呼吸系统急症及传染病方向工作,E-mail:doctorzzd99@163.com

key genes and pathways of corylin against A549 cell proliferation, followed by the verification of sequencing results by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Corylin inhibited the proliferation of A549 cells and regulated the expression of 4 364 genes in cells. The trend analysis revealed that these genes were clustered into 20 distinct modules, among which four were significantly down-regulated, suggesting that corylin exerted the anti-proliferation effect by inhibiting the expression of some genes. The inter-group comparison of differentially expressed genes (DEGs) showed that the elevation in the concentration of corylin resulted in more down-regulated genes but weakened proliferation, consistent with the findings by trend analysis. The GO and KEGG enrichment analysis of 278 DEGs in the high-dose corylin group demonstrated that corylin mainly changed the cellular and metabolic processes, which was attributed to its regulation of steroid biosynthesis, fatty acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, synthesis and degradation of ketone bodies, and steroid hormone biosynthesis. The Real-time PCR results confirmed that corylin down-regulated the mRNA expression levels of LSS, stearoyl-CoA desaturase (SCD), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (HMGCS1), but up-regulated the mRNA expression of recombinant human angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4), basically consistent with the transcriptomics results. **Conclusion:** Corylin inhibits A549 cell proliferation and alleviates lung cancer by targeting the related genes in lipid metabolism pathways.

[**Keywords**] corylin; A549; lipid metabolism; high-throughput sequencing; cancer

肺癌是所有癌症中发病率及致死率最高的疾病,近年来,我国肺癌患者数量不断攀升^[1-2]。目前,系统的化疗是治疗非手术型肺癌的首选治疗方案,但其不良反应显著,成本高昂。与之相比,中医药在控制癌症、改善患者生存质量方面具有独到的优势,因此从中药中寻找高效低毒的抗肿瘤活性成分,已成为肺癌新药开发的重要方向^[3-5]。

中医认为癌症的病机主要为正气不足,素体本虚,因此治疗上以扶正贯穿始终,兼以活血化瘀、清热解毒等对症治疗。此外,已有的现代医学研究证实,代谢物调控了细胞内许多功能活动,在肺癌患者的体内,癌细胞的能量代谢异于常人,糖酵解过程被过度激活,内源性脂肪酸代谢紊乱,出现代谢重塑的现象,这种代谢重塑提升了肺癌细胞增殖、侵袭迁移及上皮间质转化的能力^[6]。在肺癌的发生发展中,癌细胞增殖迁移是肺癌病情恶化的重要驱动因素^[7-9],而上皮间质转化不仅可以调节癌细胞的增殖,还可能导致肺癌患者出现耐药性^[10],很可能是癌症恶化的重要环节^[11]。因此,寻找能够干预癌细胞内代谢重塑进程,从而靶向干预肺癌细胞增殖迁移或上皮间质转化的药物在肺癌的治疗中尤为重要。补骨脂又名破故纸,具有补肾、补气血等功效,其药力温和,可以扶正以化瘀,是癌症患者补气固阳的常用药物。补骨脂宁是从补骨脂中提取出的黄酮类化合物,药理实验证明黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等作用^[12]。研究证实补骨脂宁可以显著抑制结直肠癌、乳腺癌、肝癌的癌细胞

活力,促进癌细胞凋亡,抵抗癌细胞的增殖、迁移及上皮间质转化,在控制肿瘤增长的同时,提高对依托泊苷化疗的敏感性^[13-16]。综上可见补骨脂宁有广谱的抗癌效果,在多种癌症中均呈现出较为显著的抑制癌细胞增殖迁移及抵抗癌细胞上皮间质转化的作用,由此推测,补骨脂宁对于肺癌细胞的增殖迁移等活动可能同样具有抑制的作用,可能是抑制肺癌的潜在有效药物。回顾文献,发现目前尚缺乏补骨脂宁在代谢领域以及肺癌领域中的相关研究报告,鉴于体内代谢进程在癌症发生发展中起到重要的调控作用,笔者创新性的猜测补骨脂宁可能通过调节某些代谢进程,从而抑制肺癌细胞的增殖迁移来发挥抗癌的作用。

在本研究中,笔者以补骨脂宁对肺癌细胞增殖能力的影响为初始研究,运用高通量测序技术,从转录组学方面分析补骨脂宁对A549细胞中代谢相关基因表达的影响,利用生信分析技术进一步归纳补骨脂宁对肺癌细胞中代谢进程的改变,以期高效严谨地挖掘补骨脂宁抗肺癌机制的可能方向,为进一步深入机制研究奠定科学坚实的基础。

1 材料

1.1 细胞株、药品及试剂 人非小细胞肺癌细胞系A549由广东省中医药研究院再生与转化医学中心提供,补骨脂宁(上海融禾医药科技发展有限公司,批号53947-92-5,纯度98.0%),二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号D8418),胎牛血清(TOCYTO公司,批号UT81304),磷酸盐缓冲液

(PBS, Hyclone 开发公司, 批号 SH30256.01); RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液(美国 Gibco 公司, 批号分别为 11875-093, 25300062), 噻唑蓝(MTT, 美国 MCE 公司, 批号 HY-15924), trizol(美国 Invitrogen 公司, 批号 15596018), Evo M-MLV 型反转录试剂预混液, Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(广州瑞真公司, 批号分别为 AG11706, AG11718), 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶[GAPDH, 生工生物工程(上海)有限公司, 批号 B661104]。

1.2 实验仪器 A49891 型自动细胞计数仪, MK3 型酶标仪, ABI7500 型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪, Qubit 2.0 型荧光定量仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); T100 小型梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), B30142 型低温冷冻离心机(美国 Beckman 公司), CX33 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), PE150 型 HiSeq3000/4000 测序仪(美国 Illumina 公司), G2939BA 型 2100 生物分析仪(美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色实验 A549 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养, 置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱中, 用胰酶消化处于指数生长期的 A549 细胞, 并制成单细胞悬液, 以每孔 1×10⁴ 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁后, 每孔依次加入质量浓度为 10, 20, 40, 80, 160, 320 mg·L⁻¹ 的补骨脂宁, 每组浓度设 6 个复孔, 同时设立无加药细胞组(空白组)。在培养箱中孵育 48 h 后, 吸弃培养基, PBS 清洗后每孔加入 MTT 50 μL, 继续培养 4 h, 培养结束将板内的 MTT 弃去, 每孔加入 DMSO 试剂 150 μL, 用手振摇 10 min, 至完全溶解后用酶标仪检测 A549 细胞在 490 nm 处吸光度 *A*。以上实验重复 3 次后, 用 SPSS 19.0 求出半抑制浓度(IC₅₀), 并计算每个浓度对细胞增殖的抑制率。

2.2 基因文库构建与测序 依据 MTT 结果, 将补骨脂宁干预 A549 细胞的质量浓度设为 0, 10, 20, 40 mg·L⁻¹, 分别对应组 BL, T1, T2, T3, 每组 3 个样本; 干预 48 h 后提取 RNA, 进行 PCR 扩增, 得到最终的文库。文库检测合格后, 按照有效浓度及目标下机数据量的需求将不同文库汇集至 flowcell, cBOT 成簇后使用 Illumina HiSeq PE150 测序仪进行测序分析。该实验部分技术服务由广州赛哲生物科技股份有限公司提供。

2.3 测序数据分析 将测序得到的原始数据进行质量评估, 以得到高质量的读段, 保证数据分析的

质量。采用 Cuffliks (v2.2.1) 程序对 12 个样品中 mRNA 的表达量进行评估分析, 得到基因表达量的 FPKM 计算结果, 并对所有样本进行主成分分析(PCA)和相似性分析(ANOSIM)。使用 edgeR (v3.14.0) 程序包筛选满足条件为 FDR<0.05 且以 2 为底差异倍数(|FC|)>1 的差异表达基因(DEGs), 利用 STEM 软件对所有 DEGs 的并集进行趋势分析。选取趋势差异最显著的两组 DEGs, 利用基因本体(GO)数据库, 分别从生物学过程、细胞组分和分子功能方面进行功能注释及利用 DAVID 数据库进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。

2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) 参照 GO 和 KEGG 分析结果, 同时验证测序数据的可靠性, 选取 4 个显著的 DEGs 进行 Real-time PCR 验证。补骨脂宁干预 A549 细胞 48 h 后, 用 trizol 法提取 mRNA, 逆转录为 cDNA, 以 GAPDH 作为内参, 通过 Real-time PCR 检测目标 DEGs 的 mRNA 水平变化情况, 反应条件为 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 延伸 45 s, 共 40 个循环; 最后 95 °C 15 s, 60 °C 1 min 重复 2 次解离。所有引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列羊毛甾醇合酶(LSS)上游 5'-GAGAACGGCTCTGCGATGCTG-3', 下游 5'-GCTTGGTCTCATAGGTGGCGAAC-3', 长度 81 bp; 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)上游 5'-CTTTCTGATCATTGCCAACACA-3', 下游 5'-TGTTTCTGAAAACCTTGTTGGTGG-3', 长度 91 bp; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 1(HMGCS1)上游 5'-AAACTCTCCATACAGTGCTACC-3', 下游 5'-GTGAGTGAAAGATCATGAAGCC-3', 长度 121 bp; 血管生成素类似物 4 (ANGPTL4) 上游 5'-CCAAGCCTGCCCCGAAGAAAGAG-3', 下游 5'-CGGTTGAAGTCCACTGAGCCATC-3', 长度 112 bp; GAPDH 上游 5'-AGGTCGGTGTGAACGGA TTTG-3', 下游 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3', 长度 95 bp。

2.5 统计学分析 所有数据比较采用 SPSS 19 软件进行处理, 符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐时两组数据采用 Student *T* 检验, 多组数据采用最小显著性差异法(LSD)检验, 方差不齐时, 两组数据采用秩和检验, 多组数据采用 Tamhane's 法检验。在多组数据比较时, 若多个实验组与同一对照组进行比较则用 Dunnett 法进行检验, *P*<0.05 时数据被

认为具有统计学意义,并采用 GraphPad Prism 7(美国 GraphPad 公司)进行画图。

3 结果

3.1 补骨脂宁抑制 A549 细胞的增殖 采用 MTT 法检测补骨脂宁对 A549 细胞增殖的影响,实验结果显示,与空白组相比,不同浓度的补骨脂宁皆对 A549 细胞的增殖产生显著抑制作用($P<0.01$),并且随着用药浓度的增加,抑制效果也随之加强,见表 1。在给药 48 h 后,补骨脂宁的 IC_{50} 为 $46\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,此时可显著抑制 A549 细胞的增殖。

3.2 转录组数据质控 本实验中 12 个样本的序列数据总计 50.1×10^7 ,以碱基质量值 $\geq Q20$ 和 $Q30$ [$Q20$ (%)即每 100 个碱基中会有 1 个碱基识别出错, $Q30$ (%)每 1 000 个碱基中会有 1 个碱基识别错误]为筛选条件,经过滤后约有 49.9×10^7 (99.8%)的数据作为高质量的读段被保留下来,所有样本的基因碱基差异较小,且过滤后得到的非核糖体序列数据量超过 97%,表明测序数据质控良好,可用于后续的分析,见表 2。样本间 PCA 分析结果显示 PC1 的特征值累

表 2 测序数据质控统计

Table 2 Sequencing data quality control statistics

样本	序列数据数量/条	高质量的序列数据数量/条	质量值 $\geq Q20$ /%	质量值 $\geq Q30$ /%	GC/%	非比对核糖体的比率/%
BL-1	42 684 316	42 601 262	97.05	92.00	50.95	98.18
BL-2	43 842 072	43 762 186	96.91	91.64	51.24	98.15
BL-3	44 936 976	44 858 980	97.51	93.00	50.76	98.09
T1-1	40 834 602	40 764 748	97.30	92.45	51.10	97.47
T1-2	44 480 764	44 402 752	97.29	92.50	50.59	98.10
T1-3	38 750 132	38 675 566	97.38	92.70	50.74	97.87
T2-1	45 469 316	45 379 636	97.27	92.45	50.56	97.95
T2-2	41 197 788	41 128 642	97.44	92.84	51.12	97.83
T2-3	40 413 736	40 341 122	97.24	92.43	50.92	97.97
T3-1	40 008 894	39 935 736	97.33	92.60	50.84	97.76
T3-2	37 516 142	37 444 990	97.03	91.96	50.96	97.49
T3-3	40 683 776	40 617 030	97.18	92.17	50.97	97.65

3.3 趋势分析 通过 STEM 软件分析所有差异基因的表达量,将多个连续型样本基因的表达曲线形状聚类分析,从中挑选符合一定生物学特性的基因集。趋势分析结果显示,4 364 个 DEGs 共聚类在 20 个基因表达趋势模式中,其中模式 0, 2, 7 和 9 基因表达模式具有统计学意义,分别包含 199, 381, 242, 343 个 DEGs,且 DEGs 的表达模式均为下调趋势,见图 2。在组间差异基因对比中,BL 与 T1 比较中共有 121 个 DEGs,包括 38 个上调基因和 83 个下调基因,

表 1 不同浓度的补骨脂宁对 A549 细胞增殖的抑制作用($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Inhibitory effects of different concentrations of corylin on A549 cell proliferation ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	药物浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞增殖抑制率
空白	0	0
补骨脂宁	10	$0.33\pm 0.03^{1)}$
	20	$0.40\pm 0.06^{1)}$
	40	$0.46\pm 0.03^{1)}$
	80	$0.60\pm 0.10^{1)}$
	160	$0.63\pm 0.06^{1)}$
	320	$0.67\pm 0.08^{1)}$

注:与空白组比较 $^{1)}P<0.01$ 。

积占总方差的 57.3%,PC2 特征值累积占总方差的 25.1%,空白组与各实验组各自聚集,无明显交叉重叠,说明组间存在差异,ANOSIM 分析发现每组组间差异明显大于组内差异,组间产生显著差异($P<0.05$),提示该实验分组合理,且经不同浓度补骨脂宁干预后,A549 细胞的基因表达显示出明显改变。见图 1。

BL 与 T2 比较中共有 158 个 DEGs,其中上调与下调基因的数量分别为 30 和 128 个,BL 与 T3 比较中共有 278 个 DEGs,其中上调基因 66 个,而下调基因 212 个,综合上述结果,随着补骨脂宁浓度的增加,A549 细胞中表达改变的基因明显增多,因此认为补骨脂宁主要通过下调 A549 细胞的基因表达,发挥抗增殖的作用,且该作用与药物浓度相关,见表 3。

3.4 GO 功能富集分类 上述结果表明,补骨脂宁对 A549 细胞的作用与用药浓度显著相关,用药浓

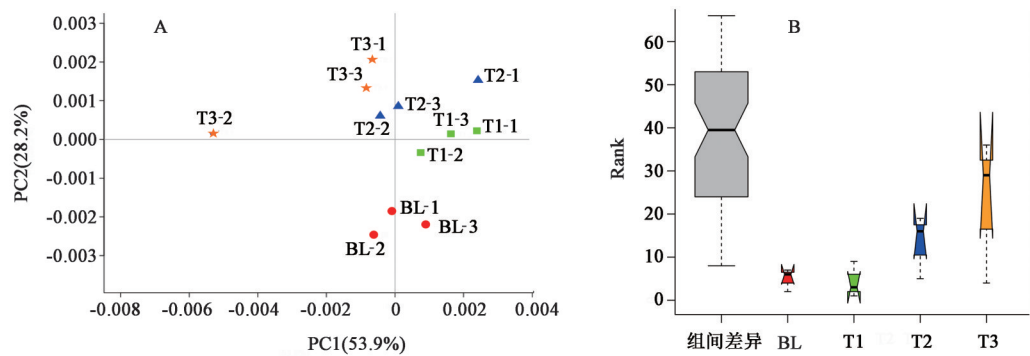
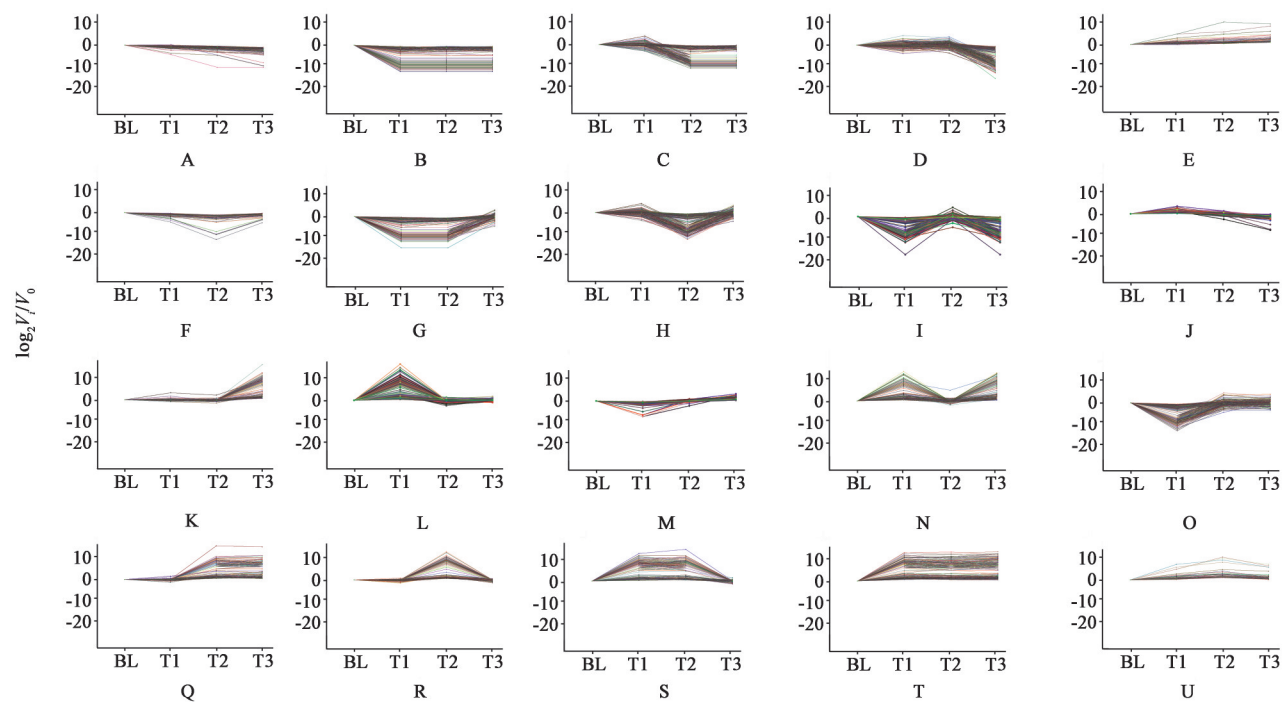


图 1 不同补骨脂宁处理组样本的 PCA(A)和 ANOSIM(B)
Fig. 1 PCA(A) and ANOSIM(B) of different corylin groups



模式 A~U 按照 P 由小到大排序,模式 A~D 趋势块差异基因均显著富集, P 均 < 0.05, 具有统计学意义
图 2 DEGs 聚类的 20 个基因表达趋势
Fig. 2 Trend of 20 gene expression patterns of DEGs

表 3 不同补骨脂宁处理组组间差异基因趋势统计
Table 3 Statistics of difference gene trends between different corylin groups

组别	上调基因	下调基因	总基因
BL-vs-T1	38	83	121
BL-vs-T2	30	128	158
BL-vs-T3	66	212	278

度越高,差异基因愈多,因此选取 T3 组与空白组比较所得的差异基因进行层级相关分析,筛选样本基因富集数目大于 5,且 $P < 0.05$ 的条目进行整理;GO 功能富集分析提示,在细胞组分中差异表达基因主要富集在细胞外区域中;而在分子功能方面主要涉

及氧化还原酶活性功能;在生物过程中主要涉及脂质代谢进程、单一生物过程和小分子代谢过程,见表 4。其中,脂质代谢过程是差异表达基因显著富集且处于较低层级的 GO term ($P = 1.92 \times 10^{-10}$),该通路中含有 48 个差异基因,2 个基因上调分别为人周脂素 -1 (PLIN1), ANGPTL4; 46 个基因下调,如 HMGCS1, SCD, LSS 等,说明补骨脂宁可能通过调节 A549 中脂质代谢来发挥作用,值得后续关注。
3.5 KEGG 通路富集分析 在 KEGG 分析中,排在前 20 的富集通路中涉及脂质代谢的通路有 5 条,分别是类固醇生物合成、脂肪酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、酮体的合成与降解和类固醇激素的合

表 4 BL 与 T3 比较的 GO 分类
Table 4 Table of BL-vs-T3 GO classification

类别	GO 注释	描述	基因数目(比率)/个(%)	富集的基因
生物 进程	GO:0006629	脂质代谢进程	48(21.15)	PLIN1,ANGPTL4,细胞色素 P450 家族 51 亚家族 A 成员 1(CYP51A1),甲基固醇单加氧酶 1(MSMO1),异戊烯基-二磷酸 8 异构酶 1(IDI1),固醇调节元件结合转录因子 1(SREBF1),妊娠特异性糖蛋白 19(CEAC),肾上腺髓质素(AM1),法呢基-二磷酸法呢基转移酶 1(FDFT1),羟类固醇 17-β 脱氢酶 14(HSD17B14),SCD,磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白 1(PIK3IP1),含有 3 的 patatin 样磷脂酶结构域(PNPLA3),脂肪酶 G(LIPG),角鲨烯环氧酶(SQLE),酪氨酸酶相关蛋白 1(TYRP1),甲羟戊酸激酶(MVK),HMGCS1,3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGCR),24-脱氢胆固醇还原酶(DHCR24),乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 2(ACAT2)等
	GO:0044710	单一生物代谢过程	71(31.28)	CYP51A1, DCN, MSMO1, 支链氨基酸转氨酶 1 (BCAT1), 亚甲基四氢叶酸环化酶 (MTHFD2), IDI1, 天冬酰胺合成酶(ASNS), SREBF1, CEA 细胞黏附分子 1(CEACAM1), FDFT1, 羟类固醇 17-β 脱氢酶 14(HSD17B14), 溶质载体家族 7 成员 8(SLC7A8), 磷酸甘油酸脱氢酶 (PHGDH), 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD), PIK3IP1, PNPLA3, 溶质载体家族 52 成员 3 (SLC52A3), 脂肪酶 G(LIPG), SQLE, TYRP1 等
	GO:0044281	小分子代谢进程	58(25.55)	BCAT1, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP), MTHFD2, ASNS, PHGDH, PSAT1, CBS, FUT1, MME, CYP51A1, MSMO1, IDI1, SREBF1, CEAC, AM1, FDFT1, HSD17B14, SCD, PIK3IP1, PNPLA3, LIPG, SQLE, TYRP1, MVK, HMGCS1, HMGCR, DHCR24, ACAT2, LDLR, ACSS2, HSD17B7, LPIN1, FADS2, AGT, PLA1A, NSDHL, FADS1, LSS, FDPS, PLB1, STARD4, MVD, PCSK9, FASN, SERPINA6, CYP7B1, DHCR7, PLCB1, PCYT2, INSIG1, APOD, AKR1C4, ABCA4, SREBF2, lnc-PAX8-6, lnc-DIRAS2-3, SULT1C2, UAP1L1, ADCY5
细胞 组成	GO:0005576	细胞外区域	98(41.18)	DCN, NADP, MTHFD2, 促甲状腺激素释放激素降解酶 (TRHDE), PHGDH, IL1A, LY3/PLAUR 结构域(LYPD3), 肾上腺髓质素 2(ADM2), Rac 家族小 GTPase 2(RAC2), 角蛋白 17(KRT17), 几丁质酶 3(CHI3L1), PSAT1, 脂肪形成调节因子(ADIRF), 类似肾素的肾上腺素家族黏附分子 3(KIRREL3), VI 型胶原蛋白 alpha 3 链(COL6A3), I 型胶原蛋白 alpha 2 链(COL1A2), ANGPTL4, 富含亮氨酸的重复 LGI 家族成员 3(LGI3), 白细胞介素 7 受体(IL7R), CD248 分子(CD248); 富含亮氨酸的重复序列包含 26(LRRC26), 角蛋白 5(KRT5), 角蛋白 14(KRT14), 瑞林 (RELN), MME, 基质金属肽酶 1 (MMP1), H2A 簇状组蛋白 18(HIST2H2AA3), 角蛋白 6A (KRT6A), serpin B 家族成员 5(SERPINB5), 类人激蛋白 2(MTRNR2L2), 丝氨酸蛋白酶 22(PRSS22), scinderin L 同源蛋白(SCIN), MIR5196, 甲状腺球蛋白(TG), 脑富集的髓磷脂相关蛋白 1(BCAS1), CEACAM1, CEA 细胞黏附分子 6(CEACAM6), 细胞间黏附分子 1(ICAM1), SLC7A8, PIK3IP1 等
	GO:0005615	细胞外空间	81(34.03)	DCN, NADP, MTHFD2, TRHDE, PHGDH, IL1A, LYPD3, RAC2, KRT17, CHI3L1, PSAT1, ADIRF, COL6A3, COL1A2, ANGPTL4, CD248, LRRC26, KRT5, KRT14, RELN 等
	GO:0044421	细胞外区域部分	83(34.87)	DCN, NADP, MTHFD2, TRHDE, PHGDH, IL1A, LYPD3, RAC2, KRT17, CHI3L1, PSAT1, ADIRF, COL6A3, COL1A2, ANGPTL4, CD248, LRRC26, KRT5, KRT14, RELN 等
分子 功能	GO:0016491	氧化还原酶活性	27(11.59)	YP51A1, MSMO1, NADP, MTHFD2, 含有二甲基苯胺单加氧酶 4 的黄素(FMO4), HSD17B14, PHGDH, SCD, SQLE, TYRP1, HMGCR, DHCR24, STEAP4, HSD17B7, FADS2, NSDHL, MIR1908, CBS, FASN, LDHAL6B, CYP7B1, DHCR7, NDUFA4 线粒体复合物类似 2(NDUFA4L2), AKR1C4, XLOC_017244, XLOC_017572, XLOC_002282, ENSG00000260170

注: P 及校正后 P 均<0.01(表 5 同)。

成,进一步佐证补骨脂宁可能通过脂质代谢通路发挥作用,因此可进一步将脂质代谢过程所涉及的相关差异基因作为探索补骨脂宁抑制肺癌增殖的切入点。见表 5。

3.6 补骨脂宁抑制 LSS, SCD, HMGCS1 的 mRNA 表达,升高 ANGPTL4 的 mRNA 表达 由上述分析可知,补骨脂宁可能通过扰乱 A549 细胞内正常的脂质代谢进程,从而影响细胞增殖,因此选择显著富集于脂质代谢通路并且 P<0.01 的差异表达基因 LSS, SCD, HMGCS1, ANGPTL4, 分别采用 Real-time PCR 进行验证,验证结果趋势与测序数据保持

一致,说明测序结果贴合实际,为补骨脂宁通过影响肿瘤细胞脂质代谢而发挥抗增殖的作用提供佐证依据。见表 6,图 3。

4 讨论

结合上述结果,笔者推测补骨脂宁主要通过调节脂质代谢途径中相关代谢基因的表达,从而对 A549 细胞产生抑制增殖的作用。脂质代谢失调是癌细胞最重要的代谢标志之一,尤其在提供能量、合成细胞膜以及脂质信号等方面。脂质代谢的改变促进了癌症的发展^[17],研究表明高度增殖的癌细胞往往显示出强大的脂质和胆固醇亲和力^[18],重新

表 5 BL-vs-T3 KEGG 富集分析

Table 5 BL-vs-T3 KEGG enrichment analysis

KEGG I 级分类	KEGG II 级分类	通路 ID	通路	基因数目/条
代谢	脂质代谢	ko00100	类固醇生物合成 Steroid biosynthesis	10
	萜类和聚酮化合物的代谢	ko00900	萜类骨架的生物合成	7
	整体和局部	ko01230	氨基酸的生物合成	6
	整体和局部	ko01212	脂肪酸代谢	5
	氨基酸代谢	ko00260	甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸的代谢	4
	整体和局部	ko01230	氨基酸的生物合成	6
	脂质代谢	ko01040	不饱和脂肪酸的生物合成	3
	碳水化合物代谢	ko00640	丙酸酯代谢	3
	脂质代谢	ko00072	酮体的合成与降解	2
	聚糖的生物合成与代谢	ko00603	糖鞘脂的生物合成-globo 系列	2
	氨基酸代谢	ko00270	半胱氨酸和蛋氨酸的代谢	3
	脂质代谢	ko00140	类固醇激素的合成	4
	碳水化合物代谢	ko00620	丙酮酸代谢	3
	整体和局部	ko01200	碳代谢	5
生物系统	免疫系统	ko04640	造血细胞谱系	6
	内分泌系统	ko04913	卵巢类固醇生成	4
	免疫系统	ko04670	白细胞跨内皮迁移	6
	内分泌系统	ko04925	醛固酮的合成与分泌	5
	消化系统	ko04974	蛋白质消化吸收	5
细胞过程	细胞运动	ko04810	肌动蛋白细胞骨架的调节	8

表 6 补骨脂宁抑制肺癌增殖作用目标基因 mRNA 表达量与对应的测序 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 6 mRNA expression of target genes and corresponding sequencing results of corylin in the treatment of lung cancer ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	药物浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	目标基因 mRNA 表达量				目标基因 mRNA 的测序			
		HMGCS1	SCD	LSS	ANGPTL4	HMGCS1	SCD	LSS	ANGPTL4
空白	0	1.00±0.20	1.0±0.16	1.0±0.19	1.0±1.20	127.73±2.09	358.16±6.37	65.49±3.64	24.67±0.77
补骨脂宁	40	0.62±0.28 ¹⁾	0.64±0.24 ¹⁾	0.35±0.15 ¹⁾	3.07±0.94 ¹⁾	30.82±1.65 ¹⁾	42.84±1.89 ¹⁾	15.18±1.67 ¹⁾	81.98±3.14 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ 。

编程脂质代谢可调节癌细胞的存活,增殖、转移扩散和对化疗的不敏感性^[18]。临床统计发现体内低密度脂蛋白水平升高的患者患肺癌的风险增加^[19],而另一方面高密度脂蛋白的升高与肺癌良好的预后密切相关^[20],实验研究也发现胆固醇合成途径的改变可以影响非小细胞肺癌的细胞活性^[21],由此可见胆固醇等物质的合成途径是肺癌发生发展不可缺少的环节,并且脂质代谢在肺癌中的作用可能是双向的,如何调节脂质代谢过程尤其是胆固醇合成途径,发挥其正向的抗癌作用,将会是肺癌研究中的新方向,因此我们选取与胆固醇合成途径相关的差异基因,进行进一步的研究探讨。

LSS在胆固醇和类固醇生物合成途径中起关键

作用,通过催化(S)-2,3-氧化角鲨烯向羊毛甾醇转化,羊毛甾醇作为胆固醇生物合成的第一个固醇,是后续合成途径的共同底物^[22-24]。虽然目前该物质在肺癌中的作用仍是一片空白,但 PHILLIPS 等^[25]最近已经确定了 MI-2 在弥漫性桥脑神经胶质瘤(DIPG)的细胞模型中表现出有效的抗肿瘤活性,并且发现 MI-2 是羊毛甾醇合酶的直接抑制剂,从而推测 MI-2 通过直接抑制羊毛甾醇合酶,胆固醇合成受到抑制,导致胆固醇耗竭和肿瘤细胞死亡。同时,我们此次实验中已发现补骨脂宁可以改变 A549 细胞中 LSS mRNA 的表达,说明 LSS 可能是靶向肺癌的重要靶点。

硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)是负责去饱和的

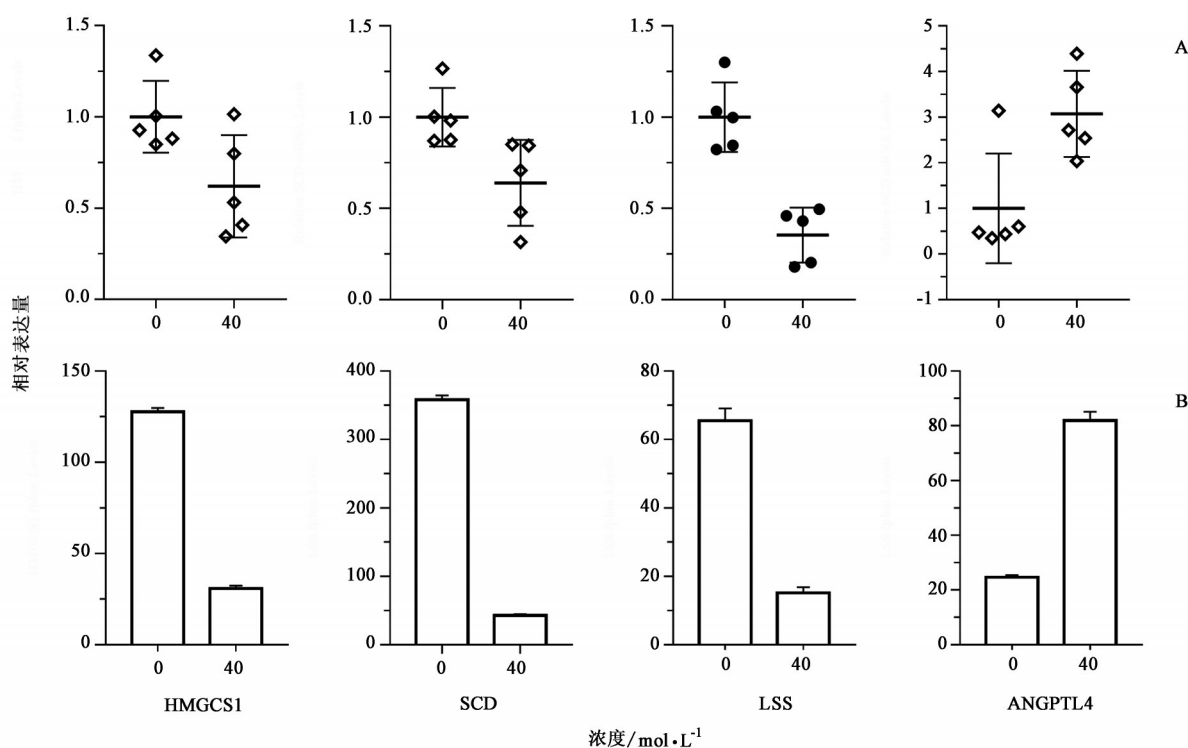


图3 目标基因 mRNA 表达量验证(A)与对应的测序(B) ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 mRNA expression of target genes (A) and corresponding sequencing results (B) ($\bar{x} \pm s, n=5$)

主要酶,将饱和脂肪酸前体生物合成单不饱和脂肪酸(MUFA)。而 MUFA 是合成磷脂、甘油三酯和胆固醇的主要底物^[26]。此外,大多数癌细胞含有较高水平的 MUFA 和 SCD,并且参与细胞增殖信号传导途径,表明 SCD 活性可能在细胞增殖和肿瘤发生中起作用^[27]。最近的研究也发现 SCD 在肺癌细胞中过表达,并与肺癌患者预后不良之间呈正相关^[28],实验研究表明 SCD 可以使 EGFR/PI3K/AKT 信号传导的激活,促进细胞上皮到间充质的表型改变^[29],从而促进肺癌细胞 A549 细胞和 H1573 细胞的增殖。因此抑制 SCD 的表达可能是抑制癌细胞扩散的有效方法。

HMGCS1 是胆固醇合成过程的限速酶,催化乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 和乙酰乙酰辅酶 A (acetoacetyl-CoA) 向 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 转化,处于整个反应的第一步,故对于胆固醇的合成非常重要^[30]。有报道证实 HMGCS1 在结肠癌组织中过表达,并积极调节结肠癌细胞的增殖,迁移和侵袭,抑制 HMGCS1 可以完全减少 EGF 诱导的结肠癌细胞增殖^[31]。而在肺癌细胞中,使用 cBioPortal 分析癌症基因组数据集,发现 HMGCS1 可在包括乳腺癌和肺癌在内的癌症中扩增^[32],在 NCI-H460 和 A549 的细胞中,FOXJ2 是与 HMGCS1 结合的上游区域,并可与 miRNA 结合,肺

癌细胞内胆固醇水平的调控不仅受 miRNA 的调节,与 STAT6 的表达也息息相关^[33]。

大量研究的结果证明,血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4) 的生物活性具有高度多面性^[34]。其是参与脂质代谢的脂肪因子,比较一致的认为是该蛋白抑制脂蛋白脂肪酶(LPL)活性,减弱了甘油三酯的清除,从而导致血浆甘油三酸酯和脂肪酸水平增加,其作用可能与该蛋白的结构域有关^[35]。在部分表达截短的 N 端 ANGPTL4 的 Angptl4-亚型小鼠中,胆固醇的水平较正常小鼠减少^[36],而在一项有关青少年肥胖的队列研究发现,ANGPTL-4 的水平变化与总胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇水平变化相关^[37],由此可见 ANGPTL4 的表达可以影响胆固醇的水平,而胆固醇在癌症中扮演着重要的角色,因此不能忽视 ANGPTL4 在癌症进展中的重要作用。研究表明 ANGPTL4 不仅具有促进肿瘤侵袭和转移的功能,其抗肿瘤作用也已明确^[38-39],不同功能的展现可能与肿瘤微环境相关^[40]。在非小细胞肺癌中,ANGPTL4 在癌组织中过表达,沉默 ANGPTL4 表达可下调 ERK 信号,明显抑制 A549 和 H520 细胞的增殖、迁移和侵袭,这也与上皮标记 E-钙黏着蛋白的增加和间质标记波形蛋白的减少有关^[41]。

综上所述,LSS、SCD、HMGCS1 作为胆固醇合成途径中的关键酶,在多种癌症细胞中过表达,而

抑制 LSS、SCD、HMGCS1 的表达,能有效的抑制肿瘤细胞的增殖。我们的研究首次发现 LSS 在肺癌 A549 细胞中过表达,并推测补骨脂宁可抑制 A549 细胞中 LSS、SCD、HMGCS1 的 mRNA 表达,影响脂质代谢中胆固醇的合成,发挥抑制肿瘤增殖的作用;同时我们还发现补骨脂宁可促进 A549 细胞中 ANGPTL4 的 mRNA 表达,ANGPTL4 与胆固醇合成以及脂质代谢密切相关,并且具有促进和抑制的双重功能,虽然之前已有研究表明 ANGPTL4 与非小细胞肺癌的进展相关,但鉴于癌细胞中脂质代谢的过程过于复杂,我们对 ANGPTL4 在癌症中的作用角色还处于认知的萌芽阶段,以及补骨脂宁对肺癌的抑制作用还需进行深入验证,因此对于 ANGPTL4 方向的相关研究仍需进行大胆、谨慎、科学的验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1):7-33.
- [2] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1):19-28.
- [3] 赵亚楠,杨爱琳,庞道然,等. 龙血竭中双黄酮化合物 HIS-4 对人肝癌 HepG2 和 SK-HEP-1 细胞的抗肿瘤作用研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7):1442-1449.
- [4] 黄雨婷,迟宗良,王姝梅,等. 甘草中的黄酮类成分及其抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(13):1532-1537.
- [5] 冯雪娇,任虹,曹学丽,等. 鸡血藤中黄酮成分的高速逆流色谱分离及其抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2011, 42(11):2244-2247.
- [6] CHANG L, FANG S, GU W. The molecular mechanism of metabolic remodeling in lung cancer[J]. J Cancer, 2020, 11(6):1403-1411.
- [7] VEGA S, MORALES V A, OCAÑA H O, et al. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death [J]. Genes Dev, 2004, 18(10):1131-1143.
- [8] MEJLVANG J, KRIAJEVSKA M, VANDEWALLE C, et al. Direct repression of cyclin D₁ by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition [J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(11):4615-4624.
- [9] EVDOKIMOVA V, TOGNON C, NG T, et al. Translational activation of snail and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition [J].

- Cancer Cell, 2009, 15(5):402-415.
- [10] SINGH A, GRENINGER P, RHODES D, et al. A gene expression signature associated with 'K-Ras addiction' reveals regulators of EMT and tumor cell survival[J]. Cancer Cell, 2009, 15(6):489-500.
- [11] TULCHINSKY E, DEMIDOV O, KRIAJEVSKA M, et al. EMT: A mechanism for escape from EGFR-targeted therapy in lung cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019, 1871(1):29-39.
- [12] 鲁亚奇,张晓,王金金,等. 补骨脂化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3):180-189.
- [13] 聂丽娟,李红梅,郭星,等. 补骨脂抗氧化及抗肿瘤活性成分的研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2015, 40(11):1461-1464.
- [14] CHEN C Y, CHEN C C, SHIEH T M, et al. Corylin suppresses hepatocellular carcinoma progression via the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, mediated by long noncoding RNA GAS5[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2):380.
- [15] CHEN C C, CHEN C Y, UENG S H, et al. Corylin increases the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to chemotherapy through long noncoding RNA RAD51-AS1-mediated inhibition of DNA repair [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(5):543.
- [16] YANG L, YAO Y, BAI Y, et al. Effect of the isoflavone corylin from cullen corylifolium on colorectal cancer growth, by targeting the STAT3 signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2021, 80:153366.
- [17] SWINNEN J V, BRUSSELMANS K, VERHOEVEN G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(4):358-365.
- [18] BELORIBI-DJEFAFLIA S, VASSEUR S, GUILLAUMOND F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells[J]. Oncogenesis, 2016, 5(1):e189.
- [19] LIU Q, LUO Q, HALIM A, et al. Targeting lipid metabolism of cancer cells: a promising therapeutic strategy for cancer[J]. Cancer Lett, 2017, 401:39-45.
- [20] LYU Z, LI N, CHEN S, et al. Risk prediction model for lung cancer incorporating metabolic markers: Development and internal validation in a Chinese population[J]. Cancer Med, 2020, 9(11):3983-3994.
- [21] LUO F, ZENG KM, ZHANG ZH, et al. Prognostic value of serum high-density lipoprotein cholesterol elevation in nonsmall cell lung cancer patients receiving radical surgery[J]. Clin Transl Med, 2020, 10

- (2):e94.
- [22] KIM H, CHOI SY, LIM J, et al. EHMT2 inhibition induces cell death in human non-small cell lung cancer by altering the cholesterol biosynthesis pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):1002.
- [23] NES W D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols [J]. *Chem Rev*, 2011, 111(10):6423-6251.
- [24] THOMAS B, NATACHA S, ALICE G, et al. Biallelic pathogenic variants in the lanosterol synthase gene *LSS* involved in the cholesterol biosynthesis cause alopecia with intellectual disability, a rare recessive neuroectodermal syndrome [J]. *Genet Med*, 2019, 21(9):2025-2035.
- [25] PHILLIPS R E, YANG Y H, SMITH R C, et al. Target identification reveals lanosterol synthase as a vulnerability in glioma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(16):7957-7962.
- [26] RIOS-ESTEVEZ J, RESH M D. Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins [J]. *Cell Rep*, 2013, 4(6):1072-1081.
- [27] FRITZ V, BENFODDA Z, RODIER G, et al. Abrogation of de novo lipogenesis by stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(6):1740-1754.
- [28] ZHANG J Q, SONG F, ZHAO X J, et al. EGFR modulates monounsaturated fatty acid synthesis through phosphorylation of SCD1 in lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):127.
- [29] SHE K, FANG S, DU W, et al. SCD1 is required for EGFR-targeting cancer therapy of lung cancer via reactivation of EGFR/PI3K/AKT signals [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:103.
- [30] VOCK C, DORING F, NITZ I. Transcriptional regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase genes by human ACBP [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 22(5/6):515-524.
- [31] ZHOU S, XU H, TANG Q, et al. Dipyrindamole enhances the cytotoxicities of trametinib against colon cancer cells through combined targeting of HMGCS1 and MEK pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19(1):135-146.
- [32] PANDYRA A A, MULLEN P J, GOARD C A, et al. Genome-wide RNAi analysis reveals that simultaneous inhibition of specific mevalonate pathway genes potentiates tumor cell death [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29):26909-26921.
- [33] DUBEY R, SAINI N. STAT6 silencing up-regulates cholesterol synthesis via miR-197/FOXJ2 axis and induces ER stress-mediated apoptosis in lung cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(1):32-43.
- [34] MANDARD S, ZANDBERGEN F, VAN S E, et al. The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(2):934-944.
- [35] ARYAL B, PRICE N L, SUAREZ Y, et al. ANGPTL4 in metabolic and cardiovascular disease [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(8):723-734.
- [36] OTENG A B, RUPPERT P M M, BOUTENS L, et al. Characterization of ANGPTL4 function in macrophages and adipocytes using Angptl4-knockout and Angptl4-hypomorphic mice [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(10):1741-1754.
- [37] BARJA-FERNANDEZ S, FOLGUERIA C, CASTELAO C, et al. ANGPTL-4 is associated with obesity and lipid profile in children and adolescents [J]. *Nutrients*, 2019, 11(6):1340.
- [38] TAN M J, TEO Z Q, SNG M K, et al. Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(6):677-688.
- [39] GALAUP A, CAZES A, LE J S, et al. Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(49):18721-18726.
- [40] LAURA L P, LISTI ANGELA, STEFANO C, et al. Potential role of ANGPTL4 in the cross talk between metabolism and cancer through PPAR signaling pathway [J]. *PPAR Res*, 2017, 2017:1-15.
- [41] ZHU X M, GUO X B, WU S, et al. ANGPTL4 Correlates with NSCLC progression and regulates epithelial-mesenchymal transition via ERK Pathway [J]. *Lung*, 2016, 194(4):637-646.

[责任编辑 顾雪竹]