

针灸调控结肠炎相关性结肠癌大鼠结肠肿瘤增殖相关的 circRNA 表达谱的研究

姚重界^{1,2}, 祁琴^{1,2}, 赵继梦^{1,2}, 乔宇^{1,2}, 李峰^{1,2}, 李昆珊^{1,2}, 黄艳^{1,2}, 陈子怡¹, 徐静¹, 孙可鑫¹, 顾沐恩^{1,2}, 吴焕淦^{1,2}

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; 2. 上海市针灸经络研究所, 上海 200030)

【摘要】 目的 探索针灸对结肠炎相关性结肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CAC)大鼠结肠环状 RNA(circular RNA, circRNA)表达谱的影响, 阐释针灸调控 CAC 肿瘤细胞增殖相关的 circRNA 的可能机制。**方法** 将 SD 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、隔药灸组和电针组, 采用氧化偶氮甲烷和葡聚糖硫酸钠溶液诱导 CAC 大鼠模型, 造模成功后, 隔药灸组和电针组在天枢和气海穴分别进行相应干预, 每连续 6 次治疗间隔 1 次, 持续 4 周。观察大鼠结肠肿瘤负荷情况, 采用 HE 染色法观察大鼠结肠组织病理学变化并评分, 采用 circRNA-seq 高通量测序检测大鼠结肠组织 circRNA 表达谱, 筛选出针灸调控与 CAC 肿瘤增殖相关的 circRNAs 并采用 qRT-PCR 法进行验证, 通过生物信息学分析, 对 CAC 肿瘤增殖相关性 circRNAs 进行功能分析。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠肿瘤数量、肿瘤直径、肿瘤负荷量显著增加($P<0.01$), 结肠组织损伤严重, 可见不同程度的异型增生且组织病理学评分升高($P<0.01$); 与模型组比较, 隔药灸组、电针组大鼠肿瘤数量、肿瘤直径、肿瘤负荷量显著降低($P<0.01$), 大鼠结肠黏膜可见炎症性改变, 组织结构基本清晰, 组织病理学评分显著降低($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组大鼠结肠组织有 158 个可能与肿瘤增殖相关的差异表达 circRNAs, 隔药灸干预 CAC 肿瘤增殖相关的关键 circRNAs 有 23 个, 电针干预 CAC 肿瘤增殖相关的关键 circRNAs 有 30 个, 隔药灸与电针共同干预的 CAC 肿瘤增殖相关 circRNAs 有 10 个, 其中 rno_circ:chr10:3301041-3304937 和 rno_circ:chr6:93404013-93407172 的表达经验证符合测序结果($P<0.05$)。**结论** CAC 大鼠结肠组织 circRNA 表达谱异常, 隔药灸和电针均能抑制 AOM-DSS 诱导的 CAC 大鼠结肠肿瘤增殖, 影响与 CAC 大鼠肿瘤增殖相关性 circRNA 表达谱, 而上调 rno_circ:chr10:3301041-3304937 并下调 rno_circ:chr6:93404013-93407172 可能是抑制 CAC 大鼠结肠肿瘤增殖的关键机制之一。

【关键词】 针灸疗法; 环状 RNA; 高通量测序; 基因表达谱; 结肠炎相关肿瘤; 结肠炎相关性结肠癌; 大鼠

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2023.13.3012

Study on the circRNA expression profile related to colonic tumor proliferation regulated by acupuncture-moxibustion in colitis-associated colorectal cancer rats YAO Chongjie¹, QI Qin^{1,2}, ZHAO Jimeng^{1,2}, QIAO Yu^{1,2}, LI Feng^{1,2}, LI Kunshan^{1,2}, HUANG Yan^{1,2}, CHEN Ziyi¹, XU Jing¹, SUN Kexin¹, GU Muen^{1,2}, WU Huangan^{1,2}. 1.Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2.Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China

[Abstract] Objective To explore the effects of acupuncture-moxibustion on the colonic circular RNA (circRNA)

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973953, 82004474, 81873372); 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院院级基金项目(2021yygq02); 上海中医药大学预算内项目(2021LK094); 上海市卫健委课题(20204Y0245)

作者简介: 姚重界(1992—), 男, 2019 级博士生, Email:goodluckyaoshutcm.edu.cn

通信作者: 顾沐恩(1985—), 女, 副主任医师, Email:390116146@qq.com

吴焕淦(1956—), 男, 教授, Email:wuhuangan@126.com

expression profile in colitis-associated colorectal cancer (CAC) rats and interpret the plausible mechanism in acupuncture-moxibustion regulating circRNA related to tumor cell proliferation in CAC. **Method** Male Sprague Dawley rats were randomly divided into a normal group, a model group, a herb-partitioned moxibustion group, and an electroacupuncture group. The CAC rat model was induced by Azoxymethane plus Dextran sodium sulfate (AOM-DSS). After successful modeling, the herb-partitioned moxibustion group and electroacupuncture group were subjected to the corresponding intervention at Tianshu (ST25) and Qihai (CV6) for 4 weeks with 1 interval between every 6 consecutive treatments. The colonic tumor load of the rats was observed. The pathological changes in rats' colon were observed and scored using HE staining. CircRNA-seq high-throughput sequencing was used to detect the circRNA expression profile in rats' colon tissues. CircRNAs related to the regulation of acupuncture-moxibustion and CAC tumor proliferation were screened and verified using qRT-PCR. Functional analysis of circRNAs related to CAC tumor proliferation was performed using bioinformatic analysis. **Result** Compared with the normal group, the number of tumors, tumor diameter, and tumor load increased significantly in the model group ($P < 0.01$), along with seriously damaged colonic tissues, various degrees of dysplasia, and a markedly increased histopathology score ($P < 0.01$). Compared with the model group, the number of tumors, tumor diameter, and tumor load dropped significantly in the herb-partitioned moxibustion group and electroacupuncture group ($P < 0.01$), along with inflammatory changes in the colonic mucosa, basically clear tissue structures, and a notably decreased histopathology score ($P < 0.01$). Compared with the normal group, 158 differentially expressed circRNAs which might be related to tumor proliferation were discovered in the colonic tissues of the model group rats, there were 23 key circRNAs related to herb-partitioned moxibustion intervening CAC tumor proliferation and 30 key circRNAs related to electroacupuncture intervening CAC tumor proliferation, and there were 10 circRNAs related to CAC tumor proliferation interfered by both herb-partitioned moxibustion and electroacupuncture. Of these circRNAs, the expression of rno_circ:chr10:3301041-3304937 and rno_circ:chr6:93404013-93407172 was consistent with the sequencing results ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression profile of circRNA is abnormal in colonic tissues of CAC rats. Herb-partitioned moxibustion and electroacupuncture can inhibit colonic tumor proliferation in CAC rats induced by AOM-DSS, affecting the expression profile of circRNA associated with tumor proliferation in CAC. Up-regulating rno_circ:chr10:3301041-3304937 and down-regulating rno_circ:chr6:93404013-93407172 may be one of the key mechanisms to inhibit the proliferation of colonic tumors in CAC rats.

[Key words] Acupuncture-moxibustion therapy; CircRNA; High-throughput sequencing; Gene expression profile; Colitis-associated neoplasms; colitis-associated colorectal cancer; Rats

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界范围内最常见的癌症之一,在我国CRC的发病率与死亡率都位居前五名^[1]。结肠炎相关结直肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CAC)是CRC中的一种,与溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)密切相关,UC的癌变率较高,转变为CAC的患者也相对更年轻,且更容易发生降结肠多灶性病变^[2],通过抑制UC的炎症情况有助于减少CAC的发生^[3],是防治CAC的有效手段。近年来,环状RNA(circular RNA, circRNA)成为了生命科学领域的研究热点,其不受RNA外切酶的影响,表达稳定,不易降解,并具有高度稳定性、物种保守

性以及细胞组织特异性和疾病特异性,故可参与多种生物体生命活动的调控,尤其可为肿瘤疾病提供新的生物标志物与治疗靶点^[4]。

针灸作为中医治疗的主要手段之一,在改善恶性肿瘤症状及放疗副作用方面具有很大优势。课题组在前期的临床试验中,通过长期针灸治疗UC的临床疗效观察,发现针灸治疗可以显著改善患者的症状^[5],也发现化脓灸对消化道恶性肿瘤患者的免疫功能具有调节作用,进而改善其临床症状与生活质量^[6]。但针灸对CAC的效应机制尚不明确,针灸是否通过影响circRNA表达谱,调控与CAC肿瘤增殖相关的circRNAs发挥作

用?本研究从这一角度出发,拟采用 circRNA-seq 高通量测序方法筛选 CAC 模型大鼠结肠组织差异表达的 circRNAs,结合生物信息学技术和方法,分析 CAC 肿瘤增殖相关性的关键 circRNAs,并结合其亲本基因进行生物信息学分析,找出与 CAC 高度相关的 circRNAs 参与的生物学功能及相关信号通路,为针灸应用于临床防治 CAC 提供科学的实验依据和理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 清洁级大鼠 40 只,体质量(180±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号 SCXK(沪)2012-0002;饲养于上海中医药大学实验动物中心屏障内,饲养环境为 12 h 昼夜节律交替,室温(20±2)℃,室内相对湿度 50%~70%。本研究中的所有操作均通过上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审查号为 SZY201804018)。

1.2 主要试剂与仪器

氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)(美国 Sigma 公司, A5486);葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)(美国 MpBiomedical 公司, 0216011090);精制艾绒(南阳汉医艾绒有限公司);桂附 1 号方(上海华济药业);TRIzol reagent(美国 Life Technologies 公司, 15596026);RNA ScreenTape&RNA Reagent(美国 Agilent Technologies 公司);D1000 ScreenTape&D1000 Reagent(美国 Agilent Technologies 公司);HiSeq 3000/4000 SBS Kit(美国 Illumina 公司);PCR 引物(广州市锐博生物科技有限公司)。韩式电针仪(南京济生医疗科技有限公司);Agilent 2200 Tape Station(美国 Agilent Technologies 公司);紫外分光光度计 K5500(北京凯奥公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 模型制备与分组

将 40 只大鼠随机分为正常组、模型组、隔药灸组和电针组,每组 10 只。模型组、隔药灸组和电针组,在适应性饲养 1 周后,用浓度为 2 mg/mL 的 AOM 溶液以 12.5 mg/(kg·bw)为标准对大鼠进行腹腔注射^[7]。1 周后予反复 3 个周期的炎症刺激,其中第一个周期为 3%的 DSS 溶液,饮用 4 d 后改用正常饮水 17 d;第二周期同前;第三个周期为 4%的 DSS 溶液,饮用 4 d 后改用正常饮水 10 d。每日观察大鼠的一般

情况,如饮水量、饮水量、精神状态、皮毛光泽度、大便秘性状等。

1.4 干预方法

干预穴位取天枢和气海,干预前用动物专用剃毛器去除天枢和气海部位的毛发。隔药灸组,将附子、肉桂、木香等碾粉后,加入黄酒拌成糊状制成直径约 1 cm、厚约 0.3 cm 大小的药饼,置于穴位上;艾炷以精制艾绒捏成圆锥状,重量约 90 mg,点燃后置于药饼上。每次每穴灸 2 壮,每日 1 次,每连续 6 次治疗间隔 1 次,持续 4 周。电针组,采用 0.25 mm×25 mm 毫针刺 0.2~0.3 cm,针刺后立即接入电针仪,疏密波,频率 2/100 Hz,电流 1 mA。每次 20 min,每日 1 次,每连续 6 次治疗间隔 1 次,持续 4 周。正常组、模型组不予针灸干预,只做与干预组相同的抓取与固定。

1.5 标本采集与处理

取材前各组大鼠禁食不禁水 24 h,用 2%戊巴比妥钠溶液 50 mg/(kg·bw)腹腔注射麻醉。将大鼠仰卧于鼠板上,快速暴露腹腔并分离出结肠组织,以盲肠为主要解剖标志,从回盲交界处到肛门为结直肠组织,取出结直肠后沿主轴纵向剪开,用 0.9%生理盐水将内容物洗净。观察组织宏观情况,记录肿瘤的数量及大小。从结肠中下部取所需部分平均分成 3 份,其中 1 份置于 4%多聚甲醛中固定,其余 2 份分别放入冻存管中置于 -80℃冰箱中备用。

1.6 大鼠肿瘤负荷情况评估

参考 NEUFERT C^[8]的标准,用肿瘤负荷来评估结肠肿瘤的宏观情况,并从以下 3 个方面进行。宏观肉眼可见的肿瘤个数,计算肿瘤的大小(平均直径),通过组内每只大鼠肿瘤的平均直径计算肿瘤负荷。

1.7 大鼠结肠组织病理学观察

将固定在 4%多聚甲醛固定液中的大鼠结肠组织样本进行脱水、包埋,并制备成 4 μm 厚的切片,将切片常规脱蜡至水为二甲苯 I、II 各 20 min;下行梯度乙醇为 100%、90%、80%、70%乙醇各 5 min;双蒸水 5 min×2 次;苏木素浸染 3 min,流水冲洗 10 min,1%盐酸乙醇分化 1 s,流水冲洗 5 min,伊红浸染 5 min;流水冲洗 3 min,观察着色情况;二甲苯 I、II 透明各 15 min;封片,于光学显微镜下观察大鼠结肠黏膜上皮组织形态学变化并评分,参考 ROSE A H 等^[9]提出的结肠癌病理评分方法。无肿瘤或异型增生为 1 分;基底核出现轻度核膨大,核拥挤并增色,细胞内黏蛋白减少

或丢失为 2 分;出现明显的核分层,更严重的增色和多形性,结构畸变明显为 3 分;出现腺体背靠背,中间无间质存在,并有大量异性增生并向基底膜浸润为 4 分。

1.8 circRNA 建立文库、circRNA-seq 高通量测序及信息分析

采用 Trizol 的方法提取总 RNA,每组随机挑选 3 个样本,采用 K5500 和 Agilent2200 对提取的总 RNA 进行质量检测。以 2 μg 总 RNA 的起始量进行文库的构建,按照 Illumina 平台仪器对应 UserGuide 中所述的方法进行上机样本制备。上机后,使用 Pair End Flow Cell,在高通量测序仪 Hiseq3000 上进行操作,并运行 PairEnd 标准测序程序,测序模式 PE150。序列预测将用于 circRNA 的命名(物种名简写_circ:染色体:起始位置-终止位置);表达值的计算将用于差异表

达分析,不再单独以结果的形式列出,差异程度由折叠倍率(fold change, FC)体现。差异表达分析采用 DESeq 方法,计算不同组之间 circRNA 表达差异的 *P* 值。差异 circRNA 的界定标准是 *P* 值<0.05 且 log2FC 的绝对值>1。

1.9 差异表达 circRNA 的 qRT-PCR 验证

通过分析差异表达的 circRNA,筛选出隔药灸与电针干预 CAC 肿瘤增殖相关的关键 circRNA 进行 qRT-PCR 验证。实验以β-actin 为内参,每个样本设 2 个复孔。在提取的总 RNA 中,按顺序加入试剂与反应物完成 RNA 逆转录后,进行聚合酶链反应,引物序列见表 1。进行 PCR 扩增条件为 95 ℃ 10 min、95 ℃ 15 s、62 ℃ 30 s 共 40 个循环,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据分析。

表 1 目的 circRNA 引物序列

circRNA ID	引物序列	产物长度
rno_circ:chr10:33010413304937	F:5' GAGACGAAGATGAGGAGCCC3'	83 bp
	R:5' GCATCGCCTCTTTCAAGTTTT3'	
rno_circ:chr10:6341217563418716	F:5' TATGGCAATACGGGAAAGGG3'	145 bp
	R:5' GGGTGTGTGTCAGAATTCGA3'	
rno_circ:chr6:93404013-93407172	F:5' ATCAATCAGAGATTCACTCGTGG3'	147 bp
	R:5' ACTTACAAAGCAGGTCCGCA3'	

1.10 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。若数据服从正态分布,用均数±标准差表示;若不服从正态分布,用中位数(四分位数间距)表示。若数据服从正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析,进一步采用 LSD 检验进行两两比较;若不服从正态分布,则采用秩和检验分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大体情况比较

正常组大鼠毛色雪白光泽,饮食正常,体质量稳定增长,反应灵敏,精神良好,便质软硬适中,呈颗粒状。模型组大鼠被毛蓬乱且微微发黄,饮食稍有减少,体质量虽呈增长趋势但有波动性变化,精神欠佳,便质稀软,多数大鼠肛周时有外漏的稀便甚至有血便,气味秽臭。隔药灸组大鼠被毛较模型组改善,饮食基本正常,开始体质量有所波动但后期稳定增长,精神转佳,开始粪便稀时不成形甚至有血便,后期便质基本正常偶有偏稀及出现血便情况。电针组大鼠被毛较模型组改善,

饮食基本正常,开始体质量有所波动但后期稳定增长,精神转佳,开始粪便稀时不成形甚至有血便,后期便质时有偏稀,但无血便。

2.2 4 组直肠解剖图与肿瘤负荷情况比较

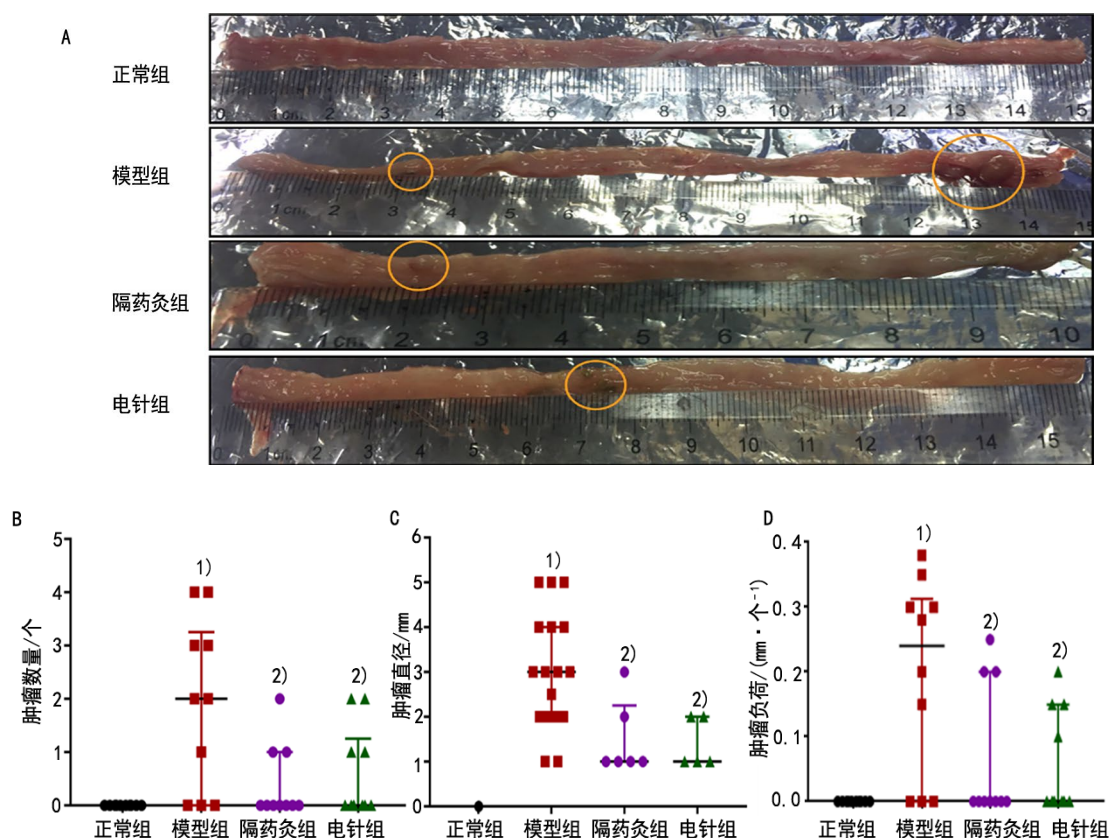
从肿瘤的宏观数量上来看,正常组大鼠少于模型组(*P*<0.01),模型组大鼠显著多于隔药灸和电针组(*P*<0.01),而隔药灸组与电针组比较差异无统计学意义(*P*>0.05);从肿瘤的直径上来看,正常组大鼠短于模型组(*P*<0.01),模型组大鼠显著长于隔药灸和电针组(*P*<0.01),而隔药灸与电针组比较差异无统计学意义(*P*>0.05);用各组肿瘤的平均直径计算每只大鼠的肿瘤负荷,正常组大鼠肿瘤负荷低于模型组(*P*<0.01),模型组大鼠的肿瘤负荷显著高于隔药灸和电针组(*P*<0.01),而隔药灸组与电针组比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。提示隔药灸与电针对 CAC 大鼠的肿瘤负荷均有改善作用,且两种干预方式结果无明显差异。详见图 1。

2.3 4 组结肠组织观察及病理评分比较

正常组大鼠结肠黏膜结构清晰,结肠上皮组织完

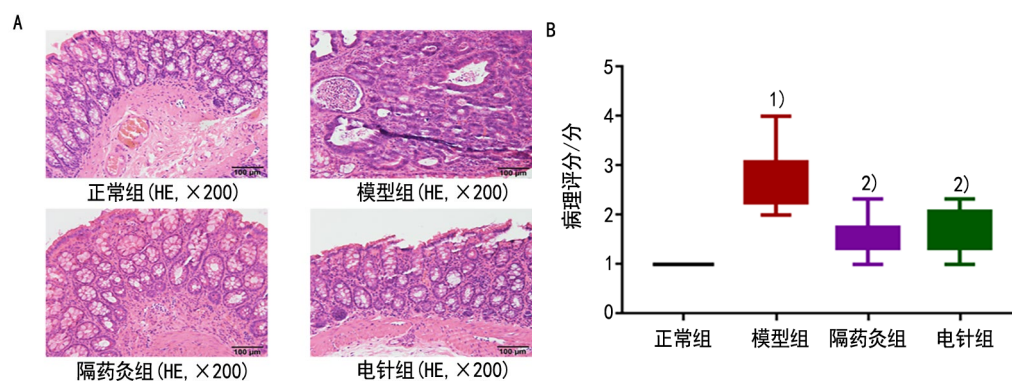
整,腺体平行整齐排列,黏膜固有层可见毛细血管和少量散在的淋巴细胞,无明显的炎症细胞浸润,未见充血、水肿等,有时可见结肠结合淋巴结;模型组大鼠结肠黏膜可见弥漫性的炎症改变,淋巴细胞浸润,固有腺体减少并萎缩,隐窝拉长,细胞内黏蛋白丢失,组织结构紊乱,细胞异型,不同级别异型增生形成并向基底浸润;隔药灸组大鼠结肠黏膜可见炎症性改变,固有腺体相对减少并伴有隐窝拉长,细胞内黏蛋白少量减少,组

织结构基本清晰;电针组大鼠结肠黏膜可见炎症性改变,固有腺体减少并伴有隐窝拉长,细胞内黏蛋白部分丢失,组织结构基本清晰。与正常组比较,模型组大鼠结肠组织内病变情况较重,病理学评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,隔药灸和电针组病变程度减轻,病理学评分显著降低($P<0.01$),隔药灸与电针组病理学评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 2。



注:A为大鼠直肠解剖图,黄色标记处为结肠肿瘤增殖部位,可见模型组肿瘤数量多且体积较大,而电针组和隔药灸组肿瘤数量少且体积较小。B、C、D为大鼠肿瘤负荷情况评估。与正常组比较¹⁾ $P<0.01$,与模型组比较²⁾ $P<0.01$ 。

图1 4组直肠解剖图与肿瘤负荷情况比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

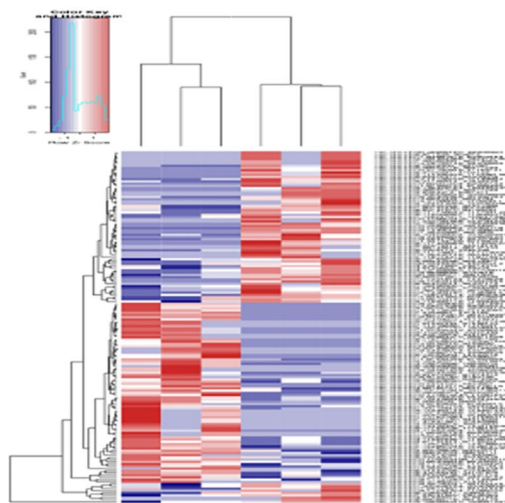


注:A为大鼠结肠组织病理学观察(HE, $\times 200$);B为结肠组织病理学评分。与正常组比较¹⁾ $P<0.01$,与模型组比较²⁾ $P<0.01$ 。

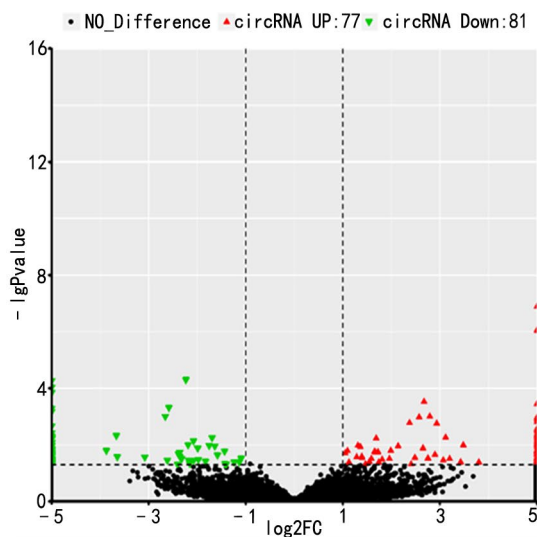
图2 4组结肠组织观察及病理学评分($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

2.4 CAC 肿瘤增殖相关性 circRNA 表达谱

与正常组比较,模型组大鼠结肠组织中共体现 158 个差异表达的 circRNAs,其中表达上调的有



77 个,下调的有 81 个。通过将归一化后的数值绘制成热图、散点图,可直观地显示出模型组与正常组之间的 circRNAs 表达的差异,具体分析见图 3。



注:左图为热图,每个小方格表示每个基因,其颜色表示该基因表达量大小,

表达量越大颜色越深(红色为上调,蓝为下调),每行表示每个基因在不同样本中的表达量情况,

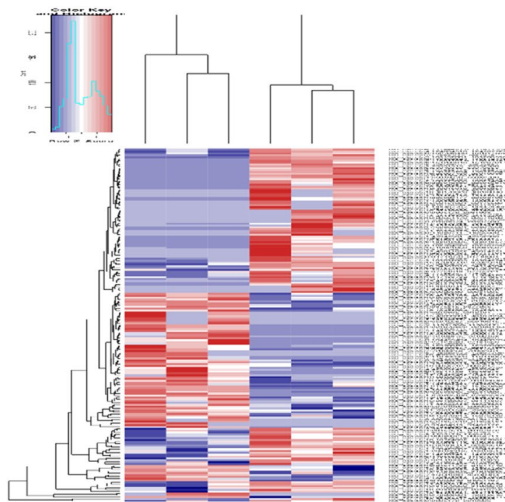
每列表示每个样品中所有基因的表达量情况;右图为散点图,横坐标代表 circRNAs 在不同样本中表达倍数变化;

纵坐标代表 circRNAs 表达量变化差异的统计学显著性;红点表示显著上调的 circRNAs,绿点表示显著下调的 circRNAs。

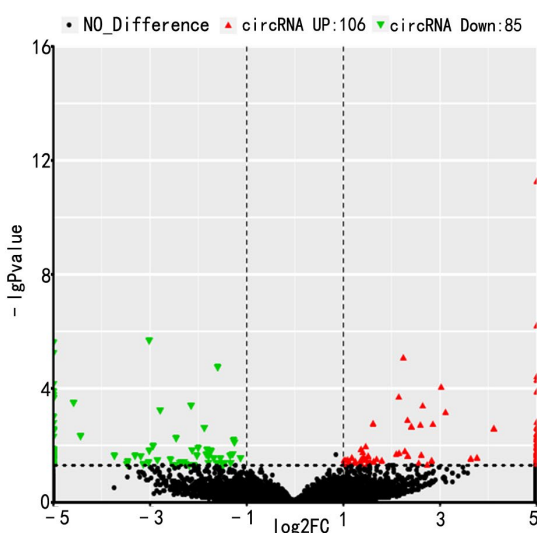
图 3 模型组与正常组结肠组织 circRNAs 差异表达分析热图与散点图

2.5 隔药灸对 CAC 肿瘤增殖相关性 circRNA 表达谱的影响

与模型组比较,隔药灸组大鼠结肠组织中共体现 191 个差异表达的 circRNAs,其中表达上调的有



106 个,下调的有 85 个。通过将归一化后的数值绘制成热图、火山图,可直观地显示出隔药灸组与模型组之间的 circRNAs 表达的差异,具体分析见图 4。



注:左图为热图,每个小方格表示每个基因,其颜色表示该基因表达量大小,

表达量越大颜色越深(红色为上调,蓝为下调),每行表示每个基因在不同样本中的表达量情况,

每列表示每个样品中所有基因的表达量情况;右图为散点图,横坐标代表 circRNAs 在不同样本中表达倍数变化;

纵坐标代表 circRNAs 表达量变化差异的统计学显著性;红点表示显著上调的 circRNAs,绿点表示显著下调的 circRNAs。

图 4 隔药灸组与模型组结肠组织 circRNAs 差异表达分析热图与散点图

在模型组与隔药灸组中共同发生差异表达的 circRNAs 有 23 个, 其中在模型组上调同时在隔药灸组下调的有 6 个, 在模型组下调同时在隔药灸组上调的有 17 个, 详见表 2。

表 2 在模型组与隔药灸组中共同发生差异表达的 circRNAs

circRNA ID	gene	log ₂ FC(正常组-模型组)	P 值	log ₂ FC(模型组-隔药灸组)	P 值
rno_circ:chr8:68089178-68154119	Map2k5	*	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr6:93404013-93407172	Actr10	*	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr20:48899180-48909560	Rtn4ipl	*	<0.05	#	<0.05
rno_circ:chr3:133012095-133043574	Tasp1	*	<0.05	#	<0.01
rno_circ:chr8:84741970-84748991	Lrrc1	3.12	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr7:35041630-35048464	Fgd6	1.05	<0.05	- 3.02	<0.01
rno_circ:chr10:3301041-3304937	Pdxcl	#	<0.01	*	<0.01
rno_circ:chr9:81573667-81574212	Tmbim1	#	<0.01	*	<0.05
rno_circ:chr10:63412175-63418716	Gosr1	#	<0.01	*	<0.01
rno_circ:chr11:73126466-73144093	Acap2	#	<0.01	*	<0.05
rno_circ:chr19:29664470-29671928	Inpp4b	#	<0.05	*	<0.05
rno_circ:chr1:47947561-47952986	Wtap	#	<0.05	*	<0.01
rno_circ:chr1:235793877-235800597	Vps13a	#	<0.05	*	<0.05
rno_circ:chr3:140058428-140061239	Rin2	#	<0.05	*	<0.05
rno_circ:chr6:44055353-44107579	Mboat2	- 2.24	<0.01	1.49	<0.05
rno_circ:chr4:115636561-115643263	Zfp638	- 2.19	<0.05	2.41	<0.01
rno_circ:chr2:240822115-240867796	Nfkb1	- 2.08	<0.01	2.33	<0.01
rno_circ:chr2:196608497-196620788	Arnt	- 2.07	<0.05	2.09	<0.05
rno_circ:chr3:67751613-67755221	Nckap1	- 1.99	<0.05	1.69	<0.05
rno_circ:chr10:29318809-29319752	Pwpp2a	- 1.76	<0.05	1.61	<0.01
rno_circ:chr8:91509748-91527174	Bckdhb	- 1.70	<0.01	1.37	<0.05
rno_circ:chr9:88630024-88653711	Agfg1	- 1.40	<0.05	1.37	<0.05
rno_circ:chr6:21334766-21354603	Ltbp1	- 1.10	<0.05	1.05	<0.05

注:*为此 circRNA 在对照样本中完全不表达, 仅在干预后表达;#为此 circRNA 仅在对照样本中表达, 但在干预后被完全沉默, 故 log₂FC 无法计算, 以组间表达的差值作为排序主要依据。以下表 4、表 5 同。

2.6 电针对 CAC 肿瘤增殖相关性 circRNA 表达谱影响

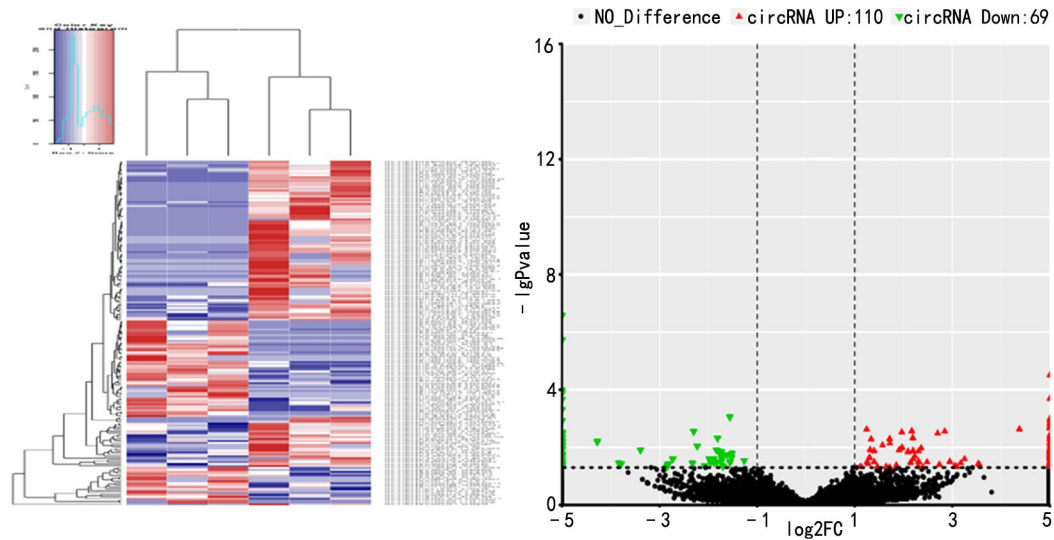
与模型组比较, 电针组大鼠结肠组织中共体现 179 个差异表达的 circRNAs, 其中表达上调的有 110 个, 下调的有 69 个。通过将归一化后的数值绘制成热图、火山图, 可直观地显示出电针组与模型组之间的 circRNAs 表达的差异, 具体分析见图 5。

在模型组与电针组中共同发生差异表达的 circRNAs 有 30 个, 其中在模型组上调同时在电针组下调的有 8 个, 在模型组下调同时在电针组上调的有

22 个, 详见表 3。

2.7 针灸干预 CAC 大鼠结肠组织的共同作用靶点

隔药灸与电针干预 CAC 肿瘤增殖相关的 circRNAs 共同作用靶点有 10 个, 并且对这 10 个关键 circRNAs 作用趋势相同, 其中 9 个共同上调, 分别为 rno_circ:chr10:3301041-3304937、rno_circ:chr10:63412175-63418716、rno_circ:chr1:47947561-47952986 等;1 个共同下调, 为 rno_circ:chr6:93404013-93407172, 详见表 4。



注:左图为热图,每个小方格表示每个基因,其颜色表示该基因表达量大小,表达量越大颜色越深(红色为上调,蓝为下调),每行表示每个基因在不同样本中的表达量情况,每列表示每个样品中所有基因的表达量情况;右图为散点图,横坐标代表 circRNAs 在不同样本中表达倍数变化;纵坐标代表 circRNAs 表达量变化差异的统计学显著性;红点表示显著上调的 circRNAs,绿点表示显著下调的 circRNAs。

图 5 电针组与模型组结肠组织 circRNAs 差异表达分析热图与散点图

表 3 在模型组与电针组中共同发生差异表达的 circRNAs

circRNA ID	gene	log ₂ FC(正常组-模型组)	P 值	log ₂ FC(模型组-电针组)	P 值
rno_circ:chr18:71053204-71086703	Dym	*	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr6:93404013-93407172	Actr10	*	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr5:58554178-58577339	Unc13b	*	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr13:26340136-26346116	Phlpp1	*	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr1:222783268-222784238	At13	*	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr6:871525-904673	Crim1	*	<0.05	#	<0.05
rno_circ:chr5:117148017-117175009	Inad1	*	<0.05	#	<0.05
rno_circ:chr9:111748642-111794123	Fer	2.90	<0.01	#	<0.01
rno_circ:chr12:25226326-25234184	Clip2	#	<0.01	*	<0.01
rno_circ:chr6:27575763-27582987	Hadhb	#	<0.01	*	<0.01
rno_circ:chr10:3301041-3304937	Pdxcl	#	<0.01	*	<0.05
rno_circ:chr10:63412175-63418716	Gosr1	#	<0.01	*	<0.05
rno_circ:chr19:43061525-43063236	Glg1	#	<0.05	*	<0.05
rno_circ:chr11:73126466-73144093	Acap2	#	<0.01	*	<0.01
rno_circ:chr18:27238069-27247390	Fam13b	#	<0.01	*	<0.05
rno_circ:chr5:135463739-135467451	Nasp	#	<0.05	*	<0.05
rno_circ:chr1:47947561-47952986	Wtap	#	<0.05	*	<0.05
rno_circ:chr8:77675817-77687766	Aldh1a2	#	<0.05	*	<0.05
rno_circ:chr7:11218959-11219231	Mfsd12	#	<0.05	*	<0.01
rno_circ:chrX:21104017-21112341	Phf8	#	<0.05	*	<0.05
rno_circ:chr7:125753311-125758635	Arhgap8	- 2.66	<0.01	2.09	<0.05
rno_circ:chr13:95167819-95230772	Akt3	- 2.36	<0.05	*	<0.05

表 3 在模型组与电针组中共同发生差异表达的 circRNAs (续)

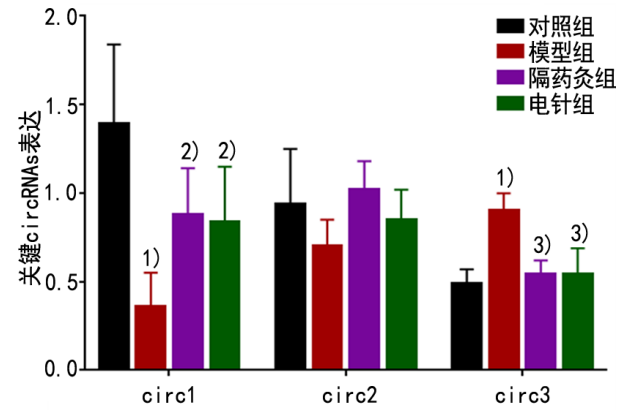
circRNA ID	gene	log ₂ FC(正常组-模型组)	P 值	log ₂ FC(模型组-电针组)	P 值
rno_circ:chr6:44055353-44107579	Mboat2	- 2. 24	<0. 01	*	<0. 05
rno_circ:chr4:66193731-66214585	Ubn2	- 2. 18	<0. 05	2. 14	<0. 05
rno_circ:chr2:240822115-240867796	Nfkb1	- 2. 08	<0. 01	2. 19	<0. 01
rno_circ:chr2:196608497-196620788	Arnt	- 2. 07	<0. 05	2. 31	<0. 05
rno_circ:chr6:22242071-22250518	Spast	- 1. 83	<0. 05	1. 97	<0. 01
rno_circ:chr10:29318809-29319752	Pwpp2a	- 1. 76	<0. 05	1. 11	<0. 05
rno_circ:chr10:109055498-109056103	Rptor	- 1. 64	<0. 05	1. 72	<0. 01
rno_circ:chr6:21334766-21354603	Ltbp1	- 1. 10	<0. 05	1. 34	<0. 01

表 4 隔药灸与电针干预 CAC 大鼠结肠组织的共同作用靶点

circRNA ID	gene	log ₂ FC(隔药灸组-模型组)	P 值	log ₂ FC(电针组-模型组)	P 值
rno_circ:chr10:3301041-3304937	Pdxcl	*	<0. 01	*	<0. 05
rno_circ:chr10:63412175-63418716	Gosr1	*	<0. 01	*	<0. 05
rno_circ:chr1:47947561-47952986	Wtap	*	<0. 01	*	<0. 05
rno_circ:chr11:73126466-73144093	Acap2	*	<0. 05	*	<0. 01
rno_circ:chr2:240822115-240867796	Nfkb1	2. 33	<0. 01	2. 19	<0. 01
rno_circ:chr2:196608497-196620788	Arnt	2. 09	<0. 05	2. 31	<0. 05
rno_circ:chr10:29318809-29319752	Pwpp2a	1. 61	<0. 01	1. 11	<0. 05
rno_circ:chr6:44055353-44107579	Mboat2	1. 49	<0. 05	*	<0. 05
rno_circ:chr6:21334766-21354603	Ltbp1	1. 05	<0. 05	1. 34	<0. 01
rno_circ:chr6:93404013-93407172	Actr10	#	<0. 01	#	<0. 01

2.8 4 组关键 circRNAs 表达比较

验证结果显示, rno_circ:chr10:3301041-3304937 在模型组中的表达显著低于正常组 ($P<0.01$), 而在隔药灸与电针组中表达显著高于模型组 ($P<0.05$), 且两种干预方式间差异无统计学意义 ($P>0.05$); rno_circ:chr10:63412175-63418716 在 各 组 间 差 异 无 统 计 学 意 义 ($P>0.05$), 但 从 趋 势 上 来 看, 在 模 型 组 中 的 表 达 低 于 正 常 组, 而 在 隔 药 灸 组 与 电 针 组 中 表 达 高 于 模 型 组; rno_circ:chr6:93404013-93407172 在模型组中的表达显著高于正常组 ($P<0.01$), 而在隔药灸组与电针组中表达显著低于模型组 ($P<0.01$), 且两种干预方式间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 详见图 6。



注:与正常组比较 ¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较 ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; circ1 为 rno_circ:chr10:3301041-3304937, circ2 为 rno_circ:chr10:63412175-63418716, circ3 为 rno_circ:chr6:93404013-93407172。

图 6 4 组关键 circRNAs 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3 讨论

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)作为CRC最主要的癌前病变,已经是西医学中的共识,其主要包括了溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD)^[10]。研究发现,IBD引起的慢性持续性炎症会引起结肠上皮细胞的异型增生,通过炎性细胞产生的活性氧和氮物质来影响抑制肿瘤的基因,从而导致CAC的发生^[11]。其中,UC若久治不愈极易发生癌变,累计超过30年的UC癌变率可高达近20%,并且其风险会随着疾病的累及范围和持续时间等因素增加^[12]。现代疗法防治CAC还是只有靠手术和抗炎治疗,手段有限且发病率依然很高^[13]。

中医学中对CAC并无明确的记载,但是根据其常见的临床症状,可以将其归类为“肠溜”“肠风”“脏毒”“泄泻”“积聚”“癥瘕”“便血”等研究范畴。根据《医宗金鉴》中的论述,“此证有内外、阴阳之别”;而《灵枢》记载,“肠胃之间,寒温不次,邪气稍至,蓄积留止,大聚乃起”;《景岳全书》则认为,“凡脾肾不足及虚弱失调之人,多有积聚之病”凡此种种,总不外乎《诸病源候论》总结的外邪侵袭、饮食不节、脏腑虚弱等发病因素,并强调了正气在此类疾病发生发展中的重要的作用^[14]。而《素问·评热病论》有“邪之所凑,其气必虚”《素问遗篇·刺法论》“正气存内,邪不可干”,因此扶正祛邪是防治CAC发生发展的主要思路。针灸作为中医治疗的主要手段之一,其适应证也较为广泛^[15]。本课题组前期实验已证实针灸可以调节UC大鼠的肠道菌群,抑制TNF- α 和IL-12的表达,上调IFN- β 和IL-10的表达,通过有效调节多种信号分子的表达,从而促进受损结肠黏膜的修复^[16-17]。本实验选取天枢与气海进行干预,在治疗脾胃肠腑疾病中应用频率较高且两穴相配可以达到相辅相成的治疗效果。动物实验研究显示,隔药灸与电针天枢和气海均能抑制UC大鼠结肠上皮细胞的异常凋亡、调节炎症因子,修复肠黏膜屏障,减轻炎症反应^[18-21]。本实验研究结果显示,针灸干预的CAC大鼠从大体情况、结肠肿瘤负荷情况以及组织观察评分等方面分析,针灸可以改善CAC大鼠的情况,且隔药灸与电针的效果并无显著差异。而且针灸干预的效应靶点基于肿瘤增殖相关性方面的多个角度,因此具有其独特的优势。

随着基因芯片和高通量测序技术的发展,circRNA的结构及其生物学功能在CAC发生发展中的作用逐渐

被揭示,因此,本研究从circRNA角度观察针灸对AOM-DSS诱导的CAC大鼠结肠组织circRNA表达谱的影响,探索针灸治疗CAC的作用机制。circRNA可以作为竞争性内源RNA(competiting endogenous RNA, ceRNA)发挥miRNA海绵的作用,通过miRNA应答元件(microRNA response element, MRE)竞争性结合miRNA,影响下游mRNA的表达^[22]。其次,由于circRNA与其亲本基因之间的相关性,从而可以在调控基因的转录与表达方面发挥重要作用,因此circRNA可以调控其亲本基因的表达^[23]。此外,circRNA还可以与RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBP)结合从而发生相互作用,进而调控相应蛋白的表达^[24]。circHIPK3主要是通过其海绵作用直接与miR-124结合,减弱其抗增殖作用,使得IL6R和DLX2这两个促进增殖的靶点被重新激活,最终导致CRC细胞异常增殖^[25]。同样的,XIE H等^[26]发现circ_001569对CRC的细胞增殖和侵袭起到了正向调控的作用,可以促进SW480细胞进入G2/M期并抑制细胞的凋亡,通过引入miR-145则会消除这种抑制。而E2F5、BAG4以及FMNL2作为miR-145的作用靶点,在肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移等过程中发挥了重要作用。

本实验结果发现,在AOM-DSS诱导的CAC大鼠结肠中异常表达的circRNAs有158个,其中表达上调的有81个,下调的有77个;CAC大鼠在隔药灸的干预作用下,导致了191个circRNAs的差异表达,其中上调的有85个,下调的有106个;CAC大鼠在电针的干预作用下,导致了179个circRNAs的差异表达,其中上调的有69个,下调的有110个。通过分析,筛选出了10个隔药灸与电针发挥作用的共同效应靶点,其中rno_circ:chr10:3301041-3304937、rno_circ:chr10:63412175-63418716、rno_circ:chr11:73126466-73144093等9个circRNAs的表达显著上调,而rno_circ:chr6:93404013-93407172的表达显著下调。本实验进一步选择表达变化最明显的3个circRNA进行qRT-PCR验证,结果显示rno_circ:chr10:3301041-3304937与rno_circ:chr6:93404013-93407172的表达差异与circRNA-seq高通量测序结果相符合,且差异具有统计学意义;而rno_circ:chr10:63412175-63418716的表达差异无统计学意义,但趋势符合,考虑在今后继续加大样本量以验证。

其中, rno_circ:chr10:3301041-3304937 的亲本基因 Pdxdc1 是一种名为依赖于吡啶的脱羧酶结构域蛋白 1(pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing-1, Pdxdc1) 的与糖基化过程有关的关键酶。在结肠组织中, 可以促进包括黏蛋白 2(mucin2, MUC2) 在内的众多结肠组织黏蛋白的表达^[27]; FELDCAMP L A 等^[28]推测 Pdxdc1 可以参与单胺类神经递质的合成, 从而控制神经递质水平; 而脑可以通过向肠传递信息, 从而影响结直肠的病变, 这或许可以为目前肠-脑轴的作用机制提供一些思路^[29]。而 Actr10 是唯一在隔药灸和电针中均为显著下调的 rno_circ:chr6: 93404013-93407172 的亲本基因, 在线粒体逆行运动中具有独特的功能, 可以在轴突逆行运输中将线粒体支架移动到动力蛋白复合物中^[30]。近年来 DORANI F 等^[31]通过 CRC 全基因组关联性研究, 证明了 Actr10 确实在 CRC 的 44 个易感基因中。除了以上提及的针灸共同作用的 circRNAs 外, 隔药灸与电针还有其各自独特的干预靶点, 比如隔药灸下调的 rno_circ:chr8: 68089178-68154119, 其亲本基因为 Map2k5。Map2k5 是 MAPK 信号通路中的关键成员, 目前更多是关注于其在神经系统疾病中的作用^[32]。介于 MAPK 信号通路本身就在包括细胞增殖和分化等在内的许多细胞过程中发挥了重要的作用, 我们推测 Map2k5 同样会在 CAC 中起到重要作用, 并且是隔药灸干预 CAC 肿瘤增殖、抑制炎-癌转化的重要靶点。

此外, 本研究也存在一定不足。首先, 通过本研究发现样本量还需进一步提高, 从而可以更显著地发现组间 circRNAs 的差异表达; 其次, 随着近年来对 circRNA 研究的深入, 筛选出的 circRNA 还需通过凝胶电泳进一步验证其成环性, 以进一步对结果进行证实; 而转移作为 CAC 后期的一个主要表型, 可对其肿瘤转移相关表型进行验证与实验。在今后研究中, 我们将会在此基础上进一步完善, 并进行更为深入的机制探讨。

综上所述, 针灸可能通过影响 CAC 结肠组织与肿瘤增殖相关的 rno_circ:chr10:3301041-3304937 和 rno_circ:chr6:93404013-93407172, 调控相关与炎症、肿瘤相关的信号通路, 延缓 AOM-DSS 诱导的 CAC 大鼠结肠组织肿瘤的生长进展。后续研究中可从体内和体外对筛选的 circRNAs 作进一步功能性的验证, 探索针灸通过调控关键 circRNAs 发挥生物学效应的证

据, 为针灸应用于临床防治 CAC 提供科学的实验依据和理论基础。

参考文献

- [1] 王锡山. 中美结直肠癌流行病学特征对比及防控策略分析[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2019(1): 1-5.
- [2] WANG Y N, LI J, ZHENG W Y, *et al.* Clinical characteristics of ulcerative colitis-related colorectal cancer in Chinese patients[J]. *J Dig Dis*, 2017(12): 684-690.
- [3] WANG Z, LI S, CAO Y, *et al.* Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 9875298.
- [4] QU S, YANG X, LI X, *et al.* Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015(2): 141-148.
- [5] 吴焕淦, 施征, 朱毅, 等. 隔药灸治疗溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 上海针灸杂志, 2007(4): 3-4.
- [6] 张秀丽. 足三里化脓灸防治消化道恶性肿瘤化疗后不良反应 39 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2018(12): 70-71.
- [7] KOLIARAKI V, PASPARAKIS M, KOLLIAS G. IKK β in intestinal mesenchymal cells promotes initiation of colitis-associated cancer[J]. *J Exp Med*, 2015(13): 2235-2251.
- [8] NEUFERT C, BECKER C, NEURATH M F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression[J]. *Nat Protoc*, 2007(8): 1998-2004.
- [9] ROSE A H, HUANG Z, MAFNAS C, *et al.* Calpain-2 Inhibitor therapy reduces murine colitis and colitis-associated cancer[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015(9): 2005-2015.
- [10] RUBIN D C, SHAKER A, LEVIN M S. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer[J]. *Front Immunol*, 2012, 3:107.
- [11] ULLMAN T A, ITZKOWITZ S H. Intestinal inflammation and cancer[J]. *Gastroenterology*, 2011(6): 1807-1816.
- [12] EADEN J A, ABRAMS K R, MAYBERRY J F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-

- analysis[J]. *Gut*, 2001 (4) :526-535.
- [13] NOWACKI T M, BRÜCKNER M, EVESLAGE M, *et al.* The risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2015 (2) :492-501.
- [14] 李晨龙, 葛倩, 孟静岩. 《诸病源候论》对当代肿瘤研究的启示[J]. *天津中医药*, 2016 (1) :22-25.
- [15] 何巍, 童元元, 赵英凯, 等. 基于国外文献的针灸适应症分析[J]. *针刺研究*, 2012 (5) :428-430.
- [16] WANG X, LIU Y, DONG H, *et al.* Herb-partitioned moxibustion regulates the TLR2/NF- κ B signaling pathway in a rat model of ulcerative colitis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015:949065.
- [17] MA T M, XU N, MA X D, *et al.* Moxibustion regulates inflammatory mediators and colonic mucosal barrier in ulcerative colitis rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2016 (8) :2566-2575.
- [18] GARCIA M K, MCQUADE J, HADDAD R, *et al.* Systematic review of acupuncture in cancer care: a synthesis of the evidence[J]. *J Clin Oncol*, 2013 (7) :952-960.
- [19] ZHANG D, REN Y B, WEI K, *et al.* Herb-partitioned moxibustion alleviates colon injuries in ulcerative colitis rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2018 (30) :3384-3397.
- [20] QI Q, LIU Y N, JIN X M, *et al.* Moxibustion treatment modulates the gut microbiota and immune function in a dextran sulphate sodium-induced colitis rat model[J]. *World J Gastroenterol*, 2018 (28) :3130-3144.
- [21] WU H G, GONG X, YAO L Q, *et al.* Mechanisms of acupuncture and moxibustion in regulation of epithelial cell apoptosis in rat ulcerative colitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2004 (5) :682-688.
- [22] HENTZE M W, PREISS T. Circular RNAs: splicing's enigma variations[J]. *EMBO J*, 2013 (7) :923-925.
- [23] ZHANG Y, ZHANG X O, CHEN T, *et al.* Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013 (6) :792-806.
- [24] HANSEN W, HUTZLER M, ABEL S, *et al.* Neuropilin 1 deficiency on CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth[J]. *J Exp Med*, 2012 (11) :2001-2016.
- [25] ZHENG Q, BAO C, GUO W, *et al.* Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:11215.
- [26] XIE H, REN X, XIN S, *et al.* Emerging roles of circRNA_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016 (18) :26680-26691.
- [27] MA Y, ZHOU G, LI Y, *et al.* Intake of fish oil specifically modulates colonic Muc2 expression in middle-aged rats by suppressing the glycosylation process[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018 (4) :1700661.
- [28] FELDCAMP L A, BOUTROS P C, RAYMOND R, *et al.* Pdxcl modulates prepulse inhibition of acoustic startle in the mouse[J]. *Transl Psychiatry*, 2017 (5) :e1125.
- [29] BRZOZOWSKI B, MAZUR-BIALY A, PAJDO R, *et al.* Mechanisms by which stress affects the experimental and clinical inflammatory bowel disease (IBD): role of brain-gut axis[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2016 (8) :892-900.
- [30] DRERUP C M, HERBERT A L, MONK K R, *et al.* Regulation of mitochondria-dynactin interaction and mitochondrial retrograde transport in axons[J]. *Elife*, 2017, 6:e22234.
- [31] DORANI F, HU T, WOODS M O, *et al.* Ensemble learning for detecting gene-gene interactions in colorectal cancer[J]. *PeerJ*, 2018, 6:e5854.
- [32] CATOIRE H, SARAYLOO F, MOURABIT AMARI K, *et al.* A direct interaction between two restless legs syndrome predisposing genes: MEIS1 and SKOR1[J]. *Sci Rep*, 2018 (1) :12173.

收稿日期 2023-11-25