

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.17.017

中药提取物贝母素乙对人结肠癌 HCT-416 细胞基因表达的影响

张喆¹, 何勤思^{2,3}, 吴晨雯^{2,3}, 陈信义⁴, 郑智^{2*}

(1. 中日友好医院, 北京市朝阳区樱花东街 2 号, 100029; 2. 江西省肿瘤医院; 3. 南昌大学医学院研究生部; 4. 北京中医药大学东直门医院)

摘要 目的 观察中药提取物贝母素乙对人结肠癌 HCT-416 细胞的可能作用途径。方法 取人结肠癌 HCT-416 细胞接种于 6 孔板, 每孔 1 ml 共计 2000 细胞, 设对照组和贝母乙素组, 每组 3 个平行标本, 贝母素乙组中每孔加入贝母素乙 200 μg , 最终工作浓度 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 对照组加入等体积二甲基亚砜, 药物处理后 72 h 吸出培养基, 进行总 RNA 提取。应用基因芯片技术检测两组的差异基因表达谱, 并对差异基因进行 GO、KEGG 富集分析和聚类分析。结果 共筛选出差异基因 37 个, 其中显著上调基因共 5 个, 其余为下调基因共 32 个 (差异倍数 ≥ 2 , $P < 0.05$)。GO 分析主要影响通路集中在生物学过程中的热生成调控、运动行为调控、尿嘧啶核苷代谢过程、肾上腺素能受体信号通路的调控、脂肪组织代谢的调控和 G 蛋白偶联受体信号通路的调控; 分子功能方面的肾上腺素能受体结合活性和尿嘧啶核苷磷酸化酶活性。KEGG 富集分析主要影响通路集中在药物代谢酶、嘧啶代谢、酮体合成和降解、维生素 B6 代谢、核糖体等方面。聚类分析结果显示, 贝母素乙组相对对照组上调基因中 RPL 和 PHLDA1 两群联系较为紧密, 在下调基因中 UPP1 与 ARRDC3 两群联系较为紧密。结论 贝母素乙能显著影响结肠癌 HCT-416 细胞中的嘧啶代谢通路, 抑制其细胞增殖, 促进其能量代谢。

关键词 结肠癌; 贝母素乙; 浙贝母; 基因表达

近年我国结肠癌发病率呈现逐年上升的趋势。目前西医主要以手术结合放疗、化疗治疗为主。临床中我们加用中药贝母为主的中药复方制剂辅助治疗, 前期研究显示, 复方浙贝颗粒药物血清可能抑制人结肠癌 HCT-416 细胞增殖, 使其早期凋亡^[1]。在此基础上本研究应用基因芯片技术^[2]观察中药浙贝母提取物贝母素乙 (Peiminine) 对于人结肠癌 HCT-416 细胞, 尤其是氟尿嘧啶通路的相关基因表达的影响, 从而从基因表达进而对相关酶学的影响探寻其可能的作用机理。

1 材料

1.1 细胞株及药物

人结肠癌 HCT-416 细胞由清华大学生命科学院提供; 贝母素乙, 编号 110751, 购自中国药品食品检定研究院。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基和胎牛血清 (FCS), 批号: SH30022.01B, Hyclone 公司; Trizol Reagent, 货号: 15596-026, Invitrogen 公司; Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit, Poly-A Control Stock, Poly-A Control Dilution Buffer, 货号: 900433, 100rxns, Affymetrix 公司; MessageAmpTM Premier RNA Amplification Kit, 货号: 1792, 100rxns, Ambion 公司; Eukaryotic Hybridization Control Kit, 20X Hybridization Controls, Control Oligo B2, 货号: 900454, 30 rxns, Affymetrix 公司; Hybridization wash and stain Kit, 货号: 900720, 30 rxns, Affymetrix 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 货号: 67-68-5, Sigma 公司。

超净工作台 (CJT-46 型, 北京长城公司); 超纯水处理机 (UPW 50S 型, 北京市历元电子仪器有限公司); 微量台式离心机 (5415D 型, Eppendorf 公司); 涡旋混合器 (TDX-4 型, TonDa 公司); PCR 仪 (PTC-225 型, MJ 公司); Magnetic Stand-96

基金项目: 国家自然科学基金 (81260592)

* 通讯作者: zhengxia_2007@163.com, (0791) 88331492

(AM10027 型, Ambion 公司); 紫外分光光度计(ND-1000 型, NanoDrop 公司); 超低温冰箱: (-86℃, ULT Freezer 型, 美国 Thermo-Forma 公司); 凝胶成像仪(GDS-7600 型, UVP 公司); 扫描分析软件系统(Gel-Pro Analyzer, 美国 Media Cybernetics 公司); Hybridization Oven(640 型, Affymetrix 公司); Fluidics Station(450 型, Affymetrix 公司); GeneChip® Scanner(3000 型, Affymetrix 公司)。

1.3 细胞培养和分组

取人结肠癌 HCT-116 细胞加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 条件下恒温培养箱中培养, 待细胞增殖进入对数生长期的 90% 时, 将 HCT-116 细胞接种于 6 孔板, 每孔 1 ml 共计 2000 细胞, 设对照组和贝母乙素组, 每组 3 个平行标本, 贝母素乙组中每孔加入贝母素乙 200 μg, 最终工作浓度 200 μg/ml, 对照组加入等体积 DMSO, 药物处理后 72 h 吸出培养基, PBS 清洗两次后, 进行总 RNA 提取。

1.4 总 RNA 提取

细胞总 RNA 采用 Trizol 法提取, 6 孔板细胞吸出培养基, PBS 轻轻洗两次后, 加 700 μl Trizol/孔, 振荡使盖满细胞; 充分混匀吹打, 减少其黏稠性; 消化 3~5 min, 裂解液吸到无 RNA 酶 EP 管中; 150 μl 氯仿(0.2 体积的 Trizol), 剧烈振荡 20 s, 室温静置 3 min; 12 000 r/min、4℃ 离心 15 min; 取上清无色水相到新 EP 管中; 加入同体积异丙醇(0.5 体积的 Trizol), 混匀, 室温静置 10 min; 12 000 r/min、4℃ 离心 10 min。弃上清, 加入 1 ml 75% 乙醇(75% 乙醇用 DEPC 水配置); 轻轻涡旋; 12 000 r/min、4℃ 离心 10 min; 弃上清, 尽量吸干, 室温开盖静置, 使乙醇挥发; 加入 20 μl DEPC 水或 TE, 旋涡混匀, 稍离心, 65℃ 水浴 5 min 助溶; 定量后, 于 -70℃ 保存。最后用分光光度计测定浓度并电泳检测 RNA 的完整性。进行 RNA 定量时, OD_{260/280} 在 1.8~2.0 之间, 甲醛变性胶凝胶电泳 28S 和 18SrRNA 比值在 2.0 左右。

1.5 基因芯片制备

实验在北京博奥晶典生物技术有限公司利用 Affymetrix 公司的 PrimeView™ Human Gene Expression Array 进行, 包含 530 000 个探针可以检测 20 000 多个注释完好功能明确基因的 36 000 多个转录本, 每个转录本采用 9~11 个探针进行检测人物种的基因表达谱, 芯片检测以待检测样品的 total RNA 为起始, 进行体外扩增和生物素标记, 标记

过程采用扩增标记试剂盒。1) 反转录合成 First strand cDNA: 以 Total RNA 起始, 含有 T7 启动子序列的 T7 Oligo(dT) Primer 为引物, 使用 First Strand Enzyme Mix 合成 First strand cDNA。2) 合成 Second strand DNA: 用 Second Strand Enzyme Mix 将 DNA-RNA 杂合体中的 RNA 链转化为 Second Strand cDNA, 合成双链 DNA。3) 体外转录合成 cRNA: 以 Second Strand cDNA 为模板, 利用 T7 Enzyme Mix 合成 cRNA, 掺入生物素 biotin。4) cRNA 纯化: 使用磁珠纯化 cRNA, 除去盐、酶等杂质, 并对 cRNA 进行定量。5) cRNA 片段化: 将 cRNA 片段化成适宜杂交的大小。6) 片段化后的生物素标记 cRNA 和芯片在 GeneChip Hybridization Oven 640 杂交炉中 45℃ 旋转杂交 16 h。杂交好的芯片在 Fluidics Station 450 工作站清洗染色, 然后用 GeneChipScanner 3000 进行芯片的扫描获得芯片杂交图。

1.6 数据的提取和统计分析

应用 AGCC 软件(Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software, version 1.4, Affymetrix 公司)将 DAT 文件从图像信号转化为数字信号即 CEL 文件, CEL 文件记录探针水平的荧光信号强度。以 CEL 文件为源文件进行数据预处理: 包括背景校正, 将探针信号整合为探针组信号, 片段归一化去除非生物学因素带来的样本间变异。数据预处理采用 RMA 算法^[9]进行。对 RMA 算法预处理后的数据进行差异表达基因分析: 有 3 个及以上生物学重复的实验设计, 利用 SAM3.0 软件(<http://www.stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>)的差异基因筛选程序包分析差异基因, 差异基因的筛选标准是: q-值(FDR) ≤ 5% 且差异倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5。并采用 MAS3.0 分子功能注释系统(<http://bioinfo.capitalbio.com/mas3/>)对发生显著变化的基因参与的 GO、KEGG 通路的富集分析进行注释并计算每条 GO 通路的功能富集显著程度, 以 FDR ≤ 0.05 为标准评估其显著性。

2 结果

2.1 原始数据质量控制

1) Oligo B2、Poly-A Controls、Hybridization Controls 等阳性对照信号正常; 2) 看家基因信号值及 3'/5' 比值正常; 3) 平均背景值与噪音值较低; 4) Present Percent 数值正常。

2.2 两组细胞差异基因表达结果

利用 SAM 软件共筛选出差异基因 37 个, 贝母

素乙组和对照组比较显著上调基因共 5 个, 其余为下调基因共 32 个 (差异倍数 ≥ 2 , $P < 0.05$), 具体见表 1。

2.3 两组细胞差异基因表达的 GO、KEGG 富集分析结果

经过 GO 富集分析, 贝母乙组和对照组比较, 差异基因主要集中在生物学过程和分子功能方面, 而在细胞组分方面无明显差异; 表 2 提示差异基因主要集中在生物学过程中的热生成调控、运动行为调控、尿嘧啶核苷代谢过程、肾上腺素能受体信号通路的调控、脂肪组织代谢的调控和 G 蛋白偶联受体信号通路的调控; 表 3 提示差异基因主要集中在

在分子功能方面肾上腺素能受体结合活性和尿嘧啶核苷磷酸化酶活性。经过 KEGG 富集分析, 表 4 提示两组差异表达基因主要集中在药物代谢酶、嘧啶代谢、酮体合成和降解、维生素 B6 代谢、核糖体方面。

2.4 两组细胞差异基因表达的聚类分析

根据样品表达模式的相关性进行聚类, 首先数据源自归一化后基因的信号值; 应用 Cluster 3.0 (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>), 采用 hierarchical, average linkage 算法进行聚类, 结果用 Treeview2.11 生成, 结果显示, 贝母素乙组相对对照组上调基因中 RPL

表 1 两组细胞差异基因表达比较

基因简称	得分 (d)	q-值 (%)	差异倍数	基因简称	Score (d)	q-值 (%)	差异倍数
RPL31*	9.919006	0	2.5791	RBKS	-4.26127	0	0.4715
RPL27A*	10.3753	0	2.3997	PAAFI	-5.91584	0	0.4655
INSIG1*	5.833069	0	2.2030	ZNF562	-6.49974	0	0.4647
PHLDA1*	7.266363	0	2.1291	DENND5B	-6.984	0	0.4629
YY1*	9.116818	0	2.0064	SNX5	-10.2792	0	0.4614
HIST2H2AC	-4.28796	0	0.4994	UCP2	-7.92499	0	0.4581
H1FO	-4.81555	0	0.4993	GRAMD1B	-7.72633	0	0.4570
PCBD2	-4.9349	0	0.4976	LOC729991	-7.00123	0	0.4484
ZNF562	-6.35671	0	0.4965	THNSL1	-5.46364	0	0.4439
DLG3	-7.26399	0	0.4946	PBX1	-4.3453	0	0.4286
RTEL1 /// TNFRSF6B	-8.32081	0	0.4917	SLC16A14	-9.9673	0	0.4245
PRR3	-6.30629	0	0.4914	ARRDC3	-3.87557	0	0.4004
EREG	-6.5059	0	0.4900	UPPI	-6.31237	0	0.3694
SCG2	-9.27993	0	0.4893	DHRS2	-5.1858	0	0.3451
FAN1	-6.29698	0	0.4837	SLC16A6	-12.9084	0	0.2970
OXCT1	-6.01967	0	0.4819	ARRDC3	-7.12818	0	0.2780
UPPI	-4.62786	0	0.4812	ARRDC4	-8.02428	0	0.2371
PTPDC1	-3.92579	0	0.4807	ARRDC4	-9.05289	0	0.2131
EGR3	-2.94712	0.037954	0.4748				

注: * 表示该基因上调, 其余均为下调

表 2 两组细胞差异基因表达的 GO 分析生物过程

名称	显著差异基因 (个)	基因简称	P 值	Q 值
GO: 0031651//negative regulation of heat generation	2	ARRDC3; ARRDC3	2.21×10^{-6}	0.000775
GO: 0090325//regulation of locomotion involved in locomotory behavior	2	ARRDC3; ARRDC3	2.21×10^{-6}	0.000775
GO: 0090327//negative regulation of locomotion involved in locomotory behavior	2	ARRDC3; ARRDC3	2.21×10^{-6}	0.000775
GO: 0046108//uridine metabolic process	2	UPPI; UPPI	4.42×10^{-6}	0.000775
GO: 0071879//positive regulation of adrenergic receptor signaling pathway	2	ARRDC3; ARRDC3	1.10×10^{-5}	0.001549
GO: 0060613//fat pad development	2	ARRDC3; ARRDC3	1.54×10^{-5}	0.001806
GO: 0071877//regulation of adrenergic receptor signaling pathway	2	ARRDC3; ARRDC3	2.06×10^{-5}	0.002063
GO: 0044252//negative regulation of multicellular organismal metabolic process	2	ARRDC3; ARRDC3	4.84×10^{-5}	0.004245
GO: 0031650//regulation of heat generation	2	ARRDC3; ARRDC3	9.94×10^{-5}	0.007754
GO: 0045745//positive regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway	2	ARRDC3; ARRDC3	0.000360	0.025244
GO: 0060612//adipose tissue development	2	ARRDC3; ARRDC3	0.000508	0.032420

表 3 两组细胞差异基因表达的 GO 分析分子功能

名称	显著差异基因 (个)	基因简称	P 值	Q 值
GO: 0031699//beta-3 adrenergic receptor binding	2	ARRDC3; ARRDC3	1.96×10^{-6}	0.000257
GO: 0004850//uridine phosphorylase activity	2	UPP1; UPP1	3.92×10^{-6}	0.000257
GO: 0031690//adrenergic receptor binding	2	ARRDC3; ARRDC3	0.000194	0.008471

表 4 两组细胞差异基因表达的 KEGG 通路表

名称	显著差异基因 (个)	基因简称	P 值	Q 值
ko00983 Drug metabolism -other enzymes	2	UPP1; UPP1	0.001192	0.014309
ko00240 Pyrimidine metabolism	2	UPP1; UPP1	0.006108	0.027551
ko00072 Synthesis and degradation of ketone bodies	1	OXCT1	0.008036	0.027551
ko00750 Vitamin B6 metabolism	1	THNSL1	0.008036	0.027551
ko03010 Ribosome	2	RPL27A; RPL31	0.011585	0.027804

和 PHLDA1 两群联系较为紧密,在下调基因中 UPP1 与 ARRDC3 两群联系较为紧密。

3 讨论

中医学认为,结肠癌尤其是晚期结肠癌主要的病理特征是痰、瘀^[4],浙贝母能够清热化痰,散结解毒,其味苦性寒,开泄力大,清火散结力强,因此常常被用在结肠癌治疗当中。我们前期研究发现,贝母素乙能够通过加强细胞自噬通量,诱导人结肠癌 HCT-416 细胞的凋亡和抑制其增殖^[5],从而进一步实现其抗肿瘤的作用。本研究结果提示,贝母素乙组与对照组共有差异基因 37 个,主要体现在对氟尿嘧啶代谢通路的影响、细胞增殖和能量代谢三个方面。

对细胞氟尿嘧啶代谢通路的影响主要体现在对尿嘧啶核苷磷酸化酶 1 (Uridine Phosphorylase 1, UPP1) 的下调,UPP1 是嘧啶补救通路和维持尿嘧啶浓度自我平衡的一种重要的酶,有可逆性,在癌症和艾滋病的化疗当中都起着关键性的作用^[6]。它能够催化尿嘧啶核苷和其类似物转化为各自的碱基和核糖-1-磷酸这一可逆磷酸化的过程。在许多类型的实体肿瘤组织中高度表达,且其表达水平与疾病的进展有关,并可能是肿瘤细胞对嘧啶核苷类似物细胞毒性敏感的机制之一^[7]。本研究结果表明,贝母素乙干预后的 HCT-416 细胞表现为 UPP1 表达的显著抑制,这种抑制作用在 GO 分析中显著影响了药物和氟尿嘧啶的代谢,在 KEGG 富集分析中也提示显著影响,这能够增加组织中氟尿苷的利用,同时减少化疗中氟尿嘧啶对患者的毒性。尽管有部分人认为在某些肿瘤治疗中 UPP1 水平的升高可能会相应地增加氟尿嘧啶的细胞毒作用,从而

加强疗效,但是临床实际来看往往由于氟尿嘧啶对组织的毒副作用而限制了用量^[8]。因此通过贝母素乙来调节 5-氟尿嘧啶及其衍生物的毒副作用,可能增加这些药物的治疗指数^[9-10]。

对细胞增殖的影响主要体现在 RPL31、RPL27A 基因表达的上调,RPL31 和 RPL27A 都属于核糖体蛋白家族基因,该家族在各种组织的真核细胞中广泛存在,目前共发现有 80 多种,它们与核糖核酸共同组成核糖体 (RP),其经典作用主要是影响蛋白质的生物合成^[11]。Lohrum 等^[12]研究认为,核糖体大亚基蛋白 L11 能抑制 MDM2 的活性,进而抑制 MDM2 介导的 p53 蛋白质泛素化反应,Zhang 等^[13]也证明 MDM2 能与 RPL11 结合,认为 L11-MDM2 功能性的结合将抑制 MDM2 介导的 p53 分子泛素化降解反应,进而使 p53 的转录激活功能得以恢复,p21 蛋白聚集并诱导 p53 依赖的细胞周期抑制效应。而 Maruyama 等^[14]发现 RPL31 通过 p53 通路影响前列腺癌细胞的生长,在前列腺癌细胞 LNCaP 中 p53、p21 蛋白会经 RPL31 siRNA 处理后增加,而相应 p53 的降解会随着 RPL31 的敲除而减少。因此我们认为,贝母素乙可能通过 RPL 家族基因的上调从而影响 RP-MDM2-p53 通路,抑制了人结肠癌 HCT-416 细胞的增殖和分化,促进 HCT-416 的凋亡。

对肿瘤细胞能量代谢的影响主要与 ARRDC3 的下调有关,可能会抑制肥胖,增加能量消耗,促进脂肪组织产热。ARRDC3 属于抑制蛋白相关结构域蛋白家族,他与人的肥胖密切相关,人类基因组中和肥胖相关的基因很多,但是在人染色体 5q13-45 上的基因 ARRDC3 是这组相关性联动的一个高峰,和人体重指数直接相关^[15]。Patwari 等^[16]通过动物

实验也证明失活 ARRDC3 的小鼠会由于能量消耗增加、活动量增加、脂肪组织产热增加而避免了肥胖,其中对雄性小鼠的影响更大,这些结果表明,ARRDC3 是肥胖和能量消耗的非常敏感的调控基因。一方面由于肥胖人群多有较多量饱和脂肪酸的摄入,这会导致结肠中胆汁酸与中性固醇水平升高,进而导致大肠菌群改变固醇环等物质被芳香化而形成致癌物质,从而导致肥胖人群中具有较高的结肠癌患病率^[7];另一方面肥胖结肠癌患者可能发生转移的概率更高,因此控制体重成为目前结肠癌研究中的一个热点^[8]。从研究结果来看,贝母素乙具有下调肿瘤细胞 ARRDC3 的作用,可能会通过控制肿瘤患者的体重使之受益,同时能够增加肿瘤细胞的能量代谢,可能会加速其凋亡的过程。

综上所述,由于贝母素乙显著影响了结肠癌细胞中的氟尿嘧啶代谢通路,因此未来可以在此基础上对贝母素乙潜在的对氟尿嘧啶减毒增敏和抗结肠癌化疗方案的联合应用进行探索,同时结合 ARRDC3、RPL 家族基因的表达对肿瘤细胞增殖和能量代谢中相关酶学的表达进行研究,从而进一步探寻结肠癌治疗的中西医结合新方案。

参考文献

- [1] 张喆,陈信义,郑智. 复方浙贝颗粒药物血清对人结肠癌 HCT-116 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(1): 55-58.
- [2] 荆志伟,周才秀,王忠,等. 用主成分分析探索不同中药组分配伍干预脑缺血的基因表达模式 [J]. 中医杂志, 2010, 51(2): 164-167.
- [3] IRIZARRY RA, HOBBS B, COLLIN F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data [J]. Biostatistics, 2003, 4(2): 249-264.
- [4] 张喆,刘瑜,张挽澜,等. 加味三香颗粒治疗结肠癌术后胃肠功能障碍 32 例 [J]. 中医杂志, 2013, 54(11): 966-967.
- [5] LYU Q, TOU F, SU H, et al. The natural product peiminine represses colorectal carcinoma tumor growth by inducing autophagic cell death [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 462(1): 38-45.
- [6] DENEEN B, HAMIDI H, DENNY CT. Functional analysis of the EWS/ETS target gene uridine phosphorylase [J]. Cancer Res, 2003, 63(14): 4268-4274.
- [7] ROOSILD TP, CASTRONOVO S, FABBIANI M, et al. Implications of the structure of human uridine phosphorylase on the development of novel inhibitors for improving the therapeutic window of fluoropyrimidine chemotherapy [J]. BMC Struct Biol, 2009, 9: 14. doi: 10.1186/1472-6807-9-14.
- [8] PIZZORNO G, CAO D, LEFFERT JJ, et al. Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1587(2/3): 133-144.
- [9] EL KOUNI MH, GOUDGAON NM, RAFEEQ M, et al. 5-phenylthioacyclouridine: a potent and specific inhibitor of uridine phosphorylase [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(6): 851-856.
- [10] AL SAFARJALANI ON, RAIS R, SHI J, et al. Modulation of 5-fluorouracil host-toxicity and chemotherapeutic efficacy against human colon tumors by 5-(Phenylthio)acyclouridine, a uridine phosphorylase inhibitor [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006, 58(5): 692-698.
- [11] 李小光,宋伦,袁胜涛. 核糖体蛋白参与调控 p53 诱导活化的分子机制 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(3): 423-426.
- [12] LOHRUM MA, LUDWIG RL, KUBBUTAT MH, et al. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11 [J]. Cancer Cell, 2003, 3(6): 577-587.
- [13] ZHANG Y, WOLF GW, BHAT K, et al. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(23): 8902-8912.
- [14] MARUYAMA Y, MIYAZAKI T, IKEDA K, et al. Short hairpin RNA library-based functional screening identified ribosomal protein L31 that modulates prostate cancer cell growth via p53 pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e108743.
- [15] QI S, O'HAYRE M, GUTKIND JS, et al. Structural and biochemical basis for ubiquitin ligase recruitment by arrestin-related domain-containing protein-3 (ARRDC3) [J]. J Biol Chem, 2014, 289(8): 4743-4752.
- [16] PATWARI P, EMILSSON V, SCHADT EE, et al. The arrestin domain-containing 3 protein regulates body mass and energy expenditure [J]. Cell Metabolism, 2011, 14(5): 671-683.
- [17] 韩永军,车向明,许延发. 肥胖结肠癌患者血清 Chemerin 与 MMPs 及粘附因子相关性研究 [J]. 陕西医学杂志, 2015, 44(3): 313-315.
- [18] BORDONARO M, LAZAROVA D. Hypothesis: Obesity Is Associated with a Lower Mutation Threshold in Colon Cancer [J]. J Cancer, 2015, 6(9): 825-831.

Effects of Chinese Herb Extracts Peiminine on Gene Expression of HCT-116 Cells in Patients with Colon Cancer

ZHANG Zhe¹, HE Qinsi^{2, 3}, WU Chenwen^{2, 3}, CHEN Xinyi⁴, ZHENG Zhi²

(1. China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029; 2. Jiangxi Cancer Hospital; 3. Graduate Faculty, Medical College of Nanchang University; 4. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe possible effect and mechanism of Chinese herb extracts Peiminine on HCT-116 cells in patients with colon cancer. **Methods** HCT-116 cells in colon cancer patients were inoculated in 6-well plate with 1 ml in each hole, summing to 2000 cells. Those cells were divided into the control group and the Peiminine group. There were three parallel samples in each group. The Peiminine group was put Peiminine 200 μg into each hole. The final working concentration was 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The control group was put isopyknic dimethyl sulfoxide. Seventy-two hours after medication, drew out medium for extracting total RNA. Gene chip technology was used to detect differential gene expression profile in the two groups and made GO, KEGG enrichment analysis and cluster analysis for differential genes. **Results** Totally 37 differential genes were screened out including 5 significantly up-regulated genes and 32 down-regulated genes (differences multiples ≥ 2 , $P < 0.05$). The main influenced access of GO analysis focused on the regulation and control of thermogene, motor behavior, uracil nucleotide metabolism process, adrenoceptor signal channel, adipose tissue metabolism and G-protein-coupled receptors signal channel in the biological process, also focused on the activity of adrenoceptor binding and uracil nucleoside phosphorylase in the molecular function. The main influenced access of KEGG enrichment analysis focused on the drug-metabolizing enzyme, pyrimidine metabolism, synthesis and degradation of ketone body, vitamin B6 metabolism and ribosomes. The results of Cluster analysis showed the RPL and PHLDA1 of up-regulated genes contacted more closely in the Peiminine group than in the control group and the UPP1 and ARRDC3 of down-regulated genes contacted more closely. **Conclusion** Peiminine may obviously affect the pyrimidine metabolic pathway of HCT-116 cells of colon cancer, inhibit the proliferation of the cells and promote the energy metabolism.

Keywords colon cancer; Peiminine; Zhebeimu [*Fritillaria thunbergii* Miq.]; gene expression

(收稿日期: 2015-11-30; 修回日期: 2016-03-30)

编辑: 邓 媛