

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.05.012

实验研究

仙连解毒方对结直肠癌湿热瘀毒证模型小鼠肠道细胞类型的影响

张钦畅^{1,2}, 程海波^{1,2}✉, 余成涛^{1,2}, 沈卫星^{1,2}, 徐长亮^{1,2},
谭佳妮^{1,2}, 赖岳阳^{1,2}, 范旻旻^{1,2}, 李柳^{1,2}



1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心

[摘要] **目的** 采用单细胞转录组测序技术探讨仙连解毒方治疗结直肠癌湿热瘀毒证的作用机制。**方法** 30 只雄性 C57BL/6N 小鼠随机分为对照组、模型组、仙连解毒方组, 每组 10 只。模型组和仙连解毒方组小鼠采用高脂饮食与氧化偶氮甲烷 (AOM) / 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导建立结直肠癌湿热瘀毒证模型, 对照组给予正常饮食。3 个循环的 DSS 饮水结束后, 仙连解毒方组开始给予仙连解毒方 12.9 g/kg 灌胃, 对照组及模型组给予等体积的生理盐水, 每天 1 次, 连续灌胃 6 天后停 1 天, 连续给药 16 周。末次给药结束 4 h 后, 取各组小鼠结直肠组织, HE 染色观察小鼠结直肠的组织病理形态。取距肛门 6 cm 的远端结肠段 2 cm, 解离组织样本, 分离单细胞悬液, 提取 RNA 行 qPCR 扩增, 进行单细胞转录组测序。采用 CellRanger-v5.0.0 进行数据质控, Seurat-v3.1.1 软件包进行降维聚类分析、细胞类型鉴定, 对差异基因行 GO 和 KEGG 富集分析。**结果** HE 染色结果显示, 空白组小鼠结肠腺体排列规则, 细胞核位于基底部, 呈扁平或立方状; 模型组上皮细胞极性消失, 呈巢状、筛孔状, 中央见坏死, 细胞核浆比增大, 核染色深, 核仁明显, 核分裂现象显著; 仙连解毒方组上述情况得到明显改善。单细胞转录组测序共捕获 3 组小鼠肠道细胞 45 480 个, 降维聚类将所有细胞归为 20 个细胞群, 鉴定各细胞群标记基因, 分析得出小鼠肠道细胞主要包括 9 种细胞类型: 肠上皮细胞、B 细胞、自然杀伤 T 细胞、天然淋巴细胞、干细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞、成纤维细胞。仙连解毒方组较模型组小鼠肠道组织中肠上皮细胞占比上升, B 细胞、自然杀伤 T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞占比下降。GO 与 KEGG 富集分析显示, 仙连解毒方对结直肠癌湿热瘀毒证的作用主要富集在免疫系统进程、抗原处理和呈递、适应性免疫反应、转运 ATP 合酶活性旋转机制等方面, 信号通路主要涉及免疫系统信号、癌症相关通路、细胞增殖与死亡信号、能量代谢信号等。**结论** 仙连解毒方调控结直肠癌湿热瘀毒证模型小鼠肠道组织中免疫细胞比例, 抑制上皮细胞间质转化, 可能是其治疗结直肠癌湿热瘀毒证的作用机制。

[关键词] 结直肠癌; 湿热瘀毒证; 仙连解毒方; 肠道细胞; 单细胞转录组测序

结直肠癌是我国高发的恶性肿瘤, 在全球癌症病死率中排名第三^[1]。国医大师周仲瑛教授在总结多年恶性肿瘤临床辨治经验的基础上, 根据恶性肿瘤的发病规律提出了癌毒学说, 认为癌毒是导致恶性肿瘤发生发展的关键致病因素^[2]。仙连解毒方是在癌毒病机理论指导下研制的临床经验方, 具有清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气的功效, 用于治疗结直肠癌湿热瘀毒证^[3]。前期研究^[4]表明, 仙连解

毒方可显著改善小鼠结直肠肿瘤数目、体积, 减轻结直肠组织损伤和异型增生。单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 可深入表征单个细胞的转录状态, 揭示单个细胞的基因结构和基因表达状态, 研究单个细胞或基因的表达情况, 也可以获得基因表达、剪接等信息, 以及根据这些信息构建的调控关系, 反映细胞间的异质性^[5]。此方法有利于找寻中药复方治疗疾病潜在的细胞靶点, 并阐明其作用机制^[6]。本研究通过建立结直肠癌湿热瘀毒证模型, 基于单细胞转录组测序技术观察仙连解毒方对小鼠肠道组

基金项目: 国家自然科学基金 (81930117)

✉ 通讯作者: hbcheng@njucm.edu.cn

织内细胞类型及基因表达的影响,探讨仙连解毒方治疗结直肠癌湿热瘀毒证的可能作用机制。本研究经南京中医药大学实验动物中心伦理审查,批准号 201911A027。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠 30 只,6~8 周龄,体质量 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物使用许可证号 SCXK(京)2016-0006。饲养室温 22~26℃,相对湿度 40%~60%,明暗各 12 h。

1.2 药物

仙连解毒方由仙鹤草、黄连、苦参、薏苡仁组成,药物比例为 12:5:9:30。按配比称取各药材,分别加入 10 倍量、8 倍量水煎煮两次(2 h、1.5 h),收集合并两次滤液,减压浓缩后加入 95%乙醇至含醇量 70%,静置 24 h,抽滤,滤液减压浓缩,复方水提浓缩为 1 g/ml 后,60%乙醇 4℃醇沉 24 h,抽滤后旋蒸浓缩至 3 g/ml,4℃保存。

1.3 主要试剂及仪器

高脂饲料购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司,配方号 D12451。氧化偶氮甲烷(AOM,批号 A2107153),Sigma 公司;葡聚糖硫酸钠(DSS,批号 SR01606),美国 MPBIO 公司;苏木素-伊红(HE)染液(批号 20190404),南京建成科技有限公司;杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS,批号 D210923),上海源培生物科技股份有限公司;DMEM 杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM/F-12,批号 2089098),美国 Gibco 公司;肿瘤组织解离试剂盒(货号 130-097-410),德国美天旆生物技术有限公司。

细胞过滤器(型号 QN2881),北京百奥莱博科技有限公司;台式离心机(型号 Centrifuge 5418R),艾本德中国有限公司;PCR 仪(型号 MyCycler),美国 Bio-Rad 公司;定量仪(型号 Qubit3.0),美国赛默飞世尔科技公司;磁力架(型号 10×Magnetic H),Chromium 公司;生物分析仪(型号 2100),安捷伦科技有限公司;石蜡包埋机(型号 JB-P5),武汉俊杰电子有限公司;石蜡切片机(型号 RM2016),上海徠卡仪器有限公司;倒置荧光显微镜(型号 Eclipse Ti-SR),日本 Nikon 公司。

1.4 模型制备、分组与给药

30 只小鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组和仙连解毒方组,每组 10 只。适应性喂养 1 周

后,以 AOM/DSS 经典造模方法^[7]结合高脂饲料、湿热环境饲养^[8]建立小鼠结直肠癌湿热瘀毒证模型,以结直肠中下段及肛门处黏膜充血水肿、出现多个隆起赘生物,小鼠出现便溏、便血、食欲不振表现为造模成功标准^[7-8]。具体方法如下:模型组和仙连解毒方组小鼠腹腔注射 AOM 工作液 10 mg/kg,对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水;AOM 给药 1 周后,以饮水方式给予 2%DSS 溶液持续 7 天,每只小鼠保证每天饮用 5 ml DSS 溶液,然后连续正常饮水 14 天。以上给予 DSS 的步骤为一个循环,共进行 3 个循环。DSS 饮水期间同时将小鼠置于造模箱温度(33±2)℃、湿度 93%±2%持续 8 h,连续 7 天。3 个循环的 DSS 饮水结束后,仙连解毒方组开始给予仙连解毒方 12.9 g/kg 灌胃,对照组及模型组给予等体积的生理盐水,每天 1 次,每连续灌胃 6 天后停 1 天,连续给药 16 周。实验期间,模型组和给药组每天给予高脂饲料喂养,对照组小鼠给予正常饲料喂养。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 HE 染色观察结直肠组织病理变化 末次给药结束 4 h 后,小鼠脱颈椎处死。解剖取出小鼠结直肠,4%多聚甲醛固定。用梯度乙醇逐步脱去组织中的水分,二甲苯透明组织后用石蜡包埋。石蜡切片,60℃烘箱过夜烤片,苏木素染细胞核,伊红染细胞质,中性树胶封片,光学显微镜下进行观察。

1.5.2 标本的采集与处理 每组采用随机数字表法选取 1 只小鼠,取出结直肠放入预冷的 DPBS 进行清洗,除去粪便,取距肛门 6 cm 之间的远端结肠段 2 cm 放入装满 DMEM F-12 的离心管中,冰上运输。所有组织用肿瘤解离试剂盒酶解。细胞分离后,通过 70 μm 细胞过滤器,400 g、25℃离心 10 min。去除上清液,然后将沉淀的细胞裂解为红细胞。将细胞颗粒重新悬浮在分选缓冲液(含 1%FBS 的 PBS)中。在 10×Genomics 单细胞 3'溶液中捕获单个细胞,并按照制造商的操作规程制备 RNA-seq 文库。

1.5.3 单细胞测序数据质控及基因定量 高通量测序中产生的原始数据为 fastq 格式序列,采用 10×Genomics 官方软件 CellRanger-v5.0.0 对原始数据进行数据质量统计以及比对参考基因组,通过识别序列中的区分细胞的标签序列标记和每个细胞内不同 mRNA 分子的唯一分子识别标签(UMI)标记对高通量单细胞转录组进行定量,获得高质量细胞数、基因中位值、测序饱和度等质控统计信息。

1.5.4 基因定量质控及数据预处理 使用Seurat-v3.1.1软件包在Cellranger初步质控结果的基础上,对数据进行进一步质控及处理^[9]。通过拟合广义线性模型过滤离域细胞,根据每个细胞的UMI数、基因数量和线粒体基因所占比例3项指标的分布,过滤剔除双细胞、多细胞或凋亡细胞等低质量细胞。

1.5.5 降维与聚类分析 使用Seurat的典型相关分析(CCA)整合工具对单细胞数据进行整合。使用“FindClusters”功能以0.8的分辨率进行细胞聚类,并使用前20个主成分(PC)来定义细胞身份。利用基因表达量进行主成分分析(PCA)线性降维分析,通过t-分布邻域嵌入(t-SNE)将PCA结果在二维空间进行可视化。

1.5.6 标记基因与细胞类型鉴定 采用Seurat中的FindAllMarkers函数进行标记基因鉴定,使用bimod检验方法对指定细胞群与其余所有细胞群进行差异检验(logfc.threshold=0.1, min.pct=0.01),其中满足 $P \leq 0.05$ 和 ≥ 1.5 倍差异表达的基因指定为细胞群与其余细胞群之间的差异基因,通过FeaturePlot函数对鉴定得到的标记基因进行可视化。采用SingleR-v1.4.1,基于人源代细胞图谱(HPCA)数据集进行细胞类型注释^[10]。

1.5.7 差异基因富集分析 使用Seurat中的FindMarkers函数进行差异基因筛选,根据 $P0.05$ 以及差异倍数 >1.5 的条件筛选出差异显著基因,并通过超几何分布检验差异显著基因的GO分析和KEGG富集分析。

2 结果

2.1 各组小鼠结肠组织病理学结果

HE染色结果显示,对照组结肠腺体排列规则,细胞核位于基底部,呈扁平或立方状。模型组上皮细胞极性消失,呈巢状、筛孔状,中央见坏死,上皮黏液层消失,细胞核浆比增大,核染色深,核仁明显,核分裂现象易见。仙连解毒方组腺体排列尚

整齐,杯状细胞数量减少,部分隐窝、上皮黏液层消失,上皮细胞核略增大,可见细小核仁,核分裂象偶见。详见图1(请扫描本文二维码获取彩图)。

2.2 小鼠肠道细胞单细胞转录组测序数据质控结果

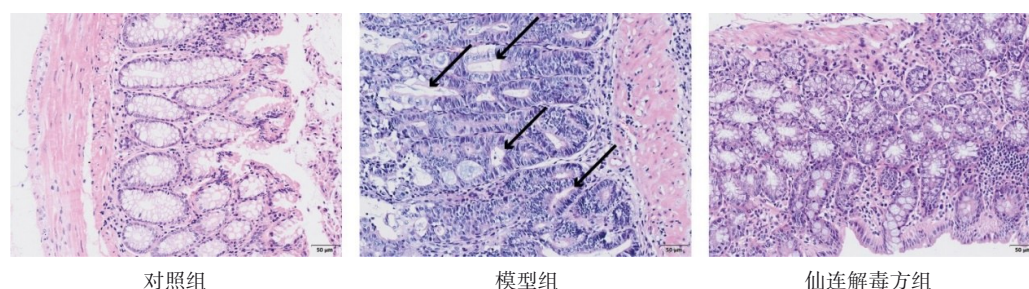
共捕获3组小鼠肠道细胞45 480个,3组细胞单细胞转录组测序样本CellRanger定量质控的高质量细胞数为14 306~16 455个。在CellRanger初步质控的基础上进一步对实验数据进行质控,剔除多细胞、双细胞或者凋亡细胞数据,保留细胞基因数和UMI数在平均值 ± 2 倍标准差范围内、且线粒体基因比例低于30%的细胞作为高质量细胞,进行下游分析,最终获得的细胞数目为9308~10 783个,每个细胞中的平均UMI数为3339~8651个,每个细胞中的平均基因数为1090~2103个,每个细胞中平均线粒体基因比例分布为0.0487~0.0746。

2.3 各组小鼠肠道细胞数据降维与聚类分析结果

基于PCA的降维结果,通过t-SNE对单细胞群聚类进行可视化,聚类算法采用SNN,最终获得最优细胞分群,3组样本共归类为20个细胞群。分析每个细胞群在不同组别中比例,表1示,模型组与对照组相比细胞群2、4、6、8、10、11、12、15、17、18、19占比升高,细胞群1、3、5、7、9、13、14、16、20占比降低;仙连解毒方组与模型组相比细胞群1、3、5、7、8、9、10、13、14、16、20占比升高,细胞群2、4、6、11、12、15、17、18、19占比下降,表明仙连解毒方可能通过干预以上细胞群发挥抗结肠癌湿热瘀毒证作用。

2.4 各组小鼠肠道细胞标记基因与细胞类型鉴定结果

筛选20个细胞群表达量前10位的标记基因,以细胞群1为例,其标记基因分别为Nxpe2、Nxpe4、Gm3054、Fut9、Plbd1、Defb45、Cttnbp2、Slc1a1、Slc5a6、Casp14,根据每个细胞群中的高变化基因集采用斯皮尔曼等级相关系数,取80%



注:箭头所指为腺体萎缩,杯状细胞减少或消失。

图1 各组小鼠结肠病理组织学比较(HE染色, $\times 100$)

表1 各组小鼠肠道样本细胞群数量和占比统计结果

细胞群	对照组		模型组		仙连解毒方组	
	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%
1	1608	17.28	292	3.11	1551	14.38
2	475	5.10	2073	22.07	859	7.97
3	1017	10.93	321	3.42	1983	18.39
4	276	2.97	1702	18.12	736	6.83
5	975	10.47	220	2.34	1458	13.52
6	459	4.93	1153	12.28	922	8.55
7	2422	26.02	3	0.03	4	0.04
8	83	0.89	627	6.68	1044	9.68
9	782	8.40	131	1.39	242	2.24
10	1	0.01	326	3.47	600	5.56
11	29	0.31	721	7.68	116	1.08
12	57	0.61	572	6.09	221	2.05
13	715	7.68	27	0.29	79	0.73
14	175	1.88	94	1.00	306	2.84
15	15	0.16	422	4.49	95	0.88
16	167	1.79	76	0.81	288	2.67
17	4	0.04	358	3.81	20	0.19
18	9	0.10	141	1.50	129	1.20
19	11	0.12	130	1.38	23	0.21
20	28	0.30	4	0.04	107	0.99

分位数来确定此细胞的细胞类型注释,分析可得细胞群1、3、5、7、9、10主要为肠上皮细胞,细胞群2、11主要为B细胞,细胞群4主要为自然杀伤T细胞(NKT)等。鉴定后三组小鼠肠道组织样本共9类主要细胞类型:肠上皮细胞、B细胞、NKT细胞、天然淋巴细胞(ILC)、干细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞、成纤维细胞。表2示,模型组肠上皮细胞比例较对照组显著下降,B细胞、NKT细胞、巨噬细胞、中性粒细胞比例增高;仙连解毒方组肠上皮细胞比例较模型组显著增加,B细胞、NKT细胞、巨噬细胞、中性粒细胞比例下降。因此,仙连解毒方可能通过调控B细胞、NKT细胞等免疫细胞比例,防止肠上皮细胞癌变等途径治疗结直肠癌湿热瘀毒证。

表3 仙连解毒方治疗结直肠癌湿热瘀毒证靶点功能富集结果(排名前4位)

通路名称	功能分类	P值	关键基因
免疫系统进程	生物学功能	3.82×10^{-13}	Fcer1g, S100a8, S100a9, Cd79a, Tyrobp, Cd19, Bst2, Ets1, Cd3d, Csk, Cd79b, Ly86, H2-K1, H2-DMA, H2-DMb2, Psmb9, H2-Ob, H2-Ab1, H2-Aa, H2-Eb1, Cd14, Cd74
抗原处理和呈递	生物学功能	1.80×10^{-12}	H2-K1, H2-DMA, H2-DMb2, Psmb8, H2-Ob, H2-Ab1, H2-Aa, H2-Eb1, H2-D1, Cd74
适应性免疫反应	生物学功能	1.69×10^{-11}	Ctss, Jchain, Cd79a, Lat, Csk, Cd79b, Ighm, Gpr183, H2-DMA, H2-DMb2, H2-Ab1, H2-Aa, H2-Eb1, H2-T23, Cd74
转运ATP合酶活性旋转机制	分子功能	9.91×10^{-11}	Atp5c1, Atp5f1, Atp5d, Atp5b, Atp5g1, Atp5o, Atp5a1

表2 各组小鼠肠道样本不同类型细胞数量和占比统计结果

细胞类型	对照组		模型组		仙连解毒方组	
	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%
肠上皮细胞	7862	86.99	1490	15.86	6511	60.40
B细胞	519	5.74	3282	34.93	1018	9.44
NKT	276	3.05	1706	18.15	732	6.79
巨噬细胞	57	0.63	572	6.09	221	2.05
肥大细胞	9	0.01	141	1.50	129	1.20
成纤维细胞	28	0.31	4	0.04	107	0.99
中性粒细胞	15	0.17	422	4.49	95	0.88
ILC	459	5.08	1153	12.27	922	8.55
干细胞	83	0.92	627	6.67	1044	9.69

注:NKT,自然杀伤T细胞;ILC,天然淋巴细胞。

2.5 各组小鼠肠道细胞中差异基因筛选结果

模型组与对照组比较,上调基因261个、下调基因563个;仙连解毒方组与模型组比较,上调基因229个、下调基因173个。分别比较对照组与模型组、仙连解毒方组与模型组中每组上、下调最显著的50个基因,发现在模型组中高表达、同时在仙连解毒方组中低表达的基因共17个:Igcl1、Igha、Igkc、Jchain、Ighg2b、Cd52、S100a9、Igcl2、Igcl3、Cd74、H2-Ab1、H2-Eb1、CD79a、Tmsb4x、Mzbl、Ly6d、S100a8;在模型组中低表达、同时在仙连解毒方组中高表达的基因共14个:Zg16、Atf3、Lgals4、Krt8、Krt18、Hbegf、Krt19、Pigr、Areg、Retnlb、Cldn3、Ckmt1、Syncn、Tspan1。

2.6 各组小鼠肠道细胞中差异基因富集分析结果

GO分析结果显示,仙连解毒方干预结直肠癌湿热瘀毒证基因生物学功能排名前4位的分别为免疫系统进程、抗原处理和呈递、适应性免疫反应、转运ATP合酶活性旋转机制方面(表3);KEGG富集分析结果显示,排名前4位的主要信号通路富集在免疫系统信号、癌症相关通路、细胞增殖与死亡信号、能量代谢信号方面(表4)。

表 4 仙连解毒方治疗结直肠癌湿热瘀毒证靶点通路富集结果（排名前 4 位）

通路名称	功能分类	通路占比/%	关键基因
免疫系统信号	有机系统	33.64	Actb, Calml4, Ccl5, Cd74, Cd79a, Cd79b, Cd9, Cldn3, Gng2, Gngt2, Grk2, Gsn, H2-Aa, H2-Ab1, Klr1d1, Pigr, Plpp2, Ptpn6, Ptpre, Pycard, Rac2, Rhoh, Runx3, S100a8, S100a9
癌症相关通路	人类疾病	22.27	Areg, Cd14, Cd63, Chpt1, Creb3l1, Cxcr4, Fos, H2-D1, H2-K1, H2-Q4, Hbegf, Maf, Mapk13, Nupr1, Pim1, Plpp2, Sdc4, Sp100, Stat1, Sult1a1, Thbs1, Tmprss2, Tpm1
细胞增殖与死亡信号	细胞进程	13.18	Acsl3, Actg1, Calml4, Ctss, Ets1, Fos, Glul, H2-D1, H2-K1, Hist1h2ae, Hist1h2ap, Lmna, Mapk13, Perp, Pycard,
能量代谢信号	代谢	11.82	Atp5g1, Car1, Cox4i1, Cyc1, Ethel, Glul, Ndufb5, Ndufb8, Ndufb9, Ppa1, Sqor, Tst, Uqcr10, Uqcrfs1

3 讨论

癌毒病机理论认为，结直肠癌是人体在肠腑功能失常、气血瘀滞的基础上，受湿邪侵袭、情志失调、饮食不节、正气亏虚等体内多种因素影响，诱生癌毒，并与肠腑中湿浊、瘀血相互搏结而导致的恶性病变，其病机总属肠腑通降失司、湿热瘀毒胶结，故湿热瘀毒证为晚期结直肠癌的主要证候。仙连解毒方中仙鹤草、黄连清热解毒，苦参、薏苡仁清热利湿，全方共奏清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气之功。

本研究 HE 染色结果显示，仙连解毒方可以显著改善结直肠癌湿热瘀毒证模型小鼠的结直肠组织病理状态。对 3 组小鼠肠道进行单细胞转录组测序结果发现，仙连解毒方肠上皮细胞比例较模型组显著增加，B 细胞、NKT 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞比例下降，与模型组比较共表达差异基因 402 个，其中上调基因 229 个、下调基因 173 个。差异基因的 GO 与 KEGG 富集分析显示，仙连解毒方对结直肠癌湿热瘀毒证小鼠的治疗作用主要富集在免疫系统过程、抗原处理和呈递、适应性免疫反应等方面。研究显示，Ⅱ型 NKT 细胞可通过分泌白细胞介素 13（IL-13），促进髓源性抑制细胞分泌转化生长因子β（TGF-β），抑制 CD8⁺T 细胞功能导致肿瘤进展^[10]，调节性 B 细胞(Breg)可促进 TNF-α 产生和聚集从而促进肿瘤细胞增多，还可在小鼠体内对肿瘤转移发挥作用^[11-12]。仙连解毒方组中小鼠肠道 NKT、B 细胞比例较模型组下降，故提示仙连解毒方可通过调控免疫微环境干预结直肠癌，KEGG 通路富集分析同样提示其治疗机制与免疫系统信号相关。

S100a8、S100a9 的异常表达与不可控性炎症密切相关，其可通过激活分化抑制因子 3（ID3）促进结直肠肿瘤发生，并可通过募集巨噬细胞，促进

结肠细胞的增殖和迁移^[13]。模型组小鼠中 S100a8、S100a9 基因表达较对照组上升，且巨噬细胞比例增高，在仙连解毒方组中这些基因表达与细胞比例均下降，表明仙连解毒方可能通过调控炎症微环境抑制结直肠癌发生发展。本团队前期研究^[14]发现，癌毒病机理论与炎癌转化密切相关。本研究采用的 AOM/DSS 诱导小鼠肠癌模型已被广泛应用于炎症性肠病向肠癌转化的机制研究^[15]，模型组小鼠肠上皮细胞比例较对照组小鼠明显下降，仙连解毒方组肠上皮细胞比例较模型组小鼠升高，初步表明仙连解毒方可抑制肠上皮细胞的炎癌转化进程，证实了仙连解毒方治疗结直肠癌湿热瘀毒证的有效性。另有研究表明，CD74 与结直肠癌细胞黏附和迁移密切相关^[16]，Atf3 在正常结肠黏膜上皮中低表达，在癌组织及转移灶中低表达，其过表达可以抑制 Wnt/β-catenin 信号通路和上皮-间质转化，抑制结肠癌的发生及转移^[17]。仙连解毒方可下调模型小鼠肠道中 CD74 表达，上调 Atf3 表达，表明其可能通过干预上皮间质转化等途径抑制肿瘤生长与转移。

综上所述，仙连解毒方治疗结直肠癌湿热瘀毒证的机制可能是通过干预 B 细胞、NKT 细胞、肠上皮细胞、巨噬细胞等发挥治疗结直肠肿瘤的作用，主要影响 S100a8、S100a9、Cd52、Cd74、Areg、Atf3、Hbegf、Krt18 等基因表达以及免疫系统、能量代谢、转运和分解代谢等信号通路，从而调控肠癌小鼠免疫细胞比例，干预上皮间质转化，抑制肿瘤发生发展。然而单细胞转录组测序的数据分析还存在一定局限性，细胞类型鉴定主要根据细胞内的特征性标记基因进行分类，目前小鼠肠道肿瘤细胞尚未发现合适的标记基因，因此在小鼠结直肠癌模型中未对肠道上皮细胞与肿瘤细胞进行细分。此外，仙连解毒方对上述细胞类型、基因与信号通路的作用机制仍需进一步研究与验证。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] 程海波. 癌毒病机理论探讨[J]. 中医杂志, 2014, 55(20): 1711-1715.
- [3] 韦堂军, 赵智强. 周仲瑛运用抗癌解毒法治疗肠癌经验[J]. 中医杂志, 2015, 56(2): 99-101.
- [4] 陈桐庆, 余成涛, 许惠琴, 等. 仙连解毒方干预“湿热瘀毒证”小鼠结直肠肿瘤的转录组学分析[J/OL]. 中国实验方剂学杂志. (2021-10-18) [2021-11-04]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20212322>.
- [5] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. Nat Methods 2009, 6(5): 377-382.
- [6] 李捷, 唐勇, 刘洁. 单细胞测序技术与中医药前沿研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(11): 1513-1519, 1526.
- [7] PARANG B, BARRETT CW, WILLIAMS CS. AOM/DSS model of colitis-associated cancer[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1422: 297-307. doi: 10.1007/978-1-4939-3603-8_26.
- [8] 吕冠华, 劳绍贤. 脾胃湿热证动物模型的建立与评价[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(3): 231-235.
- [9] BUTLER A, HOFFMAN P, SMIBERT P, et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(5): 411-420.
- [10] TERABE M, MATSUI S, NOBEN-TRAUTH N, et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway [J]. Nat Immunol, 2000, 1(6): 515-520.
- [11] SCHIOPPA T, MOORE R, THOMPSON RG, et al. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(26): 10662-10667.
- [12] OLKHANUD PB, DAMDINSUREN B, BODOGAI M, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺T cells to T-regulatory cells [J]. Cancer Res, 2011, 71(10): 3505-3515.
- [13] ZHANG X, AI F, LI X, et al. Inflammation-induced S100A8 activates Id3 and promotes colorectal tumorigenesis [J]. Int J Cancer, 2015, 137(12): 2803-2814.
- [14] 程海波, 沈卫星. 癌毒病机理论与炎症转变[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(2): 243-246.
- [15] 张华月, 李琦, 付晓伶. 结直肠相关癌前病变动物模型的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(5): 27-31, 36.
- [16] 刘峰, 王建祥, 周锐, 等. STAT1 与 CD74/CD44 在结肠癌细胞中协同调控上皮-间质转化机制研究 [J]. 内科急危重症杂志, 2018, 24(3): 256-258.
- [17] 袁明, 张永盟, 张姗姗, 等. ATF3 在结肠癌组织中表达及其对 HCT116 细胞增殖和迁移影响机制探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(2): 106-111.

Effect of *Xianlian Jiedu Formula* (仙连解毒方) on Intestinal Cell Types in Colorectal Cancer Model Mice with Damp-heat Stasis Toxin Pattern

ZHANG Qinchang^{1,2}, CHENG Haibo^{1,2}, YU Chengtao^{1,2}, SHEN Weixing^{1,2}, XU Changliang^{1,2}, TAN Jiani^{1,2}, LAI Yueyang^{1,2}, FAN Minmin^{1,2}, LI Liu^{1,2}

1. First School of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Prevention and Treatment of Tumor

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Xianlian Jiedu Formula* (仙连解毒方, XJF) in treating colorectal cancer mice with damp-heat stasis toxin pattern by using single-cell transcriptome sequencing. **Methods** Thirty male C57BL/6N mice were randomly divided into control group, model group and XJF group, with 10 mice in each group. Mice in model group and XJF group were induced by high fat diet and azomethane oxide (AOM)/ dextran sulfate sodium (DSS) to establish the model of colorectal cancer with damp-heat stasis toxin pattern, while those in the control group were given normal diet. After three cycles of DSS drinking water, XJF group was given 12.9 g/kg by gavage, while the control group and model group were given equal volume of normal saline, once daily for six consecutive days a week, with one day off, for consecutive 16 weeks. Four hours after the last administration, the colorectal tissues of mice in each group were collected, and the histopathological morphology of the mice was observed by hematoxylin-eosin staining (HE). A 2 cm-long distal colon segment located 6 cm away from the anus was taken, and tissue samples were dissociated; single-cell suspension was isolated, and RNA was extracted for qPCR amplification. Single-cell transcriptome sequencing was performed. Cell Ranger was used for data quality control. Seurat-v3.1.1 software package was used to perform dimensionality reduction cluster analysis, cell type identification, and gene ontology (GO) and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis of differential genes.

Results HE staining showed that the colon glands of the mice in the control group were arranged regularly, and the nuclei were located at the base, which were flat or cubic. Epithelial cells in the model group lost their polarity, and were nest-like and cribriform-like, with necrosis in the center, having increased nucleocytoplasmic ratio, deep nuclear staining, obvious nucleoli, and significant mitotic phenomenon; the above conditions were improved in the XJF group. Totally, 45 480 intestinal cells were captured in the three groups through single-cell transcriptome sequencing, which can be classified into 20 cell groups by dimensionality reduction clustering. The marker genes of each cell group were identified, and 9 main intestinal cell types were obtained, which were intestinal epithelial cells, B cells, natural killer T (NKT) cells, natural lymphocytes, stem cells, macrophages, neutrophils, mast cells, and fibroblasts. Compared to the model group, the XJF group had significant higher proportion of intestinal epithelial cells as well as lower proportion of B cells, NKT cells, macrophages, and neutrophils in the intestinal tissue. GO and KEGG enrichment analysis showed that XJF's effect on colorectal cancer mice with damp-heat stasis toxin pattern was mainly enriched in immune system process, antigen processing and presentation, adaptive immune response and rotation mechanism of ATP transport synthase activity, and the signaling pathways were mainly involved with immune system signals, cancer-related pathways, cell proliferation and death signals, and energy metabolism signals. **Conclusion** XJF may play its role in treating colorectal cancer mice with damp-heat stasis toxin pattern by regulating the proportion of immune cells in intestinal tissue, and preventing the transformation of intestinal epithelial cells into colorectal cancer cells.

Keywords colorectal cancer; damp-heat stasis toxin pattern; *Xianlian Jiedu Formula* (仙连解毒方); intestinal cells; single-cell transcriptome sequencing

(收稿日期: 2021-09-05; 修回日期: 2021-11-15)

[编辑: 邓媛]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

广告

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951 年—2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951 年—1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,邮政编码:100700

电话:(010) 64035632 联系人:杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951 年—1986 年光盘合订本每套(4 张光盘)480 元

1987 年—1994 年光盘合订本每套(1 张光盘)260 元

1995 年—2004 年光盘合订本每套(1 张光盘)280 元

2005 年—2013 年光盘合订本每套(1 张光盘)300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5—《中医杂志》(1987—1994)

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

