



# 肝癌小鼠不同阶段有关证候肾上腺差异表达的基因分析

潘志强<sup>1</sup>, 方肇勤<sup>1</sup>, 卢文丽<sup>1</sup>, 梁超<sup>1</sup>, 吴中华<sup>1</sup>, 刘小美<sup>1</sup>, 侯俐<sup>1</sup>, 张辉<sup>1</sup>, 卓少元<sup>1</sup>, 廖明娟<sup>1</sup>, 高必峰<sup>2</sup>

1. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203

2. 科罗拉多大学医学院, 科罗拉多州 丹佛 80262, 美国

**目的:**揭示肝癌小鼠不同阶段常见证候肾上腺基因表达的特征。

**方法:**采用实验小鼠及其标准化四诊及辨证方法, 以及 GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array 等技术, 检测 H22 肝癌小鼠早期邪毒壅盛证和气虚证、中期阳气虚证、中晚期气阴虚证共 3 阶段 4 个证候肾上腺基因表达的差异, 重点关注那些表达量大、差异显著的基因。

**结果:**筛选到不同阶段一致上调的基因 73 个, 一致下调的基因 26 个。其中一致上调的基因包括 Hp、C3、Anxa1、Procr、C2、Il4ra、Cd14、Ptprc、Cd52、C4b 以及 Eno3、Xdh、Gpx3 等。一致下调的基因涉及到神经系统相关基因如 Plp1、Mbp、Aldh1a1、Cck 和 Atn1, 与水电解质代谢有关的基因如 Aldh1a1 和 Slc22a17 等, 与信号转导有关的基因如 Cxcr4、Spag5 和 Stmn3 等, 以及参与转录调控和蛋白质生物合成的基因, 如 Hspalα、Dnajb1、Thra 和 Hhex 等。

**结论:**H22 肝癌小鼠在疾病发生发展过程中, 存在证候的演变及肾上腺组织基因表达的差异, 不同阶段一致上调或下调的差异表达基因可能是肝癌小鼠及其证候区别于正常小鼠的特征之一。

**关键词:**肝癌; 证候; 肾上腺; 肿瘤分期; 基因表达; 基因芯片

**中图分类号:** R735.7; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1672-1977(2008)08-0843-09

Pan ZQ, Fang ZQ, Lu WL, Liang C, Wu ZH, Liu XM, Hou L, Zhang H, Zhuo SY, Liao MJ, Gao BF. *J Chin Integr Med/Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2008; 6(8): 843-851.

Received January 14, 2008; published online August 15, 2008.

Free full text (PDF) is available at [www.jcimjournal.com](http://www.jcimjournal.com).

Indexed/abstracted in and full text link-out at PubMed.

Forward linking and reference linking via CrossRef.

DOI: 10.3736/jcim20080814

Open Access

## Differentially expressed genes in adrenal gland of H22 liver cancer mice with different syndromes and in different stages

Zhi-qiang PAN<sup>1</sup>, Zhao-qin FANG<sup>1</sup>, Wen-li LU<sup>1</sup>, Chao LIANG<sup>1</sup>, Zhong-hua WU<sup>1</sup>, Xiao-mei LIU<sup>1</sup>, Li HOU<sup>1</sup>, Hui ZHANG<sup>1</sup>, Shao-yuan ZHUO<sup>1</sup>, Ming-juan LIAO<sup>1</sup>, Bi-feng GAO<sup>2</sup>

1. School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Medicinal College of Colorado State University, Denver CO 80262, United States of America

**Objective:** To reveal the characteristics of gene expression in adrenal gland of H22 tumor mice with typical syndromes and in different liver cancer stages.

**Methods:** By the quantitative four diagnosis and syndrome differentiation methods and GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array, we observed adrenal gland gene expression in H22 tumor mice with pathogenic factor-toxin predominance syndrome and qi deficiency syndrome in the earlier stage, yang-qi deficiency syndrome in the intermediate stage, and qi-yin-yang deficiency syndrome in the advanced stage. Genes highly expressed and remarkably different were analyzed in this study.

**Results:** A total of seventy-three up-regulated coincident genes and twenty-six down-regulated coincident genes in different stages were investigated in the study. Up-regulated coincident genes included Hp, C3, Anxa1, Procr, C2, Il4ra, Cd14, Ptprc, Cd52, C4b, Eno3, Xdh, Gpx3, and so on. Down-regulated

**基金项目:** 上海市科委国际科技合作基金项目 (No. 064307052)

Correspondence: Zhao-qin FANG, MD, Professor; Tel: 021-51322115; E-mail: zqfang@sh163d.sta.net.cn

coincident genes included nervous system function-related genes such as Plp1, Mbp, Aldh1a1, Cck, Atn1, genes associated with electrolyte metabolism such as Aldh1a1 and Slc22a17, genes related to signal transduction such as Cxcr4, Spag5 and Stmn3, etc, and genes related to transcriptional control and protein biosynthesis such as Hspa1a, Dnajb1, Thra, Hhex and so on.

**Conclusion:** With the development of the tumorigenesis, the symptoms and signs and differentially expressed genes in adrenal gland of H22 tumor mice can be measured. Up-regulated and down-regulated coincident genes may be the features of H22 tumor mice different from those of normal mice.

**Keywords:** liver cancer; symptom complex; adrenal gland; neoplasm staging; gene expression; GeneChip

中医药肿瘤防治讲究辨证论治,这是基于肿瘤患者存在“同病异证”的现象<sup>[1, 2]</sup>。那么,肿瘤不同证候形成的内在机制是什么呢?以往的研究表明,证候,尤其是虚证,其形成与肾上腺等内分泌器官的功能紊乱与衰退有关;H22 肝癌小鼠在肿瘤的发生与发展过程中也存在证候的自然发生与演变,早期以邪毒壅盛和气虚为主,以后过渡到中期和中晚期的阳气虚、气阴阳虚的复合证,与人类十分相似<sup>[3, 4]</sup>。因此,检测不同阶段肝癌小鼠肾上腺基因表达谱的改变,有助于深刻认识肿瘤常见证候的内在机制。我们采用小鼠四诊工作站及其系列标准,以及 Affymetrix 的 GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array 系统,对 H22 肝癌小鼠早期邪毒壅盛证(pathogenic factor-toxin predominance syndrome, PTPS)和气虚证(qi deficiency syndrome, QDS)、中期阳气虚证(yang-qi deficiency syndrome, YQDS)和中晚期气阴阳虚证(qi-yin-yang deficiency syndrome, QYYDS)等 3 个阶段 4 个常见证候进行了肿瘤、下丘脑、垂体、肾上腺、甲状腺、胸腺、脾脏和睾丸共 8 个目标组织基因表达谱的检测,本文主要报道荷瘤小鼠 3 个阶段一致上调或下调的肾上腺基因芯片数据特征。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 昆明种雄性小鼠 270 只,体质量(25±1)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,动物合格证号为 SCXK(沪)2003-0003,其中 20 只腹腔接种 H22 腹水癌细胞株作为种鼠,腹水形成后抽取腹水用于 H22 实体瘤接种。H22 腹水癌细胞株由上海中医药大学科技实验中心保存。

1.2 实验试剂 TRIzol 试剂购自美国 GIBCO BRC 公司,RNeasy Mini Kit 购自德国 QIAGEN 公司,RNA 6000 Nano LabChip 购自美国 Agilent Technologies 公司,小鼠外显子基因芯片(GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array)及其试剂盒购自美国 Affymetrix 公司。

### 1.3 实验仪器

1.3.1 四诊计量化检测设备 YLS-13A 型小鼠抓

力测定仪(购自山东省医学科学院设备站)用于抓力检测,底部划有 4.5 cm×5.5 cm 方格(3 行×6 列=18 格)的实验笼用于旷场检测,NIKON 4500 数码相机用于显微和普通拍照、旷场检测录像,3 200 K(色温)250 W 摄像专用光源用于显微和普通照明,MP200B 型电子天平(购自上海恒平科学仪器有限公司)用于动物和饲料称质量,数字 WMY-01 型温度计(购自上海华辰医用仪表有限公司)用于检测腋温,SQF-EA 体视显微镜(购自上海万科仪器有限公司)用于爪、尾的显微拍摄,游标卡尺用于肿瘤瘤径的测量,个人电脑用于图像和数据处理。

1.3.2 芯片检测仪器 杂交炉、芯片洗涤系统和芯片扫描仪等购自美国 Affymetrix 公司。

### 1.4 实验方法

1.4.1 实验分组及处理 250 只正常昆明种小鼠采用随机数字表随机取 60 只作正常对照,另 190 只腋下接种 H22 肿瘤腹水癌细胞 0.2 ml(细胞浓度  $4 \times 10^7$ /ml),出瘤后淘汰 40 只出瘤不佳及畸形小鼠,剩余 150 只。取正常小鼠 20 只和肝癌小鼠 150 只用于四诊计量检测和辨证,另 40 只正常对照小鼠不做四诊检测(用于早期、中期的正常对照组)。常规饲养。

1.4.2 四诊计量化检测方法与计量辨证方法 我们采用课题组研制的小鼠四诊工作站技术与方法标准采集小鼠四诊信息,主要包括小鼠一般外观表现、体质量、体温、饮水量、摄食量、旷场实验小鼠跨格数、小鼠肢体抓力、爪色泽、尾色泽和肿瘤瘤径等指标,然后进行计量化辨证。可参见有关文献<sup>[5, 6]</sup>。

1.4.3 肝癌小鼠分期与常见证候的确定 H22 肝癌小鼠分期标准参见有关文献<sup>[4]</sup>。分别于接种肿瘤后第 7 天(早期)、第 20 天(中期)和第 28 天(中晚期)进行全体小鼠四诊检测与辨证,并分别于检测后的次日,即接种肿瘤后第 8 天,辨证并筛选出最为典型的邪毒壅盛证和气虚证小鼠各 16 只;第 21 天,辨证并筛选出最为典型的阳气虚证小鼠 16 只;第 29 天,辨证并筛选出最为典型的气阴阳虚证小鼠 16 只。

1.4.4 不同证候肝癌小鼠的处死与取材 小鼠四诊检测与辨证后处死,分别取下丘脑、垂体、甲状腺、肾

上腺、睾丸、胸腺、脾脏和肿瘤组织。称质量和计算各组织与正常对照小鼠对应组织质量均数的比值。

1.4.5 RNA 的提取与检测 以上共 5 组样本采用 TRIzol(GIBCO BRC)试剂盒及其方法,抽提肾上腺组织总 RNA,16 个组织样本合并混匀;采用 RNeasy Mini Kit(QIAGEN)试剂盒及其方法纯化 RNA;采用 RNA Nano LabChip 和方法,及其配套的 Agilent-bioanalyzer 2100 芯片检测 RNA 的质量和电泳图谱。

1.4.6 芯片检测 采用 GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array 及其试剂盒所建议的检测方法,采用 iterPlier 法计算核心基因表达读数值,并作外显子剪接差异分析。以上 RNA 检测和芯片检测委托上海生物芯片有限公司完成。

1.4.7 不同阶段肾上腺一致上调或下调基因的筛选  
 筛选标准为:(1)筛选 4 个证候与正常组比值至少有 1 组大于或等于 2.0,及小于或等于 0.5 的基因;(2)一致上调的基因,进一步筛选 4 个证候与正常组比值均大于 1.5 者;(3)一致下调的基因,进一步筛选 4 个证候与正常组比值均小于 0.67 者;(4)一致上调或下调的高表达基因,本文重点分析步骤(2)和(3)中至少有 1 组读数大于或等于 1 000 的基因。

2 结 果

2.1 肝癌小鼠肾上腺差异表达的基因数 在芯片

16 661 个核心基因中,采用以上筛选条件,得到肿瘤发生后,不同阶段肾上腺一致上调的基因 73 个,一致下调的基因 26 个。

2.2 肝癌小鼠肾上腺一致上调的基因

2.2.1 肝癌早期小鼠肾上腺一致上调的基因 肝癌早期小鼠肾上腺组织中上调的基因有 19 个(表 1),其中邪毒壅盛证有 16 个(表 1 前 16 个),气虚 3 个(表 1 后 3 个)。其表达量大于中期和中晚期。

2.2.2 肝癌中期小鼠肾上腺上调的基因 肝癌中期阳气虚证小鼠肾上腺组织中上调,且在 4 个证候中表达量最高的基因有 12 个。见表 2。

2.2.3 肝癌中晚期小鼠肾上腺上调的基因 中晚期气阴虚证上调,且在 4 个证候中表达量最高的基因有 30 个,见表 3。

2.2.4 早期至中晚期逐步上调的基因 这类基因共有 12 个。其特点是在早期,包括邪毒壅盛证和气虚证,这些基因表达业已升高;随着疾病的发展,其表达进一步增加。见表 4。

2.3 肝癌小鼠肾上腺一致下调的基因 通过以上筛选方法,获得肾上腺中表达一致下调的基因共 26 个。

2.3.1 肝癌早期小鼠肾上腺一致下调的基因 早期一致下调的基因有 9 个,其中邪毒壅盛证有 3 个,气虚证 6 个。其表达量小于中期和中晚期。见表 5。

表 1 早期邪毒壅盛和气虚证上调显著的基因(芯片读数计算值)  
 Table 1 Up-regulated genes of mice with PTPS and QDS in earlier stage

Genebank No.	GeneChip reading					Gene	Function category
	Normal	PTPS	QDS	YQDS	QYYDS		
NM_011723	1 628	3 259	3 008	2 756	2 575	Xdh	Chemical modification
NM_008161	1 414	3 004	2 286	2 526	2 491	Gpx3	Metabolism
NM_008149	1 287	2 991	2 567	2 565	2 870	Gpam	Chemosynthesis, metabolism
NM_009621	737	2 222	1 622	1 406	1 355	Adamts1	Metabolism, signal transduction
NM_213660	1 059	2 124	1 652	2 065	2 115	Stat3	Regulation, JAK-STAT
NM_011171	893	2 015	1 696	1 776	1 703	Procr	Immunization
NM_011498	574	2 012	1 160	1 091	1 273	Bhlhb2	Regulation
NM_013484	760	1 716	1 715	1 298	1 672	C2	Metabolism, immunization
NM_133857	640	1 709	1 106	1 175	1 040	Usp53	Metabolism
NM_011580	460	1 329	1 068	1 298	1 001	Thbs1	Growth and development
NM_008873	324	1 237	871	723	592	Plau	Metabolism, signal transduction
NM_025967	563	1 213	941	1 192	974	D16Ertd472e	
NM_007469	417	1 190	951	840	1 098	Apoc1	Transport, metabolism
NM_177317	0	1 166	940	468	2	Fpr-rs7	
NM_001030305	393	1 139	1 032	853	885	Pmp2	Transport
XM_977523	364	1 117	579	723	639	Atxn7	Growth and development
NM_026268	1 325	2 312	2 709	2 524	2 630	Dusp6	Cell cycle, MAPK
NM_019472	548	1 216	1 288	945	875	Myo10	Signal transduction
NM_027209	573	921	1 261	926	895	Ms4a6b	Signal transduction

PTPS; pathogenic factor-toxin predominance syndrome; QDS; qi deficiency syndrome; YQDS; yang-qi deficiency syndrome; QYYDS; qi-yin-yang deficiency syndrome.

表 2 中期阳气虚证上调显著的基因(芯片读数计算值)

Table 2 Up-regulated genes of mice with YQDS in intermediate stage

Genebank No.	GeneChip reading					Gene	Function category
	Normal	PTPS	QDS	YQDS	QYYDS		
NM_007933	1 655	3 774	2 880	4 060	4 023	Eno3	Chemolysis
NM_009626	1 513	2 745	2 782	3 432	3 152	Adh7	Regulation
NM_001008700	702	1 694	1 638	2 279	2 206	Il4ra	Immunization
AK076887	910	1 436	1 848	1 960	1 568	Drctnnb1a	
NM_173051	491	861	768	1 914	1 495	Serpinb1c	
NM_009653	490	1 546	950	1 738	1 301	Alas2	Chemosynthesis
NM_008953	16	87	67	1 445	192	Psp	
NM_008555	582	1 066	1 029	1 398	1 097	Masp1	Chemolysis, immunization
NM_181320	616	1 294	932	1 296	1 033	Dusp16	Chemical modification
NM_178098	91	267	265	1 267	968	4930486L24Rik	
NM_009994	573	1 042	887	1 167	957	Cyp1b1	Immunization, chemical modification
NM_172964	304	648	597	1 010	894	Arhgap28	

表 3 中晚期气阴阳虚证上调显著的基因(芯片读数计算值)

Table 3 Up-regulated genes of mice with QYYDS in advanced stage

Genebank No.	GeneChip reading					Gene	Function category
	Normal	PTPS	QDS	YQDS	QYYDS		
NM_009654	1 224	4 626	4 677	2 582	5 332	Alb1	Transport, signal transduction
NM_017370	2 299	3 768	3 574	3 961	4 602	Hp	Chemolysis, immunization
NM_009114	37	300	227	2 422	4 245	S100a9	Regulation
NM_008491	93	362	281	2 525	4 242	Lcn2	Transport
NM_017371	120	1 615	1 124	2 287	4 165	Hpxn	Metabolism, transport
NM_009778	1 056	2 044	1 690	2 376	3 009	C3	Immunization, signal transduction
NM_008694	16	121	94	1 266	2 925	Ngp	
NM_139198	753	1 317	1 219	1 913	2 171	Plac8	
NM_010196	134	1 261	866	965	2 052	Fga	
NM_181849	76	1 088	744	913	1 988	Fgb	
NM_029796	353	663	535	1 434	1 882	Lrg1	
NM_011314	0	709	271	928	1 766	Saa2	
NM_133862	95	1 034	776	737	1 673	Fgg	Signal transduction, regulation
NM_013465	253	1 204	1 135	788	1 500	Ahsg	Growth and development, signal transduction
XM_001002722	332	753	569	1 053	1 485	C4b	Immunization
NM_010924	549	867	922	884	1 460	Nnmt	
NM_009841	502	793	770	1 224	1 441	Cd14	Apoptosis, immunization
NM_010266	352	707	621	1 141	1 370	Gda	Metabolism, growth and development
NM_018746	113	763	457	670	1 302	Itih4	Immunization
NM_023125	76	575	471	411	1 279	Knlg1	Immunization
NM_011210	497	1 045	867	1 055	1 146	Ptpre	Signal transduction, cell cycle
NM_008096	150	730	760	393	1 120	Gc	Transport
NM_175933	554	1 028	1 081	957	1 115	Pex5	Transport
NM_010705	476	728	816	782	1 096	Lgals3	
NM_009253	197	709	846	407	1 091	Serpina3m	
NM_007376	93	674	566	363	1 087	Pzp	
NM_145594	17	514	411	523	1 052	Fgl1	
NM_028672	378	711	635	1 038	1 052	4930430E16Rik	
NM_008625	523	800	806	1 033	1 049	Mrc1	Immunization
NM_011314	1	377	168	490	1 020	Saa2	

表 4 早期至中晚期逐步上调的基因(芯片读数计算值)  
Table 4 Gradually up-regulated genes of mice from earlier stage to advanced stage

Genebank No.	GeneChip reading					Gene	Function category
	Normal	PTPS	QDS	YQDS	QYYDS		
NM_013650	59	666	455	3 938	6 140	S100a8	Immunization
XM_993285	547	945	1 106	3 213	4 782	Igk-V21-9	
NM_010730	932	1 413	1 600	2 486	3 652	Anxa1	Metabolism, cell cycle and apoptosis
NM_172768	1 652	3 082	3 297	3 425	3 491	Gramd1b	
NM_009892	13	102	103	1 154	2 176	Chi3l3	
NM_008522	28	106	106	1 014	2 173	Ltf	Transport, immunization
NM_145122	902	1 496	1 554	1 799	2 119	Pex16	Growth and development
NM_013706	491	770	791	1 031	1 391	Cd52	
NM_010824	10	77	100	616	1 205	Mpo	Apoptosis, immunization
NM_008611	8	30	35	516	1 197	Mmp8	Metabolism, chemolysis
NM_001034870	327	644	754	992	1 184	Serpina3h	
NM_011408	435	823	882	936	1 072	Slfn2	

表 5 早期邪毒壅盛和气虚证一致下调显著的基因(芯片读数计算值)  
Table 5 Down-regulated genes of mice with PTPS and QDS in earlier stage

Genebank No.	GeneChip reading					Gene	Function category
	Normal	PTPS	QDS	YQDS	QYYDS		
NM_007906	1 270	415	461	831	809	Eef1a2	Chemosynthesis
NM_026159	2 029	588	1 289	1 033	620	Retsat	Chemical modification,metabolism
NM_021551	1 599	727	1 009	944	1 055	Slc22a17	Transport
NM_177013	1 026	84	68	94	120	6332401O19Rik	
NM_031161	1 933	166	155	224	180	Cck	Signal transduction
NM_153581	1 143	274	272	349	315	Gpm6a	
NM_007881	1 260	520	455	603	576	Atn1	Growth and development
NM_009133	1 178	565	495	693	610	Stmn3	Signal transduction,growth and development
NM_011428	1 781	676	593	974	857	Snap25	Signal transduction

2.3.2 肝癌中期小鼠肾上腺下调的基因 中期阳气虚证下调,且在 4 个证候中表达量最低的基因有 11 个。见表 6。

2.3.3 肝癌中晚期小鼠肾上腺下调的基因 中晚期气阴虚证下调,且在 4 个证候中表达量最低的基因有 6 个。见表 7。

表 6 中期阳气虚证下调显著的基因(芯片读数计算值)  
Table 6 Down-regulated genes of mice with YQDS in intermediate stage

Genebank No.	GeneChip reading					Gene	Function category
	Normal	PTPS	QDS	YQDS	QYYDS		
NM_009508	1 342	89	97	58	91	Slc32a1	Transport
XM_990459	13992	154	132	127	6 690	Similar to H3 histone, family 3B	
NM_001025255	4248	207	133	131	131	Mbp	Immunization
NM_010479	2 798	482	271	156	232	Hspa1a	chemical modification
NM_025491	1 145	460	302	249	257	Susd3	
NM_017407	1 716	531	458	348	361	Spag5	Cell cycle, signal transduction
NM_025844	1 323	684	788	411	485	Chordc1	
NM_172391	1 881	1 132	1 086	691	784	1110064P04Rik	
NM_013559	3 188	1 799	1 418	713	831	Hsp110	
NM_013467	3 346	1 259	1 394	913	922	Aldh1a1	Metabolism
NM_009911	3 022	1 863	1 206	1151	1 228	Cxcr4	Signal transduction

表 7 中晚期气阴阳虚证下调显著的基因(芯片读数计算值)  
Table 7 Down-regulated genes of mice with QYYDS in advanced stage

Genebank No.	GeneChip reading					Gene	Function category
	Normal	PTPS	QDS	YQDS	QYYDS		
NM_013415	1 006	412	387	294	264	Atp1b2	Transport
NM_008245	1 071	514	572	387	362	Hhex	Regulation
NM_011123	5 219	696	414	429	334	Plp1	
NM_144921	1 367	624	618	505	411	Atp1a3	Transport
NM_178060	1 150	728	666	609	569	Thra	Regulation
NM_018808	2 761	909	692	682	680	Dnajb1	Chemical modification

### 3 讨 论

3.1 肝癌小鼠肾上腺一致上调基因的功能 这类基因在肝癌小鼠肾上腺中扮演什么角色呢? 遗憾的是经文献检索, 这些基因以往研究大多未涉及到肾上腺, 是在其他组织研究中发现, 并初步观察其作用的。依据文献报道, 有两类基因比较集中。

(1) 参与炎症反应、防御应答和补体激活途径等与免疫功能相关的基因。如: Hp、C3、Anxa1、Procr、C2、Il4ra、Maspl、Cd14、Ptprc、Cd52、C4b、Kngl、S100a8、Ltf 和 Mpo 等。其中一些基因在正常情况下便有表达, 表达量大, 如 Hp 和 C3; 而 Cd14、Ptprc、Cd52、C4b 和 S100a8 等基因在正常小鼠表达较低, 有的近乎不表达, 但肿瘤发生后, 这些基因表达异常活跃, 如 S100a8 由正常读数的 59 到中晚期读数高达 6 140。

触珠蛋白(Hp)被称为急性期炎症反应蛋白, 在炎症、外伤急性期明显升高<sup>[7]</sup>。Procr 又称为 Epcr, 主要表达于大动脉和大静脉腔内皮细胞表面, 参与抗凝、抗炎症、抗凋亡及自身免疫, 最近发现还可在多种肿瘤细胞表达, 是肿瘤细胞表面发现的又一种与抗凝相关的蛋白<sup>[8]</sup>。补体 C3 主要由肝细胞和巨噬细胞产生, 是补体系统的中枢, 参与并调节细胞免疫应答。膜联蛋白 A1(Anxa1)又称为磷脂酶 A2 抑制蛋白, 它与细胞增殖、分化、凋亡、信号转导、膜融合和炎症等相关。研究表明 Anxa1 与肿瘤的发生、发展、诊断及治疗密切相关<sup>[9]</sup>。我们的研究发现, C3 和 Anxa1 在肿瘤发生后, 肾上腺中的表达量呈现逐渐升高趋势。

Il4ra 由活化的 T 细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞合成分泌, 主要参与调节 T 淋巴细胞的生长、繁殖和分化<sup>[10]</sup>。Cd14 是一种特异性的单核细胞和巨噬细胞细胞表面标记物, 主要生物学活性是作为内毒素脂多糖受体, 在机体免疫、防御系统引起的一系列病理反应中起关键作用<sup>[11]</sup>。Ptprc 又称为 Cd45, 是位于白细胞表面的白细胞共同抗原, 主要参与活化信号转导、淋巴细胞发育和 T 细胞活化等的调节

作用, 此外, Cd45 还参与 B 细胞的分化等多种免疫功能<sup>[12]</sup>。Cd52 抗原是分布在淋巴细胞及淋系肿瘤细胞上的一种糖基磷脂酰肌醇锚定糖蛋白抗原, 其分子交联化可引起一系列信号传导, 但直接功能至今还不清楚<sup>[13]</sup>。髓过氧化物酶(Mpo)是由活化的吞噬细胞分泌的一种血红素蛋白, 也是髓细胞的特异性标志<sup>[14]</sup>。

肝癌小鼠肾上腺没有炎症, 为什么这类基因会表达如此活跃呢? 是机体整体免疫反应在肾上腺中的反映, 还是这些基因在肾上腺中可能扮演着其他角色呢? 有待进一步研究。

(2) 涉及到许多酶。如 Eno3、Xdh、Adh7、Gpx3、Dusp6、Gpam、Pex16、Adamts1、Usp53、Dusp16、Pex5、Nnmt、Alas2、Gda、Plau、Arhgap28 和 Mmp8 等。其中 Adamts1、Mmp8、Plau 参与蛋白质水解等过程, Dusp6、Dusp16 参与蛋白氨基酸去磷酸化等, Pex5 参与蛋白质运输, Usp53 参与泛素依赖蛋白分解代谢等过程。Eno3 参与糖酵解, Xdh 参与电子传递过程, Gpx3 参与过氧化氢分解代谢。Alas2、Gpam、Pex16 参与血红素和磷脂等生物合成。Gda 和 Adh7 参与核苷酸、核酸代谢及调控转录等。

以上这些酶相关基因, 部分如 Eno3、Xdh、Adh7、Gpx3、Dusp6 和 Gpam 在正常小鼠肾上腺表达较高, 当肿瘤发生后, 其表达量更是增加达 2 倍。提示肿瘤发生后, 肾上腺部分生物大分子的合成、分解、代谢十分活跃。这些酶的变化与肿瘤分期没有显著的关系, 更可能与疾病有关。

初步分析发现, Fpr-rs7、Pmp2、Atxn7 和 Plau 等基因在肿瘤早期邪毒壅盛证表达很高; 而 S100a8、4930486L24Rik、Lcn2、S100a9、Ltf、Ngp、Mmp8 和 Chi3l3 等基因在中期和中晚期表达非常高, 在正常小鼠表达却十分低。这些基因是否是不同阶段、不同证候的标志基因? 其病理意义如何? 值得进一步关注。

3.2 肝癌小鼠肾上腺一致下调基因的功能 这类基因下调幅度大, 主要涉及到以下几类基因。

(1) 与神经系统功能相关的基因。如 *Plp1*、*Mbp*、*Aldh1a1*、*Snap25*、*Cck*、*Atn1*、*Stmn3* 等。这类基因以往研究集中在神经系统。那为什么在肾上腺表达会出现如此的变化呢? 可能是因为肾上腺髓质由外胚层的神经嵴细胞迁移而来, 人胚胎自 7 周起, 第 18~24 对体节水平的神经嵴细胞迁入肾上腺皮质原基而分化为肾上腺嗜铬细胞, 使肾上腺髓质与交感神经细胞同源。由此推断, 这类基因可能在肾上腺髓质表达。值得注意的是, 这些基因在正常小鼠肾上腺内表达均很高, 显得很重要, 当肿瘤形成后, 其表达量大幅度下降。

如 *Plp1* 基因正常小鼠肾上腺芯片读数为 5 219, 提示为高表达基因, 在肿瘤形成全过程中, *Plp1* 基因表达量比正常小鼠降低 10 多倍。*Plp1* 基因编码髓鞘蛋白脂蛋白, 在中枢神经系统中含量最丰富, 并在其发育过程中起到十分重要的作用<sup>[15]</sup>。*Mbp* 基因在正常小鼠肾上腺芯片读数为 4 248, 在肿瘤形成全过程中, *Mbp* 基因表达量比正常小鼠降低竟达 20 余倍, 几乎被关闭。*Mbp* 是组成髓鞘的主要蛋白之一, 主要参与突触传递、中枢神经系统发育、神经入鞘及免疫应答等<sup>[16]</sup>。*Cck* 基因在正常小鼠肾上腺芯片读数为 1 933, 肿瘤发生后各期, *Cck* 表达量降低也达 10 倍之多。*Cck* 编码缩胆囊素, 是具有广泛生物学活性的脑肠肽, 它既是胃肠道主要调节激素之一, 参与摄食、胰岛素的释放、胃肠运动、镇痛、情绪等活动的调节; 也作用于中枢神经系统, 起着神经递质或调质的作用<sup>[17]</sup>。

此外, 研究表明 *Aldh1a1* 可能参与帕金森病的发生; *Snap25* 在轴突的生长、树突的形成、神经递质吸收与分泌、突触小泡与质膜的融合过程中起着重要的作用; *Atn1* 和 *Stmn3* 参与神经系统发育和细胞内信号转导等<sup>[18,19]</sup>。芯片结果显示 *Aldh1a1*、*Snap25*、*Atn1* 与 *Stmn3* 在肿瘤形成中, 比正常降低 2 倍左右。

(2) 参与水电解质代谢的基因, 如 *Aldh1a1*、*Slc22a17*、*Atp1a3*、*Atp1b2* 等。推测这些基因可能是由肾上腺皮质所表达, 提示肿瘤发生后, 肾上腺参与调节水电解质代谢的基因表达下降, 导致机体水电解质平衡紊乱。

其中, *Aldh1a1* 基因参与醛代谢, 正常小鼠肾上腺芯片读数为 3 346, 随着肿瘤的发展, 其表达量下降 2~3 倍。值得注意的是, 与此相反, 肾上腺皮质类固醇醛固酮合成酶 *Cyp11b2* 表达却逐渐升高, 反映了机体醛固酮合成增多与代谢减少的一致。*Slc22a17*、*Atp1a3*、*Atp1b2* 等基因参与钾和钠离子的运输, 随着肿瘤的发生发展, 这些基因表达呈现逐

渐下降的趋势, 提示肿瘤小鼠水电解质代谢调节功能紊乱。

(3) 参与信号转导的基因。诸如 *Cxcr4*、*Cck*、*Spag5*、*Stmn3* 等。*Cxcr4* 被发现是 T 细胞-嗜性 HIV-1 的主要辅助受体, 主要参与信号转导、G 蛋白偶联受体蛋白信号转导途径等。研究表明 *Cxcr4* 在炎症反应、HIV 感染, 以及调控免疫细胞分化、发育及定向迁移过程中起重要作用, 且在心脏、血细胞、血管和神经网络的发育、损伤的修复及肿瘤的生长恶化中起一定作用<sup>[20]</sup>。正常小鼠肾上腺芯片读数为 3 022, 在肿瘤形成全过程中, *Cxcr4* 基因表达量比正常小鼠降低 2 倍左右。*Spag5* 主要参与磷酸肌醇介导的信号转导、细胞周期、有丝分裂、纺锤体组织和生物发生等生物过程。正常小鼠肾上腺芯片读数为 1 716, 在肿瘤形成全过程中, *Spag5* 基因表达量比正常小鼠降低 3~5 倍。*Cck* 与 *Stmn3* 基因也参与了细胞内信号转导级联反应等。有研究表明 *Cck*-8 可剂量依赖性地激活静息状态和 LPS 诱导的大鼠 PMs cAMP-PKA 信号转导途径, 并认为这可能是 *Cck* 抗炎作用的分子机制之一<sup>[21]</sup>。

(4) 参与转录调控、蛋白质生物合成及其折叠等的基因。如 *Hspa1a*、*Dnajb1*、*Thra*、*Hhex* 等。其中 *Hspa1a* 编码 70 kD 热休克蛋白 (*Hsp70*) 1A。*Hsp70* 具有多种生物学功能, 包括分子伴侣功能, 参与免疫反应, 抗细胞凋亡功能, 抗氧化功能, 提高细胞的应激耐受性, 促进细胞增殖, 参与细胞骨架的形成和修复等等<sup>[22]</sup>。*Dnajb1* 基因又称为 *Hsp40*, 被认为可以对 *Hsp70* ATP 酶的活性起到重要的调节作用。*Dnajb1* 在小鼠睾丸中持续性表达, 其表达水平不受热休克而改变<sup>[23]</sup>。*Thra* 即  $\alpha$  型甲状腺激素受体。

此外, 值得注意的是, *H3 histone, family 3B* 基因在正常小鼠表达量高达 13 992, 而肝癌小鼠早期的邪毒壅盛证、气虚证和阳气虚证中表达急剧下降, 下调倍数达 100 倍。在阴阳气虚证中下调也有 2 倍, 这种情况与证候有关, 还是其他原因所致, 尚有待于深入研究。研究表明 *H3 histone* 是染色体的结构蛋白, 它与 DNA 组成的核小体是染色体的基本结构单元, 组蛋白的功能是协助折叠及包装 DNA, 保护 DNA 不被酶消化, 除此之外, 它还在基因调控、肿瘤形成、细胞凋亡中起到重要作用<sup>[24]</sup>。

总之, 以上这些基因表达的改变, 标志着肾上腺整体生理机能的减退, 也表明了这些基因表达的改变与肿瘤相关、与疾病相关, 是疾病导致了这些基因表达的改变。但是, 值得注意的是, 即便如此, 在早期、中期、中晚期 3 个不同阶段, 不同组别基因表达

高低存在差异;即使在早期这同一阶段,邪毒壅盛和气虚也存在基因表达的差异。这提示这些基因表达数量的改变,还可能与证候有着密切的关系,部分基因可能即是证候形成的内在基础。我们希望今后能进一步探讨、检验、揭示这些基因与肿瘤不同证候的关系。

### 3.3 采用基因芯片技术研究中医证候的考虑

将基因芯片技术引入中医证候的研究中,可以全面、客观、真实地反映不同证候在不同组织中基因转录的整体特征,这样的研究,对于深入认识疾病-证候的本质是必要的,这也还为今后深入研究开拓了广阔的视野和空间。以往由于受到检测手段的限制,中医证候研究往往局限在肾上腺轴的几个基因、蛋白或激素。那么,究竟是如何导致这些基因表达改变的,还有没有其他基因的表达发生显著的改变?显然,仅仅对若干基因的观察,会遗漏许多重要的生物信息,而且对全面综合评价目标组织基因表达改变特征是不利的。本文主要分析了小鼠肾上腺基因芯片的表达特征,是基于以往学术界在证候研究中发现神经内分泌组织与证候尤其是虚证的关系密切。最近,沈自尹等<sup>[25]</sup>对自然衰老大鼠肾虚证模型及皮质酮大鼠肾阳虚证模型采用大鼠全基因组芯片检测下丘脑、垂体、肾上腺、淋巴细胞(HPAT)组织基因表达谱,结果老年大鼠和皮质酮大鼠与青年大鼠比较,在 HPAT 轴上首先是众多的神经递质显著下调,接下来是生长激素类和性激素类都显著下调,其表达下调的模式呈高度一致。该研究采用基因芯片技术筛选肾虚证的部分特征性基因,并观察给予中药干预后的改变。

基因芯片结果是否可靠,是不是需要采用 RT-PCR 等手段逐一验证呢?对于那些将要深入研究的基因,前期的验证是必须的。然而,就研究方法而言,以上结果是可靠的。首先,我们所观察的肝癌小鼠 4 个常见证候,以及所建立的小鼠四诊工作站及其标准,业已通过大量重复的实验验证,是稳定且可重复的;其次,本实验采用 16 只小鼠的样本合并,反映了不同阶段肝癌小鼠基因表达的集中趋势,不是个别小鼠可能带来的误差;再次, Affymetrix 的 GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array 具有一套标准的操作方法和不同环节的质量检测与控制,芯片扫描结果也采用了一系列内在质量检验与控制,经检查,以上芯片检测各环节和结果质量是稳定的。因此,可以说以上所观察的结果是可靠的。

关于不同证候的基因芯片数据分析,面对如此大量的数据结果,如何取舍是重要的选择。我们首先公布那些表达量较大的基因。这是因为我们以往

的研究一再发现,那些表达量大的基因,往往具有比较重要的生理功能和病理意义。所以我们把芯片读数在 1 000 以上的基因入选(至少 1 组),希望能够集中反映那些具有比较重要功能的基因。对于以上所筛选获得的一些差异表达基因,我们将开展实验进行验证,以揭示 H22 肝癌荷瘤小鼠证候的物质基础。

## REFERENCES

- 1 Fang ZQ, Li YJ, Tang CL, *et al.* Analysis on characteristics of syndrome in 2 060 cases of primary hepatic cancer. *Zhong Yi Za Zhi*. 2004; 45(1): 53-54. Chinese with abstract in English.  
方肇勤, 李永健, 唐辰龙, 等. 2 060 例原发性肝癌患者证候特点分析. *中医杂志*. 2004; 45(1): 53-54.
- 2 Li YJ, Fang ZQ, Tang CL, *et al.* The study of clinical epidemiology of symptoms and signs about 2 060 primary hepatic carcinoma's distribution of TCM syndrome. *Zhongguo Yi Yao Xue Bao*. 2003; 18(3): 144-146. Chinese with abstract in English.  
李永健, 方肇勤, 唐辰龙, 等. 2 060 例原发性肝癌中医证候分布规律的临床流行病学调查研究. *中国医药学报*. 2003; 18(3): 144-146.
- 3 Fang ZQ, Hou L, Lu WL, *et al.* Occurrence, development, accompanying symptoms and prognosis of syndromes in tumor-bearing mice. *Shanghai Zhong Yi Yao Za Zhi*. 2007; 41(1): 57-62. Chinese with abstract in English.  
方肇勤, 侯俐, 卢文丽, 等. 荷瘤小鼠证候的发生、演变、兼证及预后. *上海中医药杂志*. 2007; 41(1): 57-62.
- 4 Fang ZQ. The experiment technology of determination of treatment based on pathogenesis obtained through differentiation of symptoms and signs—experiment mouse technique of diagnosis and differentiation of symptoms and signs. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers. 2006; 45, 132-153. Chinese.  
方肇勤. 辨证论治实验方法学—实验小鼠诊法和辨证. 上海: 上海科学技术出版社. 2006; 45, 132-153.
- 5 Fang ZQ, Pan ZQ, Tang WC, *et al.* Construction and operational standard of four diagnostic methods workstation for mice. *Shanghai Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao*. 2006; 20(1): 42-46. Chinese with abstract in English.  
方肇勤, 潘志强, 汤伟昌, 等. 小鼠“四诊工作站”构建与操作标准探讨. *上海中医药大学学报*. 2006; 20(1): 42-46.
- 6 Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, *et al.* Establishment and evaluation of metrological methods of syndrome differentiation about common syndrome in rats and



- mice. *Zhongguo Zhong Yi Ji Chu Yi Xue Za Zhi*. 2007; 13(7): 502-505. Chinese with abstract in English.
- 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 大鼠、小鼠常见证候计量化辨证及方法的建立及其评价. *中国中医基础医学杂志*. 2007; 13(7): 502-505.
- 7 Wang Y, Kinzie E, Berger FG, *et al*. Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox Rep*. 2001; 6(6): 379-385.
- 8 Zheng X, Li W, Gu JM, *et al*. Effects of membrane and soluble EPCR on the hemostatic balance and endotoxemia in mice. *Blood*. 2007; 109(3): 1003-1009.
- 9 Bensalem N, Ventura AP, Vallée B, *et al*. Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients. *Mol Cell Proteomics*. 2005; 4(10): 1591-1601.
- 10 Soriano A, Lozano F, Oliva H, *et al*. Polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha chain gene influence susceptibility to HIV-1 infection and its progression to AIDS. *Immunogenetics*. 2005; 57(9): 644-654.
- 11 Benhnia MR, Wroblewski D, Akhtar MN, *et al*. Signaling through CD14 attenuates the inflammatory response to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *J Immunol*. 2005; 174(3): 1539-1548.
- 12 Irls C, Symons A, Michel F, *et al*. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nat Immunol*. 2003; 4(2): 189-197.
- 13 Ito K, Hasegawa A, Komori S, *et al*. Biochemical property and immunogenicity of mouse male reproductive tract CD52 (mrt-CD52). *J Reprod Immunol*. 2007; 75(1): 32-39.
- 14 Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, *et al*. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*. 2002; 296(5577): 2391-2394.
- 15 Simons M, Kramer EM, Macchi P, *et al*. Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol*. 2002; 157(2): 327-336.
- 16 Galiano MR, Andrieux A, Deloulme JC, *et al*. Myelin basic protein functions as a microtubule stabilizing protein in differentiated oligodendrocytes. *J Neurosci Res*. 2006; 84(3): 534-541.
- 17 Giacobini P, Wray S. Cholecystokinin directly inhibits neuronal activity of primary gonadotropin-releasing hormone cells through cholecystokinin-1 receptor. *Endocrinology*. 2007; 148(1): 63-71.
- 18 Molotkov A, Duester G. Genetic evidence that retinaldehyde dehydrogenase Raldh1 (Aldh1a1) functions downstream of alcohol dehydrogenase Adh1 in metabolism of retinol to retinoic acid. *J Biol Chem*. 2003; 278(38): 36085-36090.
- 19 Shen Y, Lee G, Choe Y, *et al*. Functional architecture of atrophins. *J Biol Chem*. 2007; 282(7): 5037-5044.
- 20 Xu J, Mora A, Shim H, *et al*. Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37(3): 291-299.
- 21 Li S, Ni Z, Cong B, *et al*. CCK-8 inhibits LPS-induced IL-1beta production in pulmonary interstitial macrophages by modulating PKA, p38, and NF-kappaB pathway. *Shock*. 2007; 27(6): 678-686.
- 22 Carsillo T, Traylor Z, Choi C, *et al*. hsp72, a host determinant of measles virus neurovirulence. *J Virol*. 2006; 80(22): 11031-11039.
- 23 Doiguchi M, Kaneko T, Urasoko A, *et al*. Identification of a heat-shock protein Hsp40, DjB1, as an acrosome- and a tail-associated component in rodent spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 2007; 74(2): 223-232.
- 24 Witt O, Albig W, Doenecke D. Transcriptional regulation of the human replacement histone gene H3.3B. *FEBS Lett*. 1997; 408(3): 255-260.
- 25 Shen ZY, Huang JH, Chen WH. Comparison of gene expression profiles between rats of Shen deficiency syndrome and Shen-yang deficiency syndrome differentiated according to therapeutic efficacy of drugs used. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2007; 27(2): 135-137. Chinese with abstract in English.
- 沈自尹, 黄建华, 陈伟华. 以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究. *中国中西医结合杂志*. 2007; 27(2): 135-137.