

# 黄柏苍术汤对急性痛风性关节炎鼠模型抗炎作用的研究

杨 虹 罗 千 熊梓汀 李巧玲 陈雄斌 王 勇

**摘要 目的** 观察黄柏苍术汤对急性痛风性关节炎模型大鼠的治疗效果,探讨其可能的作用机制。**方法** 制备尿酸盐晶体诱导的大鼠痛风性关节炎模型,在致炎后动态观察关节肿胀值,连续给药3天后处死大鼠,收集关节液,通过酶联免疫法检测各组关节液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6表达水平。**结果** 模型组、黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术中剂量组、黄柏苍术低剂量组、秋水仙碱组大鼠的关节肿胀值在6、12、24、48h均高于正常组( $P < 0.05$ );在注射后72h正常组的关节肿胀值与秋水仙碱组、黄柏苍术中剂量组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而模型组、黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术低剂量组与正常组间比较大均大于正常组( $P < 0.05$ ),同时黄柏苍术高剂量组和黄柏苍术低剂量组关节肿胀值显著小于模型组( $P < 0.05$ )。处死后黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术中剂量组、黄柏苍术低剂量组、秋水仙碱组大鼠、正常组的关节液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6表达水平均显著低于模型组( $P < 0.05$ )。其中黄柏苍术中剂量组、秋水仙碱组的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 表达水平显著低于黄柏苍术高剂量组和黄柏低剂量组( $P < 0.05$ )。**结论** 黄柏苍术汤可能通过抑制炎性细胞释放炎性因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6,从而明显改善急性痛风性关节炎的炎性反应,其抗炎反应强度可能受药物浓度影响。

**关键词** 黄柏苍术汤 急性痛风性关节炎 大鼠 炎性因子

**中图分类号** R684.3      **文献标识码** A      **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.01.022

**Anti-inflammatory Effect of Huangbai Cangzhu Decoction on Acute Gouty Arthritis Model.** Yang Hong, Luo Gan, Xiong Ziting, et al.

The Medicinal and Life Sciences College of Chengdu University of TCM, Sichuan 611137, China

**Abstract Objective** To observe the therapeutic effect of Huangbai Cangzhu Decoction on acute gouty arthritis model rats, and to explore its possible mechanism. **Methods** A rat model of gouty arthritis induced by urate crystals was prepared. The joint swelling value was observed dynamically after inflammation. The rats were sacrificed 3 days after continuous administration, and the joint fluid was collected. The joint fluid was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 expression levels. **Results** The joint swelling values of the model group, Huangbai atracylodes high-dose group, Huangbai atracylodes chinensis middle dose group, Huangbai atracylodes low-dose group and colchicine group were higher than the normal group at 6, 12, 24, 48 hours ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the joint swelling value between the colchicine group and the Huangbai Cangzhu Decoction group at 72 hours after injection ( $P > 0.05$ ), while the model group, the high dose group of Acorticoptera chinensis, and the low dose group of Acorticula sinensis. The comparison between the normal groups was greater than that of the normal group ( $P < 0.05$ ). The joint swelling value of the high dose group of Phellodendron chinense L. and the low dose group of Atractylodes lancea L. was significantly lower than that of the model group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-6 in the synovial fluid of the high dose group of Phellodendron chinense L., the middle dose of Phellodendron chinense L., the low dose group of Acorticulaceae, the colchicine group and the normal group after sacrifice were performed. Both were significantly lower than the model group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the middle dose group and the colchicine group of A. chinensis were significantly lower than those in the high dose group and the low dose group of Phellodendron chinense ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Phellodendron chinense L. can significantly improve the inflammatory response of acute gouty arthritis by inhibiting the release of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 by inflammatory cells, and the intensity of anti-inflammatory reaction may be affected by drug concentration.

**Key words** Huangbai Cangzhu Decoction; Acute gouty arthritis; Rat; Inflammatory factor

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(18PJ480);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(030/030041159);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划医院专项基金资助项目(自然科学类)(2018yky19)

作者单位:611137 成都中医药大学医学与生命科学学院(杨虹、熊梓汀、李巧玲);成都市中西医结合医院骨科(罗干);成都中医药大学基础医学院(陈雄斌、王勇)

通讯作者:罗干,电子信箱:luoganhd@126.com

痛风是由于体内嘌呤代谢紊乱,尿酸排泄减少,体内持续高尿酸状态,引起过饱和的尿酸析出沉积于组织或器官的一种非特异炎性反应<sup>[1]</sup>。常累及关节,致反复发作性的关节炎;肾脏引发慢性肾间质性肾炎和尿路结石等。急性痛风性关节炎临幊上常表现为突发的关节红、肿、热、痛及功能障碍,好发部位多见于第一跖趾关节、踝关节、膝关节<sup>[2]</sup>。对于该病的治疗中西医采取的方式有所不同,西医一线用药主要为秋水仙碱、非甾体消炎药、激素等,能够起到迅速控制症状的作用,但是同时也存在着一定的弊端,如不良反应大,有些患者药物依赖性差等<sup>[3,4]</sup>。中医药治疗痛风在我国已有悠久的历史,而黄柏苍术汤在中医药治疗痛风中有一定的临床疗效,但其作用机制目前尚不明确<sup>[5,6]</sup>。本研究通过观察不同浓度黄柏苍术汤对急性痛风性关节炎模型大鼠的治疗后关节肿胀值的动态变化及治疗后关节液中炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6 的变化,初步探讨黄柏苍术汤治疗急性痛风性关节炎的可能机制。

### 材料与方法

1. 药物与试剂:黄柏苍术汤的主要组成成分:黄柏 10g、苍术 10g、制天南星 10g、桂枝 10g、威灵仙 15g、防己 15g、桃仁 10g、红花 10g、龙胆草 10g、茯苓 15g、萆薢 12g<sup>[6]</sup>。水煎浓缩待用。临用前用 0.8% CMC-Na 稀释。秋水仙碱悬液是由云南昆明制药集团生产的秋水仙碱片研磨呈粉末状后溶于蒸馏水形成浓度为 0.01mg/ml 的混悬液。尿酸购自美国 Sigma 公司。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6 ELISA 检测试剂盒均购自深圳欣博盛有限公司。

2. 实验动物:SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,体质量为 200~240g,均为 3 月龄。所有动物均由四川省医学科学院实验动物研究所提供。饲养温度 21~27℃,湿度 50% ± 5%,昼夜光照及通风环境自然调节。实验程序严格按照动物管理条例。

3. 主要仪器:酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),FA2004B 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司),移液枪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

4. 尿酸钠悬液的制备:称取 80mg 尿酸盐晶体,加入无菌 PBS 溶液中,制成终浓度为 80mg/ml 的尿酸盐混悬液。以上操作均在无菌操作台中进行。

5. 实验动物的造模与给药:48 只大鼠在开放的实验环境下饲养 1 周后,随机分为模型组、黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术中剂量组、黄柏苍术低剂量组、秋水仙

碱组、正常组,每组各 8 只大鼠。对各组大鼠进行吸入乙醚麻醉后,在无菌条件下以右踝关节外侧后方为穿刺点,除正常组注射 PBS 外,其余各组均注入 50μl 80mg/ml 的尿酸盐混悬液,局部消毒预防感染。尿酸盐注射后分别灌喂相应的药物,其中黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术中剂量组、黄柏苍术低剂量组分别为 12.6、3g/kg,秋水仙碱组为 0.1mg/kg。正常组、模型组灌喂 0.9% 氯化钠溶液。每次灌胃 2.5ml,每天 1 次,连续 3 天。

6. 关节肿胀值:分别用游标卡尺在 6、12、24、48、72h 测量 6 组大鼠注射部位同一部位的直径。用该部位的直径代表其关节肿胀值。

7. 关节液炎性因子的测定:给药 3 天后对大鼠进行颈脱臼处死,收集注射部位关节腔积液。根据各 ELISA 试剂盒说明书的方法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6 的表达。

8. 统计学方法:采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析。计数资料的比较用  $\chi^2$  检验;多样本均数的比较及均数的两两比较用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 柏苍术汤对急性痛风性关节炎关节肿胀值影响的比较:关节腔注射尿酸盐悬液后,除正常组外,其余 5 组小鼠均在 1h 内出现关节肿胀值增加的情况,且伴随有红、肿、热,大鼠活动功能受限现象,说明急性痛风性关节炎动物模型造模成功。模型组、黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术中剂量组、黄柏苍术低剂量组、秋水仙碱组大鼠的关节肿胀值在 6、12、24、48h 均高于正常组( $P < 0.05$ );在注射后 72h 正常组的关节肿胀值与秋水仙碱组、黄柏苍术中剂量组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而模型组、黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术低剂量组与正常组间比较均大于正常组( $P < 0.05$ ),同时黄柏苍术高剂量组和黄柏苍术低剂量组关节肿胀值显著小于模型组( $P < 0.05$ ,表 1)。

2. 黄柏苍术汤对急性痛风性关节炎关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6 表达的影响:模型组大鼠关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6 均显著高于其余 5 组( $P$  均  $< 0.05$ )。其中,黄柏苍术中剂量组、秋水仙碱组的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达水平显著低于黄柏苍术高剂量组和黄柏低剂量组( $P$  均  $< 0.05$ ),与正常组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。IL-8、IL-6 的表达水平在黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术中剂量组、黄柏苍术低剂量组、秋水仙碱组、正常组间比较差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。

表 1 5 组大鼠不同时间点关节肿胀值比较

组别	6h	12h	24h	48h	72h
正常组	12.25 ± 1.832	9.00 ± 1.069	6.75 ± 1.035	5.13 ± 0.641	5.00 ± 0.756
模型组	22.75 ± 1.282 *	26.63 ± 2.722 *	18.63 ± 3.378 *	14.63 ± 2.134 *	13.50 ± 2.726 *
秋水仙碱组	19.13 ± 2.357 * #	13.50 ± 1.852 * #	9.75 ± 2.121 * #	7.25 ± 1.669 * #	6.25 ± 0.886 #
高剂量组	20.88 ± 1.885 *	16.25 ± 1.982 * #Δ	12.50 ± 1.604 * #Δ	10.88 ± 1.808 * #Δ	8.75 ± 1.282 * #Δ▲
中剂量组	19.38 ± 1.188 * #	13.38 ± 1.061 * #▲	10.13 ± 2.167 * #▲	8.75 ± 1.035 * #▲	6.75 ± 0.707 #▲
低剂量组	20.63 ± 1.847 *	15.88 ± 1.727 * #Δ&	12.88 ± 1.808 * #Δ&	10.00 ± 1.309 * #Δ	7.88 ± 1.126 * #Δ
F	33.375	83.826	28.164	36.963	34.988
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与秋水仙碱组比较, Δ  $P < 0.05$ ; 与黄柏苍术汤高剂量组比较, ▲  $P < 0.05$ ; 与黄柏苍术汤中剂量组比较, ▲  $P < 0.05$

表 2 5 组大鼠关节液中炎性因子的表达水平

组别	IL - 1β	TNF - α	IL - 8	IL - 6
正常组	67.63 ± 6.523	150.50 ± 19.191	79.00 ± 11.212	147.38 ± 19.213
模型组	221.63 ± 21.186 *	668.00 ± 38.374 *	186.00 ± 14.061 *	299.63 ± 12.258 *
秋水仙碱组	68.88 ± 10.176 #	144.38 ± 20.417 #	80.63 ± 11.173 #	142.75 ± 26.494 #
高剂量组	114.63 ± 19.063 * #Δ	252.38 ± 29.194 * #Δ	85.25 ± 6.453 #	172.00 ± 19.131 * #Δ
中剂量组	78.88 ± 9.992 #▲	168.50 ± 23.158 #▲	74.88 ± 12.800 #	142.25 ± 22.607 #▲
低剂量组	101.13 ± 9.992 * #Δ&	245.25 ± 28.694 * #Δ&	77.75 ± 9.254 #	172.13 ± 18.795 * #Δ&
F	151.451	428.876	123.486	71.699
P	0.000	0.000	0.000	0.000

与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与秋水仙碱组比较, Δ  $P < 0.05$ ; 与黄柏苍术汤高剂量组比较, ▲  $P < 0.05$ ; 与黄柏苍术汤中剂量组比较, ▲  $P < 0.05$

## 讨 论

急性痛风关节炎是一种由尿酸盐晶体沉积于组织和器官引起的急性非特异性炎性反应<sup>[7]</sup>。本研究造模通过在关节腔局部注射尿酸混悬液, 人工模拟痛风的急性发作过程, 该模型的构造可有效的研究和评价急性痛风性关节炎药物治疗效果, 这主要依据既往的痛风动物模型而选择<sup>[8]</sup>。尿酸盐悬液注射到局部关节后首先迅速引起大量单核-吞噬细胞聚集, 大量聚集的巨噬细胞逐渐对尿酸盐进行吞噬<sup>[9,10]</sup>。同时, 单核-吞噬细胞还可以通过合成和分泌炎性细胞因子如 IL - 1、TNF - α、趋化因子来进一步引发炎性反应和组织损伤。活化模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)从而激活体内的固有免疫。体内的 MSU 还可以通过激活 Toll 样受体及髓样分化因子 88, 从而启动下游的核因子(NF)-κB, 进一步促使 TNF - α、IL - 1β 的表达, 促进炎症的级联损伤<sup>[11,12]</sup>。研究发现, 尿酸盐可通过激活 NALP3 炎性体进一步加剧痛风的炎性反应<sup>[13~15]</sup>。因此机体通过分泌 IL - 1β 诱导急性炎性反应, 固有免疫激活后会募集大量的炎性细胞如单核细胞、粒细胞等, 通过大量产生趋化因子及 TNF - α、IL - 8、IL - 6 等炎性因子进一步加剧痛风急性发作部位的炎性反应和组织损伤<sup>[16]</sup>。

本研究显示, 在注射后模型组的大鼠关节肿胀值

随着时间的进展呈逐渐减低的趋势, 这与痛风自然缓解的过程一致。模型组关节肿胀值显著高于黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术中剂量组、黄柏苍术汤低剂量组、秋水仙碱组, 且在 72h 黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术汤低剂量组关节肿胀值低于秋水仙碱组、黄柏苍术汤中剂量组, 该结果说明了黄柏苍术治疗有效, 且存在一定剂量的关系, 因为随着黄柏苍术的剂量改变大鼠的关节肿胀组变化并非完全一致, 从研究结果显示中剂量的结果较优, 可能是药物浓度过高或过低在炎性反应某阶段会参与炎性因子的产生。

本研究还发现, 模型组大鼠关节液中 TNF - α、IL - 1β、IL - 8、IL - 6 显著增高, 均高于其余 5 组, 该组的目的主要是起到阳性对照, 可见本研究造模成功, 组间有可比性。其中, 黄柏苍术中剂量组、秋水仙碱组的 TNF - α、IL - 1β 表达水平显著低于黄柏苍术高剂量组和黄柏低剂量组, 可能是由于黄柏苍术治疗痛风急性关节炎有某一最适剂量, 可能秋水仙碱、中剂量汤剂对 TNF - α、IL - 1β 抑制作用更强。IL - 8、IL - 6 的表达水平在黄柏苍术高剂量组、黄柏苍术中剂量组、黄柏苍术低剂量组、秋水仙碱组、正常组间比较差异无统计学意义, 可能是由于 IL - 8、IL - 6 受到 4 组试剂的抑制作用相同。具体药物剂量对不同细胞因子的抑制作用尚不明确, 可能与炎性因子在炎

症诱发缓解的触发环节不同有关,还需进一步实验研究加以证实<sup>[17]</sup>。

本研究对大鼠进行不同药物灌胃暂未发现不良反应,考虑可能是由于研究样本量较少,也可能是由于未对研究对象进行生化方面的相关检测,无法确定有无肝脏、肾脏损伤,但是在实验过程中各组大鼠活力正常。后期可通过加大样本量观察有无药物不良反应。

综上所述,黄柏苍术汤可能通过抑制炎性细胞分泌炎性细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-8、IL-6 等,缓解急性炎性反应,改善急性痛风性关节炎的关节症状。其效果是否与黄柏苍术汤的剂量有关还需要进一步验证。

#### 参考文献

- 1 Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Clinical review 138: anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(11): 5108–5117
- 2 Kuo CF, See LC, Yu KH, et al. Significance of serum uric acid levels on the risk of all-cause and cardiovascular mortality [J]. Rheumatology, 2013, 52(1): 127–134
- 3 高颖, 辛雷, 赵东宝.《2016 中国痛风诊疗指南》解读[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(12): 1136–1138
- 4 胡志成, 陈海鹏, 刘志坤, 等. 痛风性关节炎的中西医治疗现状[J]. 中医临床研究, 2017, 9(16): 142–144
- 5 孙晶, 于永军, 陈宝忠. 中医药治疗痛风病的研究进展[J]. 中医药信息, 2016, 33(5): 126–129
- 6 闫美凤, 吕新亮. 黄柏苍术汤治疗急性痛风性关节炎临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(35): 3898–3899
- 7 施桂英. 急性痛风关节炎的治疗选择[J]. 临床药物治疗杂志,

(上接第 103 页)

- 13 Cancer Genome Atlas Research N, Analysis Working Group: Asan U, Agency BCC, et al. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma [J]. Nature, 2017, 541(7636): 169–175
- 14 Chang J, Tan W, Ling Z, et al. Genomic analysis of oesophageal squamous-cell carcinoma identifies alcohol drinking-related mutation signature and genomic alterations [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15290
- 15 Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(7): 484–492
- 16 Kulis M, Heath S, Bibikova M, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia [J]. Nat Genet, 2012, 44(11): 1236–1242
- 17 Yang X, Han H, De Carvalho DD, et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer [J]. Cancer Cell, 2014, 26(4): 577–590
- 18 Sen GL, Boxer LD, Webster DE, et al. ZNF750 is a p63 target gene that induces KLF4 to drive terminal epidermal differentiation [J]. Dev Cell, 2012, 22(3): 669–677
- 19 Hazawa M, Lin DC, Handral H, et al. ZNF750 is a lineage-specific tumour suppressor in squamous cell carcinoma [J]. Oncogene, 2017, 36(16): 2243–2254
- 20 Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the

2012, 10(1): 1–4

- 8 周京国. 痛风的动物模型与模式动物 [J]. 中华风湿病学杂志, 2017, 21(7): 433–435
- 9 张晓洁, 姜林娣. 痛风患者肾脏结石与关节部位尿酸盐晶体沉积的相关性 [J]. 中国临床医学, 2017, 24(5): 767–769
- 10 Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout [J]. Clin Ther, 2014, 36(10): 1465–1479
- 11 蒋丽, 周京国, 青玉凤, 等. Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 及其信号通路在原发性痛风性关节炎发病机制中作用的研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(5): 300–304
- 12 Peter S, Ma H. Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals [J]. J Immunol, 2006, 177(9): 6370–6378
- 13 Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation [J]. J Clin Immunol, 2010, 30(5): 628–631
- 14 Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica [J]. Science, 2008, 320(5876): 674–677
- 15 Liu-Bryan R, Scott P, Sydlausk A, et al. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(9): 2936–2946
- 16 Busso N, Ea HK. The mechanisms of inflammation in gout and pseudogout (CPR-induced arthritis) [J]. Reumatismo, 2012, 63(4): 230–237
- 17 杨雯雯, 孙永强. 不同剂量秋水仙碱对痛风急性发作的临床疗效 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2018, 28(8): 113–114

(收稿日期: 2019-04-01)

(修回日期: 2019-05-05)

importance of context [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(8): 564–571

- 21 Shibata T, Kokubu A, Saito S, et al. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer [J]. Neoplasia, 2011, 13(9): 864–873
- 22 Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, et al. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2002, 62(17): 4938–4944
- 23 Guo W, Dong Z, Cui J, et al. Aberrant hypermethylation of RASSF2 in tumors and peripheral blood DNA as a biomarker for malignant progression and poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 33(1): 73–85
- 24 Bedford DC, Kasper LH, Fukuyama T, et al. Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases [J]. Epigenetics, 2010, 5(1): 9–15
- 25 Kamei Y, Xu L, Heinzel T, et al. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors [J]. Cell, 1996, 85(3): 403–414
- 26 Morris LG, Kaufman AM, Gong Y, et al. Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation [J]. Nat Genet, 2013, 45(3): 253–261

(收稿日期: 2019-04-22)

(修回日期: 2019-05-09)

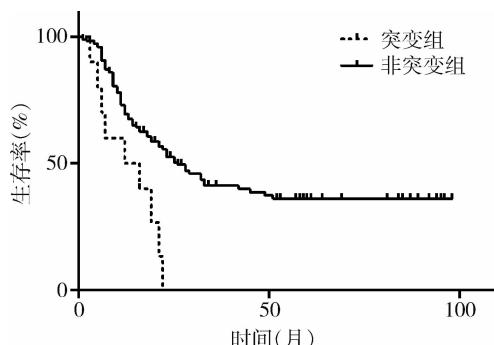


图 3 FAT1 突变组与非突变组患者生存曲线比较

水平在两组间比较差异有统计学意义。为了探究食管鳞癌发生、发展过程中的异常甲基化改变对驱动基因转录调控的影响,笔者对单个位点甲基化与对应驱动基因表达水平进行关联分析。考虑到不同区域DNA甲基化调控基因表达的差异,笔者分别针对启动子区域和基因体区域的关联进行筛选<sup>[15-17]</sup>。ZNF750是一种谱系特异的转录因子,与其他转录因子共同参与鳞状细胞分化的调控<sup>[18, 19]</sup>。这一结果提示驱动基因突变不仅可以通过影响编码蛋白的功能参与异常信号网路的调控,而且可能通过调节其转录参与食管鳞癌的发生、发展。

通过拷贝数改变与基因表达的关联分析中 8 个驱动基因的表达水平均与其拷贝数改变呈显著正相关,并在两组数据中比较差异均有统计学意义,其中 CUL3 和 RBPJ 的敲降可以显著增加食管鳞癌细胞的增殖和迁移等<sup>[14]</sup>。FAT1 和 MLL2 的拷贝数仅在本研究数据中与表达呈正相关,而 NFE2L2 等 6 个驱动基因表达水平仅在 TCGA 数据中与其拷贝数呈显著正相关。NFE2L2 是抗氧化信号通路的重要成员,其编码蛋白 NRF2 可以激活多个控制氧化应激基因的转录,该基因的突变还与食管鳞癌患者的不良预后和化疗抵抗相关<sup>[20, 21]</sup>。

此外,本研究通过 DNA 甲基化与基因表达水平的关联分析,探究了甲基化在驱动基因转录调控中的贡献。已有的食管鳞癌甲基化报道仅关注启动子区甲基化与基因表达间的调控关系<sup>[22, 23]</sup>。笔者同时考虑了启动子和基因体甲基化对基因表达的调控作用,在本研究数据中发现 CDKN2A、FBXW7、CUL3、FAT1 和 PTCH1 的表达与启动子和基因体的甲基化均显著相关,而 TCGA 数据中仅发现 KDM6A、NOTCH3 和 RBPJ。这表明食管鳞癌驱动基因表达可能受到启动子甲基化、基因体甲基化或二者的共同调控。

最后,本研究结果显示 CREBBP 和 FAT1 突变均与患者的预后相关,可能作为食管鳞癌潜在的预后标志物。CREBBP 是 KAT3 家族主要的赖氨酸乙酰转移酶,可以作为许多信号通路的转录共激活因子<sup>[24, 25]</sup>。FAT1 在多个发育过程中十分重要,其异常失活会导致多种肿瘤中 Wnt 信号通路的异常激活<sup>[26]</sup>。

综上所述,本研究通过 20 个驱动基因多组学数据的整合分析,阐明了食管鳞癌驱动基因多个分子层面的异常改变以及它们间的交互作用。通过生存分析,本研究还鉴别了两个潜在的食管鳞癌预后标志物,为临床患者的预后判断和分层治疗提供了帮助。

#### 参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30
- Wang AH, Liu Y, Wang B, et al. Epidemiological studies of esophageal cancer in the era of genome-wide association studies [J]. World J Gastrointest Pathophysiol, 2014, 5(3):335-343
- Cohen DJ, Ajani J. An expert opinion on esophageal cancer therapy [J]. Expert Opin Pharmacother, 2011, 12(2):225-239
- Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(14):2137-2150
- Youn A, Kim KI, Rabadian R, et al. A pan-cancer analysis of driver gene mutations, DNA methylation and gene expressions reveals that chromatin remodeling is a major mechanism inducing global changes in cancer epigenomes [J]. BMC Med Genomics, 2018, 11(1):98
- Agrawal N, Jiao Y, Bettigowda C, et al. Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma [J]. Cancer Discov, 2012, 2(10):899-905
- Gao YB, Chen ZL, Li JG, et al. Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Nat Genet, 2014, 46(10):1097-1102
- Lin DC, Hao JJ, Nagata Y, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Nat Genet, 2014, 46(5):467-473
- Song Y, Li L, Ou Y, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer [J]. Nature, 2014, 509(7498):91-95
- Zhang L, Zhou Y, Cheng C, et al. Genomic analyses reveal mutational signatures and frequently altered genes in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Am J Hum Genet, 2015, 96(4):597-611
- Qin HD, Liao XY, Chen YB, et al. Genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma reveals critical genes underlying tumorigenesis and poor prognosis [J]. Am J Hum Genet, 2016, 98(4):709-727
- Sawada G, Niida A, Uchi R, et al. Genomic landscape of esophageal squamous cell carcinoma in a Japanese population [J]. Gastroenterology, 2016, 150(5):1171-1182

(下转第 107 页)