

# 基于转录组学分析驴油生酮饮食下 CT26<sup>+</sup>结肠癌肿瘤的变化

张华宸<sup>1</sup>, 张宁<sup>2</sup>, 邢敬亚<sup>3</sup>, 谢兰<sup>1</sup>, 祁兴震<sup>1</sup>, 路挺<sup>1</sup>, 程杰<sup>4</sup>, 李兰杰<sup>1\*</sup>, 刘桂芹<sup>1\*</sup>

(1.聊城大学农学与农业工程学院, 山东省黑毛驴高效繁育与生态饲养工程技术研究中心, 山东省驴产业科技协同创新中心, 山东聊城 252059) (2.聊城大学生物制药研究院, 山东聊城 252059) (3.内蒙古农业大学动物科学学院, 内蒙古自治区马属动物遗传育种与繁殖学重点实验室, 内蒙古农业大学马属动物研究中心, 内蒙古呼和浩特 010018) (4.东阿阿胶股份有限公司, 山东聊城 252200)

**摘要:** 该研究旨在通过转录组测序技术筛选出驴油生酮饮食 (Donkey Oil Ketogeni Diet, DOKD) 影响 CT26<sup>+</sup> 结肠癌肿瘤生长的相关基因, 挖掘对 DOKD 响应的基因及其代谢通路, 为解析驴油生酮饮食抑制肿瘤生长的机制提供依据。该研究选取一致性较好的 CT26<sup>+</sup> 结肠癌 BALB/c 模型小鼠, 随机分为 2 组, 每组 3 个重复, 分别饲喂驴油生酮饮食 (DOKD) 与正常饮食 (ND)。饲喂 10 d 后处死摘取肿瘤组织, 测量肿瘤的质量及体积, 并利用 RNA-Seq 技术和生物信息分析方法进行转录组测序及结果分析。DOKD 组与 ND 组小鼠体质量无显著差异, 肿瘤明显小于 ND 组。与 ND 组相比, DOKD 组共 18 个基因差异表达, 其中 12 个 DEGs 上调, 6 个 DEGs 下调。这些 DEGs 注释到 170 条 GO 条目, 其中生物过程 (BP) 类别 124 条, 细胞组成 (CC) 类别 2 条, 分子功能 (MF) 类别 44 条; 涉及 18 条 KEGG 通路, 主要富集在 IL-17 信号通路、趋化因子信号通路、细胞因子受体相互作用信号通路、肿瘤坏死因子信号通路等重要通路。此外, 该研究通过 Western blot 进一步研究了 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路在肿瘤中的作用。综上, DOKD 对 CT26<sup>+</sup> 结肠癌肿瘤有明显抑制作用, 该作用可能与 IL-17 信号通路、趋化因子信号通路、细胞因子受体相互作用信号通路、TNF 信号通路等通路密切相关。

**关键词:** 驴油生酮饮食; 肿瘤; 转录组学; CT26<sup>+</sup> 结肠癌

文章编号: 1673-9078(2023)06-18-26

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0827

## Transcriptomic Analysis of Changes in CT26<sup>+</sup> Colon Cancer Tumors under Donkey Oil Ketogenic Diet

ZHANG Huachen<sup>1</sup>, ZHANG Ning<sup>2</sup>, XING Jingya<sup>3</sup>, XIE Lan<sup>1</sup>, QI Xingzhen<sup>1</sup>, LU Ting<sup>1</sup>, CHENG Jie<sup>4</sup>, LI Lanjie<sup>1\*</sup>,  
LIU Guiqin<sup>1\*</sup>

(1.College of Agriculture, Liaocheng University, Shandong Engineering Technology Research Center of Efficient Breeding and Ecological Rearing of black Donkey, Shandong Province Donkey Industry Science and Technology Collaborative Innovation Center, Liaocheng 252059, China) (2.Institute of Biopharmaceutical Research Liaocheng University, Liaocheng 252059, China) (3.Equine Research Center, Inner Mongolia Key Laboratory of Equine Genetics, Breeding and Reproduction, College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)  
(4.Dong-E-E-Jiao Co. Ltd., Liaocheng 252200, China)

引文格式:

张华宸,张宁,邢敬亚,等.基于转录组学分析驴油生酮饮食下 CT26<sup>+</sup>结肠癌肿瘤的变化[J].现代食品科技,2023,39(6):18-26.

ZHANG Huachen, ZHANG Ning, XING Jingya, et al. Transcriptomic analysis of changes in CT26<sup>+</sup> colon cancer tumors under donkey oil ketogenic diet [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 18-26.

收稿日期: 2022-06-29

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系驴产业创新团队项目资助 (SDAIT-27); 山东省乡村振兴科技创新提振行动计划项目 (2021TZXD012); 聊城大学博士科研启动项目 (318052120); 聊城大学畜牧学学科开放课题 (319312101-03)

作者简介: 张华宸 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物学, E-mail: 897365695@qq.com

通讯作者: 李兰杰 (1988-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 动物科学, E-mail: lilanjie@lcu.edu.cn; 共同通讯作者: 刘桂芹 (1975-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 动物科学, E-mail: guiqinliu@lcu.edu.cn

**Abstract:** Screening of the genes related to the donkey oil ketogenic diet (DOKD) that affects the growth of CT26<sup>+</sup> colon cancer tumors using transcriptome sequencing technology was investigated in this study. Mining the genes and metabolic pathways that respond to DOKD provides a basis for analyzing the mechanism of DOKD in inhibiting tumor growth. BALB/c model mice with CT26<sup>+</sup> colon cancer with high consistency were selected and randomly divided into two groups with three replicates, and they were fed either a DOKD or normal diet (ND). The animals were sacrificed after 10 days of treatment. Subsequently, the tumors were excised, and tumor weights and volumes were recorded for analysis. RNA-Seq technology and bioinformatic analysis were used for transcriptome sequencing and results analysis. No significant difference was found in the body weight between the DOKD and ND groups, and the tumors were significantly smaller in the DOKD than those in the ND group. Compared with the ND group, a total of 18 genes were differentially expressed in the DOKD group, of which 12 differentially expressed genes (DEGs) were upregulated, and 6 DEGs were down regulated. These DEGs were annotated into a total of 170 GO items, including 124 in the biological process category, 44 in the molecular function category, and 2 in the cellular composition category. A total of 18 KEGG pathways were involved, mainly enriched in the interleukin (IL)-17 signaling, chemokine signaling, cytokine receptor interaction signaling, tumor necrosis factor signaling, and other important pathways. In addition, this study further examined the role of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in tumors using western blotting. In summary, DOKD has a significant inhibitory effect on CT26<sup>+</sup> colon cancer tumors, and this effect may be closely related to the IL-17, chemokine, cytokine receptor interaction, and tumor necrosis factor signaling pathways, among others.

**Key words:** donkey oil ketogenic diet; tumor; transcriptomics; CT26<sup>+</sup> colon cancer

生酮饮食 (Ketogenic Diet, KD) 由高比例脂肪、低比例糖类及适量蛋白质等营养元素构成<sup>[1]</sup>, 常见 KD 配方中脂肪通常是糖类及蛋白质二者能量总和的 3~4 倍<sup>[2]</sup>。KD 最早被应用于癫痫<sup>[3]</sup>的治疗, 随着对 KD 代谢机制的深入研究, 其应用逐步扩展到糖尿病<sup>[4]</sup>、心血管疾病<sup>[5]</sup>、肥胖<sup>[6]</sup>等多种慢性代谢疾病<sup>[7]</sup>的治疗。此外, 大量基础研究已证实了 KD 的抗肿瘤疗效中, 如神经胶质瘤<sup>[8]</sup>、结肠癌<sup>[9]</sup>、前列腺癌<sup>[10]</sup>、子宫内膜癌<sup>[11]</sup>等。KD 利用肿瘤细胞线粒体内膜缺失、无法利用酮体的特征<sup>[12]</sup>, 通过限制葡萄糖的供应、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (Mammalian Target of Rapamycin, mTOR) 信号通路、调节炎症及免疫反应等机制抑制肿瘤的生长。Marsh 等<sup>[13]</sup>在小鼠恶性星型细胞瘤模型中采用糖酵解抑制剂和 KD 联合治疗, 发现 KD 可以通过降低葡萄糖转运蛋白-1 的表达减少肿瘤对葡萄糖的摄取, 从而达到抑制肿瘤生长的效果。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可通过抑制炎症、血管生成与细胞上皮间-充质转化 (EMT) 等多条通路抑制肿瘤生长<sup>[14]</sup>, 目前已经成为肿瘤治疗的标志性靶点<sup>[15]</sup>。Zou 等<sup>[16]</sup>研究发现, KD 与雷帕霉素药物联合疗法可通过抑制 mTOR 信号通路有效地抑制乳腺癌小鼠肿瘤的生长, 延长小鼠的生存期。大量研究表明, 炎症反应对肿瘤的作用是把双刃剑。一方面, 炎症因子白细胞介素-8 (Interleukin-8, IL-8)、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等促进肿瘤的生长<sup>[17]</sup>。Nakamura 等<sup>[18]</sup>在对结直肠癌小鼠模型的研究中发现, KD 可以通过降低 IL-6 炎症因子水平抑制肿瘤的生长。另一方面, 炎症因子干扰素 (Interferon, IFN)、肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) 有抑制肿瘤的作用<sup>[19]</sup>。Lussier<sup>[20]</sup>等通

过 KD 对脑胶质瘤小鼠的研究发现, KD 可促进 IFN- $\gamma$ 、TNF 和 IL-2 的产生, 使小鼠生存期更长。由此可见, KD 对炎症的调控作用很可能与动物模型及肿瘤类型有关。

转录组测序 (Transcriptome Se-quencing, RNA-seq) 是一种研究在 RNA 水平上基因表达差异的方法<sup>[21]</sup>。自 2005 年以来, 人们开始利用高通量测序技术认识分子水平上的生命活动, 并对基因组和转录组进行研究<sup>[22]</sup>。如今在癌症的研究和治疗领域, RNA-seq 已经成为一种重要研究手段, 在生物标记的识别、肿瘤表征的异质性与进化、耐药性以及肿瘤免疫微环境、癌症新抗原等方面起到重要作用<sup>[23]</sup>。

本研究通过 Illumina 高通量测序技术, 明确 DOKD 处理组与 ND 组中差异表达的基因, 挖掘其基因的相关代谢通路, 揭示 DOKD 抑制肿瘤的信号通路及分子机制, 为驴油的应用转化提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物模型构建及样品采集

用含有 glutamine 的 RPMI1640 培养基, 在 37 °C 和体积分数 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 CT26<sup>+</sup> 结肠癌细胞系 (购自日本驻波理研生物资源中心), 并加入质量分数 10% 胎牛血清和 100 单位/mL 青霉素链霉素。反复传代两三次后, 对 BALB/c 雄性小鼠 (21 g $\pm$ 0.1 g, 购自济南市鹏岳实验动物公司) 进行腋窝皮下注射。注射后的小鼠用 ND 喂养 14 d, 确认模型建立成功后, 随机分为 ND 和 DOKD 两组, 每组 3 只, 分别给予 ND 和 DOKD (配方见表 1), 喂养 10 d。末次喂食的 24 h

后断颈处死小鼠,测量小鼠体质量、肿瘤质量与体积,摘取肿瘤组织放入液氮冻存。实验小鼠参照《山东大

学实验动物护理与使用指南》进行喂养,使其自由取食和饮水,光照周期为 12:12 h。

表 1 ND 组与 DOKD 组营养成分配方

Table 1 Detailed list of macronutrient components of ND and DOKD

项目	ND		DOKD	
	质量/(g/kg)	能量密度/(kcal/g)	质量/(g/kg)	能量密度/(kcal/g)
干酪素	200.00	0.80	194.00	0.78
蔗糖	100.00	0.40		
玉米淀粉	394.00	1.58		
麦芽糊精	132.00	0.53		
L-半胱氨酸	3.00	0.01	3.00	0.01
纤维素	53.50	0.00	23.50	0.00
V1002 纤维素混合物	10.00	0.04	10.00	0.04
M1003G 矿物质混合物	35.00	0.00	35.00	0.00
重酒石酸胆碱	2.50	0.00	2.50	0.00
TBHQ	0.01	0.00	0.01	0.00
大豆油	70.00	0.63		
驴油			520.00	4.06
MCT			212.00	1.91
总计	1 000.01	3.99	1 000.01	6.80

## 1.2 文库构建及转录组测序分析

将 6 个肿瘤样本进行 RNA-seq 测序。如下,采用 NanoPhotometer®分光光度计检测 RNA 样品纯度 (Thermo Fisher),安捷伦 2100 RNA Nano 6000 Assay Kit (Agilent Technologies, CA, USA) 检测 RNA 样品的完整性和浓度。

确认总 RNA 样本质量合格后,先用含有 Oligo (dT) 的磁珠对 mRNA 进行富集,再用片段缓冲液将富集到的 mRNA 断为短片段,用六碱基随机引物将短片段后的 mRNA 为模板合成 cDNA 第一链,再加入缓冲液、RNaseH、DNA Polymerase I 和 dNTPs 合成 cDNA 第二链,使用 QIAQuick PCR 试剂盒对 cDNA 第二链进行纯化并用 EB 缓冲液进行洗脱。对洗脱纯化后得到的双链 cDNA 进行末端修复、加碱基 A、加测序接头处理,接头连接和 PCR 扩增,得到扩增产物质检合格后,进行变性和单链环化,并进行环化产物质检。

## 1.3 测序分析

该测序工作由山东解螺旋生物科技有限公司完成。转录组测序共包括 2 组处理,每组处理 3 个重复,共构建 6 个 cDNA 文库。使用 Illumina HiSeq™4000 高通量测序平台对建立好的文库进行转录组测序,测序方法为 PE150。对下机后的原始数据 (Raw Reads)

加以过滤,通过去除低质量序列、去接头污染等操作后得到的即为高质量的序列 (Clean Reads),再使用 Trinity 软件对 Clean Reads 进行序列组装与拼接,获得 unigene<sup>[24]</sup>。

## 1.4 Western blot

使用 Minute 总蛋白提取试剂盒 (Invent Biotechnologies) 提取肿瘤总蛋白,质量分数 1%的蛋白酶抑制 (CW2200S, 北京康文生物科技有限公司) 和磷酸酶抑制剂 (CW2383S, 北京康文生物科技有限公司)。采用 BCA 蛋白测定试剂盒 (CW0014S, 北京康文生物技术有限公司) 测定蛋白浓度。提取的蛋白使用 Bio-Rad Mini-Protein II 系统,通过 SDS-PAGE 变性凝胶电泳按大小分离,然后转移到聚偏氟乙烯膜 (Millipore, Billerica, MA, USA) 上<sup>[25]</sup>。转膜完成后,在室温下用 5% 脱脂牛奶中封闭膜 2 h,然后在 4 °C 下一抗孵育过夜。本研究孵育了以下抗体:  $\beta$ -actin (Rabbit Monoclonal Antibody, 1:10 000, Abcam)、NF- $\kappa$ B p65 (66535-Ig, 1:1 000, Proteintech)、MYD88 (WL02494, 1:500, Wanleibio)、S100a9 (ab242945, 1:1 000, Abcam)、IL-17 (WL02981, 1:500, Wanleibio)、IL-6 (WL02841, 1:1 000, Wanleibio)、TLR4 (WL00196, 1:1 000, Wanleibio)、TNF- $\alpha$  (WL01581, 1:1 000, Wanleibio)。第二天,将膜洗涤,用与辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔二抗在 1:10 000 稀释 (Proteintech)

的室温下孵育 1.5 h。使用化学发光 ECL western blot 检测系统 (Amersham Biosciences, NJ, USA) 对免疫反应蛋白进行可视化。

### 1.5 数据分析

利用软件 RSEM (<http://deweylab.github.io/RSEM/>) 对转录组的基因表达水平进行计算, 再利用 DESeq2 分析软件 (Anders and Huber, 2010), 以  $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$  和  $P < 0.05$  为条件筛选样本间差异表达的 mRNA。将差异表达基因序列利用 BLAST 软件与 Swiss-Prot、Nr、COG、GO、KOG、KEGG 和 eggNOG4 四数据库加以对比 ( $E$  值  $< 1 \times 10^{-5}$ ), 以获取相应的注释信息。再利用软件 GoseqGO 完成富集分析<sup>[26]</sup>, 使用 Cluster Profiler 完成的 KEGG 通路富集分析中, 以  $P < 0.05$  为显著富集的 KEGG 通路。采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 采用独立样本  $t$  检验评估实验组间是否存在显著性差异。确定了三个差异显著性水平:  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 DOKD 对肿瘤生长的影响

CT26<sup>+</sup> 结肠癌 BALB/c 小鼠分别饲喂 ND 和 DOKD 10 d (图 1), 每天测量每只小鼠体质量, 间隔一天测量每只小鼠肿瘤体积。10 d 后处死小鼠, 取每只小

鼠的肿瘤组织称质量。研究结果表明, ND 与 DOKD 组的小鼠体质量无显著差异(图 2)。与 ND 组相比, DOKD 组小鼠的肿瘤体积明显减小(图 3), 肿瘤质量显著降低(图 4)。这些研究结果说明, DOKD 可在不影响小鼠体质量的情况下抑制 CT26<sup>+</sup> 肿瘤的生长。

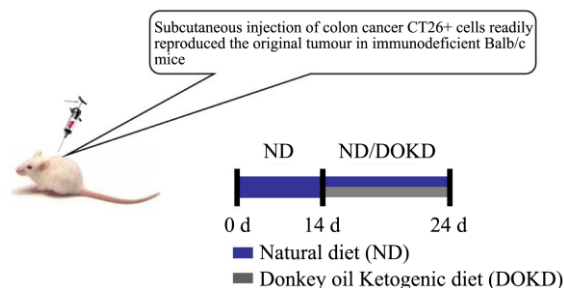


图 1 CT26<sup>+</sup>结肠癌 BALB/c 小鼠模型的建立

Fig.1 CT26<sup>+</sup> colon cancer BALB/c mouse model

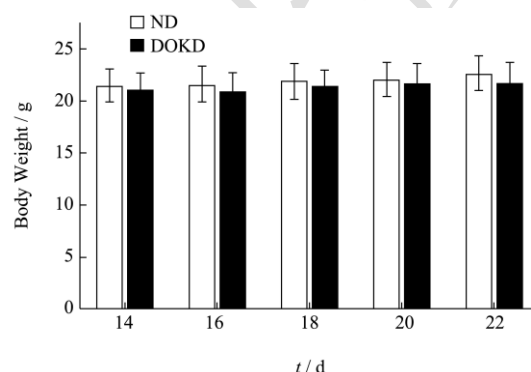


图 2 DOKD 组与 ND 组小鼠体质量对比

Fig.2 Comparison of body weight between DOKD and ND

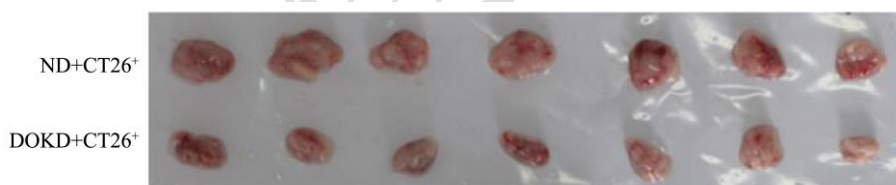


图 3 DOKD 组与 ND 组肿瘤体积对比

Fig.3 Comparison of tumor volume between DOKD and ND

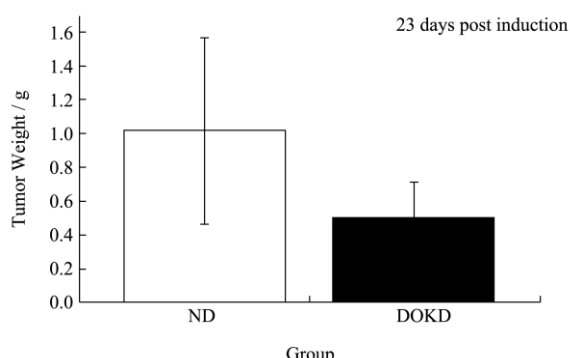


图 4 DOKD 组与 ND 组肿瘤质量对比

Fig.4 Comparison of tumor weight between DOKD and ND

### 2.2 测序数据结果统计

本研究对驴油生酮饮食条件下结肠癌小鼠肿瘤组织进行 RNA-seq 分析。为了提高信息分析数据的质量, 我们对原始下机序列进行过滤。将 Raw Reads 去除不合格的序列后得到过滤后得到 Clean Reads。其中, DOKD 组 3 个样本的 Clean Reads 总序列数为分别为 46 015 574、47 300 354 和 46 657 959.5 条, 占原始下机序列的 97.58%、97.84% 和 97.76%; ND 组 3 个样本的 Clean Reads 总序列数为 45 265 454、44 026 984 和 44 646 219 条, 占原始下机序列的 98%、97.59% 和 97.80% (见表 2)。将这些 Reads 与参考基因组 (Mus\_musculus.GRCm 38.102) 比对可得到有效数据 (Mapped Reads)、存在于参考序列上具有多个比对位置的 Clean Reads 数量 (Multiple Mapped) 和具有唯一

比对位置的 Clean Read 数量 (Unique Reads)。6 个样本可比对到参考基因组上的序列占总序列的比例均 > 90%，说明参考基因组注释完整，试验也不存在污染的

情况。由表 2 可知，6 个样本在过滤前原始序列中质量值超过 30 (错误率小于 0.1%) 的碱基数占总碱基数的比例 (Q30) 均 > 90%，说明本研究测序数据准确可靠。

表 2 转录组测序数据与参考基因组比对分析

Table 2 Transcriptome sequencing data were compared with reference genome

Sample	DOKD1	DOKD2	DOKD3	ND1	ND2	ND3
原始下机序列数 (Raw Reads)	47 157 910	48 345 174	47 751 542	46 187 586	45 113 734	45 650 660
高质量序列数 (占比/%) (Clean Reads)	46 015 574 (97.58)	47 300 354 (97.84)	46 657 959.5 (97.76)	45 265 454 (98.00)	44 026 984 (97.59)	44 646 219 (97.80)
比对上基因组序列数 (占比/%) (Mapped Reads)	41 717 512 (90.66)	44 239 714 (90.66)	42 978 613 (90.66)	42 760 032 (94.47)	41 784 189 (94.91)	42 272 110.5 (94.74)
比对到基因组多点位序列数 (占比/%) (MultiMap Reads)	3 182 438 (6.92)	3 815 097 (8.07)	3 498 767.5 (7.49)	2 999 202 (6.63)	3 296 765 (7.49)	3 1479 83.5 (7.06)
过滤后总序列中质量值大于 30 的碱基数的比例 (Clean Q30 Bases Rate) /%	91.91	90.22	91.065	91.03	92.87	91.95

注：括号内的数字表示占原始序列数的百分比。

### 2.3 差异表达分析

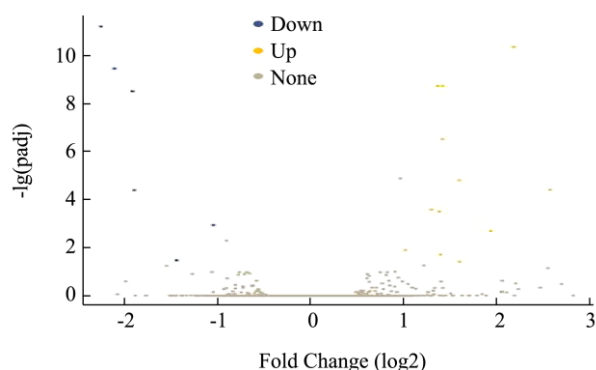


图 5 差异表达基因火山图

Fig.5 Volcano plot of differentially expressed genes

差异表达基因的筛选条件为  $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$  和  $P < 0.05$ 。比较两种饮食结构下小鼠肿瘤的转录组数据，共筛选出 18 个差异表达基因 (图 5)：与 ND 组相比，12 个基因表达上调，包括 S100 钙结合蛋白 A8 (S100 Calcium Binding Protein A8, *S100a8*)、S100 钙结合蛋白 A9 (S100 Calcium Binding Protein A9, *S100a9*)、G0/G1 开关基因 2 (Mus Musculus G0/G1 Switch Gene 2, *G0S2*)、趋化因子 (C-X-C Motif Chemokine 2 Precursor, *Cxcl2*、C-X-C Motif Chemokine 3 Precursor, *Cxcl3*) 等；6 个基因表达下调，包括小家鼠颗粒酶 G (Mus Musculus Granzyme G, *Gzmg*)、小家鼠颗粒酶 F (Mus Musculus Granzyme F, *Gzmf*)、小家鼠颗粒酶 D (Mus Musculus Granzyme D, *Gzmd*)、小家鼠颗粒酶 E (Mus Musculus Granzyme E, *Gzme*)、锌指蛋白 1 (Prdm1 Protein, *Prdm1*) 等 (表 3)。S100 家族蛋白在炎症反应、免疫中起到重要作用，激活

*S100a9* 可以通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路促进炎症因子 IL-6、Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MYD88) 等的分泌，进而加强炎症反应<sup>[27]</sup>。另外，有研究发现 *S100a8/a9* 可通过激活自然杀伤细胞，促进 IFN- $\gamma$  的表达引起免疫反应<sup>[28]</sup>。趋化因子是一种为细胞运输功能提供方向的趋化肽，在对宿主的保护性反应中起到至关重要的作用<sup>[29]</sup>。在免疫细胞中表达的趋化因子受体 (G 蛋白偶联受体) 传导趋化因子信号，主导造血细胞的活化、分化和存活等生物过程<sup>[30]</sup>。研究表明 *Cxcl2* 能够通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路减轻支气管上皮细胞炎症反应<sup>[31]</sup>。而 Lin 等<sup>[32]</sup>认为，*Cxcl2* 等多个趋化因子的高表达与肝癌患者预后良好有关，并且促进了免疫细胞的浸润。在本研究中 *S100a8*、*S100a9*、*Cxcl2*、*Cxcl3* 基因表达均上调，而肿瘤明显减小，说明 DOKD 可能促进了 CT26<sup>+</sup> 细胞的炎症反应的同时也引起了免疫反应。Yim 等<sup>[33]</sup>研究发现，*G0S2* 可通过抑制 PI3K/mTOR 活性发挥抑制肿瘤的作用，高水平的 *G0S2* 还可降低乳腺癌的复发率。本研究中 *G0S2* 基因表达上调，说明 DOKD 可通过 PI3K/mTOR 通路抑制肿瘤生长。颗粒酶是一种由自然杀伤细胞和细胞毒性 T 细胞分泌的丝氨酸蛋白酶，在肿瘤细胞凋亡时进行免疫清除<sup>[34]</sup>。本研究中检测到明显下调的颗粒酶基因是 *Gzmg*、*f*、*d*、*e*，与 Cao<sup>[35]</sup>和顾雅茹<sup>[36]</sup>报道颗粒酶 *Gzm A* 与 *Gzm B* 在肿瘤组织中表达上调结果相反，这可能与肿瘤种类有关。*Prdm1* 是可在免疫抑制中发挥重要作用的调节因子，由 B 细胞和 T 细胞分化而来，在多种肿瘤组织中高表达，是一种有前景的免疫治疗策略<sup>[37]</sup>，还可通过核因子  $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa-B, NF- $\kappa$ B) 信号通路调控 M1 型巨噬细胞极化，



抑制肿瘤发展<sup>[38]</sup>。在本研究中 *Prdm1* 表达下调,说明 DOKD 可通过调节免疫抑制 CT26<sup>+</sup>细胞的增殖。

表 3 DOKD-ND 组的差异基因

Table 3 DEGs between DOKD and ND

项目	基因 ID	基因	log <sub>2</sub> 倍比	P 值	基因描述
上调基因	ENSMUSG00000056054	<i>S100a8</i>	2.57	<0.001	小家鼠 S100 钙结合蛋白 A8, mRNA
	ENSMUSG00000056071	<i>S100a9</i>	2.18	<0.001	小家鼠 S100 钙结合蛋白 A9, 转录变体 2, mRNA
	ENSMUSG00000009633	<i>G0s2</i>	1.93	<0.001	小家鼠 G0/G1 开关基因 2, mRNA
	ENSMUSG00000029379	<i>Cxcl3</i>	1.60	<0.001	小家鼠第 5 染色体, 克隆 RP23-307P18, 序列完整
	ENSMUSG00000045502	<i>Hcar2</i>	1.60	<0.001	小家鼠羧胺受体 2, mRNA
	ENSMUSG00000076258	<i>Gm23935</i>	1.42	<0.001	小家鼠 45S 前核糖体 RNA (Rn45s), 核糖体 RNA
	ENSMUSG00000076281	<i>Gm24270</i>	1.42	<0.001	小家鼠 45S 前核糖体 RNA (Rn45s), 核糖体 RNA
	ENSMUSG00000027360	<i>Hdc</i>	1.39	<0.001	小家鼠 10 天新生儿皮肤 cDNA, RIKEN 全长富集文库
	ENSMUSG00000058427	<i>Cxcl2</i>	1.38	<0.001	小家鼠第 5 染色体, 克隆 RP23-307P18, 序列完整
	ENSMUSG00000035202	<i>Lars2</i>	1.37	<0.001	小家鼠亮氨酸-tRNA 合成酶, mRNA
	ENSMUSG00000029373	<i>Pf4</i>	1.30	<0.001	小家鼠血小板因子 4, mRNA
	ENSMUSG00000033327	<i>Tnxb</i>	1.02	<0.001	小家鼠腱生蛋白 XB, mRNA
	下调基因	ENSMUSG00000040284	<i>Gzmg</i>	-2.26	<0.001
ENSMUSG00000015441		<i>Gzmf</i>	-2.11	<0.001	小家鼠颗粒酶 F (Gzmf) mRNA
ENSMUSG00000059256		<i>Gzmd</i>	-1.92	<0.001	小家鼠颗粒酶 D (Gzmd) mRNA
ENSMUSG00000022156		<i>Gzme</i>	-1.90	<0.001	小家鼠颗粒酶 E (Gzme) mRNA
ENSMUSG00000038151		<i>Prdm1</i>	-1.44	<0.001	小家鼠锌指蛋白 BALB/cBlimp-1 mRNA, 完整 cds
ENSMUSG00000021831		<i>Ero1l</i>	-1.05	<0.001	小家鼠 ERO1 样 (酒酿酵母) (Ero1l), mRNA

注: log<sub>2</sub>FC 倍比表示 DOKD 组基因表达量/ND 组基因表达量。

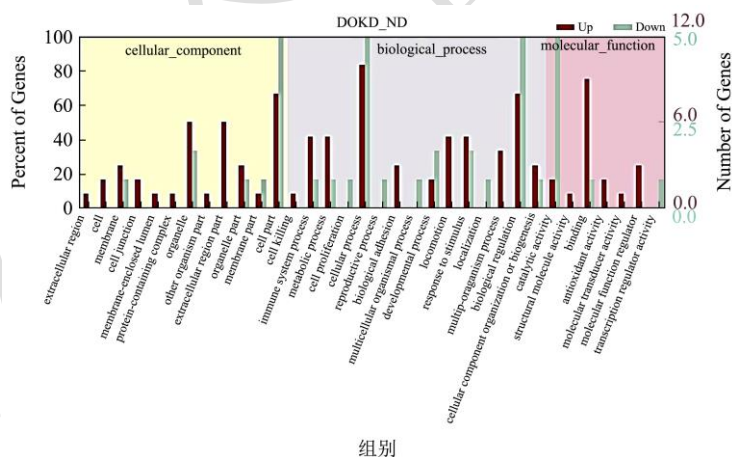


图 6 DOKD 与 ND 组差异表达基因的 GO 富集分析

Fig.6 GO enrichment analysis of differentially expressed genes between DOKD and ND groups

## 2.4 差异表达基因的 GO 富集分析

Gene Ontology (GO) 是一个用来说明基因产物功能特征的国际规范基因组功能分类体系。经 GO 富集分析表明, DOKD 与 ND 组之间的 18 条差异基因被注释到 170 个 GO 条目上。其中细胞组成 (Cellular Component, CC) 类别有 2 个 GO 条目, 生物过程 (Biological Process, BP) 类别有 124 个 GO 条目, 分子功能 (Molecular Function, MF) 类别有 44 个 GO

条目。在 CC 分类中, 细胞外间隙、其他生物细胞质 GO 条目富集程度最显著; 在 BP 分类中, 细胞凋亡信号通路、粒细胞趋化等 GO 条目富集程度最显著; 在 MF 分类中, TLR4 结合、花生四烯酸结合等 GO 条目富集程度最显著 (图 6)。细胞外间隙, 指多细胞生物在固有细胞膜外相互连接的部分, 包含了组织液和基质的不规则特殊空间, 一般在脑胶质瘤侵袭扩散时发挥重要作用<sup>[39]</sup>。目前未见细胞外间隙对 CT26<sup>+</sup>肿瘤作用的相关报道, 本研究中细胞外间隙通路表达上调的

基因主要是 *Tnxb*。Yan 等<sup>[40]</sup>以乳腺癌为模型,发现上调 *Tnxb* 基因可调控 PI3K/Akt 信号通路抑制乳腺癌的侵袭、迁移和上皮-间质转化。由此推测 DOKD 可能由 *Tnxb* 基因调控的 PI3K/Akt 信号抑制 CT26<sup>+</sup>肿瘤的迁移与侵袭。中性粒细胞为多形核细胞,它是哺乳动物血液中最常见的一类白细胞,是机体固有的免疫重要组成部分,可通过产生抗肿瘤因子、免疫反应、血管生成和迁移来影响肿瘤的生长<sup>[41]</sup>。*TLR4* 是现代免疫治疗的新靶点,*TLR4* 表达上调可启动信号转导并促进程序性死亡配体 1 (PD-IL) 的表达,导致自分泌诱导局部免疫抑制<sup>[42]</sup>,本研究中 *TLR4* 表达上调,与前人研究结果相符。花生四烯酸是一类多不饱和脂肪酸,在生命体内含量极高,具有调节炎症反应、增强血管弹性、调节血细胞功能等生理功能<sup>[43]</sup>,本研究中花生四烯酸结合通路表达上调,与常剑等<sup>[44]</sup>报道的花生四烯酸通过 COX-2 代谢促进结直肠癌氧化应激的结果一致。以上 GO 富集分析结果表明,DOKD 可能主要是通过调节炎症、免疫、迁移、氧化应激等方面的通路来抑制 CT26<sup>+</sup>结肠癌肿瘤生长。

## 2.5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

KEGG 是一种连接了基因组数据和高级功能信息的基因组功能智能系统分析知识库。将 DOKD-ND 组差异基因比对到 KEGG 数据库中获得基因注释,并利用超几何检验对 KEGG 中的每个通路展开富集分析,以寻找其中差异表达基因显著性富集的通路。由图 7 可知,DOKD 组与 ND 组比较的差异基因富集在 18 条通路上,包括:IL-17 信号通路 (IL-17 Signaling Pathway)、趋化因子信号通路 (Chemokine Signaling Pathway)、细胞因子受体相互作用 (Cytokine-cytokine Receptor Interaction)、细胞坏死因子信号通路 (TNF Signaling Pathway) 等重要通路,其中  $P < 0.05$  富集程度最高的前 10 条通路如图 3。IL-17 家族包括 IL-17A-F 等细胞因子,可以启动下游信号,如 NF- $\kappa$ B、丝裂素活化蛋白激酶,从而上调炎症因子、趋化因子以及抗菌肽的表达,起到了促进炎症反应、保护宿主免遭细胞外病原体攻击、增强粘膜防御机制等重要作用<sup>[45]</sup>。Housseau 等<sup>[46]</sup>研究发现下调 IL-17 可通过抑制炎症反应明显抑制结肠肿瘤的形成,本研究中 IL-17 通路的表达明显上调,说明 DOKD 促进了 CT26<sup>+</sup>细胞的炎症反应,与前人研究结果相反。然而另有研究表明,IL-17 诱导的炎症因子和趋化因子对 NF- $\kappa$ B 的刺激作用较差,对炎症基因的转录诱导较轻<sup>[47]</sup>,且促进了肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的激活,在肿瘤免疫中发挥了保护作用<sup>[48]</sup>。可见,DOKD 可通过增强免疫反应,抑制

CT26<sup>+</sup>结肠癌的生长。TNF 是一种可诱导细胞存活、细胞凋亡、炎症、免疫等信号通路的重要细胞因子<sup>[49]</sup>。TNF 的主要受体 TNFR1,几乎能在所有细胞中表达,主要通过 NF- $\kappa$ B 通路和 AMPK 级联诱导诸多基因激活<sup>[50]</sup>。在本研究中 TNF 信号通路显著上调,说明 DOKD 可通过调控 TNF 促进 CT26<sup>+</sup>细胞坏死,与前人研究结果一致<sup>[51]</sup>。以上这些通路在 DOKD 抑制 CT26<sup>+</sup>结肠癌生长过程发挥重要调控作用,可能是抑制 CT26<sup>+</sup>结肠癌生长的关键调控通路。

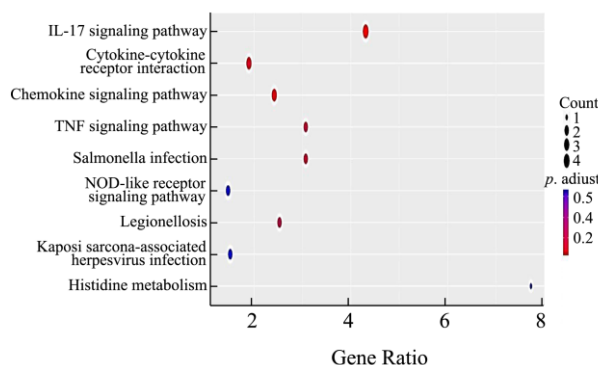


图 7 DOKD 与 ND 组差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig.7 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between DOKD and ND

## 2.6 Western blot 检测结果

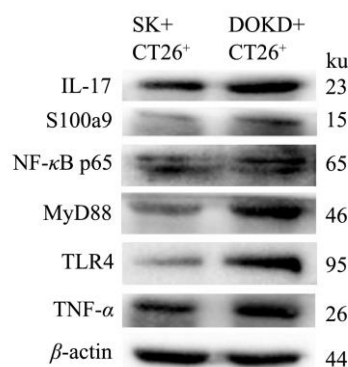


图 8 DOKD 对小鼠 CT26<sup>+</sup>肿瘤组织中 IL-17、S100a9、NF- $\kappa$ B p65、TLR4、MyD88、TNF- $\alpha$  蛋白表达的影响

Fig.8 Effects of DOKD on protein expressions of IL-17, S100a9, NF- $\kappa$ B p65, TLR4, MyD88 and TNF- $\alpha$  in CT26<sup>+</sup> colon cancer tissue of mice

如图 8 所示,与 ND 组相比,DOKD 组小鼠 CT26<sup>+</sup>肿瘤组织中 IL-17、S100a9、NF- $\kappa$ B p65、TLR4、MyD88、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平均显著升高,与 RNA-seq 测序结果一致。TLR4/NF- $\kappa$ B 通路受多种上游信号分子调控,如 S100a8/a9<sup>[53]</sup>。在本研究中,IL-17 信号通路上调了 S100a8/a9、Cxcl 2/3 的表达,因此 DOKD 可通过

TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调控炎症反应及增强免疫抑制肿瘤的生长。

### 3 结论

本研究以 CT26<sup>+</sup>结肠癌 BALB/c 小鼠为模型, 采用 RNA-Seq 技术和生物信息分析方法探究 DOKD 处理后肿瘤的变化。转录组测序结果表明, DOKD 通过 IL-17 信号通路、趋化因子信号通路、细胞因子受体相互作用信号通路、TNF 信号通路调控凋亡、炎症、免疫、迁移等方面抑制结肠癌 CT26<sup>+</sup>小鼠肿瘤生长。

### 参考文献

- [1] Al Aamri, Khadija, Sulaiman, et al. The effect of low-carbohydrate ketogenic diet in the management of obesity compared with low caloric, low-fat diet. [J]. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2022, 49: 522-528.
- [2] 刘诗贺,南伟伟,李晓莲,等.生酮饮食的临床应用与研究进展[J].*生理科学进展*,2021,52(6):445-450.
- [3] Ad B. The ketogenic diet in epilepsy [J]. *Canadian Medical Association Journal*, 1931, 24(1): 106-107.
- [4] Tyler T, Liu B, Linda S, et al. Ketogenic ratio of macronutrients and risk of diabetes among postmenopausal women [J]. *Current Developments in Nutrition*, 2021, 5(Supplement\_2): 459-459.
- [5] Jeenan K, Vandaalen K R, Arjun T, et al. A systematic review of the association between vegan diets and risk of cardiovascular disease [J]. *The Journal of Nutrition*, 2021, 6: 54-61.
- [6] Castellana M, Biacchi E, Procino F, et al. Very-low-calorie ketogenic diet for the management of obesity, overweight and related disorders [J]. *Minerva Endocrinol (Torino)*, 2021, 46(2): 161-167.
- [7] Crosby L, Davis B, Joshi S, et al. Ketogenic diets and chronic disease: weighing the benefits against the risks, [J]. *Front Nutrition*, 2021, 8: 1-11.
- [8] J Sperry, Condro M C, Guo L, et al. Glioblastoma utilizes fatty acids and ketone bodies for growth allowing progression during ketogenic diet therapy [J]. *iScience*, 2020, 23(9): 101453.
- [9] Mann S DO, Sidhu M DO, Gowin K DO. Understanding the mechanisms of diet and outcomes in colon, prostate, and breast cancer; malignant gliomas; and cancer patients on immunotherapy [J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2226.
- [10] Okechukwu C E. Cross talk between the ketogenic diet and metastatic prostate cancer cells [J]. *The World Journal of Mens Health*, 2022, 40(1): 162-163.
- [11] Cohen C W, Fontaine K R, Arend R C, et al. A ketogenic diet is acceptable in women with ovarian and endometrial cancer and has no adverse effects on blood lipids: A randomized, controlled trial [J]. *Nutr Cancer*, 2020, 72(4): 584-594.
- [12] Feng S, Wang H, Liu J, et al. Multi-dimensional roles of ketone bodies in cancer biology: Opportunities for cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150: 104500.
- [13] Marsh J, Mukherjee P, Seyfried T N. Drug/diet synergy for managing malignant astrocytoma in mice: 2-deoxy-D-glucose and the restricted ketogenic diet [J]. *Nutrition & Metabolism*, 2008, 5(1): 33.
- [14] Hua H, Kong Q, Zhang H, et al. Targeting mTOR for cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 71.
- [15] 舒婷,万福生.PI3K/Akt/mTOR 信号通路与自噬及肿瘤的关系[J].*中国生物化学与分子生物学报*,2016,11:1192-1196.
- [16] Zou Y, Fineberg S, Pearlman A, et al. The effect of a ketogenic diet and synergy with rapamycin in a mouse model of breast cancer [J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0233662.
- [17] Mitchell J P, Carmody R J. NF- $\kappa$ B and the transcriptional control of inflammation [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 335: 81-84.
- [18] Nakamura K, Tonouchi H, Sasayama A, et al. A ketogenic formula prevents tumor progression and cancer cachexia by attenuating systemic inflammation in colon 26 tumor-bearing mice [J]. *Nutrients*, 2018, 10(2): 206-206.
- [19] 吴纪,陈泽斌,贺平.炎症反应在肿瘤治疗中的应用[J].*热带医学杂志*,2022,22(8):1167-1172.
- [20] Lussier D M, Woolf E C, Johnson J L, et al. Enhanced immunity in a mouse model of malignant glioma is mediated by a therapeutic ketogenic diet [J]. *Bmc Cancer*, 2016, 16(1): 310.
- [21] 杨惠,刘淑英.基于转录组测序分析自然感染的绵羊肺腺瘤肿瘤组织差异表达基因富集的生物功能模块[J].*中国预防兽医学报*,2020,42(10):992-997,1057.
- [22] Hong M, Tao S, Zhang L, et al. RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 166.
- [23] Margulies M, Egholm M, Altman W E, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors [J]. *Nature*, 2005, 437: 376-380.
- [24] 杜文丽,陈中钊,许端祥,等.低温胁迫下苦瓜叶片转录组差异基因分析及生理响应特征[J].*核农学报*,2021,35(2):338-348.
- [25] Zhang N, Liu C, Jin L, et al. Ketogenic diet elicits antitumor properties through inducing oxidative stress, inhibiting



- MMP-9 Expression, and Rebalancing M1/M2 tumor-associated macrophage phenotype in a mouse model of colon cancer [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(40): 11182-11196.
- [26] Young M D, Wakefield M J, Smyth G K, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias [J]. *Genome Biol*, 2010, 11(2): R14.
- [27] 周鑫,白巧,张小印,等.S100A9 通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路活化星形胶质细胞促进炎症反应[J].*基因组学与应用生物学*,2022,41(5):1103-1111.
- [28] Narumi K, Miyakawa R, Ueda R, et al. Proinflammatory proteins S100A8 /S100A9 activate NK cells via interaction with RAGE [J]. *J Immunol*, 2015, 194(11): 5539-5548.
- [29] 褚伟伟,王海明,刘锐.趋化因子受体 6 和趋化因子受体 7 在乳腺癌组织中的表达及临床价值[J].*中国妇幼保健*,2022, 37(5):891-894.
- [30] Dhakal B, Wang T, Kuxhausen M, et al. Prognostic impact of serum CXCL chemokine ligands 4 and 7 on myelodysplastic syndromes post allogeneic hematopoietic cell transplant [J]. *Leukemia & Lymphoma*, 2021, 62(1): 229-233.
- [31] 钟甜,郭璐,蒋才玉,等.CXCL2 基因在 LPS 诱导的支气管上皮细胞炎症反应中的作用[J].*中国免疫学杂志*,2021,37(15): 1804-1808.
- [32] Lin T, Zhang E, Mai PP, et al. CXCL2/10/12/14 are prognostic biomarkers and correlated with immune infiltration in hepatocellular carcinoma [J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(6): BSR20204312.
- [33] Yim C Y, Bikorimana E, Khan E, et al. G0S2 represses PI3K/mTOR signaling and increases sensitivity to PI3K/mTOR pathway inhibitors in breast cancer [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(21): 2146-2155.
- [34] Chollat-Namy M, Ben Safta-Saadoun T, Haferssas D, et al. The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 695.
- [35] Cao X, Cai S F, Fehniger T A, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance [J]. *Immunity*, 2007, 27(4): 635-646.
- [36] 顾亚茹,郭长缨.颗粒酶 A 在肿瘤免疫中的功能研究[J].*科学技术创新*,2020,9:14-15.
- [37] Shen L, Chen Q, Yang C, et al. Role of PRDM1 in tumor immunity and drug response: A pan-cancer analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 593195.
- [38] 张梦莹,李志,李雪琴,等.PRDM1 调控 NF- $\kappa$ B 信号通路对巨噬细胞极化和功能的影响[J].*中国免疫学杂志*,2021,37(11): 1286-1291.
- [39] 马凯明,杨军.脑胶质瘤周水肿区细胞外间隙改变及机制研究进展[J].*中华神经医学杂志*,2022,21(3):242-248.
- [40] Yan S P, Chu D X, Qiu H F, et al. LncRNA LINC01305 silencing inhibits cell epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer by inhibiting TNXB-mediated PI3K/Akt signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2656-2666.
- [41] 张英楠,姚圣城,郭雯雯,等.中性粒细胞通过分泌 ATX 激活整合素  $\beta$ 3 促进肺癌细胞转移[J].*肿瘤预防与治疗*,2022, 35(4):311-317.
- [42] Litak J, Grochowski C, Litak J, et al. TLR-4 signaling vs. immune checkpoints, miRNAs molecules, cancer stem cells, and wntless-signaling interplay in glioblastoma multiform-future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3114.
- [43] 袁成凌,姚建铭,余增亮.花生四烯酸及其代谢物的生物学作用[J].*中国药物化学杂志*,2000,1:78-81.
- [44] 常剑,陶京,朱忠超,等.花生四烯酸通过 COX-2 酶代谢氧化失活 PTEN 促进结肠癌生长[J].*现代生物医学进展*,2020, 20(21):4001-4006.
- [45] McGeachy M J, Cua D J, Gaffen S L. The IL-17 family of cytokines in health and disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 892-906.
- [46] Housseau F, Wu S, Wick E C, et al. Redundant innate and adaptive sources of IL17 production drive colon tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2115-2124.
- [47] Amatya N, Garg A V, Gaffen S L. IL-17 signaling: The Yin and the Yang [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(5): 310-322.
- [48] Eyerich K, Dimartino V, Cavani A. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology [J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(4): 607-614.
- [49] 李市荣,王西双,程国良,等.基于 NF- $\kappa$ B/NLRP3/IL-1 $\beta$  信号通路探讨荆防合剂对荨麻疹小鼠干预作用的研究[J].*中国中药杂志*,2022,47(20):5467-5472.
- [50] 王琴,林春霖,程志彬,等.肿瘤坏死因子受体相关因子 6 泛素化位点突变载体的构建及其功能位点泛素化位点的鉴定 [J].*吉林大学学报(医学版)*,2021,47(3):551-558.
- [51] 高世勇,李丹.肿瘤坏死因子与癌症相关研究进展[J].*中国药理学通报*,2020,36(9):1209-1213.
- [52] Yang A, Fan H, Zhao Y, et al. An immune-stimulating proteoglycan from the medicinal mushroom *Huaier* up-regulates NF- $\kappa$ B and MAPK signaling via toll-like receptor 4 [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(8): 2628-2641.
- [53] Riva M, Källberg E, Björk P, et al. Induction of nuclear factor- $\kappa$ B responses by the S100A9 protein is toll-like receptor-4-dependent [J]. *Immunology*, 2012, 137(2): 172-82.