

张晨曦,李继娟,张飞程,等. MNNG 胃癌大鼠肠道菌群与转录组学特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 70-81.

ZHANG C X, LI J J, ZHANG F C, et al. Characterization of intestinal flora and transcriptomics in rats with gastric cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 70-81.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.007

MNNG 胃癌大鼠肠道菌群与转录组学特征分析

张晨曦,李继娟,张飞程,高田宇,梁新月,潘丽佳*

(河北中医药大学针灸推拿学院,石家庄 050200)

【摘要】

目的 分析 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 胃癌大鼠与正常大鼠肠道菌群差异、转录组学差异,以探究 MNNG 胃癌大鼠肠道菌群与转录组学特征,并分析二者的相关性,为以 MNNG 胃癌大鼠为模型的相关研究提供参考。**方法** 12 只 Wistar 大鼠随机分为正常 (Normal, NM) 组、胃癌 (Gastric cancer, GC) 组,GC 组给予浓度 20 mg/mL 的 MNNG 灌胃,剂量为 100 g/mL,每天 1 次, NM 组给予相同剂量的生理盐水灌胃,连续干预 16 周后取材检测。取大鼠胃组织,苏木素-伊红 (HE) 染色观察两组大鼠胃黏膜形态变化,转录组测序检测差异基因的表达水平;无菌 Ep 管收集盲肠内容物用于 16S rRNA 测序。**结果** (1) 肉眼观察及 HE 结果:肉眼观察, NM 组大鼠胃组织黏膜体积正常,表面有光泽,胃壁有弹性,黏膜皱襞走向有规律,无增生无出血点, GC 组大鼠胃组织胃黏膜体积缩小,胃壁变薄,弹性变差,皱襞走向错乱无规律,出现隆起且伴有黄黑色角质增生; HE 染色, NM 组胃黏膜鳞状上皮层、粘膜下层、粘膜肌层层层次清晰,无增生和角化, GC 组胃粘膜层次和细胞极性紊乱,细胞形态不一,鳞状上皮层被破坏,鳞状上皮细胞增生和角化,并向下增殖侵入肌层,造模成功; (2) 肠道菌群测序结果显示, MNNG 胃癌大鼠阿克曼氏菌和乳杆菌的丰度显著减少,瘤胃球菌科、普雷沃氏菌、布劳特氏菌的丰度显著增加; (3) 转录组学测序:京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析得到的 3 条关键通路分别是阿米巴病、系统性红斑狼疮和酯酰肌醇 3 激酶-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase-RAC- α serine/threonine-protein kinase, PI3K-Akt) 信号通路,富集到这 3 条通路的 5 个差异基因分别是 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1、ACTN2、VEGF-D; (4) 肠道菌群与转录组学联合分析结果显示,瘤胃球菌科_UCG-005、普雷沃氏菌_UCG-003 和布劳特氏菌可能与阿米巴病、系统性红斑狼疮和 PI3K-Akt 信号通路呈正相关。**结论** 经 MNNG 灌胃形成的胃癌大鼠在肠道菌群丰度方面与正常大鼠之间存在差异,上调的 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1、ACTN2、VEGF-D 可能是 MNNG 灌胃诱发胃癌的差异基因,肠道菌群与差异基因联合分析推测 MNNG 致癌的机制可能主要与胃粘膜破坏,引起炎症反应有关。

【关键词】 胃癌; 胃癌模型; 肠道菌群; 转录组学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025) 01-0070-12

Characterization of intestinal flora and transcriptomics in rats with gastric cancer

ZHANG Chenxi, LI Jijuan, ZHANG Feicheng, GAO Tianyu, LIANG Xinyue, PAN Lijia*

【基金项目】 河北省自然科学基金 (H2023423029), 河北省中医药管理局科研计划项目 (2022361, 2021095), 河北中医药大学 2022 年博士科研基金项目 (BSZ2022006)。

Funded by the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2023423029), Scientific Research Program Project of Hebei Administration of Traditional Chinese Medicine (2022361, 2021095), Doctoral Research Fund Project of Hebei University of Traditional Chinese Medicine in 2022 (BSZ2022006).

【作者简介】 张晨曦,女,在读硕士研究生,研究方向: 刺灸法效应特异性和灸法的抗肿瘤机制。Email: zhangchenxi@hebcm.edu.cn

【通信作者】 潘丽佳,女,副教授,硕士生导师,研究方向: 刺灸法效应特异性和灸法的抗肿瘤机制。Email: panlijia@hebcm.edu.cn

(College of Acupuncture and Massage, Hebei University of Traditional Chinese Medicine,
Shijiazhuang 050200, China)

Corresponding author: PAN Lijia. E-mail: panlijia@hebcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze differences in the intestinal microbiota and transcriptomics between N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) gastric cancer rats and normal rats and to analyze the correlation between the two, so as to provide a reference for related studies using MNNG gastric cancer rats as a model. **Methods** A total of 12 Wistar rats were randomly divided into normal (NM) and gastric cancer (GC) groups. The GC group was given a concentration of 20 mg/mL of MNNG by gavage with a dose of 100 g/mL once a day, and the NM group was given the same amount of normal saline by gavage. Samples were collected for testing after 16 weeks of continuous intervention. The gastric tissues were collected and stained by HE staining to observe morphological changes in the gastric mucosa of the two groups, and the expression levels of differential genes were detected by transcriptome sequencing. The cecal contents were collected for 16S rRNA sequencing. **Results** (1) Visual observation and HE results showed that the volume of gastric mucosa in the NM group was normal, the surface was glossy, the gastric wall was elastic, the direction of the mucosal folds was regular, there were no hyperplasia or hemorrhagic spots. In the GC group, the volume of gastric mucosa was reduced, the gastric wall was thinned, elasticity was poor, the direction of the folds was disordered and irregular, and there was a bulge accompanied by yellow-black keratotic hyperplasia. In the NM group, the squamous epithelial layer, submucosa, and muscular layer of the gastric mucosa were clear, with no hyperplasia and keratinization. In the GC group, the gastric mucosa had disorganized layers and cell polarity, with different cell morphologies; the squamous epithelial layer was destroyed, and squamous epithelial cells were hyperplastic, keratinized, and had invaded the muscular layer by proliferation. The modeling was considered successful. (2) The results of intestinal microbiota sequencing showed that the abundance of Akkermansia and Lactobacillus in MNNG gastric cancer rats decreased significantly, and the abundance of the rumen coccaceae Prevotella, and Blautia increased significantly. (3) The three key pathways obtained by transcriptomic sequencing and KEGG pathway enrichment analysis were amebiasis, systemic lupus erythematosus, and the PI3K-Akt signaling pathway, and five genes differentially enriched in these three pathways were those for MCPT8I2, IGH-6, IGHG1, ACTN2, and VEGF-D. (4) Combined analysis of intestinal microbiota and transcriptomics showed that _UCG-005, Prevotella _UCG-003 and Brautella were positively correlated with amebiasis, systemic lupus erythematosus, and the PI3K-Akt signaling pathway. **Conclusions** The abundance of intestinal microbiota in gastric cancer rats formed by MNNG gavage is different from that of normal rats. The genes for MCPT8I2, IGH-6, IGHG1, ACTN2 and VEGF-D may be up-regulated in gastric cancer induced by MNNG gavage. Combined analysis of intestinal microbiota and differential genes suggested that the mechanism of MNNG carcinogenesis may be mainly related to the destruction of gastric mucosa and the inflammatory response.

【Keywords】 gastric cancer; gastric cancer model; intestinal flora; transcriptomics
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

胃癌(gastric cancer, GC)是全球第五大常见恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的第四大原因^[1],尽管目前胃癌的发病率下降,但仍是世界上重要的公共卫生问题^[2]。饮食、环境、遗传和幽门螺杆菌感染等因素都是胃癌发病的潜在危险因素,但没有明确的定论^[3]。有研究表明,胃肠道疾病的致癌性主要归因于微生物失调^[4],肠道共生菌在生理状态下形成微生物屏障,可以抵御致病菌的入侵,然而由于肠道菌群的失调,微生物屏障

被破坏,微生物及其代谢产物侵入肠道上皮细胞,引起炎症甚至凋亡,破坏肠道生理功能,使消化道功能紊乱,导致胃癌的发生、发展^[5-6]。高通量测序技术的发展和应用于胃癌的诊断和靶向治疗提供了技术支持,如通过高通量测序发现胃癌发病过程中的融合基因 LRP5-LITAF,为胃癌辅助诊断及靶向治疗提供了初步实验依据^[7],半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SN(cystatin SN, CST1)高表达能够保护胃癌细胞免于铁死亡,促进胃癌转移,

所以 CST1 可能作为一种新的肿瘤标志物和胃癌转移的潜在治疗靶点^[8]。基因测序和转录组测序的大量应用为学者探究人体生理病理状态下与胃肠菌群之间的相关性提供了广泛的研究空间。以 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 诱导的胃癌大鼠模型是研究胃癌最常用的动物模型^[9], 然而目前对 MNNG 胃癌大鼠的肠道菌群及转录组的分析研究较少, 因此本研究通过分析正常大鼠与 MNNG 胃癌大鼠肠道菌群与转录组学的差异、胃癌大鼠肠道菌群与转录组学特征及二者的相关性, 旨在为以 MNNG 胃癌大鼠为模型的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 20 只, 体质量 160 ~ 180 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京) 2021-0006】。所有动物均饲养于河北省中医针灸优势病证国际联合研究中心【SYXK(冀) 2022-010】, 环境温度为 (23 ± 1) °C, 湿度为 40% ~ 70%, 每日 12 h 交替照明, 适应性饲养 1 周后进行干预。所有动物实验程序都遵循河北中医药大学动物伦理原则并获得批准(DWLL2020016)。

1.1.2 主要试剂与仪器

MNNG(日本东京株式会社), 生理盐水(石家庄思耀有限公司), 戊巴比妥钠(美国圣路易斯), 多聚甲醛固定(武汉 Servicebio), TRIzol(美国 Thermo), NEBNext® UltraTM 文库制备试剂盒(美国 NEB), QIAamp DNA Mini Kit(德国 Qiagen Hilden)。Lecia 显微镜(德国 Lecia DM2000), Illumina HiSeq 测序平台(美国 Illumina), Illumina Novaseq 平台(美国 Illumina), 转录组测序仪(Illumina Novaseq)。

1.2 方法

1.2.1 造模制备和干预

将 20 只大鼠按随机数字表随机分为 2 组: 正常(Normal, NM)组和胃癌(Gastric cancer, GC)组, 每组各 10 只。通过灌胃 MNNG 建立胃癌模型。GC 组给予新鲜配制的浓度为 20 mg/mL

MNNG(将 1 g MNNG 溶解于 50 mL 蒸馏水), 灌胃剂量为 100 g/mL, 每天 1 次^[10], 共 16 周。NM 组给予相同剂量的 100 g/mL 生理盐水灌胃。以出现胃黏膜层次紊乱, 前胃鳞状上皮增生, 并向下侵入肌层为模型成功标准^[11], 连续干预 16 周后取材检测。在实验过程中, GC 组大鼠由于 MNNG 造模导致的副作用死亡 4 只。

1.2.2 取材和检测

肉眼及苏木素-伊红(HE)染色观察胃组织形态: 末次治疗结束后, 所有大鼠禁食 24 h, 禁食期间不禁水, 使用浓度为 10 g/L 的戊巴比妥钠进行腹腔麻醉, 摘取大鼠全胃, 纵切胃大弯, 充分暴露胃腔, 氯化钠溶液(0.9%)充分清洗, 肉眼观察胃组织形态变化。沿胃大弯长轴方向于胃窦部和胃体部剪取 0.2 cm × 1.5 cm 的条状组织标本, 氯化钠溶液冲洗, 中性多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片(4 μm), 将切片脱蜡水化后, 苏木素、伊红染色, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明后, 中性树胶封片, 使用 Lecia 显微镜系统对染色标本进行观察拍照; NM 组和 GC 组分别剪取部分胃组织和胃部瘤体, 随后迅速放入液氮中速冻, 保存于 -80 °C 冰箱中, 用于转录组测序检测; 无菌 EP 管收集盲肠内容物并储存在 -80 °C 冰箱中用于 16S rRNA 测序。

16S rRNA 基因测序分析: 通过 QIAamp DNA Mini Kit 从粪便样本中提取总细菌基因组 DNA。通过通用引物 319F 和 806R: 319F: 5'-ACTCCTA CGGGAGGCAGCAG-3' 和 806R: 5'-GGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3' 扩增总粪便 DNA 的 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域^[12]。对其产物进行纯化、定量和均一化以形成测序文库, 对构建的文库进行质量测试。基于 Illumina HiSeq 测序平台, 利用双末端测序的方法, 进行测序。聚类序列的相似性为 97%, 所有序列中的 0.005% 作为阈值过滤 OTU, 并基于 Silva 分类学数据库对 OTU 进行分类学注释。

转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)分析: 将样本用 TRIzol 提取其总 RNA, 按送检要求稀释后交由北京百迈克云科技有限公司完成质检并进行转录组测序。用 Illumina Novaseq 平台进行测序。使用 edgeR 3.8.6 软件, 参数 FDR = 0.05, FC = 2 对样本进行基因定量分析, 以筛选

出差异表达基因 (differently expression genes, DEGs), 通过火山图分析总览 DEGs 分布情况、差异大小及差异显著性等信息; 对 DEGs 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释、KEGG 通路功能注释, 根据注释结果筛选出相关的 DEGs 进行富集分析, 寻找与肠道菌群相关的信号通路。

1.3 统计学分析

肠道菌群数据分析: 使用 Mothur (version v. 1.30) 软件计算 ACE、Shannon、Simpson 指数, 并绘制稀释性曲线。对 α 多样性的组间差异进行分析。使用 QIIME 1.8.0 软件计算 Unifrac 距离进行 β 多样性分析, 绘制主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 图和具有算术平均值的未加权配对组方法的层次聚类 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)。在属水平上, 选择 TOP 20 的物种丰度进行分类注释和差异分析, 并采用 Wilcoxon 检验进行组间比较。线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 效应大小 (linear discriminant analysis, LDA) 方法用于鉴定每个实验组中具有相对差异丰度的分类群, 通过 LEfSe 软件完成, 设置 $LDA > 3.5$ 。采用 IBM SPSS 27.0 软件对数据进行分析处理, 计量资料用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 满足正态性和方差齐性检验, 采用独立样本 t 检验方法进行组间数据比较, 不符合正态分布且方差不齐者, 采用两个独立样本检验, 数据以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

转录组学数据分析: 使用 Nanodrop 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测, 采用 Illumina Novaseq 平台进行文库构建测序。得到原始测序数据后, 筛选出 Q20 $> 85\%$ 、Q30 $> 80\%$ 的高质量序列 (clean reads)。使用 StringTie 对所有样本的 clean reads 进行从头组装, 用整合基因组浏览器 (integrative genomics viewer, IGV) 进行可视化浏览。通过 RSEM 计算基因表达量。使用 edgeR 进行组间表达量差异分析, 以 $FDR = 0.05$, $FC = 2$ 作为筛选条件, 筛选出两组的 DEGs。使用 GOseq R 包对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析。

转录组与肠道菌群联合分析: 采用 Graph Pad Prism 9.5.1 对差异菌群和差异基因进行 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 胃组织形态肉眼观察结果

NM 组大鼠胃组织胃黏膜体积正常, 表面有光泽、胃壁有弹性、黏膜皱襞走向有规律, 无增生无出血点。GC 组大鼠胃组织胃黏膜体积缩小, 胃壁变薄, 弹性变差, 皱襞走向错乱无规律, 出现隆起且伴有黄黑色角质增生 (见图 1)。

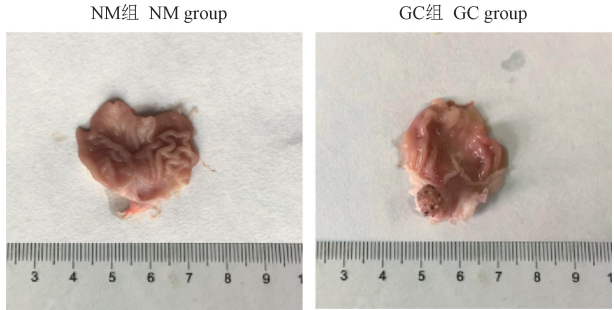


图 1 大鼠胃组织形态肉眼观察

Figure 1 Gross observation of gastric morphology of rats

2.2 HE 染色观察大鼠胃黏膜病理变化

HE 染色镜下观察, NM 组胃黏膜鳞状上皮层、粘膜下层、粘膜肌层层清晰, 无增生和角化。GC 组胃粘膜层次和细胞极性紊乱, 细胞形态不一, 鳞状上皮层被破坏, 鳞状上皮细胞增生和角化, 并向下增殖侵入肌层, 造模成功^[11], 见图 2。

2.3 肠道菌群结果分析

2.3.1 α 多样性分析

α 多样性分析, 包括 α 多样性指数、稀释曲线, 如图 3 所示。图 3A 表明随着测序量的增加, 曲线趋于平缓, 表明样品序列充足, 可以进行数据分析。NM 组和 GC 组之间肠道菌群在菌群丰度方面具有显著性差异 (图 3B~3D)。ACE 指数表明 GC 组大鼠的肠菌菌群在菌群丰度方面与 NM 组大鼠具有差异性 ($P < 0.05$), 即 MNNG 灌胃能够显著改变肠道菌群的丰度; Shannon 和 Simpson 指数发现 NM 组和 GC 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明胃癌大鼠肠道菌群的多样性与正常大鼠相似。

2.3.2 β 多样性分析

β 多样性分析, 包括 PCoA 分析、聚类分析 (未加权算术平均法)。图 4A 可看出, 两组平面分布区域分界清晰, 组间物种多样性存在差异。

使用 UPGMA 对样本进行聚类,以确定样本间物种组成的相似性。在图 4B 中,正常大鼠与胃癌

大鼠的肠道菌群存在差异,表明 MNNG 给药后,两组样本的菌群和数量发生了变化。

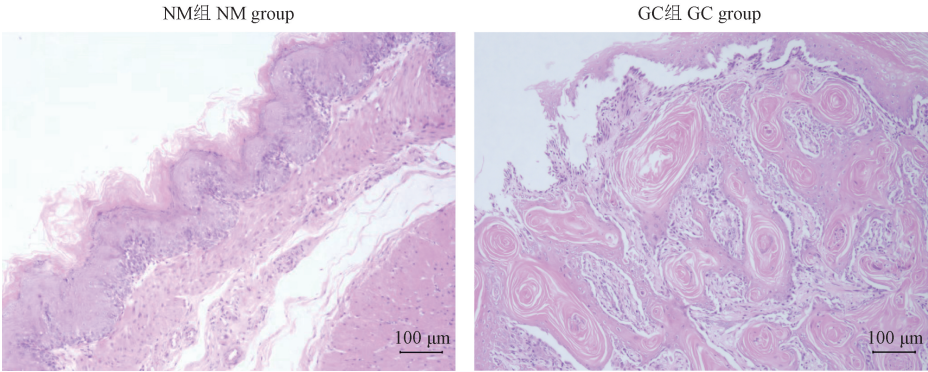
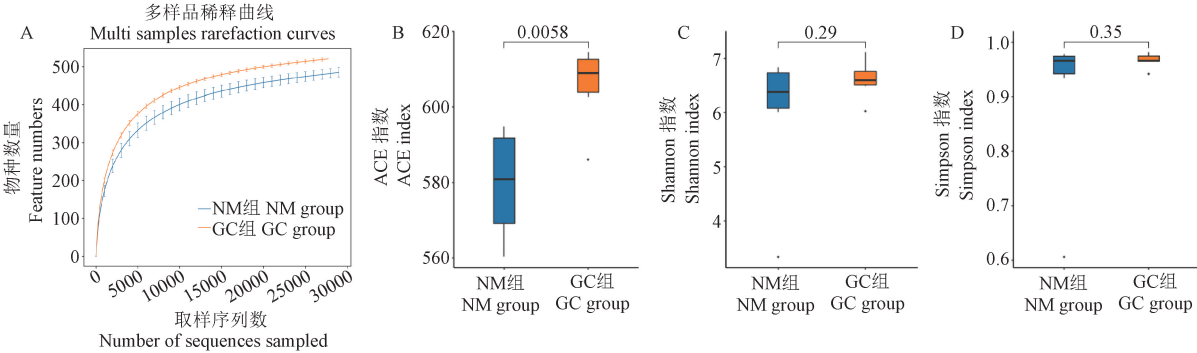


图 2 大鼠胃组织 HE 染色
Figure 2 HE staining of rat gastric tissue

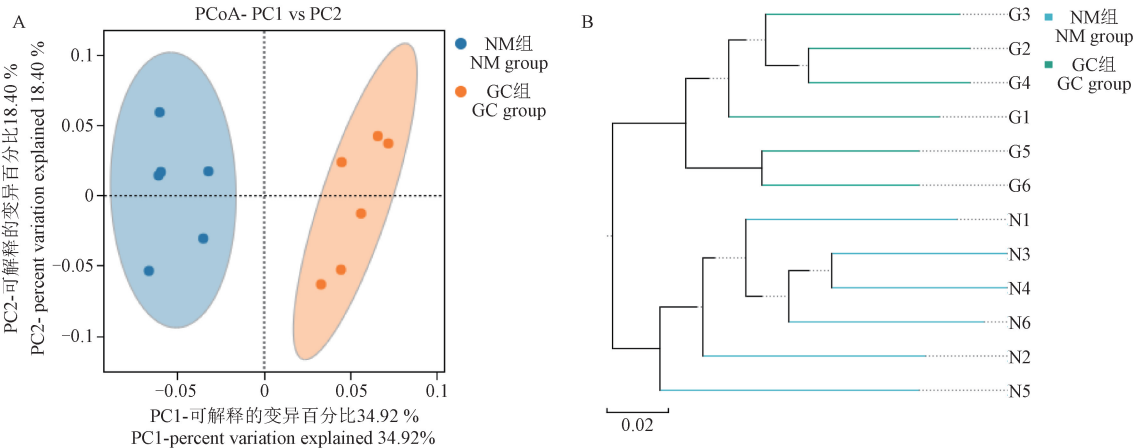


注:A:稀释曲线;B:ACE 指数;C:Shannon 指数;D:Simpson 指数;与 NM 组相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 NM 组和 GC 组肠道菌群的 α 多样性分析($n = 6$)

Note. A. Dilution curve. B. ACE index. C. Shannon index. D. Simpson index. Compared with NM group, * $P < 0.05$.
(The same in the following figures)

Figure 3 α diversity analysis of intestinal flora in normal and gastric cancer groups($n = 6$)



注:A:主坐标分析(PCoA 分析);B:UPGMA 样本聚类分析。

图 4 β 多样性分析($n = 6$)

Note. A. Principal coordinate analysis (PCoA analysis). B. UPGMA cluster analysis of the samples.

Figure 4 β diversity analysis of intestinal flora in normal group and gastric cancer group($n = 6$)

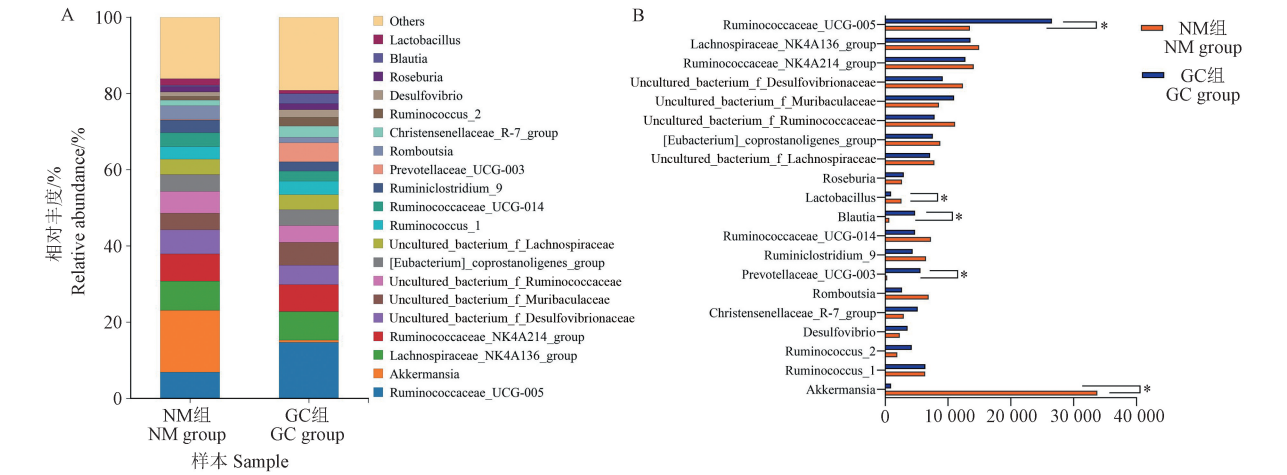
2.3.3 差异菌群分析

选择属水平上 TOP20 的物种丰度进行分类注释和差异分析。两组之间的阿克曼氏菌 (Akkermansia)、乳杆菌 (Lactobacillus)、瘤胃球菌 _UCG-005 (Ruminococcaceae_ UCG-005)、普雷沃氏菌 _UCG-003 (Prevotallaceae_ UCG-003)、布劳特氏菌 (Blautia) 存在显著性差异 (图 5A)。NM 组中阿克曼氏菌 (16.2%) ($P < 0.05$)、乳杆菌 (1.7%) ($P < 0.05$) 较 GC 组显著增加。GC 组中瘤胃球菌 _UCG-005、普雷沃氏菌 _UCG-003 (5.0%) ($P < 0.05$)、布劳特氏菌 (2.6%) ($P < 0.05$) 较 NM 组显著增加 (图 5B)。结果表明胃癌大鼠肠道菌群的组成与正常大鼠有显著性差异,

MNNG 灌胃可以显著减少阿克曼氏菌和乳杆菌的丰度,并显著增加瘤胃球菌科、普雷沃氏菌、布劳特氏菌的丰度。

2.3.4 优势菌群分析

为了验证和进一步确定每组中各不相同的显著肠道菌群,进行了 LEfSe 分析,如图 6 所示。当 $LDA > 3.5$ 时 NM 组中优势菌群为 f_消化球菌科 (f_Peptococcaceae)、g_未培养细菌_f_消化球菌科 (g_uncultured_bacterium_f_Peptococcaceae)、s_未培养细菌_f_消化球菌科 (s_uncultured_bacterium_f_Peptococcaceae);GC 组中的优势菌群为 s_未培养细菌_g_瘤胃球菌 _UCG-005 (s_uncultured_bacterium_g_Ruminococcaceae _UCG-

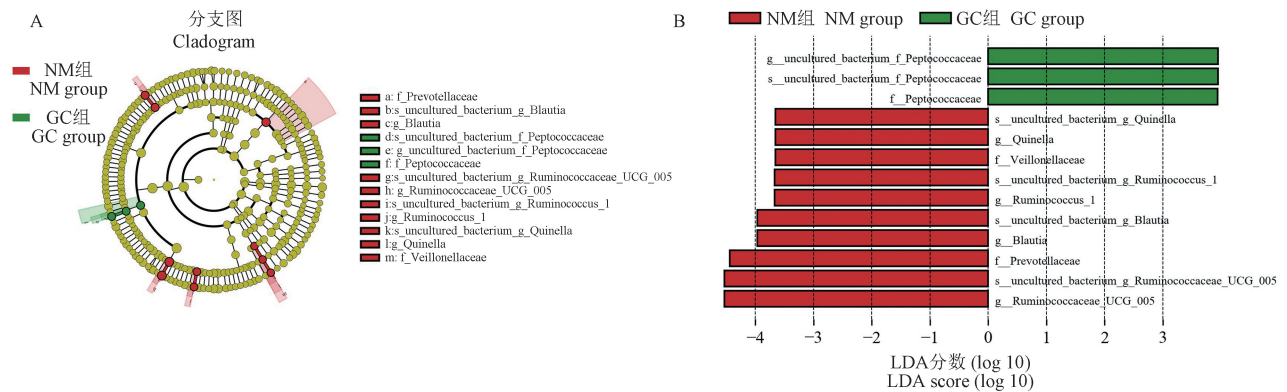


注:A:属水平肠道菌群的群落成分;B:属水平物种丰度。

图 5 胃癌对肠道菌群在属水平上的影响 (n = 6)

Note. A. Community components of intestinal flora at genus level. B. Genus level species abundance.

Figure 5 Effects of gastric cancer on intestinal flora at the generic level (n = 6)



注:A:16S rRNA 测序分析获得的分类分支图;B:LDA 值分布柱状图。

图 6 LEfSe 分析肠道菌群群落组成特征 (n = 6)

Note. A. Taxonomic branching diagram obtained by 16S rRNA sequencing analysis. B. Histogram of LDA value distribution.

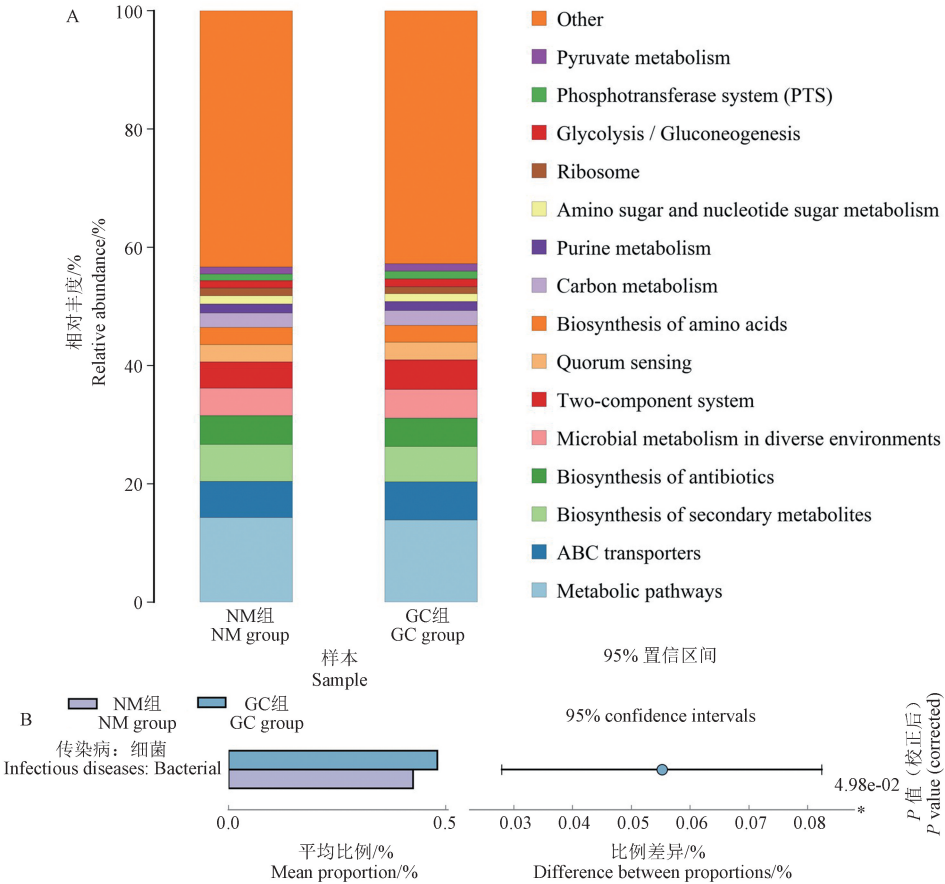
Figure 6 Microbial community composition characteristics analyzed by LEfSe (n = 6)

005)、g_瘤胃球菌_UCG-005(g_Ruminococcaceae_UCG-005)、f_普雷沃氏菌科(f_Preyotellaceae)、g_布劳特氏菌(g_Blautia)、s_未培养细菌_g_布劳特氏菌(s_uncultured_bacterium_g_Blautia)、s_未培养细菌_g_酸乳球菌_1(s_uncultufed_bacterium_g_Ruminococcus_1)、g_酸乳球菌_1(g_Ruminococcus_1)、s_未培养细菌_g_昆氏菌属(s_uncultured_bacterium_g_Quinella)、f_韦荣氏菌科(f_Veillonellaceae)、g_奎因氏菌(g_Quinella)。LEfSe 分析进一步证明了 MNNG 灌胃的胃癌模型改变了大鼠肠道菌群的种类和丰度。

2. 3. 5 Tax4Fun 功能预测

基于 Tax4Fun 功能预测(图 7A),NM 组和

GC 组肠道菌群的基因功能主要通过以下途径表达(按相对丰度由高到低排列):代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物的生物合成、抗生素的生物合成、不同环境下的微生物代谢、双组分系统、群体感应、氨基酸的生物合成、碳代谢、嘌呤代谢、氨基糖和核苷酸糖的代谢、核糖体、糖酵解/糖异生、磷酸转移酶系统(PTS)、丙酮酸代谢和其他代谢途径。其中代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物的生物合成、抗生素的生物合成表达最多。进一步分析 GC 组与 NM 组的特异性差异代谢途径(图 7B),结果发现胃癌大鼠肠道菌群的差异功能表达主要集中在细菌感染疾病方面($P < 0.05$)。



注:A:功能组成预测;B:功能差异预测。

图 7 NM 组与 GC 组的功能预测($n = 6$)

Note. A. Functional composition prediction. B. Functional difference prediction.

Figure 7 Functional prediction of normal group and gastric cancer group($n = 6$)

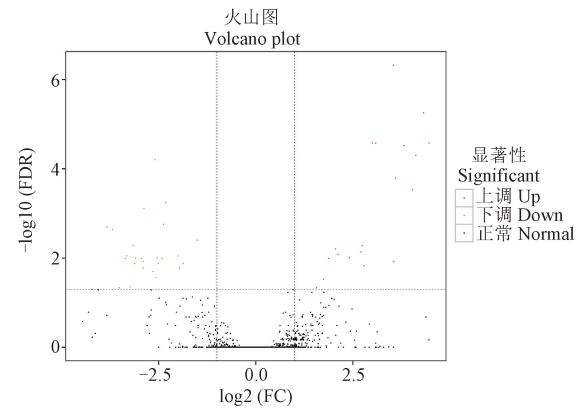
2. 4 转录组测序分析

2. 4. 1 差异表达基因分析

经 NM 组与 GC 组对比分析,共获得 44 个

DEGs,其中 GC 组高于 NM 组的上调基因有 19 个,GC 组低于 NM 组的下调基因 25 个(图 8)。

2. 4. 2 差异表达基因功能富集分析



注:红色;上调基因;绿色;下调基因。

图 8 差异基因火山图($n = 6$)

Note. Red. Up-regulated genes. Green. Down-regulated genes.

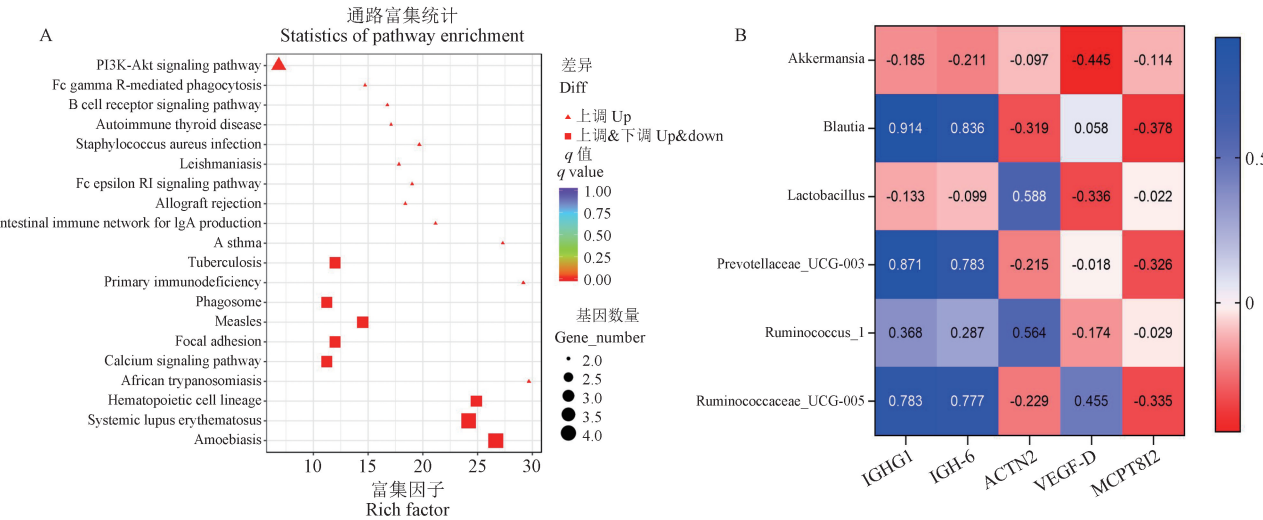
Figure 8 Differential gene volcano map($n = 6$)

通过 KEGG 通路富集分析,可以得到三条关键通路分别是阿米巴病、系统性红斑狼疮和 PI3K-Akt 信号通路($P < 0.01$)(图 9A)。其中阿米巴病、系统性红斑狼疮是上下调通路,而 PI3K-Akt 信号通路是上调通路。对关键通路富集的差异基因进行分析,阿米巴病富集的差异基因包括 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1 和 ACTN2;系统性红斑

狼疮富集的差异基因与阿米巴病富集的差异基因相同;PI3K-Akt 信号通路富集的差异基因有 VEGF-D、IGH-6 和 IGHG1。

2.5 肠道菌群与转录组学联合分析

为探究大鼠 MNNG 溶液灌胃形成胃癌后关键通路所富集的 DEGs 与差异肠道菌群(differential gut microbiotas, DGMs)的交互特征,选取这 5 位差异基因以及具有显著性差异的 6 个菌群进行分析,如图 9B 所示。Pearson 相关性分析表明,多个 DEGs 与 DGMs 显著相关。其中,IGHG1、IGH-6 与瘤胃球菌科_UCG-005、普雷沃氏菌_UCG-003 和布劳特氏菌呈显著正相关;ACTN2 与瘤胃球菌_1、乳杆菌呈正相关,与布劳特氏菌呈负相关;而 MCPT8I2 与瘤胃球菌_1、乳杆菌无明显相关性,与布劳特氏菌、普雷沃氏菌_UCG-003、瘤胃球菌科_UCG-005 呈负相关;VEGF-D 与阿克曼氏菌、乳杆菌呈显著负相关,与布劳特氏菌和普雷沃氏菌_UCG-003 无明显相关性。因 5 个 DEGs 富集到不同的通路上,而 DEGs 与 DGMs 之间存在显著的相关性,综合分析显示瘤胃球菌_UCG-005、普雷沃氏菌_UCG-003、布劳特氏菌分别



注:A;KEGG 通路富集分析(▲ 代表上调;■ 代表上调和下调;● 代表基因数量;q 值从紫色到红色表示 q 值越来越低);B;横坐标为差异表达基因,纵坐标为差异肠道菌群; $P < 0$ 为二者呈负相关; $P = 0$ 为二者无相关性; $P > 0$ 为二者呈正相关。

图 9 DEGs 在 KEGG 途径的功能富集分析聚类热图和 DEGs 与 DGMs 的相关性热图分析

Note. A. KEGG pathway enrichment analysis. (▲ represents up-regulation, ■ represents up-regulation and down-regulation, ● represents number of genes, the q value from purple to red indicates that the q value is getting lower and lower) B. Abscissa is the differentially expressed genes, and the ordinate is the differential intestinal microbiota. $P < 0$ was negative correlation. $P = 0$ was no correlation. $P > 0$ was positive correlation.

Figure 9 Functional enrichment analysis of DEGs in the KEGG pathway, cluster heatmap and correlation heatmap analysis of DEGs and DGMs

与阿米巴病、系统性红斑狼疮、PI3K-Akt 信号通路呈正相关。

3 讨论

3.1 MNNG 灌胃成功复制大鼠胃癌模型

MNNG 是一种活性的 N-亚硝基化合物,具有很强的诱变能力,对大鼠前胃有很高的亲和力,能够直接作用于胃黏膜,使 DNA 链上的碱基发生烷基化,引起癌变^[13-14]。目前胃癌的发病病理变化为:正常胃黏膜-慢性浅表性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌^[15]。SUGIMURA 等^[16]以 MNNG 持续性饮用诱导大鼠胃腺癌模型后,以 MNNG 为基础的造模法便广泛用于建立胃癌等动物模型。N-亚硝基化合物主要来源于腌制、熏制的食物,本研究以持续灌胃 MNNG 模拟胃中硝酸盐的长期摄入,MNNG 通过 DNA 损伤表现出遗传毒性和致癌作用,是导致胃癌发生的主要化学物质^[17-18]。GC 组与 NM 组比较,肉眼即可发现 GC 组的胃组织黏膜体积缩小,胃壁变薄,皱襞走向错乱无规律,出现隆起且伴有角质增生;HE 病理可观察到 GC 组胃粘膜层次和细胞极性紊乱,细胞形态不一,鳞状上皮细胞增生和角化,并向下增殖侵入肌层,病理观察确认大鼠胃癌模型成功。

3.2 MNNG 使有益菌减少,增加潜在有害菌的丰度

本实验通过分析正常大鼠与胃癌大鼠的肠道菌群,发现 MNNG 灌胃显著减少了阿克曼氏菌和乳杆菌的丰度,并增加了瘤胃球菌科、普雷沃氏菌、布劳特氏菌的丰度。阿克曼氏菌是一种黏蛋白降解革兰阴性厌氧菌,能够促进杯状细胞分泌黏蛋白,维持肠腔黏液黏蛋白的动态平衡,增强肠黏膜的屏障功能,促进黏膜的完整性^[19-20]。有研究表明胃癌的进展与阿克曼氏菌的耗竭有关^[21],因此推测胃癌大鼠由于阿克曼氏菌的减少,胃内黏膜屏障破坏,影响胃浅层的完整性,促进胃癌的形成^[22]。普雷沃氏菌目前发现广泛存在于人体的各个部位,包括皮肤、口腔、阴道和肠道等^[23],通过激活 Toll 样受体 2 (toll-like receptor2, TLR2),导致抗原呈递细胞产生 Th17 极化细胞因子,引起炎症反应^[24]。瘤胃球菌能够作用于肠道屏障,激发肠道免疫细胞释放大促炎

细胞因子,如白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6),而 IL-6 的过度表达会使肠道内环境失衡,刺激肠上皮通透性升高^[25]。由此推测,MNNG 灌胃增加了普雷沃氏菌、瘤胃球菌的丰度,二者可能通过升高胃黏膜通透性,使胃黏膜屏障受损,引起炎症,而促进胃癌的发生。通过对 MNNG 胃癌大鼠肠道菌群的分析可以得出 MNNG 的致癌效应不仅表现在直接的 DNA 损伤上,还通过调控肠道菌群,影响机体的免疫反应和炎症状态。

3.3 差异基因和信号通路在胃癌发展中的作用

通过转录组测序共获得了 44 个差异表达基因和 3 条关键通路。3 条关键通路分别是阿米巴病、系统性红斑狼疮和 PI3K-Akt 信号通路,而富集到 3 条通路的差异基因有 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1、ACTN2、VEGF-D。免疫球蛋白 G1 重链 (immunoglobulin heavy constant gamma 1, IGHG1) 在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[26],在卵巢癌中能够通过调节 EMT 促进卵巢癌细胞的迁移和侵袭^[27],激活 AKT 通路促进乳腺癌的恶性发展^[28],靶向沉默 IGHG1 的表达后能够明显抑制前列腺癌细胞的增殖并诱发早期凋亡^[29]。IGHG1 上调是胃癌细胞的特征,通过上调 AKT/GSK-3 β / β -连环蛋白通路促进胃癌肿瘤细胞增殖、迁移和化疗耐药^[30]。血管内皮生长因子 D (vascular endothelial growth factor D, VEGF-D) 也被称为 c-fos 诱导的生长因子 (c-fos induced growth factor, FIGF),能够与血管内皮细胞上的受体 VEGFR-2、VEGFR-3 结合,并且通过 LncRNA CRART16/miR-122-5p/FOS 轴上调 VEGF-D 表达促进胃癌血管生成^[31-32]。通过对 KEGG 通路的分析,发现 VEGF-D、IGHG1 富集在 PI3K-Akt 通路上。在癌细胞中,PI3K-Akt 信号通路中致癌基因重新编程细胞代谢,促进异常生长细胞的合成代谢^[33],因此推测 PI3K-Akt 通路中上调的 VEGF-D、IGHG1 基因通过促进胃癌中异常细胞的合成代谢进而促进胃癌的生长、转移。肌动蛋白 $\alpha 2$ (α -actinin-2, ACTN2) 编码 α -actinin-2,在人心脏和骨骼肌中表达的蛋白质^[34]。在头颈鳞状细胞癌^[35]、肝细胞癌^[36]中被认为是风险基因,对肿瘤的进展具有促转移作用。最近的一项研究发现 ACTN2 是胃癌细胞中核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号转导的直接靶基因,通过

丝状伪足促进原发肿瘤生长和骨髓转移^[37],证明了 ACTN2 在胃癌发展中的促进作用。

3.4 肠道菌群与差异基因之间的关联

通过对肠道菌群与差异基因的联合分析,发现普雷沃氏菌、瘤胃球菌科等与系统性红斑狼疮、PI3K-Akt 信号通路呈正相关。有研究表明系统性红斑狼疮患者的瘤胃球菌总体表现是其他患者的 5 倍^[38],而乳杆菌菌株对系统性红斑狼疮具有抗炎和免疫调节作用^[39]。本研究中瘤胃球菌与系统性红斑狼疮呈显著正相关,而系统性红斑狼疮通路富集的 ACTN2 基因与乳杆菌呈正相关,推测乳杆菌减少可能抑制 ACTN2 基因从而对系统性红斑狼疮的发生发展产生抑制作用。有研究证实普雷沃氏菌定植的微生物群小鼠肠道屏障受损,促进了脂多糖的产生和易位,进而激活 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)依赖性 PI3K-Akt-NF- κ B 信号通路,PI3K-Akt 通路活化生成的内源性硫化氢,抑制肠道动力、加速肠道的通透损伤及细菌移位,导致机体严重的炎症反应和致癌过程^[40-41]。VEGF 家族成员(包括 VEGF-D)可以通过与 VEGF 受体结合启动包括 PI3K-Akt 在内的下游信号通路,从而促进细胞增殖、迁移和血管生成等过程^[42],因此研究人员推测普雷沃氏菌的增加可能通过增强了 VEGF-D 和 IGHG1 的表达,激活 PI3K-Akt-NF- κ B 信号通路,从而促进了肿瘤细胞的增殖和血管生成。

综上所述,本实验通过肠道菌群测序和转录组学的联合分析将微生物与基因及通路进行联系,证明了经 MNNG 灌胃形成的胃癌大鼠在肠道菌群丰度方面与正常大鼠之间存在差异,研究推测 MNNG 通过改变肠道菌群的组成,削弱了肠道和胃黏膜的屏障功能,进而通过 PI3K-Akt-NF- κ B 信号通路引发炎症反应,最终促进胃癌的发生和发展。上调的 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1、ACTN2、VEGF-D 可能是 MNNG 致癌作用的核心调控因素,研究结果可以为 MNNG 胃癌大鼠为模型的相关机制研究提供依据。

本研究虽然通过 MNNG 灌胃成功复制了胃癌大鼠模型,并通过转录组学和 16S rRNA 测序揭示了肠道菌群与胃癌相关基因的关系,但尚未通过功能性实验直接验证这些菌群或基因在胃

癌进程中的具体作用机制,在未来的研究中可针对本研究发现的关键差异菌群和差异基因,通过基因敲除或过表达等功能性实验,进一步验证其在胃癌发生和发展的具体作用机制。

参 考 文 献(References)

- [1] GUAN W L, HE Y, XU R H. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives [J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 57.
- [2] GRAD C, GRAD S, FĂRCAȘ R A, et al. Changing trends in the epidemiology of gastric cancer [J]. Med Pharm Rep, 2023, 96(3): 229-234.
- [3] 梁维仁. 胃癌患者胃肠道微生态结构与多样性研究 [D]. 杭州: 浙江大学; 2019.
LIANG W R. Research on composition and diversity of Gastrointestinal microbiota in gastric cancer patients [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2019.
- [4] MENG C, BAI C, BROWN T D, et al. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2018, 16(1): 33-49.
- [5] HUANG S, HE J, CHEN Y, et al. Effect of Huangqin decoction on regulating intestinal flora in colitis mice characterized as inhibition of the NOD2-dependent pathway [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 108-118.
- [6] LIU Y, BABA Y, ISHIMOTO T, et al. Gut microbiome in gastrointestinal cancer: a friend or foe? [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(10): 4101-4117.
- [7] 徐晓凤, 王建江, 叶金松, 等. 高通量测序法检测胃癌患者融合基因 LRP5-LITAF [J]. 临床检验杂志, 2014, 32(11): 828-830.
XU X F, WANG J J, YE J S, et al. Determination of LRP5-LITAF fusion gene in gastric cancer by transcriptome analysis [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2014, 32(11): 828-830.
- [8] LI D, WANG Y, DONG C, et al. CST1 inhibits ferroptosis and promotes gastric cancer metastasis by regulating GPX4 protein stability via OTUB1 [J]. Oncogene, 2023, 42(2): 83-98.
- [9] 纪润壁, 马吉春, 闻向梅, 等. 大鼠胃炎癌转化模型建立与早期诊断方法探索 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 444-447.
JI R B, MA J C, WEN X M, et al. Construction of gastritis transformation into cancer model of rat and preliminary exploration of early diagnosis of gastric cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 444-447.
- [10] LI Y, HU Y, SHI S, et al. Evaluation of antioxidant and immuno-enhancing activities of purslane polysaccharides in gastric cancer rats [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 68: 113-116.
- [11] HIROSE M, FUKUSHIMA S, KURATA Y, et al.

- Modification of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced forestomach and glandular stomach carcinogenesis by phenolic antioxidants in rats [J]. *Cancer Res*, 1988, 48 (18): 5310-5315.
- [12] PAN L J, MA S Y, WEN J, et al. Direct contact moxibustion promotes apoptosis of gastric cancer cells in rats by regulating intestinal flora [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 41(6): 943-952.
- [13] 张永欣, 曾勇, 王婷, 等. MNNG 亚慢性暴露致大鼠胃损伤及炎症反应机制研究 [J]. *毒理学杂志*, 2023, 37 (1): 12-17, 30.
ZHANG Y X, ZENG Y, WANG T, et al. Mechanism of gastric injury and inflammatory response induced by sub-chronic exposure to MNNG in rats [J]. *J Toxicol*, 2023, 37 (1): 12-17, 30.
- [14] 王颖, 矫健鹏, 徐晶钰, 等. 胃癌前病变病证结合动物模型研究进展 [J]. *现代中医药*, 2024, 44(1): 1-4.
WANG Y, JIAO J P, XU J Y, et al. Research progress on animal models combined with disease and syndrome of gastric precancerous lesions [J]. *Mod Chin Med*, 2024, 44 (1): 1-4.
- [15] 曹芝郡, 姜永珊, 李吉彦, 等. 胃癌前病变细胞模型的建立及其在中医药研究中的应用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(7): 1208-1212.
CAO Z J, JIANG Y S, LI J Y, et al. Establishment of cell model for gastric precancerous lesions and its application in traditional Chinese medicine research [J]. *J Basic Chin Med*, 2023, 29(7): 1208-1212.
- [16] SUGIMURA T, FUJIMURA S. Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [J]. *Nature*, 1967, 216 (5118): 943-944.
- [17] LUO Y, LIANG M, YAO W, et al. Functional role of lncRNA LOC101927497 in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced malignantly transformed human gastric epithelial cells [J]. *Life Sci*, 2018, 193: 93-103.
- [18] XU J, SHEN W, PEI B, et al. Xiao Tan He Wei Decoction reverses MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma *in vivo* and *in vitro*; Regulation of apoptosis through NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 95-102.
- [19] 黄桥深, 张永康, 汪水平, 等. 嗜黏蛋白阿克曼氏菌治疗疾病的潜力与作用机制研究进展 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(9): 3360-3373.
HUANG Q S, ZHANG Y K, WANG S P, et al. Potential and mechanism of *Akkermansia muciniphila* in disease treatment [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2023, 63(9): 3360-3373.
- [20] LUO Z W, XIA K, LIU Y W, et al. Extracellular vesicles from *Akkermansia muciniphila* elicit antitumor immunity against prostate cancer via modulation of CD8⁺ T cells and macrophages [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 2949-2963.
- [21] YU C, SU Z, LI Y, et al. Dysbiosis of gut microbiota is associated with gastric carcinogenesis in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110036.
- [22] PARK J Y, SEO H, KANG C S, et al. Dysbiotic change in gastric microbiome and its functional implication in gastric carcinogenesis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 4285.
- [23] 李宗岩, 胡云霏, 赵昌会, 等. 肠道普雷沃菌与人类相关疾病关系研究进展 [J]. *中国微生态学杂志*, 2024, 36 (1): 100-104.
LI Z Y, HU Y F, ZHAO C H, et al. The relationship between intestinal *Prevotella* and human related diseases: research progress [J]. *Chin J Microecol*, 2024, 36 (1): 100-104.
- [24] LARSEN J M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease [J]. *Immunology*, 2017, 151(4): 363-374.
- [25] 王敦方, 朱琳, 冯雪, 等. AOM/DSS 结肠癌模型优化及其肠道菌群变化探究 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32 (2): 151-160.
WANG D F, ZHU L, FENG X, et al. Optimization of the azomethane oxide and dextran sodium sulfate model of colitis-associated colon cancer and changes in the intestinal microbiota [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(2): 151-160.
- [26] 丁洋, 林堃, 王纯, 等. IGHG1 在胃癌中的表达及其临床意义的生物信息学分析 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2023, 44(10): 1214-1219.
DING Y, LIN K, WANG C, et al. Bioinformatics analysis of the expression and clinical significance of IGHG1 in gastric cancer [J]. *Med J Wuhan Univ*, 2023, 44(10): 1214-1219.
- [27] QIAN J, JI F, YE X, et al. IGHG1 promotes motility likely through epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer [J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(2): 282-290.
- [28] JIN Y, QIU L, BAO W, et al. High expression of IGHG1 promotes breast cancer malignant development by activating the AKT pathway [J]. *Cell Cycle*, 2023, 22 (6): 718-731.
- [29] 潘斌. 免疫球蛋白 G 在前列腺癌细胞的表达及 RNA 干扰 IGHG1 基因表达对前列腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [D]. 广州: 南方医科大学; 2012.
PAN B. Expression of IgG in human prostate cancer cell lines and the effect of IGHG1 gene RNAi on prostate cancer cell proliferation and apoptosis [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2012.

[30] LI X, CHEN W, YANG C, et al. IGHG1 upregulation promoted gastric cancer malignancy via AKT/GSK-3 β / β -Catenin pathway [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 397.

[31] PAN T, JIN Z, YU Z, et al. Cathepsin L promotes angiogenesis by regulating the CDP/Cux/VEGF-D pathway in human gastric cancer [J]. Gastric Cancer, 2020, 23(6): 974-987.

[32] ZHANG J, PANG X, LEI L, et al. LncRNA CRART16/miR-122-5p/FOS axis promotes angiogenesis of gastric cancer by upregulating VEGFD expression [J]. Aging, 2022, 14(9): 4137-4157.

[33] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 425.

[34] RANTA-AHO J, OLIVE M, VANDROUX M, et al. Mutation update for the ACTN2 gene [J]. Hum Mutat, 2022, 43(12): 1745-1756.

[35] YOU Y, DU Z, XU G, et al. Identification of exosome-related genes associated with prognosis and immune infiltration features in head-neck squamous cell carcinoma [J]. Biomolecules, 2023, 13(6): 958.

[36] LO L H, LAM C Y, TO J C, et al. Sleeping beauty insertional mutagenesis screen identifies the pro-metastatic roles of CNPY2 and ACTN2 in hepatocellular carcinoma tumor progression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 541: 70-77.

[37] WANG C, XIE B, YIN S, et al. Induction of filopodia formation by α -Actinin-2 via RelA with a feedforward activation loop promoting overt bone marrow metastasis of gastric cancer [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 399.

[38] KIM J W, KWOK S K, CHOE J Y, et al. Recent advances in our understanding of the link between the intestinal microbiota and systemic lupus erythematosus [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4871.

[39] WANG W, FAN Y, WANG X. Lactobacillus: friend or foe for systemic lupus erythematosus? [J]. Front Immunol, 2022, 13: 883747.

[40] 李萍, 唐哲, 徐三鹏, 等. 益髓破血方对脑出血小鼠肠道菌群和 PI3K/Akt 信号通路调节的作用机制研究 [J]. 中医药学报, 2024, 52(6): 24-30.

LI P, TANG Z, XU S P, et al. Mechanism of yisui poxue formula on regulating intestinal microbiota and PI3K/Akt signaling pathway in mice with cerebral hemorrhage [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2024, 52(6): 24-30.

[41] HAN J X, TAO Z H, QIAN Y, et al. ZFP90 drives the initiation of colitis-associated colorectal cancer via a microbiota-dependent strategy [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-20.

[42] MALEKAN M, HAASS N K, ROKNI G R, et al. VEGF/VEGFR axis and its signaling in melanoma: Current knowledge toward therapeutic targeting agents and future perspectives [J]. Life Sci, 2024, 345: 122563.

[收稿日期] 2024-07-17