

天麻总酚抗大鼠脑缺血再灌注损伤的转录组学分析及实验验证

夏霜莉, 王 维, 张冰琳, 廖 陈, 林 青, 代 蓉*

云南中医药大学 药理教研室, 云南 昆明 650500

摘 要: 目的 通过转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)分析天麻总酚(total polyphenols of *Gastrodia elata*, TPGE)抗大鼠脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemic reperfusion injury, CIRI)的转录组学特征,并采用定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)验证其分子作用机制。方法 将动物分为假手术组、模型组及 TPGE 组(262.3 mg/kg),通过线栓法复制大鼠脑中动脉栓塞/再灌注损伤(middle cerebral artery embolization/reperfusion injury, MCAO/R)模型,连续 ig 给药 14 d 后,以神经行为学评分评价 TPGE 对 MCAO/R 大鼠的脑保护作用;采用 RNA-seq 技术对大鼠脑组织进行转录组测序分析,筛选出 TPGE 抗 CIRI 的相关差异基因,对其进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析;通过 qPCR 对筛选出的差异基因进行实验验证。结果 神经行为学评分提示 TPGE 可明显改善 MCAO/R 大鼠的神经功能缺失症状;转录组学数据表明 TPGE 主要作用于 *Itgam*、*Tnfrsf13b*、*Itgb2*、*Cd86*、*Cxcl16*、*Cxcl10*、*Irf7*、*Tlr4*、*Csf2rb*、*Csf3r* 等差异基因,GO 分析主要富集在炎症反应、免疫应答和应激反应等生物学过程,KEGG 分析主要富集在炎症、凋亡、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和 Toll 样受体等信号通路;qPCR 结果表明,与模型组比较,TPGE 组大鼠脑组织中的 *MyD88*、*NF-κB*、*TNF-α*、*MCP-1*、*IL-1β*、*P62*、*LC-3*、*LC3-II*、*Bax* mRNA 表达水平显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 TPGE 具有抗大鼠 CIRI 的作用,转录组学特征提示其抗 CIRI 的关键差异基因主要与抑制炎症、减轻自噬和抗凋亡反应相关,可能通过干预 *MyD88*/*NF-κB*/*TNF-α* 信号通路发挥作用。

关键词: 天麻总酚;脑缺血再灌注损伤;转录组学;RNA-seq;MyD88/*NF-κB*/*TNF-α* 信号通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)05-1402-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.05.021

Analysis on transcriptomic characteristics of total phenols of *Gastrodia elata* in prevention of CIRI based on RNA-seq technology

XIA Shuang-li, WANG Wei, ZHANG Bing-lin, LIAO Chen, LIN Qing, DAI Rong

Department of Pharmacology, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To analyze the transcriptome characteristics of total polyphenols of *Gastrodia elata* (TPGE) against cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) in rats via RNA-Seq high-throughput sequencing. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to verify the molecular mechanism. **Methods** The animals were divided into sham group, model group, and TPGE group (262.3 mg/kg). The model of middle cerebral artery occlusion/reperfusion injury (MCAO/R) in rats was established by thread occlusion. After continuous ig administration for 14 d, the neurobehavioral score, Hematoxylin-Eosin (HE) staining, and Nissl staining were utilized to evaluate the neuroprotective effects of TPGE on CIRI rats. The transcriptome sequencing of the brain tissue of rats in each group was carried out by RNA-Seq technique. The differential expressed genes related to anti-CIRI of TPGE were screened and analyzed by gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). **Results** Neurological Severity Scores (NSS) showed that TPGE can improve the pathological damage of neurons in brain tissue of MCAO/R. The analysis of transcriptome data showed that TPEG mainly effected on *Itgam*, *Tnfrsf13b*, *Itgb2*, *Cd86*, *Cxcl16*, *Cxcl10*, *Irf7*, *Tlr4*, *Csf2rb*, and *Csf3r*. GO analysis was mainly concentrated in inflammatory response, immune response, stress response, and regulation of tumor

收稿日期: 2020-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660677);云南省科技计划中医联合重点项目[2018FF001(-007)];云南省科技计划中医联合重点项目[2017FF117(-004)];云南省科技计划重点项目(2017FA046)

作者简介: 夏霜莉(1996—),女,中药学硕士,研究方向为中药药理与应用研究。Tel: 18288216460 E-mail: 814624720@qq.com

*通信作者: 代 蓉,副教授,硕士生导师,主要研究方向为中药抗脑缺血再灌注损伤研究。Tel: 13629442690 E-mail: 1647029626@qq.com

necrosis factor; KEGG analysis was mainly concentrated in chemokine signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, and TNF signaling pathway. The qPCR results showed that, compared with model group, the mRNA expression level of *MyD88*, *NF- κ B*, *TNF- α* , *MCP-1*, *IL-1 β* , *P62*, *LC-3*, *LC3-II*, and *Bax* in brain tissue of rats in TPGE group significantly reduced. The difference was statistically significant ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). **Conclusion** TPGE has anti-CIRI effect in rats, its mechanism may be related to the regulation of chemokine, Toll-like receptors, NOD-like receptors, and TNF signaling pathways.

Key words: total phenols of *Gastrodia elata*; cerebral ischemia-reperfusion injury; transcriptomic; RNA-seq; MyD88/NF- κ B/TNF- α signaling pathway

缺血性脑卒中 (ischemic stroke) 的发病率占有脑血管疾病的 60%~80%, 具有较高的致残率和致死率, 严重危害了人类的健康^[1-2]。脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemic reperfusion injury, CIRI) 是 IS 后重要的病理损伤之一, 涉及氧化应激损伤、血脑屏障破坏、能量代谢异常和离子代谢紊乱等一系列复杂的病理过程^[3-4]。课题组前期研究表明, 天麻总酚 (total polyphenols of *Gastrodia elata*, TPGE) 中的多个酚性成分存在协同增效的作用, 可通过干预 CIRI 病理过程中的炎症反应、神经细胞凋亡、神经修复、血管新生等环节改善脑微环境^[5-9]。由此可见, 从单一角度去研究 TPGE 抗 CIRI 的作用难以完整地阐释其作用机制。随着近年来基因组学、转录组学、蛋白组学等组学技术的迅速发展, 研究更注重生物系统的整体性, 以反映机体在病理状态以及药物干预之后整体状态的变化。基于中药多成分、多靶点的特点, 本研究借助转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 技术从基因水平进行研究, 探寻正常、病变以及药物干预后组织中的差异表达基因, 并对测序结果进行生物信息学分析及验证, 以期阐明 TPGE 改善 CIRI 预后的可能靶基因及相关通路, 进而阐明 TPGE 治疗 CIRI 的分子作用机制。

1 材料

1.1 动物

成年 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 250~300 g, 8~10 周龄, 共 30 只, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 许可证号 SCXK (川) 2015-030。适应性喂养 1 周, 自由进食进水, 室温 22~26 °C, 湿度 55%, 定时通风换气, 模拟标准昼夜系统即 12 h 光照/12 h 黑夜。实验中所有操作均获得云南中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (批准号 R-06202003)。

1.2 药品、试剂

天麻购自云南省昭通市彝良县原生态天麻种植专业合作社, 经云南中医药大学中药鉴定教研室张洁副教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata*

Blume 的干燥块茎; 脑中动脉栓塞/再灌注损伤 (middle cerebral artery embolization/reperfusion injury, MCAO/R) 线栓 (批号 2838-50/A4, 北京西浓科技有限公司); 异氟烷 (批号 2017180101, 瑞沃德生命科技有限公司); TRIzol (批号 T101100, 上海美吉生物医药科技有限公司); 三氯甲烷 (批号 0706106, 上海申博化工); 异丙醇 (批号 20170901, 天津市风船化学试剂科技有限公司); RNA 逆转录试剂盒 (批号 R123-01, 赛默飞世尔科技公司); 定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测试剂盒 (批号 31598800, Roche 公司)。

1.3 仪器

Illumina HiSeq 6000 型测序仪 (美国 Illumina 公司); Centrifuge 5424 R 型低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); Agilent Technologies 型生物分析仪 2100 系统 (美国 CA 公司); V1824301 型小动物麻醉机 (美国 Matrx 公司); Microm HM 型石蜡切片机 (日本 Thermo 公司); Ti-S 倒置显微镜 (日本尼康公司); XS125A 型赛多利斯分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

2 方法

2.1 TPGE 的制备及剂量设置

取干燥天麻 500 g 粉碎, 置于回流冷凝装置中, 用 3 倍生药量 95%乙醇溶液浸取 3 次, 浸取时间为 2、1、0.5 h, 合并 3 次滤液, 回收乙醇, 得总浸膏即为 TPGE (经 HPLC 测得天麻素质量分数为 0.35%, 对羟基苯甲醇质量分数为 0.46%)。前期药效学实验分为 TPGE 高 (7.29 g/kg)、低 (1.74 g/kg) 2 个剂量组, 连续 ig 给予 TPGE 14 d 后, 结果显示高剂量组具有显著抗 CIRI 的作用。故本实验选择 7.29 g/kg 剂量, 按提取率 3.6%折算得本实验 TPGE 的剂量为 262.3 mg/kg。

2.2 模型的制备^[10-11]

大鼠 ip 10%水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉, 翻正

反射消失后仰卧固定于手术台,手术过程中用智能恒温控制仪维持大鼠肛温 37℃,颈部剃毛并进行常规消毒,在颈正中偏左 0.5 cm 处纵切口长约 1.5 cm,分离右侧颈总动脉,栓线经颈总动脉、颈内动脉插入大脑中动脉,微遇阻力时停止,栓线插入深度为 18~20 mm,记录大鼠脑缺血开始时间,缺血 2 h 后,将栓线缓慢拔出以恢复缺血区供血造成再灌注,涂抹青霉素后缝合伤口。假手术组不插入栓线,其余手术操作相同。在缺血及再灌注期间保持室温在 25~30℃。

2.3 分组与给药

将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、TPGE 组 (262.3 mg/kg),每组 10 只,于再灌注后 6 h 首次 ig 给予 TPGE,给药体积均为 1 mL/100 g 体重,1 次/d,连续 14 d,假手术组与模型组 ig 给予同体积溶媒。30 只动物均进行神经行为学评分,其中每组随机选择 3 只大鼠进行转录组测序分析,每组随机选择 4 只大鼠进行 qPCR 实验验证。

2.4 神经行为学评分

依据 Longa 5 分法^[11]、改良神经功能 (neurological severity scores, NSS) 评分法^[12]、平衡木行走实验、攀绳实验和步态分析^[13-16],对大鼠神经功能及神经损害程度进行评分。

2.5 RNA-seq 转录组测序分析

麻醉后颈椎脱臼处死大鼠,手术获取各组大鼠缺血半球脑组织 (含大鼠海马、纹状体、皮层区域),采用 TRIzol 裂解液提取总 RNA,利用 RNA 6000 Nano kit 检测试剂盒对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测, RNA 浓度和纯度质检合格后,通过 Oligo 磁珠富集带有 poly A 尾的 mRNA,以片段化的 mRNA 为模板,合成双链 cDNA,对 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,进行片段大小选择,通过 PCR 实验富集得到最终的 cDNA 文库。最后在流动槽的各通道中加入 cDNA 文库,使用 Illumina HiSeq 6000 测序仪进行测序分析,计算质量分值。

2.6 基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析

对转录组测序的原始数据 (raw data) 进行过滤,筛选得到高质量数据信息,设定阈值为显著性水平 $P < 0.05$ 和差异倍数 $|\log_2 \text{Fold change}| \geq 2$,对 9 个样品中的 mRNA 进行差异基因的筛选。以大鼠全基因组为背景和参照,以 $P < 0.05$ 为标准,对差异

基因进行 GO 富集分析和 KEGG 代谢通路富集分析,从而获取关键通路信息,并通过 R 语言将相关信息进行可视化。

2.7 qPCR 验证检测

取各组大鼠缺血半球脑组织标本,液氮速冻, -80℃ 保存至使用。用 qPCR 验证预测的关键差异基因: Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, *TLR9*), 髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, *MyD88*), 核转录因子- κ B (nuclear factor kappa B, *NF- κ B*), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, *TNF- α*), 单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, *MCP-1*), 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*), 白细胞介素-6 (interleukin-6, *IL-6*), 自噬相关基因 *Becn-1*、*P62*, 凋亡调节因子 *LC-3*、*LC3 I/II*, 半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase 3, *Caspase-3*) 和 Bcl 2 相关 X 凋亡调节因子 (Bcl 2 associated X apoptosis regulator, *Bax*)。根据试剂盒说明书操作,使用 TRIzol 提取脑组织中的总 RNA,随后进行逆转录合成 cDNA。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 为内源性参照基因,定量检测目的基因的表达水平。各引物序列见表 1。反应条件为 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 1 min, 反应完毕,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对表达量。

3 结果

3.1 TPGE 对 MCAO/R 模型大鼠行为学的影响

实验结果表明,与假手术组比较,模型组大鼠再灌注 14 d Longa 5 分法、NSS 评分、平衡木行走实验、攀绳实验、步态分析实验评分均升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$ 、 0.001);与模型组比较,TPGE 组再灌注 14 d Longa 5 分法、NSS 评分、平衡木行走实验、攀绳实验、步态分析实验评分均降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01),提示 TPGE 可改善 CIRI 引起的神经功能损伤,恢复大鼠平衡能力,减轻恢复早期对称自体感觉缺失情况,提高大鼠恢复期前肢的运动协调能力 (表 2)。

3.2 RNA-seq 转录组测序分析

3.2.1 测序数据质量评估 本实验所建立的测序文库中,9 个样品的原始数据在 $4.5 \times 10^7 \sim 6.1 \times 10^7$,总计 5.01×10^8 。每个 cDNA 文库平均获得 5.5×10^7 个原始数据,对应于 73.99 Gb 的原始数据。经过原始数据过滤后,约有 4.95×10^8 (98.9%) 的原始数据作为高质

量的读段 (clean reads) 被保留下来。9 个样品的 reads 97.43%, 质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比 (Q_{30}) $\geq$ 差异较小, 质量值 ≥ 20 的碱基所占百分比 (Q_{20}) $\geq$ 92.82%, 表明测序结果较好, 可用于后续的分析 (表 3)。

表 1 待测靶基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes to be measured

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp	基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
<i>GAPDH</i>	正向: GCCCACTAAAGGGCATCCTG 反向: CATTGAGAGCAATGCCAGCC	111	<i>IL-6</i>	正向: AGCGATGATGCACTGTCAGA 反向: GGAAGTCCAGAAGACCAGAGC	127
<i>TLR9</i>	正向: TGTGTCTGGAGGACCGAGAT 反向: GCACAAACAGAGATCTTGCGG	93	<i>Becn-1</i>	正向: GAATGGAGGGGTCTAAGGCG 反向: CTCCTCCTGGCTCTCTCCT	180
<i>MyD88</i>	正向: CGGAGGAGATGGGTTTCGAG 反向: CCAGGCATCCAACAACTGC	83	<i>P62</i>	正向: GCACTGTTGCCCGGTAGTTA 反向: GGGAGGACGGTACAAATCCA	132
<i>NF-κB</i>	正向: CATACTGCTGACCTAGCCTG 反向: TTTCTTCAATCCGGTGGCGA	135	<i>LC3</i>	正向: GGCACAGATGAAGACACCC 反向: TTCCACCATCTGCCAAAGTCA	172
<i>TNF-α</i>	正向: ATGGGCTCCCTCTCATCAGT 反向: GCTTGGTGGTTTGTCTACGAC	106	<i>LC3-I/II</i>	正向: TTGGTCAAGATCATCCGGCG 反向: CGAAGGTTTCTTGGGAGGCA	172
<i>MCP-1</i>	正向: TGATCCCAATGAGTCGGCTG 反向: TGGACCCATTCCTTATTGGGG	127	<i>Caspase-3</i>	正向: CTGGAATGTCAGCTCGCAATG 反向: AACTGCTCCTTTTGTGTGA	165
<i>IL-1β</i>	正向: GCACAGTTCCCCAACTGGTA 反向: TGTCCCGACCATGTCTGTTT	82	<i>Bax</i>	正向: CAGGATCGAGCAGAGAGGATG 反向: CAATTCGCCTGAGACACTCG	106

表 2 TPGE 对 MCAO/R 模型大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effects of TPGE on behavioral change in MCAO/R model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Longa 5 分法	改良神经功能评分	平衡木行走实验	攀绳实验	步态分析实验
假手术	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型	1.60 $\pm$ 0.70 ^{AAA}	8.60 $\pm$ 1.35 ^{AAA}	4.70 $\pm$ 0.95 ^{AAA}	1.30 $\pm$ 1.06 ^{AA}	1.60 $\pm$ 0.84 ^{AAA}
TPGE	0.40 $\pm$ 0.52 ^{**}	6.00 $\pm$ 0.67 ^{**}	1.80 $\pm$ 1.03 ^{**}	0.00 $\pm$ 0.00 [*]	0.10 $\pm$ 0.32 ^{**}

与假手术组比较: ^{AA} $P < 0.01$ ^{AAA} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{AA} $P < 0.01$ ^{AAA} $P < 0.001$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 3 各样本 cDNA 文库测序数据

Table 3 Sequencing data of each sample cDNA library

样品	原始数据	原始条目	读段	过滤条目	测序错误率/%	Q_{20} /%	Q_{30} /%	GC 碱基占比/%
Z1	54 295 396	8 198 604 796	53 480 418	8.003 488 714	0.023 4	98.67	95.81	51.40
Z2	60 339 380	9 111 246 380	59 619 880	8.908 356 397	0.023 3	98.7	95.85	50.83
Z3	57 947 884	8 750 130 484	57 118 792	8.541 834 210	0.023 6	98.59	95.57	51.04
M1	54 591 606	8 243 332 506	54 120 420	8.074 364 143	0.025 5	97.81	93.72	49.94
M2	60 156 560	9 083 640 560	59 435 438	8.892 879 148	0.023 4	98.68	95.79	51.01
M3	45 090 236	6 808 625 636	44 588 552	6.660 477 506	0.026 4	97.43	92.82	49.73
F1	53 610 510	8 095 187 010	53 088 642	7.925 402 462	0.025 7	97.70	93.46	49.19
F2	60 135 214	9 080 417 314	59 391 268	8.886 542 608	0.023 3	98.69	95.84	50.59
F3	54 846 506	8 281 822 406	54 292 386	8.100 720 101	0.026 0	97.62	93.26	49.75

Z1~Z3-假手术组 M1~M3-模型组 F1~F3-TPGE 组

Z1—Z3-sham group M1—M3-model group F1—F3-TPGE group

3.2.2 差异基因分析 采用 DEseq 软件, 筛选出具有统计学意义的差异表达基因 ($|\log_2\text{Fold change}| \geq 2, P < 0.05$)。数据分析结果表明 (表 4、5 和图 1), 与假手术组比较, 模型组显著上调的差异基因为 561 个, 显著下调的差异基因为 120 个;

表 4 基因表达整体水平变化

Table 4 Changes in overall level of gene expression

组别	差异表达基因数	上调基因数	下调基因数
模型组 vs 假手术组	681	561	120
TPGE 组 vs 模型组	136	10	126

表 5 TPGE 治疗 CIRI 大鼠部分显著表达的差异基因

Table 5 Some different significantly expressed genes in CIRI rats treated with TPGE

表达趋势	基因	倍数 (vs 模型组)	表达趋势	基因	倍数 (vs 模型组)
显著上调	<i>Dbh</i>	3.1	显著下调	<i>Clec7a</i>	5.04
	<i>Ghdc</i>	1.65		<i>Zbp1</i>	4.42
	<i>Alkbh6</i>	1.39		<i>Tnfrsf13c</i>	4.37
	<i>Pomp</i>	1.24		<i>Slfn4</i>	4.12
	<i>Gfral</i>	1.22		<i>C3</i>	3.87
显著下调	<i>Itiprip</i>	7.77		<i>Cd68</i>	3.64
	<i>Myh9</i>	6.03		<i>Ciita</i>	3.47
	<i>Robo4</i>	5.87			

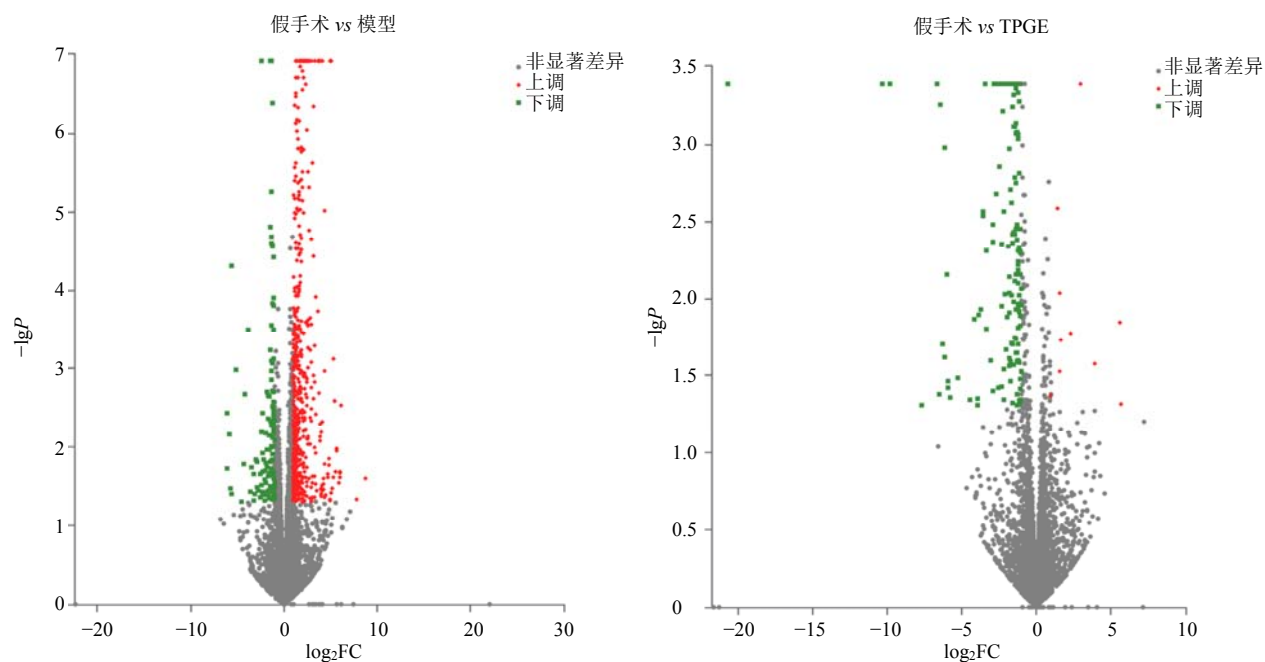


图 1 差异表达的 mRNA 火山图

Fig. 1 mRNA volcanogram of differential expression

与模型组比较, TPGE 组显著上调的差异基因为 10 个, 显著下调的差异基因为 126 个。

3.3 GO 和 KEGG 富集分析

对筛选出的 136 个差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并设置 $P < 0.05$ 为筛选标准。GO 富集分析主要包括生物过程、细胞组分和分子功能, 结果显示主要富集在免疫系统过程 (immune system

process)、炎症反应 (inflammatory response)、调节刺激反应 (regulation of response to stimulus)、调控肿瘤坏死因子的产生 (regulation of tumor necrosis factor production) 和调控 Toll 样受体信号通路 (regulation of Toll-like receptor signaling pathway) (图 2)。KEGG 主要富集在 NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway)、

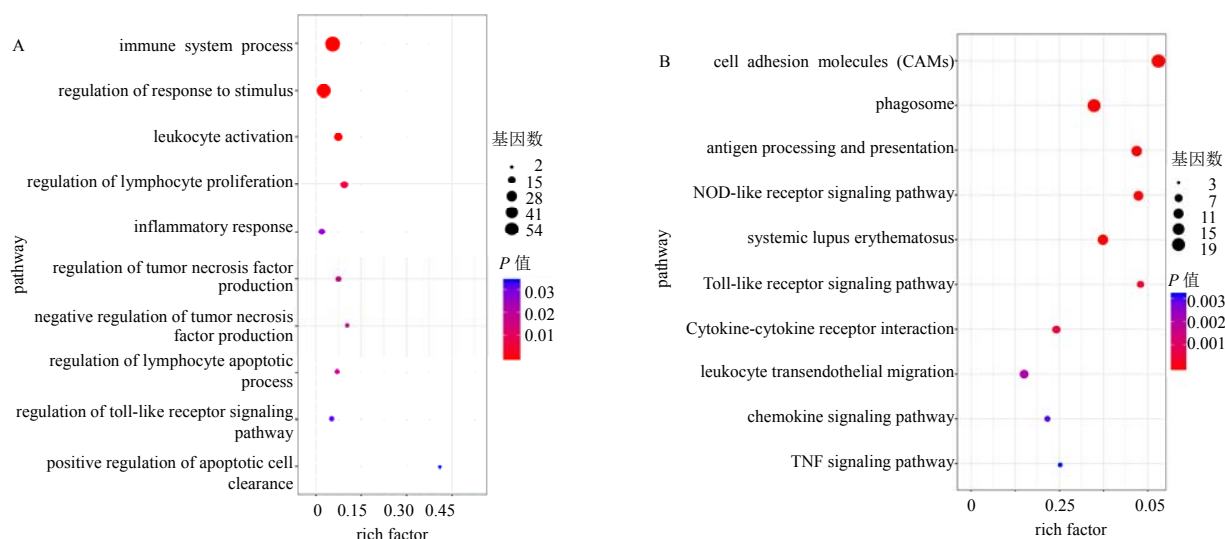


图 2 TPGE 干预后差异基因的 GO (A) 和 KEGG (B) 富集分析

Fig. 2 Enrichment analysis of GO (A) and KEGG (B) of differential genes after TPGE intervention

Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)、趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway) 和肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway), 见图 2。

3.4 TPGE 对 MCAO/R 模型大鼠关键基因 mRNA 表达的影响

给予 TPGE 14 d 后, 以 *GAPDH* 为内参, 采用 qPCR 法对转录组测序分析结果的 TLR-MyD88/NF- κ B/TNF- α 通路中 7 个炎症关键基因 *TLR9*、*MyD88*、*NF- κ B*、*TNF- α* 、*MCP-1*、*IL-1 β* 、*IL-6* 及与自噬相关的 *Becn-1*、*P62*、*LC-3*、*LC3-I/II* 及凋亡

相关的 *Caspase-3*、*Bax* 关键基因进行 mRNA 表达水平的验证。结果表明, 与假手术组比较, 模型组 *TLR9*、*MyD88*、*NF- κ B*、*TNF- α* 、*MCP-1*、*IL-1 β* 、*IL-6*、*Becn-1*、*P62*、*LC-3*、*LC3-I/II*、*Caspase-3*、*Bax* mRNA 的表达上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001 、 0.0001); 与模型组比较, TPGE 可降低 *MyD88*、*NF- κ B*、*TNF- α* 、*MCP-1*、*IL-1 β* 、*P62*、*LC-3*、*LC3-I/II*、*Bax* mRNA 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001 、 0.0001), *TLR9*、*IL-6*、*Becn-1*、*Caspase-3* mRNA 的表达有下降趋势, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 6。

表 6 TPGE 对 MCAO/R 模型大鼠关键基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 6 Effects of TPGE on mRNA expression of key genes in MCAO/R model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

基因	假手术	模型	TPGE
<i>TLR9</i>	1.00 $\pm$ 0.00	3.28 $\pm$ 3.23 ^Δ	2.13 $\pm$ 1.02
<i>MyD88</i>	1.00 $\pm$ 0.00	1.40 $\pm$ 0.42 ^Δ	0.94 $\pm$ 0.35 [*]
<i>NF-κB</i>	1.00 $\pm$ 0.00	2.25 $\pm$ 0.87 ^{ΔΔΔ}	1.35 $\pm$ 0.82 ^{**}
<i>TNF-α</i>	1.00 $\pm$ 0.00	1.66 $\pm$ 0.70 ^Δ	0.72 $\pm$ 0.10 ^{**}
<i>MCP-1</i>	1.00 $\pm$ 0.00	3.01 $\pm$ 1.80 ^{ΔΔ}	1.43 $\pm$ 0.93 ^{**}
<i>IL-1β</i>	1.00 $\pm$ 0.00	39.8 $\pm$ 2.71 ^{ΔΔΔΔ}	1.32 $\pm$ 0.30 ^{****}
<i>IL-6</i>	1.00 $\pm$ 0.00	2.48 $\pm$ 1.11 ^{ΔΔ}	2.29 $\pm$ 0.84
<i>Becn-1</i>	1.00 $\pm$ 0.00	2.07 $\pm$ 0.98 ^{ΔΔ}	1.56 $\pm$ 0.33
<i>P62</i>	1.00 $\pm$ 0.00	1.54 $\pm$ 0.54 ^{ΔΔ}	1.10 $\pm$ 0.20 ^{**}
<i>LC-3</i>	1.00 $\pm$ 0.00	2.95 $\pm$ 0.26 ^{ΔΔΔΔ}	1.88 $\pm$ 0.53 ^{****}
<i>LC3-I/II</i>	1.00 $\pm$ 0.00	1.39 $\pm$ 0.40 ^{ΔΔ}	0.96 $\pm$ 0.15 ^{***}
<i>Caspase-3</i>	1.00 $\pm$ 0.00	2.92 $\pm$ 1.50 ^{ΔΔΔ}	2.38 $\pm$ 0.64
<i>Bax</i>	1.00 $\pm$ 0.00	2.45 $\pm$ 1.06 ^{ΔΔΔΔ}	1.49 $\pm$ 0.22 ^{**}

与假手术组比较: ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$ ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$ ^{ΔΔΔΔ} $P < 0.0001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ ^{****} $P < 0.0001$
^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$ ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$ ^{ΔΔΔΔ} $P < 0.0001$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ ^{****} $P < 0.0001$ vs model group

4 讨论

MCAO/R 模型可引起大鼠海马、纹状体、皮层等区域的神经元损伤,导致感觉运动功能障碍,可模拟人 CIRI 时感觉运动能力损伤,通过行为学评价可评估大鼠的感觉运动功能,预测脑损伤程度并进行药效评价^[17]。Longa 5 分法可从整体上反映动物神经损伤程度,进行定性和半定量的评价,结合平衡木行走实验、攀绳实验、步态分析实验行为学评分可判断运动功能的整合性、协调性,综合评价感觉运动能力。本实验观察 TPGE 对 MCAO/R 模型大鼠干预 14 d 的作用,与模型组比较,TPGE 组 Longa 5 分法、NSS 评分法、平衡木行走实验、攀绳实验、步态分析实验行为学评分显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),表明 TPGE 可减轻 MCAO/R 模型大鼠的神经元损伤,促进运动功能恢复。

转录组学能从整体水平上探索细胞中所有基因转录及转录调控规律,通过基因表达比较正常、病变以及药物干预后的组织中大量相关基因的差异表达,以明确药物的主要作用靶点。本实验采用 RNA-seq 高通量测序技术对假手术组、模型组、TPGE 干预 14 d 组大鼠脑组织进行转录组测序,确定了在 TPGE 作用下 CIRI 大鼠缺血侧脑组织较为全面、动态的基因含量变化过程。通过对模型组与假手术组及 TPGE 组与模型组数据进行深度挖掘分析,在 2 个组合的差异表达基因中,找到了 136 个重叠基因,对这些差异基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,结果表明,模型组与假手术组比较,转录组数据分析共筛选出 681 个差异表达基因,其中显著上调的差异基因为 561 个,显著下调的差异基因为 120 个;TPGE 干预后,可回调 136 个差异基因,其中,显著下调的差异基因为 126 个,显著上调的差异基因为 10 个,分析得到 *Itgam*、*Tnfrsf13b*、*Itgb2*、*Cd86*、*Cxcl16*、*Cxcl10*、*Irf7*、*Tlr4*、*Csf2rb*、*Csf3r*、*TLR9* 等核心差异基因;差异基因显著富集于炎症反应、凋亡反应,趋化因子、肿瘤坏死因子、Toll 样受体等信号通路,提示 TPGE 可能通过调控 *TLR9*、*MyD88*、*NF- κ B* 等多个基因参与 CIRI 后炎症、凋亡、自噬等修复过程。

已有的大量研究表明炎症损伤在 CIRI 的发生和发展中起关键作用^[18-19]。过度炎症反应是缺血后脑损伤重要的病理生理机制,脑缺血后小胶质细胞被激活,局部趋化因子、黏附分子及炎症因子表达上调促进了缺血性损伤向炎症性损伤转化^[20]。近年

研究发现,先天免疫系统的重要组成部分 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 通过参与炎症反应介导了缺血性损伤,TLR9 是 Toll 样受体家族的重要成员,定位在细胞内的内涵体膜上,在中枢神经系统中 TLR9 主要表达于小胶质细胞,TLR9 可通过 Toll/IL-1 受体结构域结合 MyD88 衔接子样接头蛋白 MAL (也称为 TI-RAP),从而识别和募集 MyD88,使 IL-1 受体相关激酶 (IL-1 receptor-associated kinases, IRAKs) 磷酸化,然后与下游的肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6) 相互识别作用,从而激活 NF- κ B 信号通路,促进 NF- κ B 进入细胞核,增加促炎基因的转录与表达,促进炎症因子如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的释放,启动并放大炎症反应^[20-23]。上调的炎症因子反过来可刺激 NF- κ B 的再次活化,引起炎症性损伤,导致细胞凋亡,从而进一步加重脑损伤,因此应用药物抑制由于脑梗死导致的 NF- κ B 相关信号通路的激活,可减轻过度炎症反应所引起的神经元损伤^[21-23]。本研究选取 TLR-MyD88/NF- κ B/TNF- α 通路中 7 个关键基因 *TLR9*、*MyD88*、*NF- κ B*、*TNF- α* 、*MCP-1*、*IL-1 β* 、*IL-6* 及与自噬相关的 *Becn-1*、*P62*、*LC-3*、*LC3-I/II* 及凋亡相关的 *Caspase-3*、*Bax* 关键基因进行 qPCR 验证。结果表明,模型组与假手术组相比 *TLR9*、*MyD88*、*NF- κ B*、*TNF- α* 、*MCP-1*、*IL-1 β* 、*IL-6* mRNA 表达升高,提示 MCAO/R 模型大鼠 TLRs/NF- κ B 信号通路被激活,引起了过度炎症反应,导致脑缺血损伤;TPGE 干预后 *MyD88*、*NF- κ B*、*TNF- α* 、*MCP-1*、*IL-1 β* mRNA 的表达显著减少,*TLR9*、*IL-6* mRNA 的表达有下降的趋势,提示 TPGE 可通过抑制 MyD88/NF- κ B/TNF- α 信号通路减少相关炎症因子在缺血脑组织中的表达,发挥脑保护作用。*MyD88* 上游的 *TLR9* 水平只有下降的趋势,因 *TLR2*、3、4、7、9 都可通过 MyD88 依赖性和非依赖性信号传导途径激活脑缺血后的炎症通路,验证与分析的差异表明存在作用于其他 TLRs 的可能性,后续将继续进行研究。

脑缺血后炎症反应与细胞自噬和凋亡之间存在密切联系,多种 TLR 通过连接蛋白 MyD88 的配体在诱发炎症反应的同时,能够诱导细胞自噬,自噬激活对 CIRI 的作用是双向的,在脑缺血的最初阶段,自噬作为一种修复机制,被激活以后可以消除在神经元细胞内积累的受损蛋白。然而,自噬被过度激活后,可促进细胞凋亡^[22-23]。损伤变性、坏

死或者凋亡的细胞这些危险信号刺激 NF- κ B 的再次活化, 形成恶性循环^[24-25]。Becn-1、P62、LC3 是参与自噬的关键蛋白, 调节自噬小体的形成和发展, 是自噬检测的重要指标。LC3 包括 LC3-I 和 LC3-II 两种存在形式, LC3-I 与 LC3-II 的比值改变可间接判断自噬是否发生, 其比值下降提示自噬活性减弱; 反之则说明自噬活性增强^[26]。Bax 是促凋亡蛋白, 可使线粒体的通透性增加, 进而释放细胞色素 C 进入细胞质, 最终激活 Caspase-3 后造成细胞凋亡。Caspase 家族是凋亡过程中最重要的蛋白酶, 凋亡的最后实施是通过 Caspase 的激活引发的“瀑布式”的级联反应而实现的, 而 Caspase-3 是 Caspase 级联反应中下行的最重要的凋亡执行蛋白酶, 在不同程序启动的细胞凋亡过程中起最后的“触发点”作用^[27]。激活的 Caspase-3 可以通过裂解 DNA 依赖的蛋白激酶、细胞骨架蛋白及其他 Caspase 相关底物蛋白等机制, 改变细胞结构, 最终导致细胞凋亡的发生, 加重了 CIRI 的病理过程^[28]。本研究结果表明, 与假手术组比较, 模型组 *Becn-1*、*P62*、*LC-3*、*LC3-I/II*、*Caspase-3*、*Bax* mRNA 的表达上调; 与模型组相比较, TPGE 可显著降低 *P62*、*LC-3*、*LC3-I/II*、*Bax* mRNA 的表达, *Becn-1*、*Caspase-3* 的表达有下降的趋势, 提示 TPGE 能够减轻由 CIRI 激活的自噬效应, 抑制神经细胞凋亡, 结合 TPGE 可抑制 MyD88/NF- κ B/TNF- α 信号通路的作用机制, 提示其作用可能与抑制该信号通路相关。

综上所述, 研究表明 TPGE 具有抗大鼠 CIRI 的作用, 转录组学特征提示其抗 CIRI 的关键差异基因及信号通路主要集中在炎症反应、自噬与凋亡、免疫应答过程, 通过干预 MyD88/NF- κ B/TNF- α 信号通路介导发挥作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gu J S, Shi Y, Chen N, *et al.* Ambient fine particulate matter and hospital admissions for ischemic and hemorrhagic strokes and transient ischemic attack in 248 Chinese cities [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 715: 136896.
- [2] 王陇德, 刘建民, 杨弋, 等. 我国脑卒中防治仍面临巨大挑战: 《中国脑卒中防治报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(2): 105-119.
- [3] Wang W Z, Jiang B, Sun H X, *et al.* Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: Results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults [J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.
- [4] Yamashita T, Kamiya T, Deguchi K, *et al.* Dissociation and protection of the neurovascular unit after thrombolysis and reperfusion in ischemic rat brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(4): 715-725.
- [5] 向彬, 肖纯, 申婷, 等. 对羟基苯甲醛可预防大鼠急性脑缺血后神经炎症 [J]. 中成药, 2017, 39(8): 1572-1576.
- [6] 李艳, 蒋石, 郭营营, 等. 天麻成分对羟基苯甲醇抗实验性脑血栓形成及抗炎作用研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(1): 28-31.
- [7] 李秀芳, 孙衍鲲, 张维明, 等. 天麻脂溶性酚性成分对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(5): 842-845.
- [8] 段小花, 李秀芳, 周宁娜, 等. 天麻提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马氧化损伤的作用 [J]. 中成药, 2011, 33(7): 1138-1141.
- [9] He F Y, Duan X H, Dai R, *et al.* Protective effect of 4-methoxy benzyl alcohol on the blood-brain barrier after cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26(6): 1258-1265.
- [10] 何芳雁, 韩春妮, 李艳, 等. 制作线栓法大鼠脑缺血再灌注模型的要点及体会 [J]. 实验动物科学, 2013, 30(4): 46-48.
- [11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [12] Chen J, Li Y, Wang L, *et al.* Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [13] 顾国军, 黄振兴, 陶凯忠, 等. HBO 对内皮素-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血模型的疗效观察 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(10): 1134-1137.
- [14] Ohlsson A L, Johansson B B. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 644-649.
- [15] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, *et al.* Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634.
- [16] van der Borght K, Kóbor-Nyakas D E, Klauke K, *et al.* Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: Temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis [J]. *Hippocampus*, 2009, 19(10): 928-936.
- [17] Ma X J, Wang L, Yin X J, *et al.* Protective effect and mechanism of scutellarin ethyl ester on focal cerebral ischemia induced by ligation of middle cerebral artery in

- rats [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(7): 1350-1357.
- [18] Amantea D, Micieli G, Tassorelli C, *et al.* Rational modulation of the innate immune system for neuroprotection in ischemic stroke [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 147.
- [19] Suzuki N, Suzuki S, Duncan G S, *et al.* Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4 [J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 750-756.
- [20] Hoogerwerf J J, van der Windt G J, Blok D C, *et al.* Interleukin-1 receptor-associated kinase M-deficient mice demonstrate an improved host defense during Gram-negative pneumonia [J]. *Mol Med*, 2012, 18: 1067-1075.
- [21] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-384.
- [22] Jones S A, Mills K H, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases [J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(3): 250-258.
- [23] 何贤辉, 何健, 欧阳东云. 细胞自噬与炎症反应相互作用的研究进展 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2013, 34(2): 125-128.
- [24] Imagawa K, de Andrés M C, Hashimoto K, *et al.* The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inhibitor on primary human chondrocytes: Implications for osteoarthritis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(3): 362-367.
- [25] Zhang J, Fu B S, Zhang X J, *et al.* Neuroprotective effect of bicyclol in rat ischemic stroke: Down-regulates TLR4, TLR9, TRAF6, NF- κ B, MMP-9 and up-regulates claudin-5 expression [J]. *Brain Res*, 2013, 1528: 80-88.
- [26] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [27] Porter A G, Jänicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(2): 99-104.
- [28] Varghese J, Chattopadhyaya S, Sarin A. Inhibition of p38 kinase reveals a TNF- α -mediated, caspase-dependent, apoptotic death pathway in a human myelomonocyte cell line [J]. *J Immunol*, 2001, 166(11): 6570-6577.

[责任编辑 潘明佳]