

# 银杏二萜内酯葡胺注射液及其银杏二萜内酯成分抗人脐静脉内皮细胞氧糖剥夺损伤的转录组学研究

徐小波<sup>1</sup>, 武子寅<sup>2,3\*</sup>, 张新庄<sup>2,3</sup>, 曹亮<sup>2,3</sup>, 王振中<sup>2,3</sup>, 肖伟<sup>1,2,3\*</sup>

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

**摘要:** 目的 研究银杏二萜内酯葡胺注射液 (Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection, DGMI) 及其银杏二萜内酯成分抗人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells-T1, HUVEC-T1) 氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 损伤的潜在作用通路。方法 采用 CCK-8 法分别测定不同浓度银杏内酯 A (ginkgolide A, GA)、银杏内酯 B (ginkgolide B, GB)、银杏内酯 K (ginkgolide K, GK) 和 DGMI 对 HUVEC-T1 细胞的毒性, 明确药物处理细胞浓度; 采用转录组测序技术对溶剂对照组 (二甲基亚砜)、模型组 (OGD/R 4 h/24 h) 及给药组 (造模+不同剂量 DGMI、GA、GB、GK 处理) 的细胞样本分别进行转录组测序; 通过生物信息学分析方法, 以 GEO 数据库中缺血性脑卒中患者转录组数据为参考, 采用基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)、差异基因富集等分析方法完成对 HUVEC-T1 OGD 模型及不同浓度药物抗 OGD 损伤能力的评价, 阐明 DGMI 及其功效成分的潜在作用机制。结果 GSEA 分析显示, 临床缺血性脑卒中患者血液转录组数据分析获得的疾病富集通路与本实验细胞模型测序结果获得的富集通路相似度为 55.6%; DGMI、GA、GB、GK 处理组与模型组相比, 显著富集的主要信号通路包括 FcεRI、NOD 样受体、有丝分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等。差异基因分析显示, 与对照组相比, 模型组共筛选出 439 个差异基因, 差异基因的基因本体 (gene ontology, GO) 分析主要富集在应激反应过程, 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析主要富集在磷脂酶 D、FcεRI、NOD 样受体和血小板活化等信号通路; 与模型组相比, 给药组差异基因的 GO 分析主要富集在造血和代谢过程, KEGG 分析主要富集在血小板活化、磷脂酶 D 等信号通路。结论 HUVEC-T1 OGD 模型模拟了部分缺血性脑卒中的病理特征; DGMI、GA、GB、GK 均具有抗 OGD 损伤作用, 发挥抗 OGD 损伤作用的关键基因及信号通路主要集中在抗炎、抗凋亡、调控血小板活化等生物学过程, 可能通过下调 FcεRI、NOD 样受体、MAPK 和 VEGF 信号通路, 干预血小板活化、磷脂酶 D 等信号通路发挥作用。

**关键词:** 银杏二萜内酯葡胺注射液; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 银杏内酯 K; 人脐静脉内皮细胞; 氧糖剥夺模型; 转录组测序  
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4233-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.016

## Transcriptome study of Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection and its components against oxygen-glucose deprivation damage in HUVEC-T1 cells

XU Xiao-bo<sup>1</sup>, WU Zi-yin<sup>2,3</sup>, ZHANG Xin-zhuang<sup>2,3</sup>, CAO Liang<sup>2,3</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>2,3</sup>, XIAO Wei<sup>1,2,3</sup>

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of New Technology for Pharmaceutical Process of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China

**Abstract: Objective** To study the potential pathway of Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection (银杏二萜内酯葡胺注射液, DGMI) and its ginkgo diterpene lactone components against oxygen-glucose deprivation (OGD) injury in human umbilical vein

收稿日期: 2022-11-25

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20210139)

作者简介: 徐小波, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药新药的研究与开发。E-mail: 1165992664@qq.com

\*通信作者: 肖伟, 中国工程院院士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药的研究与开发。E-mail: kanionlunwen@163.com

武子寅, 博士, 研究方向为中药新药研发。E-mail: cs416@qq.com

endothelial cells-T1 (HUVEC-T1). **Methods** CCK-8 method was used to determine the toxicity of ginkgolide A (GA), ginkgolide B (GB), ginkgolide K (GK) and DGMI at different concentrations on HUVEC-T1 cells, and determine the drug treatment cell concentration. Transcriptomic sequencing was performed on the cell samples of solvent control group (DMSO), model group (OGD/R 4 h/24 h) and the drug administration group (modeling + different doses of GA, GB, GK, DGMI treatment), respectively. Through bioinformatics analysis, the transcriptomic data of ischemic stroke patients in GEO database was used as reference, gene set enrichment analysis (GSEA) and differential genes enrichment analysis methods were used to evaluate the HUVEC-T1 OGD model and the anti-OGD ability of different concentrations of drugs, and to clarify the potential mechanism of action of DGMI and its functional components. **Results** GSEA analysis showed that the similarity between the disease enrichment pathway obtained from the analysis of blood transcriptome data of clinical ischemic stroke patients and the enrichment pathway obtained from the cell model sequencing results in this experiment was 55.6%. Compared with model group, the main signaling pathways in DGMI, GA, GB, GK treatment group were significantly enriched, including FcεRI, NOD like receptors, mitogen-activated protein kinase (MAPK), vascular endothelial growth factor (VEGF), etc. Differential genes analysis showed that 439 differential genes were detected in model group compared with control group. Gene ontology (GO) analysis of differential genes was mainly enriched in the stress response process, while Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis was mainly enriched in phospholipase D, FcεRI, Nod-like receptor and platelet activation signaling pathways. Compared with model group, GO analysis of differential genes in administration group was mainly enriched in hematopoietic and metabolic processes, while KEGG analysis was mainly enriched in signal pathways such as platelet activation and phospholipase D, etc. **Conclusion** The HUVEC-T1 OGD model simulated the pathological features of partial ischemic stroke. DGMI, GA, GB, GK have anti-OGD damage effects. The key genes and signaling pathways of DGMI, GA, GB, GK in anti-OGD injury mainly focus on anti-inflammatory, anti-apoptosis, regulation of platelet activation and other biological processes, which may down-regulate FcεRI, Nod-like receptor, MAPK and VEGF signaling pathways, and intervene in platelet activation and phospholipase D and other signaling pathways.

**Key words:** Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide K; human umbilical vein endothelial cells; oxygen-glucose deprivation model; transcriptomic sequencing

脑卒中是世界范围内导致死亡和残疾的主要原因之一，每年因脑卒中死亡的人数占全球死亡人数的12%，这一比例在发展中国家更高<sup>[1]</sup>。随着人们生活方式的改变与生活水平的提高，脑卒中的发病率呈现上升趋势<sup>[2]</sup>，其中血管阻塞导致的缺血性脑卒中约占所有脑卒中类型的85%<sup>[3]</sup>，引发脑血管阻塞的机制十分复杂，涉及到动脉粥样硬化、动脉炎症等，因此其病理机制也十分复杂，缺氧缺糖导致的能量衰竭、谷氨酸等代谢物累积导致的兴奋性中毒、炎症爆发以及神经细胞凋亡等均参与其中。目前临床上最有效的治疗方法是在时间窗内进行重组组织型纤溶酶原激活剂静脉溶栓或机械取栓，但这2种救治方法时间窗窄、成本高且面临出血风险<sup>[1]</sup>，无法满足目前的临床需求。因此，开发更可靠的治疗药物和方法至关重要。

银杏叶提取物制剂是临床上使用最广泛的中药提取物制剂之一，具有拮抗血小板活化因子、扩血管和抗炎等药理作用<sup>[4-6]</sup>，被广泛用于心脑血管疾病治疗。银杏二萜内酯葡胺注射液（Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection, DGMI）是主要的银杏提取物制剂之一<sup>[7-8]</sup>，其主要活性成分为银杏内

酯A（ginkgolide A, GA）、银杏内酯B（ginkgolide B, GB）和银杏内酯K（ginkgolide K, GK）。临床研究显示DGMI对中、老年缺血性脑卒中患者均有显著疗效<sup>[9-10]</sup>。此外，来自不同实验室的现有研究显示，GA有抗炎和神经保护等作用<sup>[11-12]</sup>；GB有抗炎、抗氧化和血小板拮抗等作用<sup>[13-14]</sup>；GK有抗脑缺血损伤作用<sup>[15]</sup>。上述研究表明DGMI及其功效成分可能是治疗缺血性脑卒中的潜力药物。为明确DGMI及其功效成分抗脑缺血损伤的潜在作用通路，本研究通过建立人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells-T1, HUVEC-T1）氧糖剥夺（oxygen-glucose deprivation, OGD）模型，模拟缺血性脑卒中时细胞缺血缺氧的状态，再利用转录组测序技术对对照组、模型组及给药组的细胞样本进行转录组测序，并结合生信分析方法，鉴定DGMI/GA/GB/GK抗脑缺血损伤的作用通路及生物学功能，为中药及中药功效成分作用机制的科学阐释提供思路。

## 1 材料

### 1.1 细胞

HUVEC-T1细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

## 1.2 药品与试剂

DGMI (国药准字 Z20120024, 批号 201201)、GA (批号 F15IB207297, 质量分数为 97.4%)、GB (批号 S23HB195722, 质量分数 $\geq$ 98%)、GK (批号 J12HB184945, 质量分数 $\geq$ 98%) 由江苏康缘药业股份有限公司提供; CCK-8 试剂盒购自美国 Bimake 公司; DMEM 培养基 (批号 AE29422782)、双抗 (批号 J190015)、胰酶 (批号 J1900034) 购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清 (批号 11G292) 购自依科赛生物; 裂解缓冲液 (批号 20201211-270-1)、裂解酶 (批号 20201211-270-1) 购自博奥生物集团有限公司。

## 1.3 仪器

Spectra Max Plus 384 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); T100 型 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 4150 型 TapeStation 自动化电泳系统 (美国 Agilent 公司); Invitrogen Qubit4.0 核酸定量仪、Countess II 型细胞计数器、3111 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、3131 型三气培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Illumina HiSeq X Ten 型测序仪 (美国 Illumina 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将 HUVEC-T1 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的完全培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。实验前用 PBS 润洗, 胰酶消化, 显微镜下观察, 当 80% 的细胞呈圆形时, 加入完全培养基终止消化, 转移至离心管内, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重悬细胞计数, 根据实验需求计算稀释体积并稀释。

### 2.2 CCK-8 法测定受试药细胞毒性

HUVEC-T1 细胞以 8000 个/孔接种至 96 孔板中, 于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后, 将细胞分为对照组 (加入含对应溶剂的培养基) 和给药组 (分别加入含 12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/mL DGMI 或 12.5、25、50、100、200  $\mu$ mol/L GA、GB、GK 的培养基), 放入培养箱中继续培养 24 h。取出 96 孔板, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 将 96 孔板放入培养箱中避光孵育 3 h 后, 移至酶标仪中检测各组细胞在 450 nm 处的吸光度 (*A*) 值。

### 2.3 转录组实验分组与给药

HUVEC-T1 细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种至 96 孔板中, 培养 24 h。设置对照组、模型组、给药组, 对照组于正常条件下培养; 模型组将培养基更换为无糖培养基, 置于 37 °C 三气培养箱 (94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub>) 中培养 4 h, 随后将培养基换为完全培养基

于 CO<sub>2</sub> 培养箱中再培养 24 h; 给药组相同条件下缺氧培养 4 h 后分别加入含 12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/mL DGMI 或 12.5、25、50、100、200  $\mu$ mol/L GA、GB、GK 的培养基, 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。加入裂解液, 于冰上裂解每个样本孔 5 min。裂解完成后, 收集裂解液于 -80 °C 冰箱保存备用。

### 2.4 转录组测序

吸取裂解液上清, 经反转录、PCR 扩增和纯化后, 使用双端引物进行建库, 质检合格后混样 pooling, 采用 Illumina HiSeq X Ten 测序平台进行高通量测序 (委托博奥生物集团有限公司完成)。

### 2.5 转录组数据分析

**2.5.1 转录组数据处理** 利用 Trimmomatic 软件<sup>[16]</sup> 对测序数据进行过滤, 获取高质量数据信息, 再利用 HISAT2<sup>[17]</sup> 和 StringTie<sup>[18]</sup> 软件对高质量数据进行序列比对和拼接, 统计每组样本比对到各个基因上的 reads 数。

**2.5.2 体外模型评价** 从基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 中下载 3 组缺血性脑卒中患者与健康人群血液转录组数据 (GSE22255、GSE16561、GSE58294) 进行基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA), 获得缺血性脑卒中疾病特征通路集合; 将本研究中模型组与对照组的数据对比进行 GSEA 分析, 获得 HUVEC-T1 细胞 OGD 模型的特征通路集合, 比较缺血性脑卒中疾病特征通路集合与 OGD 模型特征通路集合的相似程度, 用于判断本研究构建的 OGD 模型是否可以表征临床疾病的特征通路, 并用于受试药物评价。

**2.5.3 药物处理组逆转通路分析** 将上述模型组 vs 对照组 GSEA 分析获得的通路集定义为 OGD 特征通路集; 将每组药物处理后的细胞转录组数据分别以模型组数据为对照进行 GSEA 分析, 获取给药组富集通路, 与 OGD 特征通路集进行比较, 并计算药物干预后表达趋势逆转的通路数与 OGD 特征通路总数的比值 (响应值), 将该比值作为评价不同受试药物抗 OGD 损伤能力的指标: 若响应值 $\geq$ 50%, 表明该受试药物具有强抗 OGD 损伤能力; 若响应值为 30%~50%, 表明该受试药物有中等抗 OGD 损伤能力; 若响应值 $<$ 30%, 表明该受试药物不具备抗 OGD 损伤能力。

**2.5.4 差异基因筛选** 采用 DESeq<sup>[19]</sup> 软件包对各组细胞的基因表达量进行差异分析, 模型组差异基因以模型组 vs 对照组筛选, 给药组差异基因以给药

组 vs 模型组筛选 (筛选标准 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1.5$  且  $P \leq 0.05$ )。

**2.5.5 GO 和 KEGG 富集分析** 对各组差异基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和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, 获取富集通路, 并用 R 语言将相关信息可视化。

**3 结果**

**3.1 受试药物的细胞毒性检测**

如图 1 所示, 受试药物 DGMI 在质量浓度不超过 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , GA、GB、GK 在浓度不超过 200

$\mu\text{mol}/\text{L}$  时对细胞均无明显毒性, 且 DGMI 表现出一定的促细胞增殖作用。

**3.2 转录组测序数据质量分析**

在所建立的测序文库中, 36 组样本碱基质量超过  $Q_{20}$  的比例在 91.84% 以上, 超过  $Q_{30}$  的比例在 84.42% 以上, 与指定参考基因组的序列比对率在 93.15% 以上, 表明测序结果较好。

**3.3 体外模型评价**

如图 2、3 所示, 与健康人群相比, 3 组缺血性脑卒中患者数据的富集通路中共有 27 条通路重合且变化趋势相同。与对照组相比, 模型组共富集到

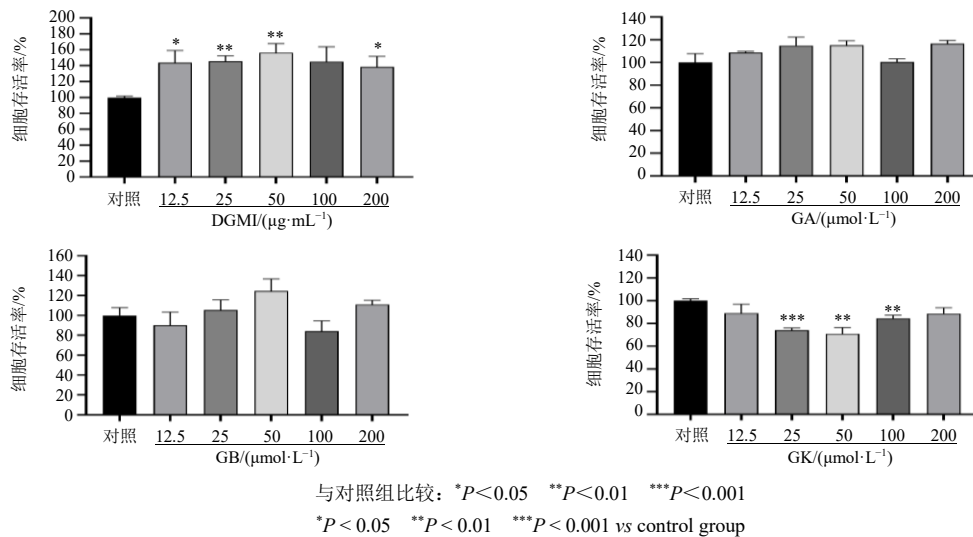


图 1 DGMI、GA、GB、GK 对 HUVEC-T1 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 1 Effect of DGMI, GA, GB and GK on survival rate of HUVEC-T1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

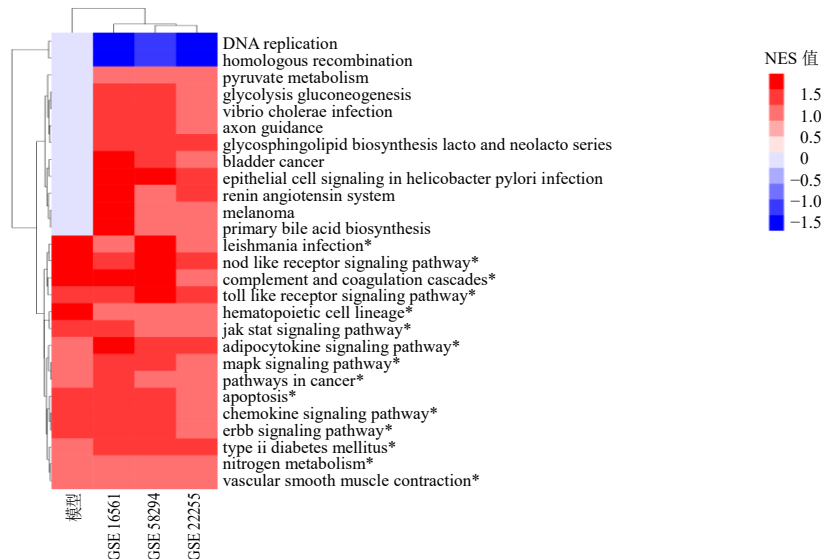


图 2 OGD 造模对 HUVEC-T1 细胞的影响

Fig. 2 Effect of OGD modeling on HUVEC-T1 cells

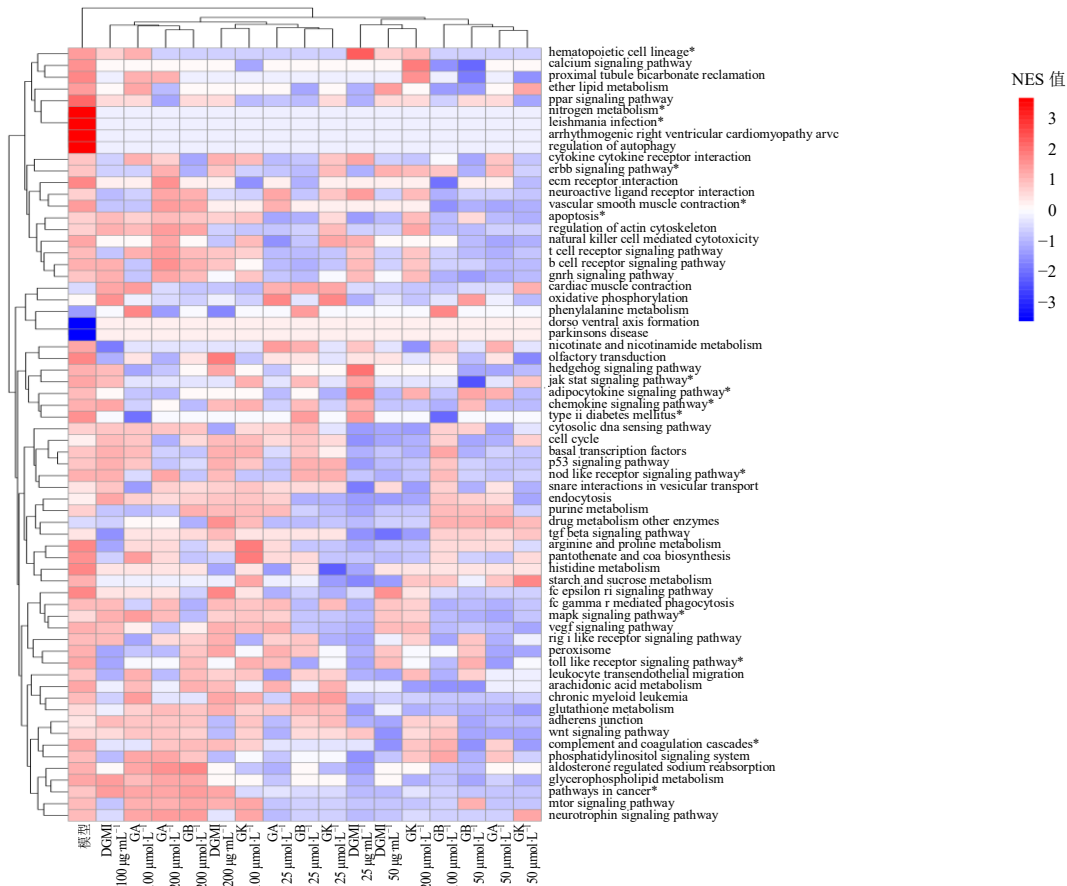


图 3 受试药物干预对 OGD 损伤后的 HUVEC-T1 细胞的影响

Fig. 3 Effect of drug intervention on HUVEC-T1 cells after OGD injury

66 条通路，其中 15 条与缺血性脑卒中疾病通路集中的通路重合且变化趋势相同，包括细胞凋亡、有丝分裂原激活蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）、Toll 样受体、NOD 样受体等与炎症、免疫和凋亡相关的通路。

### 3.4 药物干预对 GSEA 通路的影响

如表 2 所示，16 个不同浓度药物处理组中，11 组表现出中等及以上抗 OGD 损伤能力（响应值 > 30%），其中 GB 50 μmol/L（响应值 38/66=57.58%）、GK 50 μmol/L（响应值 40/66=60.61%）、DGMI 25 μg/mL（响应值 35/66=53.03%）均表现出强抗 OGD 损伤能力，GA 50 μmol/L（响应值 32/66=48.48%）

表现出中等抗 OGD 损伤能力。上述 4 个组别均逆转了 FcεRI、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、MAPK 和 NOD 样受体信号通路的表达趋势，且 16 个药物处理组中，FcεRI、VEGF、MAPK 和 NOD 样受体信号通路的表达趋势均被 8 个以上组别逆转。此外，B 细胞受体、T 细胞受体、血管平滑肌收缩、自然杀伤细胞介导的细胞毒性等通路均在 GA、GB、GK 50 μmol/L 通路中被逆转，DGMI 25 μg/mL 中未被逆转；而转化生长因子-β（transforming growth factor-β, TGF-β）信号通路则仅在 DGMI 25 μg/mL 中被逆转，单体中未被逆转（图 3）。

表 2 药物干预后各组的响应值

Table 2 Response values of each group after drug intervention

药物	剂量	响应值/%	药物	剂量	响应值/%
DGMI	25 μg·mL <sup>-1</sup>	53.03	GB	25 μmol·L <sup>-1</sup>	37.88
	50 μg·mL <sup>-1</sup>	42.42		50 μmol·L <sup>-1</sup>	57.58
	100 μg·mL <sup>-1</sup>	30.30		100 μmol·L <sup>-1</sup>	46.97
	200 μg·mL <sup>-1</sup>	16.67		200 μmol·L <sup>-1</sup>	18.18
GA	25 μmol·L <sup>-1</sup>	43.94	GK	25 μmol·L <sup>-1</sup>	31.82
	50 μmol·L <sup>-1</sup>	48.48		50 μmol·L <sup>-1</sup>	60.61
	100 μmol·L <sup>-1</sup>	25.76		100 μmol·L <sup>-1</sup>	18.18
	200 μmol·L <sup>-1</sup>	19.70		200 μmol·L <sup>-1</sup>	33.33

### 3.5 差异基因分析

如图4所示,与对照组相比,模型组共筛选获得439个差异表达基因,其中127个基因上调,312个基因下调;与模型组相比,药物处理组细胞的差异基因数量见表3,进一步分析发现,部分模型组差异基因在药物干预后表达趋势被逆转(图5、6)。

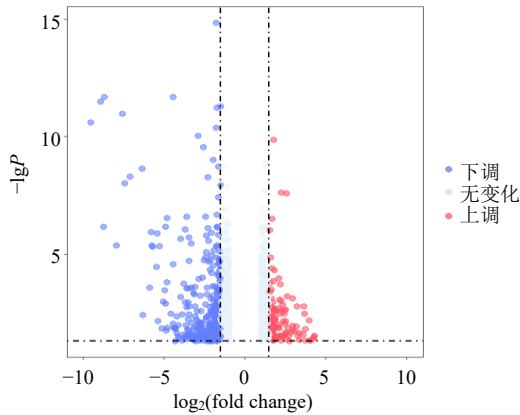
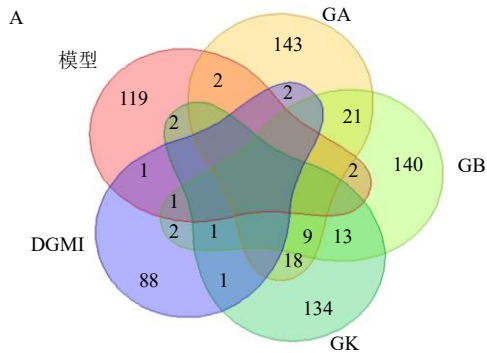


图4 模型组差异基因火山图

Fig. 4 Volcano plot of differential genes by model group



A-模型组上调基因与给药组下调基因的交集 B-模型组下调基因与给药组上调基因的交集

A-intersection of up-regulated genes in model group and down-regulated genes in drug administration group B-intersection of down-regulated genes in model group and up-regulated genes in drug administration group

表3 受试药物干预对 OGD 处理后的 HUVEC-T1 细胞基因表达的影响

Table 3 Effect of drug intervention on gene expressions of HUVEC-T1 cells after OGD treatment

组别	差异基因总数	上调基因	下调基因
GA 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	78	37	41
GA 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	97	44	53
GA 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	99	48	51
GA 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	98	46	52
GB 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	91	52	39
GB 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	108	55	53
GB 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	87	42	45
GB 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	106	49	57
GK 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	73	38	35
GK 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	83	46	37
GK 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	120	56	64
GK 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs M	88	45	43
DGMI 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs M	15	12	3
DGMI 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs M	53	27	26
DGMI 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs M	37	15	22
DGMI 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs M	79	34	45

M-模型组

M-model group

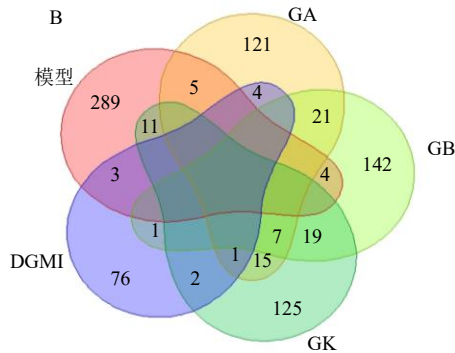


图5 差异基因韦恩分析图

Fig. 5 Venn analysis of differential genes

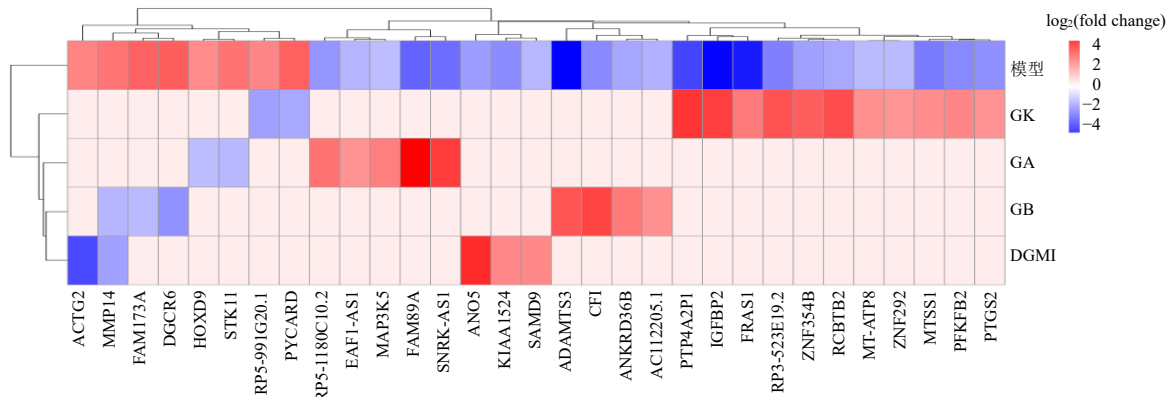


图6 模型组与药物处理组细胞差异基因热图

Fig. 6 Differential genes heat map between model group and drug administration group

### 3.6 受试药物干预对细胞功能的影响

为明确 HUVEC-T1 细胞 OGD 处理以及 OGD 处理+不同浓度药物干预后所涉及的生物学功能变化,本研究对模型组及药物处理组细胞的差异表达基因进行 GO 功能富集分析,主要包括生物学过程 (GO biological process, GO\_BP)、细胞组分 (GO cellular component, GO\_CC) 和分子功能 (GO molecular function, GO\_MF) 富集分析。

**3.6.1 差异基因 GO\_BP 富集分析** 结果显示, HUVEC-T1 细胞 OGD 处理后主要富集在机体内凝血功能、血氧运输、细胞对外界刺激 (生物刺激、剪切应力刺激) 等生物过程 (图 7-a)。药物干预后, GA 组细胞富集在血管生成、碳水化合物代谢等生物过程; GB 组细胞富集在生长发育、TORC1 信号的调节等生物过程; GK 组细胞富集在信号转导、

细胞分化等生物过程; DGMI 组富集在钙离子跨膜转运、对铵离子的反应等生物过程 (图 8)。

**3.6.2 差异基因 GO\_CC 富集分析** 结果显示,模型组细胞主要富集在细胞质膜、肌动蛋白细胞骨架与细胞核等组分 (图 7-b)。药物处理后, GA 组细胞主要富集在细胞核、细胞质与细胞复合物等组分; GB 组细胞主要富集在突触膜等组分; GK 组细胞主要富集在细胞器、突触膜等组分; DGMI 组细胞主要富集在突触后膜等组分 (图 9)。

**3.6.3 差异基因 GO\_MF 富集分析** 结果显示,模型组细胞主要富集在 GTP 酶激活及活性调节等功能 (图 7-c)。药物处理后, GA、GB 和 GK 组细胞均主要富集在蛋白结合、酶活性调节等功能; GK 组细胞还在钙释放通道活性调节功能富集; DGMI 组细胞则主要在酶活性调节功能富集 (图 10)。

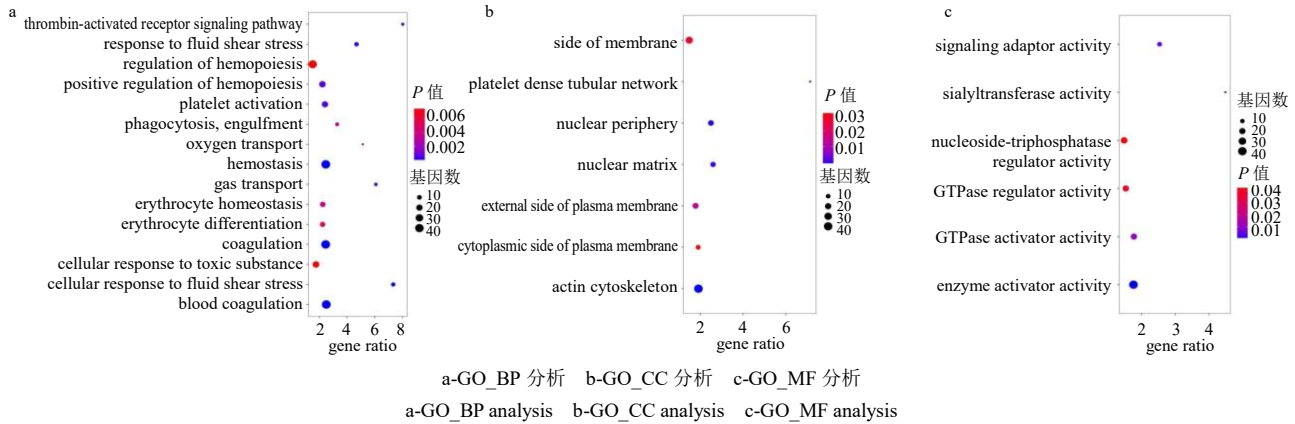


图 7 模型组差异基因 GO 分析结果

Fig. 7 GO analysis results of different genes in model group

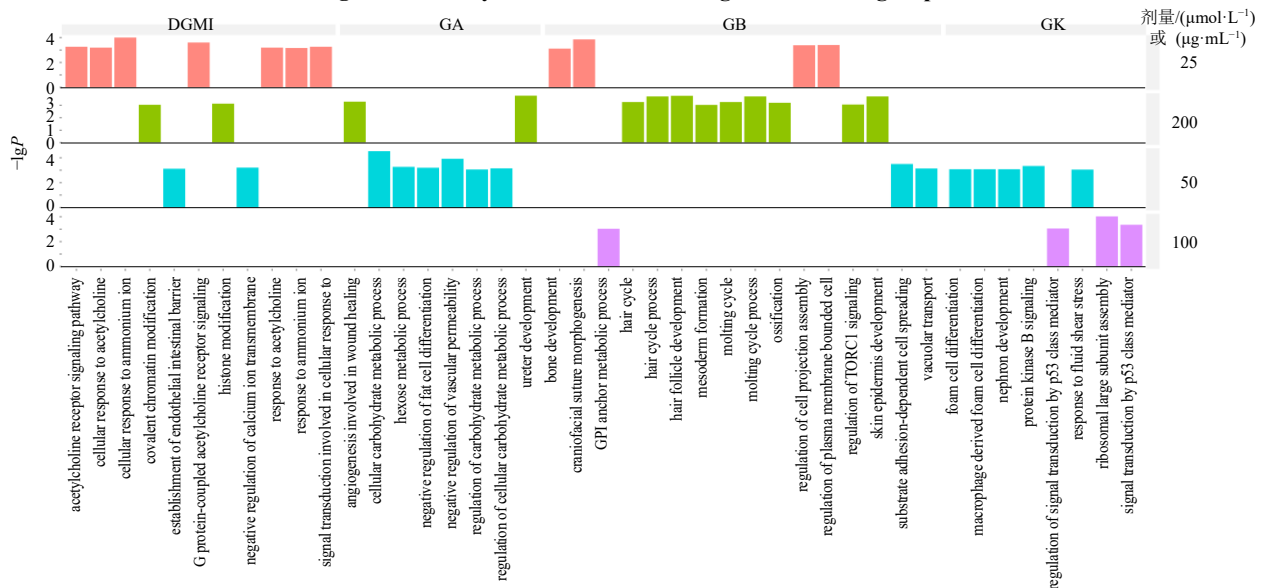


图 8 给药组差异基因 GO\_BP 富集分析

Fig. 8 GO\_BP enrichment analysis of differential genes in administration group

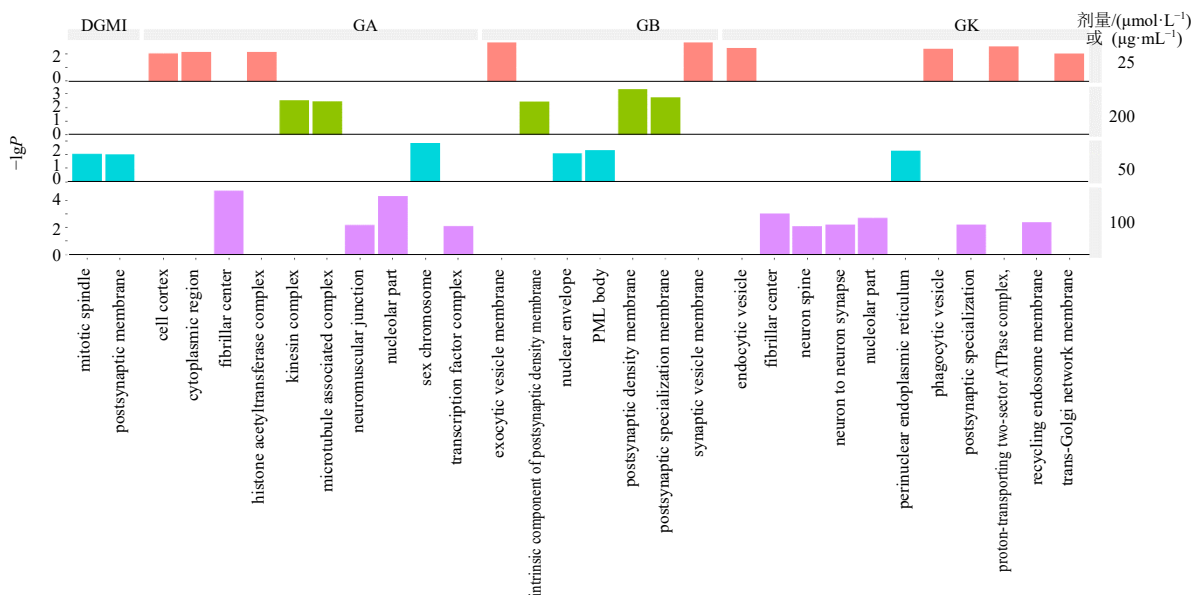


图9 给药组差异基因 GO\_CC 通路富集分析

Fig. 9 GO\_CC enrichment analysis of differential genes in administration group

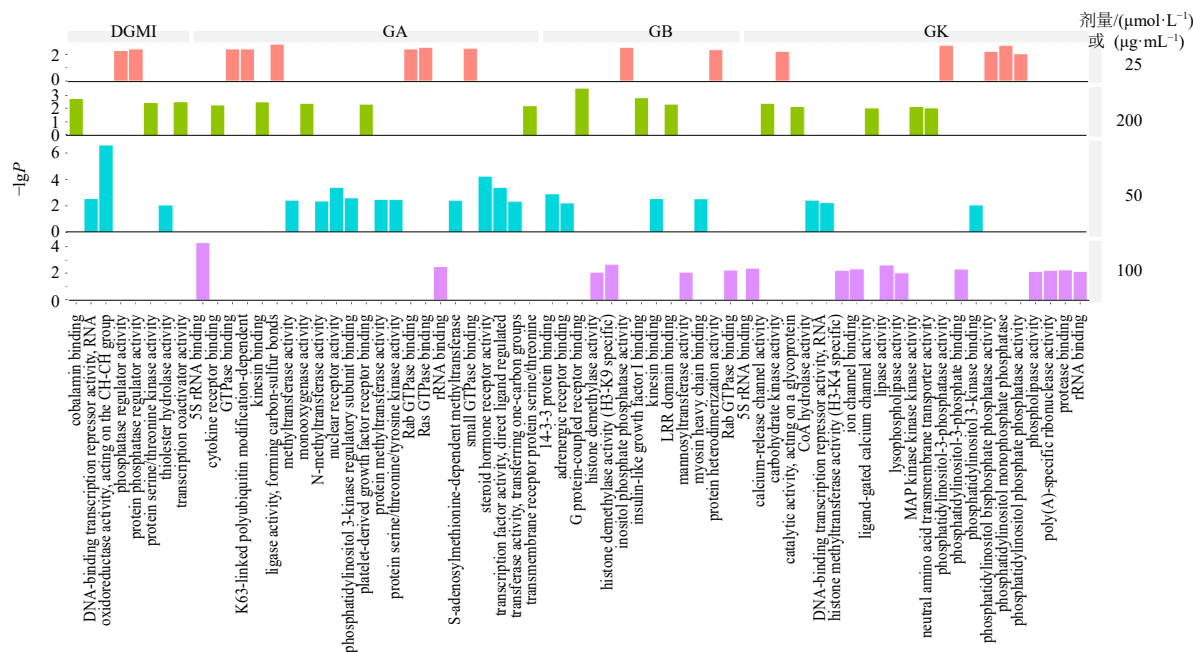


图10 给药组差异基因 GO\_MF 通路富集分析

Fig. 10 GO\_MF enrichment analysis of differential genes in administration group

### 3.7 差异基因 KEGG 通路富集分析

为明确 DGMI 及其功效成分影响 OGD 处理后 HUVEC-T1 细胞的功能和状态的 KEGG 作用通路, 本研究对获得的差异基因进行 KEGG 通路富集分析。结果显示, 模型组差异基因富集于 13 条 KEGG 疾病通路, 主要涉及炎症、凋亡和免疫反应。与模型组相比, 16 个药物处理组中有 4 组在 13 条 KEGG 疾病通路上富集 (图 11), 主要包括血管平滑肌收缩、血小板活化、自然杀伤细胞介导的细胞毒性和

磷脂酶 D 信号通路。

中药制剂及活性成分具有多靶点特性, 可能涉及对其他通路的影响, 本研究进一步对给药组差异基因进行 KEGG 分析, 筛选在药物处理组中显著富集且属于心血管疾病、细胞生长与死亡、发育与再生、免疫系统、脂质代谢、神经系统、信号转导 7 类二级通路中的 KEGG 通路。结果显示, 不同浓度药物处理后, 细胞还在神经发育、能量供应、血管再生和神经保护相关通路显著富集 (图 12)。



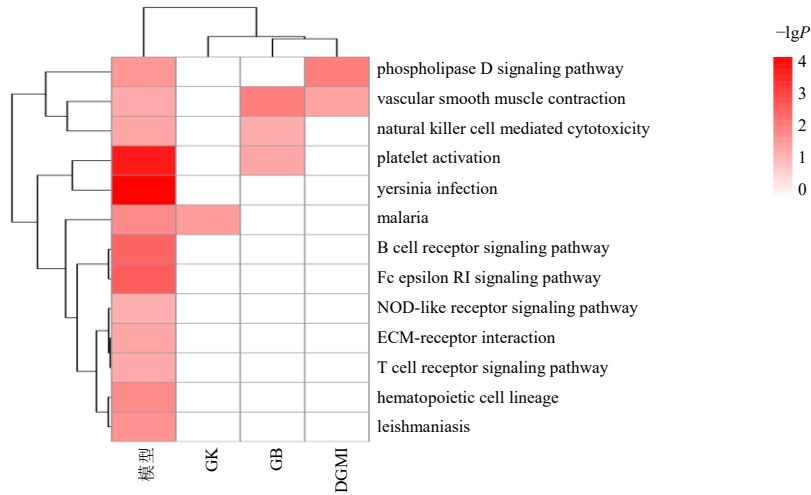


图 11 差异基因 KEGG 富集分析

Fig. 11 KEGG enrichment analysis of differential genes

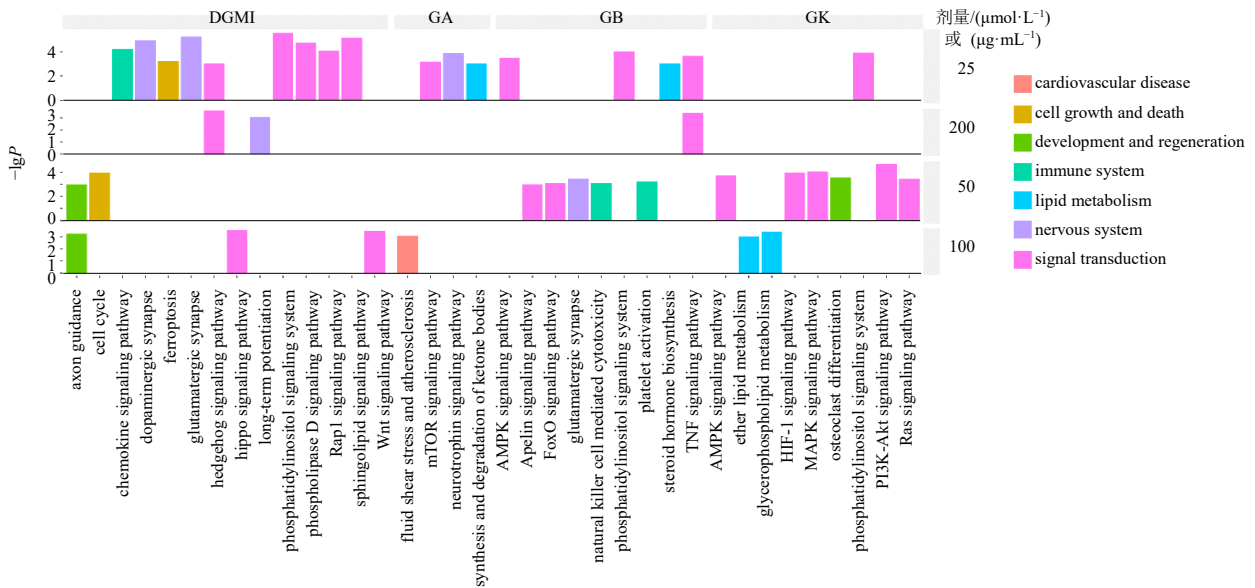


图 12 药物处理组差异基因在 7 类 KEGG 通路中的富集情况

Fig. 12 Enrichment of differentially expressed genes in seven types of KEGG pathways in administration group

#### 4 讨论

近年来,大量的研究证实部分银杏叶提取物制剂对缺血性脑卒中后脑损伤具有改善作用,如金纳多<sup>[20-22]</sup>、DGMI<sup>[9,23-24]</sup>等。DGMI作为主要的银杏叶提取物制剂之一<sup>[8]</sup>,已有较多抗脑缺血相关的研究,但这些研究大多以动物为载体且主要针对特定通路或靶标,具有研究偏好,忽略了对潜在作用通路的探索;此外,在动物体内开展中药提取物制剂作用机制研究存在动物个体差异大,研究成本高,实验周期长等缺陷。因此,开发针对多个通路、低成本、可重复性强且普遍适用的研究策略对于开展中药及中药功效成分的作用机制研究具有重要意义。转录

组学能全面地反映细胞内的基因表达情况,通过比较细胞内基因表达情况可以明确对照组、模型组以及药物处理组细胞的差异,更全面地研究药物作用机制及通路。

本研究基于二代测序技术的高通量转录组测序策略,在体外 OGD 诱导的 HUVEC-T1 细胞模型上评价中药提取物注射液 DGMI 及其功效成分的抗 OGD 损伤能力及潜在作用通路。通过对 GEO 数据库中缺血性脑卒中患者与正常人群转录组数据及模型组与对照组细胞转录组数据进行 GSEA 分析并比较,明确了 OGD 处理后的 HUVEC-T1 细胞具有部分缺血性脑卒中的病理特征,提示本研究选用的体

外细胞模型是模拟缺血性脑卒中的合理模型。

进一步 GSEA 分析发现, 经 DGMI、GA、GB、GK 干预后, 模型组细胞中的 OGD 特征通路表达趋势被不同程度逆转, 提示 DGMI 及 GA/GB/GK 均具备一定的抗 OGD 损伤活性。缺血性脑卒中患者及本研究模型组细胞的 GSEA 通路中, NOD 样受体、MAPK、FcεRI、VEGF 通路均为上调趋势, 在 DGMI、GA、GB、GK 干预后, NOD 样受体、MAPK、FcεRI、VEGF 通路均变为下调趋势。过往的研究证实, 卒中发生后, 由于脑内 ATP 供应减少, 胞内 K<sup>+</sup> 外流、Ca<sup>2+</sup> 内流, NOD 样受体炎性小体被激活, 进而激活 MAPK 和核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 通路, 诱导 NOD 样受体家族中炎性小体相关蛋白的转录翻译, 导致促炎细胞因子释放增加, 炎症加剧, 最终诱导细胞凋亡, 导致大脑损伤<sup>[25-27]</sup>。也有研究证明 FcεRI 受体可与 IgE 分子结合激活肥大细胞释放促炎细胞因子, 加剧炎症<sup>[27-28]</sup>。VEGF 对缺血性脑卒中恢复具有重要作用, 但在缺血性脑卒中急性期, 急剧增加的 VEGF 可能会导致血脑屏障和血管破坏<sup>[29]</sup>。在系列针对临床缺血性脑卒中患者的转录组研究中, 有研究者也认为 NOD 样受体、MAPK 和 FcεRI 信号通路是缺血性脑卒中患者诊断与治疗的关键通路<sup>[30-31]</sup>。提示 DGMI、GA、GB、GK 均具有抗 OGD 损伤作用, 其作用机制可能为诱导下调 NOD 样受体、MAPK、FcεRI 和 VEGF 信号通路, 发挥减轻炎症、抑制细胞凋亡和保护血脑屏障等作用, 进而减轻脑缺血损伤。GSEA 分析还发现与 DGMI 相比, GA、GB、GK 单体对免疫相关通路的调节作用更为显著, 如调节 T 细胞受体、B 细胞受体等; 而 DGMI 则还对促进血管生成、抑制氧化应激、代谢等通路调节能力更强, 如 TGF-β 信号通路等。

此外, 差异基因分析结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞筛选获得 439 个差异表达基因, 其中 127 个基因上调, 312 个基因下调; DGMI、GA、GB、GK 干预后, 可逆转 31 个差异基因, 包括前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、基质金属肽酶 14 (matrix metalloproteinase 14, MMP14)、胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (insulin like growth factor binding protein 2, IGFBP2) 等。在针对临床缺血性脑卒中患者的研究中, PTGS2、MMP14 被认为是与缺血性脑卒中相关的关键基因、是潜在的诊断生物标志物, 被推荐

为缺血性脑卒中的治疗靶点<sup>[32-34]</sup>, IGFBP2 被认为是治疗缺血性脑卒中的新型生物标志物<sup>[35-37]</sup>。提示 DGMI、GA、GB、GK 可能通过调控 MMP14、PTGS2、IGFBP2 等多个基因参与缺血性脑卒中后的大脑修复过程。

DGMI、GA、GB、GK 干预可以改变 OGD 处理后 HUVEC-T1 细胞内的主要生物学过程, 由血氧运输和应对外界刺激反应转变为血管生成、生长发育与代谢调节等。在差异基因 KEGG 分析中, 模型组共富集到 13 条通路, 其中磷脂酶 D 信号通路与脑缺血密切相关, 磷脂酶 D 活性增加会促进脑缺血的发生, 加剧大脑损伤<sup>[38-39]</sup>; T 细胞受体、B 细胞受体信号通路与细胞内免疫反应相关<sup>[40]</sup>; FcεRI、NOD 样受体信号通路与炎症和凋亡相关<sup>[41]</sup>。在系列针对临床缺血性脑卒中患者与健康人群转录组数据的差异基因 KEGG 富集分析中, FcεRI、NOD 样受体、T 细胞受体、B 细胞受体等信号通路也被显著富集<sup>[30-31]</sup>。经 DGMI、GA、GB、GK 干预后, DGMI 组细胞差异基因在血管平滑肌收缩和磷脂酶 D 信号通路富集; GB 组细胞差异基因在血管平滑肌收缩、血小板活化、自然杀伤细胞介导的细胞毒性通路富集。提示 DGMI 可能通过干预血管平滑肌收缩和磷脂酶 D 信号通路; GB 可能通过干预血管平滑肌收缩、血小板活化和自然杀伤细胞介导的细胞毒性发挥抗 OGD 损伤作用。此外, 对药物处理组 KEGG 分析结果进一步分析发现 GA 组细胞还在 mTOR 等信号通路富集; GK 组细胞还在 MAPK 等信号通路富集; DGMI 组细胞还在 Hedgehog 等信号通路富集。尽管这 3 条通路未在模型组差异基因 KEGG 分析中被富集, 但在模型组 GSEA 分析中, 该 3 条通路均被富集到。有研究表明 mTOR 信号通路可维持细胞基本功能, 促进轴突再生和神经功能恢复, 促进缺氧诱导因子 1 合成以增加能量供应, 维持线粒体功能, 改善大脑损伤<sup>[42-44]</sup>。也有研究显示 Hedgehog 信号通路参与诱导缺血后新生血管的生成<sup>[45]</sup>, 其中音猬因子 (Shh) 可以控制部分促进新生血管形成和血管成熟的生长因子表达<sup>[46]</sup>, 指导血管形成和成熟<sup>[47]</sup>。提示这部分通路可能也是 DGMI、GA、GB、GK 抗 OGD 损伤的潜在作用通路。

本研究采用 2 类分析方法, 即基于全部基因的 GSEA 分析方法和基于差异基因的 GO 和 KEGG 分析方法。在本研究中, 与差异基因 GO 和 KEGG 分析结果相比, GSEA 分析得出的结果与临床缺血性

脑卒中患者转录组分析结果更吻合。一般而言,中药提取物制剂及中药活性成分作用机制比较复杂,且具有弱结合、多靶点的特性,能同时影响多个基因的表达<sup>[48]</sup>,差异基因相关分析仅关注差异最显著的部分基因,可能无法完全展示中药制剂或中药活性成分潜在的作用机制及通路。与差异基因分析方法相比,GSEA分析方法可能更适用于中药制剂及中药活性成分的作用机制研究。

综上,本研究应用转录组学研究方法对DGMI及其功效成分抗OGD损伤的作用机制及通路进行探索,首先通过对缺血性脑卒中患者与本研究模型组细胞数据进行分析对比,证实HUVEC-T1 OGD模型能够模拟部分缺血性脑卒中的病理特征。然后对本研究中的细胞转录组数据进行GSEA、差异基因GO和KEGG分析,明确了DGMI及其功效成分具有抗OGD损伤能力以及发挥抗OGD损伤作用的主要作用机制及通路,即通过下调FcεRI、NOD样受体、MAPK和VEGF信号通路发挥减轻炎症、抑制细胞凋亡和保护血脑屏障作用;通过影响磷脂酶D、血小板活化等信号通路发挥抗OGD损伤作用。此外,本研究还发现了部分DGMI及其功效成分抗OGD损伤的潜在作用通路。本研究为后续深入挖掘DGMI及其功效成分治疗缺血性脑卒中的分子机制和靶点提供了研究思路及参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Campbell B C V, De Silva D A, MacLeod M R, *et al.* Ischaemic stroke [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 70.
- [2] 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.
- [3] Sun K, Fan J Y, Han J Y. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1): 8-24.
- [4] 张鹏飞, 廖丽君, 邓祯, 等. 银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(2): 4.
- [5] 刘磊, 卫昊, 陈丹丹, 等. 银杏叶提取物调控TLR4/NF-κB通路减轻急性脑缺血小鼠脑皮质缺血研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(21): 5282-5288.
- [6] 陈璟, 吕志阳, 汪洁, 等. 银杏总内酯在脑缺血损伤模型大鼠体内的PK-PD研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 885-890.
- [7] 孙毅, 朱永红, 童正兵, 等. 银杏内酯注射液及其制备方法: 中国, CN102626383A [P]. 2012-08-08.
- [8] 杜雨芯, 操娇娇, 张倩霞, 等. 银杏二萜内酯通过拮抗PAFR和调节SIRT1/STAT3抑制氧化应激诱导的PC12神经元衰老研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2793-2801.
- [9] Zhang D D, Wang Y, Meng Z H, *et al.* Efficacy of Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection in elderly patients with ischemic stroke: A post hoc analysis of a randomized controlled trial [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154391.
- [10] 杜晓, 韩舟, 何斌, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对急性缺血性脑卒中再通成功患者预后的影响 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(3): 607-613.
- [11] 黄维玲, 马宇昕, 刘靖, 等. 银杏内酯A对中枢神经系统作用及机制的研究进展 [J]. *解剖学研究*, 2017, 39(2): 149-151.
- [12] Li Y, Wu Y N, Yao X L, *et al.* Ginkgolide A ameliorates LPS-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 794.
- [13] Nabavi S M, Habtemariam S, Daglia M, *et al.* Neuroprotective effects of ginkgolide B against ischemic stroke: A review of current literature [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15(21): 2222-2232.
- [14] Tsai J Y, Su K H, Shyue S K, *et al.* EGb761 ameliorates the formation of foam cells by regulating the expression of SR-A and ABCA1: Role of haem oxygenase-1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(3): 415-423.
- [15] 马舒伟, 张现涛, 何盛江, 等. 银杏叶内酯K对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(13): 993-997.
- [16] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [17] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [18] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(3): 290-295.
- [19] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data [J]. *Genome Biol*, 2010, 11(10): R106.
- [20] Feng Z L, Sun Q, Chen W, *et al.* The neuroprotective mechanisms of ginkgolides and bilobalide in cerebral ischemic injury: A literature review [J]. *Mol Med*, 2019, 25(1): 57.
- [21] Li S S, Zhang X J, Fang Q, *et al.* *Ginkgo biloba* extract improved cognitive and neurological functions of acute ischaemic stroke: A randomised controlled trial [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2017, 2(4): 189-197.
- [22] Kressmann S, Müller W E, Blume H H. Pharmaceutical quality of different *Ginkgo biloba* brands [J]. *J Pharm*

- Pharmacol*, 2002, 54(5): 661-669.
- [23] Wang T J, Wu Z Y, Yang C H, *et al.* Multiple mechanistic models reveal the neuroprotective effects of diterpene ginkgolides against astrocyte-mediated demyelination via the PAF-PAFR pathway [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(6): 1565-1597.
- [24] 张学非, 曹泽斌, 许治良, 等. 银杏内酯治疗脑缺血作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(16): 2943-2948.
- [25] Kufer T A. Signal transduction pathways used by NLR-type innate immune receptors [J]. *Mol Biosyst*, 2008, 4(5): 380-386.
- [26] Liu H Q, Wei X B, Kong L J, *et al.* NOD2 is involved in the inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion injury and triggers NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(5): 525-535.
- [27] Xu Q X, Zhao B, Ye Y Z, *et al.* Relevant mediators involved in and therapies targeting the inflammatory response induced by activation of the NLRP3 inflammasome in ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 123.
- [28] Klemm S, Ruland J. Inflammatory signal transduction from the Fc epsilon RI to NF-kappa B [J]. *Immunobiology*, 2006, 211(10): 815-820.
- [29] Geiseler S, Morland C. The Janus face of VEGF in stroke [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1362.
- [30] Wei D C, Chen J, Chen X P, *et al.* Screening for differentially expressed circRNAs in ischemic stroke by RNA sequencing [J]. *BMC Neurol*, 2021, 21(1): 370.
- [31] Cui S S, Zhao Y F, Huang M H, *et al.* Integrated microarray analysis to identify genes and small-molecule drugs associated with stroke progression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7634509.
- [32] Yang Y, Rosenberg G A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke [J]. *Brain Res*, 2015, 1623: 30-38.
- [33] Zhu W H, Nan Y N, Wang S Q, *et al.* Bioinformatics analysis of gene expression profiles of sex differences in ischemic stroke [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2478453.
- [34] Chen G Z, Li L, Tao H M. Bioinformatics identification of ferroptosis-related biomarkers and therapeutic compounds in ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 745240.
- [35] Fan Q R, Zhou J, Wang Y L, *et al.* Chip-based serum proteomics approach to reveal the potential protein markers in the sub-acute stroke patients receiving the treatment of Ginkgo Diterpene Lactone Meglumine Injection [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 112964.
- [36] Prentice R L, Zhao S S, Johnson M, *et al.* Proteomic risk markers for coronary heart disease and stroke: Validation and mediation of randomized trial hormone therapy effects on these diseases [J]. *Genome Med*, 2013, 5(12): 112.
- [37] Tao H M, Dong L H, Li L. N6-methyladenosine modulation classes and immune microenvironment regulation in ischemic stroke [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 1013076.
- [38] Stegner D, Thielmann I, Kraft P, *et al.* Pharmacological inhibition of phospholipase D protects mice from occlusive thrombus formation and ischemic stroke: Brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(9): 2212-2217.
- [39] Lee M Y, Kim S Y, Min D S, *et al.* Upregulation of phospholipase D in astrocytes in response to transient forebrain ischemia [J]. *Glia*, 2000, 30(3): 311-317.
- [40] Kim Y Y, Je I G, Kim M J, *et al.* 2-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid attenuates mast cell-mediated allergic reaction in mice via modulation of the FcεRI signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(1): 90-99.
- [41] Wen H, Miao E A, Ting J P. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation [J]. *Immunity*, 2013, 39(3): 432-441.
- [42] Li M X, Weng J W, Ho E S, *et al.* Brain delivering RNA-based therapeutic strategies by targeting mTOR pathway for axon regeneration after central nervous system injury [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(10): 2157-2165.
- [43] Düvel K, Yecies J L, Menon S, *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1 [J]. *Mol Cell*, 2010, 39(2): 171-183.
- [44] Cunningham J T, Rodgers J T, Arlow D H, *et al.* mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1α transcriptional complex [J]. *Nature*, 2007, 450(7170): 736-740.
- [45] Mooney C J, Hakimjavadi R, Fitzpatrick E, *et al.* Hedgehog and resident vascular stem cell fate [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 468428.
- [46] Chinchilla P, Xiao L Q, Kazanietz M G, *et al.* Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(3): 570-579.
- [47] Dohle E, Fuchs S, Kolbe M, *et al.* Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(4): 1235-1237.
- [48] Wang J, Guo Z, Fu Y, *et al.* Weak-binding molecules are not drugs?-toward a systematic strategy for finding effective weak-binding drugs [J]. *Brief Bioinform*, 2017, 18(2): 321-332.