

天麻对帕金森小鼠神经元保护作用机制的转录组学分析

张大燕, 文欢, 王伟, 赵灵, 彭成*, 高继海*

(成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用重点实验室
——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**研究天麻水煎液对 A53T α -突触核蛋白(α -synuclein)转基因帕金森小鼠的治疗作用,及其对凋亡相关通路表达的影响。**方法:**以 A53T α -synuclein 转基因帕金森小鼠为实验对象,设置模型组、天麻组、空白组、阳性组(美多巴组);采用基因型鉴定法、苏木素-伊红(HE)染色法和行为学实验测定小鼠中脑黑质神经元病理改变,以判断造模是否成功;Illumina HiSeq 2500 平台测序,检测天麻组所有基因转录本的差异表达,通过功能注释和富集分析筛选出与帕金森保护相关的基因及代谢途径。**结果:**预给予天麻水煎液治疗后能改善 A53T α -synuclein 转基因帕金森小鼠中脑黑质神经元病变,转录数据分析显示其作用机制主要涉及原癌基因大鼠肉瘤(Ras),p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)及 Ca^{2+} 等相关凋亡途径的抑制或激活调控。与模型组相比,天麻组中多巴胺第三受体,神经肽 Y, Ras 蛋白特异鸟嘌呤核苷酸释放因子 1,钙/钙调蛋白依赖的磷酸二酯酶 1A 等基因表达上调,原癌基因 *c-Fos*, p38 MAPK 和人促分裂素原活化蛋白激酶激活的蛋白激酶 3 等凋亡基因表达下调。**结论:**天麻水煎液对 A53T α -synuclein 转基因帕金森小鼠具有一定的治疗作用,其机制可能与抑制多种凋亡相关信号通路有关。

[关键词] 天麻; 水煎液; A53T α -突触核蛋白; 转基因; 帕金森小鼠; 转录组; 凋亡

[中图分类号] R22;R24;Q78;R285;R284;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0073-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181303

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1319.018.html>

[网络出版时间] 2018-04-12 16:26

Transcriptome Analysis of Protective Mechanism of Gastrodiae Rhizoma on Neurons of Parkinson Mice

ZHANG Da-yan, WEN Huan, WANG Wei, ZHAO Ling, PENG Cheng*, GAO Ji-hai*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the therapeutic effect of Gastrodiae Rhizoma decoction on A53T α -synuclein transgenic Parkinson mice and its influence on the expression of apoptosis related pathways. **Method:** A53T α -synuclein transgenic mice with Parkinson disease were used as experimental subjects, and model group, Gastrodiae Rhizoma group, blank group and positive group (madopar group) were also set up. The pathological changes of substantia nigra neurons in mice were determined by genotype identification, hematoxylin-eosin (HE) staining and behavioural experiment to judge the success of the model establishment, the Illumina HiSeq 2500

[收稿日期] 20171016(027)

[基金项目] 四川省科技支撑计划项目(2014FZ0121,2015FY111500-140);中药资源四川省青年科技创新研究团队项目(2015TD0028)

[第一作者] 张大燕,在读硕士,从事中药学研究,E-mail:184638222@qq.com

[通信作者] *彭成,博士,研究员,从事药理学研究,E-mail:peng_cutcm@126.com;

*高继海,博士,副研究员,从事分子生药学研究,E-mail:271969318@qq.com

platform sequencing technologies was used to detect differential expression of transcripts of all genes in *Gastrodiae Rhizoma* group. The genes related to Parkinson's protection and metabolic pathways were screened by functional annotation and enrichment analysis. **Result:** It could improve the substantia nigra neuron pathological changes in A53T α -synuclein transgenic Parkinson mice after treating *Gastrodiae Rhizoma* decoction, and transcriptome analysis showed that the mechanism mainly involved the inhibition or activation of proto oncogene of rat sarcoma (Ras), p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) and Ca^{2+} related apoptosis pathways. Compared with the model group, the expression of dopamine third receptor (*DRD3*), neuropeptide Y (*NPY*), Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1 (*RASGRP1*), calcium/calmodulin-dependent 3', 5'-phosphodiesterase 1A (*PDE1A*) in *Gastrodiae Rhizoma* group were up-regulated, and apoptotic genes, such as proto oncogene of *c-Fos*, *p38 MAPK* and protein kinase 3 activated by human mitogen activated protein kinase (*MAPKAPK3*) were down-regulated. **Conclusion:** *Gastrodiae Rhizoma* decoction has a certain therapeutic effect on A53T α -synuclein transgenic Parkinson mice, its mechanism may be mainly related to the inhibition of many apoptotic related signaling pathways.

[**Key words**] *Gastrodiae Rhizoma*; decoction; A53T α -synuclein; transgene; Parkinson mice; transcriptome; apoptosis

帕金森病(PD)是一种继阿尔茨海默病后的第二大类神经退行性疾病,其临床症状包括静止性震颤、肌僵直、运动迟缓等,疾病晚期可发展为痴呆^[1]。PD 关键的病理特征为黑质多巴胺(dopamine, DA)神经元变性缺失导致纹状体中 DA 含量减少,残存的神经元细胞内出现纤维状 α -突触核蛋白和过度磷酸化神经细丝形成的嗜酸性路易小体(LBs)^[2]。目前对其病因及病理机制的认识正不断深入,主要涉及遗传因素、细胞凋亡、免疫炎症反应、氧化应激学说、线粒体功能障碍、兴奋性氨基酸学说和 α -突触核蛋白集聚等。虽然 PD 的发病机制尚未完全阐明,但诸多学说均表明多种因素导致 PD 病变,引起黑质 DA 能神经元变性死亡。PD 患者神经损伤最终的主要表现形式为细胞凋亡^[3-4], PD 动物模型研究结果也证明凋亡参与了疾病的病理过程^[5-6]。因此,研究 PD 发病过程中 DA 神经元死亡机制对寻找其有效治疗方法具有重要意义。

天麻临床多用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、癫痫、抽搐等^[7]。现代药理研究表明天麻有效成分天麻素具有广泛的神经保护作用,能够有效减轻脑缺血再灌注损伤,防治部分中枢神经系统退行性疾病,抑制神经性疼痛,兼有镇静催眠、抗衰老等功效,可通过多种机制对神经元起到保护作用^[8-10]。因此,本实验采用天麻水煎液预处理 PD 转基因模型小鼠,并运用转录组学分析方法探讨天麻对 PD 的分子作用机制。

转录组学是一门在整体水平上研究特定时空某一细胞中基因全部转录本的种类及结构,揭示基因

转录、调控规律以及疾病发生过程中分子机制的学科^[11],其作为功能基因组学研究的重要组成部分,在生命科学、医学领域已得到广泛应用。在中医学领域,转录组学主要用于中医辨治理论实质研究^[12-14]及方药有效成分的筛选和作用机制研究^[15-16];在西医学领域中,转录组学已逐渐运用于复杂疾病(癌症、肝炎、糖尿病等)的诊断^[17-18]。目前,利用转录组学技术研究疾病的转录组信息,系统阐明其基因表达调控规律,构建基因调控网络,已经成为医药学研究领域的热点。基于此,本实验采用转录组学方法,以 PD 转基因小鼠为动物模型,预给予天麻水煎液处理,取其发病部位黑质进行转录组学测序分析,以期阐明天麻发挥神经保护作用的分子机制,为天麻治疗 PD 提供理论依据。

1 材料

RM2016 型病理切片机(上海莱卡仪器有限公司),ECLIPSE Ci 型正置光学显微镜(日本尼康公司);PTC-200 型梯度聚合酶链式反应(PCR)仪, DYCP-34A 型电泳槽和 GelDoc™ XR + 型凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司。天麻饮片(四川赤健中药科技有限公司,龙潭沙地二级品,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎),多巴丝肼片(美多芭,国药准字 H10930198,上海罗氏制药有限公司,批号 SH2806,规格为左旋多巴 200 g/苄丝肼 50 mg),水为蒸馏水或双蒸水。A53T α -突触核蛋白上游引物为 5'-TGTAGGCTCCAAAACCAAGG-3',下游引物为 5'-TGTCAGGATCCACAGGCATA-3';内参基因上游引物

为 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAAGATCT-3', 下游引物为 5'-GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC-3', 以上引物均由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

A53T α -突触核蛋白转基因帕金森病 (PD) 小鼠, 鼠龄 8 周, 雄鼠, 体质量 (22 ± 2) g, 购自南京大学-南京生物医药研究院, 合格证号 SCXK(苏)2015-0001, SPF 级实验动物饲养环境, 温度 (24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (60 ± 10)%, 定时通风换气, 模拟标准昼夜系统即 12 h 光照 + 12 h 黑夜, 适应性喂养 1 周, 给予自由饮食和饮水。实验中所有操作均遵循成都中医药大学实验动物伦理委员会的批准, 批准号 TCM-2016-312。

2 方法

2.1 A53T PD 转基因小鼠基因型鉴定 小鼠鼠尾全 DNA 提取后用 PCR 技术对突变基因 A53T α -突触核蛋白进行扩增, 扩增产物条带 248 bp, 内参基因扩增产物条带 324 bp; PCR 扩增总体积 25 μL , 包括 MasterMix 5.25 μL , 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1.0 μL , 模板 1.0 μL , 双蒸水 16.75 μL 。PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min, 设计 3 次实验重复。PCR 反应结束后, 取产物 5 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶上, 经电泳 (170 V, 25 min) 处理后利用凝胶成像设备观察结果, 确定小鼠是否携带 A53T α -突触核蛋白基因。

2.2 动物分组及给药 以 8 周龄 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠为实验对象, 将 32 只小鼠随机分为 4 组, 空白组、模型组、实验组、阳性组, 正常饲养至 12 周。实验组每天灌胃给予 $7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 天麻水煎液 (用水一次性制成剂量为 $7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 天麻水煎液浓缩液, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用), 天麻药理用量参照陈慧等^[19]所用方法, 稍有改动; 阳性组小鼠按剂量 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予美多芭^[20]; 空白组和模型组灌胃等量水, 共 4 周, 灌胃结束的第 2 天对小鼠进行爬杆行为学检测, 实验期间正常饲养, 不采取任何处理。

2.3 爬杆实验 参照 Ogawa 等^[21]所用测试方法, 将一直径 2.5 cm 的软木小球固定于一垂直 (长 50 cm 和粗 1 cm) 的木杆顶端, 木杆上缠上纱布以防打滑, 将被测小鼠放到小球上, 记录小鼠从小球上下来的时间、爬过杆的上半部分所用时间、小鼠爬完杆的下半部分所用时间。若 3 s 内完成上述任一动作的记 3 分, 6 s 内完成的记 2 分, >6 s 的记 1 分。记录每只小鼠得分情况, 采用 SPSS 22.0 软件进行统

计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 多组间比较采用最小显著性差异法 (LSD) 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.4 小鼠脑组织取材及苏木素-伊红 (HE) 染色 每组 5 只动物腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉 (剂量 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 麻醉成功后将其仰卧于固定板上, 伸展固定四肢, 开胸腹充分暴露心脏和肝脏。经左心室迅速插管并固定, 同时剪开右心耳, 快速灌注生理盐水 50 mL, 待肝脏完全变白且右心耳流出液体为澄清时, 灌注 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 4% 多聚甲醛 40 mL, 至肝脏、四肢僵硬, 迅速开脑取脑组织, 脑组织于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 以上, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋, 脑冠状切片 (切片厚度 4 μm), HE 染色, 然后进行形态学观察和黑质神经元细胞计数 (所制切片在 40 倍物镜下计算 1 cm^2 面积内正常神经元数目, 随机选取 5 个视野下面积, 取平均值); 每组余下 3 只动物用于转录组测序, 脱臼处死后, 冰上迅速开脑取黑质组织, 液氮保存, 以备 RNA 提取。

2.5 转录组测序及功能注释 将天麻组、模型组及空白组小鼠的大脑黑质组织按 RNA 试剂盒说明书提取每个样品组织总 RNA, RNA 浓度和纯度质检合格后, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠分离、纯化, 片段化后合成第一、第二链 cDNA, 末端修复, 3' 末端加 A, 连接接头, 富集等, 构建 A53T α -突触核蛋白小鼠 cDNA 转录组文库。文库质检合格后, 使用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台测序。测序所得的原始序列经过滤获得高质量整洁序列, 通过 TopHat2 软件与指定参考基因组比对得到 mapped reads, 经可变剪接、基因结构优化分析后得到海量序列 (unigenes), 所得序列 (unigene) 与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中 RefSeq Non-Redundant Proteins (NR), Gene Ontology (GO), Clusters of Orthologous Groups (COG), EuKaryotic Orthologous Groups (KOG) 以及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 等数据库比对, 获得 unigene 功能注释信息。

2.5.1 差异表达分析 将天麻组、模型组、空白组测序所得的 reads 与 unigene 库进行比对, 根据比对结果, 结合 RSEM 软件进行表达量水平估计, 利用 FPKM 值 (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped) 表示对应 unigene 的表达丰度, 假阳性率 (FDR) ≤ 0.05 , 计算的绝对值 $\log_2 \text{FC} \geq 2$, 其中 FC (fold change) 表示两样品间表达量的比值。采用 DEGseq R 进行样本差异表达分

析,使用 GOseq R, KOBAS 软件对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,在差异表达基因(DEGs)中通过与全转录组数据进行比对以确定各个基因的功能类别和通路。

2.5.2 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)验证关键凋亡基因 采用 Real-time PCR 对转录组数据中参与凋亡通路的差异表达基因进行量化,选取数据库中凋亡通路的关键基因,根据其核苷酸序列,设计荧光定量 PCR 引物见表 1,使用 β -肌动蛋白

(β -actin)为内参基因。使用 CFX 1000 Real-Time PCR 平台进行荧光定量 PCR 试验,以小鼠中脑黑质组织建库的 cDNA 样品为模板,PCR 总体系 25 μ L: SsoFast™ EvaGreen Supermix 10 μ L,上、下游引物(10 nmol·L⁻¹)各 1.0 μ L,适量模板与双蒸水。PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 孵育 20 s,94 $^{\circ}$ C 变性 5 s,退火温度(T_m)下退火与延伸 20 s,40 个循环;溶解曲线程序升温 65~95 $^{\circ}$ C,升温速度 0.5 $^{\circ}$ C·s⁻¹。使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算结果,设计 3 次实验重复。

表 1 Real-time PCR 的引物设计

Table 1 Primer design of Real-time PCR

基因名称	基因 ID	引物	引物序列(上游 5'—3',下游 5'—3')	序列碱基数/个	T_m / $^{\circ}$ C
原癌基因 <i>c-Fos</i>	ENSMUSG00000021250	上游	GCATCATCTAGGCCAGTG	19	57
		下游	GGAGTCAGCTCAGGGTAGG	20	
p38 丝裂原活化蛋白激酶(<i>p38 MAPK</i>)	ENSMUSG00000022610	上游	CGGAGATGATTACTGGGAAGA	21	56
		下游	AAGGGACTCAAAGTATGGATGG	22	
人促分裂素原活化蛋白激酶激活的蛋白激酶 3(<i>MAPKAPK3</i>)	ENSMUSG00000032577	上游	TGGATTCCCACCTTCTA	18	53
		下游	CAGGTCCTTGATCTTCACC	19	
神经肽 Y(<i>NPY</i>)	ENSMUSG00000029819	上游	TCACAGAGGCACCCAGAG	18	57
		下游	AGATTGATGTAGTGTCCGACAG	22	
多巴胺第三受体(<i>DRD3</i>)	ENSMUSG00000022705	上游	AAGCAGCCACATCAACTC	18	54
		下游	GACATCCAGGGTGACAAA	18	
Ras 蛋白特异鸟嘌呤核苷酸释放因子 1(<i>RASGRP1</i>)	ENSMUSG00000027347	上游	GTCTCCCAAACCTGACCC	18	56
		下游	TTGCACTCGAACACCACC	18	
β -actin	-	上游	GAGACCTTCAACACCCGAGC	20	58
		下游	ATGTCACGCACGATTCCC	19	

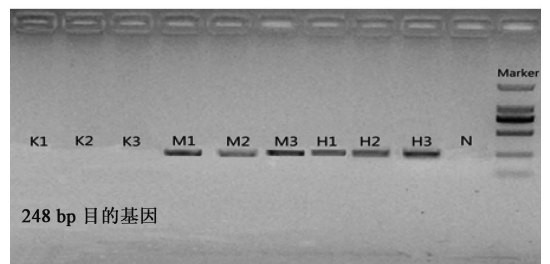
3 结果

3.1 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠基因型的鉴定

PCR 扩增后进行凝胶电泳成像,根据其条带判断转基因小鼠基因型。结果发现 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠在 248 bp 处有明显的条带,与目的基因 α -突触核蛋白 cDNA 片段的预期位置相符,见图 1, 2,说明造模成功。

3.2 爬杆试验 对各组小鼠进行爬杆能力检测,结果空白组、模型组、美多芭组、天麻组得分分别为(34.80 \pm 3.192), (29.48 \pm 3.873), (31.71 \pm 4.450), (30.56 \pm 3.681)分。与空白组相比,模型组、美多芭组、天麻组差异显著($P < 0.05$)。与模型组小鼠相比,采用天麻水煎液和美多芭治疗后爬杆能力均有提高,但美多芭组提高显著($P < 0.05$)。

3.3 HE 染色及计数观察小鼠中脑黑质神经元病



K1~K3. 空白组;M1~M3. 模型组;H1~H3. 天麻组;N. 阴性组;Marker. DL2000(图 2 同)

图 1 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠目的基因的鉴定

Fig. 1 Identification of target genes in A53T α -synuclein transgenic mice

变 显微镜下观察 HE 染色切片,结果显示空白组小鼠黑质致密度神经元数量丰富,胞体较大,多为椭圆形,胞浆染色较淡,核仁清楚。与空白组相比,模

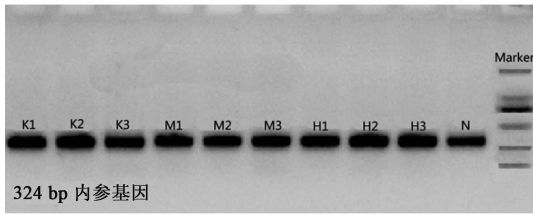
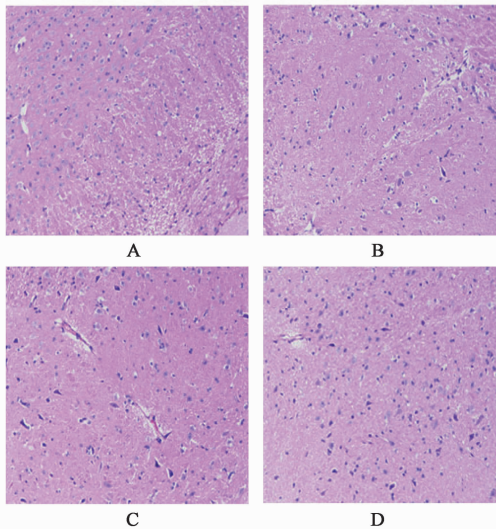


图 2 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠内参基因的鉴定
Fig.2 Identification of internal control genes in A53T α -synuclein transgenic mice

型组部分神经元胞体深染,胶质细胞增生,说明 A53T α -突触核蛋白小鼠神经元损伤,出现 PD,造模成功。美多芭组黑质正常神经元数目仅次于空白组,部分黑质细胞黑色素减少,部分神经元胞体深染,胞核浓染。天麻组染色结果和美多芭组较为相似,且天麻组、美多芭组 5 个视野黑质正常神经元平均数量均显著高于模型组 ($P < 0.05$),形态上可观察到天麻组黑质残存的神经元较多,细长、深染的神经元数量较少,胶质细胞增生得到改善,说明天麻具神经元保护作用。见图 3。



A. 空白组; B. 模型组; C. 美多芭组; D. 天麻组
图 3 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠的黑质区神经元病理变化 (HE, $\times 200$)
Fig.3 Pathological changes of neurons in substantia nigra region of A53T α -synuclein transgenic mice (HE, $\times 200$)

3.4 测序及序列评估 完成了 9 个样品(空白组、模型组、天麻组)的转录组分析,经测序质量控制,共获得 Clean Data 74.34 Gb,各样品 Clean Data 均达到 7.04 Gb,质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比(Q30)在 85.92% 及以上。分别将各样品的 Clean reads 与指定的参考基因组进行序列比对,比对效率从 79.70% 到 86.35% 不等。测序数据见表 2。

表 2 测序数据的统计

Table 2 Statistics of sequencing data

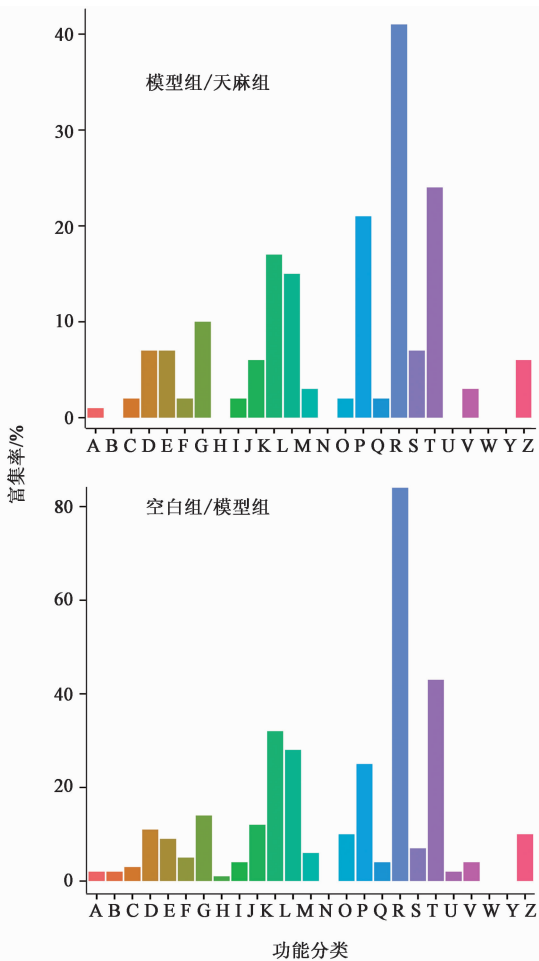
组别	编号	Clean reads /个	Clean bases /个	GC content/%	Q30 /%
空白	K1	26 493 241	7 916 017 082	50.53	89.47
	K2	30 882 364	9 180 812 500	50.55	89.98
	K3	26 216 252	7 830 571 972	50.56	89.89
模型	M1	27 111 998	8 072 903 188	52.05	86.22
	M2	23 679 218	7 041 484 148	50.88	85.92
	M3	27 086 643	8 078 532 496	51.66	86.67
天麻	H1	27 916 721	8 340 119 090	50.68	89.59
	H2	30 943 050	9 212 940 704	50.90	89.45
	H3	29 116 154	8 668 342 554	51.22	89.92

注: Clean reads. Clean Data 中 pair-end reads 总数; Clean bases. Clean Data 总碱基数; GC content. Clean Data 中碱基鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)占总碱基的百分比。

3.5 差异表达基因功能注释及分类 使用 FPKM 方法对天麻组、模型组及空白组的基因表达水平进行测量,基于总体表达量的 FPKM 分析数据表明,差异表达基因共计 788 个。模型组比空白组显示 369 个基因表达上调,419 个基因表达下调;天麻组比模型组表明 292 个基因表达上调,174 个基因表达下调。所得差异基因通过与 NR, Swiss-Prot, GO, COG, KOG, KEGG 等公共数据库比对,获得注释信息。COG 功能分类显示,共计 178 个差异基因被注释,分布于 19 类,见图 4,其类别代表中最大的组为“一般功能预测”(41 个基因),其次是信号转导机制(24 个基因)及无机离子转运与代谢(21 个基因)。

GO 分析过程中,148 个差异基因分类于 27 个功能项中,包括 14 个生物过程方面的功能,9 个细胞组成成分功能与 4 个分子功能,见图 5。其中参与生物过程富集较为丰富的是细胞过程(GO: 0009987)及代谢过程(GO: 008152),细胞成分(GO: 0044464)和细胞(GO: 0005623)为细胞组成成分功能中的广大代表,分子功能比较丰富的归纳为拼接(GO: 0005488)及结构分子活性(GO: 0005198)。

此外,获得的差异基因通过 BLASTx 和 KEGG 分析比对表明,与空白组相比,模型组有 788 个基因表达上调或下调,涉及 215 条代谢通路,其中基因含量最丰富的是神经活性的配体-受体相互作用途径(30 个基因),其次是磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶



A. RNA processing and modification; B. chromatin structure and dynamics; C. energy production and conversion; D. cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E. amino acid transport and metabolism; F. nucleotide transport and metabolism; G. carbohydrate transport and metabolism; H. coenzyme transport and metabolism; I. lipid transport and metabolism; J. translation, ribosomal structure and biogenesis; K. transcription; L. replication, recombination and repair; M. cell wall/membrane/envelope biogenesis; N. cell motility; O. posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P. inorganic ion transport and metabolism; Q. secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R. general function prediction only; S. function unknown; T. signal transduction mechanisms; U. intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V. defense mechanisms; W. extracellular structures; Y. nuclear structure; Z. cytoskeleton

图 4 差异表达基因 COG 分类柱状

Fig. 4 COG histogram classification of differential expression genes

B 途径(22 个基因)和 Ca^{2+} 途径(19 个基因)。与模型组相比,天麻组共 466 个基因表达上调或下调,涉及 177 条代谢通路,主要涉及神经活性的配体-受体相互作用途径(23 个基因),磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B 途径(14 个基因),环磷酸腺苷途径(11 个基因),原癌基因途径(10 个基因)等。

3.6 天麻水煎液应对凋亡相关信号的代谢途径改

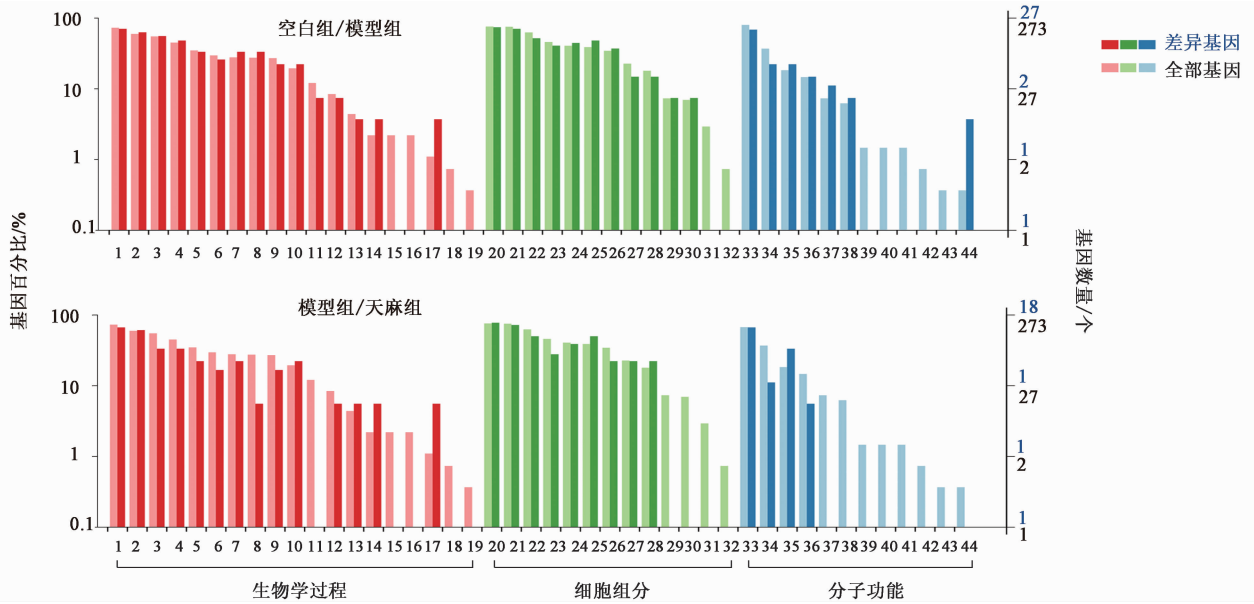
变 与模型组比较,天麻组出现上调表达基因 292 个,下调表达基因 174 个,差异表达基因主要涉及 *Ras*, *p38 MAPK* 及 Ca^{2+} 等相关凋亡途径的抑制或激活。经天麻水煎液干预后 *DRD3*, *RASGRP1*, *NPY* 等基因出现表达上调; *c-Fos*, *p38 MAPK* 和 *MAPKAPK3* 等基因出现表达下调。

3.7 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠凋亡关键基因的活性验证 为验证转录组数据库中天麻组抗凋亡关键基因的转录丰度,使用 Real-time PCR 对其 RNA 表达量进行验证,基因信息及引物序列见表 1 和图 6。结果显示各基因在天麻组中均有表达,且相对表达丰度与转录组数据基本一致。

4 讨论

随着转录组测序技术的飞速发展,转录组学研究进入了全新时代,因其在全基因转录水平上的整体性、系统性特点,深受中医药研究者的喜爱,利用转录组学分析能挖掘与中药有效成分相关的功能基因和代谢通路,可从分子水平上阐述有效成分的作用机制。因此,近年来转录组学已被广泛用于中医药学研究中,以寻找疾病的治疗靶点。本研究采用表达人 A53T α -突触核蛋白变种的小鼠为实验动物,由于其能较好地模拟 PD 症状,目前已作为 PD 模型广泛应用于科学研究。通过基因鉴定、爬杆行为学检测及 HE 染色计数实验说明动物造模成功。行为学试验显示,与模型组相比,天麻组爬杆能力有所提高但无统计学意义,推测可能由于成长周期过短,行为学上还未完全出现 PD 症状。转录组分析结果提示 *c-Fos*, *p38 MAPK*, *NPY*, *RASGRP1*, *DRD3* 可能是天麻抗凋亡的关键基因。

c-Fos 蛋白是一种即刻早期基因^[22],其作为第 3 信使表达着 Fos 蛋白的变化,反映细胞信号传导的改变。受到刺激后 *c-Fos* 的表达非常明显和迅速,因此其蛋白活性常作为显示神经元活动和神经功能通路的标志物^[23]。当受到刺激时, *c-Fos* 基因编码的蛋白 Fos 常与原癌基因 *c-Jun* 产物 Jun 结合成异源二聚体核蛋白复合物,激活蛋白 1 (AP-1) 以此启动促凋亡基因引发凋亡。同时, Jun 和 Fos 均可结合脂肪酸合成酶 (Fas) 启动子,启动凋亡^[24]。本研究表明 PD 转基因小鼠经天麻水煎液给药后,其 *c-Fos* 基因表达出现下调,推测天麻水煎液抗凋亡作用可能是通过下调 *c-Fos* 基因表达,降低 Fos 蛋白与 Jun 蛋白的结合,减少 AP-1 的形成,同时也降低了 Fos 蛋白与促凋亡基因 *Fas* 的结合,以此对抗黑质神经元的凋亡。



1. cellular process; 2. metabolic process; 3. single-organism process; 4. biological regulation; 5. response to stimulus; 6. developmental process; 7. cellular component organization or biogenesis; 8. localization; 9. multicellular organismal process; 10. immune system process; 11. signaling; 12. locomotion; 13. multi-organism process; 14. biological adhesion; 15. reproduction; 16. reproductive process; 17. growth; 18. biological phase; 19. cell killing; 20. cell part; 21. cell; 22. organelle; 23. membrane; 24. organelle part; 25. macromolecular complex; 26. membrane part; 27. extracellular region; 28. extracellular region part; 29. synapse; 30. synapse part; 31. membrane-enclosed lumen; 32. cell junction; 33. binding; 34. catalytic activity; 35. structural molecule activity; 36. enzyme regulator activity; 37. transporter activity; 38. guanyl-nucleotide exchange factor activity; 39. molecular transducer activity; 40. nucleic acid binding transcription factor activity; 41. receptor activity; 42. protein binding transcription factor activity; 43. channel regulator activity; 44. electron carrier activity

图 5 差异表达基因 GO 注释分类统计

Fig. 5 GO annotation classification statistics of differential expression genes

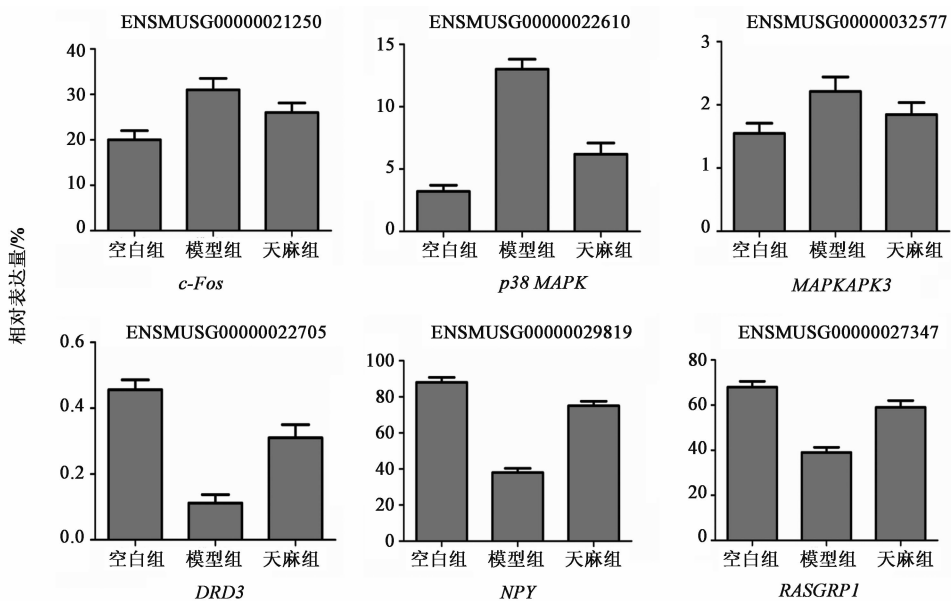


图 6 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠凋亡关键基因的活性验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Verification of activity of key genes of apoptosis in A53T α -synuclein transgenic mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

MAPKs 级联反应通路是重要的细胞内信号转导通路之一, 当胞外有刺激时会发生磷酸化而活化, 活化前的 MAPK 位于胞浆, 活化后立即进入核内,

激活靶基因将胞外信号向胞核内传递, 从而调节细胞的增殖、分化及凋亡等过程。细胞外信号调节激酶 (ERK), c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 和 p38 为

MAPK 家族中最重要的 3 个亚族,其参与细胞的增殖、分化和凋亡。本研究结果显示经天麻水煎液给药后 PD 转基因小鼠 *p38 MAPK* 基因均表达下调,这与 PD 患者脑组织中 *p38* 信号转导通路明显活化^[25]结果相一致,提示天麻水煎液可能通过抑制 *p38 MAPK* 基因表达,使 MAPKs 激酶的激酶 (MEKKs)/转化生长因子 β 活化激酶 (TAK)-MAPK 激酶 6 (MKK6)/MKK3-*p38 MAPK* 途径抑制,阻碍酪氨酸和苏氨酸组成的 T-X-Y 结构的双位点磷酸化,以此调控下游转录因子的活性,发挥神经元保护作用。体外实验结果也显示,使用 *p38* 抑制剂可有效抑制 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 引起的 DA 能神经元的损伤及凋亡^[26],说明 *p38 MAPK* 基因可能是治疗 PD 的有效靶基因。

此外,与模型组相比,预给予天麻水煎液能显著上调 PD 小鼠 5-羟色胺 (5-HT) 受体, NPY 受体, *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸离子能谷氨酸受体 2A 和 2B (GRIN2A 和 GRIN2B) 受体及 DRD3 的基因表达。5-HT 受体, NPY 受体及 DRD3 均在脑中广泛分布,其与情绪及精神活动的调节密切相关,在重要的生理功能及病理条件如癫痫、慢性疼痛、抑郁、焦虑和神经退行性疾病中起着重要的作用^[27]。而 PD 患者发病过程中常伴随着情绪及精神活动的失调,本研究结果提示 5-HT 受体, NPY 受体及 DRD3 的基因均为 Ras 通路上游基因,这些基因表达上调可激活 RASGRP1,进而激活 Ras 下游基因,天麻水煎液发挥抗凋亡作用可能是通过 Ras 途径,激活下游基因如细胞外信号调节激酶 1/2 (EPK1/2),蛋白激酶 B (Akt) 等,启动 B 细胞淋巴瘤基因 (Bcl) 和核转录因子 (NF)- κ B 使促生存基因表达。此外,现代研究表明第二代非麦角碱类化合物——DRD3 激动剂普拉克索和罗匹尼罗,在 PD 治疗的各阶段都有效,特别是对于左旋多巴治疗起效甚微的晚期患者^[28],说明 Ras 通路上游基因对 PD 患者起到了一定的辅助治疗作用。

本研究还发现相比于模型组,天麻组中环核苷酸磷酸二酯酶 1A (*PDE1A*) 基因表达上调,使嘌呤代谢产物尿酸含量明显增加。尿酸具有很强的抗氧化功能,对多巴胺能神经元具有保护作用,能降低 PD 的发病风险,并与 PD 的病程和预后相关,具有潜在的治疗意义^[29]。由此可见,天麻具有神经保护作用,在 PD 治疗中有显著的应用前景,本研究提示天麻发挥神经保护作用可能与其抗凋亡机制相关。

[参考文献]

- [1] Heisters D. Focus on Parkinson's; causes, treatment and support [J]. Br J Community Nurs, 2011, 16 (4): 182-183.
- [2] 张丽,张连峰. α -synuclein 致病机制和转基因帕金森疾病模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22 (11): 63-67.
- [3] Kobayashi H, Oikawa S, Umemura S, et al. Mechanism of metal-mediated DNA damage and apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. Free Radic Res, 2008, 42 (7): 651-660.
- [4] 吴建军,肖清,刘凯,等. 细胞凋亡学说在帕金森病发病机制的理论探索 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29 (16): 2135-2137.
- [5] Sauer H, Oertel W H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat [J]. Neuroscience, 1994, 59 (2): 401-415.
- [6] Saporito M S, Thomas B A, Scott R W. MPTP activates c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons *in vivo* [J]. J Neurochem, 2000, 75 (3): 1200-1208.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 58-59.
- [8] WANG Y, WU Z, LIU X, et al. Gastrodin ameliorates Parkinson's disease by downregulating connexin 43 [J]. Mol Med Rep, 2013, 8 (2): 585-590.
- [9] WANG X L, XING G H, HONG B, et al. Gastrodin prevents motor deficits and oxidative stress in the MPTP mouse model of Parkinson's disease; involvement of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway [J]. Life Sci, 2014, 114 (2): 77-85.
- [10] HU Y, LI C, SHEN W. Gastrodin alleviates memory deficits and reduces neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neuropathology, 2014, 34 (4): 370-377.
- [11] 祁云霞,刘永斌,荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用 [J]. 遗传, 2011, 33 (11): 1191-1202.
- [12] 马晓娟,殷惠军,陈可冀. 血瘀证患者差异基因表达谱研究 [J]. 结合医学学报 (英文), 2008, 6 (4): 355-360.
- [13] 严石林,沈宏春,王浩中,等. 3 种疾病肾阳虚证“同证异治”的信号通路调控研究 [J]. 云南中医学院学报, 2012, 35 (1): 5-9.
- [14] 王阶,姚魁武,刘咏梅,等. 冠心病血瘀证转录组学研究——病证结合生物标志物研究思路与方法 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (19): 1-5.

- [15] 仇凤梅,曹巧巧,张如松. 中药抗肿瘤有效成分的药效基团研究概况[J]. 现代肿瘤医学,2008,16(4):666-671.
- [16] 张大燕,文欢,王伟,等. 乌头萜类生物合成代谢的转录组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(16):45-50.
- [17] CHEN L,LI Y,LIN C H,et al. Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma[J]. Nat Med,2013,19(2):209-216.
- [18] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:33-34.
- [19] 陈慧,艾国,黄正明. 天麻最细粉和普通粉对帕金森病大鼠神经行为学、氧化应激反应和神经炎症反应的对比研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(3):144-148.
- [20] 邝少松. 银杏叶提取物对帕金森疾病动物模型的治疗作用研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.
- [21] Ogawa N,Hirose Y,Ohara S,et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice [J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1988, 50 (3):435-441.
- [22] Hitier M, Besnard S, Smith P F. Vestibular pathways involved in cognition[J]. Front Integr Neurosci,2014,8(8):59-75.
- [23] Velazquez F N, Prucca C G, Etienne O, et al. Brain development is impaired in *c-fos* - / - mice [J]. Oncotarget,2015,6(19):16883-16901.
- [24] 周长春,刘芝华,齐军,等. AP-1 和肿瘤关系研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(1):1-5.
- [25] Corrêa S A L, Eales K L. The role of p38 MAPK and its substrates in neuronal plasticity and neurodegenerative disease [J]. J Signal Transduct, 2012, doi: 10.1155/2012/649079.
- [26] Hwang C J, Choi D Y, Jung Y Y, et al. Inhibition of p38 pathway-dependent MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in estrogen receptor alpha knockout mice [J]. Horm Behav, 2016, doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.01.011.
- [27] Decressac M, Barker R A. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair[J]. Exp Neurol,2012,238(2):265-272.
- [28] 祝辉,杨日芳,李锦,等. 多巴胺 D3 受体选择性配体研究进展 [J]. 解放军药学学报, 2006, 22 (6):441-445.
- [29] Hooper D C, Scott G S, Zborek A, et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis [J]. FASEB J,2000,14(5):691-698.

[责任编辑 刘德文]