

天麻素对糖氧剥夺再复供皮层神经细胞 NF- κ B 炎症级联信号通路表达的影响

文欢, 张大燕, 王伟, 高继海, 饶朝龙*, 彭成*

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

[摘要] **目的:**研究天麻素对糖氧剥夺再复供损伤原代皮层神经细胞的保护作用,以及对炎症相关信号通路表达的影响。**方法:**构建皮层神经细胞糖氧剥夺再复供(OGD/R)损伤模型,随机分为空白组、模型组、天麻素(80,60,40 mg·L⁻¹)组。噻唑蓝(MTT)比色法测定皮层细胞存活率,比色法测定乳酸脱氢酶(LDH)漏出率,高通量RNA-Seq测序分析技术检测处理细胞的所有基因转录本的表达差异,通过功能注释与富集分析筛选出与OGD/R损伤或天麻素预处理保护作用相关的基因分子与代谢通路。**结果:**OGD/R损伤后皮层细胞活性下降,LDH释放增加,而天麻素预处理能提高细胞存活率,并显著下调LDH漏出率,转录组测序分析发现其分子机制主要涉及核转录因子- κ B(NF- κ B,18 gene),肿瘤坏死因子(TNF,21 gene)等信号通路的抑制调控。与模型组比较,天麻素下调了NF- κ B,Toll样受体2(TLR2),肿瘤坏死因子受体1/2(TNFR1/2),白细胞介素-6(IL-6),细胞间黏附分子-1(ICAM-1),干扰素诱导蛋白-10(IP-10),CC趋化因子2(CCL2),CXC趋化因子1/2/3(CXCL1/2/3),CXC趋化因子9(CXCL9/Mig)等多种炎症相关信号分子的转录表达。**结论:**天麻素对OGD/R损伤皮层神经细胞具有保护作用,其机制主要与抑制TLR-NF- κ B-TNF炎症级联相关信号通路表达相关。

[关键词] 天麻素;皮层神经细胞;糖氧剥夺再复供;转录组;炎症

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0104-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210104

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1027.026.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:27

Effect of Gastrodin on Expression of NF- κ B Inflammatory Cascade Signaling Pathway in Cortical Neurons After Oxygen-glucose Deprivation and Reperfusion

WEN Huan, ZHANG Da-yan, WANG Wei, GAO Ji-hai, RAO Chao-long*, PENG Cheng*

(State Key Laboratory and Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, School of Pharmaceutical, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of gastrodin on primary cortical neurons damaged by oxygen-glucose deprivation and reperfusion (OGD/R), and the impact on expression of inflammation-related signaling pathway. **Method:** The primary cortical neurons of rats were randomly divided into control group, model group, and high, middle and low-dose gastrodin (80, 60, 40 mg·L⁻¹). The OGD/R damage model was built by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. The survival rate of nerve cells was determined by 3- (4, 5-

[收稿日期] 20170527(003)

[基金项目] 国家自然科学基金人才培养项目(J1310034);中药资源四川省青年科技创新研究团队项目(2015TD0028);四川省中医药管理局项目(2016Z008)

[第一作者] 文欢,在读硕士,从事中药药理学研究,Tel:18215525273,E-mail:1083816976@qq.com

[通讯作者] *饶朝龙,博士,教授,从事中药药理与毒理研究,Tel:13908066335,E-mail:184950883@qq.com;

*彭成,博士,研究员,从事中药药理与毒理研究,Tel:028-61800018,E-mail:pengchengchengdu@126.com

dimethyl-2-thiazolyl) -2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) method, and the leakage rate of lactate dehydrogenase (LDH) was measured by colorimetric method, high-throughput RNA-Seq transcriptome sequencing analysis was used to detect the differential expressions of all genes in the treated cells, and the OGD/R damage or protection-related genes or/and metabolic pathways were screened by functional annotation and enrichment analysis. **Result:** The activity of cortical cells decreased and the release of LDH increased after OGD/R, while gastrodin pretreatment increased cell viability and significantly lowered the LDH leakage rate. The sequence analysis revealed that the molecular mechanism mainly involved the inhibition of NF-kappa B signaling pathway (NF- κ B, 18 gene), and tumor necrosis factor signaling pathway (TNF, 21 gene). Compared with the model group, gastrodin inhibited expressions of NF- κ B, Toll like receptor 2 (TLR2), tumor necrosis factor receptor 1/2 (TNFR1/2), interleukin-6 (IL-6), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), interferon-inducible protein-10 (IP-10), monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1), CXC-chemokine 1/2/3 (CXCL1/2/3), CXC-chemokine 9 (CXCL9/Mig), and other inflammatory signaling molecules. **Conclusion:** Gastrodin has a protective effect on the cortical neurons of rats after oxygen-glucose deprivation and reperfusion, and its mechanism is mainly related to the inhibition of TLR-NF- κ B-TNF inflammatory cascade-related signaling pathways.

[**Key words**] gastrodin; cortical nerve cell; oxygen-glucose deprivation and reperfusion; transcriptome; inflammation

脑缺血再灌注损伤是指脑血供中断引起的脑损伤,通过恢复血供而加重,既往好发于脑外,休克等过程中的危重症,但随着心脏体外大循环手术,心脏移植等多种心血管外科手术的广泛开展,其发病率越发增高,已成为诱发脑梗死的重要原因,已经严重威胁到人类的身心健康^[1]。脑缺血再灌注损伤机制复杂,涉及兴奋性氨基酸毒性作用、氧化应激、血脑屏障破坏、钙超载、细胞凋亡、自噬以及免疫炎症反应等,尚无有效的干预手段,因而合理选择药物种类、给药方式及时间窗对预防和治疗脑缺血再灌注损伤后神经损伤具有重要意义^[2-4]。

天麻作为治风神药,有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络之功效,临床常用于美尼尔氏综合征、基底动脉缺血等与脑供血不足有关疾病的治疗^[5]。天麻素是其有效成分之一,具有促进受损脑组织的恢复、镇静、安神、缓解神经性头痛等作用^[6]。有关资料证明天麻素能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡等效应改善脑缺血病理损伤^[7-8],但其作用机制尚不完善。因此,本研究拟通过糖氧剥夺再复供(oxygen-glucose deprivation and reperfusion, OGD/R)损伤原代皮层神经细胞体外模拟脑缺血再灌注,采用高通量 RNA-Seq 转录组测序分析技术检测处理细胞的所有基因转录本的表达差异情况,通过功能注释与富集分析筛选出与 OGD/R 损伤或保护相关的基因和代谢通路,以期在转录组水平上阐释天麻素对糖氧剥夺再复供损伤皮层神经细胞保护作用的机制,促进治风神药的现代化研究。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,新生 24 h 内,雌雄皆用,由成都达硕动物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2015-0030。实验动物的开展取得了成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 ACCDU-2015-116)。

1.2 试剂 天麻素对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号 62499-27-8);胰蛋白酶,DMEM 培养基,胎牛血清(HyClone 公司,批号分别为 J160030, AB214657, GYK0119); Neurobasal Medium, B27 Supplement (Gibco 公司,批号分别为 1806043, 1813319);乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(南京建成生物工程研究所,货号 A020-2);连二亚硫酸钠(上海阿拉丁生化科技公司,批号 7775-14-6)。

1.3 仪器 31384 型超净工作台,3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);HVE-50 型高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司);Allegra® X-12R centrifuge 型低速离心机(美国 Beckman Coulter 公司);CFX1000 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 皮层神经细胞培养^[9] 新生 24 h SD 大鼠浸泡于 75% 乙醇致死,剪取皮层部分,放入预冷的 D-Hank's 溶液,冰盒上剥除脑膜及血管,剪碎,胰酶消化 20 min。消化完成后吸弃胰酶,加入适量含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化,并反复吹打分散细胞。将细胞悬液经 200 目细胞滤网过滤,细胞滤

液转移至离心管, $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 吸弃上清液, 加入适量 DMEM 培养基 (含 10% FBS) 重悬, 计数, 按 5×10^5 个/mL 密度接种于预先经 0.1% 多聚赖氨酸处理过的细胞培养板中。细胞置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中培养, 6 h 后更换为含 2% B27 的 Neurobasal 神经细胞培养基继续培养。以后每 3 d 半量更换培养液, 连续培养至第 7 天进行实验。

2.2 造模及分组^[9] OGD/R 模型制备采用含 $8\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的无糖 Earle's 液培养作为糖氧剥夺处理, 1 h 后更换为含 2% B27 的 Neurobasal 培养基并继续培养 2 h 作为复供处理。实验共分为 5 组, 每组设置 6 个复孔。模型组和实验组分别施以糖氧剥夺再复供处理, 空白组同时更换为含氧含糖的 Earle's 液, 复供处理同模型组和实验组。实验组皮层细胞在造模前 2 h 预先给予天麻素质量浓度为 $40, 60, 80\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养液。

2.3 检测指标

2.3.1 皮层细胞活性、存活率测定 采用噻唑蓝比色 (MTT) 法测定细胞存活率, 细胞复供 2 h 后每孔加入 MTT (终质量浓度 $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $20\ \mu\text{L}$, 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中继续孵育 4 h, 吸弃 MTT, 每孔加入二甲亚砜 (DMSO) $150\ \mu\text{L}$, 轻轻震荡培养板待沉淀充分溶解后用酶标仪在 $570\ \text{nm}$ 测定吸光度 A 。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{各组 } A}{\text{空白组 } A} \times 100\%$$

2.3.2 LDH 漏出率测定 将皮层细胞按上述浓度接种于 48 孔板, 培养、给药及造模处理同前, 细胞复供 24 h 后收集细胞培养液, 重新加入细胞培养液并放入 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱, 6 h 后收集冻融液。按 LDH 试剂盒 (A020-2) 说明书测定细胞培养液和冻融液中 LDH 活性, 并计算 LDH 漏出率。

$$\text{LDH 漏出率} = \frac{\text{细胞液 LDH 活性}}{\text{细胞液 LDH 活性} + \text{冻融液 LDH 活性}} \times 100\%$$

2.4 转录组测序 皮层神经细胞以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 培养至第 7 d 用于实验处理, 实验分为空白组 (control, C), 模型组 (model, M), 实验组 (test, T, 天麻素质量浓度为 $60\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。处理完成后立即采用胰酶消化收集细胞, 保存于液氮, 用于提取 RNA。

按 RNAisoTM Plus (TaKaRa) 说明提取皮层细胞总 RNA, 用带 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA, 并进行随机打断, 反转录成 cDNA 链, 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 采用 AMPure XP beads 进行片段大小选择, 并通过 PCR 扩增富集得到 cDNA 文库。文库质检完成后采用 HiSeq X-ten 进行高通量

测序分析, 测序读长为 PE150。皮层神经细胞样品的转录组测序由北京百迈客生物公司完成。

2.5 数据分析 测序获得的 Raw Data 经去除接头、引物及低质量数据得到 Clean Data, 通过 Blast 软件比对 NT 库, 确定样品无污染。通过 TopHat2 将过滤得到的 Clean Data 与指定的参考基因组进行序列比对, 得到 Mapped Data, 再通过插入片段长度、随机性等检验评估文库质量; 采用 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped) 作为衡量转录本或基因表达水平的指标, 根据转录本或基因在各样品中的表达量差异进行表达水平分析, 并对差异表达基因进行功能注释与富集等信息学分析。

2.6 基因差异表达分析 根据空白组、模型组、实验组间基因表达水平差异, 筛选出差异表达基因。差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选标准为: False Discovery Rate (FDR) < 0.05 且 $\log_2|\text{FC}| \geq 2$, 其中 FC (Fold Change, FC) 表示两样品间表达量的比值。对差异表达基因做信息注释, COG 分类, GO 功能分类与富集, KEGG 通路富集分析。

2.7 关键炎症基因验证 使用 Real-time PCR 方法对天麻抗 OGD/R 损伤转录组中关键炎症基因序列的转录丰度进行验证, 以肌动蛋白 (actin) 为内参, 所涉基因及其引物信息见表 1, 引物合成由成都擎科生物科技有限公司完成。在 Bio-Rad CFX 1 000 Real-time PCR 平台上, 以细胞材料建库的 cDNA 样品为模板, PCR 体系为 $25\ \mu\text{L}$: SsoFastTM EvaGreen Supermix (Bio-Rad, USA) $10\ \mu\text{L}$, 引物 ($10\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.0\ \mu\text{L}$, 适量模板与双蒸水。PCR 程序: $95\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 s, 40 个循环 ($94\ ^\circ\text{C}$ 5 s, T_m 温度下退火与延伸 20 s), 溶解曲线 ($65\sim 95\ ^\circ\text{C}$, $0.5\ ^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$)。实验设置 3 次技术重复, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行定量数据计算。

2.8 统计学方法 实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 天麻素预处理对皮层神经细胞活性、存活率及 LDH 漏出率的影响 采用无糖 Earle's 联合 $8\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 进行糖氧剥夺再复供处理可显著降低皮层神经细胞活性、存活率, 并升高 LDH 漏出率 ($P < 0.05$); 而天麻素预处理使皮层细胞活性、

表 1 关键炎症基因 Real-time PCR 引物信息

Table 1 Primer information of Real-time PCR of key inflammatory genes

引物	编号	序列		长度 /bp	Tm /°C
		上游 5'→3'	下游 5'→3'		
NF-κB	ENSRNOG00000023258	CCCTCTTCGACTACGCGTT	CCCTCACGAGCTGAGCATGA	2 919	60
	ENSRNOG00000019311	AGGCTCTGCCCAAATGTTA	GTGAGGTTGGGGATCCAAG	2 697	62
IL-1β	ENSRNOG00000004649	ATGTCTTGCCCGTGGAGCTT	ATGGGTCAGACAGCAGGAGG	807	62
IL-6	ENSRNOG00000010278	AGCGATGATGCACTGTCAAG	GGAAGTCCAGAAGACCAGAGC	636	59
ICAM-1	ENSRNOG00000020679	TGGTGAAGTCTGTCAAACGG	CCCCTCAATGATCAGTACCAA	1 638	58
IP-10	ENSRNOG00000022256	TGCAAGTCTATCCTGTCCGC	TCTTTGGCTCACCGCTTCA	297	60
TLR2	ENSRNOG00000009822	CTGTGTCTCCACAAGCGGA	CAAAACAAGGATGGCCGCGT	2 355	62
β-actin	ENSRNOG00000001408	AGGTAGCTGCACAAATGCC	TGTCGATGTCACACATGCCG	1 281	61

注: NF-κB. 核转录因子; IL-1β. 白细胞介素-1β; ICAM-1. 细胞间黏附分子-1; IP-10. 干扰素诱导蛋白-10; TLR2. Toll 样受体 2。

存活率提高,同时降低 LDH 漏出率,与模型组比较具有显著性($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 天麻素对皮层神经细胞活性、存活率及 LDH 漏出率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of gastrodin on activity, survival rate and LDH leakage rate of cortical neurons ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞活性 A	存活率 /%	LDH 漏 出率/%
空白	-	0.558 6 ± 0.122	90.96 ± 9.93	30.10 ± 1.503
模型	-	0.350 7 ± 0.094 ¹⁾	62.26 ± 3.72 ¹⁾	68.73 ± 3.785 ¹⁾
天麻素	80	0.383 4 ± 0.093	68.36 ± 2.26 ²⁾	52.49 ± 2.488 ²⁾
	60	0.412 1 ± 0.109	73.20 ± 4.02 ²⁾	48.72 ± 1.053 ²⁾
	40	0.375 6 ± 0.088	67.06 ± 1.45 ²⁾	51.16 ± 1.821 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (图 5 同)。

3.2 转录组测序序列评估 本研究共完成 9 个样品的转录组分析,获得 76.94 Gb Clean Data,各样品 Clean Data 均达到 6.65 Gb, Q30 碱基比率在 90.32% 及以上,测序数据统计结果见表 3。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 81.98% 到 83.21% 不等。

3.3 差异表达基因 通过将空白组、模型组、实验组各基因表达情况比较,获得了 OGD/R 损伤皮层神经细胞的转录组差异表达基因基本信息。基于总体表达量的 FPKM 分析数据表明,合计 2 391 个基因表达有所差异。与空白组比较,模型组细胞中 944 个基因表达上调,1 095 个基因表达下调;与模型组比较,天麻素预处理实验组细胞中 749 个基因表达上调,789 个基因表达下调,差异表达火山见图 1。

表 3 转录组测序数据统计

Table 3 Data of transcriptome sequencing

组别	编号	Clean reads	Clean bases	GC Content /%	≥ Q30 /%
空白	C1	25 364 985	7 456 485 128	52.53	91.22
	C2	32 778 360	9 688 663 884	51.51	90.92
	C3	25 302 802	7 462 207 974	51.10	91.01
模型	M1	22 586 683	6 645 642 526	52.45	91.19
	M2	27 709 560	8 187 876 416	51.68	91.05
	M3	33 711 658	10 042 647 704	51.74	90.32
实验	T1	27 034 269	7 996 592 032	51.26	90.69
	T2	35 346 476	10 501 267 816	51.51	90.57
	T3	30 263 290	8 961 635 418	51.69	90.45

注: Clean reads. Clean Data 中 pair-end Reads 总数; Clean bases. Clean Data 总碱基数; GC content. Clean Data GC 含量,即 Clean Data 中 G 和 C 2 种碱基占总碱基的比率; ≥ Q30. Clean Data 质量值大于或等于 30 的碱基所占的比率。

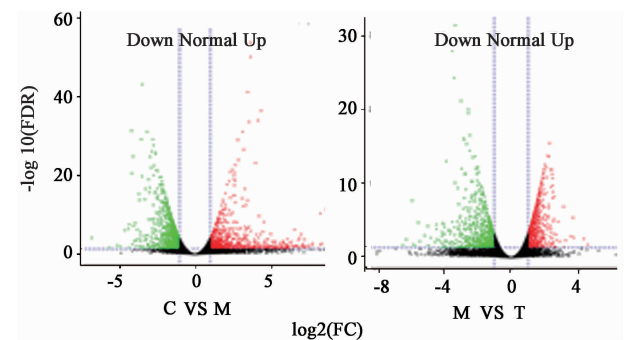


图 1 C VS M 及 M VS T 基因差异表达火山

Fig.1 Differential expression volcano map of C VS M and M VS T

3.4 差异表达基因功能注释和富集分析 将差异表达基因与 NR, Swiss-Prot, GO, COG, KOG, KEGG 等公共数据库比对,获得了不同数据库中差异表达

基因注释信息。在 GO 分析过程中, C VS M 及 M VS T 分别有 1 405, 1 074 个差异表达基因获得注释。差异表达基因 GO 功能分类分析结果见图 2, 所有差异基因均被注释到生物学过程、细胞组分、分子功能等 GO 分类的 60 项功能分类中。在生物学过程一类中, 与形态结构发生 (anatomical structure formation involved in morphogenesis), 器官发育

(organ development), 神经系统发育 (nervous system development) 相关的基因富集较多; 在细胞组分一类中, 与细胞膜内细胞器 (intracellular membrane-bounded organelle), 相关的基因富集较多; 在分子功能一类中, 与结合 (protein binding, ATP binding, protein domain specific binding, binding) 相关的基因富集较多。

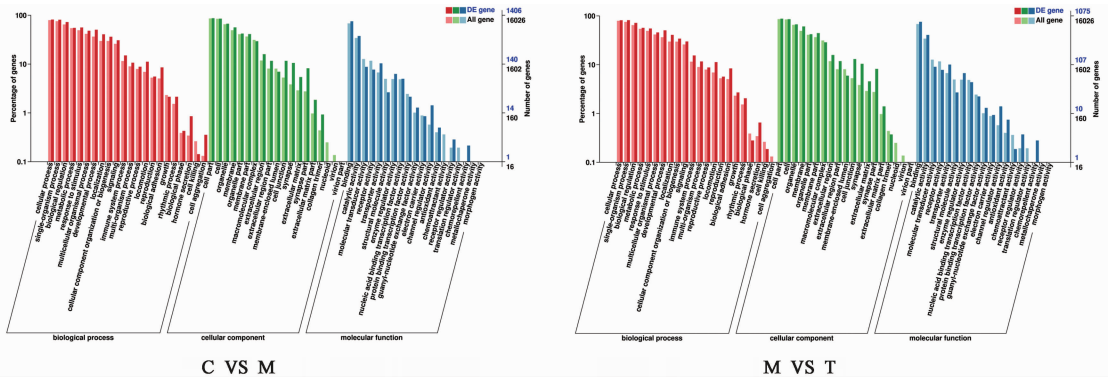
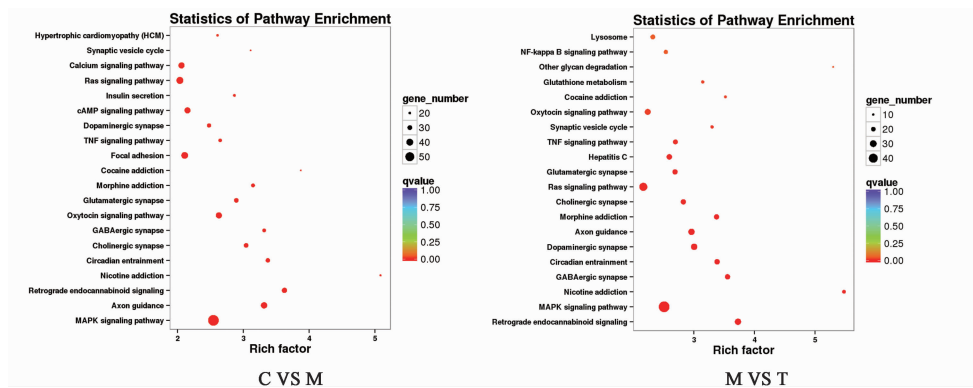


图 2 差异表达基因 GO 注释分类统计
Fig. 2 GO annotation classification statistics of differential expression gene

与空白组比较, OGD/R 模型组有 2 039 个基因表达发生上调或下调, 涉及 261 条 KEGG 代谢通路, 主要包括 Calcium signaling pathway (37 gene)。Ras signaling pathway (41 gene)。cAMP signaling pathway (37 gene)。TNF signaling pathway (25 gene)。MAPK signaling pathway (59 gene)。与模型组比较, 天麻素干预组有 1 538 个基因表达发生上调或下

调, 涉及 253 条 KEGG 代谢通路, 主要包括 NF- κ B signaling pathway (18 gene)。TNF signaling pathway (21 gene)。Ras signaling pathway (36 gene)。MAPK signaling pathway (48 gene)。PI3K-Akt signaling pathway (32 gene)。C VS M 及 M VS T 差异表达基因 KEGG 富集散点见图 3。



每一个图形表示 1 个 KEGG 通路, 通路名称见右侧图例。横坐标为富集因子 (enrichment factor), 表示差异基因中注释到某通路的基因比例与所有基因中注释到该通路的基因比例的比值。富集因子越大, 表示差异表达基因在该通路中的富集水平越显著。纵坐标为 $\log_{10}(Q \text{ value})$, 其中 $Q \text{ value}$ 为多重假设检验校正之后的 $P \text{ value}$ 。因此, 纵坐标越大, 表示差异表达基因在该通路中的富集显著性越可靠

图 3 差异表达基因 KEGG 富集散点
Fig. 3 KEGG enrichment scatter plot of differential expression gene

3.5 天麻素对炎症相关信号的影响 与 OGD/R 模型组比较, 天麻素干预实验组 mRNA 表达量上调的基因为 749 个, 下调的基因为 789 个, 涉及 NF-

κ B, TLR, TNF 等多条炎症信号通路抑制。根据转录组测试结果, 绘制天麻素抗 OGD/R 损伤炎症信号通路图。见图 4。

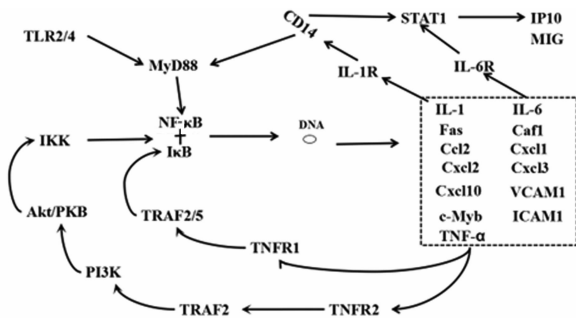


图 4 天麻素抗 OGD/R 损伤炎症信号通路
Fig. 4 Inflammation signal transduction pathway of gastrodin against OGD/R injury

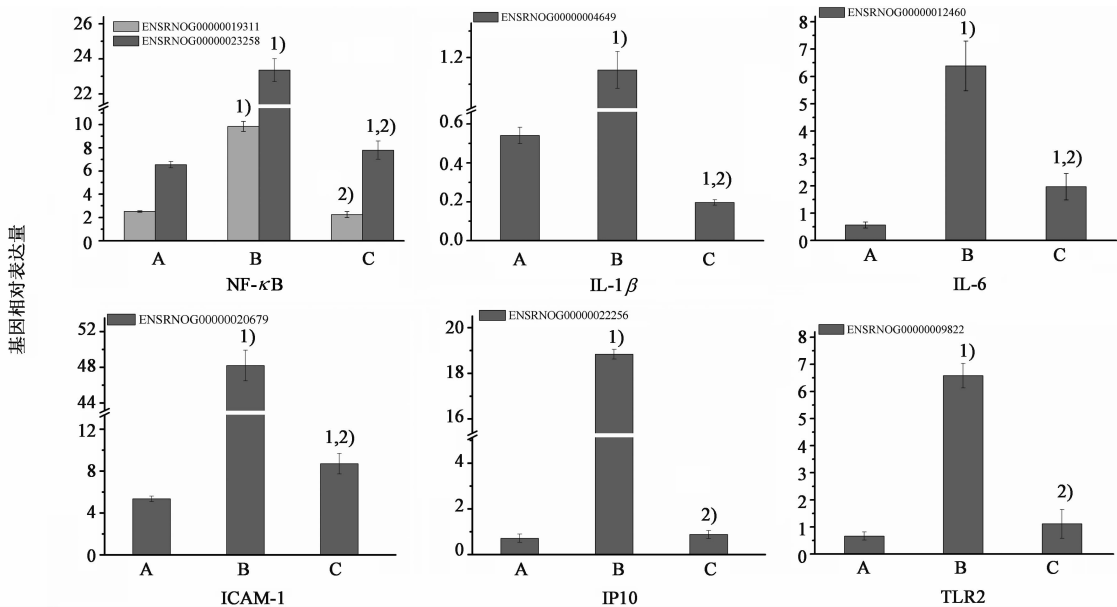
在炎症相关信号通路中,天麻素干预使磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K),蛋白激酶 B(Akt/PKB)表达上调,凋亡相关因子 Fas, TLR2, NF-κB, TNFR1, TNFR2, IL-6, ICAM-1, CCL2, IP10/CXCL10, CXCL1/2/3, 信号转导与转录激活因子(STAT), 髓样分化因子(MyD88), CD14 等信号分子表达下调, 关键基因表达差异信息见表 4。其中以 IP10/CXCL10, CCL2, CXCL1/2/3 等趋化因子表达量改变最为明显。

3.6 关键炎症基因转录活性验证 使用 Real-time-PCR 方法, 针对天麻素预处理抗炎反应信号通路中关键基因进行转录丰度验证, 结果显示 6 个基因在皮层神经细胞中均有表达, 且表达量比值趋势与转录组 FPKM 比值趋势一致, 说明本研究获得的转录组数据具有较高的参考价值。见图 5。

表 4 天麻素对 OGD/R 损伤炎症关键基因的影响

Table 4 Effect of gastrodin on inflammatory genes in OGD/R damage

基因	KEGG entry 号	基因 ID 号	Log ₂ FC	改变趋势
PI3K	K00922	00000016846	1.201 238 581 301 08	up
Akt	K04456	00000021497	1.085 075 834 550 35	up
Fas	K04390	00000019142	-1.458 323 943 255 98	down
CD14	K04391	00000017819	-2.759 407 278 813 26	down
TLR2	K10159	00000009822	-2.500 587 887 306 08	down
MyD88	K04729	00000013634	-2.129 614 239 198 36	down
NF-κB	K02580	00000023258	-1.667 676 613 085 74	down
	K04469	00000019311	-2.104 676 316 854 51	down
TNFR1	K03158	00000031312	-1.085 524 125 597 1	down
TNFR2	K05141	00000016575	-3.035 271 112 880 61	down
TRAF2/5	K03173	00000006238	-1.097 856 889 529 57	down
IL-1β	K04519	00000004649	-2.552 866 186 776 41	down
IL-6	K05405	00000010278	-1.698 335 818 069 27	down
IL-6R	K05055	00000020811	-2.000 092 391 823 55	down
ICAM-1	K06490	00000020679	-2.420 281 571 369 96	down
Vcam-1	K06527	00000014333	-1.319 803 185 490 32	down
IP10/CXCL10	K12671	00000022256	-5.399 099 210 441 12	down
CCL2	K14624	00000007159	-3.888 699 507 011 74	down
CXCL1/2/3	K05505	00000002802	-3.456 957 751 351 47	down
Mmp14	K07763	00000010947	-1.281 921 553 131 41	down



A. 空白组; B. 模型组; C. 天麻素组

图 5 OGD/R 损伤关键炎症基因转录活性验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Transcriptional activity of key inflammatory genes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

琥珀酸脱氢酶活性与 LDH 漏出率是反应细胞活性与损伤情况的常用指标。活细胞线粒体内琥珀酸脱氢酶与 MTT 发生还原反应生成蓝紫色甲瓚结晶,可通过 A 反应细胞活性与线粒体完整性;而 LDH 存在与胞浆内,当细胞受损使膜通透性增高时,胞浆内 LDH 释放增加,因此 LDH 漏出率可用于定量细胞损伤程度。本实验发现,皮层细胞在糖氧剥夺再复供处理后,细胞活性下降,LDH 漏出率增加,损伤严重;而经天麻素预处理,皮层细胞活性、存活率增加,LDH 漏出率显著降低,说明天麻素能够保护糖氧剥夺再复供皮层神经细胞膜结构的完整性,提高皮层细胞的存活率。

NF- κ B 是 Rel 蛋白家族中一种重要的核转录因子,主要发挥生理功能的是 p50/p65 异二聚体,在静息细胞中,p50/p65 二聚体与其抑制剂 I κ B 结合形成三聚体,以失活状态存在于胞架中^[10]。正常情况下 NF- κ B 在中枢神经系统仅少量表达,当脑组织受到缺血、缺氧刺激时被激活,诱发炎症细胞浸润、黏附分子及趋化因子等靶基因表达^[11]。研究表明,TLRs 激活,特别是 TLR2 与 TLR4 的激活,通过下游信号分子 NF- κ B 促进炎症细胞因子,如 TNF- α , IL-1, IL-6 等转录,激活的 TNF- α 等可进一步上调黏附分子,如 ICAM-1 表达,并反馈激活 NF- κ B,引发瀑布样炎症反应,从而放大炎症级联反应加重损伤^[12]。

炎症反应是脑缺血再灌注损伤的关键机制之一,而趋化因子具有趋化白细胞迁移、参与炎症损伤及损伤修复等多种作用,是脑缺血诱发的炎症损伤中不可或缺的一类介质^[13]。有研究表明,脑缺血浸润的炎症细胞包括中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞等^[14],当趋化因子与其相应受体结合后其表达活性增强,诱导炎症细胞向缺血再灌注损伤部位趋化游走并聚集在炎症部位,加重损伤部位的炎症反应^[15]。在对大鼠大脑中动脉栓塞动物模型的研究中,有些学者认为 IP-10 (又名 CXCL10)作为一种趋化因子激活单核/巨噬细胞和 Th1 细胞的活化,参与早期脑损伤的过程^[16]。CCL2 又名 MCP-1,在脑缺血发生过程中趋化单核巨噬细胞浸润脑实质,同时上调黏附分子表达,加重脑局部损伤。Cher 等^[17]研究发现,MCP-1 转基因小鼠较野生型小鼠对脑缺血损伤更敏感,梗死体积更大,脑梗死后的血浆 MCP-1 水平显著增高,且梗死部位的巨噬细胞与中性粒细胞更多,提示

脑内 MCP-1 过表达可通过募集炎症细胞加重缺血性脑损伤。抑制脑缺血再灌注后趋化因子的生成,能减少再灌注后的炎症损伤,发挥神经保护作用^[18-19]。

炎症级联反应中炎症细胞因子与趋化因子是引起脑缺血的重要危害因素,是评价脑缺血严重性的关键炎症标志物。资料显示天麻素可通过抑制 TNF- α , IL-1 和 IL-6 的表达,影响炎症信号通路,以达到减轻缺血性脑损伤、抗癫痫的作用^[20-21]。本研究发现 OGD/R 损伤后皮层细胞活性下降,LDH 释放增加,而天麻素预处理能提高细胞存活率,并显著下调 LDH 漏出率,KEGG 通路富集分析发现其主要涉及 NF- κ B (18 gene), TNF (21 gene) 等信号通路。与模型组比较,天麻素预处理使 NF- κ B, TLR2, TNFR1/2, IL-6, ICAM-1, IP-10, CCL2, CXCL1/2/3, Mig 等多种炎症相关信号分子的表达发生下调,提示天麻素具有抗炎作用,通过下调相关炎症因子和趋化因子的表达,降低炎症细胞的趋化、黏附和浸润,从而减轻糖氧剥夺再复供的炎症损伤。

[参考文献]

- [1] 兰晶, 潘敬芳. 姜黄素对脑缺血再灌注损伤大鼠 PI3K/AKT/mTOR 的影响[J]. 重庆医学, 2017, 46(1):36-39.
- [2] GUO M F, YU J Z, MA C G. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia [J]. Folia Neuropathol, 2011, 49(2):78-87.
- [3] Dziejdz T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke [J]. Expert Rev Neurother, 2015, 15(5):523-531.
- [4] ZHANG X, YAN H, YUAN Y, et al. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance [J]. Autophagy, 2013, 9(9):1321-1333.
- [5] 吕国平, 王春芹, 蔡中琴. 天麻素注射液的药理及临床研究[J]. 中草药, 2002, 33(5):U003-U004.
- [6] 郭正平, 钟裕国. 天麻素及天麻甙元作用机制的研究[J]. 四川大学学报:医学版, 1991(1):79-82.
- [7] PENG Z W, WANG S Q, CHEN G J, et al. Gastrodin alleviates cerebral ischemic damage in mice by improving anti-oxidant and anti-inflammation activities and inhibiting apoptosis pathway [J]. Neurochem Res, 2015, 40(4): 661-673.
- [8] 韩春妮, 林青, 何芳雁, 等. 云南昭通 3 种天麻对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 云南中医中药杂志, 2013, 34(10):62-64.
- [9] 柳弯. 天麻酚性成分对大鼠原代皮层神经元 OGD/R

- 损伤后钙通道影响的研究[J]. 昆明: 云南中医学院, 2015.
- [10] Owlasiuk P, Zajkowska J M, Pietruczuk M, et al. Fractalkine-structure, functions and biological activity[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2009, 26(153):253-257.
- [11] Ridder D, Schwaninger M. NF-kappaB signaling in cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3):995-1006.
- [12] Denes A, Thornton P, Rothwell N J, et al. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation [J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(5):708-723.
- [13] 黄坚, 李振东. 趋化因子在缺血性脑损伤中的作用[J]. *中华脑血管病杂志: 电子版*, 2008, 2(3):232-237.
- [14] Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke[J]. *Stroke*, 2009, 40(5):1849-1857.
- [15] 毕惠娟, 王健. CXCR1, CXCR2 及其配体的结构和功能[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(12):1091-1095.
- [16] LI H L, Kostulas N, HUANG Y M, et al. IL-17 and IFN-gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *J Neuroimmunol*, 2001, 116(1):5-14.
- [17] Cher Y, Hallenbeck J M, Ruetzler C, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(6):748-755.
- [18] 张云霞, 赵钢, 史明, 等. 人参皂甙 Rd 抑制大鼠局灶性脑缺血后趋化因子 CXCL1 和 γ -干扰素的蛋白表达[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(6):1059-1062.
- [19] 方晓艳, 栗俞程, 刘丹丹, 等. 凌霄花总黄酮对脑缺血大鼠脑组织中炎症因子及趋化因子的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016(9):3481-3483.
- [20] 李文君, 徐振田, 索大琴, 等. 天麻素对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2014, 34(5):12-16.
- [21] 李飞, 孙亚凌, 成祥林, 等. 天麻素调节癫痫大鼠海马炎症信号通路的抗癫痫机制研究[J]. *实用药物与临床*, 2015, 18(5):510-512.

[责任编辑 邹晓翠]