

# 基于转录组测序的谷红注射液抗脑缺血分析

周瑞<sup>1,2</sup>, 项昌培<sup>1,2</sup>, 高金环<sup>2</sup>, 张毅<sup>2</sup>, 张晶晶<sup>2\*</sup>, 杨洪军<sup>1,2\*</sup>

(1. 云南中医药大学, 昆明 650500;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:** 在确定谷红注射液保护脑缺血的基础上, 采用 RNA-Seq 转录组测序与生物信息分析的方法探究谷红注射液抗脑缺血的分子机制。**方法:** 采用线栓法制备大鼠中动脉栓塞(MCAO)模型, 设置假手术组, 模型组, 谷红注射液低、中剂量组(0.625, 2.5 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 阳性药组(金纳多注射液, 8 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 通过 Ludmila Belayev 12 分评分法进行药效学评价, 并采用 RNA-Seq 技术检测药物干预前后的差异基因, 使用 DAVID, String 及 The Human Phenotype Ontology 等数据库, 进行富集分析、聚类分析、以及与脑缺血疾病靶标的关联分析, 通过 Cytoscape3.4.0 构建相关的调控网络。**结果:** 与假手术组相比, 模型组大鼠可见明显神经功能缺损( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 谷红注射液高剂量组减轻了大鼠神经功能损伤( $P < 0.05$ )。转录组数据分析表明谷红注射液主要是通过调控细胞凋亡, 炎症反应, 氧化应激, Toll 样受体信号通路及丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路等生物学过程干预脑缺血。此外, 谷红注射液干预脑缺血的差异基因关联到 20 个脑缺血疾病相关的靶标, 且关联到 64 个 MAPK 信号通路相关的基因, 其中 23 个基因参与凋亡与炎症等过程。**结论:** 谷红注射液通过多条途径发挥抗脑缺血作用, 其中 MAPK 信号通路是其发挥抗凋亡及炎症作用的重要途径。

**[关键词]** 谷红注射液; 脑缺血; RNA-Seq; 丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0195-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200505

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191119.1205.005.html>

**[网络出版时间]** 2019-11-19 14:28

## Mechanism of Guhong Injection Against Cerebral Ischemia Based on Transcriptome Analysis

ZHOU Rui<sup>1,2</sup>, XIANG Chang-pei<sup>1,2</sup>, GAO Jin-huan<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>, ZHANG Jing-jing<sup>2\*</sup>, YANG Hong-jun<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** Based on the protective effect of Guhong injection (GH) on cerebral ischemia, mechanism of GH against cerebral ischemia was identified using RNA-seq transcriptome and bioinformation analysis. **Method:** The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established through thread embolization. Sham group, model group, low-dose GH group (0.625 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), high-dose GH group (2.5 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), positive group (Ginaton, 8 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) were set up. Ludmila Belayev 12-point scoring method was applied to assess the protective effect of GH against MCAO-induced cerebral ischemia. And the differentially expressed genes after treatment with GH were identified by RNA-Seq technology. Enrichment analysis, cluster analysis and association analysis on disease targets of cerebral ischemia were carried out through such databases as DAVID, String and The Human Phenotype Ontology. Finally, the regulatory network was

**[收稿日期]** 20190725(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81974550, 81330086, 81603422)

**[第一作者]** 周瑞, 在读硕士, 从事中药药理与应用研究, E-mail: zhourui677000@163.com

**[通信作者]** \* 张晶晶, 博士, 副研究员, 从事中药心脑血管分子药理学研究, E-mail: zjj4785@163.com;

\* 杨洪军, 博士, 研究员, 从事中药心脑血管药理研究及中药大品种培育研究, Tel: 010-64032656, E-mail: hongjun0420@vip.sina.com

constructed by Cytoscape3. 4. 0. **Result:** Compared with the sham group, the neurological impairment was obvious in the model group ( $P < 0. 01$ ), and the neurological impairment was alleviated in the GH group compared with the model group ( $P < 0. 05$ ). RNA-Seq technology analysis showed that GH regulated genes involving such biological processes as cell apoptosis, inflammation, oxidative stress, toll-like signaling pathway and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. Twenty disease targets and 64 MAPK signaling pathway genes were associated with differentially expressed genes after GH treatment, in which 23 genes were involved in apoptosis and inflammation. **Conclusion:** GH protected against cerebral ischemia in many ways, among which MAPK signaling pathway is an important way to exert its effect in inhibiting apoptosis and inflammation.

**[Key words]** Guhong injection; cerebral ischemia; RNA-Seq; mitogen-activated protein kinase (MAPK)

脑卒中是一类由脑血管突然破裂或大脑血管堵塞为特征的脑血液循环障碍性疾病,具有发病率高、死亡率高、致残率高、复发率高以及并发症多的特点,是全世界死亡和残疾的第一因素<sup>[1-3]</sup>。脑卒中按性质可分为两大类,一类是由血管堵塞导致的缺血性脑卒中,另一类是由血管破裂导致的出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中尤为常见<sup>[4-6]</sup>。重组组织型纤溶酶原激活剂 (rtPA) 是目前 FDA 唯一批准的用于急性缺血性卒中的药物,但严格的治疗时间窗和严重的副作用(出血性潜在风险等),限制了其进一步的应用<sup>[7-8]</sup>。此外,脑缺血在一定时间恢复正常灌注后,大脑功能未得到恢复,反而因溶栓再灌注呈进行性加重的过程,称为缺血再灌注损伤<sup>[9-10]</sup>。缺血再灌注是一个极其复杂的病理过程,是缺血性脑卒中发病过程中最重要的环节之一,涉及能量代谢异常、离子代谢紊乱、自由基损伤和炎症反应等一系列复杂的生物学过程<sup>[11-14]</sup>。目前,虽然有许多药物已经证明具有良好的保护作用,但仍然不能完全解决因缺血再灌注而导致的损伤问题。因此,急需寻找有效的治疗脑缺血损伤的药物,并深入研究其抗脑缺血的信号转导调控机制,为进一步针对性的拟定抗脑缺血再灌注损伤的保护策略提供参考。

针对脑缺血复杂的病理过程,中药具有多成分、多靶标协同作用特点,相比单一靶点的药物具有更好的整体作用优势。谷红注射液由红花提取物和乙酰谷酰胺组成,其抗脑缺血临床治疗效果良好,是多成份组合的典型代表药物<sup>[15-16]</sup>,前期的实验证明谷红注射液干预脑缺血具有较好的效果<sup>[17]</sup>。本研究基于前期实验结果,利用高通量转录组测序技术结合生物信息学分析的方法,对谷红注射液干预脑缺血的潜在作用机制进行全景式揭示,从而阐释谷红注射液抗脑缺血再灌注损伤的作用机制。

转录组测序技术能够从基因表达的整体水平来揭示特定生物学过程及疾病发生过程中的分子机

制,在已知基因组序列物种的转录组分析中具有极大的优势,同时,其高通量的特点更适合多靶点药物作用机制的解析<sup>[18-19]</sup>。采用转录组测序技术对谷红注射液抗脑缺血分子机制的研究,有助于从整体的角度揭示谷红注射液抗脑缺血的分子机制。因此,本课题的实施一方面对谷红注射液的临床应用提供研究基础,加深对其抗脑缺血作用机制的理解;另一方面,深入研究有效药物抗脑缺血的药物作用机制,为下一步有针对性的拟定抗脑缺血再灌注损伤的保护策略提供一定的参考。

## 1 材料

**1.1 动物** 成年雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量 ( $280 \pm 10$ ) g,购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司,合格证号 SCXK(京)2014-0004。适应性喂养 3 d,自由进食水,室温  $22 \sim 26$  °C,湿度 55%。实验中所有操作均遵循中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会的批准,批准号 2017105。

**1.2 药品、试剂与仪器** 谷红注射液(通化谷红制药有限公司,批号 20170402);金纳多注射液(中豪国际有限公司,批号 KC068);戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司,货号 P3761-25G);鱼线线栓(北京西浓科技有限公司,货号 2838-50/A4);trizol(美国 Life Technologies 公司,货号 15596-018)。

**1.3 仪器** Illumina HiSeq 4000 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)。

## 2 方法

**2.1 模型建立**<sup>[20]</sup> 用改良的线栓法制备模型,大鼠用戊巴比妥钠( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉并固定于手术台上,剃毛器去颈部手术区毛发,碘伏消毒,经颈正中剪开皮肤、钝性分离皮下结缔组织及肌肉,使颈总动脉和颈外动脉暴露,小心分离血管,结

扎颈外动脉远心端,电凝器阻断颈外动脉远心端,在颈外动脉残端打一松结作为固定线,动脉夹夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉,颈外动脉残端剪一小口,向颈内方向插入线栓,扎紧固定线,松开颈内动脉动脉夹,轻推线栓入颈内动脉,一般插入 18~20 mm,松开颈总动脉近心端动脉夹。90 min 后,轻轻拔出线栓,扎紧颈外动脉残端。假手术组不插入线栓,其余手术操作相同。

**2.2 分组给药** 大鼠随机分为 5 组,分别为假手术组,模型组,金纳多注射液组( $8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),谷红注射液低剂量组( $0.625 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),谷红注射液高剂量组( $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),拔栓后立即腹腔注射给药,24 h 后再次给药,术后 48 h 取材。给药剂量按照临床成人每日常用量结合本课题前期实验探究确定<sup>[17]</sup>。

**2.3 神经功能评分** 参考 Ludmila Belayev 12 分评分法<sup>[21]</sup>,对 5 个组别大鼠进行神经功能评分。Ludmila Belayev 12 分评分法由姿势反射实验和肢体放置实验 2 部分组成。

**2.3.1 姿势反射测验** 无明显神经功能缺失为 0 分,脑梗死对侧肢体不能完全伸展为 1 分,侧推倾倒为 2 分。

**2.3.2 肢体放置实验**

**2.3.2.1 视觉亚实验(前方刺激实验)** 将动物握在手中,使其前爪悬空,从桌面上方 10 cm 处沿斜线向桌面缓慢靠近(桌子位于大鼠正前方),正常大鼠反应为前肢即刻抓向桌面,脑损伤大鼠则表现为肢体反应迟缓。动物肢体反应正常为 0 分;反应延迟但不超过 2 s 为 1 分;反应延迟且超过 2 s 为 2 分。侧方刺激的方法与评分标准同正前方刺激,桌子位于大鼠侧方。

**2.3.2.2 触觉亚实验** 遮住动物双眼,并使其前爪悬空,用其前爪背部轻触桌面,刺激深度仅达皮肤和毛发,评分方法同视觉亚实验,触觉刺激同样分前方刺激和侧方刺激。

**2.3.2.3 本体觉亚实验** 评分方法同视觉亚实验,仅刺激深度不同,本体觉亚实验给予前爪较大压力,刺激深达肌肉及关节。本体觉亚实验只有前方刺激。

姿势反射测验和肢体放置试验两部分实验总分范围为 0~12 分,神经功能缺损越严重,得分越高。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析,各组均数间多重比较前,先对数据采用 Levene 检验方差齐性,若方差齐,采用 LSD 检验;若

方差不齐,则采用 Dunnett's  $T_3$  检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 RNA-seq 转录组测序分析<sup>[22]</sup>

**3.1 RNA 提取与纯化** 根据试剂盒说明,用 trizol 试剂提取脑组织 RNA,使用生物分析仪 2100 系统(Agilent Technologies, CA, USA)的 RNA Nano 6000 检测试剂盒分析 RNA 的完整性。

**3.2 RNA 测序文库构建** 使用带有 Oligo 的磁珠,通过 A-T 互补配对与 mRNA 的 polyA 尾部结合的方式富集真核生物的 mRNA,随后加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段,以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成一链 cDNA,然后加入缓冲液,dNTPs 和 DNA polymerase I 合成二链 cDNA。对于双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后用 AMPure XP beads 进行片段大小选择,最后通过 PCR 实验富集得到最终的 cDNA 文库。每个样品的 1  $\mu\text{g}$  RNA 用于文库构建,每组做 3 个生物学重复。

**3.3 测序分析** 在流动槽的各通道中加入 cDNA 文库,利用 Illumina HiSeq 4000 测序仪进行测序分析,质量分值由计算机软件给出。以图像的位置坐标为依据,把同一位置测得的数据根据测序顺序连成 read。

**3.4 生物信息分析** 运用 MapSplice 分析工具对于 RNA-Seq 数据进行比对,将原始数据映射至基因组。对于基因表达量的分析,通过 Reads Per Kilo bases per Million reads 算法来实现。其公式为  $\text{PRKM} = \frac{\text{某个样本映射到特定基因的外显子上的所有的 reads (Total exon reads)}}{\text{某个样本的所有 reads 总和 (mapped reads)}} \times \text{某个基因的总长度 (exon length)}$ ,即读数中有百分之多少是映射到这个基因的,然后再除以这个基因的总长度,就能够以某基因得到的单位长度有百分之多少的映射读取总数来表现。采用 EBseq 算法,以显著性水平(FDR)和差异倍数( $\log_2$  Fold change)为条件,设置筛选条件为  $\text{FDR} \leq 0.1$ , $\log_2$  Fold change  $\geq 1$  来进行差异基因的筛选。

**3.5 基因表达水平对比分析与计算** 通过所有基因的 FPKM 分布图及 violin 图对不同实验条件下的基因表达水平进行比较,对于同一实验条件下的重复样品,最终的 FPKM 为所有重复数据的平均值。差异表达基因的计算使用 Edger 软件完成<sup>[23]</sup>。

**3.6 富集分析与聚类分析** 将谷红注射液干预脑缺血的差异基因采用 DAVID 进行聚类分析,对富集

度 ( $P < 0.05$ ) 的基因本体 (GO) 或京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 条目进行气泡图的绘制。热图聚类分析由 R 语言的 gplot 包中的 pheatmap 函数实现, 使用 DAVID<sup>[24]</sup> 进行聚类分析, 标示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) 的 GO 或 KEGG 条目。

**3.7 与疾病靶标关联分析及网络构建** 通过 The Human Phenotype Ontolog (<https://hpo.jax.org/app/>) 下载脑缺血的疾病靶标, 将谷红注射液干预后的差异基因与脑缺血疾病靶标通过 String 数据库进行关联, 并将差异表达基因与关联到的疾病基因采用 DAVID 进行富集分析, 最后使用 Cytoscape3.40 进行网络构建。

**3.8 与 MAPK 信号通路基因进行关联及网络构建** 采用 String 数据库将谷红注射液干预后的差异基因与 MAPK 信号通路的基因进行关联, 并使用 Cytoscape 3.40 进行网络构建。

#### 4 结果

**4.1 Ludmila Belayev 12 神经功能评分** Ludmila Belayev 12 神经功能评分显示, 与假手术组比较, 模型组有明显的肢体偏瘫等神经功能缺失症状, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 谷红注射液高剂量组、金纳多注射液组对神经功能有明显改善 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 Ludmila Belayev 12 神经功能评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

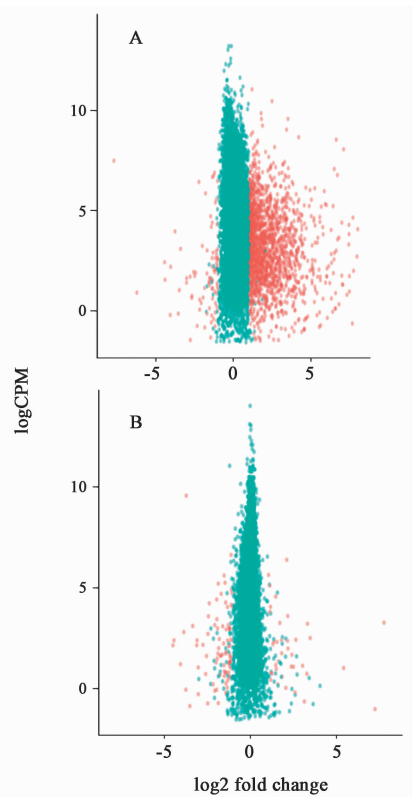
Table 1 Neurological function score of Ludmila Belayev 12 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	给药体积 /mL·kg <sup>-1</sup>	Ludmila Belayev 12 神经功能评分/分
假手术	-	0
模型	-	9.40 ± 0.60 <sup>1)</sup>
金纳多注射液	8	4.67 ± 4.33 <sup>2)</sup>
谷红注射液	0.625	7.33 ± 2.67
	2.5	4.67 ± 1.33 <sup>2)</sup>

注: 与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

**4.2 RNA-seq 鉴定差异表达基因** 基于前期实验<sup>[17]</sup> 和 Ludmila Belayev 12 神经功能评分结果, 高剂量谷红注射液能够改善脑缺血后的神经功能, 因此转录组学研究中药物干预组采用 2.5 mL<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 剂量。根据 EBseq 算法, 筛选出各组的差异表达基因 ( $FDR \leq 0.1, \log_2 \text{Fold change} \geq 1$ ) 见图 1。与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中显著表达的差异基因为 2 512 个 (显著上调的 2 407 个, 显著下调的 105 个), 而与模型组比较, 给予谷

红注射液干预后, 差异表达的基因为 121 个 (显著上调的 37, 显著下调的 84 个)。



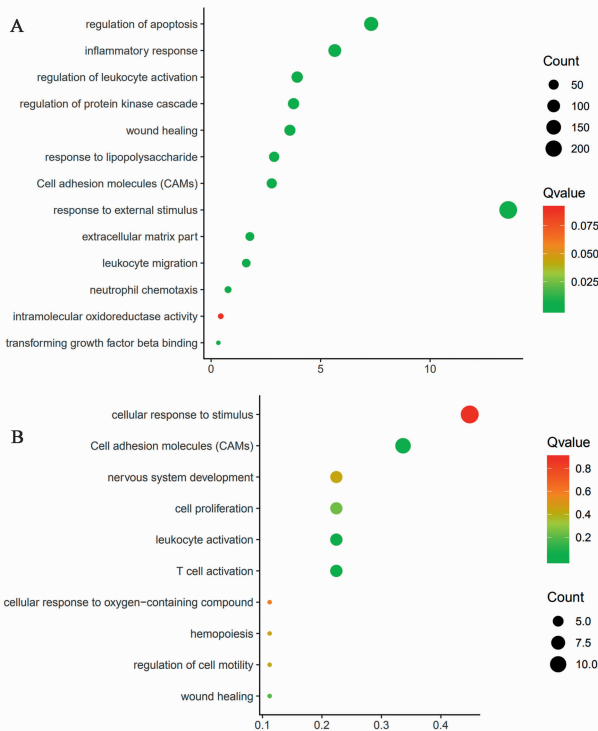
A. 模型组与假手术组比较; B. 谷红注射液组与模型组比较; 红色点表示差异表达的基因; 绿色点表示非差异表达的基因

图 1 基因表达整体水平变化

Fig. 1 Overall alteration of gene expression level

**4.3 差异表达基因富集分析** 为了进一步分析这些差异表达的基因的生物学功能, 采用 DAVID 对这些差异表达的基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织中显著表达的差异基因主要富集在炎症反应 (inflammatory response), 调节凋亡 (regulation of apoptosis), 调节白细胞活化 (regulation of leukocyte activation), 细胞黏附分子 (cell adhesion molecules), 对外部刺激的反应 (response to external stimulus), 细胞外基质部分 (extracellular matrix part) 等相关功能和信号通路上; 与模型组比较, 谷红注射液干预后的差异表达基因主要富集在神经系统发育 (nervous system development), 细胞增殖 (cell proliferation), 细胞黏附分子 (cell adhesion molecules), 白细胞活化 (leukocyte activation), T 细胞活化 (T cell activation), 细胞对含氧化合物的反应 (cellular response to oxygen-containing compound) 等相关功能和信号通路上。这些结果表明谷红注射液能够调控

细胞黏附、白细胞活化及 T 细胞活化等炎症过程,对含氧化合物反应、伤口愈合、细胞增殖等生物学过程。见图 2。



A. 与假手术组比较,模型组的差异基因富集;B. 与模型组比较,谷红注射液组的差异基因富集

图 2 差异表达基因富集的 GO 功能和 KEGG 信号通路

Fig. 2 Enrichment of differentially expressed genes with GO function and KEGG signaling pathway

**4.4 与疾病靶标的关联分析** 通过对模型组与谷红注射液组差异表达的基因与脑缺血疾病靶标进行关联分析,发现 82 个差异表达基因与 20 个疾病靶标具有互作关系,再对这些基因进行富集分析,发现这些差异表达基因与关联到的疾病靶标富集到的生物学过程包括血管生成 (angiogenesis), 血液循环 (blood circulation), 细胞增殖 (cell proliferation), 细胞外基质组织 (extracellular matrix organization), 细胞因子产生的负调节 (negative regulation of cytokine production), 神经元死亡 (neuron death), 细胞运动调节 (regulation of cell motility), 对氧水平的反应 (response to oxygen levels), 伤口愈合 (wound healing) 等。用 Cytoscape3. 4. 0 构建网络图, 见图 3, 如图所示, 差异表达的基因标记为蓝色, 脑缺血的疾病靶标标记为粉色, 富集到的 GO 或 KEGG 条目标记为红色。该分析表明谷红注射液能够关联到脑缺血相关靶标, 并调控细胞外基质组织、对氧的反应、神经元死亡、伤口愈合等生物学过程。

**4.5 差异表达基因聚类分析** 药效学结果表明谷红注射液具有对脑缺血有保护作用, 差异表达基因分析结果显示其保护作用主要体现在参与代谢过程、炎症反应、细胞黏附分子, 白细胞活化, T 细胞活化等过程。进一步整体聚类分析显示, 谷红注射液干预后对模型中上调的参与炎症反应 (GO: 0006954 ~ inflammatory response), 脂多糖反应 (GO: 0032496 ~ response to lipopolysaccharide), 凋亡过程 (GO: 0006915 ~ apoptotic process), Toll 样受体信号通路 (GO: 0002224 ~ Toll-like receptor signaling pathway), 氧化应激反应 (GO: 0006979 ~ response to oxidative stress), 细胞内钙离子浓度的正调控 (GO: 0007204 ~ positive regulation of cytosolic calcium ion concentration), 丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 级联 (GO: 0000165 ~ MAPK cascade), 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路 (rno04151: PI3K/Akt signaling pathway), 伤口愈合 (GO: 0042060 ~ wound healing) 等生物学过程的基因有下调作用。而谷红注射液干预后对参与激素反应 (GO: 0009725 ~ response to hormone) 这一过程的基因基本上没有改变。聚类分析结果表明, 谷红注射液能够下调在模型组中上调的参与炎症反应、凋亡过程、氧化应激反应, MAPK 级联, 伤口愈合等生物学过程的基因。见图 4。

**4.6 与 MAPK 信号通路相关基因进行关联分析** 将谷红注射液干预后的差异基因与 MAPK 信号通路基因进行关联分析, 谷红注射液干预后的 15 个差异基因关联到 64 个 MAPK 信号通路基因, 其中 23 个基因为炎症或细胞凋亡相关基因。采用 Cytoscape3. 4. 0 构建网络图, 见图 5, 谷红注射液干预后的差异基因标记为粉色, MAPK 信号通路基因标记为蓝色, 红色星号表示炎症或细胞凋亡相关基因。该分析表明, 谷红注射液干预脑缺血与 MAPK 信号通路密切相关, 其可能通过 MAPK 信号通路发挥抗凋亡及炎症作用。

## 5 讨论

脑血管疾病是人类发病率最高的疾病之一, 模拟临床疾病, 制作较为可靠的脑缺血动物模型显得尤为重要<sup>[25-27]</sup>。大脑中动脉 (MCA) 是人群脑卒中的多发部位, MCA 闭塞模型 (MCAO) 被普遍认为是局灶性脑缺血的标准动物模型<sup>[28]</sup>。本研究复制以 MCAO 模型为基础的大鼠脑缺血再灌注模型, 在谷红注射液抗脑缺血的药效学基础上, 进一步探究谷红注射液抗脑缺血作用机制。与前期研究结果一



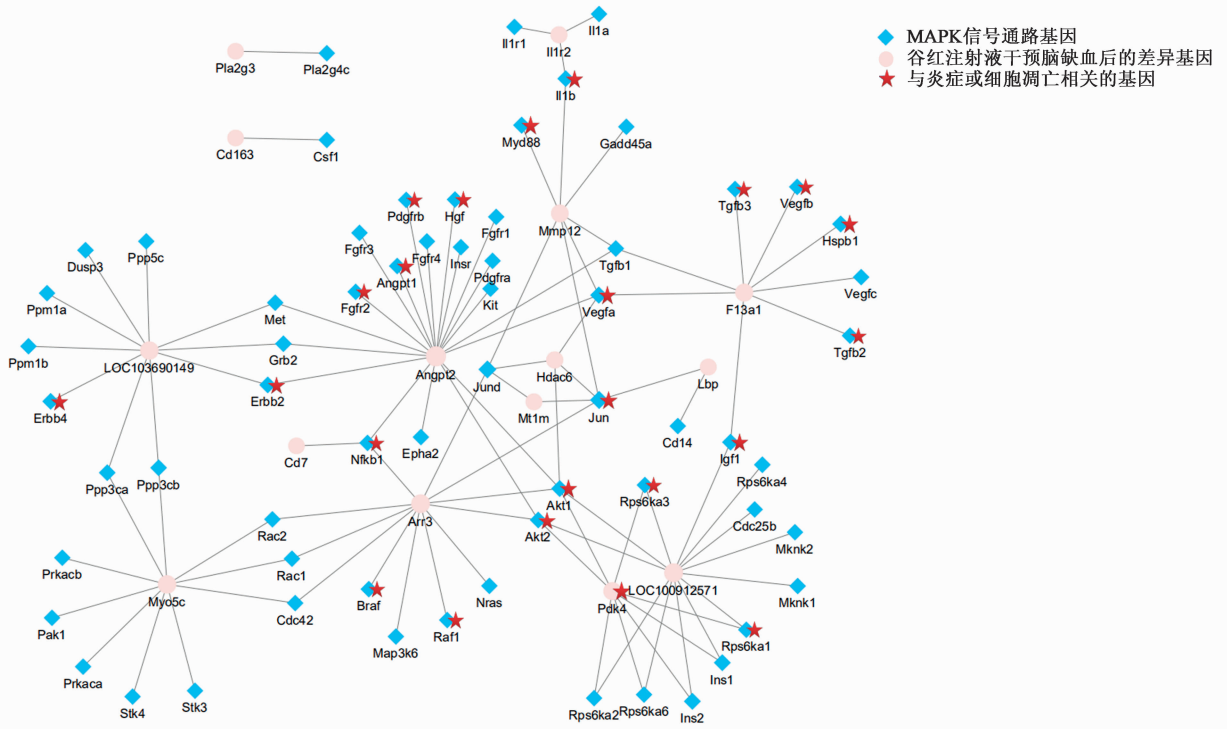


图 5 谷红注射液干预后差异表达基因与 MAPK 信号通路基因的关联分析网络

Fig. 5 Association network of the differentially expressed genes after GH treatment with genes involved in MAPK signaling pathway

应激反应和 PI3K/Akt 信号通路等过程和通路的基因具有下调作用。

MAPK 级联信号传导途径存在于所有真核生物中,被认为是与细胞增殖,分化与凋亡密切相关的细胞信号转导途径。MAPK 级联信号传导途径包括细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 信号传导通路, JNK 信号传导通路, p38 信号传导通路等。近年来,大量研究表明,脑缺血缺氧后,存在于中枢神经系统中的 MAPK 信号转导途径被激活,对神经元的生存与细胞凋亡起着重要的调控作用<sup>[30-31]</sup>。徐榆林等<sup>[32]</sup>研究发现抗大鼠脑缺血再灌注损伤作用机制与抑制 p38MAPK 信号通路有关。王巧云等<sup>[33]</sup>证实大鼠脑缺血损伤海马神经元凋亡的作用机制,与海马 CA1 区 p-ERK1/2 蛋白表达有关。王胜春<sup>[34]</sup>采用 MCAO 模型大鼠探讨 p38 与炎症诱导脑缺血损伤的关系,结果表明抑制炎症因子与抑制 p38 信号通路激活有关。此外, JNK 通路在介导脑缺血细胞凋亡中也起着关键的作用<sup>[35-39]</sup>。本研究将各组药物干预后富集到 MAPK 级联的差异基因与 MAPK 信号通路相关基因进行关联分析,发现谷红注射液抗脑缺血作用与 MAPK 级联信号通路密切相关。谷红注射液干预后的 15 个差异基因与 64 个 MAPK 信号通路基因关联分析显示, 23 个基因为炎症或细

胞凋亡相关基因,说明谷红注射液抗脑缺血可能通过 MAPK 信号通路发挥抗凋亡及炎症发挥作用。

综上所述,本研究发现谷红注射液可降低神经缺陷评分,进一步通过转录组测序技术对谷红注射液抗脑缺血作用机制进行探究,发现其主要是通过调控细胞凋亡,炎症反应,氧化应激, Toll-like 信号通路及 MAPK 信号通路等多条途径发挥抗脑缺血的作用,并鉴定出谷红注射液抗脑缺血的关键差异基因,这些差异基因关联到了 20 个脑缺血疾病靶标。本研究着重分析了谷红注射液干预脑缺血的关键差异基因与 MAPK 级联信号通路的关联,发现其关联到 64 个 MAPK 信号通路相关基因,其中 23 个基因参与凋亡和炎症等过程。我们的研究通过转录组测序技术从整体的角度阐释了谷红注射液抗脑缺血可能作用的分子机制,为谷红注射液的临床应用提供了研究基础,也为下一步深入研究奠定一定的基础;同时,基于有效药物抗脑缺血作用机制的研究,为针对性的拟定脑缺血再灌注损伤的保护策略提供了一定参考。

[参考文献]

[1] ZHOU M, WANG H, ZHU J, et al. Cause-specific mortality for 240 causes in China during 1990-2013: a systematic subnational analysis for the Global Burden of

- Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2016, 387(10015): 251-272.
- [ 2 ] LIU L, WANG D, WONG K S, et al. Stroke and stroke care in China; huge burden, significant workload, and a national priority [ J ]. *Stroke*, 2011, 42 ( 12 ): 3651-3654.
- [ 3 ] TOWFIGHI A, SAVER J L. Stroke declines from third to fourth leading cause of death in the United States; historical perspective and challenges ahead[J]. *Stroke*, 2011, 42(8): 2351-2355.
- [ 4 ] WANG D, LIU J, LIU M, et al. Patterns of stroke between university hospitals and nonuniversity hospitals in mainland china; prospective multicenter hospital-based registry study [J]. *World Neurosurg*, 2017, 98: 258-265.
- [ 5 ] WANG W, JIANG B, SUN H, 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.
- [ 6 ] EL-KOUSSY M, SCHROTH G, BREKENFELD C, et al. Imaging of acute ischemic stroke [J]. *Eur Neurol*, 2014, 72(5/6): 309-316.
- [ 7 ] LAPCHAK P A. Neuroprotective and neurotrophic curcuminoids to treat stroke: a translational perspective [ J ]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20 ( 1 ): 13-22.
- [ 8 ] SCHWAMM L H, ALI S F, REEVES M J, et al. Temporal trends in patient characteristics and treatment with intravenous thrombolysis among acute ischemic stroke patients at Get With The Guidelines-Stroke hospitals [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2013, 6 ( 5 ): 543-549.
- [ 9 ] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation [ J ]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [ 10 ] FERNANDEZ-LOPEZ D, FAUSTINO J, DANEMAN R, et al. Blood-brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(28): 9588.
- [ 11 ] 王道合, 拜承萍, 赵秀丽. 脑缺血再灌注损伤的防治方法与机制研究进展 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2019(17): 1-7.
- [ 12 ] 刘抒雯, 杨丽华, 马春, 等. 中医药保护脑缺血再灌注损伤后神经血管单元的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(23): 225-234.
- [ 13 ] 龚婉, 陈晓玲, 周莉, 等. 阿魏酸钠对大鼠脑缺血再灌注炎症损伤的保护作用及机制分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3): 94-99.
- [ 14 ] 闫安, 谢云亮. 当归多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激水平及炎症因子表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 123-127.
- [ 15 ] 陈俊奎, 万海同, 周惠芬, 等. 谷红注射液在脑缺血再灌注大鼠体内药动学与抗氧化作用关联性研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(3): 447-453.
- [ 16 ] 张苗. 谷红注射液治疗急性脑梗死有效性和安全性的多中心、随机、开放性临床观察 [J]. *现代预防医学*, 2010, 37(22): 4382-4383.
- [ 17 ] 范芳芳, 陈舒曼, 杨洪军, 等. 谷红注射液抗脑缺血网络药理学分子机制研究 [J]. *复杂系统与复杂性科学*, 2018, 15(1): 11-17.
- [ 18 ] 崔凯, 吴伟伟, 刁其玉. 转录组测序技术的研究和应用进展 [J]. *生物技术通报*, 2019, 35(7): 1-9.
- [ 19 ] 赵利南, 赵益, 孙有智. 基于 RNA-seq 技术的活血化癥法治疗乳腺癌关键基因的筛选和验证 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4): 101-108.
- [ 20 ] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. *Journal of neuroscience the official journal of the society for neuroscience* [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84.
- [ 21 ] BALAYEV L. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model [J]. *Stroke*, 1996, 27 ( 9 ): 1616-1622.
- [ 22 ] ZHANG J, GUO F, WEI J, et al. An integrated approach to identify critical transcription factors in the protection against hydrogen peroxide-induced oxidative stress by Danhong injection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 112: 480-493.
- [ 23 ] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. *Biogeosciences*, 2010, 26: 139-140.
- [ 24 ] HUANG DA W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [ 25 ] 周雨濛, 张卓伯, 刘锡茜. 局灶性脑缺血动物模型的建立及神经功能评价 [J]. *生物医学工程与临床*, 2018, 22(4): 473-476.
- [ 26 ] 郭晓利, 肖伟. 线栓法大鼠中动脉闭塞脑缺血动物模型的影响因素探析 [J]. *中医药临床杂志*, 2012, 24(3): 239-241.
- [ 27 ] 胡建鹏, 王键. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型研究中的几个问题 [J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14 ( 2 ): 115-118.
- [ 28 ] LAING R J, JAKUBOWSKI J, LAING R W. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats.

- Which method works best? [J]. *Stroke*, 1993, 24 (2): 294-297.
- [29] CAKMAK H A, COSKUNPINAR E, IKITIMUR B, et al. The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study[J]. *J Cardiovasc Med*, 2015, 16(6): 431-437.
- [30] ZHANG M, GONG J X, WANG J L, et al. p38 MAPK participates in the mediation of GLT-1 up-regulation during the induction of brain ischemic tolerance by cerebral ischemic preconditioning [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 54(1): 1-14.
- [31] WU D C, YE W, CHE X M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(9): 1320-1330.
- [32] 徐榆林, 秦莎莎, 祝赫, 等. 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血小板 Src, Akt 和 p38MAPK 蛋白的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (5): 143-148.
- [33] 王巧云, 刘凤, 吴峰阶, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠海马 p-ERK1/2 与 p-JNK 表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(2): 229-234.
- [34] 王胜春. 乐尔脉对脑缺血再灌注损伤大鼠皮层炎症因子与 ERK 和 p38 信号通路表达的作用 [C] // 中国中药杂志编委会暨中药新药研发理论与技术创新论坛. 2009.
- [35] YANG H, GU Z T, LI L, et al. SIRT1 plays a neuroprotective role in traumatic brain injury in rats via inhibiting the p38 MAPK pathway [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, 38(2): 168-181.
- [36] SOOJIN K, JAEWON J, HYE-SEON J, et al. Anti-inflammatory effect of glucagon like peptide-1 receptor agonist, exendin-4, through modulation of IB1/JIP1 expression and JNK signaling in stroke [J]. *Exp Neurobiol*, 2017, 26(4): 227.
- [37] 贾冬雪, 王晓茹, 王书华, 等. 荜草苷对脑缺血再灌注大鼠神经保护作用及其机制 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(19): 2285-2288.
- [38] 梁晨, 王叶叶, 江羽, 等. 木犀草素纳米制剂通过介导 ERK/p38 MAPK/JNK 改善体内氧化应激损伤作用机制研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31 (5): 753-759.
- [39] 李盛楠, 刘洋, 刘小菲, 等. 基于 JNK 通路探讨调更汤对 GT1-7 下丘脑神经元细胞凋亡的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(20): 49-55.

[责任编辑 周冰冰]