

基于转录组测序技术研究川芎嗪对急性脊髓损伤模型大鼠基因表达的影响^Δ

张毅^{1*}, 祁文^{2#}, 吴迪¹, 谢旻成¹(1.广西中医药大学瑞康临床医学院, 南宁 530001; 2.广西中医药大学研究生院, 南宁 530001)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)11-1327-09

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.11.08

摘要 目的:探讨川芎嗪对急性脊髓损伤(SCI)模型大鼠基因表达的影响。方法:将雄性SD大鼠随机分为假手术组(A组,6只),模型组(B组,不同时间点各6只,共12只)和川芎嗪干预组(C组,不同时间点各6只,共12只)。B、C组大鼠参照改良Allen's法复制急性SCI模型。造模后,C组大鼠腹腔注射川芎嗪100 mg/kg,A、B组大鼠腹腔注射等容生理盐水,每日1次,持续7 d或14 d(分别记为B_{7d}、B_{14d}组和C_{7d}、C_{14d}组)。分别于造模前和造模后7、14 d对各组大鼠进行BBB评分,并脊髓标本苏木精-伊红、尼氏染色观察;采用转录组测序技术分析A组与B组、B组与C组大鼠脊髓标本中的差异表达基因(DEGs),借助基因本体(GO)数据库和KEGG数据库进行GO和KEGG信号通路富集分析。结果:与A组比较,B组大鼠造模后7、14 d的BBB评分均显著降低($P < 0.05$),其脊髓组织中的神经细胞和尼氏体数量明显减少;与B组比较,C组大鼠上述时间点的BBB评分均显著升高($P < 0.05$),其脊髓组织中的神经细胞和尼氏体数量有所增多。A组和B_{7d}组、A组和B_{14d}组、B_{7d}组和C_{7d}组、B_{14d}组和C_{14d}组大鼠的DEGs分别有886、1 404、70、66个,组间表达变化趋势相反的基因包括*Nemap*、*Prx*、*Gabrq*、*Gabrg2*等。各组间DEGs富集的细胞部位、分子功能、生物学过程各有不同,主要涉及溶泡、溶酶体、质膜部分、同型蛋白结合、免疫应答、离子通道活性、免疫反应(A组和B组),基底外侧质膜、外脱氧核糖核酸酶活性、对干扰素 γ 的反应(B_{7d}组和C_{7d}组),以及细胞外区、受体调节活性、含酚化合物代谢过程(B_{14d}组和C_{14d}组)等;同时,DEGs富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用(A组和B组),细胞黏附分子、补体和凝血级联、Hedgehog信号通路(B_{7d}组和C_{7d}组),逆行内源性大麻素信号、神经活性配体-受体相互作用、过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路、 γ -氨基丁酸(GABA)能突触(B_{14d}组和C_{14d}组)等信号通路。结论:川芎嗪对急性SCI模型大鼠的保护作用可能与其参与炎症反应、免疫应答/调节、离子通道、细胞因子-细胞因子受体相互作用、神经活性配体-受体相互作用、GABA能突触活性调节等有关。

关键词 川芎嗪;急性脊髓损伤;转录组测序技术;差异表达基因;基因本体;KEGG信号通路;机制;大鼠

Study on the Effects of Ligustrazine on Gene Expression of Acute Spinal Cord Injury Model Rats Based on Transcriptome Sequencing

ZHANG Yi¹, QI Wen², WU Di¹, XIE Mincheng¹(1. School of Ruikang Clinical Medicine, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China; 2. Graduate College, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of ligustrazine on gene expression of acute spinal cord injury (SCI) model rats. METHODS: Male SD rats were randomly divided into sham operation group (group A, 6 rats), model group (group B, 6 rats at each time point, 12 rats in total) and ligustrazine intervention group (group C, 6 rats at each time point, 12 rats in total). Acute SCI model was established by modified Allen's method in group B and C. After modeling, group C was given ligustrazine 100 mg/kg intraperitoneally, while group A and B were given constant volume of normal saline intraperitoneally, once a day, for consecutive 7 d or 14 d (i.e. group B_{7d} and B_{14d}, group C_{7d} and C_{14d}). BBB scoring was conducted in each group before modeling, 7 and 14 days after modeling. HE and Nissl staining observation were also carried out for spinal cord specimen. The differentially expressed genes (DEGs) between group A and group B, group B and group C were analyzed by transcriptome sequencing. The enrichment of Gene Ontology (GO) and KEGG signaling pathway was analyzed by GO database and KEGG database. RESULTS: Compared with group A, BBB scores of group B were decreased significantly 7 d and 14 d after modeling ($P < 0.05$), and the number of nerve cells and Nissl body in spinal cord tissue were decreased. Compared with group B, BBB scores of group C were increased significantly at above time points ($P < 0.05$), and the number of nerve cells and Nissl body in spinal cord tissue were

^Δ 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2016GXNS-FAA380076)

* 住院医师,硕士研究生。研究方向:中医药治疗骨与关节退行性疾病。E-mail:747388614@qq.com

通信作者:副主任医师,硕士生导师,博士。研究方向:脊柱脊髓疾病的基础与临床、中医药治疗骨与关节退行性疾病。E-mail:630179114@qq.com

increased. The numbers of DEGs of group A and group B_{7d}, group A and group B_{14d}, group B_{7d} and group C_{7d}, group B_{14d} and group C_{14d} were 886, 1 404, 70, 66, respectively. The genes with opposite expression trend included *Nemap*, *Prx*, *Gabrq*, *Gabrg2*, etc. The enrichment cell component, molecular function, biological process of DEGs were different in each group, mainly involving lymphocytosis, lysosome, plasma

membrane, homotype protein binding, immune response, ion channel activity, immune response (group A and B); basolateral plasma membrane, exodeoxyribonuclease activity, response to INF- γ (group B_{7d} and C_{7d}); extracellular domain, receptor regulatory activity, phenolic compound metabolism process (group B_{14d} and C_{14d}). DEGs enriched in cytokine-cytokine receptor interaction (group A and B); CAMs, complement and coagulation cascades and Hedgehog signaling pathway (group B_{7d} and C_{7d}); retrograde endocannabinoid signaling, neuroactive ligand-receptor interaction, PPAR signaling pathway, GABA ergic synapse (group B_{14d} and C_{14d}), etc. CONCLUSIONS: Protective effect of ligustrazine on acute SCI model rats may be associated with inflammatory response, immune response/regulation, neuron ion channel, cytokine-cytokine receptor interaction, neuroactive ligand-receptor interaction and regulation of GABA ergic synapse activity.

KEYWORDS Ligustrazine; Acute spinal cord injury; Transcriptome sequencing; Differentially expressed gene; Gene Ontology; KEGG signaling pathway; Mechanism; Rats

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)是一种因高能量损伤而导致的严重性致残性疾病。在全世界范围内,由于收集数据的方式以及结果推算的技术不同,不同地区SCI的发病率差别很大,从236/100万到4 187/100万不等^[1]。最近的一项二次研究显示,我国SCI每年的发病率约为37/100万^[2]。SCI在中医上属于“体惰”“癱证”“痿躄”范畴,为督脉损伤所导致的其他经络、气血、脏腑功能障碍^[3]。近年来,中医药治疗SCI的相关研究有所增多。川芎嗪(即四甲基吡嗪)是从中药川芎中分离出的一种生物碱,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、改善微循环等作用,临床上多用于治疗各种缺血再灌注损伤^[4-5]。SCI的原发性损伤大多不可逆,继发性损伤则是紧接原发性损伤之后的由类似于“雪崩式”损伤激活的自身损伤过程,包括缺血、出血、脊髓休克、水电解质紊乱、自由基增多、一氧化氮改变等,可引起持续性的细胞损害,甚至可引发神经细胞凋亡^[6-7]。近年来,学者对SCI的研究逐渐转向多基因参与、复杂网络调控等分子水平发展。转录组测序是当前最有效的高通量技术,可快速检测和发现细胞或器官在特定条件下所有基因、功能基因及其转录的调控规律^[8]。基于此,本研究在动物实验的基础上,借助转录组测序技术分析川芎嗪干预急性SCI模型大鼠基因表达的影响并寻找差异表达基因(DEGs),并对其进行基因本体(GO)和KEGG信号通路富集分析,以期为进一步探索川芎嗪治疗SCI的分子机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2100型生物分析仪(美国Agilent公司);Hiseq X-ten型高通量转录组测序仪(美国Illumina公司);CK31型正置光学显微镜(日本Olympus公司);TVO 63XC-MO型显微数码成像系统(广州市明美光电技术有限公司);Pannoramic SCAN型数字全扫仪器(匈牙利3DHISTECH公司);Impactor Model I型打击仪(安徽正华生物仪器设备有限公司);KD-BM型包埋机、KD-2258型病理切片机、KD-P型推片机、KD-BL型冷冻台(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);PHG-9070A型烤箱(上海精宏实验设备有限公司);JJ124BC型分析天平(常熟双杰测试仪器厂)。

1.2 药品与试剂

注射用盐酸川芎嗪(北京四环科宝制药有限公司,批号:18110345,规格:80 mg;临床用量:80~120 mg/次,每日1次);氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号:A18122701-1,规格:500 mL:4.5 g,作生理盐水用);注射用青霉素(山东圣旺药业股份有限公司,批号:20180301,规格:167万单位);Ambion Trizol试剂盒(美国Life Technologies公司,批号:15596018);多聚甲醛(美国Sigma公司);尼氏体染色液(北京索莱宝科技有限公司);苏木精-伊红(HE)染色液、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)均为本实验室自制;无水乙醇、二甲苯等其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠30只,雄性,6~8周龄,体质量200~230 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物生产合格证号:SCXK(湘)2016-0002。所有动物均单笼饲养,环境温度为20~28℃。

2 方法

2.1 造模

大鼠适应性喂养1周后,随机分为假手术组(A组,6只)、模型组(B组,共12只;不同时间点各6只,分别记为B_{7d}、B_{14d}组)和川芎嗪干预组(C组,共12只;不同时间点各6只,分别记为C_{7d}、C_{14d}组)。禁食、不禁水8 h后,大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液(0.3 mg/kg)麻醉,以第9胸椎(T₉)为中心,咬除椎板,暴露长约5 mm的脊髓。A组大鼠止血缝合;B、C组大鼠利用打击仪参照改良Allen's法复制急性SCI模型:以棘突固定器钳夹固定胸椎T₈、T₁₀棘突,调节T₉节段脊髓水平,用直径2.5 mm、质量10 g的撞针自2.5 cm高处自由落下垂直撞击T₉脊髓后正中部位(致伤能量:25 gcf),撞击后迅速移除撞针。以肉眼可见脊髓组织肿胀、出血以及大鼠摆尾反射、双下肢回缩样扑动且麻醉清醒后呈迟缓性瘫痪为造模成功^[9],缝合术后皮下注射青霉素8万单位,每日1次、持续3 d。人工按摩大鼠膀胱排尿,每日2次,直至其恢复自主排尿。

2.2 给药

造模成功后,C组大鼠腹腔注射川芎嗪(药液质量浓

度为 10 mg/mL,以生理盐水配制;给药量为 100 mg/kg,剂量根据该药临床用量并按人与动物体表面积换算而得),A、B 组大鼠均腹腔注射等容生理盐水。首次给药应在术后 30 min 内,每日 1 次,分别持续 7 d 或 14 d。

2.3 大鼠神经功能行为学观察及评分

分别于造模前和造模后 7、14 d 时对各组大鼠进行 BBB 评分:将大鼠放入开口圆盆中,使其自由直线行走,尽量令其在盆内的中心区域活动。测试时间为 4 min,观察大鼠在行走过程中膝、髌和踝关节的运动幅度、躯干运动和协调情况并计分;总分为 21 分,分数高低与大鼠 SCI 程度呈反比^[10]。评分由两位研究者独立完成,取平均值作为评分结果。

2.4 标本的采集与指标检测

2.4.1 标本的采集 分别于造模后 7、14 d 时取 B、C 组大鼠各 6 只,于造模后 14 d 时取 A 组大鼠 6 只,均于耳缘静脉注射 30 g/L 戊巴比妥钠溶液(30 mg/kg)麻醉后,于左心室灌注生理盐水约 30 mL,再用 4% 多聚甲醛溶液 30 mL 灌注至肢体强直,以脊髓受损处(A 组大鼠于对应位置)为中心,取出上下各长约 0.5 cm 的脊髓,备用。

2.4.2 HE、尼氏染色观察 每组在相应时间点取 3 只大鼠的脊髓标本适量,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜,次日经常规脱水、透明、石蜡包埋后切片(厚度约 4 μm)。切片分别经 HE、尼氏染色后,置于显微镜下观察并拍照,记录大鼠脊髓损伤及恢复情况[经 HE 染色后,神经细胞的细胞质呈红色,细胞核呈蓝紫色;经尼氏染色后,尼氏体呈块状(如虎斑状)或颗粒状]。

2.4.3 DEGs 分析 每组在相应时间点取另外 3 只大鼠的脊髓标本适量,采用 Ambion Trizol 试剂盒提取总 RNA,选择质量合格[即经生物分析仪检测,RNA 完整值(RIN) ≥ 7 ;28S/18S ≥ 1.5 ,且起始量为 0.1~1 μg]^[11]的总 RNA 作为 mRNA 测序的建库起始样品,经 mRNA 纯化及片段化、cDNA 合成、文库片段富集、文库质检后,采用二代转录组测序技术以高通量转录组测序仪对上述文库进行双末端(PE)测序。使用 Cutadapt v1.15 软件对原始数据进行处理,去除 3' 端带接头的序列、平均质量分数低于 Q20 的序列,以保证测序错误率 $< 1\%$;使用 FastQC v0.11.8 软件对测序数据进行单碱基质量分布、含量分布、Reads 值平均质量分布检测,以评估测序数据的质量;使用 HISAT 2.0 软件将过滤后的 Reads 值与 Ensembl 数据库(<http://www.ensembl.org/>)中的参考基因组(共有基因 22 250 个)进行对比。根据比对结果,使用 HTSeq v0.11.1 软件统计各比对基因的 Reads 值,并将该值作为此基因的原始表达量。使用 FPKM(Fragments per kilobase million,即在每百万个 Reads 值中,来自某基因每千个碱基长度的 Reads 值)对表达量进行标准化,使用 RSeQC v2.6.4 软件分析表达量饱和度,并以 Pearson 相关系数表示样本间基因表达模式的相关性,并制作成热图(重复样本间的相关系数越接近于 1,表明相关性越强^[12])。在此基础上,对不同样本进行表达分析,采用

DESeq V3.10 软件对各组基因表达量(以经 FRKM 进行标准化的 Reads 值表示)进行差异分析,以表达差异倍数 $\log_2\text{FC} > 1$ 且 $P < 0.05$ 的基因为 DEGs^[13-14],并绘制各组间共有、特有 DEGs 的 Upset 图。

2.5 生物学分析

以“2.4”项下所得 DEGs 为对象,借助 GO 数据库(<http://geneontology.org/>)中的“topGO”插件进行 GO 富集分析,挖掘 DEGs 涉及的生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF);借助 KEGG 数据库(<http://www.kegg.jp/>)进行 KEGG 通路富集分析,挖掘 DEGs 富集的主要信号通路。两者均以 $P < 0.05$ 为显著富集。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠 BBB 评分结果

造模前,各组大鼠的 BBB 评分均为 21 分。与 A 组比较,B 组大鼠造模后 7、14 d 时的 BBB 评分均显著降低;与 B 组比较,C 组大鼠造模后 7、14 d 时的 BBB 评分均显著升高($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 各组大鼠 BBB 评分比较($\bar{x} \pm s, n=6$,分)

Tab 1 Comparison of BBB score of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$,score)

组别	造模后 7 d	造模后 14 d
A 组	21	21
B 组	6.42 \pm 1.11*	10.08 \pm 1.28*
C 组	10.25 \pm 0.69 [#]	12.83 \pm 1.21 [#]

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,[#] $P < 0.05$

Note:vs. group A,* $P < 0.05$;vs. group B,[#] $P < 0.05$

3.2 HE、尼氏染色观察结果

经 HE 染色后,A 组大鼠脊髓神经细胞形态正常,胞核清晰可见;B 组大鼠脊髓神经细胞核固缩,且数量明显减少;C 组大鼠脊髓神经细胞破损程度较同一时间点的 B 组要轻,详见图 1A。经尼氏染色后,A 组大鼠尼氏体呈块状(形如虎斑)或颗粒状;B 组大鼠尼氏体染色变浅,数量明显减少,在 7 d 时几乎消失;C 组大鼠尼氏体的数量较同一时间点的 B 组明显增多,详见图 1B。

3.3 DEGs 分析结果

测序所得数据的质量检测结果显示,大部分序列的碱基质量均在 Q20 以上,未出现碱基偏移;中等表达的基因占大多数,而低表达、高表达的基因占比较小,见图 2[图中,A、B、C 分别对应 A、B、C 组,数字对应各组大鼠序号,“7 d”“14 d”分别表示造模后 7 d、造模后 14 d(下同);盒型中间的横线是中位数,盒型的上下边缘为 75% lgFRKM,上下限为 90% lgFRKM];样本间基因表达模式的 Pearson 相关系数均大于 0.8,提示各样本选择合理、生物重复性较好,见图 3(图中,左侧和上侧为样本聚类情况,方块中的数据为 Pearson 相关系数)。

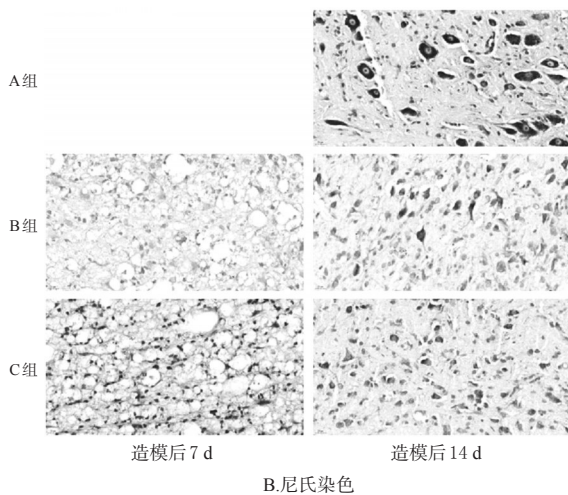
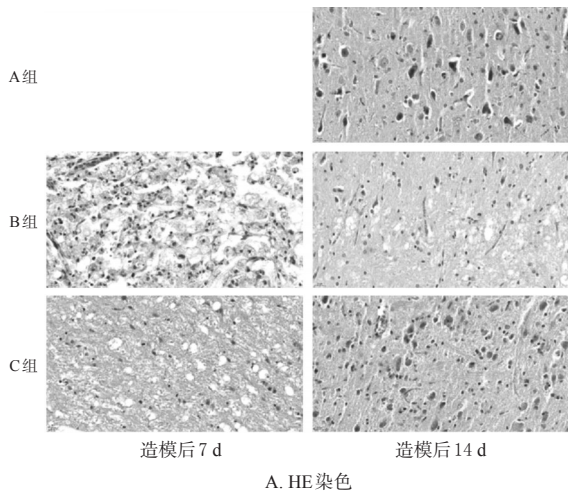


图1 染色结果(×400)

Fig 1 Results of staining(×400)

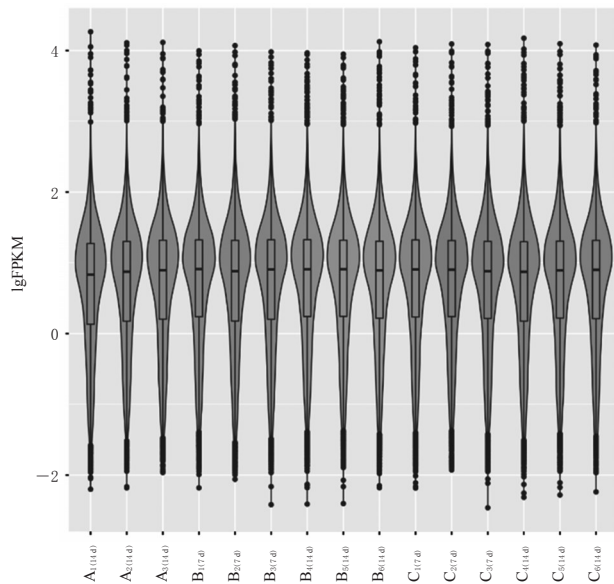


图2 FPKM密度分布小提琴图

Fig 2 Violin chart of FPKM density distribution

在此基础上,对各组间的DEGs进行筛选,各组差异分析共有、特有DEGs的Upser图见图4(图中,“number

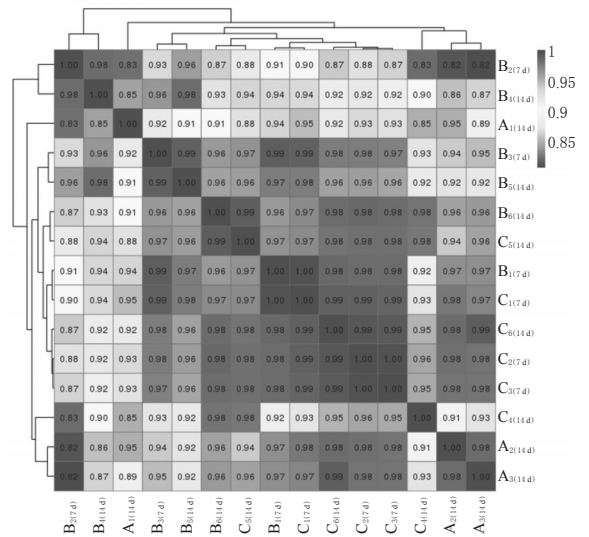


图3 样本相关性检验结果

Fig 3 Correlation test results of samples

in each set”表示各组鉴定到的差异基因的总数,“number of each intersection”表示多个比较组鉴定到的共有差异基因的数目;横坐标的单一“·”表示该组鉴定到的特有差异基因的数目,横坐标多个“·”之间的连线所对应的“number of each intersection”表示连线连接的多个比较组鉴定到的共有差异基因的数目)。结果,A组和B_{7d}组、A组和B_{14d}组、B_{7d}组和C_{7d}组、B_{14d}组和C_{14d}组大鼠比较,分别涉及DEGs 886、1 404、70、66个,详见表2;涉及 *Ncmap*、*Prx*、*Gabrq*、*Gabrg2* 等基因,部分DEGs筛选结果见表3。

3.4 生物信息学分析

由于生物过程条目众多,故本研究根据P值大小将排序前10位的GO富集结果进行展示,详见图5(图中,CC为细胞部位,MF为分子功能,BP为生物过程;MHC为主要组织相容性复合体,LUBAC为线性泛素装配复合体,IFN- γ 为 γ 干扰素,CRLF为细胞因子受体样因子,CLCF1为心肌营养素样细胞因子1,CNTFR为睫状神经营养因子受体,GABA为 γ -氨基丁酸)。根据FDR值(FDR即未发生率,一般取值范围为0~1,越接近于零则表示富集越显著^[15])大小将排序前20位的KEGG富集结果($P < 0.05$)进行展示,详见图6(图中,HLTV-1为人类嗜T淋巴细胞病毒1,CAMs为细胞黏附因子,TNF为肿瘤坏死因子,FoxO为叉头框蛋白O,PPAR为过氧化物酶体增殖物激活受体)。

3.4.1 A组与B组 GO富集分析结果(图5A、5B)显示,A、B组DEGs富集的BP主要与免疫系统过程、生物过程调节、应激反应、细胞激活等有关,具体包括免疫应答、防御反应、对细胞因子的反应等。两组DEGs富集的CC主要为细胞外区、细胞膜、细胞表面等部位,还涉及到MHC蛋白复合物、炎症复合物(A组 vs. B_{7d}组)和受体复合物(A组 vs. B_{14d}组)、溶酶体(A组 vs. B组)等。在

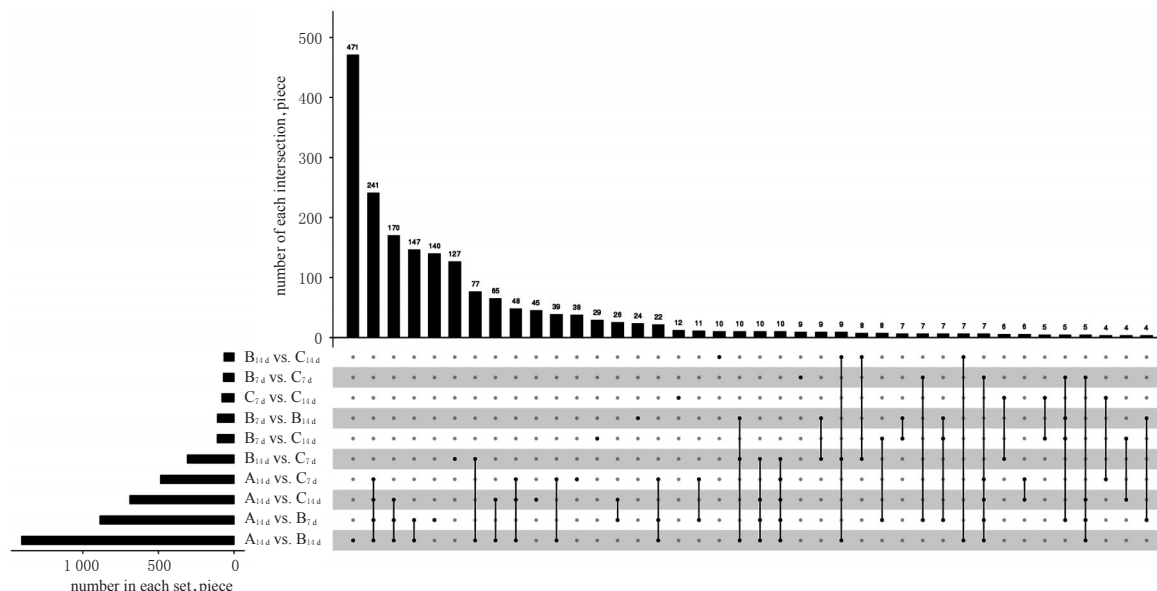


图4 各组差异分析共有、特有DEGs的Upset图

Fig 4 Upset map of common and specific DEGs of differential analysis in each group

表2 DEGs统计结果(个)

Tab 2 Statistics of DEGs(piece)

对比组别	表达上调的DEGs	表达下调的DEGs	合计
A组和B _{7d} 组	702	184	886
A组和B _{14d} 组	921	483	1 404
B _{7d} 组和C _{7d} 组	42	28	70
B _{14d} 组和C _{14d} 组	31	35	66

MF中,两组DEGs均富集于结合,包括蛋白质结合、阴离子结合、阴离子配位等,同时还涉及半胱氨酸型内肽酶活性、细胞因子受体结合、趋化因子受体结合等受体结合(A组 vs. B_{7d}组)以及被动跨膜转运蛋白活性、底物比通道活性等转运活性(A组 vs. B_{14d}组)。KEGG富集分析结果(图6A、6B)显示,A、B组的DEGs主要富集于细

表3 部分DEGs的筛选结果

Tab 3 Screening results of partial DEGs

对比组别	差异类型(数量)	具体变化(数量)	基因名称
A组和B _{7d} 组与A组和B _{14d} 组	表达上调(42个)	在B _{7d} 组和C _{7d} 组表达上调而在A组和B _{14d} 组表达下调(19个)	<i>Nemap, Prx, Slc36a2, Cldn1, Ddn, Myoc, AABR07053509.2, Cyp39a1, Slc13a5, Dhh, Mpz, Cldn19, B3gnt5, Mlip, AABR07071891.2, Gln, Gli1, Ptch2, Fam163a</i>
		在B _{7d} 组和C _{7d} 组、A组和B _{7d} 组均表达上调(1个) 仅在B _{7d} 组和C _{7d} 组表达上调(22个)	<i>Pimreg, Asb15, Ifit1, Neur1b, Rasd2, Cpne1, Doc2b, Nmu, Lbx1, Slc9a3, Srms, Zfp831, Kif18a, Gpr26, Selp, Naa11, Grp, Prox2, Slc1a6, AABR07041232.1, AABR07000398.1, LOC100359539, Gpx2</i>
A组和B _{14d} 组与A组和C _{14d} 组	表达上调(31个)	在B _{7d} 组和C _{7d} 组表达下调而在A组和B _{14d} 组表达上调(24个)	<i>Lilrb3, Callm2, AABR07025272.1, AABR07025140.1, Unc93a, C2, Cdh3, Romo1, Aoah, Cxcl16, F2r3, F10, Meioi, Epst1, Sfn2, Slc25a43, Sl14, Lrrn4cl, Lye2, Scin, Mrc1, Clec12a, Folr1, Aif1</i>
		仅在B _{7d} 组和C _{7d} 组表达下调(4个)	<i>Otulin, LOC688459, Exo1, Ubd</i>
A组和B _{14d} 组与A组和C _{14d} 组	表达上调(35个)	在B _{14d} 组和C _{14d} 组表达上调而在A组和B _{7d} 组表达下调(16个)	<i>Gabrq, Gabrg2, LOC108348136, RGD1562420, Agr2, Sprn, Cited1, LOC100362965, Rtl4, RGD1359290, Cntn5, Tmem266, AABR07020786.1, Mab2112, Fig18, Grb14</i>
		在B _{14d} 组和C _{14d} 组、A组和B _{14d} 组均表达上调(1个) 仅在B _{14d} 组和C _{14d} 组表达上调(14个)	<i>Cxcl13, Romo1, Phyhip, RGD1310507, Smim18, Ces1d, Cpa2, Zfp541, Lhx1, Pck1, Pla2g2a, Tmem270, Rprml, Myom3, Ucp1</i>
A组和B _{14d} 组与A组和C _{14d} 组	表达下调(15个)	在B _{14d} 组和C _{14d} 组表达下调而在A组和B _{7d} 组表达上调(20个)	<i>Cxcl14, Olr35, Clef1, Acp4, Drd1, Clqt19, Batf3, Fam115c, Rgs1, Pla2g2e, Ly6g6e, Il18r1, Card14, Lmhn2, Mapk13, Serpinf2, Clec4a2, Dnah8, Dendd2d, Tnfrsf6</i>
		仅在B _{14d} 组和C _{14d} 组表达下调(15个)	<i>Abcg3f3, LOC103693323, Tmem82, Igf2bp2, Scube2, Slf2d1b2, Aknad1, Amy1a, AC125873.1, Eqtn, Ifit1, Tal2, Dntt, AABR07034739.1, Vax2</i>

胞因子-细胞因子受体相互作用、CAMs、吞噬体、类固醇生物合成、抗原处理和呈递、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、补体和凝血级联等信号通路上。

3.4.2 B组与C组 ①B_{7d}组与C_{7d}组:GO富集分析结果(图5C)显示,两组DEGs主要富集于与免疫应答、神经元保护、有机酸转运等BP上,主要包括对IFN-γ的反应、电压门控钠离子通道的聚集、髓鞘形成、神经鞘、神经元离子通道聚集、固有免疫应答、羧酸跨膜转运等。DEGs

主要富集的CC包括基底外侧质膜、质膜区、刷状缘等部位,主要具有外脱氧核糖核酸酶活性、二羧酸跨膜转运蛋白活性、钙离子结合等MF。KEGG富集分析结果(图6C)显示,两组的DEGs主要富集于CAMs、补体和凝血级联、Hedgehog信号通路等信号通路上。②B_{14d}组与C_{14d}组:GO富集分析结果(图5D)显示,两组DEGs富集的BP主要与含酚化合物代谢过程、细胞对内源性刺激的反应等有关,包括对儿茶酚类化合物代谢过程、对氮化

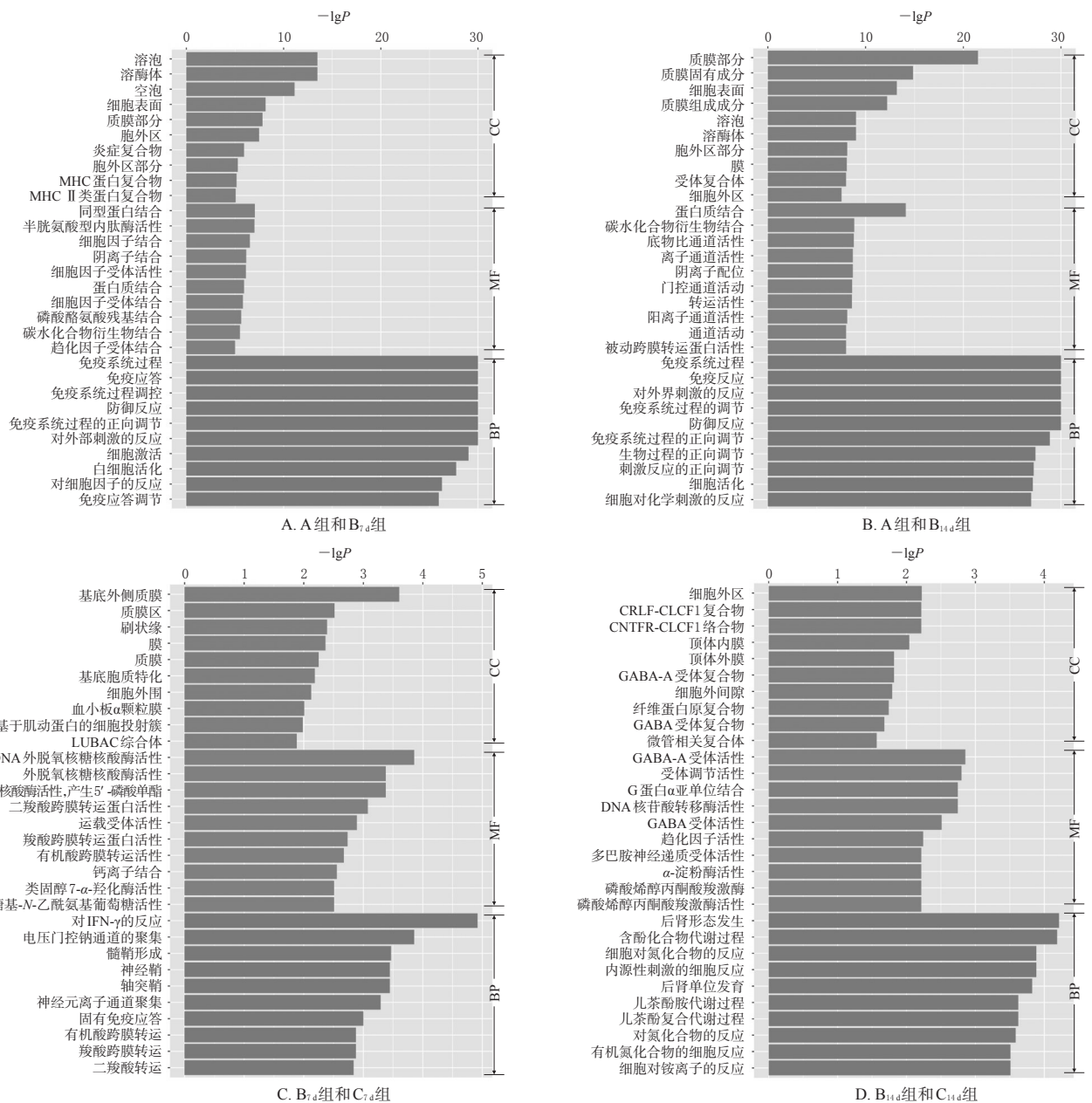


图5 GO富集分析柱状图

Fig 5 Column diagrams of GO enrichment analysis

化合物的反应、有机氮化合物的细胞反应等。DEGs 主要富集于细胞外区、细胞外间隙、顶体内膜、顶体外膜等部位,涉及CRLF-CLCF1复合体、CNTFR-CLCF1络合物、GABA受体复合体、GABA-A受体复合物等;主要涉及受体调节活性、G蛋白 α 亚单位结合、DNA核苷酸转移酶活性等MF。KEGG富集分析结果(图6D)显示,两组DEGs主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用、逆行内源性大麻素信号转导、神经活性配体-受体相互作用、PPAR信号通路、GABA能突触、FoxO信号通路、多巴胺能突触等信号通路上。

4 讨论

SCI在临床上较为常见且治疗棘手,且由于该症高发病率、高致残率、高耗费和青壮年多发的特点,给患者

及其家庭乃至整个社会都造成了极大的负担^[1-2]。DEGs及其mRNA一直是近十几年来研究的热点之一,以其为基础开展靶向治疗、精准治疗研究,可为SCI的临床治疗提供新的方向。本研究基于二代测序基础,初步探讨了川芎嗪对急性SCI模型大鼠脊髓组织中DEGs的影响,并对DEGs进行GO和KEGG富集分析,旨在为川芎嗪治疗SCI的深入研究提供参考。

4.1 A组与B组比较结果的分析

与A组比较,B组大鼠造模后7、14 d时的BBB评分均显著降低,且脊髓神经细胞和尼氏体的数量均明显减少。两组共涉及DEGs 886个(A组和B_{7d}组)、1 404个(A组和B_{14d}组)。GO富集、KEGG信号通路富集分析结果显示,两组DEGs主要富集于细胞表面、胞外区部分、

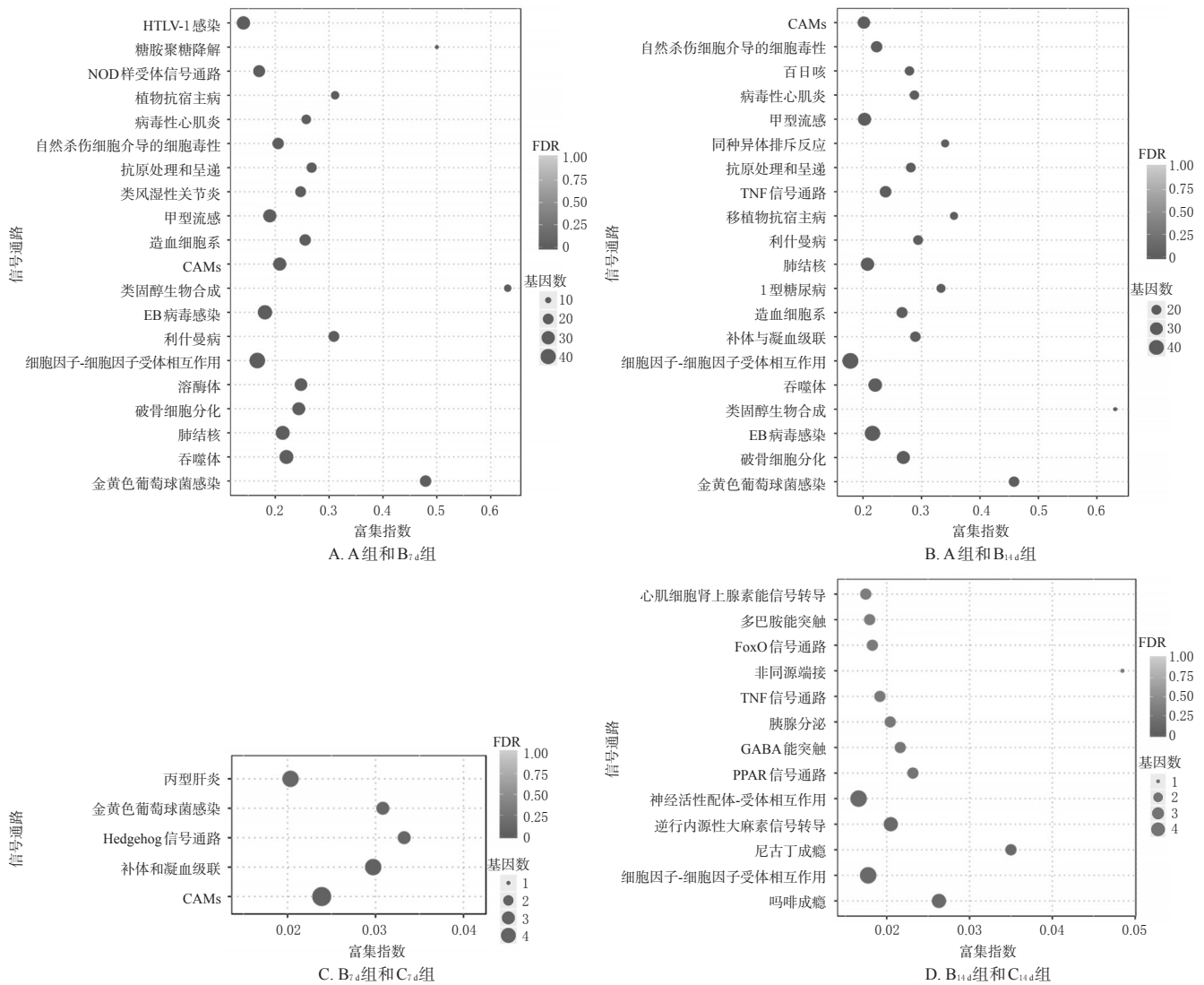


图6 KEGG通路富集分析高级气泡图

Fig 6 Senior bubble charts for KEGG pathway enrichment analysis

溶泡、溶酶体、质膜部分等CC,涉及蛋白质结合、细胞因子结合、阴离子结合/配位等MF以及免疫系统过程、免疫反应、免疫应答、防御反应等BP,主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用、CAMs、吞噬体等信号通路,与脊髓损伤相关机制和病理生理过程(如免疫性损伤、缺血再灌注损伤、脂质过氧化)^[6-7]基本相符。

4.2 B组与C组比较结果的分析

与B组比较,C组大鼠造模后7、14 d时的BBB评分均显著升高,且脊髓神经细胞和尼氏体的数量均有所增多。两组共涉及DEGs 70个(B_{7d}组和C_{7d}组)、66个(B_{14d}组和C_{14d}组)。

4.2.1 B_{7d}组和C_{7d}组 DEGs分析结果显示,在A组和B_{7d}组表达下调而在B_{7d}组和C_{7d}组表达上调的DEGs有*Ncmap*、*Prx*、*Ddn*等,主要与髓鞘形成、神经元发育和突触可塑性有关^[7]。GO、KEGG富集分析结果显示,两组DEGs主要富集于基底外侧质膜、质膜区、刷状缘等CC,主要涉及外脱氧核糖核酸酶活性、二羧酸跨膜转运蛋白

活性、运载受体活性等MF,对IFN、IFN- γ 的反应、电压门控钠离子通道的聚集、髓鞘形成、神经元离子通道聚集、有机酸转运等BP以及CAMs、补体和凝血级联反应、Hedgehog信号通路等信号通路。

有研究表明,应用钠离子通道阻滞剂、早期开放低电导钙依赖性钾通道、激活磷酸三腺苷敏感性钾通道(KATP)、阻断钾离子过度外流/阻断细胞内钙超载等均对神经损伤具有一定的改善作用;而激活延迟外向钾通道、高电导钙依赖性钾通道等则可对神经细胞造成损伤^[16-18];同时,钠离子通道各亚型均参与了炎性疼痛和神经性疼痛的发生^[19]。细胞免疫、体液免疫都受IFN- γ 的调节:有研究指出,1型辅助T细胞(Th1)和小胶质/巨噬细胞分泌的IFN- γ 依赖性白细胞介素10(IL-10)有助于SCI后的功能恢复^[20]。补体和凝血级联在机体止血、免疫防御等方面具有非常重要的作用:有研究指出,在外周神经损伤诱发的神经疼痛模型大鼠中,其脊髓背角存在补体的异常活化,且干预该活化过程可明显抑制或者

逆转其痛觉过敏^[21]。脱氧核糖核酸酶在细胞凋亡、DNA降解等中起着重要作用^[22]。此外,CAMs的作用也不能忽视:有研究认为,急性SCI患者的外周血淋巴细胞中细胞间黏附分子1(ICAM-1)含量升高,该分子可能参与了患者机体的免疫应答及SCI发生过程^[23];神经细胞黏附分子(NCAM)是细胞外基质的重要组分,参与了中枢神经的分化、迁移、发芽、突触重建等过程^[24-25],有研究者于蛛网膜下腔注射重组人神经细胞黏附分子1(rhNCAM-1)蛋白后,患者双下肢运动功能有所恢复,提示该药可通过改善SCI后损伤区及其两端神经细胞之间的功能来促进轴突再生,从而促进患者运动功能恢复^[26]。Hedgehog信号通路与神经发育、分化过程以及神经炎症、神经性疼痛有关,可能参与了SCI后的神经修复调控^[27-29]。由此可见,造模后7d,川芎嗪对模型组大鼠的保护作用可能与其参与免疫应答、炎症反应、离子通道聚集、髓鞘形成、CAMs、补体和凝血级联反应等有关。

4.2.2 B_{14d}组和C_{14d}组 DEGs分析结果显示,在A组和B_{14d}组表达下调而在B_{14d}组和C_{14d}组表达上调的DEGs有*Gabrq*、*Gabrg2*等,主要与GABA能突触有关^[30]。GO富集、KEGG信号通路富集分析结果显示,两组DEGs主要富集于细胞外区、顶体内/外膜等部位,主要涉及受体调节活性、G蛋白 α 亚单位结合、DNA核苷酸转移酶活性等MF,含酚化合物代谢过程、细胞对氮化合物的反应、内源性刺激的细胞反应等BP以及细胞因子-细胞因子受体相互作用、逆行内源性大麻素信号转导、神经活性配体-受体相互作用、PPAR信号通路、GABA能突触、FoxO信号通路、多巴胺能突触等信号通路。

GABA是中枢神经系统中一种重要的神经递质,其对神经元抑制作用的发挥主要是由GABA-A受体来完成的^[30]。GABA-A受体的再分配由多种神经调节物质(如激素和细胞因子)介导^[31]。有研究发现,TNF- α 增加了神经突触上GABA-A受体的数量,该炎症因子介导的GABA-A受体向脊髓神经质膜转运是中枢神经兴奋性毒性的一个潜在靶点^[32]。有研究指出,GABA可降低SCI七鳃鳗幼虫和非SCI七鳃鳗幼虫的弯曲反应;GABA-A受体拮抗剂能增强SCI七鳃鳗幼虫的弯曲反应,同时GABA能效应受其SCI恢复程度的影响^[33]。有学者以部分坐骨神经结扎大鼠模型为研究对象,发现经脊髓刺激后诱导的镇痛与局部GABA能神经递质系统的激活有关^[34]。唾液 α -淀粉酶可反映交感神经系统活性^[35];同时,副交感神经活动、反射活动或SCI下受体超敏反应等也可能导致运动后唾液 α -淀粉酶活性的变化^[36]。有研究者从不同角度探讨去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺等儿茶酚胺类神经递质与免疫系统之间的相互作用,发现下丘脑、海马和外周淋巴器官中儿茶酚胺的含量与免疫系统功能密切相关^[37-38];其他的如PPAR信号通路、FoxO信号通路虽未见与急性SCI直接相关的证据,但均与氧化应激损伤、细胞凋亡等有关^[39-40]。由此可见,造模

后14d,川芎嗪对模型组大鼠的保护作用可能与免疫调节、儿茶酚胺代谢、GABA-A受体活性、细胞因子-细胞因子受体相互作用等有关。

5 结语

SCI是多因子、多因素、多生物过程共同作用的结果。本研究发现,川芎嗪可能通过炎症反应、免疫应答、免疫调节、神经元离子通道聚集、细胞因子-细胞因子受体相互作用、神经活性配体-受体相互作用、氧化应激损伤、突触重建、轴突感觉、髓鞘形成、神经性疼痛、GABA能突触等生物学过程来发挥对SCI细胞凋亡、神经损伤的改善作用,可为后续研究提供新方向。但本研究也存在一定的局限性,如川芎嗪对SCI主要为辅助治疗、未设置多个剂量组等,且上述结论尚未通过相关基础研究予以验证,故有待后续进一步研究证实。

参考文献

- [1] SINGH A, TETREAU L, KALSI-RYAN S, et al. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury [J]. *Clin Epidemiol*, 2014. DOI:10.2147/CLEP.S68889.
- [2] 陈星月,陈栋,陈春慧,等.中国创伤性脊髓损伤流行病学和疾病经济负担的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2018,18(2):143-150.
- [3] 吴杨鹏.活血通督汤对大鼠急性脊髓损伤的修复作用及机制[D].福州:福建中医药大学,2018.
- [4] 张春兵.川芎嗪抗脑缺血再灌注损伤作用的机制研究[D].南京:南京中医药大学,2008.
- [5] 王树森,郑越,肖漓,等.川芎嗪对缺血再灌注致急性肾损伤的影响及机制研究[J]. *解放军医药杂志*, 2019,31(6):78-82.
- [6] LOSEY P, ANTHONY DC. Impact of vasculature damage on the outcome of spinal cord injury: a novel collagenase-induced model may give new insights into the mechanisms involved[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(20):1783-1786.
- [7] MORTAZAVI MM, VERMA K, HARMON OA, et al. The microanatomy of spinal cord injury: a review[J]. *Clin Anat*, 2015,28(1):27-36.
- [8] 柴华文,罗光明,吴波,等.转录组测序技术在中药中的应用[J]. *时珍国医国药*, 2018,29(12):3001-3003.
- [9] 李一帆,杨茂有,陈东.急性大鼠脊髓损伤Allen's法模型的改良及电生理评价[C]//重庆:中国解剖学会2012年年会论文集,2012:124.
- [10] BASSO DM, BEATTIE MS, BRESNAHAN JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*, 1995,12(1):1-21.
- [11] ROMERO IG, PAI AA, TUNG J, et al. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification[J]. *BMC Biology*, 2014. DOI:10.1186/1741-7007-12-42.
- [12] 吴婧.千金文武汤干预糖尿病肾病模型的蛋白质组学和代谢组学研究[D].延吉:延边大学,2019.
- [13] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estima-

- tion of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biol*, 2014. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- [14] 梁斌,冷红,吴斌.运用生物信息学预测乳腺导管原位癌及浸润性导管癌的差异表达基因[J].*中华肿瘤防治杂志*,2019,26(24):1866-1871.
- [15] 刘京铭.基于多组学的结核病发病分子机制核心复杂网络系统的发现及预测诊断模型构建的研究[D].北京:北京市结核病胸部肿瘤研究所,2017.
- [16] 张登文,张传汉,王学仁.神经系统ATP敏感性钾离子通道相关研究进展[J].*华中科技大学学报(医学版)*,2015,36(1):125-128.
- [17] GANDHI S, CHEN S, HONG L, et al. Effect of mobile health interventions on the secondary prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis[J]. *Can J Cardiol*, 2016, 32(10): 219-231.
- [18] 羊明智.脊髓继发性损伤中Ca²⁺介导的即早基因表达及机理研究[D].上海:第二军医大学,2004.
- [19] 韩鹏刚,范崇旭,陈冀胜.电压门控钠离子通道与疼痛症[J].*生命科学研究*,2014,18(3):275-282.
- [20] ISHII H, TANABE S, UENO M, et al. IFN- γ -dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury[J]. *Cell Death Dis*, 2013. DOI: 10.1038/cddis.2013.234.
- [21] 王金保.脊髓背角补体异常活化与神经病理性疼痛关系的实验研究[D].重庆:第三军医大学,2009.
- [22] VALLE FM BALADA E ORDI-ROS J, et al. DNase 1 and systemic lupus erythematosus[J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 5(7): 359-363.
- [23] 杨立利,贾连顺,苟三怀,等.急性脊髓损伤患者外周血淋巴细胞细胞间黏附分子-1的表达及其临床意义[J].*脊柱外科杂志*,2007,5(3):163-165.
- [24] HANSEN SM, BEREZIN V, BOCK E. Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 65(23): 3809-3821.
- [25] AXELSSON M, DUBUISSON N, NOVAKOVA L, et al. Cerebrospinal fluid NCAM levels are modulated by disease: modifying therapies[J]. *Acta Neurol Scand*, 2019, 139(5): 422-427.
- [26] 路伟,王廷华,王特为,等.蛛网膜下腔置管灌注rhNCAM1促损伤脊髓再生修复的实验研究[J].*神经解剖学杂志*,2011,27(2):169-173.
- [27] MOREAU N, MAUBORGNE A, BOURGOIN S, et al. Early alterations of Hedgehog signaling pathway in vascular endothelial cells after peripheral nerve injury elicit blood-nerve barrier disruption, nerve inflammation, and neuropathic pain development[J]. *Pain*, 2016, 157(4): 827-839.
- [28] 祁文,夏天,王志威,等. Hedgehog 信号通路 with 神经干细胞的研究进展[J].*重庆医学*,2013,42(31):3824-3826.
- [29] 崔兆辉,滕元君,姜金,等. Sonic Hedgehog 信号通路在成年大鼠脊髓损伤后的表达[J].*中国修复重建外科杂志*,2015,29(5):576-581.
- [30] HENNING F, BERNHARD H, JÜRGEN S. Heterosynaptic long-term potentiation at GABAergic synapses of spinal lamina I neurons[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(48): 17383-17391.
- [31] WANG Q, LIU L, PEI L, et al. Control of synaptic strength, a novel function of Akt[J]. *Neuron*, 2003, 38(6): 915-928.
- [32] STÜCK ED, CHRISTENSEN RN, HUIE JR, et al. Tumor necrosis factor alpha mediates GABA (A) receptor trafficking to the plasma membrane of spinal cord neurons in vivo[J]. *Neural Plast*, 2012. DOI:10.1155/2012/261345.
- [33] SVENSSON E, KIM O, PARKER D. Altered GABA and somatostatin modulation of proprioceptive feedback after spinal cord injury in lamprey[J]. *Neuroscience*, 2013. DOI:10.1016/j.neuroscience.2013.01.017.
- [34] JANSSEN SP, GERARD S, RAIJMAKERS ME, et al. Decreased intracellular GABA levels contribute to spinal cord stimulation-induced analgesia in rats suffering from painful peripheral neuropathy: the role of KCC2 and GABA (A) receptor-mediated inhibition[J]. *Neurochem Int*, 2011, 60(1): 21-30.
- [35] LEICHT CA, PAULSON TAW, GOOSEY-TOLFREY VL, et al. Salivary alpha amylase not chromogranin A reflects sympathetic activity: exercise responses in elite male wheelchair athletes with or without cervical spinal cord injury[J]. *Sports Med Open*, 2017, 3(1): 1-9.
- [36] LEICHT CA, GOOSEY-TOLFREY VL, BISHOP NC. Spinal cord injury: known and possible influences on the immune response to exercise[J]. *Exerc Immunol Rev*, 2013. DOI:10.1155/2013/159124.
- [37] KHODAYARI S, PAKDEL FG, SHAHABI P, et al. Acute tramadol-induced cellular tolerance and dependence of ventral tegmental area dopaminergic neurons: an in vivo electrophysiological study[J]. *Basic Clin Neurosci*, 2019, 10(3): 209-224.
- [38] CAI NS, QUIROZ C, BONAVENTURA J, et al. Opioid-galanin receptor heteromers mediate the dopaminergic effects of opioids[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(7): 2730-2744.
- [39] SUN W, ZHENG K, LIU B, et al. Neuroprotective potential of gentongping in rat model of cervical spondylotic radiculopathy targeting PPAR- γ pathway[J]. *J Immunol Res*, 2017. DOI:10.1155/2017/9152960.
- [40] GUO F, YU X, XU A, et al. Japanese encephalitis virus induces apoptosis by inhibiting Foxo signaling pathway[J]. *Vet Microbiol*, 2018. DOI:10.1016/j.vetmic.2018.05.008.

(收稿日期:2019-09-18 修回日期:2020-04-08)

(编辑:张元媛)