

蛭龙活血通瘀胶囊对小鼠脑出血及长链非编码RNA和靶基因的影响[△]

谭睿陟^{1*}, 钟霞¹, 王丽¹, 杨思进², 徐厚平^{3#} (1. 西南医科大学附属中医医院中西医结合研究中心, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院心脑血管科, 四川泸州 646000; 3. 西南医科大学附属中医医院治未病中心, 四川泸州 646000)

中图分类号 R965;R743.34 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)12-1421-09

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.12.03



摘要 目的 研究蛭龙活血通瘀胶囊对小鼠脑出血及长链非编码RNA(LncRNA)和靶基因的影响。方法 将24只C57BL/6雄性小鼠随机均分为假手术1组、模型1组和蛭龙活血通瘀胶囊低、高剂量组(0.35、1.40 g/kg),尾状核注射胶原酶以建立脑出血模型。术后1 h,各药物组小鼠灌胃相应药液,假手术1组和模型1组小鼠灌胃生理盐水,每天1次,连续3 d。通过苏木精-伊红和尼氏染色观察各组小鼠脑组织的形态学变化,通过免疫组化法、Western blot法和实时定量聚合酶链反应(PCR)法检测其脑组织中白细胞介素1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)蛋白及mRNA的表达水平。另将9只C57BL/6雄性小鼠随机均分为假手术2组、模型2组和干预组(蛭龙活血通瘀胶囊1.40 g/kg),按上述方法建模、给药,分离全脑组织,提取总RNA后测序并分析差异LncRNA,进行基因本体(GO)富集,预测有效LncRNA和靶基因,并通过实时定量PCR法进行验证。结果 与模型1组比较,蛭龙活血通瘀胶囊低、高剂量组小鼠脑组织病理损伤明显改善,脑组织中IL-1 β 、TNF- α 蛋白及mRNA的表达均显著下调($P < 0.05$)。筛选出2个有效LncRNA体内验证结果(LncRNA-Dl1st-211在模型2组中高表达,经蛭龙活血通瘀胶囊干预后显著下调;LncRNA-Dl1st-211靶基因Rps6kl1和LncRNA-MSTRG.8169.4在模型2组中低表达,经蛭龙活血通瘀胶囊干预后显著上调),与测序结果一致。结论 蛭龙活血通瘀胶囊能改善脑出血模型小鼠的脑损伤及炎症反应,其作用机制可能与下调LncRNA-Dl1st-211表达,上调LncRNA-MSTRG.8169.4、Rps6kl1表达有关。

关键词 蛭龙活血通瘀胶囊;脑出血;炎症;长链非编码RNA;转录组测序

Effects of Zhilong huoxue tongyu capsules on intracerebral hemorrhage, LncRNA and target genes in mice

TAN Ruizhi¹, ZHONG Xia¹, WANG Li¹, YANG Sijin², XU Houping³ (1. Research Center of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine Integration, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2. Dept. of Cardiovascular and Cerebrovascular Disease, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 3. Preventive Treatment Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of Zhilong huoxue tongyu capsules on intracerebral hemorrhage, long non-coding RNA (LncRNA) and its target genes in mice. **METHODS** Twenty-four male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group 1, model group 1 and Zhilong huoxue tongyu capsule low-dose and high-dose groups (0.35, 1.40 g/kg). Collagenase was injected into the caudate nucleus to construct the model of intracerebral hemorrhage. One hour after the operation, the mice in each treatment group were given the corresponding medicinal solution, and the mice in the sham operation group 1 and the model group 1 were given normal saline intragastrically, once a day, for 3 consecutive days. The morphological changes of the brain tissue of the mice in each group were observed by hematoxylin-eosin staining and Nissl staining. The protein and mRNA expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the brain tissue were detected by immunohistochemistry, Western blot and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). In addition, 9 of male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group 2, model group 2 and intervention group (Zhilong huoxue tongyu capsule 1.40 g/kg). The mice were modeled and administered according to the above method, and then the whole brain tissue of mice in each group was isolated, total RNA was extracted and sequenced, followed by analyzing the different LncRNA. Gene ontology (GO) enrichment was performed to predict effective

[△] 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81703905); 国家中医临床基地项目(No.国中医药科技函[2018]131号);四川省省级科技计划项目(No.2019YFS0543)

* 高级实验师。研究方向:中西医结合防治炎症和纤维化。E-mail:tanruizhi627@swmu.edu.cn

通信作者:主任中医师,博士。研究方向:中西医结合防治心脑血管疾病。E-mail:xuhpswmu@163.com

LncRNA and target genes, and verified by real-time quantitative PCR. **RESULTS** Compared with model group 1, the brain tissue pathological damages were significantly improved in Zhilong huoxue tongyu capsule low-dose and high-dose groups, and the IL-1 β , TNF- α protein and mRNA expression in brain tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Two effective LncRNAs were screened out. The results of *in vivo* verification test (LncRNA-DlSt-211 was highly expressed in model group 2, and significantly down-regulated after the intervention of Zhilong huoxue tongyu capsules; LncRNA-DlSt-211 target genes Rps6kl1 and LncRNA-MSTRG.8169.4 were expressed weakly in model group 2, and strongly up-regulated after intervention) were consistent with the sequencing results. **CONCLUSIONS** Zhilong huoxue tongyu capsules can improve the brain injury and inflammatory response in intracerebral hemorrhage model mice, and its mechanism may be related to down-regulating the expression of LncRNA-DlSt-211 and up-regulating the expression of LncRNA-MSTRG.8169.4 and Rps6kl1.

KEYWORDS Zhilong huoxue tongyu capsules; intracerebral hemorrhage; inflammation; long non-coding RNA; transcriptome sequencing

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是常见的脑卒中类型之一, 发病率仅次于脑梗死, 具有极高的致残率和致死率^[1]。据研究统计, 患者脑卒中后 1 年的病死率接近 60%, 仅有 20% 的患者在脑卒中 6 个月后能存活并独立生活^[2], 且男性发病率远高于女性^[3]。可见, 脑卒中已严重威胁患者的生命安全, 影响患者及其家属的生活质量。ICH 由脑组织出血引起, 并可由高血压、动静脉畸形或头部外伤导致, 其病理生理学特征为严重的炎症、铁毒性、水肿、氧化应激和凝血酶形成^[4]。蛭龙活血通瘀胶囊由水蛭、地龙、大血藤、黄芪、桂枝等药材组成, 是西南医科大学附属中医医院研制的院内制剂, 被广泛用于 ICH 的临床治疗, 效果明显^[5-6]。此外, 多项动物实验研究亦发现, 蛭龙活血通瘀胶囊能有效改善大鼠/小鼠 ICH 导致的脑损伤, 具有显著的脑保护作用^[7-9]。然而, 蛭龙活血通瘀胶囊干预 ICH 的具体作用机制尚不明确。近年来研究发现, 部分长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 参与了染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多个重要的调控过程^[10-12], 且在中枢神经系统损伤中扮演关键角色, 如诱导 ICH 后细胞自噬和神经炎症^[13]。本研究拟采用尾状核注射胶原酶以建立 ICH 小鼠模型, 先考察蛭龙活血通瘀胶囊对小鼠 ICH 的影响, 再通过转录组测序分析差异 LncRNA 并进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集, 预测有效 LncRNA 和靶基因, 最后通过体内实验进行验证, 旨在为明确蛭龙活血通瘀胶囊改善 ICH 后脑损伤的作用机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 LightCycler480 II 型实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (瑞士 Roche 公司), Mini-Protein Tetra System 型蛋白质电泳转印系统、ChemiDoc XRS+ 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司), RM2255 型组织切片系统 (德国 Leica 公司), BX61VS 型全自动虚拟切片扫描系统 (日本

Olympus 公司), NanoDrop 2000 型超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 等。

1.2 主要药品和试剂

蛭龙活血通瘀胶囊 (批号 20180216, 规格 0.4 g/粒) 由西南医科大学附属中医医院制剂室制备; VII 型胶原酶 (批号 C0773) 购自美国 Sigma 公司; cDNA 逆转录试剂 (批号 R323-01)、荧光定量 PCR 试剂 (批号 Q711-03) 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 苏木精-伊红染色试剂盒 (批号 C0105) 和尼氏染色试剂盒 (批号 C0117) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 免疫组化试剂盒 (批号 PV-9000) 和 3, 3'-二氨基联苯胺 (批号 ZLI-9017) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 小鼠白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 单克隆抗体 (批号分别为 sc-52012、sc-52746、sc-365062) 均购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G 二抗 (批号 31430) 和 Trizol 总 RNA 抽提试剂 (批号 15596026) 均购自美国 Invitrogen 公司; 考马斯亮蓝 (批号 B104237) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; SuperSignal™ West Pico PLUS 高敏发光液 (批号 pierce34580) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 其余试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 33 只, 8 周龄, 购自成都药康生物科技有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK (川)-2020-034。所有小鼠均饲养于西南医科大学动物实验中心动物房内, 温度为 20~22 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 50%~60%, 12 h/12 h 明暗交替。本实验方案已通过西南医科大学实验动物伦理委员会批准, 审批编号为 20211111-002。

2 方法

2.1 造模

小鼠经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后, 头部向上固定于脑立体定位仪上, 于前囟区域备皮, 用 75% 乙醇消毒, 纵向剪开该处皮肤约 1 cm, 用 3% 过氧化氢除去骨

膜并暴露前囟及右侧颅骨,定位右侧尾状核(前囟右2.5 mm,前囟前左侧0.2 mm),钻孔,注射0.075 U/ μ L VII型胶原酶溶液1 μ L,进针深度为3 mm,5 min注射完毕,留针5 min后以1 mm/min缓慢出针,骨蜡封闭进针孔,缝合皮肤并消毒。实验过程中保持室温(25 \pm 2) $^{\circ}$ C。术后24 h,待小鼠清醒后进行改良的神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS),若mNSS评分 \geq 7分则提示建模成功^[4]。

2.2 分组、给药与采样

2.2.1 药效学观察 将24只小鼠适应性喂养1周后,随机分为假手术1组、模型1组和蛭龙活血通瘀胶囊低、高剂量组[0.35、1.40 g/kg,以水为溶剂,剂量根据成人日剂量(0.08 g/kg)换算并结合多次动物预实验结果设置],每组6只。模型1组和各药物组小鼠按“2.1”项下方法复制ICH模型,假手术1组小鼠除不注射胶原酶外其余操作同“2.1”项。术后1 h,各药物组小鼠灌胃相应药液,假手术1组和模型1组小鼠灌胃生理盐水,每天1次,连续3 d。末次给药后,小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉,经心脏采血处死后迅速分离大脑,并提取ICH血肿周围组织。血液样品于室温下放置1 h后,以3 000 r/min离心15 min,分离血清。脑组织分为两部分,一部分用4%多聚甲醛溶液固定,用于后续形态学观察和免疫组化实验;另一部分冻存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中,用于后续RNA和蛋白表达检测。

2.2.2 转录组测序 将剩余的9只小鼠适应性饲养1周后,随机分为假手术2组、模型2组和干预组(蛭龙活血通瘀胶囊1.40 g/kg,选择药效学实验中改善效果较好的剂量),每组3只。小鼠造模和给药同“2.2.1”项。末次给药后,小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉,经心脏采血处死后迅速分离全脑组织。将全脑组织快速冻存于液氮中,一部分用干冰保存寄往广州基迪奥生物科技有限公司,以提取高质量RNA并进行测序;另一部用于实时定量PCR验证。

2.3 小鼠脑组织形态学观察

取“2.2.1”项下固定于4%多聚甲醛溶液中的脑组织适量,常规石蜡包埋,切片(厚度4 μ m),经脱蜡、复水后用苏木精-伊红染料(苏木精染色5 min,伊红染色40 s)、尼氏染料(染色1 h)染色,晾干后用中性树胶封片。使用全自动虚拟切片扫描系统观察各组小鼠的脑组织形态学变化。

2.4 小鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 表达的检测

采用免疫组化法进行检测。取“2.2.1”项下固定于4%多聚甲醛溶液中的脑组织适量,常规石蜡包埋,切片(厚度4 μ m),经脱蜡后用柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)微波修复抗原,以5%胎牛血清室温封闭30 min,随后滴加IL-1 β 、TNF- α 一抗(稀释比例均为1:200),4 $^{\circ}$ C孵育过

夜;再滴加生物素标记的二抗,室温孵育1 h后,使用3,3'-二氨基联苯胺(稀释20倍)显色,苏木精复染细胞核,晾干后用中性树胶封片。使用全自动虚拟切片扫描系统采集图片并评估IL-1 β 、TNF- α 表达情况,阳性细胞被染成棕色,棕色越深即表达越强。

2.5 小鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达的检测

采用Western blot法进行检测。取“2.2.1”项下冻存的脑组织适量,液氮研磨后加入RIPA裂解液冰上孵育30 min,超声(功率200 W,频率20 kHz)处理2 s \times 5次;以13 000 r/min离心10 min,取上清液,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。取100 $^{\circ}$ C加热变性的蛋白70 μ g进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,100 V转膜60 min后将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜上,用5%胎牛血清室温封闭1 h,分别加入IL-1 β 、TNF- α 一抗(稀释比例均为1:1 000)和GAPDH一抗(稀释比例为1:5 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;随后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G二抗(稀释比例为1:5 000),室温孵育1 h,用高敏发光液浸泡30 s后置于凝胶成像系统下成像。使用Image J V1.8.0软件分析蛋白的条带灰度值,以GAPDH为内参计算目标蛋白的相对表达量。

2.6 小鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α mRNA和有效LncRNA及靶基因表达的检测

采用实时定量PCR法进行检测。取“2.2.1”项下冻存或“2.2.2”项下液氮中的脑组织适量,液氮研磨后加入Trizol总RNA抽提试剂提取总RNA。使用超微量分光光度计测定RNA浓度和纯度后,每个样本取RNA 1 μ g进行逆转录以制备相应的cDNA。cDNA经无酶水40 μ L稀释后,采用基于SYBR green体系的PCR试剂进行PCR扩增。PCR反应体系(10 μ L)包含上/下游引物各0.5 μ L、2 \times 扩增试剂5 μ L、cDNA模板1 μ L、无酶水3 μ L。PCR反应条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火15 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,共40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法,以GAPDH为内参计算目标基因的相对表达量。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列及产物长度见表1。

2.7 转录组测序数据处理

为保证数据质量,需要在信息分析之前对原始的RNA数据进行分析 and 过滤,以减少无效数据对结果造成的干扰。本研究利用Fastp软件对测序得到的原始数据(raw reads)进行质量分析,过滤低质量数据^[15];利用R V4.0.4软件“DESeq2包”筛选高质量数据中的差异LncRNA,标准为错误发现率(false discovery rate, FDR) $<$ 0.05且|样品间表达量比值[log₂(FC)] $>$ 1^[16];根据差异LncRNA与其邻近蛋白编码基因相关(顺式mRNA),或差异LncRNA与其共表达的蛋白编码基因相关(反式mRNA)分析得到与差异LncRNA关联的顺式或反式

表1 IL-1 β 等的PCR引物序列及产物长度

基因/LncRNA	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
IL-1 β	上游引物:TGCCACCTTTGACAGTGATG	220
	下游引物:AAGGTCCACGGAAAGACAC	
TNF- α	上游引物:CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	175
	下游引物:TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	
LncRNA-Dlsc-211	上游引物:CCATCAGCAACGGAGGAGTT	131
	下游引物:TCGAACTCCACCTTGCCTC	
LncRNA-MSTRG.8169.4	上游引物:GCTACAGCGCTATCCTGACC	133
	下游引物:CTTCAGATGCTGTTGCTGTC	
Rps6kl	上游引物:CCACTACCAGAATGGTGTGGA	109
	下游引物:TGCCCTCCGTAGTACTTGG	
GAPDH	上游引物:AGGTCCGGTGTGAACGAGATTG	129
	下游引物:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

mRNA^[17];将顺式或反式 mRNA 数据导入 GO 数据网站 (<http://geneontology.org>) 进行功能分类并富集,应用超几何检验找出与整个基因组背景相比显著富集的 GO 条目;利用 R V4.0.4 软件“热图(heat map)包”对差异 LncRNA 表达模式进行层级聚类分析,并使用热图呈现聚类结果。蛭龙活血通瘀胶囊干预相关有效 LncRNA 的筛选标准如下:在模型 2 组中找出与假手术 2 组相比有显著差异的 LncRNA,且其在干预组中的表达相对于模型组有明显改善,此 LncRNA 即为蛭龙活血通瘀胶囊干预 ICH 相关的有效 LncRNA。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 蛭龙活血通瘀胶囊对 ICH 模型小鼠脑组织形态的影响

苏木精-伊红染色结果(图 1)显示,与假手术 1 组比较,模型 1 组小鼠脑组织病理损伤严重,细胞间隙增大、

排列紊乱;与模型 1 组比较,蛭龙活血通瘀胶囊低、高剂量组小鼠脑组织病理损伤均有所减轻,其中高剂量组的改善效果更明显。尼氏染色结果(图 1)显示,与假手术 1 组比较,模型 1 组小鼠神经元大量减少,脑神经损坏严重;与模型 1 组比较,蛭龙活血通瘀胶囊低、高剂量组小鼠神经元均有所恢复,其中高剂量组恢复更佳。

3.2 蛭龙活血通瘀胶囊对 ICH 模型小鼠脑组织中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响

3.2.1 免疫组化法 模型 1 组小鼠脑组织中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平均高于假手术 1 组,而蛭龙活血通瘀胶囊低、高剂量组小鼠脑组织中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平均低于模型 1 组。结果见图 2。

3.2.2 Western blot 法 与假手术 1 组比较,模型 1 组小鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 蛋白的相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$);与模型 1 组比较,蛭龙活血通瘀胶囊低、高剂量组小鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 蛋白的相对表达量均显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 3、图 4。

3.2.3 实时定量 PCR 法 与假手术 1 组比较,模型 1 组小鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$);与模型 1 组比较,蛭龙活血通瘀胶囊低、高剂量组小鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的相对表达量均显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 5。

3.3 转录组测序样本 RNA 质量分析

除去含数据接头(adapter)序列、含未知碱基比例大于 10% 序列、全部都是 A 碱基序列以及低质量序列数据后,得到有效数据(clean data)占比均高于 99%,表明数据质量佳。结果见表 2。

3.4 差异 LncRNA 分析

假手术 2 组与模型 2 组比较,有 44 个差异 LncRNA,包括显著上升的 LncRNA 25 个、显著下降的 LncRNA 19

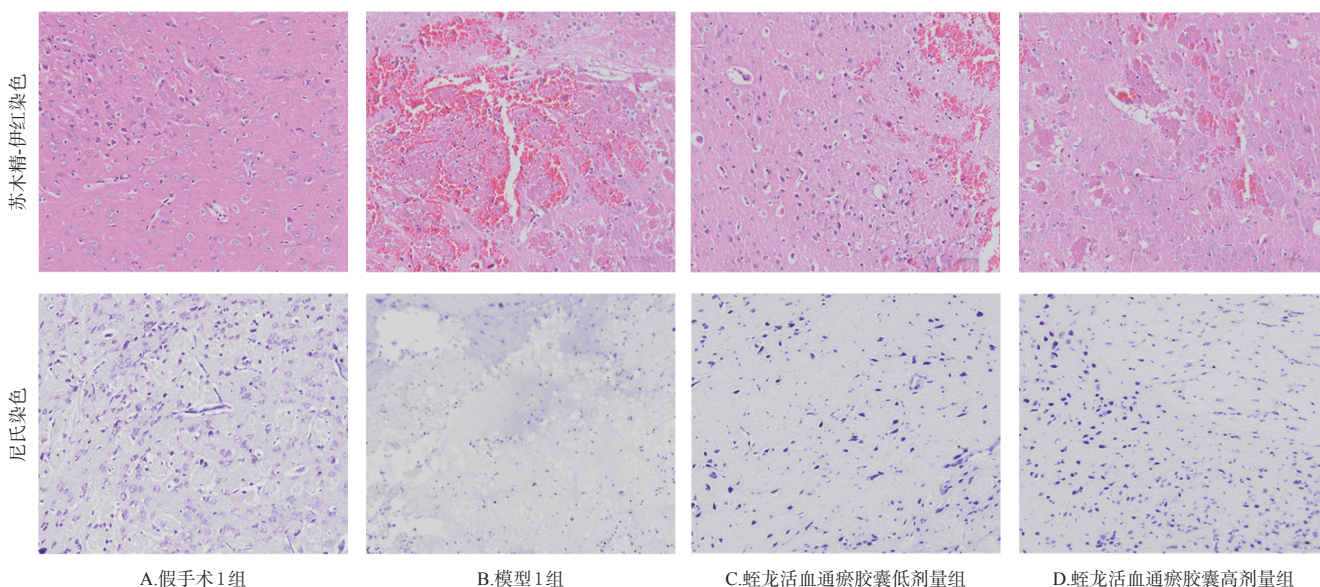


图1 蛭龙活血通瘀胶囊对 ICH 模型小鼠脑组织形态的影响($\times 100$)

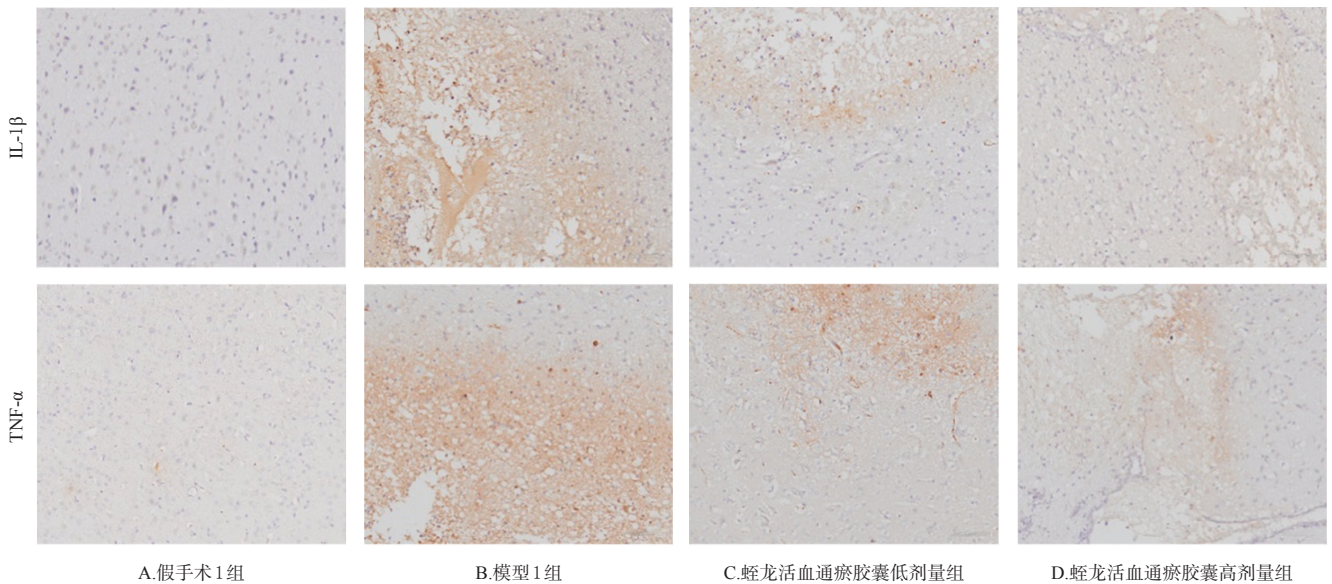


图2 蛭龙活血通瘀胶囊对ICH模型小鼠脑组织中IL-1 β 和TNF- α 表达的影响(免疫组化法, $\times 100$)

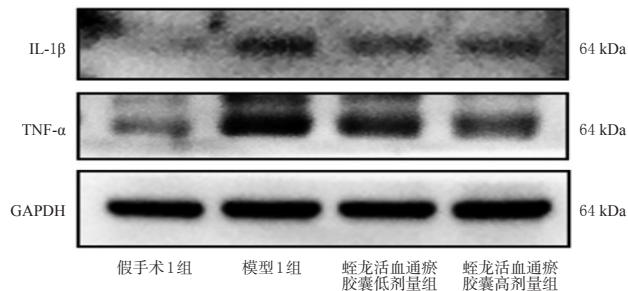
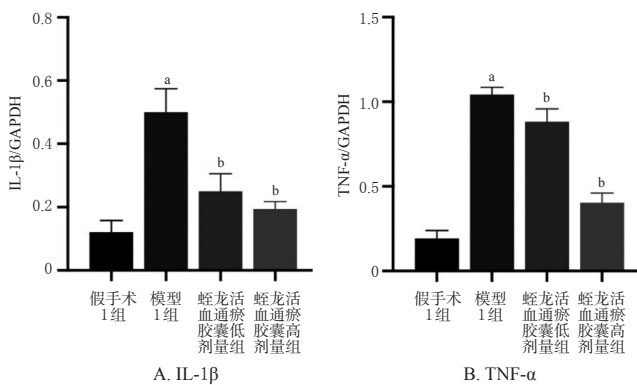


图3 蛭龙活血通瘀胶囊对ICH模型小鼠脑组织中IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达影响的电泳图



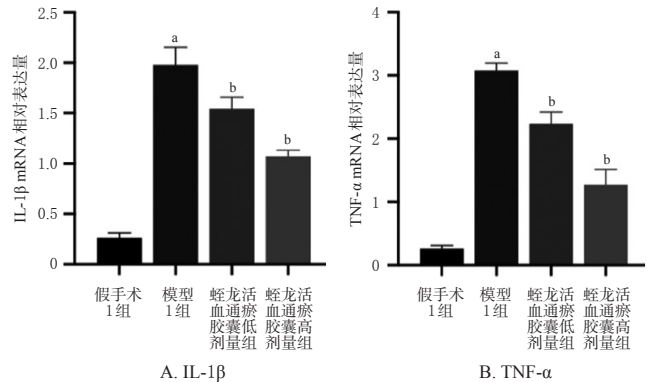
a: 与假手术1组比较, $P < 0.05$; b: 与模型1组比较, $P < 0.05$

图4 蛭龙活血通瘀胶囊对ICH模型小鼠脑组织中IL-1 β 和TNF- α 蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

个;而模型2组与干预组比较,有16个差异LncRNA,包括显著上升的LncRNA 8个、显著降低的LncRNA 8个。结果见图6。

3.5 GO富集

差异LncRNA与顺式mRNA关联的相关功能主要集中在生物调节、细胞进程、生物进程阳性调节、发育进程等方面,显著富集的GO条目见图7A;差异LncRNA与反式mRNA关联的相关功能主要集中在刺激响应、代



a: 与假手术1组比较, $P < 0.05$; b: 与模型1组比较, $P < 0.05$

图5 蛭龙活血通瘀胶囊对ICH模型小鼠脑组织中IL-1 β 和TNF- α mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

谢调节、免疫进程等方面,显著富集的GO条目见图7B。

3.6 有效LncRNA分析

筛选到1个LncRNA在模型2组中表达较假手术2组更高,且经蛭龙活血通瘀胶囊干预后显著下调,经数据库(<http://asia.ensembl.org>)查询发现其为LncRNA-Dlst-211,其靶基因为ribosomal protein S6 kinase-like 1 (Rps6kl1)。此外,还发现LncRNA-MSTRG.8169.4在模型2组中低表达,而经蛭龙活血通瘀胶囊干预后显著上调。聚类分析结果见图8。

3.7 有效LncRNA的PCR验证

与假手术2组比较,模型2组小鼠脑组织中LncRNA-Dlst-211的相对表达量显著升高($P < 0.05$), Rps6kl1、LncRNA-MSTRG.8169.4的相对表达量均显著降低($P < 0.05$)。与模型2组比较,干预组小鼠脑组织中LncRNA-Dlst-211的相对表达量显著降低($P < 0.05$), Rps6kl1、LncRNA-MSTRG.8169.4的相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。结果见图9。

表2 各组小鼠转录组测序样本RNA质量分析结果

样本	原始数据/个	有效数据/个(%)	数据接头序列/个(%)	低质量序列/个(%)	全部都是A碱基的序列/个(%)	含未知碱基比例大于10%的序列/个(%)
假手术2组1	89 330 528	89 197 784(99.85)	23 006(0.03)	109 454(0.12)	0(0)	284(<0.01)
假手术2组2	83 071 266	82 949 748(99.85)	21 466(0.03)	99 916(0.12)	0(0)	136(<0.01)
假手术2组3	103 528 790	103 398 828(99.87)	16 740(0.02)	113 206(0.11)	0(0)	16(<0.01)
模型2组1	92 918 014	92 806 848(99.88)	14 916(0.02)	96 232(0.10)	0(0)	18(<0.01)
模型2组2	114 180 380	114 028 524(99.87)	19 972(0.02)	131 848(0.13)	0(0)	36(<0.01)
模型2组3	97 215 760	97 071 690(99.85)	16 576(0.02)	127 474(0.13)	0(0)	20(<0.01)
干预组1	104 493 620	104 360 542(99.87)	18 288(0.02)	114 764(0.11)	0(0)	26(<0.01)
干预组2	101 788 986	101 654 222(99.87)	17 236(0.02)	117 510(0.12)	0(0)	18(<0.01)
干预组3	83 938 996	83 782 080(99.81)	22 836(0.03)	133 842(0.16)	0(0)	238(<0.01)

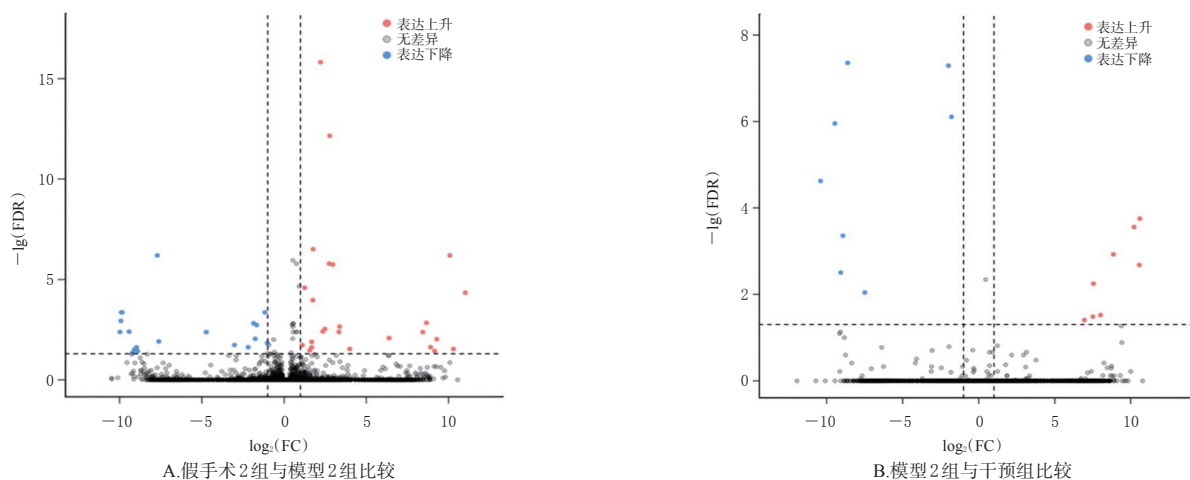


图6 假手术2组、模型2组、干预组两两比较的差异LncRNA散点图

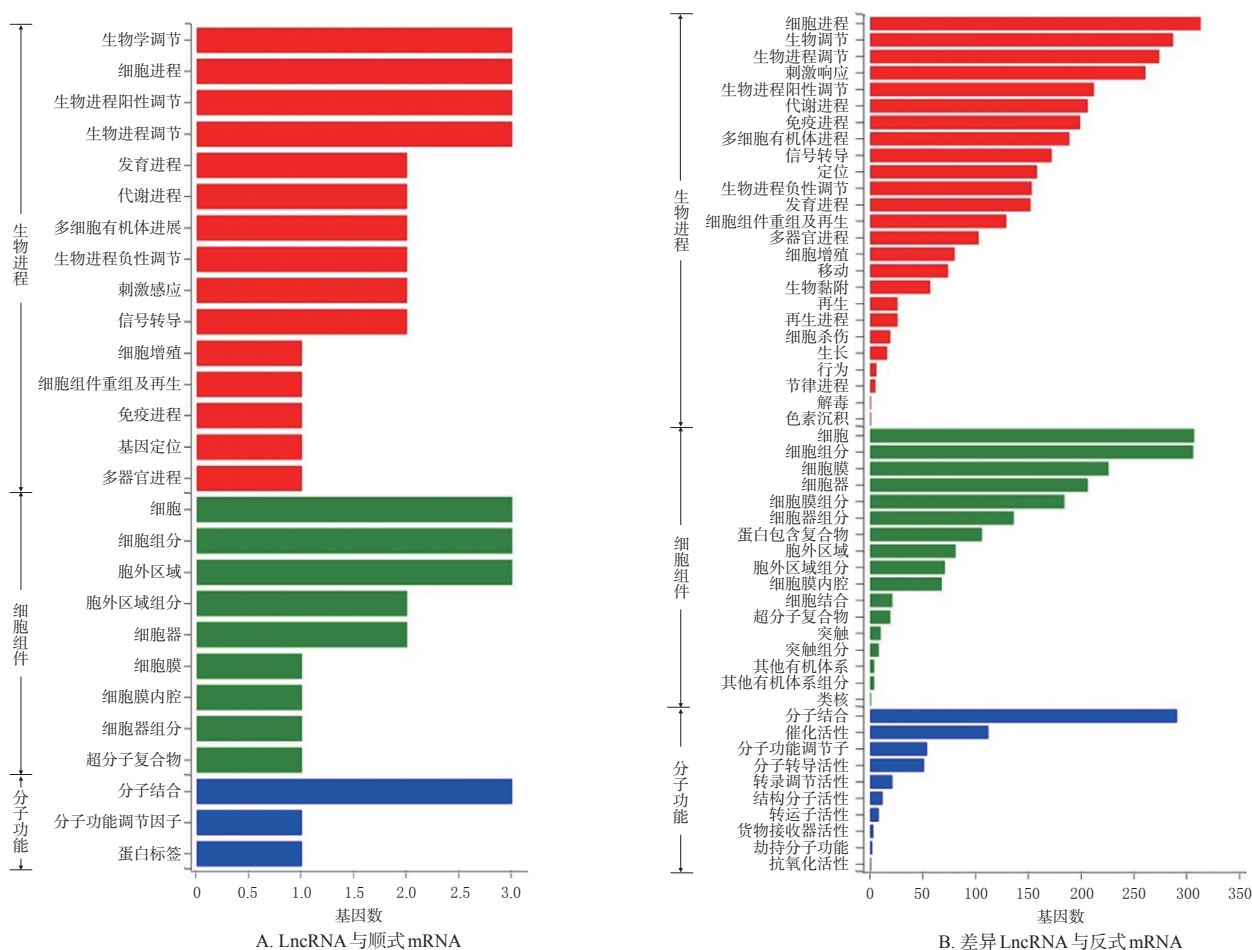


图7 差异LncRNA与顺、反式mRNA关联的显著富集GO条目

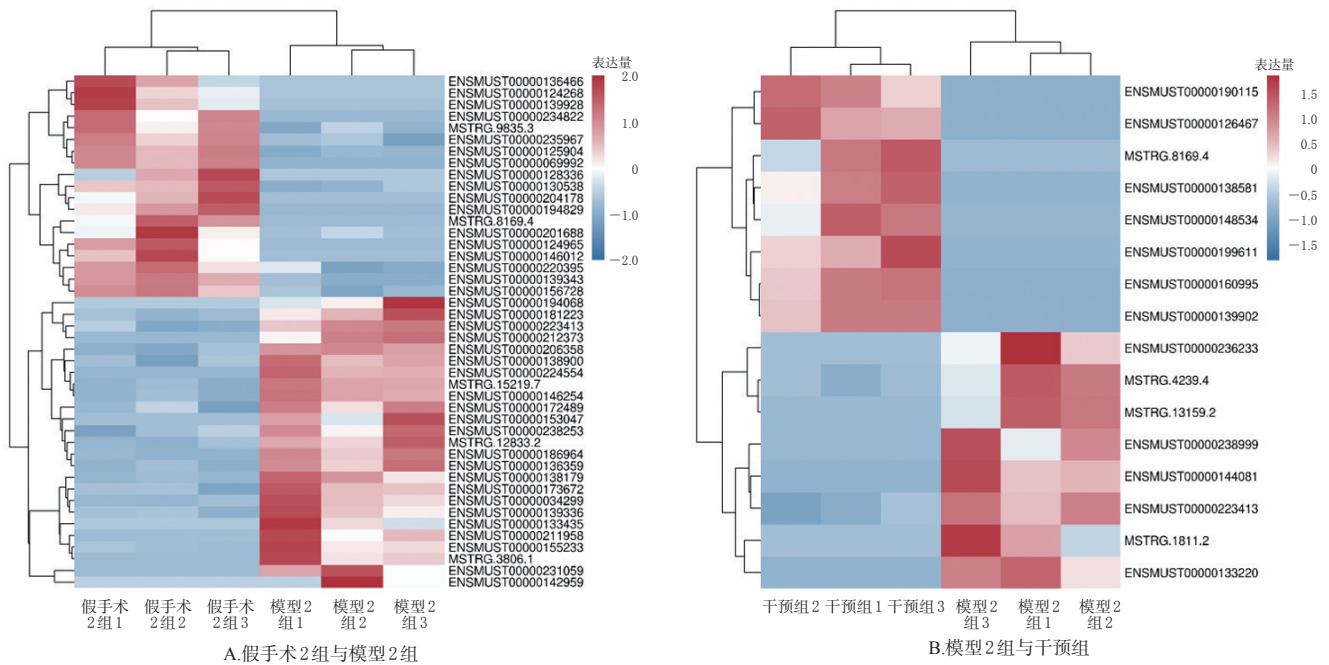
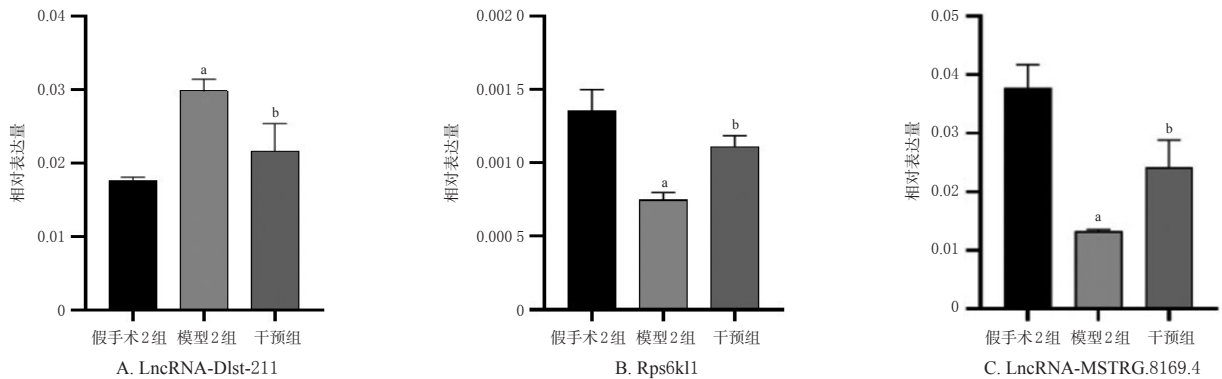


图8 差异LncRNA的聚类分析结果



a:与假手术2组比较, $P < 0.05$; b:与模型2组比较, $P < 0.05$

图9 LncRNA-Dlst-211及其靶基因Rps6kl1和LncRNA-MSTRG.8169.4的验证实验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

ICH是一种发病率高、致残率高、致死率高、复发率高的脑血管疾病,好发于中老年人群,严重威胁人们的生命安全和生活质量^[18]。现有研究表明,高血压和淀粉样脑血管病是原发性ICH的主要发病原因;除此以外,颅内动脉瘤、动脉硬化等也是ICH的发病原因之一^[19]。ICH发病会造成脑组织局部占位性病变,同时释放大量的凝血酶,并激活损伤相关分子模式从而释放出大量炎症因子和补体因子,进而诱导脑组织炎症反应、免疫细胞浸润和脑细胞凋亡^[20]。尽管针对原发性ICH损伤的手术已可以减轻神经功能损伤并降低病死率,但是ICH患者的预后依然不佳^[21]。因此,减轻ICH诱导的炎症和继发性脑损伤成为目前ICH临床治疗的主要方向。

中医认为,中风(脑卒中)发生多因风、火、痰、瘀、气、虚等导致人体气血阴阳运行失常、脏腑功能失调,故中医治疗注重祛风、补气、化痰、活血^[22-23]。根据多年临

床经验,我院杨思进教授结合现代医学理论提出补气通络、活血化瘀、化痰祛风的脑血管疾病治疗方法,并组方蛭龙活血通瘀胶囊。该方主要包含黄芪、水蛭、地龙、大血藤、桂枝等药材,被广泛用于脑卒中的临床治疗,并取得了良好的疗效^[24]。本研究结果也证实,蛭龙活血通瘀胶囊能显著改善ICH模型小鼠的脑损伤,促进其脑神经功能恢复,同时能有效降低小鼠脑组织中炎症因子IL-1 β 、TNF- α 的表达,减轻继发性脑损伤,符合目前ICH临床治疗的抗二次损伤策略。

LncRNA是一种不具备蛋白质编码能力的非编码RNA,其长度超过200个核苷酸^[25]。已有研究证实,LncRNA能参与表观遗传传导的转录、翻译、RNA代谢、细胞自噬和细胞凋亡等进程^[26],能调节神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞等细胞炎症^[27],还与脊髓损伤以及神经退行性疾病的发生有关^[28]。基于此,本研究收集蛭龙活血通瘀胶囊干预前后的脑组织,快速提取总RNA

后采用转录组测序技术对各组差异 LncRNA 予以甄别。结果显示,模型 2 组和假手术 2 组比较,有 44 个差异 LncRNA;模型 2 组和干预组比较,有 16 个差异 LncRNA;通过进一步筛选发现了 2 个有效 LncRNA,即 LncRNA-Dlst-211 和 LncRNA-MSTRG.8169.4。笔者通过数据分析发现,LncRNA-Dlst-211 有顺式作用靶基因。顺式作用靶基因预测基本原理认为,LncRNA 的功能与其邻近的蛋白编码基因相关,位于上游的 LncRNA 可能与启动子或者共表达基因的其他顺式作用元件有交集,进而在转录时或者转录后对基因的表达进行调控^[29]。LncRNA-Dlst-211 的顺式靶基因可能为 Rps6k11,该基因与脑神经发育相关,在脑部及中枢神经系统中呈高表达^[30]。本研究在假手术 2 组、模型 2 组和干预组小鼠脑组织中检测这两个差异 LncRNA (LncRNA-Dlst-211 和 LncRNA-MSTRG.8169.4)以及 LncRNA-Dlst-211 靶基因 Rps6k11 的表达情况,结果显示,PCR 验证结果与测序结果一致,即 LncRNA-Dlst-211 在模型 2 组中的表达升高,在干预组中的表达显著降低,其靶基因 Rps6k11 的表达与之相反;而 LncRNA-MSTRG.8169.4 在模型 2 组中的表达降低,在干预组中的表达显著升高。

综上所述,蛭龙活血通瘀胶囊能改善 ICH 模型小鼠的脑损伤,并减轻炎症反应;其作用机制可能与下调 LncRNA-Dlst-211 的表达,上调 LncRNA-MSTRG.8169.4、Rps6k11 的表达有关。本研究通过转录组测序分析了蛭龙活血通瘀胶囊干预后的差异 LncRNA 以及其靶基因,并在体内进行了验证。后续笔者将进一步检测差异 LncRNA 在脑组织中表达的细胞种类,并探讨其在蛭龙活血通瘀胶囊改善 ICH 损伤中的潜在分子机制。本研究有助于从非编码 RNA 水平阐明复方蛭龙活血通瘀胶囊改善 ICH 的表观遗传机制,为中药干预 ICH 的研究开拓了新的思路,为中药药理研究提供了基础科学依据。

参考文献

- [1] 王娟,王改青.脑出血后内源性血肿清除机制的研究进展[J].中国神经精神疾病杂志,2016,42(7):438-440.
- [2] DE OLIVEIRA MANOEL A L, GOFFIA, ZAMPIERI F G, et al. The critical care management of spontaneous intracranial hemorrhage: a contemporary review[J]. Crit Care, 2016, 20: 272.
- [3] 吴燕,李淮玉,李虎.1 298 例自发性脑出血流行病学与临床特点分析[J].中国循证医学杂志,2010,10(11): 1256-1258.
- [4] SHAO Z W, TU S, SHAO A W. Pathophysiological mechanisms and potential therapeutic targets in intracerebral hemorrhage[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1079.
- [5] 杨思进,王蔚,杜渊,等.中医分阶段治疗脑出血急性期临床观察[J].四川中医,2017,35(3):109-111.
- [6] 王蔚,杜渊,白雪,等.中医分阶段综合治疗脑出血急性期 30 例临床观察[J].湖南中医杂志,2017,33(6):7-9.
- [7] 王蔚,杜渊,王洪连,等.蛭龙活血通瘀胶囊通过 Rho/ROCK 通路改善脑出血后脑水肿的实验研究[J].中药药理与临床,2021,37(1):142-147.
- [8] 王蔚,钟霞,杜渊,等.蛭龙活血通瘀胶囊对模型大鼠脑出血后脑组织水肿及 ZO-1、Occludin 的影响[J].中国中医急症,2020,29(12):2084-2086,2096.
- [9] 王蔚,杜渊,白雪,等.蛭龙活血通瘀胶囊对脑出血大鼠脑组织 AQP-4、MMP-9 表达的影响[J].中医药学报,2017,45(5):72-75.
- [10] FERRÈ F, COLANTONI A, HELMER-CITTERICH M. Revealing protein-lncRNA interaction[J]. Brief Bioinform, 2016, 17(1):106-116.
- [11] CHEN B, WANG H R, LV C L, et al. Long non-coding RNA H19 protects against intracerebral hemorrhage injuries via regulating microRNA-106b-5p/acyl-CoA synthetase long chain family member 4 axis[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):4004-4015.
- [12] XIE L J, WANG Y Y, CHEN Z. LncRNA Blnc1 mediates the permeability and inflammatory response of cerebral hemorrhage by regulating the PPAR- γ /SIRT6/FoxO3 pathway[J]. Life Sci, 2021, 267: 118942.
- [13] LI L Z, WANG P P, ZHAO H P, et al. Noncoding RNAs and intracerebral hemorrhage[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2019, 18(3):205-211.
- [14] CHEN J, SANBERG P R, LI Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke, 2001, 32(11):2682-2688.
- [15] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17):i884-i890.
- [16] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biol, 2014, 15(12):550.
- [17] LAM M T Y, LI W B, ROSENFELD M G, et al. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs[J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(4):170-182.
- [18] 王拥军,李子孝,谷鸿秋,等.中国卒中报告 2019:中文版:1[J].中国卒中杂志,2020,15(10):1037-1043.
- [19] AN S J, KIM T J, YOON B W. Epidemiology, risk factors, and clinical features of intracerebral hemorrhage: an update[J]. J Stroke, 2017, 19(1):3-10.
- [20] REN H L, HAN R R, CHEN X M, et al. Potential therapeutic targets for intracerebral hemorrhage-associated inflammation: an update[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40(9):1752-1768.
- [21] HANLEY D F, THOMPSON R E, ROSENBLUM M, et al. Efficacy and safety of minimally invasive surgery

- with thrombolysis in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE III) : a randomised, controlled, open-label, blinded endpoint phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2019, 393(10175) : 1021-1032.
- [22] 路文杰,王泽颖,肖萌,等.祛风痰法干预进展性脑卒中的临床观察[J].*中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(7) : 952-953.
- [23] 刘颖,张楠,艾民.活血化瘀法治疗高血压性脑出血的临床疗效[J].*中国老年学杂志*, 2019, 39(11) : 2605-2607.
- [24] LIANG P, MAO L S, MA Y, et al. A systematic review on Zhilong Huoxue Tongyu capsule in treating cardiovascular and cerebrovascular diseases: pharmacological actions, molecular mechanisms and clinical outcomes[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 277 : 114234.
- [25] BRAGA E A, FRIDMAN M V, MOSCOVTSEV A A, et al. LncRNAs in ovarian cancer progression, metastasis, and main pathways: CeRNA and alternative mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22) : E8855.
- [26] QIAN X Y, ZHAO J Y, YEUNG P Y, et al. Revealing lncRNA structures and interactions by sequencing-based approaches[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(1) : 33-52.
- [27] GAO S, CHENG Q C, HU Y G, et al. LncRNA AK148321 alleviates neuroinflammation in LPS-stimulated BV2 microglial cell through regulating microRNA-1199-5p/HSPA5 axis[J]. *Life Sci*, 2021, 266 : 118863.
- [28] CUEVAS-DIAZ DURAN R, WEI H, KIM D H, et al. Invited review: long non-coding RNAs: important regulators in the development, function and disorders of the central nervous system[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2019, 45(6) : 538-556.
- [29] GIL N, ULITSKY I. Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(2) : 102-117.
- [30] MANNING G, WHYTE D B, MARTINEZ R, et al. The protein kinase complement of the human genome[J]. *Science*, 2002, 298(5600) : 1912-1934.
- (收稿日期:2022-01-05 修回日期:2022-05-05)
(编辑:邹丽娟)

(上接第1414页)

- [5] WU M M. Research on quality improvement of undergraduate thesis based on TQM concept[EB/OL].[2022-01-11]. <https://www.atlantis-press.com/proceedings/ichssr-19/125-909152>.
- [6] STABILE M E. An examination of the total quality management (TQM) concept given current Federal/DoD competition initiatives[EB/OL].[2022-01-11]. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1992MsT.....18S/abstract>.
- [7] 郑锴,杨美娟,郝峰.全面质量管理在综合医院住院诊疗管理中的运用探讨[J].*中国医院管理*, 2015, 35(11) : 41-42.
- [8] 李娟,张杨,杜杏利,等.基于全面质量管理的临床药学服务体系[J].*中国医院*, 2016, 20(2) : 43-44.
- [9] 崔芳芳,孙东旭,曹明波,等.基于TQM的O2O医药电商服务质量控制体系研究[J].*中国卫生事业管理*, 2021, 38(4) : 244-247.
- [10] NICE. Who we are? [EB/OL].[2022-4-29]. <https://www.nice.org.uk/about/who-we-are>.
- [11] IQWiG. Social code book: book V : statutory health insurance[EB/OL].(1988-12-20). [2022-04-24]. https://www.gesetze-im-internet.de/sgb_5/index.html.
- [12] NICE. Guide to the process of technology appraisal 2014 [EB/OL].(2014-09-02)[2022-03-31]. <https://www.nice.org.uk/process/pmg19/chapter/acknowledgements>.
- [13] NICE. Guide to the methods of technology appraisal 2013 [EB/OL].(2013-04-04)[2022-03-31]. <https://www.nice.org.uk/process/pmg9/chapter/foreword>.
- [14] IQWiG. Quality assurance of IQWiG assessment[EB/OL]. [2022-04-01]. https://www.who.int/medical_devices/assessment/en/.<https://htai.org/about-htai/>.
- [15] IQWiG. General methods: version, 6: IQWiG[EB/OL]. (2020-11-05) [2022-04-01]. https://www.iqwig.de/methoden/general-methods_version-6-0.pdf.
- [16] 谢金平,邵蓉.英国NICE药品卫生技术评估和决策框架体系研究及启示[J].*中国卫生经济*, 2020, 39(12) : 114-119.
- [17] BELETSI A, KOUTRAFOURI V, KARAMPLI E, et al. Comparing use of health technology assessment in pharmaceutical policy among earlier and more recent adopters in the European Union[J]. *Value Health Reg Issues*, 2018, 16 : 81-91.
- [18] 霍玉雯,任平,田雪晴,等.药品临床综合评价基础信息平台建设构想[EB/OL].[2022-04-01]. <http://biomedrxiv.org.cn/article/pdf/display/bmr.202110.000006>.
- (收稿日期:2022-04-14 修回日期:2022-05-19)
(编辑:孙冰)