

· 药理 ·

## 基于转录组学和蛋白质组学的黄连素抗脑缺血 关键转录因子分析

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

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京脑科学与类脑研究中心, 北京 102206)

**[摘要]** 目的:在确定黄连素保护脑缺血的基础上,采用转录组和蛋白质组测序的方法探究黄连素抗脑缺血的关键转录因子(TFs)。方法:采用线栓法制备大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,并将其分为假手术组、模型组及黄连素低、高剂量组(37.5, 75 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),连续灌胃7 d后处死大鼠,取脑组织。通过Longa评分法和脑梗死率测定进行药效学评价,采用酶联免疫吸附测定试验(ELISA)测定白细胞介素-1β(IL-1β),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达。采用RNA-Seq技术检测黄连素干预前后的差异表达基因(DEGs),使用DAVID 6.8对DEGs进行富集分析;通过catTFREs技术检测黄连素干预前后的差异TFs,使用DAVID 6.8和STRING 11.0进行富集分析和TFs关联分析;通过整合TFs活性及其下游靶基因的变化情况,识别关键TFs,并通过Cytoscape 3.7.1构建相关的调控网络。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能显著缺损(P<0.01);与模型组比较,黄连素低、高剂量组均能显著减轻大鼠神经功能损伤(P<0.01),并降低脑梗死率(P<0.01)。转录组数据分析表明黄连素主要是通过影响细胞黏附、脑发育、神经元迁移、钙信号通路、环磷酸腺苷信号通路、炎症反应等生物学过程和信号通路参与脑缺血后的恢复过程。蛋白质组数据分析表明黄连素干预后的差异表达TFs主要通过调控细胞分化、免疫系统过程、细胞增殖等生物学过程干预脑缺血。此外,对TFs和DEGs的整合分析发现,转录因子CP2样1(TFCP2L1),核因子红细胞2相关因子1(NFE2L1),神经源性分化蛋白6(NeuroD6)和POU域类2转录因子1(POU2F1)4个TFs是黄连素介导的抗脑缺血再灌注损伤的关键TFs。结论:黄连素对脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用,其关键TFs有TFCP2L1,NFE2L1, NeuroD6和POU2F1。

**[关键词]** 黄连素; 脑缺血; RNA-Seq; catTFREs; 转录因子; 炎症因子; 大脑中动脉栓塞(MCAO)模型

**[中图分类号]** R22;R28;R96;R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0100-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211849 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210729.1328.004.html>

**[网络出版日期]** 2021-07-29 15:51

## Analysis of Crucial Transcription Factors of Berberine Against Cerebral Ischemia Based on Transcriptomics and Proteomics

ZHOU Rui<sup>1</sup>, GAO Jin-huan<sup>1</sup>, GUO Fei-fei<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, ZHANG Jing-jing<sup>1,2\*</sup>, YANG Hong-jun<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Chinese Institute for Brain Research, Beijing 102206, China)

**[Abstract]** **Objective:** On the basis of determining the protective effect of berberine (BBR) on cerebral ischemia, crucial transcription factors (TFs) of BBR against cerebral ischemia was identified by using transcriptome and proteome sequencing. **Method:** The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by thread embolization. The sham operation group, model group, low-dose group of BBR (dose of

**[收稿日期]** 20210430(023)

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2017YFC1702605);国家自然科学基金项目(81974550)

**[第一作者]** 周瑞,硕士,从事中药药理与应用研究,E-mail:zhouhui677000@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,研究员,从事基于整合策略的中药新药设计与大品种培育,E-mail:hongjun0420@vip.sina.com

37.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and high-dose group of BBR (75 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) were set up. The rats were killed after continuous intragastric administration for 7 days. The pharmacodynamics was evaluated by Longa score and cerebral infarction rate, and the expressions of inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Then, RNA-Seq technique was used to detect the differentially expressed genes (DEGs) before and after BBR intervention, and DAVID 6.8 was used for enrichment analysis of DEGs. CatTFREs technique was used to detect differential TFs before and after BBR intervention, and DAVID 6.8 and STRING 11.0 were used for enrichment analysis and TFs association analysis. Finally, by integrating the activity of TFs and the changes of downstream target genes, crucial TFs were identified and the related regulatory network was constructed by Cytoscape 3.7.1. **Result:** Compared with the sham operation group, the neurological impairment was significant in the model group ( $P<0.01$ ), and compared with the model group, the low and high dose BBR groups could significantly reduce the neurological function damage ( $P<0.01$ ) and decrease the rate of cerebral infarction ( $P<0.01$ ). Transcriptome data analysis showed that BBR was involved in the recovery process after cerebral ischemia mainly by affecting cell adhesion, brain development, neuron migration, calcium signaling pathway, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway, inflammatory response and other related functions and signaling pathways. Proteomic data analysis showed that the differentially expressed TFs after BBR intervention interfered with cerebral ischemia mainly by regulating cell differentiation, immune system process, cell proliferation and other biological processes. In addition, integration analysis of TFs and DEGs revealed that transcription factor CP2-like 1 (TFCP2L1), nuclear factor erythroid-2 like 1 (NFE2L1), neurogenic differentiation protein 6 (NeuroD6) and POU domain, class 2, transcription factor 1 (POU2F1) were crucial TFs against cerebral ischemia-reperfusion injury mediated by BBR. **Conclusion:** BBR has obvious protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury and its crucial TFs include TFCP2L1, NFE2L1, NeuroD6 and POU2F1.

**[Keywords]** berberine; cerebral ischemia; RNA-Seq; catTFREs; transcription factors; inflammatory factors; middle cerebral artery occlusion (MCAO) model

我国缺血性脑卒中占有所有类型脑卒中的85%，其死亡率高、致残率高及复发率高，已经超过心血管疾病，成为导致死亡和残疾的主要因素<sup>[1-2]</sup>。脑缺血再灌注损伤是缺血性脑卒中后重要的病理环节之一<sup>[3]</sup>，是由多种因素和机制介导的一个极其复杂的病理过程<sup>[4-6]</sup>。目前，对于缺血性脑卒中的治疗缺乏有效的药物。因此，急需寻找有效治疗脑缺血再灌注损伤的药物，并深入研究其抗脑缺血的信号转导调控机制。

黄连素是从黄连、黄柏等植物中提取分离的一种季胺型生物碱，具有抗炎、抗凋亡、抗氧化等多种脑保护作用<sup>[7-8]</sup>。有研究显示，黄连素能够通过降低脑缺血再灌注大鼠DNA(胞嘧啶-5)甲基转移酶1(DNMT1)和DNA(胞嘧啶-5)甲基转移酶3 $\alpha$ (DNMT3A)的表达水平，抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )启动子甲基化<sup>[9]</sup>，减少细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达<sup>[10]</sup>，降低B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)/自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin-1)

比值<sup>[11]</sup>，减少缺氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的表达<sup>[12]</sup>发挥脑保护作用。此外，其还能激活磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)并调控其下游如红系衍生的核转录因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)信号通路、核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路等减少氧化应激损伤<sup>[13]</sup>和细胞凋亡<sup>[14]</sup>、抑制炎症介质表达<sup>[15]</sup>，促进血管生成<sup>[16]</sup>，防治缺血性脑卒中<sup>[17]</sup>，但其作用机制有待进一步揭示，尤其是在转录因子(TFs)的层面上。

TFs是一种能够与真核基因发生特异性相互作用，并对基因转录的有激活和抑制作用的DNA结合蛋白，在生物生长发育和逆境防御反应等过程具有重要调控作用<sup>[18]</sup>。而转录组测序技术能够从基因的整体水平揭示脑缺血再灌注中涉及的基因表达情况和重要生物学过程<sup>[19]</sup>。通过对TFs和其下游基因表达的整合分析，不仅能在TFs和基因水平2个不同层面上透视生物体生理病理的规律与本质，还能揭示二者间的相互调控作用及关联，可以更加

准确地掌握转录因子与基因的作用。目前将蛋白质组学和转录组学的整合分析已成为一种组学研究的趋势。本课题组前期对蛋白质组和转录组的整合分析,确定了益心舒胶囊和丹红注射液保护心肌细胞免受过氧化氢( $H_2O_2$ )损伤的关键TFs,揭示了心肌细胞损伤保护的潜在治疗靶点<sup>[20-21]</sup>。因此,本研究拟采用RNA-Seq转录组学和catTFREs蛋白质组学相结合的策略,系统探讨黄连素抗脑缺血再灌注损伤的关键TFs,以揭示缺血性卒中治疗的潜在关键靶点,为治疗脑缺血的药物开发提供参考。

## 1 材料

2100型生物分析仪(美国Agilent公司),HiSeq 6000型测序系统(美国Illumina公司),Centrifuge 5424R型低温离心机(德国Eppendorf公司),SpectraMax M5型酶标仪(美国Molecular Devices公司),LTQ-Orbitrap Velos型质谱仪(美国Thermo Fisher公司)。黄连素<sup>[22]</sup>(由西南大学提供,纯度95%),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)和戊巴比妥钠(美国Sigma公司,批号分别为BCBR5462, P3761-25G),TRIzol(美国Life Technologies公司,货号15596-018),4%组织固定液(北京索莱宝生物科技有限公司,货号P1110),核蛋白提取试剂盒(美国Thermo Fisher公司,货号78835);白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)检测试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,货号分别为SEA564Ra, SEA133Ra, SEA087Ra);神经源性分化蛋白6(NeuroD6)检测试剂盒(上海研谨生物科技有限公司,货号F07932),胰蛋白酶(罗恩试剂,货号9002-07-7),RNA 6000 Nano检测试剂盒(安捷伦公司,货号5067-1511)。

成年雄性SPF级SD大鼠,体质量( $280\pm 10$ )g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2014-0004。适应性喂养3d,自由进食水,室温22~26℃,相对湿度55%。实验中所有操作均遵循谱尼测试集团股份有限公司实验动物伦理委员会的批准,批准号PONY-2020-FL-76。

## 2 方法

**2.1 大脑中动脉栓塞(MCAO)模型建立** 用改良的线栓法制备<sup>[23]</sup>。大鼠用戊巴比妥钠( $55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉并固定于手术台上,用剃毛器剃去颈部手术区毛发,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,使颈内动脉、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18~20mm,松开颈总动脉近心端动脉夹。90min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 分组与给药** 术后,待大鼠完全清醒,对其进行神经功能评分,按照神经功能评分结果,将神经功能损伤的大鼠平均分为3组,即模型组和黄连素低、高剂量组( $37.5, 75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),每组16只。另设假手术组,共16只。分组后开始灌胃给药,每天1次。黄连素使用的时候分别用0.9%生理盐水配成质量浓度为3.75, 7.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,按大鼠体质量0.01  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 灌胃给药。模型组和假手术组给予等量生理盐水。连续给药7d,再次进行神经功能评分。

**2.3 神经功能评分与脑梗死率测定** 参考Longa评分法<sup>[24]</sup>对4组大鼠进行神经功能评分。正常,无症状计0分;患侧前爪不能完全伸展计1分;行走时大鼠向患侧转圈计2分;行走时大鼠身体向患侧倾倒计3分;不能自发行走,有意识丧失计4分。神经功能评分后,大鼠用戊巴比妥钠( $55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉,断头处死后取脑组织,沿冠状面将脑组织切为6片,每片2mm。其中每组随机选择8只大鼠的脑组织置于预温的1% TTC染色液中避光孵育15min,用4%组织固定液固定30min,取出拍照。使用Image J 2.1.0进行分析,按脑梗死率=(梗死区域面积/总面积) $\times 100\%$ 计算脑梗死率。其余大鼠脑组织经液氮速冻后置于-80℃冰箱冻存,每组随机选择3只大鼠的脑组织进行转录组测序分析,1只大鼠的脑组织进行蛋白质组测序分析,6只大鼠的脑组织进行相关试剂盒测定。

**2.4 酶联免疫吸附测定试验(ELISA)** 所有操作按照试剂盒说明书进行,将100  $\mu\text{L}$ 的大鼠脑组织蛋白提取液加入相应的酶标板中孵育60min,加入生物素抗体孵育60min,辣根过氧化物酶标记的亲抗体孵育30min及3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液孵育15min。最后加入终止液停止反应并立即使用酶标仪于450nm处测定吸光度A。

**2.5 统计分析** 采用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),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,采用最小显著性差异法(LSD)检验;若方差不齐,则

采用Dunnett's *T*<sub>3</sub>检验; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

**2.6 RNA-seq转录组测序分析** RNA-Seq转录组测序方法参照本课题组前期文献报道方法进行<sup>[20-21, 25-28]</sup>,使用TRIzol裂解液提取脑组织RNA, RNA 6000 Nano检测试剂盒分析RNA的完整性。使用带有寡核苷酸(Oligo)的磁珠,通过碱基互补配对与信使RNA(mRNA)3'-末端多聚A(ployA)尾部结合的方式富集真核生物的mRNA,随后以被fragmentation buffer打断成短片段的mRNA为模板,合成双链互补DNA(cDNA)。对于双链cDNA进行末端修复、加A尾并连接测序接头,用AMPure XP beads进行片段大小选择,通过聚合酶链式反应(PCR)试验富集得到最终的cDNA文库。在流动槽的各通道中加入cDNA文库,利用HiSeq 6000型测序系统进行测序分析,质量分值由计算机软件给出。每个样品的1 μg RNA用于文库构建,每组进行3个生物学重复。

**2.7 差异表达基因(DEGs)筛选与富集分析** 以显著性水平和差异倍数(FC)为条件,设置筛选条件为 $P < 0.05$ ,  $|\log_2FC| \geq 1$ 进行DEGs筛选。使用DAVID 6.8对DEGs进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,对富集度显著( $P < 0.05$ )的GO和KEGG条目进行柱状图的绘制。

**2.8 catTFREs蛋白质组定量测定TFs** 根据试剂盒说明,使用核蛋白提取试剂盒提取大鼠脑组织样本,获得核蛋白提取液。将核蛋白提取液与预固定生物素化DNA的免疫磁珠混合。混合溶液于4℃孵育2 h,去除上清液,磁珠用胰蛋白酶浸泡过夜。按报道的方法进行液相色谱-质谱法(LC-MS/MS)和蛋白质组学分析<sup>[20-21, 29]</sup>。蛋白鉴定软件为Proteome Discovery V1.3,基于RefSeq数据库,对TFs类别进行判定,汇总蛋白总强度和肽段数后进行基于强度的iBAQ蛋白绝对定量,以 $|\log_2FC| \geq 1$ 为筛选条件进行TFs筛选。

**2.9 TFs的关联分析与富集分析** 将筛选得到的所有TFs导入STRING 11.0进行关联分析,将有关联的TFs导入Cytoscape 3.7.1,构建差异表达TFs网络图。将黄连素干预后的TFs导入DAVID 6.8进行GO和KEGG富集分析,对富集度显著( $P < 0.05$ )的GO和KEGG条目进行柱状图的绘制。

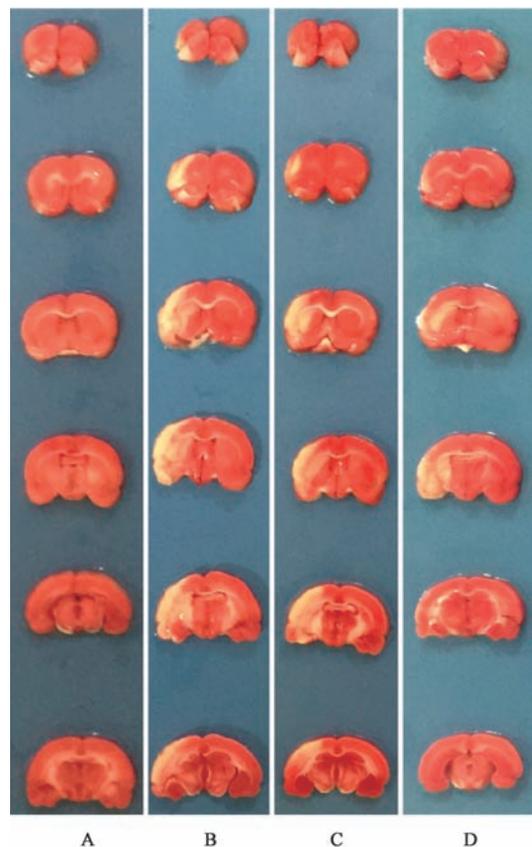
**2.10 关键TFs的筛选** 参照本课题组前期研究方法对catTFREs检测到的TFs和RNA-Seq检测下游靶基因(TG)进行整合分析<sup>[24-25]</sup>,利用Cytoscape

3.7.1,基于关键TFs( $|\log_2FC| \geq 2$ )及其差异表达TG调控关系,构建TFs-TG网络。

### 3 结果

**3.1 对大鼠神经功能评分的影响** Longa评分显示,模型组神经功能评分为(1.88±0.35)分,表明模型组大鼠有明显的肢体偏瘫等神经功能缺失症状,且与假手术组比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组相比,黄连素高、低剂量组对大鼠神经功能均有显著改善( $P < 0.01$ ),二者神经功能评分分别为(0.94±0.18), (1.19±0.26)分。

**3.2 对缺血再灌注损伤大鼠脑梗死率的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死率(16.40±4.37)%,梗死率显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,黄连素高、低剂量组的脑梗死率显著降低( $P < 0.01$ ),二者脑梗死率分别为(7.76±3.02)%, (10.47±2.55)%,且黄连素高剂量组的作用优于低剂量组,但差异无统计学意义。见图1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 黄连素低剂量组;D. 黄连素高剂量组

图1 黄连素对缺血再灌注损伤大鼠脑组织的影响

Fig. 1 Effect of berberine on brain tissue of rats with ischemia-reperfusion injury

**3.3 对缺血再灌注损伤大鼠脑组织炎症因子表达的影响** 与假手术组比较,模型组的IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$

和MCP-1表达均显著升高( $P<0.01$ ),而高、低剂量黄连素干预后均可显著降低IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 和MCP-1的表达( $P<0.01$ )。见表1。

表1 黄连素对缺血再灌注大鼠炎症因子表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )  
Table 1 Effect of berberine on expression of inflammatory cytokines in rat with ischemia-reperfusion injury( $\bar{x}\pm s, n=6$ )  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	MCP-1
假手术		3.31 $\pm$ 0.87	2.20 $\pm$ 0.21	9.70 $\pm$ 0.88
模型		8.93 $\pm$ 0.94 <sup>1)</sup>	7.13 $\pm$ 0.73 <sup>1)</sup>	43.40 $\pm$ 5.82 <sup>1)</sup>
黄连素	37.5	5.84 $\pm$ 0.81 <sup>2)</sup>	4.55 $\pm$ 1.06 <sup>2)</sup>	22.59 $\pm$ 2.37 <sup>2)</sup>
	75.0	3.37 $\pm$ 1.12 <sup>2)</sup>	4.50 $\pm$ 0.57 <sup>2)</sup>	17.83 $\pm$ 0.93 <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> $P<0.01$ 。

**3.4 RNA-Seq技术鉴定DEGs** 由上述结果可知,高剂量黄连素减轻脑缺血再灌注损伤的作用较低剂量好,故后续研究中黄连素组采用 $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量。根据EBSeq算法,筛选出各组的DEGs。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中显著表达的DEGs有3 249个(显著上调的2 401个,显著下调的848个);与模型组比较,黄连素组差异表达的基因为430个(显著上调的281个,显著下调的149个)。

**3.5 DEGs的富集分析** 为了进一步分析黄连素干预后的DEGs参与的生物学过程,采用DAVID 6.8对黄连素干预后的DEGs进行GO和KEGG富集分析。黄连素干预后的DEGs主要富集的GO条目为细胞黏附(cell adhesion),神经元迁移(neuron migration),学习或记忆(learning or memory),神经元发育(neuron development),海马发育(hippocampus development),Wnt信号通路(Wnt signaling pathway),脑发育(brain development),炎症反应(inflammatory response)等;黄连素干预后DEGs主要富集于刺激神经组织的中的交互(neuroactive ligand-receptor interaction),钙信号通路(calcium signaling pathway),河马信号通路(hippo signaling pathway),环磷酸腺苷信号通路(cAMP signaling pathway),调控干细胞多能性信号通路(signaling pathways regulating pluripotency of stem cells)等信号通路。说明黄连素通过调控炎症反应、脑发育、神经元迁移、钙信号通路等与脑缺血密切相关的生物学过程干预脑缺血后的恢复,见增强出版附加材料。

**3.6 catTFREs技术鉴定差异表达的TFs** 与假手术组比较,模型组共检测到176个差异表达的TFs;与模型组比较,黄连素干预后共检测到32个差异表

达的TFs。其中包括NeuroD6,核因子红细胞2相关因子1(NFE2L1),转录因子CP2样1(TFCP2L1),DnaJ/Hsp40同源物亚家族C成员2(DNAJC2),组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶1A(KDM1A),POU域类2转录因子1(POU2F1),JUN,B淋巴瘤细胞瘤-6(Bcl-6)辅抑制因子(BCOR),孤儿核受体 $\alpha$ (RORA),8-羟基鸟嘌呤DNA糖基化酶1(OGG1)在内的10个TFs是3个组别中共有的差异表达TFs。

**3.7 TFs的关联分析和富集分析** 进一步对所有差异表达的TFs进行关联分析,发现共有107个TFs能相互关联,其中89个TFs仅是模型组与假手术组比较的差异TFs,9个TFs仅在黄连素干预后被检测到,而NeuroD6,KDM1A,RORA,NFE2L1,BCOR,TFCP2L1,POU2F1,JUN,OGG1这9个TFs不仅是模型组与假手术组比较的差异TFs,也是黄连素组与模型组比较的差异TFs,见增强出版附加材料。此外,对黄连素干预后的差异TFs进行富集分析后发现,黄连素干预后的差异TFs主要富集在细胞分化(cell differentiation),免疫系统过程(immune system process),环磷酸腺苷反应(response to cAMP),细胞增殖(cell proliferation)等相关功能和信号通路,说明黄连素干预后的TFs通过调控细胞分化、免疫系统过程、细胞增殖等与脑缺血密切相关生物学过程和信号通路参与脑缺血再灌注损伤的恢复,见增强出版附加材料。

**3.8 TFs及其下游TG调控关系的分析与关键TFs的识别** 通过对TFs和TG的整合分析,发现黄连素干预后共鉴定出22个差异表达的TFs和其下游的68个TG,见表2。进一步,筛选 $|\log_2\text{FC}|\geq 2$ 的差异表达TFs,构建TFs-TG网络图,见增强出版附加材料。结果发现黄连素干预后共有11个TFs,包括TFCP2L1,NeuroD6,POU2F1,NFE2L1,Sal样蛋白1(SALL1),RAS反应元件结合蛋白1(RREB1),转录因子FLI1,Smad3,JUNB,FOS样抗原2(FosL2)和转录因子25(TCF25)。其中TFCP2L1,NFE2L1,NeuroD6和POU2F1不仅在黄连素干预后被检测到,同时也是模型组与假手术组比较后得到的差异表达TFs,提示这四者可能是黄连素抗脑缺血再灌注损伤的关键TFs。

**3.9 关键TFs的验证** 综上分析,使用ELISA对关键TFs NeuroD6的表达进行了测定,结果其在假手术组、模型组和黄连素组的表达量分别为( $30.17\pm 3.00$ ),( $12.39\pm 2.95$ ),( $23.64\pm 2.42$ )  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (以蛋白量计)。与假手术组比较,NeuroD6在模型组的表达

表2 黄连素干预脑缺血再灌注损伤调控的TFs与其下游TG  
Table 2 Berberine interferes with TFs and its downstream TG in cerebral ischemia-reperfusion injury

No.	TFs	TG
1	Smad3	MAP2K3, CLCN1, TNKS2
2	OGG1	SENP5
3	RREB1	TRAPPC2B, ESR1
4	POU2F1	RDH12, TMCO3, KLHL14, CASZ1, INS2, TEKT4, FCRLA, SIGLEC10
5	FLI1	SLCO4C1, ROBO4, MS4A6E, FCGR2B, CD163, PRRG3, UNC45B
6	TCF25	DCUN1D2, SLC13A5, MAP2K3
7	SALL1	RIPK4, ESR1, TMEM72, HES5, TMCO3, SOSTDC1, LOC360919, SLC6A12, DAO, KLHL14, SLC22A2, ABCB11, SLCO4C1
8	BCOR	ZFP84, MBOAT4
9	NFE2L1	UNC45B, KIF9
10	JUN	CYR61
11	NeuroD6	SSTR2, CPNE4, ST8SIA3, DCC, USP29, ZFP804A, RAB3C, FSTL5, CALY, EPHA5, TRIM67, CNTNAP4, GABRG2, LYPD1, GNAL, RAB9B, OPRL1, SLC17A6, CDH9
12	FosL2	AREG, SYTL2, CYR61
13	TFCP2L1	SLC22A2, GNAT2, F2RL1, SLCO4C1, MGAT4C, KLHL14, SGSM1, SOSTDC1, PNCK, RIPK4, TMEM72, DAO
14	JUNB	LTBP2, PAK3, CYR61, SPHK1
15	SREBF2	TRAPPC2B
16	SOX6	TRAPPC2B
17	KDM1A	HPRT1
18	ADAR	ADAM33
19	CHD9	CLCN1
20	ZFP422	PRRG3
21	RORA	MAP2K3
22	DNAJC2	EPHX2

注: SREBF2. 固醇调节元件结合转录因子2; SOX6. SRY盒转录因子6; ADAR. 双链RNA特异性腺苷脱氨酶; CHD9. 染色体结构域解旋酶DNA结合蛋白9; ZFP422. 锌指蛋白422。

显著降低( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 黄连素干预后 NeuroD6 的表达显著升高( $P < 0.01$ )。

#### 4 讨论

缺血性脑卒中是人类发病率较高的疾病之一, 大脑中动脉(MCA)是人群脑卒中的多发部位, MCAO模型被普遍认为是局灶性脑缺血的标准动物模型<sup>[30]</sup>。本研究基于MCAO模型, 在黄连素抗脑缺血药效研究的基础上, 借助转录组学和蛋白质组学技术对黄连素抗脑缺血关键TFs进行研究。结果

发现脑缺血再灌注后, 神经功能缺损严重、脑梗死率明显升高, 炎症因子IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 和MCP-1的表达明显增多, 而黄连素干预可明显改善缺血再灌注损伤大鼠的神经功能, 降低脑梗死率, 减少IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 和MCP-1的表达。通过对筛选出的TFs和DEGs进行富集分析, 发现黄连素干预的TFs与DEGs参与的生物学过程与脑缺血病理过程密切相关。此外, 通过对TFs及其下游TG的整合分析发现, TFCP2L1, NFE2L1, NeuroD6和POU2F1是黄连素减轻脑缺血再灌注损伤的关键TFs。

转录组测序能够从基因表达水平系统揭示特定的生物学过程及疾病发生过程中的分子机制, 具有高通量、高灵敏度和低成本等优点<sup>[19, 27, 31]</sup>。TFs是通过与DNA序列中的增强子和启动子区域结合来调控下游基因表达的蛋白质, 是细胞中基因表达的重要调节因子, 在生命有机体的许多重要生化过程中发挥关键性作用<sup>[18]</sup>。本课题组前期研究也表明Nrf2通过激活其下游的多个抗氧化基因来减少脑缺血再灌注损伤及促进糖尿病溃疡修复<sup>[26, 32]</sup>。

通过整合TFs与DEGs的调控关系, 本文研究发现黄连素抗脑缺血再灌注损伤的关键TFs有4个, 即TFCP2L1, NFE2L1, NeuroD6和POU2F1。NeuroD6是NeuroD亚家族中的一种TFs, 对胚胎期脑组织发育、成体动物神经细胞的存活与再生过程起着重要的调控作用。有研究表明NeuroD6在实验性帕金森病等神经性疾病中具有重要作用<sup>[33-34]</sup>。神经系统中的多巴胺神经元对调节认知、情感和运动相关活动至关重要, 多巴胺神经功能变性是帕金森病的主要病因<sup>[35-37]</sup>。已有研究证实, 实验性帕金森病小鼠脑中NeuroD6明显降低<sup>[33]</sup>。此外, 有报道指出, 通过对帕金森病患者和正常受试者大脑中完整的DEGs进行比较分析, 发现NeuroD6下调可作为帕金森病的一个可能的生物标志物<sup>[38]</sup>。这与本文的研究结果一致, 既与假手术组比较, 模型组中NeuroD6的表达降低, 而黄连素干预可升高模型大鼠脑组织中NeuroD6的表达。除NeuroD6外, TFCP2L1, NFE2L1和POU2F1也与神经系统密切相关。TFCP2L1是颗粒感头状(GRHL)TFs亚家族的成员之一<sup>[39]</sup>, 对调节细胞周期、人体免疫<sup>[40]</sup>和调控小鼠和人胚胎干细胞(ESC)多能性起着重要作用<sup>[41-44]</sup>。POU2F1是POU结构域因子家族的成员。有研究发现POU2F1在胚胎组织中广泛表达, 包括在小鼠胚胎形成过程的神经系统中<sup>[45-46]</sup>。NFE2L1是CNC-bZIP TFs家族成员, 可维持蛋白质稳态<sup>[47]</sup>。

前期研究表明神经细胞中NFE2L1缺失会导致小鼠严重的神经变性<sup>[48]</sup>和神经功能障碍<sup>[49]</sup>。这些都与本文研究结果相一致,

通过分析鉴定的TFs的功能,TFCP2L1,NFE2L1,NeuroD6和POU2F1均与神经系统密切相关。这与转录组分析结果一致,既黄连素干预后的DEGs主要通过影响脑发育、神经元迁移、钙信号通路、炎症反应等与脑缺血密切相关的生物学过程和信号通路参与脑缺血后的恢复过程。越来越多证据证明,大鼠脑缺血1h后给予黄连素治疗,可减少脑梗死体积、恢复运动功能,其可能是通过调控炎症因子的表达,实现保护运动皮层神经的作用<sup>[50]</sup>。此外,研究表明黄连素可减少中枢神经系统的少突胶质细胞因氧糖剥夺造成的损伤,其作用与降低细胞内钙离子(Ca<sup>2+</sup>)浓度有关<sup>[51]</sup>。帕金森病是一种常见的神经退行性疾病,研究表明黄连素能抑制6-羟基多巴胺诱导的人神经胶质瘤细胞SH-SY5Y的神经毒性<sup>[52]</sup>,减轻神经元的变性<sup>[53]</sup>,保护SH-SY5Y细胞免受鱼藤酮诱导的损伤,改善小鼠运动功能障碍<sup>[54]</sup>。这与本研究中TFs和DEGs的富集分析结果一致,既黄连素通过参与脑发育、神经元迁移,钙信号通路、炎症反应等与脑缺血密切相关的生物学过程和信号通路参与脑缺血后的恢复过程。

综上所述,本研究发现黄连素对脑缺血再灌注损伤有明显保护作用,通过整合转录组学和蛋白质组学分析,鉴定出TFCP2L1,NFE2L1,NeuroD6和POU2F1是黄连素抗脑缺血再灌注损伤的关键TFs。本研究从TFs角度对黄连素抗脑缺血再灌注损伤的作用机制进行了阐释,也揭示了缺血性卒中治疗的潜在关键靶点,可为针对性地拟定脑缺血再灌注损伤的保护策略提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] GU J, SHI Y, CHEN N, et al. Ambient fine particulate matter and hospital admissions for ischemic and hemorrhagic strokes and transient ischemic attack in 248 Chinese cities [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 715: 136896.

[2] 王陇德, 刘建民, 杨弋, 等. 我国脑卒中防治仍面临巨大挑战——《中国脑卒中防治报告2018》概要 [J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(2): 105-119.

[3] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391-1401.

[4] 张艾嘉, 王爽, 王萍, 等. 缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(5): 227-240.

[5] 李兆珍, 张丹参. 脑缺血再灌注损伤相关机制的研究进展 [J]. *神经药理学报*, 2020, 10(6): 60-63.

[6] 李澜芯, 何甜, 石清明, 等. 脑缺血再灌注损伤信号通路的研究进展 [J]. *局解手术学杂志*, 2021, 30(4): 359-362.

[7] 周瑞, 项昌培, 张晶晶, 等. 黄连化学成分及小檗碱药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(19): 4561-4573.

[8] MENG F C, WU Z F, YIN Z Q, et al. Coptidis Rhizoma and its main bioactive components: recent advances in chemical investigation, quality evaluation and pharmacological activity [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 13.

[9] PANG Y, LIANG Y, WANG Y, et al. Effect of berberine against cerebral ischemia and reperfusion involving in the methylation of PPAR $\gamma$  promote [J]. *J Chinese Pharmaceut Sci*, 2018, 27(3): 170-182.

[10] 甘露. 黄连素对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血脑区细胞黏附分子表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(14): 240-242.

[11] 丁实, 赵学荣, 李宝群, 等. 基于Bcl-2/Beclin-1复合体探讨黄连素对脑缺血再灌注损伤大鼠模型的保护作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 651-657.

[12] ZHANG Q, QIAN Z, PAN L, et al. Hypoxia-inducible factor 1 mediates the anti-apoptosis of berberine in neurons during hypoxia/ischemia [J]. *Acta Physiol Hung*, 2012, 99(3): 311-323.

[13] XU Z, FENG W, SHEN Q, et al. Rhizoma Coptidis and berberine as a natural drug to combat aging and aging-related diseases via anti-oxidation and AMPK activation [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(6): 760-777.

[14] YANG J, YAN H, LI S M, et al. Berberine ameliorates MCAO induced cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of the BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(3): 702-710.

[15] BESS E, FISSALTHALER B, FROMEL T, et al. Nitric oxide-induced activation of the AMP-activated protein kinase alpha2 subunit attenuates IkappaB kinase activity and inflammatory responses in endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20848.

[16] ZHU J, CAO D, GUO C, et al. Berberine facilitates angiogenesis against ischemic stroke through modulating microglial polarization via AMPK signaling [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(6): 751-768.

[17] 秦思茹, 唐慧玲, 李威, 等. 基于AMPK及下游靶点的

- 黄连素防治缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(4):489-494.
- [18] FURNEY S J, HIGGINS D G, OUZOUNIS C A, et al. Structural and functional properties of genes involved in human cancer[J]. *BMC Genomics*, 2006, 7:3.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] ZHANG J, GENG Y, GUO F, et al. Screening and identification of critical transcription factors involved in the protection of cardiomyocytes against hydrogen peroxide-induced damage by Yixin-shu[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):13867.
- [22] CHEN H Y, YE X L, CUI X L, et al. Cytotoxicity and antihyperglycemic effect of minor constituents from *Rhizoma Coptidis* in HepG2 cells[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1):67-73.
- [23] BELAYEV L, ALONSO O F, BUSTO R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model[J]. *Stroke*, 1996, 27(9):1616-1623.
- [24] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [25] ZHOU R, GAO J, XIANG C, et al. Salvianolic acid A attenuated myocardial infarction-induced apoptosis and inflammation by activating Trx [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2020, 393(6):991-1002.
- [26] ZHANG J, ZHOU R, XIANG C, et al. Huangbai liniment accelerated wound healing by activating Nrf2 signaling in diabetes[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:4951820.
- [27] ZHOU R, GUO F, XIANG C, et al. Systematic study of crucial transcription factors of *Coptidis Rhizoma* alkaloids against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2021, 12(13):2308-2319.
- [28] 周瑞, 项昌培, 高金环, 等. 基于转录组测序的谷红注射液抗脑缺血分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7):195-203.
- [29] DING C, CHAN D W, LIU W, et al. Proteome-wide profiling of activated transcription factors with a concatenated tandem array of transcription factor response elements[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17):6771-6776.
- [30] 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.
- [31] 赵利南, 赵益, 孙有智. 基于RNA-seq技术的活血化瘀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.
- [32] ZHANG J, ZHOU R, XIANG C, et al. Enhanced thioredoxin, glutathione and Nrf2 antioxidant systems by safflower extract and aceglutamide attenuate cerebral ischaemia/reperfusion injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(9):4967-4980.
- [33] VIREECKEL T, DUMAS S, SMITH-ANTTILA C J, et al. Midbrain gene screening identifies a new mesoaccumbal glutamatergic pathway and a marker for dopamine cells neuroprotected in Parkinson's disease [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35203.
- [34] BIMPIDIS Z, KONIG N, STAGKOURAKIS S, et al. The NeuroD6 subtype of VTA neurons contributes to psychostimulant sensitization and behavioral reinforcement [J]. *eNeuro*, 2019, doi: 10.1523/ENEURO.0066-19.2019.
- [35] BROMBERG-MARTIN E S, MATSUMOTO M, HIKOSAKA O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting[J]. *Neuron*, 2010, 68(5):815-834.
- [36] WISE R A. Dopamine, learning and motivation [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(6):483-494.
- [37] GRAYBIEL A M, AOSAKI T, FLAHERTY A W, et al. The basal ganglia and adaptive motor control [J]. *Science*, 1994, 265(5180):1826-1831.
- [38] SATOH J I, YAMAMOTO Y, ASAHINA N, et al. RNA-Seq data mining: downregulation of NeuroD6 serves as a possible biomarker for Alzheimer's disease brains[J]. *Dis Markers*, 2014, 2014:123165.
- [39] TARACHA A, KOTARBA G, WILANOWSKI T. Neglected functions of TFCP2/TFCP2L1/UBP1 transcription factors may offer valuable insights into their mechanisms of action[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10):2852.
- [40] KOTARBA G, KRZYWINSKA E, GRABOWSKA A I, et al. TFCP2/TFCP2L1/UBP1 transcription factors in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2018, 420:72-79.
- [41] GONNOT F, LANGER D, BOURILLOT P Y, et al. Regulation of Cyclin E by transcription factors of the naive pluripotency network in mouse embryonic stem

- cells[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(20):2697-2712.
- [42] JING R Q, GUO X D, YANG Y W, et al. Long noncoding RNA Q associates with Sox2 and is involved in the maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2020, 38 (7) : 834-848.
- [43] WANG X, WANG X, ZHANG S, et al. The transcription factor TFCP2L1 induces expression of distinct target genes and promotes self-renewal of mouse and human embryonic stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(15):6007-6016.
- [44] YE S, LI P, TONG C, et al. Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfc2l1 [J]. *EMBO J*, 2013, 32(19):2548-2560.
- [45] GRAY P A, FU H, LUO P, et al. Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis [J]. *Science*, 2004, 306 (5705) : 2255-2257.
- [46] RYAN A K, ROSENFELD M G. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(10):1207-1225.
- [47] STEFFEN J, SEEGER M, KOCH A, et al. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop [J]. *Mol Cell*, 2010, 40(1):147-158.
- [48] LEE C S, LEE C, HU T, et al. Loss of nuclear factor E<sub>2</sub>-related factor 1 in the brain leads to dysregulation of proteasome gene expression and neurodegeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (20) : 8408-8413.
- [49] KOBAYASHI A, TSUKIDE T, MIYASAKA T, et al. Central nervous system-specific deletion of transcription factor Nrf1 causes progressive motor neuronal dysfunction [J]. *Genes Cells*, 2011, 16(6) : 692-703.
- [50] MALEKI S N, ABOUTALEB N, SOURI F. Berberine confers neuroprotection in coping with focal cerebral ischemia by targeting inflammatory cytokines [J]. *J Chem Neuroanat*, 2018, 87:54-59.
- [51] NADJAFI S, EBRAHIMI S A, RAHBAR-ROSHANDEL N. Protective effects of berberine on oxygen-glucose deprivation/reperfusion on oligodendrocyte cell line (OLN-93) [J]. *Int J Prev Med*, 2014, 5(9):1153-1160
- [52] PPSTUMA R B, BERG D. The new diagnostic criteria for Parkinson's disease [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2017, 132:55-78.
- [53] LI J, JIN M, WANG L, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease in China [J]. *J Neurol*, 2017, 264(3):476-481.
- [54] PARKINSON STUDY GROUP. A controlled, randomized, delayed-start study of rasagiline in early Parkinson disease [J]. *Arch Neurol*, 2004, 61 (4) : 561-566.

[责任编辑 刘德文]