

基因芯片技术研究黄秦艽对雪上一枝蒿急性心脏毒性的作用机制

黄先菊 陈 慧 李 梅 伊雪佳 余 友
(中南民族大学 药学院 武汉 430074)

摘 要 目的: 利用芯片技术探讨黄秦艽对雪上一枝蒿所致小鼠心脏急性毒性基因表达的影响及分子机制. 方法: 25只雄性昆明小鼠随机分为正常对照组、雪上一枝蒿氯仿部位组(CFA)和黄秦艽水提取物组(WVBF), 通过表达谱对各组心脏差异表达基因进行生物信息学研究. 结果: WVBF对CFA诱导的急性心脏毒性具有明显的解毒效果, 染毒组与正常组相比, 差异基因的功能主要涉及机体内物质的异常代谢, WVBF主要通过干扰CFA引起的内质网应激反应及线粒体功能紊乱过程, 提高细胞存活率, 使心肌恢复正常功能. 结论: 黄秦艽可以通过多条信号通路缓解雪上一枝蒿所致的小鼠心肌毒性作用.

关键词 雪上一枝蒿; 黄秦艽; 内质网应激; 线粒体功能紊乱; 基因表达; 基因芯片

中图分类号 Q786; R966 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)03-0031-04

Effects of *Veratilla Baillonii* Extract on Cardiac Gene Expression Profiles in Response to *Aconitum Brachypodum*-induced Cardiac Toxicity in Mice

Huang Xianju, Chen Hui, Li Mei, Yi Xuejia, Yu You

(College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Aim: To investigate the effect and mechanism of *Veratilla Baillonii* on the acute cardiac toxicity and on gene expression in mice treated with *Aconitum Brachypodum* by using gene chip technique. Methods: 25 male mice were divided randomly into control group, chloroform fraction of *Aconitum Brachypodum* Diels (CFA) group and water extract of *Veratilla Baillonii* (WVBF) group. Take mice hearts to study the expressions of various genes for bioinformatics research. Results: The results showed that WVBF had a significant detoxification effect on CFA-induced acute cardiac toxicity. Gene Ontology (GO) analysis mainly related to abnormal metabolism of the body. Pathway analysis showed that WVBF modulated the process of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction induced by CFA, thus improve cell survival rates and restore normal function to myocardium. Conclusions: WVBF could attenuate CFA-induced cardiac damage in mice through multiple signaling pathways.

Keywords *Aconitum Brachypodum*; *Veratilla Baillonii*; endoplasmic reticulum stress; mitochondrial dysfunction; gene expression; gene chip

毛茛科乌头属植物雪上一枝蒿(*Aconitum Brachypodum*)常被临床用于治疗疼痛和炎症相关的疾病^[1]. 因为过量或滥用导致中毒事件经常发生^[1,2] 现有的临床解毒策略不能完全消除乌头类植物的毒性^[3]. 因此, 寻求乌头碱中毒的解决办法具有重大的现实意义.

黄秦艽(*Veratilla Baillonii* Franch)为龙胆科黄秦艽属植物, 长期以来被云南当地纳西族和傈僳族用于治疗发热、炎症、胃痉挛和附子中毒^[4,5]. 本课题组前期研究表明, 黄秦艽水提取物(WVBF)可以在一定程度上减弱雪上一枝蒿氯仿部位(CFA)诱发的小鼠急性毒性^[6]. 本文拟利用基因芯片技术, 进一

收稿日期 2017-03-29

作者简介 黄先菊(1972-), 女, 教授, 研究方向: 民族药药理与毒理, E-mail: xianju@mail.scuec.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81374064)

步探讨 WVBF 对 CFA 诱导的急性心肌毒性的分子机制和分子靶标。

1 仪器和材料

雪上一枝蒿及黄秦艽干燥块根购自云南省大理市中药材批发市场,经药学院刘新桥老师鉴定为正品。其提取办法见本实验室前期工作^[6]。实验所用昆明雄性小鼠由湖北省疾病预防控制中心提供。

2 实验方法

2.1 小鼠急性毒性实验

选择体重 18 ~ 22 g 雄性昆明小鼠共 25 只,随机分为正常对照组、CFA 组、WVBF 低、中、高 3 个剂量组各 5 只。25 只小鼠禁食不禁水 12 h,20 只小鼠以灌胃给药方式给予 30 mg/kg CFA,其余 5 只给予等剂量无菌水,3 min 及 30 min 后 WVBF 组分别给予 10、25 和 50 mg/kg WVBF,正常对照组及 CFA 给予 10 mL/kg 无菌水。4 h 以后从空白对照组、CFA 和 WVBF (50 mg/kg) 每组随机采集 3 只心脏置于液

氮中保存。CFA 及 WVBF 提取分离过程参照本课题组前期工作^[6]。

2.2 RNA 制备及芯片杂交

RNA 制备及芯片杂交由伯豪公司完成。采用 RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany) 进行总 RNA 抽提,再进行样品 RNA 的放大和标记,芯片的杂交及扫描,所得数据经归一化处理,运用 GeneSpring software in version 12.6 (Agilent) 进行分析,组间差异基因的表达运用 fold change (FC > 1.2) and *t* 检验 ($p < 0.05$) 进行初步筛选,层次聚类分析运用聚类分析软件,差异基因基因功能(GO)分析及通路(KEGG)分析用 SBC 分析系统(SAS, <http://www.ebioservice.com>)。

2.3 实时荧光定量验证

引物设计及合成由上海生工公司完成(表 1)。采用 SYBR Green 方法对目标基因进行实时荧光定量 PCR 验证。反应条件: 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 40 s, 95 °C 扩增 30 s, 共 40 个循环。以管家基因 *GAPDH* 为参照基因,检测各组样品中 *RyR2* 和 *SERCA2a* 基因的表达水平。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法计算各基因水平。

表 1 合成引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for amplification of target genes

| Gene | Forward | Reverse |
|----------------|----------------------|-----------------------|
| <i>GAPDH</i> | TGTGTCCGTCCTGGATCTGA | TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG |
| <i>RyR2</i> | TGCTGCCGAGCCGGG | TGCCGCTGCCGTAGGA |
| <i>SERCA2a</i> | CAGCCATGGAGAACGCTCA | TCCTTGACCCCGAAGTGG |

3 结果

3.1 基因芯片数据分析

3.1.1 黄秦艽对雪上一枝蒿所致心脏芯片的基因表达影响

韦恩图显示,CFA 与正常组相比共有 6693 个基因表达量发生明显变化,3505 个上调,3188 个下调。WVBF 与 CFA 组相比共有 9859 个基因发生明显变化,4386 个基因上调,5473 基因下调。WVBF 与正常组相比,共有 5510 个基因发生明显变化,1879 个基因上调,3631 个基因下调。在给予 WVBF 后,CFA 与正常组间共同基因仅有 2162 (1554 + 608) 个,初步说明 WVBF 对 CFA 诱导的差异基因的表达具有反向调控作用。

采用 KEGG 数据库进行差异表达基因的通路富

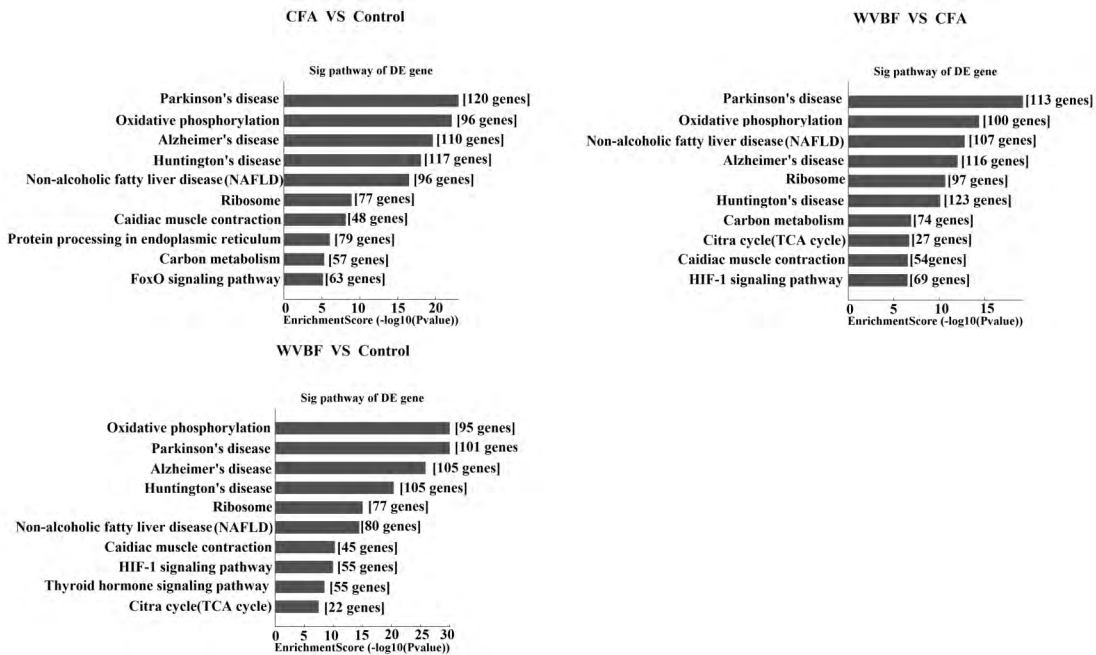
集结果显示,CFA 参与调控的通路有 98 条,WVBF 有 114 条,组间差异基因共有 72 条。CFA 对心脏的毒性主要使机体内碳、糖、脂肪酸代谢异常,导致心脏主要供能物质枯竭,细胞坏死。CFA 打乱体内的氧化磷酸化过程,蛋白的转录翻译过程,诱发内质网应激、氧化应激、线粒体功能紊乱,引起细胞凋亡。而 WVBF 可通过对富集基因的反向调控,使机体能量代谢恢复正常,减弱应激反应的发生,提高心肌细胞存活率,修复 CFA 引起的心脏结构和机能的损伤(图 1)。

3.1.2 黄秦艽解雪上一枝蒿急性心脏毒性的基因功能分析

Gene Ontology(GO)分析^[7]对分子功能、细胞组分和生物过程差异表达基因所涉及的生理过程如图 2 所示。WVBF、CFA 与空白对照组 3 组组间差异表达基因主要富集的生理进程基本相同,但 CFA 组经

过 WVBF 的处理以后 与空白对照组相比 ,差异基因在主要的生理学进程中富集数减少 ,重要性也明显

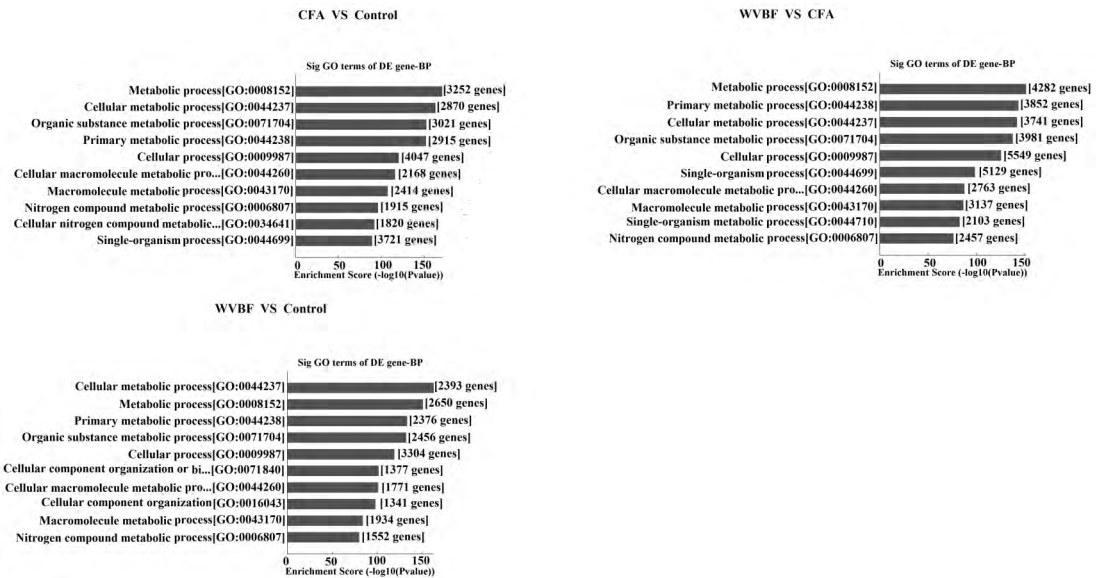
减弱 ,GO 分析可初步说明 WVBF 对 CFA 所诱导的小鼠急性心脏毒性具有一定的解毒作用.



p < 0.05 及 FDR < 0.05 作为组间通路筛选的阈值 ,纵坐标代表组间差异基因富集通路的种类 横坐标代表通路富集数取负对数的值

图 1 差异基因所涉及的信号通路分析

Fig. 1 Pathway analysis of differentially expressed genes



p < 0.05 FDR < 0.05 作为组间筛选的阈值

图 2 差异基因所涉及的生物学进程

Fig. 2 GO category based on biological process for differentially expressed genes

3.2 实时荧光定量 PCR 结果分析

实时荧光定量 PCR 结果表明(图 3) ,CFA 可以上调 RyR2 ,下调 ERCA2a ,具有潜在的促进钙离子通

道作用 ,高、低剂量的 WVBF 可以反向调节上述基因的变化 ,与芯片分析结果一致.

$p < 0.05$ vs 空白对照组, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 模型对照组

图3 黄秦艽对雪上一枝蒿所致 *RyR2* 和 *SERCA2a* 基因的表达水平影响

Fig. 3 The influence of WVBF on CFA induced *RyR2* and *SERCA2a* gene levels

4 讨论

实验结果表明,黄秦艽可通过调控相关基因的表达减弱雪上一枝蒿毒性反应,具体的作用机制如下。

4.1 内质网应激启动的细胞凋亡通路

(1) 内质网介导细胞凋亡包括非折叠蛋白反应和钙离子起始信号^[8]。通路分析结果显示,CFA可激活肌醇酶1 α (*Ire1 α*) UPR信号转导通路。在内质网应激信号出现时,分子伴侣蛋白Bip与非折叠结合而使蛋白复合物解体,导致*Ire1 α* 蛋白感受分子激活,诱导细胞凋亡。

(2) 钙离子信号。CFA可破坏内质网钙离子稳态,进而激活PI3K-Akt信号通路,诱导细胞凋亡。激活MAPK信号通路,引起由Caspase3介导的凋亡过程。激活Wnt-Ca²⁺信号通路,下调CAMK II,引起钙超载,并进一步导致细胞凋亡。

4.2 线粒体介导凋亡信号通路

CFA导致的机体内氧化磷酸化过程的异常以及大量的Ca²⁺从内质网中释放,使线粒体大量释放细胞色素c及ROS,引起CASP级联反应、细胞凋亡。由内质网应激导致的钙超载又可与细胞色素C协同使Caspase激活和细胞凋亡。WVBF可干扰促凋亡信使钙离子偶联ERS,并拮抗由线粒体功能紊乱及Caspase活化引起的凋亡反应。

4.3 心肌功能损伤

CFA可干扰钙离子稳态,影响心脏的收缩功能并引发了心率不齐等一些毒副作用,还可促进促炎因子释放参与动脉粥样硬化的形成与发展。WVBF可反向调节肌钙蛋白、肌球蛋白T及肌动蛋白的表达,恢复心肌正常的机能,减少毒副作用的发生。

另外,雪上一枝蒿对炎症反应具有双向调控作

用,既可以通过ERS诱发炎症反应发生,也可同时通过抑制核转录因子NF- κ B抑制炎症反应的发生和发展,二者主要通过活性氧分子和内质网释放的钙离子、激活核转录因子,在抗炎方面具有协同作用。

综上所述,黄秦艽主要通过干扰CFA引起的内质网应激反应及线粒体功能紊乱过程,提高细胞存活率,使心肌恢复正常功能,从而缓解雪上一枝蒿诱导的急性心脏毒性。与此同时,二者可通过多条信号通路作用产生协同抗炎作用。

参 考 文 献

- [1] Singhuber J, Zhu M, Prinz S et al. Aconitum in Traditional Chinese Medicine—A valuable drug or an unpredictable risk [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009; 126(1): 18-30.
- [2] 刘 艳. 乌头碱对大鼠心肌细胞毒性作用的分子毒理学机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [3] Chan T Y K. Aconite poisoning [J]. *Clin Toxicol*, 2009, 47(4): 279-285.
- [4] 云南省药物研究所-云南省民族药工程技术研究中心. 云南民族药志[S]. 昆明: 云南民族出版社, 2008.
- [5] 李志勇. 中国少数民族有毒药物研究与应用[M]. 北京: 中央民族大学出版社, 2011.
- [6] Ge Y B, Jiang Y, Zhou H et al. Antitoxic effect of *Veratilla Baillonii* on the acute toxicity in mice induced by *Aconitum Brachypodium*, one of the genus *Aconitum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016; 179, 27-37.
- [7] Harris M A, Clark J I, Ireland A et al. The Gene Ontology (GO) project in 2006 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(Database issue): D322-326.
- [8] Ferri K F, Kroemer G. Organelle specific initiation of cell death pathways [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 31(11): E255-263.