

神经血管单元多靶点抗缺血性脑卒中的相关靶标及通路研究

黄清¹, 梁萍², 欧阳扬², 刘蕾², 杨鏊鑫², 刘佩², 刘玥彤², 蒙兰青¹

(1. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨缺血性脑卒中神经血管单元关键基因的功能和潜在的作用机制。方法 选用 GEO 数据库中缺血性脑卒中体外模型的神经元、星形胶质细胞、血管内皮细胞和周细胞的基因表达谱芯片, 进行差异表达基因的筛选, 然后与“缺血性脑卒中”背景文库进行交集, 鉴定缺血性脑卒中神经血管单元靶标, 并做 GO、KEGG 和 PPI 分析。结果 鉴定出缺血性脑卒中相关的神经血管单元靶标 236 个, 其中 VEGFA、IL-6、CXCL8 和 SRC 为关键靶标。GO 主要参与的生物过程有炎症反应、血管生成、细胞增殖、免疫反应、信号传导等, KEGG 分析结果涉及 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、补体与凝血级联、细胞因子-细胞因子-受体相互作用通路等。结论 神经血管单元的缺血性脑卒中相关靶标, 能通过多种生物过程、多个通路来发挥作用, 为研究抗缺血性脑卒中靶向药物治疗提供一些新的思路。

关键词: 缺血性脑卒中; 神经血管单元; GEO; 信号通路

中图分类号: R743

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2020)02-0167-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.02.008

Study on targets and pathways in neurovascular unit related to multi-target anti-ischemic stroke

Huang Qing¹, Liang Ping², Ou Yangyang², Liu Lei², Yang Liuxin²,
Liu Pei², Liu Yuetong², Meng Lanqing¹

(1. *Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*; 2. *Graduate School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*)

Abstract: **Objective** To explore the function and potential mechanism of key genes of neurovascular unit in patients with ischemic stroke. **Methods** The gene expression profiles of neurons, astrocytes, vascular endothelial cells and peripheral cells in the model of ischemic stroke in vitro in GEO database were used to screen the differentially expressed genes. Then, the targets related to ischemic stroke in neurovascular unit were identified by intersection with the background library of “ischemic stroke”, and GO, KEGG and PPI analyses were conducted. **Results** A total of 236 targets of neurovascular unit of ischemic stroke were identified, among which VEGFA, IL6, CXCL8 and SRC were key targets. GO was mainly involved in biological processes such as inflammatory response, angiogenesis, cell proliferation, immune response, signal transduction, etc. KEGG analysis results involved PI3K-Akt signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, complement and coagulation cascades, and cytokine - cytokine - receptor interaction pathway, etc. **Conclusion** The targets related to ischemic stroke in neurovascular unit can play a role through a variety of biological processes and multiple pathways, which provides some new ideas for the study of the target drug therapy of anti-ischemic stroke.

Key words: ischemic stroke; neurovascular unit; GEO; signaling pathway

缺血性脑卒中是受到遗传和环境因素影响的系统性疾病,发生的分子机制是多基因、多功能蛋白相互作用

用的调控网络异常所致。氧/糖剥夺(OGD)细胞模型能够模拟脑卒中的病理状态,常用于模拟缺血性脑卒

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81660791);2020年度广西高校中青年教师科研基础能力提供项目(2020KY13015)

第一作者简介:黄清(1984-),男,在读硕士研究生,研究方向:脑血管疾病基础及临床研究,E-mail:522561558@qq.com

通讯作者简介:蒙兰青(1972-),男,医学硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:脑血管疾病基础及临床研究,E-mail:menglanqingsj@qq.com

中的体外实验^[1]。神经血管单元(NVU)将脑卒中的组织关联反应视为一个整体,体现为神经元、神经胶质细胞和微血管之间相联系及相互影响^[2]。基因表达量的改变是缺血性脑卒中的重要特征,它的改变也伴随着对多种蛋白质功能的影响^[3]。筛选缺血性脑卒中神经血管单元的差异表达基因,对探索缺血性卒中早期诊断的生物学标志物、发病机制和发现药物靶标等都有重要的意义。本研究基于神经血管单元的主要组成成分,整合缺血性脑卒中体外模型的神经元、星形胶质细胞和血管(血管内皮细胞、周细胞)芯片数据集的差异表达基因,并对各组成成分构建 PPI 互作网络、功能注释及通路分析等,为多靶点治疗缺血性脑卒中提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 神经血管单元 GEO 芯片来源

GEO 数据库^[4]中的 GSE54037、GSE3045、GSE76739 和 GSE109233

表 1 神经血管单元各组成成分的芯片基本信息

神经血管单元	GEO_ID	样本来源	实验类型	注释平台
神经元	GSE54037	大鼠	Expression profiling by array	GPL14746
星形胶质细胞	GSE3045	人	Expression profiling by array	GPL570
血管内皮细胞	GSE76739	人	Expression profiling by array	GPL10558
周细胞	GSE109233	人	Expression profiling by array	GPL10558

1.2 表达谱数据差异基因的筛选

GEO2R 是 GEO 数据库自带的在线分析工具,它是运用基于 R 编程语言的开源软件 Bioconductor 的 Biobase 2.30, GEOquery 2.40 和 limma 3.26.8 软件包对原始序列矩阵数据文件中的两组或多组样本进行分析,得出显著性的差异表达基因。我们利用 GEO2R 工具分别对 GSE54037、GSE3045、GSE76739 和 GSE109233 中的各组数据进行分析。

1.3 缺血性脑卒中背景文库的建立

为了使上述芯片筛选出来的差异基因更具有缺血性脑卒中的属性,我们从 GeneCards 和 OMIM 人类基因数据库中以关键词“ischemic stroke”或“cerebral infarction”或“ischemic cerebrovascular disease”检索靶标,作为缺血性脑卒中的背景文库。

1.4 缺血性脑卒中神经血管单元候选靶标鉴定

用 1.2 中各芯片数据筛选的差异表达基因分别与缺血性脑卒中背景文库做韦恩图取交集,合并,再删除重复值,即为缺血性脑卒中神经血管单元的候选靶标。

1.5 候选靶标的功能注释和通路分析

为了更好地理解缺血性脑卒中神经血管单元发挥的生物学功能和参与的通路,我们使用 OmicShare 云平台来进行 GO 和 KEGG 分析。

1.6 构建候选靶标的蛋白质互作(PPI)网络

STRING^[9]是一个涵盖 5090 个物种,通过基因组预

测、高通量测序、保守/共表达和文献文本挖掘等途径,拥有 24 584 628 个蛋白质相互作用的数据库。为了研究缺血性脑卒中神经血管单元各组分之间的相互作用,我们将候选靶标批量导入 STRING 数据库,“Organism”选择“Homo sapiens”,蛋白互作置信度为 0.7,隐藏网络中没有连接的节点,导出“TSV”格式的网络数据,用 Cytoscape 软件^[10]中的 cytoHubba 插件^[11]将整个网络节点通过 Degree 算法,筛选出关键基因。

2 结果

2.1 缺血性脑卒中背景文库

在 GeneCards 和 OMIM 数据库中分别检索到 2266 和 279 个缺血性脑卒中相关靶标,将 2 者合并,且删除重复值,最终得到 2469 个基因作为缺血性脑卒中的背景文库。

2.2 神经血管单元的差异表达基因

神经元 GSE54037 芯片按 2 个不同的观察时间点进行分组,根据 $p\text{-value} < 0.05$, $|\log(\text{FC})| > 1.2$ 筛选得到差异表达基因,7 h 组筛选到 543 个差异表达基因,上调 239 个,下调 304 个,24 h 组有 678 个差异表达基因,上调 145 个,下调 533 个,分别绘制火山图(见图 1A)。星形胶质细胞 GSE3045 芯片根据表达量,设定 $p\text{-value} < 0.05$, $|\log(\text{FC})| > 1.5$ 筛选得到差异表达基因 1367 个,其中有部分为探针对应多个基因名,删除重复值,整理后得到 1389 个差异表达基因,其中上调 1001 个,下调 388 个,绘制火山图(见图 1B)。血管内皮细胞

GSE76739 芯片根据表达量,设定 $p\text{-value} < 0.05$, $|\log(FC)| > 1.2$ 得到 417 个差异表达基因,其中上调 222 个,下调 195 个,绘制火山图(见图 1C)。周细胞 GSE109233 芯片按 2 个不同的观察时间点进行分组,根据 $p\text{-value} < 0.05$, $|\log(FC)| > 0.4$ 筛选得到差异表达基因,2 h 组筛选到 156 个差异表达基因,上调 63 个,下调 93 个,6 h 组筛选到 1292 个差异表达基因,上调 633 个,下调 659 个,分别绘制火山图(见图 1D)。

2.3 缺血性脑卒中神经血管单元候选基因鉴定 利用 Venn 工具分别对 GSE54037、GSE3045、GSE76739 和 GSE109233 芯片的差异表达基因与缺血性脑卒中背景基因进行交集分析,并绘制韦恩图(见图 2)。将 4 个交集的基因进行整合,删除重复值,最终得到 236 个由神经元、星形胶质细胞、血管内皮细胞和周细胞基因芯片组成缺血性脑卒中神经血管单元的候选靶标(见表 2)。

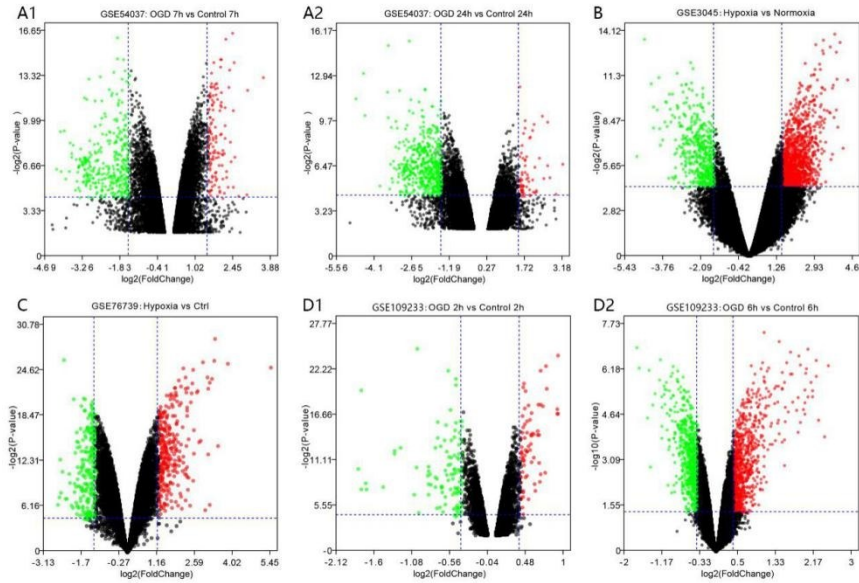


图 1 神经血管单位的差异表达基因火山图

注:A 为神经元 GSE540377 芯片(A1 为 7h 组,A2 为 24h 组);B 为星形胶质细胞 GSE3045 芯片;C 为血管内皮细胞 GSE76739 芯片;D 为周细胞 GSE109233 芯片(D1 为 2h 组,D2 为 6h 组);上调为红色,下调为绿色

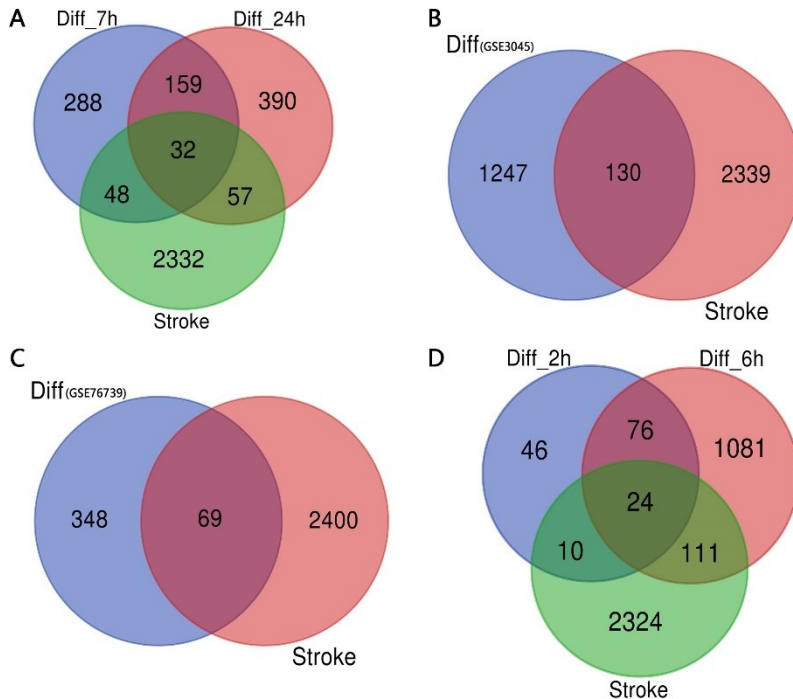


图 2 神经血管单元差异表达基因与脑缺血背景基因韦恩图

注:A 为神经元 GSE540377 芯片,B 为星形胶质细胞 GSE3045 芯片,C 为血管内皮细胞 GSE76739 芯片,D 为周细胞 GSE109233 芯片

表 2 缺血性脑卒中神经血管单元候选靶标列表

Microarray	Gene Symbol	Style
GSE54037	AGBL1, PCSK2, TRNP1, TAC1, RTN4R, PDE4DIP	up
GSE54037	PVR, IL1RL1, BMP2, IL6, HSPA1B, ICAM1, MMP3, PLAUR, P2RY2, RUNX1, FGG, MGP, LIPG, CRYAB, IL5, ANXA1, KRT18, PROCR, TCF7L2, KCNJ1, CKM, MCC, PLAU, SERPINE1, CXCL1, TFP12	down
GSE3045	ABCC6, IGF1, PON3, TACR1, VASH1, PCCB, COLEC11, HBG2, SPP1, PCSK6, ADRA1A, CYP4A22, KCNK10, GC, VSTM4, SLC4A5, MIP, CA4, MCM10, FCAR, ACE2, MEGF11, SRRT, ITGB8, ITGB2, NTS, TRPC5, IL10, SAMHD1, TNFSF11, SLC22A7, CD28, ENPEP, HSPA12B, TRPV4, THBS1, ADORA3, TBX3, SRC, CDK2, FGF10, PLG, SSPN, AHSG, KMO, DCN, CIB4TTL5, CALM1, ITGB5, BCL2L14, PSPH, SLC6A2, SLC6A4, TLR6, TP73, RUNX1, PIK3C2A, F11, SMPD1, IL6, NPAS4, P2RY12, CSMD1, CYP4A11, RPINF2, HAVCR1, SLC25A13, COL13A1, POLB, EPOR, VDR, ENG, CD163, HTR1B, LPA, NQO1, FGA, IRF5, ADIPOQ, TLR4, CELSR1, KLC1, FABP4, FCN3, SCN8A, LCN2, CSF1R, FAM160A1, HELLS	up
GSE3045	ADGRF1, KLKB1, THPO, ENO2, VEGFA, SLC2A1, NR3C2, FCGR2A, NAMPT, TEP1, LRP1, XPNPEP3, LOX, ADM, IGFBP3, SCNN1G, PVR, PDE4A, PTGER3, ANGPTL3, OSMR, CSF1, PAPP, MYH11, ANG, CP, ALDOA, FGF14, CMAHP, DNAJC6, CPNE8, BRAP, DDIT4, SURF1, SYK, SLC12A1, MMAA, GRM5, TNFRSF1B, OPRM1	down
GSE76739	ADM, CXCR4, ANGPT2, AKAP12, ADORA2A, SLC2A1, DDIT4, PTRPB, LOX, PTGS1, ADD3, PGF, ALDOC, PDGFB, NTN4, NOX4, NEDD4L, CUBN, ENO2, IL4R, SGIP1, CD34, KLHL3, MMP2, RASD1, ITGA11, NOTCH4, GRN, RPS6KA2, MME, TENM3, ESM1, LAMA4, PXDN, ERRF1, ABCA1, LAMB2, COL4A2, MAP1LC3A, GAS6, CCL2, ITGA10, CXCL8, PLTP, SELE, CDH13, HLA-B, SERPINE2	up
GSE76739	IL1RL1, TFRC, ODC1, CCDC86, GABBR2, WDR12, NUP93, SIGMAR1, QDPR, GCSH, NOS3, NCEH1, PARP1, TTF2, FEN1, FH, DKK1, NQO1, UHRF1, FABP4, HMG2	down
GSE109233	HSPA1A, HSPA1B, MED22, TFRC, THBD, TXNIP, HMOX1	up
GSE109233	ADAMTS1, ADM, BDNF, CXCL1, CXCL8, DDIT4, DKK1, EDN1, EGR1, F3, GDF15, IL6, IRS2, NGF, SGK1, VCAM, RHOB	down

2.4 缺血性脑卒中神经血管单元候选靶标的功能注释和通路分析 为了更好地理解缺血性脑卒中神经血管单元发挥的生物学功能和参与的通路,我们使用OmicShare 云平台来进行GO 和KEGG 分析。GO 结果显示,显著性的生物学过程(Biological Process, BP)包括:免疫反应、细胞增殖、内皮细胞增殖、信号传导等;分子功能(Molecular Function, MF)包括:蛋白酶

结合、血管内皮生长因子受体结合、钙离子结合、细胞因子活性、G 蛋白偶联腺苷受体活性等;细胞组成(Cellular Component, CC)包括:神经元、血小板、细胞外基质、纤维蛋白原复合物等(见图 3、表 3)。KEGG 结果显示,神经血管单元参与的通路有 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、补体与凝血级联、肿瘤坏死因子信号途径等(见图 4、表 4)。

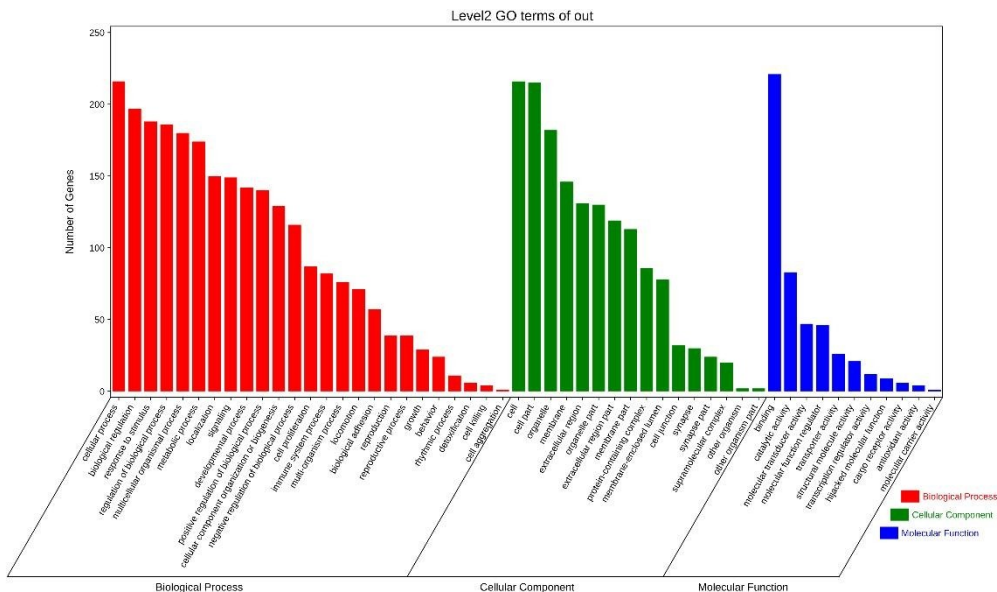


图 3 缺血性脑卒中神经血管单元基因功能分析
注:红色:生物学过程,绿色:细胞组成,蓝色:分子功能

表 3 缺血性脑卒中神经血管单元前 10 位生物学过程

Term	Description	Count	p-value
GO:0032501	multicellular organismal process	180	8.49E-29
GO:0051240	positive regulation of multicellular organismal process	83	1.92E-26
GO:0009605	response to external stimulus	98	2.24E-26
GO:0065008	regulation of biological quality	124	3.90E-26
GO:0010033	response to organic substance	112	5.18E-26
GO:0008283	cell proliferation	87	2.57E-25
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	109	5.02E-25
GO:0042221	response to chemical	135	1.22E-24
GO:0042127	regulation of cell proliferation	75	9.74E-23
GO:0032101	regulation of response to external stimulus	56	9.97E-23

注:p-value 列下的 E 为科学计数

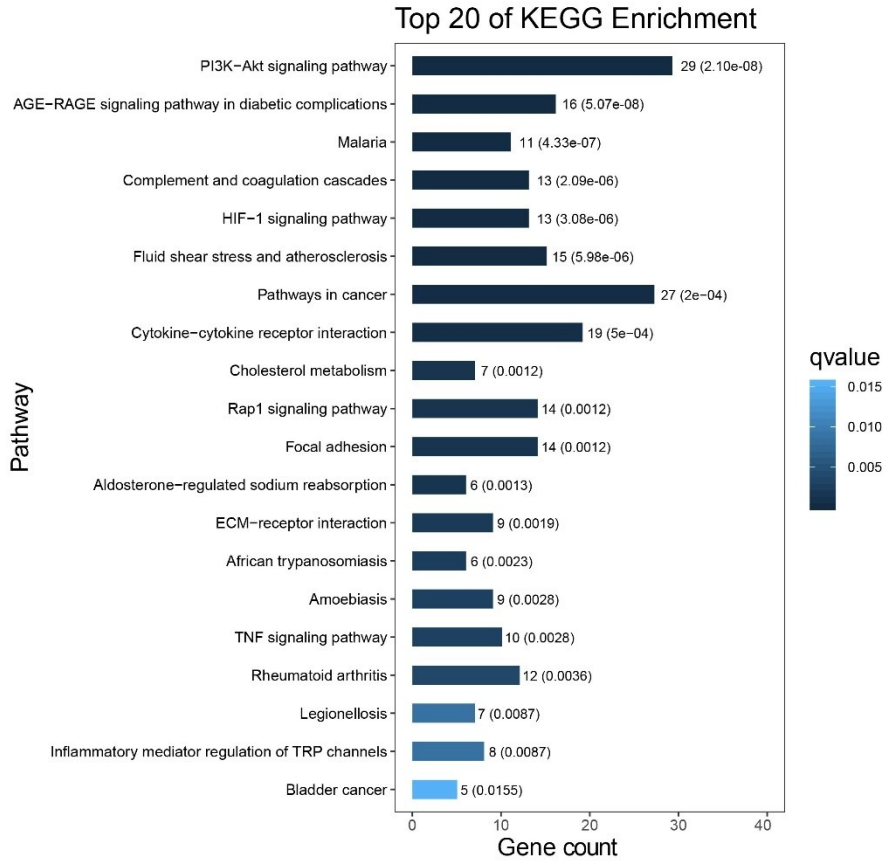


图 4 缺血性脑卒中神经血管单元前 20 位 KEGG 通路柱状图

表 4 缺血性脑卒中神经血管单元前 10 位 KEGG 信号通路表

ID	Description	Count	p-value
hsa04933	PI3K-Akt signaling pathway	29	9.03E-11
hsa04151	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	16	4.35E-10
hsa05144	Malaria	11	5.57E-09
hsa04610	Complement and coagulation cascades	13	3.59E-08
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	13	6.62E-08
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	15	1.54E-07
hsa05323	Pathways in cancer	27	5.55E-06
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	19	1.80E-05
hsa04640	Cholesterol metabolism	7	4.91E-05
hsa04979	Rap1 signaling pathway	14	5.33E-05

注:p-value 列下的 E 为科学计数

2.5 缺血性脑卒中神经血管单元 PPI 分析 将 236 个候选基因批量导入 STRING 数据库,“Organism”选择“Homo sapiens”,蛋白互作置信度为 0.7,隐藏网络中没有连接的节点,得到 236 个节点连接 679 条边,平均节点度:5.75,平均局部聚类系数:0.442,PPI 富集 p 值: $<1.0 \times 10^{-16}$ 的蛋白互作网络图(见图 5A)。下载“TSV”格式的 PPI 数据,用 Cytoscape 软件中的 cytoHubba 插件将整个网络节点通过 Degree 算法,筛选出连接度最大的前 20 个靶标(VEGFA, IL6, CXCL8,

SRC, IGF1, PLG, FGG, FGA, SERPINE1, CCL2, IL10, ITGB2, AHSG, SPP1, EDN1, ICAM1, TLR4, THBS1, CXCL1, MMP2),即为神经血管单元的枢纽靶标(见图 5B、图 5C)。STRING 中的通路分析显示,显著富集的通路有 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、补体与凝血级联等(见表 5)。这些靶标和通路可能是神经血管单元在缺血性脑卒中的病理过程中发挥重要作用。

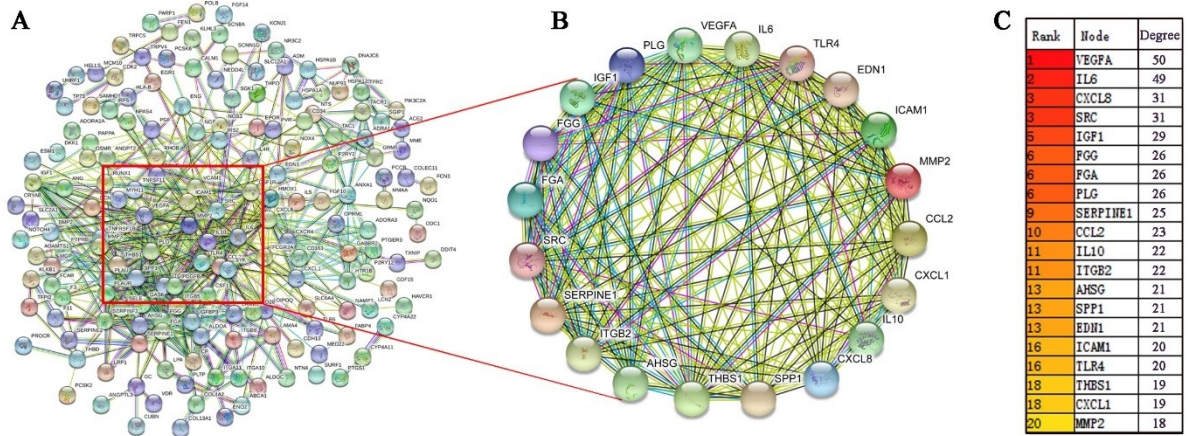


图 5 神经血管单元候选靶标 PPI 网络

注:A 为 236 个候选靶标的蛋白互作网络;B 为由 cytoHubba 插件 Degree 算法得出的前 20 个连接度最大的靶标互作子网络;C 为 Degree 排名方法

表 5 神经血管单元 20 个枢纽靶标富集的部分信号通路

Term ID	Term description	FDR	Genes
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	6.17E-06	IGF1, IL6, SPP1, THBS1, TLR4, VEGFA
hsa04610	Complement and coagulation cascades	1.62E-07	FGA, FGG, ITGB2, PLG, SERPINE1
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	1.67E-08	EDN1, IGF1, IL6, SERPINE1, TLR4, VEGFA
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	4.83E-08	CCL2, EDN1, ICAM1, MMP2, SRC, VEGFA
hsa04657	IL-17 signaling pathway	1.17E-05	CCL2, CXCL1, CXCL8, IL6
hsa04668	TNF signaling pathway	6.24E-07	CCL2, CXCL1, EDN1, ICAM1, IL6
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	1.45E-06	CCL2, CXCL1, CXCL8, IL10, IL6, VEGFA
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	7.38E-06	IGF1, IL6, SRC, VEGFA
hsa04510	Focal adhesion	8.14E-06	IGF1, SPP1, SRC, THBS1, VEGFA

注:FDR 列下的 E 为科学计数

3 讨论

20 世纪 80 年代,人类基因组计划被提出,随着生物信息技术的飞速发展,基因芯片技术现已被广泛应用于发现疾病易感基因、分子诊断和靶向治疗等医学与生物学领域。脑卒中是全球死亡和致残的主要原因之一,缺血性脑卒中占脑卒中的 70%~80%。缺血性脑卒中不仅对神经元造成损伤,神经胶质和血管成分也发生不同程度的损害。神经血管单元(NVU)作为

缺血性脑卒中生物学标志物的来源^[12],研究其各组成部分之间的功能关系和调控的信号通路具有重要意义。

本研究对神经血管单元的主要成分神经元、星形胶质细胞、血管内皮细胞和周细胞的基因表达谱芯片数据进行整合,得到 236 个缺血性脑卒中神经血管单元的靶标。GO 分析结果显示,这些靶标参与的生物过程主要与炎症反应、血管生成、细胞增殖、免疫反应、

信号传导等有关。KEGG 显著富集的信号通路有 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、补体与凝血级联、细胞因子-细胞因子-受体相互作用通路等。通过 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行拓扑分析, VEGFA、IL-6、CXCL8 和 SRC 在整个网络的连接度均超过 30, 可见在缺血性脑卒中发挥重要作用。

VEGFA 属于 PDGF/VEGF 家族的成员, 是具有约 120~190 个编码氨基酸的同源二聚体糖蛋白^[13]。其基因表达受缺氧刺激、细胞因子、性激素、趋化因子、生长因子等调节。低氧诱导因子 1(HIF-1) 是促进其表达的重要转录因子, 激活 HIF-1 α /VEGF 信号转导通路, 可促进脑缺血再灌注损伤大鼠血管新生^[14-15]。白细胞介素 6(IL-6) 是常见的炎症细胞因子, 但在脑缺血中具有双重作用。在急性期, IL-6 由神经元和小胶质细胞分泌作为炎症介质, 但在亚急性期, 由星形胶质细胞分泌, 则可能参与神经营养和保护作用^[16-17]。炎症趋化因子 CXC 配体 8(CXCL8) 又称白细胞介素 8(IL-8), 有研究表明, 抑制 CXCL8 可以抑制炎症反应^[18], 而 CXCL8 基因沉默能激活 PI3K-Akt 信号通路^[19], 进而起到神经保护作用^[20], 有助于阐明中风的潜在分子机制。此外, SRC 激酶(一种原癌性酪氨酸激酶) 已被证实, 通过 NR2A 亚基的直接磷酸化来增强 NMDA 受体功能, 调节突触囊泡的谷氨酸释放, 并激活钙通道^[21-22]。因此, 阻断 SRC 活性可能会降低 NMDA 的功能, 并调节与缺血性卒中兴奋性毒性损伤相关的多种蛋白。

综上所述, 本研究利用多个基因表达谱芯片鉴定了缺血性脑卒中神经血管单元的靶基因并进行生物学信息分析, 发现在缺血性脑卒中, 神经血管单元主要参与炎症反应、血管生成、细胞增殖、免疫反应、信号传导等生物过程, 并调控 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、补体与凝血级联、细胞因子-细胞因子-受体相互作用通路等。我们着重分析了 VEGFA、IL-6、CXCL8 和 SRC 在缺血性脑卒中可能发挥作用的分子机制。这些神经血管的关键靶标和信号通路, 可以为我们的研究抗缺血性脑卒中靶向药物治疗提供一些新的思路。

参考文献:

[1] 张鹏, 张鹏飞, 高琛, 等. 条件培养基对氧-葡萄糖剥夺诱导皮层神经元死亡的保护作用[J]. 中国实用医药, 2018, 13(12): 196-198.

[2] Del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection[J]. New England Journal of Medicine, 2006, 354(6): 553-555.

[3] Mitsios N, Saka M, Krupinski J, et al. A microarray study of gene and protein regulation in human and rat brain following middle cerebral artery occlusion[J]. BMC neuro-

science, 2007, 8: 93.

[4] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database issue): D991-D995.

[5] Fernandes J, Vieira M, Carreto L, et al. In vitro ischemia triggers a transcriptional response to down-regulate synaptic proteins in hippocampal neurons[J]. PloS one, 2014, 9(6): e99958.

[6] Mense S M, Sengupta A, Zhou M, et al. Gene expression profiling reveals the profound upregulation of hypoxia-responsive genes in primary human astrocytes[J]. Physiological genomics, 2006, 25(3): 435-449.

[7] Voellenkle C, Garcia-Manteiga JM, Pedrotti S, et al. Implication of Long noncoding RNAs in the endothelial cell response to hypoxia revealed by RNA-sequencing[J]. Scientific reports, 2016, 6: 24141.

[8] Carlsson R, Özen I, Barbariga M, et al. STAT3 precedes HIF1 α transcriptional responses to oxygen and oxygen and glucose deprivation in human brain pericytes[J]. PloS one, 2018, 13(3): e0194146.

[9] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(D1): D447-D452.

[10] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Research, 2003, 13(11): 2498-2504.

[11] Chin CH, Chen SH, Wu HH, et al. CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. BMC Systems Biology, 2014, 8(4): S11.

[12] Steliga A, Kowiański P, Czuba E, et al. Neurovascular Unit as a Source of Ischemic Stroke Biomarkers-Limitations of Experimental Studies and Perspectives for Clinical Application[J]. Translational Stroke Research, 2019. doi: 10.1007/s12975-019-00744-5.

[13] Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3(5): 391-400.

[14] Liu H, Ren X, Ma C. Effect of Berberine on Angiogenesis and HIF-1 α ; /VEGF Signal Transduction Pathway in Rats with Cerebral Ischemia - Reperfusion Injury[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2018, 28(10): 753-757.

[15] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia; Role of the HIF system [J]. Nature Medicine, 2003, 9(6): 677-684.

[16] Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia; Inflammatory versus neurotrophic aspects[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2009, 29(3): 464-479.

- [17] Nakamachi T, Tsuchida M, Kagami N, et al. IL-6 and PACAP receptor expression and localization after global brain ischemia in mice[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2012, 48(3): 518-525.
- [18] Fischer CD, Beatty JK, Duquette SC, et al. Direct and Indirect anti-inflammatory effects of tulathromycin in bovine macrophages; Inhibition of CXCL-8 secretion, induction of apoptosis, and promotion of efferocytosis[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(3): 1385-1393.
- [19] Lv H, Li J, Che YQ. CXCL8 gene silencing promotes neuroglial cells activation while inhibiting neuroinflammation through the PI3K/Akt/NF- κ B-signaling pathway in mice with ischemic stroke[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(5): 7341-7355.
- [20] Miao J, Wang L, Zhang X, et al. Protective Effect of Aliskiren in Experimental Ischemic Stroke: Up-Regulated p-PI3K, p-AKT, Bcl-2 Expression, Attenuated Bax Expression[J]. *Neurochemical Research*, 2016, 41(9): 2300-2310.
- [21] Salter MW, Kalia LV. SRC kinases; A hub for NMDA receptor regulation[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004, 5(4): 317-328.
- [22] Cataldi M, Tagliatela M, Guerriero S, et al. Protein-tyrosine kinases activate while protein-tyrosine phosphatases inhibit L-type calcium channel activity in pituitary GH3 cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(16): 9441-9446.

收稿日期: 2020-03-18; 修回日期: 2020-03-30

(上接第 166 页)

禾本科芦笋中含有黄酮、酚酸、多糖等化学成分,具有良好的抗癌与抗氧化等活性^[11],而对其黄酮中的具体成分研究较少,比色法进行总黄酮含量测定时,通常以芦丁计,显色比较稳定,测定比较准确,因而在总黄酮的含量测定中以芦丁计,为总黄酮含量评价提供经典方法。

静态吸附量的比较中,本研究考察了芦笋样品溶液中总黄酮在三种不同型号大孔树脂上的静态吸附量与解吸率,静态吸附量大小关系为 AB-8 > D101 > HPD100,采用 95%乙醇解吸附时解吸率大小顺序为 HPD100 > AB-8 > D101。可见, D101 大孔吸附树脂对禾本科芦笋中总黄酮具有较好的静态吸附与解吸附性能。大孔吸附树脂的选择中,综合 3 种树脂(AB-8、D101、HPD100)对芦笋总黄酮的静态性能分析,最终选择 D101 大孔吸附树脂进行动态性能考察。动态吸附径高比考察中,在 3 个径高比(1:3、1:4、1:5)下,径高比为 1:5 时,泄漏量最低,可见径高比为 1:5 对芦笋中总黄酮吸附量较高。D101 大孔吸附树脂的纯化工艺可见,乙醇能有效溶解中草药中的黄酮成分^[12]。特别是动态洗脱时,总黄酮在不同浓度的乙醇中均有洗脱,为了提高洗脱率,选择 90%乙醇进行洗脱。进行分离纯化后,总黄酮纯度提高了 6.54 倍。

综上所述, D101 大孔吸附树脂对禾本科芦笋中总黄酮具有较好的静态与动态吸附性能,可以用于禾本科芦笋中总黄酮的纯化,与其他纯化方法相比选择性强、价格合理,为各类中药中黄酮类化合物的纯化工艺研究提供了基础。

参考文献:

- [1] 邵荣,郭海滨,许伟,等. 芦苇中活性物质研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(2): 167-168.
- [2] 余晓红,许伟,邵荣,等. 富含黄酮的芦苇提取物的抑菌性和抗氧化性研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(23): 185-188.
- [3] 孙丽芳,刘邻渭,吕俊丽,等. 芦苇叶类黄酮高效液相色谱分析[J]. *食品科学*, 2011, 32(10): 241-245.
- [4] 李娟,王智,刘塔斯,等. 芦根及其混淆品的鉴定[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(17): 3320-3325.
- [5] 姜云云,叶光明,范国荣,等. HPLC 法同时测定芦笋黄酮中 5 个黄酮苷的含量[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(4): 623-626.
- [6] 王元清,罗堃,李顺祥,等. 淫藤骨痹康方中 7 种活性成分的大孔树脂静态吸附性能研究[J]. *中成药*, 2014, 36(7): 1424-1429.
- [7] 李瑞光,刘邻渭,郑海燕,等. 大孔树脂分离纯化芦苇叶总黄酮[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(3): 60-64.
- [8] 李俊,刘孟源,方升平,等. 大孔吸附树脂分离纯化油橄榄叶总黄酮[J]. *中成药*, 2019, 41(2): 261-265.
- [9] 李园园,李洪娟,候桂革,等. 大孔吸附树脂纯化紫菀总黄酮工艺[J]. *中成药*, 2019, 41(3): 501-505.
- [10] 孙长花,王正云,钱小丽,等. 芦笋下脚料中黄酮类物质分离纯化及鉴定[J]. *食品工业*, 2011, 32(8): 51-53.
- [11] 贺帆. 寻找在水一方的“洞庭明珠”——沅江芦笋的饕餮盛宴[J]. *中国食品*, 2015, 677(13): 30-33.
- [12] 林燕燕,罗秀针,曹林枝,等. 超声下白凤菜总黄酮的优化提取及其体外抑菌活性研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2017, 39(2): 90-93.

收稿日期: 2020-01-19; 修回日期: 2020-02-25