·实验研究·

# 基于转录组学和蛋白质组学分析小檗碱抗糖尿病慢性炎症机制

操映倩[1],周立分[2],余　宏[3],薛亚楠[1],艾志福[4],罗小泉[4],章常华[1]
(1 江西中医药大学药学院,南昌 330004;2 江西中医药大学大型精密仪器共享服务中心,南昌 330004;
3 豫章师范学院数学与计算机学院,南昌 330004;4 江西中医药大学实验动物科技中心,南昌 330004)

[**摘要**] **目的**:通过 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型,应用转录组学和蛋白质组学技术探究小檗碱抗糖尿病慢性炎症机制。**方法**:RAW264.7 细胞通过 LPS(0.1 μg·mL$^{-1}$)诱导,给予小檗碱(1 μg·mL$^{-1}$),分别提取蛋白和 RNA,进行蛋白质组学和转录组学分析,分别找出差异表达蛋白和差异表达基因,并进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并运用 STRING 进行绘制相互作用图(PPI),对共同差异表达蛋白和基因进行实时荧光定量 PCR 进行验证。**结果**:通过模型组与小檗碱组相比较,转录组学共有 1 801 个差异表达基因,找出 11 种差异表达基因 *Pdia4*,*Itgam*,*Hsp90b1*,*Prdx5*,*Pdia6*,*Myc*,*Fosl1*,*Il10*,*Ccl2*,*Lpin2*,*Pik3r2* 与炎症相关;蛋白质组学共得到 83 个差异表达蛋白,找出 10 个差异表达蛋白 Hsp90b1,Pdia6,Prdx5,Pdia4,Itgam,Stat1,Pgm2,Ptgs1,Nos2,Actb 与炎症相关;共同差异表达蛋白和基因共有 5 个。**结论**:小檗碱可能是通过减少炎症因子释放,同时减少 Hsp90b1,Pdia6,Prdx5,Pdia4,Itgam,PTGS1,NOS2 和 IL-10 及增加 *Pik3r2* 和 *LPIN 2* 基因的生成来达到抗炎作用,进一步缓解异常代谢和胰岛素抵抗以及减轻内质网氧化损伤来治疗糖尿病。

[**关键词**] 转录组学;蛋白质组学;小檗碱;RAW264.7 细胞;糖尿病;抗炎
[**中图分类号**] R96;R977.15　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003-3734(2021)05-0424-10

# The anti-diabetic chronic inflammation mechanism of berberine based on transcriptomics and proteomics analysis

CAO Ying-qian[1],ZHOU Li-fen[2],YU Hong[3],XUE Ya-nan[1],AI Zhi-fu[4],LUO Xiao-quan[4],ZHANG Chang-hua[1]
(1 *School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang* 330004, *China*;
2 *Large Precision Instrument Sharing Service Center of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang* 330004, *China*;3 *School of Mathematics and Computer, Yuzhang Normal University, Nanchang* 330004, *China*;4 *Experimental Animal Science and Technology Center of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang* 330004, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: LPS induces RAW264.7 cells to become an inflammation model, and uses transcriptomics and proteomics techniques to explore the anti-diabetic chronic inflammation mechanism of berberine. **Methods**: After RAW264.7 cells induced by LPS (0.1 μg·mL$^{-1}$) were incubated with berberine (1 μg·mL$^{-1}$), protein and RNA were extracted, and proteomics and transcriptomics analysis were performed. Proteins and genes that were differentially expressed were found, and gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. STRING was used to draw interaction diagrams (PPI) to perform real-time fluorescence quantification of common differentially expressed proteins and genes PCR for verification. **Results**: By comparing the model group with the berberine group, there are a total of 1 801

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81774194);江西省自然科学重点项目联合资助基金(20192ACBL20027);江西省自然科学基金(20202BABL206142);江西省教育厅科技计划重点项目(GJJ190636);江西省中药学一流学科专项科研基金项目(JXSYLXK-ZHYAO118)
[**作者简介**] 操映倩,女,硕士研究生,主要从事中药及天然产物药理学研究。E-mail:18178945787@163.com。
[**通讯作者**] 章常华,男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事中药及天然产物药理学研究。E-mail:20070964@jxutcm.edu.cn。

differentially expressed genes in transcriptomics, and 11 differentially expressed genes, such as *Pdia4*, *Itgam*, *Hsp90b1*, *Prdx5*, *Pdia6*, *Myc*, *Fosl1*, *Il10*, *Ccl2*, *Lpin2 and Pik3r2*, are related to inflammation. Proteomics obtained a total of 83 differentially expressed proteins, and 10 differentially expressed proteins were found, including Hsp90b1, Pdia6, Prdx5, Pdia4, Itgam, Stat1, Pgm2, Ptgs1, Nos2, Actb, are related to inflammation. There are 5 common differentially expressed proteins and genes. **Conclusion**: Berberine may achieve anti-inflammatory effects by reducing the release of inflammatory factors, while reducing Hsp90b1, Pdia6, Prdx5, Pdia4, Itgam, PTGS1, NOS2 and IL-10, and increasing the production of *Pik3r2* and *LPIN 2* genes to further relieve abnormal metabolism and insulin resistance as well as reducing oxidative damage to the endoplasmic reticulum to treat diabetes.

[**Key words**] transcriptomics; proteomics; berberine; RAW264.7 cells; diabetes; anti-inflammatory

随着社会物质文明的发展和时代自然环境的变化,人们的生活居住水平和饮食结构也在不断提高,糖尿病的发病率日益增加,常伴有多种并发症,已经成为影响人类生活健康的第三大慢性疾病之一[1-4]。糖尿病(diabetes,DM)是由遗传因素和环境因素共同作用而导致的慢性全身性代谢性疾病,主要由于体内胰岛素的分泌缺陷及对胰岛素抵抗而引起糖、脂肪、蛋白质、水及盐代谢紊乱,表现为高血糖及尿糖等[5]。

糖尿病被认为是一种非特异性的低度炎症性疾病[6],其导致体内炎性标志物因子水平升高,而黄连主要成分小檗碱可以通过激活巨噬细胞来降低非特异性炎症因子的水平来达到抗炎作用,能够有效降低 KKAy 小鼠的空腹血糖[7]。小檗碱又称黄连素,是一种属于原小檗碱类的苄基异喹啉季铵生物碱,研究表明,小檗碱具有广泛的药理活性,具有抗菌、抗病毒、抗胃溃疡等药理作用,还在降血糖、降脂、改善胰岛素抵抗、调节慢性炎症、抗微生物、预防和抗肿瘤以及抗心脑血管疾病方面发挥着重要的作用[8-9]。

蛋白质组学是从整体研究蛋白质的表达水平、翻译后的修饰、蛋白与蛋白相互作用等,从而进一步寻找新的作用靶点,阐明药物的作用机制[10]。转录组学主要从 mRNA 水平上研究基因的表达,在整体水平上研究细胞中基因转录的情况及转录调控规律,阐明药物的作用机制[11]。为了更好研究小檗碱的作用机制,本实验将蛋白质组学和转录组学相结合,从多靶点、多通路、多途径来阐明小檗碱通过抗炎作用来抗糖尿病作用机制,报道如下。

## 材料与方法

### 1 Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞培养

RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞(购于上海细胞库),采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养。接种细胞于 6 孔板中(密度 $2\times10^5$ 个·$mL^{-1}$),细胞贴壁后将细胞分为空白组、模型组和小檗碱组(见表 1),给药后培养 6 h。

**表 1** 细胞分组

| 组别 | 培养基 | LPS | 小檗碱 |
|---|---|---|---|
| 空白组 | DMEM:胎牛血清 =9:1 | 0 | 0 |
| 模型组 | DMEM:胎牛血清 =9:1 | 0.1 μg·$mL^{-1}$ | 0 |
| 小檗碱组 | DMEM:胎牛血清 =9:1 | 0.1 μg·$mL^{-1}$ | 1 μg·$mL^{-1}$ |

### 2 实验试剂及仪器

**2.1 实验试剂** 小檗碱(批号:110713-200911),LPS(SIGMA 公司,批号:028M4094V),胎牛血清(BI 公司,批号:1913445),DMEM 培养基(HyClone 公司,批号:AE26872264),PBS 溶液(Solarbio 公司,批号:20170712),RIPA 高效裂解液(CWBIO 公司,批号:141511),BCA 蛋白定量试剂盒(CWBIO 公司,批号:20504),尿素(Sigma-aldrich 公司,批号:BCBV4714),二巯基苏糖醇(Promega 公司,批号:0000234509),碘乙酰胺(Sigma 公司,批号:SLBJ4716V),碳酸氢铵(Sigma-aldrich 公司,批号:WXBB1027V),胰酶(Promega 公司,批号:0000154326),C-18 脱盐小柱(Thermo 公司,批号:T1274178),甲酸(Sigma-aldrich 公司,批号:BCBM1192V),甲醇(默克公司,批号:1743230428),三氟乙酸(MACKLIN 公司,批号:C10425017),乙腈(默克公司,批号:10989807901),PrimeScript RT reagent kit 试剂盒(TaKaRa 公司,批号:AHE3187A),TB Green Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa 公司,批号:AI11043A)。

**2.2 实验仪器** Thermo UL timate 3000 高效液相色谱仪(Thermo 公司),LTQ-Orbitrap Pro 质谱仪(Thermo 公司),EASY-SPRAY PEPMAP C18(Thermo 公司),AcclaimR PepMap 100(Thermo 公司),Mili－Q 超声纯水仪(Milipore 公司),Elx800 型酶标仪(BIO

Tek 公司),64132 型浓缩离心干燥机(LABCONCO 公司),BT225 电子分析天平(Sartorius 公司),Neofuge13R 型台式高速冷冻离心机(Heal Force 公司)。

## 3 Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞的转录组学

### 3.1 RNA 的制备和 cDNA 的合成及 RNA 测序

RAW264.7 细胞诱导给药 6 h 后,分别加入 Trizol,吹打至无明显沉淀;加入氯仿,振荡,得粉红色浑浊液,无分层,静置离心,取上层无色水相移至另一离心管;加入异丙醇,混匀静置离心,弃上清;加入 75% 的乙醇,混匀离心,弃上清,干燥沉淀。根据所得 RNA 的量加入的 DEPC 处理水溶解沉淀,得到 RNA 样品。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 浓度,合格后用 BGI-SEQ 500 平台测序。

**3.2 生物信息学分析** 将数据进行基因定量分析,差异倍数大于 2 的基因视为差异基因,对差异基因进行 GO 富集分析和 KEGG PATHWAY 富集分析以及蛋白互作图。

## 4 Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞的蛋白质组学

**4.1 蛋白质的准备** 在文献[12]的方法基础上进行改进,将提取的蛋白加入 RIPA(含有 PMSF)裂解,冰上孵育,于 14 000 × g 离心,收集上清液,加入尿素缓冲液进行变性使终浓度为 8 mmol·$L^{-1}$,加入二硫基苏糖醇(DTT)水浴还原使其终浓度为 10 mmol·$L^{-1}$,加入碘乙酰胺(IAA)烷基化,蛋白溶于 25 mmol·$L^{-1}$碳酸氢铵溶液中,加入测序级胰酶,酶解过夜;利用 $C_{18}$小柱进行脱盐,真空冷冻干燥,加入 0.1% 甲酸水复溶,取上清液进行上样分析。

**4.2 纳升液相-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪分析** 液相仪器为 UltiMate 3000 UHPLC system(Thermo Scientific,San Jose,CA,USA)和质谱仪器为 LTQ ORBITRAP VELOS PRO(Thermo Fisher Scientific,San Jose,CA,USA)行蛋白质组学研究。采用 ACQUITY HSS $T_3$ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.8 μm),纳升液相条件设置为:流动相 A 相为 0.1% 甲酸水,B 相为 0.1% 甲酸乙腈,流速 300 nL·$min^{-1}$,进样量 2 μL。见表 2。

**表 2** 流动相梯度设置

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|---|---|---|
| 0 | 96 | 4 |
| 5 | 93 | 7 |
| 85 | 78 | 22 |
| 100 | 68 | 32 |
| 110 | 10 | 90 |
| 120 | 10 | 90 |

**4.3 蛋白质的鉴定和生物信息学分析** 将 nano-LC-LTQ/OrbitrapMS 得到的 RAW 文件用 Proteome Discoverer 1.4 软件进行数据搜索,采用 Sieve v2.1(×64)软件进行蛋白质的筛选,将其差异倍数设定为 1.3 倍以上(即 < 0.7 或 > 1.3),且统计学检验 $P < 0.05$,从而进行无标样定量分析寻找与疾病相关差异蛋白,符合上述条件则认定为是差异蛋白。利用在线数据库 KEGG 对差异蛋白进行信号通路富集,通过 STRING 在线数据库找出相应蛋白的名称以及 GO 分析,进一步绘制出蛋白相互作用网络图。

## 5 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)分析

RNA 的提取参考转录组学 RNA 的提取,按照试剂盒进行反转录,采用 Light Cycler96(Roche)仪器进行荧光定量 PCR 扩增反应,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$计算每个基因的相对 mRNA 表达量,见表 3。

**表 3** 目的基因的引物序列

| 目的基因 | 前引物序列 | 后引物序列 |
|---|---|---|
| *β-actin* | TGAGCTGCGTTTTACACCCT | GCCTTCACCGTTCCAGTTTT |
| *Itgam* | GAGCATCAATAGCCAGCCTCAGTG | CCAACAGCCAGGTCCATCAAGC |
| *Pdia6* | CCCTGGGAGGTCAGTATGGTGTC | GGCGGCATCTACAATGGCTTCTC |
| *Prdx5* | CGCTCGCTGAAGAGAGTACACAC | CGTGACAGTTCGTGACCCATAGC |
| *Hsp90b1* | GCAACGCTTCGGTCAGGGTATC | GGTTCTTCTTCGGGCTCTTCTTCC |
| *Pdia4* | CACTGCAAGCAGCTAGAGCCTATC | TTGGTCGTTGGTGATGTCGTTGG |

# 结 果

## 1 Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞的转录组学分析

**1.1 差异表达基因的筛选** 细胞样品 RNA 纯度和完整性检测都为合格,差异表达基因变化在 2 倍以上的基因且 $P < 0.05$,共筛选得到 1 801 个差异表达基因,其中上调差异表达基因有 1 418 个,下调差异表达基因有 383 个,见图 1。

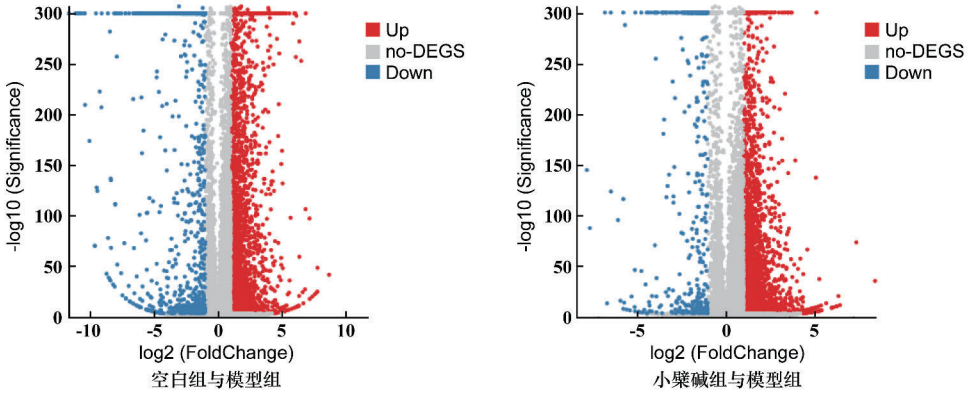



**图 1** 空白组、模型组与小檗碱组差异表达基因火山图

**1.2 差异表达基因的 GO 富集分析** 图 2 显示了差异表达基因的 GO 富集分析，差异表达基因主要参与的生物过程主要包括 cellular process，immune system process，metabolic process，response to stimulus，developmental process 等；其次，差异表达基因主要参与的分子功能主要包括 catalytic activity，molecular transducer activity，signal transducer activity，transporter activity，structural molecule activity 等；最后，差异表达基因主要参与的细胞组成主要包括 cell，membrane，membrane part，synapse part，extracellular region 等，其中上调差异表达基因和下调差异表达基因在 GO 的 3 个类别中基本一致。

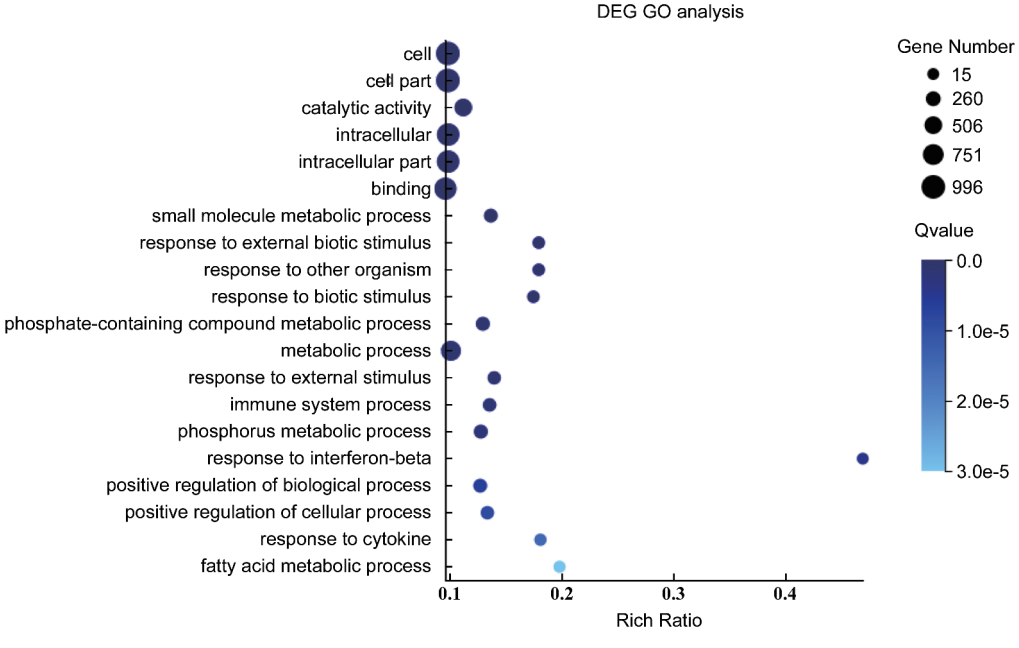



**图 2** 差异表达基因的 GO 富集分析

**1.3 差异表达基因的 KEGG PATHWAY 富集分析** 图 3 显示了差异表达基因的 KEGG 通路富集，其中差异表达基因参与通路共有 44 条，发现其中有 25 条通路与炎症相关，主要包括 TNF signaling pathway，IL-17 signaling pathway，fatty acid metabolism，FoxO signaling pathway，PPAR signaling pathway，MAPK signaling pathway，HIF-1 signaling pathway，inflammatory bowel disease（IBD），NF-kappa B signaling pathway，toll-like receptor signaling pathway，Insulin resistance，type I diabetes mellitus，AMPK signaling pathway，PI3K-Akt signaling pathway，insulin signaling pathway，non-alcoholic fatty liver disease（NAFLD），type II diabetes mellitus 等。

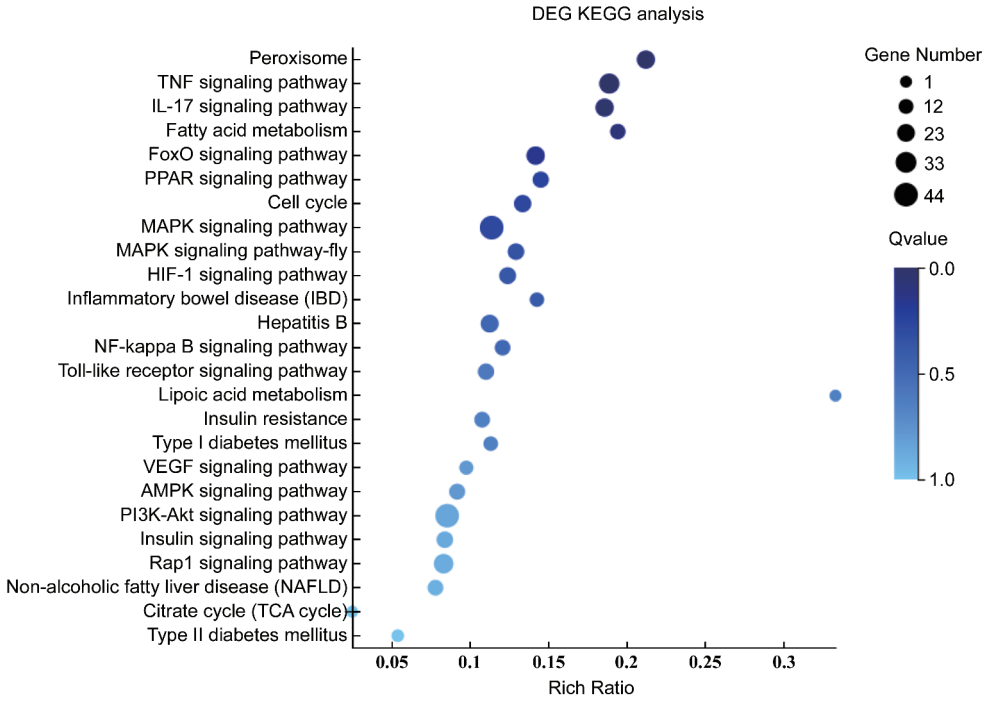



**图 3**　差异表达基因 KEGG 通路富集分析

**1.4　筛选相关差异表达基因**　通过上述的 GO 分析和 KEGG Pathway 分析，我们筛选了与糖尿病相关的差异表达蛋白如表 4 所示。

**表 4**　与糖尿病相关的差异表达基因

| 基因 ID | 其他基因 ID | 差异倍数 | 趋势 |
|---|---|---|---|
| 12304 | Pdia4 | −1.098 273 1 | down |
| 16409 | Itgam | −1.827 877 309 | down |
| 22027 | Hsp90b1 | −1.113 368 557 | down |
| 54683 | Prdx5 | −2.073 514 663 | down |
| 71853 | Pdia6 | −1.042 921 813 | down |
| 17869 | Myc | −1.216 276 53 | down |
| 14283 | Fosl1 | −1.607 442 598 | down |
| 16153 | Il10 | −1.881 629 705 | down |
| 20296 | Ccl2 | −3.919 053 729 | down |
| 64898 | Lpin2 | 1.512 516 019 | up |
| 18709 | Pik3r2 | 2.073 640 172 | up |

**1.5　差异表达基因相互作用图**　运用 STRING 在线分析，输入表 4 中与糖尿病相关的 11 个差异表达基因，其相互作用图如图 4，从图中我们可以看到众多节点基因都有相互作用关系，从图中我们可以得出，节点为 11，边为 11，平均节点度为 2，平均局部聚类系数为 0.727，PPI 富集 *P* 值为 0.002 39。

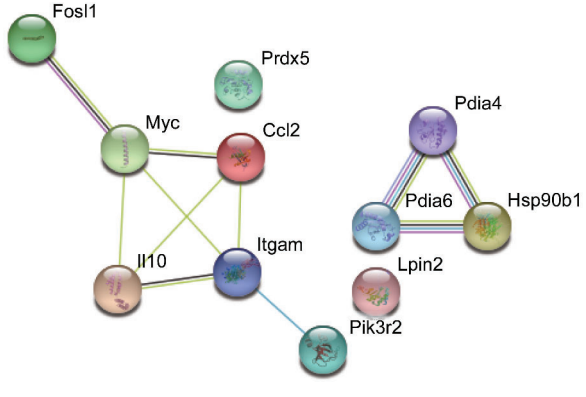



**图 4**　差异表达基因相互作用图

## 2　Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞的蛋白质组学分析

**2.1　LC-MS 总离子流图以及差异表达蛋白的筛选**　从各组 LC-MS 总离子流图可以看出（见图 5），细胞蛋白样品制备较好，被分解为小分子肽段，LC-MS 峰型图较好，不同组峰型图有差别，但出峰时间基本一致，未见杂质峰。经过分析得到小檗碱组与模型组差异表达蛋白且与空白组趋势一致的共 83 个差异表达蛋白，其中上调差异表达蛋白 2 个，下调差异表达蛋白 81 个。

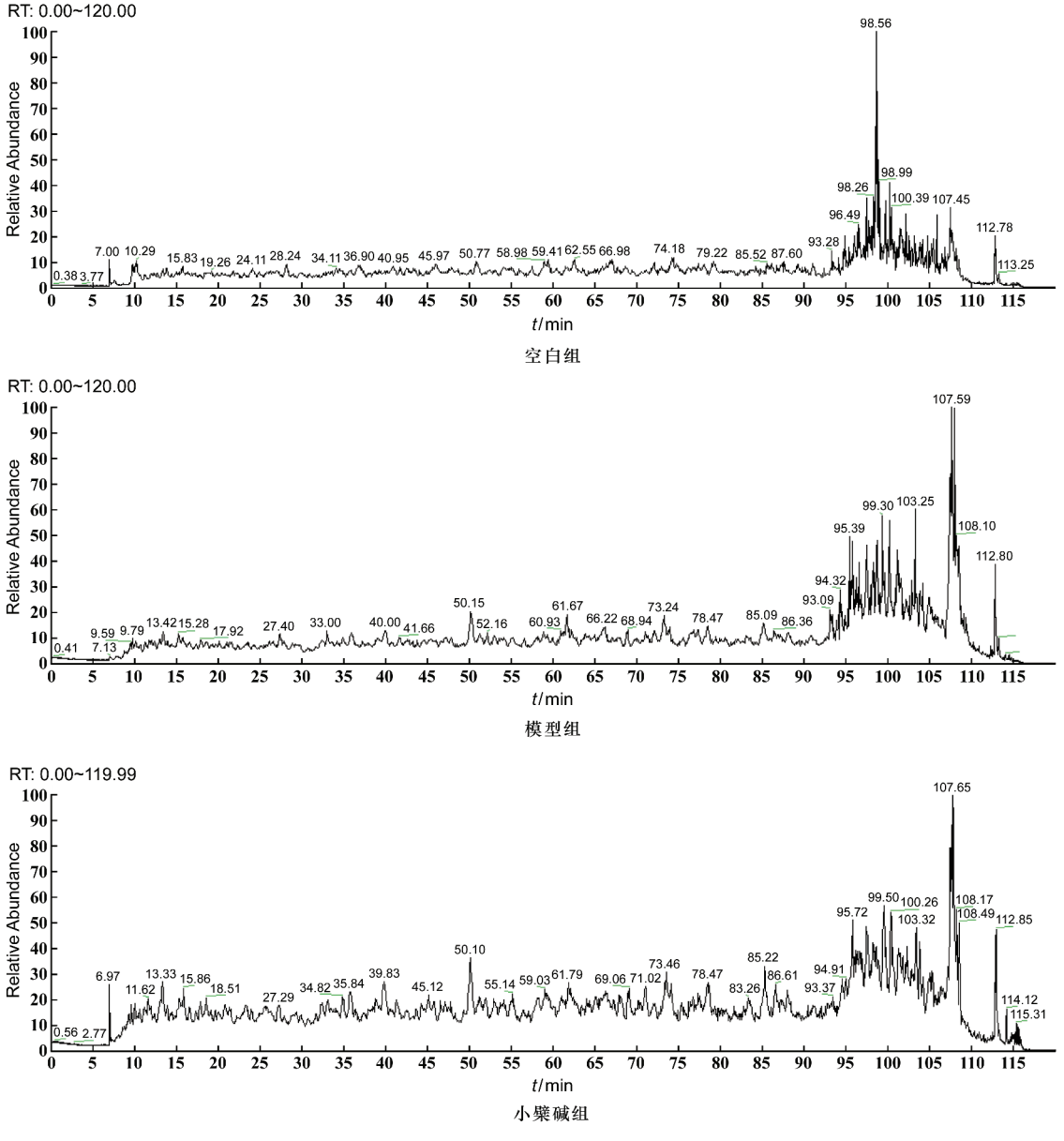



**图 5** 各组 LC-MS 总离子流图

**2.2 差异表达蛋白的 GO 富集分析** 图 6 显示了差异表达蛋白的 GO 分析，差异表达蛋白参与的生物过程主要包括 protein peptidyl-prolyl isomerization，regulation of multi-organism process，regulation of symbiosis，encompassing mutualism through parasitism，catabolic process 等。由此可见，参与了众多的代谢过程，提示小檗碱在炎症模型中具有代谢调节作用；其次，差异表达蛋白参与的分子功能主要包括 cyclosporin A binding，peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity，binding，isomerase activity，enzyme binding 等。在 GO 的分子功能分类中，主要与核酸和酶结合有关，参与了各种核酸和酶结合过程；随后，差异表达蛋白参与的细胞组成主要包括 intracellular part，organelle part，cytoplasm，keratin filament，intracellular organelle part 等。在 GO 的细胞组成分类中，与细胞各部分紧密相关，由此可见，小檗碱在炎症模型很大程度上影响了细胞各部分活动。

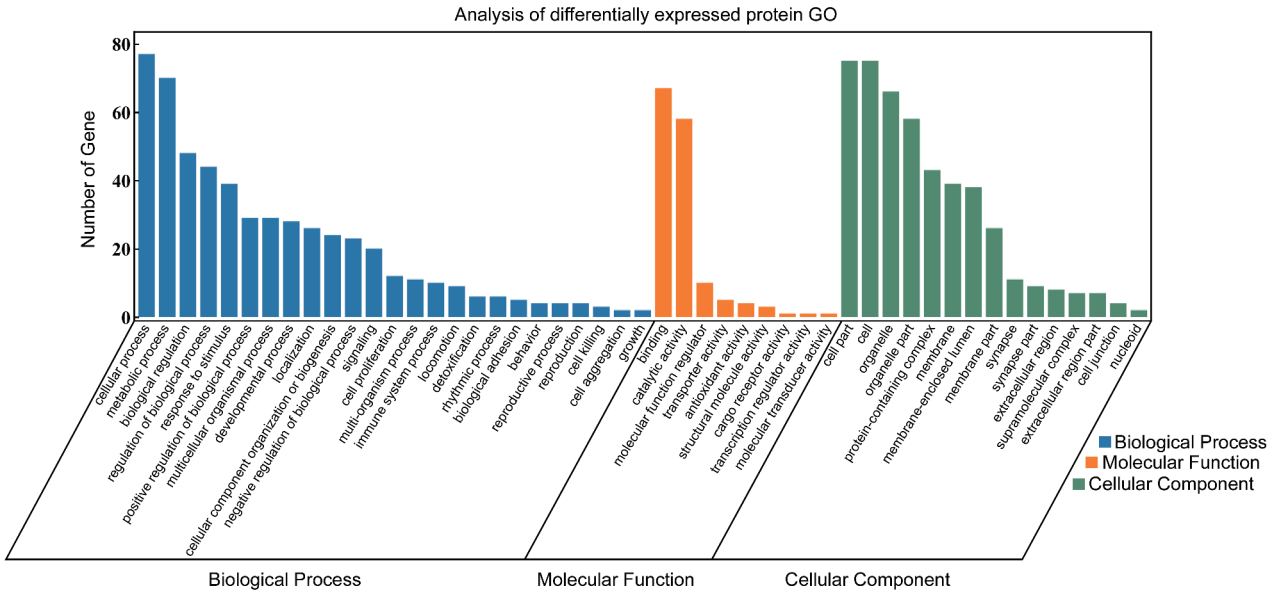



**图 6** 差异表达蛋白的 GO 富集分析

**2.3 差异表达蛋白的 KEGG PATHWAY 富集分析** 图 7 显示了差异表达蛋白 KEGG 通路富集分析，差异表达蛋白参与的信号通路有 38 条，发现其中 13 条与炎症相关，主要包括 proteasome，metabolic pathways，protein processing in endoplasmic reticulum，insulin resistance，carbon metabolism，arginine and proline metabolism，amino sugr and nucleotide sugar metabolism，regulation of actin cytoskeleton，alanine，aspartate and glutamate metabolism，non-alcoholic fatty liver disease（NAFLD），citrate cycle（TCA cycle），rap1 signaling pathway，cGMP-PKG signaling pathway 代谢通路。

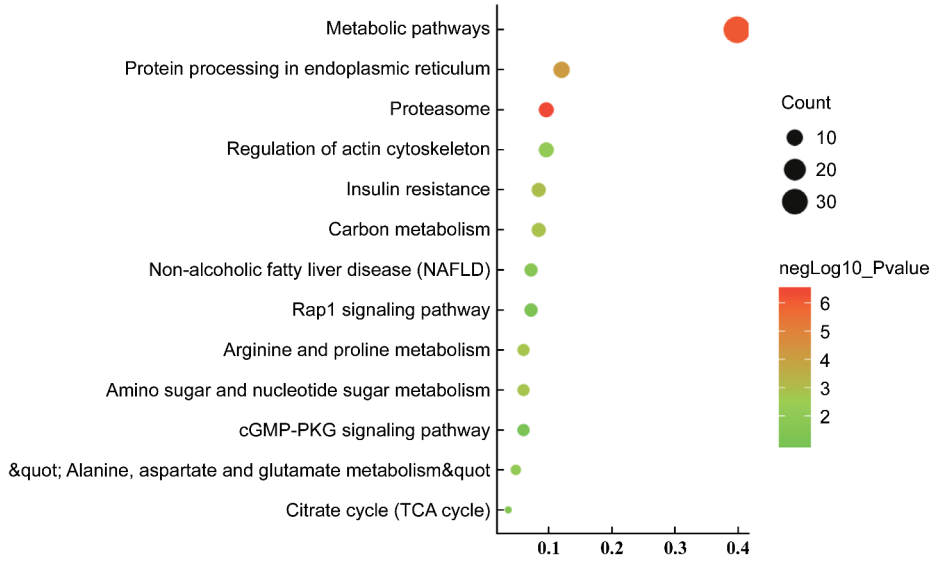



**图 7** 差异表达蛋白的 KEGG 通路富集分析

**2.4 筛选相关差异表达蛋白** 通过上述的 GO 分析、KEGG Pathway 分析与蛋白之间相互作用，我们筛选了与糖尿病相关的差异表达蛋白如表 5 所示。

**表 5** 与糖尿病相关的差异表达蛋白

| 蛋白 ID | 蛋白 | 描述 | 肽段 | 碎片 | 撞击 | 差异倍数 | 趋势 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P08113 | Hsp90b1 | ENPL_MOUSE Endoplasmin OS = Mus musculus GN = Hsp90b1 PE = 1 SV = 2 | 11 | 12 | 190 | 0.561 | down |
| Q922R8 | Pdia6 | PDIA6_MOUSE Protein disulfide_isomerase A6 OS = Mus musculus GN = Pdia6 PE = 1 SV = 3 | 2 | 3 | 70 | 0.551 | down |
| P99029 | Prdx5 | PRDX5_MOUSE Peroxiredoxin_5_ mitochondrial OS = Mus musculus GN = Prdx5 PE = 1 SV = 2 | 2 | 3 | 29 | 0.406 | down |
| P08003 | Pdia4 | PDIA4_MOUSE Protein disulfide_isomerase A4 OS = Mus musculus GN = Pdia4 PE = 1 SV = 3 | 1 | 1 | 4 | 0.495 | down |
| P05555 | Itgam | ITAM_MOUSE Integrin alpha_M OS = Mus musculus GN = Itgam PE = 1 SV = 2 | 1 | 1 | 2 | 0.143 | down |
| P42225 | Stat1 | STAT1_MOUSE Signal transducer and activator of transcription 1 OS = Mus musculus GN = Stat1 PE = 1 SV = 1 | 1 | 1 | 2 | 0.499 | down |
| Q9D0F9 | Pgm2 | PGM1_MOUSE Phosphoglucomutase_1 OS = Mus musculus GN = Pgm1 PE = 1 SV = 4 | 1 | 1 | 1 | 0.402 | down |
| P22437 | Ptgs1 | PGH1_MOUSE Prostaglandin G/H synthase 1 OS = Mus musculus GN = Ptgs1 PE = 1 SV = 1 | 1 | 1 | 15 | 0.267 | down |
| P29477 | Nos2 | NOS2_MOUSE Nitric oxide synthase_ inducible OS = Mus musculus GN = Nos2 PE = 1 SV = 1 | 1 | 2 | 2 | 0.112 | down |
| P60710 | Actb | ACTB_MOUSE Actin_ cytoplasmic 1 OS = Mus musculus GN = Actb PE = 1 SV = 1 | 57 | 59 | 1 139 | 0.639 | down |

**2.5 差异表达蛋白相互作用图** 运用 STRING 在线分析,输入表 5 中与糖尿病相关的 10 个差异表达蛋白,其蛋白相互作用图如图 8。从图中我们可以看到众多节点蛋白都有相互作用关系,节点为 10,边为 9,平均节点度为 1.8,平均局部聚类系数为 0.7,PPI 富集 *P* 值为 0.001 15。

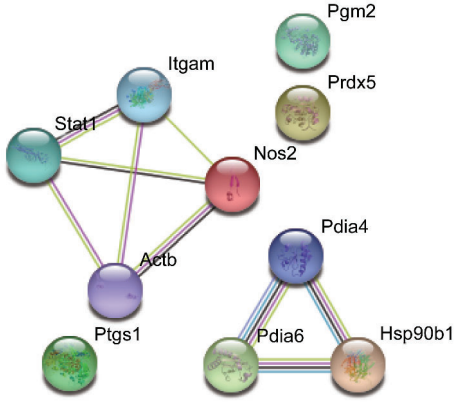



**图 8** 差异表达蛋白相互作用图

## 3 共同表达差异蛋白和基因的 qRT-PCR 结果

共同差异表达蛋白和基因的 PPI 图见图 9。为了进一步验证 mRNA 转录水平与蛋白表达水平的对应关系,采用实时荧光定量 PCR 对 5 个 *cos-degs-deps* 基因进行了验证。图 10 可以看出,与空白组比较,模型组基因 *Pdia4*,*Itgam*,*Hsp90b1*,*Prdx5*,*Pdia6* 上调;与模型组比较,小檗碱组基因 *Pdia4*,*Itgam*,*Hsp90b1*,*Prdx5*,*Pdia6* 下调。此外,蛋白的表达趋势一样,被 iTRAQ 验证,证明 iTRAQ 数据是可靠的。

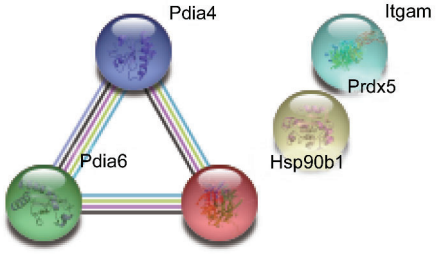
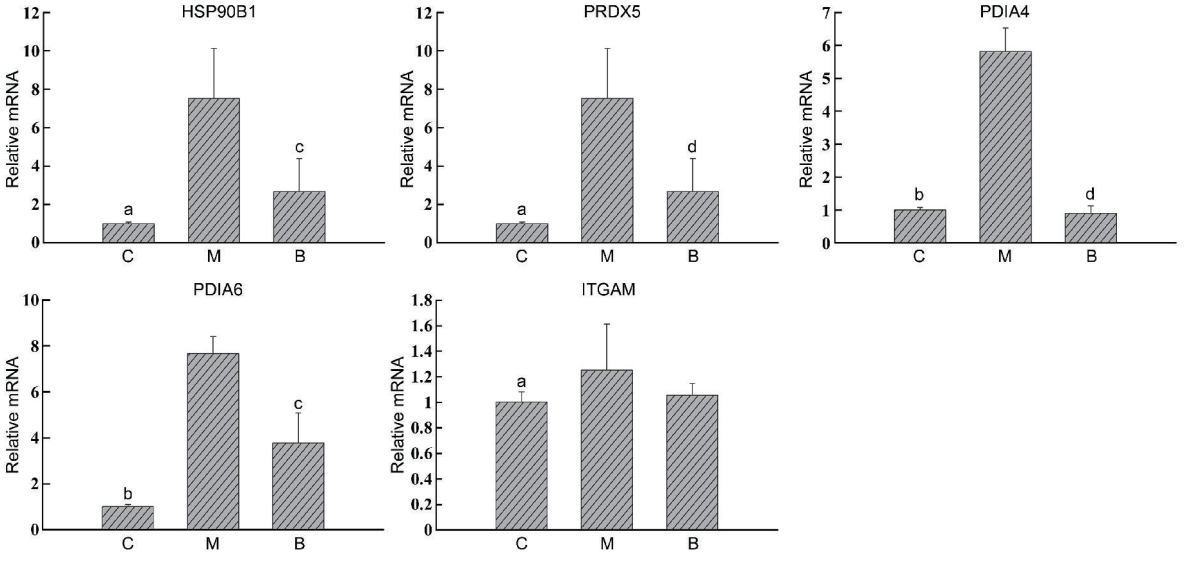



**图 9** 共同差异表达蛋白和基因的 PPI 图




C:空白组;M:模型组;B:小檗碱组;$n=3$,模型组与空白组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;
模型组与小檗碱组比较,c:$P<0.05$,d:$P<0.01$

**图 10** 共同表达差异蛋白和基因的 PCR 图

## 讨　论

转录组学是指特定细胞在某一功能状态下能全面表达的基因总和,基于新一代测序技术揭示生物个体在特定组织和特定时期的全局基因的表达情况,打破以往对细胞特异性质研究的局限性,利用整体性研究基因水平表达[13]。通过模型组与小檗碱组相比较,一共得到 11 个差异表达基因。RAW264.7 细胞通过 LPS 诱导造成炎症模型,作用于 TOLL 样受体,激活 Toll 样受体信号途径,TLR4 激活 NF-κB 信号途径和 MAPK 信号途径,从而释放炎症因子 IL-10,TNF-α 和 IL-1β[14],而小檗碱能有效抑制炎症反应,调节免疫应答,通过下调炎症因子 IL-10 来达到抗炎作用,而 TLR4 可以诱导分化 PI3K 的活化,继而导致 NF-KB 的活化,激活 NF-κB 信号途径从而改善糖尿病大鼠的胰岛素抵抗和血脂代谢[15],小檗碱可抑制肝脏的糖异生和脂肪生成,并通过 TLR4 非依赖性 JNK/NF-KB 途径诱导 β 细胞增殖,提高细胞活力,减轻 β 细胞损伤,从而达到抗糖尿病的作用[23]。实验研究表明[16],脂多糖(LPS)激活 Toll-like 受体 TLR4 显著抑制小鼠脂肪 LipinRNA 和蛋白质水平,并伴随有炎症 的发生。并且 *LPIN 2* 基因与体重指数高的 2 型糖尿病相关,在肝脏中大量表达,影响肝脏 TAG 合成,而小檗碱可抑制脂肪细胞分化,在改善胰岛素抵抗的同时能够减轻体重,其降糖作用不依赖于胰岛素的释放[17]。通过转录组学研究,我们发现 RAW264.7 细胞通过 LPS 诱导造成炎症模型,小檗碱可能通过阻断 Toll 样受体信号途径和 NF-KB 信号途径从而进一步使 *IL-10* 基因下调,*Pik3r2* 和 *LPIN 2* 基因上调来达到抗炎作用,进一步改善异常代谢和胰岛素抵抗以及减少炎症反应而达到抗糖尿病作用。

蛋白质组学是在整体水平上研究蛋白质组成及其动态变化的一门新兴科学,从而有利于从整体方面揭示糖尿病作用机制以及小檗碱的作用机制[18]。通过模型组与小檗碱组相比较找出 10 个下调差异表达蛋白与糖尿病相关。PTGS1 又称为环氧化酶 1(COX1),是具有环氧合酶和过氧化物酶活性的双重酶,朱秋爽等[19]报道通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞,TNF-α 的分泌水平明显升高,槲皮苷通过下调 COX-2/5-LO 活性,减少炎症介质的分泌,达到抗炎的效果,而小檗碱下调 PTGS1。NOS2 是诱导型一氧化氮合酶,能够催化大量 NO 产生导致细胞结构的氧化损伤,文献中口服山柰酚能够降低 NOS2 水平,降低炎症因子 TNF-α,IL-1β,IL-6 和 ICAM-1 过度分泌,负调控 Rap1 信号通路和 cGMP-PKG 信号通路[20]。而小檗碱可以通过下调 db/db 小鼠肝脏中的 cAMP/GP 信号通路,缓解其肝糖原的异常代谢,从而达到降低糖尿病小鼠血糖水平,改善糖代谢紊乱的症状[21]。通过蛋白质组学研究,我们发现 RAW264.7 细胞通过 LPS 诱导造成炎症模型,小檗碱可能通过阻断 Rap1 信号通路和 cGMP-PKG 信号

通路从而进一步使 PTGS1 和 NOS2 蛋白下调来达到抗炎作用,进一步减少炎症因子释放和缓解异常代谢从而改善糖尿病。

通过筛选找出共同差异表达蛋白和基因有 5 个,分别是 *Hsp90b1*, *Pdia6*, *Prdx5*, *Pdia4* 和 *Itgam*。据 Hong 等[22]报道,热休克蛋白 HSP 响应于急性应激而被激活以发挥细胞保护作用,而热休克蛋白 90 kDa β 成员 1(HSP90B1)是 Toll 样受体和整联蛋白(也称为 GP96)的主要分子伴侣,慢性 CORT 暴露在鸡肝中引起炎症和纤维化,与 HSP 表达的显著调节有关,HSP 的表达在 mRNA 水平上显著上调,而文中给予小檗碱后,HSP90B1 显著下调。大量文献表明[23],PDIA 家族在发炎的结肠黏膜中 PDIA4 的 mRNA 显著增加,同时,GSPs 通过减缓内质网应激相关分子抑制氧化应激诱导的 PDIA4 mRNA 表达上调,从而起到减轻内质网氧化损伤的作用。Itgam 是整合素,又称为 CD11b,是参与免疫相关的一种趋化性炎症因子,Faridi 等[24]发现早期炎症有关的 TLR4,ITGAM 和 C5AR2 在围产期奶牛中表达较低,通过 LPS 刺激 TLR4,ITGAM,COX2 的表达,这些基因的表达在 LPS 刺激后会增加,因为 ITGAM(编码 CD11b)表达的减少使正确的嗜中性粒细胞定位和吞噬作用复杂化并可能增加炎症失衡的风险,因为它被认为在正常炎症过程中具有抗炎作用。Prdx5 是过氧化物酶原-5,是抗氧化剂基因,Graham 等[25]证明参与抗氧化剂反应抑制树突状细胞中 Toll 样受体(TLR)诱导的细胞因子产生,而 Prdx5 则是减轻炎症性细胞因子产生所必需的。

本研究发现,小檗碱可能是通过减少炎症因子释放,同时减少 *Hsp90b1*, *Pdia6*, *Prdx5*, *Pdia4*, *Itgam*, *PTGS1*, *NOS2* 和 *IL-10* 及增加 *Pik3r2* 和 *LPIN 2* 基因的生成来达到抗炎作用,通过参与胰岛素抵抗通路、MAPK 信号途径、NF-κB 信号途径和 Toll 样受体信号途径而达到抗慢性炎症作用,进一步缓解异常代谢和胰岛素抵抗以及减轻内质网氧化损伤来治疗糖尿病的作用。本文联合转录组学和蛋白质组学对小檗碱通过抗炎作用进而达到抗糖尿病的作用机制进行了分析和解释,为今后继续研究小檗碱提供了理论依据。

## [ 参 考 文 献 ]


[1] LIANG YZ, LI JJH, XIAO HB, *et al*. Identification of stress-related microRNA biomarkers in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Diabetes*, 2020, 12(9): 633 – 644.

[2] 郭立新. 糖尿病的流行势态和应对策略[J]. 中国临床保健杂志, 2020, 23(4): 433 – 436.

[3] 洪小媛,潘芸芸,陈吉生. 阿卡波糖仿制药与原研药治疗 2 型糖尿病的临床综合评价[J]. 今日药学,2020,30(10):715 – 720.

[4] 袁晓环,张哲,王威,等. 姜黄素类似物的制备及其抑制 2 型糖尿病小鼠肝脏脂肪变性的活性[J]. 中国医药工业杂志,2017,48(2):179 – 183,194.

[5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292 – 344.

[6] 韩雨薇,李彩娜,环奕,等. 小檗碱配伍水苏糖对糖尿病小鼠糖脂代谢及肠道菌群的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(12): 1121 – 1124.

[7] XU LY, ZHAO WJ, WANG DM, *et al*. Chinese medicine in the battle against obesity and metabolic diseases[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 850.

[8] HAN YB, MIAO T, WANG XX, *et al*. Berberine ameliorates obesity-induced chronic inflammation through suppression of ER stress and promotion of macrophage M2 polarization at least partly via downregulating lncRNA Gomafu[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: doi: 10.1016/j.intimp.2020.106741.

[9] MENG W, ZHANG JJ, ZHAO HY, *et al*. Berberine combined with cyclosporine A alleviates acute graft-versus-host disease in murine models[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: doi: 10.1016/j.intimp.2020.106205.

[10] PIERCE A, UNWIN RD, EVANS CA, *et al*. Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases[J]. *Mol Cell Proteom*, 2008, 7(5): 853 – 863.

[11] 杨欣, 李亚辉, 李专, 等. 现代的科学技术与方法在《中药药理学》药性研究中的应用[J]. 教育教学论坛, 2019(48): 214 – 215.

[12] ZHANG CH, XIAO Q, SHENG JQ, *et al*. Gegen Qinlian Decoction abates nonalcoholic steatohepatitis associated liver injuries via anti-oxidative stress and anti-inflammatory response involved inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: doi: 10.1016/j.biopha.2020.110076.

[13] CARR HL, TURNER JD, MAJOR T, *et al*. New developments in transcriptomic analysis of synovial tissue[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: doi: 10.3389/fmed.2020.00021.

[14] MANMONTRI B, SARIAHMETOGLU M, DONKOR J, *et al*. Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatic lipin-1 expression, and insulin Acts antagonistically[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(5): 1056 – 1067.

[15] PANG B, ZHAO LH, ZHOU Q, *et al*. Application of berberine on treating type 2 diabetes mellitus[J]. *Int J Endocrinol*, 2015, 2015: 905749.

[16] TSUCHIYA Y, TAKAHASHI N, YOSHIZAKI T, *et al*. A Jak2inhibitor, AG490, reverses lipin-1suppression by TNF-alpha in3T3-L1adipocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(2): 348 – 352.

[17] GRIMSEY N, HAN GS, O'HARA L, *et al*. Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(43): 29166 – 29174.

[18] 陶颖君,吴洁,刘畅. 蛋白质组学在糖尿病及其并发症中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(3): 368 – 373.

[19] 朱秋爽,梅仲秋,刘涛,等. 新疆圆柏有效成分抑制 COX-1/2、5-LO 作用及对脂多糖诱导 $RAW_{264.7}$ 细胞释放 TNF-α 的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(2): 295 – 296.

[20] LIU Y, XIAO J, ZHAO Y, *et al*. microRNA-216a protects against human retinal microvascular endothelial cell injury in diabetic retinopathy by suppressing the $NOS_2$/JAK/STAT axis[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 115: doi: 10.1016/j.yexmp.2020.104445.

[21] 马林, 刘小翠, 邓斌. 小檗碱通过影响糖原结构调节肝糖代谢研究[J]. 中草药, 2020, 51(16): 4259 – 4265.

[22] HONG F, WU BX, LI ZH. Molecular regulation of macrophages in unleashing cancer-related inflammation[J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(1): e27659.

[23] NEGRONI A, PRETE E, VITALI R, *et al*. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response are involved in paediatric inflammatory bowel disease[J]. *Dig Liver Dis*, 2014, 46(9): 788 – 794.

[24] FARIDI MH, KHAN SM, ZHAO WP, *et al*. CD11b activation suppresses TLR-dependent inflammation and autoimmunity in systemic lupus erythematosus[J]. *J Clin Investig*, 2017, 127(4): 1271 – 1283.

[25] GRAHAM DB, JASSO GJ, MOK A, *et al*. Nitric oxide engages an anti-inflammatory feedback loop mediated by peroxiredoxin 5 in phagocytes[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(4): 838 – 850.


编辑:杨青/接受日期:2020 – 11 – 02