

基于转录组学探索蒸制黄精多糖防治血虚模型小鼠的作用机制

王娟¹, 王芙蓉¹, 彭昕^{2*}, 沈湛云¹, 朱智彪³, 范小玲³(1. 浙江药科职业大学中药学院, 浙江 宁波 315503; 2. 浙江中医药大学附属宁波市中医院, 浙江 宁波 315010; 3. 浙江三溪堂中药有限公司, 浙江 义乌 322002)

摘要: 目的 采用转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)探索蒸制黄精多糖防治小鼠血虚证(blood deficiency syndrome, BDS)的作用机制。方法 将小鼠随机分为5组(每组10只),即正常组、模型组、黄精多糖组(0.1, 0.4 g·kg⁻¹)、当归补血口服液阳性药组。采用乙酰苯肼和环磷酰胺诱导建立BDS小鼠模型。连续给药14 d后,测定小鼠血常规、体质量和体温;采用RNA-seq技术对BDS小鼠肝组织进行转录组测序分析,筛选出黄精多糖治疗BDS的相关差异基因,对其进行功能注释和富集分析,筛选出黄精多糖治疗血虚的基因表达通路,并采用定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)进行实验验证。结果 与模型组比,黄精多糖(0.4 g·kg⁻¹)可升高血虚小鼠红细胞、白细胞、血红蛋白、血小板、红细胞平均血红蛋白浓度等血常规指标($P<0.01$),恢复小鼠体质量和体温($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。转录组学分析结果显示其作用机制主要与造血细胞系、视黄醇代谢、甾类激素生物合成、血小板激活、B细胞受体信号通路、白细胞穿内皮移行等通路相关。qPCR结果表明,与血虚模型组比,黄精多糖(0.4 g·kg⁻¹)可明显促进JAK1、STAT1和GATA1 mRNA的表达水平($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 黄精多糖具有治疗BDS的作用,其治疗BDS的关键差异基因主要与恢复造血功能、调节激素和免疫功能等相关。黄精多糖治疗BDS可能通过干预JAK1/STAT1信号通路发挥作用。

关键词: 黄精多糖; 血虚; 转录组学; JAK1/STAT1信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)03-0324-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223214

引用本文: 王娟, 王芙蓉, 彭昕, 等. 基于转录组学探索蒸制黄精多糖防治血虚模型小鼠的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(3): 324-331.

Explore the Mechanism of Steam-processed *Polygonatum Sibiricum* Polysaccharides in Prophylaxis and Treatment of Blood Deficiency Mice Model Based on Transcriptomics

WANG Juan¹, WANG Furong¹, PENG Xin^{2*}, SHEN Zhanyun¹, ZHU Zhibiao³, FAN Xiaoling³(1. School of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315503, China; 2. Zhejiang Chinese Medicine University Affiliated Ningbo Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo 315010, China; 3. Zhejiang Sanxitang Chinese Medicine Co., Ltd., Yiwu 322002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanism of steam-processed *Polygonatum sibiricum* polysaccharides(SPSP) in prophylaxis and treatment of mice with blood deficiency syndrome(BDS) by RNA sequencing(RNA-seq) technology. **METHODS** The mice were randomly divided into five groups(10 mice in each group), namely normal group, model group, SPSP groups(0.1, 0.4 g·kg⁻¹), Danggui Buxue oral liquid(DOL) group. BDS model was induced in mice by acetylphenyl-hydrazine and cyclophosphamide. Blood routine, body weight and body temperature were tested after a consecutive administration for 14 d. The differential expressed genes(DEGs) related to anti-BDS by SPSP were screened through the transcriptome sequencing of the hepatic tissue in BDS mice. Functional annotation and enrichment analysis were performed to screen out the gene expression signaling pathways related to the treatment of SPSP on BDS mice. Quantitative polymerase chain reaction(qPCR) was used to verify the experiment. **RESULTS** Compared with the model group, SPSP(0.4 g·kg⁻¹) could elevate the blood routine indexes such as red blood cell, white blood cell, hemoglobin, platelet, mean corpuscular hemoglobin concentration($P<0.01$), and reverse the body weight and body temperature to normal($P<0.01$ or $P<0.05$). The result of transcriptomic analysis showed that the underlying mechanism was mainly related to hematopoietic cell line, retinol metabolism, steroid hormone biosynthesis, platelet activation, B cell receptor signaling pathway, and leukocyte transendothelial migration, etc. The result of qPCR showed that SPSP(0.4 g·kg⁻¹) could elevate the expression of JAK1, STAT1 and GATA1 mRNA ($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSION** SPSP has therapeutic effects on BDS. The key DEGs in the treatment of BDS by SPSP are mainly related to the restoration of hematopoietic function, regulation of hormone and immune function. The mechanism of SPSP on treatment of BDS might be the regulation of JAK1/STAT1 signaling pathway.

KEYWORDS: *Polygonatum sibiricum* polysaccharides; blood deficiency; transcriptomic; JAK1/STAT1 signaling pathway

基金项目: 浙江省药品监督管理与产业发展课题(ZYH2020004); 义乌市科研计划项目(20-3-124); 宁波市自然科学基金项目(202003N4334, 2022J194)

作者简介: 王娟, 女, 博士, 副教授 E-mail: juan_wangli@163.com *通信作者: 彭昕, 女, 博士, 教授 E-mail: px4142@163.com

血虚证 (blood deficiency syndrome, BDS) 是一种器官营养不良、血液功能障碍的病理状态, 其与现代医学中的贫血症状相似, 临床常以血红蛋白和血细胞含量较低作为主要诊断指标^[1]。临床发现, 术后及产后慢性出血患者, 月经过多的女性通常会有类似的血虚症状^[2]。中医认为血虚与失血过多, 或脾胃虚, 或气虚生血不足有关, 气血不足是血虚的首要因素。

黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 属于“药食同源”中药, 归脾、肺、肾经, 具有补气养阴, 健脾, 润肺, 益肾之功效^[3]。临床可用于治疗虚弱、疲劳、咳嗽、消化不良、贫血、头发过早灰白、抗衰老等^[3]。目前, 已从黄精中分离得到了多种活性成分, 主要包括糖类、皂苷、黄酮、蒽醌、生物碱、挥发油、氨基酸等^[4]。其中多糖类成分受到研究者的广泛关注, 其主要有抗肿瘤^[5]、增强免疫^[6]、抗氧化^[7]、调节血糖和血脂^[8]、防治肺部疾病^[9]等作用。另有研究表明黄精中果糖、葡萄糖和蔗糖的混合物具有补血活性^[10]。

为了临床安全有效地应用, 黄精需要蒸制以消除麻舌感等不良反应。已有研究表明生品黄精多糖和酒制黄精多糖中的单糖类型和摩尔比有明显差异, 且体内外研究均表明酒制黄精多糖的免疫调节活性显著优于生品黄精多糖^[11]。临床和实验研究表明, 蒸制过的黄精可增强“益气补血, 补脾、肝、肾”的作用^[12]。然而蒸制黄精益气补血的分子机制尚未明确。目前, 转录组测序 (RNAsequencing, RNA-seq) 技术为深入探索贫血或血虚分子机制提供了重要支持。有研究采用 RNA-seq 技术揭示了再生障碍性贫血的发病对 P53 依赖通路、造血、血管发育和细胞凋亡起着至关重要的作用^[13]; Borchert 等^[14]通过 RNA-seq 发现溶血性贫血的发病与炎症反应, 造血, 淋巴细胞功能和红细胞再生有关。阿胶在中国被用来防治贫血已有两千多年历史, RNA-seq 研究显示阿胶防治贫血的作用机制与造血细胞有关细胞系, 破骨细胞分化等相关^[15]。

综上, 本研究采用 RNA-seq 技术探索九蒸九制黄精多糖改善乙酰苯肼 (acetylphenyl-hydrazine, APH) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 联合诱导的血虚证模型小鼠的作用和相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

蒸制黄精由浙江三溪堂中药有限公司提供,

经浙江中医药大学附属宁波市中医院彭昕教授鉴定为百合科植物黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red.) 的干燥根茎; 注射用 CTX(德国 Baxter Oncology Gmb 公司, 批号: 9K345A); APH(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: L1705044); 当归补血口服液 (郑州市协和制药厂, 批号: 011905171); Trizol reagents(美国 Invitrogen 公司, 批号: 15596-026); cDNA 第一链合成试剂盒 (批号: RR036B)、One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR Kit II(批号: RR086B) 均购自日本 TaKaRa 公司。所有实验用有机溶剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

NovaSeq 6000 型测序仪 (美国 Illumina 公司); 2100 Bioanalyzer(美国安捷伦公司); ND-2000 分光光度计、Thermo 全自动匀浆器均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 荧光定量 PCR 循环仪 (ABI Step one plus Real time-PCR 系统, 美国应用系统生物公司); SYSMEX XT1800i 血液分析仪 (日本希森美康公司)。

1.3 方法

1.3.1 黄精多糖的制备与鉴定 称取 500 g 蒸制黄精置于纯化水中浸泡 12 h, 物料比为 1:10, 然后 80 °C 回流提取 2 次, 每次 1.5 h。将 2 次提取液合并, 60 °C 旋转蒸发浓缩成固液比为 1:1 的混悬液。在悬浮液中慢慢加入无水乙醇, 使乙醇最终浓度>80%, 然后 4 °C 冰箱放置 24 h, 得到沉淀。通过离心收集沉淀, 并在 80 °C 水浴加热蒸发以去除残留的乙醇。而后将沉淀溶解在适量的超纯水中, 并用 Sevag 试剂 (正丁醇: 氯仿=1:4) 脱蛋白。脱蛋白后的溶液用流动蒸馏水透析 72 h(截留分子量 8 000 Da), 然后用紫外分光光度计测定脱蛋白样品, 在 280 nm 处无吸光度峰。最后通过真空冷冻干燥得到黄精多糖样品, 用于后续实验。前期已对该黄精多糖结构进行鉴定, 蒸制后黄精多糖主要由半乳糖、半乳糖醛酸、甘露糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、盐酸氨基葡萄糖以 49.7%, 25.6%, 12.7%, 6.2%, 3.2%, 2.3% 和 0.3% 的摩尔比组成^[16]。

1.3.2 动物、造模与给药 Balb/c 小鼠 50 只, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 购自浙江省医学科学院。实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2019-0002。所有动物于 (24±2) °C, 湿度 60%~70%,

12 h 明暗交替的环境中适应性饲养，期间自由饮食。1 周后开始实验，随机分为正常组、模型组、黄精多糖低剂量 ($0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和高剂量组 ($0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)，阳性药当归补血口服液组 ($12 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) (依据中国药典 2020 年版中黄精的给药剂量和黄精多糖的提取率，设置本实验中黄精多糖的给药剂量为低剂量 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，高剂量组 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)，每组 10 只小鼠。除正常组注射等容量生理盐水外，其他各组小鼠分别在给药的第 2，5 天皮下注射 APH $20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，从第 5 天起，每日腹腔注射 CTX $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，连续 4 d，复制血虚动物模型^[17]。各组动物于实验第 1 天开始给药，除正常组和模型组给予等容量蒸馏水外，其他各组小鼠分别给予相应剂量药物，连续给药 14 d。末次给药后 1 h 量体温、称体质量，眼眶取血，解剖取肝、脾组织。

1.3.3 血常规测定 采集样本前小鼠禁食、不禁水 12 h，称体质量，各组小鼠用戊巴比妥钠进行麻醉，眼眶取血后置于 EDTA·K2 抗凝管中抗凝，测定血常规。

1.3.4 体温、体质量增长率测定 在第 14 天给药 1 h 后，用电子温度计测量小鼠的体温。各组小鼠在第 1 天和第 14 天分别称量体质量。取血后立刻取脾脏称重。体质量增长率 (%) = (第 14 天体质量 - 第 1 天体质量) / 第 1 天体质量 $\times 100\%$ 。

1.3.5 转录组测序 在上海崧晴生物科技有限公司完成 RNA 提取、cDNA 文库构建和 RNA 测序。使用 Trizol 试剂从肝脏组织中提取总 RNA。RNA 质量采用 2100 Bioanalyzer 进行评估，并由 ND-2000 分光光度计进行定量测定。使用 TruSeq protrol 进行文库构建，然后在 Illumina Novaseq 平台上进行测序。RNA-Seq 采用 $2 \times 150 \text{ bp}$ 配对测序策略，分为正常组、模型组和黄精多糖组，每组分别设 3 个生物学和技术重复。通过丢弃低质量的 RNA-Seq reads (Q score < 30) 获得高质量数据。

1.3.6 RNA-seq 数据分析 使用 Trimmomatic 0.40 版本对原始测序数据进行过滤，获得高质量的测序数据。采用 Hisat2 软件将高质量测序序列与指定的参考基因组进行比对。使用 Qualimap 软件评估 RNA-seq 的整体质量。然后使用 Featurecount version 2.0.2 对每个基因的读取信息进行每千个碱基的转录每百万映射读取的片段

(fragments per kilobase of exon per million fragments mapped, FPKM) 均质分析。最后采用 R (<https://r-project.org>)^[18] 语言 EdgeR 包分析差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。DEGs 的筛选条件为 Fold Change ≥ 2 ， q 值 ≤ 0.05 。采用 Venny 2.1.0 对组间共有的 DEGs 进行分析。采用分层聚类分析软件，比较模型组与正常组、黄精多糖组与模型组中 DEGs 表达情况。利用 Goatools (<https://github.com/tanghaibao/Goatools>) 和 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/?t=1>) 分别进行基因本体 (gene ontology, GO)、通路注释和富集分析。

1.3.7 qPCR 实验验证 取小鼠肝组织置于 RNA 保护液中。根据试剂盒说明书操作，取 1 mL Trizol 与约 100 mg 肝组织混匀，提取肝组织总 RNA。使用 PrimeScript RT 试剂盒和 cDNA 第一链合成试剂盒将等量的总 RNA 反转录成 cDNA。实验用到的引物序列 (5'-3') 见表 1。PCR 体系为 $20 \mu\text{L}$ ： $2 \times \text{Real time PCR Master Mix (SYBR Green)}$ $10 \mu\text{L}$ ，模板 (cDNA 稀释 10 倍) $1 \mu\text{L}$ ，引物 MIX (F/R 各为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$ ， 0.1% DEPC 水 $7 \mu\text{L}$ 。PCR 程序： 95°C 孵育 5 min，40 个循环 (95°C 15 s， 60°C 20 s， 72°C 40 s)。实验设置 3 次技术重复，以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行定量数据计算。

表 1 关键基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of key genes

基因名称	引物序列	碱基数/bp
JAK1	上游: CCCACTCCTTGATGCCAGTT	112
	下游: ATCATGTCCGTCTTGCTCCG	
STAT1	上游: CGACCCTAAGCGAACTGGAT	99
	下游: GACATGGGAAGCAGGTTGTC	
GATA1	上游: CCAGTTTGTGGATTCTGCC	140
	下游: AGTAGGCCAGTGCTGATGCT	
GAPDH	上游: CCCAGCTTAGGTTTCATCAGG	86
	下游: CCAAATCCGTTACACCGAC	

1.4 统计学分析

实验数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用 LSD-t 检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄精多糖对血虚模型小鼠血常规的影响

与正常组比较，模型组小鼠全血中的红细胞

(red blood cell, RBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB)、血小板 (blood platelet, PLT)、红细胞平均血红蛋白浓度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 均显著降低 ($P<0.01$), 而白细胞 (white blood cell, WBC) 代偿性升高, 表明血虚贫血模型小鼠造模成功。与模型组比, 阳性药当归补血口服液组和黄精多糖组小鼠外周血中 HGB、WBC 和 MCHC 水平均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 提示黄精多糖可改善 APH 和 CTX 导致的血常规指数异常。结果见表 2。

2.2 黄精多糖对血虚模型小鼠外观表现、体质量增长率、体温的影响

与正常组比较, 模型组小鼠整体消瘦, 体质量增长率和体温均明显下降 ($P<0.01$), 唇、爪、尾等部位苍白, 喜扎堆、蜷卧。给予高剂量黄精多糖治疗后小鼠耳朵、尾巴有血色, 行动灵敏, 体质量增长率和体温均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 3。

2.3 RNA-seq 转录组测序分析

2.3.1 测序数据质量评估 本实验所建立的测序文库中, 9 个样品的原始数据在 $5.0\times10^7\sim6.7\times10^7$,

总计 5.28×10^8 。每个 cDNA 文库平均获得 5.9×10^7 个原始数据。经过原始数据过滤后, 约有 5.02×10^8 (95.1%) 的原始数据作为高质量的读段 (clean reads) 被保留下来。9 个样品的 reads 差异较小, 质量值 ≥ 20 的碱基所占百分比 (Q20) $\geq 97.95\%$, 质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比 (Q30) $\geq 94.70\%$, 表明测序结果较好, 可用于后续的分析, 结果见表 4。

2.3.2 DEGs 通过将正常组、模型组和黄精多糖组各基因表达情况比较, 基于 FPKM 分析结果表明共有 1 252 个基因表达有差异, 火山图见图 1。与正常组相比, 模型组小鼠肝脏中有 361 个 DEGs [$|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 、 $q \text{ value} \leq 0.005$] 其中上调基因 329 个, 下调基因 32 个, 见图 2A。与模型组相比, 黄精多糖组中筛选出 107 个 DEGs, 其中 56 个 DEGs 表达上调, 51 个 DEGs 表达下调, 见图 2A。同时, 分析模型组、正常组与黄精多糖组之间的交集 DEGs, 共有 43 个 DEGs 重叠, 见图 2B。对前 20 个调控基因进行热图分析, 见图 2C, 结果表明, 黄精多糖可以恢复 CTX 和 APH 导致的 DEGs 的表达水平。

表 2 黄精多糖对各组小鼠血常规指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 2 Effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on blood parameters of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量	RBC/ $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$	HGB/ $g \cdot L^{-1}$	WBC/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	PLT/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	MCHC/ $g \cdot L^{-1}$
正常组	—	9.32 $\pm$ 0.48	156.80 $\pm$ 12.23	3.11 $\pm$ 0.69	1 121.5 $\pm$ 205.9	273.3 $\pm$ 14.1
模型组	—	6.14 $\pm$ 1.37 ¹⁾	110.67 $\pm$ 17.81 ¹⁾	6.58 $\pm$ 3.48	629.8 $\pm$ 141.5 ¹⁾	244.0 $\pm$ 10.7 ¹⁾
黄精多糖低剂量组	0.1 g·kg ⁻¹	7.47 $\pm$ 0.43 ³⁾	129.78 $\pm$ 10.65 ³⁾	13.16 $\pm$ 3.89 ³⁾	823.3 $\pm$ 281.5	260.0 $\pm$ 12.1 ²⁾
黄精多糖高剂量组	0.4 g·kg ⁻¹	7.89 $\pm$ 0.43 ³⁾	145.83 $\pm$ 7.08 ³⁾	12.63 $\pm$ 0.76 ³⁾	1 060.5 $\pm$ 223.9 ³⁾	270.8 $\pm$ 11.7 ³⁾
当归补血口服液组	12 mL·kg ⁻¹	6.75 $\pm$ 0.96	127.25 $\pm$ 13.55 ³⁾	12.38 $\pm$ 2.22 ³⁾	945.0 $\pm$ 97.4 ²⁾	276.6 $\pm$ 19.4 ³⁾

注: 与正常组比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 3 黄精多糖对各组小鼠体质量、体温的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 3 Effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on body weight, temperature of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量	体质量增长率/%	体温/℃
正常组	—	29.94 $\pm$ 7.36	38.06 $\pm$ 0.18
模型组	—	16.42 $\pm$ 5.89 ¹⁾	36.27 $\pm$ 0.48 ¹⁾
黄精多糖低剂量组	0.1 g·kg ⁻¹	25.44 $\pm$ 7.80	36.71 $\pm$ 0.49
黄精多糖高剂量组	0.4 g·kg ⁻¹	25.76 $\pm$ 7.52 ²⁾	37.10 $\pm$ 0.60 ³⁾
当归补血口服液组	12 mL·kg ⁻¹	19.88 $\pm$ 9.11	37.57 $\pm$ 0.58 ³⁾

注: 与正常组比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 4 转录组测序数据

Tab. 4 Transcriptome sequencing data

样品	原始读段	过滤读段	过滤读段 Q20/%	过滤读段 Q30/%
黄精多糖组1	50 614 412	48 189 492	99.02	96.29
黄精多糖组2	56 745 712	53 744 738	98.89	95.93
黄精多糖组3	59 255 544	56 224 508	99.02	96.32
正常组1	66 966 192	63 692 340	99.01	96.27
正常组2	54 384 800	51 802 340	99.01	96.28
正常组3	57 428 396	54 813 014	98.93	96.00
模型组1	60 715 498	57 760 900	98.95	96.11
模型组2	67 116 922	63 992 558	98.98	96.18
模型组3	54 712 772	51 795 822	98.91	95.98

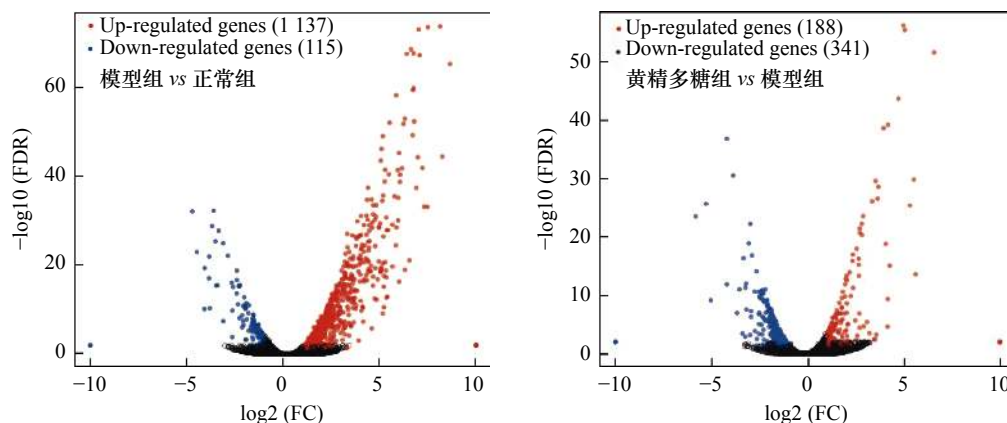


图1 差异基因表达火山图

Fig. 1 Volcano plots of DEGs

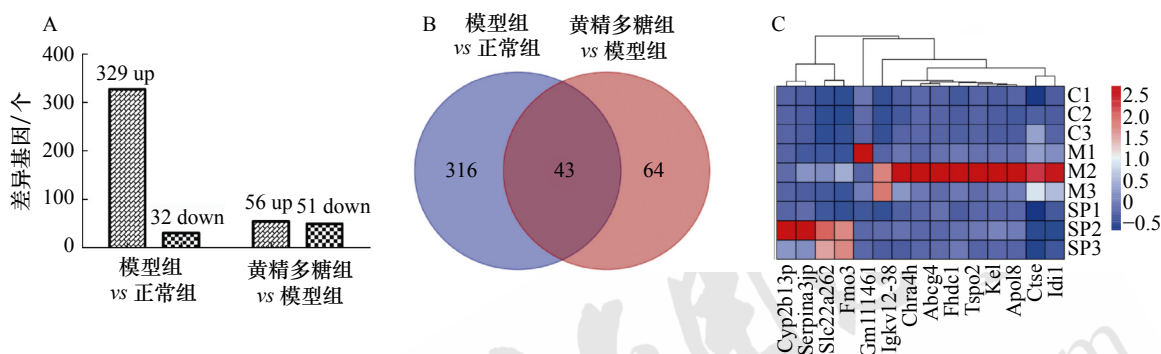


图2 组间差异基因分析

A-显著上调和下调基因个数; B-差异基因韦恩图; C-前15个交集基因聚类分析图。C1~C3-正常组; M1~M3-模型组; SP1~SP3-黄精多糖组。

Fig. 2 General analysis of DEGs between groups

A-numbers of upregulated and downregulated DEGs; B-Venn diagram of DEGs; C-hierarchical clustering of the top 15 overlapped DEGs. C1~C3-normal group; M1~M3-model group; SP1~SP3-*Polygonatum sibiricum* polysaccharides group.

2.3.3 DEGs 的功能富集分析 GO 是描述生物体中基因和基因产物的功能分类体系, 主要反映在细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物过程 (biological process, BP) 3 个方面。对黄精多糖组与模型组的 DEGs 进行 GO 功能富集分析。

结果显示, 大多数 DEGs 与 BP 相关, 仅有少数与 CC 和 MF 相关。在 BP 方面, 上调和下调的 DEGs 均与肝细胞的生物调节 (biological regulation), 细胞过程 (cellular process), 代谢过程 (metabolic process) 以及免疫系统过程 (immune system process) 相关, 见图 3。利用 KEGG 通路富集分析来深入了解黄精多糖组与模型组 DEGs 的基因功能, 见图 4。结果表明, 黄精多糖调节的 DEGs 与造血细胞系 (hematopoietic cell lineage)、视黄醇代谢 (retinol metabolism)、甾类激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis)、血小板激活 (platelet activation)、B 细胞受体信号通路 (B cell receptor

signaling pathway)、白细胞穿内皮移行 (leukocyte transendothelial migration) 等相关。

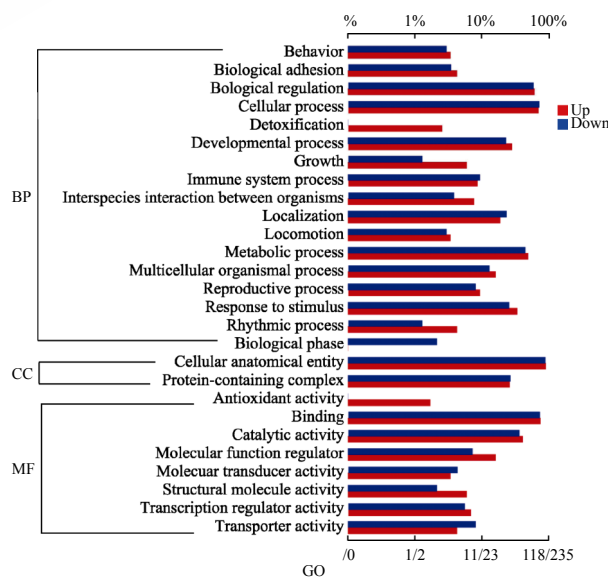


图3 差异表达基因的 GO 功能分析

Fig. 3 GO functional analysis of DEGs

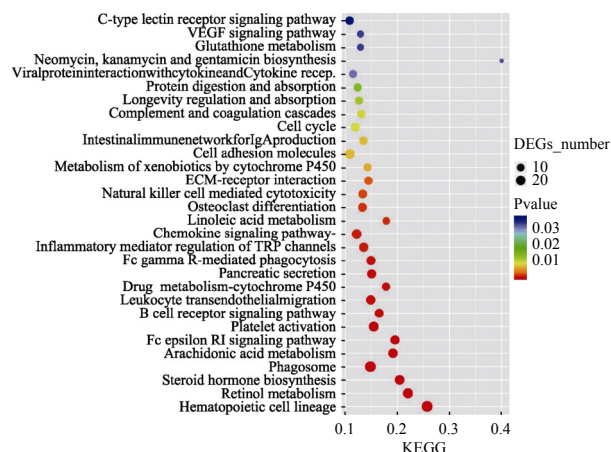


图4 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析
Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of DEGs

2.4 黄精多糖对血虚模型小鼠 JAK1-STAT1 信号通路的调控作用

JAK-STAT 信号通路被证明是参与造血、免疫调节和炎症细胞因子信号转导的关键途径之一^[19-20]。在此通路上的主要基因为 JAK1、STAT1 和 GATA1。采用 qRT-PCR 对 hematopoietic cell-lineage 通路的 3 个基因的表达进行验证。结果表明，与正常组比，血虚模型的 JAK1、STAT1 和 GATA1 mRNA 表达均代偿性的升高，差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组相比，黄精多糖可促进 3 个基因的表达，差异具有统计学意义 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)，结果见图 5。

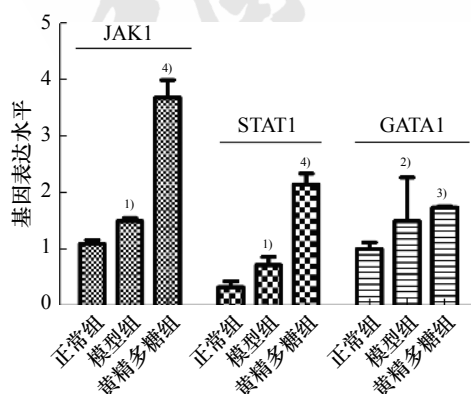


图5 黄精多糖对血虚模型小鼠肝脏 JAK1, STAT1 和 GATA1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
与正常组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effects of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on mRNA expression of JAK1, STAT1 and GATA1 in liver of BDS mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

3 讨论

根据中医理论，血虚的发病机制可能与阴阳失调、气虚、血瘀和脏腑功能失调有关。因此，临床上多采用益气活血、健脾补肾的中草药治疗血虚、贫血^[21-22]。黄精是一种药食两用的中药，可滋阴润肺、宽中益气、补脾益肾。现代研究表明，黄精炮制后可增强益气、养血、健脾补肾的功效，其主要的生物活性成分是多糖^[9]，然而其补血的作用机制至今仍未完全阐明。

血虚模型的建立可以采用放血法、辐射法、化学损伤法 (APH 或 CTX)，其中化学损伤法可使造血微环境发生改变，血虚状态持续时间久，动物存活率高^[17]。本研究采用皮下注射 APH 和腹腔注射 CTX 致小鼠血虚模型探索九蒸九制黄精多糖的补血作用。从研究结果看，蒸制黄精多糖可使血虚小鼠外周血的 HGB、RBC、MCHC、WBC 和 PLT 水平显著升高，亦可明显促进血虚小鼠体质量和体温的恢复，提示蒸制黄精多糖可增大红细胞体积，增强载氧能力，促进机体代谢功能，增强细胞免疫力和凝血功能，从而发挥补血作用。

中医认为血的生成过程与心、肝、脾、肺、肾密切相关，脾为气血生化之源，血宣于肺、统于心，藏于肝，化精于肾。有学者采用因子分析综合评价大量药理指标后发现四物汤治疗血虚的作用主要与肝、心、脾相关^[23]。而目前大多数研究集中在脾脏组织，对肝脏组织的研究鲜见。笔者所在课题组前期实验亦发现蒸制黄精多糖可明显降低血虚小鼠脾脏指数，提高脾脏中造血因子、促红细胞生成素粒细胞集落刺激因子水平。因此，本实验着重从转录组学探索蒸制黄精多糖对血虚模型小鼠肝脏组织基因转录及调控规律，明确其主要的的作用机制。

目前，RNA-seq 技术在深入了解中药治疗贫血或血虚的分子机制方面发挥重要作用。全血 RNA-seq 研究表明，炎症反应、造血、淋巴细胞功能、凝血和红细胞再生等信号通路与溶血性贫血相关^[14]。RNA-seq 揭示阿胶的作用机制与造血细胞系、ECM-受体相互作用、破骨细胞分化等有关^[15]。本研究采用 RNA-seq 技术获得了正常组、模型组和黄精多糖高剂量组的 9 个肝脏组织转录组数据 (每组各 3 个随机肝脏组织样品)。模型组与正常组的 DEGs 共有 359 个，黄精多糖组与模型组的 DEGs 有 107 个。GO 功能分析发现，血虚

的发生和发展涉及多个 BP, 黄精多糖防治血虚的作用由多个 BP 相关的基因调控, 主要体现在对肝细胞生物调节、肝细胞生长、代谢、解毒和免疫作用的正调控。在分子功能模块中, 黄精多糖提高了对抗氧化、催化活性、分子功能调节和分子传感器活性等相关基因的表达, 从而共同发挥防治血虚的作用。与前期报道相似, 本实验中 KEGG 通路富集分析结果显示, 这些 DEGs 主要涉及造血细胞系、视黄醇代谢、甾类激素生物合成、血小板激活、B 细胞受体信号通路、白细胞穿内皮移行等多个信号通路。值得注意的是, 蒸制黄精多糖直接调控造血细胞谱系, 可能影响造血发育。前期有学者构建血虚模型小鼠进行实验, 发现当归补血汤中的多糖组分可以显著改善血虚小鼠的造血功能, 在非多糖的组分中, 阿魏酸亦可明显改善造血功能^[24]。胡静等^[25]对当归补血汤调节免疫功能机制的中外文献进行研究, 结果提示当归补血汤可以保护各种淋巴细胞, 促进免疫功能恢复, 并且能够加快免疫淋巴细胞增殖速度。有研究对三七-人参药对发挥补血作用的机制进行研究, 结果发现药对可通过对视黄醇代谢、白细胞功能和血小板激活等通路的调控发挥补血作用^[26]。该研究结果与上述研究报道非常相似, 提示造血功能、免疫调节、白细胞功能和血小板激活等多个信号通路在黄精对血虚疾病的干预机制中发挥重要作用。

JAK-STAT 信号通路被证明是参与造血和免疫调节的细胞因子信号转导的关键途径^[19-20]。STAT 家族是 JAK 的直接作用底物, 在 JAK1 的刺激下, 能将信号直接传递到核内, 激活的 STAT1 可调控下游 GATA1 基因。在红细胞生成过程中, GATA1 转录因子家族被认为是红细胞生成的关键开关红细胞分化和成熟^[27]。有研究表明当归补血汤可显著抑制免疫诱导再生障碍性贫血小鼠 JAK/STAT 信号通路关键靶蛋白 JAK1、STAT1 和 STAT3 mRNA 表达水平^[28]。蒸制三七可以通过抑制脾脏中 JAK1、STAT1 mRNA, 同时促进 GATA1 mRNA 表达水平来改善血虚证^[29]。CTX 对体液免疫和细胞免疫具有抑制作用, 被广泛应用于动物模型中诱导免疫抑制^[30-31]。已有研究表明, 蒸制黄精多糖通过促进体液免疫、细胞免疫、保护免疫器官, 对 CTX 诱导的鸡免疫抑制具有免疫增强作用^[32]。如本研究所示, APH 和

CTX 可代偿性地促进 JAK1、STAT1 和 GATA1 mRNA 的表达, 推测其可能是补偿机制引起的。化疗引起的贫血可能与造血细胞的免疫抑制和细胞毒性有关^[33-34], 给予蒸制黄精多糖干预后, 血虚小鼠肝脏组织中 JAK1、STAT1 和 GATA1 mRNA 的表达均明显代偿性得升高。由于化疗药物对动物骨髓细胞的损伤, 导致反应性细胞对造血因子的反应性降低, 因此需要更高浓度的造血因子才能促进造血功能的恢复, 这与以往的文献报道一致^[29]。推测蒸制黄精多糖可作用于 JAK1/STAT1 通路调控下游因子 GATA1 支持造血细胞的生存, 进而起到改善血虚的作用。

REFERENCES

- [1] LI P L, SUN H G, HUA Y L, et al. Metabolomics study of hematopoietic function of *Angelica sinensis* on blood deficiency mice model[J]. J Ethnopharmacol, 2015(166): 261-269.
- [2] SHI X Q, ZHU Z H, YUE S J, et al. Integration of organ metabolomics and proteomics in exploring the blood enriching mechanism of Danggui Buxue Decoction in hemorrhagic anemia rats[J]. J Ethnopharmacol, 2020(261): 113000.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2020: 附录 138.
- [4] LIU N, DONG Z H, ZHU X S, et al. Characterization and protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107(Pt A): 796-802.
- [5] LONG T T, LIU Z J, SHANG J C, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathways[J]. Int J Biol Macromol, 2018(111): 813-821.
- [6] YELITHAO K, SURAYOT U, PARK W, et al. Effect of sulfation and partial hydrolysis of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* on immune-enhancement[J]. Int J Biol Macromol, 2019(122): 10-18.
- [7] LI L, THAKUR K, LIAO B Y, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneura* Hua[J]. Int J Biol Macromol, 2018(114): 317-323.
- [8] LUO D, BAI X C, CHEN D, et al. Effects of Selenium-enriched *Cyclocarya paliurus* and *Polygonatum sibiricum* compound on glucose, lipid metabolism, liver and kidney functions in diabetic rats[J]. Pharm Today(今日药学), 2021, 31(5): 353-356.
- [9] LIU T Y, ZHAO L L, CHEN S B, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides prevent LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation via the TLR4/Myd88/NF- κ B pathway[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(4): 3733-3739.
- [10] ZHANG Y X, ZHOU Q, ZHANG X L, et al. Content change and transformation mechanism of oligosaccharides and monosaccharides before and after processing in *Polygonatum*

- cyrtonema*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43(2): 318-322.
- [11] SUN T T, ZHANG H, LI Y, et al. Physicochemical properties and immunological activities of polysaccharides from both crude and wine-processed *Polygonatum sibiricum*[J]. Int J Biol Macromol, 2020(143): 255-264.
- [12] MA M N, DONG Y J, LEI S S, et al. Pharmacodynamic effects of different processed products of Rhizoma Polygonati on rat model of qi and Yin deficiency[J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2019, 53(10): 83-89.
- [13] WAN Y, ZHANG Q, ZHANG Z J, et al. Transcriptome analysis reveals a ribosome constituents disorder involved in the RPL5 downregulated zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia[J]. BMC Med Genomics, 2016(9): 13.
- [14] BORCHERT C, HERMAN A, ROTH M, et al. RNA sequencing of whole blood in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) reveals novel insights into disease pathogenesis[J]. PLoS One, 2020, 15(10): e0240975.
- [15] ZHANG Y, YE T T, GONG S Q, et al. RNA-sequencing based bone marrow cell transcriptome analysis reveals the potential mechanisms of E'jiao against blood-deficiency in mice[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019(118): 109291.
- [16] WANG J, WANG F R, YUAN L X, et al. Blood-enriching effects and immune-regulation mechanism of steam-processed *Polygonatum sibiricum* polysaccharide in blood deficiency syndrome mice[J]. Front Immunol, 2022(13): 813676.
- [17] QIAN H L, PAN Z Q. Evaluation of blood deficiency syndrome in traditional Chinese medicine and its animal model preparation method[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2018, 35(1): 176-181.
- [18] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140.
- [19] VAINCHENKER W, CONSTANTINESCU S N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies[J]. Oncogene, 2013, 32(21): 2601-2613.
- [20] CHEN L, TENG H, FANG T, et al. Agrimonolide from *Agrimonia pilosa* suppresses inflammatory responses through down-regulation of COX-2/iNOS and inactivation of NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated macrophages[J]. Phytomedicine, 2016, 23(8): 846-855.
- [21] WANG Y P, LI X Y, SONG C Q, et al. Effect of different fractions from Danggui Buxue Tang on immunological function in normal and blood-deficiency mouse[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(2): 135-138.
- [22] MA Z C, GAO Y, LIU Y X, et al. Study on the effect of Siwu Decoction on hematopoietic cells in mice with blood deficiency syndrome caused by γ -ray irradiation[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2001, 7(3): 41-44.
- [23] LI J, JIANG H J, HE Y, et al. Pharmacodynamics of Siwu decoction on blood supply based on factor analysis[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(20): 4454-4459.
- [24] MA X. Study on chemical constituents of different parts of *Angelica sinensis* and their blood-enriching effects[D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine, 2018.
- [25] HU J, LI K, LI A P, et al. Research progress on material basis of Danggui Buxue decoction[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(21): 5658-5663.
- [26] KANG D N, YU X Y, ZHANG Y F, et al. Study on the blood-enriching mechanism of steamed notoginseng and ginseng herb pair[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2021, 56(23): 1906-1917.
- [27] MORCEAU F, DICATO M, DIEDERICH M. Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: Regarding molecular mechanisms of erythropoiesis[J]. Mediators Inflamm, 2009(2009): 405016.
- [28] DENG P Y, LI X, WEI Y, et al. The herbal decoction modified Danggui Buxue Tang attenuates immune-mediated bone marrow failure by regulating the differentiation of T lymphocytes in an immune-induced aplastic anemia mouse model[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0180417.
- [29] ZHANG Z J, ZHANG Y M, GAO M, et al. Steamed *Panax notoginseng* attenuates Anemia in mice with blood deficiency syndrome via regulating hematopoietic factors and JAK-STAT pathway[J]. Front Pharmacol, 2019(10): 1578.
- [30] MOTOYOSHI Y, KAMINODA K, SAITOH O, et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high- dose cyclophosphamide[J]. Oncol Rep, 2006, 16(1): 141-146.
- [31] KIM J W, CHOI J S, SEOL D J, et al. Immunomodulatory effects of kuseonwangdago-based mixed herbal formula extracts on a cyclophosphamide-induced immunosuppression mouse model[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018(2018): 6017412.
- [32] SHU G, XU D, ZHAO J, et al. Protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in chickens[J]. Res Vet Sci, 2021(135): 96-105.
- [33] ZHU H H, JI K H, ALDERSON N, et al. Kit-Shp2-Kit signaling acts to maintain a functional hematopoietic stem and progenitor cell pool[J]. Blood, 2011, 117(20): 5350-5361.
- [34] KRATZ C P, NIEMEYER C M, ZENKER M. An unexpected new role of mutant Ras: Perturbation of human embryonic development[J]. J Mol Med, 2007, 85(3): 227-235.

收稿日期: 2023-03-27

(本文责编: 蔡珊珊)