

基于转录组测序分析美洲大蠊提取物促进小鼠创面愈合的分子机制

陈佳松^{1,2,3}, 陈峰^{1,2,3}, 彭锐^{1,2,3}, 耿福能^{3*}, 邹方东^{1,2,3*}

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 四川省药用动物工程技术研究中心, 成都 610064;
3. 药用美洲大蠊四川省重点实验室, 成都 610064)

摘要: 美洲大蠊 *Periplaneta americana* 是传统的中药材, 其提取物已在临床上广泛用于创面治疗, 但对其中的分子机制知之甚少。本文通过构建小鼠皮肤创伤模型, 并基于转录组测序 (RNA-seq) 深入分析美洲大蠊提取物促进小鼠创面愈合的分子机制。首先构建 C57 小鼠皮肤全层切除模型, 并将其分为 3 组, 其中实验组分别以 2 种美洲大蠊提取物 (康复新液、精粉) 为敷料, 而对照组以 75% 乙醇为敷料。用药处理 3 d 后取伤口皮肤组织送样进行 RNA-seq, 然后分析转录组数据找出与伤口愈合相关的差异性表达基因, 并利用荧光定量 PCR (Q-PCR) 对伤口组织中相关基因的表达量进一步验证。实验结果显示, 实验组小鼠伤口的结痂速度比对照组快, 这表明了小鼠创面模型中, 美洲大蠊提取物能促进伤口愈合。经转录组分析, 得到显著性差异表达基因数: 对照组 vs. 精粉组为 545, 对照组 vs. 康复新液组为 938。结合生物信息分析结果和已发表的文献, 发现 3 个可能参与调节伤口愈合的关键基因: 表皮调节素 (*Ereg*)、*Gli-kruppel* 家族成员 (*Gli2*) 和表皮型转谷氨酰胺酶 3 (*Tgm3*)。Q-PCR 实验表明, 这 3 个基因在美洲大蠊提取物加药组中均高表达。本文研究结果表明, 2 种美洲大蠊提取物: 康复新液、精粉可能通过诱导 *Ereg*、*Tgm3* 和 *Gli2* 的高表达来促进皮肤创面的愈合。

关键词: 美洲大蠊; 伤口修复; 转录组分析; 关键基因

中图分类号: Q95-33; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2017)04-0398-06

Regulatory Molecular Mechanism of *Periplaneta americana* Extracts on Wound Healing Using RNA-seq

CHEN Jiasong^{1,2,3}, CHEN Feng^{1,2,3}, PENG Rui^{1,2,3}, GENG Funeng^{3*}, ZOU Fangdong^{1,2,3*}

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;
2. Sichuan Engineering Research Center for Medicinal Animals, Chengdu 610064, China;
3. Sichuan Key Laboratory for Medicinal American Cockroach, Chengdu 610064, China)

Abstract: *Periplaneta americana* is a traditional Chinese medicine, and its extracts have been widely used in the treatment of wound in clinic. However, the molecular mechanism is poorly understood. In this study, to investigate the regulatory mechanism of *P. americana* extracts on wound healing, a mouse model with excision wound was constructed to assess the efficacy of *P. americana* extracts on wound therapy. A total of 9 mice were randomly divided into 3 groups: control group (treated with 75% ethanol solution) and 2 *P. americana* extracts treated groups (Kangfuxin and Jingfen), respectively. RNA-seq was used to screen the key genes in wound skin tissues on day 3. Furthermore, real-time quantitative PCR was performed to confirm the expression of key genes. The results showed that both *P. americana* extracts could accelerate wound healing. RNA-seq analyses showed that, comparison to the control group, a total of 545 differentially expressed genes (DEGs) were identified in Jingfen treated group and 938 DEGs in Kangfuxin treated group. Bioinformatics analysis revealed that 3 key genes, including *Ereg*, *Gli2* and *Tgm3*, may play important roles in wound healing during the treatment of *P. americana* extracts. Q-PCR experiments further confirmed that *Ereg*, *Gli2* and *Tgm3* were up-regulated after the treatment of both *P. americana* extracts. Collectively, our results indicated that the extracts of *P. americana* may accelerate wound healing by regulating *Ereg*, *Gli2* and *Tgm3* expression.

Keywords: *Periplaneta americana*; wound healing; RNA-seq; key genes

收稿日期: 2017-03-31 接受日期: 2017-05-09

作者简介: 陈佳松 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为细胞生物学, E-mail: chenjiasong91@qq.com

* 通信作者 Corresponding author, E-mail: haoyishengf@126.com; fundzou@scu.edu.cn

美洲大蠊 *Periplaneta americana* 是蜚蠊目 Blattaria 蜚蠊科 Blattidae 昆虫,主要分布于热带和亚热带,是世界性卫生害虫,除传播多种人类疾病外,其分泌物还引起人类过敏反应。此外,美洲大蠊还是传统的中药材,常以干燥或鲜成虫入药,具有抗肿瘤、抑菌、抗氧化、增强免疫、抗炎、镇痛等作用。例如,在子宫内膜癌细胞株 JEC 中,美洲大蠊提取物能够通过阻滞 G2/M 期抑制肿瘤增殖(张晓巍,朱艳,2015)。美洲大蠊 70% 乙醇提取物:异香豆素类化合物,对肝癌细胞(HepG2)和人乳腺癌细胞(MCF-7)也有显著的细胞毒性(Luo *et al.*,2014)。此外,美洲大蠊精粉对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠埃希菌 *Escherichia coli*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 均有抑菌作用(李远辉等,2014)。

康复新液由美洲大蠊醇提物配制而成,临床上广泛用于创面治疗。在对肛管难愈合的 79 例临床观察中,发现以康复新液进行局部换药时,与对照组利凡诺溶液局部换药相比治愈率高、伤口愈合时间明显较短(伍伟明等,2015)。另外,在大鼠皮下切割伤实验中,康复新液处理组伤口愈合率也高于对照组(张俊等,2014)。有实验表明美洲大蠊提取物可以加速全身放射损伤的愈合。作者使用美洲大蠊多元醇提取物 W_{11-a12} 作为治疗药物发现,其能通过增加细胞外基质表达量、调控伤口细胞增值、使肉芽组织的形成速度加快,从而提高伤口愈合速度和质量(舒崇湘等,2001)。

临床及实验证据都表明美洲大蠊提取物有明显的促创面愈合能力,且能通过多种途径促进创面愈合。但是,目前对其中涉及的分子机制不甚明确。基于此,本文利用转录组测序(RNA-seq)这一成熟的基因组学研究技术手段,分析美洲大蠊提取物促进创伤修复过程中基因表达变化,从中筛选出与创面愈合相关的差异性表达基因,并进一步从细胞和个体水平进行验证,从而初步揭示美洲大蠊提取物促进创伤修复的分子机制,为美洲大蠊的深入开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPF 级 C57 小鼠(四川大学实验动物中心),实验动物生产许可证:SCSK(川)2013-026,实验动物使用许可证:SYSK(川)2013-185;康复新液、精粉(四川好医生攀西药业有限公司);RNAiso Plus(TaKaRa, Code No. 9108);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa, RR047A);EvaGreen

2X qPCR Master Mix(abm, Master Mix-S);Tissue Protein Extraction Kit(康为,CW0891S)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型实验 5~7 周龄的 C57 实验小鼠称量后选取体质量在平均值 ± 3 g 内的小鼠,随机分为 3 组:对照组(Control)、康复新液实验组(KFX)、精粉实验组(JF)(用 75% 乙醇配制为 0.05 g · mL⁻¹)。每组 3 只。饲养 1 d 后,将小鼠背部脱毛备用。首先用无水乙醚麻醉小鼠,然后参照《现代创伤修复学》所述(付小兵,王德文,1997)在背部用消毒手术剪,剪下边长为 1 cm 的正方形创口。用 75% 乙醇擦拭伤口消毒后,每天早晚擦药各 1 次,每次 1 mL 溶液,对照组抹 75% 乙醇。拍照记录,利用 Photoshop 计算伤口面积变化。

1.2.2 转录组分析 造模 3 d 后,取伤口周围约 2 mm 区域的皮肤送公司进行 RNA-seq。原始 reads 经过滤后用 tophat2 和 cufflink 对 reads 进行组装拼接。用 R 语言包:EdgeR 分析得到显著性差异基因,然后用 blast2go 对差异基因进行 Gene Ontology(GO)和 kyoto encyclo pedia of genes and genomes(KEGG)分析。

1.2.3 荧光定量 PCR 实验 使用试剂盒 RNAiso Plus 提取皮肤组织总 RNA,步骤按照试剂所提供的说明书;反转试剂盒将总 RNA 反转成 cDNA;从 NCBI 上查找 *Ereg*、*Gli2*、*Tgm3*、*GAPDH* 序列,用 Primer 5 设计引物如表 1;荧光定量 PCR(Q-PCR)步骤和参数设置按照 EvaGreen 2X qPCR Master Mix 说明书所示。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primer used in this study

基因名	引物(5'-3')
<i>GAPDH</i>	Forward: AGGTCGGTGTGAACGGATTTC
	Reverse: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>Ereg</i>	Forward: CTGCCTCTTGGGTCTTGACC
	Reverse: GCGGTACAGTTATCCTCGGATTC
<i>Gli2</i>	Forward: CAACGCCTACTCTCCAGAC
	Reverse: GAGCCTTGATGTACTGTACCAC
<i>Tgm3</i>	Forward: CTGGCAGGTGCCTATGAATCG
	Reverse: TCAAGACTTCGGTTGCAGACTA

2 结果

2.1 动物模型实验

构建 C57 小鼠创伤模型,实验组每天涂康复新液或精粉液,对照组每天涂 75% 乙醇,隔一天拍照

记录。统计实验组和对照组伤口面积变化,结果表明美洲大蠊提取物:康复新液和精粉能加速伤口面积收缩(图 1)。

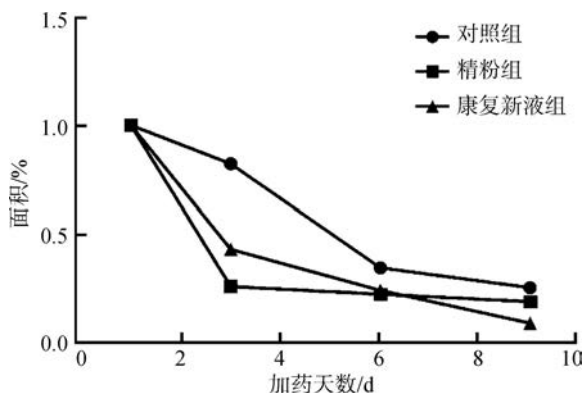


图 1 伤口面积变化
Fig. 1 Wound area in mice

2.2 转录组分析

2.2.1 伤口组织测序结果 由前期的观察实验发现,用药 3 d 左右加药组已有结痂现象。因此,药物

处理 3 d 后分别选择了 3 组(对照组、精粉组和康复新液组)伤口组织进行 RNA-seq。RNA 提取、文库构建后,通过 Illumina 高通量测序平台得到的原始数据用 raw reads 表示。各组样品得到的原始 reads 如表 2 所示。

表 2 测序原始 reads
Table 2 Raw data of RNA-seq

样品	Raw reads	Raw bases/G	测序错误率 < 0.1% 的 reads/%
对照组	25 440 776	7.63	88.38
精粉组	28 858 803	8.66	89.57
康复新液组	24 927 381	7.48	88.75

2.2.2 显著性差异表达基因分析 完成原始 reads 过滤、拼接和组装后用 R 语言的软件包:edgeR,可以得到实验组和对照组基因差异表达情况,FDR 与 log2FC 为筛选差异基因参数,筛选条件为 FDR < 0.05 且 |log2FC| > 1,满足条件即为显著性差异表达基因,结果见表 3。

表 3 差异基因数目统计
Table 3 Number of differentially expressed genes

比较组	表达量上调的差异基因	表达量下调的差异基因	所有差异基因
精粉组 vs. 对照组	421	124	545
康复新液组 vs. 对照组	739	199	938

2.2.3 差异基因注释 在得到差异基因后,对其进行 GO 富集分析。GO 是通用的基因功能分类体系,用来全面描述基因和基因产物的属性。GO 共有 3 个本体(ontology),分别描述基因的分子功能、细胞组分、参与的生物过程(Ashburner et al.,2000)。通过 GO 富集分析可以得到的差异基因富集情况如图 2。

富集结果表明:康复新液、精粉 2 个实验组,差异基因主要富集于生物学过程中的胞间信号、发育过程;细胞成分中的细胞外组分;分子功能中的结构分子激活。暗示这 2 种药物可能共同作用于上面 4 个 GO term 中的基因。结合已发表的文献,筛选出 3 个与创面愈合相关的关键基因:表皮调节素(Ereg)、Gli-Kruppel 家族成员 Gli2(Gli2)、表皮型转谷氨酰胺酶 3(Tgm3)。

2.2.4 差异基因 KEGG pathway 富集 为了进一步了解药物作用的信号通路,将差异基因进行 KEGG pathway 富集。KEGG 是一个综合数据库,通过它可以将基因和细胞生化过程联系起来(Kanehisa & Goto,2000)。实验组差异基因富集显著性最高的 10 个通路详见表 4。

结果表明,康复新液影响最显著的通路为细胞因子受体相互作用。已有实验表明这条通路上基因在皮肤创伤早期表达量变化明显(Roy et al.,2008)。第二条通路为趋化因子信号途径,该通路可以调节炎症反应和伤口愈合(Martin & Leibovich,2005)。PPAR 信号通路中基因缺失会导致伤口愈合延迟(Michalik & Wahli,2006)。在精粉实验组中,变化最明显的通路是花生四烯酸代谢。花生四烯酸是 PGE2 的前体,而 PGE2 能刺激伤口愈合(Li et al.,2010)。精粉也能调控细胞因子受体相互作用通路从而影响伤口的愈合。其他通路与伤口愈合的联系有待进一步研究。

2.3 Q-PCR 验证实验

加药 3 d 后提取伤口皮肤组织 RNA,利用 Q-PCR 技术检测对照组和实验组中 3 个关键基因的表达情况。

Q-PCR 结果如图 3,这 3 个基因在实验组中均高表达。已有研究表明,这几个基因高表达能促进伤口的愈合。Ereg 在精粉实验组中表达量最高,这和前期观察到精粉组创面愈合最快的结果相符。

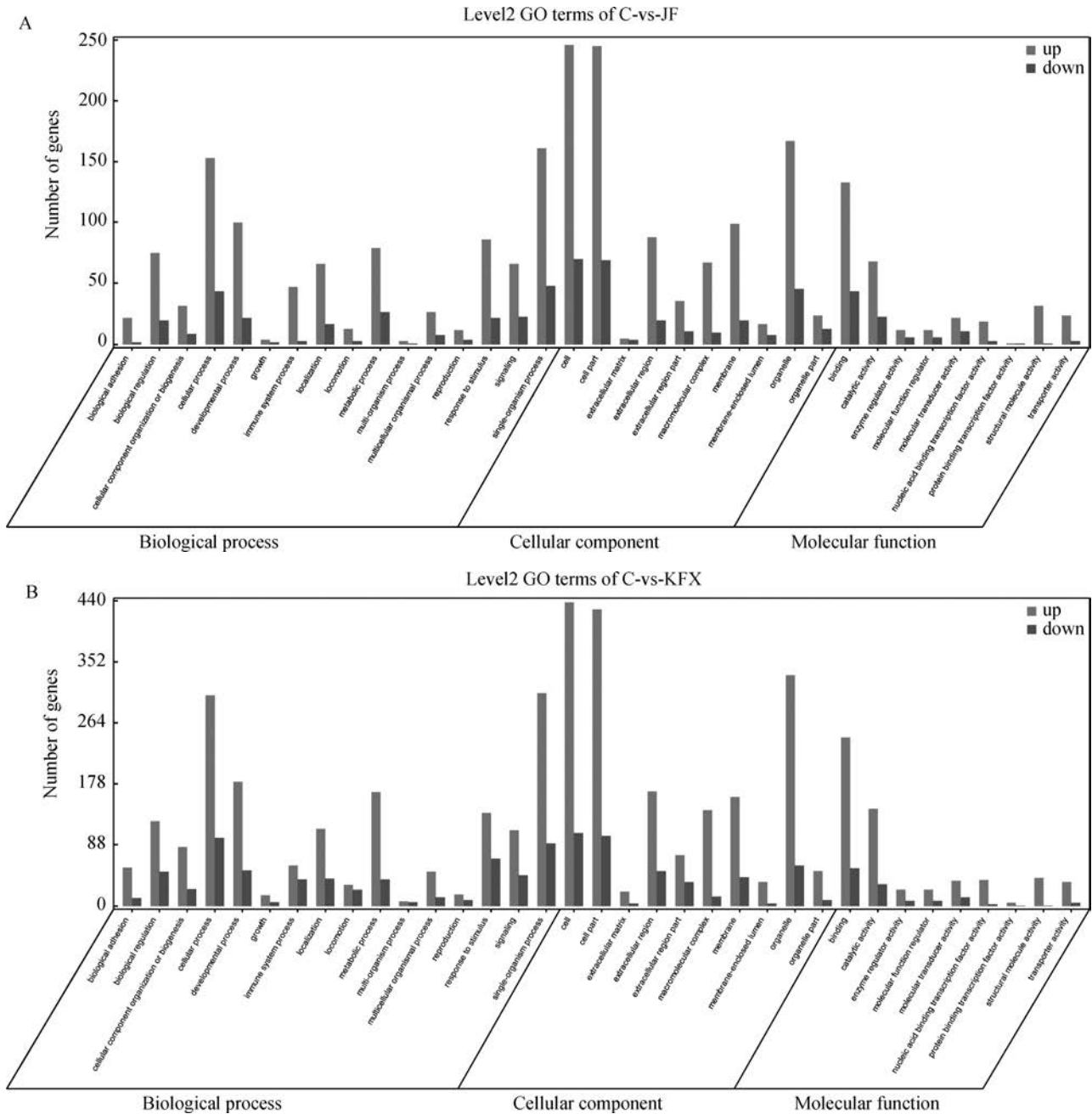


图2 差异基因 GO 富集

Fig. 2 GO enrichment analysis for DEGs

A. C-vs-JF (对照组 vs. 精粉组), B. C-vs-KFX (对照组 vs. 康复新液组).

A. C-vs-JF (Control vs. JF treated group), B. C-vs-KFX (Control vs. KFX treated group).

3 讨论

转录组是连接基因组遗传信息与生物功能的必要纽带,转录组研究已经成为揭示生物生长发育调控和逆境胁迫适应机制、生物进化规律、疾病发生发展的重要机制以及发现致病基因调控关键靶点等方面的最佳研究手段。通过转录组分析,找出在加药组中显著性差异(FDR ≤ 0.05)表达的基因。精粉组

和对照组相比:有 545 个基因差异表达,其中在精粉组中表达量升高的有 421 个,表达量降低的有 124 个;康复新液组和对照组相比:差异基因总数为 938 个,高表达 739 个,低表达 199 个。

结合已发表的文献,从 2 组共同的差异性表达基因中筛选出了 3 个与创面愈合相关的关键基因: *Ereg*、*Tgm3* 和 *Gli2*。 *Ereg* 是表皮调节素家族中的一员,而表皮调节素在皮肤损伤愈合中是关键

表 4 差异基因 KEGG pathway 富集
Table 4 KEGG pathway enrichment results

组别	Pathway ID	Pathway	差异基因数	P-value
KFX	ko04060	细胞因子受体相互作用	35	1.55E-10
	ko04062	趋化因子信号转导通路	21	1.85E-05
	ko05144	疟疾	9	7.07E-05
	ko05323	类风湿性关节炎	11	7.09E-05
	ko04640	造血细胞系	12	8.13E-05
	ko05132	沙门氏菌感染	10	0.000 2
	ko00350	酪氨酸代谢	7	0.000 225
	ko03320	PPAR 信号通路	10	0.000 304
	ko05217	基底细胞癌	8	0.000 414
	ko04916	黑色素生成	11	0.000 454
JF	ko00590	花生四烯酸代谢	8	0.000 122
	ko05332	移植物抗宿主病	6	0.000 203
	ko04060	细胞因子受体相互作用	14	0.000 961
	ko04640	造血细胞系	7	0.001 392
	ko04916	黑色素生成	7	0.001 656
	ko04660	T 细胞受体信号通路	7	0.002 3
	ko05217	基底细胞癌	5	0.002 471
	ko04650	自然杀伤细胞介导的细胞毒性	8	0.002 628
	ko04940	I 型糖尿病	5	0.003 111
	ko00350	酪氨酸代谢	4	0.004 089

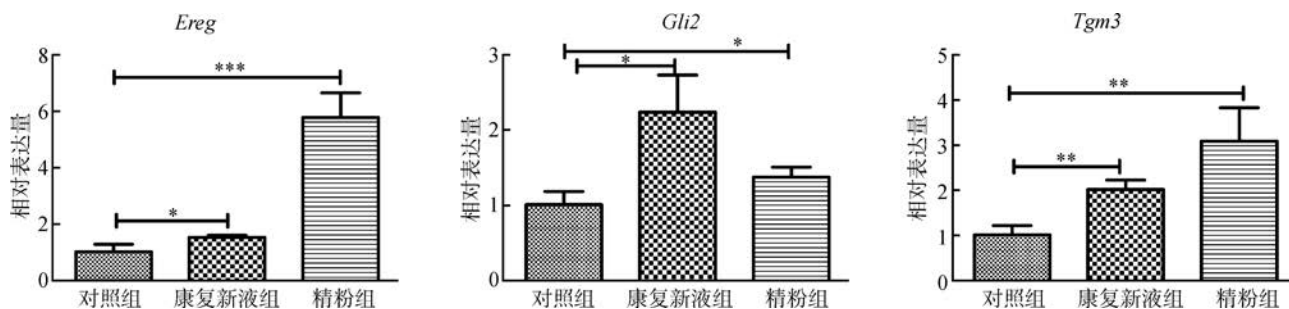


图 3 Q-PCR 检测关键基因表达量
Fig. 3 Key genes expression in wound tissues

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

基因。Ereg 可以通过增加细胞增殖和迁移来加快体外伤口的愈合,而且 Ereg 加速伤口愈合的效率比 2 种公认的促进伤口愈合因子:表皮生长因子、转化生长因子 a 更高(Draper et al.,2003)。这表明 Ereg 可能在美洲大蠊提取物促进伤口愈合中发挥着重要作用。此外,有实验显示 Ereg 还与炎症反应、肝祖细胞生长和结肠炎相关的肿瘤细胞生长等方面相关(Zhang et al.,2012;Neufert et al.,2013;Tomita et al.,2014)。因此,Ereg 的作用值得深入研究。Tgm3 对皮肤功能的完整有重要贡献,在表皮角质化包膜形成过程中参与结构蛋白的交联。Tgm3 缺陷小鼠中,皮肤炎症会增加(Bognar et al.,2014)。Gli2 是一种

转录因子,参与 Hn 信号通路的调节,已有实验表明 Gli2 能促进细胞增殖(Pan et al.,2009)。

Q-PCR 结果进一步证实在创伤组织中 Gli2、Ereg、Tgm3 这 3 个基因在实验组中均高表达,其中 Ereg 在精粉组中表达量最高,而 Ereg 高表达可以促进细胞增殖,暗示前期观察中精粉组结痂速度快,可能与 Ereg 表达量高有关。这表明了 2 种美洲大蠊提取物:康复新液、精粉都能提高伤口组织中 Ereg、Gli2、Tgm3 这 3 个参与伤口愈合分子通路的基因的表达量,从而加速皮肤伤口的愈合。此外,精粉为美洲大蠊干燥后磨成的粉末,擦药后会覆盖在伤口表面,还可以阻止外来细菌等有害微生物的侵袭,提供

了伤口修复过程中细胞迁移的路径等。

近年来,对美洲大蠊的药物作用机制已有一些相关研究。谭巧云等(2016)的研究表明,美洲大蠊提取物可以降低机体的炎症因子($CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$)水平和通过IL-2调节免疫功能,加快大鼠口腔黏膜愈合。杨胜群等(2016)认为美洲大蠊水提取物可能调控TGF- β 1的释放促进伤口愈合又避免形成瘢痕。曾娟妮等(2016)实验表明美洲大蠊提取液能提高伤口VEGF表达量来促进创面愈合。目前,对美洲大蠊促进创面愈合的分子机制了解仍然很少,而本文基于小鼠创面愈合模型,初步探讨了其中的分子机制。基于RNA-seq分析技术,筛选了3个与美洲大蠊促进创面愈合相关的关键基因。本文结果表明,美洲大蠊提取物——康复新液、精粉能通过刺激伤口组织中3个关键基因:*Gli2*、*Ereg*、*Tgm3*加速伤口愈合。本研究结果可为美洲大蠊临床研究及深入开发奠定理论基础。

致谢:本实验得到四川好医生药业集团的大力支持,在此致以最诚挚的谢意!

参考文献:

- 付小兵,王德文. 1997. 创伤修复基础[M]. 北京:人民军医出版社: 81.
- 李远辉,李希,冯建安,等. 2014. 美洲大蠊不同提取部位的体外抑菌活性研究[J]. 中药与临床, 5(6): 27-29.
- 舒崇湘,程天民,阎国和,等. 2001. 6Gy全身照射对皮肤伤口几种细胞外基质成分的影响及W_{11-a12}的促愈作用[J]. 中华创伤杂志, 17(10): 604-607.
- 谭巧云,满红霞,那凯歌,等. 2016. 美洲大蠊提取物对口腔溃疡大鼠模型的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 32(11): 1014-1016.
- 伍伟明,金丽颖,王真权,等. 2015. 康复新液治疗肛管难愈合创面的临床研究[J]. 中医药导报, 21(22): 71-73.
- 杨胜群,熊茜,邹俊波,等. 2016. 美洲大蠊水提取物对小鼠烫伤模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 22(22): 145-149.
- 曾娟妮,刘筱,伍伟明,等. 2016. 美洲大蠊提取液对大鼠难愈合创面VEGF表达影响的研究[J]. 中国民族民间医药杂志, (19): 64-66.
- 张俊,孟令贺,单士军,等. 2014. 康复新液对实验性大鼠皮肤切割伤痂下愈合的影响[J]. 天津医科大学学报, 20(3): 192-195.
- 张晓巍,朱艳. 2015. 苦参总碱和美洲大蠊提取物对孕激素受体阴性的子宫内膜癌细胞株JEC的作用研究[J]. 中国中药杂志, 40(11): 2210-2213.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology [J]. Nature Genetics, 25(1): 25-29.
- Bognar P, Nemeth I, Mayer B, et al. 2014. Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice [J]. Journal of Investigative Dermatology, 134(1): 105-111.
- Draper BK, Komurasaki T, Davidson MK, et al. 2003. Epiregulin is more potent than EGF or TGF α in promoting *in vitro* wound closure due to enhanced ERK/MAPK activation [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 89(6): 1126-1137.
- Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. Nucleic Acids Research, 28(1): 27-30.
- Li F, Huang Q, Chen J, et al. 2010. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration [J]. Science Signaling, 3(110): ra13.
- Luo SL, Huang XJ, Wang Y, et al. 2014. Isocoumarins from American cockroach (*Periplaneta americana*) and their cytotoxic activities [J]. Fitoterapia, 95: 115-120.
- Martin P, Leibovich SJ. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly [J]. Trends in Cell Biology, 15(11): 599-607.
- Michalik L, Wahli W. 2006. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair [J]. The Journal of Clinical Investigation, 116(3): 598-606.
- Neufert C, Becker C, Türeci Ö, et al. 2013. Tumor fibroblast-derived epi-regulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK [J]. The Journal of Clinical Investigation, 123(4): 1428-1443.
- Pan Y, Wang C, Wang B. 2009. Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development [J]. Developmental Biology, 326(1): 177-189.
- Roy S, Khanna S, Rink C, et al. 2008. Characterization of the acute temporal changes in excisional murine cutaneous wound inflammation by screening of the wound-edge transcriptome [J]. Physiological Genomics, 34(2): 162-184.
- Tomita K, Haga H, Mizuno K, et al. 2014. Epi-regulin promotes the emergence and proliferation of adult liver progenitor cells [J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 307(1): G50-G57.
- Zhang Y, Kobayashi T, Hayashi Y, et al. 2012. Important role of epi-regulin in inflammatory responses during corneal epithelial wound healing [J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 53(4): 2414-2423.