

## 实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.13.012

## 五子衍宗丸对神经管畸形细胞模型凋亡途径的影响

李瑞雪<sup>1</sup>, 樊慧杰<sup>1</sup>, 柴智<sup>1\*</sup>, 李艳荣<sup>1</sup>, 孙梦瀛<sup>1</sup>, 肖午帅<sup>1</sup>,  
尉杰忠<sup>2</sup>, 李艳花<sup>2</sup>, 张波<sup>3</sup>, 马存根<sup>1</sup>, 周然<sup>1</sup>

(1. 山西中医药大学基础医学院, 山西省晋中市高校园区大学街 121 号, 030619; 2. 山西大同大学脑科学研究所; 3. 山西卫生健康职业学院)

**摘要** 目的 探讨五子衍宗丸防治神经管畸形 (NTDs) 的可能作用机制。方法 PC12 细胞随机分为空白组、模型组及五子衍宗丸低、中、高剂量组。除空白组外, 其余各组采用全反式维甲酸 (atRA) 干预 PC12 细胞构建 NTDs 模型。五子衍宗丸低、中、高剂量组分别给予含五子衍宗丸的 RPMI-1640 培养基并使其最终浓度分别为 125、250、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  进行预处理, 模型组和空白组加入 RPMI-1640 培养基。测定各组 PC12 细胞活力及细胞凋亡率, 并提取空白组、模型组及经细胞活力、细胞凋亡率实验确定的最佳剂量五子衍宗丸组细胞总 RNA 测序, 筛选差异表达基因, 运用维恩图得到目的差异表达基因集, 并进行 GO 功能和 KEGG 通路显著性富集分析, 对与细胞凋亡相关的差异基因进行共表达网络分析。结果 模型组 PC12 细胞活力显著下降, 细胞凋亡率显著增加, 五子衍宗丸各剂量组细胞活力增强、细胞凋亡率降低, 且以五子衍宗丸低剂量组效果最佳 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。目的差异表达基因集 GO 功能分析显著富集到内质网应激介导细胞凋亡相关和细胞增殖生长相关的 GO 条目, KEGG 通路分析显著富集到细胞生长和死亡相关的信号通路。与模型组比较, 五子衍宗丸低剂量组内质网应激相关基因 *Ern1*、*Casp12*、*Creb3l1* 下调, 抗凋亡基因 *Birc5* 上调, 与模型组较空白组这些基因上下调方向正好相反。结论 五子衍宗丸可抑制细胞凋亡, 保护神经元样细胞, 其机制与调控内质网应激相关的基因表达, 与染色体分离、细胞核分裂、细胞周期等细胞增殖、生长和死亡等生物过程或信号通路相关。

**关键词** 五子衍宗丸; 神经管畸形; 细胞凋亡; 凋亡途径; 细胞增殖

神经管畸形 (neural tube defects, NTDs) 是中枢神经系统的严重出生缺陷, 由胚胎形成过程中神经管闭合失败引起, 包括脊柱裂和无脑畸形等<sup>[1]</sup>。细胞凋亡在 NTDs 形成过程中发挥着一定的作用, 细胞凋亡的失调会导致神经管闭合缺陷<sup>[2]</sup>, 细胞死亡的增加能够使神经上皮细胞的完整性受到功能性或机械性的损伤从而抑制神经管闭合<sup>[3]</sup>, 凋亡过程中相关基因的缺失或异常表达则能够引起

NTDs<sup>[4-5]</sup>。目前临床主要用叶酸预防 NTDs, 但叶酸也不能完全消除 NTDs<sup>[6]</sup>。

NTDs 是先天性发育异常, 其中腿部无力、瘫痪或变形, 脑积水, 学习障碍是其主要临床表现。我们认为, NTDs 属于中医学肾精亏损为主的先天禀赋不足的范畴, 通过补肾益精的方法能达防治之功<sup>[7-8]</sup>。五子衍宗丸取义衍宗繁育子嗣之义, 有补血益肾、填精益髓之效, 是补肾良方。全反式维甲酸 (all-transretinoic acid, atRA) 是公认的制备 NTDs 模型的药物<sup>[9]</sup>, PC12 细胞是研究神经系统疾病的经典细胞<sup>[10]</sup>。本研究用 atRA 诱导 PC12 细胞凋亡建立 NTDs 细胞模型, 运用 RNA-seq 技术在基因层面探讨五子衍宗丸对神经元细胞凋亡的保护作用及可能作用机制。

基金项目: 国家自然科学基金 (81102552, 81703978); 山西省留学人员科技活动项目; 山西省回国留学人员科研资助项目 (2017-129); 山西省重点研发计划 (201703D421016, 201803D31209); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“科技创新团队” (2018TD-012); 基于炎症反应的重大疾病创新药物山西省重点实验室开放课题基金 (SXIDL-2018-04)

\* 通讯作者: chaizhi008@126.com, (0351) 3179952

## 1 材料

### 1.1 细胞株

PC12 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 (未分化) 购自中国科学院上海生科院细胞资源中心, 源自美国模式菌种收集中心 (ATCC), 编号 CRL-1721。置于液氮中保存。

### 1.2 药品

五子衍宗丸由菟丝子、枸杞子、五味子、覆盆子、车前子组成, 北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂生产, 批号: 17035142。将五子衍宗丸研磨成微细粉末后制备浸膏备用。

### 1.3 主要试剂和仪器

标准胎牛血清 (HyClone 公司, 批号: GYK0119); 马血清 (Gibco 公司, 批号: 16050122); RPMI-1640 培养基 (HyClone 公司, 批号: ABA211779); 神经生长因子 (PeproTech 公司, 批号: 061260L3014); atRA (Sigma 公司, 批号: R2625); 二甲基亚砜 (DMSO, MP 公司, 批号: 6349K); 谷氨酰胺 (Hyclone 公司, 批号: 56-85-9); 青链霉素 (Biosharp 公司, 批号: 66056725); 膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (FITC) /碘化丙啶 (PI) 试剂盒 (Beyotime 公司, 批号: C1062); 3, 3'-[1-(苯基氨基)-3, 4-四氮唑] 二(4-甲氧基-6-硝基) 苯磺酸钠 (XTT) 试剂 (Sigma 公司, 批号: 403A0214); 人胎盘 IV 型胶原 (Sigma 公司, 批号: C5533); RNeasy Mini Kit 试剂盒 (Qiagen 公司, 批号: 151047028)。

流式细胞仪 (BD 公司, 型号 FACS Calibur); 酶标仪 (Leica 公司, 型号 C-1150); CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo 公司, 型号 3131); 转录组测序仪 (Illumina 公司, 型号 HiSeqTM 2000); 倒置相差显微镜 (Leica 公司, 型号 DMI3000B); 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 型号 5840)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将 PC12 细胞从液氮中取出, 移入离心管, 在室温下以 1500 r/min (离心半径 10 cm) 离心 10 min。去除上清液, 用 5 ml 新鲜培养基重悬沉淀细胞。用一个新的带针头的 20 ml 无菌注射器轻轻抽吸 4 或 5 次将细胞团分散。将等分的细胞悬液加入新的 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 再加入 15 ml 新鲜的含 10% 马血清、5% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、

青霉素 (100 U/ml) 及链霉素 (100 μg/ml) 的 RPMI-1640 培养基中, 使细胞密度为  $5 \times 10^5$  /ml, 将培养瓶放入 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养。

### 2.2 分组、造模及给药

将 PC12 细胞根据随机数字表分为空白组、模型组及五子衍宗丸低、中、高剂量组, 每组 3 个复孔。6 孔板、96 孔板使用前用人胎盘 IV 型胶原预处理, 6 孔板每孔加入 200 μl, 96 孔板每孔加入 30 μl 的 0.1 mg/ml 人胎盘 IV 型胶原溶液, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱 24 h 后吸弃人胎盘 IV 型胶原, 再置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱 24 h 后用于实验。各组细胞用含 50 ng/ml 的 RPMI-1640 培养基制成细胞悬液接种于 6 孔板中, 每孔 2 ml, 神经生长因子诱导分化 24 h; 五子衍宗丸低、中、高剂量组分别给予含终浓度为 125、250、500 μg/ml 五子衍宗丸的 RPMI-1640 培养基进行预处理, 模型组和空白组加入 RPMI-1640 培养基并使其与五子衍宗丸低、中、高剂量组体积相同; 24 h 后模型组和五子衍宗丸低、中、高剂量组分别加入含 atRA 的 RPMI-1640 培养基并使其最终浓度为 20 μmol/L, 干预 24 h, 空白组加入 DMSO 使其体积与其他组相同。

### 2.3 检测指标及方法

2.3.1 XTT 法检测细胞活力 将 PC12 细胞  $5 \times 10^4$  /孔接种于 96 孔板, 细胞分组及处理同上, 分别加入 XTT 溶液 50 μl, 37℃ 恒温避光培养 4 h。将培养好的 96 孔平底培养板放入多功能酶标仪检测 492 nm 处各孔的吸光度 (OD) 值。

2.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡情况 PC12 细胞以  $5 \times 10^5$  /孔接种于 6 孔板, 细胞分组及处理同上, 1200 r/min (离心半径 10 cm) 离心 5 min, 收集细胞, PBS 冲洗 2 次, 结合缓冲液中悬浮细胞, 吹均匀后加入 5 μl Annexin V-FITC, 混匀后 4℃ 条件下避光保存 20 min, 再加 5 μl PI, 混匀后 4℃ 条件下避光保存 10 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.3.3 转录组测序及数据分析 用 RNeasy Mini 试剂盒提取空白组、模型组以及通过以上两项检测确定的五子衍宗丸最佳给药剂量组的总 RNA。用转录组测序仪进行 RNA-seq。采用 fastqc 查看原始序列质量, 使用 Trim\_galore 对原始序列进行质量控制, 对低质量及 adaptor 序列进行处理。处理后的测序序列使用 STAR-2.5.4b 与小鼠基因组 UCSC rn6 进行比对。R-3.5.0 软件的 edgeR 程序包用于检测空白组、模型组和五子衍宗丸组之间的差异表

达基因, Benjamini Hochberg (BH) 方法控制错误发现率 (false discovery rate, FDR), 差异基因定义为:  $FDR < 0.05$ ,  $|\log_2 FC| > 2$ , 其中  $|\log_2 FC|$  为差异倍数, FC (Fold Change) 表示样本表达量的比值。用维恩图得到目的差异表达基因集。Cluster Profiler 程序包对目的基因集进行 GO 功能分析 ( $P < 0.01$ ) 和 KEGG 通路分析 ( $P < 0.05$ ),  $P$  值都用 BH 校正。通过表达预处理 9 个样本中至少 3 个的表达量 CPM (count per million)  $> 1$ , 用 WGCNA 建立共表达网络。根据 WGCNA 协议, 选择“7”作为软阈值, 共表达网络用 Cytoscape v3.7.1 进行可视化处理。

## 2.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组 PC12 细胞活力比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组 OD 值显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 五子衍宗丸各剂量组 OD 值均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 五子衍宗丸低剂量组升高最为显著, 且明显高于五子衍宗丸高剂量组 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各组 PC12 细胞活力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 样本数 | OD 值                           |
|-----------|-----|--------------------------------|
| 空白组       | 3   | $0.83 \pm 0.04$                |
| 模型组       | 3   | $0.43 \pm 0.02^*$              |
| 五子衍宗丸低剂量组 | 3   | $0.80 \pm 0.03^\Delta$         |
| 五子衍宗丸中剂量组 | 3   | $0.71 \pm 0.02^\Delta$         |
| 五子衍宗丸高剂量组 | 3   | $0.65 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$ |

注: 与空白组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与五子衍宗丸低剂量组比较,  $\Delta\Delta P < 0.05$

### 3.2 各组 PC12 细胞凋亡率比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 PC12 细胞凋亡率明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 五子衍宗

表 2 各组 PC12 细胞凋亡率比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 样本数 | 细胞凋亡率                          |
|-----------|-----|--------------------------------|
| 空白组       | 3   | $4.23 \pm 0.38$                |
| 模型组       | 3   | $10.27 \pm 0.22^*$             |
| 五子衍宗丸低剂量组 | 3   | $6.07 \pm 0.23^\Delta$         |
| 五子衍宗丸中剂量组 | 3   | $7.27 \pm 0.32^\Delta$         |
| 五子衍宗丸高剂量组 | 3   | $8.01 \pm 0.12^{\Delta\Delta}$ |

注: 与空白组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与五子衍宗丸低剂量组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$

丸各剂量组 PC12 细胞凋亡率均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 五子衍宗丸低剂量组降低最为显著, 且明显低于五子衍宗丸高剂量组 ( $P < 0.01$ )。

### 3.3 各组 PC12 细胞凋亡相关基因表达比较

以上两个实验结果表明, 五子衍宗丸防治 NTDs 细胞模型的最佳给药剂量为  $125 \mu\text{g/ml}$ 。故以下实验提取的五子衍宗丸组总 RNA 来自于五子衍宗丸低剂量组。

3.3.1 差异基因表达结果 对测序后的数据使用 edgeR 进行差异表达基因分析。图 1 示, 空白组、模型组、五子衍宗丸组每组的 3 个样本在图中的位置较集中, 说明各组的重复聚类性很好, 没有出现异常样本。各组样本位置较分散, 说明各组间基因表达差异较为显著。图 2 示, 与空白组相比, 模型组 148 个基因表达上调, 591 个基因表达下调。与

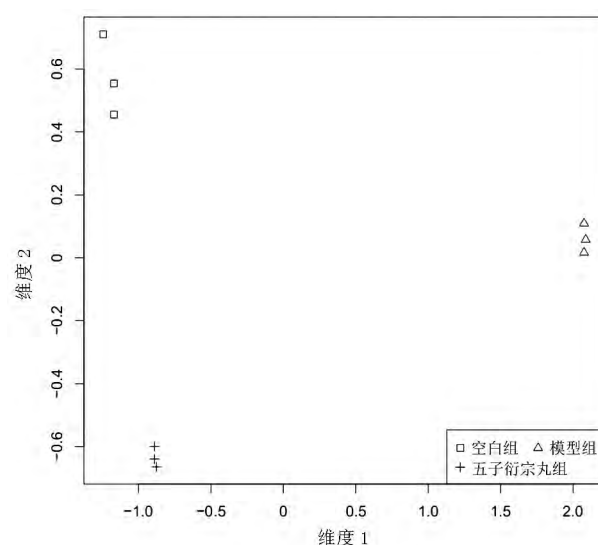


图 1 PC12 细胞凋亡相关基因表达的多维标度分析 (MDS) 图

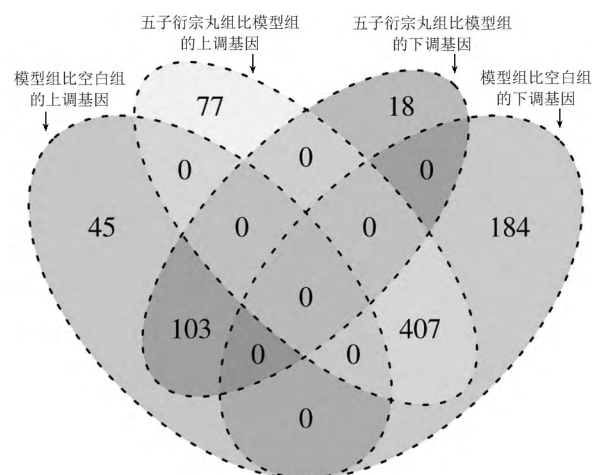
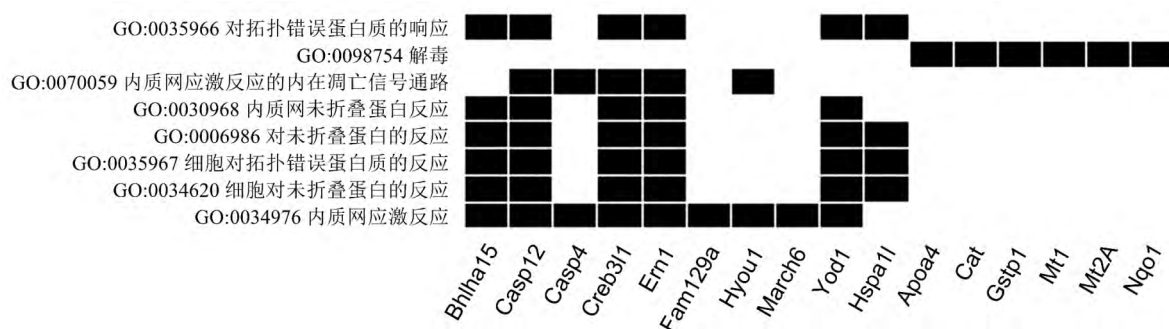


图 2 各组 PC12 细胞凋亡相关基因差异表达维恩图

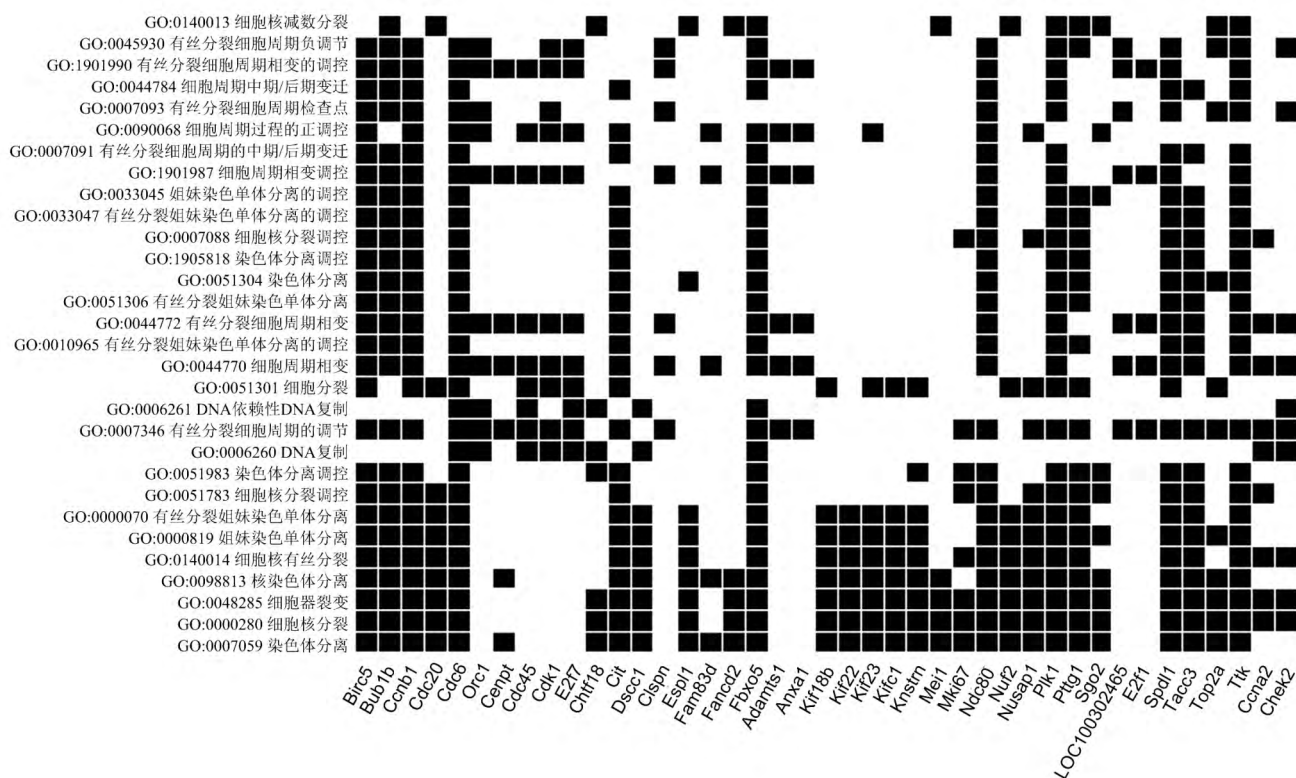
模型组相比,五子衍宗丸组 484 个基因表达上调,121 个基因表达下调。模型组比空白组的上调基因与五子衍宗丸组比模型组的下调基因有 103 个相同,模型组比空白组的下调基因与五子衍宗丸组比模型组的上调基因有 407 个相同,且占差异基因的大部分。也就是说,atRA 与五子衍宗丸对这两部分基因的作用相反,故之后主要对这两个目的基因集进行进一步分析。为了方便描述,将包含 103 个基因的称为基因集 M,将包含 407 个基因的称为基因集 N。

3.3.2 目的基因集 GO 分析结果 为了进一步了解五子衍宗丸作用的分子机制,我们对基因集 M、N 分别进行 GO 富集分析。基因集 M 的 GO 富集分析只在生物过程类有显著富集,且只有“内质网应激反应”“细胞对未折叠蛋白的反应”“内质网应激反应的内在凋亡信号通路”等 8 个 GO 条目(图 3)。基因集 N 的 GO 富集分析在生物过程类有“染色体分离”“细胞核分裂”“细胞周期相变”等 132 个 GO 条目(图 4 为最显著富集的前 30 个条目),细胞组分类有 34 个 GO 条目,分子功能类



注: 基因集 M, 模型组比空白组的上调基因与五子衍宗丸比模型组的下调基因的 103 个相同基因

图 3 基因集 M 显著富集的 GO 条目与基因关系图 ( $P < 0.01$ , BH 校正)



注: GO 条目是显著富集的前 30 个 GO 条目; 基因是出现在不少于 5 个 GO 条目中的基因; 基因集 N, 模型组比空白组的下调基因与五子衍宗丸组比模型组的上调基因的 407 个相同基因

图 4 基因集 N 显著富集的 GO 条目 (生物过程) 与基因关系图 ( $P < 0.01$ , BH 校正)

表 3 基因集 M、N 的 KEGG 通路富集结果 ( $P < 0.05$ , BH 校正)

| ID 号     | 功能描述      | 样本基因<br>比率 | 库基因<br>比率 | $P$ 值<br>(BH 校正) | 基因数 | 样本基因富集到 KEGG 通路上的基因                                                                                                     |
|----------|-----------|------------|-----------|------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| rno04110 | 细胞周期      | 19/238     | 127/8562  | 4.61E-07         | 19  | Orc1, Mcm3, Chek2, Mcm6, Cdc45, Cdc20, Tgfb1, E2f1, Mcm5, Cdc6, Cenb1, Plk1, Esp1, Pttg1, Bub1b, Cdk1, Cenb2, Ccn2, Ttk |
| rno00100 | 类固醇生物合成   | 6/238      | 19/8562   | 0.001158         | 6   | Fdft1, Sqle, Ebp, Dher24, Cyp51, Dher7                                                                                  |
| rno04725 | 胆碱能突触     | 12/238     | 114/8562  | 0.001361         | 12  | Creb3l1, Caenals, Plcb4, Camk4, Gng13, Chrn4, Chrn3, Chat, Kcnq3, Slc18a3, Plcb1, Pik3r5                                |
| rno05031 | 苯丙胺成瘾     | 8/238      | 66/8562   | 0.004311         | 8   | Creb3l1, Arc, Slc18a1, Fosb, Camk4, Calml4, Ppp1r1b, Maob                                                               |
| rno04925 | 醛固酮的合成和分泌 | 11/238     | 98/8562   | 0.004311         | 11  | Creb3l1, Caenals, Plcb4, Ldlr, Atp1b1, Camk4, Atp2b2, Calml4, Atp2b4, Nr4a1, Plcb1                                      |
| rno05146 | 阿米巴病      | 10/238     | 101/8562  | 0.021231         | 10  | Col4a1, Rab7b, Lamb2, Serpinb1a, Actn1, Plcb4, Lamb3, Tgfb1, C9, Plcb1                                                  |

注: 基因集 M, 模型组比空白组的上调基因与五子衍宗丸比模型组的下调基因的 103 个相同基因; 基因集 N, 模型组比空白组的下调基因与五子衍宗丸组比模型组的上调基因的 407 个相同基因

有 6 个 GO 条目显著富集。可以看出 GO 功能主要富集在生物过程类上, 为了找到关键基因, 进一步分析显著富集 GO 条目与基因的关系。图 3、图 4 示, 同一基因出现在不同 GO 条目中的次数较多, 说明该基因参与了多种生物学过程, 很可能是多种生物学过程的枢纽基因, 起关键作用。出现在基因集 M 的 GO 条目中 60% 以上的基因有: Bhlha15, Casp12, Creb3l1, Ern1, Yod1; 出现在基因集 N 的最显著 30 个生物过程类的 GO 条目中 60% 以上的基因有: Birc5, Bub1b, Cenb1, Cdc6, Cit, Fbxo5, Ndc80, Plk1, Pttg1, Spdl1, Tacc3, Ttk。

3.3.3 目的基因集 KEGG 分析结果 将基因集 M、N 中基因进行 KEGG 通路富集分析, 以了解五子衍宗丸作用可能相关的信号通路。表 3 示, “细胞周期”“类固醇生物合成”“胆碱能突触”等通路显著富集, 这些通路基本都与基因集 N 中的基因相关, 单独对基因集 M 进行 KEGG 富集, 无显著富集通路。Tgfb1、Plcb4、Plcb1、Pik3r5、Camk4、Creb3l1 基因与两条 KEGG 通路相关, 可能是关键基因。

3.3.4 五子衍宗丸对 atRA 诱导的 PC12 细胞凋亡相关基因的影响 atRA 诱导的 PC12 细胞是凋亡模型, 因此我们特别关注凋亡相关的基因, 基因集 M、N 与 KEGG 通路 rno 04210 凋亡的 141 个基因比对, 得到 3 个基因 Ern1、Casp12、Birc5。Ern1 和 Casp12 是基因集 M 中的基因, 与内质网相关的凋亡途径相关。Birc5 是基因集 N 中的基因, 是凋亡抑制因子基因家族成员。

3.3.5 共表达网络分析 对基因集 M、N 进行共表达网络分析, 9 个样本聚类后, 空白组、模型

组、五子衍宗丸组每组的 3 个样本聚类, 空白组与五子衍宗丸组也聚类, 说明 atRA 干预的 PC12 细胞在五子衍宗丸的作用下趋向于空白组的状态, 五子衍宗丸对细胞凋亡有一定抑制作用。皮尔森系数法相关系数  $r > 0.8$ 、节点相关度最高的 20 个节点如表 4 所示, 且节点都与 Ern1、Casp12、Birc5 相关。我们着重关注与凋亡基因 Ern1、Casp12、Birc5 相关联的基因 (如图 5), 分析得到 110 个基因, 对这些基因做 KEGG 富集分析, 结果包含 3.3.3 分析得到的“细胞周期”和“类固醇生物合成”KEGG 通路。

表 4 基因集 M、N 共表达网络分析节点相关度最高的节点 (前 20 个)

| 基因      | 节点相关度 | 基因       | 节点相关度 |
|---------|-------|----------|-------|
| Scd     | 440   | Hmgcs1   | 440   |
| Mboat1  | 439   | Nuf2     | 439   |
| Hand2   | 437   | Fads1    | 436   |
| Serine5 | 435   | Rasd1    | 435   |
| Nrn1    | 440   | Cga      | 436   |
| Acat2   | 438   | Ascl1    | 435   |
| Sncb    | 436   | Npepo    | 439   |
| Angpt2  | 435   | Idi1     | 437   |
| Dusp6   | 439   | Serpinb2 | 435   |
| Ncald   | 437   | Nptxr    | 433   |

注: 基因集 M, 模型组比空白组的上调基因与五子衍宗丸比模型组的下调基因的 103 个相同基因; 基因集 N, 模型组比空白组的下调基因与五子衍宗丸组比模型组的上调基因的 407 个相同基因

3.3.6 关键基因筛选 基于以上 GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析、细胞凋亡通路基因比对及共表达网络分析, atRA 诱导的 PC12 细胞凋亡在五子衍宗丸的作用下, 至少在两个分析结果中包含的基因有 Birc5、Ern1、Casp12、Creb3l1, 认定其为关键基因。



GO 条目 “GO: 0034976 内质网应激反应” “GO: 0030968 内质网展开蛋白反应” “GO: 0070059 内质网应激反应的内在凋亡信号通路”，这 3 个 GO 条目都包含基因 *Ern1*、*Casp12*、*Creb3l1*。因此，五子衍宗丸抑制 *atRA* 诱导的 PC12 细胞凋亡很可能是通过调节 *Ern1*、*Casp12*、*Creb3l1* 内质网应激相关的基因，进而影响内质网应激介导的细胞凋亡途径实现。

IAPs 是一个保守的蛋白质家族，也被称为含 BIR 的蛋白质 (BIRCs)，它们中的大多数在过度表达时表现出抗凋亡的特性，而 IAPs 蛋白家族中最小的凋亡抑制因子 *Birc5*/*Survivin* 是一种细胞增殖和分裂调节因子<sup>[27]</sup>。本研究结果中关键基因 *Birc5* 在模型组与空白组比较中下调，五子衍宗丸组与模型组比较中上调，促进细胞存活拮抗凋亡。五子衍宗丸作用下 *atRA* 诱导的 PC12 细胞凋亡的分子机制与基因集 M、N 显著富集到的“染色体分离”“细胞核分裂”“细胞周期相变”等生物过程、“细胞周期”“类固醇生物合成”等 KEGG 通路有一定的相关性。

综上所述，五子衍宗丸可抑制 *atRA* 诱导的 PC12 细胞凋亡，其作用机制是整体性的，与调控内质网应激相关的基因表达相关，下调了内质网应激相关基因 *Ern1*、*Casp12*、*Creb3l1*；与凋亡抑制因子 *Birc5*/*Survivin* 相关，上调了抗凋亡基因 *Birc5*；与“染色体分离”“细胞核分裂”“细胞周期”等细胞增殖、生长和死亡等生物过程或 KEGG 通路相关。因此，我们推测调节细胞凋亡相关基因的表达是五子衍宗丸抑制细胞凋亡进而防治 NTDs 的重要分子机制。但是，明确具体的调控机制还需要在相关通路某些关键节点上进行相关蛋白质、细胞因子等验证。

## 参考文献

- [1] DE MARCO P, MERELLO E, CAMA A, et al. Human neural tube defects: genetic causes and prevention [J]. *Biofactors*, 2011, 37(4): 261-268.
- [2] YAMAGUCHI Y, SHINOTSUKA N, NONOMURA K, et al. Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure [J]. *J Cell Bio*, 2011, 195(6): 1047-1060.
- [3] GREENE ND, COPPA J. Neural tube defects [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2014, 37: 221-242. doi: 10.1146/annurev-neuro-062012-170354.
- [4] CECCONI F, PIACENTINI M, FIMIA GM. The involvement of cell death and survival in neural tube defects: a distinct role for apoptosis and autophagy? [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(7): 1170-1177.
- [5] FUKUDA T, TOKUNAGA A, SAKAMOTO R, et al. *Fbxl10*/*Kdm2b* deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2011, 46(3): 614-624.
- [6] PARKER SE, YAZDY MM, TINKER SC, et al. The impact of folic acid intake on the association among diabetes mellitus, obesity, and spina bifida [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2013, 209(3): 239.e1-e8.
- [7] 樊慧杰, 柴智, 解军, 等. 五子衍宗丸对 ATRA 诱导的神经管畸形防治作用的初探 [J]. *中成药*, 2014, 36(5): 1054-1056.
- [8] 樊慧杰, 李艳彦, 柴智, 等. 五子衍宗丸对 NTDs 胎鼠神经管细胞凋亡的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(9): 143-146.
- [9] CHAI Z, YANG LH, YU BF, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent regulation of SRC-3 and involvement in retinoic acid receptor signaling in embryonic cortical neurons [J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(6): 670-678.
- [10] LIU JG, ZHOU R, HE QR, et al. Calmodulin kinase II activation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cell following all-trans retinoic acid treatment [J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(4): 599-604.
- [11] 刘珊, 代晓南, 崔毓桂, 等. 早期胚胎发育与细胞凋亡 [J]. *国际生育健康/计划生育杂志*, 2014, 33(1): 32-35.
- [12] 王莉, 吕爱平, 王梅, 等. “肾藏精”与生长壮老关系的现代研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(9): 1021-1023.
- [13] 单海军, 曹彩红, 张英英, 等. 补肾开窍祛痰方对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马神经元凋亡基因 *Bcl-2*、*Bax* 及 *Bcl-2/Bax* 比例变化的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(6): 1336-1338.
- [14] 靳贺超, 于文涛, 刘晓, 等. 补肾活血方对血管性痴呆大鼠脑海马细胞凋亡及 ERK2、CREB 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12): 129-135.
- [15] 李莉, 戴宁, 那莎, 等. 五子衍宗丸对实验性少弱精子症大鼠的保护作用与机制研究 [J]. *中华男科学杂志*, 2016, 22(9): 827-833.
- [16] 谭为, 马柯, 周卫东, 等. 五子衍宗丸含药血清对紫杉醇诱导的小肠隐窝细胞 IEC-6 化疗损伤的保护机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(12): 5551-5554.
- [17] QI B, JI Q, WEN Y, et al. Lycium barbarum polysaccharides protect human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis and senescence [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110275.

- [8] SUN SL, GUO L, REN YC, et al. Anti-apoptosis effect of polysaccharide isolated from the seeds of *Cuscuta-chinensis* Lam on cardiomyocytes in aging rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(9): 6117-6124.
- [9] 赵梦岚, 燕波, 刘超, 等. 覆盆子乙酸乙酯部位不同单体对  $H_2O_2$  诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(3): 58-62.
- [20] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495-516.
- [21] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(2): 103-107.
- [22] 李欲轲, 熊孟连, 徐德, 等. 内质网应激与凋亡研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(23): 7856-7862.
- [23] 夏元平, 王立花, 樊燕蓉. 细胞凋亡与内质网应激机制 [J]. *药学与临床研究*, 2010, 18(3): 291-293, 298.

- [24] 张利平, 孟燕, 元小冬, 等. 内质网应激及介导细胞凋亡信号转导研究进展 [J]. *生物医学工程与临床*, 2018, 22(2): 214-220.
- [25] GREENWOOD M, GREENWOOD MP, PATON JF, et al. Transcription factor CREB3L1 regulates endoplasmic reticulum stress response genes in the osmotically challenged rat hypothalamus [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124956.
- [26] SCHÖNTHAL AH. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy [J]. *Scientifica (Cairo)*, 2012, 2012: 857516. doi: 10. 6064/2012/857516.
- [27] DUBREZ-DALLOZ L, DUPOUX A, CARTIER J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(8): 1036-1046.

# Effects of *Wuzi Yanzong Pills* (五子衍宗丸) on the Apoptotic Pathway of Neural Tube Defects Cell Model

LI Ruixue<sup>1</sup>, FAN Huijie<sup>1</sup>, CHAI Zhi<sup>1</sup>, LI Yanrong<sup>1</sup>, SUN Mengying<sup>1</sup>, XIAO Wushuai<sup>1</sup>, YU Jiezhong<sup>2</sup>, LI Yanhua<sup>2</sup>, ZHANG Bo<sup>3</sup>, MA Cungen<sup>1</sup>, ZHOU Ran<sup>1</sup>

(1. Basic Medical College, Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi, 030619; 2. Institute of Brain Science, Datong University, Shanxi Province; 3. Shanxi Health Vocational College)

**ABSTRACT Objective** To explore the possible mechanism of *Wuzi Yanzong Pills* (五子衍宗丸) on apoptotic pathway of neural tube defects (NTDs) cell model. **Methods** PC12 cells were randomly divided into a blank group, a model group and *Wuzi Yanzong Pills* low, medium, high dose group. All groups but the blank group used all-trans retinoic acid (atRA) to intervene PC12 cells to construct NTDs model. The low, medium and high doses of *Wuzi Yanzong Pills* were given RPMI-1640 medium containing *Wuzi Yanzong Pills* and the final concentration was 125, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectively for pre-treatment. The model group and the blank group were added with RPMI-1640 medium. The viability and apoptosis rate of PC12 cells in each group were determined, and the total RNA sequencing of the blank group, the model group and the optimal dose of the *Wuzi Yanzong Pills* group that determined by cell viability and apoptosis rate was extracted. The differentially expressed genes were screened and the target differentially expressed gene set was obtained by Venn diagram, and performed significant enrichment analysis of GO function and KEGG pathway, and also performed co-expressed network analysis of differential genes related to apoptosis. **Results**

The cell viability of PC12 cells in the model group was significantly decreased, and the apoptosis rate was significantly increased. The cell viability of *Wuzi Yanzong Pills* groups were increased, apoptosis rate decreased, and the best result appeared in the *Wuzi Yanzong Pills* low dose group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Target differentially expressed gene set GO functional analysis was significantly enriched into endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis-associated and cell proliferation-related GO entries, and the KEGG pathway analysis significantly enriched the cell growth and death-related signaling pathways. Compared with the model group, the endoplasmic reticulum stress-related genes *Ern1*, *Casp12* and *Creb3l1* were down-regulated in the *Wuzi Yanzong Pills* low-dose group, and the anti-apoptotic gene *Birc5* was up-regulated, which was in the opposite direction to the genes in the model group compared with the blank group. **Conclusion** *Wuzi Yanzong Pills* can inhibit apoptosis, protect neuron-like cells, and its mechanism might be related to the regulation of gene expression related to endoplasmic reticulum stress, and biological processes or signal pathways such as chromosome segregation, cell division, cell cycle and other cell proliferation, growth and death.

**Keywords** *Wuzi Yanzong Pills* (五子衍宗丸); neural tube defects; cell apoptosis; apoptotic pathway; cell proliferation

(收稿日期: 2018-12-05; 修回日期: 2019-04-12)

编辑: 王利芬