

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.17.018

长夏环境中松果腺对大鼠小肠差异基因的影响

刘雷蕾, 马淑然*

北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029

[摘要] **目的** 探讨松果腺在长夏环境中对大鼠肠道基因表达的影响, 从转录组学水平初步揭示“脾应长夏”的物质基础。**方法** 24 只 SD 大鼠随机分为空白组、伪手术组和手术组, 每组 8 只。手术组大鼠结扎矢状静脉、摘除松果腺, 伪手术组大鼠结扎矢状静脉但不摘除松果腺, 空白组不予处理。术后继续饲养 28 天。比较各组大鼠一般状态及粪便粒数、含水率, 采用转录组测序筛选出手术组大鼠小肠组织中显著差异表达基因, 并对差异基因进行 GO 功能的显著性富集分析以及 KEGG 通路的显著性富集分析。**结果** 长夏环境中切除大鼠松果腺后, 手术组大鼠的饮食及活动度有所减少, 体质量明显下降, 24 h 粪便粒数及粪便含水率明显增加 ($P < 0.01$)。测序结果显示, 手术组大鼠肠道组织中呈现出 64 个显著差异表达基因, 上调基因有 20 个, 下调基因有 44 个。GO 功能富集分析结果提示, 这些差异表达基因与 T 细胞活化、淋巴细胞迁移、白细胞与细胞间黏附以及适应性免疫反应等功能相关。KEGG 通路富集分析结果表明这些基因与细胞黏附分子相关途径、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、产生 IgA 的肠道免疫网络、趋化因子信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化以及核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路等相关。**结论** 松果腺可通过调控肠道中 Itgb2、Zap70、Cd40、Tnfrsf13b 和 Icam1 等免疫相关基因的表达, 抑制肠道免疫环境中包括 NF- κ B 信号通路在内的多条免疫途径, 促使机体适应长夏环境, 从而防止腹泻的发生, 提示松果腺是“脾应长夏”的关键所在。

[关键词] 松果腺; 肠道免疫; 脾应长夏; 核因子 κ B; 转录组测序

《素问·宝命全形论篇》曰“天覆地载, 万物悉备, 莫贵于人, 人以天地之气生, 四时之法成”, 说明人体的生理、病理等各项生命活动在一定程度上都受到自然环境变化的影响。前期研究^[1-2]表明, 节气与松果腺的中介调节密切相关, 机体适应自然气候季节变化产生的适应性反应皆与松果腺相关, 松果腺可作为研究自然五时(春、夏、长夏、秋、冬)和人体五脏相应的中介。

《素问·脏气法时论篇》曰“脾主长夏, 足太阴阳明主治。”长夏(夏至一处暑)阳气升发已极, 此时转而向下, 机体气机顺应外界气的运动趋势也呈现出下降内收的特点, 又因长夏时节自然环境以湿热为特点, 湿性重浊趋下, 此时机体赖于脾的升清功能, 增加肠道对水液的吸收代谢, 而不至于形成腹泻^[3]。“脾应长夏”的这一生理特点从理

论上而言与松果腺有关, 但尚未有充分的实验证明松果腺在其中的具体调节机制。本研究基于转录组测序(RNA-seq)技术的肠道组织差异基因表达的研究, 探讨松果腺对脾系统的调控机制, 为进一步揭示“脾应长夏”适应性调节的物质基础提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 6 周龄左右, 体质量 (200 ± 10) g, 购自北京斯贝福实验动物技术有限公司, 实验动物使用许可证号: SCXK(京)2019-0010, 饲养于人工模拟气候箱内。北京位于温暖的温带地区, 属半湿润大陆性季风气候, 夏季炎热多雨^[4], 参考 1970-2012 北京市气象资料^[5], 以及中国气象数据共享服务系统(<http://cdc.nmic.cn/home.do>), 模拟长夏(农历六月)环境温度: 28℃, 相对湿度: 81%, 每日光照时长: 807 min。

1.2 主要仪器及试剂

活芯鼠颅骨钻(GZ-65 型, 北京西浓公司);

基金项目: 国家自然科学基金(81774162); 北京市自然科学基金(7204276); 北京中医药大学基本科研业务费项目(2019-JYB-JS-003)

* 通讯作者: mashuran64@sina.com, 13810398297

电子天平 (BSA224S 型, 德国 Sartorius 公司); 干燥箱 (GZX-9030 型, 上海博迅实业有限公司); 台式离心机 (AG22331 型, 德国 Eppendorf 公司); 涡旋混匀器 (VORTEX-5 型, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 微量紫外分光光度计 (Micro Drop 型, 上海宝予德科学仪器有限公司); 人工模拟气候箱 (NHRHG6 型, 重庆虹瑞试验仪器有限公司)。RNA 提取试剂盒 (上海索莱宝生物科技有限公司, 批号 R6812-02); 10% 水合氯醛 (上海国药集团化学试剂有限公司, 批号 20160225); 氨苄青霉素 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 A7490)。

1.3 动物分组与造模

采用人工模拟气候箱模拟长夏环境, 24 只大鼠适应性饲养 7 d 后, 称量体重录入 Excel 2016 表并生成一组随机数, 将随机数按照升序排列后依次分为空白组、伪手术组和手术组, 每组 8 只。手术组大鼠用 10% 水合氯醛 (0.4 ml/100 g) 腹腔注射麻醉后剪开头顶部正中皮肤, 暴露颅骨矢状缝和人字缝, 用活芯鼠颅骨钻揭开骨片, 结扎矢状静脉两端后从中间切断, 用微型镊摘除松果腺, 按压止血, 缝合创口, 敷以氨苄青霉素 0.1 g 预防感染。伪手术组大鼠结扎矢状静脉但不摘除松果腺。空白组不予处理。各组大鼠皆重新置于人工模拟气候箱内, 给予充足的饮水和基础饲料, 继续饲养 28 天。

1.4 大鼠一般状态观察

实验期间大鼠均以组分笼饲养, 自由摄食、饮水, 分别于术前及术后第 7、14、28 天称量大鼠体重, 每天观察大鼠的皮毛整洁度、饮食变化、活动情况和粪便状态, 以评价大鼠基础生存状态。

1.5 大鼠粪便含水量的测算

于手术前 1 天和术后第 28 天分别收集大鼠 24 h 粪便, 称量其湿重, 并计数 1 g 湿粪便中的粪便粒数, 进而以滤纸吸干所有粪便水分后放置于干燥箱内, 于 80℃ 的干燥条件下烘干后称取其干重^[6], 计算粪便含水率, 粪便含水率 = (粪便湿重 - 粪便干重) / 粪便湿重 × 100%。

1.6 RNA-seq 转录组学测序及分析

于实验结束后统一断颈处死大鼠, 剖腹取 1 cm 小肠组织存于液氮中, 后研磨组织并按照 RNA 提取试剂盒操作说明提取小肠组织中总 RNA; 以微量紫外分光光度计检测 RNA 纯度 (OD260/OD280 比值); 以片段化的 mRNA 为模版, 用 AMPureXP-beads 筛选 250 ~ 300 bp 左右的 cDNA, 进行 PCR 扩增及纯化而获得文库; 库检合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求池化后进行

Illumina 测序, 本次测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

使用 DESeq2 软件比较组间的差异表达分析 (每个组 3 个生物学重复); 并将所有比较组的差异基因取并集之后作为差异基因集, 采用 R 包中的热图函数 pheatmap 包对基因的 FPKM 值进行层次聚类分析, 表达模式相近的基因或样本会被聚集在一起; 基于已知和预测蛋白质-蛋白质相互作用的 STRING 数据库, 使用 diamond 将目标基因序列与选择的参考蛋白序列进行比对, 获得差异基因蛋白相互作用网络数据文件并用 Cytoscape 3. X 软件进行可视化编辑; 通过 ClusterProfiler 3. 4. 4 软件实现差异表达基因的 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间样本均数比较采用单因素方差分析, 均采用双侧检验, 检验水准 $P = 0.05$ 。

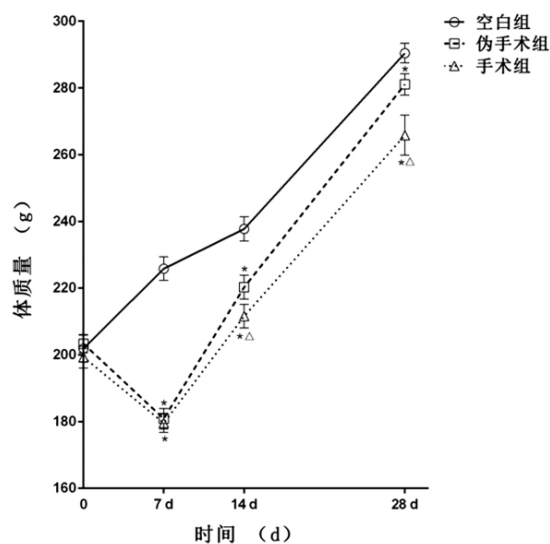
2 结果

2.1 各组大鼠一般状态观察结果

空白组大鼠皮毛整洁, 饮食正常, 体质量逐日增加, 排便正常。术后第 7 天, 与空白组大鼠相比, 伪手术组和手术组大鼠行动迟缓, 皮毛不洁, 饮食较少, 体质量明显减少 ($P < 0.01$), 排便减少。术后第 14 天开始, 伪手术组和手术组大鼠行动逐渐恢复, 皮毛较整洁, 饮食逐渐恢复, 与术前比较, 体质量逐渐增加, 排便量增加; 与伪手术组大鼠相比, 手术组大鼠饮食及活动度较少, 体质量明显减小 ($P < 0.01$)。术后第 28 天, 与伪手术组相比, 手术组大鼠饮食及活动度较少, 体质量明显减少 ($P < 0.01$), 排便量少, 且有部分大鼠可见稀软便。各组大鼠体质量比较见图 1。

2.2 各组大鼠术前及术后 28 天 24 h 粪便粒数和含水率比较

表 1 示, 与本组术前比较, 术后 28 天空白组大鼠粪便粒数明显增加 ($P < 0.01$), 粪便含水率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 伪手术组大鼠粪便粒数和粪便含水率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 手术组大鼠粪便粒数和含水率均显著增加 ($P < 0.01$)。术后 28 天, 与空白组比较, 伪手术组和手术组大鼠粪便粒数均明显减少, 手术组粪便含水率显著增加 ($P < 0.01$)。术后 28 天, 手术组较伪手术组大鼠粪便含水率显著增加 ($P < 0.01$)。



注：与空白组同时间比较，* $P < 0.01$ ；与伪手术组同时间比较， $\Delta P < 0.01$

图 1 各组大鼠不同时间体质量比较

表 1 各组大鼠不同时点 24 h 粪便含水率和粒数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	含水率 (%)	粒数
空白组	术前	8	47.14 ± 5.19	13.22 ± 1.39
	术后 28 天	8	44.57 ± 3.38	16.95 ± 1.59*
伪手术组	术前	8	43.91 ± 4.65	13.28 ± 1.57
	术后 28 天	8	43.25 ± 2.31	14.33 ± 1.07 Δ
手术组	术前	8	45.64 ± 4.22	12.43 ± 1.41
	术后 28 天	8	53.87 ± 2.32* Δ	14.62 ± 1.48* Δ

注：与本组术前比较，* $P < 0.01$ ；与空白组术后 28 天比较， $\Delta P < 0.01$ ；与伪手术组术后 28 天比较， $\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠小肠组织差异表达基因聚类分析

以多重假设检验校正后的 $P < 0.05$ ，且 $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$ 为筛选标准，发现与空白组相比，伪手术组大鼠肠道组织中呈现出 46 个差异表达基因，其中上调基因有 27 个，下调基因有 19 个；而切除松果腺后大鼠小肠组织中呈现出 64 个差异基因，上调基因有 20 个，下调基因有 44 个。手术组与伪手术组比较，大鼠小肠组织中呈现出 81 个差异基因，上调基因有 27 个，下调基因有 54 个。并通过聚类发现，伪手术组和空白组可以聚在一起，初步表明伪手术组基因与空白组基因表达情况相近。

2.4 差异基因相互作用网络分析

应用 STRING 数据库对手术组和空白组差异基因进行互作网络的分析，初步预测切除松果腺后的肠道差异基因相互作用情况。通过进一步分析发现处于较为核心的位置的部分基因 Rac2 (基因 ID: ENSRNOG00000007350)、RhoA (基因 ID: ENSRNOG00000002540) 和 Itgb2 (基因 ID: EN-

SRNOG00000001224) 等主要涉及的生物学途径与炎症反应、免疫调节反应以及核因子 κB (NF- κB) 信号传导的调节等相关。

2.5 GO 功能显著性富集分析结果

为了进一步探索松果腺切除后所呈现出的差异基因与哪些生物学功能相关，本实验对鉴定到的各组间的差异基因通过 GO 综合性数据库进行了富集分析，以 $P < 0.05$ 为显著性富集的阈值，找出了各组间差异基因显著性富集的生物过程、细胞组成和分子功能。结果发现，手术组与空白组相比，在生物学功能上主要表现为肠道免疫相关的生物过程显著上调，如 T 细胞活化、淋巴细胞迁移、白细胞与细胞间黏附以及适应性免疫反应等，其中涉及上调的关键基因有 Slamf1、Zap70、Cd40、Tnfsf13b 和 Icam1 (详见表 2)。伪手术组与空白组相比，本次注释未见有显著差异的生物学功能 ($P > 0.05$)。

表 2 手术组与空白组大鼠小肠组织差异基因 GO 注释部分结果

注释类别	P 值	描述	基因名称
生物过程	<0.001	T 细胞活化	Slamf1 ↑, RhoA ↑, Tnfsf8 ↑, Cdc88b ↑, Satb1 ↑, Tcf7 ↑, Zap70 ↑, Sirpa ↑, Fzd5 ↓, Tmem131 ↑, Lat ↑, Gpr183 ↑, Egr3 ↑, Nfkbid ↑, Nlr3 ↑, Itk ↑, Rasgrp1 ↑, RT1-DOa ↑, Icam1 ↑, Itgal ↑, Tnfrsf4 ↑, Rac2 ↑, Cd5 ↑, Ly9 ↑, Icos ↑, Apbb1p ↑, Vav1 ↑, Msn ↑, Bcl6 ↑, Lig4 ↑, Dusp10 ↑, Ebi3 ↑, Ptpre ↑, Fyn ↑, Il7r ↑, Tgfb1 ↑, Cd4 ↑, Dock8 ↑, Efnb3 ↑, Spn ↑, Runx1 ↑, Tnfsf13b ↑, Cd80 ↑, Ccl21 ↑, Tnfsf9 ↑
生物过程	<0.001	淋巴细胞迁移	Klrl1 ↑, Itga4 ↑, Gpr183 ↑, Ccl20 ↑, Gcsam ↑, Madcam1 ↑, Il27ra ↑, LOC290595 ↓, Itgb3 ↑, Myo1g ↑, Ccl7 ↑, Msn ↑, Cxcr3 ↑, Cxcl13 ↑, Slpr1 ↑, Itgb7 ↑, Dock8 ↑, Spn ↑, Ccl9 ↑, Ccl21 ↑
生物过程	<0.001	白细胞与细胞间黏附的正调控	Slamf1 ↑, Cdc88b ↑, Itgb2 ↑, Zap70 ↑, Sirpa ↑, Itga4 ↑, Tmem131 ↑, Egr3 ↑, Nfkbid ↑, Ets1 ↑, Madcam1 ↑, Rasgrp1 ↑, Seema4d ↑, Icam1 ↑, Itgal ↑, Rac2 ↑, Cd5 ↑, Icos ↑, Msn ↑, Bcl6 ↑, Skap1 ↑, Dusp10 ↑, Itgb7 ↑, Ptpre ↑, Il7r ↑, Tgfb1 ↑, Cd4 ↑, Dock8 ↑, Efnb3 ↑, Runx1 ↑, Tnfsf13b ↑, Cd80 ↑, Ccl21 ↑, Tnfsf9 ↑
生物过程	<0.001	适应性免疫反应	Slamf1 ↑, Gent3 ↓, Sh2d1a ↑, Unc13d ↑, Klrl1 ↑, Inpp5d ↑, Fzd5 ↓, Adey7 ↑, Lat ↑, Gpr183 ↑, Rftn1 ↑, Nfkbid ↑, Mef2c ↑, Itk ↑, Il27ra ↑, Lta ↑, Myo1g ↑, Ly9 ↑, Bcl6 ↑, Cd40 ↑, Gzmm ↓, Nlrp10 ↑, AABR07065656.3 ↓, RT1-N2 ↑, Tnfaip3 ↑, Skap1 ↑, Serping1 ↑, Lig4 ↑, Dusp10 ↑, Ptpre ↑, Il7r ↑, Tgfb1 ↑, Prkd2 ↑, Cd4 ↑, Cd226 ↑, RT1-A2 ↓, Tnfsf13b ↑, RT1-N3 ↑

注：↓表示基因下调，↑表示基因上调

表 3 手术组与空白组大鼠小肠组织差异基因 KEGG 注释部分结果

KEGG 通路 ID	描述	P 值	基因名称
mo04514	细胞黏附分子 (CAMs) 相关途径	<0.001	LOC108348139 ↓, Itgb2 ↑, Itga4 ↑, Ntng2 ↑, Cdh15 ↑, Ntng1 ↑, Madcam1 ↑, RT1-DOa ↑, Icam1 ↑, Icam2 ↑, Itgal ↑, Selplg ↑, Icoslg ↑, Icos ↑, Cd40 ↑, Cntnap1 ↑, Cd6 ↑, RT1-N2 ↑, Itgb7 ↑, Ptpre ↑, Cd4 ↑, Cd226 ↑, Spn ↑, RT1-A2 ↓, Nfasc ↑, RT1-N3 ↑, Cd80 ↑
mo04650	自然杀伤细胞介导的细胞毒性	<0.001	Itgb2 ↑, Zap70 ↑, Sh2d1a ↑, Prkcb ↑, Pik3cd ↑, Klrk1 ↑, Nfatc1 ↑, Lat ↑, Plcg2 ↑, Nfatc2 ↑, Icam1 ↑, Icam2 ↑, Itgal ↑, Rac2 ↑, Gzmb ↑, Lep2 ↑, Vav1 ↑, Gzmb12 ↓, Fyn ↑, Prkeg ↑
mo04672	产生 IgA 的肠道免疫网络	<0.001	LOC108348139 ↓, Itga4 ↑, Madcam1 ↑, RT1-DOa ↑, Icoslg ↑, Icos ↑, Cd40 ↑, Itgb7 ↑, Tgfb1 ↑, Tnfsf13b ↑, Cd80 ↑
mo04062	趋化因子信号通路	0.001	Rasgrp2 ↑, Prkcb ↑, Pik3cd ↑, Jak3 ↑, Adcy7 ↑, Pik3cg ↑, Ccl20 ↑, Itk ↑, Rac2 ↑, Ccl7 ↑, Gnai1 ↓, Elmo1 ↑, Adey4 ↑, Vav1 ↑, Pik3r5 ↑, Fgr ↑, Cxcr3 ↑, Nefl ↑, Cxcl13 ↑, Plcb2 ↑, Ccl9 ↑, Ccl21 ↑
mo04658	Th1 和 Th2 细胞分化	0.012	LOC108348139 ↓, Notch2 ↑, Zap70 ↑, Nfatc1 ↑, Il2rg ↑, Jak3 ↑, Lat ↑, RT1-DOa ↑, Nfatc2 ↑, Rbpjl ↑, Runx3 ↑, Cd4 ↑
mo04064	核因子 κB (NF-κB) 信号通路	0.018	Zap70 ↑, Prkcb ↑, Lat ↑, Plcg2 ↑, Lta ↑, Icam1 ↑, Birc3 ↑, LOC103694381 ↑, Cd40 ↑, Tnfai3 ↑, Tnfsf13b ↑, Ccl21 ↑

注: ↓表示基因下调, ↑表示基因上调

因此, 可以认为上述差异主要与松果腺摘除相关。

2.6 KEGG 通路显著性富集分析结果

为了进一步研究大鼠松果腺摘除后引起的肠道显著改变的基因参与的主要的代谢途径或生物信号转导通路, 本实验通过 KEGG 数据库, 以 $P < 0.05$ 作为显著性富集的阈值, 找出了各组间差异基因显著性富集的通路。结果发现, 与空白组相比, 手术组主要表现为肠道免疫相关生物信号转到通路上调, 如细胞黏附分子相关途径、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、产生 IgA 的肠道免疫网络、趋化因子信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化以及 NF-κB 信号通路等, 其中涉及上调的关键基因有 Pik3cd、Itgb2、Lat、Zap70、Cd40、Tnfsf13b 和 Icam1 等 (详见表 3)。伪手术组与空白组相比, 本次注释未见有显著差异的免疫相关信号途径 ($P > 0.05$)。因此, 认为上述免疫信号通路的差异主要与松果腺摘除相关。

3 讨论

长夏是夏季向秋季过渡时段, 此时节气候炎热, 降水较多, 天气下而地气腾, 湿热蕴蒸, 万物华实。脾与长夏相应, 其气主升, 此时节其升清之力相对增强, 可及时输布水湿, 不至于使湿气太过; 反之若脾气虚弱, 升清之力不足, 则易被湿邪所困, 清气不升则生飧泻。现代研究^[7]证实, 松果腺是关联人体与自然界并使之相适应的一个关键中介, 且松果腺分泌的褪黑素与长夏季节脾脏生理、病理模型的主要分子有深刻的内在联系, 可见脾的这种在长夏时节的适应性调节也与松果腺相关。

《素问·奇病论篇》曰 “夫五味入口, 藏于胃, 脾为之行其津液”; 《素问·经脉别论篇》亦

指出 “饮入于胃, 游溢精气, 上输于脾, 脾气散精, 上归于肺, 通调水道, 下输膀胱, 水精四布, 五经并行”, 可见脾在水液运输方面具有主导作用, 脾的这一作用与肠道对水分的吸收密切相关。长夏为泄泻高发时节, 其关键病机是脾虚湿困。有学者对泄泻患者中医证候季节性分布进行分析后发现, 夏秋季节患者的泄泻症状集中表现为泻下不爽、大便黏腻, 其病机是脾不能及时运化水液, 为湿所困而导致泄泻^[8]。本研究结果显示, 长夏环境中切除大鼠松果腺后, 大鼠的饮食及活动度有所减少, 体质量与同期伪手术组大鼠相比明显下降, 排便量也比同期空白组大鼠明显减少, 且有部分大鼠可见稀软便, 进一步测定后可以发现切除松果腺后的大鼠其粪便含水率明显增加, 这些生理指标提示切除松果腺影响到肠道对水液的吸收。因此, 结合上述长夏水液代谢异常与脾主运化水液的功能相关的依据, 可以从宏观上认为脾在长夏环境中的这种适宜性调节功能与松果腺有内在联系。

肠道是脾系统中参与吸收运化的主要器官, 为了进一步从微观上探究这种内在联系, 本实验进一步采用 RNA-seq 技术对大鼠肠道基因表达情况进行了检测及分析。从研究结果来看, 伪手术组与空白组相比基因表达差异不大, 且可以聚类在一起, 说明手术创伤在本实验中对大鼠并未造成显著影响。而手术组大鼠切除松果腺后, 与空白组相比, 其基因表达差异较多, 并且通过初步网络相互作用分析发现, 主要差异表达基因有 Rac2、Rhoh 和 Itgb2 等。Rac2 属于 Rho GTP 酶超家族的 Rac 亚家族, 在免疫介导的小肠疾病乳糜泻中异常表达, 且

可通过肿瘤坏死因子 (TNF) 介导的信号传导和 I- κ B 激酶/NF- κ B 信号传导途径影响疾病的进展^[9]; 该基因还通过调控 T 细胞迁移、分化和凋亡等免疫过程影响炎症性肠病的发生^[10]。Rho 编码的蛋白是一个 21 kDa 的 G 蛋白, 同样也属于 Rho GTP 酶超家族的 Rac 亚家族成员。Itgb2 与肠黏膜免疫和防御反应相关, 在发炎的结肠圆形平滑肌细胞中 Itgb2 显著上调, 同样也参与了炎症性肠病的发生^[11]。

对测序结果进行生物信息学分析后发现, 大鼠切除松果腺后包括 T 细胞活化、淋巴细胞迁移、白细胞与细胞间黏附以及适应性免疫反应等肠道免疫相关的生物过程都显著上调, 其中显著上调的基因有 Slamf1、Zap70、Cd40、Tnfsf13b 和 Icam1 等。通过 KEGG 数据库进一步发现手术切除松果腺后可以激活细胞黏附分子相关途径、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、产生 IgA 的肠道免疫网络、趋化因子信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化以及 NF- κ B 信号通路, 这些通路中显著上调的基因同样涉及 Itgb2、Zap70、Cd40、Tnfsf13b 和 Icam1 等。信号淋巴细胞激活分子家族成员 Slamf1 是一种免疫球蛋白样受体, 是多种免疫细胞中启动信号转导网络的共刺激分子, 参与了 Toll 样受体 4 介导的干扰素 β 途径和巨噬细胞对革兰氏阴性细菌的捕杀^[12-13]。Syk 家族激酶 ζ 链相关蛋白激酶 Zap70 是导致 T 细胞活化的 T 细胞受体信号传导机制的重要组成部分, 可通过磷酸化 T 细胞和 SLP-76 的衔接蛋白接头将信号向下游传导^[14], Zap70 的磷酸化还可激活下游的 NF- κ B 信号通路, 介导炎症反应^[15]。研究指出, 颅脑外伤会导致肠道中 NF- κ B 的活化, 产生炎症反应, 而损伤肠黏膜, 而在 NF- κ B 的活化中 Cd40 起着主要作用^[16]。由此可见, 松果腺摘除同样促进了肠道中 NF- κ B 的活化。此外, 本研究结果显示, 富集到的编码 B 细胞激活因子的 Tnfsf13b 基因和介导黏附反应的重要黏附分子 Icam1 也都参与了肠道 NF- κ B 的活化。

临床上腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 患者常在夏秋季节因湿热刺激诱发或加重^[17], 多因脾胃功能虚弱不能够适应长夏湿热环境所致。现代研究指出, 经典的 NF- κ B 激活途径在 IBS-D 发生中起关键作用, 一旦 NF- κ B 被激活, 形成 NF- κ B 复合物, 可与肠上皮细胞膜上的水通道蛋白启动子的特定 κ B 元件结合, 从而抑制其表达, 而导致水液吸收障碍, 增加粪便含水量或形成腹泻^[18]。又有研

究^[19]指出, 由松果腺产生的褪黑素对改善肠道蠕动、缓解局部炎症反应以及减轻内脏感觉有重要作用, 临床以睡前使用 3 mg 褪黑素作为标准试验剂量治疗 IBS-D, 可有效改善患者的生活质量。综合本实验研究结果可以推测, 松果腺可通过调控肠道中 Itgb2、Zap70、Cd40、Tnfsf13b 和 Icam1 等免疫相关基因的表达, 抑制肠道免疫环境中包括 NF- κ B 信号通路在内的多条免疫途径, 促使机体适应长夏环境, 从而防止腹泻的发生。

综上, 本实验观察了长夏环境中大鼠肠道水液吸收转运的作用与松果腺的关系, 并初步揭示了长夏环境中松果腺介导的大鼠肠道基因表达情况及调控机制, 松果腺主要是通过调节肠道免疫相关基因和生物学途径而发挥作用, 为进一步揭示“脾应长夏”的科学内涵奠定了基础, 也为临床防治长夏时节腹泻疾病提供一种新思路。然而, 松果腺是通过何种途径实现对肠道免疫相关基因的调控尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张明泉, 王亚利, 郭霞珍, 等. 褪黑素在中医学天人相应理论中的地位和作用 [J]. 新中医, 2009, 41(3): 10-11.
- [2] 袁卫玲, 马淑然, 郭霞珍, 等. 不同节气对松果腺摘除大鼠褪黑素的影响 [J]. 中医杂志, 2011, 52(8): 686-688.
- [3] 覃骊兰, 马淑然, 刘燕池. 中医“脾主长夏”理论内涵的探讨 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(8): 1815-1820.
- [4] MA P, WANG S, ZHOU J, et al. Meteorological rhythms of respiratory and circulatory diseases revealed by Harmonic Analysis [J]. Heliyon, 2020, 6(5): e04034.
- [5] YAN L, WANG H, ZHANG X, et al. Impact of meteorological factors on the incidence of bacillary dysentery in Beijing, China: A time series analysis (1970-2012) [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182937.
- [6] 王志凡, 马慧, 陈旺盛, 等. 高脂饮食对 SD 大鼠排便状况和粪便菌群的影响及其意义 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2014, 40(4): 734-738.
- [7] 梁红娟, 常瑞华, 季新燕, 等. 褪黑素与“脾应长夏”理论的关系及机理初探 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(9): 1226-1229.
- [8] 苏芳静. 急性腹泻中医证候季节性分布规律的临床研究 [J]. 中医临床研究, 2015, 7(32): 4-6.
- [9] RICAÑO-PONCE I, GUTIERREZ-ACHURY J, COSTA AF, et al. Immunochip meta-analysis in European and Argentinian populations identifies two novel genetic loci associated with celiac disease [J]. Eur J Hum Genet, 2019. DOI: 10.1038/s41431-019-0520-4.

- [10] RAMZI F, CONG-HUI G, LAM GY, et al. Rac2-Deficiency leads to exacerbated and protracted colitis in response to *Citrobacter rodentium* infection [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61629.
- [11] HARRIS RA, NAGY-SZAKAL D, MIR SA, et al. DNA methylation-associated colonic mucosal immune and defense responses in treatment-naïve pediatric ulcerative colitis [J]. *Epigenetics*, 2014, 9(8): 1131–1137.
- [12] WANG G, VAN DRIEL BJ, LIAO G, et al. Migration of myeloid cells during inflammation is differentially regulated by the cell surface receptors Slamf1 and Slamf8 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121968.
- [13] YURCHENKO M, SKJESOL A, RYAN L, et al. SLAMF1 is required for TLR4-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling in human macrophages [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(4): 1411–1429.
- [14] GOODFELLOW HS, FRUSHICHEVA MP, JI Q, et al. The catalytic activity of the kinase ZAP-70 mediates basal signaling and negative feedback of the T cell receptor pathway [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(377): ra49. doi: 10.1126/scisignal.2005596.
- [15] HU J, LUO T, XI D, et al. Silencing ZAP70 prevents HSP65-induced reverse cholesterol transport and NF- κ B activation in T cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 271–277. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.082.
- [16] HU YC, WANG F, ZHANG DD, et al. Expression of intestinal CD40 after experimental traumatic brain injury in rats [J]. *J Surg Res*, 2013, 184(2): 1022–1027.
- [17] 李勤, 丰芬, 李源, 等. 肠易激综合征的流行病学研究近况 [J]. *湖南中医杂志*, 2014, 30(3): 143–145.
- [18] CHAO G, ZHANG S. Aquaporins 1, 3 and 8 expression in irritable bowel syndrome rats' colon via NF- κ B pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47175–47183.
- [19] SIAH KT, WONG RK, HO KY. Melatonin for the treatment of irritable bowel syndrome [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(10): 2492–2498.

Effects of Pineal Gland on Differential Genes in Small Intestines of Rat under the Long Summer Environment

LIU Leilei, MA Shuran

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029

ABSTRACT Objective To explore the effects of pineal gland on the expression of intestinal gene in rats in long summer, and to reveal the material basis of “spleen corresponding to long summer” from the level of transcriptomics.

Methods A total of 24 SD rats were randomly divided into a blank group, a sham operation group and an operation group, with 8 rats in each group. Rats in the operation group were ligated the sagittal vein and removed the pineal gland, rats in the sham operation group were ligated the sagittal vein but did not remove the pineal gland, and the blank group was not treated. The rats were raised for 28 days after operation. The general condition of rats in each group and the number of feces and water content were compared. Transcriptome sequencing was used to screen out the significantly differentially expressed genes in the small intestine tissue of the rats in the operation group, and the significant enrichment analysis of GO function and the KEGG pathway of the differential genes were performed. Significant enrichment analysis. **Results** After excision of rat pineal gland in long summer environment, the diet and activity of the rats in the operation group were decreased, and their body weight were decreased significantly, while the 24-hour defecation amount and fecal water content increased significantly ($P < 0.01$). Sequencing results showed that there were 64 significant differential genes in the intestinal tissue of the operation group, with 20 up-regulated genes and 44 down-regulated genes. GO functional enrichment analysis indicated that these differentially expressed genes were associated with T cell activation, lymphocyte migration, leukocyte and intercellular adhesion, and adaptive immune response. KEGG pathway enrichment analysis revealed that these genes were associated with cell adhesion molecule-related pathways, natural killer cell-mediated cytotoxicity, IgA-producing intestinal immune network, chemokine signaling pathway, Th1 and Th2 cell differentiation, and NF- κ B signaling pathway. **Conclusion** The pineal gland can inhibit the expression of immune related genes such as *Itgb2*, *Zap70*, *Cd40*, *Tnfrsf13b* and *Icam1* in the intestinal tract, and inhibit multiple immune pathways in the intestinal immune environment, including NF- κ B signal path. The pineal gland can promote the body to adapt to the long summer environment and prevent diarrhea, indicating that pineal gland is the key to the “spleen corresponding to long summer”.

Keywords pineal gland; intestinal immunity; spleen corresponding to long summer; nuclear factor κ B; transcriptome sequencing

(收稿日期: 2019-10-24; 修回日期: 2020-02-13)

[编辑: 王利芬]