

基于 lncRNA-mRNA 共表达网络探讨党参增强衰老小鼠免疫功能的机制

陈冬梅¹, 刘佳佳¹, 蒙洁¹, 康甲超¹, 段永强², 王晶¹(1. 甘肃中医药大学临床医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学基础医学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 基于对小鼠脾脏长链非编码 RNA(lncRNA)、信使 RNA(mRNA)表达谱的检测, 探讨中药党参增强衰老小鼠免疫功能的分子机制。**方法** 将 100 只昆明种小鼠随机分为对照组、模型组和党参低、中、高剂量组(5、10、15 g·kg⁻¹); 采用每日颈背部皮下注射 D-半乳糖溶液(1.25 mg·g⁻¹)建立衰老小鼠模型; 党参组每日按上述剂量灌胃给药, 给药体积 20 mL·kg⁻¹, 对照组和模型组给予等量生理盐水; 连续造模、给药 42 d。给药结束后, 测定脾脏质量和体质量, 计算脾脏脏器系数; 采用 HE 染色法对脾脏组织进行病理学观察, 以透射电镜观察脾脏组织超微结构; 采用基因芯片技术筛选组间差异表达的 lncRNAs 和 mRNAs, 并对差异基因进行通路富集分析; 选取组间差异表达的共同 lncRNAs 和 mRNAs 进行 lncRNA-mRNA 共表达网络构建, 并采用实时荧光定量 PCR 法对网络中的基因表达进行验证。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠的脾脏质量和脏器系数明显降低($P < 0.01$); 脾脏组织出现病理改变, 淋巴细胞发生变异、自噬及凋亡; 共有 96 个 lncRNAs 和 65 个 mRNAs 在衰老后发生了显著变化; Enpp6、Cped1、Galnt15 基因表达上调。与模型组比较, 党参低、中、高剂量组小鼠的脾脏质量和脏器系数均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 党参对衰老小鼠脾脏组织病理变化及细胞超微结构有明显改善作用; 共有 623 个 lncRNAs 和 435 个 mRNAs 在高剂量党参干预后出现表达差异; 差异基因的 KEGG 通路富集主要与免疫过程、免疫疾病相关, 包括同种异体移植物排斥反应、移植物抗宿主病、自身免疫性甲状腺疾病、抗原处理及呈递等; 党参高剂量组的 Enpp6、Cped1、Galnt15 基因表达下调($P < 0.01$)。**结论** 党参对衰老小鼠脾脏具有一定的保护作用, lncRNA-mRNA 共表达网络可能在党参增强衰老小鼠免疫过程中发挥重要作用。

关键词: 党参; 衰老; 免疫; 基因芯片技术; 长链非编码 RNA(lncRNA); 信使 RNA(mRNA); 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)03-0307-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.03.002

Study on the Mechanism of *Codonopsis pilosula* Enhancing Immune Function of Aging Mice Based on lncRNA-mRNA Co-expression Network

CHEN Dongmei¹, LIU Jiajia¹, MENG Jie¹, KANG Jiachao¹, DUAN Yongqiang², WANG Jing¹(1. School of Clinical Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000 Gansu, China; 2. School of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000 Gansu, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of *Codonopsis pilosula* in enhancing the immune function of aging mice, the expression profiles of long-chain non-coding RNA (lncRNA), messenger RNA (mRNA) in spleen of mice were detected. **Methods** One hundred Kunming mice were randomly divided into control group, model group and *Codonopsis pilosula* low, medium and high dose groups (5, 10, 15 g·kg⁻¹). The aging mouse model was established by subcutaneous injection of 1.25 mg·g⁻¹ D-galactose solution into the back of the neck. The *Codonopsis pilosula* group was given intragastric administration according to the above doses every day, and the administration volume was 20 mL·kg⁻¹, while the control group and model group were given the same amount of normal saline. The above model was made continuously for 42 days. The body weight and weight of spleen were

收稿日期: 2020-06-05

作者简介: 陈冬梅, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药分子药理学研究。Email: 2753161828@qq.com。通信作者: 王晶, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 甘肃道地药材在衰老、肿瘤和生殖等疾病中的应用研究。Email: jwang_2017@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760835, 82060829); 甘肃省高等学校科学研究一般项目(2018A-052)。

measured and the organ coefficient of spleen was calculated. The pathology of spleen was observed by HE staining and the ultrastructure of spleen tissue was observed by transmission electron microscope. The differentially expressed lncRNAs and mRNAs between groups were screened by gene chip technology and the pathway enrichment analysis of differentially expressed genes was performed. The common differentially expressed lncRNAs and mRNAs between groups were selected for lncRNA-mRNA co-expression network construction, and Real-time fluorescence quantitative PCR was used to verify the genes in the network. **Results** Compared with the control group, the spleen weight and organ coefficient in the model group were significantly decreased ($P < 0.01$). The spleen tissue showed pathological changes, the lymphocytes underwent mutation, autophagy and apoptosis. A total of 96 lncRNAs and 65 mRNAs showed significant changes; the expression of Enpp6, Cpel1, Galnt15 increased. Compared with the model group, the spleen weights and organ coefficients in the low, medium and high dose *Codonopsis pilosula* groups were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). *Codonopsis pilosula* significantly improved the pathology and cellular ultrastructure of spleen in aging mice. The results of chip analysis showed that compared with the control group, 96 lncRNAs and 65 mRNAs changed significantly after aging, and compared with the model group, 623 lncRNAs and 435 mRNAs expressed differentially after high-dose *Codonopsis pilosula* treatment ($P < 0.05$). KEGG pathways involved in aging and high-dose *Codonopsis pilosula* treatment are mainly related to immune process and immune disease, including allograft rejection, graft-versus-host disease, autoimmune thyroid disease, antigen processing and presentation, and so on. The expression of Enpp6, Cpel1 and Galnt15 in the high-dose *Codonopsis pilosula* group was down-regulated compared with the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Codonopsis pilosula* has a certain protective effect on the spleen of aging mice and the lncRNA-mRNA co-expression network may play an important role in enhancing the immunity of aging mice.

Keywords: *Codonopsis pilosula*; aging; immunity; gene chip technology; long chain non-coding RNA (lncRNA); messenger RNA (mRNA); mice

2020年新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的大流行已成为一项重大的全球健康危机^[1],严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)对所有人群都具有易感性,年龄较大是重要的危险因素^[2],这与老年人的免疫力低下密切相关。因此,增强老年人的免疫力显得至关重要。中药党参具有健脾补肺、养血润肺的功效^[3],其药理作用广泛,主要集中在增强免疫、增强造血功能、调节血压、调节血糖、保护胃肠道、抗应激、抗溃疡等方面^[4],但其增强老年人免疫功能的分子机制尚不清楚。

衰老使机体的免疫功能下降,而脾脏是人体最大的外周免疫器官,负责启动对血源性抗原的免疫反应,过滤外来物质和衰老或受损的红细胞^[5]。长链非编码RNA(lncRNA)是一种内源性的细胞RNA转录本,长度在200~100 000个核苷酸之间^[6]。lncRNA可在转录或转录后水平对信使RNA(mRNA)产生调控作用,从而影响下游蛋白的翻译,发挥其生理病理功能^[7]。基于此,本研究拟建立衰老小鼠模型,通过对小鼠脾脏进行lncRNA和mRNA表达谱检测并整体

构建lncRNA-mRNA共表达网络,以探讨中药党参增强衰老小鼠免疫功能的分子机制,为党参增强老年人免疫功能的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物 昆明种小鼠100只,雌雄各半,SPF级,2月龄,体质量(20 ± 2)g,购自甘肃中医药大学科学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(甘)2015-0002。

1.2 药物及试剂 党参,采自甘肃岷县,经甘肃中医药大学中药资源教研室杜弢教授鉴定合格。取100g党参,第1次用10倍量水煎煮1h,第2次用6倍量水煎煮1h;将2次提取液混合、过滤、浓缩至含 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 原药材的水煎剂,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存;党参水煎剂每隔5d制备1次。D-半乳糖(批号:Lot#SLBD7045V),美国Sigma公司,使用前用生理盐水配制成 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。

1.3 主要仪器 CX31型光学显微镜,日本奥林巴斯公司;JEM-1230型透射电子显微镜,日本JEOL公

司; Agilent G2565CA 型生物芯片扫描仪, 美国安捷伦公司; QuantStudio™ 7 Flex RealTime PCR 仪, 美国应用生物系统公司。

1.4 分组、模型复制及给药 将 100 只小鼠随机分为对照组、模型组和党参低、中、高剂量组(5、10、15 g·kg⁻¹), 每组 20 只, 雌雄各半。模型复制方法及党参给药剂量按照张帆等^[8]的研究进行设计。模型组及党参低、中、高剂量组大鼠每日颈背部皮下注射 5%D-半乳糖溶液(50 mg·mL⁻¹), 注射量为 0.025 mL·g⁻¹, 对照组注射等量生理盐水。党参低、中、高剂量组按上述剂量灌胃给药(20 mL·kg⁻¹), 每日 1 次, 对照组和模型组给予等量生理盐水。按以上方案连续造模、给药 42 d。

1.5 脾脏质量及脏器系数测定 实验结束后, 每组小鼠均测定体质量, 然后用颈椎脱臼法将小鼠处死, 解剖取脾脏, 称定质量。计算: 脾脏脏器系数(%)=脾脏质量(g)/体质量(g)×100%。

1.6 脾脏组织病理学观察 小鼠处死后取脾脏, 用 4%多聚甲醛溶液浸泡, 在室温下固定。常规脱水和石蜡包埋后, 进行组织病理学切片(3 μm)。脱蜡洗涤后进行苏木精-伊红(HE)染色, 封片后在光学显微镜下观察。

1.7 透射电镜观察脾脏组织超微结构 取小鼠脾脏, 切成约 1 mm³的小块, 放入预冷的 2.5%戊二醛溶液中, 在 4 ℃下固定过夜。经 PBS 漂洗 3 次, 以 1% Osmic 酸染色、脱水、浸泡、包埋、聚合后, 切成 70 nm 片状, 复染后用透射电镜观察。

1.8 基因芯片技术检测组间差异表达 lncRNAs 及 mRNAs 采用 Trizol 试剂从对照组、模型组及党参高剂量组小鼠(*n*=3)的脾脏组织中提取总 RNA^[9]。利用 CapitalBio Technology Mouse LncRNA Array v1.0 (4×180 K)芯片检测小鼠物种的基因表达谱, 整个实验过程严格按照北京博奥晶典生物技术有限公司的微阵列芯片实验指南进行。采用 Agilent G2565CA 型生物芯片扫描仪对清洗后的芯片进行扫描, 得到杂交图片; 采用 Agilent Feature Extraction(v10.7)软件对杂交图片进行分析并提取数据。然后, 使用 Agilent GeneSpring 软件对数据进行归一化处理 and 差异分析。最后, 选择差异倍数(FC)绝对值 > 2 和 *P* < 0.05 的 lncRNAs 及 mRNAs 作为差异表达基因。lncRNA 及 mRNA 微阵列数据已经上传至 GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 登录号:GSE150773。

1.9 功能富集分析 采用 KOBAS (KEGG Orthology Based Annotation System)平台对差异表达 mRNAs 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。GO 富集分析包括生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)。以 *P* < 0.05 为 GO 条目和 KEGG 通路显著富集。

1.10 lncRNA-mRNA 共表达网络的构建 选取党参高剂量组相比于模型组和模型组相比于对照组中共同的差异 lncRNAs 和 mRNAs; 根据 lncRNA 和 mRNA 的表达量, 计算 lncRNA 和 mRNA 之间的皮尔森相关系数, 选择相关系数 > 0.8 和 *P* < 0.05 的共表达关系对; 使用 Cytoscape 3.6.1 软件进行网络的构建和可视化处理。

1.11 实时荧光定量 PCR 法测定 mRNAs 表达 采用 Trizol 试剂提取对照组、模型组和党参高剂量组小鼠(*n*=3)脾脏组织中的总 RNA, 用分光光度计定量, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。采用 Sybrgreen 荧光染料法对总 RNA 进行定量检测。采用随机引物进行逆转录, 反应条件: 65 ℃ 5 min, 然后在冰上冷却至少 2 min; 25 ℃ 10 min, 37 ℃ 1 h。进行逆转录终止反应, 反应条件: 70 ℃ 10 min, 4 ℃保持。然后进行定量 PCR 检测, 反应体系为 20 μL; 反应条件: 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCT}法计算基因的相对表达量, 以 GAPDH 为内参进行标准化处理。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

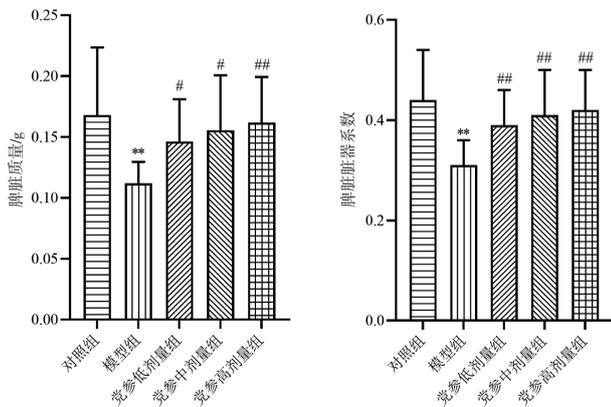
Table 1 Sequences of primers used in quantitative PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	Forward primer: GTTGCTCTCTGCGACTTCA	182
	Reverse primer: TGGTCCAGGGTTTCTTACTC	
Enpp6	Forward primer: TCAACTGGGAAGGAGCGGAA	128
	Reverse primer: CCATTCTGAAGGAAAAGAAAAC	
Cped1	Forward primer: ACCCAGGGTGAAGTACGGAA	112
	Reverse primer: TGTGCCGTCCCATTTGTGATA	
Galnt15	Forward primer: CTGTGGAGGTTCCACCAGAT	62
	Reverse primer: TTGCTCTCTGTAAGGTCGTT	

1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较用 LSD 检验; 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 党参对衰老模型小鼠脾脏质量及脏器系数的影响 结果见图 1。与对照组比较, 模型组小鼠的脾脏质量和脏器系数显著降低, 差异有统计学意义



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

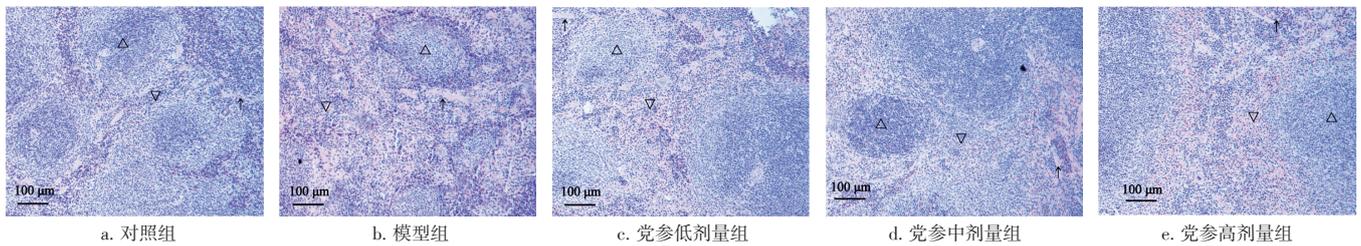
图 1 党参对衰老模型小鼠脾脏质量和脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Figure 1 Effects of *Codonopsis pilosula* on spleen weight and organ coefficient in aging model mice ($\bar{x} \pm s, n=20$)

($P < 0.01$)；与模型组比较，党参低、中、高剂量组小鼠的脾脏质量和脏器系数明显升高，差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。结果表明，衰老模型建立成功，而党参对衰老小鼠脾脏有保护作用。

2.2 党参对衰老模型小鼠脾脏组织病理形态学的影响

结果见图 2。对照组小鼠脾脏结构完整，白髓、红髓清晰，脾小梁未见增生。与对照组比较，模型组小鼠脾脏白髓与红髓边界不清，脾小梁明显增生。与模型组比较，党参低剂量组脾脏白髓和红髓边界不清，脾小梁增生；党参中剂量组脾脏白髓和红髓边界清晰，脾小梁增生减轻；党参高剂量组脾脏白髓和红髓边界清晰，脾小梁未见增生。随着党参剂量的增加，衰老小鼠脾脏组织病理形态逐渐恢复正常。结果表明，党参对衰老小鼠的脾脏组织病理变化有明显改善作用。



注：Δ表示白髓；▽表示红髓；↑表示脾小梁

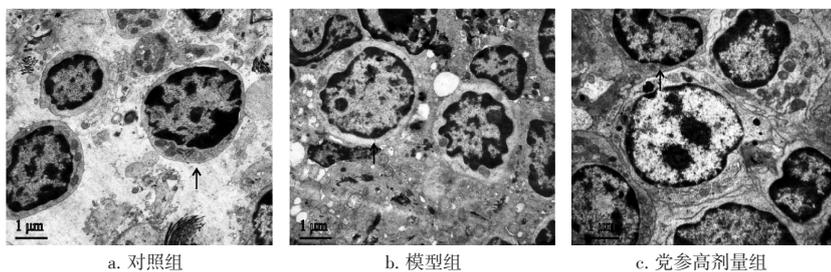
图 2 党参对衰老模型小鼠脾脏组织病理形态学的影响(HE 染色, $\times 10$)

Figure 2 Effect of *Codonopsis pilosula* on spleen histomorphology of aging model mice(HE staining, $\times 10$)

2.3 党参对衰老模型小鼠脾组织超微结构的影响

结果见图 3。对照组小鼠脾脏组织结构正常，可见淋巴细胞。与对照组比较，模型组小鼠脾脏组织的淋巴细胞发生变异、自噬(有自噬泡)及凋亡。与模型

组比较，党参高剂量组小鼠脾脏组织的自噬、凋亡细胞数量减少。结果表明，党参对衰老小鼠脾组织细胞超微结构有改善作用。



注：↑表示淋巴细胞

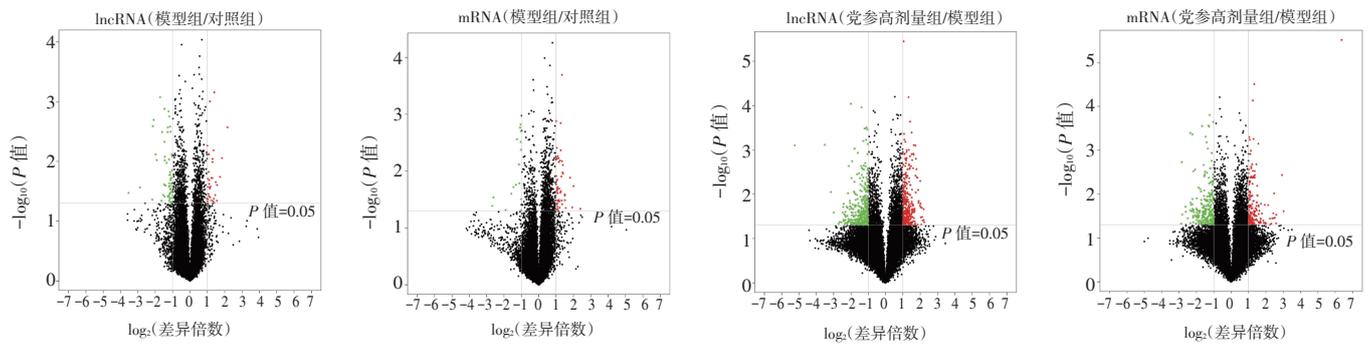
图 3 党参对衰老模型小鼠脾脏组织超微结构的影响($\times 10\ 000$)

Figure 3 Effect of *Codonopsis pilosula* on ultrastructure of spleen tissue in aging model mice($\times 10\ 000$)

2.4 党参对衰老模型小鼠脾脏组织 lncRNA 及 mRNA 表达谱的影响

根据 $|FC| > 2, P < 0.05$ 为条件筛选出差异基因，结果见图 4、表 2、表 3。火山图显示了各组之间存在差异表达的 lncRNAs 和 mRNAs。与对照组比较，模型组有 96 个差异表达的

lncRNAs，其中 35 个上调，61 个下调；有 65 个差异表达的 mRNAs，其中 49 个上调，16 个下调。与模型组比较，党参高剂量组有 623 个差异表达的 lncRNAs，其中 297 个上调，326 个下调；有 435 个差异表达的 mRNAs，其中 178 个上调，257 个下



注：红色表示上调基因，绿色表示下调基因

图 4 差异表达 lncRNAs 及 mRNAs 的火山图

Figure 4 Volcano plots showing differentially expressed lncRNAs and mRNAs

表 2 共同 lncRNAs 的表达情况

Table 2 The expression of common lncRNAs

lncRNA ID	差异倍数(模型组/对照组)	P 值(模型组/对照组)	差异倍数(党参高剂量组/模型组)	P 值(党参高剂量组/模型组)
gil755517696lreflXR_377576.2l	4.42 ↓	0.002 6	3.00 ↑	0.018 2
NONMMUT003133	2.43 ↓	0.003 2	2.27 ↑	0.003 7
NONMMUT010811	2.32 ↓	0.026 4	3.03 ↑	0.018 2
NONMMUT037918	2.74 ↓	0.008 4	2.17 ↑	0.013 2
NONMMUT018366	2.14 ↓	0.048 3	2.77 ↑	0.002 3
rilB230105C15lPX00068P17l2507	2.76 ↓	0.038 7	3.68 ↑	0.008 1
rilD130097K18lPX00187M19l1687	2.27 ↓	0.016 8	2.50 ↑	0.026 2
gil755491011lreflXR_864923.1l	3.31 ↑	0.018 1	3.85 ↓	0.021 3
NONMMUT050420	2.36 ↑	0.018 9	2.41 ↓	0.025 1
rilA730021F12lPX00149K22l943	2.03 ↑	0.019 6	2.56 ↓	0.005 1
NONMMUT057337	2.46 ↑	0.010 2	3.35 ↓	0.038 7
NONMMUT049631	2.15 ↑	0.023 8	4.01 ↓	0.000 1

注：↑表示上调；↓表示下调

表 3 共同 mRNAs 的表达情况

Table 3 The expression of common mRNAs

基因简称	差异倍数(模型组/对照组)	P 值(模型组/对照组)	差异倍数(党参高剂量组/模型组)	P 值(党参高剂量组/模型组)
Cd47	2.03 ↓	0.004 2	2.09 ↑	0.046 6
Enpp6	2.38 ↑	0.023 9	3.47 ↓	0.024 1
Zbtb16	4.02 ↑	0.018 4	4.50 ↓	0.003 0
Lamc3	2.40 ↑	0.001 4	3.18 ↓	0.000 3
Cyp26b1	2.63 ↑	0.011 1	2.69 ↓	0.021 8
Vmn1r183	2.13 ↑	0.019 0	3.67 ↓	0.007 1
Ston1	2.21 ↑	0.005 9	2.63 ↓	0.003 3
Lepr	2.60 ↑	0.010 6	2.99 ↓	0.019 8
Ldhd	2.54 ↑	0.000 2	2.93 ↓	0.003 9
Pdk4	2.96 ↑	0.044 4	2.15 ↓	0.014 7
Map3k6	2.24 ↑	0.006 9	2.02 ↓	0.036 6
Cped1	2.06 ↑	0.003 9	2.66 ↓	0.000 7
Trmp1	3.49 ↑	0.013 0	3.24 ↓	0.017 1
Galnt15	2.08 ↑	0.006 1	2.28 ↓	0.005 4

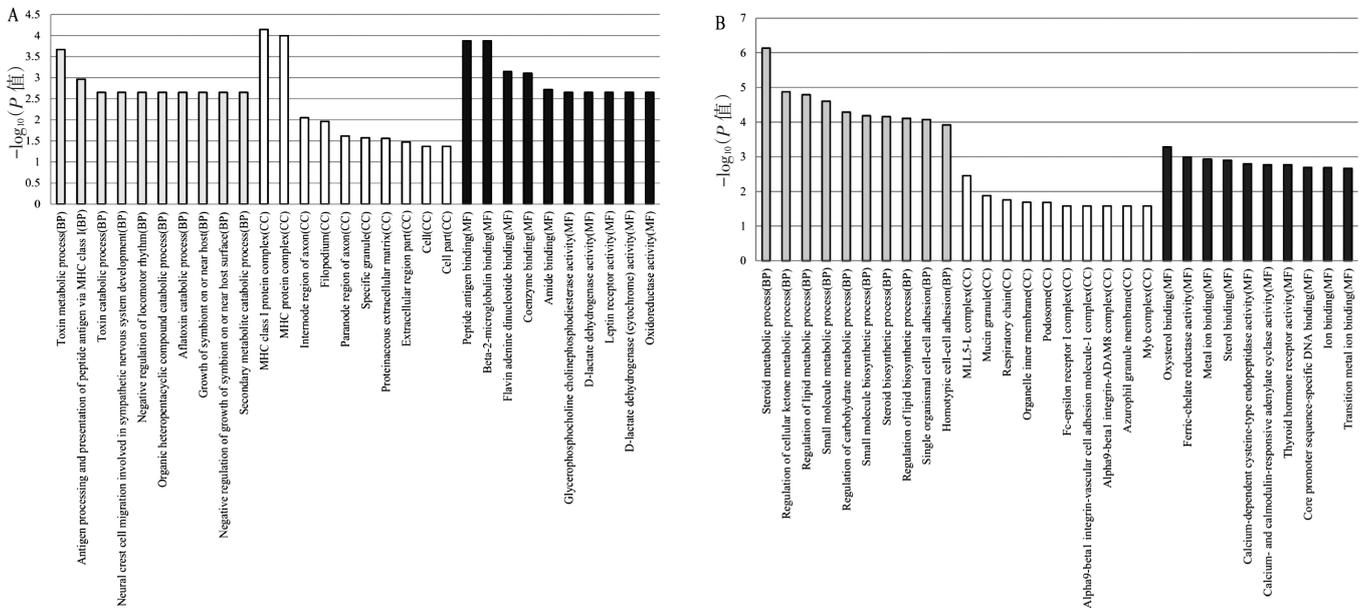
注：↑表示上调；↓表示下调

调。在党参高剂量组相比于模型组和模型组相比于对照组中，有 12 个共同的 lncRNAs 和 14 个共同的 mRNAs，这些共同基因在党参高剂量组相比于对照组无明显变化。结果表明，党参干预可以逆转衰老引起的小鼠脾脏基因表达的变化。

2.5 党参对衰老模型小鼠脾脏组织差异表达 mRNAs 的功能富集分析 结果见图 5、图 6。模型组与对照组比较，显著富集的 GO 条目是毒素代谢过程、MHC I 类蛋白复合物、肽抗原结合(图 5-A)；显著富集的 KEGG 通路是同种异体移植排斥反应、移植

物抗宿主病、自身免疫性甲状腺疾病(图 6-A)。党参高剂量组与模型组比较，显著富集的 GO 条目是类固醇代谢过程、MLL5-L 复合物、氧化甾醇结合(图 5-B)；显著富集的 KEGG 通路是癌症转录失调、癌症途径、萜类主干生物合成(图 6-B)。

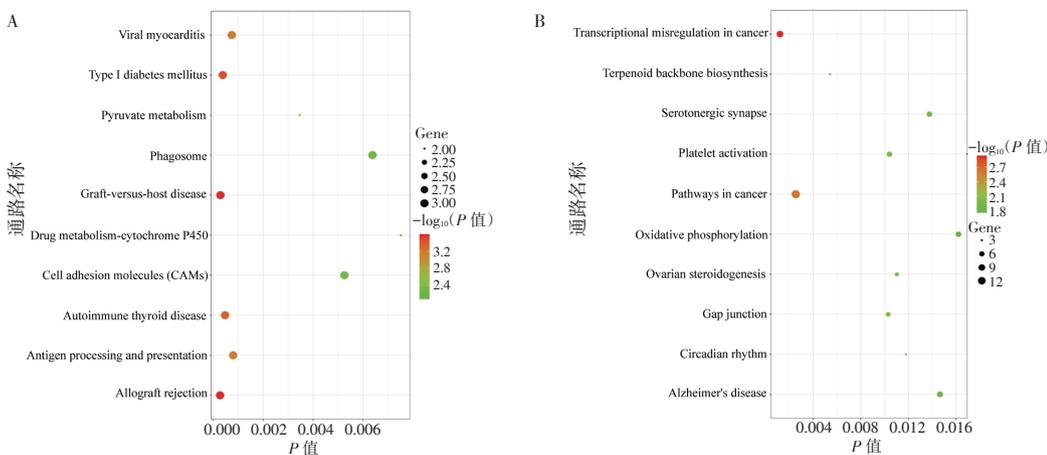
2.6 lncRNA-mRNA 共表达网络 结果见图 7。根据相关系数 > 0.8 和 $P < 0.05$ 筛选，lncRNA-mRNA 共表达网络共包括 38 对 lncRNA-mRNA 相互作用关系，其中包括 11 个(6 个上调和 5 个下调)lncRNAs 和 14 个(1 个上调和 13 个下调)mRNAs。



注：A. 模型组与对照组比较；B. 党参高剂量组与模型组比较。前 10 个显著富集的 GO 条目，包括生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)

图 5 组间差异表达 mRNAs 的 GO 富集分析

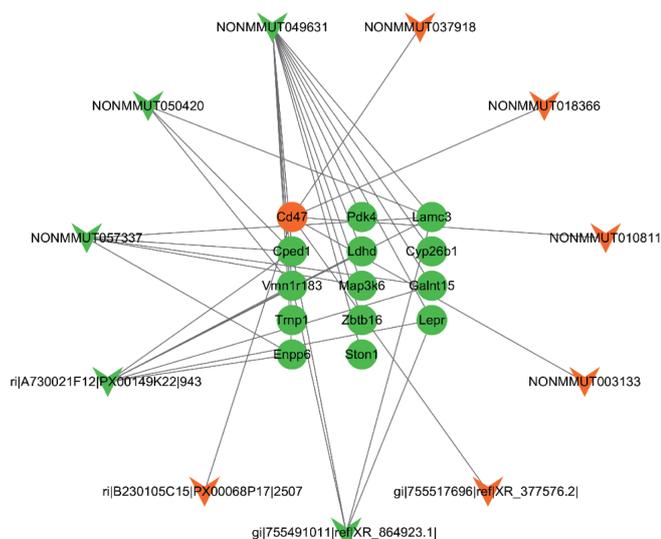
Figure 5 GO enrichment analysis of differentially expressed mRNAs between groups



注：A. 模型组与对照组比较；B. 党参高剂量组与模型组比较

图 6 显著富集的前 10 条 KEGG 通路

Figure 6 KEGG pathway analysis of the top 10 significantly enriched pathways



注：箭头代表 lncRNA；圆圈代表 mRNA。橘黄色代表上调；绿色代表下调

图 7 lncRNA-mRNA 共表达网络

Figure 7 lncRNA-mRNA co-expression network

2.7 党参对衰老模型小鼠脾脏组织差异 mRNAs 表达的影响

根据 lncRNA-mRNA 共表达网络中节点的 Degree 值和芯片分析的差异倍数变化，采用实时荧光定量 PCR 方法检测了 3 个 mRNAs：Enpp6、Cpeb1、Galnt15，结果见图 8。与对照组比较，模型组小鼠脾脏组织的 Enpp6、Cpeb1、Galnt15 基因表达显著上调 ($P < 0.01$)；与模型组比较，党参高剂量组小鼠脾脏组织的 Enpp6、Cpeb1、Galnt15 基因表达均显著下调 ($P < 0.01$)。所得结果与基因芯片分析结果一致。

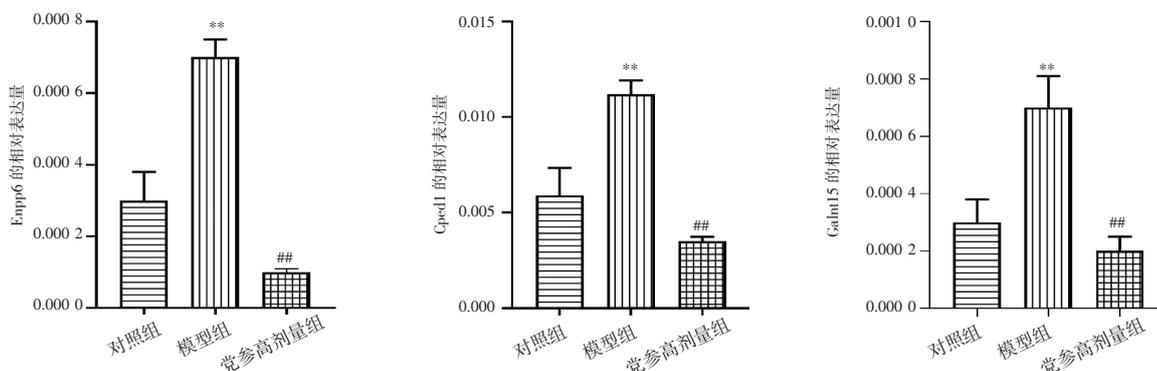
3 讨论

党参作为一种重要的药食同源中药，具有良好的

免疫调节作用^[10]。有研究^[11]表明，从党参中提取的果胶多糖可能通过 TCR/CD28 信号通路促进 T 细胞活化，从而发挥其免疫刺激作用。Deng 等^[12]发现党参多糖干预可以维持免疫功能紊乱小鼠的 T 细胞平衡。Fu 等^[13]研究表明，党参在免疫抑制，特别是在黏膜免疫损伤的保护和抑制病原菌定植方面能够发挥重要作用。本课题组前期运用网络药理学方法进行探讨，发现党参中的免疫活性成分可能通过调控 TNF、RELA、IL-10、IL-6 等靶点，以及 T 细胞受体信号通路、NOD 样受体信号通路等多个途径发挥增强机体免疫功能的作用^[14]。

研究表明，衰老小鼠可表现出明显的器官萎缩和脏器系数降低^[15-16]。本研究证实，与对照组比较，衰老小鼠的脾脏质量和脏器系数明显降低。脾脏是人体最大的外周免疫器官，是 T、B 淋巴细胞主要的定居场所，衰老引起的脾脏萎缩必然会影响机体的体液及细胞免疫功能^[17]。党参干预后，脾脏质量和脏器系数显著升高，表明党参对衰老小鼠的脾脏具有保护作用。本研究还从脾脏组织病理学形态和细胞超微结构 2 个方面证实了党参对衰老小鼠脾脏的保护作用。研究表明，衰老小鼠的脾脏白髓与红髓边界不清^[18]，脾小梁明显增生^[19]，脾脏中淋巴细胞数量减少^[20]，与本研究结果一致。经党参干预后，衰老小鼠脾脏白髓和红髓边界清晰，脾小梁未见增生，自噬、凋亡细胞数量减少。

基因芯片分析结果显示，模型组与对照组比较，有 96 个差异表达 lncRNAs 和 65 个差异表达 mRNAs；党参高剂量组与模型组比较，有 623 个差异表达 lncRNAs 和 435 个差异表达 mRNAs。差异表达 mRNAs 涉及的 KEGG 通路主要和免疫过程、免疫



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图 8 党参对衰老模型小鼠脾脏组织差异 mRNAs 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 8 Effect of *Codonopsis pilosula* on differential mRNAs expression of spleen tissue in aging model mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

疾病相关,包括同种异体移植排斥反应、移植抗宿主病、自身免疫性甲状腺疾病、抗原处理及呈递等。脾脏是人体最大的免疫器官,在免疫功能的调节中发挥重要的作用^[21],表明这些免疫相关通路可能在党参增强衰老小鼠免疫力中发挥关键作用。

选取组间比较获得的共同差异基因进行 lncRNA-mRNA 共表达网络的构建,并对其中 3 个 mRNAs (Enpp6、Cped1、Galnt15)进行实时荧光定量 PCR 实验验证,结果与微阵列芯片分析结果一致,同时也证明了微阵列芯片结果的可靠性。Enpp6 是一种胆碱特异性磷酸二酯酶,能水解含有胆碱的化合物,作为一种生理底物参与胆碱代谢^[22-23]。研究^[22]发现,Enpp6 在肝窦的内皮细胞和发育中的少突胶质细胞中特异性表达。Cped1 是一种功能未知的非特征性基因,其在小鼠组织和细胞系包括骨和骨细胞中广泛表达^[24]。同样,目前尚无有关 Galnt15 分子功能的相关研究报道。本研究结果显示,Enpp6、Cped1、Galnt15 可能与党参提高衰老小鼠免疫力有关。

此外,共表达网络中的其他 lncRNAs 和 mRNAs 可能也在党参增强衰老小鼠免疫过程中发挥作用。lncRNA NONMMUT010811、NONMMUT018366 在小鼠脾脏组织中表达较高^[25]。本研究显示,lncRNA NONMMUT010811、NONMMUT018366 在衰老小鼠脾脏组织中表达下调,而在党参干预后表达上调。Zbtb16 是一种转录因子,参与调节多种生物学过程,包括细胞增殖、分化、干细胞维持、器官发育和先天免疫细胞发育^[26]。在免疫系统中,Zbtb16 的表达仅存在于先天细胞中^[27]。Zbtb16 对 NKT 细胞几乎所有的独特特性(包括它们对抗原的快速而有效的反应)都至关重要。本课题组前期研究^[28]也发现,Zbtb16 在衰老小鼠的肺脏中同样高表达。CD47 是一种具有免疫调节功能的细胞受体,通过与其配体相互作用,调节巨噬细胞的吞噬作用,中性粒细胞的转运和树突状细胞、T 细胞以及 B 细胞的激活^[29]。有研究^[30]表明,瘦素/瘦素受体(LEPR)途径在氧化应激诱导以及免疫和炎症反应中具有潜在作用。根据瘦素的多功能作用,完全活跃的 LEPR 亚型不仅在下丘脑表达,参与能量稳态,而且也存在于外周组织、造血细胞和所有类型的免疫细胞中,包括参与先天免疫和适应性免疫^[31]。

综上所述,党参干预能提高衰老小鼠的脾脏质量及其脏器系数,改善衰老小鼠脾脏组织病理形态和细胞超微结构变化,而 lncRNA-mRNA 共表达网络

可能在党参增强衰老小鼠免疫过程中发挥了重要作用。本研究结果可为党参增强老年人的免疫功能机制研究提供参考,但具体的分子机制还需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] GENG Y J, WEI Z Y, QIAN H Y, et al. Pathophysiological characteristics and therapeutic approaches for pulmonary injury and cardiovascular complications of coronavirus disease 2019[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2020, 47: e107228.
- [2] SHEN N, ZHU Y, WANG X, et al. Characteristics and diagnosis rate of 5,630 subjects receiving SARS-CoV-2 nucleic acid tests from Wuhan, China[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(10): e137662.
- [3] GAO S M, LIU J S, WANG M, et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Codonopsis*: a review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 50-70.
- [4] 王涵,林红强,谭静,等.党参药理作用及临床应用研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(7): 21-22, 24.
- [5] CESTA M F. Normal structure, function, and histology of the spleen [J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(5): 455-465.
- [6] DUNHAM I, KUNDAJE A, ALDRED S F. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome[J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 57-74.
- [7] 廖江铨,王阶,刘咏梅,等.高通量测序筛选冠心病血瘀证相关 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(19): 28-33.
- [8] 张帆,王岚,车敏,等.甘肃党参水提物对衰老模型小鼠脑细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(19): 2807-2809.
- [9] GUO Y N, LUO B, CHEN W J, et al. Comprehensive clinical implications of homeobox A10 in 3,199 cases of non-small cell lung cancer tissue samples combining qRT-PCR, RNA sequencing and microarray data[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(1): 45-66.
- [10] BAI R B, ZHANG Y J, FAN J M, et al. Immune-enhancement effects of oligosaccharides from *Codonopsis pilosula* on cyclophosphamide induced immunosuppression in mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11(4): 3306-3315.
- [11] ZHANG P, HU L, BAI R, et al. Structural characterization of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula* and its immunomodulatory activities *in vivo* and *in vitro*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104: 1359-1369.
- [12] DENG X, FU Y, LUO S, et al. Polysaccharide from *Radix Codonopsis* has beneficial effects on the maintenance of T-cell balance in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: e108682.
- [13] FU Y P, FENG B, ZHU Z K, et al. *Codonopsis pilosula* the polysaccharides from modulates the immunity and intestinal microbiota of cyclophosphamide-treated immunosuppressed mice[J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1801-1814.
- [14] 陈冬梅,蒙洁,刘佳佳,等.基于网络药理学的党参增强免疫功

- 能机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(2): 184-187, 288-289.
- [15] DU H M, WANG Y J, LIU X, et al. Defective central immune tolerance induced by high-dose D-galactose resembles aging[J]. *Biochemistry Mosc*, 2019, 84(6): 617-626.
- [16] CHEN P, CHEN F, ZHOU B. Author correction: antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of ellagic acid in liver and brain of rats treated by D-galactose[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): e19129.
- [17] 苏韞, 刘永琦, 吴建军, 等. 锁阳对衰老模型大鼠脾淋巴细胞转化能力、脾病理学变化及血清SOD、MDA、NO水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(8): 927-929.
- [18] 张晶, 邵月, 张力恒, 等. 人参皂苷Rg1缓解D-半乳糖致衰老大鼠脾损伤[J]. *基础医学与临床*, 2015, 35(10): 1308-1313.
- [19] 陈志宏, 程丽梅, 张宏凯, 等. 中药天年饮对脾衰老的延缓作用研究[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(13): 1650-1653.
- [20] FLAHERTY D K, WAGNER C A, GROSS C J, et al. Aging and lymphocyte subsets in the spleen and peripheral blood of the Sprague-Dawley rat[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1997, 19(2): 185-195.
- [21] LI Y, JIANG W, LI Z Z, et al. Repetitive restraint stress changes spleen immune cell subsets through glucocorticoid receptor or β -adrenergic receptor in a stage dependent manner[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1108-1114.
- [22] MORITA J, KANO K, KATO K, et al. Structure and biological function of ENPP6, a choline-specific glycerophosphodiester-phosphodiesterase[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: e20995.
- [23] MORITA J, KATO K, MIHARA E, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp6[J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2014, 70(6): 794-799.
- [24] MAYNARD R D, GODFREY D A, MEDINA-GOMEZ C, et al. Characterization of expression and alternative splicing of the gene cadherin-like and PC esterase domain containing 1 (Cped1) [J]. *Gene*, 2018, 674: 127-133.
- [25] ZHAO Y, LI H, FANG S, et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 203-208.
- [26] JIN Y, NENSETH H Z, SAATCIOGLU F. Role of PLZF as a tumor suppressor in prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 71317-71324.
- [27] ZHANG S, LAOUAR A, DENZIN L K, et al. Zbtb16(PLZF) is stably suppressed and not inducible in non-innate T cells via T cell receptor-mediated signaling[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: e12113.
- [28] CHEN D, LIU J, MENG J, et al. Integrative analysis of long non-coding RNAs(lncRNAs), miRNAs, and mRNA-Associated ceRNA network in lung tissue of aging mice and changes after treatment with codonopsis pilosula[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e921580.
- [29] HAYAT S M G, BIANCONI V, PIRRO M, et al. CD47: role in the immune system and application to cancer therapy[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43(1): 19-30.
- [30] ZHAO Z, PENG W, ZHOU J, et al. Association of LEPR polymorphisms with predisposition and inflammatory response in anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a pilot prospective investigation in Western Chinese Han population[J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 75: e103970.
- [31] MARTÍN-GONZÁLEZ J, PÉREZ-PÉREZ A, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, et al. Leptin receptor is up-regulated in inflamed human dental pulp[J]. *J Endod*, 2013, 39(12): 1567-1571.

(编辑: 邹元平)