

癫痫大鼠海马组织的转录组学特征分析

黄亚辉¹, 匡卫平¹, 朱勇¹, 王琴¹, 卢军¹, 张熙², 贺冰³, 杨萍¹

1. 湖南省脑科医院神经外科, 湖南长沙 410007

2. 湖南中医药大学临床医学院, 湖南长沙 410208

3. 湖南中医药大学附属第二医院中医科, 湖南长沙 410007

摘要:目的 探究癫痫的转录组学特征,寻找癫痫诊治的潜在靶点。方法 选取雄性幼龄SD大鼠17只,采用抽签法随机将大鼠分为2组:对照组(8只)、CSRS组(9只)。基于氯化锂-匹罗卡品构建的慢性自发性癫痫(CSRS)大鼠模型,取CSRS大鼠及对照组大鼠海马组织进行转录组测序(RNA-seq),并对信使RNA(mRNA)及微小RNA(miRNA)进行差异分析、信号通路富集分析及差异表达蛋白互作用网络构建寻找核心调控基因。结果 对照组及CSRS组的mRNA进行差异分析获得的354个差异表达基因(DEGs),信号通路富集分析DEGs与离子转运调控、组织发育、应激反应等相关。蛋白互作网络分析发现WDR88、SHANK2、TEC、NFKB1Z、EPHA8等为DEGs中主要的核心调控基因。同时获得差异表达miRNA,并进行靶基因预测及GO通路富集分析,发现靶基因主要与离子型谷氨酸受体复合物、谷氨酸受体活性、谷氨酸盐化的钙离子通道活性、NF- κ B诱导激酶活性等分子功能相关。结论 基于RNA-seq发现差异基因表达异常是癫痫发生的重要原因,是导致神经元发生异常的、同步化放电的关键因素。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(3): 249-255]

关键词:癫痫;慢性自发性癫痫;转录组测序;信使RNA;微小RNA;大鼠

中图分类号:R742.1

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.03.008

An analysis of transcriptomic characteristics of hippocampal tissue in epileptic rats

HUANG Ya-Hui¹, KUANG Wei-Ping¹, ZHU Yong¹, WANG Qin¹, LU Jun¹, ZHANG Xi², HE Bing³, YANG Ping¹

1. Department of Neurosurgery, Brain Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China

2. Clinical Medical College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

3. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

Corresponding author: YANG Ping, Email: cuteping12384@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the transcriptomic characteristics of epilepsy and explore potential targets for the diagnosis and treatment of epilepsy. **Methods** A total of 17 young male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group ($n=8$) and chronic spontaneous recurrent seizures (CSRS) group ($n=9$). Lithium chloride-pilocarpine was used to establish a rat CSRS model. Transcriptome sequencing (RNA-seq) was performed on the rat hippocampal tissues from the CSRS and control groups. A differential analysis and a signaling pathway enrichment analysis on messenger RNA (mRNA) and microRNA (miRNA) were performed, and a differentially expressed protein-protein interaction network was constructed to search for core regulatory genes. **Results** A total of 354 differentially expressed genes (DEGs) were obtained via the differential analysis on mRNA between the control group and the CSRS group. The signaling pathway enrichment analysis showed that DEGs were related to ion transport regulation, tissue development, stress response, etc. The protein-protein in-

基金项目:国家自然科学基金(81874429);湖南省卫生计生委科研课题(20200009; B2019047);湖南省自然科学基金(2019JJ80027; 2019JJ80094; 2020JJ5294; 2020JJ8057);湖南省教育厅科研项目(19B440);湖南省中医药管理局科研计划项目(202145)

收稿日期:2020-12-29; **修回日期:**2021-04-02

作者简介:黄亚辉,男,主治医师,主要从事癫痫基础研究。

通信作者:杨萍,女,副主任医师。Email:cuteping12384@126.com。

teraction network analysis revealed that WDR88, SHANK2, TEC, NFKBIZ, EPHA8, etc., were the main core regulatory genes in DEGs. In addition, differentially expressed miRNA was obtained. Target genes were predicted, and the GO pathway was enriched. It was found that the target genes were mainly related to the molecular functions such as ionic glutamate receptor complex, glutamate receptor activity, glutamate-dependent calcium channel activity, and NF- κ B-inducing kinase activity. **Conclusions** Based on the results of RNA-seq, it was found that abnormal expression of differentially expressed genes is an important cause of epilepsy, and it is a key factor leading to abnormal and synchronized discharge of neurons.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(3): 249-255]

Keywords: epilepsy; chronic spontaneous recurrent seizures; transcriptome sequencing; messenger RNA; microRNA; rat

癫痫是以脑神经元过度放电导致的发作性中枢神经系统功能障碍为特征的脑部疾病,在任何年龄段均可患病,且近年来发病率逐渐上升,目前尚无理想的治疗方法,其治疗局限性原因在于对癫痫病因和发病机制研究不足^[1-3]。新一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)实现了对细胞内全部RNA反转录形成的DNA(cDNA)文库进行高通量测序,这种技术称为转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq),基于NGS的RNA-Seq让研究人员能够突破芯片等传统技术低效率和高成本的限制,并使我们进一步加深对转录组的认识,诠释基因功能,指导探究疾病发生发展机制^[4-6]。本研究通过构建慢性自发性癫痫(chronic spontaneous recurrent seizures, CSRS)大鼠模型,取CSRS大鼠及对照组大鼠海马组织进行RNA-seq,分析了CSRS大鼠转录组学特征,并对mRNA及miRNA进行差异分析及信号通路富集分析,同时对差异表达miRNA进行靶基因预测,以期从基因组学层面进一步深入研究癫痫的发病机制,为临床寻找癫痫治疗提供新的靶点及新机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取无特定病原体级21 d雄性幼龄SD大鼠17只,周龄8~10周,体重180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证编号:SCXK(湘)2016-0002]。采用抽签法随机将所有大鼠分为2组:对照组(8只)、CSRS组(9只)。

1.2 试剂及造模方法

氯化锂(Sigma公司,1001011078)和匹罗卡品(ABCR公司,ab141301)。CSRS组大鼠采取氯化锂-匹罗卡品构建CSRS大鼠模型^[7],4只对照组大鼠腹腔注射等量0.9%的NaCl溶液。采用Racine分级法评估大鼠癫痫程度,达到4级及以上发作视为建模成功^[8],造模成功后28 d,CSRS组平均发作次数(7.11±2.03)/周。取新鲜海马组织行HE染色^[9],剩余的大鼠取新鲜海马组织行全转录测序。

1.3 转录组测序及差异表达基因筛选

采用Illumina高通量测序平台行转录组测序,对原始数据进行严格的质量控制。所有样本进行150 bp长度的paired end测序,转录组数据去除低质量reads之后样本均有超过140 m的reads,符合分析标准;Q30(评估reads测

序质量的参数)均超过95%,说明样本测序质量较高。测序完成后,通过R语言(version 3.6.3)中的Limma包(version 3.44.3)计算继续对照组及CSRS组之间的差异基因,以 $P<0.05$ 、差异倍数绝对值 ≥ 2 为筛选阈值,获得对照组及CSRS组之间的显著差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。

1.4 差异表达基因的信号通路富集

将计算得到的显著差异表达基因进行基因本体分析(gene ontology, GO)及通路富集分析(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)。其中GO分析包括:细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)。

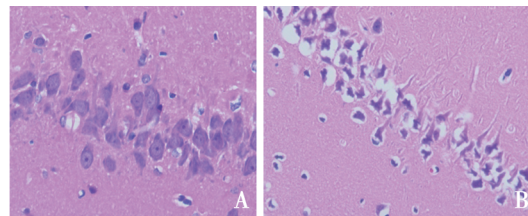
1.5 差异表达蛋白互作用网络构建

基于对照组及CSRS组大鼠的差异表达基因,使用STRING数据库(<https://string-db.org>)构建了蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,该数据库中存储了基因的上下游调控关系,其中蛋白质之间的关联是根据既往实验验证、文献挖掘、基因融合、共表达分析、以及计算预测的,例如基因组荟萃分析等技术方法获得,该分析主要用以寻找并探究网络中的基因相互调控关系,然后通过Cytoscape软件中的cytoHubba算法将该调控网络中的基因进行加权计算,得到处于网络最核心位置的基因(hub genes)。

2 结果

2.1 两组大鼠HE染色情况

对照组海马CA1区神经元排列整齐,CSRS组海马CA1区神经元排列疏松,出现细胞肿胀,伴有不同程度的细胞固缩。见图1。



A: 对照组; B: CSRS组

图1 HE染色结果

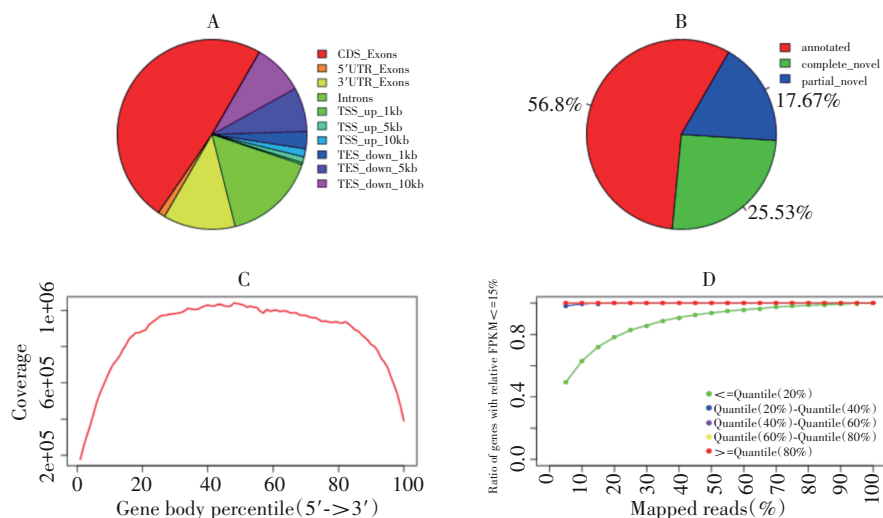
2.2 转录组测序一般性结果描述

转录组数据去除低质量reads之后样本均有超过140 m的reads,符合分析标准——Q30(评估reads测序质量的参数)均超过95%,可进行下一步实验。利用基因组reads与当前已知数据库进行比较分析,接近一半reads位于基因编码区;约75%的reads位于功能已知的基因组区域,另有接近25%的reads位于新发现的基因组区域;这显示转录组测序数据主要分布gene的中间位置,靠近UTR区的reads较少,符合RNA测序的特点(图2)。将所有比对成功的reads统计在基因组上的分布,其中22.4%位于基因上游区,最多的分布在intron区约41%(图3)。与已知

小RNA数据进行对比,其中71%为未知信息的RNA,提示基因组中尚有大量未知区域可能在生物学中有功能;其次为核糖体RNA(rRNA)及miRNA(小分子RNA,一般调控基因表达功能)(图4)。

2.3 差异mRNA功能注释

将对照组及CSRS组的mRNA进行差异分析,获得的354个DEGs(图5),然后将DEGs进行GO分析,在生物过程(biological process, BP)层面,DEGs富集于脂质转运的调节、离子传输、多细胞生物过程的调控、脂质转运、脂质定位等通路;在细胞组分(cellular component, CC)层面,DEGs主要富集于质膜的外侧、受体复合体、中间丝、蛋白



A:接近一半reads位于基因编码区;B:约75%的reads位于已知基因组区域;C、D:转录组测序数据分布情况

图2 Reads比对已知基因组数据库

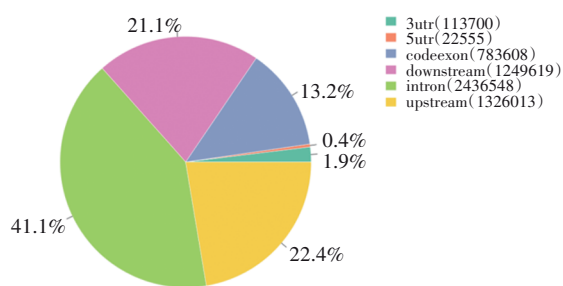


图3 reads统计在基因组上的分布

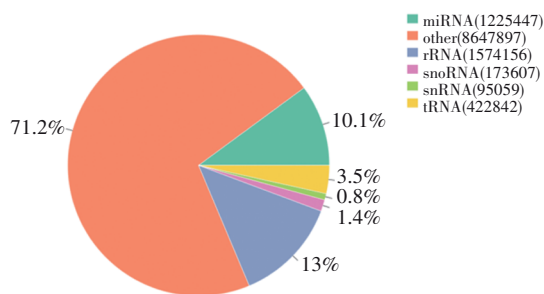


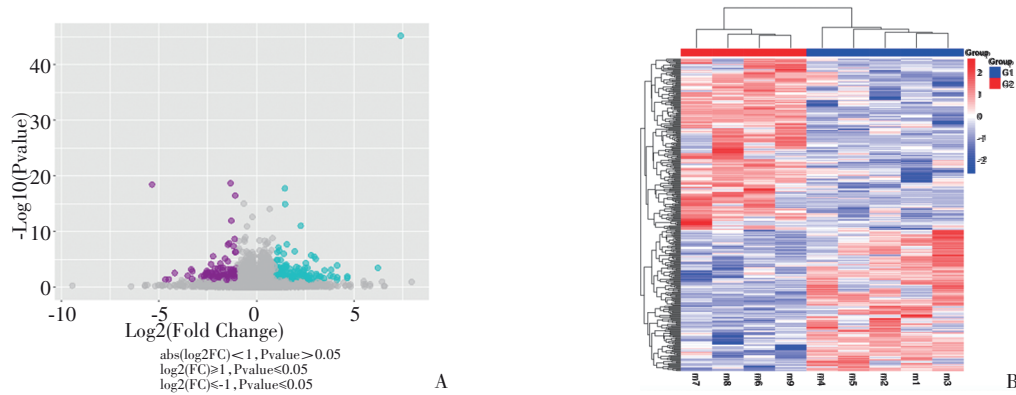
图4 转录组组成分布

质细胞外基质、MHC I类蛋白复合物等;在分子功能(molecular function, MF),主要与DEGs细胞外基质结合、配体门控离子通道活性、配体门控通道活性、ATP依赖性蛋白结合、钙离子跨膜转运蛋白活性、神经肽受体活性以及钙通道活性等功能相关(图6)。

KEGG 通路富集分析发现主要与神经活性配体-受体相互作用、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、色氨酸代谢、酪氨酸代谢以及细胞黏连等通路相关。上述结果表明CSRS组大鼠与对照组大鼠海马组织存在神经信号转导相关通路上的基因表达水平的变化,差异表达基因主要表现为离子转运调控,组织发育,应激反应等功能(图7)。

2.4 差异表达蛋白的互作网络

通过对差异表达蛋白的相互作用分析寻找核心基因(hub-gene),其中WDR88、SHANK2、TEC、NFKBIZ、EPHA8、UBD、ZPF84、ZPF438等基因处于较核心的地位。见图8。



A: CSRS 组与对照组大鼠对比两组样本的差异表达 mRNA 火山图, 蓝绿色点代表在 G2(对照组) 中高表达, 紫色代表在 G1 (CSRS 组) 中高表达; B: 差异基因表达热图

图5 对照组及 CSRS 组的 mRNA 差异分析

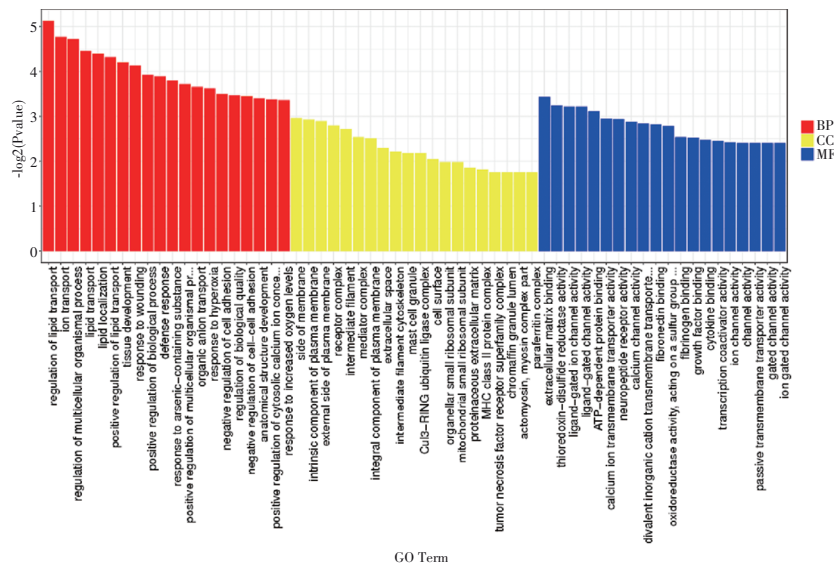


图6 CSRS 组与对照组大鼠差异表达 mRNA GO 富集分析

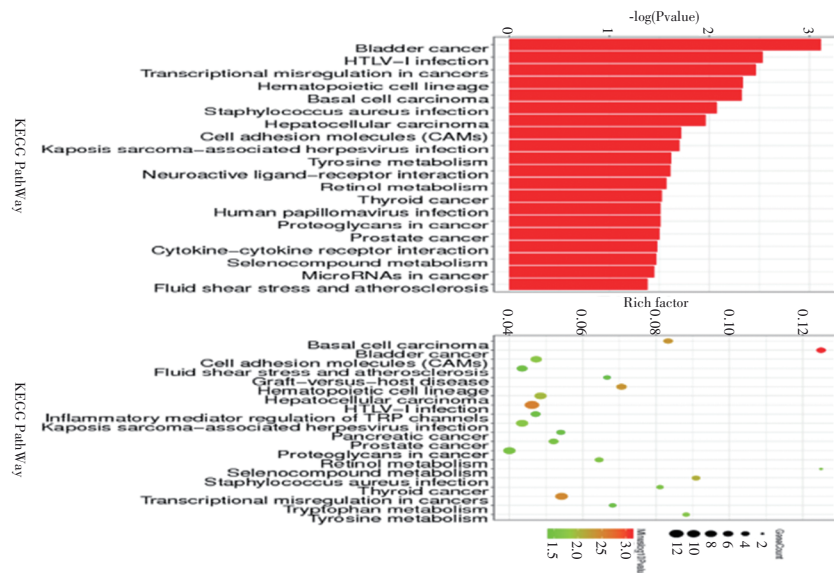


图7 CSRS 组大鼠与对照组大鼠差异表达 mRNA KEGG 信号通路富集分析

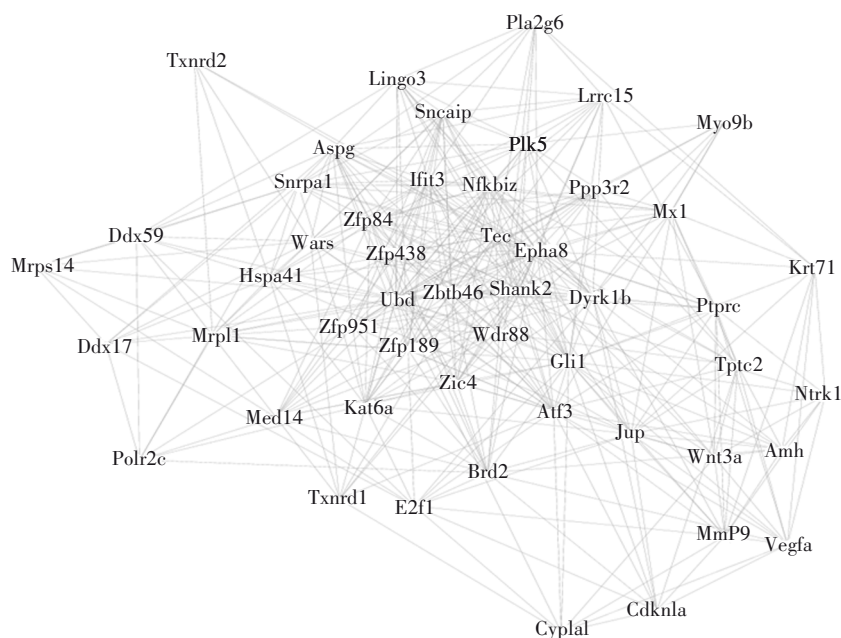


图8 CSRS组与对照组大鼠差异表达 mRNA PPI 网络

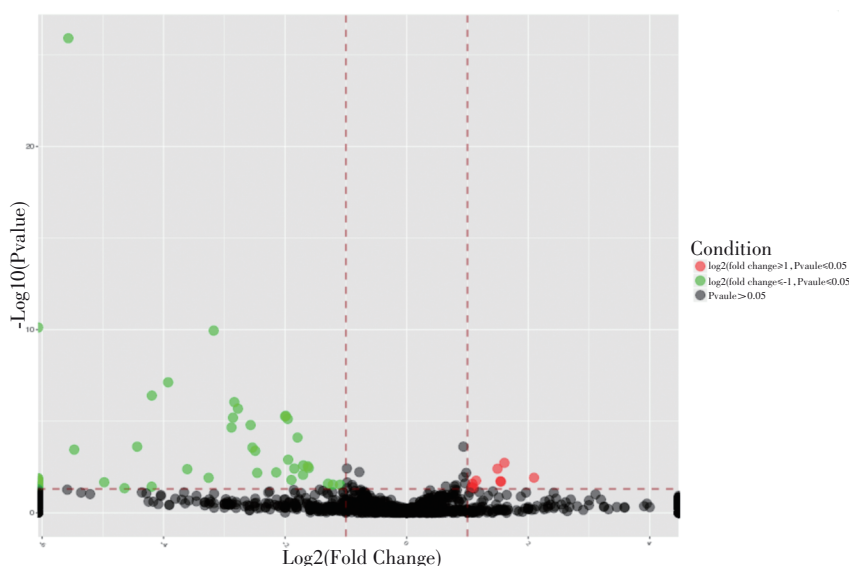


图9 CSRS组大鼠与对照组大鼠对比两组样本的差异表达 miRNA 火山图

2.5 差异表达 miRNA 的靶基因 Go 富集

将对照组及 CSRS 组的 miRNA 差异分析获得的 57 个 DEGs (图 9), 通过 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 预测其调控的靶基因, 并计算靶基因的 GO 富集, 结果发现在 BP 层面, 靶基因主要富集于 RNA 聚合酶 II 的转录调控、细胞生物合成过程的负调控、基因表达的负调控等生物过程; 在 CC 层面, 靶基因主要与受体复合体、质膜受体复合体、NMDA 选择性谷氨酸受体复合体、离子型谷氨酸受体复合体等细胞组分形成相关; 在 MF 层面, 靶基因主要与谷氨酸受体活性、谷氨酸盐化的钙离子通道活性、NF- κ B 诱导激酶活性等分子功能相关 (图 10)。表 1 中我们列出了评分较高的 6 组差异表达 miRNA 及其调控

基因。

3 讨论

癫痫是最常见的慢性神经系统疾病, 全世界约有 7 000 万人受到影响。疾病基因的发现改变了癫痫遗传学的临床实践, 但目前尚未见癫痫大鼠脑组织的基因表达谱特点的研究^[10-11]。为了探究癫痫的发生机制, 本研究构建了 CSRS 大鼠模型, 通过 HE 染色发现 CSRS 组存在一定程度的神经元损伤; 对 CSRS 组大鼠及对照组大鼠的海马组织进行 RNA-seq, 分析了两组大鼠差异表达基因的特征。

在本研究共鉴定了 354 个 mRNA, 包括 194 个上调基因和 160 个下调基因。差异表达基因 GO 功能富集分析

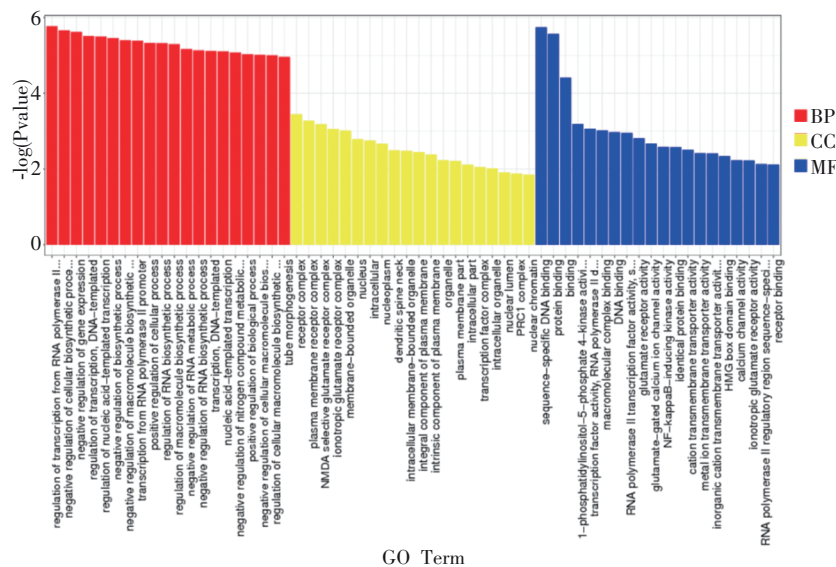


图10 CSRS与对照组大鼠差异表达miRNA预测靶基因GO富集分析

表1 差异miRNA与其预测调控靶基因

miRNA ID	CSRS组 miRNA	靶基因	靶基因 . intron	CSRS组 mRNA
17_34840	下调	Fam107a	family with sequence similarity 107, member A	下调
8_21373	下调	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	下调
9_22968	下调	Prdm12	PR domain containing 12	下调
rno-miR-324-5p	上调	Trim29	tripartite motif-containing 29	上调
X_38237	下调	Prdm12	PR domain containing 12	下调
X_38237	下调	Pou3f3	POU class 3 homeobox 3	上调

发现,主要表现为离子转运调控尤其是钙离子跨膜转运蛋白活性、应激反应等功能相关。目前多项研究发现,钙离子跨膜转运失调是导致癫痫发生的重要机制, Ca^{2+} 的快速内流导致了神经元去极化,并促进突触前膜的兴奋性氨基酸谷氨酸(Glu)的释放增加,打破了中枢神经系统内Glu与抑制性氨基酸 γ -氨基丁酸(GABA)的平衡,最终导致神经元发生异常的、同步化放电导致癫痫症状发生^[13-14]。KEGG富集分析发现,主要与神经活性配体-受体相互作用、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、色氨酸代谢、酪氨酸代谢以及细胞黏连等通路相关。

差异表达蛋白的相互作用分析发现ZBTB46(zinc finger and BTB domaincontaining 46)、WDR88(WD repeat domain 88)、SHANK2(SH3 and multipleankyrin repeat domains 2)、TEC(tec protein tyrosine kinase)、NFKBIZ(nuclearfactor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta)、EPHA8(EPH receptor A8)等是DEGs的主要核心基因,其中,Corrêa等^[12]研究发现,ZBTB46是20q13.33中缺失后果的影响基因之一,与癫痫相关。SHANK2主要编码一种蛋白质,该蛋白质是Shank突触蛋白家族的成员,可以在兴奋性突触的突触后密度中充当分子支架,Shank蛋白家族与神经元损伤及代谢性谷氨酸

受体在突触后膜的锚定作用相关。

NFKBIZ基因是锚蛋白重复家族的成员,由脂多糖(LPS)诱导。包含锚蛋白重复序列的编码产物的C端部分与IkB家族蛋白具有高度的序列相似性,后者通过锚蛋白重复结构域与NF- κ B蛋白相互作用而在LPS的炎症反应中起作用,小鼠的实验研究表明,该基因产物是NF- κ B核蛋白之一,是IL-6产生的激活剂^[15-16]。EPHA8基因编码蛋白质酪氨酸激酶家族的ephrin受体亚家族的成员,与神经发育相关,在神经系统中,EPH亚家族中的受体通常具有一个激酶结构域和一个胞外区域,其中包含一个富含Cys的结构域和2个纤连蛋白III型重复序列。在哺乳动物神经系统发育过程中在短距离接前在国内外与癫痫的关系罕见研究报道,且与神经系统发育、损伤、修复等关系密切,可能是癫痫的潜在治疗靶点^[17-18]。

miRNA是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA,具有抑制靶mRNA转录、翻译或者能够剪切靶mRNA并促进其降解的功能,在细胞分化,生物发育及疾病发生发展过程中发挥巨大作用^[19-21]。本研究获得57个差异miRNA,并预测了它们的靶基因,进行了信号通富集分析,结果显示靶基因主要与谷氨酸受体活性、谷氨酸盐化的钙离子通道活性、NF- κ B诱导激酶活

性等癫痫相关信号通路相关。同时我们列出了评分较高的6组差异表达miRNA及其调控基因,这些miRNA可能是癫痫重要的潜在靶点,我们将对其进行进一步的深入研究。

综上所述,本研究发现差异表达基因异常是癫痫发生的关键因素。由此引起的神经元兴奋性改变,是导致神经元发生异常的、同步化放电导致癫痫症状发生及发作的重要原因。不过,本研究存在一定的局限性,按照伦理要求,人体正常脑组织无法取样,因此本研究采用大鼠建模后的海马组织,但动物样本与人体组织存在物种差异性,在后续实验中我们将继续思考该问题的解决方法,并将进一步完善机制实验研究。但本研究结果为揭示癫痫发生发展提供基因层面的依据,为癫痫的机制研究提供新的实验依据和线索,为癫痫的早期诊断和治疗提供新的思路及靶点。

参 考 文 献

- [1] CHARI A, THORNTON RC, TISDALL MM, et al. Microelectrode recordings in human epilepsy: a case for clinical translation[J]. *Brain Commun*, 2020, 2(2): fcaa082.
- [2] 贺淑慧,孙洪英. 多药耐药相关蛋白1基因多态性及蛋白表达与癫痫患者耐药机制关系的研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2020, 47(2): 141-147.
- [3] HERNANDEZ-RONQUILLO L, MIRANZADEH MAHABADI H, MOIEN-AFSHARI F, et al. The concept of an epilepsy brain bank[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 833.
- [4] DENTI L, PIROLA Y, PREVITALI M, et al. Shark: fishing relevant reads in an RNA-Seq sample[J]. *Bioinformatics*, 2020, 37(4): 464-472.
- [5] LIU Y, WU XQ, XIE J, et al. Identification of transcriptome differences in goat ovaries at the follicular phase and the luteal phase using an RNA-Seq method[J]. *Theriogenology*, 2020, 158: 239-249.
- [6] 朱勇,卢军,王琴,等. 氟西汀对癫痫合并抑郁大鼠模型海马自噬的作用[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46(4): 378-382.
- [7] RACINE RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure[J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294.
- [8] SHARMA S, PUTTACHARY S, THIPPESWAMY A, et al. Status epilepticus: behavioral and electroencephalography seizure correlates in kainate experimental models[J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 7.
- [9] ZHAO JJ, LIU ZW, WANG B, et al. Inhibiting endogenous tissue plasminogen activator enhanced neuronal apoptosis and axonal injury after traumatic brain injury[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(4): 667-675.
- [10] DELEN D, DAVAZDAHEMAMI B, ERYARSOY E, et al. Using predictive analytics to identify drug-resistant epilepsy patients[J]. *Health Informatics J*, 2020, 26(1): 449-460.
- [11] SUNG SF, LEE PJ, HSIEH CY, et al. Medication use and the risk of newly diagnosed diabetes in patients with epilepsy: a data mining application on a healthcare database[J]. *J Organ End User Com*, 2020, 32(2): 93-108.
- [12] CORRÊA T, VENÂNCIO AC, GALERA MF, et al. Candidate genes associated with delayed neuropsychomotor development and seizures in a patient with ring chromosome 20[J]. *Case Rep Genet*, 2020, 2020: 5957415.
- [13] GAO W, BI YF, DING L, et al. SSa ameliorates the Glu uptake capacity of astrocytes in epilepsy via AP-1/miR-155/GLAST[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(3): 1329-1335.
- [14] YANANLI HR, DEMIRKAPU MJ, SAKALLI HE, et al. Effect of U-92032, T-type Ca^{2+} channel blocker, on rats with genetic absence epilepsy[J]. *Pharmacology*, 2020, 105(9-10): 561-567.
- [15] CAUMES R, SMOL T, THUILLIER C, et al. Phenotypic spectrum of SHANK2-related neurodevelopmental disorder[J]. *Eur J Med Genet*, 2020, 63(12): 104072.
- [16] LOPEZ G, KONKRITE KL, DOEPNER M, et al. Somatic structural variation targets neurodevelopmental genes and identifies SHANK2 as a tumor suppressor in neuroblastoma[J]. *Genome Res*, 2020, 30(9): 1228-1242.
- [17] STARK DA, COFFEY NJ, PANCOAST HR, et al. Ephrin-A3 promotes and maintains slow muscle fiber identity during postnatal development and reinnervation[J]. *J Cell Biol*, 2015, 211(5): 1077-1091.
- [18] JEONG YJ, SON Y, CHOI HD, et al. Behavioral changes and gene profile alterations after chronic 1,950-MHz radiofrequency exposure: an observation in C57BL/6 mice[J]. *Brain Behav*, 2020, 10(11): e01815.
- [19] EYILETEN C, SHARIF L, WICIK Z, et al. The relation of the brain-derived neurotrophic factor with microRNAs in neurodegenerative diseases and ischemic stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(1): 329-347.
- [20] FALAGAN-LOTSCH P, MURPHY CJ. Network-based analysis implies critical roles of microRNAs in the long-term cellular responses to gold nanoparticles[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(41): 21172-21187.
- [21] SZCZERBA E, ZAJKOWSKA A, BOCHOWICZ A, et al. Down-regulated expression of microRNAs associated with cardiac hypertrophy and fibrosis in physiological pregnancy and the association with echocardiographically-evaluated myocardial function[J]. *Biomed Rep*, 2020, 13(5): 41.

责任编辑:龚学民