

利用 RNA-Sequencing 鉴定大鼠脑缺血-再灌注损伤模型中差异表达的基因*

白 波 王春梅

(济宁医学院神经生物研究所, 济宁 272067)



白波, 博士, 教授, 博士生导师, 济宁医学院院长。任中华医学会行为医学分会主任委员、中国生理学会理事、中国神经科学会理事、中国高等教育学会高等教育管理委员会委员, 山东省生理学会副理事长等。长期从事生理学、神经生物学领域的教学和科学研究工作, 被评为山东省教学名师、全国劳动模范、国务院特殊津贴获得者。主持和承担国家自然科学基金、山东省自然科学基金、山东省科技攻关计划等 20 多项课题的研究工作。近年来在 *Biochim Biophys Acta*、*J Biol Chem*、*Cell Signal*、*Neuroscience Bulletin*、*中华行为医学与脑科学杂志* 等国内外学术期刊发表论文 100 余篇。主编《生理学》、《正常人体功能》等教育部“十二五”国家级高等学校规划教材。获得山东省科技进步二等奖和三等奖、国家中医药局中医药基础研究三等奖、山东省优秀社会科学理论成果奖三等奖等多项奖励。

摘 要 目的 利用 RNA-Sequencing 方法, 试图鉴定大鼠脑缺血-再灌注损伤模型中差异表达的基因, 为探讨脑缺血-再灌注损伤的分子机制提供实验依据。**方法** 首先利用 RNA-Sequencing 方法初步鉴定大鼠脑缺血-再灌注损伤模型中差异表达的基因, 然后利用生物信息学方法对差异表达基因的功能进行预测分析; 再利用 RT-PCR 和 qRT-PCR 方法进一步检测差异基因的表达变化。**结果** 与对照组相比, 脑缺血-再灌注损伤实验组共鉴定出 182 个基因差异表达, 其中 156 个基因表达上调, 26 个基因表达下调; RT-PCR 和 qRT-PCR 方法进一步验证其中 3 个基因表达上调, 2 个基因表达下调。**结论** 利用 RNA-Sequencing 方法可以鉴定大鼠脑缺血-再灌注损伤模型中差异表达的基因, 表明这些基因可能参与了脑缺血-再灌注损伤, 为进一步揭示脑缺血-再灌注损伤机制奠定了实验基础。

关键词 RNA-Sequencing; 缺血-再灌注损伤; 基因表达

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2016)02-001-06

Identification of differentially expressed genes in rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury by RNA-Sequencing

BAI Bo, WANG Chunmei

(Neurobiology Institute, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To identify differentially expressed genes in rat model of cerebral ischemia reperfusion injury using RNA-Sequencing and elaborate the molecular mechanism of cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** RNA-Sequencing was used to identify differentially expressed genes. Bioinformatics methods were used to predict the function of differentially expressed genes. RT-PCR and qRT-PCR were used to further detect the expression of different genes. **Results** Compared to control, 182 genes were identified dif-

* [基金项目] 山东省自然科学基金 (ZR 2013 CQ 031); 国家自然青年基金 (81501018); 济宁医学院博士启动基金 (094301)

ferentially expressed in model of ischemia-reperfusion injury. 156 genes were up-regulated and 26 genes were down-regulated. The expression of three genes were further proved to increase and two genes decrease using RT-PCR and qRT-PCR. **Conclusion** RNA-Sequencing could identify differentially expressed genes in rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury suggesting that these genes may participate in cerebral ischemia-reperfusion injury. This study provides a basis to further reveal the mechanism of cerebral ischemia-reperfusion injury.

Keywords: RNA-Sequencing; Ischemia-reperfusion injury; Gene expression

近年来脑血管疾病严重威胁人类的健康,其中脑缺血性疾病所占比例越来越大。脑缺血后,早期恢复脑血流再灌注是救治脑缺血患者最有效的手段之一,然而再灌注治疗的同时反而会出现病情进一步加重,即缺血-再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)^[1-2]。大量研究表明,脑缺血-再灌注损伤与炎症反应、细胞凋亡、血-脑脊液屏障的损伤、 Ca^{2+} 超载及氨基酸代谢异常等因素有着密切关系^[3-7]。从目前的研究结果看,虽然对缺血-再灌注损伤的可能机制提出了很多假说,然而,关键因素及具体的机制尚不明确,缺乏较系统、全面的研究结论。因此,对脑缺血-再灌注损伤的发病主因及机制仍需深入的研究。

RNA-Sequencing(转录组测序)是近年来发展起来的研究某一生物在特定生物过程中基因表达差异的技术,是基因组遗传信息传递和表达的重要步骤和过程,在基因组序列拼接注释、样品间基因转录差异表达及其功能研究等方面有重要作用^[8]。RNA-Sequencing 技术结合了转录组测序建库的实验方法与 DGE(Digital Gene Expression Tag Profiling)的信息分析手段,具有高通量、定量准、可重复性高、检测范围宽、分析可靠等特点。

本研究利用 RNA-Sequencing 研究大鼠脑缺血-再灌注后转录组基因表达变化,以期较全面性、针对性解释参与缺血-再灌注损伤基因的表达变化,为进一步研究缺血-再灌注损伤机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

MCAO 模型制备:选取 280 ~ 320g 健康雄性 Wistar 大鼠,随机分为假手术对照组(Control)和缺血组(IRI)。术前禁食 12h,禁水 2h。腹腔注射 10% 水合氯醛醉(0.4ml/100g)大鼠后,分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external

carotid artery, ECA),结扎 ECA 远端,微动脉夹夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉远心端。在 ECA 上剪一小口,用自制处理过的钓鱼线从颈外动脉剪口处插入,经 CCA 进入 ICA,以颈总动脉分叉处开始计算,进线深度为(18.0 ± 0.5)mm,行至大脑中动脉起始部形成栓塞,造成局灶性脑缺血状态。缺血 2h 再灌注 24h 后处死大鼠,取缺血侧海马组织进行后续实验。

1.2 方法

1.2.1 RNA 测序 Trizol 法提取 Control 和 IRI 模型组海马组织总 RNA。紫外吸收测定法和甲醛变性电泳检测总 RNA 的浓度和纯度。然后用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA,向得到的 mRNA 中加入适量打断剂高温条件下使其片断化,再以片断后的 mRNA 为模板,合成 cDNA,经过磁珠纯化、末端修复、3'末端加碱基 A、加测序接头后,进行 PCR 扩增,从而完成整个文库制备工作。构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlusReal-Time PCR System 进行质量和产量检测,文库质控合格后进行测序。

1.2.2 数据分析 测序所得的原始数据(raw reads 或 raw data)首先进行质控,以确定测序数据是否适用于后续分析。质控后,经过滤得到的 clean reads 比对到参考序列。然后进行第二次质控。若通过,则进行基因定量分析、基于基因表达水平的各项分析(主成分、相关性、条件特异表达、差异基因筛选等等),并对筛选出的样品间差异表达基因进行 GO 功能显著性富集分析、pathway 显著性富集分析和聚类分析。

1.2.3 RT-PCR 利用 FastQuant RT 试剂盒(TIANGEN)将上述所提总 RNA 逆转录成 cDNA。反应体系及步骤如下:1)去除 gDNA 的反应体系与步骤 2μl 5 × gDNA Buffer, 2μl 总 RNA, 6μl RNase-Free dd H₂O,混匀,42℃ 孵育 3min,置于冰上。2)反转录的体系与步骤 2μl 10 × Fast RT Buffer, 1μl RT Enzyme Mix, 2μl FQ-RT Primer Mix, 5μl RNase-

Free dd H₂O 混匀,加入到去除 gDNA 体系中,42℃ 孵育 15min,然后 95℃ 孵育 3min,置于冰上。3) PCR 反应体系 (20μl) 如下 2 × PCR Buffer 10μl, 10μM 上游引物 0.2 μl,10μM 下游引物 0.2 μl, cDNA 1μl,EDPC 水 8.6 μl。PCR 反应条件: 94℃ 2min;94℃ 30s,55℃ 50s,72℃ 50s,32 个循环; 72℃ 10min,4℃ 保存。其中 β-actin 为靶基因的内参对照。4) 产物的电泳检测取 10μl PCR 扩增产物,加 2μl 6 × 上样缓冲液,分别上样于 1.0% 含 EB 的琼脂糖凝胶,同时上样 DNA Marker 2000 用于标定 DNA 片段大小。最后,利用凝胶扫描仪观察结果并拍像记录。

1.2.4 qRT-PCR 利用 SuperReal PreMix Plus (TIANGEN) 试剂盒,将上述逆转录的 cDNA 进行荧光定量 PCR 反应。1) PCR 反应体系 (20μl): 10μl 2 × SYBR Premix Ex Taq,0.6μl 10uM 正向引物,0.6μl10uM 反向引物,0.4μl 50 × ROX,2μl cDNA,6.4μl EDPC 水。2) PCR 反应条件:95℃ 预变性 15min;95℃ 变性 10s,60℃ 退火 20s,72℃ 延伸 20s,40 个循环。其中 β-actin 为内参对照。将以上反应体系加入荧光定量 PCR 反应板内,同时设未加模板的阴性对照孔,反应在 LightCycler® 480 荧光定量 PCR 仪中进行。每个反应设 3 个复孔,结果为 3 次实验的平均值。采用 2^{-ΔΔC_t} 相对定量法处理数据,通过公式计算获得靶基因表达的相对水平。

表 1 靶基因的扩增引物序列

	正向引物	反向引物
Fidcd1	5'-gggtgggcttgttctctgt-3'	5'-gttctctgaatggctcgtgc-3'
Hspb1	5'-acgaagaaaggcaggatgaa-3'	5'-gacaggggaagaggacaccag-3'
Rgs4	5'-ctaagtccecaaggccaagaa-3'	5'-gttcgggtgtgtctctct-3'
Ttr	5'-actggaaggctcttggcatt-3'	5'-gctgtaggagtacgggctga-3'
Wfs1	5'-cagccgagaaggacagata-3'	5'-ggcaagtcgcaggtagtgtt-3'
β-actin	5'-tggaatctctgtggcatcatgaac-3'	5'-taaaacgcagctcagtaacagtcgc-3'

1.3 统计学方法

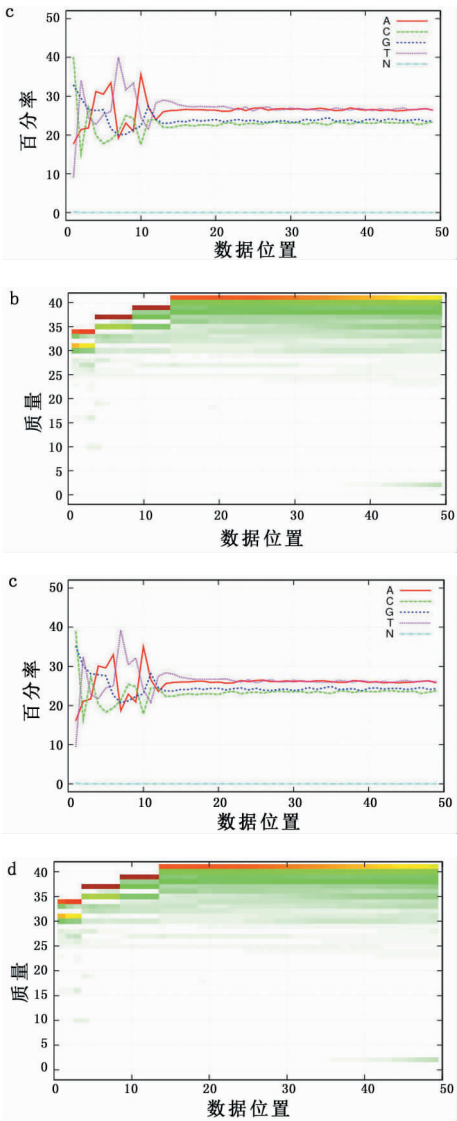
所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 5.0 统计学软件进行统计分析。

2 结果

2.1 Clean 数据碱基组成和质量分布图

先对过滤后得到的 clean reads 进行碱基的组成和质量值分布绘制,从而控制数据质量,来衡量

建库、测序是否合格。正常情况下,reads 每个位置的碱基含量应该分布稳定,无 AT 或 GC 分离现象。实验显示 IRI 模型组与 Control 组的碱基组成稳定,无分离现象;质量分布 >30 (<20 为质量较低),总体反映了测序 reads 的准确性,测序样品质量比较好,可以用于后续的分析。见图 1。



a:对照初始数据碱基组成图;b:对照初始数据质量分布图;
c:IRI 模型初始数据碱基组成图;d:IRI 模型初始数据质量分布图
图 1 初始数据碱基组成和质量分布图

2.2 表达基因的聚类分析

利用 euclidean 距离算法计算样品基因的表达量距离,同时利用离差平方和算法计算样品间的距离,根据距离大小建立聚类图,后者能直观地反映出样品之间的距离关系、差异关系等。基于基因表达量,Control 组与 IRI 样品的聚类图表明,上调表

达的基因可分为 2 大类;下调表达的基因可分为 4 大类。见图 2。

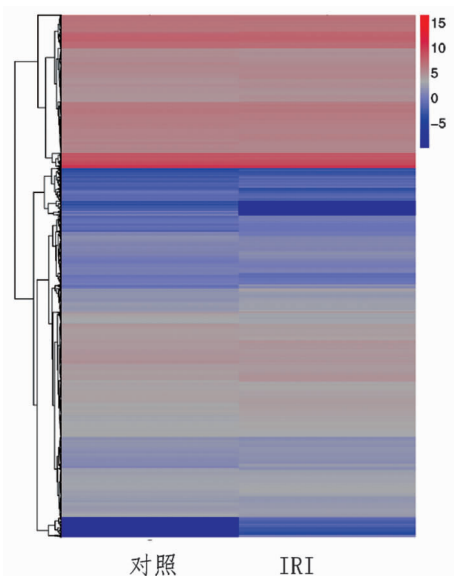


图 2 差异基因聚类图

2.3 差异基因的筛选

利用 Noiseq 软件和 EBSeq 软件对表达基因进行差异分析,为差异表达基因的功能研究打下基础。数据分析表明,在 Control 样品与 IRI 样品间有 182 个基因表达存在差异,其中 156 个基因表达上调,26 个基因表达下调。表明这些基因可能参与了大鼠脑缺血-再灌注损伤。见图 3。

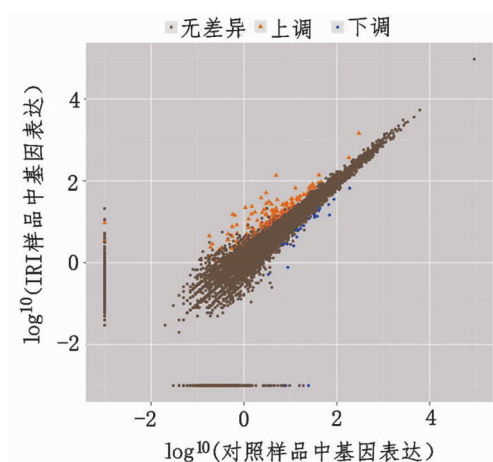


图 3 差异基因表达水平图

2.4 差异基因的 GO 分析

GO (Gene Ontology) 是一个国际化的基因功能分类体系,用于全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 总共有 3 个本体,分别描述基因的分子功能 (molecular function)、细胞成分 (cellu-

lar component)、参与的生物过程 (biological process)。本研究经过差异表达基因中显著富集的 GO 分析,差异表达基因参与了生物过程、细胞组成及分子功能(图 4)。其中有 80% 基因参与了应激反应,78% 基因参与了代谢过程,96% 基因参与了细胞过程,76% 基因参与了发育过程,40% 基因参与了生长;76% 基因参与了膜成分,86% 基因参与了细胞成分,79% 基因参与了细胞器;95% 基因具有结合功能,46% 基因具有催化活性,30% 基因具有分子转导功能,25% 基因具有受体的活性功能。表明脑缺血-再灌注损伤会引起生物过程、细胞组成及分子功能等多方面的功能异常。

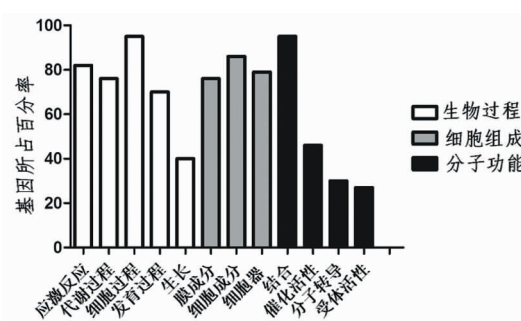


图 4 差异基因 GO 分析图

2.5 差异基因的 Pathway 显著性富集分析

Pathway 分析有助于更进一步了解基因的生物功能,通过 Pathway (Q-value ≤ 0.05) 显著性富集能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。本研究差异基因富集前 7 位见表 2,差异基因可能参与了剪接体 (2.34%)、RNA 降解 (1.24%)、B 细胞受体信号通路 (1.7%)、蛋白质组学 (1.06%)、代谢通路 (14.52%)、上皮细胞信号通路 (1.33%) 及细胞凋亡 (1.56%)。结果表明脑缺血-再灌注损伤过程中可引起 RNA 的降解、信号通路、代谢途径的改变,同时也会引起脑细胞的凋亡。

表 2 pathway 显著性富集分析

Pathway	Pathway annotation	Q-value	Pathway ID
1 Spliceosome	51 (2.34%)	0.009082024	Ko03040
2 RNA degradation	27 (1.24%)	0.009506909	Ko03018
3 B cell receptor signaling pathway	37 (1.7%)	0.009506909	Ko04662
4 Proteasome	23 (1.06%)	0.009506909	Ko03050
5 Metabolic pathways	316 (14.52%)	0.010928943	Ko01100
6 Epithelial cell signaling in Helicobacter Pylori infection	29 (1.33%)	0.022314733	Ko05120
7 Apoptosis	34 (1.56%)	0.031025582	Ko04210

2.6 RT-PCR

从差异表达基因中挑选出 3 个上调基因和 2 个下调基因,分别进行 RT-PCR 分析,以验证基因的表达情况。Fibcd1、Hspb1、Rgs4 表达升高,Ttr、Wfs1 表达降低,结果与测序结果一致,表明测序结果可靠。而且进一步说明基因 Fibcd1、Hspb1、Rgs4、Ttr、Wfs1 在脑缺血-再灌注损伤中发挥重要作用,进一步阐述它们的作用机制将有助于理解缺血-再灌注损伤的机制。见图 5。

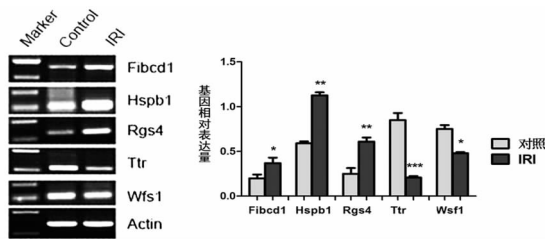


图 5 差异基因 RT-PCR 分析图

2.7 qRT-PCR

将上述 3 个上调和 2 个下调基因,利用 qRT-PCR 分析,结果显示 Fibcd1、Hspb1、Rgs4 表达明显升高,而 Ttr、Wfs1 表达明显下降(图 6),结果与 RT-PCR 及测序结果相吻合。

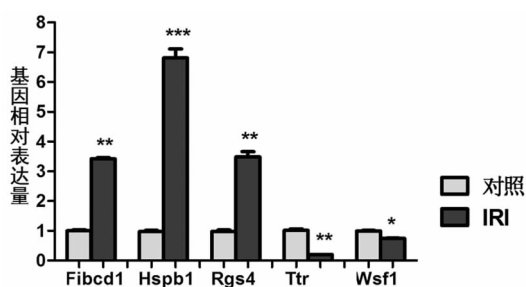


图 6 差异基因 qRT-PCR 分析图

3 讨论

RNA-sequencing 是一种转录组文库测序与生物信息分析相结合高效鉴定差异表达基因的技术,具有高通量、定量准等优点。在基因组序列拼接、样品间基因转录及其功能研究等方面有重要作用^[9-10]。

本研究利用 RNA-sequencing 分析了缺血-再灌注损伤模型与对照间差异表达基因,共检测到 182 个基因差异表达,其中 156 个基因表达上调,26 个基因表达下调。其中 80% 基因参与了应激反应,78% 基因参与代谢过程,76% 基因参与了膜成分,

86% 基因参与了细胞成分;95% 基因具有结合功能,30% 基因具有分子转导功能。表明这些基因可能参与了脑缺血-再灌注损伤,阐述这些基因的功能将有助于揭示脑缺血-再灌注损伤的机制。

脑缺血-再灌注损伤过程中,脑血流中断、血流恢复使脑组织发生一系列级联反应,如能量代谢障碍、氨基酸释放异常、细胞内钙稳态失衡、线粒体功能障碍、炎症反应及细胞凋亡等。缺血-再灌注损伤的机制可能与相关的通路中关键靶基因的异常表达调控密切相关。本研究结果初步显示,在大鼠脑缺血-再灌注损伤后,损伤区异常表达的基因参与了剪接体、RNA 降解、B 细胞受体信号通路、蛋白质组学、代谢途径、上皮细胞信号通路及细胞凋亡等调控,特别是差异表达的基因有 14.52% 参与了缺血-再灌注损伤的代谢通路,表明脑缺血-再灌注过程中这些基因通过影响正常的代谢通路而抑制或者增强缺血-再灌注损伤。在差异显著的表达基因中,筛选 Fibcd1、Hspb1、Rgs4、Ttr、Wfs1 这 5 个基因进一步利用 RT-PCR 和 qRT-PCR 方法进行分析,结果与 RNA-sequencing 所得结果一致,表明测序结果可靠。检索资料显示这几个基因与线粒体功能、重要的信号通路、免疫反应、内质网应激等有关,提示我们下一步的研究可以进一步阐述这些基因的功能,这将有助于阐明缺血-再灌注损伤的机制。

参考文献:

- [1] Collard C D, Gelman S. Clinical manifestations and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* [J]. *Pathophysiology*, 2001, 94: 1133-1138.
- [2] Pan J, Konstant A A, Bateman B, et al. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies [J]. *Neuroradiology*, 2007, 49: 93-102.
- [3] Wang R, Xu C, Zhao W, et al. Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues [J]. *European journal of biochemistry*, 2003, 270: 2680-2688.
- [4] Zhang Z G, Sun X, Zhang Q Z, et al. Neuroprotective effects of Ultra-Low-Molecular-Weight heparin on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: involvement of apoptosis, inflammatory reaction and energy metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (1): 1932-1939. DOI: 10.3390/ijms14011932.

(下转第 11 页)

- [22] Mauri C, Menon M. The many faces of type I interferon in systemic lupus erythematosus [J]. J Clin Invest, 2015, 125(7):2562-2564. DOI:10.1172/JCI82574.
- [23] Choubey D. Interferon-inducible Ifi200-family genes as modifiers of lupus susceptibility [J]. Immunol Lett, 2012, 147(1/2):10-17. DOI:10.1016/j.imlet.2012.07.003.
- [24] Böckle B C, Baltaci M, Ratzinger G, et al. Hepatitis C and autoimmunity: a therapeutic challenge [J]. J Intern Med, 2012, 271(1):104-106. DOI:10.1111/j.1365-2796.2011.02391.x.
- [25] Bezalel S, Guri K M, Elbirt D, et al. Type I interferon signature in systemic lupus erythematosus [J]. Isr Med Assoc J, 2014, 16(4):246-249.
- [26] Yan B, Ye S, Chen G, et al. Dysfunctional CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon- α -producing antigen-presenting cells [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(3):801-812. DOI:10.1002/art.23268.
- [27] Andrade D, Kim M, Blanco L P, et al. Interferon- α and angiogenic dysregulation in pregnant lupus patients who develop preeclampsia [J]. Arthritis & rheumatology (Hoboken, N. J.), 2015, 67(4):977-987. DOI:10.1002/art.39029.
- [28] Sjöstrand M, Johansson A, Aqrabi L, et al. The expression of BAFF is controlled by IRF transcription factors [J]. J Immunol, 2016, 196(1):91-96. DOI:10.4049/jimmunol.1501061.
- [29] Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(2):118-132. DOI:10.1038/nri3383.
- [30] Wang J H, New J S, Xie S, et al. Extension of the germinal center stage of B cell development promotes autoantibodies in BXD2 mice [J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(10):2703-2712. DOI:10.1002/art.38059.
- [31] Lund F E, Randall T D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4⁺ T cell immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(4):236-247. DOI:10.1038/nri2729.
- [32] Rosario C, Seguro L, Vasconcelos C, et al. Is there a cure for systemic lupus erythematosus [J]. Lupus, 2013, 22(5):417-421. DOI:10.1177/0961203313479839.
- [33] Petri M, Wallace D J, Spindler A, et al. Sifalimumab, a human anti-interferon- α monoclonal antibody, in systemic lupus erythematosus: a phase I randomized, controlled, dose-escalation study [J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(4):1011-1021. DOI:10.1002/art.37824.
- [34] Wang B, Higgs B W, Chang L, et al. Pharmacogenomics and translational simulations to bridge indications for an anti-interferon- α receptor antibody [J]. Clin Pharmacol Ther, 2013, 93(6):483-492. DOI:10.1038/clpt.2013.35.
- [35] Lauwerys B R, Hachulla E, Spertini F, et al. Down-regulation of interferon signature in systemic lupus erythematosus patients by active immunization with interferon α -kinoid [J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(2):447-456. DOI:10.1002/art.37785.
- [36] Crow M K, Olfertiev M, Kirou K A. Targeting of type I interferon in systemic autoimmune diseases [J]. Transl Res, 2015, 165(2):296-305. DOI:10.1016/j.trsl.2014.10.005.

(收稿日期 2015-01-09)

(上接第 5 页)

- [5] Ketheeswaranathan P, Turner N A, Spary E J, et al. Changes in glutamate transporter expression in mouse forebrain areas following focal ischemia [J]. Brain Res, 2011, 1418:93-103. DOI:10.1016/j.brainres.2011.08.029.
- [6] Ma M, Uekawa K, Hasegawa Y, et al. Pretreatment with rosuvastatin protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through attenuation of oxidative stress and inflammation [J]. Brain Res, 2013, 1519:87-94. DOI:10.1016/j.brainres.2013.04.040.
- [7] Yin J, Tu C, Zhao J, et al. Exogenous Hydrogen sulfide protects against global cerebral ischemia/reperfusion injury via its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in rats [J]. Brain Res, 2013, 1491:188-196. DOI:10.1016/j.brainres.2012.10.046.
- [8] Qiu J, Zhang W, Xia Q, et al. RNA sequencing identifies crucial genes in papillary thyroid carcinoma (PTC) progression [J]. Exp Mol Pathol, 2015 [Epub ahead of print].
- [9] Cesnik A J, Shortreed M R, Sheynkman G M, et al. Human Proteomic Variation Revealed by Combining RNA-Seq Proteogenomics and Global Post-Translational Modification (G-PTM) Search Strategy [J]. J Proteome Res, 2015 [Epub ahead of print].
- [10] Li C L, Li K C, Wu D, et al. Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity [J]. Cell Res, 2015 [Epub ahead of print].

(收稿日期 2015-01-06)