

DOI:10.12113/201912001

# 大鼠颅脑损伤后差异表达基因及 miRNA 研究

王家昕, 王晓霞, 李 洁, 苗泽远, 倪 爽, 王子钰, 苏立宁\*

(河北北方学院 基础医学院, 河北 张家口 075000)

**摘要:** 研究背景创伤性脑损伤 (Traumatic brain injury, TBI) 是致死率和致残率极高的外科疾患, 我国在对于 TBI 的判断、治疗等方面还处于薄弱阶段, 因此我们需要在分子层面了解大鼠颅脑损伤后基因及 miRNA 表达差异, 以便更好地对症治疗。目的了解大鼠颅脑损伤后基因及 miRNA 表达差异, 为临床治疗 TBI 提供新的思路。方法利用 GEO2R 筛选基因, 然后用 MiRwalk 软件对筛选的 miRNA 的靶基因进行预测, 再用 DAVID 做基因本体论功能富集分析, 最后利用 cytoscape 做网络关系图。结果发现 247 个相对明显的差异表达的基因, 包括 150 个上调表达基因和 97 个下调表达基因; 7 个差异表达的 miRNA, 包括 2 个上调表达 miRNA 和 5 个下调表达 miRNA。这些差异表达基因在细胞内和细胞外都起作用, 并且在炎症反应, 药物应答等生物过程中起作用。将差异基因与靶基因对比后, 可得到 48 个重合基因, 同时发现这些重合基因与差异表达的 miRNA 有着一定的联系。

**关键词:** 颅脑损伤; miRNA; 基因; 大鼠

中图分类号: Q344+.13 文献标志码: A 文章编号: 1672-5565(2020)03-157-06

## Study on differentially expressed gene and miRNA after brain injury in rats

WANG Jiixin, WANG Xiaoxia, LI Jie, MIAO Zeyuan, NI Shuang, WANG Ziyu, SU Lining\*

(Basic Medicine Department, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China)

**Abstract:** Traumatic brain injury (TBI) is a surgical disease with high mortality and disability rates. China is still in a weak stage in the judgment and treatment of TBI. It is necessary to understand the differentially expressed gene and miRNA after TBI at the molecular level, so as to provide basis for better treatment. This paper aims to investigate the differentially expressed gene and miRNA after TBI in rats, and provide a new way for clinical treatment of TBI. GEO2R was used to screen genes, and mirwalk software was adopted to predict the target genes of the screened miRNA. Then, David was used to conduct gene ontology function enrichment analysis, and finally cytoscape was applied to carry out network analysis. Results show that 247 differentially expressed genes were found, including 150 up-regulated genes and 97 down-regulated genes, and 7 differentially expressed miRNAs were found, including 2 up-regulated miRNAs and 5 down-regulated miRNAs. These differentially expressed genes play a role in both intracellular and extracellular processes, as well as in biological processes such as inflammatory response and drug response. By comparing the difference gene and the target gene, 48 overlapped genes were obtained, and it was found that these overlapped genes had a certain relations with the differentially expressed miRNA.

**Keywords:** Traumatic brain injury; miRNA; Gene; Rat

创伤性脑损伤 (Traumatic brain injury, TBI) 是外科常见的疾患, 严重影响人们健康和正常生活, 致

死和致残率极高。TBI 发病机制非常复杂, 相关文献表明, TBI 是一个十分复杂的过程, 需要多分子参

收稿日期: 2019-12-02; 修回日期: 2020-02-01.

基金项目: 2018 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (No: 201810092001); 河北北方学院青年基金项目 (No: QN2018022).

作者简介: 王家昕, 女, 本科生, 研究方向: 医学麻醉学. E-mail: 1032247565@qq.com.

\* 通信作者: 苏立宁, 女, 副教授, 研究方向: 细胞生物学. E-mail: 343376274@qq.com.

与及相互作用。因此我们利用多种现代生物学手段及统计学处理方法,得到大鼠颅脑损伤后基因及 miRNA 表达差异,为临床诊断及治疗 TBI 提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 筛选差异表达基因

在基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus) 搜索并下载基因表达谱 GSE111452 和 miRNA 表达谱 GSE59646,利用 GEO2R 筛选关于大鼠脑损伤24 h后基因和 miRNA 的差异表达数据 ( $P$  值及  $FDR$  值均  $\leq 0.05$ ),再利用 MiRwalk 软件对筛选 miRNA 的靶基因进行预测,将靶基因与差异基因进行比较,保留重叠的差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGenes)。

### 1.2 DAVID 做差异表达基因的本体论功能富集分析

DAVID 做基因本体论功能富集分析,从生物学过程 (Biological process, BP)、细胞成分 (Cell components, CC) 及分子功能 (Molecular function, MF) 方面,对这些基因的功能进行描述。筛选标准为  $P \leq 0.05$ 。

### 1.3 Cytoscape 软件构建 miRNA-DEGenes 网络图

利用 Excel 软件得出关于筛选出的 miRNA 和

差异表达基因的上调和下调结果 (根据  $\log_{2}FC$  值得出上调和下调结果),并将其结果导入 Cytoscape 软件生成 miRNA-DEGenes 网络图。

## 2 结果

### 2.1 大鼠脑组织基因及 miRNA 表达变化

用 GEO2R 筛选关于大鼠脑损伤 24 小时后基因和 miRNA 的表达数据 ( $P$  值及  $FDR$  值均  $\leq 0.05$ ),得到 247 个相对明显的差异表达的基因,包括 150 个上调表达基因和 97 个下调表达基因;7 个差异表达的 miRNA,包括 2 个上调表达 miRNA 和 5 个下调表达 miRNA。将差异基因与靶基因对比后,可得到 48 个重叠基因。

### 2.2 差异表达基因的本体论功能富集分析

在 DAVID 软件中进行基因的本体论功能富集分析 GO 发现,差异表达基因中,NES、CCL2、PLIN2、LGALS1 等 13 个基因在药物应答 (Response to drug) 的生物学过程中起作用,CXCL1、CALCA、S1PR3 等 12 个基因在炎症反应 (Inflammatory response) 的生物学过程中起作用,CXCL1、CCL2、RELT 等 10 个基因在对脂多糖的反应 (Response to lipopolysaccharide) 中发挥作用。根据  $P$  值大小,BP 富集结果前 20 名  $P$  值对数大小结果 (见图 1)。

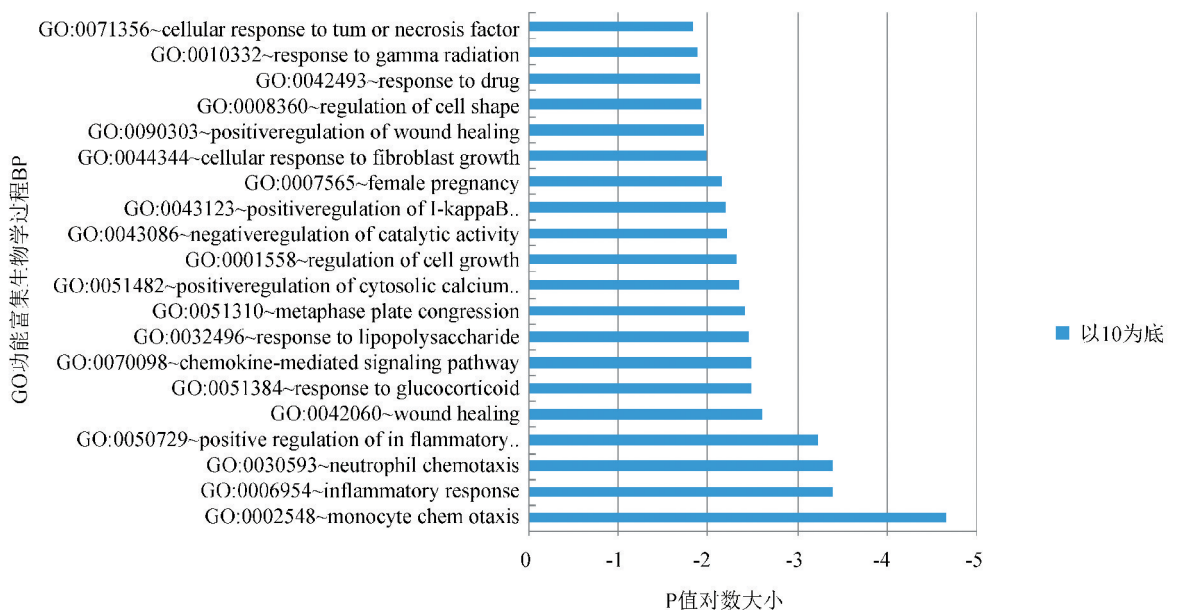


图 1 差异表达基因 GO 功能富集-生物学过程 BP 结果

Fig.1 Biological process results of GO function enrichment of differentially expressed genes

差异表达基因在细胞质 (Cytoplasm)、胞外外体 (Extracellular exosome)、细胞外间隙 (Extracellular-

space) 等处发挥作用。根据  $P$  值大小,CC 富集结果前 20 名  $P$  值对数大小 (见图 2)。

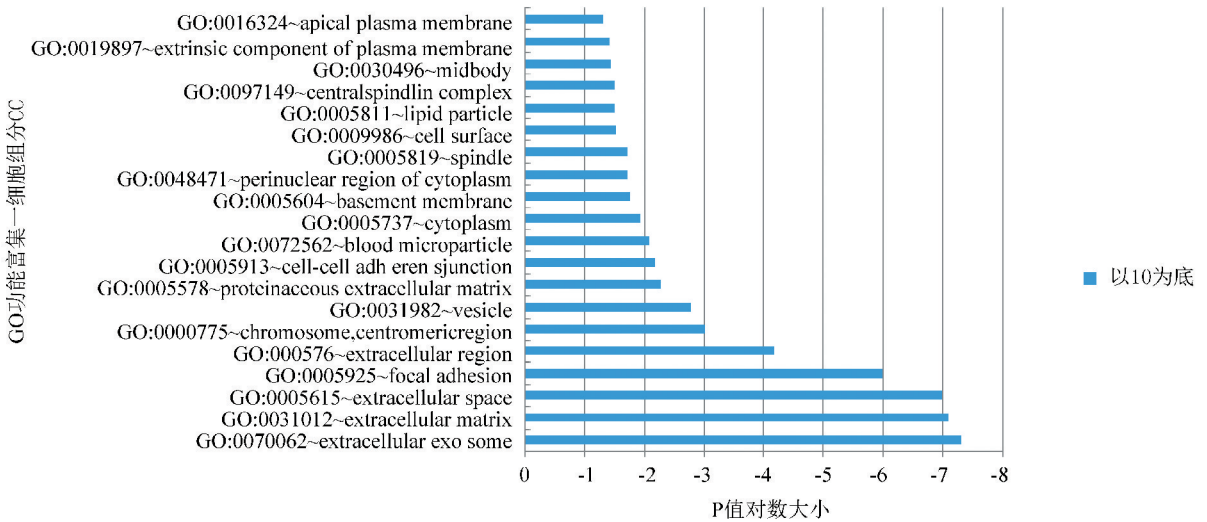


图 2 差异表达基因 GO 功能富集-细胞成分 CC 结果

Fig.2 Cell components results of GO function enrichment of differentially expressed genes

差异表达基因在钙离子结合 (Calcium ion binding)、钙黏蛋白结合参与细胞间粘附 (Cadherin binding involved in cell-cell adhesion)、蛋白域特异性

结合 (Protein domain specific binding) 等分子功能中起作用。根据 P 值大小, MF 富集结果前 20 名 P 值对数大小(见图 3)。

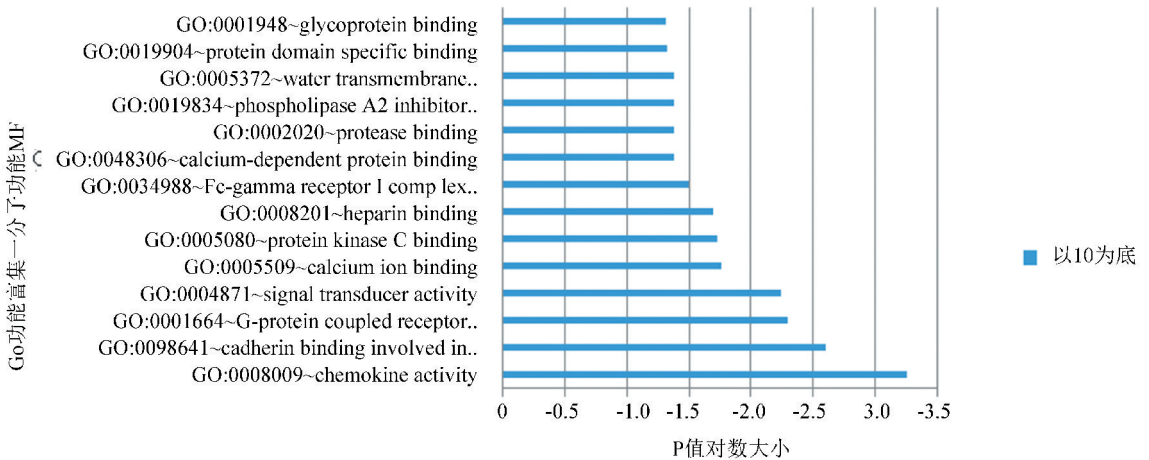


图 3 差异表达基因 GO 功能富-分子功能 MF 结果

Fig.3 Molecular function results of GO function enrichment of differentially expressed genes

### 2.3 重叠基因及其对应的 miRNA

在上述分析中,将靶基因与差异基因比较得到 48 个重叠基因,包括 14 个下调基因以及 34 个上调基因。为了更直观清楚地看到重叠基因与其对应的 miRNA 的关系,将重叠基因、miRNA 及其上下调结果导入 cytoscape 软件,得到 miRNA-DEGenes 网络图(见图 4)。

## 3 讨论

20 世纪 80 年代以来,随着医疗技术的发展及

人类急救意识的增高,各项急救指南的不断健全与完善,大大提高了创伤性脑损伤的救治水平和救治成功率。现阶段,对于创伤性脑损伤的发病机制及病理生理的研究逐渐成熟起来<sup>[1]</sup>。

### 3.1 创伤性脑损伤与炎症反应有着密切联系

研究发现,创伤性脑损伤破坏了血脑屏障,从而导致了炎症反应的发生。在差异表达基因 GO 功能富集-生物学过程 BP 分析结果中,趋化因子 CCL 和 CXCL 基因高表达,如 CCL2、CXCL1、CXCL13 等基因。趋化因子是细胞分泌的微细胞因子或信号蛋白,它们被称为趋化因子,因为它们可以诱导邻近反

应性细胞的趋化。研究表明,趋化因子在中枢神经系统中表达。脑组织在创伤性脑损伤后发生缺血缺氧,导致部分趋化因子表达上调,如单核细胞趋化因子-1 (Monocyte chemoattractant protein, MCP-1)/CCL2、单核细胞趋化因子-2 (Monocyte chemoattractant protein, MCP-2)/CCL8、巨噬细胞炎症因子-1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein, MIP-1 $\alpha$ )/CCL3、白介素-8 (Interleukin, IL-8)/CXCL8 (分泌趋化因子的细胞有受损的神经元细胞、小胶质细

胞、星形胶质细胞等)<sup>[2]</sup>。这些趋化因子的高表达进一步促进了炎症反应的发展。随着血脑屏障的进一步破坏,血液循环中的巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞进入破坏的脑组织。多个临床试验表明,炎症反应的发展与脑损伤后继发的局部神经组织变性坏死、脑血流自身调节功能的改变、血脑屏障通透性改变及血管性和细胞毒性脑水肿的发生、损伤区域神经组织生化代谢的紊乱和神经递质的变化以及脑组织的修复有着极大的关系<sup>[3]</sup>。

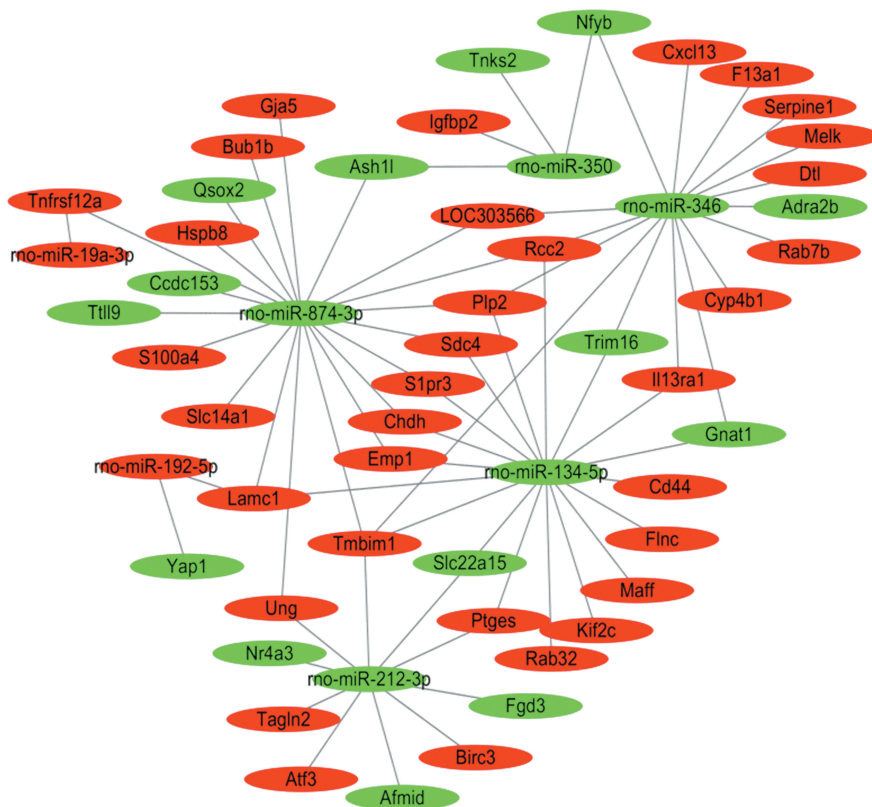


图4 重叠基因及其对应 miRNA

Fig.4 Overlapping genes and corresponding miRNA

注:红色代表上调,绿色代表下调

### 3.2 miRNA 参与调控 TBI 后的细胞凋亡

在上述论述中,可发现颅脑损伤后引起神经细胞的炎症反应和水肿,进而引起细胞凋亡,加重创伤性脑损伤的程度。研究发现,创伤性脑损伤后大鼠大脑皮质中上调的 miRNA 有 miRNA-23a、miRNA-27a;有些促凋亡蛋白因子也上调,如 noxa、puma、Bax, BH3-only 等因子,这说明 miRNA-23a、miRNA-27a 等 miRNA 对创伤性脑损伤后的细胞凋亡起调控作用,对神经细胞修复起着负向调控的作用<sup>[4]</sup>。本研究发现,趋化因子 CXCL13 高表达,其对应的 miRNA-346 却下调,导致大量细胞凋亡。同时有研究发现,在创伤性脑损伤大鼠神经元细胞模型中

miRNA-22 表达下调,乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 含量增加,蛋白酶 caspase3 活性也增强,人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因 (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 以及蛋白激酶 B (Protein Kinase B, AKT) 即凋亡基因蛋白水平增加,而且对抑制凋亡蛋白如 Bcl-2 和 Bcl-w 起着负向调控的作用,这提示下调的 miRNA-22 可能会通过参与调控 PTEN/AKT 信号通路,来对神经细胞的凋亡起促进作用<sup>[5]</sup>。通过图 4 可发现, *Cxcl13*、*F13a1*、*Serpine1*、*Melk*、*Dtl*、*Rab7b*、*Rcc2* 等多种基因高表达,而靶标 miRNA-346 下调,猜测它们共同调控细胞的

凋亡。通过上述多项研究,发现 miRNA 极大可能参与调控 TBI 后的细胞凋亡。

### 3.3 miRNA 参与调节创伤性脑损伤后突触的可塑性

突触可塑性是学习记忆细胞的生物学基础,在神经系统发育中起着重要的作用。越来越多的研究资料显示,miRNA 参与调节创伤性脑损伤后突触的可塑性。在孙婷怡,刘良等<sup>[6]</sup>人的研究中发现作用于大鼠海马神经元树突棘的 miRNA-134 在调控树突棘的大小中起着负性调控作用。miRNA-134 通过抑制 LIM 结构域蛋白激酶 1 (Lim-domain containing protein kinase 1, LIMK1) 的翻译,在不影响树突棘的数量下使其大小受到限制,在突触传递中发挥负调控作用<sup>[7]</sup>。突触受到刺激,会释放脑源性神经营养因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 脑源性神经营养因子作用于相应的受体之后,阻断了对 miRNA-134 的抑制作用,增加了树突棘数目。Griesbach 等已检测到大鼠创伤性脑损伤后, BDNF 表达量上调,由此推测 miRNA-134 可能参与导致创伤性脑损伤后认知功能障碍<sup>[8]</sup>。研究发现, *Sdc4*、*Chdh*、*S1pr3*、*Cd44*、*Maff* 等基因高表达,但对应的 miRNA-134-5P 下调,由此推测这些高表达的基因抑制 miRNA-134-5P 表达,从而导致创伤性脑损伤后认知功能障碍。另外,有一项研究发现, Rho 家族的一种 GTP 酶激活蛋白 p250GAP, 可与多种突触蛋白发生作用并水解下游底物上的 GTP, 并激活与底物相关的信号通路,最终破坏突触结构骨架,减小树突棘的密度及体积<sup>[9]</sup>。Gu 等用强直刺激引诱大鼠海马区谢佛侧枝产生长时增强效应 (Long term potentiation, LTP) 后发现 miRNA-26a 和 miRNA-384-5p 的水平下降,经过预测和实验验证,发现 miRNA-26a 和 miRNA-384-5p 参与调控 RSK3 基因的表达。在抑制 LTP 过程中的 RSK3 的活性后,发现海马区的海马回的场兴奋性突触后电位 (Field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) 显著增强,因此推断 RSK3 在 LTP 中扮演着重要角色, miRNA-26a 和 miRNA-384-5p 通过调控 RSK3 参与了调节突触的可塑性<sup>[10]</sup>。有研究显示,抑制 miRNA-9-3p 的表达后,与 LTP 负相关的基因 *Dmd*、*SAP97* 表达升高<sup>[11]</sup>。研究发现 miRNA-26a, miRNA-384-5p 和 miRNA-9-3p 可通过调节 LTP 影响突触可塑性的发生发展。

### 3.4 控制炎症反应和 miRNA 成为治疗 TBI 的新靶点

以往研究资料发现,创伤性脑损伤后血脑屏障破坏,同时大量的炎症因子炎症细胞进入脑循环中导致细胞坏死,神经组织受到破坏,脑组织发生一些

不可逆的损伤,所以如何控制炎症反应的发展,减少细胞的损伤与死亡是今后研究创伤性脑损伤的重点。在上述结果中,我们发现大量的趋化因子和其他炎症因子过度表达,最终导致了炎症的级联反应,因此如何控制炎症因子及其相关基因的表达是今后探索的方向之一。

创伤性脑损伤中针对炎症反应的治疗还有许多不同的手段,所应用的药物绝大部分为抗炎药物或者免疫抑制剂,比如糖皮质激素、非甾体类抗炎药、他汀类药物和特定的细胞因子抑制剂,在不同的创伤性脑损伤动物模型的实验研究中,这些药物在神经保护方面都发挥着比较好的作用<sup>[12]</sup>。在创伤性脑损伤的治疗中,黄体酮也是应用较多的一种药物,在进行反复的基础研究并结合一些临床随机对照实验后,发现黄体酮在创伤性脑损伤后早期的炎症反应方面有较好的治疗作用,可以恢复患者的神经功能<sup>[13]</sup>。Zheng 等在纳入了 6 项大型临床随机对照试验的系统评价中却指出,在创伤性脑损伤 6 个月后对患者的预后进行评估,并未发现黄体酮和安慰剂对照组在死亡率或神经功能预后上有明显的差异<sup>[14]</sup>。上述研究发现,运用抗炎药物抑制创伤性脑损伤后的炎症反应并不都具有良好的治疗作用。通过药物控制炎症反应治疗创伤性脑损伤表现出了二重性。

而基于一些 miRNA 导致创伤性脑损伤后认知功能出现障碍的发现,为今后创伤性脑损伤的治疗提供了新的方向。研究资料显示, Ge 等给创伤性脑损伤大鼠模型的脑室内输注 miRNA-21 mimics,发现大鼠脑组织水肿得到不同程度的缓解,病灶面积减少,细胞凋亡改善等<sup>[15]</sup>。因此抑制或促进某些 miRNA 的表达是治疗创伤性脑损伤的新靶点。

## 4 结 论

1) 创伤性脑损伤后,可引起多个基因的表达发生变化,而这些差异表达基因在生物学过程、分子功能、细胞学组分等方面发挥着重要作用。

2) 创伤性脑损伤与炎症反应有密切的关系,脑损伤后可引起炎症的级联反应,趋化因子和其它炎症因子的表达也发生变化。因此如何控制炎症因子及其相关基因的表达是今后探索的方向之一。

3) 创伤性脑损伤后,重合基因和对应的 miRNA 分别发生着上调或是下调的不同变化,这些基因和 miRNA 的变化可能是介导创伤性脑损伤后人体各个功能发生障碍的关键靶点,比如一些 miRNA 参与调节创伤性脑损伤后突触的可塑性。因此,对其深入

研究,能够为治疗创伤性脑损伤提供新的诊断和治疗依据。

## 参考文献(References)

- [1]程世翔. 创伤性脑损伤基础研究的现状与展望[J]. 武警医学, 2019, 30(07): 553-556.  
CHENG Shixiang. Current situation and prospect of basic research on traumatic brain injury[J]. Medical Journal of the Chinese People's Armed Police Forces, 2019, 30(07): 553-556.
- [2]徐葳. 大鼠创伤性脑损伤炎症细胞因子的变化及意义[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.  
XU Wei. Changes and significance of inflammatory cytokines in rats with traumatic brain injury[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2017.
- [3]李廷富, 万里华, 肖复燊. 大鼠创伤性脑损伤早期基因差异表达的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(02): 81-86. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2010.02.003.  
LI Tingfu, WAN Lihua, XIAO Fushen. Differential gene expression in the early stage of traumatic brain injury in rats[J]. Journal of Molecular Diagnosis and Therapy, 2010, 2(2): 81-86. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2010.02.003.
- [4]SABIRZHANOV B, ZHAO Zaorui, STOICA B A, et al. Downregulation of miR-23a and miR-27a following experimental traumatic brain injury induce neuronal cell death through activation of proapoptotic Bcl-2 proteins[J]. Journal of Neuroscience, 2014, 34(30): 10055-10071. DOI: 10.1523/jneurosci.1260-14.2014.
- [5]JI Wei, JIAO Jiantong, CHENG Chao. MicroRNA-21 in the pathogenesis of traumatic brain injury[J]. Neurochemical Research, 2018, 43(10): 1863-1868. DOI: 10.1007/s11064-018-2602-z.
- [6]孙婷怡, 刘良, 刘子龙. MicroRNA 在创伤性脑损伤的研究进展[J]. 中国法医学杂志, 2013, 28(6): 484-487.  
SUN Tingyi, LIU Liang, LIU Zilong. Research progress of microRNA in traumatic brain injury[J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2013, 28(6): 484-487.
- [7]SCHRATT G M, TUEBING F, NIGH E A, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development[J]. Nature, 2006, 439: 283-289. DOI: 10.1038/nature04367.
- [8]GRIESBACH G S, HOVDA D A, MOLteni R, et al. Voluntary exercise following traumatic brain injury: Brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function[J]. Journal of Neuroscience, 2004, 24(1): 129-139. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.01.030.
- [9]闫静, 宋佳希, 汪俊军. miRNAs 在创伤性脑损伤中的临床意义及相关调节机制的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(3): 193-196. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2018.03.09.  
YAN Jing, SONG Jiayi, WANG Junjun. The clinical significance of miRNAs in traumatic brain injury and the related regulatory mechanism[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2018, 36(3): 193-196. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2018.03.09.
- [10]GU Qinhua, YU Danni, HU Zhonghua, et al. miR-26a and miR-384-5p are required for LTP maintenance and spine enlargement[J]. Nature Communications, 2015, 6: 6789. DOI: 10.1038/ncomms7789.
- [11]SIM S E, LIM C S, KIM J I, et al. The brain-enriched microRNA miR-9-3p regulates synaptic plasticity and memory[J]. Journal of Neuroscience, 2016, 36(33): 8641-8652. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0630-16.2016.
- [12]李佳蕊, 罗本燕. 神经炎症反应在动物创伤性脑损伤中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2019, 46(2): 214-217. DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.02.022.  
LI Jiarui, LUO Benyan. Research progress of neuroinflammatory response in traumatic brain injury[J]. Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2019, 46(2): 214-217. DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.02.022.
- [13]陈礼刚, 江涌. 重新认识创伤性脑损伤后的神经炎症反应[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2017, 16(4): 289-292.  
CHEN Ligang, JIANG Yong. A new understanding of neuroinflammatory response after traumatic brain injury[J]. Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research, 2017, 16(4): 289-292.
- [14]ZENG Yunhui, ZHANG Yujie, MA Junpeng, et al. Progesterone for acute traumatic brain injury: A systematic review of randomized controlled trials[J]. PLoS One, 2015, 10(10): 140624-140639. DOI: 10.1371/journal.pone.0140624.
- [15]GE Xintong, LEI Ping, WANG Haichen, et al. miR-21 improves the neurological outcome after traumatic brain injury in rats[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6718. DOI: 10.1038/srep06718.

[责任编辑: 吴永英]