

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.24.009

新生大鼠缺氧缺血性脑病中 miRNA 表达谱的改变及分析*

袁 昊,李 婷,张腾伟,肖 娟,杨 刘,黎 巧,阮 滔,朱 昉,肖咏梅,彭湘莲[△]

湖南省妇幼保健院新生儿科,湖南长沙 410000

摘要:目的 通过基因芯片检测新生大鼠缺氧缺血性脑病(HIE)模型中差异性表达 miRNA,构建 HIE 中 miRNA 及其靶基因调控网络。**方法** 将 7 d 龄新生 SD 大鼠 12 只随机分为 HIE 组及假手术对照组,每组 6 只。采用 Rice 法建立新生大鼠 HIE 模型,造模 24 h 取新生大鼠海马组织,基因芯片检测 HIE 组和假手术对照组海马组织中差异性表达的 miRNA,采用生物信息软件分析相关 miRNA 调控的靶基因及信号通路。**结果** 筛选出差异性表达的 miRNA 共 22 个,其中表达上调 9 个(mmu-miR-215-5p,mmu-miR-1249-3p,mmu-miR-3072-5p,mmu-miR-324-3p,mmu-miR-690,mmu-miR-874-5p,11_10767,11_10888,13_12928_star)、表达下调共 13 个(mmu-miR-141-3p,mmu-miR-182-5p,mmu-miR-183-5p,mmu-miR-190a-3p,mmu-miR-200a-3p,mmu-miR-200b-3p,mmu-miR-200c-3p,mmu-miR-429-3p,mmu-miR-455-3p,mmu-miR-760-5p,mmu-miR-96-5p,6_5971_star,9_8784)。GO 功能分析显示,差异性表达的 miRNA 调控基因在生物过程中主要参与调节生物生长发育、神经元形成与分化过程,KEGG 通路分析显示主要有丝裂原活化蛋白激酶信号通路被激活。**结论** 差异性表达的 miRNA 可能参与调控 HIE 发病的机制,将为 HIE 的机制研究、临床诊断及药物设计提供理论依据和新的思路。

关键词: 缺氧缺血性脑病; miRNA; 基因芯片**中图法分类号:** R722.19**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2023)24-3619-04

Change and analysis of miRNA expression spectrum in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy*

YUAN Hao, LI Ting, ZHANG Tengwei, XIAO Juan, YANG Liu, LI Qiao, RUAN Tao, ZHU Fang, XIAO Yongmei, PENG Xianglian[△]

First Department of Neonatology, Hunan Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Changsha, Hunan 410000, China

Abstract: **Objective** To detect the differential expression of miRNA in the neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy(HIE) by gene microarray for constructing the miRNA and its target gene regulatory network in HIE. **Methods** Twelve neonatal SD rats aged 7 d were randomly divided into HIE group and sham operation control group, with 6 rats in each group. The HIE model was established by the Rice method, and the hippocampus tissue of neonatal rats was taken at 24 h after modeling. The miRNA differentially expressing in the hippocampus tissue of the HIE group and control group was detected by the gene microarray, and the target genes and signaling pathways regulated by related miRNA were analyzed by the bioinformatic software. **Results** A total of 22 differentially expressed miRNAs were screened out, in which the 9 miRNAs expressions were up-regulated (mmu-miR-215-5p, mmu-miR-1249-3p, mmu-miR-3072-5p, mmu-miR-324-3p, mmu-miR-690, mmu-miR-874-5p, 11_10767, 11_10888, 13_12928_star), and 13 miRNAs were downregulated (mmu-miR-141-3p, mmu-miR-182-5p, mmu-miR-183-5p, mmu-miR-190a-3p, mmu-miR-200a-3p, mmu-miR-200b-3p, mmu-miR-200c-3p, mmu-miR-429-3p, mmu-miR-455-3p, mmu-miR-760-5p, mmu-miR-96-5p, 6_5971_star, 9_8784). The GO functional analysis showed that differentially miRNA regulatory genes were mainly involved in regulating the biological growth, development, neuronal formation and differentiation processes. The KEGG pathway showed that the mitogen activated protein kinase signaling pathway was mainly activated. **Conclusion** Differentially expressed miRNA may participate in the regulation of the pathogenesis of HIE, which will provide a theoretical basis and new ideas for the mechanism research, clinical diagnosis and drug design of HIE.

Key words: hypoxic-ischemic encephalopathy; miRNA; gene microarray

* 基金项目:湖南省妇幼保健院科研基金课题(201926)。

作者简介:袁昊,女,主治医师,主要从事新生儿神经系统方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 340273789@qq.com。

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是指足月和近足月新生儿由于围生期缺氧导致的急性脑损伤。我国报告 HIE 发生率为活产婴儿的 3%~6%,其中 15%~20%患儿在新生儿期死亡,存活者中有 25%~30%可遗留严重的神经功能障碍,包括脑瘫、癫痫、视听障碍、认知障碍、行为异常等,成为影响我国儿童生活质量的重要疾病之一^[1-2]。因此,积极研究 HIE 的发生机制、早期诊断及针对性干预治疗,在临床上具有重大意义。microRNA(miRNA)是一种内源性非编码 RNA(由 18~23 个核苷酸组成),其功能广泛,参与细胞周期、增殖和分化、信号传导和凋亡等过程^[3]。有研究证明,许多 miRNA 在神经系统损伤修复过程中发挥重要的调控作用^[4],将成为 HIE 具有潜力的治疗靶点及有效的生物预测指标。本研究利用基因芯片技术,分析出新生大鼠 HIE 中差异表达的 miRNA,筛选特异性的 miRNA,探讨其可能的发生机制,为 HIE 的机制研究、临床诊断及药物设计提供理论依据和新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 7 d 龄 SD 大鼠 12 只,雌雄不限,体质量 12~16 g,购自广东省实验动物检测所。随机分为 HIE 组及假手术对照组,每组 6 只。

1.2 主要材料及仪器 基因芯片筛选 miRNA 由新开源晶锐(广州)生物医药科技有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 造模 采用 Rice 法制作 HIE 模型:7 d 龄 SD 新生大鼠乙醚吸入麻醉后,仰卧位固定于手术台,消毒切开颈部皮肤,分离左侧颈总动脉并在远、近心端进行双结扎,缝合切口,术后放入 37℃ 恒温箱中 30 min,以 1.5 L/min 不断输入含 8% 氧气和 92% 氮气的低氧气源 2 h。假手术对照组:7 d 龄 SD 新生大鼠只游离左侧颈总动脉穿线但不结扎,缝合伤口后不进行缺氧处理。两组手术时间均低于 10 min,环境温度 26~28℃。造模后观察新生大鼠行为情况。

1.3.2 取新生大鼠海马组织 造模后 24 h,取海马组织。给予新生大鼠乙醚吸入麻醉,在低温环境下快速断头取脑,冰上分离海马组织。将左右两侧海马放入冻存管中,液氮速冻后放入-80℃ 低温冰箱备用。

1.3.3 基因芯片筛选差异性 miRNA 取新生大鼠海马组织,采用 Trizol 法进行样品的总 RNA 抽提纯化并质检。将提取的总 RNA 送检,进行微阵列杂交、芯片扫描,利用生物信息软件筛选显著差异的 miRNA。本实验采用 illumina Hiseq 测序平台的单端 50 bp 测序模式对样本进行高通量测序。原始数据需经过引物与 adaptor 序列去除,并经过对测序片段碱基的质量检验和长度筛选,最终选择质量可靠的测序片段。将每个样本的 reads 比对到已有的 miRNA 数据库(miRBase)和新 miRNA 预测的结果上,从而计算 miRNA 表达量。利用 DESeq 软件进行差异表达分析,筛选差异表达的 miRNA,计算每个样本的表达量

和组内均值,并且计算组间差异 Fold Change,再计算 $\log_2$ (Fold Change)用于后续筛选差异基因。

1.3.4 目的基因 GO 功能集分析及富集分析 将全部基因作为背景列表,目的基因列表作为从背景列表中筛选出来的候选列表,利用 Fisher 精确检验计算 GO 功能集在目的基因列表中是否显著富集的 P 值,再对 P 值经 Benjamini & Hochberg 多重检验校正后得到 FDR。针对这些基因进行 KEGG 数据库中通路的功能注释和归类,以及 DisGeNET 疾病数据库中疾病类型的功能注释和归类。

1.4 统计学处理 利用 Seqtk(1.0-r82-dirty)对预处理数据进行质量控制分析。序列比对使用 Bowtie(1.0.0)软件分析,采用 DESeq 软件进行差异表达分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评估 HIE 组术后 1 只新生大鼠表现为持续精神萎靡,其余 5 只均出现先兴奋后抑制行为:首先躁动不安;术后 30 min,出现呼吸增快、站立不稳、全身震颤症状;术后 1 h,出现精神萎靡、嗜睡、易激惹、夹尾左旋症状。假手术对照组活动正常。

2.2 miRNA 检测结果分析

2.2.1 测序数据质控 针对每个样本预处理后所有序列和去重复后的唯一序列,分别采用 bowtie 软件与该物种的参考基因组、Rfam 序列数据库、RepBase 序列数据库、miRBase 数据库进行比对,平均质控率大于 89.00%,平均对比率约为 47.96%,所获得数据能满足进一步分析要求。

2.2.2 差异表达的 miRNA 通过比较两组 miRNA 表达量,利用 DESeq 软件对两组进行差异表达分析,筛选出共 22 个表达存在差异的 miRNA,HIE 组表达上调的 miRNA 共 9 个(mmu-miR-215-5p, mmu-miR-1249-3p, mmu-miR-3072-5p, mmu-miR-324-3p, mmu-miR-690, mmu-miR-874-5p, 11_10767, 11_10888, 13_12928_star),表达下调的 miRNA 共 13 个(mmu-miR-141-3p, mmu-miR-182-5p, mmu-miR-183-5p, mmu-miR-190a-3p, mmu-miR-200a-3p, mmu-miR-200b-3p, mmu-miR-200c-3p, mmu-miR-429-3p, mmu-miR-455-3p, mmu-miR-760-5p, mmu-miR-96-5p, 6_5971_star, 9_8784),见图 1 和表 1。当满足 $P<0.05$ 并且 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 0.58$ 时,认为该基因表达在组间差异有统计学意义。

2.2.3 差异性 miRNA 的靶基因预测及富集分析 使用 miRanda 对差异表达的 miRNA 进行靶标预测,共得到 1 495 个靶基因。针对目的基因集,采用 TopGO 软件进行 GO 功能分析。图 2 展示预测靶基因在生物过程、细胞组成、分子功能的前 10 个最显著的 GO。结果显示差异 miRNA 调控基因在生物过程中主要参与调节生物生长发育、神经元形成与分化过程,在细胞组成中主要与突触发生、突触可塑性有关,在分子功能中调节蛋白结合、酶结合及谷氨酸受体活性等。

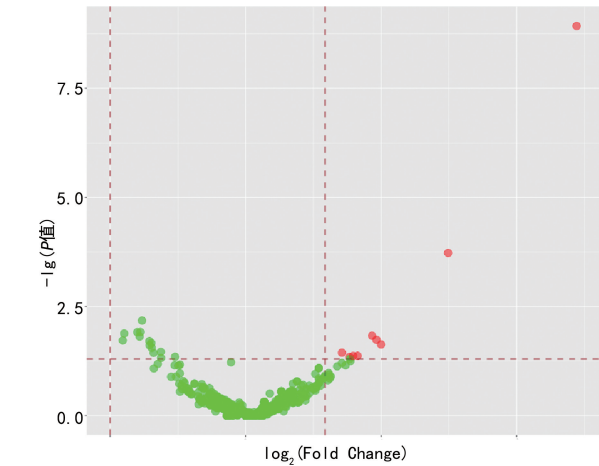


图 1 HIE 组与假手术对照组对比的火山图

表 1 HIE 组与假手术对照组差异性 miRNA 筛选

差异性 miRNA	log ₂ (Fold Change)	P	表达
mmu-miR-215-5p	2.44	0.00	上调
mmu-miR-1249-3p	0.77	0.04	上调
mmu-miR-3072-5p	0.83	0.04	上调
mmu-miR-324-3p	0.97	0.02	上调
mmu-miR-690	0.79	0.04	上调
mmu-miR-874-5p	1.00	0.02	上调
11_10767	1.49	0.00	上调
11_10888	0.71	0.03	上调
13_12928_star	0.93	0.01	上调
mmu-miR-141-3p	-0.70	0.02	下调
mmu-miR-182-5p	-0.78	0.01	下调
mmu-miR-183-5p	-0.71	0.02	下调
mmu-miR-190a-3p	-0.77	0.00	下调
mmu-miR-200a-3p	-0.80	0.01	下调
mmu-miR-200b-3p	-0.78	0.01	下调
mmu-miR-200c-3p	-0.69	0.03	下调
mmu-miR-429-3p	-0.68	0.04	下调
mmu-miR-455-3p	-0.90	0.02	下调
mmu-miR-760-5p	-0.62	0.04	下调
mmu-miR-96-5p	-0.63	0.03	下调
6_5971_star	-0.89	0.01	下调
9_8784	-0.71	0.02	下调

注:log₂(Fold Change)为 HIE 组相对于假手术对照组评价表达量的差异倍数的 log₂ 转化值。

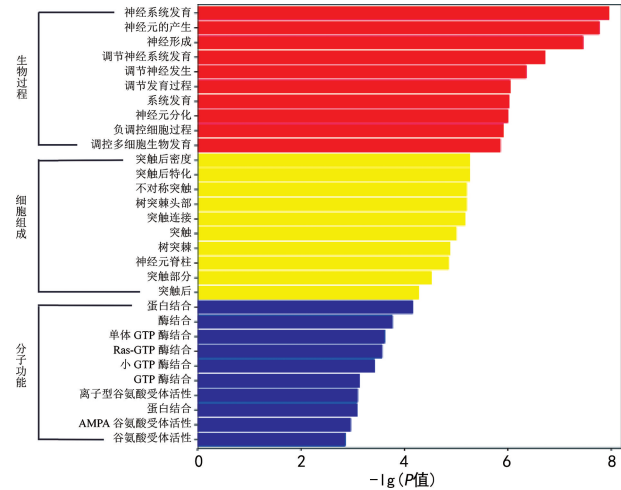
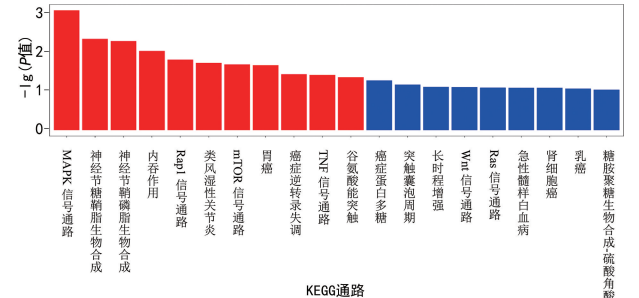


图 2 显著富集 GO 柱状图

针对这些基因进行 KEGG 数据库中通路的功能注释和归类。图 3 显示富集到的主要通路有丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、神经节鞘磷脂生物合成、细胞内吞作用等。其中以 MAPK 信号通路最为显著,HIE 组表达上调的 11-10767 及 mmu-miR-874-5p 调控的 8 个靶基因(Braf, Mapt, Ppp5c, Mapk8ip2, Fgf6, Flt1, Ngfr, Tgfb1)共同参与此信号通路。



注:横坐标代表显著富集的 KEGG 通路名称,纵坐标代表 -lg(P 值)。纵坐标越显著表示该通路越富集显著,红色柱表示显著的通路(P<0.05),蓝色柱表示不显著的通路。

图 3 显著富集 KEGG 通路柱状图

3 讨论

新生儿 HIE 病理生理改变主要包括脑血流低灌注或过度灌注、脑细胞能力代谢障碍、自由基损伤及神经元坏死或过度凋亡等。临床治疗策略主要通过增加氧分压、维持脑血流灌注等多方法联合治疗,但不能有效阻断神经损伤。如何进行早期诊断及高效治疗,最大程度上减少后遗症发生,是近年来国内外研究热点。miRNA 被认为参与多种疾病的发病机制,能够通过转录后调控靶基因的表达来调节不同的细胞过程^[5],可用于疾病分子生物诊断、靶向治疗和评估。目前,已有大量研究证明,miRNA 在 HIE 损伤修复过程中发挥重要的调控作用,将有助于新生儿 HIE 早期诊断、评估预后及靶向治疗^[6-7]。

本研究通过构建 HIE 新生大鼠模型,在 HIE 发生 24 h 进行基因测序,共筛选出 22 个表达差异的 miRNA,其中 9 个表达上调,13 个表达下调。通过靶基因预测,将目的基因进行 GO 功能富集分析,显示调控基因主要涉及调节生物生长发育、神经元形成与分化的过程,促进突触发生。因此,笔者推测在 HIE 发生脑损伤早期,miRNA 大多富集在与神经元功能相关的生物通路中,修复受损神经元。

在 HIE 表达上调的 miRNA 中,mmu-miR-215-5p 差异倍数最为明显,大量研究认为,其参与调控肿瘤发生、发展。在非小细胞肺癌,miR-215-5p 通过调控 MAPK/ERK 信号通路靶向调节 ZEB2 表达,参与细胞凋亡及死亡^[8]。在恶性胸膜间皮瘤中,miR-215-5p 通过激活基因 p53 功能,参与 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及抑制血管生成等过程,其低表达与该疾病不良预后有关^[9]。在其他肿瘤疾病如乳腺癌、结肠直肠癌、髓系白血病等中均有异常表

达^[10]。本研究中发现 mmu-miR-215-5p 表达明显上调,考虑可能参与缺氧缺血损伤后神经元凋亡及死亡的调控机制,需进一步研究验证,其有望成为评估 HIE 的生物标志物。

在 HIE 表达下调的 miRNA 中,miR-200 家族最为明显。miR-200 家族成员包括 miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141、miR-429,其参与多种疾病的发病机制,包括神经退行性病变、纤维化、肿瘤等^[11]。在缺氧缺血发生后,少突胶质前体细胞迅速反应、增殖、迁移到损伤部位,分化为成熟的少突胶质细胞,包绕轴突形成髓鞘,促进神经修复。在脑卒中的研究中发现,miRNA-200 过表达可抑制血清反应因子表达,从而抑制少突胶质前体细胞分化^[12]。在缺氧研究中发现,抑制 miRNA-200 表达可诱导内皮细胞血管生成,改善组织缺氧^[13]。由此可见,miRNA-200 参与神经系统损伤修复的病理过程。本研究发现 miRNA-200 表达下调,GO 功能富集提示主要与神经元形成与分化有关,推测新生大鼠神经系统损伤后,机体修复神经元及促进血管生成,与上述研究结论一致。故本研究认为,miR-200 家族有望成为 HIE 治疗靶点之一。

在 HIE 中 KEGG 通路分析结果显示 MAPK 信号通路激活。MAPK 家族主要包括细胞外调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK),通过调节细胞内相关基因转录,参与细胞增殖、分化、癌变、转移、凋亡等生理过程,介导生长发育、炎症反应等^[14]。研究表明,MAPK 参与调节脑缺血再灌注损伤的发生、发展过程,但存在脑保护及脑损伤双重作用^[15-16]。本研究发现 HIE 组表达上调的 11-10767 及 mmu-miR-874-5p 调控的 8 个靶基因(Braf, Mapt, Ppp5c, Mapk8ip2, Fgf6, Flt1, Ngfr, Tgfb1)共同参与此信号通路,可为治疗靶点提供参考方向。

综上所述,本研究初步筛选出 HIE 中差异 miRNA 表达谱,构建靶基因调控网络,提示 HIE 发生机制复杂多样,需进一步对差异表达的 miRNA 进行验证、分子机制及信号通路调控的研究。随着不断发现及深入研究 miRNA 及其靶位点,miRNA 在 HIE 中发挥的作用将逐步被揭开,分子机制也将逐渐阐明。这将为 HIE 找到新的生物标志物和治疗靶点提供思路及理论基础。

参考文献

- [1] 邵肖梅,叶鸿瑁,丘小汕.实用新生儿学[M].5 版.北京:人民卫生出版社,2019.
- [2] WANG Q, LV H, LU B, et al. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: emerging therapeutic strategies based on pathophysiologic phase of the injury[J]. Matern Fetal Neonatal Med, 2019, 32(21): 3685-3692.
- [3] KLOOSTERMAN W P, PLASTERK R H. The diverse

function of microRNAs in animal development and disease[J]. Dev Cell, 2006, 11(4): 441-450.

- [4] PEEPLES E S, SAHAR N E, SNYDER W, et al. Temporal brain microRNA expression changes in a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic injury [J]. Pediatr Res, 2022, 91(1): 92-100.
- [5] MENDELL J T, OLSON E N. MicroRNAs in stress signaling and human disease[J]. Cell, 2012, 148: 1172-1187.
- [6] PEEPLES E S. MicroRNA therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic brain injury: a narrative review[J]. Pediatr Res, 2023, 93(4): 780-788.
- [7] PONNUSAMY V, YIP P K. The role of microRNA in newborn brain development and hypoxic ischaemic encephalopathy[J]. Neuropharmacology, 2019, 149(1): 55-65.
- [8] HOU Y, ZHEN J, XU X, et al. miR-215 functions as a tumor suppressor and directly targets ZEB2 in human non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2015, 10: 1985-1992.
- [9] SINGH A, BHATTACHARYA N, SRIVASTAVA A, et al. MicroRNA-215-5p treatment suppresses mesothelioma progression via the MDM2-p53-signaling axis[J]. Mol Ther, 2019, 4: 1665-1680.
- [10] LI W, LINGDI L, XIQIANG D, et al. MicroRNA-215-5p inhibits the proliferation and migration of Wilm's tumor cells by targeting CRK [J]. Technol Cancer Res Treat, 2021, 20: 15330338211036523.
- [11] SUNDARARAJAN V, BURK U C, BAJDAK-RUSINEK K. Revisiting the miR-200 Family: a clan of five siblings with essential roles in development and disease[J]. Biomolecules, 2022, 12(6): 781.
- [12] BULLER B, CHOPP M, UENO Y, et al. Regulation of serum response factor by miRNA-200 and miRNA-9 modulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation [J]. Glia, 2012, 60(12): 1906-1914.
- [13] CHAN Y C, KHANNA S, ROY S, et al. MiR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(3): 2047-2056.
- [14] BOST F, AOUDI M, CARON L, et al. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity[J]. Biochimie, 2005, 87(1): 51-56.
- [15] ZHANG J, XIA J, ZHANG Y, et al. HMGB1-TLR4 signaling participates in renal ischemia reperfusion injury and could be attenuated by dexamethasone-mediated inhibition of the ERK/NF- κ B pathway[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(10): 4054.
- [16] ZHAO J, LE M, LI J, et al. LINC00938 alleviates hypoxia ischemia encephalopathy induced neonatal brain injury by regulating oxidative stress and inhibiting JNK/p38 MAPK signaling pathway [J]. Exp Neurol, 2023, 367: 1414449.