

癫痫所致CD57小鼠脑组织海马区小胶质细胞极化后基因表达的研究

贺苗苗^{1,2*}, 王宇青³, 王莉⁴, 曹相玫^{1#}

¹宁夏医科大学基础医学院病理学系, 宁夏 银川

²永宁县公安局城关派出所, 宁夏 银川

³宁夏医科大学第一临床医学院, 宁夏 银川

⁴宁夏医科大学公共卫生学院, 宁夏 银川

收稿日期: 2024年8月18日; 录用日期: 2024年9月12日; 发布日期: 2024年9月19日

摘要

目的: 研究癫痫对C57小鼠脑组织海马区小胶质细胞极化后基因表达的差异。方法: 40只C57小鼠随机分为对照组(CNC组12只)及癫痫组PTZ (CPTZ组(戊四氮pentylenetetrazole, PTZ)组28只), CNC组给予生理盐水, CPTZ组给予戊四氮, 隔日腹腔注射, 共28 d。诱导癫痫过程中, 观察小鼠行为, 癫痫发作级别、持续时间及结局, 实验结束后取材, 进行相应转录组测序分析。样本的MethylationEPIC BeadChip实验及数据分析由欧易生物技术有限公司(中国上海)进行。结果: 转录组相关测序显示癫痫发作改变小鼠脑组织海马区小胶质细胞M2型的基因表达, 其中表达上调基因245个, 表达下调基因88个。结论: 癫痫发作改变小鼠海马区小胶质细胞的基因异常表达。

关键词

癫痫, 小胶质细胞, 基因表达, 转录组测序

Gene Expression Research after Microglia Polarization in the Hippocampus of CD57 Mouse with Epilepsy

Miaomiao He^{1,2*}, Yuqing Wang³, Li Wang⁴, Xiangmei Cao^{1#}

¹Department of Pathology, Basic Medical School, Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia

²Chengguan Police Station, Yongning County Public Security Bureau, Yinchuan Ningxia

³The First Clinical Medical School, Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia

⁴School of Public Health, Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 贺苗苗, 王宇青, 王莉, 曹相玫. 癫痫所致 CD57 小鼠脑组织海马区小胶质细胞极化后基因表达的研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(9): 1142-1146. DOI: 10.12677/acm.2024.1492577

Abstract

Objective: To investigate the effects of epilepsy on the mechanized gene expression of microglia in hippocampus of C57 mouse. **Methods:** 40 C57 mice were randomly divided into control group (12 in CNC group) and PTZ group (28 in CPTZ group). The CNC group was given normal saline, and the CPTZ group was given pentatetrazole by intraperitoneal injection every other day for a total of 28 days. During the process of inducing epilepsy, the behavior, seizure level, duration and outcome of the mice were observed. After the experiment, the samples were collected and analyzed by transcriptome sequencing. Sample MethylationEPIC BeadChip experiments and data analysis were performed by OYI Biotechnology Co., Ltd. (Shanghai, China). **Results:** Transcriptome-related sequencing showed that epileptic seizure changed the expression of M2 type of microglia in the hippocampus of mouse brain tissue, including 245 up-regulated genes and 88 down-regulated genes. **Conclusion:** Epileptic seizure changes the abnormal gene expression of microglia in hippocampus of mouse.

Keywords

Epilepsy, Microglia, Gene Expression, Transcriptome Sequencing

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

癫痫是以暂时性中枢神经系统功能失常为特征, 由脑神经元异常放电导致的一种慢性脑部疾病[1], 对患者行为、认知等方面均产生影响。目前, 药物治疗仍是癫痫的主要治疗方法, 但是其本质是抗癫痫发作, 而非改善癫痫导致的后果[2]。小胶质细胞是大脑中的先天免疫细胞, 也是病理性损伤的第一反应者[3], 在癫痫等病理状态下, 病灶周围的小胶质细胞迅速被激活, 随后释放一系列的细胞因子, 并可吞噬细胞碎片或病原体、调节突触功能。并在维持中枢神经系统的稳态中起着关键作用[4]。那么癫痫发作对于脑组织的损伤与基因的表达有何关系还鲜有报道。因此, 本文通过转录组测序探究癫痫对于脑组织基因表达进行一定的研究。

2. 材料与方法

2.1. 材料

清洁级 18~20 g 雄性 C57 小鼠 40 只, 自由饮食, 室内温度 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $50\% \pm 10\%$ 。3 d 更换垫料, 环境干燥清洁、安静舒适。戊四氮(Pentylentetrazole, PTZ), 购自美国 Sigma 公司; 0.9%生理盐水。

2.2. 方法

样本的 MethylationEPIC BeadChip 实验及数据分析由 OE 生物技术有限公司(中国上海)进行。

3. 结果

基因在每一个样本中的表达

对癫痫小鼠脑组织样本进行测序分析。各样本中检出基因数目统计, 图中围绕一个极点, 每扇为一

个样本的基因数目，不同颜色划分出基因数目区间(图 1(A))，反映出 CPTZ 和 CNC 两组中不同 count 的基因数量。FPKM 法(图 2)能消除蛋白编码基因长度和测序量差异对计算蛋白编码基因表达的影响，计算得到的基因表达量高或低，箱线图(Box-whisker Plot)，是利用数据中的五个统计量：最小值、第一四分位数(25%)、中位数(50%)、第三四分位数(75%)和最大值来描述数据的一种方法，它也可以粗略地看出数据分布的分散程度等信息(图 1(B))，横轴为样本名称，纵轴为 $\log_{10}(\text{FPKM})$ ，每个区域的盒形图对应五个统计量(至上而下分别为最大值，第三四分位数，中值，第一四分位数和最小值)，从图中我们可以看出两样本之间基因表达数目及基因表达分布存在一定的差异。

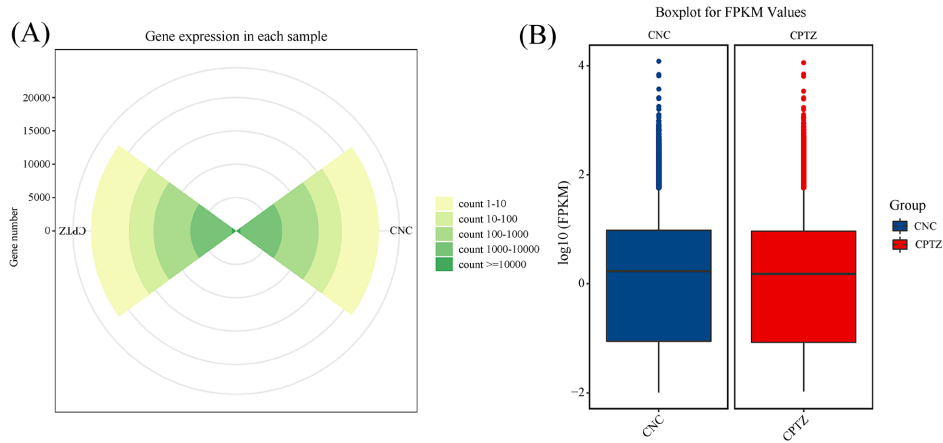


Figure 1. Transcriptome sequencing analysis. (A) Number of genes in each sample; (B) FPKM box map
图 1. 转录组测序分析。(A) 每个样本中的基因数目; (B) FPKM 箱线图

$$\text{FPKM (A)} = \frac{\text{比对到基因A的fragments数}}{\text{比对到所有基因的总fragments数} \times \text{基因A的长度}} \times 10^9$$

Figure 2. FPKM correction formula
图 2. FPKM 校正公式

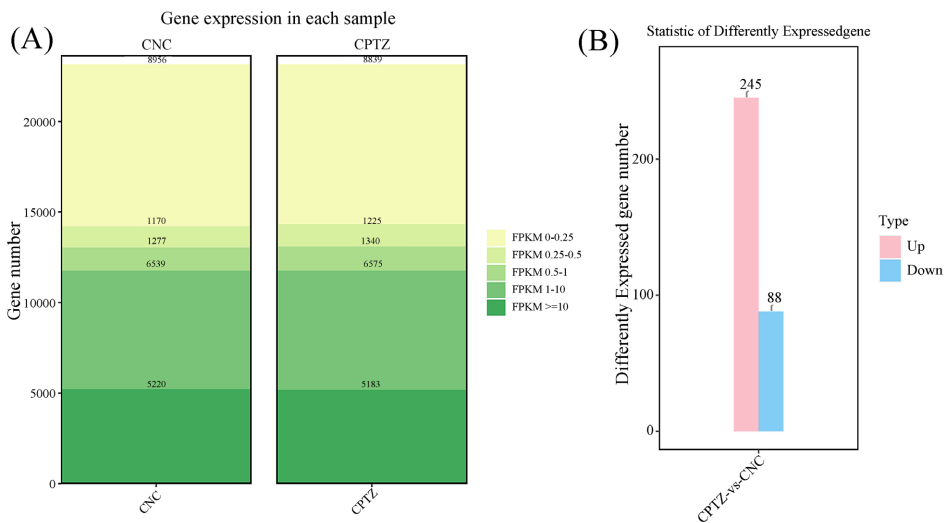


Figure 3. Transcriptome sequencing analysis. (A) FPKM analyzed by transcriptome sequencing;
 (B) Statistical histogram of differential genes
图 3. 转录组测序分析。(A) FPKM 表达量分布图; (B) 差异基因统计柱状图

由于样本的基因表达数目及基因表达值分布存在一定差异,可以将样本表达值(FPKM)划分为不同区间,计算不同表达区间样本表达的基因数目,并绘制堆积柱状图进行展示(图 3(A)),图中不同颜色代表不同范围的 FPKM 值,横轴为样本,纵轴为蛋白编码基因数量,可以看出对照组(CNC 组)和实验组(CPTZ 组)蛋白编码基因数量存在差异。利用 DESeq2 [4]软件对各个样本基因的 counts 数目进行标准化处理(采用 BaseMean 值来估算表达量),计算差异倍数,并采用 NB (负二项分布检验的方式)进行差异显著性检验,最终根据差异倍数及差异显著性检验结果来筛选差异蛋白编码基因(图 3(B))。横轴是各个比较组,纵轴是比较组的差异基因数量;其中 Up 是显著性差异的上调基因数量,共 245 个;Down 是显著性差异的下调基因数量,共 85 个。

4. 讨论

癫痫是一组由脑部神经元异常过度放电引起的以短暂性的中枢神经系统功能失常为特征的慢性脑部疾病[5]。激活的小胶质细胞可通过释放大炎症因子,引发神经毒性,诱导神经元损伤和凋亡,抑制神经元再生[6]。癫痫发作对小胶质细胞激活的形态学影响包括小胶质细胞的胞体大小、突起长度、突起数目及分支复杂性的变化等。实验研究中诱导的啮齿类动物癫痫发作揭示了显著的小胶质细胞的形态学改变[7]。但是小胶质细胞在癫痫发作中的作用和机制尚未被具体阐明,因此转录组测序可以展示癫痫发作后小胶质细胞的分子层面上的变化,后续可以从具有显著改变的差异化基因中挑选出重要且有意义的基因,为小胶质细胞的极化在癫痫中的作用的探究打下基础。

组学包括基因组学、转录组学、蛋白质组学等,是指运用高通量技术检测不同分子区域变化,对生物系统进行全面解读[8][9]。转录组学是功能基因组学的重要组成部分,转录水平调控是最常见的调控方式,可从整体水平上研究细胞中所有基因表达情况及转录调控的规律[10][11]。现在常用的测序技术包括微阵列技术、基因芯片技术、大规模平行测序技术及 RNA 测序技术(RNA Sequencing, RNA-Seq)等[12]-[14]。转录组测序是对细胞中的转录本进行的非靶向定量,能够更加深入的使我们了解和研究细胞的类型、细胞的特征、细胞的亚群等,还可用于其他如识别新细胞类型、确定新的细胞群。因为此项技术具有其独特的优点,成为目前生物科学、医学、农业等许多领域的研究方式,极大的改变了现有的研究方式。同时转录组也应用于肿瘤等重要领域,已在肿瘤异质性、肿瘤转移、肿瘤微环境、抗肿瘤药物研发等方面的研究中广泛应用,拓展并加深了人们对肿瘤的认识,为肿瘤的防治提供了新的思路 and 策略[15]。

神经炎症、神经元变性及神经退化等在诱发癫痫发作中起着重要作用,而活化的 MG 根据不同表型可以产生不同类型的炎症介质介导神经系统炎症损伤。此外, MG 还可通过对神经元、神经发生及突触修剪的影响参与癫痫的发生发展。因此,针对 MG 相关的炎症信号通路及其对神经元变性、神经发生和突触修剪的影响, MG 可能会成为有希望的下一代的癫痫药物设计目标,为那些对抗癫痫药常规治疗耐药的患者提供新的治疗思路[5]。因此我们将转录组测序应用于癫痫小鼠模型中,通过取出小鼠对照组和癫痫组海马区脑组织进行转录组测序。后续可以通过转录组测序所得出的显著差异基因(DEGs),通过阅读大量文献从中筛选出与癫痫相关的基因和通路,进行后续的药物靶向研究,探究其中的不同。

综上所述,我们对对照组和癫痫组的 C57 小鼠的脑组织海马区取样后利用转录组测序的方法,发现了癫痫发作改变 C57 小鼠脑组织海马区小胶质细胞的基因表达模式,并从中发现多个显著差异基因,与小胶质细胞的通路相关。因此,本文也为更多在癫痫领域的研究以及癫痫的治疗方面提供了一种新的方法和思路,未来也希望转录组测序可以用在更多的领域,做出更大更多的贡献。

基金项目

宁夏重点研发重点项目(项目编号: 2023BEG02009)。

参考文献

- [1] Wu, Q., Wang, H., Liu, X., Zhao, Y. and Su, P. (2022) Microglial Activation and over Pruning Involved in Developmental Epilepsy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **82**, 150-159. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlac111>
- [2] 史向松, 宋苏蒙, 徐建洋. 癫痫药物治疗的过去、现在与未来[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2023, 23(2): 78-88.
- [3] Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J.E., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., *et al.* (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *The Lancet Neurology*, **14**, 388-405. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(15)70016-5)
- [4] Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M.A. and Quintana, F.J. (2021) Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages—From Origin to Disease Modulation. *Annual Review of Immunology*, **39**, 251-277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-110159>
- [5] 申佳, 孙凡雅, 狄政莉. 小胶质细胞在癫痫发作状态中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2023, 50(6): 57-62.
- [6] 贾音, 曾常茜, 王丹. 癫痫相关小胶质细胞分子信号转导机制研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2023, 23(10): 948-953.
- [7] 刘黔飞, 刘瑛, 叶兰, 冯占辉. 小胶质细胞参与癫痫发病机制的研究进展[J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2023, 32(4): 225-228.
- [8] Rajczewski, A.T., Jagtap, P.D. and Griffin, T.J. (2022) An Overview of Technologies for MS-Based Proteomics-Centric Multi-Omics. *Expert Review of Proteomics*, **19**, 165-181. <https://doi.org/10.1080/14789450.2022.2070476>
- [9] Wang, X., Liu, C., Chen, L. and Zhang, Q.C. (2021) RNA Structure Probing Uncovers RNA Structure-Dependent Biological Functions. *Nature Chemical Biology*, **17**, 755-766. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00805-7>
- [10] de Jong, E. and Bosco, A. (2021) Unlocking Immune-Mediated Disease Mechanisms with Transcriptomics. *Biochemical Society Transactions*, **49**, 705-714. <https://doi.org/10.1042/bst20200652>
- [11] Martyniuk, C.J., Feswick, A., Munkittrick, K.R., Dreier, D.A. and Denslow, N.D. (2020) Twenty Years of Transcriptomics, 17Alpha-Ethinylestradiol, and Fish. *General and Comparative Endocrinology*, **286**, Article 113325. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113325>
- [12] Shi, H., Zhou, Y., Jia, E., Pan, M., Bai, Y. and Ge, Q. (2021) Bias in RNA-Seq Library Preparation: Current Challenges and Solutions. *BioMed Research International*, **2021**, Article 6647597. <https://doi.org/10.1155/2021/6647597>
- [13] Gill, N. and Dhillon, B. (2021) RNA-Seq Data Analysis for Differential Expression. *Methods in Molecular Biology*, **2391**, 45-54. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1795-3_4
- [14] Li, D., Zand, M.S., Dye, T.D., Goniewicz, M.L., Rahman, I. and Xie, Z. (2022) An Evaluation of RNA-Seq Differential Analysis Methods. *PLOS ONE*, **17**, e0264246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264246>
- [15] 胡静涵, 胡懿凡, 蒋俊锋, 熊俊. 单细胞转录组测序技术及其在肿瘤研究中的应用进展[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(7): 800-807.