

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.05.012

论著·实验研究

炎症诱导早产小鼠脑组织长链非编码RNA的筛选及验证研究

陈茹娟 奚莎 王凡 肖谧 林晓洁 刘俐

(西安交通大学附属第一医院新生儿科, 陕西 西安 710061)

[摘要] **目的** 探讨长链非编码RNA (lncRNA) 与炎症诱导早产小鼠脑损伤的关系, 为脑损伤的防治提供依据。**方法** 孕鼠腹腔注射LPS建立炎症诱导早产小鼠脑损伤模型(早产组), 正常孕鼠分娩足月小鼠作为对照(足月组)。应用lncRNA芯片技术筛选与早产小鼠脑损伤相关的lncRNA, 并应用Real-time PCR技术对lncRNA进行验证。**结果** 比较早产组与足月组, 显著差异表达的lncRNA有1978条($P < 0.05$), 包括上调lncRNA 786条, 下调lncRNA 1192条, 其中差异表达1.5倍及以上的lncRNA共有29条。对差异表达倍数最高的前10条lncRNA行进一步分析, 发现这些lncRNA可能参与转录、信号转导、凋亡、细胞周期、炎症反应等生物学过程, 并与G蛋白偶联受体信号通路、神经肽信号通路有关。对其中2条lncRNA在早产组和足月组脑组织中的表达进行Real-time PCR验证, 发现与芯片结果一致。**结论** 炎症诱导早产小鼠脑组织中的lncRNA表达谱发生了明显变化, G蛋白偶联受体信号通路可能参与早产脑损伤的发生机制。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(5): 435-439]

[关键词] 长链非编码RNA; 炎症; G蛋白偶联受体; 小鼠

Screening and validation of long non-coding RNAs in brain tissue of inflammation-induced preterm mice

CHEN Ru-Juan, XI Sha, WANG Fan, XIAO Mi, LIN Xiao-Jie, LIU Li. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China (Liu L, Email: liuli918@163.com)

Abstract: Objective To investigate the association between long non-coding RNAs (lncRNAs) and brain injury in inflammation-induced preterm mice, and to provide a reference for the prevention and treatment of brain injury. **Methods** An intraperitoneal injection of lipopolysaccharide in pregnant mice was performed to establish a model of inflammation-induced preterm mice with brain injury (preterm group). The full-term mice delivered by normal pregnant mice were used as controls (full-term group). The lncRNA chip assay was used to screen out the lncRNAs associated with brain injury in preterm mice. Quantitative real-time PCR was used to validate the lncRNAs identified by the above method. **Results** The preterm and full-term groups showed significant differences in the expression of 1978 lncRNAs ($P < 0.05$), consisting of 786 up-regulated lncRNAs and 1192 down-regulated lncRNAs, and 29 lncRNAs were 1.5 or more times differentially expressed between the two groups. A further analysis was performed for the 10 most differentially expressed lncRNAs, and the results showed that these lncRNAs were involved in the biological processes including transcription, signal transduction, apoptosis, cell cycle, and inflammatory response, as well as G protein-coupled receptor signaling pathway and neuropeptide signaling pathway. Real-time PCR was performed to validate the expression of two lncRNAs in brain tissue in the preterm and full-term groups, and the results were consistent with those of the chip assay. **Conclusions** The expression profiles of lncRNAs in brain tissue change significantly in inflammation-induced preterm mice, and the G protein-coupled receptor signaling pathway may be involved in the pathogenesis of preterm brain injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(5): 435-439]

Key words: Long non-coding RNA; Inflammation; G protein-coupled receptor; Mice

[收稿日期] 2016-01-21; [接受日期] 2016-03-23

[基金项目] 国家自然科学基金(81571477)。

[作者简介] 陈茹娟, 女, 博士研究生。

[通信作者] 刘俐, 女, 教授。

已有大量研究表明母亲宫内感染 / 炎症反应是导致胎儿早产的重要原因, 并对早产儿神经系统发育造成严重影响^[1]。近年来, 对早产儿脑损伤分子生物学机制的研究取得了很大进展。多种蛋白编码基因及信号通路如 Cdk2 基因、Olig2 基因、Wnt/ β -catenin、STAT-3、Notch 信号通路等被证明参与早产脑损伤的发生及发展^[2-3], 但未能完全阐明其关键点和机制。

近年来逐渐引起广泛关注的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是长度大于 200 nt 的转录本^[4-5]。相比于 miRNA 及编码基因, lncRNA 数量、种类更多, 功能及作用机制相对更丰富, 通过在染色体、转录、转录后、蛋白等多层次调控基因表达^[6-7], 参与生物体多种生理或病理过程, 包括生物进化、细胞周期及机体信号传导, 并调控感染、免疫反应的发生发展等^[8-9]。已有研究表明, lncRNA 在脑发育及疾病中具有重要作用。如近期研究发现 lncRNA 表达谱在蛛网膜下腔出血所致早期脑损伤中发生明显变化^[10]; lncRNA FosDT 能通过与相关蛋白互相作用而促进缺血性脑损伤的发展^[11]。提示 lncRNA 的异常表达与脑损伤密切相关, 但 lncRNA 在早产脑损伤中的研究尚未见报道。本研究中, 我们应用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为炎症诱导因子, 建立早产小鼠脑损伤模型, 并采用 lncRNA 芯片技术筛选与炎症诱导早产脑损伤相关的差异表达 lncRNA。本研究首次描述了早产脑损伤相关 lncRNA 表达谱, 为探讨 lncRNA 与早产脑损伤的关系及其防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

雌性 BALB/c 小鼠与雄性 C57 小鼠由西安交通大学医学院动物中心提供; 脂多糖购于美国 Sigma 公司; GeneChip Mouse Transcriptome (MT) Array 1.0 芯片购自美国 Affymetrix 公司; 芯片数据分析由上海其明公司提供; TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购于日本 Takara 公司; Step One Plus 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; β -actin 及 2 条 lncRNA 引物由上海生工公司合成。

1.2 炎症诱导早产动物模型制备

成年雌性 BALB/c 小鼠 28 只与雄性 C57 小鼠

14 只于 SPF 级环境饲养。按雌雄 2:1 合笼, 以检查到母鼠出现阴栓为妊娠 0 d。将孕鼠随机分为对照组和 LPS 组单独饲养, 每组 14 只。妊娠 17 d 时, LPS 组于不同时间点连续两次腹腔注射 LPS (血清型 055:B5, 美国 Sigma 公司) 50 μ g/kg, 对照组注射相同剂量磷酸盐缓冲液。对照组孕鼠于妊娠 21 d 时分娩的小鼠纳入足月组, LPS 组孕鼠于妊娠 18 d 时分娩的小鼠纳入早产组^[12]。

1.3 脑组织病理学检查

两组各取 6 只仔鼠脑组织, 去除小脑及脑干后置于 4% 多聚甲醛中固定, 梯度乙醇脱水。常规石蜡包埋, 冠状面切片厚度 10 μ m、行苏木精-伊红 (HE) 染色, 40 倍光镜下观察脑组织病理学变化。

1.4 芯片选择与探针设计

利用 Gene Chip Mouse Transcriptome (MT) Array 1.0 芯片, 该芯片覆盖 NCBI RefSeq、Ensemble、NONCODE、lncRNA db 等多个权威数据库, 可检测约 55000 条 lncRNA。芯片的探针为长度 25-mer 的寡核苷酸, 用于芯片杂交中质量评估的外标基因有 BioB、BioC、BioD 和 Cre X。

1.5 样本总 RNA 的提取与检测

两组各取 3 只仔鼠脑组织, 用 TRIzol 提取脑组织样本总 RNA。紫外分光光度计检测总 RNA 浓度及 A260/A280, 结合琼脂糖凝胶电泳图, 分析样本总 RNA 质量。

1.6 芯片实验

两组各取 3 只仔鼠脑组织, 按照 Affymetrix 公司的 GeneChip WT PLUS Reagent Kit 试剂盒说明书合成 ss-cDNA, 并对 ss-cDNA 进行片段化、标记, 再与 Affymetrix 的基因芯片杂交。杂交后应用 Fluidics Station 450 对芯片进行洗染。应用 Affymetrix 的 GeneChip Scanner 3000 7G 扫描仪对芯片的荧光强度进行扫描, 再将 CEL 文件输入 Expression Console 软件进行数据标准化处理。以上芯片实验由上海其明公司完成。

1.7 Real-time PCR 验证

选取 2 条 lncRNA 进行 real-time PCR 验证, 以 β -actin 为内参基因, 引物序列见表 1。两组各取 3 只仔鼠脑组织, 用 TRIzol 提取脑组织样本总 RNA, 将总 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 采用 Step One Plus 荧光定量 PCR 仪, SYBR Green 荧光染料法进行相对定量。采用 20 μ L 反应体系,

含 SYBR Premix 10 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, DEPC 水 7 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 35 个循环。结果以 Ct 值表示, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较 lncRNA 在早产组和足月组小鼠脑组织中的表达差异。

表 1 lncRNA 及 β -actin 引物序列

lncRNA 编号 *	引物序列 (5' \rightarrow 3')
KnowTID_00002271	Forward: TTCAGGTCGTGTTTTGGTCCC Reverse: GCAAGTGCGATTTCCAGAGAA
NONMMUT036082	Forward: TCTGGTTTTGGTCCCAAGAAGT Reverse: CAACTCAAATGGACCTGTCTCCA
β -actin	Forward: AACAGTCCGCCTAGAAGCAC Reverse: CGTTGACATCCGTAAGACC

注: * 表示 lncRNA 在 NONCODE 数据库中的编号。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立样本 *t* 检验比较 lncRNA 在两组样本中的表达差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理学改变

肉眼可见早产组小鼠脑组织充血、肿胀明显。光镜下观察: 早产组小鼠脑组织细胞排列疏松, 并出现大面积坏死灶, 灶内神经元广泛溶解、消失, 出现大量泡沫细胞; 而足月组小鼠脑组织细胞排列较整齐紧密, 细胞形态正常, 未见明显坏死灶及泡沫细胞。见图 1。

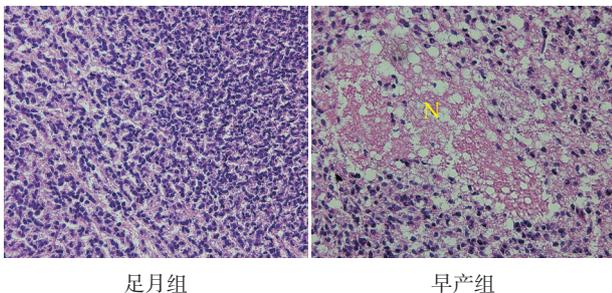


图 1 新生鼠脑组织苏木精-伊红染色 ($\times 40$) 足月组小鼠脑组织细胞排列紧密, 未见坏死灶; 早产组小鼠脑组织可见坏死灶。N 为坏死灶。

2.2 总 RNA 样本质检结果

所有样本总 RNA 的 A260/A280 值均在 1.8~2.2 之间, 琼脂糖凝胶电泳可见 28S 和 18S 两条核糖体 RNA 条带 (图 2), 质量检测结果全部通过 (表 2), 可用于后续芯片检测。

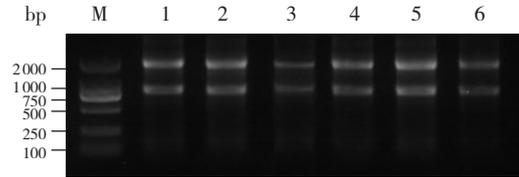


图 2 脑组织样本总 RNA 电泳图 M 为 Marker; 1~3 分别为早产组小鼠脑组织 3 个样本; 4~6 分别为足月组小鼠脑组织 3 个样本。

表 2 小鼠脑组织 RNA 质检结果

样本编号	A260/A280	浓度 (ng/ μ L)	总 RNA (μ g)	质检结果
1	2.11	371.3	19.78	通过
2	2.12	325.3	13.13	通过
3	1.90	71.2	1.78	通过
4	2.11	350.8	28.77	通过
5	1.99	341.0	11.03	通过
6	1.92	299.0	7.48	通过

注: 1~3 分别为早产组小鼠脑组织 3 个样本; 4~6 分别为足月组小鼠脑组织 3 个样本。

2.3 芯片杂交结果

将质检合格的 6 份样本进行芯片检测, 结果显示: 在早产组与足月组中, 显著差异表达的 lncRNA 共有 1978 条 (取 $P < 0.05$), 包括上调 lncRNA 786 条, 下调 lncRNA 1192 条。其中差异表达 1.5 倍及以上的 lncRNA 共有 29 条。通过 NONCODE 数据库 (www.bioinfo.org/NONCODEv4) 对差异表达倍数最高的前 10 条 lncRNA 进一步分析, 发现这些 lncRNA 参与众多生物学过程, 如转录、信号转导、凋亡、细胞周期、炎症反应等, 还与 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 信号通路、神经肽信号通路有关 (表 3)。

2.4 Real-time PCR 结果

应用 Real-time PCR 对 2 条 lncRNA 在早产组和足月组脑组织中的表达进行验证, 发现与芯片结果一致 (图 3)。

表 3 差异表达倍数最高的前 10 条 lncRNA

lncRNA 编号 *	差异倍数	染色体	调节	可能参与的功能及信号通路
NONMMUT048938	3.06	chr4	上调	无
KnowTID_00006493	2.77	chr7	上调	无
KnowTID_00002271	2.58	chr14	上调	信号转导; 转录; 凋亡
NONMMUT036082	2.51	chr2	上调	转录; 细胞迁移
KnowTID_00006395	2.46	chr6	上调	神经肽信号通路; G 蛋白偶联受体信号通路
KnowTID_00001995	2.40	chr13	上调	细胞周期; 蛋白磷酸化
KnowTID_00001219	2.36	chr11	上调	转录; G 蛋白偶联受体信号通路; 炎症反应
NONMMUT056583	2.35	chr6	上调	生物反应过程
KnowTID_00000711	2.34	chr10	上调	无
KnowTID_00001809	2.31	chr13	上调	无

注: * 表示 lncRNA 在 NONCODE 数据库中的编号。

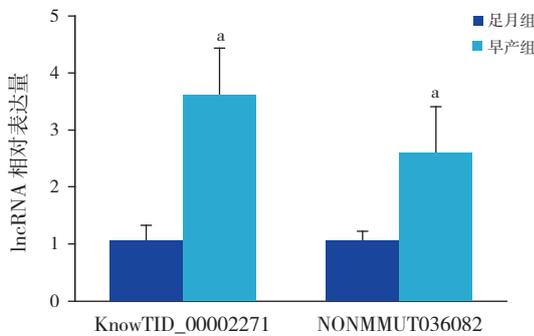


图 3 Real-time PCR 检测脑组织差异表达 lncRNA (n=3) lncRNA KnowTID_00002271、NONMMUT036082 在早产组小鼠脑组织中表达明显上调, 与芯片结果一致。a 示与足月组比较, P<0.01。

3 讨论

已有研究表明, lncRNA 在多种神经系统疾病中发挥重要作用。如 lncRNA BDNF-AS 参与亨廷顿病、精神分裂症、抑郁症等的发生发展^[8]; lncRNA BACE1-AS 在阿尔兹海默病患者脑组织中上调表达, 与其发病机制密切相关^[13]。然而 lncRNA 在与早产导致的脑损伤、脑发育异常的相关研究尚未见报道。高通量 lncRNA 芯片技术为寻找早产脑损伤诊治靶点提供了捷径。本研究成功建立了宫内炎症诱导早产小鼠脑损伤模型, 通过 lncRNA 芯片技术对早产及足月产小鼠脑组织中 lncRNA 的表达谱进行分析。研究发现, 在两组小鼠脑组织中, 显著差异表达的 lncRNA 共有 1978 条, 上调表达的 lncRNA 有 786 条, 下调表达的 lncRNA 有 1192 条。这提示, 脑损伤早产鼠脑组织中的 lncRNA 表达谱发生了明显变化, 这些表达

变化的 lncRNA 可能参与了早产脑损伤的发病过程。

脑发育过程中涉及一系列复杂的分子事件, 需要对基因的时空表达进行精确的调控, 从而形成复杂的神经网络系统^[14]。lncRNA 在发育及成熟的大脑中广泛表达^[15], 能够在多层面调控编码基因表达。如在表观遗传水平调节 DNA 甲基化、调节组蛋白修饰、调节基因组印记、诱发染色体重组等; lncRNA 还可以通过与编码基因相互作用形成小干扰 RNA 调节基因表达水平等方式参与生物体多种生理或病理过程。为阐明 lncRNA 在早产脑损伤中的功能, 本研究进一步对差异表达倍数较高的 lncRNA 进行分析后发现, 这些变化的 lncRNA 参与众多生物学过程, 如转录、信号转导、凋亡、细胞周期、炎症反应等。因此我们推测, lncRNA 在早产脑损伤的发生中可能具有重要的作用, 但其具体作用方式还需进一步研究。同时, 还发现差异表达的 lncRNA 与 GPCRs 等信号通路相关, 提示 GPCRs 可能参与了早产脑损伤的调控。GPCRs 是人类最大的一类跨膜受体家族, 具有丰富的种类和功能, 通过与相应配体结合, 完成细胞内外的信号转导。GPCRs 介导的信号通路对体内神经系统、心血管系统、免疫系统、肿瘤的发生发展等发挥广泛调控作用, 并与多条信号通路如 Wnt、MAPK 等信号通路具有交互作用。GPCRs 被证明在神经系统的发育及疾病中有重要作用。如近年来研究较多的 GPR56 能够调控少突胶质细胞发育^[16]; 其与配体 collagen III 结合可激活 RhoA 信号通路, 在脑皮质发育和分层中发挥重要作用^[17-18]。其他 GPCRs 如 GPR3、GPR17 等也被报

道与神经系统发育密切相关。但至今尚无 GPCRs 与 lncRNA 在早产脑发育中相互作用关系的报道,二者是否以配体受体结合的方式发挥作用还不得而知,因此可将其作为下一步研究的一个新思路。

越来越多的研究表明 lncRNA 在神经系统发育及疾病中具有重要作用。而相对于蛋白编码基因, lncRNA 在神经系统中的研究在国内外还处于起步阶段。我们虽然已筛选出在早产小鼠脑组织中差异表达的 lncRNA,并对其表达谱进行了初步分析,但对于这些 lncRNA 的功能及与编码基因的作用关系还不明确。后续研究中,我们将建立 lncRNA 与编码基因等的共表达网络,并通过 lncRNA 相关生物技术对 lncRNA 的功能及作用机制进行深入探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Yuan TM, Sun Y, Zhan CY, et al. Intrauterine infection/inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 229(1-2): 16-25.
- [2] Salmaso N, Jablonska B, Scafidi J, et al. Neurobiology of premature brain injury[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(3): 341-346.
- [3] Fancy SP, Harrington EP, Baranzini SE, et al. Parallel states of pathological Wnt signaling in neonatal brain injury and colon cancer[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(4): 506-512.
- [4] Nagano T, Fraser P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2011, 145(2): 178-181.
- [5] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.
- [6] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 155-159.
- [7] Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(13): 1494-1504.
- [8] Ng SY, Lin L, Soh BS, et al. Long noncoding RNAs in development and disease of the central nervous system[J]. *Trends Genet*, 2013, 29(8): 461-468.
- [9] Qureshi IA, Mehler MF. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13(8): 528-541.
- [10] Zheng B, Liu H, Wang R, et al. Expression signatures of long non-coding RNAs in early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 967-973.
- [11] Mehta SL, Kim T, Vemuganti R. Long noncoding RNA FosDT promotes ischemic brain injury by interacting with REST-associated chromatin-modifying proteins[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(50): 16443-16449.
- [12] Wang F, Xiao M, Lin XJ, et al. Expression of heme oxygenase 1 and leukemia inhibitory factor in maternal plasma and placental tissue in a lipopolysaccharide induced late-pregnancy preterm birth mouse model[J]. *J Reprod Med*, 2016, 61(1-2): 39-46.
- [13] Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase[J]. *Nat Med*, 2008, 14(7): 723-730.
- [14] 杨峰, 易凡, 曹慧青, 等. 长链非编码 RNA 研究进展[J]. *遗传*, 2014, 36(5): 456-468.
- [15] Hangauer MJ, Vaughn IW, McManus MT. Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(6): e1003569.
- [16] Giera S, Deng Y, Luo R, et al. The adhesion G protein-coupled receptor GPR56 is a cell-autonomous regulator of oligodendrocyte development[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6121.
- [17] Bae BI, Tietjen I, Atabay KD, et al. Evolutionarily dynamic alternative splicing of GPR56 regulates regional cerebral cortical patterning[J]. *Science*, 2014, 343(6172): 764-768.
- [18] Singer K, Luo R, Jeong SJ, et al. GPR56 and the developing cerebral cortex: cells, matrix, and neuronal migration[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(1): 186-196.

(本文编辑: 万静)