

小鼠脑缺血再灌注损伤不同时间点基因表达谱的变化研究

杨春辉¹, 邵贵强², 吴春荣¹, 尹雪¹

摘要 目的:通过生物信息学方法研究小鼠脑缺血再灌注损伤(CIRI)所致的损伤模型的基因表达谱变化,寻找疾病相关的关键基因。**方法:**从 Gene Expression Omnibus(GEO)中下载关于小鼠脑损伤 GSE23160 时间序列基因表达谱芯片的原始数据,分析皮质脑组织样本和纹状体脑组织样本在缺血再灌注不同时间点基因表达谱的差异,并对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析。再通过聚类分析挑取表达趋势明显的差异基因进行免疫细胞浸润分析和关键基因分析。并在大鼠 CIRI 模型上对显著差异基因进行验证。**结果:**免疫细胞浸润分析发现 CIRI 过程中出现肥大细胞和巨噬细胞浸润。CIRI 过程中的差异基因主要参与愈伤反应、炎症反应和信号转导通路等。在 2 个组织样本的不同再灌注时间点 Timp1 和 Gpr84 基因表达都发生了显著上调。大鼠 CIRI 模型进一步验证了 Timp1 和 Gpr84 基因的上调表达。**结论:**Timp1 和 Gpr84 基因可能是脑缺血再灌注过程中的关键基因。

关键词 脑缺血;再灌注损伤;基因表达;Timp1;Gpr84

中图分类号 R741;R741.02;R743 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.10.001

Study on Gene Expression Profile at Different Time Points during Cerebral Ischemia Reperfusion in Mice YANG Chun-hui¹, SHAO Gui-qiang², WU Chun-rong¹, YIN Xue¹. 1. Department of Trauma-Emergency & Critical Care Medicine Center, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Hyperbaric Oxygen Chamber, Wujing Hospital, Minhang District, Shanghai 200241, China

Abstract Objective: To explore the key genes related to ischemia reperfusion injury (CIRI) by investigating the gene expression profile of the CIRI model in mice via bioinformatics analysis. **Methods:** The expression data of GSE23160 time series dataset associated with mouse cerebral injury was downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO). The expression of gene expression profile of cortical brain tissue samples and striatum brain tissue samples at different time points after ischemia-reperfusion was analyzed. The underlying function of differentially expressed genes were predicted by GO and KEGG enrichment analysis. Then the cluster analysis was applied to identify the obvious trend of the differential genes for immune cell infiltration analysis and key genetic analysis. Consequently, the significant differentially expressed genes were verified in ischemia-reperfusion rats. **Results:** Immune cell infiltration analysis revealed that mast cells and macrophages were infiltrated during CIRI. CIRI gene differences major in the genes involved in callus, inflammatory response, and signal transduction pathway. Moreover, Timp1 and Gpr84 gene expression were significantly up-regulated in both tissues at different reperfusion time. Finally, the up-regulation of Timp1 and Gpr84 genes was further verified in ischemia-reperfusion rats. **Conclusion:** Our results suggest that Timp1 and Gpr84 genes may be the key genes in CIRI.

Key words cerebral ischemia; reperfusion injury; gene expression; Timp1; Gpr84

脑缺血一段时间后,由于再灌注导致的损伤称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)。CIRI 发生机制不明,可能与自由基生成、细胞内钙超载和细胞凋亡等相关^[1]。CIRI 的不同时期,病理生理过程不同^[2]。近年来,通过基因表达谱芯片和高通量测序技术,研究者发现在 CIRI 过程中大量基因的表达出现变化,促炎因子、转录因子和抗氧化酶基因表达增加,而离子通道和蛋白激酶等相关基因表达降

低^[3-5]。本研究利用生物信息学方法分析 CIRI 后不同时期小鼠脑组织基因表达谱芯片数据,探索关键基因,为 CIRI 防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 表达谱数据获取及预处理

从 Gene Expression Omnibus(GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载小鼠脑损伤的时间序列表达数据(GSE23160, PMID 21193029, Platform GPL6885 Illumina

作者单位

1. 复旦大学附属上海市第五人民医院创伤急救危重症医学中心

上海 200240

2. 上海市闵行区吴泾医院高压氧舱

上海 200241

基金项目

上海市闵行区卫生计生委基金(No. 2016MW02)

收稿日期

2018-08-06

通讯作者

尹雪

7252122@qq.com

MouseRef-8 v2.0 expression beadchip)的未标准化 txt 文件和注释文件。该数据集共包含 2 种脑组织样本:皮质和纹状体;各分为 4 组:假手术(sham)组、再灌注(IR)后 2 h、8 h 和 24 h 组,每组 4 例样本。

原始数据用 R (Version 3.4.0)进行读取和预处理,用 R 软件包 limma v.3.32.2^[6],采用 RMA (Robust Multi-array Average)法^[7,8]行背景校正,quantile 法行标准化,对信号值行 Log₂转换,最后用注释文件对探针进行注释,去除未匹配到基因的探针;若不同探针映射到同一基因,取不同探针的均值作为该基因的表达值。

1.2 差异表达基因筛选及差异基因聚类分析

利用 R 包 limma 分别对各组进行差异分析,分别比较 IR2、8、24 h 组与 sham 组的差异,各个对比组差异表达基因的筛选阈值均为 $P<0.05$ 且 $|\text{Log}_2\text{FC}|>0.585$ (即 1.5 倍变化)。

分别对皮质和纹状体组织中各时间点的差异基因取并集,作为 IR 组与 sham 组的差异基因集。利用 R 包 pheatmap 绘制聚类热图,聚类方法为 Complete-linkage clustering,距离算法为 Pearson correlation。

对于皮质和纹状体组的差异基因集,分别使用 R 包 Mfuzz v2.36.0^[9,10]对该数据进行噪音抗变性软聚类分析。根据基因随时间的变化趋势将结果分为不同的模块(如持续上升、持续下降、先升后降和先降后升)。分析参数为 Minimum Standard Deviation=0.3,acore=0.5,cOptimal=8。

1.3 差异表达基因的功能富集分析

首先使用 R 包 clusterProfiler v3.4.4 分析不同的表达趋势聚类的基因集。再对这些基因进行 GO 功能富集及 KEGG 通路富集分析,以 BH (Benjamini and Hochberg)校正后的超几何分布检验显著性 $P<0.05$ 为显著富集的阈值。

1.4 免疫细胞浸润分析

组织 IR 后会激活免疫系统,本研究采用 CIBERSORT^[11]方法对上述 2 个基因表达谱进行免疫细胞百分比的推算。

1.5 关键基因筛选

通过以上分析,分别得到皮质和纹状体中的基因表达变化情况。将 2 种组织的结果取交集,得到在 2 种组织中共同持续上/下调的差异表达基因,最后将其转换为大鼠的同源基因,作为参与 CIRI 过程的关键候选基因。并利用 R 包 clusterProfiler 对得到的候选关键基因进行 GO 和 KEGG pathway 富集分析。

1.6 关键基因验证

20 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术(sham)组和缺血再灌注(IR)组。IR 组大鼠采用线栓法制作大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,缺血 2 h 后将线栓拔出,分别于缺血再灌注 6、12、24、48 及 72 h 时取样;sham 组大鼠仅分离和暴露血管。用 Trizol 试剂盒分别提取各组大鼠皮质及纹状体的总 RNA 并检测浓度。用逆转录试剂盒逆转录为模板单链 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR。PCR 反应条件:95 ℃ 1 min,92 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,75 ℃ 30 s,40 个循环,每个样品均设 3 个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对关键基因相对表达量进行计算。

2 结果

2.1 差异表达基因筛选结果

GSE23160 数据集数据经预处理后得到 18120 个基因。经过差异分析及显著性阈值 ($|\text{Log}_2\text{FC}|>0.585$ 和 $P<0.05$)筛选后,各组得到的差异基因个数见表 1。

分别对皮质和纹状体在 IR 后不同时间点的差异基因结果取并集。皮质部位共得到差异基因 2240 个,纹状体部位得到差异基因 2595 个,聚类热图见图 1。同组的差异基因倾向于聚类在一起,表明差异基因可以将不同组的样本很好地区分开。

2.2 聚类分析

通过使用 Mfuzz 时间序列分析法及相应阈值,皮质和纹状体均得到 8 个基因聚类,随着时间点的变化,聚类结果呈现不同的变化情况,见图 2。

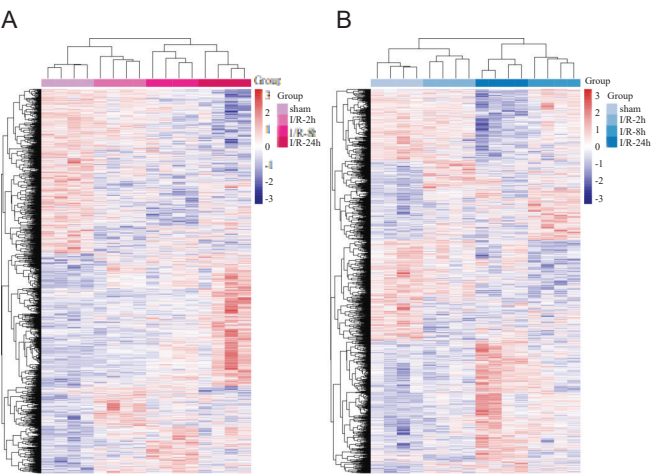
选择有连续上调或下调趋势的聚类进行后续分析。皮质部位聚类 2、4、7 的基因表达值随时间变化基本呈上升趋势,将其合并作为上调基因;聚类 5、6 呈下降趋势,将其合并作为下调基因,见图 2A、表 2。纹状体部位聚类 4、6、8 基因随时间变化基本呈上升趋势,将其合并作为上调基因;聚类 2、7 呈下降趋势,将其合并作为下调基因见图 2B、表 2。

2.3 差异表达基因的功能富集

对皮质和纹状体筛选出的上/下调基因分别进行 GO 生物学过程富集分析和 KEGG 代谢富集分析。GO 富集结果显示,皮质和纹状体的上调基因富集到许多

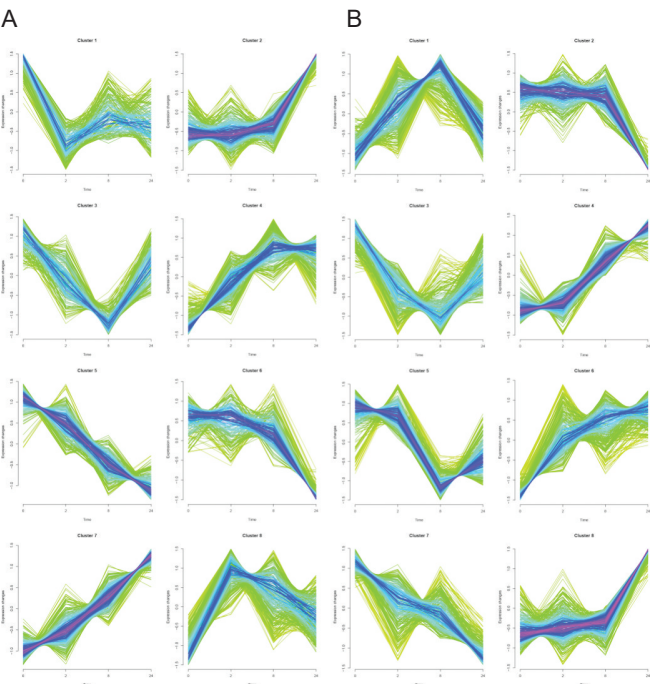
表 1 以 sham 组为对照筛选到的各组差异基因个数

	皮质/个			纹状体/个		
	2 h	8 h	24 h	2 h	8 h	24 h
上调	392	509	815	325	538	899
下调	281	401	599	265	524	697
总数	673	910	1414	590	1062	1596



注：(A)皮质；(B)纹状体；热图中红色代表高表达，蓝色代表低表达

图1 IR后不同时间点的差异基因聚类热图



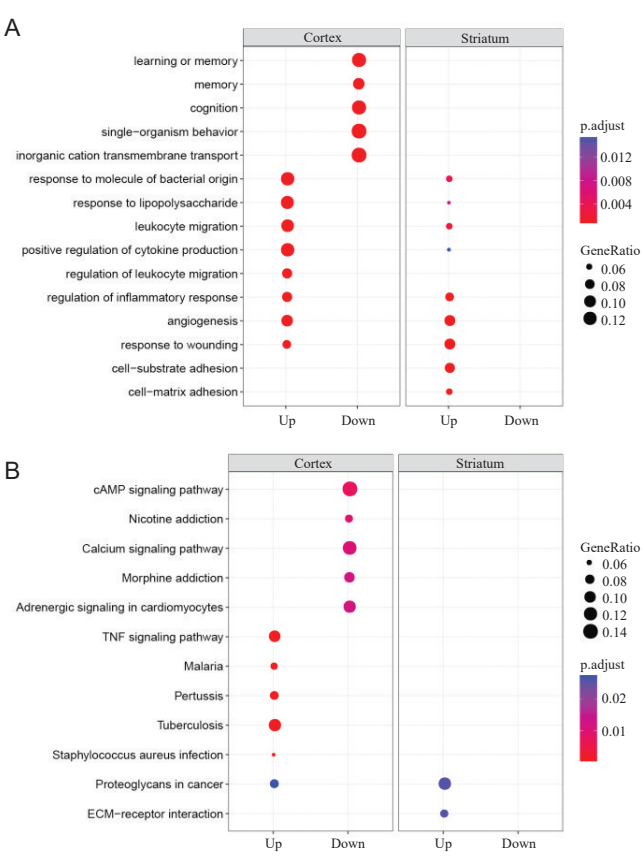
注：(A)皮质；(B)纹状体；红-蓝-绿-黄的变化表示基因的变化情况与该聚类的中心变化的符合程度

图2 聚类结果图

表2 Mfuzz 聚类结果

皮质			
	聚类号	基因数/个	总数
上调	2, 4, 7	93, 49, 104	246
下调	5, 6	75, 59	134
纹状体			
	聚类号	基因数/个	总数
上调	4, 6, 8	106, 42, 126	274
下调	2, 7	98, 39	137

相同的生物学过程,包括细胞粘附相关、血管生成、炎症反应和白细胞迁移等,见图3。KEGG pathway 富集



注：(A)GO富集结果；(B)KEGG 富集结果

图3 GO生物学过程和KEGG代谢通路富集结果

结果显示,皮质部位的上调基因显著富集在TNF信号通路和金葡菌感染等;纹状体部位上调基因只显著富集在ECM受体相互作用和癌症蛋白多糖通路;皮质组下调基因显著富集在cAMP信号通路和钙信号通路等。

2.4 免疫细胞浸润分析

CIBERSORT 分析结果显示,在皮质和纹状体中, sham组和IR组不同免疫细胞的浸润程度一致性高,呈显著正相关,见图4。因皮质和纹状体中的免疫细胞浸润比例无显著差别,故将2种组织的数据合并,重新分为sham组和IR2、8、24 h组,再分析2组间各种免疫细胞浸润程度差异。结果显示,Sham组的免疫细胞浸润主要为CD4+静息T细胞、巨噬细胞和肥大细胞(64%);IR2、8、24 h组以肥大细胞和巨噬细胞为主(55%),见图5。提示在CIRI过程中,免疫细胞浸润程度改变,以肥大细胞和巨噬细胞的活化最明显。

2.5 关键基因筛选

因皮质和纹状体的免疫细胞浸润程度无显著差别,推测2种组织中有部分基因的变化具有共性。因此将IR组皮质和纹状体组织中持续上/下调差异基因分别取交集,得到共有上调基因41个,共有下调基因7个。

在41个上调基因中,有5个基因在各时间点与

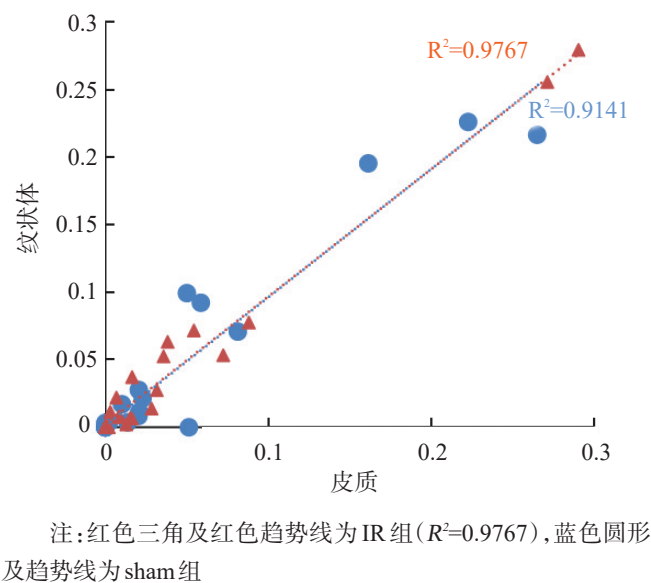
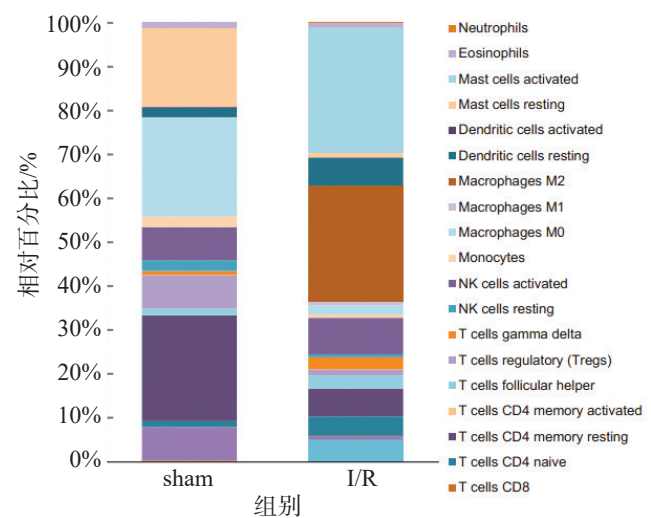


图4 皮质和纹状体各种免疫细胞浸润程度相关性



sham组的差异均有统计学意义($P<0.05$),见表3。其中,基因 *Timp1* 和 *Gpr84* 趋势较好,4930486L24Rik、*Ggt1* 和 *Osmr* 在RI 24 h处有不同程度下降。在7个下调基因中未发现与sham组差异有统计学意义的基因。对48个重点基因(上调41个,下调7个)进行GO和KEGG pathway富集分析,得到12条GO-BP Term和1条KEGG pathway。这些基因显著富集的GO Terms包括愈伤反应和吞噬调节等,此外仅富集在补体级联反应KEGG通路,见图6。

2.6 关键基因的验证

以上分析结果表明, *Timp1* 和 *Gpr84* 可能是参与CIRI过程的2个关键基因。在大鼠CIRI模型上对这2个基因进行验证的结果显示,与sham组比较,IR大鼠脑组织中 *Timp1* 和 *Gpr84* mRNA相对转录水平显著上调,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表4。

3 讨论

CIRI会引起脑组织损伤加重,这些加重与许多相关基因的表达变化有关。本研究全面检测了CIRI不同时期及不同组织之间的基因表达水平差异。

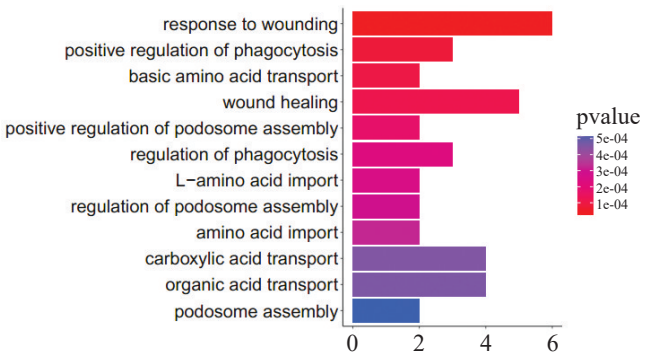
与CIRI损伤过程相关的基因多与细胞凋亡和信号转导等过程相关^[3,4,12]。在CIRI 4~72 h上调表达的基因与蛋白质合成、细胞促凋亡、损伤反应和抗细胞凋亡等有关^[13]。本研究发现皮质和纹状体中上调的基因富集于许多相同的生物学过程,如细胞粘附、血管生成、炎症反应、白细胞迁移等,与以往研究结果一致。本研究还发现皮质组中腺苷酸环化酶(cAMP)信号通路和钙信号通路相关的基因表达显著下调。赵菁等^[14]研究发现刺激G蛋白偶联受体可增加纹状体内的含量,使细胞内钙离子增高,这提示参与cAMP信号转导通路和钙信号途径的相关基因对缺血脑组织可能起到保护作用。

分析在皮质和纹状体中都出现的差异基因,发现基质金属蛋白酶抑制因子(*Timp1*)和 *Gpr84* 基因在各时间点都显著上调表达。*Timp1* 是基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases, MMP-9)的内源性抑制剂,由结缔组织细胞和巨噬细胞产生。MMP-9可破坏血管基底膜,导致血管源性水肿、血液循环中炎症细胞的渗入及继发出血等^[15]。研究显示, *Timp1* 会抑制或削弱MMP-9的作用,对抗由MMP-9等炎症因子导致的细胞凋亡^[16,17]。此外,功能注释发现TIMP参与低氧诱导因子(HIF-1)信号转导通路, HIF-1是缺氧应激时调节基因表达的重要转录因子,而HIF-1的靶基因能减弱缺氧损伤^[18]。本研究发现, *Timp1* 表达量随CIRI损伤时间延长而增加, *Timp1* 可能参与了脑组织缺氧耐受的建立。*Gpr84* 编码蛋白属于G蛋白偶联受体家族成员,是一类膜蛋白受体,参与磷脂酶C激活G蛋白偶联受体信号转导过程。*Gpr84* 在免疫应答中发挥了重要作用, *Gpr84* 在正常情况下表达量相对较低,当受到外来刺激引起炎症反应时,其表达量明显增加^[19]。 *Gpr84* 通过增强巨噬细胞中炎症因子的表达加重炎症反应^[20]。本研究中, *Gpr84* 基因表达在2个损伤组织都显著上调。免疫细胞浸润分析发现, CIRI引起了肥大细胞和巨噬细胞的浸润。推测在CIRI过程中 *Gpr84* 基因的高表达,可能引起免疫细胞浸润,最终导致细胞凋亡。

本研究应用生物信息学方法分析了CIRI的皮质样本和纹状体样本表达谱芯片,发现了大量差异表达基因,初步筛选并了解与CIRI损伤密切相关的基因和通路。 *Timp1* 和 *Gpr84* 基因表达的上调表明它们可能

表3 重点上调基因

	皮质						纹状体					
	2 h		8 h		24 h		2 h		8 h		24 h	
	LogFC	P值	LogFC	P值	LogFC	P值	LogFC	P值	LogFC	P值	LogFC	P值
4930486L24Rik(Testin)	0.860	0.049	1.648	0.000	1.619	0.001	0.874	0.045	1.316	0.005	1.466	0.002
Ggt1(Ggta1p)	0.580	0.001	0.985	0.000	0.967	0.000	0.592	0.028	0.811	0.004	1.065	0.001
Gpr84(Gpr84)	2.183	0.001	4.289	0.000	4.533	0.000	2.396	0.000	3.260	0.000	3.354	0.000
Osmr(Osmr)	0.931	0.028	2.053	0.000	1.816	0.000	1.150	0.019	1.883	0.001	1.751	0.001
Timp1(Timp1)	3.635	0.000	4.740	0.000	5.292	0.000	4.092	0.000	4.785	0.000	4.927	0.000



注:横轴代表该 Term 富集到的基因个数,颜色代表 P 值,越接近红色,P 值越小

图6 重点基因 GO 富集分析结果

表4 大鼠脑组织中 Timp1 和 Gpr84mRNA 相对转录水平比较			
组别	只数	Timp1/(\bar{x}\pm s)	Gpr84/(\bar{x}\pm s)
sham 组	10	0.85±0.14	0.94±0.13
IR 组	10	2.93±0.28 ^①	4.37±0.73 ^①

注:与 sham 组比较,^①P<0.05

是 CIRI 损伤过程中参与免疫应答和细胞凋亡信号通路的 2 个关键基因,但还需要进一步的实验来验证这些结果。

参考文献

[1] 齐军,李峰.缺血再灌注脑损伤机制及治疗进展[J].卒中与神经疾病,2015,22: 120-122.

[2] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011, 17: 1391-1401.

[3] Kim YD, Sohn NW, Kang C, et al. DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral ischemia[J]. Brain Res Bull, 2002, 58: 491-498.

[4] Schwartz C, Hampton M, Andrews MT. Seasonal and regional differences in gene expression in the brain of a hibernating mammal[J]. Plos One, 2013, 8: e58427.

[5] Schmidt-Kastner R, Zhang B, Belayev L, et al. DNA microarray

analysis of cortical gene expression during early recirculation after focal brain ischemia in rat[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2002, 108: 81-93.

[6] Smyth GK. Limma: linear models for microarray data, in bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor[M]. Springer, 2005: 397-420.

[7] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias[J]. Bioinformatics, 2003, 19: 185-193.

[8] Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data[J]. Biostatistics, 2003, 4: 249-264.

[9] Futschik ME, Carlisle B. Noise-robust soft clustering of gene expression time-course data[J]. J Bioinform Comput Biol, 2005, 3: 965-988.

[10] Kumar L, Futschik ME. Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data[J]. Bioinformation, 2007, 2: 5-7.

[11] Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles[J]. Nat Methods, 2015, 12: 453-457.

[12] Nagata T, Takahashi Y, Sugahara M, et al. Profiling of genes associated with transcriptional responses in mouse hippocampus after transient forebrain ischemia using high-density oligonucleotide DNA array [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 121: 1-11.

[13] Jin K, Mao XO, Eshoo MW, et al. Microarray analysis of hippocampal gene expression in global cerebral ischemia[J]. Ann Neurol, 2001, 50: 93-103.

[14] 赵菁,王忠诚,徐超.多巴胺受体与脑缺血的关系[J].国际脑血管病杂志,2000,8: 146-148.

[15] Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, et al. Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2007, 25: 506-513.

[16] Wei H, Wang S, Zhen L, et al. Resveratrol attenuates the blood-brain barrier dysfunction by regulation of the MMP-9/Timp1 balance after cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. J Mol Neurosci, 2015, 55: 872-879.

[17] 李增伟,刘松,李滢,等.兔脑缺血再灌注后细胞凋亡与 Timp1 表达的特点[J].齐鲁医学杂志,2010,25: 496-498.

[18] Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, et al. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 39728-39738.

[19] Bouchard C, Pagé J, Bédard A, et al. G protein-coupled receptor 84, a microglia-associated protein expressed in neuroinflammatory conditions [J]. Glia, 2010, 55: 790-800.

[20] 王绍莹,陈莉莉,殷诚聪,等. Gpr84 基因敲除小鼠的构建及对巨噬细胞功能的影响[J].中国科技论文在线精品论文,2017,10: 242-247.

(本文编辑:唐颖馨)