

高同型半胱氨酸血症导致大鼠海马基因表达谱变化

潘建青^{1a}, 李巷^{1a}, 杨志刚^{1a}, 杨少敏^{1b}, 张玲玲^{1a}, 江山², 杨春水^{1a}

摘要 目的:观察高同型半胱氨酸(HCY)对大鼠海马基因表达谱的影响。**方法:**10只雄性SD大鼠随机分为对照组和高HCY组。高HCY组大鼠皮下注射L-HCY(60 μg/g),2次/日,连续注射14 d;对照组注射等量生理盐水。造模完成后取血浆分析HCY水平;提取海马组织RNA采用BGISEQ-500技术进行测序。测序数据通过主成分分析进行样本间的比较,找出并剔除离群样品,DEGseq方法分析组间差异表达基因。根据KEGG注释结果以及官方分类,将差异基因进行生物通路分类和富集分析。**结果:**高HCY组大鼠血HCY明显高于对照组($P<0.01$)。大鼠海马RNA测序数据使用DEGseq总共筛选到34个有显著性差异表达的mRNA,生物通路分类和富集分析找到最主要的通路是神经活动配体-受体相互作用通路。**结论:**高HCY血症导致大鼠海马的基因表达谱改变,影响神经活动配体-受体相互作用等生物通路。

关键词 同型半胱氨酸;海马;基因表达

中图分类号 R741;R741.02;R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2020.02.003

潘建青, 李巷, 杨志刚, 等. 高同型半胱氨酸血症导致大鼠海马基因表达谱变化[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(2): 75-77, 122.

Hyperhomocysteinemia-Induced Gene Expression Changes in Hippocampus of Rats PAN Jian-qing^{1a}, LI Xiang^{1a}, YANG Zhi-gang^{1a}, YANG Shao-min^{1b}, ZHANG Ling-ling^{1a}, JIANG Shan², YANG Chun-shui^{1a}. 1.a. Department of Neurology, b. Department of Pain Treatment, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518052, China; 2. Institute for Advanced Study, Shenzhen University, Guangdong Shenzhen 518060, China

Abstract Objective: To observe the effect of homocysteine (HCY) on the gene expression profile in rat hippocampus. **Methods:** Ten male SD rats were randomly divided into the control group and the high HCY group. For 14 consecutive days, high HCY group rats were injected subcutaneously with L-HCY at 60 μg/g twice a day, and control group rats were injected with equal doses of saline. The plasma HCY of each group was analyzed after establishment of model; hippocampus RNA was extracted, and sequencing was completed via BGISEQ-500 sequencing. Principal component analysis was used to compare the samples and exclude the outliers. The differentially expressed genes (DEGs) between groups were analyzed by DEGseq. According to the annotation results of KEGG and official categories, biological pathway classification and enrichment analysis were conducted on the DEGs. **Results:** The plasma HCY level of the high HCY group was significantly higher than that of the control group ($P<0.01$). A total of 34 mRNA with significant difference in expression were screened from rat hippocampus RNA sequencing data using DEGseq. The major pathway found by biological pathway classification and enrichment analysis was the neuroactive ligand-receptor interaction pathway. **Conclusion:** Hyperhomocysteinemia leads to changes in the gene expression profile of rat hippocampus and interferes with the neuroactive ligand-receptor interaction and other biological pathways.

Key words homocysteine; hippocampus; gene expression

同型半胱氨酸(Homocysteine, HCY)是人体内含硫氨基酸的一个重要代谢中间产物。高HCY血症与认知功能减退密切相关,其机制不完全清楚。有观点认为HCY通过破坏脂质代谢,损害血管内皮细胞和凝血系统,影响血管的调节功能,导致脑血流灌注不足,从而导致认知功能障碍^[1];也有观点认为HCY对神经元有直接的毒性作用,引起磷酸化tau蛋白增多、加速Aβ形成,导致神经功能受损引起认知障碍^[2-4]。

有研究发现,在体外培养条件下,高

HCY影响了星形胶质细胞、小胶质细胞、内皮细胞、神经元细胞的21个基因的表达^[5]。MTHFR基因缺陷可以导致高HCY血症, MTHFR基因敲除小鼠的脑RNA表达谱有5个基因的表达改变^[6]。但临床上叶酸缺乏、B族维生素不足、代谢酶基因多态性是HCY升高的主要原因, MTHFR基因完全缺失突变在人群中罕见^[7],用MTHFR基因敲除动物建立高HCY血症模型缺乏流行病学代表性。

为探讨高HCY导致认知障碍的分子机

作者单位

1. 深圳市南山区人民医院 a. 神经内科, b. 疼痛科
深圳 518052

2. 深圳大学高等研究院
深圳 518060

基金项目

广东省医学科学技术研究基金(No. A2016388);
深圳市卫生系统科研项目(No.SZFZ2018029)

收稿日期

2018-08-06

通讯作者

杨春水

yangzyi@126.com

制,本课题组采用皮下注射法建立高HCY血症动物模型,分析高HCY对大鼠海马基因表达谱的影响,通过对基因数据挖掘寻找高HCY影响的最主要生物学通路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SPF级成年SD大鼠10只,体质量275~300 g,购自广东省医学实验动物中心。所有实验动物操作程序符合《实验动物管理和使用指南》规定,并经深圳大学医学伦理委员会批准。

1.1.2 试剂配制 L-HCY(Sigma-Aldrich)溶于0.85%的生理盐水,配成200 mg/mL溶液,调节pH值为7.4。

1.2 方法

1.2.1 高HCY血症大鼠模型建立 随机数字表法将大鼠分为对照组和高HCY组,每组5只。高HCY组大鼠在背部皮下注射HCY溶液(60 μg/g),2次/日(8:00和16:00),连续注射14 d;对照组大鼠在背部皮下注射等体积的生理盐水,其他同高HCY组。

1.2.2 标本留取 在完成最后一次注射HCY 2 h后,10%水合氯醛麻醉大鼠,在颈外静脉取血0.5 mL,留取抗凝血浆通过HITACHI 7600-110全自动生化分析进行HCY测定。取血后断头处死动物,分离海马组织置于干冰上,快速转移到-80℃冰箱保存。

1.2.3 RNA 检测分析 Trizol 法提取海马组织总RNA,测量RNA浓度,保存于-80℃。RNA样品委托华大基因由BGISEQ-500测序技术进行测序。使用序列比对软件将质控后的clean reads分别比对到参考基因组上,对样本中的基因/转录本表达进行定量。主成分分析将样本所包含的大量基因表达量信息降维为少数几个互相无关的主成分,以进行样本间的比较。剔除离群样本后,使用DEGseq对差异mRNA进行筛选。将基因参与的KEGG代谢通路分为7个分支:细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病(仅限动物)、代谢、有机系统、药物开发。每一分支下进一步分类统计。根据KEGG PATHWAY注释分类,使用R软件中的phyper函数进行富集分析,计算P值,然后对P值进行FDR校正,通常FDR≤0.01的功能视为显著富集。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本均数t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

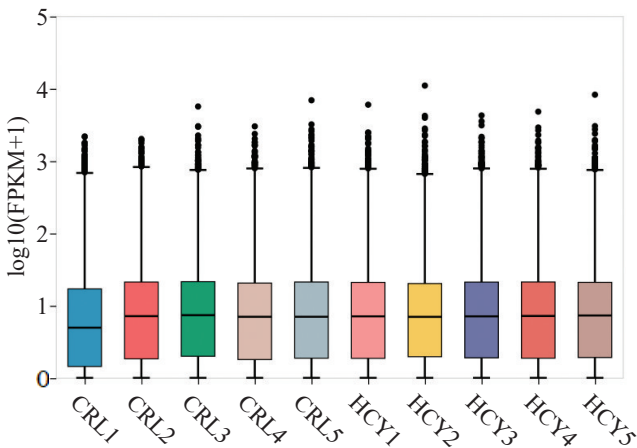
2 结果

2.1 血浆HCY浓度

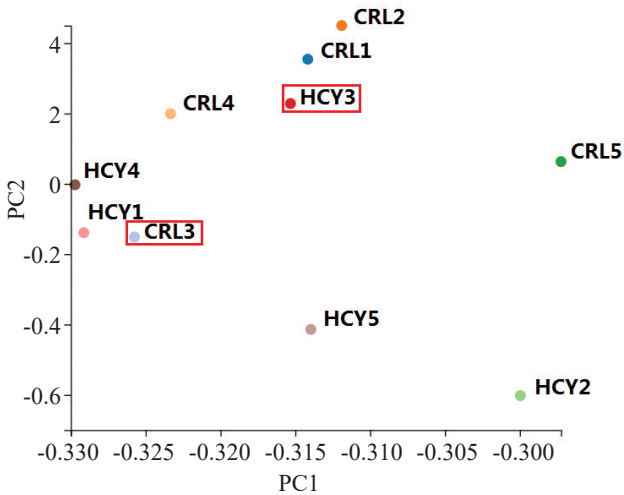
高HCY组和对照组的血浆HCY浓度分别为(49.34±5.61)μmol/L和(5.98±0.92)μmol/L,差异有统计学意义(P<0.01)。

2.2 测序数据质控

对大鼠海马组织RNA测序数据进行质控,基于每个样品比对上基因组的tag数,结果显示每个样品的表达量数据分布情况基本相似,提示本实验对mRNA的定量数据可靠,见图1。通过主成分分析发现HCY组的HCY3和对照组的CRL3是离群样品,见图2。



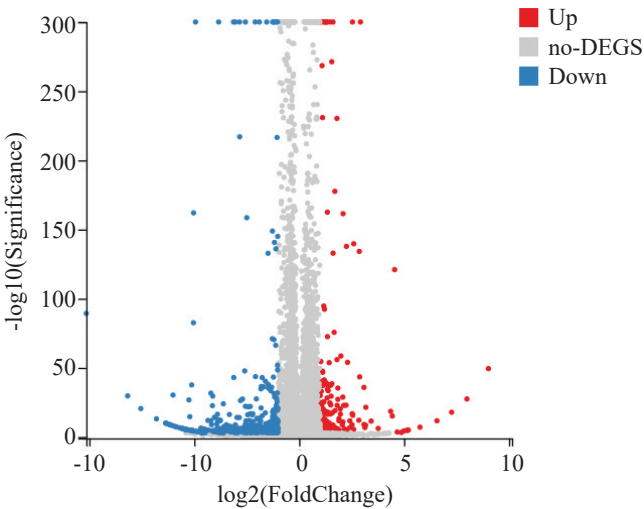
注:CRL1-CRL5为对照组,HCY1-HCY5为HCY组
图1 各样品表达量TPM值分布



注:CRL1-CRL5为对照组,HCY1-HCY5为HCY组
图2 样品间的主成分分析

2.3 筛选差异表达mRNA

剔除2个离群样品数据后,使用DEGseq对2组间差异mRNA进行筛选,共筛选出626个差异表达的mRNA,见图3。前34个差异最显著的mRNA表达情况(组间基因表达差异>60%,基因平均表达量>100),上调的基因29个,下调的基因5个,见图4。



注:Up:上调;no-DEGS:无显著差异;Down:下调
图3 2组间mRNA表达差异的火山喷发图

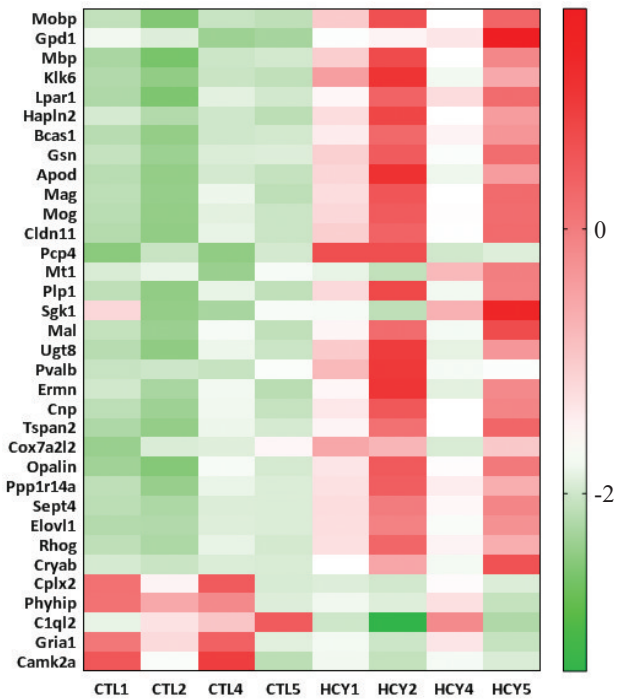


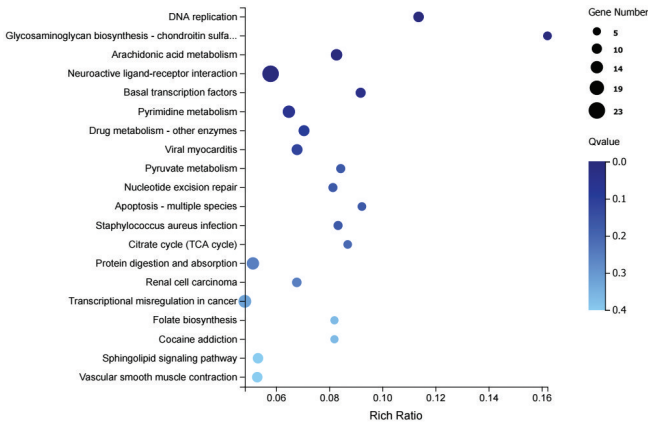
图4 2组对比部分差异表达mRNA热图(前34个)

2.4 差异表达基因GO分析

富集气泡图从三个维度展示KEGG Pathway的富集情况,默认Qvalue最小的前20个GO Term或按照选择的GO Term(按Qvalue排序,最多60个)作图。差异基因的KEGG Pathway富集结果见图5。

3 讨论

国内制备高HCY血症的动物模型大多采用高蛋白饲料喂养法^[8,9],但对营养和代谢有一定的干扰。因此,本研究采用皮下注射法直接升高动物体内的HCY,造模完成后2 h血浆HCY水平较对照组明显升高($P<0.01$),证明模型制备成功。其海马基因表达谱



注:富集到的通路最主要是神经配体受体相互作用通路
图5 2组对比差异表达基因的KEGG信号通路富集分析

与正常对照存在差异,其中34个高表达的mRNA有显著差异($P<0.01$),上调的基因29个,下调的基因5个。

目前,高HCY引起认知障碍的机制还没有定论,甚至还存在是HCY本身引起痴呆,还是其他原因(如维生素B不足)引起痴呆、HCY只是标志物这样的争论^[10,11]。有临床研究发现痴呆患者皮质/海马萎缩的程度与血HCY水平正相关^[12]。目前高HCY引起脑萎缩的病理机制有几个不同的观点,包括:血管机制导致局部脑萎缩、促进神经纤维缠结和淀粉样斑块形成、神经元死亡和表观遗传机制等^[13,14]。

本研究发现高HCY可直接导致大鼠海马的基因表达谱改变,对有差异表达的mRNA进行GO分析富集,发现最重要的通路是神经配体受体相互作用通路(neuroactive ligand-receptor interaction)。在一项双生子临床研究发现这一通路基因的甲基化水平与认知功能下降有相关性^[15]。这提示高HCY血症影响神经配体受体相互作用通路的基因表达可能是认知功能下降的原因之一。

综上所述,本研究首次报道高HCY可以直接导致大鼠海马的基因表达谱改变,主要与神经活动配体-受体相互作用等生物通路相关,这可能是高HCY引起认知障碍的分子基础之一,具体的分子机制还有待进一步阐明。

参考文献

[1] Cervellati C, Romani A, Seripa D, et al. Oxidative balance, homocysteine, and uric acid levels in older patients with Late Onset Alzheimer's Disease or Vascular Dementia[J]. J Neurol Sci, 2014, 337: 156-161.
[2] Li JG, Chu J, Barrero C, et al. Homocysteine exacerbates β -amyloid pathology, tau pathology, and cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer disease with plaques and tangles[J]. Ann Neurol, 2014, 75: 851-863.
[3] Oikonomidi A, Lewczuk P, Kornhuber J, et al. Homocysteine metabolism is associated with cerebrospinal fluid levels of soluble amyloid precursor protein and amyloid beta[J]. J Neurochem, 2016, 139: 324-332.

参考文献

- [1] 孙雪松, 王宁, 李杰, 等. 重症肌无力风险基因挖掘[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17: 5944-5949.
- [2] 张恒, 钱如林, 祁敏现. 胸腔镜胸腺扩大切除术治疗重症肌无力的临床疗效及影响因素研究[J]. 中国内镜杂志, 2017, 23: 62-66.
- [3] 闫芳, 臧卫周, 孟祺, 等. 免疫球蛋白联合糖皮质激素治疗老年重症肌无力患者的临床观察[J]. 中华老年医学杂志, 2018, 37: 398-399.
- [4] 中华医学会神经病学分会神经免疫学组, 中国免疫学会神经免疫学分会. 重症肌无力诊断和治疗中国专家共识[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2012, 19: 401-408.
- [5] 许贤豪, 侯世芳, 殷剑. 获得性自身免疫性重症肌无力[J]. 中华内科杂志, 1998, 37: 210-211.
- [6] 李尊波, 郭俊, 沈定国, 等. 放射免疫法定量检测乙酰胆碱受体抗体与重症肌无力患者临床特征的相关性[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2017, 24: 156-161.

- [7] 董梦琪, 郭军红, 张金. 难治性重症肌无力的治疗管理[J]. 国际免疫学杂志, 2017, 40: 216-220.
- [8] 马甲, 章帆, 芪葛补益方联合溴吡斯的明治疗重症肌无力的疗效观察及其对生活质量的影响[J]. 中国中医药科技, 2018, 25: 99-100.
- [9] 辛华雯, 李冉, 刘飞. 他克莫司治疗重症肌无力临床研究进展[J]. 医药导报, 2017, 36: 597-600.
- [10] 陈岷, 侯世芳, 赵明, 等. 重症肌无力患者他克莫司血药浓度监测与影响因素分析[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53: 295-299.
- [11] 陈岷, 侯世芳, 赵明, 等. 重症肌无力患者他克莫司血药浓度与疗效及安全性分析[J]. 中华全科医师杂志, 2018, 17: 370-371.
- [12] 辛华雯, 李冉, 刘飞. 他克莫司治疗重症肌无力临床研究进展[J]. 医药导报, 2017, 36: 597-600.
- [13] 王娜, 邹利, 袁江, 等. 重症肌无力外周血调节性T细胞线粒体自噬异常的研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2017, 24: 270-275.

(本文编辑:唐颖馨)

(上接第77页)

- [4] Di Meco A, Li JG, Barrero C, et al. Elevated levels of brain homocysteine directly modulate the pathological phenotype of a mouse model of tauopathy[J]. Mol Psychiatry, 2019, 24: 1696-1706.
- [5] Weekman EM, Woolums AE, Sudduth TL, et al. Hyperhomocysteinemia-Induced Gene Expression Changes in the Cell Types of the Brain[J]. ASN Neuro, 2017, 9: 1759091417742296.
- [6] Chen Z, Ge B, Hudson TJ, et al. Microarray analysis of brain RNA in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and hyperhomocysteinemia[J]. Brain Res Gene Expr Patterns, 2002, 1: 89-93.
- [7] Kluijtmans LA, Wendel U, Stevens EM, et al. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency[J]. Eur J Hum Genet, 1998, 6: 257-265.
- [8] 马文斌, 张辉, 赵丽, 等. 高同型半胱氨酸血症通过内质网应激抑制 ApoE 敲除鼠肾脏 CFTR 的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23: 237-242.
- [9] 任晓丽, 杨波, 陈锡文, 等. 高蛋氨酸饲料饮食诱导血管内皮细胞损伤大鼠模型建立[J]. 温州医科大学学报, 2017, 13: 47-51.

- [10] Mccaddon A, Miller JW. Assessing the association between homocysteine and cognition: reflections on Bradford Hill, meta-analyses, and causality[J]. Nutr Rev, 2015, 73: 723-735.
- [11] Smith AD, Refsum H. Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment[J]. Annu Rev Nutr, 2016, 36: 211-239.
- [12] Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia[J]. FEBS Lett, 2006, 580: 2994-3005.
- [13] Gallucci M, Zanardo A, Bendini M, et al. Serum Folate, Homocysteine, Brain Atrophy, and Auto-CM System: The Treviso Dementia (TREDem) Study[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 38: 581-587.
- [14] Li JG, Barrero C, Merali S, et al. Five lipoxygenase hypomethylation mediates the homocysteine effect on Alzheimer's phenotype[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46002.
- [15] Anna S, Qihua T, Matt MG, et al. Epigenome-Wide Association Study of Cognitive Functioning in Middle-Aged Monozygotic Twins[J]. Front Aging Neurosci, 2017, 9: 413.

(本文编辑:唐颖馨)

(上接第110页)

- Against Acute Ischemic Stroke by Suppressing Microglial Proteasome-Mediated Inflammation[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53: 2529-2540.
- [11] Wu SD, Xia F, Lin XM, et al. Ginsenoside-Rd Promotes Neurite Outgrowth of PC12 Cells through MAPK/ERK- and PI3K/AKT-Dependent Pathways[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17: E177.
- [12] Liu XY, Zhou XY, Hou JC, et al. Ginsenoside Rd promotes neurogenesis in rat brain after transient focal cerebral ischemia via activation of PI3K/Akt pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36: 421-428.
- [13] Wan Q, Ma X, Zhang ZJ, et al. Ginsenoside Reduces Cognitive Impairment During Chronic Cerebral Hypoperfusion Through Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulated by Epigenetic Modulation[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54: 2889-2900.
- [14] Li L, Liu J, Yan X, et al. Protective effects of ginsenoside Rd against okadaic acid-induced neurotoxicity in vivo and in vitro[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138: 135-141.
- [15] Zhang X, Shi M, Ye R, et al. Ginsenoside Rd Attenuates Tau Protein Phosphorylation Via the PI3K/AKT/GSK-3 β Pathway After Transient Forebrain Ischemia[J]. Neurochem Res, 2014, 39: 1363-1373.
- [16] Liu JF, Yan XD, Qi LS, et al. Ginsenoside Rd attenuates A β 25-35-induced oxidative stress and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons[J]. Chem Biol Interact, 2015, 239: 12-18.
- [17] Yan X, Hu G, Yan W, et al. Ginsenoside Rd promotes non-amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein processing by regulating phosphorylation of estrogen receptor alpha[J]. Life Sci, 2017,

- 168: 16-23.
- [18] Kim MS, Yu JM, Kim HJ, et al. Ginsenoside Re and Rd Enhance the Expression of Cholinergic Markers and Neuronal Differentiation in Neuro-2a Cells[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37: 826-833.
- [19] Zhang X, Wang Y, Ma C, et al. Ginsenoside Rd and ginsenoside Re offer neuroprotection in a novel model of Parkinson's disease[J]. Am J Neurodegener Dis, 2016, 5: 52-61.
- [20] Liu Y, Zhang RY, Zhao J, et al. Ginsenoside Rd Protects SH-SY5Y Cells against 1-Methyl-4-phenylpyridinium Induced Injury[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16: 14395-14408.
- [21] González-Burgos E, Fernández-Moriano C, Lozano R, et al. Ginsenosides Rd and Re co-treatments improve rotenone-induced oxidative stress and mitochondrial impairment in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Food Chem Toxicol, 2017, 109: 38-47.
- [22] Zhu D, Liu M, Yang Y, et al. Ginsenoside Rd Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice[J]. J Neurosci Res, 2014, 92: 1217-1226.
- [23] Wang B, Zhu Q, Man X, et al. Ginsenoside Rd inhibits apoptosis following spinal cord ischemia/reperfusion injury[J]. Neural Regen Res, 2014, 9: 1678-1687.
- [24] Cong L, Chen W. Neuroprotective Effect of Ginsenoside Rd in Spinal Cord Injury Rats[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2016, 119: 193-201.
- [25] Ye R, Zhao G, Liu X. Ginsenoside Rd for acute ischemic stroke: translating from bench to bedside[J]. Expert Rev Neurother, 2013, 6: 603-613.

(本文编辑:唐颖馨)