

基于生物信息学方法对抑郁症小鼠 脑组织差异基因表达的分析

陈盛,王高华

摘要 **目的:**基于生物信息学方法分析抑郁症小鼠海马和杏仁核等脑组织中差异表达基因及其可能的生物学功能。**方法:**选取GEO数据库中数据集GSE151807,利用R软件及Limma包进行差异基因的筛选;对数据集GSE151807基因表达矩阵进行基因集富集分析;利用David在线分析工具对差异基因进行基因本体论(GO)富集分析和KEGG信号通路富集分析。利用String在线网站构建差异基因表达蛋白间相互作用网络(PPI),使用Cytoscape软件进行模块聚类 and 关键基因筛选及数据可视化。**结果:**抑郁症小鼠脑组织(海马和杏仁核)中共有351个基因表达水平发生改变,其中182个基因上调,169个基因下调。对基因表达矩阵进行基因集富集分析发现,神经活性配体-受体相互作用、泛素介导的蛋白水解、亨廷顿氏病、谷胱甘肽代谢、过氧化物酶、长期抑郁等有关的基因显著富集。差异基因GO富集分析发现,RNA聚合酶II启动子转录的调控、细胞内膜结合细胞器、转录因子活性调控等显著富集。差异基因KEGG信号通路富集分析发现,烟酸酯和烟酰胺代谢、孕激素介导的卵母细胞成熟、ECM-受体相互作用等信号通路显著富集。通过构建蛋白质相互作用网络,筛选出2个核心基因Fos和Itpkb,其中Fos基因在抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中为下调基因,而Itpkb基因则为上调基因。**结论:**抑郁症小鼠脑组织(海马和杏仁核)中基因表达发生显著改变,差异基因参与不同的生物学过程和信号通路,Fos和Itpkb可能是与抑郁症发生相关的核心基因,可能作为潜在的药物靶点。

关键词 生物信息学;抑郁症;GEO数据库;海马;杏仁核

中图分类号 R741;R749.4 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20201035

本文引用格式:陈盛,王高华.基于生物信息学方法对抑郁症小鼠脑组织差异基因表达的分析[J].神经损伤与功能重建,2021,16(3):125-129.

作者单位

武汉大学人民医院精神卫生中心/武汉大学人民医院神经精神病研究所

武汉 430060

收稿日期

2020-10-19

通讯作者

王高华

wgh6402@163.

com

Differential Gene Expression in Brain Tissues of Depressed Mice Based on Bioinformatics Analysis CHEN Sheng, WANG Gao-hua. Department of Psychiatry, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To analyze the differentially expressed genes and their possible biological function in the brain tissues (hippocampus and amygdala) of depressed mice based on bioinformatics methods. **Methods:** Data set GSE151807 in the GEO database was selected, and the R software and Limma package were used to screen differentially expressed genes. Gene set enrichment analysis was carried out on the expression matrix of data set GSE151807. Gene ontology (GO) enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed on the differentially expressed genes using the David (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) online tool. The String website was used to construct a protein-protein interaction network (PPI) of the differentially expressed genes. The Cytoscape software was used for module clustering, key gene screening, and data visualization. **Results:** The expression levels of 351 genes in the brain tissues (hippocampus and amygdala) of depressed mice showed change; 182 genes were up-regulated and 169 down-regulated. Gene set enrichment analysis of the gene expression matrix showed that genes related with the neuroactive ligand-receptor interaction, ubiquitin-mediated proteolysis, Huntington's disease, glutathione metabolism, peroxidase, and long-term depression were significantly enriched. GO enrichment analysis showed that regulation of transcription from the RNA polymerase II promoter, intracellular membrane-bounded organelles, and transcription factor activity regulation were significantly enriched. KEGG pathway enrichment analysis revealed that nicotinate and nicotinamide metabolism, progesterone-mediated oocyte maturation, and ECM-receptor interaction were significantly enriched. Through construction of the protein interaction network, two hub genes Fos and Itpkb were selected. Fos gene is a down-regulated gene in the hippocampus and amygdala tissue of depressed mice while Itpkb gene is an up-regulated gene. **Conclusion:** Gene expression in the brain tissues (hippocampus and amygdala) of depressed mice is significantly changed. Differentially expressed genes are involved in different biological processes and signaling pathways. Fos and Itpkb may be key genes related to depression and may be used as potential targets of anti-depression drugs.

Key words bioinformatics; depression; GEO database; hippocampus; amygdala

抑郁症是一种情感性精神障碍综合征,随着社会经济的发展、生活节奏的加快,抑郁症患者数量逐年增加,研究表明,全球范围内抑郁症发病率约17%,抑郁症已经成为人类心理疾病的头号杀手^[1]。目前,临床上对于抑郁症患者主要以药物治疗为主^[2],选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)最常用,SSRI通过抑制突触前神经元对5-羟色胺的再摄取,提高突触间隙5-羟色胺浓度,从而提高神经元兴奋性,发挥抗抑郁作用,然而长期使用患者可出现耐药性,药效降低^[3]。随着基因组学、分子生物学、影像学、病理学等多学科的发展,基于疾病发病机理开发的各种靶向药物广泛应用于临床,特别是恶性肿瘤人群,而当前对于药物治疗无效的抑郁症患者,尚缺乏有效的个性化和靶向治疗手段。

生物信息学是将信息技术应用于分子生物学的一门新兴的交叉学科,随着当前各种高通量测序技术的发展,越来越多的学者将测序手段应用于科研中,通过对疾病模型或者生物学过程进行广泛筛选,并利用生物信息学技术挑选出目的基因,然后通过各种细胞实验、分子实验及动物实验验证其功能,由此筛选出调控某些疾病发生或生物学过程的关键基因和信号通路,为疾病的早期诊断和药物开发提供研究基础^[4,5]。本研究基于公共数据库,利用生物信息学这一新兴研究手段,筛选与抑郁症的发生相关的生物学过程和核心基因,以期探索抑郁症的发病机理和靶向药物开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站中的基因表达综合库中,以“Major Depressive Disorder”为关键词,设置小鼠组织和基因表达矩阵为过滤条件,获得GSE151807数据集。该数据集基于高通量测序检测慢性温和应激模型诱导的抑郁症小鼠和对照组小鼠海马和杏仁核组织中基因表达水平。

1.2 方法

1.2.1 差异基因的筛选 本研究基于抑郁症组和对照组小鼠海马和杏仁核组织中基因表达值倍数变化(Fold change, FC)和 P 值,使用R软件并借助Bioconductor中的Limma功能包对差异基因(differentially expressed genes, DEGs)进行筛选,设置筛选条件为: $|\log_2 FC| > 0.5$ 且 $P\text{-Val} < 0.05$ 。

1.2.2 GSEA分析 使用GSEA3.0软件对数据集

GSE151807的基因表达矩阵进行基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA),根据Nominal P -Value和标准化富集得分(Normalized Enrichment Score, NES)对富集的信号通路进行过滤,设置过滤条件为:Nominal P -Value < 0.05 且 $|NES| > 1$ 。

1.2.3 基因本体论富集分析 利用David(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)在线分析工具对抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中的差异基因进行基因本体论(Gene Ontology, GO)富集分析,使用R软件及ggplot2功能包进行数据可视化。该分析从生物学过程(Biological Process, BP)、细胞组成(Cellular Component, CC)和分子功能(Molecular Function, MF)三个方面分析差异基因可能涉及的功能,设置筛选条件为: $P\text{-Val} < 0.05$ 。

1.2.4 KEGG信号通路富集分析 利用David在线分析工具对抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中的差异基因进行KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)信号通路富集分析,数据可视化借助R软件进行,当 P 值小于0.05时认为此信号通路显著富集。

1.2.5 差异基因表达蛋白相互作用网络分析及关键基因筛选 使用String在线网站(网址:<http://stringdb.org/>)构建抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中的差异基因表达蛋白间相互作用网络(Protein-Protein Interaction, PPI),将蛋白间相互作用数据导入Cytoscape3.7.2软件,利用MCODE插件工具进行模块聚类分析及数据可视化,利用Cytohubba插件工具,基于不同的算法挑选前10位关键基因(Hub gene),不同算法之间进行Venn分析,筛选出核心基因。

2 结果

2.1 差异基因的筛选

选取GEO数据库中数据集GSE151807,共含有12个小鼠海马和杏仁核组织样本,其中对照组小鼠6个,抑郁症组小鼠6个。结果表明,与对照组小鼠相比,抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中共有351个基因表达水平发生改变,其中182个基因上调,169个基因下调,见图1。

2.2 数据集GSE151807基因富集分析

对数据集GSE151807基因表达矩阵进行GSEA分析发现,抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中神经活性配体-受体相互作用、泛素介导的蛋白水解、亨廷顿氏病、谷胱甘肽代谢、过氧化物酶、长期抑郁等有关的基因显著富集,见图2。

2.3 差异基因GO富集分析

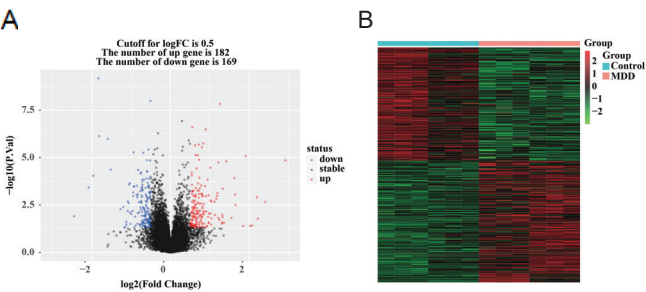


图1 数据集GSE151807差异基因的筛选

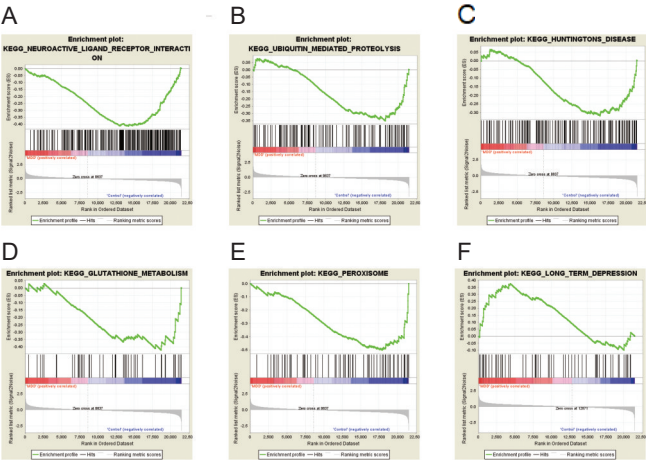


图2 数据集GSE151807基因富集分析

利用David在线分析工具进行GO富集分析发现,差异基因富集在RNA聚合酶II启动子转录的调控(GO:0006357)、单-多细胞生物过程(GO:0044707)、系统发育(GO:0048731)等生物学过程,见图3A;主要分布在细胞内膜结合细胞器(GO:0043231)、细胞内细胞器(GO:0043229)等细胞组分,见图3B;具有转录因子活性调控(GO:0000982)、转录调控区DNA结合调控(GO:0044212)等分子功能,见图3C、表1。

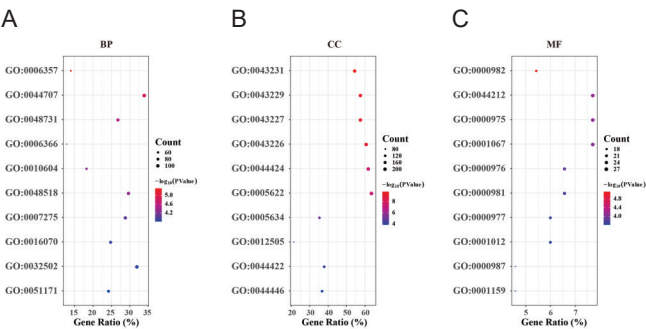


图3 差异基因GO富集分析

2.4 差异基因KEGG信号通路富集分析

KEGG信号通路富集分析发现,差异基因富集在烟酸酯和烟酰胺代谢(mmu:00760)、孕激素诱导的卵母细胞成熟(mmu:04914)、ECM-受体相互作用(mmu:04512)等信号通路中,见图4。

2.5 差异基因表达蛋白互作网络分析及核心基因筛选

通过String在线分析工具,构建了317个差异基因

表达蛋白相互作用的蛋白-蛋白网络,见图5A;使用Cytoscape软件中MCODE插件工具进行聚类,共含有9个模块,前3个模块系数较高,见图5B~D,与适应性免疫过程有关。使用Cytoscape软件中Cytohubba功能包进行核心基因的筛选,基于6种不同的算法,得到前10位核心基因,见表2;其中,Fos和Itpkb基因在此6种算法中均居于前10位,见图5E;Fos基因在抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中为下调基因,Itpkb基因在抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中为上调基因,见图5F。

3 讨论

既往研究表明,海马和杏仁核与抑郁症的发生密切相关^[6]。海马体积缩小是抑郁症神经影像学研究中最为常见的发现^[7],对抑郁症患者死亡后脑分析发现基底外侧杏仁核功能障碍与抑郁症的病理生理有关,同时有研究表明,杏仁核体积及活动减少与抑郁症严重程度密切相关^[8,9]。Shen等^[10]研究发现,杏仁核中存在胆囊收缩素阳性和阴性两种神经元,管理小鼠“厌恶”和“愉悦”两种情绪体验,进一步研究发现,胆囊收缩素阳性的神经元表达大量的大麻素受体,敲低大麻素受体的小鼠在社会应激压力下更容易出现抑郁样表现,这些研究均表明,海马及杏仁核功能异常与抑郁症的发生密切相关。因此,本研究利用生物信息学手段,对抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中基因表达情况进行深入分析,结果发现,抑郁症小鼠海马和杏仁核组织中有大量基因表达水平发生改变,这些差异基因主要分布在细胞内细胞器中,参与调控RNA聚合酶II启动子转录的调控等生物学过程,与烟酸酯和烟酰胺代谢过程密切相关,而既往的研究已经表明,抑郁症大鼠体内存在烟酸酯和烟酰胺代谢异常^[11]。此外,基因集富集分析发现,与长期抑郁有关的基因显著富集,表明此种分析方法具有一定的可靠性和科学性。随后,本研究构建差异基因表达蛋白相互作用网络,并进行核心基因的筛选,发现Fos和Itpkb基因可能是与抑郁症有关的核心基因。

Fos基因属于Fos基因家族的一员,该家族包括:Fos、Fos11、Fos12和Fosb共4个基因,其编码的蛋白质c-Fos作为一种核蛋白转录因子,广泛参与调控细胞增殖、分化、凋亡等生物学过程,与恶性肿瘤、阿尔兹海默病、帕金森病等中枢神经系统退行性疾病密切相关^[12,13],而Fos基因在抑郁症发生、发展中的作用目前尚未完全阐明。既往研究表明,在慢性应激诱导的抑郁症大鼠海马中,c-Fos蛋白水平显著降低,同样,在右旋苯丙

表1 差异基因GO富集分析,包括生物过程、细胞组分、分子功能

分类	GO术语	描述	基因数	P
生物过程	GO:0006357	RNA 聚合酶II启动子转录调控	49	4.78E-06
生物过程	GO:0044707	单细胞生物过程	119	1.35E-05
生物过程	GO:0048731	系统发育	94	3.08E-05
生物过程	GO:0006366	RNA 聚合酶II启动子转录	45	3.80E-05
生物过程	GO:0010604	高分子代谢过程的正性调控	64	4.48E-05
生物过程	GO:0048518	生物学过程正性调控	104	4.75E-05
生物过程	GO:0007275	多细胞生物发育	101	9.23E-05
生物过程	GO:0016070	RNA 代谢过程	87	1.34E-04
生物过程	GO:0032502	发育过程	112	1.40E-04
生物过程	GO:0051171	氮化合物代谢调控	85	4.78E-06
细胞成分	GO:0043231	细胞内膜结合细胞器	191	1.71E-10
细胞成分	GO:0043229	细胞内细胞器	202	1.13E-09
细胞成分	GO:0043227	膜上细胞器	202	1.45E-09
细胞成分	GO:0043226	细胞器	213	2.25E-09
细胞成分	GO:0044424	细胞内部分	217	6.39E-08
细胞成分	GO:0005622	细胞内	223	7.46E-08
细胞成分	GO:0005634	细胞核	124	6.95E-06
细胞成分	GO:0012505	内膜系统	75	6.55E-05
细胞成分	GO:0044422	细胞器部分	133	6.96E-05
细胞成分	GO:0043231	细胞膜上细胞器功能相关	191	1.71E-10
分子功能	GO:0000982	转录因子活性	19	7.41E-06
分子功能	GO:0044212	结合DNA的转录调节区域	27	7.44E-05
分子功能	GO:0000975	结合调节区域DNA	27	7.72E-05
分子功能	GO:0001067	结合调节区域核酸	27	8.06E-05
分子功能	GO:0000976	转录调节区序列特异性DNA结合	23	1.45E-04
分子功能	GO:0000981	序列特异性DNA结合, RNA 聚合酶II转录因子活性	23	1.74E-04
分子功能	GO:0000977	RNA 聚合酶II调节区域序列特异性DNA结合	21	1.99E-04
分子功能	GO:0001012	RNA 聚合酶II调节区域DNA结合	21	2.28E-04
分子功能	GO:0000987	核心启动子近端区域序列特异性DNA结合	16	2.33E-04
分子功能	GO:0001159	核心启动子近端区域DNA结合	16	2.45E-04

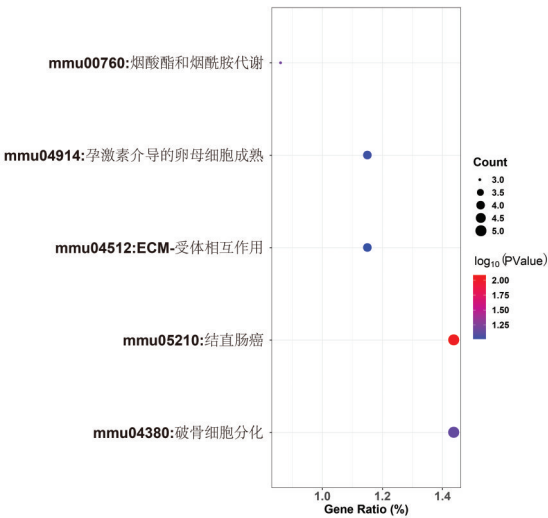
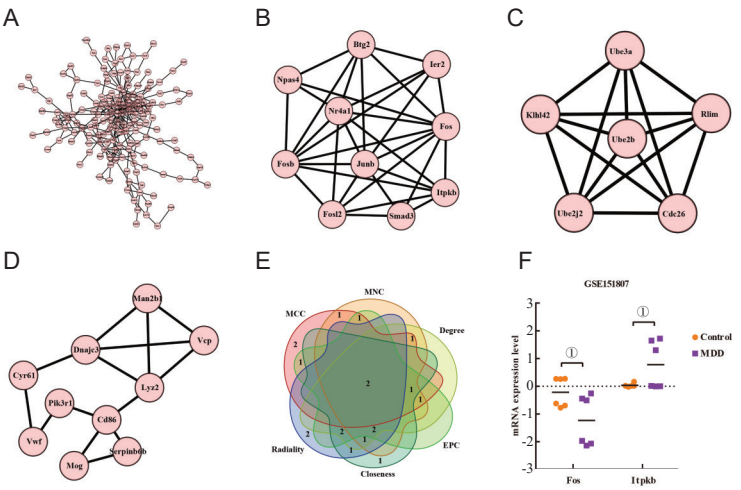


图4 差异基因KEGG信号通路富集分析

胺戒断诱发的大鼠抑郁症模型中,海马及杏仁核组织中Fos基因 mRNA 水平显著降低^[14]。而 Ionov 等^[15]研究



注:与对照组比较,① $P<0.05$

图5 差异基因表达蛋白互作网络分析及核心基因筛选

发现,抗抑郁药能上调大鼠侧内嗅皮质和海马背侧下室c-Fos的表达,这些研究均提示,Fos可能作为一个保

表2 基于不同算法的核心基因筛选

类别	cytoHubba中的排名方法					
	MCC	MNC	Degree	EPC	Closeness	Radiality
前10位基因	Fos	Itpkb	Itpkb	Itpkb	Itpkb	Itpkb
	Fosb	Fos	Fos	Fos	Vcp	Vcp
	Nr4a1	Fosb	Grin2b	Cyr61	Smad3	Sumo1
	Junb	Nr4a1	Vcp	Nr4a1	Fos	Smad3
	Itpkb	Cyr61	Smad3	Fosb	Sumo1	Fos
	Btg2	Junb	Dcn	Junb	Dcn	Dcn
	Fosl2	Dcn	Cyr61	Btg2	Grin2b	Grin2b
	Ube2b	Ube2b	Fosb	Smad3	Cyr61	Lyz2
	Ube3a	Vcp	Nr4a1	Grin2b	Vwf	Cyr61
	Ube2j2	Ube3a	Ube3a	Vcp	Nr4a1	Arf6

护性基因抑制抑郁症的发生。Itpkb 基因编码一种肌醇三磷酸激酶,即肌醇 1, 4, 5-三磷酸 3-激酶 B,属于肌醇多磷酸激酶家族,该家族包括 Itpka、Itpkb 和 Itpkc 三种同工酶,其中 Itpkb 在脑组织中广泛表达,参与调节免疫反应和细胞内 Ca²⁺平衡。目前关于 Itpkb 的报道,主要集中在自身免疫性疾病和肿瘤等领域。研究表明,Itpkb 与 T 细胞的活化,肿瘤细胞的生长、转移及耐药等生物学行为有关^[16,17]。此外,也有研究报道,Itpkb 在阿尔茨海默病患者的大脑皮质中的水平显著增加,Itpkb 过表达可以加剧小鼠阿尔茨海默病^[18],而关于 Itpkb 在抑郁症疾病中的作用还未见报道。既往有学者认为,磷酸肌醇-钙离子功能相对亢进及腺苷酸环化酶-环磷酸腺苷系统功能减退是抑郁发生的根本原因^[19],而 Itpkb 本身就具有催化肌醇 1, 4, 5-三磷酸(IP3)至肌醇 1, 3, 4, 5-四磷酸(IP4)及维持 Ca²⁺平衡的功能,因此,Itpkb 过表达可能是通过引起磷酸肌醇-钙离子功能相对亢进及腺苷酸环化酶-环磷酸腺苷系统功能减退从而促进抑郁症的发生。不过,本研究尚未构建抑郁症动物模型进一步验证海马和杏仁核组织中 Fos 和 Itpkb 基因的变化,也未能从动物水平验证 Fos 和 Itpkb 基因敲低及过表达对慢性温和应激诱导的小鼠抑郁症的影响,这有待后续进一步探究。

总之,本研究基于公共数据库,利用生物信息学这一快速且经济的方法,发现 Fos 和 Itpkb 可能是与抑郁症发生相关的关键基因,为后期实验验证提供基础,Fos 和 Itpkb 可能作为潜在的抗抑郁药物治疗靶点。

参考文献

[1] 刘贺, 南彩, 马思梦, 等. 抑郁症患者事件相关电位 P300 与健康问卷-9 评分的相关性及其临床意义分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15: 91-94.
[2] Malhi GS, Mann JJ. Depression[J]. Lancet, 2018, 392: 2299-2312.
[3] Jakubovski E, Varigonda AL, Freemantle N, et al. Systematic Review

and Meta-Analysis: Dose-Response Relationship of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Major Depressive Disorder [J]. Am J Psychiatry, 2016, 173: 174-183.
[4] Gauthier J, Vincent AT, Charette SJ, et al. A brief history of bioinformatics [J]. Brief Bioinform, 2019, 20: 1981-1996.
[5] Mulder NJ, Adebiyi E, Adebiyi M, et al. Development of Bioinformatics Infrastructure for Genomics Research [J]. Glob Heart, 2017, 12: 91-98.
[6] 王明月, 王玉莲, 许苑南, 等. 抑郁症诊断技术分析及应用[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14: 357-359.
[7] Roddy DW, Farrell C, Doolin K, et al. The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression [J]. Biol Psychiatry, 2019, 85: 487-497.
[8] Zavorotnyy M, Zöllner R, Schulte-Güstenberg LR, et al. Low left amygdala volume is associated with a longer duration of unipolar depression [J]. J Neural Transm (Vienna), 2018, 125: 229-238.
[9] Ferri J, Eisendrath SJ, Fryer SL, et al. Blunted amygdala activity is associated with depression severity in treatment-resistant depression [J]. Cogn Affect Behav Neurosci, 2017, 17: 1221-1231.
[10] Shen CJ, Zheng D, Li KX, et al. Cannabinoid CB1 receptors in the amygdalar cholecystokinin glutamatergic afferents to nucleus accumbens modulate depressive-like behavior [J]. Nat Med, 2019, 25: 337-349.
[11] Liu T, Zhou N, Xu R, et al. A metabolomic study on the anti-depressive effects of two active components from Chrysanthemum morifolium [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48: 718-727.
[12] Brown AG, Thapa M, Hooker JW 4th, et al. Impaired chemoreflex correlates with decreased c-Fos in respiratory brainstem centers of the streptozotocin-induced Alzheimer's disease rat model [J]. Exp Neurol, 2019, 311: 285-292.
[13] Krishna A, Bhatt MLB, Singh V, et al. Differential Expression of c-fos Proto-Oncogene in Normal Oral Mucosa versus Squamous Cell Carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19: 867-874.
[14] Horner KA, Noble ES, Lauterbach EC. Differential regulation of prodynorphin, c-fos, and serotonin transporter mRNA following withdrawal from a chronic, escalating dose regimen of D-amphetamine [J]. Synapse, 2009, 63: 257-268.
[15] Ionov ID, Pushinskaya II, Gorev NP, et al. Antidepressants upregulate c-Fos expression in the lateral entorhinal cortex and hippocampal dorsal subiculum: Study in rats [J]. Brain Res Bull, 2019, 153: 102-108.
[16] Bäder S, Glaubke E, Grüb S, et al. Effect of the actin- and calcium-regulating activities of ITPKB on the metastatic potential of lung cancer cells [J]. Biochem J, 2018, 475: 2057-2071.
[17] Pouillon V, Maréchal Y, Fripiat C, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B (Itpkb) controls survival, proliferation and cytokine production in mouse peripheral T cells [J]. Adv Biol Regul, 2013, 53: 39-50.
[18] Stygelbout V, Leroy K, Pouillon V, et al. Inositol trisphosphate 3-kinase B is increased in human Alzheimer brain and exacerbates mouse Alzheimer pathology [J]. Brain, 2014, 137: 537-552.
[19] Berridge MJ. Vitamin D and Depression: Cellular and Regulatory Mechanisms [J]. Pharmacol Rev, 2017, 69: 80-92.

(本文编辑:王晶)