

氯化锂-匹罗卡品诱导癫痫大鼠海马组织差异表达 circRNA的筛选及功能分析

黄亚辉¹, 杨萍¹, 朱勇¹, 王琴¹, 卢军¹, 贺冰², 张熙¹

摘要 目的:探究氯化锂-匹罗卡品诱导癫痫大鼠海马组织差异表达共价闭合、单链环状RNA(circRNA)及功能分析。方法:通过构建氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠模型,取癫痫大鼠及对照大鼠海马组织通过Illumina高通量测序平台进行转录组测序,并通过EdgeR包对circRNA进行差异分析、通过R语言进行GO及KEGG信号通路富集分析,通过Targetscan与miRanda软件进行circRNA与miRNA互作分析寻找circRNA核心调控靶标。结果:对照组及癫痫组大鼠海马的circRNA进行差异分析获得的262个差异表达circRNA,信号通路富集分析发现与胞蛋白修饰过程、蛋白质变性过程、树突形态调控、神经元分化调节、离子跨膜转运的调节等生物过程相关。并进一步确定了可能与circRNA存在互作的核心调控miRNA,包括miR-322-5p、miR-322-3p、miR-323-5p、miR-323-3p、miR-301a-5p、miR-301a-3p、miR-324-5p、miR-324-3p等。结论:本研究筛选了氯化锂-匹罗卡品点燃癫痫大鼠与正常大鼠脑组织差异circRNA,系统地分析了其可能的作用功能机制,为癫痫诊断或治疗寻找到可靠的生物标志物。

关键词 氯化锂-匹罗卡品;癫痫;circRNA;miRNA

中图分类号 R741;R741.02;R742.1 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20201286

本文引用格式:黄亚辉, 杨萍, 朱勇, 王琴, 卢军, 贺冰, 张熙. 氯化锂-匹罗卡品诱导癫痫大鼠海马组织差异表达circRNA的筛选及功能分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2022, 17(6): 315-319.

Screening and Functional Analysis of Differentially Expressed CircRNA in Hippocampus of Rats with Epilepsy Induced by Lithium Chloride-Pilocarpine HUANG Ya-hui¹, YANG Ping¹, ZHU Yong¹, WANG Qin¹, LU Jun¹, HE Bing², ZHANG Xi¹. 1.Epilepsy Treatment Center, Brain Hospital of Hunan Province (Clinical Medical College, Hunan University of Chinese Medicine), Changsha 410007, China; 2.The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract Objective: To investigate the differential expression of circRNA and its function in hippocampal tissues of epileptic rats induced by lithium chloride-pilocarpine. **Methods:** The epileptic rat model was established using lithium chloride-pilocarpine. Hippocampal tissue of epileptic rats and control rats was collected for transcriptome sequencing by the Illumina high-throughput sequencing platform. The differences in circRNA were analyzed with the edgeR package. GO and KEGG pathway enrichment analysis was performed in R. Targetscan and miRanda were used for circRNA-miRNA interaction software analysis to find circRNA core control targets. **Results:** We obtained 262 differentially expressed circRNAs by differential analysis of hippocampal circRNA in the control group and epilepsy group. Signal pathway enrichment analysis revealed that these circRNAs were associated with the cytoprotein modification process, protein degeneration process, dendritic morphology regulation, neuron differentiation regulation, ion transmembrane transport, and other biological processes. We further identified core regulatory miRNAs that may interact with circRNA, including miR-322-5p, miR-322-3p, miR-323-5p, miR-323-3p, miR-301a-5p, miR-301a-3p, miR-324-5p, miR-324-3p, etc. **Conclusion:** In this study, the difference in brain tissue circRNA between lithium chloride-pilocarpine epileptic rats and normal rats was screened and the possible mechanism of function was systematically analyzed so as to find a reliable biomarker for the diagnosis and treatment of epilepsy.

Key words lithium chloride-pilocarpine; epileptic rats; circRNA; miRNA

癫痫不是具有单一表达和病因的疾病,而是具有多种危险因素和强烈遗传易感性的症状复合体。癫痫病影响所有年龄段,可致残^[1-3]。癫痫发作的准确诊断至关重要,但现阶段对癫痫的筛查及防治远未能满足临床的需求^[4,5]。寻找癫痫诊断或治疗的生物标志物具有重要意义。

共价闭合、单链环状的RNA(circRNA)是一类比较特殊的内源性非编码RNA,没有游离的5'帽子结构和3'poly(A)结构,且对核酸酶不敏感,比普通的线性RNA(linear RNA)更稳定^[6-8]。circRNA可能在多种疾病的发展中起作用^[9-11],其在多种神经系统疾病(包括阿尔茨海默氏病、脑卒中和脑胶质瘤)

作者单位

1. 湖南省脑科医院(湖南中医药大学临床医学院)癫痫中心

长沙 410007

2. 湖南中医药大学附属第二医院中医科

长沙 410007

基金项目

国家自然科学基金(No. 81874429);
湖南省卫生计生委科研课题(No. 20200009, B2019047);

湖南省自然基金(No. 2019JJ80027, 2020JJ5294);
湖南省中医药管理局重点项目(No. 202145);
湖南省教育厅科研项目(No. 19B440)

收稿日期

2021-09-12

通讯作者

张熙

1104622012@

qq.com

中存在异常表达^[12,13],但其作用机制目前尚不明确。circRNA在癫痫中鲜有研究报道,探索circRNA在癫痫中的功能机制具有重要意义。

氯化锂-匹罗卡品点燃大鼠癫痫模型是目前理想的颞叶癫痫模型,被广泛使用于颞叶癫痫发病机制及抗癫痫药物筛选研究^[14]。故本研究通过构建氯化锂-匹罗卡品点燃大鼠癫痫模型,使用高通量测序方法进一步探索circRNA在癫痫中的功能机制,以期寻找到癫痫诊断或治疗的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

无特定病原体级雄性SD大鼠17只,8~10周龄,体质量180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证编号:SCXK(湘)2016-0002]。氯化锂(1001011078)购于Sigma公司,匹罗卡品(ab141301)购于ABCR公司。

1.2 方法

1.2.1 氯化锂-匹罗卡品点燃癫痫大鼠模型构建及评估 将17只大鼠随机分为对照组(8只)及癫痫组(9只)。癫痫组大鼠先腹腔注射氯化锂溶液(3 mmol/kg),16 h后腹腔注射匹罗卡品溶液(50 mg/kg),约15~35 min后诱发癫痫发作^[14]。对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水。采用Racine分级大鼠癫痫程度,达到4级及以上发作入组,28 d后即癫痫大鼠造模成功。

1.2.2 HE染色 从2组大鼠中各随机抽取4只处死,在冰面上快速分离出海马组织,生理盐水洗净后用4%多聚甲醛固定,依次经过不同浓度酒精脱水、石蜡包埋、切片、染色等HE染色常规操作。观察对照组及癫痫组海马组织病理学差异。

1.2.3 circRNA测序及差异表达基因筛选 取对照组4只、癫痫组5只大鼠,处死后取新鲜海马组织,快速用RNase-free配制的生理盐水/PBS清洗,吸干表面的液体,迅速将样本分割成长宽高均≤0.5 cm的小块,将样本放入Rnase-free管中,迅速投入液氮中速冻。提取总RNA,采用去除核糖体RNA(rRNA depletion)的方法构建链cDNA文库。文库质检合格后采用Illumina Novaseq™ 6000进行测序,测序读长为双端2×150 bp(PE150)。根据circRNA结构特征以及剪接序列特征,采用CIRCEXplorer2和CIRI 2款软件预测circRNA,并且依据circRNA起始、终止位置来整合2个软件的结果。circRNA鉴定标准:①mismatch≤2;②Back-spliced junctions reads≥1;③two splice sites在基因组上距离

≤100 kb。测序完成后,通过Tophat 2进行序列比对,然后用cufflinks对所有基因包括编码和非编码RNA进行定量;再使用EdgeR包进行差异分析,有生物学重复的同时满足Log2差异倍数绝对值≥1且P<0.05的基因标为差异基因。

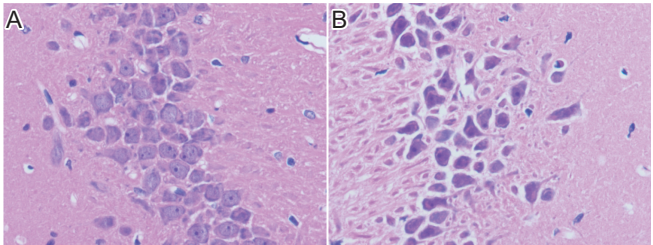
1.2.4 差异表达基因的信号通路富集 对得到的差异circRNA进行(Gene Ontology,GO)、京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)功能富集分析。

1.2.5 circRNA与miRNA互作分析 circRNA-miRNA互作分析主要采用Targetscan和miRanda软件进行分析。Targetscan基于种子区域(seed region)进行miRNA target预测;miRanda主要基于circRNA与miRNA两者结合自由能大小,自由能越小,两者结合能力越强。

2 结果

2.1 氯化锂-匹罗卡品点燃癫痫大鼠模型构建结果

癫痫组大鼠腹腔注射匹罗卡品溶液后,在数分钟内出现流涎、瞳孔缩小、腹泻、毛发耸立、血泪症等外周胆碱能反应,活动量明显减少,摄食饮水减少,表现呆滞,头面部轻颤,随后进展为4级及以上的痫性发作,约15~35 min后出现癫痫发作。28 d后大鼠呈慢性自发性癫痫发作,即癫痫造模成功。对照组大鼠则表现正常,未出现上述行为学变化。HE染色结果显示对照组大鼠海马区神经元边缘清晰,形状正常,数量较多,排列规则;而癫痫组大鼠海马神经元排列紊乱,失去带状规则,海马神经元数量明显减少,再次提示模型构建成功,见图1。



注:(A)对照组;(B)癫痫组

图1 癫痫组与对照组大鼠海马区形态学观察(HE染色,光学显微镜,100×)

2.2 2组大鼠差异circRNA分析结果

将对照组及癫痫组的circRNA进行差异分析获得的262个差异circRNA,其中差异最显著的18个见表1。通过火山图及散点图展示了它们的分布情况,见图2;并通过热图展示了部分差异circRNA的表达,

见图3。

2.3 2组差异circRNA的GO分析结果

在生物过程(biological process, BP)层面, 差异基因富集于细胞蛋白修饰过程、蛋白质改性过程、树突形态形成的调控、高分子改性、突触前膜组织、肽基-赖氨酸改性、树突形态形成的正调控、树突发育的正向调控、树突形态发生、肽基-氨基酸修改、枝晶发育的调节、细胞组成、组织或生物形成、通过小蛋白偶联修饰蛋白质、细胞分解代谢的过程、细胞投射组织的正向调节、神经元分化调节、离子跨膜转运的调节等通路。在细胞组分(cellular component, CC)层面, 差异基因主要富集于膜-有界的细胞器、细胞器、细胞内细胞器内腔、细胞器内腔、膜-封闭腔、细胞投影、核浆、核浆部分、神经元投射、突触后膜、突触等功能相关。在分子功能(molecular function, MF)层面, 差异基因主要富集于二价无机阳离子跨膜转运体钙离子跨膜转运蛋白活性、酶结合、封闭的通道活动、离子门控通道活性、金属离子跨膜转运活性、大分子复杂的绑定、核苷-三磷酸酶监管组织的活动、无机阳离子跨膜转运体活化、核激素受体结合、GTPase 监管活动、GTPase 激活活动、电压门控离子通道活性、电压-封闭通道活动等通路相关, 见图4。

2.4 2组差异circRNA的KEGG pathway分析结果

KEGG pathway 富集分析发现主要与泛素介导的蛋白水解作用、自噬、p53 信号通路、cGMP-PKG 信号通路、D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢、磷酸肌醇代谢、细胞周期等相关。上述结果表明癫痫大鼠与对照大鼠海马组织存在神经信号转导相关通路上的基因表达水平的变化, 差异circRNA 富集为蛋白质变性、离子转运调控及神经发育等功能, 见图5。

2.5 circRNA与miRNA互作分析

通过 Targetscan 与 miRanda 两款软件进行分析, 发现与 circRNA 存在互作的 miRNA, 如 miR-322-5p、miR-322-3p、miR-323-5p、miR-323-3p、miR-301a-5p、miR-301a-3p、miR-324-5p、miR-324-3p 等, 见图 6。circRNA 可能通过与 miRNA 或其他分子结合而在转录或转录后水平介导基因表达, 然后抑制其功能。

3 讨论

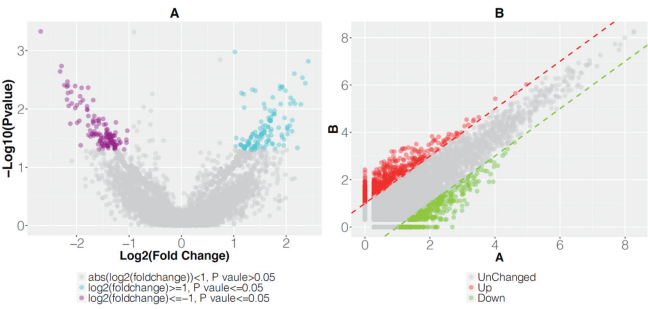
本研究通过构建氯化锂-匹罗卡品点燃大鼠癫痫模型, 通过行为学观察及 HE 染色结果确定模型构建成功后取新鲜海马组织, 使用高通量测序方法进一步探索 circRNA 在癫痫中的功能机制, 以期寻找到癫痫诊断或治疗的生物标志物, 为未来癫痫诊断和治疗寻找潜在靶点。

癫痫发展和进展是基因转录和蛋白质表达的大规

表1 癫痫组与对照组大鼠海马组织差异表达circRNA(最显著的18个)

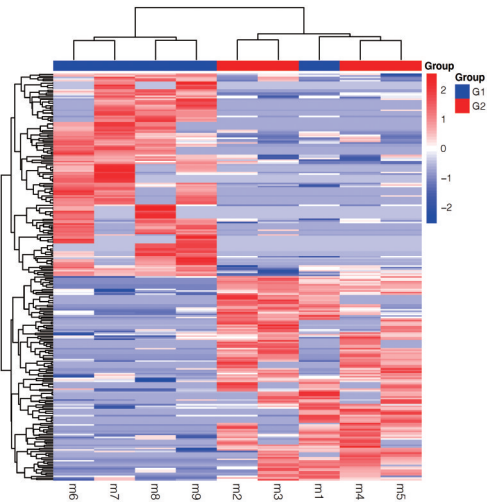
circRNA_ID	Log2FoldChange	P value	Start	End	Strand	Symbol
5:106171074 106202563	2.4237	0.0015	106171074	106202563	-	MIlt3
8:39224604 39228788	2.3654	0.0036	39224604	39228788	-	Stt3a
5:169386045 169413847	2.3122	0.0029	169386045	169413847	+	Acot7
3:3461485 3463941	2.2822	0.0083	3461485	3463941	-	Ubac1
11:66399341 66426089	2.2156	0.0465	66399341	66426089	+	Stxbp5l
X:4856245 4898806	2.1680	0.0081	4856245	4898806	-	Kdm6a
1:185306404 185307538	2.1563	0.0025	185306404	185307538	+	Pik3c2a
5:128714471 128718860	2.1341	0.0072	128714471	128718860	-	Osbp19
8:65528263 65584587	2.1176	0.0156	65528263	65584587	-	Lrrc49
X:56083435 56087250	-2.1661	0.0040	56083435	56087250	-	Il1rapl1
4:117422680 117446827	-2.1665	0.0053	117422680	117446827	+	Alms1
9:94890532 94898104	-2.1757	0.0034	94890532	94898104	+	Atg16l1
16:79648750 79666416	-2.1848	0.0069	79648750	79666416	-	Myom2
1:113229268 113256389	-2.1862	0.0041	113229268	113256389	+	Gabrb3
X:10563367 10568439	-2.2355	0.0039	10563367	10568439	-	Usp9x
17:27592203 27602936	-2.2900	0.0018	27592203	27602936	-	Rreb1
1:176374378 176382073	-2.3158	0.0023	176374378	176382073	-	Galnt18
13:35748508 35784163	-2.6865	0.0005	35748508	35784163	-	Ptpn4

注: Log2FoldChange-差异倍数; Start-circRNA 在染色体上的起始位点; End-circRNA 在染色体上的终止位点; Strand-来源于DNA 双链中的正义链+或反义链-; Symbol-circRNA 对应线性转录本或基因信息



注：(A)火山图，蓝色点代表在正常样本中高表达，紫色点代表在癫痫中高表达；(B)散点图

图2 癫痫组与对照组大鼠海马组织差异表达的 circRNA 火山图和散点图



注：G1 代表对照组，G2 代表癫痫组，颜色代表表达值

图3 癫痫组与对照组大鼠海马组织部分 差异表达 circRNA 热图

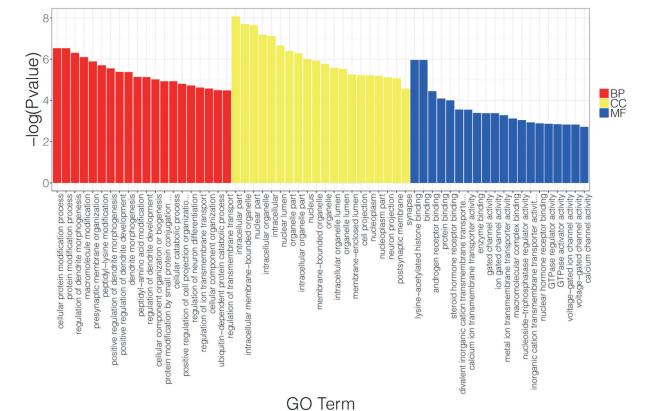


图4 癫痫组与对照组大鼠海马组织差异表达 circRNA 的 GO 富集分析

模变化引起异常的网络重构和过度兴奋，导致反复发作^[15-17]。circRNA 是在人体组织中发现的一类独特的非编码 RNA，其来自前体-mRNA(pre-mRNA)转录本的反向剪接，与多种疾病有关。我们通过高通量测序后进行差异分析获得的 262 个差异 circRNA，这些可能是癫痫防治的潜在靶标。目前结果虽然显示极少数 circRNA 的表达发生了显著改变，但它们通过

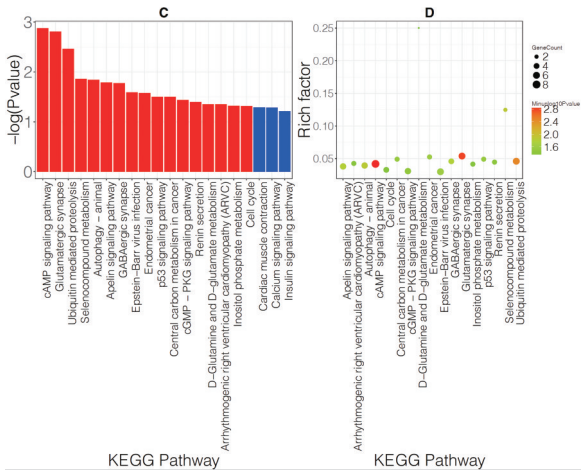


图5 癫痫组与对照组大鼠差异表达 circRNA KEGG 信号 通路富集分析

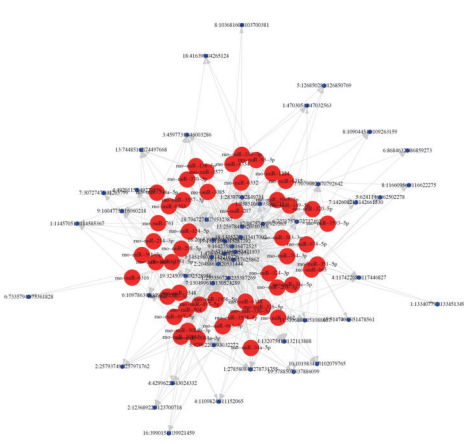


图6 癫痫组与对照组大鼠海马组织差异表达 circRNA 与 miRNA 互作网络图(相关最高的前 50 个)

circRNA-miRNA-mRNA 相互作用靶向大量 mRNA。另外，信号通路富集结果表明差异基因富集于细胞蛋白修饰过程、蛋白质变性过程、树突形态调控、神经元分化调节、离子跨膜转运的调节等通路相关。这些信号通路多数被证实与海马神经元的结构和功能的维持关系密切^[18]，表面 circRNA 的异常可能引起神经元兴奋性改变，有可能导致神经元发生异常的、同步化放电导致癫痫症状发生及发作，在癫痫发病及疾病进展中发挥重要作用。基于文献报道^[19,20]，circRNA 主要存在 5 种可能的调控机制：①细胞核内参与转录调控；②转录时与 mRNA 前体发生剪切竞争；③细胞质中与 mRNA 竞争 miRNA 的靶标结合位点；④包含核糖体进入位点，可以翻译表达有效多肽或蛋白；⑤circRNA 与蛋白相互作用。这部分研究目的主要针对第 3 种调控机制，即 circRNA 作为内源性竞争 RNA(ceRNA)影响 miRNA 转录后调控功能进行深入分析，为后续实验验证提供依据。在本研究中，与 circRNA 存在互作的 miRNA，如 miR-322-5p、miR-323-5p、miR-324-5p 等也

有少量的研究证实其与神经系统疾病相关。如金书欣等^[21]研究证实通过 miR-322-5p 靶向影响 Akt3 的表达,可以抑制 Th17 分化来缓解自身免疫性脑脊髓炎的疾病进程;Lian 等^[22]通过使用 miR-323-5p 模拟物过度表达 miR-323-5p 后,其可以靶向胰岛素样生长因子 1 受体,抑制人神经胶质瘤细胞中的细胞生长,凋亡和迁移;Xu 等^[23]研究表明过度表达的 miR-324-5p 可能降低神经胶质瘤细胞系的细胞存活率并提高 G₁/G₀ 期速率,miR-324-5p 可以通过靶向调节神经胶质瘤细胞的生长来抑制神经胶质瘤细胞的增殖。这些结果从侧面进一步证明了本研究发现的重要性。

本研究也存在一定的局限性。①因为 circRNA-miRNA-mRNA 网络的复杂性,相互作用在本研究中仅通过生物信息学方法可以预测;②动物样本与人体组织存在物种差异性,结果无法直接推及于人;③差异 circRNA 的作用尚未得到验证,在后续实验中我们将继续思考该问题的解决方法,并将进一步完善机制实验研究。但本研究结果为揭示癫痫发生发展提供基因层面的依据,为癫痫的机制研究提供新的实验依据和线索,为癫痫的早期诊断和治疗提供新的思路及靶点。

综上所述,本研究通过构建氯化锂-匹罗卡品点燃大鼠癫痫模型,使用高通量测序方法进一步探索 circRNA 在癫痫中的差异表达,系统地分析了其可能的作用功能机制,有助于寻找到癫痫诊断或治疗的生物标志物。

参考文献

[1] Abdulaziz AT, Sander JW. The increasing challenge of epilepsy in the elderly: shortening hospital admission[J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2020, 78: 669-671.

[2] Akyuz E, Polat AK, et al. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review[J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118826.

[3] Bailey K, Im-Bolter N. Language in childhood epilepsy: A systematic review and meta-analysis[J]. *Epilepsy Behav*, 2021, 114: 107621.

[4] Blackmon K, Waechter R, Landon B, et al. Epilepsy surveillance in normocephalic children with and without prenatal Zika virus exposure[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14: e0008874.

[5] Crevier-Sorbo G, Brunette-Clément T, Medawar E, et al. A needs assessment of pediatric epilepsy surgery in Haiti[J]. *J NeurosurgPediatr*, 2020, 27: 189-195.

[6] MaC, GuR, WangX, et al. circRNA CDR1as Promotes Pulmonary Artery SmoothMuscle Cell Calcification by Upregulating CAMK2D and CNN3 via Sponging miR-7-5p[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 530-541.

[7] Jiang Q, Su D Y, Wang Z Z, et al. Retina as a window to cerebral dysfunction following studies with circRNA signature during neurodegeneration[J]. *Theranostics*, 2021, 11: 1814-1827.

[8] Ruan ZB, Wang F,Yu QP, et al. Integrative analysis of the circRNA-miRNA regulatory network in atrial fibrillation[J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 20451.

[9] Chen XJ, Li ML, Wang YH, et al. Abundant Neural circRNA Cdr1as Is Not Indispensable for Retina Maintenance[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 565543.

[10] Lin X, Huang C, Chen Z, et al. CircRNA_100876 Is Upregulated in Gastric Cancer (GC) and Promotes the GC Cells' Growth,Migration and Invasion via miR-665/YAP1 Signaling[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 546275.

[11] Zhu J, Zhou Y, Zhu S, et al. circRNA circ_102049 Implicates in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression through Activating CD80 by Targeting miR-455-3p[J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 8819990.

[12] Liu J, Yang L, Fu Q, et al. Emerging Roles and Potential Biological Value of CircRNA in Osteosarcoma[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 552236.

[13] Shen ZJ, Han YC, Nie MW, et al. Analyses of circRNA and mRNA profiles in the submandibular gland in hypertension[J].*Genomics*, 2020, 113: 57-65.

[14] Honchar MP, Olney JW, Sherman WR. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats[J]. *Science*, 1983, 220: 323-325.

[15] Roh H, Kim W, Kim J, et al. Duration-dependent extensive volume and shape changes of mesolimbic structures in surgically treated unilateral patients with temporal lobe epilepsy[J]. *Epilepsy Behav*, 2020: 107517.

[16] Ahmed S N. Support for self-care for patients with Epilepsy[J]. *BMJ*, 2020, 5: 327-332.

[17] Sparks FT, Liao Z, Li W, et al. Hippocampal adult-born granule cells drive network activity in a mouse model of chronic temporal lobe epilepsy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 6138.

[18] Kobau R, Zack MM. Knowledge of and familiarity with epilepsy in U. S. adults: Results from the 2017 Consumer Styles Online Panel Survey[J]. *Epilepsy Behav*, 2021, 114: 107535.

[19] Kovacs S, Toth M, Janszky J, et al. Cost-effectiveness analysis of invasive EEG monitoring in drug-resistant epilepsy[J]. *Epilepsy Behav*, 2021, 114: 107488.

[20] Nunes ML, Esper NB, Franco AR, et al. Epilepsy after congenital Zika virus infection: EEG and neuroimaging features[J]. *Seizure*, 2020, 84: 14-22.

[21] 金书欣, 吴婷, 蔡飞扬, 等. miR-322-5p 靶向 Akt3 抑制 Th17 分化对干扰素 β 干预实验性自身免疫性脑脊髓炎的影响[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2019, 39: 834-842.

[22] Lian HW, Zhou Y, Jian ZH, et al. MiR-323-5p acts as a tumor suppressor by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor in human glioma cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15: 10181-10185.

[23] Xu HS, Zong HL, Shang M, et al. MiR-324-5p inhibits proliferation of glioma by target regulation of GLI1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18: 828-832.

(本文编辑:唐颖馨)