

黄艺滢,石桂英,吕颖,等. 小鼠侧脑室下区基因表达的增龄性变化研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 57-67.
Huang YY, Shi GY, Lyu Y, et al. Age-related changes in gene expression of the subventricular zone of mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(1): 57-67.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.01.010

小鼠侧脑室下区基因表达的增龄性变化研究

黄艺滢,石桂英,吕 颖,李珂雅,白 琳*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 研究幼年期、成年期和老年期小鼠侧脑室下区(subventricular zone,SVZ)中基因表达的增龄性变化。**方法** 分别提取3周龄、6月龄和20月龄C57小鼠SVZ的mRNA,基于转录组测序及实时荧光定量PCR技术,检测SVZ中在不同年龄阶段的基因表达差异。**结果** 以幼年期小鼠为对照,成年期检测到253个差异表达的基因,老年期检测到519个,以成年期作对照,老年期检测到147个差异表达的基因。GO分析发现成年期小鼠与幼年期相比差异表达基因主要涉及营养和代谢,老年期小鼠与成年期相比主要涉及中枢神经系统神经元分化等。KEGG分析发现差异表达基因主要涉及通路为蛋白质消化吸收、神经活性配体-受体相互作用等。**结论** 该研究提供了不同年龄段SVZ转录水平基因变化的数据,为探讨SVZ的功能发育和退化,进一步治疗和抵抗神经衰老提供新的理论依据和方法。

【关键词】 侧脑室下区;增龄性变化;转录组测序技术;神经干细胞;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)01-0057-11

Age-related changes in gene expression of the subventricular zone of mice

HUANG Yiying, SHI Guiying, LYU Ying, LI Keya, BAI Lin*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the age-related changes in SVZ gene expression of 3-week-old, 6-month-old, and 20-month-old mice. **Methods** RNA was extracted from the SVZ of mice at the three ages. The difference in gene expression of SVZ at the different ages was detected by RNA sequencing and quantitative real-time PCR. **Results** Compared with the levels in young mice, 253 differentially expressed genes were detected in adult mice and 519 in old mice. Compared with the levels in adult mice, 147 differentially expressed genes were detected in old mice. GO analysis found that the differentially expressed genes are mainly involved in nutrition and metabolism in adult mice compared with young, and central nervous system neuron differentiation among others in old mice compared with adult mice. KEGG analysis found that the differentially expressed genes are mainly involved in protein digestion and absorption, and neuroactive ligand-receptor interaction, among others. The differentially expressed genes were analyzed by GO and KEGG pathways analyses. **Conclusions** This study provides basic data on the changes of gene transcription levels with age in the

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(31672374);中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费(2017-I2M-2-005)。

【作者简介】 黄艺滢(1991—),女,硕士,专业:细胞生物学。E-mail: huangyiying91@163.com

【通信作者】 白琳(1984—),女,硕士生导师,研究方向:干细胞临床转化。E-mail: bailin49@163.com

SVZ, and also provides a new theoretical basis for treatment and resistance to nerve aging in the future.

【Keywords】 subventricular zone; age-related change; RNA sequencing; neural stem cell; mouse

啮齿动物中枢神经系统(central nervous system, CNS)中神经元的产生是一个持久的过程,不仅发生在胚胎阶段,而且发生在整个成年期的大脑的部分区域^[1-2]。成体神经发生是指神经干细胞(neural stem cells, NSCs)增殖并产生新神经元,经过迁移、分化形成成熟的神经元,最终整合到原有的神经回路中的过程。成体 NSCs 主要存在于两个区域:海马齿状回的颗粒下区(subgranular zone, SGZ)和侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)^[3-4]。NSCs 提供新的神经元,有助于大脑的可塑性、学习、记忆和修复。随着年龄的增长,在中年期 NSC 功能就会下降,导致增殖细胞减少,神经元输出减少。

SVZ 的 NSCs 是星形胶质细胞样静息细胞,表达神经胶质原纤维酸性蛋白和 CD133,被称为 B 型细胞。B 型细胞被激活,泛干细胞标记物巢蛋白和表皮生长因子受体表达上调,并进行分裂^[5-6],产生转运扩增型的 C 型细胞。C 型细胞最终产生成神经细胞,其形成链并从 SVZ 迁移到吻侧迁移流中,最终到达嗅球。一部分神经母细胞整合入已有的神经回路,成熟成为多巴胺能或 GABA 能神经元^[7-8]。由此可见,SVZ 对于成年期大脑的神经元产生十分重要。

研究表明小鼠 SVZ 在衰老过程中变得更薄,表现出增殖和神经发生的显著减少^[9]。并且在老年小鼠中,SVZ 中的 B 型 NSCs 更多处于增殖状态,但其总体数量减少^[10],这可能是由于早在成年期,活化的 B 型 NSCs 细胞周期延长,防止衰老的神经干细胞池(NSC pool)的消耗^[11-12]。另外在衰老过程中,SVZ 内小胶质细胞变化显著。小胶质细胞是大脑中主要的免疫细胞,有助于大脑的神经发育和神经细胞功能的维持^[13]。在中年时,SVZ 中的小胶质细胞开始表现出活化的吞噬细胞状态,并释放促炎细胞因子,导致小胶质细胞介导的炎症反应稳步增加,最终在老年时期导致脑中产生抗神经生成的微环境^[14]。

目前已有大量 SVZ 细胞增龄性改变的研究^[15-17],但相关的分子机制仍未完全阐明。因此我们采用转录组测序技术研究幼年期、成年期和老年期小鼠 SVZ 基因表达的差异,以此研究其增龄性改变的分子机制。本研究选取 3 周龄,6 月龄和 20 月龄小鼠,采用 Illumina 测序平台对小鼠 SVZ 的差异

基因表达进行分析,并通过实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)检测差异表达基因的表达情况以验证转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-Seq)结果的可信度。通过 GO 和 KEGG 分析其差异基因和参与的信号通路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL 小鼠购买于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0009],并在本所三层屏障环境动物房[SYXK(京)2015-0035]中长期进行饲养繁殖,选取幼年期(3 周龄,体重 9~11 g),成年期(6 月龄,体重 25~35 g)和老年期(20 月龄,体重 28~35 g)小鼠各 6 只,雌雄各半,取脑组织的 SVZ 进行研究。经本所实验动物管理和使用委员会(IACUC)审批,IACUC 号为 BL17001。实验动物饲养繁育和实验过程中,严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol Reagent (Thermo, 美国); NEBNext[®] Ultra[™] RNA 文库制备试剂盒(NEB, 美国); PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、TB Green Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 日本); Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, 美国); StepOnePlus[™] (Thermo, 美国); 实时荧光定量 PCR (qPCR)所使用的正向和反向引物见表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取

提取每只小鼠的 SVZ,使用 TRIzol Reagent 试剂盒按照操作流程提取总 RNA,测定浓度后按照幼年期,成年期和老年期 3 个组分别将 6 个样本等量混合构建 cDNA 文库。

1.3.2 文库构建与质检

简而言之,使用 NEBNext[®] Ultra[™] RNA 文库制备试剂盒(NEB, 美国)进行建库。使用 poly-T oligo 连接的磁珠纯化 mRNA,然后通过离子打断将 mRNA 随机打断。在 M-MuLV 逆转录酶体系中,以片段化的 mRNA 为模板合成 cDNA 第 1 条链,然后通过 RNA 酶 H 和 DNA 聚合酶 I 合成第 2 条链。将 cDNA 用 AMPure XP beads 筛选为 200 bp 左右的

cDNA,通过 PCR 扩增并纯化后得到文库。最后,使用 Agilent Bioanalyzer 2100 评估文库质量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences	退火温度(℃) Temperature	产物长度(bp) Product length
Oca2	TCATCAGACAGATCAGCAACGG	60.42	231
	GAACACAGACGCTCTTCCCA	59.97	
Aqp1	GACAATTCACCTGGCCGCAA	59.69	205
	AGCCAGTGTAGTCAATCGCC	60.11	
Mfrp	CTACAGAGAGTGGGTGTCCCT	60.27	273
	TCAGACTCTTGTAGCCTCGGA	60	
Kl	CGTTCAAGTGGACACTACTCTCT	59.75	109
	CTTCTTGGCTACAACCCCGT	59.96	
Bdkrb2	GAACCGGCTCGCTTGAGAAA	60.95	138
	AACATTTCGATGCCAAAGGAGG	59.51	
Igfbp2	CGAGGTGCTGTTCCGCT	59.69	292
	ATCACTGTCTGCAACCTGCT	59.6	
Prked	GAGCTCTTCGAGTCCATCCG	59.97	221
	GAAGGGGATTTCACTTTGGGC	59.45	
Neurod6	TCGTAATGCCCGAATCCC	56.81	248
	GACCCTTTCAGTCGTAGTTTG	58.94	
Ccl21b	TGTGCAAACCCCTGAGGAAGG	60.18	151
	TTCTCTTGCAGCCCTTGGAG	59.96	
Mmp3	CCCACATCACCTACAGGATTGT	59.76	206
	GACTGTTCAGGCCCATCAA	59.96	
Len2	GACTTCCGGAGCGATCAGTT	59.83	258
	CTGTACCTGAGGATACCTGTGC	59.9	
Nmbr	CAAAAAGCAGATGGAGACACGG	60.1	277
	ATAGGACTTCCGCCCACAAC	59.75	
Sncg	AATGCCGTGAGTGAAGCTGT	60.25	175
	CTCCACTCTTGGCCTCTTCATT	60.03	
Ptx3	TGCCCCGAGGTTGTGAAA	60.12	178
	TAGGGGTTCACCTTTGTGCC	59.89	
Rassf10	CAGCCGTCGTCACCTTGTT	60.59	106
	CCAGCGTCTCCATACGTTCTAC	60.54	
Rgs9	ACTTGGGGGTTTCCCCTTTC	59.81	136
	TCACCAGGGCTTCGATCTTT	59.02	
Gng7	GCTGAGACACTGGCTGGAG	60.08	205
	AGGCCTTGGAGACCTTGATG	59.38	
Drd1	AGTGACTCTAAAGCAAGGGCATT	60.25	235
	CTTCTGGGTTCAGTGCTCCA	59.6	
Gpr88	CCCCAAATCAAGCAGGCAAG	59.75	266
	TTTCGGAAGGACGACACGAG	60.04	
Adora2a	AGAGAAGGAAGCAATCGCA	59.38	125
	TGAGATACCCTTGTAGGCAGCA	60.89	
Penk	GCGCGTTCTTCTCTCCTACA	59.83	170
	GTGCACGCCAGGAAATTGAT	59.47	
Nts	TGTGTGGACCTGCTTGTCAG	60.18	182
	GACTTGCTTTGCTGATCTTGGAT	59.56	
Gpr6	CGACAGGCCAGCAGTACTTT	60.04	153
	CGCTAGATGTTGCTCCCTGG	60.53	
Neto1	TTGAAACCATTGCCAGCGTG	59.97	131
	GGGGCTCGGATGTACCATTT	59.82	
β-actin	TGCTGTCCCTGTATGCCTCT	60.62	223
	TTGATGTCACGCACGATTTC	57.13	

1.3.3 上机测序

库检合格后,选择北京诺禾致源科技股份有限公司,按照有效浓度把不同文库进行 Illumina 测序,并产生 150 bp 配对末端读数。

1.3.4 数据处理

对原始数据进行过滤,去除带有接头或低质量的序列数据,对过滤后的干净数据进行 Q20, Q30 和 GC 含量计算。使用 Hisat2 v2.0.5 将配对末端干净数据与参考基因组比对。

1.3.5 差异基因分析

将序列数据映射到每个基因数值用 HTSeq 计算。每个基因的 FPKM 通过基因的长度进行计算,并将序列数据映射到该基因的数值进行统计。然后使用 DESeq R 软件进行差异表达分析。最后使用 Benjamini-Hochberg 校正 P 值。校正后的 P 值 ≤ 0.05 和 $|\log_2\text{foldchange}| \geq 1$ 为显著差异表达。

1.3.6 功能富集分析

通过 ClusterProfiler R 软件进行包括 GO 与 KEGG 通路的富集在内的差异表达基因的功能富集分析。校正后的 P 值 ≤ 0.05 的 GO term 通过差异表达基因显著富集。

1.3.7 qPCR

使用反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 将提取的 mRNA 反转录为 cDNA。通过 qPCR 检测差异表达基因的表达情况以验证 RNA-Seq 结果的可信度。TaKaRa 该 20 μL 反应体系含 20 ng cDNA, 正向和反向引物 (表 1) 各 400 nmol/L, 0.4 μL ROX (50 $\times$) 和 10 μL SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$) (TaKaRa)。反应包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 进行 40 次循环。在 StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 系统-

Life Tech (Applied Biosystems) 进行检测。每个基因设置三个复孔, 将每个基因的 CT 值用内参基因 β -actin 的 CT 值进行标准化。计算公式为: 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{实验组}) - \Delta\text{Ct}(\text{对照组})$, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{目的基因}) - \text{Ct}(\text{内参基因})$ 。

1.4 统计学方法

qPCR 实验设置 3 个复孔, 使用 SPSS 软件通过 Shapiro-Wilk 检验和 F 检验来检验基因相对表达量的正态分布和方差齐性, 使用 GraphPad Prism 5.0 软件分析数据, 数据表示为平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)。对于符合正态分布和方差齐性的数据, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA followed by Dunnett's test), 对于不符合正太分布的数据使用 Mann-Whitney U 秩和检验。在整个研究中, $P < 0.05$ 被认为有显著差异。

2 结果

2.1 差异表达基因的筛选

根据数据质量检测结果可知, 本次测序的有效性良好, 数据丰富。

差异表达基因火山图 (图 1) 可直观反应总体基因的分布情况, 结果表明幼年期、成年期及老年期小鼠 SVZ 的 NSC 转录组表达水平差异较大。差异基因 Venn 图 (图 2) 用于显示差异基因的重叠区域, 表示各组差异基因之间的关系。幼年期、成年期及老年期小鼠共同拥有的差异基因有 12 个, 分别是 Rgs9、Cd4、Gpr6、Ido1、Gpr88、Adora2a、Sh3rf2、Drd1、Serpina9、Actn2、Penk、Syt15。

如图 3 所示, 与幼年小鼠相比, 成年小鼠中 86 个基因表达上调, 167 个下调。老年小鼠中 213 个

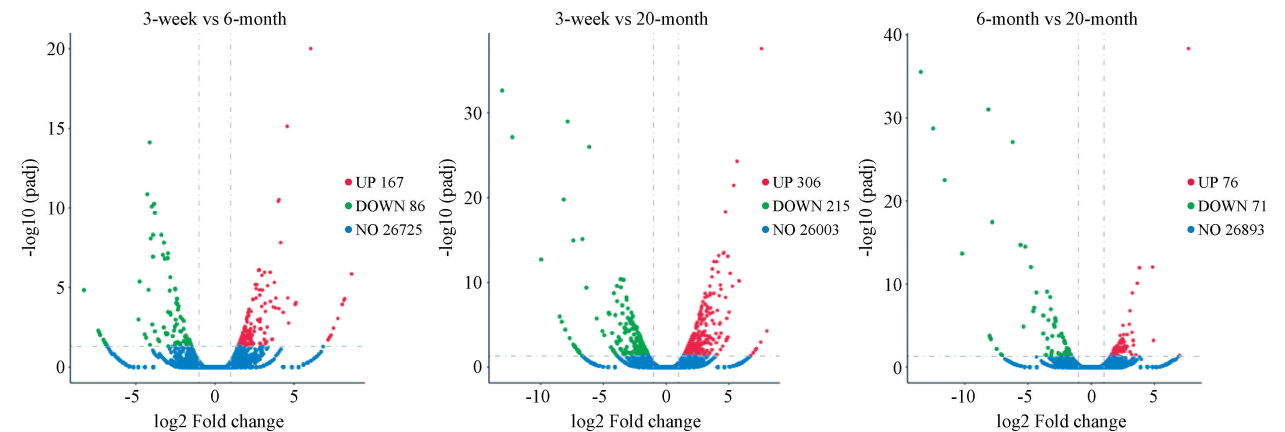


图 1 差异表达基因火山图
Figure 1 Volcano chart of differentially expressed genes

基因表达上调,306 个下调。与成年小鼠相比,老年小鼠中 71 个基因表达上调,76 个下调。与幼年小鼠相比,成年小鼠上调或下调编码蛋白基因前 10 位如表 2 所示,老年小鼠上调或下调编码蛋白基因前 10 位如表 3 所示,与成年小鼠相比,老年小鼠上调

或下调编码蛋白基因前 10 位如表 4 所示。
另外为了验证转录组测序结果的可信度,通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测差异表达基因的表达情况。如图 4 所示,qPCR 检测的几个基因表达情况与转录组测序结果一致。

表 2 下调或上调编码蛋白基因前 10 位(幼年小鼠与成年小鼠相比)
Table 2 The top 10 protein-coding genes (young mice compared with adult mice)

	mID	log2 差异倍数 log2 Fold Change	P 值 P value	基因名称 Gene name	基因描述 Gene description
下调 Down-regulated	ENSMUSG00000000215	-7.04748	0.00012	Ins2	insulin II 胰岛素 II
	ENSMUSG00000045471	-4.75489	4.26E-09	Hert	hypocretin 下丘脑分泌素
	ENSMUSG00000039672	-4.28096	2.10E-15	Kcne2	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 2 钾电压门控通道,Isk 相关亚家族,基因 2
	ENSMUSG00000030450	-4.19418	1.87E-08	Oca2	oculocutaneous albinism II 眼皮肤白化病 II
	ENSMUSG00000061808	-4.12272	8.54E-19	Ttr	transthyretin 甲状腺素
	ENSMUSG00000059887	-4.10486	0.000349	Olfr1507	olfactory receptor 1507 嗅觉受体 1507
	ENSMUSG00000004655	-3.98782	2.48E-14	Aqp1	aquaporin 1 水通道蛋白 1
	ENSMUSG000000025461	-3.9633	6.96E-06	Cd163l1	CD163 molecule-like 1 CD163 分子样 1
	ENSMUSG00000073409	-3.91552	7.36E-11	H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 6 组织相容性 2,Q 区位点 6
	ENSMUSG00000079436	-3.90633	2.02E-12	Kcnj13	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13 钾内向整流通道,亚科 J,成员 13
	ENSMUSG00000095675	8.64371	1.25E-09	Ccl21b	chemokine (C-C motif) ligand 21B (leucine) 趋化因子(C-C 基序)配体 21B(亮氨酸)
	ENSMUSG00000043613	8.06055	2.40E-07	Mmp3	matrix metalloproteinase 3 基质金属肽酶 3
	ENSMUSG00000048922	7.777932	2.40E-06	Cdca2	cell division cycle associated 2 细胞分裂周期相关 2
	ENSMUSG00000040026	7.257243	7.55E-05	Saa3	serum amyloid A 3 血清淀粉样蛋白 A 3
	ENSMUSG00000023940	7.257243	7.55E-05	Sgo1	shugoshin 1 shugoshin 1
上调 Up-regulated	ENSMUSG00000070526	5.127385	1.67E-07	Peg12	paternally expressed 12 父系表达基因 12
	ENSMUSG00000020808	5.076946	2.40E-07	Pimreg	PICALM interacting mitotic regulator PICALM 相互作用的有丝分裂调节剂
	ENSMUSG00000027656	4.610305	7.22E-08	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2 WNT1 诱导型信号通路蛋白 2
	ENSMUSG00000026043	4.57033	5.53E-20	Col3a1	collagen, type III, alpha 1 胶 原蛋白,III 型,α1
	ENSMUSG00000041064	4.317473	9.27E-07	Pif1	PIF1 5'→3' DNA helicase PIF1 5'→3' DNA 解旋酶

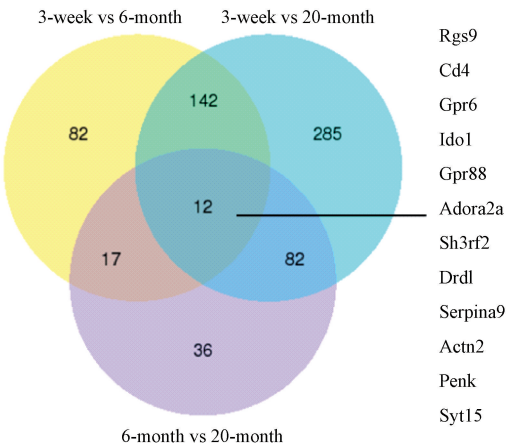


图 2 差异基因表达 Venn 图

Figure 2 Venn chart of differentially expressed genes

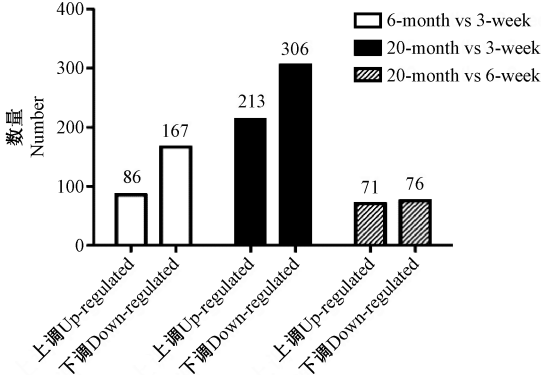


图 3 幼年、成年与老年期小鼠神经干细胞差异表达基因统计
Figure 3 Statistics of differentially expressed genes in young, adult, and old mice

表 3 下调或上调编码蛋白基因前 10 位(幼年小鼠与老年小鼠相比)
Table 3 The top 10 protein-coding genes (young mice compared with old mice)

	mID	log2 差异倍数 log2 Fold Change	P 值 P value	基因名称 Gene name	基因描述 Gene description
下调 Down-regulated	ENSMUSG00000023216	-7.31443	3.05E-05	Epb42	erythrocyte membrane protein band 4.2 红细胞膜蛋白带 4.2
	ENSMUSG00000038357	-7.24091	4.78E-05	Camp	cathelicidin antimicrobial peptide cathelicidin 抗菌肽
	ENSMUSG00000031738	-7.24091	4.78E-05	Irx6	Iroquois related homeobox 6 (Drosophila) 易洛魁相关同源框 6(果蝇)
	ENSMUSG00000029372	-7.08157	0.00012	Ppbbp	pro-platelet basic protein 促血小板基础蛋白
	ENSMUSG00000031286	-6.99477	0.000194	Glt28d2	glycosyltransferase 28 domain containing 2 糖基转移酶 28 结构域含 2
	ENSMUSG00000039264	-6.99477	0.000194	Gimap3	GTPase, IMAP family member 3 GTPase, IMAP 家庭成员 3
	ENSMUSG00000026934	-6.99477	0.000194	Lhx3	LIM homeobox protein 3 LIM 同源框蛋白 3
	ENSMUSG00000044265	-6.69782	0.000858	Olfm5	olfactomedin 5 嗅觉蛋白 5
	ENSMUSG00000051906	-5.08864	2.51E-07	Cd209f	CD209f antigenCD209f 抗原
	ENSMUSG00000026822	-4.53536	1.44E-09	Lcn2	lipocalin 2 脂质运载蛋白 2
上调 Up-regulated	ENSMUSG00000031766	7.114689	0.00012	Slc12a3	solute carrier family 12, member 3 溶质载体家族 12, 成员 3
	ENSMUSG00000031551	5.816808	6.30E-14	Idol	indoleamine 2,3-dioxygenase 1 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1
	ENSMUSG00000068696	5.654506	1.13E-28	Gpr88	G-protein coupled receptor 88 G 蛋白偶联受体 88
	ENSMUSG00000020178	5.383252	9.38E-26	Adora2a	adenosine A2a receptor 腺苷 A2a 受体
	ENSMUSG00000067724	5.285156	3.10E-13	Gbx1	gastrulation brain homeobox 1 原肠胚同源框 1
	ENSMUSG00000058260	5.102706	6.70E-15	Serpina9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 9 丝氨酸(或半胱氨酸)肽酶抑制剂,进化枝 A(α-1 抗蛋白酶,抗胰蛋白酶),成员 9
	ENSMUSG00000023274	4.917906	4.73E-17	Cd4	CD4 antigen CD4 抗原
	ENSMUSG00000031074	4.911373	1.83E-06	Fgf3	fibroblast growth factor 3 成纤维细胞生长因子 3
	ENSMUSG00000059864	4.830582	5.04E-09	Olf1393	olfactory receptor 1393 嗅觉受体 1393
	ENSMUSG00000041064	4.821521839	3.68E-06	Pif1	PIF1 5'→3' DNA helicase PIF1 5'→3' DNA 解旋酶

表 4 下调或上调编码蛋白基因前 10 位(成年小鼠与老年小鼠相比)
Table 4 The top 10 protein-coding genes (adult mice compared with old mice)

	mID	log2 差异倍数 log2 Fold Change	P 值 P value	基因名称 Gene name	基因描述 Gene description
下调 Down- regulated	ENSMUSG00000032496	-7.98817	5.06E-07	Ltf	lactotransferrin 乳运铁蛋白
	ENSMUSG000000095675	-7.93394	7.40E-07	Ccl21b	chemokine (C-C motif) ligand 21B (leucine) 趋化因子(C-C 基序)配体 21B(亮氨酸)
	ENSMUSG00000038357	-7.4836	1.96E-05	Camp	cathelicidin antimicrobial peptide cathelicidin 抗菌肽
	ENSMUSG00000043613	-7.0459	0.000194	Mmp3	matrix metalloproteinase 3 基质金属肽酶 3
	ENSMUSG00000026822	-4.58489	1.53E-10	Lcn2	lipocalin 2 脂质运载蛋白 2
	ENSMUSG00000056054	-4.34105	6.17E-13	S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A) S100 钙结合蛋白 A8(钙粒蛋白 A)
	ENSMUSG00000026043	-3.50118	4.59E-13	Col3a1	collagen, type III, alpha 1 胶原蛋白,III 型,α1
	ENSMUSG00000041616	-3.48056	6.14E-07	Nppa	natriuretic peptide type A 利尿钠肽 A 型
	ENSMUSG00000056071	-3.38484	2.01E-09	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) S100 钙结合蛋白 A9(钙粒蛋白 B)
	ENSMUSG00000024529	-2.94366	8.20E-09	Lox	lysyl oxidase 赖氨酰氧化酶
	ENSMUSG00000025461	4.92598	1.16E-06	Cd163l1	CD163 molecule-like 1 CD163 分子样 1
	ENSMUSG00000027301	4.847435	4.16E-16	Oxt	oxytocin 催产素
	ENSMUSG00000068696	3.812913	5.35E-16	Gpr88	G-protein coupled receptor 88 G 蛋白偶联受体 88
	ENSMUSG00000020178	3.643911	4.14E-14	Adora2a	adenosine A2a receptor 腺苷 A2a 受体
	ENSMUSG00000031551	3.5515	0.000155	Ido1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1
上调 Up-regulated	ENSMUSG00000058260	3.33499	1.17E-06	Serpina9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 9 丝氨酸(或半胱氨酸)肽酶抑制剂,进化枝 A (α-1 抗蛋白酶,抗胰蛋白酶),成员 9
	ENSMUSG00000045573	3.25711	7.54E-13	Penk	preproenkephalin 前脑啡肽原
	ENSMUSG00000019772	3.23623	7.89E-08	Vip	vasoactive intestinal polypeptide 血管活性肠多肽
	ENSMUSG00000019936	3.193827	0.000138	Epyc	epiphycan epiphycan
	ENSMUSG000000096225	3.065929	5.36E-05	Lhx8	LIM homeobox protein 8 LIM 同源框蛋白 8

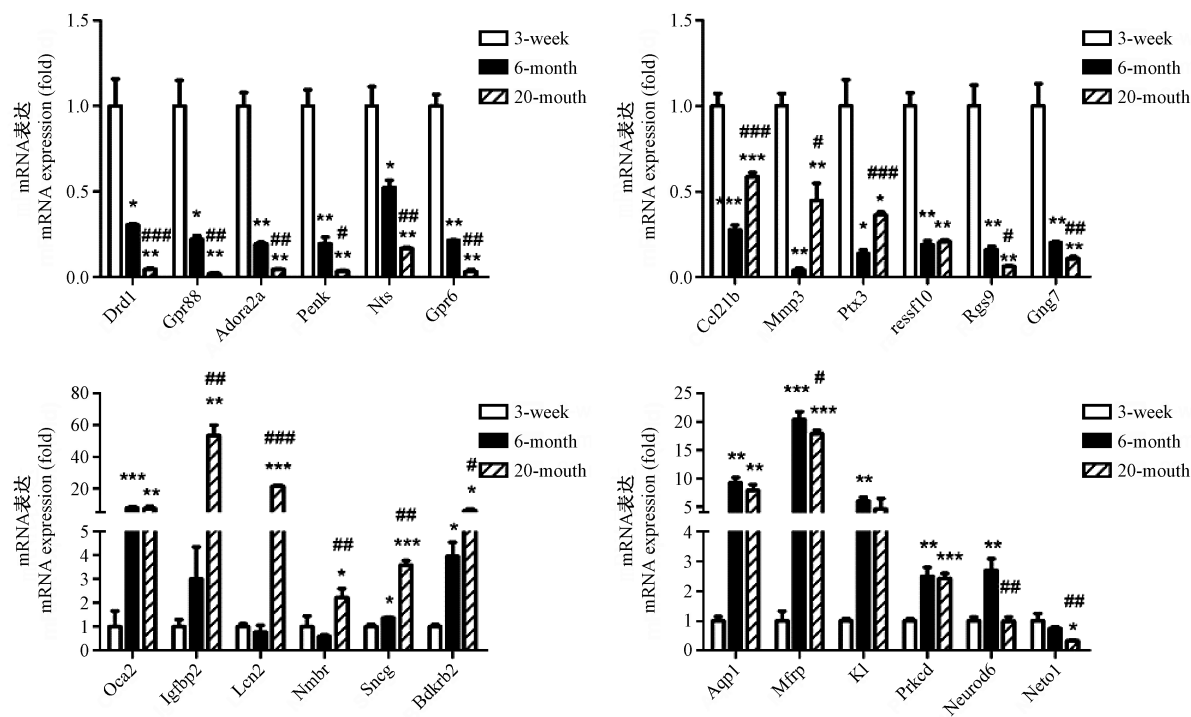
2.2 GO 分析

利用 clusterProfiler R 软件对差异基因进行 GO 分析(图 5),结果可分为生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、和分子功能(molecular function, MF)3 个大类。对各类中涉及差异表达基因差异较显著的前 5 位生物学功能进行分析,成年期小鼠 SVZ 与幼年期相比,在生物过程中差异表达基因主要涉及对维生素及盐胁迫的反应、调节体液水平和调节腺苷酸环化酶活性等;在细胞组分中,差异表达基因主要涉及细胞外基质;在分子功能中,差异表达基因主要涉及生长因子结合、蛋白酶结合、激素活动与药物结合。老年期小鼠 SVZ 与幼年期相比,在生物过程中差异表达基因主要涉及单一生物行为、中枢神经系统神经元分化与生成、循环系统过程等;在细胞组分中,差异表达基因主要涉及神经元投射;在分子功能

中,差异表达基因主要涉及 G 蛋白偶联受体活性、胺结合、血清素结合等。老年期小鼠 SVZ 与成年期相比,在生物过程中差异表达基因主要涉及单一生物行为、神经元分化与生成、运动行为等;在细胞组分中,差异表达基因主要涉及神经元投射;在分子功能中,差异表达基因主要涉及神经肽激素活性、激素活动、神经递质受体活性等。

2.3 KEGG 分析

利用 clusterProfiler R 软件对差异基因进行 KEGG 通路分析(图 6)。成年期与幼年期小鼠的 SVZ 比较,差异表达基因涉及蛋白质消化吸收的信号通路。老年期与幼年期小鼠的 SVZ 比较,涉及信号通路较多,包括神经活性配体-受体相互作用、cAMP 信号通路、吗啡成瘾、多巴胺能突触、胆碱能突触、GABA 能突触等。老年期与成年期小鼠的 SVZ 比较,涉及神经活性配体-受体相互作用和 GABA 能突触。



注:使用 qPCR 检测小鼠 SVZ 的 mRNA 表达,并使用内参基因 β -actin 进行标准化,以 3-week 表达量为对照计算小鼠 SVZ 的 mRNA 不同时期表达量。数据表示为平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n \geq 3$),使用单因素方差分析 (Dunnnett's test) 或 Mann-Whitney U 秩和检验进行统计。与 3 周龄组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 6 月龄相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 4 差异基因表达 qPCR 验证

Note. mRNA levels of mouse SVZ were analyzed by qPCR and normalized to that of β -actin, and are expressed as the fold difference relative to the 3-week group. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n \geq 3$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Dunnnett's test or Mann-Whitney U-test. Compared with the 3-week group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the 6-month group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 4 qPCR verification of differentially expressed genes

3 讨论

3.1 RNA-Seq 可靠性分析

RNA-Seq 是较为成熟的一种使用深度测序技术的转录组分析方法。与其他方法相比, RNA-Seq 可以更精确快速的获取待测样品大量的转录本信息,为研究基因表达提供了更加方便快捷的途径^[18]。本研究通过 Illumina 测序平台分析检测小鼠幼年期、成年期和老年期 SVZ 的 cDNA 文库,获得小鼠 SVZ 在不同时期基因表达的增龄化改变。结果表明(表 5),选择的实验材料测序质量好, Q20 比例均在 97% 以上, Q30 比例均在 93% 以上;在小鼠幼年、成年和老年期 SVZ 分别检测到 55983268、73094774 和 53309824 个有效的 reads,对比效率为 95.37%、95.62% 和 95.04%,显示比对效率较好,测序质量高(表 6)。

3.2 基因差异表达分析

SVZ 及位于其中的 NSCs 对于成年期大脑的神

经元产生十分重要,有助于大脑的可塑性,记忆,学习及修复。研究表明,位于 SVZ 的 NSCs 出现增龄性改变,老年小鼠(28 月龄)的 SVZ 与年轻小鼠(2 月龄)相比,厚度明显变薄,老年小鼠 NSCs 的增殖水平下降,衰老与活性氧水平升高^[15]。本研究对小鼠幼年、成年和老年期 SVZ 的 cDNA 文库进行分析,幼年与成年期或老年期小鼠对比,共检测到 253 个及 519 个差异表达的基因;成年与老年期小鼠对比,共检测到 147 个差异表达的基因。意料之中的是,由于小鼠从幼年到老年发育时间跨度较长,差异表达的基因数目最多。小鼠作为经典的模式生物,参考基因在比对数据库中较为全面,本研究选用小鼠作为研究对象,差异表达基因被注释的比例在 GO 与 KEGG 功能分类中比其他物种更高。老年与幼年期小鼠对比,差异表达基因数量和 KEGG 通路中差异表达基因的富集较成年与幼年期小鼠对比、老年与成年期小鼠对比更多,可能是由于时间跨度较其他两种更大。

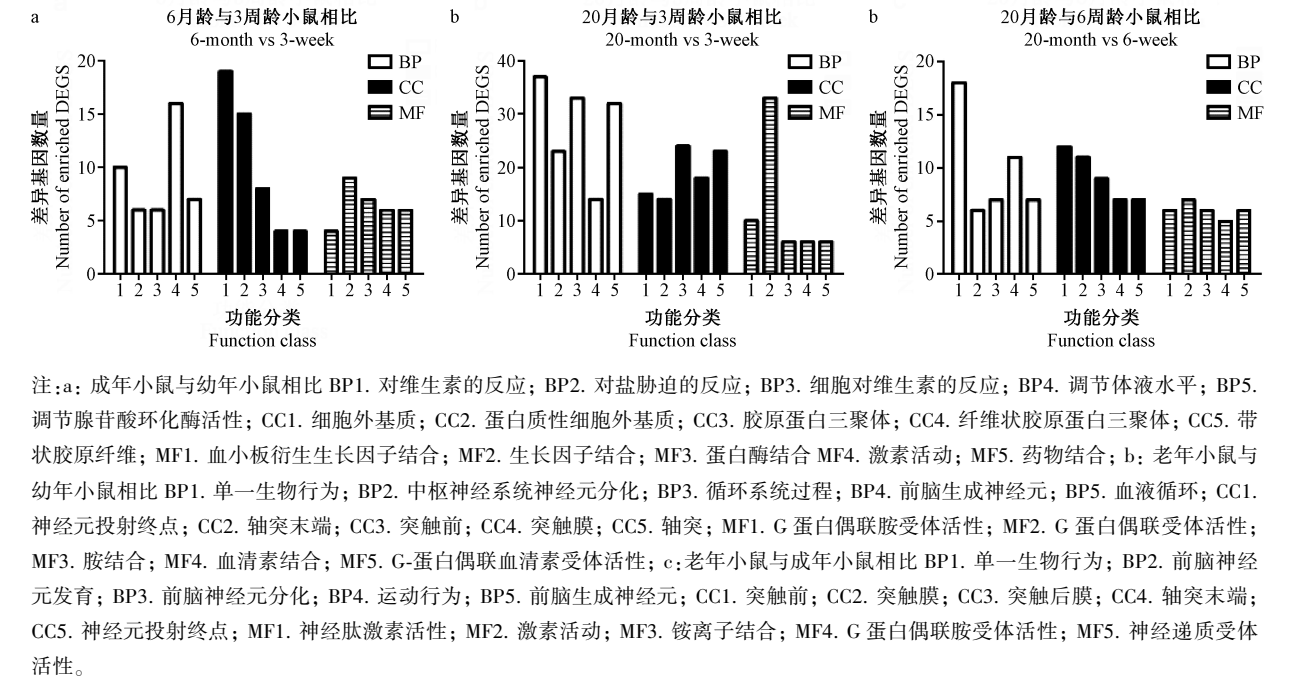


图 5 GO 功能分类

Note. a: adult mice compared to young mice: BP1. response to vitamin; BP2. response to salt stress; BP3. cellular response to vitamin; BP4. regulation of body fluid levels; BP5. regulation of adenylate cyclase activity; CC1. extracellular matrix; CC2. proteinaceous extracellular matrix; CC3. collagen trimer; CC4. fibrillar collagen trimer; CC5. banded collagen fibril; MF1. platelet-derived growth factor binding; MF2. growth factor binding; MF3. protease binding; MF4. hormone activity; MF5. drug binding. b: old mice compared with young mice: BP1. single-organism behavior; BP2. central nervous system neuron differentiation; BP3. circulatory system process; BP4. forebrain generation of neurons; BP5. blood circulation; CC1. neuron projection terminus; CC2. axon terminus; CC3. presynapse; CC4. synaptic membrane; CC5. axon; MF1. G-protein-coupled amine receptor activity; MF2. G-protein-coupled receptor activity; MF3. amine binding; MF4. serotonin binding; MF5. G-protein-coupled serotonin receptor activity; c: old mice compared with adult mice: BP1. single-organism behavior; BP2. forebrain neuron development; BP3. forebrain neuron differentiation; BP4. locomotory behavior; BP5. forebrain generation of neurons; CC1. presynapse; CC2. synaptic membrane; CC3. postsynaptic membrane; CC4. axon terminus; CC5. neuron projection terminus; MF1. neuropeptide hormone activity; MF2. hormone activity; MF3. ammonium ion binding; MF4. G-protein-coupled amine receptor activity; MF5. neurotransmitter receptor activity.

Figure 5 GO function classification

表 5 NSCs 转录组测序数据评价分析

Table 5 Evaluation of transcriptome sequencing data of NSCs							
样本 Sample	原始数据 Raw reads	过滤数据 Clean reads	过滤碱基 Clean bases	错误率 Error rate	Q ₂₀ 比例 Q ₂₀ /%	Q ₃₀ 比例 Q ₃₀ /%	GC 含量 GC/%
3-week	28690195	27991634	8. 4G	0. 03	97. 55	93. 59	49. 33
6-month	37039491	36547387	10. 96G	0. 03	97. 48	93. 37	49. 32
20-month	27405977	26654912	8. 0G	0. 03	97. 39	93. 27	49. 66

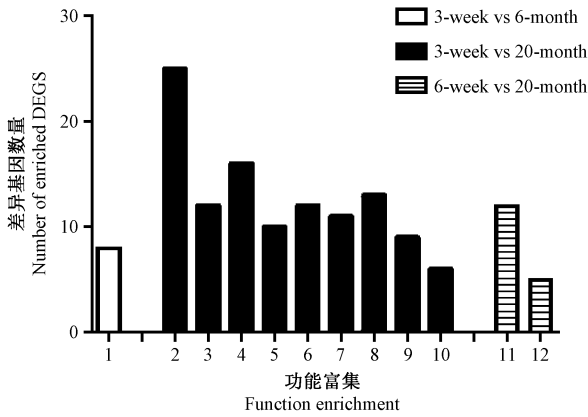
表 6 NSCs 转录组测序数据比对结果基本统计

Table 6 Basic statistics of transcriptome sequencing data of NSCs					
样本 Sample	比对序列数 Total reads	参考基因比对有效数(比例) Total map(%)	多位点比对数(比例) Multi map(%)	单位点比对数(比例) Unique map(%)	双末端同时比对数(比例) Prope map(%)
3-week	55983268	53389002(95. 37%)	3368117(6. 02%)	50020885(89. 35%)	48087782(85. 9%)
6-month	73094774	69894485(95. 62%)	3784186(5. 18%)	66110299(90. 44%)	63528976(86. 91%)
20-month	53309824	50667098(95. 04%)	2723114(5. 11%)	47943984(89. 93%)	46058652(86. 4%)

3.3 差异表达基因的功能分析

在 GO 分析中发现,在生物过程与细胞组分中,幼年期与成年期小鼠 SVZ 的差异基因多涉及离子

代谢和细胞外基质,而老年期小鼠 SVZ 与幼年期和成年期相比,主要涉及神经生成分化与神经投射等。这可能说明了幼年与成年小鼠 SVZ 在神经生



注:1. 蛋白质消化吸收;2. 神经活性配体 - 受体相互作用;3. 含血清素的突触;4. cAMP 信号通路;5. 吗啡成瘾;6. 多巴胺能突触;7. 胆碱能突触;8. 酗酒;9. GABA 能突触;10. I 型糖尿病;11. 神经活性配体 - 受体相互作用;12. GABA 能突触。

图 6 差异表达基因 KEGG 通路分析

Note. 1. protein digestion and absorption; 2. neuroactive ligand-receptor interaction; 3. serotonergic synapse; 4. cAMP signaling pathway; 5. morphine addiction; 6. dopaminergic synapse; 7. cholinergic synapse; 8. alcoholism; 9. GABAergic synapse; 10. type I diabetes mellitus; 11. neuroactive ligand-receptor interaction; 12. GABAergic synapse.

Figure 6 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes

成分化水平上并无明显差别,而老年期小鼠 SVZ 中 NSC 增殖水平下降,发生增龄性改变。根据测序结果在成年期比幼年期与神经分化或迁移相关的蛋白,如 *Drd1* 和 *Drd2* 等,发生了少量降低,而在老年期,这些基因的表达发生了剧烈下降。在分子功能中,这三个年龄段的小鼠均涉及到了激素与神经递质的变化。以 G 蛋白偶联受体活性相关基因为例,其中部分基因(如 *Gpr88* 与 *Adora2a* 等)随年龄增加表达逐渐下降,而部分基因(如 *Oprd1*、*Htr1a* 等)只在老年阶段发生下降,这些只在老年阶段表达发生改变的基因,可能与衰老过程密切相关。

由测序及 qPCR 结果发现,部分基因的表达未随年龄增长而升高或下降,而是只在成年阶段升高或降低。如神经元分化因子(neuronal differentiation 6, *Neurod6*),仅在成年时期表达升高。*Neurod6* 是一种脑特异性碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子,是正在发育的 CNS 中神经前体细胞的分化因子^[19],研究表明,*Neurod6* 在大脑皮层,海马和小脑的成熟成体神经元中大量表达^[20],位于 SVZ 表达 *Neurod6* 的祖细胞具有在上皮质层(upper cortical layers)中分化成锥体谷氨酸能

神经元的能力^[21],并且 *Neurod6* 可以调节神经投射的正确形成^[19]。另外,*Neurod6* 作为 ROS 稳态调节剂的新作用,导致对氧化应激的耐受性增强。有研究表明,通过转录组测序发现,在阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease, AD)患者脑中不同部位,*Neurod6* 的表达一致下调^[22]。本研究在幼年期、成年期和老年期均检测到 *Neurod6* 的表达,且老年小鼠 SVZ 中 *Neurod6* 表达水平低于成年小鼠,这可能是由于神经凋亡,对氧化应激的耐受性降低,且可能有 AD 病变倾向,但尚未有研究表明幼年期小鼠 SVZ 中 *Neurod6* 表达水平低于成年小鼠。基质金属蛋白酶 3(matrix metalloproteinase-3, MMP3)与趋化因子 CCL21b(chemokine (C-C motif) ligand 21B (leucine), CCL21b)在 GO 分类细胞组分中都属于细胞外基质相关基因,且两者都在成年期剧烈降低,CCL21b 是体外淋巴细胞和树突状细胞的有效化学引诱物^[23],但目前与神经相关的研究极少。MMP3 在细胞外基质的降解过程中发挥了重要作用^[24],目前,对于 CCL21b 和 MMP3 的研究多几种在炎症与肿瘤相关疾病。有研究表明,MMP3 的表达升高会破坏神经元之间的紧密连接,并且消除神经相关蛋白如 DJ-1 对氧化损伤的保护作用,从而导致了神经退行性疾病。

3.4 结论

本研究对幼年期、中年期和老年期小鼠 SVZ 进行 RNA-seq,检测小鼠 SVZ 基因表达差异和相关信号通路的增龄性改变。该研究为丰富小鼠不同年龄段 SVZ 转录组信息提供了数据,为探讨 SVZ 的功能发育和退化,进一步治疗和抵抗神经衰老提供新的理论依据和方法。

参考文献:

[1] Doetsch F, Caillé I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain[J]. Cell, 1999, 97(6): 703-716.

[2] Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment[J]. Nature, 1997, 386(6624): 493-5.

[3] Gage HF. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287(5457): 1433.

[4] Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain[J]. Neuron, 2004, 41(5): 683-686.

[5] Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, et al. Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche[J]. Neuron, 2014, 82(3): 545

- 559.
- [6] Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(15): 6387-6392.
- [7] Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(25): 14895-14900.
- [8] Lois C, García-Verdugo J-M, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors [J]. *Science*, 1996, 271(5251): 978-981.
- [9] Luo J, Daniels SB, Lenington JB, et al. The aging neurogenic subventricular zone[J]. *Aging Cell*, 2006, 5(2): 139-152.
- [10] Shook BA, Manz DH, Peters JJ, et al. Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(20): 6947.
- [11] Daynac M, Pineda JR, Chicheportiche A, et al. TGFβ lengthens the G1 phase of stem cells in aged mouse brain[J]. *Stem Cells*, 2015, 32(12): 3257-3265.
- [12] Daynac M, Morizur L, Chicheportiche A, et al. Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 21505.
- [13] Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, et al. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair [J]. *Brain*, 2015, 138(Pt 5): 1138-1159.
- [14] Solano FR, Mahesula S, Apple D, et al. Neurogenic niche microglia undergo positional remodeling and progressive activation contributing to age-associated reductions in neurogenesis [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(7): 542-555.
- [15] 董传明, 金国华. 自然衰老小鼠室管膜下区神经干细胞增殖性改变[J]. *解剖学报*, 2016, 47(5): 577-582.
- [16] 汪建民, 袁群芳, 姚志彬. 大鼠室管膜下区和齿状回神经前体细胞增殖的衰老性变化[J]. *神经解剖学杂志*, 2002, 18(1): 17-20.
- [17] Shuboni-Mulligan DD, Chakravarty S, Mallett CL, et al. In vivo serial MRI of age-dependent neural progenitor cell migration in the rat brain[J]. *Neuroimage*, 2019, 199:153-159.
- [18] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2009,10(1): 57-63.
- [19] Bormuth I, Yan K, Yonemasu T, et al. Neuronal basic helix-loop-helix proteins neurod2/6 regulate cortical commissure formation before midline interactions[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(2): 641-651.
- [20] Bartholomä A, Nave KA. NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons[J]. *Mech Dev*, 1994, 48(3): 217-28.
- [21] Wu SX, Goebbels S, Nakamura K, et al. Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(47): 17172-17177.
- [22] Satoh J, Yamamoto Y, Asahina N, et al. RNA-Seq data mining: downregulation of neurod6 serves as a possible biomarker for alzheimer's disease brains [J]. *Dis Markers*, 2014, 2014:123165.
- [23] Chen SC, Vassileva G, Kinsley D, et al. Ectopic expression of the murine chemokines CCL21a and CCL21b induces the formation of lymph node-like structures in pancreas, but not skin, of transgenic mice[J]. *J Immunol*, 2002, 168(3): 1001-1008.
- [24] 胡涂, 曾乐平, 黄菊芳. MMP3 生物学特性与神经系统疾病相关的研究进展[J]. *中国科技论文在线*, 2013, <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201307-254>.

[收稿日期] 2019-08-23