

于志君,袁琼,金志刚,等. 基于 RIP-Seq 技术检测 MRTF-A 结合 RNA 在小鼠 MCAO/R 模型中表达[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 765-772.

Yu ZJ, Yuan Q, Jin ZG, et al. Detection of MRTF-A-binding gene expression in the MCAO/R mouse model via RIP-Seq [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 765-772.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.005

基于 RIP-Seq 技术检测 MRTF-A 结合 RNA 在小鼠 MCAO/R 模型中表达

于志君¹,袁琼¹,金志刚²,向梓非¹,龙萍²,朱明²,杨越旺³,胡霞敏^{3*}

(1. 武汉科技大学医学院,新药创制研究所,职业危害识别与控制湖北省重点实验室,武汉 430065;
2. 华润武钢总医院,武汉 430080; 3. 上海健康医学院,上海 200030)

【摘要】 目的 应用 RIP-Seq 测序技术检测小鼠 MCAO/R 模型中心肌素相关转录因子 A (MRTF-A) 结合 RNA 的表达差异,探讨 MRTF-A 潜在的作用机制。方法 将 C57BL/6 小鼠随机分成假手术组及 I/R 组,线栓法构建 MCAO 模型,再灌注 24 h 后,提取脑组织总蛋白,利用 MRTF-A 抗体免疫共沉淀后,进行 RNA 高通量测序,获得 MRTF-A 结合 RNA 的表达谱,继而对差异 RNA 进行 GO、KEGG 分析。结果 与假手术组相比,I/R 组有 429 个 RNA 发生差异表达(上调 203,下调 226),并且在功能元件和染色体分布上均具有显著差异。GO 分子功能分析显示,差异表达 RNA 主要富集 RNA 结合、Poly(A)RNA 结合等注释。KEGG 通路分析显示 10 条通路被显著富集,其中雌激素信号通路富集最显著。结论 在脑 I/R 损伤时 MRTF-A 结合 RNA 表达谱发生差异改变,为深入探讨 MRTF-A 的分子机制提供理论依据。

【关键词】 心肌素相关转录因子 A;RNA 结合蛋白免疫共沉淀-高通量测序;脑缺血再灌注损伤;差异基因分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0765-08

Detection of MRTF-A-binding gene expression in the MCAO/R mouse model via RIP-Seq

YU Zhijun¹, YUAN Qiong¹, JIN Zhigang², XIANG Zifei¹, LONG Ping², ZHU Ming², YANG Yuewang³, HU Xiamin^{3*}

(1. Institute of Pharmaceutical Innovation, Hubei Provincial Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China. 2. China Resources & WISCO General Hospital, Wuhan 430080.
3. Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 200030)

Corresponding author: HU Xiamin. E-mail: huxm@sumhs.edu.cn

【Abstract】 Objective To detect the expression of RNA-bound myocardin-related transcription factor A (MRTF-A)-binding genes using RIP-Seq technology in a mouse middle cerebral artery occlusion (MCAO)/reperfusion model and explore the potential mechanism of action of MRTF-A. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into the sham and cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury groups. The model of focal MCAO was constructed using the suture method. After 24 h of reperfusion, total brain tissue protein was extracted. Furthermore, the expression profile of MRTF-A-binding genes was detected using immunoprecipitation plus high-throughput sequencing. Additionally, the differentially expressed

【基金项目】国家自然科学基金(81770377),湖北省自然科学基金杰出青年基金(2020CFA076),湖北省卫生计生委科研项目(WJ2019H164). Funded by National Natural Science Foundation of China(81770377), Hubei Province Funds for Distinguished Young Scholars(2020CFA076), Scientific Research Project of Hubei Provincial Health Commission(WJ2019H164).

【作者简介】于志君(1978—),女,在读博士研究生,研究方向:脑缺血再灌注损伤分子机制研究。Email:yuzhijun@wust.edu.cn

【通信作者】胡霞敏(1965—),女,教授,博士生导师,研究方向:脑缺血再灌注损伤分子机制研究。Email:huxm@sumhs.edu.cn

genes were analyzed using GO and KEGG. **Results** Compared with the findings in the sham group, 429 genes were differentially expressed (203 upregulated and 226 downregulated genes) in the cerebral I/R group. GO molecular function analysis revealed that the differentially expressed genes were mainly enriched in RNA binding and Poly(A) RNA binding. KEGG pathway analysis illustrated that 10 pathways were significantly enriched, among which the estrogen signaling pathway was most enriched. **Conclusions** The expression profile of MRTF-A-binding genes was significantly altered by cerebral I/R injury, which provides a theoretical basis for in-depth exploration of the molecular mechanism of MRTF-A.

[Keywords] myocardin-related transcription factor A; RNA-binding protein immunoprecipitation-high throughput sequencing; cerebral ischemia/reperfusion injury; differential gene analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心肌素相关转录因子 A (myocardin-related transcription factor-A, MRTF-A) 是血清反应因子 (serum response factor, SRF) 的转录共激活因子, 广泛存在于大脑皮层、心脏、血管、胚胎及肿瘤组织中, 参与包括阿尔茨海默病^[1]、心脏缺血再灌注损伤^[2]、动脉粥样硬化^[3]、恶性肿瘤^[4]等在内的多种病理生理过程。研究发现, MRTF-A 主要定位于胞质, 可通过与肌动蛋白结合与解离在细胞质和细胞核之间穿梭。外界刺激 (如缺血、缺氧等) 可引起胞质内 G-肌动蛋白与 MRTF-A 解离, 促进 MRTF-A 由胞质转移至胞核, 入核的 MRTF-A 与 SRF 形成复合物后, 结合靶基因启动子上的 CC [A/T]6GG DNA 序列, 又称 CArG 盒, 引起靶基因的转录激活, 参与细胞增殖、分化、凋亡及信号转导等过程^[5], 从而对外界刺激产生快速基因反应。杨辉等^[6] 研究发现, 在心肌缺血再灌注损伤时, 上调心肌中 MRTF-A 表达, 可促进 Bcl-2、Mcl-1 表达, 抑制 Bax 表达, 缩小心肌梗死面积, 抑制心肌细胞凋亡, 发挥心肌保护功能。本课题组前期研究也证实, 在脑缺血再灌注 (ischemic/reperfusion, I/R) 诱导的大鼠模型及氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导的细胞模型中, MRTF-A 可通过 SRF/CArG 途径激活抗凋亡基因 Mcl-1、Bcl-2 转录发挥重要的神经保护作用^[7]。

目前, 关于 MRTF-A 机制的研究均基于对转录水平的调节, 其可否通过结合 RNA 发挥其他生物功能目前尚不清楚。因此, 为了深入了解 MRTF-A 在脑 I/R 损伤中的分子功能, 本研究利用 RIP-Seq 技术对小鼠 MCAO/R 模型中 MRTF-A 结合 RNA 的表达谱进行深度测序, 以挖掘差异基因, 继而通过生物信息方法在分子功能、信号通路等方面进行探讨, 为下一步实验研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只 6~8 周龄 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 20~25 g, 购自湖北省实验动物研究中心【SCXK(鄂)2015-0018】。小鼠饲养于武汉科技大学实验动物中心【SYXK(鄂)2018-0045】。饲养期间小鼠自由进食、饮水。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度在 22~25℃。实验前将小鼠随机分为假手术组及 I/R 组 ($n=9$), 进行 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 染色、RNA 结合蛋白免疫沉淀-高通量测序 (RNA immunoprecipitation, RIP-Seq) 及测序结果验证 ($n=3$)。所有操作均符合武汉科技大学实验动物伦理学要求 (审批号: 201849)。

1.1.2 主要试剂与仪器

线栓购于广州佳灵生物有限公司; RIP 试剂盒、IgG 抗体购自 Millipore 公司; MRTF-A 抗体购自 CST 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠二抗购自 Santa Cruz 公司; 酚: 氯仿: 异戊醇 = 125:24:1 (pH = 4.3), 购自索莱宝科技有限公司。

体式显微镜 (Motic SMZ-140, 麦克奥迪实业集团有限公司); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rid CFX96, 美国伯乐); 旋转混匀器 (SilentShake, 美国 CRYSTAL); 恒温摇床 (KYC-100B, 上海福玛实验设备有限公司); 测序仪器 (Hiseq 2500, 美国 Illumina 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 MCAO 模型的建立

参照改良的 Longa 法^[8] 制备小鼠右侧局灶性 MCAO 模型。术前小鼠禁食 8~10 h, 自由饮水。腹腔麻醉, 仰卧固定于 37℃ 恒温手术台上。消毒颈部皮肤, 体式显微镜下暴露右侧颈部总动脉 (common

carotid arter, CCA), 颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。结扎 ECA 远心端后, 切开 ECA, 插入线栓, 使线栓经由 CCA、ICA 后入颅, 直至大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA), 插入深度约 0.8~1 cm。待缺血 1 h 后缓慢拔出线栓实现再灌注, 24 h 后处死小鼠, 取样。假手术组只暴露相关血管而不插入线栓。

1.2.2 神经功能学评分

动物麻醉清醒后, 采用 Longa's 5 分法进行评分。0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能伸展左侧前爪; 2 分: 提尾向左侧转; 3 分: 向左侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。剔除 0 分及 4 分, 选取 1~3 分的小鼠进行 RIP-Seq。

1.2.3 TTC 染色

再灌注 24 h 后, 每组随机选取 3 只小鼠, 断头取脑进行梗死体积检测。新鲜脑组织-80℃速冻 3 min 后取出, 以 2 mm 厚度做冠状切片, 随后浸泡于 1% TTC 磷酸盐缓冲液中, 37℃避光孵育 15 min, 期间将脑片上下翻转至少 1 次, 使之染色均匀。TTC 染剂可将正常脑组织染为深红色, 梗死区脑组织染为白色。最后将脑片浸泡于 4% 多聚甲醛中, 4℃固定过夜, 拍片, 计算脑梗死体积百分比。脑梗死体积百分比利用 Image J 图像分析软件对梗死体积进行量化, 首先计算每片脑组织的梗死体积, 每片脑片梗死体积=梗死面积 × 切片厚度, 再求和算出总梗死体积, 脑梗死体积百分比=总梗死体积/全脑体积 × 100%。

1.2.4 RIP 实验

RIP 实验所有试剂均需无酶处理。再灌注 24 h 后取患侧大脑半球组织(梗死区及非梗死区), 用预冷的 PBS 冲洗匀浆, 制成单细胞悬液。4℃, 1500 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加入等体积裂解液冰

上裂解 5 min, -80℃保存备用。RIP 实验具体操作按照 Millipore 公司 RIP 试剂盒操作说明进行。即每组 50 μL 磁珠中, 加入 MRTF-A/IgG 抗体 5 μg, 室温孵育 1 h, 获得磁珠抗体复合物。洗涤磁珠, 900 μL RIP 免疫共沉淀缓冲液中加入 100 μL 脑组织裂解液, 4℃孵育过夜, 蛋白酶 K 消化后酚:氯仿:异戊醇=125:24:1 (pH=4.3) 提取 RNA, 待质检合格后进行高通量测序, 验证样本则用于差异 RNA 表达 qRT-PCR 检测。

1.2.5 RNA 高通量测序

样本(Sham MRTF-A- RIP 组及 I/R MRTF-A- RIP 组)委托广州市锐博生物科技有限公司, 采用 Illumina HiSeq TM2500 测序方式进行。

1.2.6 测序数据分析

Illumina HiSeq TM2500 测序所得 50 nt 序列(reads), 通过初步过滤, 得到干净序列。利用 TopHat (v2.0.13) 软件将其与参考基因组比对, 挑选出比对 reads 进行全基因组分布、结合峰(Peak)检测、注释及相关统计分析, 最后获得差异 Peaks, 并对差异基因进行 GO 和 KEGG 分析。基因表达采用 RPKM 法估算, 用 Zscore 值表示某 Peak 在成对样本中的差异程度, 以 |Zscore| > 2 作为 RNA 差异性表达的筛选条件。

1.2.7 qRT-PCR 验证基因表达

使用 Thermo Scientific 逆转录试剂对 RIP 纯化后的 RNA 样品进行逆转录, 逆转录条件为: 42℃ 60 min, 70℃ 10 min, 4℃, 终止反应。qRT-PCR 按照 Yeasen 试剂盒说明书进行扩增, 反应条件为: 95℃, 2 min; 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共 40 个循环, 反应结束后对所得数据进行处理, 按 2^{-ΔΔCt}法计算基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward Primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse Primer(5'-3')
Gm33780	TTGTCTCACTTCGCTTCTCTGC	TCCAATGCTCAAACCTCTGCT
Gm3871	TCCAGTTCTCTCAGGCATTGT	TGAGGGGAAATGGAACACCG
Hic2	ACTGGTTGACCCGTCGGTTC	CTGATGAGGTTGCGCTGTGG
Malat1	GAGATGAGTGGGATCGAGCG	GAAACCTGTCTGAGGCAAACG
Hsp90b1	ACACTAGCTCGTGGAAACAACA	GCTACTCCACACGTAGATGGG
Hspa8	CCAGCCTGGTGTACTGATTCA	ATGCCTGTGAGCTCGAACTTT
Calm1	CGCCACGTCATGACAAACTT	TTGACTTGTCCGTCGCCATC

1.3 统计学分析

芯片数据由广州锐博生物科技有限公司分析,以 $P < 0.05$ 为显著阈值。实验数据利用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析,结果用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两两比较采用 Wilcoxon 秩检验(等级资料)或独立样本 t 检验(计量资料), $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

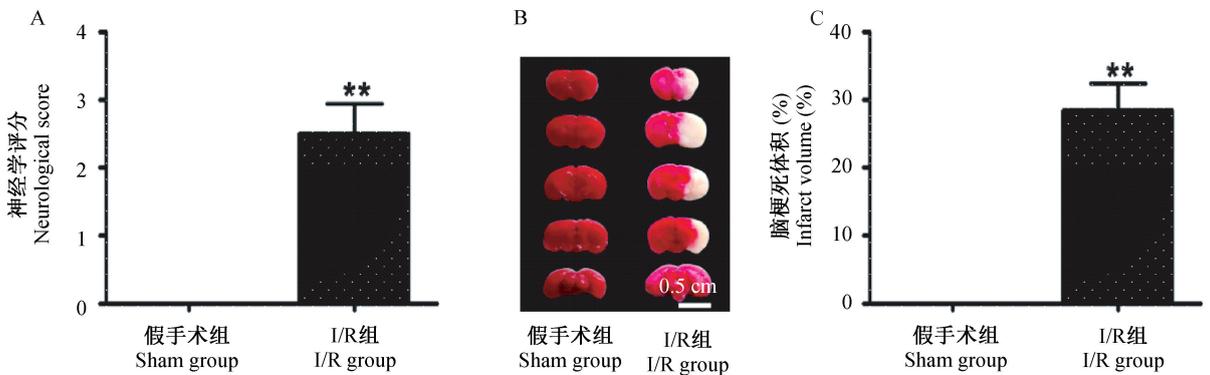
2.1 成功构建小鼠脑 I/R 模型

小鼠 MCAO 模型成功构建是本实验的关键,因此我们采用神经功能缺陷评分和 TTC 染色对脑损伤程度进行评估,以确保测序样本符合脑 I/R 损伤。结果显示,I/R 组均出现不同程度的神经损伤症状,评分为 2.5 ± 1.0 ,而假手术组无神经损伤症状(图

1A)。每组随机选取 3 只小鼠行 TTC 染色,结果如图 1B 所示,假手术组脑组织染色正常,而 I/R 组呈现不同程度的梗死灶,梗死体积百分比为 $(28.42 \pm 7.73)\%$ (图 1C),以上结果提示,小鼠脑 I/R 模型构建成功。

2.2 MRTF-A 结合 RNA 差异表达

本研究以 $|Zscore| > 2$ 作为筛选条件,共获得 429 个 RNA 差异结合峰,其中上调 203 个,下调 226 个;通过对 RNA 类型分析发现 mRNA 384 个,ncRNA 45 个,其中长链非编码 RNA (lncRNA) 24 个。表 2 显示变化最显著的 10 个结合峰,具体为 Gm33780、LOC105245688、Gm3871、Rpph1、Hic2、Olfir856-ps1、Gm32291、Jarid2、Gm10845、Malat1,其中 lncRNA 有 7 个,可见 lncRNA 在 MRTF-A 参与的脑 I/R 损伤中可能发挥重要作用。



注:A:神经学评分;B:脑组织 TTC 染色;C:脑梗死体积百分比。与假手术组相比,** $P < 0.01$ 。

图 1 成功构建小鼠脑 I/R 模型

Note. A. Neurological score. B. TTC staining. C. Percentage of cerebral infarction volume. Compared with sham group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Successful construction of mice cerebral I/R injury model

表 2 10 个最显著 RNA 差异结合峰

Table 2 Ten most significant RNAs differential binding peaks

结合峰编号 Peak ID	起点 Start	终点 End	基因名 Gene	变化倍数 Zscore	RNA 类型 RNA type
Merged-chr2-98666801-1	98666701	98667901	Gm33780	24.51	lncRNA
Merged-chr14-19416076-1	19415976	19416176	LOC105245688	15.64	lncRNA
Merged-chr10-110009971-1	110009871	110010071	Gm3871	14.07	lncRNA
Merged-chr14-50807611-1	50807511	50807711	Rpph1	12.83	RNase_P
Merged-chr16-17222253-1	17222153	17222353	Hic2	12.42	mRNA
Merged-chr9-19657951-1	19657851	19658051	Olfir856-ps1	12.33	lncRNA
Merged-chr18-85698301-1	85698201	85698401	Gm32291	10.54	lncRNA
Merged-chr13-44869478-1	44869378	44869578	Jarid2	10.43	mRNA
Merged-chr14-79861111-1	79861011	79861211	Gm10845	10.18	lncRNA
Merged-chr19-5802218-1	5802118	5802318	Malat1	-11.96	lncRNA

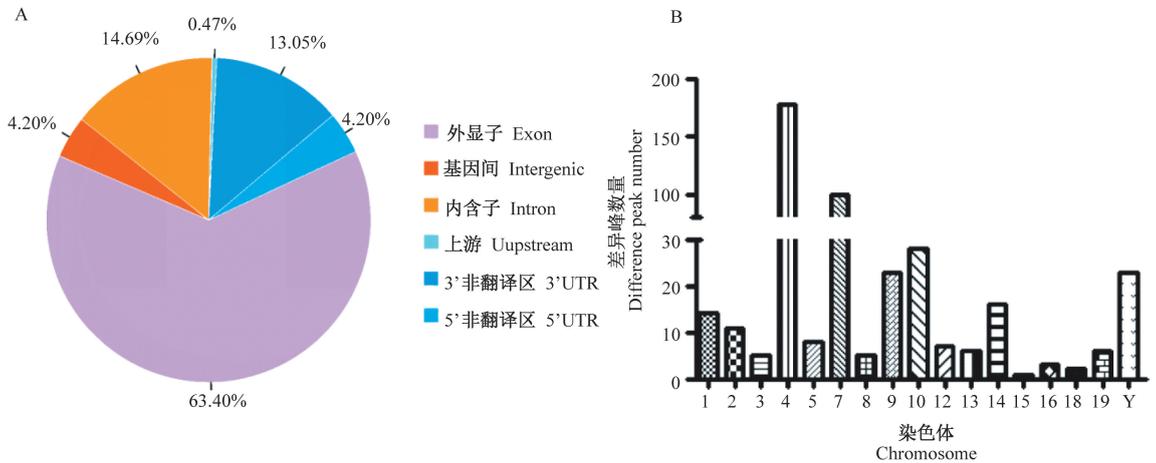
2.3 RNA 差异结合峰在功能元件及染色体来源上的分布分析

通过分析 RNA 差异性结合峰在不同基因组功能元件上的分布,发现差异性结合峰主要分布于外显子(exon)、内含子(intron)及 3' UTR 区,分别为 63.40%、14.69%及 13.05%,其他 8.86%分布于基因间区(Intergenic)、5' UTR 区和宿主基因上游(upstream)序列,分别为 4.20%、4.20%和 0.47%(图 2A)。染色体来源分析发现,大量差异性结合峰来源于 4 号及 7 号染色体(图 2B)。其中 4 号染色体 178 个,约占总差异性结合峰的 41.49%;7 号染色体 100 个,占总差异性结合峰的 23.31%,而 6、11、17、X 染色体未发现 peak 富集。以上结果提示,脑 I/R 后 MRTF-A 相关的 RNA 不仅在功能元件上

分布不同,且与染色体来源关系密切。

2.4 RNA 差异表达基因 GO 分析

对 MRTF-A 结合 RNA 差异性表达基因进行 GO 分析发现,差异基因在生物进程中主要富集 RNA、mRNA 的加工、拼接、代谢过程,细胞及骨架组成、微管解聚以及蛋白质复性等。在细胞组成方面,富集包括轴突、突触、神经元、神经元突触后密度、投射神经元等。在分子功能注释中主要富集与多种物质的结合功能,如与 MHC 的结合、钙结合素结合、脂蛋白受体结合等,其中富集最多的注释为 RNA 结合,共富集 31 个基因,而富集最为显著是 Poly(A) RNA 结合(表 3, $P < 1.09 \times 10^{-5}$)。结果提示,脑 I/R 损伤时 MRTF-A 可以通过募集特异性 RNA,在 RNA 结合、Poly A RNA 结合等方面发挥重要的生物功能。



注:A:RNA 差异结合峰在功能元件上的分布;B:RNA 差异结合峰染色体来源。

图 2 MRTF-A 结合 RNA 差异结合峰分析

Note. A. Distribution of RNAs differential binding peaks on functional elements. B. Chromosome source of RNAs differential binding peak.

Figure 2 MRTF-A binding RNAs differential binding peak analysis

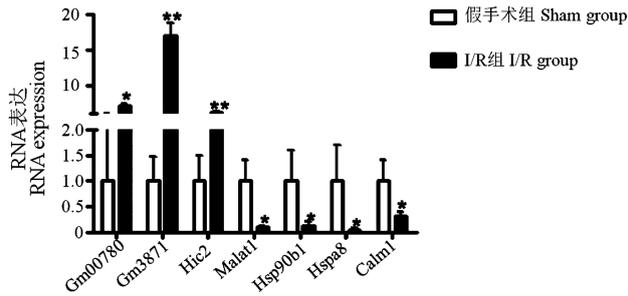
2.5 RNA 差异表达基因 KEGG 通路分析

通过对 MRTF-A 结合 RNA 差异性表达基因进行 KEGG 信号通路分析显示,差异表达基因主要富集 10 条信号通路,分别是甲状腺激素合成、胃酸分泌、唾液分泌、雌激素信号通路、多巴胺能突触、谷氨酸突触、胰岛素分泌、安非他明成瘾、内质网蛋白加工及 RNA 转运。在 10 条显著富集的信号通路中,雌激素信号通路是富集最显著的信号通路(表 4, $P < 6.09 \times 10^{-4}$),共富集 6 个基因,分别为 Hsp90b1、Hspa8、Gabbr2、Hsp90aa1、Calm1、Atf2。提示,在脑 I/R 损伤后,MRTF-A 主要通过雌激素信号

通路发挥神经保护功能。

2.6 qRT-PCR 验证筛选基因的表达

为了验证测序结果及生物信息预测结果的可信度,本实验在差异表达前 10 的 RNA 中随机选取 4 个基因(Gm33780、Gm3871、Hic2、Malat1)进行测序结果的验证;同时在 KEGG 预测富集最显著的雌激素信号通路中选取 3 个基因(Hsp90b1、Hspa8、Calm1)进行生物信息预测结果验证,结果发现 MRTF-A 抗体无论在假手术组还是 I/R 组均能富集到相应 RNA 表达(图 3),且均发生差异性改变,其变化趋势与测序结果一致。



注:与假手术组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 差异 RNA 的 qRT-PCR 验证

Note. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 3 qRT-PCR verification of differential RNAs

3 讨论

MRTF-A 是 SRF 转录共激活剂,主要通过核转位与 SRF 结合,促进 SRF 结合靶基因启动子上的 CaRG 盒,激活靶基因转录,从而在转录水平发挥调节功能^[5]。然而 MRTF-A 是否存在其他作用方式,目前尚未阐明。随着各种测序技术及生物信息学技术的发展,为探寻分子在不同水平的作用机制提供了技术支持。RNA 结合蛋白免疫共沉淀-高通量测序技术(RIP-Seq)是研究细胞内 RNA 与蛋白结合及转录后调控网络动态过程的工具,能帮助发现蛋白-RNA 复合体的相互作用。因此,为了深入了解 MRTF-A 在脑 I/R 损伤中的作用方式,探寻与

表3 GO 分析中的分子功能注释

Table 3 Annotation of molecular functions in GO analysis

GO 编号 GO number	GO 注释 GO annotation	基因数 Number of genes	P 值 P value
0044822	Poly(A) 结合 Poly(A) RNA binding	28	1.09×10^{-5}
0050750	低密度脂蛋白受体结合 Low-density lipoprotein particle receptor binding	4	1.09×10^{-4}
0003723	RNA 结合 RNA binding	31	1.15×10^{-4}
0044877	大分子复合物结合 Macromolecular complex binding	30	1.61×10^{-4}
0070325	脂蛋白受体结合 Lipoprotein particle receptor binding	4	1.78×10^{-4}
0008135	翻译因子活性,核酸结合 Translation factor activity, nucleic acid binding	6	2.12×10^{-4}
0003743	翻译起始因子活性 Translation initiation factor activity	5	2.69×10^{-4}
0005516	钙调蛋白结合 Calmodulin binding	8	3.04×10^{-4}
0023026	MHC II 类蛋白复合物结合 MHC class II protein complex binding	3	3.48×10^{-4}
0023023	MHC 蛋白复合物结合 MHC protein complex binding	3	4.39×10^{-4}

表4 KEGG 通路分析

Table 4 KEGG signal pathway analysis

KEGG 通路 KEGG signal pathway	基因数 Number of genes	P 值 P value
雌激素信号通路 Estrogen signaling pathway	6	6.09×10^{-4}
RNA 转运 RNA transport	7	2.03×10^{-3}
甲状腺激素合成 Thyroid hormone synthesis	4	6.74×10^{-3}
内质网中的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	6	8.07×10^{-3}
胰岛素分泌 Insulin secretion	4	1.25×10^{-2}
谷氨酸能突触 Glutamatergic synapse	4	3.01×10^{-2}
苯丙胺成瘾 Amphetamine addiction	3	3.41×10^{-2}
胃酸分泌 Gastric acid secretion	3	4.04×10^{-2}
唾液分泌 Salivary secretion	3	4.44×10^{-2}

MRTF-A 相关的潜在靶基因,我们采用 RIP-Seq 技术对比正常小鼠与脑 I/R 损伤小鼠脑组织中 MRTF-A 抗体结合 RNA 表达,以获得差异表达谱。

本研究结果显示,在脑 I/R 损伤时,429 个 MRTF-A 结合 RNA 呈现显著改变,其分类主要为 mRNA,少量为 ncRNA。在变化最显著的 10 个差异 RNA 中 lncRNA 占 7/10,可见 lncRNA 可能在 MRTF-A 参与的脑 I/R 损伤中发挥着不可忽视的调控作用。lncRNA 是一类长度大于 200 nt 的 ncRNA,能够与 DNA、RNA 及蛋白质作用参与机体的各种生理病理过程^[9]。研究发现,脑 I/R 损伤时存在大量 lncRNA 异常表达^[10],它们通过影响细胞凋亡、炎症、自噬、血管生成等在疾病的进展及转归中发挥作用^[11]。本研究获得多条已证实在大脑中发挥重要作用 lncRNA,如 Malat1、Meg3 及 Kcnq1ot1 等^[12-13],除此还筛选出多个尚未报道功能的 lncRNA,如 Gm33780、Gm32291、LOC105245688 等。为了验证测序结果的可靠性,我们在差异表达最显著的 10 个 RNA 中选取 4 个进行 qRT-PCR 验证,其中包括 lncRNA 3 个。结果显示 MRTF-A 抗体可以富集这些 RNA,同时在缺血性脑卒中后发生差异性改变,其变化趋势与测序结果一致,可见本次测序结果可靠,而这些 RNA,尤其是 lncRNA 如何通过 MRTF-A 结合发挥生物学功能有待进一步研究。

为了深入了解 MRTF-A 在脑 I/R 损伤中的作用机制,我们采用生物信息学方法对差异表达基因进行了 GO 及 KEGG 分析。GO 分析发现 MRTF-A 主要通过 RNA 结合、Poly (A) RNA 结合发挥生物学功能,于是推测 MRTF-A 可能作为 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 及 Poly (A) 结合蛋白 (Poly (A) binding protein, PABP) 参与脑 I/R 损伤病理进程。RBP 是一类可与双链或单链 RNA 结合,在转录后水平发挥重要调节作用。人抗原 R (HuR) 是一种 RBP,研究发现,缺血性脑中中风时, HuR 可正性调节炎症相关基因 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的 mRNA 稳定和翻译效率,参与脑损伤过程^[14]。同样,存在于胞浆中 PABP,可通过 RNA 识别基序与真核 mRNA 的 3' Poly (A) 尾结合,发挥 mRNA 成熟、输出及稳定功能^[15]。本实验中检测出多个与 mRNA 成熟、稳定密切相关的差异基因,如 Eef1a1、Eif5b 等。内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 是心血管系统的重要保护因子,可调节一氧化氮的产生,与缺血性脑卒中发生

密切相关^[16],研究发现 Eef1a1 可通过维持 eNOS mRNA 稳定,上调其表达,保护脑血管内皮免受脑缺血损伤^[17]。而 Eif5b 在脑 I/R 损伤中目前尚无报道,但研究指出,正常非必需的 Eif5b 在缺氧条件下是缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 1 α 和 2 α 合成机制的重要组成部分,它们的转录和翻译表现出显著的 Eif5b 依赖性^[18]。因此,推断 MRTF-A 可通过与这些基因结合发挥生物学功能。KEGG 信号通路分析发现,雌激素信号通路是富集最为显著通路。研究证实雌激素通路在脑 I/R 损伤中发挥重要作用,雌性动物脑缺血后神经元损伤弱于雄性动物,且随着生殖衰老或内源性雌激素释放停止而消失^[19],雌激素缺乏小鼠在脑 I/R 后长期给予雌激素受体激动剂可通过抑制炎症减轻脑损伤^[20]。为了进一步证实生物信息学预测结果,本实验在雌激素信号通路预测富集的 6 个差异表达基因中随机选取 3 个进行验证,结果发现, MRTF-A 可以富集这些 mRNA,并且在缺血性脑卒中后发生差异性改变,其改变趋势与测序趋势一致。因此,我们推测在脑 I/R 损伤时 MRTF-A 可结合差异表达 RNA 通过雌激素信号通路发挥作用。研究报道 lncRNA 可通过雌激素通路在肿瘤增殖、转移等过程中发挥重要作用^[21], lncRNA Malat1 在乳腺癌肿瘤中的表达改变与雌激素通路及其靶基因差异表达密切相关,且与不良预后相关^[22]。然而在缺血性脑卒中研究中,尚未发现 lncRNA 通过雌激素通路发挥相关功能。因此, lncRNA 通过雌激素信号通路在脑缺血神经损伤中发挥作用,还需要进一步深入研究。

综上,本研究通过 RIP-Seq 技术获得小鼠 MCAO/R 模型中与 MRTF-A 相关的潜在靶基因,通过生物信息学分析推断 MRTF-A 可能作为 RBP 或 PABP 通过雌激素信号通路等发挥生物学功能,从而为深入了解 MRTF-A 作用机制提供了理论基础,为探讨其在脑 I/R 损伤中的新机制提供研究方向,课题组将在下步实验中进行深入研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Zhang Y, Pan HY, Hu XM, et al. The role of myocardin-related transcription factor-A in Abeta25-35 induced neuron apoptosis and synapse injury[J]. Brain Res, 2016, 1648: 27-34.
- [2] Zhao X, Ding EY, Yu OM, et al. Induction of the matricellular protein CCN1 through RhoA and MRTF-A contributes to ischemic cardioprotection[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 75: 152-161.
- [3] An J, Naruse TK, Hinohara K, et al. MRTF-A regulates

- proliferation and survival properties of pro-atherogenic macrophages[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133: 26–35.
- [4] Yu OM, Benitez JA, Plouffe SW, et al. YAP and MRTF-A, transcriptional co-activators of RhoA-mediated gene expression, are critical for glioblastoma tumorigenicity[J]. *Oncogene*, 2018, 37(41): 5492–5507.
- [5] Lighthouse JK, Small EM. Transcriptional control of cardiac fibroblast plasticity[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 52–60.
- [6] 杨辉, 牛美芝, 郭晓丽, 等. 重组腺病毒介导 MRTF-A 基因干预缺血再灌注损伤模型大鼠心肌细胞的凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(24): 3843–3848.
- Yang H, Niu MZ, Guo XL, et al. Recombinant adenovirus encoding myocardin-related transcription factor-A prevents cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(24): 3843–3848.
- [7] Cao XL, Hu XM, Hu JQ, et al. Myocardin-related transcription factor-A promoting neuronal survival against apoptosis induced by hypoxia/ischemia[J]. *Brain Res*, 2011, 1385: 263–274.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [9] Simion V, Haemmig S, Feinberg MW. LncRNAs in vascular biology and disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 114: 145–156.
- [10] Dharap A, Nakka VP, Vemuganti R. Effect of focal ischemia on long noncoding RNAs[J]. *Stroke*, 2012, 43(10): 2800–2802.
- [11] Wang Y, Pan WY, Ge JS, et al. A review of the relationship between long noncoding RNA and post-stroke injury repair[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(10): 4619–4624.
- [12] Yu S, Yu M, He X, et al. KCNQ10T1 promotes autophagy by regulating miR-200a/FOXO3/ATG7 pathway in cerebral ischemic stroke [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3): e12940–e12514.
- [13] Bao MH, Szeto V, Yang BB, et al. Long non-coding RNAs in ischemic stroke[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 281–292.
- [14] Ardelit AA, Carpenter RS, Iwuchukwu I, et al. Transgenic expression of HuR increases vasogenic edema and impedes functional recovery in rodent ischemic stroke[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 661: 126–131.
- [15] Patel GP, Bag J. IMP1 interacts with poly(A)-binding protein (PABP) and the autoregulatory translational control element of PABP-mRNA through the KH III-IV domain[J]. *FEBS J*, 2006, 273(24): 5678–5690.
- [16] 蒋庆娟, 应燕萍. 内皮型一氧化氮合酶与血栓性疾病的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 140–144.
- Jiang QJ, Ying YP. Research progress on endothelial nitric oxide synthetase and thrombotic diseases [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(6): 140–144.
- [17] Zhang Y, Chen J, Li F, et al. A pentapeptide monocyte locomotion inhibitory factor protects brain ischemia injury by targeting the eEF1A1/endothelial nitric oxide synthase pathway [J]. *Stroke*, 2012, 43(10): 2764–2773.
- [18] Ho JJD, Balukoff NC, Cervantes G, et al. Oxygen-sensitive remodeling of central carbon metabolism by archaic eIF5B [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(1): 17–26.
- [19] Ma YL, Qin P, Li Y, et al. The effects of different doses of estradiol (E2) on cerebral ischemia in an in vitro model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion and in a rat model of middle carotid artery occlusion [J]. *BMC Neurosci*, 2013, 14: 118.
- [20] Guo H, Yang J, Liu M, et al. Selective activation of estrogen receptor beta alleviates cerebral ischemia neuroinflammatory injury[J]. *Brain Res*, 2020, 1726: 146536.
- [21] Li YH, Jiang BH, Wu XP, et al. Long non-coding RNA MIAT is estrogen-responsive and promotes estrogen-induced proliferation in ER-positive breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 45–50.
- [22] Huang NS, Chi YY, Xue JY, et al. Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) interacts with estrogen receptor and predicted poor survival in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 37957–37965.

[收稿日期] 2020-08-11