

# 大鼠创伤性脑损伤中差异表达基因microRNA调节网络的生物信息学研究

王子钰, 王家昕, 王晓霞, 李 洁, 倪 爽, 苏立宁\*

河北北方学院基础医学院, 河北 张家口

Email: 13930868320@163.com, \*343376274@qq.com

收稿日期: 2020年10月9日; 录用日期: 2020年10月29日; 发布日期: 2020年11月5日

## 摘 要

探究大鼠创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)基因表达差异同miRNA的调节网络, 为阐明TBI治疗靶点提供理论基础, 并以期寻找TBI临床诊断的客观指标。本研究实验方法使用美国国立生物技术信息中心(NCBI), 从GEO数据库获得有关TBI基因表达与miRNA表达的原始数据。通过筛选差异表达基因和miRNA, 并经过一系列生物信息学软件处理, 对差异表达的miRNA进行靶基因预测, 将系统提供的靶基因与差异表达基因进行比较, 保留重合的差异表达基因构建了miRNA-Gene靶向调控网络, 并对差异表达的基因进行了基因本体论(GO)功能富集分析。本研究结果最终筛选出95个差异表达基因和4个靶向miRNA。利用筛选结果构建完成了miRNA-Gene靶向调控网络, 并通过GO功能富集分析, 得到了从生物学过程、细胞成分及分子功能三个角度对这些基因进行的功能描述。miRNA-Gene靶向调控网络展示了创伤性脑损伤后相关miRNA与其靶基因是如何通过相互作用而进一步产生一系列生物学效应的。本研究通过GO功能富集分析和调控网络, 有助于理解和阐明TBI的潜在机制和miRNA调节的关系, 并为TBI临床诊断提供了4个可能选择的生物标志物。

## 关键词

创伤性脑损伤, miRNA, 生物信息学, 网络, 靶向调控

## Bioinformatics Study of Differentially Expressed Genes microRNA Regulatory Network in Traumatic Brain Injury in Rats

Ziyu Wang, Jiixin Wang, Xiaoxia Wang, Jie Li, Shuang Ni, Lining Su\*

Basic Medicine Department of Hebei North University, Zhangjiakou Hebei

Email: 13930868320@163.com, \*343376274@qq.com

\*通讯作者。

文章引用: 王子钰, 王家昕, 王晓霞, 李洁, 倪爽, 苏立宁. 大鼠创伤性脑损伤中差异表达基因 microRNA 调节网络的生物信息学研究[J]. 生物物理学, 2020, 8(4): 39-46. DOI: 10.12677/biphy.2020.84004

## Abstract

To explore the difference of gene expression and the regulatory network of miRNA in rats with traumatic brain injury (TBI), so as to provide a theoretical basis for elucidating the therapeutic targets of TBI, and to find the objective indicators for clinical diagnosis of TBI, in this study, the National Center for Biotechnology Information (NCBI) was used to obtain the original data on TBI gene expression and miRNA expression from GEO database. Through the screening of differentially expressed genes and the miRNA and a series of bioinformatics software processing, we performed target gene prediction for differentially expressed of miRNAs. By comparing the target genes provided by the system with the differentially expressed genes, the miRNA-gene targeting regulatory network was constructed by using the differentially expressed genes that were repeated twice, and the Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis of differentially expressed genes was conducted. There are 95 differentially expressed genes and 4 targeted miRNAs in the study were selected. The miRNA-gene targeting regulatory network was constructed based on the screening results, and the functional description of these genes was obtained from the biological process, cellular components and molecular functions through GO functional enrichment analysis. The miRNA-gene targeting regulatory network demonstrates how related miRNAs and their target genes interact to further produce a series of biological effects after TBI. Through GO functional enrichment analysis and regulatory network, this study helps to understand and clarify the potential mechanism of TBI and the relationship between miRNA regulation, and provides four possible biomarkers for the clinical diagnosis of TBI.

## Keywords

Traumatic Brain Injury, miRNA, Bioinformatics, Network, Targeted Regulation

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是一种由外力导致的脑组织损伤,包括高空坠物、交通事故、暴力等意外原因引起的脑组织损坏及神经细胞坏死[1]。近年来, TBI 的发生率受交通运输和工业水平飞速发展的影响而进一步上升, TBI 作为一种常见的神经外科疾病,已成为导致世界范围内死亡和残疾的主要原因之一,并严重威胁了人群生命健康[2]。同时, TBI 也因其高发生率、高致残率、高死亡率的特点,一直受到国内外学者的密切关注[3]。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类广泛存在于真核生物中的内源性单链小分子 RNA,长度在 21~25 个碱基之间。当前已被证明, miRNA 作为非编码 RNA 参与基因表达的调控中发挥着关键作用。近年来,有研究通过微阵列分析发现了神经损伤组织中 miRNA 表达模式的动态变化,并确定了 miRNA 参与神经损伤和再生过程[4]。

当前, TBI 的临床诊断主要依靠神经系统检查和影像学技术,具有一定的局限性,对于不同程度的脑损伤至今没有诊断的金标准[5];而 miRNA 这种参与神经损伤修复的能力使得其成为 TBI 临床诊断的生物标志物成为可能。于是,本研究旨在通过生物信息学分析,筛选 TBI 后与差异表达基因相关的 miRNA,

以期寻找 TBI 临床诊断的客观指标；并构建 gene-miRNA 网络，从而对 TBI 分子水平调节做出整体性预测，为寻找其治疗靶点提供理论基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

通过美国国立生物技术信息中心(NCBI)平台的基因表达综合数据库 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 在大鼠物种下以“创伤性脑损伤(TBI)”为关键词寻找相关数据芯片，分别检索有关 miRNA 及基因的原始数据。其他选择标准包括：1) 含有假手术与实验组相关对照；2) 含有多组实验样本；3) 样本支持线上分析工具 GEO2R。根据选择标准，筛选出涉及大鼠脑组织创伤性损伤手术后有关 miRNA 和基因的四组数据集。本次实验选取含有 miRNA 相关表达量变化的两个数据集(GSE59646 和 GSE115614-GPL22696)和基因表达量变化的两个数据集(GSE115614-GPL15084 和 GSE59647-GPL14746)作为后期分析的样本。

### 2.2. 筛选差异表达基因和 miRNA

在本研究中，利用 GEO (Gene Expression Omnibus)数据库自带的交互式线上分析工具 GEO2R 对 GSE59646、GSE115614-GPL22696、GSE115614-GPL15084 和 GSE59647-GPL14746 四个数据集进行分析，在 miRNA 及基因表达数据中比较出实验组与假手术组中存在差异表达的信息，分别对 miRNA 及基因各两组数据集的差异数据取交集，以  $P < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$  为筛选条件，筛选出差异表达的基因和 miRNA。

### 2.3. 差异表达 miRNA 的靶基因预测

为了探究差异表达的 miRNA 与差异基因的靶向关系，本研究通过 miRwalk 3.0 软件 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)对差异表达的 miRNA 进行靶基因预测，筛选标准为  $P < 0.05$ ，将系统提供的靶基因与差异表达基因进行比较，保留重合的差异表达基因。

### 2.4. miRNA-Gene 靶向调控网络的构建

为了讨论 TBI 后分子水平调节的相互作用，利用 cytoscape v3.7.1 软件，通过输入差异表达数据，自动生成初步的 miRNA-Gene 调控网络图。再通过导入差异表达上下调关系(根据  $\log_2FC$  值得出上调和下调结果)，对不同属性的网络节点(Node)进行标注与区分，并将边(Edge)和网络(Network)样式进行调整，绘制一个清晰的 miRNA-Gene 靶向网络布局图。

### 2.5. 差异表达基因的基因本体论(GO)功能富集分析

将与差异表达 miRNA 靶向基因重合的差异表达基因导入在线分析软件 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)进行 GO 功能富集分析，筛选标准为  $P < 0.05$ ，从生物学过程(BP, Biological Process)、细胞成分(CC, Cellular Component)及分子功能(MF, Molecular Function)三个角度，对这些基因的功能进行描述，从而对 TBI 分子水平调节做出整体性预测。

## 3. 结果

### 3.1. 大鼠创伤性脑损伤后典型差异表达的基因及 miRNA

将基因芯片数据库集 GSE59646 和 GSE115614-GPL22696 中的四例假手术组作为空白组、六例 TBI 手术组作为对照组分别进行差异表达分析，分别筛选出 375、1120 个差异表达 miRNA，将两组数据集基

因取交集，共筛选出 4 个差异 miRNA，其中 4 个 miRNA 表达上调、无 miRNA 表达下调。运用相同的步骤进行操作，在 GSE115614-GPL15084 和 GSE59647-GPL14746 两组差异基因数据集中，取交集后共筛选出 608 个差异基因，其中 411 个基因表达上调、197 个基因表达下调(见图 1)。

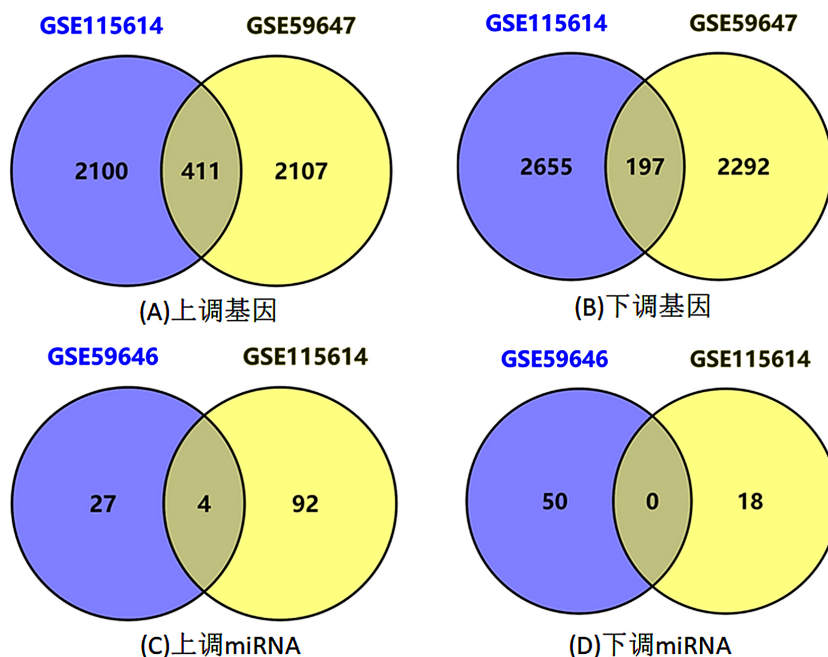


Figure 1. Differentially expressed genes and miRNAs after traumatic brain injury in rats  
图 1. 大鼠创伤性脑损伤后差异表达的基因及 miRNA

### 3.2. 大鼠创伤性脑损伤后差异表达 miRNA 的靶基因预测

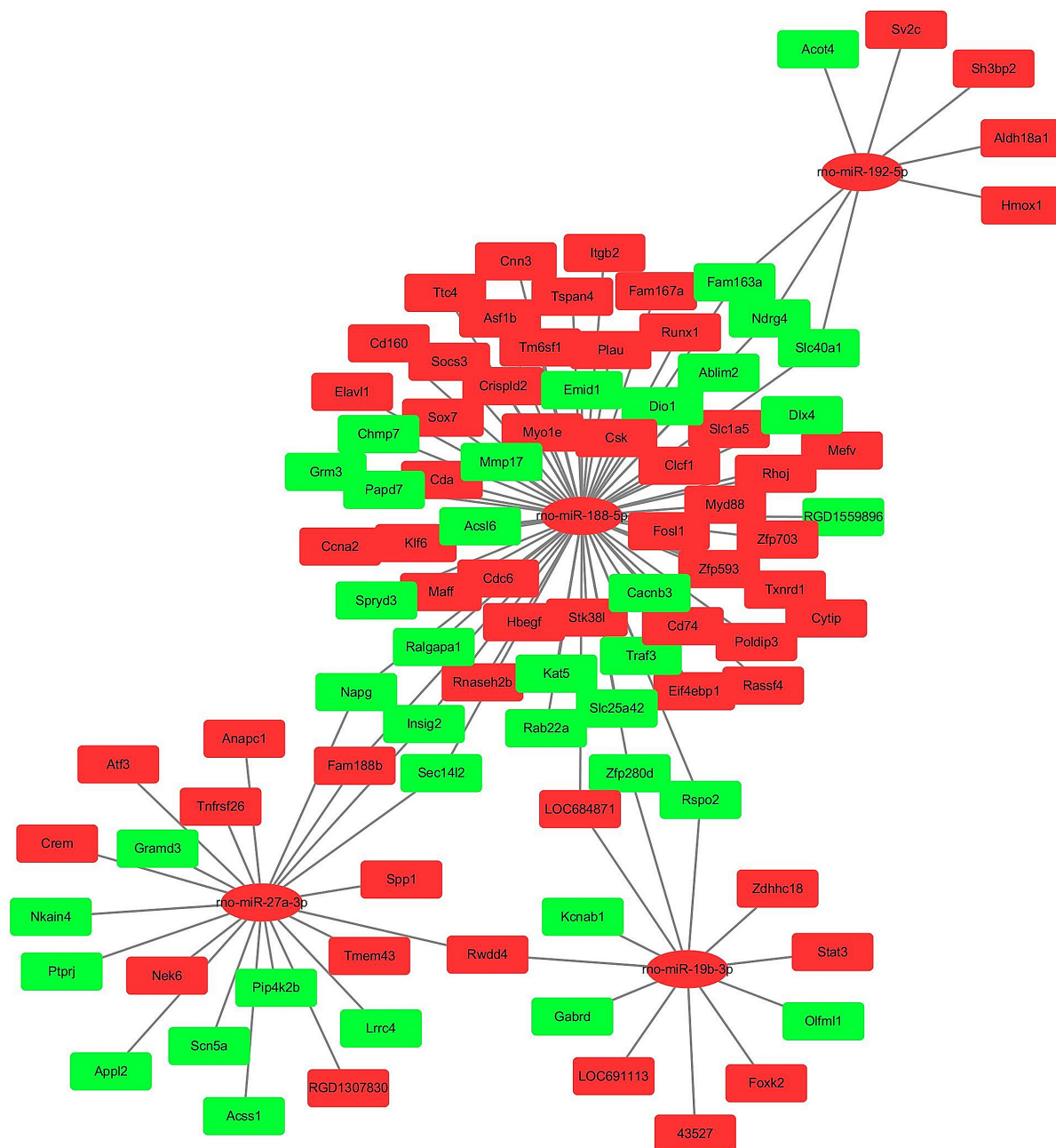
利用 miRwalk 软件对筛选 miRNA 的靶基因进行预测，将靶基因与筛选基因进行比较，得到重合的差异表达基因共 95 个。表 1 展示了筛选出的差异表达 miRNA 及其靶向的差异基因，并标明了其差异表达的上下调情况。

Table 1. Differentially expressed miRNAs and differentially targeted genes  
表 1. 差异表达 miRNA 及其靶向的差异基因

miRNA 名称	基因表达变化	基因名称
rno-miR-27a-3p	上调	Tnfrsf26, Tmem43, Spp1, Nek6, Fam188b, Sec14l2, Napg, Lrrc4, Insig2, Appl2
	下调	Rwdd4, RGD1307830, Crem, Atf3, Anapc1, Scn5a, Ptprj, Pip4k2b, Nkain4, Gramd3, Acss1
rno-miR-188-5p	上调	Zfp703, Zfp593, Tspan4, Sox7, Runx1, Rhoj, Txnrd1, Ttc4, Tm6sf1, Stk38l, Soes3, Slc1a5, Rna-seh2b, Rassf4, Poldip3, Plau, Myo1e, Myd88, Mefv, Maff, LOC684871, Klf6, Itgb2, Hbegf, Fosl1, Fam188b, Fam167a, Elavl1, Eif4ebp1, Cytip, Csk, Crispd2, Cnn3, Clcf1, Cdc6, Cda, Cd74, Cd160, Ccna2, Asf1b
	下调	Zfp280d, Traf3, Sec14l2, Rspo2, Spryd3, Slc40a1, Slc25a42, RGD1559896, Ralgapa1, Rab22a, Papd7, Ndr4, Napg, Mmp17, Kat5, Insig2, Grm3, Fam163a, Emid1, Dlx4, Dio1, Chmp7, Cacnb3, Acsl6, Ablim2
rno-miR-19b-3p	上调	43527, Foxk2, LOC684871, LOC691113, Rwdd4, Stat3, Zdhhc18
	下调	Gabrd, Kenab1, Olfm1, Rspo2, Zfp280d
rno-miR-192-5p	上调	Aldh18a1, Sh3bp2, Sv2c, Hmox1
	下调	Fam163a, Slc40a1, Ndr4, Acot4

### 3.3. miRNA-Gene 靶向调控网络的构建

利用从 miRwalk 3.0 软件预测出的靶基因, 将系统提供的靶基因与差异表达基因进行比较, 保留重合的差异表达基因, 并使用 Cytoscape 3.7.1 对获得的两组数据构建了 miRNA-Gene 靶向调控网络(见图 2), 其中共加入了 4 条 miRNA 和与之对应的 95 个靶向基因, 通过红色来标记基因或 miRNA 的上调、绿色标记下调。该网络展示了创伤性脑损伤后相关 miRNA 与其靶基因是如何通过相互作用而进一步产生一系列生物学效应的。本研究试图通过对网络中核心节点的分析, 从而对 miRNA 与其靶基因的调控在整个创伤性脑损伤生物学过程中所产生的影响进行了相关预测和描述, 并借此讨论其相关的生物学意义。



**Figure 2.** miRNA gene targeting regulatory network  
**图 2.** miRNA-Gene 靶向调控网络

### 3.4. 差异表达基因的本体论功能富集分析结果

在本研究中, miRNA 的靶向基因通过 DAVID 软件中基因本体论功能富集分析得到的结果, 差异表达基因中 CDC6、RNASEH2B、CCNA2、CD74 在成纤维细胞正调节(positive regulation of fibroblast proliferation)的生物学进程中起作用, CLCF1、SOCS3、STAT3 在 JAK-STAT 信号转导途径(JAK-STAT cascade)中起作用, PTPRJ、HMOX1、SOX7 等 7 个基因在对细胞增殖的负调节(negative regulation of cell proliferation)中发挥作用。根据 P 值大小排序, GO 分析中生物学过程(BP)富集结果及相关基因数量结果见图 3。

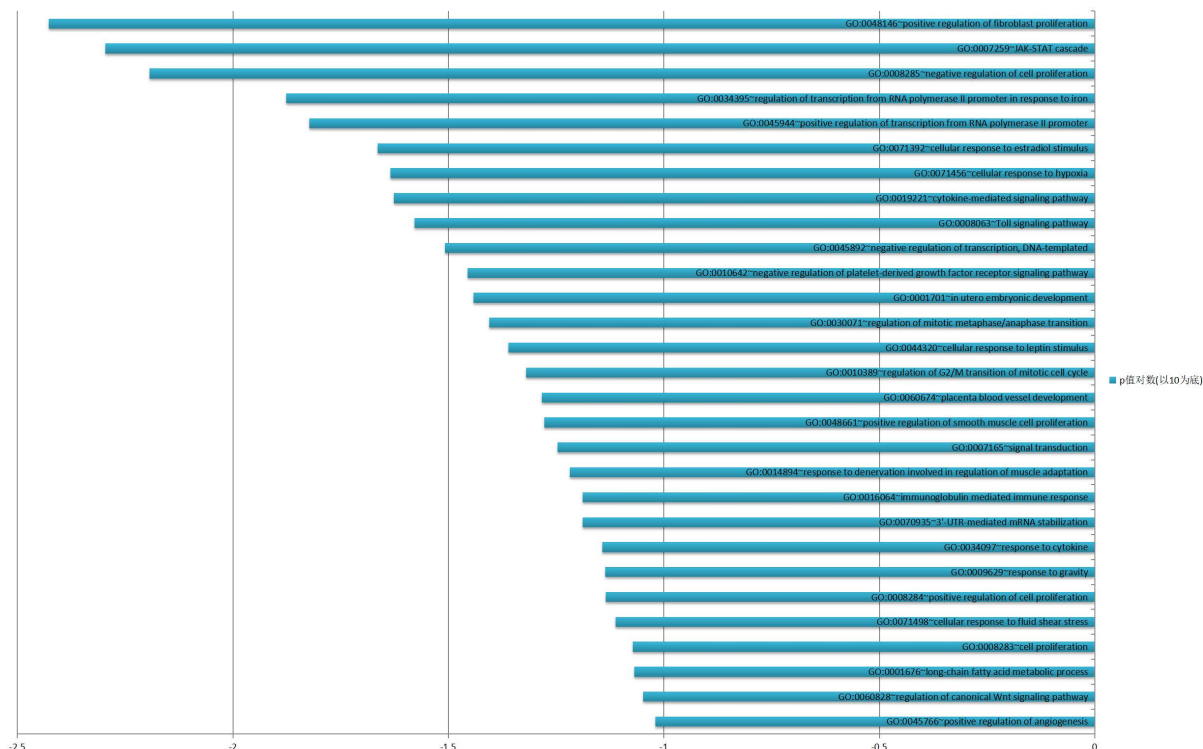


Figure 3. Functional enrichment of differentially expressed gene GO—BP results of biological process

图 3. 差异表达基因 GO 功能富集——生物学过程 BP 结果

差异表达基因在细胞内(intracellular)、核质(nucleoplasm)、肌动蛋白细胞骨架(actin cytoskeleton)等处发挥作用。根据 P 值大小排序, GO 分析中细胞成分(CC)富集结果及相关基因数量结果见图 4。

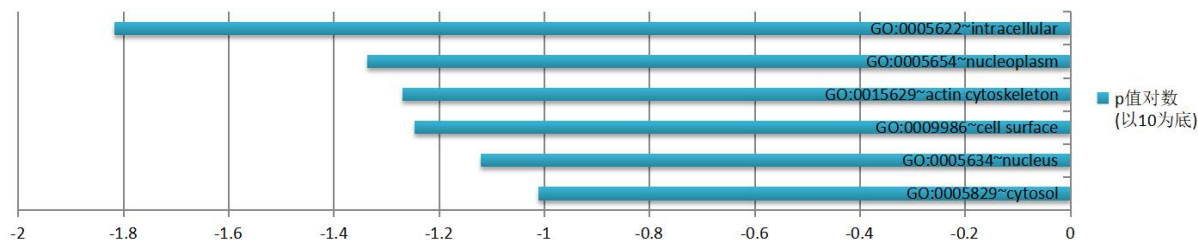


Figure 4. Functional enrichment of differentially expressed gene GO—cell component CC results

图 4. 差异表达基因 GO 功能富集——细胞组分 CC 结果

差异表达基因在蛋白质激酶结合(protein kinase binding)、抑制转录因子结合(repressing transcription

factor binding)、受体结合(receptor binding)等分子功能中起作用。根据 P 值大小排序, GO 分析中分子功能(MF)富集结果及相关基因数量结果见图 5。

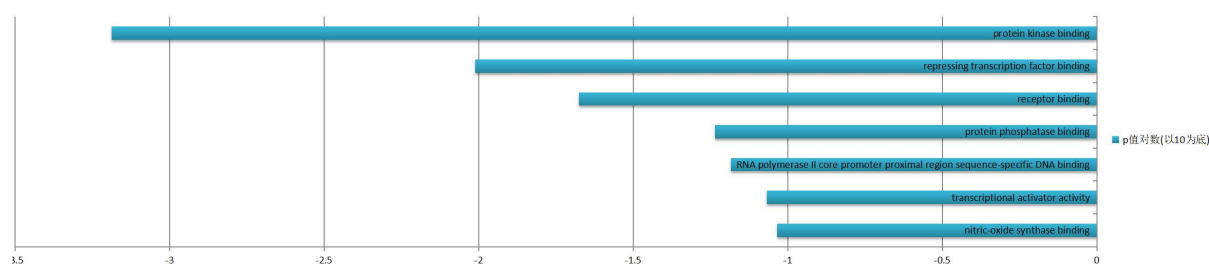


Figure 5. Functional enrichment of differentially expressed gene go—results of molecular function MF

图 5. 差异表达基因 GO 功能富集——分子功能 MF 结果

#### 4. 讨论

自 Ambros 和 Ruvkun [6]各自团队发现第一个 microRNA 开始, microRNA 的研究至今可以大致分为三个阶段: 第一阶段是从最初的发现到了解它广泛参与生命活动从发生到生长发育的各个时期; 第二阶段, 从分子水平层面揭示了成熟的 miRNA 可与其特异性 mRNA 分子部分互补, 从而发挥其下调基因表达的作用, 调节蛋白质的表达水平; 第三阶段, miRNA 分子病理学研究的大量实验证明 miRNA 与肿瘤及各类疾病有关, 由此展开针对诊断标志物及病理机制的研究。

创伤性脑损伤作为神经外科最常见疾病, 多数会引起继发性脑损伤, 涉及氧化应激、炎症、神经元凋亡坏死、轴突损伤等诸多方面, 并以细胞及突触的退化而告终。目前临床上尚没有诊断 TBI 的分子标志物, 过去很长一段时间, 许多分子被提出可作为 TBI 的生物标志物, 但由于神经系统的复杂和 TBI 病情程度的不同, 在临床应用上并不理想[7]。近年来, 大量实验证明 miRNA 与 TBI 上述生物学活动有关[8], 本研究通过生物信息学分析, 实现了利用数据库筛选扩充 miRNA 调节 TBI 网络的认识。

结合本研究最终筛选出的 95 个差异表达基因和 4 个靶向 miRNA, 构建完成了 miRNA-Gene 靶向调控网络, 并通过 GO 功能富集分析, 得到了从生物学过程、细胞成分及分子功能三个角度对这些基因进行的功能描述。其中, 值得注意的是, 多个基因靶向对应 miRNA 参与了炎症反应、血管生成、以细胞坏死凋亡为主的继发性脑损伤和突出可塑性等生物过程[9] [10]。

基因表达水平显示, CDC6, RNASEH2B, CCNA2, CD74 在 TBI 组中相比对照组明显上调, 并均与 miRNA-188-5p 存在靶向关系, 共同参与成纤维细胞增殖的正向调节, 由此推测 miRNA-188-5p 下调在 TBI 后可能促进了成纤维细胞的增殖, 相关方面还应设计实验加以证明研究。此外, HMOX1, ITGB2, RUNX1 在 TBI 组中同样表达上调, 并分别靶向下调了 miRNA-192-5p 和 miRNA-188-5p 共同参与对血管生成素的正向调节, 近年来, 多项实验证明血管生成是脑损伤后神经修复与再生的关键因素, miRNA 在其中可以起到调控血管生成的功能[11]。

在本研究中值得注意的还有 MYD88, CD74 参与免疫球蛋白介导的免疫反应以及由 LRRC4, KLF6, MYD88, SOCS3 参与细胞因子介导的信号转导通路, 二者在分子机制上同炎症反应均有相关性。此外, 有研究表明 miRNA-1224 可以调节肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumornecrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 由此说明 miRNA-1224 可能参与了炎症反应[12]。另一项研究证明, miRNA-124 能诱导小胶质细胞炎症反应显著缓解, 可见 miRNA-124 参与炎症反应的调控。此外 miRNA-155, miRNA-414, miRNA-104, miRNA-125, miRNA-146 和 miRNA-21 均参与炎症因子的表达[13] [14]。因此, 有理由推断部分 miRNAs 参与了中枢神经系统的炎症反应调节。

必须指出, 本研究的实验结果可能依旧存在不足, 有研究表明, miRNA 在执行生物功能时常常表现出时空特异性, 在 TBI 后的不同时间、脑组织不同部位遭到外力创伤, 都会对 miRNA 的表达量产生影响[15] [16]。因此, 对 TBI 进程中 miRNA 调控更详尽的机制还有待后续研究。生物信息学分析所给出的 4 个 miRNA 是否能够成为 TBI 的生物标志物, 同样需要更多基础研究的实验证明; 但总的来说, 本研究所得出的 miRNA-gene 的靶向关系无疑将有助于指导我们研究更复杂的 TBI 分子机制和 miRNA 调控机理, 为我们开展进一步的实验设计提供帮助。

## 参考文献

- [1] Shames, J., Treger, I., Ring, H., *et al.* (2007) Return to Work Following Traumatic Brain Injury: Trends and Challenges. *Disability and Rehabilitation*, **29**, 1387-1395. <https://doi.org/10.1080/09638280701315011>
- [2] Bulstode, H., Nicoll, J.A., Hudson, G., *et al.* (2014) Mitochondrial DNA and Traumatic Brain Injury. *Annals of Neurology*, **19**, 186-195. <https://doi.org/10.1002/ana.24116>
- [3] Wang, N., Zhang, Y.M., Wu, L., *et al.* (2014) Puerarin Protected the Brain from Cerebral Ischemia Injury via Astrocyte Apoptosis Inhibition. *Neuropharmacology*, **79**, 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.12.004>
- [4] Bhalala, O.G., Srikanth, M. and Kessler, J.A. (2013) The Emerging Roles of microRNAs in CNS Injuries. *Nature Reviews Neurology*, **9**, 328-339. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.67>
- [5] Shenton, M.E., Hamoda, H.M., Schneiderman, J.S., *et al.* (2012) A Review of Magnetic Resonance Imaging and Diffusion Tensor Imaging Findings in Mild Traumatic Brain Injury. *Brain Imaging and Behavior*, **6**, 137-192. <https://doi.org/10.1007/s11682-012-9156-5>
- [6] Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., *et al.* (1993) The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- [7] Azar, S., Hasan, A., Younes, R., *et al.* (2017) Biofluid Proteomics and Biomarkers in Traumatic Brain Injury. *Methods in Molecular Biology*, **1598**, 54-63. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4_3)
- [8] Lv, H., Wang, Q., Wu, S., *et al.* (2015) Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy-Related Biomarkers in Serum and Cerebrospinal Fluid. *Clinica Chimica Acta*, **450**, 282-297. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.021>
- [9] Schratt, G. (2009) Finetuning Neural Gene Expression with microRNAs. *Current Opinion in Neurobiology*, **19**, 213-219. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.05.015>
- [10] Kim, H.W., Haider, H.K., Jiang, S., *et al.* (2009) Ischemic Preconditioning Augments Survival of Stem Cells via miR-210 Expression by Targeting Caspase8-Associated Protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 33161-33168. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.020925>
- [11] Kuehbach, A., Urbich, C., Zeiher, A.M., *et al.* (2007) Role of Dicer and Drosha for Endothelial microRNA Expression and Angiogenesis. *Circulation Research*, **101**, 59-68. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.153916>
- [12] Niu, Y., Mo, D., Qin, L., *et al.* (2011) Lipopolysaccharide-Induced miR-1224 Negatively Regulates Tumour Necrosis Factor-Alpha Gene Expression by Modulating Sp1. *Immunology*, **133**, 8-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03374.x>
- [13] Alam, M.M. and O'Neill, L.A. (2011) MicroRNAs and the Resolution Phase of Inflammation in Macrophages. *European Journal of Immunology*, **41**, 2482-2485. <https://doi.org/10.1002/eji.201141740>
- [14] Ponomarev, E.D., Veremeyko, T., Barteneva, N., *et al.* (2011) MicroRNA-124 Promotes Microglia Quiescence and Suppresses EAE by Deactivating Macrophages via the C/EBP-alpha-PU. 1 Pathway. *Nature Medicine*, **17**, 64-70. <https://doi.org/10.1038/nm.2266>
- [15] Redell, J.B., Liu, Y. and Dash, P.K. (2009) Traumatic Brain Injury Alters Expression of Hippocampal microRNAs: Potential Regulators of Multiple Pathophysiological Processes. *Journal of Neuroscience Research*, **87**, 1435-1448. <https://doi.org/10.1002/jnr.21945>
- [16] He, X., Zhang, Q., Liu, Y., *et al.* (2007) Cloning and Identification of Novel microRNAs from Rat Hippocampus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **39**, 708-714. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00324.x>