

·基础研究·

## LncRNA 与凋亡相关基因在小鼠肠缺血再灌后肠黏膜表达谱中的变化及共表达网络关系

许 淼<sup>1</sup>, 杨 勇<sup>2</sup>, 邓绮文<sup>1</sup>, 沈建通<sup>1</sup>, 刘卫锋<sup>3</sup>, 杨文静<sup>4</sup>, 刘克玄<sup>3</sup>

(1.中山大学附属第一医院麻醉科,广东 广州 510080;2.广州市第一人民医院神经内科,广东 广州 510180;

3.南方医科大学南方医院,广东 广州 510515;4.郑州大学附属第一医院,河南 郑州 450052)

**摘 要:**【目的】研究小鼠肠 I/R 损伤早期肠黏膜中长链非编码 RNA(lncRNA)的变化,建立差异表达的 lncRNA 表达谱及功能角色,并对 lncRNA 和凋亡相关基因进行编码-非编码基因共表达(CNC)生物信息学分析。【方法】采用 lncRNA 芯片高通量筛选小鼠肠 I/R 损伤早期肠黏膜中差异 lncRNA 的变化并用 qRT-PCR 验证芯片重复性,通过对与 lncRNA 同时差异表达的 mRNA 进行基因本体论(GO)富集分析,重点分析凋亡相关功能。最后,挑选差异变化的已知凋亡相关基因的 mRNA,通过 CNC 分析计算出与之显著相关的 lncRNA-mRNA 关系对,构建差异 lncRNA 和凋亡 mRNA 共表达网络。【结果】与假手术组相比,肠 I/R 后小鼠肠上皮细胞 lncRNA 表达谱发生了显著变化,其中表达上调的 lncRNA 有 1 503 个,表达下调的 lncRNA 有 2 099 个(Fold change $\geq$ 2,  $P<0.05$ )。同时,1 528 个 mRNA 表达上调,1 630 个 mRNA 表达下调(Fold change $\geq$ 2,  $P<0.05$ )。GO 分析富集指数得出,参与调控的功能最主要与脂代谢过程、氧化还原反应、应激反应、凋亡过程、程序性细胞死亡、细胞周期、炎症反应、内皮细胞分化增殖、组织重构、MAPK、Wnt、血管内皮生长因子信号通路等有关。“凋亡”相关的子条目在上调和下调的 GO 分子功能条目注释中以不同形式多次富集,且排在前列。最后生物信息学分析发现,凋亡相关 mRNA 与差异表达的 lncRNA 存在着显著的共表达网络关系。【结论】本研究筛选出小鼠肠 I/R 损伤早期肠黏膜差异变化的 lncRNA,建立并初步验证了差异 lncRNA 表达谱,生物信息学分析得出调控“凋亡”相关过程是其重要的生物学功能,大量的差异 lncRNA 与凋亡基因确实存在高度的共表达关系,为后继研究提供了基础和方向。

**关键词:** 肠;缺血再灌注损伤;长链非编码 RNA;凋亡;共表达分析

**中图分类号:** R57 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2019)01-0001-13

### Microarray Profiling and Co-Expression Analysis of Long Noncoding RNA and Apoptosis-Associated mRNA in Mouse Intestinal Mucosa Following Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury

XU Miao<sup>1</sup>, YANG Yong<sup>2</sup>, DENG Qi-wen<sup>1</sup>, SHEN Jian-tong<sup>1</sup>, LIU Wei-feng<sup>3</sup>, YANG Wen-jing<sup>4</sup>,  
LIU Ke-xuan<sup>3</sup>

(1.Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2.Department of Neurology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180, China; 3. Department of

Anesthesiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. Department of

Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Corresponding to: LIU Ke-xuan; E-mail: liukexuan705@163.com

**Abstract:** 【Objective】To investigate the lncRNA expression profile and potential roles in mouse intestinal mucosa after I/R treatment and explore the co-expression relationship between dysregulated lncRNA and apoptotic mRNA at the early stage of reperfusion. 【Methods】The expression profiles of lncRNA were obtained using microarray and some

收稿日期:2018-09-21

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212660)

作者简介:许淼,主治医师,E-mail:spring\_xum@163.com;刘克玄,通信作者,教授,博士生导师,研究方向:肠损伤,E-mail:liukexuan705@163.com

lncRNA were further validated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Gene ontology (GO) analyses were performed to determine closely related biological functions, especially apoptosis-related functions. Finally, the known apoptosis-related mRNA with obviously changes were selected to construct the co-expression network of the dysregulated lncRNA and their correlated apoptotic mRNA, and were analyzed by CNC analysis to calculate the significant correlation of lncRNA-mRNA pairs. 【Results】 Compared with sham operation group, the expression profile of lncRNA in intestinal epithelium of mice after intestinal I/R was significantly changed, including 1 503 up-regulated lncRNAs and 2 099 down-regulated lncRNA (Fold change $\geq$ 2,  $P<0.05$ ). At the same time, 1 528 mRNA were up-regulated in I/R group, while 1 630 mRNA were down-regulated (fold-change $\geq$ 2.0,  $P<0.05$ ). GO enrichment analysis showed that the main functions involved in regulation were lipid metabolism, redox reaction, stress reaction, apoptosis process, programmed cell death, cell cycle, inflammatory response, endothelial cell differentiation and proliferation, tissue remodeling, MAPK, Wnt, vascular endothelial growth factor signaling pathway and so on. Apoptosis-related subitems were enriched in the up- and down-regulated annotations of GO molecular function in different forms, which were in the forefront. There was a significant co-expression relationship between apoptosis-related mRNA and dysregulated lncRNA. 【Conclusion】 In this study, we established and preliminarily validated the expression profiles of the differentially expressed lncRNA at the early stage of reperfusion in mouse intestinal ischemia injury. Bioinformatics analysis showed that the important biological function of dysregulated lncRNA was the regulation of apoptosis-related processes, and a large number of those lncRNA were indeed highly co-expressed with apoptotic genes, which would provide a basis and direction for future research.

**Key words:** intestine; ischemia/reperfusion injury; long noncoding RNA; apoptotic; co-expression analysis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(1):01-13]

肠缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是围术期常见的病理生理过程,它常出现在严重创伤、感染、休克、肠缺血性疾病,以及某些外科手术(如小肠移植术,肝移植术、腹主动脉瘤手术及心肺转流术等)中<sup>[1]</sup>。肠 I/R 不仅可引起肠道的局部损害,还可因肠损伤后肠内细菌、内毒素的移位导致全身炎症反应综合征,进而导致肠外远隔器官损害、多器官功能不全甚至死亡<sup>[2]</sup>,其发病机制一直是国内外学者研究的重点和难点。研究表明凋亡是肠 I/R 后肠黏膜上皮细胞死亡的主要形式<sup>[3]</sup>,寻找调控肠 I/R 后肠黏膜上皮细胞凋亡的靶点是防治肠 I/R 肠损伤的关键。近年来发现,长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 在众多疾病的发生发展中,通过调控细胞凋亡起到重要作用<sup>[4]</sup>。然而, lncRNA 和肠 I/R 损伤关系的研究目前尚未见报道,其在肠 I/R 过程中是否发生了改变、是否在肠黏膜上皮细胞的凋亡中发挥作用亟待探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 肠 I/R 损伤动物模型

SPF 级雄性 C57Bl/6 小鼠,由广东省医学实验

动物中心提供,动物体质量范围为 19~20 g,许可证号:SYXK(粤)2010-0108。小鼠在中山大学附属第一医院动物实验中心集体饲养,饲养条件遵照《实验动物环境及设施国家标准(GB14925-2001)》规定。1%戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后仰卧固定于手术台,常规消毒,经腹正中切口,分离肠系膜上动脉(superiormesenteric artery, SMA),无创微动脉夹夹闭,缝合切口。60 min 后经原切口进腹,取出动脉夹,恢复血供,于再灌注后 2 h 留取小肠黏膜标本。

### 1.2 实验分组和取材

12 只雄性 C57Bl/6 小鼠随机分为 2 组:假手术组(sham operation group, S 组):仅行开腹,分离 SMA 但不夹闭;肠缺血再灌注损伤组(I/R injury group, I/R 组):分离 SMA,微动脉夹夹闭之后缝合切口。60 min 后经原切口进腹,松开动脉夹,恢复血流进行再灌注。

建立小鼠肠缺血再灌注损伤模型成功,于再灌注后 2 h,在深麻醉下断颈处死实验动物。距回肠末端 5 cm 处相同部位取一约 1 cm 肠段,除去外膜脂肪组织,置于 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 12 h,常规石蜡切片,用于形态学检测。紧接其后取

5 cm 肠段, 4 ℃ PBS 溶液冲洗后置于冰面上迅速刮取肠黏膜后液氮保存, 用于 lncRNA 芯片筛选和验证, 采用 Array star 小鼠 lncRNA 芯片 V3.0 (上海康成生物技术有限公司)。

### 1.3 小肠组织光镜观察和病理学评分

小肠组织石蜡切片、HE 染色。在光学显微镜下观察 S 组和 I/R 组小鼠小肠黏膜形态学变化, 采用改良 Chiu's 评分法<sup>[5]</sup>对肠黏膜损伤程度进行评价, 评分越高, 表明损伤越严重(表 1)。

### 1.4 基因芯片筛选肠黏膜中差异 lncRNA 和 mRNA

Arraystar 小鼠 LncRNA V3.0 芯片可描述小鼠全局 lncRNA 和蛋白质编码转录本谱, 能够检测约 35 923 个 lncRNA 和 24 881 个编码转录本。

两组样品随机选择两组各 3 个样品, 经总 RNA 提取后, 采用 Agilent 表达谱芯片配套的 RNA 扩增及单标试剂盒并按标准操作流程, 对总 RNA 进行放大和标记, 并用 RNeasy Mini Kit (Qiagen) 纯化标记后的 cRNA, 并用 NanoDrop ND-1000 检测浓度和活性; 按照 Agilent 基因芯片试剂盒操作流程, 使用 Agilent surehyb 进行杂交实验。在滚动杂交炉中 65 ℃, 10 r/min ( $r=10\text{ cm}$ ), 滚动杂交 17 h, 杂交 cRNA 上样量为 1.65 μg, 并在洗缸中洗片; 完成杂交的芯片采用 Agilent DNA Microarray Scanner 芯片扫描, 用 Feature Extraction 软件 V11.0.1.1 读取数据, 用 Gene Spring GX V12.1 进行标准化处理, 把图像信号转化为数字信息。原始数据标准化后经过筛选高质量探针(某探针

在 6 个样品中至少有 3 个被标记为 Present 或 Marginal) 进行进一步分析。两组样品间具有统计学意义的差异表达 lncRNA 或差异表达 mRNA 通过  $P$ -value/FDR 筛选。两个样品间差异表达 lncRNA 或差异表达 mRNA 通过 Fold Change 筛选。

### 1.5 对差异 mRNA 的 GO 生物信息分析

对差异表达基因进行非监督层次聚类分析, 通过计算多个样品两两之间的距离, 构成距离矩阵; 随后合并距离最近的两类为一新类, 计算新类与当前各类的距离, 再合并、计算, 直至只有一类为止。用挑选的差异基因的表达情况来计算样品直接的相关性, 同一类样品能通过聚类出现在同一个簇中, 聚在同一个簇中的基因可能具有相似的生物学功能。

对筛选到的差异表达 mRNA 进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 分析, 这是基因功能国际标准分类体系。通过 GO 分类号和 GO 数据库相关分析工具将类别与具体基因联系起来, 从而对这个基因的功能进行描述。通过芯片的数据分析, 可以发现哪些变化的基因共同属于一个 GO 功能分支, 并用统计学方法测定该分类是否具有统计学意义, 从而得出这些变化基因各自可能参与的生物功能。

### 1.6 qRT-PCR 验证上下调最明显的差异 lncRNA

采用 Primer 5.0 软件设计上/下调最明显的 6 个差异长链非编码 RNA 的引物(表 2), 并由 Invitrogen 公司合成。按前述方法提取两组各 6 个

表 1 肠黏膜损伤的改良 Chiu's 评分  
Table 1 The modified Chiu score for intestinal mucosa injury

Score	Pathological changes
0	Normal villi and glands
1	Some top of villi changed and the Gruenhagen cavity began to form
2	Gruenhagen cavity formation, glandular slightly injured.
3	Increased subepithelial space, capillary congestion
4	Epithelium was moderately separated from the lamina propria, and glands were damaged
5	Some top villi falled off.
6	Villus falled off obviously and capillaries were dilated.
7	Villi of the lamina propria falled off and the glands were obviously damaged
8	Lamina propria began to digest and decompose
9	Bleeding, ulcer

表2 挑选长链非编码 RNA 双向引物序列表  
Table 2 Primers used for qRT-PCR

Seqname	Primer sequence	<i>t</i> /°C	Product Length/bp
GAPDH(MOUSE)	F:5' GTTGTCTCTGCGACTTCA3' R:5' GCCCCTCCTGTTATTATGG3'	60	293
uc007oua.1	F:5' CCAAGACAACATTCACCCCT3' R:5' CCCACAGAACACTTCCCTCA3'	60	163
ENSMUST00000129245	F:5' GAGTGTGCGGTCATTTCCA3' R:5' TGTGGCAAGAGTCCAAGTGC3'	60	244
AK014219	F:5' AGTAGCCTAGTCTAGCACCCA3' R:5' CCTTCTCCTAACTCCCTTC3'	60	86
ENSMUST00000122117	F:5' AATGTGGTCAATGGTCAGCC3' R:5' GACTTTATCTCCAGAATGTGCC3'	60	166
AK089510	F:5' AAGCCAGATAGGGCATAACAAGA3' R:5' GTCACCCGCAACTCAGAAGAT3'	60	168
NR_002865	F:5' GTGCGGAATCGACATCAAGAG3' R:5' CCGGGACCAACGATCACCC3'	60	75

样品的 RNA, 配制退火混合物, 混合液在 65 °C 水浴 5 min, 冰上放置 2 min。12 000 ×*g* 短暂离心后, 在离心管中依次加入 Reverse Transcriptase 反应液, 混合后 37 °C 恒温 1 min, 50 °C 温育 60 min, 70 °C 温育 15 min 使酶失活, 置冰浴待用或 -20 °C 保存。将所有 cDNA 样品分别配置 Realtime PCR 反应体系, 12 000 ×*g* 短暂离心。将 8 μL 混合液加到 384-PCR 板对应的每个孔中, 再加入对应的 2 μL cDNA, 小心粘上 Sealing Film 封口膜, 并短暂离心混合置于冰上, 最后置于 Realtime PCR 仪上进行 PCR 反应。

反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 1 min, 共 40 个循环。利用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 相对定量法分析, 以管家基因 GAPDH 为内参, 以非处理组为校准样本检测样品中长链非编码 RNA 的转录水平, 每个样品平行 3 次试验取均值进行计算。

### 1.7 共表达 CNC (coding-noncoding gene co-expression) 网络生物信息分析

1.7.1 结合 GO、Pathway 分析及文献支持, 比对芯片中差异肠 I/R 相关凋亡基因 根据第一部分芯片基因 GO、Pathway 分析的“凋亡”相关条目, 同时参考大量肠 I/R 文献报道的凋亡基因, 挑选代表性的 mRNAs, 并比对在本芯片中它们的差异变化, 观察 *P* 值。

1.7.2 将上述凋亡 mRNAs 和所有差异 lncRNA 进

行 CNC 共表达分析 将 lncRNA 基因标准化后的数据, 以及相同蛋白编码基因存在多个转录本时, 不同转录本的数据求均值作为作为基因的表达值。通过计算 Pearson 相关系数对上述凋亡 mRNA 和所有差异 lncRNA 之间的表达相关性 (标准化后的信号强度) 进行分析, 筛选 Pearson 相关系数绝对值 (*pcc*) ≥ 0.995, *FDR* ≤ 0.01, *P* < 0.05 的共表达关系对。根据上述 Pearson 相关系数结果, 利用 Cytoscape 工具绘制 lncRNA 和 mRNA 共表达的网络图。

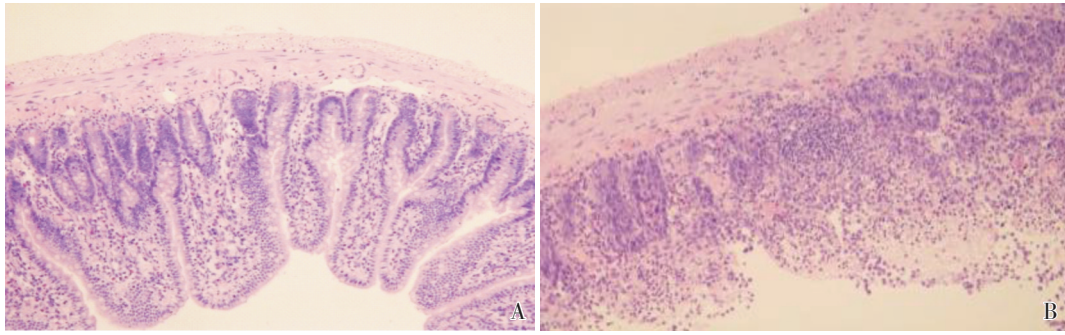
### 1.8 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件分析数据, 所有实验均重复 3 次, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示, 组间比较采用双侧 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义; 基因芯片部分实验结果利用 *t* 检验的 *P* 值和 Fold Change 倍数变化值进行差异基因筛选, 筛选的标准为上调或者下调倍数变化值 ≥ 2.0, 且 *P* 值 < 0.05。共表达分析以 Pearson 相关系数绝对值 (*pcc*) ≥ 0.995, *FDR* ≤ 0.01, *P* < 0.05 为条件筛选。

## 2 结果

### 2.1 小鼠小肠组织光学显微镜下形态学及改良 Chiu's 评分变化

再灌注 2 h 后, S 组小鼠的肠黏膜组织完整,



A: S group(sham); B: I/R group

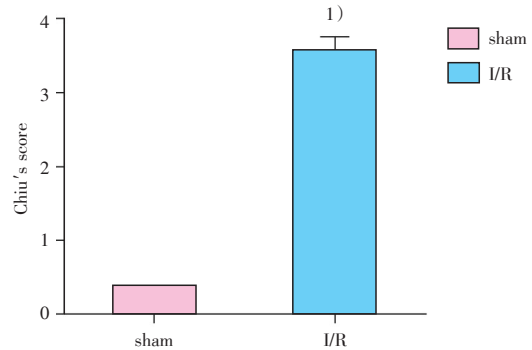
图1 小鼠小肠组织光学显微镜下形态学成像图(x200)

Fig.1 Morphological imaging of mouse intestinal mucosa under optical microscope(x200)

未见明显出血及炎症现象;I/R组小鼠的肠绒毛高度水肿,上皮细胞明显脱落,腺体损伤严重,上皮间隙扩大并与固有层分离,固有层水肿、肠黏膜出现大片的出血和溃疡,血管、淋巴管高度扩张,损伤明显(图1)。与S组( $0.37 \pm 0.18$ )比较,I/R组( $3.56 \pm 0.45$ )小鼠的小肠组织改良 Chiu's 评分升高,差异具有统计学意义( $t=15.842, P=0.000, n=6/\text{group}$ , 图2),表明本研究中小鼠肠缺血 60 min 再灌注 120 min 后,发生了肠损伤,该模型制备成功。

### 2.2 基因芯片筛选获得小鼠肠 I/R 损伤肠上皮中差异表达的 lncRNA 及 mRNA

结果对检出的原始芯片数据进行计算和分析,与S组比较,肠 I/R 损伤后小鼠肠上皮细胞中 lncRNA 及 mRNA 发生了明显改变( $P<0.05$ ),其上、下调前 20 位的 lncRNA 及 mRNA 聚类结果见图3。



The Chiu's score for mouse mucosal injury, 1) vs sham group,  $t=15.842, P=0.000, n=6/\text{group}$ .

图2 小鼠肠粘膜形态学改良 Chiu's 评分变化

Fig.2 The Chiu's score for mouse mucosal injury

总体上,I/R组筛选到差异表达的 lncRNA 共 3 602 个,其中差异表达上调的 lncRNA 有 1 503 个

表3 差异表达 10 倍以上上调的 lncRNA (I/R 比 Sham 组)

Table 3 Differentially expressed lncRNA (>10.0 fold change, I/R vs Sham) (n=3/group)

lncRNA seqname	Regulation	Type	Fold change	P-value	t-value
ENSMUST00000122117	up	intergenic	99.120	<0.000 1	21.110
ENSMUST00000139469	up	natural antisense	60.854	0.014 9	4.165
ENSMUST00000144610	up	intergenic	44.930	0.010 8	4.502
AK089510	up	natural antisense	24.533	0.002 3	6.908
ENSMUST00000156662	up	exon sense-overlapping	22.545	0.006 1	5.305
ENSMUST00000148552	up	intergenic	21.242	0.177 2	4.888
ENSMUST00000131854	up	exon sense-overlapping	19.215	<0.000 1	59.324
AK155161	up	intronic antisense	15.260	0.000 4	10.813
Uc008vch.2	up	exon sense-overlapping	12.505	0.024 1	4.535
NR_002865	up	intergenic	11.567	<0.000 1	16.838
uc009ebr.2	up	intergenic	11.182	0.000 2	13.269

表4 差异表达10倍以上上调的mRNA(I/R比Sham组)

Table 4 Differentially expressed mRNA (&gt;10.0 fold change, I/R vs Sham) (n=3/group)

Gene symbol	Regulation	Seqname	Fold change	P-value	t-value
<i>Try4</i>	up	NM_011646	327.818	<0.000 1	25.018
<i>Akp3</i>	up	NM_007432	88.514	0.022 4	3.816
<i>Try5</i>	up	NM_001003405	88.243	<0.000 1	32.070
<i>Ugt2b38</i>	up	NM_133894	44.923	0.010 1	4.797
<i>Gm766</i>	up	NM_001145390	44.876	0.015 3	4.363
<i>S100g</i>	up	NM_009789	42.301	0.009 5	4.867
<i>Tmprss15</i>	up	ENSMUST00000060402	34.338	0.019 7	3.964
<i>Slc40a1</i>	up	NM_016917	24.454	0.016 2	4.397
<i>Trpv6</i>	up	NM_022413	24.182	0.040 0	3.199
<i>Ivl</i>	up	NM_008412	23.129	0.004 6	5.915
<i>Prss2</i>	up	NM_009430	21.540	0.000 2	13.578
<i>Papss2</i>	up	NM_011864	16.433	0.018 1	4.268
<i>Hist1h1b</i>	up	NM_020034	16.237	0.003 0	6.648
<i>Trib1</i>	up	NM_144549	14.899	0.000 3	12.367
<i>Reg2</i>	up	NM_009043	13.208	0.012 4	4.528
<i>Reg1</i>	up	NM_009042	11.706	0.002 4	6.877
<i>Atp2a3</i>	up	NM_001163336	11.382	0.001 7	7.532
<i>Dusp5</i>	up	NM_001085390	11.369	<0.000 1	30.703
<i>Fosl2</i>	up	NM_008037	11.041	0.005 7	5.391
<i>Ifngr1</i>	up	NM_010511	10.904	0.002 4	6.831
<i>Atp2a3</i>	up	NM_016745	10.876	0.002 8	6.596
<i>Fos</i>	up	NM_010234	10.822	0.001 3	8.074
<i>Vmn1r53</i>	up	NM_053226	10.819	0.005 6	5.420
<i>Caprin1</i>	up	NM_016739	10.721	0.000 6	9.683
<i>Gm7120</i>	up	NM_001177666	10.601	0.009 7	4.955
<i>Atp2a3</i>	up	NM_001163337	10.297	0.001 6	7.642

(Fold change $\geq 2$ ,  $P < 0.05$ ); 差异表达下调的 lncRNA 有 2 099 个 (Fold change $\geq 2$ ,  $P < 0.05$ )。并且在此结果中, 差异倍数 10 倍以上升高的共 11 个 (表 3); 差异倍数 10 倍以上降低的共 313 个 (Fold change $\geq 10$ ,  $P < 0.05$ )。

此外, 基因芯片还筛选到差异表达的 mRNA 共 3 158 个, 其中差异表达上调的 mRNA 有 1 528 (Fold change $\geq 2$ ,  $P < 0.05$ ); 差异表达下调的 mRNA 有 1 630 个 (Fold change $\geq 2$ ,  $P < 0.05$ )。10 倍以上上调的有 26 个 (表 4), 10 倍以下下调的有 410 个 (Fold change $\geq 10$ ,  $P < 0.05$ )。经文献检索, 在上述上调的 mRNA 中, “*Trpv6*、*Fos*、*Papss2*、*Trib1*、*Reg2*、*Reg1*、*Dusp5*、*Fosl2*”可能跟凋亡相关<sup>[6-11]</sup>。

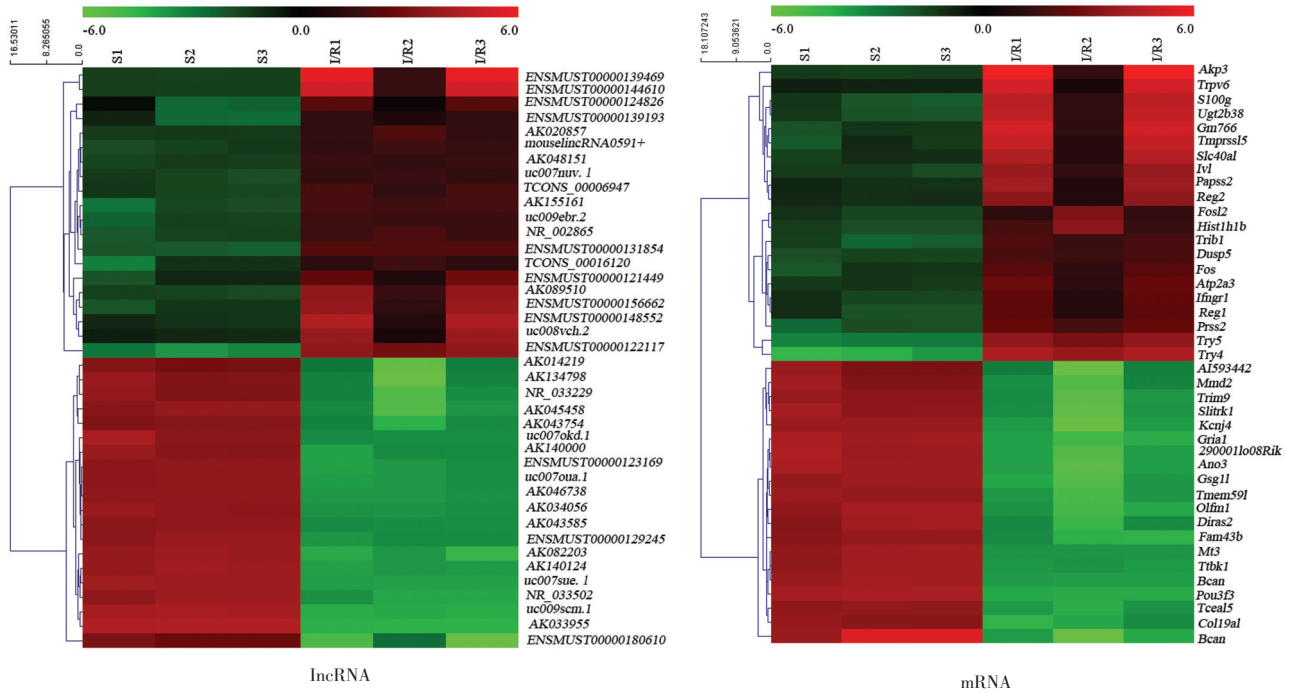
## 2.3 GO 数据分析

### 2.3.1 GO 分析差异表达的基因的生物学过程

基因芯片筛选小鼠肠 I/R 损伤中肠上皮差异基因分析如下: 上调的 mRNAs 主要与脂代谢过程、氧化还原反应、应激、正性调控凋亡过程/程序性细胞死亡、细胞周期、线粒体凋亡改变、MAPK 级联、凋亡的诱导/执行、炎症反应、p53 介导凋亡、钙离子等有关。差异下调表达相关 mRNA, 主要与多细胞生物信号、神经冲动转导、细胞分化、解剖结构发展、离子转运、化学稳态、分泌、细胞生长发育、Wnt 受体信号通路、负向调控凋亡、内皮细胞增殖、组织重构、VEGF 受体信号通路等有关 (图 4)。

### 2.3.2 GO 分析中的“凋亡”相关条目

从本芯片



Hierarchical clustering showed the top 20 of 10.0 fold change of lncRNA and mRNA expression profile between the two groups and homogeneity within groups. The color from green to red indicates that the level of transcription is from low to high.  $n=3/\text{group}$

图3 前20位的10倍以上差异表达的lncRNA和mRNA聚类图(I/R比Sham组)

Fig.3 The top 20 of hierarchical clustering about 10 fold change of lncRNA and mRNA expression profile (I/R vs Sham)

GO分析的结果中,我们发现差异变化的基因富含了大量的“凋亡”相关功能条目(表5),共29条,其中包括:凋亡的外源性/内源性阶段,凋亡的诱导/执行,凋亡的正性/负性调控,以及不同细胞定位和类型的凋亡调控等。

#### 2.4 实时荧光定量PCR验证上/下调最明显的差异lncRNA

在芯片中,随机挑选了6个显著差异表达的lncRNA,其中3个上调(ENSMUST00000122117、AK089510、NR\_002865),3个下调(uc007oua.1、ENSMUST00000129245、AK014219)。

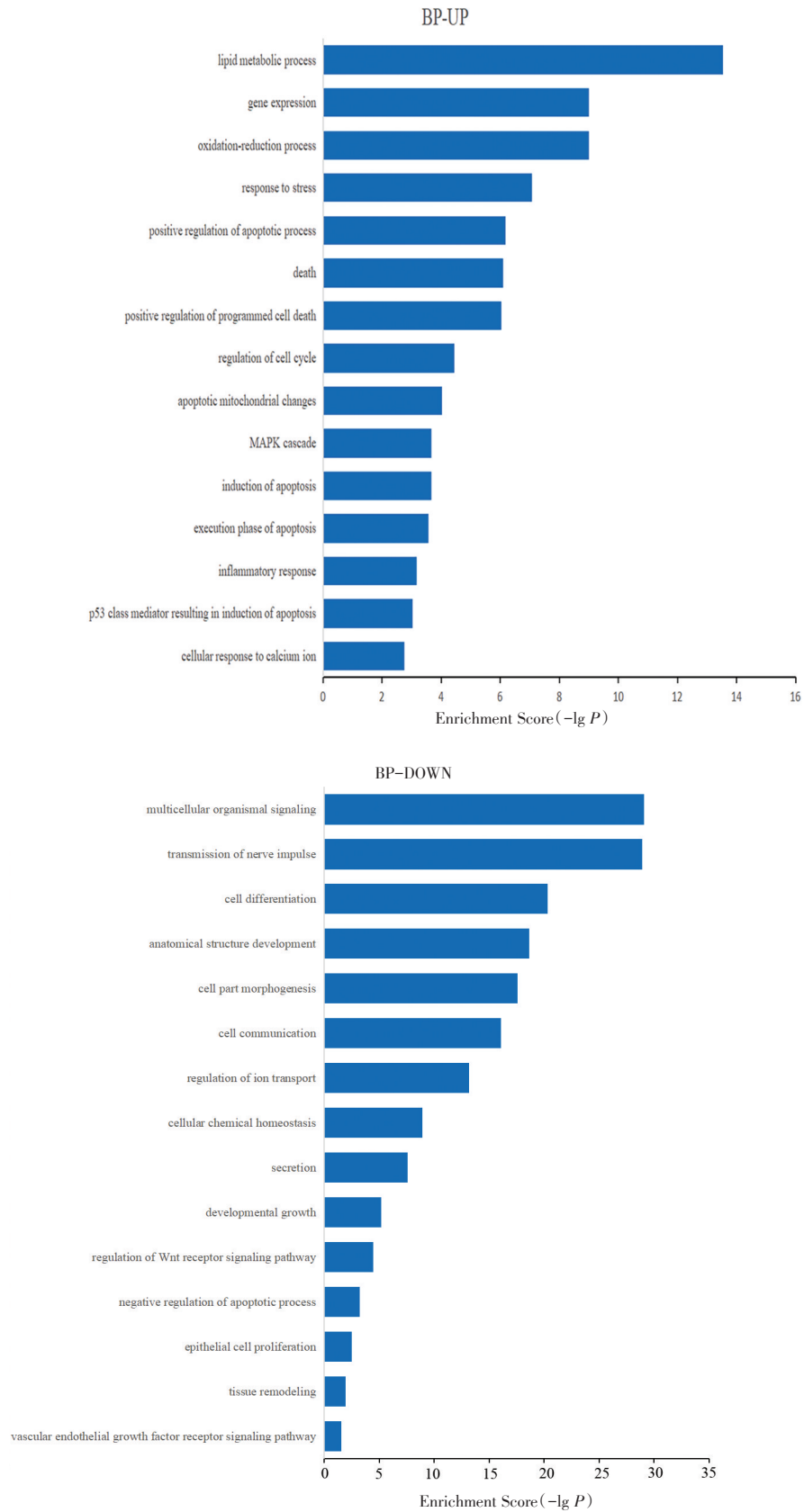
经实时定量PCR验证发现:与假手术组样本表达水平相比,AK089510( $t=8.499, P=0.0118$ )、NR\_002865( $t=8.518, P=0.0058$ )在I/R样本内的表达水平显著升高,具有显著统计学意义,而另外两个ENSMUST00000129245( $t=7.760, P=0.0253$ )、AK014219( $t=5.850, P=0.0450$ )在I/R样本内的表达水平明显降低(图5);其中AK089510上调的倍数最高,ENSMUST00000129245下调的倍数最

高。qRT-PCR结果与基因芯片表现出较好的一致性。

#### 2.5 将上述验证的lncRNA和所有差异mRNA进行CNC共表达分析

2.5.1 结合go、pathway分析及文献支持,挑选差异凋亡相关基因,在芯片结果中比对信息。通过在芯片GO、Pathway分析结果中上调的凋亡mRNA中进行比对,挑选了与肠I/R文献表达相符的10个mRNA,分别为:Stat3、Vdac1、Casp8、Fasl、Gadd45a、Casp6、Dusp6、Aifm1、Atf4、Bad(表6)<sup>[12-15]</sup>。

2.5.2 经过CNC共表达生物信息学分析,将10个凋亡mRNA和存在高度相关性的lncRNA构建了共表达网络关系图。通过分析上述10个mRNA和芯片所有差异lncRNA的CNC共表达关系,尤其关注第一部分已行qPCR验证的4个lncRNA(AK089510、NR\_002865、ENSMUST00000129245、AK014219),构成了如下具有高度相关性的CNC共表达网络关系图(图6、表7)。



The predominant 10–15 highest enriched GO terms in biological process targeted by upregulated and downregulated transcripts.

图4 GO分析差异表达的基因的生物学过程

Fig.4 Biological process of GO analysis for differentially expressed mRNAs

表5 凋亡相关GO分析条目  
Table 5 Apoptosis associated GO analysis items

GO.ID	Term	Count	Enrichment score	P value
GO:0006917	induction of apoptosis	33	1.938	<0.001
GO:0097194	execution phase of apoptosis	15	2.791	<0.001
GO:0008624	induction of apoptosis by extracellular signals	8	3.822	<0.001
GO:0072332	signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis	7	4.267	<0.001
GO:0008629	induction of apoptosis by intracellular signals	10	2.719	0.003
GO:0045767	regulation of anti-apoptosis	8	2.525	0.012
GO:0045768	positive regulation of anti-apoptosis	6	2.525	0.029
GO:0006916	anti-apoptosis	19	1.591	0.030
GO:0042771	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis	4	3.214	0.032
GO:0043065	positive regulation of apoptotic process	59	1.960	<0.001
GO:0006915	apoptotic process	118	1.479	<0.001
GO:0042981	regulation of apoptotic process	95	1.496	<0.001
GO:0008637	apoptotic mitochondrial changes	12	3.595	<0.001
GO:0097190	apoptotic signaling pathway	15	2.821	<0.001
GO:0043525	positive regulation of neuron apoptotic process	9	3.535	<0.001
GO:0097285	cell-type specific apoptotic process	27	1.663	0.006
GO:2001235	positive regulation of apoptotic signaling pathway	6	3.421	0.007
GO:2001244	positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	4	4.714	0.008
GO:0002902	regulation of B cell apoptotic process	4	4.419	0.010
GO:2001233	regulation of apoptotic signaling pathway	7	2.578	0.017
GO:0006921	cellular component disassembly involved in apoptotic process	5	3.048	0.021
GO:2001242	regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	4	3.367	0.028
GO:0097191	extrinsic apoptotic signaling pathway	5	2.678	0.036
GO:0097193	intrinsic apoptotic signaling pathway	5	2.599	0.040
GO:0060561	apoptotic process involved in morphogenesis	3	3.535	0.049
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	57	1.560	<0.001
GO:0010660	regulation of muscle cell apoptotic process	6	3.917	0.003

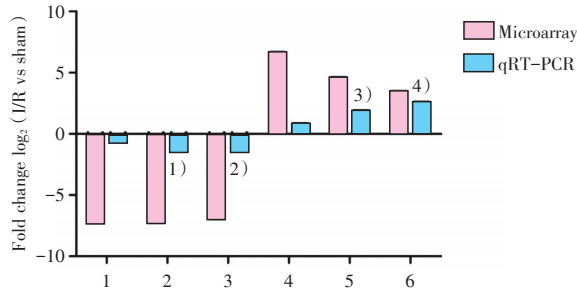
CNC共表达结果示,上述凋亡mRNA和大量差异表达的lncRNA存在高度相关性,是一对多的关系。在此图中共有726个结点,其中10个为上述mRNA,其余716个为lncRNA,它们共同组成了885对高度相关的共表达基因对。

红色为芯片所有差异表达的lncRNA,绿色为经qPCR验证的lncRNA,蓝色node为挑选的差异凋亡mRNA。图中实线表示两个结点内的基因之间存在正相关性,虚线则表示两个两个结点内的基因之间存在负相关性,mRNA和lncRNA对的共表达程度用实线或虚线的长度进行表示。

### 3 讨论

#### 3.1 肠I/R后小鼠肠上皮细胞lncRNA表达谱发生显著变化

近年来,曾被误认为基因转录“暗物质”的长链非编码RNA成为研究的热点。在人类基因组中,和大约只有1%比例的具有蛋白编码功能的RNA相比,占绝大部分比例的lncRNA虽然没有或很少具有蛋白质编码功能,但却被发现参与了重要的生物学功能,如调控细胞增殖、细胞周期、细



1: uc007oua.1; 2: ENSMUST00000129245; 3: AK014219; 4: ENSMUST00000122117; 5: AK089510; 6: NR\_002865. Three upregulated and three downregulated differentially expressed lncRNA were validated by qRT-PCR in samples from 3 sham and 3 I/R subjects. Each sample was analyzed in triplicate. Gene expression was normalized to GAPDH expression and calculated by  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. The heights of the columns in the chart represented the mean fold changes  $\log_2$ (ischemia reperfusion/sham) in the expression between I/R group and sham group. The qRT-PCR results were consistent with microarray data. In qRT-PCR validation, 1) vs sham group,  $t=7.760$ ,  $P=0.0253$ ; 2) vs sham group,  $t=5.850$ ,  $P=0.0450$ ; 3) vs sham group,  $t=8.499$ ,  $P=0.0118$ ; 4) vs sham group,  $t=8.518$ ,  $P=0.0058$ ,  $n=6$ /group.

图5 随机挑选6个lncRNA的microarray和qRT-PCR验证结果比较

Fig.5 Comparison of 6 randomly selected lncRNAs expression level between microarray and qRT-PCR validation

表6 挑选的10个凋亡mRNA在芯片结果中的比对信息  
Table 6 Ten apoptosis associated and differentially expressed mRNA in the microarray profiling  
(n=3/group)

Gene Symbol	Fold change	Regulation	P value	t value
<i>Stat3</i>	4.06	up	0.0043	5.804
<i>Vdac1</i>	3.66	up	0.0150	4.484
<i>Casp8</i>	2.97	up	0.0358	3.112
<i>Fasl</i>	2.91	up	0.0008	9.227
<i>Gadd45a</i>	2.85	up	0.0010	8.685
<i>Casp6</i>	2.45	up	0.0061	5.286
<i>Dusp6</i>	2.28	up	0.0418	2.955
<i>Aifm1</i>	2.23	up	0.0200	3.745
<i>Atf4</i>	2.21	up	0.0004	10.852
<i>Bad</i>	2.06	up	<0.0001	17.886

表7 4个验证的lncRNA与上述凋亡相关mRNA的共表达分析

Table 7 The co-expression analysis of 4 validated lncRNA and the above apoptosis associated mRNA

Gene Symbol	Seqname	pcc	pcc_group	FDR
<i>Casp6</i>	AK089510	0.995	+	0.0028
<i>Gadd45a</i>	AK089510	0.996	+	0.0026
<i>Fasl</i>	NR_002865	0.997	+	0.0020
<i>Bad</i>	ENSMUST00000129245	-0.997	-	0.0022

FDR: false discovery rate.

胞分化、细胞凋亡等<sup>[16]</sup>。lncRNA的异常表达与人类疾病密切相关,比如肿瘤、代谢性疾病等,且在相关领域中有望成为诊断和治疗的新型靶点<sup>[17-18]</sup>。然而,lncRNA的变化和作用在器官I/R损伤的研究中只是冰山一角<sup>[19-21]</sup>,尤其在肠I/R中尚无深入而全面的报道。

本研究成功的复制了小鼠肠缺血再灌注模型,并且在SMA缺血60 min再灌注120 min的时间点获取肠黏膜组织,应用Arraystar小鼠lncRNA V3.0基因芯片技术对其进行差异表达lncRNA的筛选。结果显示,与假手术组相比,肠I/R后小鼠肠上皮细胞lncRNA表达谱发生了显著变化。经聚类分析发现,总共有3602个lncRNA发生了差异性表达,其中差异倍数2倍以上共有上调lncRNA 1503个,下调2099个;差异倍数10倍以上的共有11个lncRNA上调,313个下调。

与此同时,本芯片筛选出小鼠肠I/R后mRNA在肠上皮细胞的表达也发生了明显的改变。差异表达的mRNA总共有3158个,其中差异倍数2倍以上共有1528个上调,1630个下调;差异倍数10倍以上26个上调,410个下调。

为了进一步验证芯片结果的可靠性,我们结合lncRNA差异倍数、P值、长度、表达水平等多种方法,挑选了6个lncRNA行实时定量PCR检测,结果发现AK089510、NR\_002865、ENSMUST00000129245和AK014219的验证结果和芯片一致;其中AK089510上调的倍数最高,ENSMUST00000129245下调的倍数最高。该结果提示AK089510、NR\_002865、ENSMUST00000129245、AK014219在肠I/R损伤的

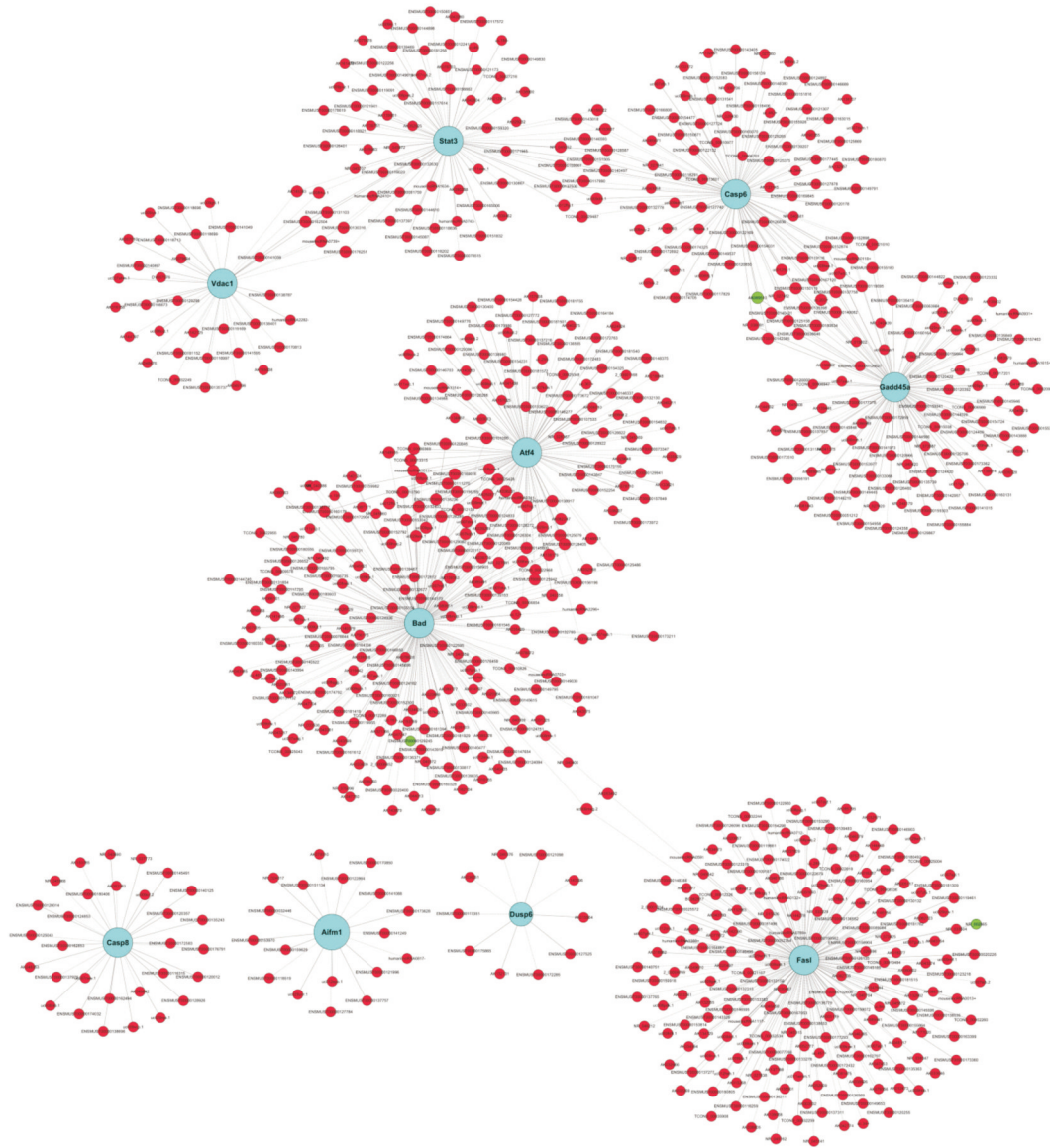


图6 10个凋亡 mRNA 和其高度相关的 lncRNA 共表达网络图 ( $pcc \geq 0.995$ ,  $FDR \leq 0.01$ )

Fig.6 The co-expression networks of 10 apoptosis associated mRNAs and their highly correlated lncRNAs ( $pcc \geq 0.995$ ,  $FDR \leq 0.01$ )

发生发展中可能发挥了重要功能,为后继研究打下基础。

### 3.2 凋亡是肠 I/R 后小鼠肠上皮差异 lncRNA 表达谱富集的重要功能

肠缺血再灌注损伤是一个多因素作用的复杂病理生理过程,受氧化应激、氧自由基、钙超载、细胞因子、细菌感染及内毒素刺激、肠道菌群和毒素移位、免疫反应等多因素独立或共同作用<sup>[22-23]</sup>。本研究结果通过计算 GO 分析的富集指数分析出,上调的 mRNA 主要与脂代谢过程、氧化

还原反应、应激、正性调控凋亡过程/程序性细胞死亡、细胞周期、线粒体凋亡改变、MAPK 级联、凋亡的诱导/执行、炎症反应、p53 介导凋亡、钙离子等有关。同时,差异下调表达相关 mRNA 主要与多细胞生物信号、神经冲动转导、细胞分化、解剖结构发展、离子转运、化学稳态、分泌、细胞生长发育、Wnt 受体信号通路、负向调控凋亡、内皮细胞增殖、组织重构、VEGF 受体信号通路等有关。上述 GO 分析主要富集的功能,符合既往 I/R 损伤方向特别是肠 I/R 损伤研究的经典理论,该结果在本

lncRNA 芯片中得到了很好的体现,同时也提示了芯片结果的可靠性。

特别值得注意的是,在位居前15位的重要GO功能中,“凋亡”这一过程,在上调和下调基因参与的生物学进程中都占有重要位置。尤其是上调的GO分子功能条目的注释结果显示,涉及“apoptosis”这一术语相关的子条目在GO分子功能条目的注释结果中反复多次出现,并且富集指数排在前列,同时涵盖了线粒体凋亡、内质网应激、内源性/外源性凋亡、凋亡诱导/执行等绝大部分重要的凋亡经典过程;这一现象提示肠I/R过程中“凋亡”功能发生了显著改变,不仅符合既往对肠I/R损伤肠上皮细胞死亡方式的解读<sup>[24-26]</sup>,也再一次提示了凋亡可能是其主要的死亡方式。

### 3.3 差异表达的lncRNA和凋亡基因间有着极其密切的共表达网络关系

由于lncRNA不编码蛋白,其生物学功能的注释复杂而困难。然而,基因芯片筛选lncRNA时,也筛选了同时差异表达的mRNA,我们可以从已知功能的mRNA角度出发,通过CNC共表达分析计算出与该mRNA具有相同表达模式的lncRNA,剔选出表达显著相关的lncRNA-mRNA关系对;通过这些熟知mRNA的功能,来推导lncRNA的功能,将lncRNA与特定生物学进程联系起来,从而利于揭示其作用和相关机制<sup>[27]</sup>。

因此在本部分研究中,我们挑选了芯片中代表性的已知凋亡相关mRNA与所有差异表达的lncRNA进行了共表达分析。这些mRNA较全面

涉及了caspase依赖(线粒体、死亡受体、内质网)/非caspase依赖、内源性/外源性凋亡的经典通路,同时在本研究芯片mRNA筛选结果中均为显著差异表达( $P < 0.05$ )。结果显示,大量的差异lncRNA和凋亡mRNA存在着高度相关性( $\text{pcc} \geq 0.995$ ,  $\text{FDR} \leq 0.01$ ),为一对多的关系,构成了复杂的共表达网络,提示有大量的lncRNA可能通过这些凋亡相关基因,参与了肠I/R损伤“凋亡”机制的调控。

并且,本研究中4个已验证的lncRNA和部分高度相关的凋亡mRNA间极有可能存在调控关系:AK089510正调控*Casp6*和*Gadd45a*,NR\_002865正调控*Fasl*,ENSMUST00000129245负调控*Bad*,提示这些高度相关的共表达mRNA与上述4个lncRNA具有极其相同的表达模式,极有可能是后者调控凋亡的靶基因,下一步我们将在后继的功能和机制研究中进行验证。

总之,在本研究中我们首次采用了lncRNA V3.0芯片技术对小鼠肠I/R肠黏膜样本进行了研究,揭示了肠上皮细胞lncRNA和mRNA的表达情况,成功建立了肠黏膜上皮细胞在肠I/R后早期的差异变化lncRNA基因表达谱,为后续相关领域提供了重要的数据基础。同时,通过生物信息学深入分析lncRNA的功能角色,GO富集出调控“凋亡”是其参与肠I/R损伤的重要功能,CNC分析出差异常表达的lncRNA和凋亡基因间有着极其密切的共表达网络关系,构建出高度相关的lncRNA-凋亡相关mRNA关系对,将为进一步深入研究差异表达lncRNA的功能和机制提供方向。

#### 参考文献

- [1] Mallick IH, Yang W, Winslet MC, et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury [J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(9): 1359-1377.
- [2] Martin B. Prevention of gastrointestinal complications in the critically ill patient [J]. *AACN Adv Crit Care*, 2007, 18(2): 158-166.
- [3] Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, et al. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium [J]. *Gut*, 1998, 42(4): 530-537.
- [4] Li J, Tian H, Yang J, et al. Long noncoding RNAs regulate cell growth, proliferation, and apoptosis [J]. *DNACell Biol*, 2016, 35(9): 459-470.
- [5] Liu KX, Chen SQ, Huang WQ, et al. Propofol pretreatment reduces ceramide production and attenuates intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. *Anesth Analg*, 2008, 107(12): 1884-1891.
- [6] Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53 [J]. *Oncogene*, 2003, 22(36): 5586-5591.
- [7] Soubeyrand S, Naing T, Martinuk A, et al. ERK1/

- 2 regulates hepatocyte Trib1 in response to mitochondrial dysfunction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3405-3414.
- [8] Jung SH, Lee HC, Yu DM, et al. Heparan sulfation is essential for the prevention of cellular senescence [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 417-429.
- [9] Ling L, Zhang SH, Zhi LD, et al. MicroRNA-30e promotes hepatocyte proliferation and inhibits apoptosis in cecal ligation and puncture-induced sepsis through the JAK/STAT signaling pathway by binding to FOSL2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 411-419.
- [10] Liu L, Liu JL, Srikant CB. Reg2 protects mouse insulinoma cells from streptozotocin-induced mitochondrial disruption and apoptosis [J]. *Growth Factors*, 2010, 28(5): 370-378.
- [11] Fecher-Trost C, Wissenbach U, Weissgerber P. TRPV6: From identification to function [J]. *Cell Calcium*, 2017, 67: 116-122.
- [12] 王鹏, 陈嘉勇, 袁勇. 肠缺血再灌损伤与肠粘膜细胞凋亡的关系 [J]. *昆明医学院学报*, 2009(3B): 285-289.  
Wang P, Chen JY, Yuan Y. The relationship between intestinal ischemia-reperfusion injury and apoptosis in intestinal mucosa [J]. *J Kunming Med Coll*, 2009(3B): 285-289.
- [13] Rao J, Qin J, Qian X, et al. Lipopolysaccharide preconditioning protects hepatocytes from ischemia/reperfusion injury (IRI) through inhibiting ATF4-CHOP pathway in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65568.
- [14] Moore-Olufemi SD, Olufemi SE, Lott S, et al. Intestinal ischemic preconditioning after ischemia/reperfusion injury in rat intestine: Profiling global gene expression patterns [J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(7): 1866-1877.
- [15] Yuan S, Fu Y, Wang X, et al. Voltage-dependent anion channel 1 is involved in endostatin-induced endothelial cell apoptosis [J]. *FASEB J*, 2008, 22(8): 2809-2820.
- [16] Sun M, Kraus WL. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(1): 25-64.
- [17] He Y, Meng XM, Huang C, et al. Long noncoding RNAs: Novel insights into hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(1): 20-27.
- [18] Zhao XY, Lin JD. Long Noncoding RNAs: A New Regulatory Code in Metabolic Control [J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(10): 586-596.
- [19] Dharap A, Nakka VP, Vemuganti R. Effect of focal ischemia on long noncoding RNAs [J]. *Stroke*, 2012, 43(10): 2800-2802.
- [20] Zhao F, Qu Y, Liu J, et al. Microarray profiling and co-expression network analysis of LncRNAs and mRNAs in neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Scientific Report*, 2015, 9: 13850.
- [21] Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2014, 115(7): 668-677.
- [22] Mallick IH, Yang W, Winslet MC, et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury [J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 9(9): 1359-1377.
- [23] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Ischemia/reperfusion [J]. *Compr Physiol*, 2016, 7(1): 113-170.
- [24] Baylor AE, Diebel LN, Liberati DM, et al. The synergistic effects of hypoxia/reoxygenation or tissue acidosis and bacteria on intestinal epithelial cell apoptosis [J]. *J Trauma*, 2003, 55(2): 241-247.
- [25] Wen SH, Li Y, Li C, et al. Ischemic postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury and mucosal cell apoptosis by inhibiting JAK/STAT signaling activation [J]. *Shock*, 2012, 38(4): 411-419.
- [26] Azuara D, Sola A, Hotter G, et al. Apoptosis inhibition plays a greater role than necrosis inhibition in decreasing bacterial translocation in experimental intestinal transplantation [J]. *Surgery*, 2005, 137(1): 85-91.
- [27] Zhang W, Dong R, Diao S, et al. Differential long noncoding RNA/mRNA expression profiling and functional network analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 30-32.

(编辑 孙慧兰)