DOI:10.16016/j.2097-0927.202203181

低叶酸联合甲氨蝶呤诱导神经管畸形胎鼠模型的 lncRNA 相关 ceRNA 网络构建及分析

曾雨冰[1],刘 帆[1,2],裴 培[1],王 珊[1] 100020 北京,首都儿科研究所,北京市儿童发育组学重点实验室[1];100020 北京,北京协和医学院研究生院[2]

[**摘要**] **目的** 构建低叶酸联合甲氨蝶呤(methotrexate,MTX)诱导神经管畸形(neural tube defect,NTDs)的胎鼠模型中 lncRNA 相关的竞争性内源 RNA(competing endogenous RNAs,ceRNA)调控网络,探讨低叶酸条件下 NTDs 中 lncRNA 可能的调控作用。**方法** 利用 SPF 级、7~8 周龄的健康雌性 C57BL/6J 小鼠(体质量 18~22 g)40 只及健康雄性 C57BL/6J 小鼠(体质量 20~22 g)20 只,建立叶酸缺乏情况下的 NTDs 胎鼠模型为实验组,并设立对照组,每组选取 3 只胎鼠分离脑组织并提取总 RNA,进行高通量 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq),并对测序结果进行 lncRNA-mRNA 共表达网络构建、对共表达网络中 mRNA 进行 GO 功能富集及 KEGG 通路富集分析、构建 lncRNA 相关 ceRNA 调控网络,并用 qPCR 验证胎鼠、细胞样本中 lncRNA Xist、Sema4f、Padi2 的相对表达量。**结果** 测序共检测到差异 lncRNA 47 个($Log_2FC>0.585$ 或 $Log_2FC<-0.585$,FDR<0.05),其中上调 38 个,下调 9 个。构建 lncRNA 和 mRNA 基因间的共表达网络,并对共表达网络关系中的 mRNA 进行 KEGG/GO 功能富集分析,发现 GO 条目中管道发育($P<0.001$)、胶原蛋白代谢过程($P=0.002$)、系统发育($P=0.002$)等显著富集,在 KEGG 通路分析中富集到与 NTDs 密切相关的 PI3K-Akt 通路;构建 lncRNA 相关 ceRNA 调控网络,发现 lncRNA Xist、LOC102633899、1700086L19Rik 等靶向差异基因 Sema4f、Padi2、Lin28a 等;选取与神经发育密切相关的 lncRNA Xist 及预测的靶基因 Sema4f、Padi2,用 qPCR 验证胎鼠脑组织、细胞样本,结果与测序一致,相较对照组,均显著下调($P<0.05$)。**结论** 在叶酸缺乏下的 NTDs 胎鼠模型中 lncRNA Xist 及预测的靶基因 Sema4f、Padi2 发生显著下调。

[**关键词**] 神经管畸形;表观遗传学;长非编码 RNA;竞争性内源 RNA
[**中图法分类号**] R394.1; R591.424; R742.89 [**文献标志码**] A

Construction and analysis of lncRNA-related ceRNA network in mouse model of methotrexate-induced neural tube defect under folate deficiency

ZENG Yubing[1], LIU Fan[1,2], PEI Pei[1], WANG Shan[1] [1]Beijing Key Laboratory of Child Development and Nutriomics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020; [2]Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing, 100020, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a regulatory network of long noncoding RNA (lncRNA)-related competing endogenous RNAs (ceRNA) in low folate combined with methotrexate (MTX) induced neural tube defects (NTDs) mouse model, and to explore the potential lncRNAs regulation in low folate-induced NTDs. **Methods** Forty SPF-grade 7~8-week-old healthy female C57BL/6J mice (body weight 18~22 g) and 20 healthy male C57BL/6J mice (20~22 g) were selected to this experiment. After a folate deficiency induced fetal mouse NTD model was successfully established, the embryonic brain tissues were extracted for total RNA and RNA high-throughput sequencing (RNA-seq) was performed. The results of RNA-seq were used to carry

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(82071690);首都儿科研究所所级基金(FX-2020-05,CXYJ-2-21-09)
[**通信作者**] 王 珊,E-mail:wsaquarius@sina.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

out co-expression network construction, GO function enrichment of mRNA in co-expression network and KEGG pathway enrichment analysis, construction of lncRNA-related ceRNA regulation network and other bioinformatics analysis. And the relative expression of lncRNA Xist, Sema4f and Padi2 in the fetal mouse and cell samples was verified by qPCR. **Results** A total of 47 differential lncRNAs ($Log_2FC > 0.585$ or $Log_2FC < -0.585$, $FDR < 0.05$) were detected by RNA-seq, of which 38 were up-regulated and 9 were down-regulated. The co-expression network between lncRNA and mRNA was constructed. The results of KEGG/GO analysis on mRNAs in the co-expression network indicated that tube development ($P < 0.001$), collagen metabolic process ($P = 0.002$), system development ($P = 0.002$) and other significant enrichments were highly relevant to NTDs. Besides, KEGG pathway analysis displayed that the PI3K-Akt pathway was closely related to NTDs; lncRNA Xist, LOC102633899, 1700086L19Rik and other targeting differential genes Sema4f, Padi2, Lin28a were found in the lncRNA-related ceRNA network. qPCR confirmed that the above results in the fetal mice and cell samples under folic acid deficiency, with consistent corresponding sequences, and obviously down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** In folic acid deficiency-induced mouse NTD model, lncRNA Xist, and its targeting genes Sema4f and Padi2 are obviously down-regulated.

[**Key words**] neural tube defects; epigenetics; long noncoding RNA; competing endogenous RNA

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82071690) and the Funds of Capital Institute of Pediatrics (FX-2020-05, CXYJ-2-21-09). Corresponding author: WANG Shan, E-mail: wsaquarius@sina.com

神经管畸形(neural tube defect,NTDs)是由于胚胎发育早期神经管闭合异常造成的一类先天性畸形,脊柱裂和无脑畸形是最常见的 NTDs 表型。导致 NTDs 发生的危险因素已有大量文献报道,如叶酸缺乏、药物等,其中叶酸缺乏是导致 NTDs 最重要的因素,可引起多种表观遗传修饰的改变,最终导致 NTDs 的发生[1-2]。

据统计,非编码 RNA(non-coding RNA,ncRNA)占人类转录组的比例约为98%,而编码 RNA 所占比例不到 2%[3]。其中长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,占人类非编码转录组的 80%,大部分不编码蛋白质,但后续研究中逐步发现 lncRNA 在转录、转录后、翻译或翻译后阶段以各种机制与其他生物分子相互作用来影响基因活性[4]。异常的 lncRNA 表达可引起严重损害脑功能的疾病发生,如胶质瘤、精神分裂症、阿尔茨海默病、发育迟缓和自闭症。在胚胎发育、中枢神经系统发育和神经干细胞分化过程中,许多 lncRNA 存在显著动态变化的表达模式,参与调控发育、分化及细胞重编等过程,发育动态的 lncRNA 表现出发散型、反义转录本等的过度表达,使得与蛋白编码的基因更相似[5-6]。另有研究发现,lncRNA 基因位点通常位于发育转录因子附近,lncRNA 产物可作为转录因子调控远端基因,此外,包含 DNA 调控元件的 lncRNA 在某些情况下作用于邻近基因[7]。因此,lncRNA 的发育动态表达反映了更复杂的转录调控。

lncRNA、circRNA 等多种类型 RNA 可以通过 miRNA 应答元件(microRNA response elements, MREs),吸附 microRNA(miRNA)后产生“竞争”关系,间接参与调控 mRNA 的表达水平[8]。lncRNA 与 miRNA 呈负调控关系,且 miRNA 和 ceRNA 呈现相互调控作用[9]。研究发现,lncRNA 相关 ceRNA 在发育过程中起重要作用,尤其是在神经系统[10-15]。这些研究进一步说明了 ceRNA 在发育过程中参与了重要调控。在 NTDs 中,已有关于 miRNA 表达谱变化及 miRNA 对 mRNA 负调控的报道,但 lncRNA 通过 ceRNA 机制对低叶酸相关 NTDs 的调控作用未见报道[16]。因此,本研究通过构建 NTDs 小鼠模型,对 lncRNA 相关 ceRNA 网络进行深入探讨,筛选差异的 lncRNA 及靶向基因,为今后研究叶酸缺乏相关的 NTDs 发生机制及疾病的预防诊疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

研究采用 SPF 级、7~8 周龄的健康雌性 C57BL/6J 小鼠(体质量 18~22 g)40 只及健康雄性 C57BL/6J 小鼠(体质量 20~22 g)20 只,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。低叶酸饲料及正常饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,MTX 购自 Sigma 公司,生理盐水购自中国大冢制药有限公司,RNeasy® mini kit 试剂盒购自 QIAGEN 公司,小鼠胚胎干细胞(Mouse embryonic stem cells,mESCs) Sv/129 细胞系来自首都

儿科研究所细胞库,磷酸盐缓冲溶液(PBS)、Dulbecco改良的Eagle培养基、胎牛血清购自Gibco公司,非必需氨基酸、谷氨酸、β-巯基乙醇、明胶购自Invitrogen公司,小鼠白血病抑制因子购自Millipore公司,T25细胞培养瓶购自Corning公司,琼脂糖购自Biosharp公司,TAE溶液购自北京索莱宝科技有限公司,BlasTaq 2X Qpcr MasterMix及5× All-In-One MasterMix购自ABM公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 选取上述40只雌性小鼠分为正常饲喂组与低叶酸联合MTX诱导NTDs组,20只/组,5只/笼,另选取20只雄性小鼠,5只/笼。实验饲养期间小鼠均处于SPF级环境中,温湿度、饲料及饮用水均符合国家标准饲养条件,全过程保证各组小鼠自由饮食。

1.2.2 NTDs胎鼠模型制备 正常饲喂组的雌性小鼠及全部雄性小鼠均提供正常繁殖饲料喂养,低叶酸联合MTX诱导NTDs组小鼠采用特制低叶酸饲料,两组饮用水一致,无特殊处理,保证设施环境维持12 h光/暗循环。两组小鼠自由饮食4周后,选取成熟C57BL/6J雄鼠个体,按雌雄比例2∶1交配过夜,于次日8:00观察到阴道栓,指定为受孕0.5 d;受孕7.5 d时,以1.5 mg/kg用量对低叶酸联合MTX诱导NTDs组雌性小鼠腹腔注射MTX,正常饲喂组雌性小鼠使用等剂量生理盐水进行腹腔注射;至受孕13.5 d,对妊娠小鼠实施颈椎脱臼处死,取出胎鼠,其中正常饲喂组选取发育正常胎鼠、低叶酸联合MTX诱导NTDs组选取NTDs表型明显的胎鼠置预冷的PBS中取出胎脑,于液氮中保存。详细参考课题组前期NTDs胎鼠模型建立方法[17]。

1.2.3 叶酸缺乏的细胞模型制备 制备叶酸缺乏组细胞的培养基:在Dulbecco改良的Eagle培养基中添加0.1 mmol/L β-巯基乙醇、0.1 mmol/L非必需氨基酸、0.1 mmol/L谷氨酸、15%胎牛血清、1 000 U/mL小鼠白血病抑制因子。叶酸正常组细胞的培养基需额外添加浓度为4 mg/L叶酸。

将mESCs复苏后放入提前涂有浓度为0.2%明胶的T25细胞培养瓶,放置在37 ℃、5% CO_2的加湿培养箱中,每2~3天传代1次,传至6代后收集细胞并提取RNA。具体实验方法可参考课题组既往报道[2]。

1.2.4 提取总RNA 按照RNeasy® mini kit试剂盒说明书操作步骤提取胎鼠脑的总RNA,测定其浓度,并用Agilent2200检测质量,检测合格后,可进行后续文库制备与测序工作。

1.2.5 cDNA文库制备及RNA测序 使用NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina进行cDNA文库的制备,并用Agilent2200进行定量。标记的cDNA文库以相等的比例汇聚在一起,并在Illumina HiSeqXTen中进行测序,使用Fast-QC软件对原始测序数据的质量进行GC含量、质量值的位置分布等方面的整体评估,去除接头及低质量序列,得到clean reads文件。

1.2.6 筛选差异基因并构建ceRNA调控网络 利用软件hisat2将clean reads与小鼠参考基因组进行比对,进一步统计得到染色体上分布及基因组结构分析情况,miRNA部分通过与小鼠的miRNA数据库进行比对得到miRNA表达情况。

用EBSeq对mRNA、miRNA、lncRNA进行差异基因筛选,筛选条件为:$Log_2FC>0.585$或<-0.585,FDR<0.05。miranda及RNAhybrid软件对差异显著的miRNA分别进行差异靶基因lncRNA和差异靶基因mRNA的预测(miranda筛选条件:Score≥140且Energy<−15,RNAhybrid筛选条件:Energy<−20);取两种算法的交集作为靶基因预测的最终结果;挑选出miRNA和lncRNA、miRNA和mRNA呈负相关的关系条目,令lncRNA、miRNA和mRNA三者的调控趋势分别为:up-down-up或down-up-down,构建lncRNA-miRNA-mRNA形式的ceRNA调控网络。

1.3 qPCR验证目标基因的相对表达量

选择与神经发育关系密切的lncRNA Xist及预测靶基因Sema4f、Padi2进行qPCR验证。提取的胎鼠脑组织及细胞总RNA样本经浓度为1%的琼脂糖凝胶在TAE溶液中电泳,检测RNA质量合格后,用5× All-In-One MasterMix试剂盒反转录为cDNA,再以cDNA为模板进行qPCR反应,将小鼠管家基因GAPDH作为内参。引物序列如下所示:lncRNA Xist上游:5′-AGCCAGTTACGCCAAGAATTAGGAC-3′,下游:5′-CCCGCAAATGCTACCACAAATCAAG-3′;Sema4f上游:5′-AGCTAAAACATGACTGCAACAG-3′,下游:5′-TCTGAGATAGGCTGTATCCGTA-3′;Padi2上游:5′-AGGCAGGAGGATGACCAAGGTG-3′,下游:5′-AGTCAGCCAGTCGGAGTAGAGTTC-3′。实验独立重复3次,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量。

1.4 统计学方法

应用GraphPad prism 8软件进行统计分析,计量资料进行方差齐性检验,数据用$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用独立样本t检验,$P<0.05$认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NTDs胎鼠模型建造情况

通过对适龄母鼠喂养低叶酸饲料,并在孕7.5 d

时对母鼠进行腹腔注射 MTX,可成功诱导出具有明显 NTDs 表型的胎鼠。通过体式显微镜观察,可见:正常饲喂组胎鼠外观上较为饱满圆润,各脑室发育良好,神经管已完全闭合;低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组胎鼠整体体积小于对照组胎鼠,并表现出脊柱裂、脑膨出等提示 NTDs 的表型(图 1)。

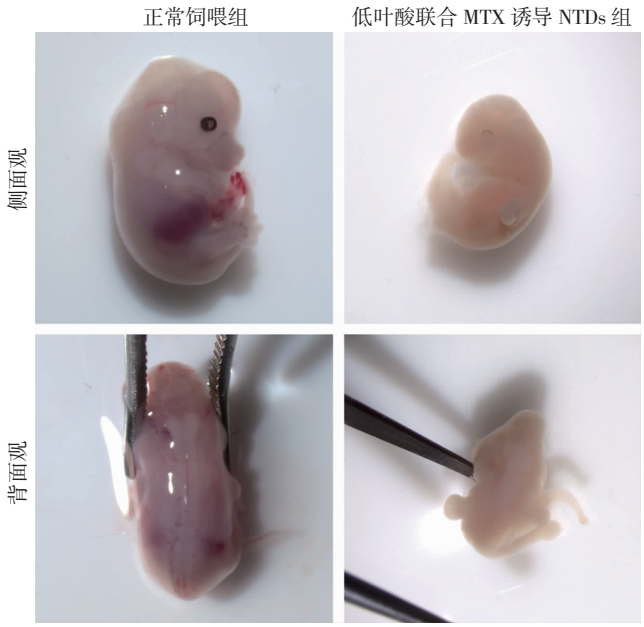


图 1 正常饲喂组及低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组胎鼠背侧面观

2.2 lncRNA 差异基因情况

通过高通量测序检测到具有显著差异的 lncRNA 共 47 个,有 38 个上调:LOC101056120、Gm20784、Gm8185、Gm4017、LOC102638475、LOC102637279、Gm6659、Mir103-2、Gm13136、Gm10421、LOC102632488 等;9 个下调:LOC102636519、Rpl19-ps1、LOC102636376、Xist、Gm4544、AK157302、LOC102634818、LOC102636563、LOC102638279(图 2)。

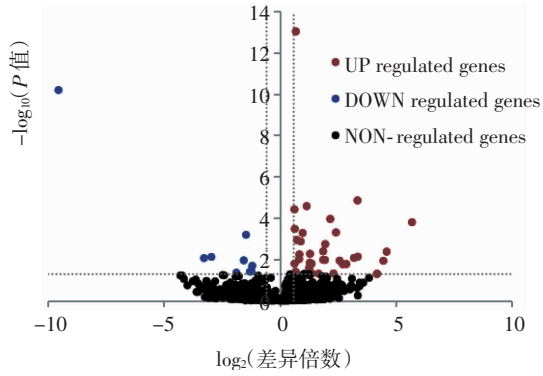


图 2 正常饲喂组和低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组胎鼠脑组织的差异 lncRNA 分布火山图

运用 GraphPad 8.0 对 NTDs 组和对照组中差异显著的 lncRNA 绘制热图(图 3),红色表示相对高表达,绿色表示相对低表达。图中可直观地观察到 lncRNAs 在正常组织与 NTDs 疾病模型中表达差异情况,为后续研究 lncRNAs 调控 NTDs 发生发展提供依据。

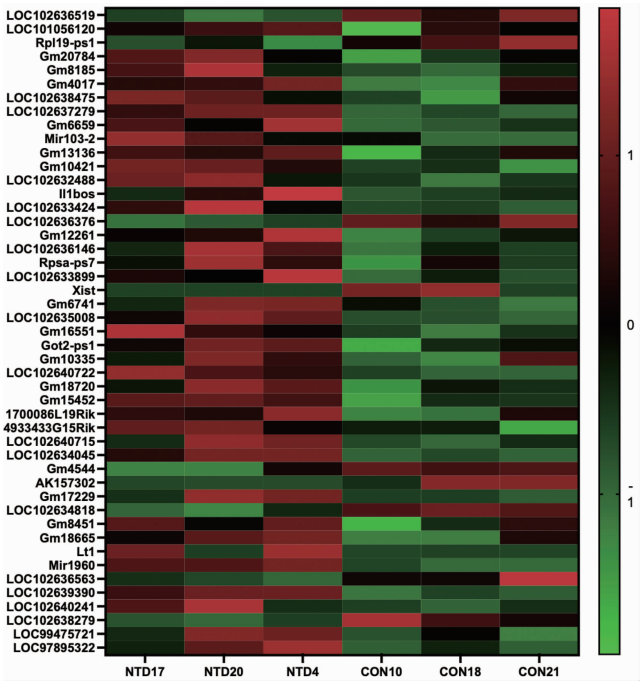


图 3 正常饲喂组和低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组胎鼠脑组织中具有显著差异的 lncRNA 热图

2.3 差异 lncRNA-mRNA 关联分析及共表达关系网络构建

为进一步探究 NTDs 模型中 lncRNA 与 mRNA 的共表达情况,将具有显著差异的 lncRNA 和 mRNA 进行共表达分析,实验组共关联 132 个 mRNA,46 个 lncRNA,对照组共关联 143 个 mRNA,39 个 lncRNA,共关联 919 对。利用在线网站 g:profiler(g:Profiler——a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists(ut.ee))、DAVID(https://david.ncifcrf.gov/home.jsp)、KOBAS(http://kobas.cbi.pku.edu.cn/index.php)进行 GO(表 1)及 KEGG(图 4)分析,得到关联的 mRNA 功能富集情况,其中与神经及发育相关且具有显著差异的 GO 条目如表 1 所示,KEGG 通路富集情况如图 4 所示。并基于 lncRNA-mRNA 分析结果,分别对正常饲喂组(图 5A)与低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组(图 5B)构建 lncRNA-mRNA 共表达关系网络,实线表示正相关,虚线表示负相关。

表 1　胎鼠脑组织差异 lncRNA-mRNA 共表达分析中 mRNA 的 GO 功能分析

GO 条目	编码	*P* 值
管道发育	GO:0035295	<0.001
胶原蛋白代谢过程	GO:0032963	0.002
系统发育	GO:0048731	0.002
多细胞生物发育	GO:0007275	0.003
心室心肌组织发育	GO:0003229	0.004
组织发育	GO:0009888	0.015
动物器官形态发生	GO:0009887	0.022
动物器官发育	GO:0048513	0.022
解剖结构形态发生	GO:0009653	0.025
解剖结构发育	GO:0048856	0.039

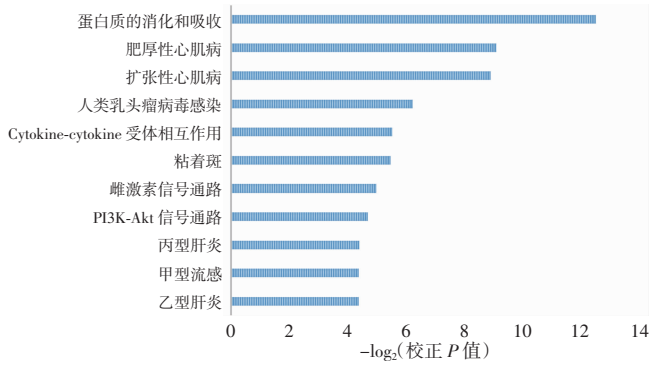
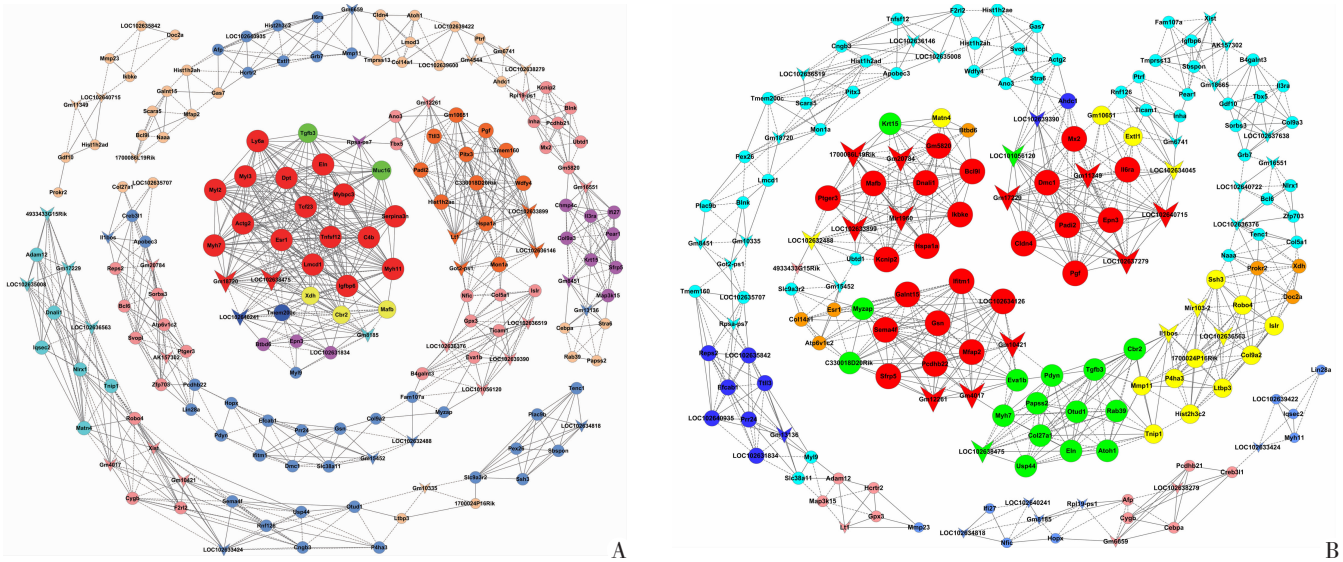


图 4　胎鼠脑组织差异 lncRNA-mRNA 共表达分析中 mRNA 的 KEGG 富集分析



A:正常饲喂组 lncRNA-mRNA 共表达网络图;B:低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组 lncRNA-mRNA 共表达网络图

图 5　胎鼠脑组织差异 lncRNA-mRNA 共表达网络图

2.4　lncRNA-miRNA-mRNA 的 ceRNA 网络构建

基于 miRanda 及 RNAhybrid 预测得到的结果,得到 18 对 lncRNA-miRNA-mRNA 调控关系,根据此构建 lncRNA-miRNA-mRNA 的 ceRNA 网络(图 6)。结果显示:Xist、LOC102633899、1700086L19Rik 等 lncRNA 通过对 mmu-miR-302d-5p、mmu-miR-98-5p、mmu-miR-196b-5p、mmu-miR-20b-5p、mmu-let-7i-5p、mmu-miR-28c 产生负调控作用,靶向差异基因 Sema4f、Padi2、Lin28a、Doc2a、Cngb3、Gas7、Nfic、Chmp4c、Scara5、Cygb、LOC102634126,提示 NTDs 可能受 lncRNA 相关 ceRNA 机制的网络调控。

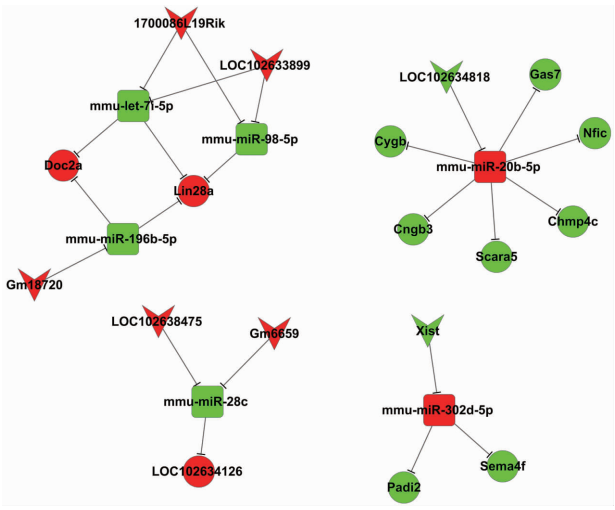
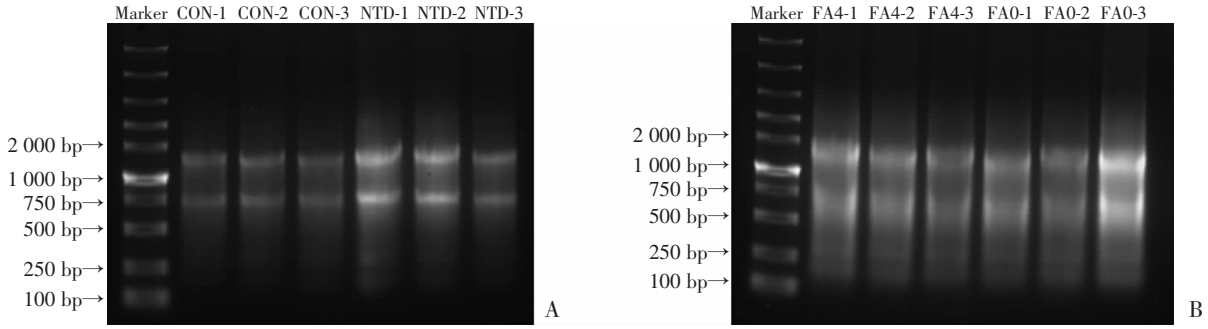


图 6　胎鼠脑组织差异 lncRNA-miRNA-mRNA 的 ceRNA 调控网络

2.5 lncRNA Xist、Padi2 和 Sema4f 相对表达量的检测结果

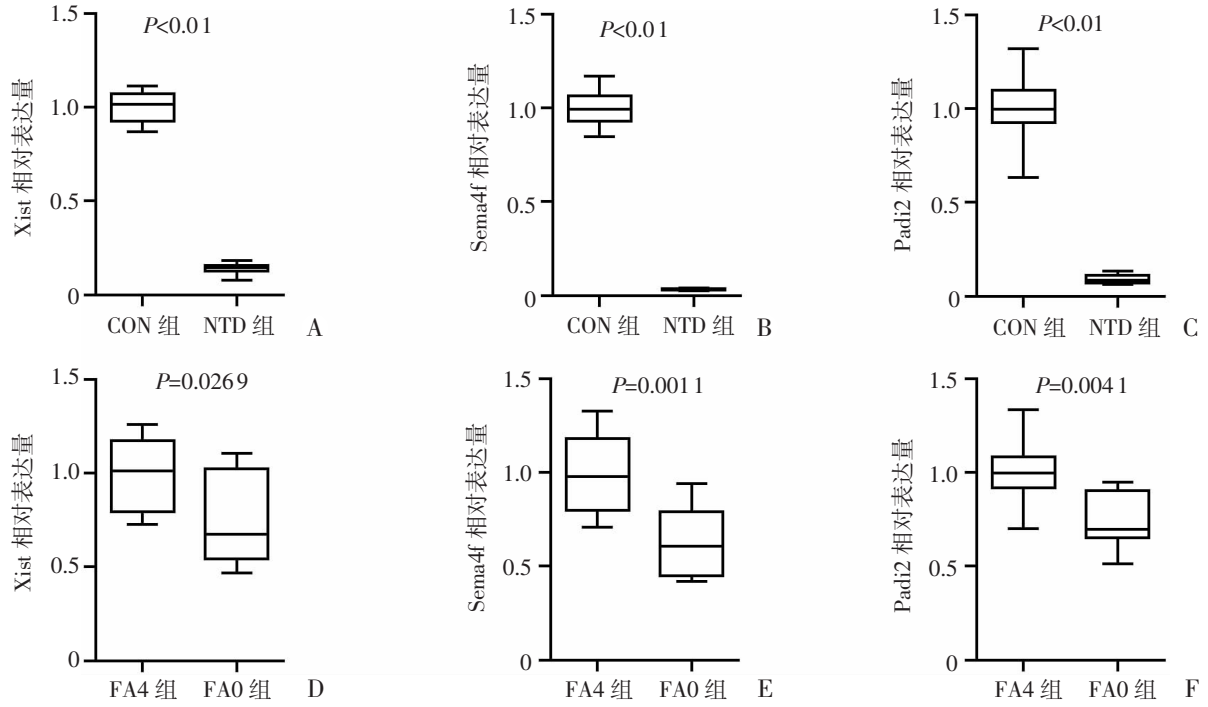
经琼脂糖凝胶进行电泳检测 RNA 质量,胶图显示条带清晰、完整,质量合格,可进行后续 qPCR 验证(图 7)。对重点关注的 lncRNA Xist 及下游靶基因 Padi2、Sema4f 通过 qPCR 实验分别在 NTDs 胎鼠脑组织及叶酸缺乏的 mESCs 中验证高通量测序结果。实验结果显示,与对照组相比,NTDs 胎鼠脑组织中,lncRNA Xist 及下游靶基因 Padi2、Sema4f 均表现出明显的下调趋势(图 8),在两组间的差异均具有统计学意义($P<0.05$);在叶酸缺乏的 mESCs 中,上述基因也同样表现出显著下调趋势($P<0.05$)。实验结果显示 lncRNA Xist 及下游靶基因的相对表达水平变化与测序结果一致。



A:提取的胎鼠脑组织的 RNA 电泳图;B:提取的 mESCs 的 RNA 电泳图

CON-1、CON-2、CON-3:正常饲喂组样本,NTD-1、NTD-2、NTD-3:低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组样本;FA4-1、FA4-2、FA4-3:叶酸正常组样本,FA0-1、FA0-2、FA0-3:叶酸缺乏组样本

图 7 提取的胎鼠脑组织及 mESCs 的 RNA 电泳结果



CON:正常饲喂组,NTD:低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组;FA4:叶酸正常组,FA0:叶酸缺乏组

A、B、C:qPCR 检测胎鼠脑组织中 lncRNA Xist、Sema4f、Padi2 相对表达量;D、E、F:qPCR 检测 mESCs 中 lncRNA Xist、Sema4f、Padi2 相对表达量

图 8 qPCR 检测胎鼠脑组织及 mESCs 中 lncRNA Xist、Sema4f、Padi2 相对表达水平($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

3 讨论

NTDs 是严重的先天性畸形。流行病学研究提示,全球每 33 名出生的婴儿中就有 1 名患有 NTDs。近年来,由于我国人民生活水平明显改善,NTDs 发病率大幅度下降[18]。NTDs 是外界环境因素与遗传因素共同作用引起的疾病,但其发病的具体分子机制尚不明确。研究显示,叶酸、维甲酸、肌醇等摄入不足可通过相关基因,进而导致甲基化异常、翻译后修饰改变等表观遗传调控失常,这提示环境因素在 NTDs 发病机制中占据关键作用[2, 19-20]。叶酸缺乏是诱发 NTDs 最重要的环境因素,叶酸作为辅酶参与一碳代谢,可对重要生物分子(脂质、氨基酸、DNA)进行甲基化修饰。叶酸缺乏可导致贫血、生殖异常和胚胎发育障碍等问题[21]。多项随机对照试验表明,高剂量叶酸(4 mg)是预防同一母体孕育胎儿再次发生神经管缺陷的重要因素,并且,高剂量叶酸可显著预防低剂量叶酸(0.4 mg)后神经管缺陷的首次发生[22]。lncRNA 作为进化保守的非编码 RNA,通过多种机制参与调控发育、分化、细胞重编等,其表达的改变与许多疾病有关,对脑发育的作用尤为重要[7]。因此,探究 lncRNA 在叶酸缺乏下对 NTDs 发生所产生的作用是十分有必要的。

3.1 构建低叶酸联合 MTX 诱导的 NTDs 胎鼠模型及叶酸缺乏的 mESCs 细胞模型

MTX 作为抗叶酸类抗代谢药,可抑制二氢叶酸还原酶,使二氢叶酸无法还原成有生理活性的四氢叶酸,从而使嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸生物合成过程中的一碳基团转移作用受阻,抑制 DNA 的生物合成[23]。课题组前期研究显示,在低叶酸饲料喂养 4 周后,选择在受孕 7.5 d 时按照 1.5 mg/kg 的剂量对小鼠进行腹腔注射 MTX,发现 NTDs 发生率最高。因此,通过低叶酸联合 MTX 的方式成功诱导具有 NTDs 表型的胎鼠模型,对探究叶酸缺乏情况下 NTDs 的发生发展具有重要意义。此外,构建叶酸缺乏的 mESCs 细胞模型,有助于进一步从细胞层面上证实,叶酸缺乏对筛选到的相关基因表达存在调控关系。

3.2 构建低叶酸联合 MTX 诱导的 NTDs 胎鼠模型的 lncRNA 相关 ceRNA 网络

本研究建立低叶酸联合 MTX 诱导的 NTDs 胎鼠模型,通过高通量测序,筛选差异 lncRNA 基因,构建 lncRNA-mRNA 共表达网络,并对共表达网络中的 mRNA 进行 GO/KEGG 功能富集分析。GO 分析中显示,lncRNA-mRNA 共表达网络中的 mRNA 参与了管道发育、胶原蛋白代谢过程、系统发育等生物学过程($P<0.05$),提示该 lncRNA-mRNA 共表达网络可能与胚胎发育存在密切联系;KEGG 通路富集分析显示,PI3K-Akt 信号通路存在显著富集($P<0.05$),该通路已被证实与 NTDs 发生有密切关系[24];后续基于 lncRNA-miRNA-mRNA 调控关系,构建 lncRNA 相关 ceRNA 调控网络,结果显示 Xist、LOC102633899、1700086L19Rik 等 lncRNA 对 Sema4f、Padi2、Lin28a、Gas7、Nfic 等靶基因起调控作用。研究认为 lncRNA Xist 可以影响神经管的正常发育[25];Lin28a 耗竭可引起小头畸形的发生[26];Gas7 在神经系统中表达丰富,并在脊椎动物的神经发生过程中发挥重要作用[27];在 NTDs 小鼠模型中,Nfic 的异常升高可在神经管闭合期间破坏细胞稳态,引起 NTDs 的发生[28]。因此,在 NTDs 胎鼠模型中构建 lncRNA 相关 ceRNA 网络,预测相应的靶基因,对进一步探究 lncRNA 如何调控 NTDs 的发生发展至关重要。

3.3 lncRNA Xist 及预测靶基因 Sema4f、Padi2 相对表达量上调与叶酸缺乏条件下的 NTDs 存在调控关系

LncRNA Xist 作为 X 染色体失活的主要调节者,在胚胎发育早期平衡对性染色体基因的剂量补偿。据报道,雌性胚胎 NTDs 样本中存在 Xist 基因的表达异常,p53 基因通过调控 Xist 水平影响神经管闭合,提示 Xist 表达与神经管发育有密切关系[25]。ceRNA 调控网络假说为 lncRNA 和 mRNA 之间的调控作用研究增加了更多的探索方向,还为后续发现新的诊断或预后生物标志物奠定了基础。许多研究表明,诸多 lncRNA 可作为癌症的生物标志物,如 HOTAIR、THCAT126 等[29]。既往研究中 lncRNA Xist、Sema4f 及 Padi2 亦因在乳腺癌及多形性胶质母细胞瘤中异常表达被认为是重要的潜在生物标志物[30-32]。本研究发现,叶酸缺乏的 NTDs 小鼠胎脑组织中 lncRNA Xist 及预测靶基因 Sema4f、Padi2 的表达均出现异常。Sema4f、Padi2 或许可作为 NTDs 的潜在生物标志物,以供进一步研究。

既往 NTDs 相关研究中尚未发现构建 lncRNA 相关 ceRNA 网络的报道,本研究在低叶酸联合 MTX 诱导的 NTDs 胎鼠模型中构建了 lncRNA 相关 ceRNA 调控网络,有助于理解 lncRNA 相关 ceRNA 作用机制在低叶酸条件下 NTDs 中的作用,为后续进一步探明 lncRNA 在 NTDs 分子层面上的异常调控机制及临床诊疗提供重要依据。

参考文献：

[1] HUANG Y, LIN S S, JIN L, *et al*. Decreased global DNA hydroxymethylation in neural tube defects: association with polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Epigenetics, 2019, 14(10): 1019 - 1029. DOI: 10.1080/15592294.2019.1629233.

[2] PEI P, CHENG X Y, YU J, *et al*. Folate deficiency induced H2A ubiquitination to lead to downregulated expression of genes involved in neural tube defects[J]. Epigenetics Chromatin, 2019, 12(1): 69. DOI: 10.1186/s13072-019-0312-7.

[3] 杨飞龙, 洪锴, 赵国江, 等. 基于长链非编码RNA的生物信息学分析构建膀胱癌预后模型并确定预后生物标志物[J]. 北京大学学报(医学版), 2019, 51(4): 615-622. DOI:10.19723/j.issn.1671-167X.2019.04.003.
YANG F L, HONG K, ZHAO G J, *et al*. Construction of prognostic model and identification of prognostic biomarkers based on the expression of long non-coding RNA in bladder cancer via bioinformatics[J]. J Peking Univ Heal Sci, 2019, 51(4): 615-622. DOI:10.19723/j.issn.1671-167X.2019.04.003.

[4] RAMAKRISHNAIAH Y, KUHLMANN L, TYAGI S. Towards a comprehensive pipeline to identify and functionally annotate long noncoding RNA (lncRNA)[J]. Comput Biol Med, 2020, 127: 104028. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2020.104028.

[5] SARROPOULOS I, MARIN R, CARDOSO-MOREIRA M, *et al*. Developmental dynamics of lncRNAs across mammalian organs and species[J]. Nature, 2019, 571(7766): 510-514. DOI:10.1038/s41586-019-1341-x.

[6] ANDERSEN R E, LIM D A. Forging our understanding of lncRNAs in the brain[J]. Cell Tissue Res, 2018, 371(1): 55-71. DOI:10.1007/s00441-017-2711-z.

[7] ANG C E, TREVINO A E, CHANG H Y. Diverse lncRNA mechanisms in brain development and disease[J]. Curr Opin Genet Dev, 2020, 65: 42-46. DOI:10.1016/j.gde.2020.05.006.

[8] THOMSON D W, DINGER M E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(5): 272-283. DOI:10.1038/nrg.2016.20.

[9] ZHANG P J, WU W Y, CHEN Q, *et al*. Non-coding RNAs and their integrated networks[J]. J Integr Bioinform, 2019, 16(3): 20190027. DOI:10.1515/jib-2019-0027.

[10] HAN T S, HUR K, CHO H S, *et al*. Epigenetic associations between lncRNA/circRNA and miRNA in hepatocellular carcinoma[J]. Cancers, 2020, 12(9): 2622. DOI:10.3390/cancers12092622.

[11] VALLONE C, RIGON G, GULIA C, *et al*. Non-coding RNAs and endometrial cancer[J]. Genes, 2018, 9(4): 187. DOI:10.3390/genes9040187.

[12] YU N H, LIANG Y, ZHU H, *et al*. CsA promotes XIST expression to regulate human trophoblast cells proliferation and invasion through miR-144/titin axis[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(8): 2208-2218. DOI:10.1002/jcb.25867.

[13] DU M R, ZHOU W H, YAN F T, *et al*. Cyclosporine A induces titin expression *via* MAPK/ERK signalling and improves proliferative and invasive potential of human trophoblast cells[J]. Hum Reprod, 2007, 22(9): 2528-2537. DOI:10.1093/humrep/dem222.

[14] ZHANG L, XUE Z Y, YAN J, *et al*. LncRNA Riken-201 and Riken-203 modulates neural development by regulating the Sox6 through sequestering miRNAs[J]. Cell Prolif, 2019, 52(3): e12573. DOI:10.1111/cpr.12573.

[15] WANG D, CHEN Y P, LIU M W, *et al*. The long noncoding RNA Arrl1 inhibits neurite outgrowth by functioning as a competing endogenous RNA during neuronal regeneration in rats[J]. J Biol Chem, 2020, 295(25): 8374-8386. DOI:10.1074/jbc.RA119.011917.

[16] ZHANG J, YANG L H, YU J, *et al*. Alteration of the microRNA expression profile and identification of miRNA/mRNA negative regulation pairs in neural tube defects[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2019, 51(7): 761-765. DOI:10.1093/abbs/gmz050.

[17] 裴培, 崔小岱, 张霆, 等. 低叶酸联合甲氨蝶呤诱导神经管畸形小鼠模型的建立[J]. 中华神经外科杂志, 2019, 35(2): 193-196. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2019.02.020.
PEI P, CUI X D, ZHANG T, *et al*. Methotrexate-induced neural tube defects mouse model under folate deficient condition[J]. Chin J Neurosurg, 2019, 35(2): 193-196. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2019.02.020.

[18] ENDALIFER M L, DIRESS G. Epidemiology and determinant factors of neural tube defect: narrative review[J]. Surg Neurol Int, 2020, 11: 81. DOI:10.25259/SNI_84_2020.

[19] YU J, WANG L, PEI P, *et al*. Reduced H3K27me3 leads to abnormal Ho_x gene expression in neural tube defects[J]. Epigenetics Chromatin, 2019, 12(1): 76. DOI:10.1186/s13072-019-0318-1.

[20] GREENE N D E, LEUNG K Y, COPP A J. Inositol, neural tube closure and the prevention of neural tube defects[J]. Birth Defects Res, 2017, 109(2): 68-80. DOI:10.1002/

bdra.23533.

[21] NADERI N, HOUSE J D. Recent developments in folate nutrition[J]. Adv Food Nutr Res, 2018, 83: 195-213. DOI:10.1016/bs.afnr.2017.12.006.

[22] VALENTIN M, COSTE MAZEAU P, ZERAH M, *et al*. Acid folic and pregnancy: a mandatory supplementation[J]. Ann Endocrinol (Paris), 2018, 79(2): 91-94. DOI:10.1016/j.ando.2017.10.001.

[23] MAKSIMOVIC V, PAVLOVIC-POPOVIC Z, VUKMIROVIC S, *et al*. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(6): 4699-4708. DOI:10.1007/s11033-020-05481-9.

[24] TIAN T, LAI X Y, XIANG K H, *et al*. Hypermethylation of PI3K-AKT signalling pathway genes is associated with human neural tube defects[J]. Epigenetics, 2022, 17(2): 133-146. DOI:10.1080/15592294.2021.1878725.

[25] DELBRIDGE A R D, KUEH A J, KE F, *et al*. Loss of p53 causes stochastic aberrant X-chromosome inactivation and female-specific neural tube defects[J]. Cell Rep, 2019, 27(2): 442-454.e5. DOI:10.1016/j.celrep.2019.03.048.

[26] YANG M, YANG S L, HERRLINGER S, *et al*. Lin28 promotes the proliferative capacity of neural progenitor cells in brain development[J]. Development, 2015, 142(9): 1616-1627. DOI:10.1242/dev.120543.

[27] HUNG F C, SHIH H Y, CHENG Y C, *et al*. Growth-arrest-specific 7 gene regulates neural crest formation and craniofacial development in zebrafish[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(24): 2943-2951. DOI: 10.1089/scd.2015.0146.

[28] HUANG W Q, HUANG T C, LIU Y S, *et al*. Nuclear factor I-C disrupts cellular homeostasis between autophagy and apoptosis *via* miR-200b-Ambra1 in neural tube defects[J]. Cell Death Dis, 2021, 13(1): 17. DOI:10.1038/s41419-021-04473-2.

[29] IYER M K, NIKNAFS Y S, MALIK R, *et al*. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome[J]. Nat Genet, 2015, 47(3): 199-208. DOI:10.1038/ng.3192.

[30] SALAMA E A, ADBELTAWAB R E, EL TAYEBI H M. XIST and TSIX: novel cancer immune biomarkers in PD-L1-overexpressing breast cancer patients[J]. Front Oncol, 2020, 9: 1459. DOI:10.3389/fonc.2019.01459.

[31] SHERGALIS A, BANKHEAD A 3rd, LUESAKUL U, *et al*. Current challenges and opportunities in treating glioblastoma[J]. Pharmacol Rev, 2018, 70(3): 412-445. DOI:10.1124/pr.117.014944.

[32] MCELWEE J L, MOHANAN S, GRIFFITH O L, *et al*. Identification of PADI2 as a potential breast cancer biomarker and therapeutic target[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 500. DOI:10.1186/1471-2407-12-500.

(**收稿**:2022-03-21;**修回**:2022-08-07)

(编辑 栾 嘉)