

· 实验研究 ·

基于 RNA-seq 技术的单眼形觉剥夺模型大鼠视皮层差异基因筛选、鉴定及功能分析

孙娅玲¹ 严兴科² 刘安国²¹甘肃中医药大学第一临床医学院,兰州 730000;²甘肃中医药大学针灸推拿学院,兰州 730000

通信作者:刘安国,Email:lagkll@126.com

【摘要】 目的 借助全转录组测序(RNA-seq)技术对右眼形觉剥夺模型大鼠视皮层差异表达基因进行筛选和生物学功能分析。**方法** 将 18 只 14 日龄 SD 幼鼠按照随机数字表法随机分为空白对照组和单眼形觉剥夺组,每组 9 只。其中单眼形觉剥夺组幼鼠采用右眼眼睑缝合方法制作单眼形觉剥夺模型,连续 14 d。分别于造模前和造模后 14 d 记录各组大鼠右眼图形视觉诱发电位 P₁₀₀ 波的潜伏期和振幅。分别提取各组大鼠双侧视皮质组织,通过 RNA-seq 技术,筛选出弱视相关发病基因,利用基因本体论(GO)富集分析对上述基因进行生物学功能描述,并进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。**结果** 与空白对照组相比,单眼形觉剥夺组 P₁₀₀ 波潜伏期明显延长,振幅明显下降(均 $P < 0.05$),表明造模成功。共筛选出左侧视皮质差异表达基因 40 个,右侧视皮质差异表达基因 63 个,其中 9 个基因重叠。GO 富集分析表明,差异表达基因主要参与转录 DNA 模板化、谷氨酸分泌、RNA 聚合酶 II 启动子的转录调控、蛋白磷酸化等生物学过程,参与 DNA 结合、ATP 结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、钙离子结合、锌离子结合、磷脂酶 A₂ 活性、核酸绑定等分子功能,参与细胞内、内质网的膜等细胞组分。其中,Grm2、Pla2g2a 基因的异常表达可能与视功能损伤改变过程密切相关,Grm2 基因主要参与谷氨酸突触、长时程增强(LTP)、长时程抑制(LTD)等视觉信号通路过程,Pla2g2a 基因主要参与 α -亚麻酸代谢通路和花生四烯酸代谢通路。**结论** 单眼形觉剥夺大鼠视觉发育敏感期内存在双侧视皮质基因的异常表达,导致视觉信号传导功能异常。基于特定响应基因调控的代谢通路改变可能是弱视发病的重要的分子生物学机制之一。

【关键词】 全转录组测序;大鼠模型;图形视觉诱发电位;形觉剥夺;生物信息学

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660816);甘肃省高等学校创新能力项目(2019A-073);甘肃中医药大学研究生创新基金项目(2021CX51)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201106-00750

Screening, identification and functional analysis of differential expression genes in rat visual cortex after monocular deprivation by RNA-Seq technique

Sun Yaling¹, Yan Xingke², Liu Anguo²¹School of The First Clinical Medical, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; ²School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Liu Anguo, Email: lagkll@126.com

[Abstract] Objective To screen differentially expressed genes (DEGs) in rat visual cortex after monocular deprivation by RNA sequencing technology, and to analyze the function of the DEGs. **Methods** Eighteen 14-day-old SD rats were randomly divided into blank control group and monocular deprivation model group according to random number table method, with 9 rats in each group. The monocular deprivation model was established through lid suture of the right eye for 14 days. Pattern visual evoked potential (PVEP) in the right eyes of the rats was recorded before and 14 days after modeling, respectively. Bilateral visual cortex tissues of the rats were dissected from the two groups, and specific genes associated with the pathogenesis of amblyopia were screened out for RNA-seq analysis. The biological functions of differentially expressed genes were evaluated by Gene Ontology (GO) enrichment analysis, and metabolic pathways involved were analyzed by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. The use and care of the animals complied with ARVO statement. This study protocol was approved by an Ethics



Committee of Gansu University of Chinese Medicine (No. 2016-58). **Results** Compared with blank control group, the latency of P_{100} wave was significantly prolonged, and the amplitude was reduced in the eyes of monocular deprivation model group (both at $P < 0.05$). Forty DEGs in the left visual cortex and 63 DEGs in the right visual cortex were determined, among which 9 genes were overlapped. GO analysis indicated that the DEGs were mainly involved in biological processes, such as DNA-templated transcription, glutamate secretion, transcriptional regulation of RNA polymerase II promoter, protein phosphorylation etc., as well as molecular functions, such as DNA binding, ATP binding, protein serine/threonine kinase activity, calcium ion binding, zinc ion binding, phospholipase A_2 activity, nucleic acid binding and cell components involved in the formation of intracellular and membrane of endoplasmic reticulum. The abnormal expressions of *Grm2* and *Pla2g2a* genes might be closely associated with visual function impairment. *Grm2* gene was mainly involved in visual signaling pathway processes including glutamate synapse, long-term potentiation (LTP), long-term depression (LTD) etc. *Pla2g2a* gene was mainly involved in α -linolenic acid metabolism and arachidonic acid pathway. **Conclusions** There are abnormal expressions of genes in the bilateral visual cortices of monocular deprivation rats in the sensitive period of visual development, mainly leading to the disorder of visual signal transduction pathway. Metabolic pathway changes based on specific response gene regulation may be one of the important molecular biological mechanisms in the pathogenesis of amblyopia.

[Key words] RNA-Seq; Models, animal/rats; Evoked potentials, visual/pattern; Form-deprivation; Bioinformatics

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81660816); Innovation Ability Project of Colleges and Universities in Gansu Province (2019A-073); Graduate Student Innovation Fund of Gansu University of Chinese Medicine (2021CX51)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201106-00750

在视觉发育期内,由单眼斜视、屈光参差、高度屈光不正及形觉剥夺引起的最佳矫正视力低于相应年龄或双眼视力相差 2 行及以上的视觉障碍称为弱视^[1]。最新的 Meta 分析结果显示弱视的综合患病率为 1.44%^[2]。弱视严重影响患者的学习和生活质量^[3]。弱视的发病机制复杂,与视网膜神经节细胞至视觉中枢的视传导通路及相应视皮层的结构和功能损伤有关。当前弱视的发病机制研究主要借助显微成像、电生理和脑功能成像等技术围绕视神经元形态功能以及视觉中枢改变来开展^[4-5]。但是,视功能减退的具体级联性分子机制研究尚不明确,尤其是转录、翻译水平的具体发病机制靶点还有待进一步探索和验证。转录组测序技术(RNA Sequencing, RNA-seq)从 RNA 水平上研究基因的表达情况,可以从整体水平研究特定时空内生物体某一细胞、组织甚至器官中全部基因的转录本^[6-7],具有准确性高、通量高和成本低等优点^[8]。形觉剥夺是导致弱视发生的常见原因,在出生后视觉发育的关键时期进行单眼形觉剥夺,视皮质的形态结构和功能将发生显著的变化,导致形觉剥夺眼视力显著降低^[9]。本研究拟采用单眼眼睑缝合方法制作大鼠形觉剥夺弱视模型,并利用 RNA-seq 技术筛选形觉剥夺弱视发病相关基因,为弱视的靶向治疗提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 14 日龄 SD 幼鼠 18 只,体质量 20~30 g[由甘肃中医药大学科研动物实验中心提供,使用许可证号:SYXK(甘)2011-0001]。实验动物饲养于甘肃中医药大学 SPF 动物实验室,环境温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~60%,大鼠饲养期间正常进食和饮水。实验动物的使用遵循 ARVO 声明,本研究方案符合《甘肃中医药大学动物实验伦理审查标准》,并经甘肃中医药大学伦理委员会审核批准(批文号:2016-58)。

1.1.2 主要试剂及仪器 水合氯醛(天津市光复精细化工研究所);复方托吡卡胺(邯郸康业制药有限公司);红霉素眼膏(北京双吉制药有限公司);TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 试剂盒(美国 Illumina 公司);Agencourt AMPure XP 试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司);Qubit dsDNA HS Assay Kit 试剂盒、Qubit RNA Assay Kit 试剂盒、SuperScript II Reverse Transcriptase 试剂盒(德国 Thermo Fisher 公司);Bioanalyzer 2100 RNA-6000 Nano Kit 试剂盒(美国 Agilent 公司);mirVanaTM miRNA ISolation Kit 试剂盒(美国 Ambion 公司)。RETI-PORT-21 Compact 眼电生理诊断系统(德国 Roland Consult 公司);Illumina

Hiseq 2500 型测序仪(美国 Illumin 公司);大鼠脑立体定位仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);Tannon 2500 凝胶成像系统(中国天能公司);Nano Drop 2000 紫外分光光度计(德国 Thermo Fisher 公司);Agilent 2100 生物分析仪(美国 Agilent 公司);台式离心机(美国 Beckman Coulter 公司);9700 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及单眼形觉剥夺大鼠模型建立 选取 14 日龄大鼠,按照体质量大小依次排序编号,按照随机数字表法随机等分为空白对照组与单眼形觉剥夺组,每组 9 只。参考文献[10]方法,选取单眼形觉剥夺组幼鼠,采用体积分数 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉;将大鼠右眼周围皮肤严格消毒,剪去右眼眼睑上、下缘各 0.5~1.0 mm;对齐创缘,用 6/0 缝线小心缝合上下眼睑 3~5 针,缝合手术后,在创面涂少量红霉素眼膏预防感染,并将模型大鼠置于自然光线、室温条件下饲养,连续饲养 14 d。每日早、晚检查动物的眼睑缝合是否裂开、是否有感染等;有裂缝者给予及时修补,否则不纳入实验。

1.2.2 大鼠视皮质图形视觉诱发电位检测 2 个组大鼠在同等生活环境下连续饲养 14 d,将单眼形觉剥夺组大鼠右眼缝合的部位剪开,暴露其角膜,各大鼠均暗适应 30 min 后称量动物体质量,并按体质量给予体积分数 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射,使大鼠处于浅麻醉状态,然后左右眼依次给予复方托吡卡胺滴眼液各 1 滴扩瞳;采用 RETI-PORT-21 Compact 眼电生理诊断系统记录大鼠右侧视皮质图形视觉诱发电位(pattern visual evoked potential, P-VEP) P_{100} 波的潜伏期和振幅,电极内置电极膏,连接 13 mm 长毫针,参考电极于大鼠内眼角连线中点刺入,记录电极于大鼠枕骨粗隆上 0.5 cm 刺入。参数设置:屏幕刺激方式选用黑白棋盘方格,刺激频率为 2.00 Hz,上限频率为 50 Hz,下限频率为 1 Hz,叠加次数为 128 次,放大倍数为 200 000,采样时程为 300 ms。检查时用不透明黑色眼罩遮盖其左侧眼,每只大鼠右眼 P-VEP 数据连续测 3 次,取其平均值。

1.2.3 RNA 提取 收集各组大鼠双侧视皮质组织样本,每 3 个样本合并成 1 个样本进行分析,参照 mirVana™ miRNA ISolation Kit 试剂盒提取视皮质总 RNA。加入 600 μ l Lysis/Binding Buffer,匀浆后加入 30 μ l miRNA Homogenate Additive,冰浴 10 min;加入 630 μ l 现配等体积酚(酸酚)氯仿溶液,高速离心(13 000 r/min, 30 s)取上清,加乙醇,高速离心弃上

清,加入 350 μ l miRNA Wash Solution,高速离心弃上清,将离心柱重新放置到收集管中;取沉淀混合 10 μ l DNase I 和 70 μ l Buffer RDD QIAGEN 上样至离心柱中的膜上;加 350 μ l miRNA Wash Solution 1,高速离心弃上清,将离心柱重新放置到收集管中;500 μ l Wash Solution 2/3 洗脱 2 次,高速离心弃上清,将离心柱重新放置到收集管中;空柱离心 1 min,将离心柱放置到新的收集管中,柱中心加入 100 μ l 95 $^{\circ}$ C 洗脱液,放置 2 min 后离心,收集洗脱液,即为总 RNA。使用 NanoDrop 微量分光光度计和 Agilent 2100 生物分析仪检测总 RNA 的完整性及质量,测定浓度与纯度后 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 链特异性转录组建库及测序 使用 TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 试剂盒进行转录组建库,主要步骤如下:样品总 RNA 使用 DNase 消化 DNA 后,用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA;加入打断试剂将 mRNA 打断成短片段,以打断后的 mRNA 为模板,用六碱基随机引物合成一链 cDNA,然后配制二链合成反应体系合成二链 cDNA,并使用试剂盒纯化双链 cDNA;纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增;构建好的文库用 Agilent 2100 生物分析仪质检合格后,采用 Illumina Hiseq 2500 型测序仪进行 RNA-seq 测序。

1.2.5 差异表达基因的筛选 采用 Hisat2 软件^[11]将 Clean reads 与大鼠的参考基因组进行比对,用 htseq-count 软件^[12]获取每个样本中比对到基因上的 Reads 数。各样本中能够定位到基因组上的测序列 Reads 数与参考基因组匹配率均维持在 97%左右;各样本测序获得的 Reads 数中,能够唯一匹配到标准基因库中的 Reads 数目,维持在 90%以上。采用 Cufflinks 软件来计算基因的表达量 FPKM 值,计算公式如下^[13]:

$$\text{FPKM}(A) = \frac{\text{比对到基因 } A \text{ 的片段数} \times 10^9}{\text{比对到基因组的总片段数} \times \text{基因 } A \text{ 长度}}^{\circ}$$

利用 RNA-seq 数据比较分析 2 个组样品中同一个基因是否存在差异表达,以样品中同一个基因表达水平的变化倍数(fold change, FC) > 2 且 $P < 0.05$ 为差异表达基因。用错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 进行差异表达基因过滤。

1.2.6 差异表达基因的功能分析 利用基因本体论(gene ontology, GO)富集分析对与弱视发病相关基因进行生物信息学分析,统计每个 GO 条目中所包括的差异基因个数,并用超几何分布检验方法计算每个 GO 条目中差异基因富集的显著性,筛选富集数大于 2

的 GO 条目。利用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库对相关差异基因进行代谢通路分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。本研究中各组手术前后 P_{100} 潜伏期和波幅总体比较采用重复测量两因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 P_{100} 波形比较

与空白对照组相比, 单眼形觉剥夺组大鼠 P_{100} 波潜伏期显著延长, 振幅显著降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), P_{100} 波形发生了显著变化, 表明造模成功 (表 1)。

2.2 差异表达基因筛选结果

单眼形觉剥夺组与空白对照组比较, 左侧视皮质差异表达基因数为 40 个, 其中表达上调基因 19 个, 下调基因 21 个; 右侧视皮质差异表达基因数为 63 个, 其中上调基因 39 个, 下调基因 24 个 (图 1)。

2.3 差异表达基因的生物学功能分析

对左侧视皮质 40 个差异表达基因进行 GO 功能富集分析, 富集数大于 2 的 GO 条目共 6 个。其中参与生物过程的 3 个 GO 条目为蛋白磷酸化、RNA 聚合酶 II 启动子的转录调控和蛋白质水解, 参与分子功能的 3 个 GO 条目为蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、DNA 结合和 ATP 结合 (表 2、图 2)。

对筛选得到的右侧视皮质 63 个差异表达基因进行 GO 富集分析, 富集数大于 2 的 GO 条目共 8 个。其中参与生物过程的 2 个 GO 条目为转录/DNA 模板化、转录的负调控/DNA 模板化; 参与细胞组分的 2 个 GO 条目为细胞内、内质网的膜; 参与分子功能的 4 个 GO 条目为核酸绑定、钙离子结合、磷

脂酶 A_2 活性和锌离子结合 (表 3、图 3)。

2.4 发病基因的 KEGG 通路分析结果

KEGG 基因组数据库的查询显示 *Grm2* 和 *Pla2g2a* 基因与视功能异常改变密切相关 (表 4)。

表 1 2 个组间大鼠右侧视皮质术前及术后 P_{100} 潜伏期和波幅比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of preoperative P_{100} latency and amplitude of

N_{45} - P_{100} for rats between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	潜伏期 (ms)		振幅 (μV)	
		术前	术后	术前	术后
空白对照组	9	106.64 $\pm$ 5.52	105.97 $\pm$ 6.28	9.42 $\pm$ 0.43	10.48 $\pm$ 0.96
单眼形觉剥夺组	9	107.22 $\pm$ 4.35	121.34 $\pm$ 3.64 ^a	10.21 $\pm$ 1.55	5.17 $\pm$ 1.44 ^a

注: P_{100} 潜伏期: $F_{\text{分组}} = 5.452, P = 0.02$; $F_{\text{时间}} = 3.382, P = 0.01$ 。振幅: $F_{\text{分组}} = 4.342, P = 0.01$; $F_{\text{时间}} = 4.811, P = 0.01$ 。与各自术后空白对照组比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验)

Note: P_{100} latency: $F_{\text{group}} = 5.452, P = 0.02$; $F_{\text{time}} = 3.382, P = 0.01$. Amplitude of N_{45} - P_{100} : $F_{\text{group}} = 4.342, P = 0.01$; $F_{\text{time}} = 4.811, P = 0.01$. Compared with respective blank control group, ^a $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD- t test)

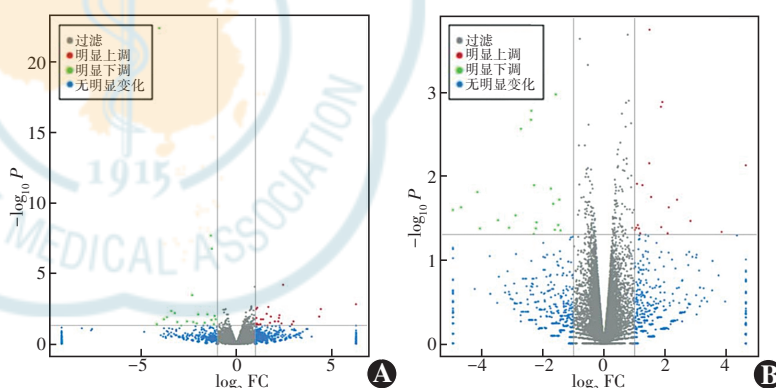


图 1 2 个组大鼠左侧、右侧视皮质差异表达基因火山图 A: 2 个组大鼠左侧视皮质差异表达基因火山图 B: 2 个组大鼠右侧视皮质差异表达基因火山图 FC: 变化倍数

Figure 1 Volcano plot of DEGs in bilateral visual cortex of rats A: Volcano plot of DEGs in the left visual cortex of rats between two groups B: Volcano plot of DEGs in the right visual cortex of rats between two groups FC: fold change

表 2 左侧视皮质差异表达基因的 GO 富集分析

Table 2 Go enrichment analysis of DEGs in the left visual cortex

基因	功能分类	功能描述	P 值
<i>LOC100910771</i> , <i>Mast4</i> , <i>Sgk2</i> , <i>Aurkb</i>	生物过程	蛋白磷酸化	0.007
<i>Foxr1</i> , <i>Sp7</i> , <i>Mafa</i>	生物过程	RNA 聚合酶 II 启动子的转录调控	0.019
<i>Grm2</i>	生物过程	谷氨酸分泌	0.031
<i>Sgk2</i> , <i>Aurkb</i>	分子功能	蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性	0.005
<i>Tshz2</i> , <i>Sp7</i> , <i>Pdcd5</i> , <i>Mafa</i>	分子功能	DNA 结合	0.034
<i>LOC100910771</i> , <i>Sgk2</i> , <i>Aurkb</i> , <i>Yme1l1</i> , <i>Katnall</i>	分子功能	ATP 结合	0.064

注: P 值表示富集显著性

Note: P value indicated the significance of enrichment



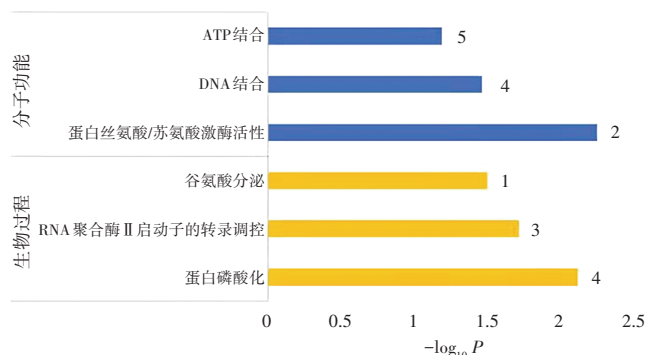


图2 左侧视皮质差异表达基因的生物学过程及分子功能分析

Figure 2 Biological process and molecular function of DEGs in the left visual cortex

表3 右侧视皮质差异表达基因的 GO 富集分析
Table 3 Go enrichment analysis of DEGs in the right visual cortex

基因	功能分类	功能描述	P 值
LOC100910771、Brd2、LOC102552640、Atf3	生物过程	转录, DNA 模板化	0.003
Lhx9、LOC102552640、Atf3	生物过程	转录的负调控, DNA 模板化	0.010
Siglec8、LOC100910771、LOC103690038、Zbbx	细胞组分	细胞内	0.005
Fmo2、Oasl1、Fkbp6	细胞组分	内质网的膜	0.007
LOC103690038、Nol8	分子功能	核酸结合	0.030
LOC100911363、LOC100911486、LOC100910178	分子功能	钙离子结合	0.030
Pla2g2a	分子功能	磷脂酶 A ₂ 活性	0.047
Lhx9、Apobec1、Zbbx	分子功能	锌离子结合	0.033

注: P 值表示富集显著性

Note: P value indicated the significance of enrichment

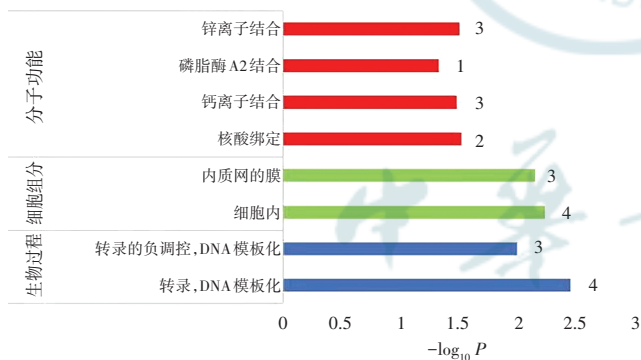


图3 右侧视皮质差异表达基因的生物学过程、细胞组分及分子功能分析

Figure 3 Biological process, cellular component and molecular function of DEGs in the right visual cortex

表4 Grm2 和 Pla2g2a 基因相关代谢通路
Table 4 Metabolic pathway of Grm2 and Pla2g2a genes

基因	物种	代谢通路
Grm2	大鼠	钙离子信号通路、FoxO 信号通路、磷脂酶 D 信号通路、脑组织神经活动配体-受体相互作用、长时程增强、谷氨酸能突触、长时程抑制
Pla2g2a	大鼠	甘油磷脂代谢、醚脂代谢、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、亚麻酸代谢、新陈代谢通路、维生素消化吸收

3 讨论

本研究结果显示,视觉发育关键期内右眼形觉剥夺模型大鼠两侧视皮质差异表达基因的 GO 生物学功能虽然不尽相同,但绝大部分代谢通路都与视觉功能的异常改变密切相关,最终筛选了 *Grm2* 和 *Pla2g2a* 这 2 个弱视相关发病基因,并对其进行 KEGG 通路分析,推测其调控的生物学过程改变可能是导致视功能下降的主要病理机制之一。

Grm2 基因主要参与调控谷氨酸突触、长时程增强 (long-term potentiation, LTP)、长时程抑制 (long-term

depression, LTD) 等视觉信号通路过程。谷氨酸是视网膜到外侧膝状体再到视皮层透射轴突末梢主要的兴奋性神经递质,与视觉通路的兴奋性传导和视觉功能的正常发挥密切相关^[7]。代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptors, mGluRs) 是谷氨酸的一类神经递质类受体,可调控神经兴奋性信号传导,改变突触膜及神经可塑性,诱导产生 LTP 和 LTD。有研究证实,给予 mGluR₁

的激动剂 3,5-二羟基苯甘氨酸可诱导海马区抑制性中间神经元上的 α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体激活,从而介导 LTP 的产生;而给予 mGluR₁ 的抑制剂可阻断 LTP 效应的产生^[14]。另外, mGluR₁ 被激活后,可刺激细胞产生活化磷脂酶 C 和三磷酸肌醇通路从而释放更多的 Ca²⁺,再通过激活 Ca²⁺ 依赖的蛋白激酶而增加 Ca²⁺ 的内流,从而产生 LTD 效应^[15]。可见, mGluR₁ 被激活将引起相关视觉信号传递及其介导的细胞内级联反应,从而产生 LTP 和 LTD 现象。而本研究证实形觉剥夺模型大鼠视皮层 *Grm2* 基因表达显著下调, *Grm2* 基因介导的 mGluRs 信号通路及下游相关生物学活性物质的表达受限,可能是产生视觉剥夺效应的一条重要的分子生物学途径。

Pla2g2a 基因主要参与 α-亚麻酸代谢通路和花生四烯酸代谢通路。研究证实,上述 2 个信号通路与正常视觉功能的发挥密切相关。α-亚麻酸对大脑神经元发育和视觉系统发育都具有较高的营养性作用, α-亚麻酸能够促进大鼠的脑发育和视功能发育,提高子代大鼠的学习记忆能力和视网膜电位水平, α-亚麻酸缺乏将对中枢神经系统生理功能,尤其是对视觉功能造成不利的影响^[16]。膳食摄入 α-亚麻酸能够在基因调控

下经脱氢与碳链延长,生成一系列代谢产物,转变为长链多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs)^[17]。而二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 作为 PUFAs 的一种,是视网膜视杆细胞和视锥细胞外部的主要不饱和脂肪酸,能够影响视网膜发育中的神经节苷脂代谢,提高二唾液酸神经节苷脂 3 的水平,从而促进视网膜的发育成熟,同时,保护视觉感受器免受氧化应激损伤^[18]。另外,视网膜感光细胞膜和神经细胞膜中含有高浓度 DHA,表明了 DHA 对于细胞膜相关的生理功能具有重要作用,其参与调节了视神经信号传导、神经传递效率和神经元突触的可塑性修复^[19]。研究发现,在孕期的最后 3 个月胎儿视网膜磷脂酰乙醇胺中的 DHA 含量显著增加,证实了胎儿在后期视网膜感光器的快速发育需要依赖大量的 DHA^[20]。本研究结果同样证实,形觉剥夺模型大鼠视皮层存在 *Pla2g2a* 基因表达下调,可能导致 α -亚麻酸及其下游的 DHA 转化及吸收异常,进一步导致视觉光转导异常,这可能是弱视形成视觉剥夺效应的另一条重要的分子生物学途径。

以往在弱视发病机制的研究中发现谷氨酸及其离子型受体 N-甲基-D-天冬氨酸在视皮层结构和功能可塑性中发挥重要的作用。本研究又从基因表达水平揭示了谷氨酸及其不同亚型的 mGluRs 也参与了神经元突触结构和功能可塑性的改变过程,为今后弱视发病机制研究和视觉系统的可塑性研究提供了新的参考依据。在今后的研究中将结合现有基因在 cDNA 的表达水平,同时对差异基因调控的上游、下游的代谢产物进行分析,进一步验证本研究结论。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 孙娅玲:直接参与起草文章、文章撰写、分析/解释数据;刘安国:直接参与酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、对文章的知识性内容作批评性审阅;严兴科:统计分析、获取研究经费、指导实验

参考文献

- Thompson B, Mansouri B, Koski L, et al. Brain plasticity in the adult: modulation of function in amblyopia with rTMS[J]. Curr Biol, 2008, 18(14): 1067-1071. DOI: 10. 1016/j. cub. 2008. 06. 052.
- Fu Z, Hong H, Su Z, et al. Global prevalence of amblyopia and disease burden projections through 2040: a systematic review and meta-analysis[J]. Br J Ophthalmol, 2020, 104(8): 1164-1170. DOI: 10. 1136/bjophthalmol-2019-314759.
- Hatt SR, Leske DA, Castañeda YS, et al. Understanding the impact of residual amblyopia on functional vision and eye-related quality of life using the PedEyeQ[J]. Am J Ophthalmol, 2020, 218: 173-181. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2020. 05. 039.
- 孙燕, 马重兵, 刘安国, 等. 基于 BOLD-fMRI 的针刺干预弱视脑功能研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 940-943.
- Sun Y, Ma CB, Liu AG, et al. Research progress of brain function of acupuncture intervention in amblyopia based on the BOLD-fMRI[J]. China J Tradit Med Pharm, 2021, 36(2): 940-943.
- 王佳君, 寇姣姣, 赵云娥. 视觉电生理检查在小儿弱视诊断中的应用[J]. 国际眼科纵览, 2019, 43(6): 401-405. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-5803. 2019. 06. 008.
- Wang JJ, Cou JJ, Zhao YE. Application of visual electrophysiology in the diagnosis of amblyopia in children[J]. Int Rev Ophthalmol, 2019, 43(6): 401-405. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-5803. 2019. 06. 008.
- Wu C, Bendriem RM, Garamszegi SP, et al. RNA sequencing in post-mortem human brains of neuropsychiatric disorders[J]. Psychiatry Clin Neurosci, 2017, 71(10): 663-672. DOI: 10. 1111/pcn. 12550.
- Withanage M, Liang H, Zeng E. RNA-Seq experiment and data analysis[J]. Methods Mol Biol, 2022, 2418: 405-424. DOI: 10. 1007/978-1-0716-1920-9_22.
- Kumaran SE, Khadka J, Baker R, et al. Functional limitations recognised by adults with amblyopia and strabismus in daily life: a qualitative exploration[J]. Ophthalmic Physiol Opt, 2019, 39(3): 131-140. DOI: 10. 1111/opo. 12610.
- 李彬, 晁小蕊, 李权达, 等. 氟西汀对单眼形觉剥夺性弱视大鼠视觉功能及视皮质突触可塑性的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2021, 35(11): 1159-1163. DOI: 10. 13507/j. issn. 1674-3474. 2021. 11. 020.
- Li B, Chao XR, Li QD, et al. Influence of fluoxetine on visual function and synaptic plasticity of optic cortex neurons in rats with monocular form-deprived amblyopia[J]. J Prac Diagnosis and Therapy, 2021, 35(11): 1159-1163. DOI: 10. 13507/j. issn. 1674-3474. 2021. 11. 020.
- 张秀艳, 吴姗姗, 徐福如, 等. 电针刺激对单眼形觉剥夺弱视大鼠初级视皮层中多巴胺、 γ -氨基丁酸及其受体 mRNA 表达的影响[J]. 眼科新进展, 2020, 40(12): 1106-1109.
- Zhang XY, Wu SS, Xu FR, et al. Effect of electroacupuncture on expression of dopamine, γ -aminobutyric acid and its receptor mRNA in primary visual cortex of monocular deprivation amblyopic rats[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2020, 40(12): 1106-1109. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2020. 0246.
- 王振恒, 王引权, 雒军, 等. 基于高通量测序的当归抽茎相关基因分析[J/OL]. 中国现代中药, 2022: 1-8(2022-02-14) [2022-02-15]. https://www. zgxdzy. net/ch/reader/view_abstract. aspx? flag = z&file_no = 202011230000006&journal_id = zgxdzy. [网络预发表].
- 刘自华, 王德贵, 李晓娟, 等. 转录组测序分析: 帕金森病小鼠 PI3K、ERK 和 P38 信号通路和代谢关系的研究[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2021, 7(3): 161-169. DOI: 10. 3877/cma. j. issn. 2095-9141. 2021. 03. 008.
- Liu ZH, Wang DG, Li XJ, et al. Transcriptome sequencing analysis: study on the PI3K, ERK and P38 signaling pathways and metabolic relationship in mice with Parkinson's disease[J]. Chin J Neurotraum Surg (Electric Edition), 2021, 7(3): 161-169. DOI: 10. 3877/cma. j. issn. 2095-9141. 2021. 03. 008.
- 罗博炜. Python cufflinks 动态数据可视化在电商运营中的应用[J]. 计算机时代, 2020(8): 72-74. DOI: 10. 16644/j. cnki. cn33-1094/tp. 2020. 08. 018.
- Rudy JW, Matus-Amat P. DHPG activation of group 1 mGluRs in BLA enhances fear conditioning[J]. Learn Mem, 2009, 16(7): 421-425. DOI: 10. 1101/lm. 1444909.
- Youn DH. Differential roles of signal transduction mechanisms in long-term potentiation of excitatory synaptic transmission induced by activation of group I mGluRs in the spinal trigeminal subnucleus oralis[J]. Brain Res Bull, 2014, 108: 37-43. DOI: 10. 1016/j. brainresbull. 2014. 08. 003.
- Gupta M, Rana SK, Mittal SK, et al. Profile of amblyopia in school going (5-15 years) children at state level referral hospital in Uttarakhand[J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(11): SC09-SC11. DOI: 10. 7860/JCDR/2016/16026. 8866.
- Simard M, Tremblay A, Morin S, et al. α -Linolenic acid and linoleic acid modulate the lipidome and the skin barrier of a tissue-engineered skin model[J]. Acta Biomater, 2022, 140: 261-274. DOI: 10. 1016/j. actbio. 2021. 11. 021.
- Zgheef F, Perrier S, Remila L, et al. EPA:DHA 6:1 is a superior omega-3 PUFAs formulation attenuating platelets-induced contractile responses in porcine coronary and human internal mammary artery by targeting the serotonin pathway via an increased endothelial formation of nitric oxide[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 853: 41-48. DOI: 10. 1016/j. ejphar. 2019. 03. 022.
- Basak S, Mallick R, Banerjee A, et al. Maternal supply of both arachidonic and docosahexaenoic acids is required for optimal neurodevelopment[J/OL]. Nutrients, 2021, 13(6): 2061 [2022-01-11]. http://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/34208549. DOI: 10. 3390/nu13062061.
- Campoy C, Chisaguano Tonato AM, de la Garza Puentes A, et al. [Controversy about the critical role of long-chain polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid (ARA) and docosahexaenoic acid (DHA), during infancy][J]. Nutr Hosp, 2021, 38(5): 1101-1112. DOI: 10. 20960/nh. 03707.

(收稿日期:2021-08-06 修回日期:2022-02-15)

(本文编辑:张宇)

