

· 基础研究 ·

亨廷顿舞蹈症中星形胶质细胞转录异质性分析

陈贝宁¹, 杨清湖^{2,3}, 袁增强^{3*}, 郭兴^{1*}

¹南京医科大学基础医学院神经生物学系, 江苏 南京 211166; ²延安大学生命科学学院多肽药物研究中心//陕西省区域生物资源保护与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000; ³军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所, 北京 100850

[摘要] 目的: 解析亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease, HD)病程中小鼠大脑内星形胶质细胞活化状态及转录异质性, 筛选和鉴定HD病程相关的核心基因。方法: 利用免疫荧光考察HD病程早期和后期星形胶质细胞的激活情况, 采用RT-qPCR分析星形胶质细胞激活表型; 利用单细胞解离和磁珠分选技术分离小鼠脑星形胶质细胞, 进行转录组学测序; 结合生物信息学分析, 分别对HD早期和后期转录组学数据进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEG)及基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析; 筛选HD病程相关基因进行蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络分析, 并验证核心基因的表达。结果: 在HD病程后期, 星形胶质细胞转变为A1型反应性星形胶质细胞; 病程早期, HD小鼠星形胶质细胞的差异基因主要与突触间隙和突触结构维持等突触相关功能有关, 而病程后期则主要涉及趋化活性、信号转导和细胞响应等功能; 最后, HD病程中星形胶质细胞的核心基因功能主要体现在血管发生、RNA剪接与代谢以及肌肉运动方面。结论: HD病程早期星形胶质细胞影响神经元发育和突触形成, 病程后期星形胶质细胞转变为具有神经毒性的A1型反应性星形胶质细胞; 排除衰老过程影响的星形胶质细胞异质性基因可作为HD病理进展和预测的有效分子标志物, 这有望为HD早期发现和诊疗提供新的实验证据。

[关键词] 亨廷顿舞蹈症; 星形胶质细胞; 转录组学

[中图分类号] R742.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)04-487-12

doi: 10.7655/NYDXBNSN241284

The transcriptional heterogeneity of astrocytes in Huntington's disease

CHEN Beining¹, YANG Qinghu^{2,3}, YUAN Zengqiang^{3*}, GUO Xing^{1*}

¹Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²School of Life Science & Research Center for Natural Peptide Drugs, Shaanxi Engineering & Technological Research Center for Conservation & Utilization of Regional Biological Resources, Yan'an University, Yan'an 716000; ³Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective:** To elucidate the activation status and transcriptional heterogeneity of astrocytes in the mouse brain during Huntington's disease (HD) progression, and screen and identify differentially expressed molecules on the key issue. **Methods:** Immunofluorescence was employed to examine the transformation of HD astrocytes into reactive astrocytes at both the early and late stages of the disease, and this transformation was then verified by RT-qPCR; Single-cell dissociation and magnetic bead sorting techniques were utilized to isolate astrocytes from mouse brains for subsequent transcriptome sequencing; Bioinformatics analysis was conducted to identify differentially expressed genes (DEGs) and perform gene ontology (GO) analysis on the transcriptome data from the early and late stages of HD; Genes related to HD progression were selected for protein-protein interaction (PPI) network analysis, and the expression of core genes were validated. **Results:** In the late stage of HD, astrocytes transformed into A1-type reactive astrocytes; In the early stage of the disease, DEGs in HD mouse astrocytes were predominantly associated with synaptic functions, such

[基金项目] 国家自然科学基金(82230042, 82371260)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guox@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-0216-0310); zqyuan@bmi.ac.cn (ORCID: 0000-0001-5739-2867)

as synaptic cleft and synaptic structure maintenance, whereas in the late stage, they were mainly involved in chemotactic activity, signal transduction, and cellular response functions; The core genes of astrocytes during HD progression were mainly related to angiogenesis, RNA splicing, metabolism, and muscle movement. **Conclusion:** In the early stage of HD, astrocytes influence neuronal development and synaptogenesis. Later in the disease course, they transform into neurotoxic type A1 reactive astrocytes. Astrocyte heterogeneity genes that are independent of the aging process may serve as effective molecular markers for the progression and prediction of HD, and the findings are expected to provide a new reference for the early detection and treatment of HD.

[Key words] Huntington's disease; astrocytes; transcriptomics

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(04): 487-497, 587]

亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease, HD)是一种常染色体显性遗传的神经退行性疾病,主要临床表现为不自主的舞蹈样运动、进行性认知障碍和精神异常^[1]。其致病因素是4号染色体上亨廷顿蛋白基因(Huntingtin gene, Htt)第1个外显子上编码谷氨酰胺的CAG序列异常重复扩增,HTT蛋白在人类和啮齿动物全身表达,但在中枢神经系统(central nervous system, CNS)中表达更高^[2]。突变型HTT(mutant HTT, mHTT)会在细胞内积累和聚集,产生神经毒性^[3-4]。HD的神经元丢失始发于纹状体中棘神经元(medium spiny neuron, MSN),随疾病进展波及各个脑区^[5]。星形胶质细胞是大脑中数量最多的胶质细胞类型,约占哺乳动物CNS的30%^[6-7]。星形胶质细胞是神经回路的重要组成部分,参与CNS的创伤、炎症、感染、肿瘤以及神经和精神系统疾病等多种过程,发挥着离子平衡、神经递质清除、突触形成及清除、突触调节以及帮助神经血管耦合和形成血脑屏障等作用^[8]。

HD大脑中受影响区域的星形胶质细胞表现出“反应性”状态,表现为胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)信号增多和纤维性胶质增生^[9-10],以及星形胶质细胞膜上的兴奋性氨基酸转运体2(excitatory amino acid transporter 2, EAAT2)蛋白水平降低^[11],这种神经毒性反应性星形胶质细胞可促进HD模型的炎症形成^[12]。mHTT在星形胶质细胞中的积累足以驱动基因表达水平的变化,导致神经变性。在先前研究中,在星形胶质细胞内过表达mHTT会导致谷氨酸转运体的表达降低以及小鼠运动功能障碍^[13];相反,在星形胶质细胞内特异性敲除mHTT可以改善HD小鼠的病理表现,减缓疾病进程^[14]。除此之外,激活纹状体星形胶质细胞胆固醇生物合成,可以逆转HD小鼠神经元中的神经突生长和突触缺陷^[15],在类器官中移植星形胶质细胞也可用于治疗神经系统疾病^[16]。

这些发现证实了星形胶质细胞在HD病理发生中的重要性,为HD的治疗策略提出一个可能的方向。然而,星形胶质细胞的生理病理特征是如何随着HD的病理进程发生改变的,目前仍不清楚。

本研究分离3月龄和12月龄HD模型小鼠和对照组野生型(wild type, WT)小鼠脑组织星形胶质细胞,进行转录组学测序,发现HD小鼠星形胶质细胞与对照组小鼠存在明显差异。这种差异在HD病程的早期和后期表现并不完全一致,在病程早期,HD组表现出了神经元发育和突触形成相关基因的差异,病程后期则更多地影响到离子通道、信号转导、胶质细胞活化等功能。此外,分析了HD小鼠病程中特异性变化的基因,通过蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络聚焦核心基因,并在mRNA水平上进行验证,揭示这些核心分子作为HD小鼠中星形胶质细胞异质性分子标志物的可能性,为靶向星形胶质细胞的HD诊疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

YAC128小鼠及其对照组小鼠获得自美国Jackson实验室(B6.FVB-Tg[YAC128]53 Hay/Chd1J; JAX stock number: 027432)。实验所用均为雄鼠,饲养在22~26℃恒温无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级环境中,保持12h光照/黑暗循环节律。经军事医学研究院实验动物中心实验动物管理与使用委员会审查批准(IACUC-JSRZ-24-1102),符合动物福利伦理3R原则。

1.1.2 试剂与仪器

Anti-GFAP(GeneTex公司,美国); Alexa Fluor™ 647-TRIZOL(Thermo Fisher公司,美国); DAPI(Sigma-Aldrich公司,美国); 4%组织细胞固定液(北京Solarbio公司); Triton™ X-100(上海VETEC公司);

C₆H₅Na₃O₇·2H₂O(北京国药公司); 蔗糖(上海沪试公司); 异丙醇、乙醇(北京京试公司); 三氯甲烷(北京通广公司); 耐高温全预混第一链 cDNA 合成试剂盒(北京 Transgen 公司); SYBR Green(Gentex 公司, 美国); 星形胶质细胞 ACSA-2 磁珠、成年鼠脑解离试剂盒(Miltenyi 公司, 德国); 基因扩增仪(杭州博日公司); QuantStudio™3 Real-Time PCR Instrument、Orbitrap Fusion Lumos Tribid 质谱仪(Thermo Fisher 公司, 美国); gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters(Miltenyi 公司, 德国); Agilent 2100 bioanalyzer(Agilent 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 分选星形胶质细胞

用2%三溴乙醇按20 μL/g浓度麻醉小鼠,经心脏灌注预冷生理盐水,灌注至肝脏发白后分离小鼠大脑。分离出的大脑立即转移到含有成年鼠脑解离试剂盒酶消化试剂的组织解离C管中,并剪成小块。用全自动组织解离器将鼠脑充分磨碎,经70 μm滤网过滤、去髓鞘后获得细胞悬液。所得细胞悬液用星形胶质细胞 ACSA-2 磁珠孵育,经 MS 柱分选。磁珠与星形胶质细胞表面抗原(astrocyte cell surface antigen-2, ACSA-2)结合,ACSA-2 阳性细胞吸附在磁极上,ACSA-2 阴性细胞无磁性,分别收集 ACSA-2 阳性和阴性细胞,300 g 离心 10 min 得到细胞沉淀,弃上清后液氮速冻细胞。

1.2.2 转录组学测序

星形胶质细胞样品由深圳微科盟科技集团有限公司进行 RNA 提取、文库构建和测序。利用 TRIzol 法提取 RNA, NanoPhotometer spectrophotometer 检测 RNA 纯度, Agilent 2100 bioanalyzer 检测 RNA 完整性。利用 Illumina 的 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit 构建文库并进行库检。库检合格后,进行 Illumina 测序。

1.2.3 数据处理和生物信息学分析

使用 Illumina Novaseq 6000 测序平台对文库进行测序,获得待测片段的序列信息。利用 Fastp 软件对原始数据进行质控并过滤,去除低质量及冗余序列。使用 HISAT2 v2.0.5 构建参考基因组的索引,并使用 HISAT2 v2.0.5 将配对末端 clean reads 与参照基因组比对。利用 R4.4.1 及 Rstudio 软件处理数据并绘图;DESeq2 包对原始 Counts 表达矩阵进行标准化处理及差异分析,获取上下调基因信息;org.Mm.eg.db 包进行基因注释;Cluster Profiler 和 enrich plot 包进行基因本体论(Gene Ontology, GO);ggplot2 包进行绘

图;STRING 数据库进行 PPI 分析。将测序结果使用基于负二项分布的 P 值计算模型进行 P 值计算,以 $P < 0.05$ 、 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 作为阈值标准筛选显著差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)。

1.2.4 取材及切片制备

小鼠麻醉后,灌流取脑,置于4%多聚甲醛中室温固定过夜,30%蔗糖脱水。利用冰冻切片机将鼠脑切为30 μm厚度的薄片,置于脑片防冻液(含30%乙二醇、30%蔗糖的PBS溶液)中,-20℃保存。

1.2.5 免疫荧光染色

脑片取出后用 PBS 清洗,加抗原修复液(含 50 mmol/L 柠檬酸钠,0.05% Tween20 的 PBS 溶液),95℃加热 20 min,晾至室温,用 PBST(含 0.1% Triton™ X-100 的 PBS 溶液)清洗 3 次(5 min/次),室温封闭 1 h(含 5% BSA、2% 马血清的 PBST 溶液)。一抗 4℃摇床过夜。次日将脑片取出,恢复至室温后,PBS 清洗 3 次,二抗室温 1 h,PBS 清洗 3 次,取出贴片,抗荧光淬灭剂封片。采用激光共聚焦成像,通过 Image J 测量胞体面积,并利用 Neuroanatomy 插件分析星形胶质细胞轴突长度。

1.2.6 RNA 提取

组织样本用液氮速冻后加入 TRIzol 匀浆,加入 1/5 TRIzol 体积的三氯甲烷,上下颠倒混匀,离心(14 000 g、15 min、4℃);取上清加入等体积异丙醇,上下颠倒混匀,离心(14 000 g、15 min、4℃);75%酒精清洗 2 次,晾干后加水溶解,得到 RNA 溶液。

1.2.7 实时荧光定量 PCR

逆转录 RNA 得到 cDNA, RT-qPCR 为 20 μL 体系:10 μL 2×SYBR Green, 1 μL cDNA, 1 μL 上、下游引物(10 μmol/L), 8 μL ddH₂O;程序:95℃ 10 min;95℃ 5 s, 60℃ 15 s, 72℃ 10 s, 40 个循环;95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 1 s;以 β-actin 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCT} 方法对目的基因进行相对定量。引物序列见表 1。

1.3 统计学方法

所有统计学结果均采用 GraphPad Prism 9 进行分析及绘图,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组资料间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HD 小鼠病程发展过程中星形胶质细胞的变化

为明确星形胶质细胞是否与 HD 病程相关联,检测了不同月龄 HD 模型小鼠脑内星形胶质细胞的

表1 RT-qPCR引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequences

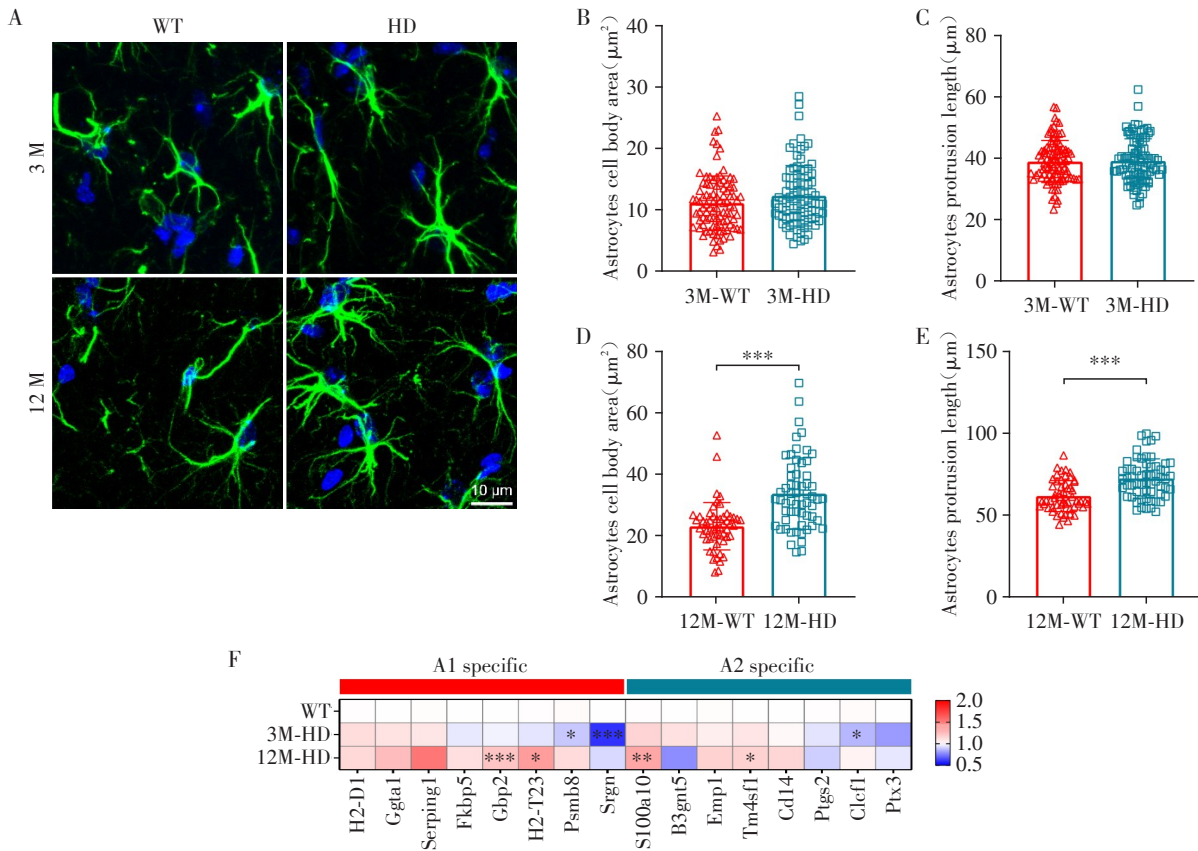
Gene	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
Serping1	GAAC TTG ACCAGGACGCAG	GCTGGTAGCTTCGGGATCTG
H2-D1	TCCGAGATTGTAAAGCGTGAAGA	ACAGGGCAGTGCAGGGATAG
Gbp2	CTGGATCTGCACAGGCCAAT	AGCAACGAGCTGATGAGACA
Fkbp5	TGCTACCTGAAGCTCCGAGA	GGCCCTGTTCTGAGGATTGA
Psmb8	CAGTCCTGAAGAGGCCTACG	CACTTTCACCCAACCGTCTT
Srgn	AATCCAGAGGCTGAGTGAG	TGGCTCTCCGAGCAGGATAA
H2-T23	TCAGGTTCTCACAGACCCA	GTCCACGTAGCCGACAATGA
Ggta1	GTGAACAGCATGAGGGGTTT	GTTTTGTTCCTCTGGGTGT
Cd14	ACTGAAGCCTTCTCGGAGC	TGAAAGCGCTGGACCAATCT
Ptx3	CGCTGTGCTGGAGGAACTG	ACAGGATGCACGCTTCCAA
S100a10	AGTGCTCATGGAACGGGAGT	CTCTGGAAGCCCACTTTGCC
Ptgs2	CAGGACTCTGCTCACGAAGG	ATCCAGTCCGGGTACAGTCA
Emp1	AAGAGAGGACCAGACCAGCA	GACCACAAAGAGACCAGCCA
Tm4sf1	TCACTGGGTTTGGCAGAAGG	TGGGCTCATAGCACTTGGAC
B3gnt5	CGTGGGGCAATGAGAATAT	CCCAGCTGAACTGAAGAAGG
C1ef1	CTTCAATCCTCCTCGACTGG	TACGTCCGAGTTCAGCTGTG
Adgrf5	GGAAGAACAGGACATCCGCTCA	CCAGGAGTTCAAGGCAGACTTG
Cdh5	GAACGAGGACAGCAACTTCACC	GTTAGCGTGCTGGTTCAGTCA
Robo4	GTCATTGCCAGTAGTGCTGTCC	AATGGCGTCTCGCTGGTGTAT
Nktr	AGCGGAGAGAAGTGAGCAAAG	TGGTGACCATCAGAGTGTCTCG
Snmp70	GCCTTCAAGACTCTGTTCGTGG	CTCGATGAAGGCATAACCACGG
Prpf39	CTCCTGGTGATGACCTTCCATC	GTCCACCTCTTACTAACTTCATGC
Npsr1	TGTCTGCTGTATGCCTCTACC	CTCCACGCTATTCCGATGAGGA
Pre1	CTGTTCCAAGGCGTCCAGAAGT	CCTCGGTTGTAAATCGACCTGG
β-actin	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG	TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

活化状态。结果显示,与对照组WT小鼠相比,小鼠在HD病程早期(3月龄),星形胶质细胞体积和分支长度未表现出明显差异(P 均 > 0.05 ,图1A~C);而在病程后期HD组(12月龄)的星形胶质细胞体积增大,分支长度增加(P 均 < 0.001 ,图1D、E)。在脑损伤或神经退行性疾病发生时,星形胶质细胞由静止状态转变为活化状态,成为反应性星形胶质细胞,主要由神经毒性(A1)和神经保护性(A2)两种类型组成。在此前的报道中,A1型星形胶质细胞无法促进神经元存活和生长、突触形成和吞噬作用,并诱导神经元和少突胶质细胞死亡,在多种神经退行性疾病中大量存在^[12,17]。利用RT-qPCR检测A1和A2型星形胶质细胞标志物的表达水平,结果显示,相比WT小鼠,HD病程早期A1和A2型星形胶质细胞标志物的表达变化并不明显;病程后期,A1型星形胶质细胞标志物的表达显著增加(图1F)。这些结果说明,星形胶质细胞的活化程度随着HD的病理进展加剧,病程后期星形胶质细胞主要活化为A1型。

2.2 HD病程早期星形胶质细胞转录组学变化

为进一步探明HD病程中激活的星形胶质细胞在转录水平上的差异,通过单细胞解离及磁珠分选技术富集HD病程早期和后期YAC128小鼠脑组织中的星形胶质细胞,进行转录组学测序分析(图2A)。

3月龄HD小鼠和WT小鼠主成分分析结果显示,两组之间投影区域有部分重叠,其中第一主成分解释率为81.9%,第二主成分解释率为8.9%,表明两者间存在一定差异(图2B)。此外,在3月龄HD小鼠脑内星形胶质细胞中共筛选出197个表达量显著上调基因和122个显著下调基因(图2C)。基于这些DEG的功能富集分析显示,上调基因主要富集于金属离子结合、DNA结合、蛋白质水解、神经元分化等相关功能,而下调基因主要富集于胞外成分以及突触相关的突触后膜、突触间隙和维持突触结构等相关功能(图2D、E),以Six4、Lmx1a、Ascl2为代表的突触相关基因在HD样本与对照组样本中存在明显差异(图2F)。这些结果说明,在小鼠HD



A: The images of activated astrocytes in the brain between WT and HD mice at 3 month and 12 month (green: GFAP; blue: DAPI; scale bars=10 μm). B, C: No significant changes in the cell body area (B) and protrusion length of astrocytes (C) at 3-month-old mice ($n=40-60$ from 6 mice). D, E: Astrocytes in 12-month-old HD mice were activated ($n=40-60$ from 6 mice). F: The expression level of A1 and A2 specific markers among the WT, early-onset HD (3M-HD), and late-onset HD (12M-HD) mice brain ($n=3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

图1 HD小鼠脑内星形胶质细胞活化状态

Figure 1 The activation of astrocytes in the brain of HD mice

病程早期,星形胶质细胞与神经突生长和突触形成缺陷相关。

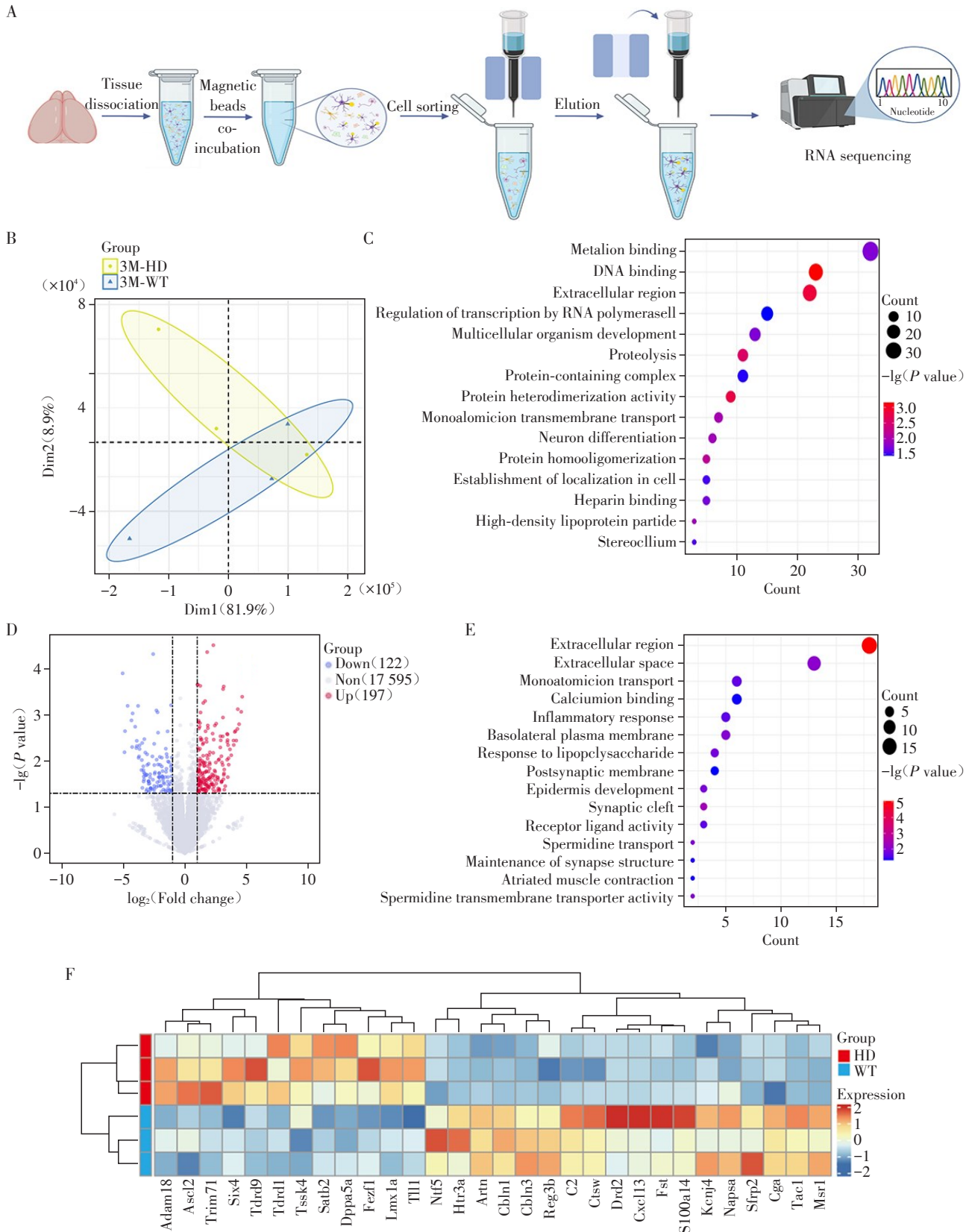
2.3 HD病程后期星形胶质细胞转录组学变化

转录组数据显示,与WT组相比,12月龄HD小鼠脑内星形胶质细胞的特征存在显著差异(图3A),共筛选出2532个差异基因,这一数目显著高于HD病程早期,其中上调基因2295个,占全部差异基因的90.64%(图3B)。进一步,针对上调和下调差异表达基因进行生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)GO功能富集分析,结果显示差异基因功能主要富集在BP中的炎症反应、信号转导、胶质细胞活化等;CC中的胞外基质、吞噬体、突触前后膜、神经元膜结构等;MF中的蛋白质结合、钙离子结合、趋化因子活性、肝素结合等。其中,544个DEG与蛋白质结合功能相关,是DEG数目最多的功能条目(图3C、D)。为进一步分析DEG功能,针对

上调的GO条目做了进一步的功能聚类,共聚类出12个功能亚类,诸如趋化活性、信号转导和细胞响应等关键功能在小鼠HD病程后期发生了显著变化(图3E)。这可能与HD小鼠病程后期出现的肌张力障碍、小脑性共济失调、癫痫等临床症状息息相关。

2.4 差异基因PPI网络构建

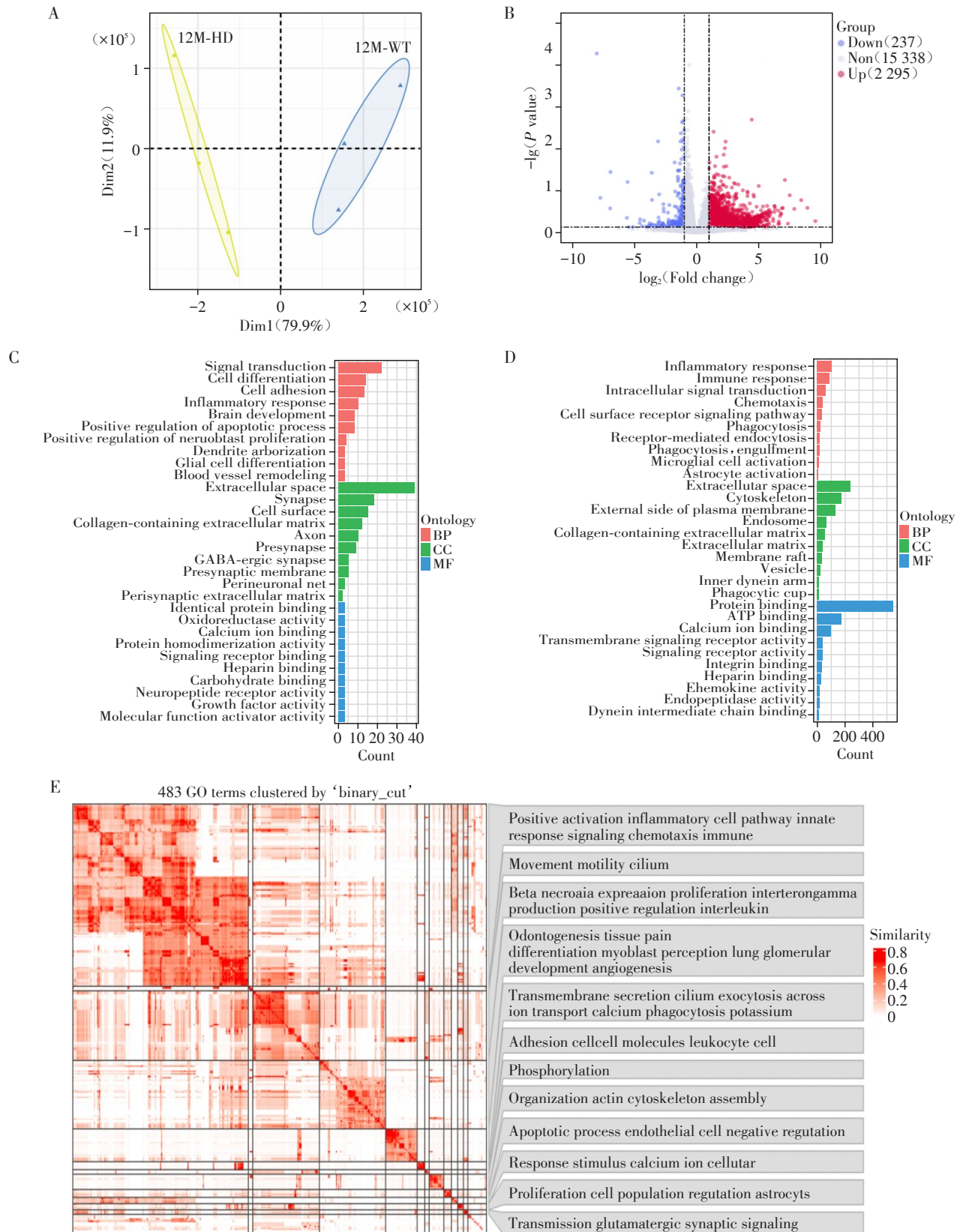
神经退行性疾病通常与衰老密切相关。为了明确HD后期由疾病而非衰老引发的星形胶质细胞转录组异质性,并进一步解析HD的潜在分子标志物,将12月龄HD小鼠检测出的所有2295个上调基因和237个下调基因,与对照组WT小鼠衰老过程中表达量变化的934个上调基因和1472个下调基因进行交集分析。韦恩图显示,1708个基因在HD病程发展过程中发生了特异性变化,与小鼠的自然衰老无关(图4A)。这些差异表达基因主要富集在PI3K-Akt、钙、Ras、MAPK等信号通路以及神经活性配体-受体相互作用、谷氨酸突触、GABA能突触等神



A: Schematic diagram of astrocyte isolation from mice brain. B: PCA analysis of 3-month-old mice in the HD group and WT group. C: The volcano map represent the differential gene expressions. D: GO functional enrichment analysis of up-regulated DEGs. E: GO functional enrichment analysis of down-regulated DEGs. F: The heatmap of synapse-related DEGs.

图2 3月龄HD小鼠星形胶质细胞转录组学差异分析

Figure 2 Differential transcriptome analysis of astrocytes in 3-month-old HD mice



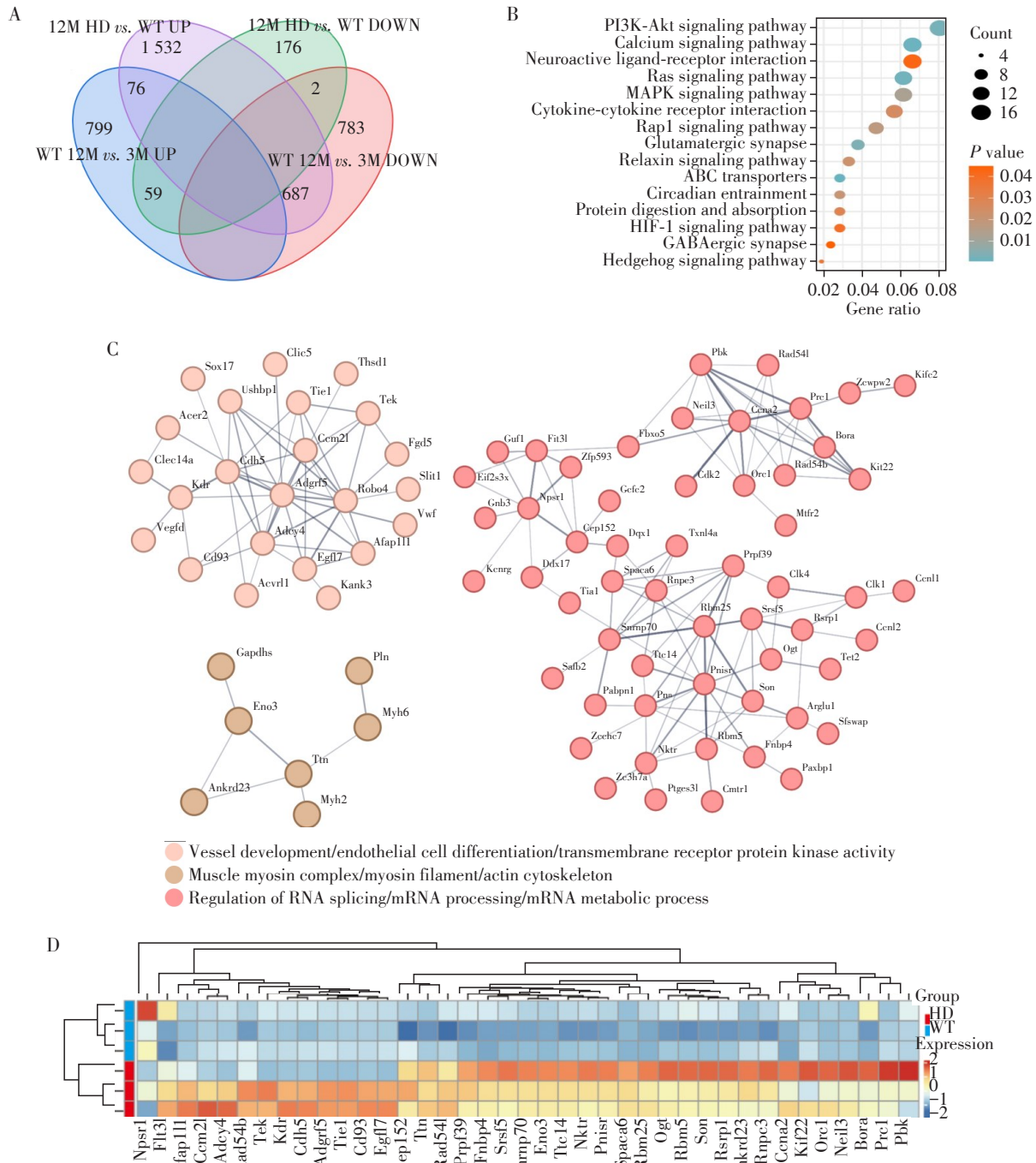
A: PCA analysis of 12-month-old mice from the HD group and WT group. B: The volcano map represents the differential gene expressions. C: GO functional enrichment analysis of up-regulated DEGs. D: GO functional enrichment analysis of down-regulated DEGs. E: The clustering of GO terms of up-regulated DEGs. BP: biological process; CC: cellular component; MF: molecular function.

图3 12月龄HD小鼠星形胶质细胞转录组学差异分析

Figure 3 Differential transcriptome analysis of astrocytes in 12-month-old HD mice

经活性和突触相关通路(图4B)。通过String数据库构建PPI网络,最终得到包含511个节点、197条边的PPI网络。根据基因在整个网络中的重要性对子网络进行打分排序,并选择得分最高的子网络^[18]。主要分为3个集团,分别是血管发生功能(血管发育/内皮细胞分化/跨膜受体蛋白激酶活性)、

RNA剪接和代谢功能(调节RNA剪接/mRNA处理/mRNA代谢过程)以及肌肉运动功能(肌肉肌球蛋白复合体/肌球蛋白丝/肌动蛋白细胞骨架),其中具有两个以上连接点的包括Cdh5、Adgrf5、Adcy4、Robo4、Ccna2、Pbk、Kif22、Pnlsr、Rbm25、Snmp70、Trn等39个核心基因(图4C、D)。



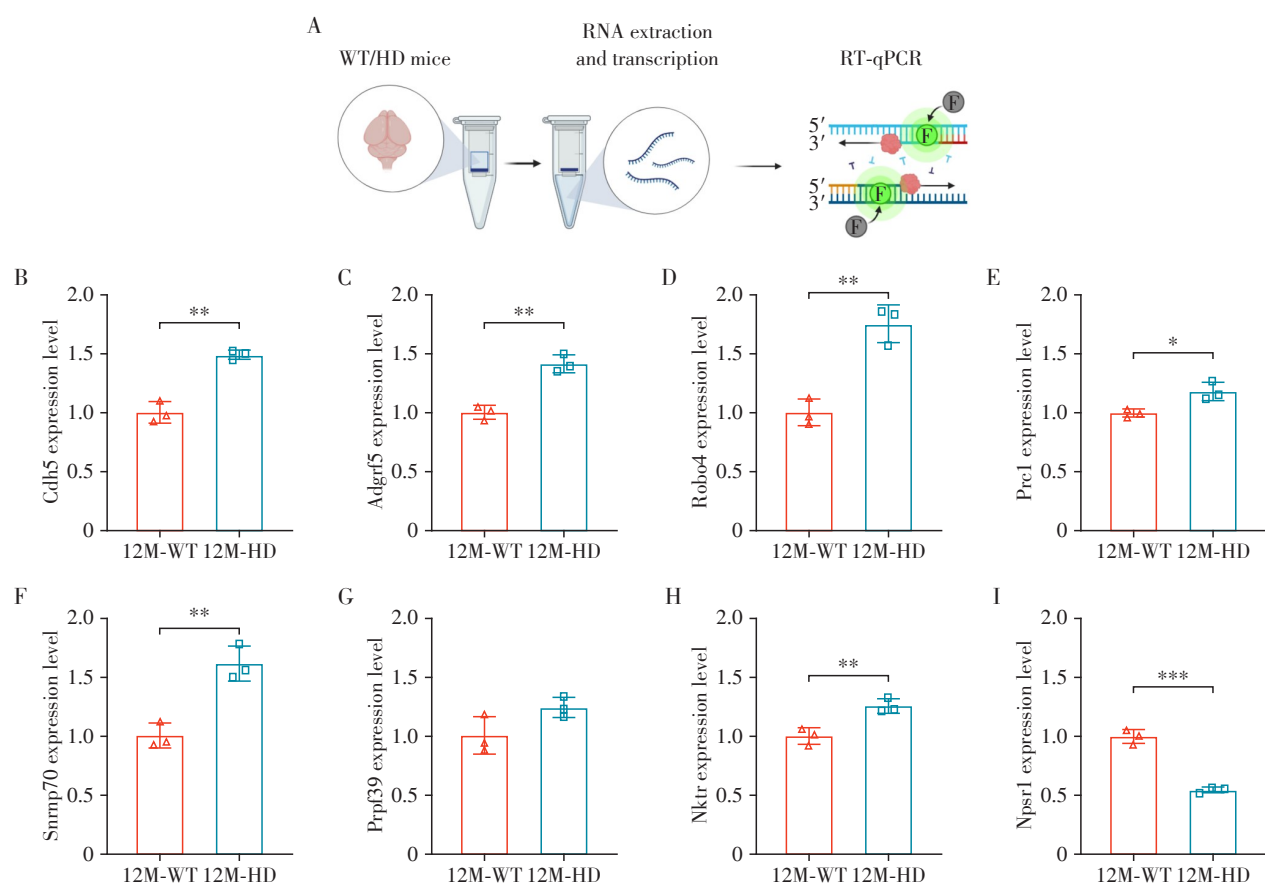
A: The Venn diagram of DEGs in the progression of HD and aging process. B: KEGG enrichment analysis of DEGs specifically altered in the progression of HD. C: Module of PPI network constructed by STRING (database: <https://string-db.org/>, PPI enrichment $P < 0.001$). D: Expression heatmap of predicted key dots.

图4 HD病程关键基因PPI网络
Figure 4 PPI network of core genes in the course of HD

2.5 核心基因验证

为了确证HD病程而非衰老引起的核心基因表达水平的变化,通过RT-qPCR验证核心基因在HD小鼠脑内的表达水平(图5A)。结果显示,核心基因Cdh5、Robo4、Adgrf5、Prc1、Snmp70和Nktr基因表

达水平在HD模型中显著上调,Npsr1显著下调(图5B-I),也证明了转录组数据的有效性和可靠性。这些结果提示,Adgrf5、Adcy4、Robo4、Snmp70等可能是HD星形胶质细胞异质性的关键分子,可作为HD的潜在标志物。



A: Schematic diagram of RT-qPCR from the 12-month-old WT and HD mice brain. B-I: The expression level of Cdh5(B), Adgrf5(C), Robo4(D), Prc1(E), Snmp70(F), Prpf39(G), Nktr(H), Npsr1(I) between the WT and HD mice brain. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图5 核心基因 mRNA 水平验证

Figure 5 Validation of core genes mRNA levels

3 讨论

本研究从转录水平揭示了HD小鼠模型星形胶质细胞的转录本异质性,并分析出靶向HD星形胶质细胞的几个关键分子,为基于星形胶质细胞的HD诊疗和药物研发提供了实验依据。HD的重要病理表现之一是MSN的丢失,而星形胶质细胞能够分泌突触相关蛋白,例如突触囊泡蛋白、突触前膜蛋白等,促进神经元之间形成突触连接^[19-20],在神经元受损的情况下,星形胶质细胞可能通过转化为神经前体细胞或直接分化为神经元来增加神经元数目^[21]。在HD病程早期,疾病组中表达量特异性

下调的基因与离子运输、突触间隙、维持突触结构等功能密切相关,这与临床研究的发现一致,已有研究证明HD患者病程早期大脑存在明显的突触受损^[22],Brtaz等^[23]的研究更是表明挽救早期神经回路缺陷是HD这一疾病极其重要和有待研究的治疗策略。

在HD病程后期,星形胶质细胞显著活化,且HD小鼠A1型反应性星形胶质细胞特异性分子标志物表达上调。转录组数据中调控EAAT2的Slc1a2基因水平降低,这可能引起HD中星形胶质细胞EAAT2的表达降低,谷氨酸清除能力下降,细胞外谷氨酸浓度升高,神经元兴奋性毒性增强,从而导致神经元死亡^[13]。除此之外,有关炎症反应、星形

胶质细胞、小胶质细胞活化的基因在此阶段发生特异性变化,虽然胶质细胞活化的目标旨在阻止神经胶质瘢痕形成,恢复脑内稳态^[24],但这些反应的结果并不总是有益的,特别是在神经变性的情况下,星形胶质细胞的功能失调会导致炎症反应过度^[25],释放炎症因子和细胞因子,促进小胶质细胞的活化,使其转变为M1型小胶质细胞,发挥促炎作用,进一步加重神经损伤^[26]。

PPI网络分析发现HD病程中独立于衰老过程的表达量发生显著变化的核心基因,主要聚焦在血管发生功能、RNA剪接和代谢功能以及肌肉运动功能。在HD患者和R6/2小鼠模型中,mHTT的积累伴随着血管密度增加、血管直径减小以及纹状体中血脑屏障泄漏^[27];TDP-43活性扰乱和m6A RNA修饰改变可能是HD中RNA剪接异常的机制^[28];而HD典型的临床表现诸如不自主运动、肌张力和运动协调障碍也佐证了这一结论^[1]。本研究筛选出的核心基因中部分基因已有文献报道其与神经退行性疾病的相关性。例如,编码血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)的Cdh5介导的Fpn缺失在缺血性脑卒中的急性期发挥神经保护作用^[29]。Adgrf5基因编码的黏附G蛋白偶联受体F5(adhesion G protein-coupled receptor F5, ADGRF5)蛋白在细胞黏附和迁移中发挥重要作用,对神经系统的发育和维护,特别是在突触的形成和维持中至关重要^[30]。而Snrnp70是U1剪接体蛋白的一部分,主要参与RNA剪接过程。Snrnp70基因的剪接变异是肌萎缩侧索硬化症一个亚型的独特特征^[31];此外,Snrnp70也是运动轴突生长、神经依赖性乙酰胆碱受体聚集和神经肌肉突触发生的重要调节因子^[32]。这些结果提示星形胶质细胞Cdh5、Adgrf5、Snrnp70表达上调,参与突触功能和神经保护,可能是HD的潜在分子靶标。

本研究为HD病理的深入探究以及不同病理进程阶段治疗策略的开发提供了新思路。首先,星形胶质细胞的转录异质性基因可作为HD病理进展和预测的有效分子标志物,这些分子标志物可以用于开发灵敏度和特异度较高的诊断试剂盒,通过检测患者血清、尿液或其他体液中的这些分子,实现HD的早期诊断和病情监测。其次,针对HD病程早期星形胶质细胞影响神经元发育和突触形成,可以开发相关药物或治疗方法,如神经营养因子、突触保护剂等,延缓HD病程进展。最后,针对HD病程后期星形胶质细胞转变为A1型反应性星形胶质细胞,可以开发抗炎药物和神经保护剂,以减轻炎症反应和

神经元损伤,改善HD后期症状。然而,本研究对象限于小鼠模型,在一定程度上影响了结果向人类HD病理的直接转化,但在全部39个核心基因中,有17个基因与来自HD患者转录组学数据库(如GSE1751、GSE24250和GSE242198)中得到的差异基因存在重叠,证明了本研究的可靠性,未来可以通过在人类样本中进行验证,以克服当前研究的局限性。此外,这些分子标志物在血清、尿液等体液中能否被有效检出也需要进一步确认。

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突,陈贝宁、郭兴与本期刊均隶属于南京医科大学,但审稿过程遵循双盲原则,评审和编辑决策完全独立,确保了评审的客观性和公正性。

Conflict of Interests:

All authors declared no competing interests. CHEN Beining, GUO Xing, and the journal itself are affiliated with Nanjing Medical University. However, the peer review process follows a double-blind principle, with the review and editorial decisions being completely independent, ensuring the objectivity and fairness of the review.

作者贡献声明:

陈贝宁负责实验探究、数据分析、实验结果可视化、初稿撰写;杨清湖负责实验思路构思、方法设计、数据分析、实验结果可视化、初稿撰写、实验监督和领导;袁增强负责实验思路构思、项目管理、资金支持;郭兴负责实验监督和领导、文章审阅和修改、资金支持。

Author's Contributions:

CHEN Beining was responsible for investigation, analysis, visualization, and writing the original draft. YANG Qinghu contributed to conceptualization, methodology, analysis, visualization, writing the original draft, and supervision. YUAN Zeng-qiang handled conceptualization, project administration, and funding acquisition. GUO Xing oversaw supervision, writing (review and editing), and funding acquisition.

[参考文献]

- [1] TABRIZI S J, ESTEVEZ-FRAGA C, VAN ROON-MOM W M C, et al. Potential disease-modifying therapies for Huntington's disease: lessons learned and future opportunities[J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(7): 645-658
- [2] MÄTLIK K, BAFFUTO M, KUS L, et al. Cell-type-specific CAG repeat expansions and toxicity of mutant Huntingtin in human striatum and cerebellum[J]. *Nat Genet*, 2024, 56(3): 383-394
- [3] CHEN L Q, QIN Y Y, GUO T T, et al. HAP40 modulates mutant Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease mice[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(5): 337
- [4] JING L, CHENG S Y, PAN Y C, et al. Accumulation of en-

- ogenous mutant huntingtin in astrocytes exacerbates neuropathology of Huntington disease in mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(10): 5112-5126
- [5] WU S S, HONG Y, CHU C, et al. Construction of human 3D striato-nigral assembloids to recapitulate medium spiny neuronal projection defects in Huntington's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(22): e2316176121
- [6] YU X Z, JUN N G, KHAKH B S. Improved tools to study astrocytes[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21(3): 121-138
- [7] HASEL P, LIDDELOW S A. Astrocytes [J]. *Curr Biol*, 2021, 31(7): R326-R327
- [8] KHAKH B S, GOLDMAN S A. Astrocytic contributions to Huntington's disease pathophysiology[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2023, 1522(1): 42-59
- [9] ABJEAN L, BEN HAIM L, RIQUELME-PEREZ M, et al. Reactive astrocytes promote proteostasis in Huntington's disease through the JAK2-STAT3 pathway [J]. *Brain*, 2023, 146(1): 149-166
- [10] GANGWANI M R, SOTO J S, JAMI-ALAHMADI Y, et al. Neuronal and astrocytic contributions to Huntington's disease dissected with zinc finger protein transcriptional repressors[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(1): 111953
- [11] TODD A C, HARDINGHAM G E. The regulation of astrocytic glutamate transporters in health and neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9607
- [12] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487
- [13] BRADFORD J, SHIN J Y, ROBERTS M, et al. Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(52): 22480-22485
- [14] BENRAISS A, WANG S, HERRLINGER S, et al. Human Glia can both induce and rescue aspects of disease phenotype in Huntington disease [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11758
- [15] BIROLINI G, VERLENGIA G, TALPO F, et al. SREBP2 gene therapy targeting striatal astrocytes ameliorates Huntington's disease phenotypes[J]. *Brain*, 2021, 144(10): 3175-3190
- [16] XU S B, LI X R, FAN P, et al. Single-cell transcriptome landscape and cell fate decoding in human brain organoids after transplantation [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(28): e2402287
- [17] EDISON P. Astroglial activation: current concepts and future directions [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20(4): 3034-3053
- [18] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-D646
- [19] 陈伟, 赵麟, 刘宁, 等. 星形胶质细胞来源的GJA1-20k在氧化应激后参与神经元保护作用的机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(8): 1098-1104
- CHEN W, ZHAO L, LIU N, et al. Protective effects and mechanism of astrocytic GJA1-20k on neurons in oxidative stress injury[J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2020, 40(8): 1098-1104
- [20] IRALA D, WANG S Y, SAKERS K, et al. Astrocyte-secreted neurocan controls inhibitory synapse formation and function[J]. *Neuron*, 2024, 112(10): 1657-1675
- [21] MA K M, DENG X B, XIA X H, et al. Direct conversion of mouse astrocytes into neural progenitor cells and specific lineages of neurons[J]. *Transl Neurodegener*, 2018, 7: 29
- [22] DELVA A, MICHIELS L, KOOLE M, et al. Synaptic damage and its clinical correlates in people with early Huntington disease: a PET study[J]. *Neurology*, 2022, 98(1): e83-e94
- [23] BRAZ B Y, WENNAGEL D, RATIÉ L, et al. Treating early postnatal circuit defect delays Huntington's disease onset and pathology in mice [J]. *Science*, 2022, 377(6613): eabq5011
- [24] VANDENBARK A A, OFFNER H, MATEJUK S, et al. Microglia and astrocyte involvement in neurodegeneration and brain cancer[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 298
- [25] PATANI R, HARDINGHAM G E, LIDDELOW S A. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration[J]. *Nat Rev Neurol*, 2023, 19(7): 395-409
- [26] MASGRAU R, GUAZA C, RANSOHOFF R M, et al. Should we stop saying 'Glia' and 'neuroinflammation'?[J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(6): 486-500
- [27] DROUIN-OUELLET J, SAWIAK S J, CISBANI G, et al. Cerebrovascular and blood-brain barrier impairments in Huntington's disease: potential implications for its pathophysiology[J]. *Ann Neurol*, 2015, 78(2): 160-177
- [28] NGUYEN T B, MIRAMONTES R, CHILLON-MARINAS C, et al. Aberrant splicing in Huntington's disease via disrupted TDP-43 activity accompanied by altered m6A RNA modification [J/OL]. *bioRxiv*, 2023 [2023-11-16]. DOI: 10.1101/2023.10.31.565004
- [29] ZHENG H W, GUO X, KANG S M, et al. Cdh5-mediated Fpn1 deletion exerts neuroprotective effects during the

- [44] HANCHARD N C A, GOODCHILD L, THOMPSON J, et al. Evidence-based clinical guidelines for the diagnosis, assessment and physiotherapy management of contracted (frozen) shoulder: quick reference summary [J]. *Physiotherapy*, 2012, 98(2): 117-120
- [45] YAN J, ZHANG X M. A randomized controlled trial of ultrasound-guided pulsed radiofrequency for patients with frozen shoulder [J]. *Medicine*, 2019, 98(1): e13917
- [46] SALOMON M, PASTORE C, MASELLI F, et al. Manipulation under anesthesia versus non-surgical treatment for patients with frozen shoulder contracture syndrome: a systematic review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(15): 9715
- [47] FORSYTHE B, LAVOIE-GAGNE O, PATEL B H, et al. Efficacy of arthroscopic surgery in the management of adhesive capsulitis: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Arthroscopy*, 2021, 37(7): 2281-2297
- [48] ZHAO Y, YANG T, FENG C, et al. Arthroscopic capsular release versus manipulation under anesthesia for refractory frozen shoulder: a systematic review with meta-analysis [J]. *Orthop Surg*, 2024, 16(7): 1517-1529
- [49] SUNDARARAJAN S R, DSOUZA T, RAJAGOPALAKRISHNAN R, et al. Arthroscopic capsular release versus manipulation under anaesthesia for treating frozen shoulder - a prospective randomised study [J]. *Int Orthop*, 2022, 46(11): 2593-2601
- [50] RANGAN A, BREALEY S D, KEDING A D, et al. Management of adults with primary frozen shoulder in secondary care (UK FROST): a multicentre, pragmatic, three-arm, superiority randomised clinical trial [J]. *Lancet*, 2020, 396(10256): 977-989
- [收稿日期] 2024-06-13
(本文编辑: 戴王娟)

(上接第 497 页)

- acute phase and inhibitory effects during the recovery phase of ischemic stroke [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2): 161
- [30] JACENIK D, HIKISZ P, BESWICK E J, et al. The clinical relevance of the adhesion G protein-coupled receptor F5 for human diseases and cancers [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, 1869(5): 166683
- [31] NAKAYA T. A specific gene-splicing alteration in the SNRNP70 gene as a hallmark of an ALS subtype [J]. *Gene*, 2022, 818: 146203
- [32] NIKOLAOU N, GORDON P M, HAMID F, et al. Cytoplasmic pool of U1 spliceosome protein SNRNP70 shapes the axonal transcriptome and regulates motor connectivity [J]. *Curr Biol*, 2022, 32(23): 5099-5115
- [收稿日期] 2024-11-24
(本文编辑: 戴王娟)

(上接第 579 页)

- speech and synchrony in the conversation of adults with autism spectrum disorder [J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0225377
- [37] DRIMALLA H, SCHEFFER T, LANDWEHR N, et al. Towards the automatic detection of social biomarkers in autism spectrum disorder: introducing the simulated interaction task (SIT) [J]. *NPJ Digit Med*, 2020, 3: 25
- [38] ZHAO Z, TANG H M, ZHANG X B, et al. Classification of children with autism and typical development using eye-tracking data from face-to-face conversations: machine learning model development and performance evaluation [J]. *J Med Internet Res*, 2021, 23(8): e29328
- [收稿日期] 2024-11-13
(本文编辑: 陈汐敏)