DOI:10.16016/j.2097-0927.202304089

胰淀素对阿尔茨海默病小鼠脑组织中 circRNA 和 mRNA 表达谱的影响

侯明亮[1],马琳秋[1],李金平[1],李小雄[1],马晶晶[1],黄 洁[1],廖旗荣[1],杨红岩[1],周华东[1,2] 233004 安徽 蚌埠,蚌埠医学院第一附属医院神经内科[1];400042 重庆,陆军特色医学中心神经内科[2]

[摘要] **目的** 研究胰淀素(islet amyloid polypeptide,IAPP)腹腔注射对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)小鼠和野生型(wild-type,WT)小鼠脑组织中环状 RNA(circular RNA,circRNA)和信使 RNA(messenger RNA,mRNA)表达谱的影响。**方法** 选取 10 月龄 20~30 g 雄性 APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠和 C57 WT 小鼠各 6 只,把 6 只 AD 小鼠和 WT 小鼠使用随机数字表法分成 2 组,每组 3 只。腹腔注射 IAPP 的 AD 小鼠(AD^{+IAPP})作为实验组,腹腔注射 IAPP 的 WT 小鼠(WT^{+IAPP})作为对照组,腹腔注射相同剂量的磷酸盐缓冲液(PBS)的 AD 小鼠(AD^{+PBS})和 WT 小鼠(WT^{+PBS})作为空白对照组。干预结束后,提取 4 组小鼠脑组织总 RNA,进行基因芯片测序,筛选出 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 相比差异表达的 circRNA 和 mRNA,以及 AD^{+PBS} 与 WT^{+PBS} 相比差异表达的 circRNA 和 mRNA。在 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 相比筛选出来的差异 circRNA 中,选取 6 个差异表达的 circRNA,进行实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)验证基因芯片结果的可靠性。对差异表达的 mRNA 进行基因本体论(gene ontology,GO)富集分析与京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析。随后构建显著差异表达的 circRNA_45921 的 ceRNA(competitive endogenous RNA)网络。**结果** AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 比较,显著差异表达的 circRNA 共有 237 个,其中 157 个上调,80 个下调;显著差异表达 mRNA 共有 663 个,其中 348 个上调,315 个下调。qRT-PCR 结果显示 6 个差异表达的 circRNA 与基因芯片结果一致,基因芯片测序结果可靠。GO 富集分析显示差异表达上调的 mRNA 在核苷磷酸结合、细胞器、含磷酸盐化合物代谢过程等 GO 条目显著富集;差异表达下调的 mRNA 在跨膜信号受体活性、超分子纤维、组织发育等 GO 条目显著富集。KEGG 富集分析显示差异表达上调的 mRNA 主要富集于胰岛素分泌、氧化磷酸化、帕金森病等信号通路;差异表达下调的 mRNA 主要富集于神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢等信号通路。CeRNA 网络显示 circRNA_45921/miR-34c-5p/Eef2k 调控网络可能在 IAPP 功能发挥中具有作用。**结论** 腹腔注射 IAPP 改变 AD 小鼠和 WT 小鼠脑组织中 circRNA 和 mRNA 的表达谱。差异表达的 Paip2、Cdon、Ttr 和 circRNA_45921/miR-34c-5p/Eef2k 调控网络可能在 IAPP 调节 AD 的发生发展中起作用。

[关键词] 阿尔茨海默病;胰淀素;环状 RNA;信使 RNA
[中图法分类号] R745.7; R966; R977.6 [文献标志码] A

Effect of amylin on expression profiles of circRNAs and mRNAs in brain tissue of Alzheimer's disease mice

HOU Mingliang[1], MA Linqiu[1], LI Jinping[1], LI Xiaoxiong[1], MA Jingjing[1], HUANG Jie[1], LIAO Qirong[1], YANG Hongyan[1], ZHOU Huadong[1,2] [1]Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province, 233004; [2]Department of Neurology, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of intraperitoneal injection of islet amyloid polypeptide (IAPP) on the expression profiles of circular RNAs (circRNAs) and messenger RNAs (mRNAs)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81771177)
[通信作者] 周华东,E-mail:zhouhuad@163.com

2097-0927/Copyright © 2023, 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/)

in the brain tissue of Alzheimer's disease (AD) mice and wild-type (WT) mice. **Methods** Six 10-month-old male APP/PS1 transgenic AD model and C57 WT mice (20~30 g) were employed in this study. They were randomly divided into 2 groups, and further assigned into AD+IAPP (AD mice with IAPP intraperitoneal injection), WT+IAPP (WT mice with IAPP intraperitoneal injection), AD+PBS (AD mice injected with same dose of PBS intraperitoneally) and WT+PBS (WT mice with intraperitoneal injection of PBS) groups (n=3). After the intervention, total RNA was extracted from the brain tissue of 4 groups of mice, and gene chip sequencing was performed to screen differentially expressed circRNAs and mRNAs between AD+IAPP and WT+IAPP mice and between AD+PBS and WT+PBS mice. Among the differentially expressed circRNAs between AD+IAPP and WT+IAPP mice, 6 circRNAs were selected and subjected to real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) to verify the reliability of the microarray results. Gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) pathway enrichment analysis were performed on the differentially expressed mRNAs. Subsequently, a competitive endogenous RNA (ceRNA) network was constructed for significantly differentially expressed circRNA_45921. **Results** There were 237 circRNAs significantly differentially expressed between AD+IAPP and WT+IAPP mice, of which 157 were up-regulated and 80 were down-regulated. Totally 663 significantly differentially expressed mRNAs were found, including 348 up-regulated and 315 down-regulated. The results of qRT-PCR showed that the differential expression of 6 circRNAs was consistent with the results of gene chip, indicating that the results of gene chip sequencing were reliable. GO enrichment analysis revealed that differentially up-regulated mRNAs were significantly enriched in nucleoside phosphate binding, organelles and metabolism processes of phosphate containing compounds. The differentially down-regulated mRNAs were significantly enriched in transmembrane signal receptor activity, supramolecular fibers and tissue development. KEGG enrichment analysis indicated that differentially upregulated mRNAs were mainly enriched in signal pathways such as insulin secretion, oxidative phosphorylation, and Parkinson's disease, while those down-regulated ones in signal pathways such as neuroactive ligand receptor interactions, calcium signaling pathways, tyrosine metabolism and phenylalanine metabolism. CeRNA network displayed that the circRNA_45921/miR-34c-5p/Eef2k regulatory network may play a role in the functioning of IAPP. **Conclusion** Intraperitoneal injection of IAPP alters the expression profiles of circRNA and mRNA in the brain tissues of AD mice and WT mice. Differentially expressed Paip2, Cdon, Ttr, and circRNA_45921/miR-34c-5p/Eef2k regulatory network may have regulatory roles in IAPP regulating the development of AD.

[**Key words**] Alzheimer's disease; amylin; circRNA; mRNA

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81771177). Corresponding author: ZHOU Huadong, E-mail: zhouhuad@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种神经退行性疾病,其特征在于含有β-淀粉样蛋白(Amyloid β, Aβ)的细胞外斑块和tau蛋白的细胞内神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)[1]。在65岁及以上的美国人中,AD位居第五大死因,且死亡人数呈逐年增加趋势[2]。胰淀素(islet amyloid polypeptide,IAPP)是由胰岛β细胞分泌的一种含有37-氨基酸残基的长肽[3]。IAPP沉积是2型糖尿病(diabetes mellitus type 2,T2DM)的典型病理特征,且错误折叠的IAPP可以在AD和T2D患者的大脑中聚集和沉积[4-5]。目前,IAPP与Aβ相互作用对AD的影响,仍没有达成共识。有研究表明,IAPP作为一种调节葡萄糖稳态的脑肠神经肽调节剂,广泛存在于脑中[6],IAPP与Aβ可通过交叉播种相互作用,形成神经元外淀粉样斑块沉积,并促进Aβ聚集,造成认知功能损伤,导致AD的发生发展[7-9]。另一些研究发现,可溶性IAPP与AD的Aβ具有高亲和力,并抑制Aβ的纤维生成和细胞毒性,减少Aβ斑块生成[10-11]。动物实验研究表明,在小鼠外周注射IAPP或其非淀粉样蛋白生成类似物普兰林肽后,Aβ从大脑转移到血液增加,改善AD小鼠认知功能[12-15]。IAPP成为AD治疗和预防的潜在分子靶点。对IAPP分子功能及其与Aβ之间的相互作用对研究AD的发病机制和治疗具有重要意义。

circRNA 是一类缺乏典型的 5'帽和 3'多聚 A 尾,并共价闭合的新的非编码 RNA,circRNA 对核酸外切酶的消化具有高度抗性并且相对稳定,通过海绵化特定的 microRNA 来调节基因表达,虽然它们被认为是非编码 RNA,但一些 circRNA 已被证明具有产生肽的潜力[16]。有研究发现,circRNA 在哺乳动物的大脑中具有高度代表性,在衰老、神经发育和突触活动中发挥调节作用,可能导致 AD 的发展[17-18]。

目前,IAPP 对 AD 的作用尚不清楚。与 AD 相关的 circRNA 的功能了解甚少,但 circRNA 的稳定性和特异性表达谱表明 circRNA 是治疗 AD 的候选者,并受到广泛关注。本研究利用基因芯片技术检测 IAPP 腹腔注射后 AD 小鼠脑组织中 circRNA 和 mRNA 表达谱变化,并对筛选的差异转录本进行分析,探究 IAPP 腹腔注射对 AD 小鼠脑组织中 circRNA 表达谱的影响,识别和验证关键 circRNA,为开发治疗 AD 的 circRNA 相关核苷酸药物提供新的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

IAPP 购自重庆市思恩特医疗器械有限公司,Arraystar Mouse circRNA Array V2 及配套试剂盒购自美国 Arraystar 公司,TRIzol 试剂和 SuperScript™ Ⅲ RT master mix 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,RNA 酶试剂盒购自美国 Qiagen 公司,2×PCR master mix 试剂盒购自美国 Arraystar 公司。

NanoDrop® ND-1000 分光光度仪为美国 NanoDrop 公司产品,Agilent Scanner G2505C、Agilent Feature Extraction (v11.0.1.1)软件、GeneSpring GX (v12.1)软件为美国 Agilent 公司产品,QuantStudio5 Real-time PCR System 为美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.2 小鼠脑组织样本

脑组织样本取自腹腔注射 IAPP 溶液和相同剂量磷酸盐缓冲液的 10 月龄雄性 APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠和 C57 野生型老年小鼠[C57WT,购自南京君科生物工程有限公司,动物许可证号:SCXK(苏)2020-0009],体质量 20~30 g,AD 小鼠和 C57 WT 小鼠各 6 只,使用随机数字表法分为 4 组:AD^{+IAPP}、WT^{+IAPP}、AD^{+PBS} 与 WT^{+PBS},每组各 3 只小鼠。IAPP 溶液浓度 0.5 μmol/L,溶剂为 PBS,剂量 200 μg/kg,每日 1 次。腹腔注射 IAPP 溶液干预时间均为 10 周,结束后立即颈椎脱位处死,剥离完整脑组织,保存在-80 ℃冰箱中备用。实验过程中遵循实验动物伦理规定。

1.3 基因芯片测序和数据分析

总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂盒说明操作。使用 Arraystar Mouse circRNA Array V2 及配套试剂盒完成基因芯片杂交;NanoDrop® ND-1000 测定 RNA 浓度和纯度;Agilent Scanner G2505C 对基因芯片进行扫描。根据扫描结果,使用 Agilent Feature Extraction 软件读取芯片信号强度和获得原始数据;GeneSpring GX (v12.1)软件将原始数据标准化处理后进行差异表达分析。差异表达的 circRNA 和 mRNA 筛选条件为:差异倍数的绝对值≥1.5,P 值<0.05 且 FDR<0.5。

1.4 qRT-PCR 验证 circRNA 的表达

选取具有潜在生物学功能的 6 个差异表达的 circRNA 进行 qRT-PCR 检测。使用 TRI Reagent 抽提 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 脑组织总 RNA,NanoDrop® ND-1000 测定 RNA 浓度和纯度。按照 SuperScript™ Ⅲ Reverse Transcriptase kit 说明书,将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。逆转录条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。使用 Primer 5.0 设计引物,引物序列见表 1。将所得 cDNA 按照 2×PCR master mix 试剂盒说明进行扩增,反应条件为:95 ℃ 10 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 60 s,40 个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,由反应曲线得出阈值循环参数后,应用 QuantStudio™ 5 real-time PCR 仪分析荧光阈值(cyclethreshold,Ct)。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。重复 3 次实验,结果取平均值。

表 1 目的基因引物序列和长度

基因名(CircRNA)	引物序列	产物长度/bp
circRNA_35138	正向:5′-TAGCGTCTGCCCTAAGAGGTA-3′ 反向:5′-CCACTTGTGCCAATTTGTTGT-3′	181
circRNA_38989 正向引物	正向:5′-TCCTGAAGCGGACTCACCAA-3′ 反向:5′-GGATTTGCCAATACCTGTCTCACT-3′	192
circRNA_22593 正向引物	正向:5′-ATGTGGGTGGCTTATCTGG-3′ 反向:5′-ACTGCGGATGTTGGTTGTT-3′	61
circRNA_36807	正向:5′-TTCGGGATGAGCACAAGGT-3′ 反向:5′-GGCTGATTGTCATGGTGGAA-3′	71
circRNA_38835	正向:5′-GCTTATCGTGCCAACTTCTGT-3′ 反向:5′-GAGTGATGTCAAAAAGTGACCTGT-3′	105
circRNA_45921	正向:5′-ATGTGGGAGCGTGGAGATAA-3′ 反向:5′-CATCACGGTCAGCATTCTTG-3′	298
GAPDH	正向:5′-CACTGAGCAAGAGAGGCCCTAT-3′ 反向:5′-GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT-3′	144

1.5 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析

将差异表达的 mRNA 导入 GO 数据库(http://www.geneontology.org)进行富集分析,对分子功能、生物过程和细胞成分 3 个领域的 GO 条目上差异表达基

因的数目进行分析,从而获得显著富集的 GO 条目和预测差异表达基因的生物学功能。将差异表达的 mRNA 导入 KEGG 数据库(http://www.genome.jp/kegg)进行通路富集分析,获得差异表达的 mRNA 显著富集的信号通路。

1.6 CeRNA 网络构建

CeRNA 假说表明 mRNA 和 circRNA 转录本可以通过 microRNA 反应元件与 microRNA 靶向结合来相互调控基因表达。为了寻找 mRNA 和 circRNA 与 microRNA 的潜在靶点,采用基于 TargetScan 和 miRanda 的 miRNA 靶点预测数据库进行预测。根据预测结果,通过合并 mRNA 和 circRNA 共同的靶向 miRNA,利用 Cytoscape 构建 ceRNA 网络图。

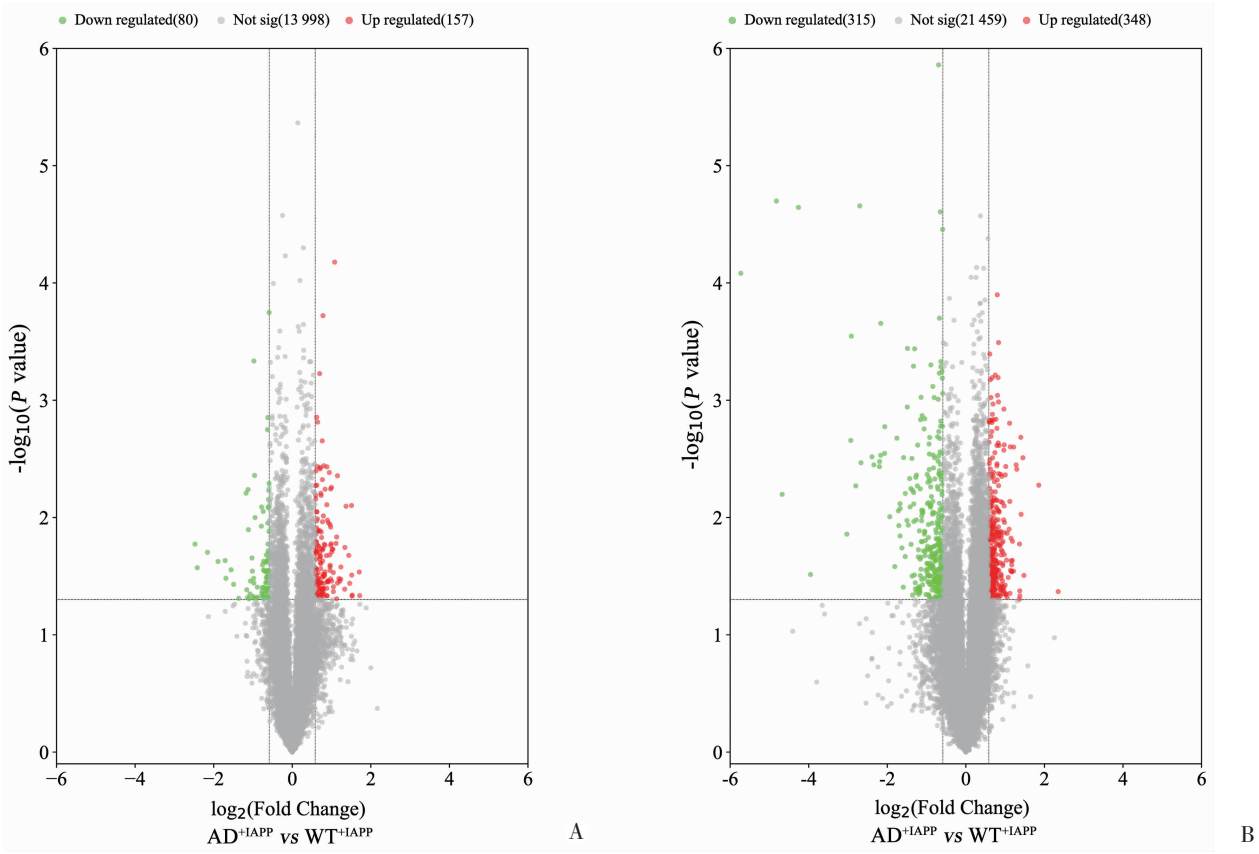
1.7 统计学分析

差异表达基因筛选使用 R-4.1,应用 Graphpad Prism 8.0 统计学软件进行数据分析和统计图绘制,组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

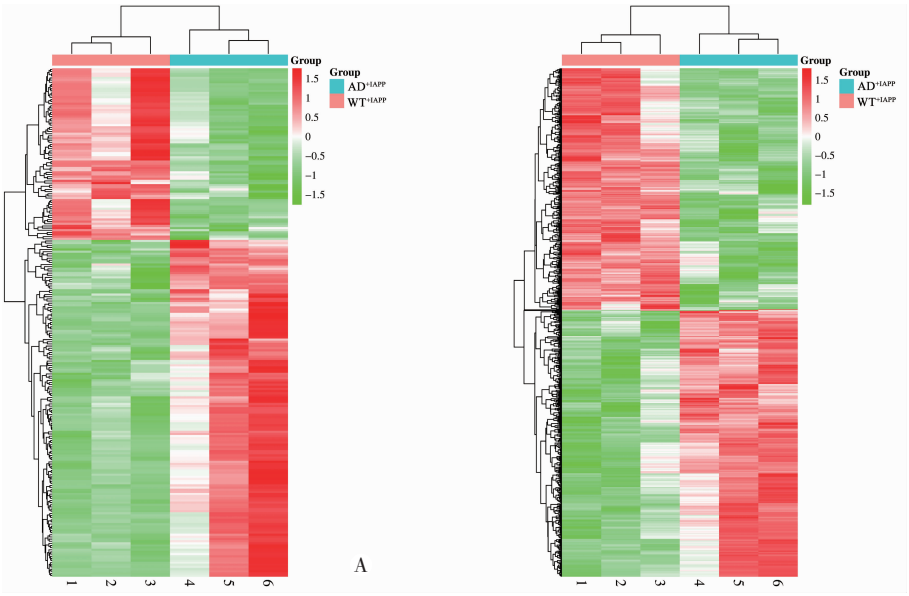
2.1 circRNA 和 mRNA 的差异表达分析

AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 芯片测序结果显示,显著差异表达的 circRNA 共有 237 个,其中 157 个上调,80 个下调;显著差异表达 mRNA 共有 663 个,其中 348 个上调,315 个下调,见图 1。热图显示,AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 小鼠脑组织的 circRNA 和 mRNA 基因表达谱存在显著差异,见图 2。差异表达前 10 位的 circRNA 和 mRNA 见表 2。这些差异表达的 circRNA 和 mRNA 在 AD^{+PBS} 与 WT^{+PBS} 小鼠之间并不存在差异表达,见表 3,说明这些差异表达的 circRNA 和 mRNA 均受 IAPP 调节。



红色为显著上调基因;绿色为显著下调基因;灰色为无差异变化的基因

图 1 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 小鼠比较差异表达 circRNA(A)和 mRNA(B)的火山图



1~3:WT^{+IAPP} 组;4~6:AD^{+IAPP} 组;纵轴为基因聚类,1 行代表 1 个基因;红色表示上调,绿色表示下调,颜色越亮基因相对表达量越高

图 2 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 小鼠比较差异表达 circRNA(A)和 mRNA(B)的热图

表 2 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 小鼠比较差异表达的 circRNA 和 mRNA

CircRNA				mRNA			
基因名称	差异倍数	*P* 值	上/下调	基因名称	差异倍数	*P* 值	上/下调
circRNA_39081	3.288	0.046	上调	Gm42417	2.736	0.003	上调
circRNA_26540	3.262	0.029	上调	Paip2	2.652	0.009	上调
circRNA_22892	2.881	0.045	上调	Cdon	2.637	0.002	上调
circRNA_39877	2.872	0.046	上调	Cmtm3	2.457	0.003	上调
circRNA_43335	2.856	0.031	上调	Erbb3	2.429	0.003	上调
circRNA_24245	5.562	0.016	下调	Ttr	28.286	0.000	下调
circRNA_45921	5.346	0.026	下调	1500015O10Rik	19.173	0.000	下调
circRNA_29625	4.465	0.019	下调	F5	6.497	0.000	下调
circRNA_007951	3.705	0.023	下调	Aldh1a2	5.236	0.003	下调
circRNA_19469	3.269	0.023	下调	Tmem212	5.066	0.004	下调

表 3 差异表达的 circRNA 和 mRNA 在 AD^{+PBS} 与 WT^{+PBS} 小鼠比较

CircRNA				mRNA			
基因名称	差异倍数	*P* 值	上/下调	基因名称	差异倍数	*P* 值	上/下调
circRNA_39081	1.558	0.262	无差异	Gm42417	1.054	0.755	无差异
circRNA_26540	1.651	0.080	无差异	Paip2	2.017	0.120	无差异
circRNA_22892	1.348	0.166	无差异	Cdon	1.055	0.445	无差异
circRNA_39877	1.352	0.086	无差异	Cmtm3	1.073	0.745	无差异
circRNA_43335	1.439	0.083	无差异	Erbb3	1.167	0.444	无差异
circRNA_24245	3.270	0.179	无差异	Ttr	5.045	0.169	无差异
circRNA_45921	3.634	0.194	无差异	1500015O10Rik	4.355	0.147	无差异
circRNA_29625	2.566	0.235	无差异	F5	3.456	0.146	无差异
circRNA_007951	2.241	0.141	无差异	Aldh1a2	2.526	0.143	无差异
circRNA_19469	2.273	0.125	无差异	Tmem212	1.734	0.240	无差异

2.2 qRT-PCR 验证 circRNA 的表达

为了验证芯片结果的可靠性,挑选具有潜在生物学功能的 6 个差异表达的 circRNA 进行 qRT-PCR 验证,结果显示,AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 相比,circRNA-35138、circRNA-38989、circRNA-22593 表达显著上调($P<0.05$),circRNA-36807、circRNA-38835、circRNA-45921 表达显著下调($P<0.05$),见图 3。qRT-PCR 检测结果与基因芯片结果一致,提示 circRNA 基因芯片测序结果可靠。

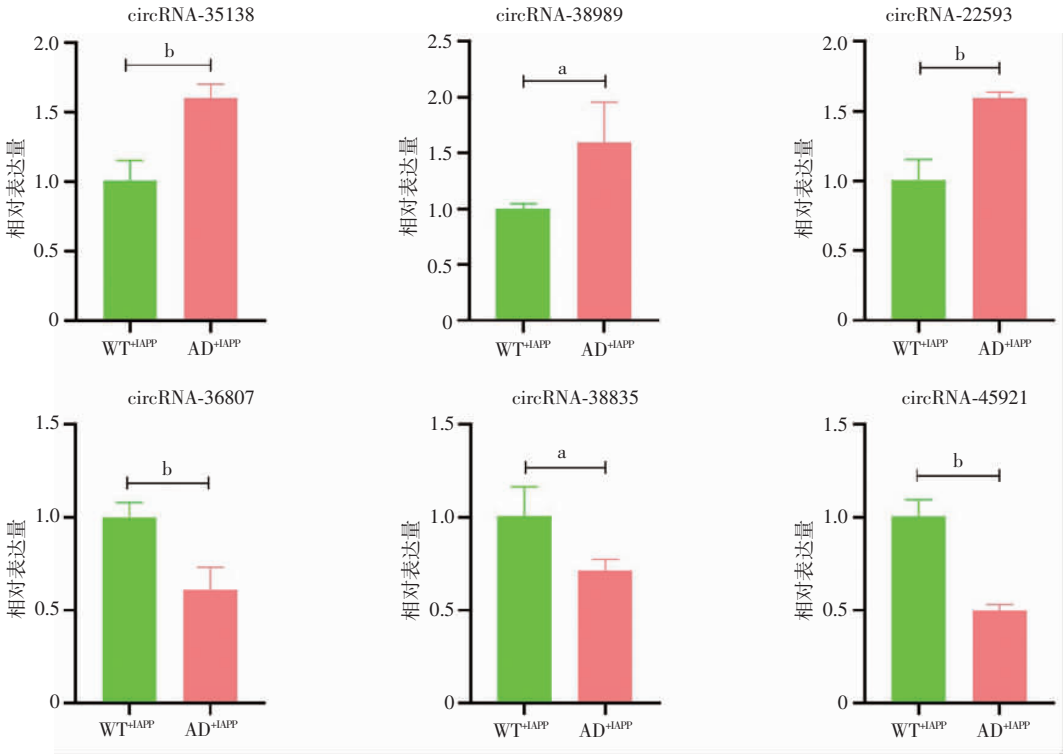
2.3 差异表达 mRNA 的 GO 和 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析显示:663 个差异表达的 mRNA 被富集到 1 019 个 GO 条目,其中 348 个上调 mRNA 被富集到 525 个 GO 条目。315 个下调的 mRNA 被富集到 494 个 GO 条目,差异均有统计学意义($P<0.05$)。差异表达上调的 mRNA 在分子功能领域主要富集于核苷磷酸结合、催化剂活性等;在细胞组分领域主要富集于细胞器、细胞质等;在生物过程领域主要富集于含磷酸盐化合物代谢过程、初级代谢过程等。差异表达下调的 mRNA 在分子功能领域主要富集于跨膜信号受体活性、分子传导活性等;在细胞组分领域主要富集于膜固有成分、超分子纤维等;在生物过程领域主要富集于组织发育、系统进程等。差异表达 mRNA 在分子功能、细胞成分、生物过程 3 个领域富集评分前 10 的 GO 条目见图 4。

KEGG 富集分析显示:663 个差异表达的 mRNA 被富集到 16 个通路,其中 348 个上调的 mRNA 被富集到 8 个通路,315 个下调的 mRNA 被富集到 8 个通路,差异均有统计学意义($P<0.05$)。差异表达上调的 mRNA 主要富集于胰岛素分泌、氧化磷酸化、帕金森病等信号通路;差异表达下调的 mRNA 主要富集于神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢等信号通路。KEGG 富集分析评分前 10 位的通路见图 5。

2.4 CeRNA 分析

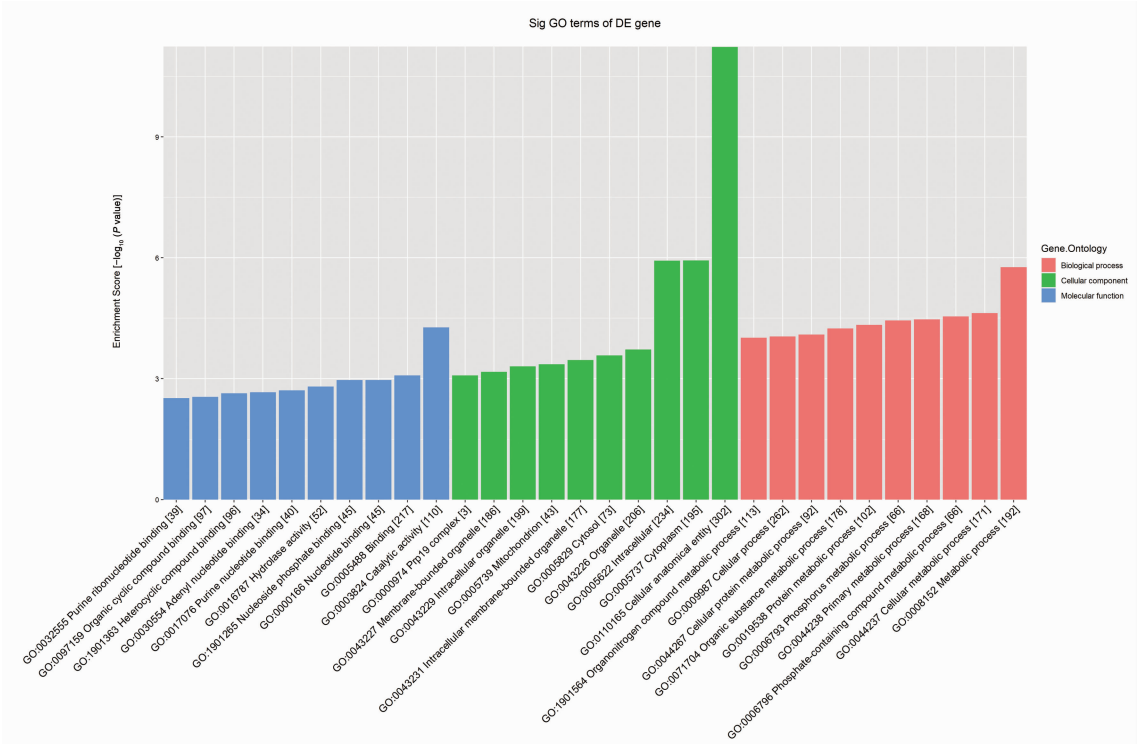
AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 小鼠相比,circRNA_45921 显著下调,qRT-PCR 验证结果与芯片结果相同。因此,选择 circRNA_45921 作为 miRNA 靶点构建 ceRNA 网络,见图 6。CeRNA 网络分析表明,circRNA_45921 与 miR-34c-5p 靶向结合具有较高的预测评分。miR-34c-5p 与真核细胞延伸因子 2 激酶(eukaryotic elongation factor 2 kinase,Eef2k)靶向结合具有较高的预测评分。合并 circRNA_45921 和 Eef2k 的共同靶向 miRNA,获得了 circRNA_45921 的 ceRNA 网络 circRNA_45921/miR-34c-5p/Eef2k 调控网络。



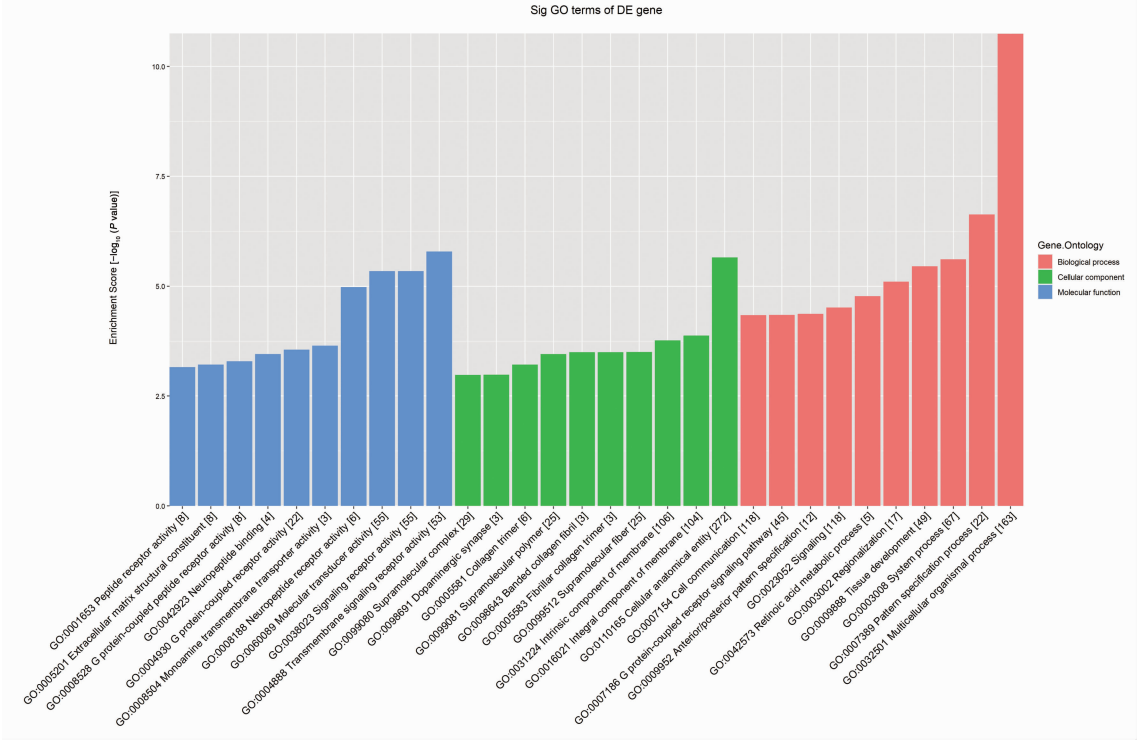
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

AD 为阿尔茨海默病鼠;WT 为野生型老年鼠;IAPP 为胰淀素

图 3 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 小鼠脑组织目的基因相对表达量



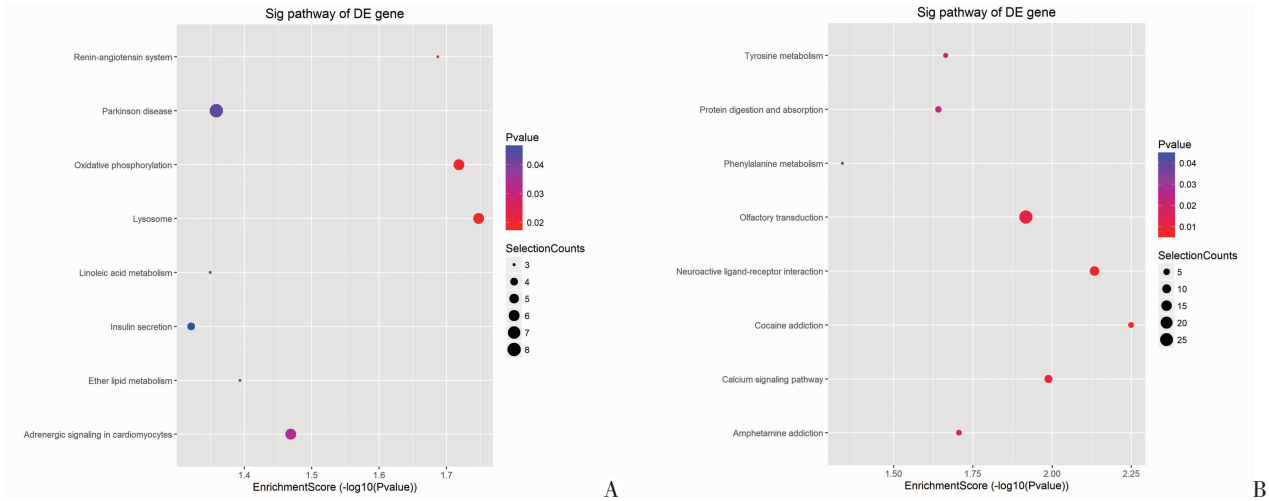
A



B

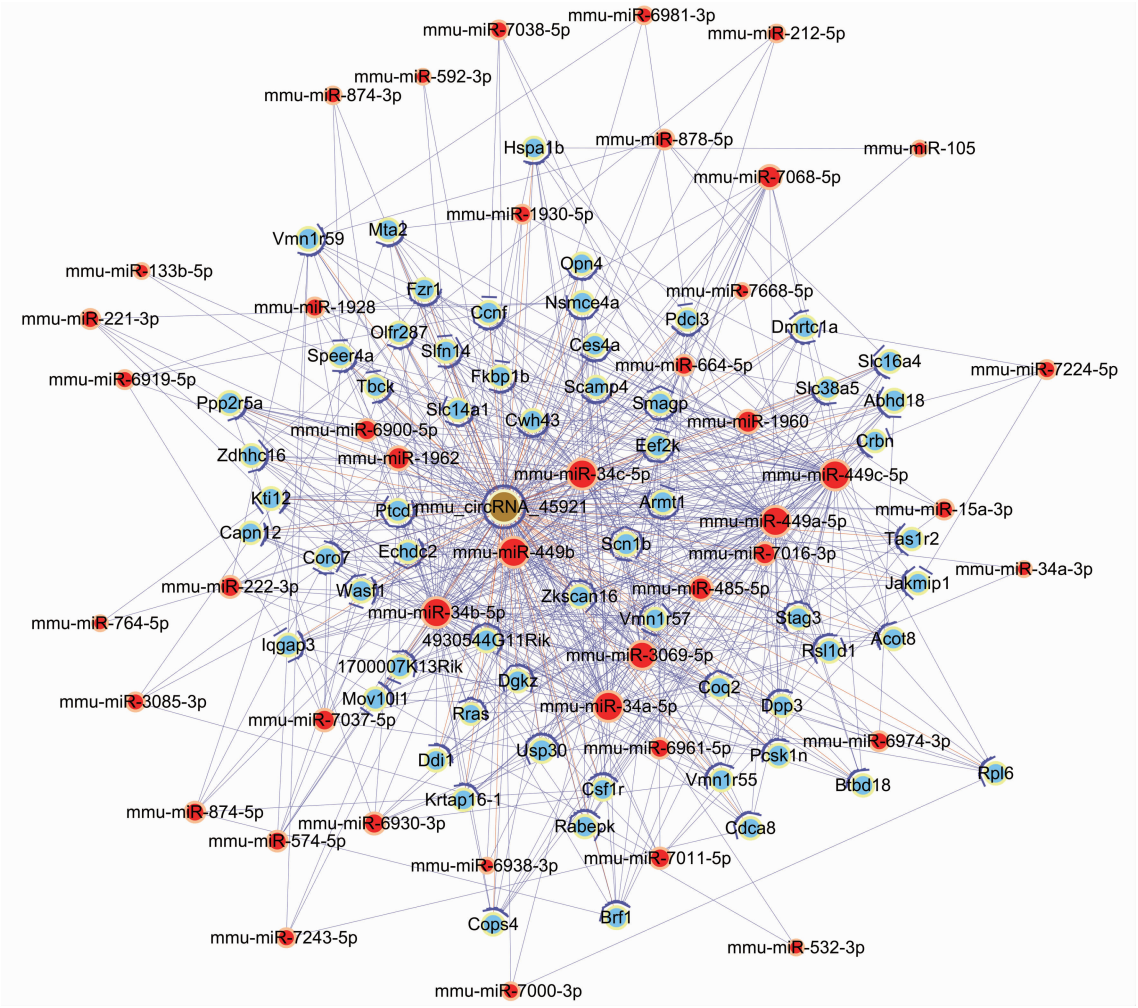
A:显著上调的差异表达 mRNA 的 GO 条目;B:显著下调的差异表达 mRNA 的 GO 条目

图 4 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 小鼠相比差异表达的 mRNA 在分子功能、细胞成分和生物学过程 3 个领域的 GO 分析



A:显著上调的差异表达 mRNA 的富集通路;B:显著下调的差异表达 mRNA 的富集通路

图 5 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 小鼠相比差异表达的 mRNA 的 KEGG 分析



棕色表示 circRNA;红色表示 microRNA;蓝色表示 mRNA

图 6 circRNA_45921 的 ceRNA 分析

3 讨论

在生理条件下,IAPP 与胰岛素协同从胰岛 β 细胞释放,共同调节糖代谢[19]。在 AD 或 T2DM 小鼠,IAPP 可因聚集和沉积而失去功能,形成有毒的低聚物和淀粉样纤维[20]。研究发现,IAPP 可与 Aβ 相互作用共同沉积在脑内,加重 AD 病理[7-8]。本研究采用基因芯片技术,AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 测序结果比较,共有 663 个差异 mRNA,包括上调的 Paip2、Cdon 和下调的 Ttr。多聚(A)结合蛋白相互作用蛋白 2(Paip2)是一种翻译抑制蛋白,有研究发现抗 Paip2 自身抗体的产生与 ApoE4 有关,APOE 是迟发型阿尔兹海默症(AD)的主要风险因子,Paip2 可能与脑内炎性病理相关。抗 Paip2 自身抗体升高与 MCI 和 AD 的风险显著相关,认为其可能是 AD 的潜在诊断生物标志物[21-22]。癌基因下调的细胞黏附分子相关蛋白(Cdon)是一种凋亡诱导蛋白,其下调对于促进 SH-SY5Y 神经细胞存活是必需的[23]。在体试验表明,Cdon 可能与 TNF-α、Il-1β 相互作用调节神经炎症。Cdon 敲除小鼠的血脑屏障紧密性导致白细胞浸润减少,小胶质细胞和星形胶质细胞活化减少以及神经元存活增加[24]。转甲状腺素(Ttr)是血浆和脑脊液中甲状腺素和视黄醇的载体蛋白,已被证明可以与 Aβ 结合。不仅如此,Ttr 还被认为可以防止 Aβ 沉积[25]。ZISKIN 等[26]通过磷酸化 tau 免疫染色发现,在皮层区域,Ttr 蛋白沉积的下方观察到磷酸化 tau 聚集体,这表明 Ttr 和 tau 病理之间存在潜在联系。腹腔注射 IAPP 使得 Paip2 和 Cdon 的表达上调,Ttr 的表达下调,可能导致 Aβ 的沉积增加、Tau 蛋白磷酸化和神经炎症相关分子表达增加。提示腹腔注射 IAPP 可能通过 Paip2、Cdon 和 Ttr 调节 AD 的发生和发展[27]。一项与本研究类似的实验结果显示,腹腔注射 IAPP 降低了大脑皮质和海马 Aβ 的沉积,增加脑脊液 Aβ 水平。同时,腹腔注射 IAPP 改善了转基因 AD 鼠的认知功能,而对野生型老年鼠没有影响[13]。本研究为 IAPP 的分子机制提供了新的见解,IAPP 通过 Paip2、Cdon 或 Ttr 调节 Aβ、tau 病理和脑内炎性病理,有待进一步研究。

AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 比较,显著差异表达的 circRNA 共有 237 个。包括上调的 circRNA_39081 和下调的 circRNA_45921 等。相关研究表明,circRNA_39081 的亲本基因 Sparcl1 在人和小鼠海马中均存在 circRNA 转录本(如 hsa_circ_0127250, mmu_circ_0011950)。circRNA_45921 的亲本基因 Phka2 在人前额叶、颞叶、间脑存在 circRNA 转录本(如 hsa_circ_0140034)[28]。本研究通过 circRNA 芯片测序小鼠脑组织存在 Sparcl1 和 Phka2 的 circRNA 转录本。研究表明,circPhka2 在人脑内是一种环状且稳定的转录物,主要位于细胞质中。circPhka2 可以靶向结合 miR-574-5p,上调 SOD2 和降低 Bax 表达,促进细胞增殖,抑制凋亡和氧化应激[29]。并且 miR-574-5p 在 3′UTR 具有与 BACE1(β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1,β-secretase)结合位点。BACE1 不仅促进 Aβ 的沉积,而且增加的 BACE1 活性可能影响正常的突触功能,导致认知障碍[30]。AD 小鼠腹腔注射 IAPP 使 circRNA_45921 表达下调,IAPP 可能通过 circRNA_45921/miR-574-5p/BACE1 轴调控 Aβ 沉积和 AD 的进展。CircPAIP2 是一种保留内含子的 circRNA,它上调记忆相关的亲代基因 Paip2[31]。IAPP 腹腔注射可能通过相关 circRNA 上调 Paip2、Cdon 和下调 Ttr 的表达,调节 AD 的发展。同时,circRNA_39081 和 circRNA_45921 也可能是潜在的 AD 诊断分子标志物和治疗靶点。

本研究 GO 和 KEGG 富集分析结果表明,IAPP 可能通过细胞器、胰岛素分泌、氧化磷酸化、帕金森病等途径参与调节 AD 的发生发展。相关研究发现,IAPP 可使细胞膜过度弯曲而破坏膜结构,导致 AD 和帕金森病的发生[32]。IAPP 和胰岛素是由胰岛 β 细胞共包装和协同分泌,胰岛素抵抗可能导致 AD 病理,IAPP 破坏囊泡功能,与阿尔茨海默病和帕金森病的发病机制有关[33-34]。IAPP 诱导 tau 蛋白磷酸化,在体外和体内增强 tau 蛋白的神经元毒性,导致小鼠突触功能障碍和记忆缺陷[35]。本研究为 IAPP 参与 AD 调节的作用机制研究提供了新的方向,IAPP 可能通过具有调节胰岛素分泌、帕金森病或氧化磷酸化作用的基因(如 COX6c)改变 AD 的病理表现。

CeRNA 结果表明,circRNA_45921/miR-34c-5p/Eef2k 调控网络显示较高预测评分。已有研究表明,miR-34c-5p 的过度表达显著降低了微管相关 tau 蛋白(microtubule-associated protein tau,MAPT)的表达[36]。Eef2k 诱导 Eef2 过度磷酸化,导致蛋白质合成受到抑制。Eef2k 减少改善了记忆缺陷和海马长时程增强损伤,而不改变 Aβ 病理[37]。这提示 circRNA_45921/miR-34c-5p/Eef2k 调控网络可能在 IAPP 调节 AD 发生发展过程中发挥作用,也为 IAPP 作用的分子机制提供新的思路。

本研究取材自小鼠脑组织进行芯片测序,没有进行细胞水平更加深入的研究,以验证所确定的 circRNA 功能及其与 IAPP 之间的作用关系;结果显示 Ttr 下调,相关研究表明 Ttr 可能是治疗 AD 的靶点[38],本研究没有对 IAPP 功能进行进一步验证。

综上所述,本研究结果表明 AD^{+IAPP} 与 WT^{+IAPP} 相比,两组小鼠脑组织中 circRNA 和 mRNA 的表达谱均发生改变。差异表达的 circRNA 如 circRNA_45921,可能通过 circRNA_45921/miR-574-5p/BACE1 轴调节 Aβ 沉积和 AD 的进展。差异表达的 mRNA 如 Paip2、Cdon 和 Ttr 等可能导致 Aβ 的沉积增加、Tau 蛋白磷酸化和神经炎症相关分子表达增加。差异表达的 mRNA 主要通过胰岛素分泌、氧化磷酸化、神经活性配体-受体相互作用等通路参与调节 AD 的发生发展。circRNA_45921/miR-34c-5p/Eef2k 调控网络可能在 IAPP 调节 AD 的发生发展中起作用。

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 侯明亮:实验操作、论文撰写;马琳秋、李金平、黄洁、廖旗荣、杨红岩:数据整理;李小雄、马琳秋:统计学分析;周华东:研究指导、论文修改、经费支持

参考文献:

[1] KNOPMAN D S, AMIEVA H, PETERSEN R C, *et al*. Alzheimer disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7: 33. DOI: 10.1038/s41572-021-00269-y.

[2] 2022 Alzheimer's disease facts and figures[J]. Alzheimers Dement, 2022, 18(4): 700-789. DOI: 10.1002/alz.12638.

[3] WESTERMARK P, ANDERSSON A, WESTERMARK G T. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 795-826. DOI: 10.1152/physrev.00042.2009.

[4] ZHANG Y, SONG W H. Islet amyloid polypeptide: another key molecule in Alzheimer's pathogenesis?[J]. Prog Neurobiol, 2017, 153: 100-120. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.03.001.

[5] MORENO-GONZALEZ I, EDWARDS III G, SALVADORES N, *et al*. Molecular interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease through cross-seeding of protein misfolding[J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(9): 1327-1334. DOI: 10.1038/mp.2016.230.

[6] KAPURNIOTU A. Enlightening amyloid fibrils linked to type 2 diabetes and cross-interactions with Aβ[J]. Nat Struct Mol Biol, 2020, 27(11): 1006-1008. DOI: 10.1038/s41594-020-00523-z.

[7] HU R D, ZHANG M Z, CHEN H, *et al*. Cross-seeding interaction between β-amyloid and human islet amyloid polypeptide[J]. ACS Chem Neurosci, 2015, 6(10): 1759-1768. DOI: 10.1021/acschemneuro.5b00192.

[8] BHARADWAJ P, SOLOMON T, SAHOO B R, *et al*. Amylin and beta amyloid proteins interact to form amorphous hetero complexes with enhanced toxicity in neuronal cells[J]. Sci Rep, 2020, 10: 10356. DOI: 10.1038/s41598-020-66602-9.

[9] JACKSON K, BARISONE G A, DIAZ E, *et al*. Amylin deposition in the brain: a second amyloid in Alzheimer disease?[J]. Ann Neurol, 2013, 74(4): 517-526. DOI: 10.1002/ana.23956.

[10] YAN L M, VELKOVA A, TATAREK-NOSSOL M, *et al*. IAPP mimic blocks Abeta cytotoxic self-assembly: cross-suppression of amyloid toxicity of Abeta and IAPP suggests a molecular link between Alzheimer's disease and type Ⅱ diabetes[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46(8): 1246-1252. DOI: 10.1002/anie.200604056.[PubMed]

[11] YAN L M, VELKOVA A, TATAREK-NOSSOL M, *et al*. Selectively N-methylated soluble IAPP mimics as potent IAPP receptor agonists and nanomolar inhibitors of cytotoxic self-assembly of both IAPP and Aβ40[J]. Angewandte Chemie Int Ed, 2013, 52(39): 10378-10383. DOI: 10.1002/anie.201302840.

[12] AFTABIZADEH M, TATAREK-NOSSOL M, ANDREETTO E, *et al*. Blocking inflammasome activation caused by β-amyloid peptide (aβ) and islet amyloid polypeptide (IAPP) through an IAPP mimic[J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(8): 3703-3717. DOI: 10.1021/acschemneuro.9b00260.

[13] ZHU H, WANG X, WALLACK M, *et al*. Intraperitoneal injection of the pancreatic peptide amylin potently reduces behavioral impairment and brain amyloid pathology in murine models of Alzheimer's disease[J]. Mol Psychiatry, 2015, 20(2): 252-262. DOI: 10.1038/mp.2014.17.

[14] ADLER B L, YARCHOAN M, HWANG H M, *et al*. Neuroprotective effects of the amylin analogue pramlintide on Alzheimer's disease pathogenesis and cognition[J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(4): 793-801. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.076.

[15] SCHULTZ N, JANELIDZE S, BYMAN E, *et al*. Levels of islet amyloid polypeptide in cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer's disease[J]. PLoS One, 2019, 14(6): e0218561. DOI: 10.1371/journal.pone.0218561.

[16] IDDA M L, MUNK R, ABDELMOHSEN K, *et al*. Noncoding RNAs in Alzheimer's disease[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018, 9(2): e1463. DOI: 10.1002/wrna.1463.

[17] SONG C H, ZHANG Y F, HUANG W Y, *et al*. Circular RNA Cwc27 contributes to Alzheimer's disease pathogenesis by repressing Pur-α activity[J]. Cell Death Differ, 2022, 29(2): 393-406. DOI: 10.1038/s41418-021-00865-1.

[18] MO D D, LI X P, RAABE C A, *et al*. Circular RNA encoded amyloid beta peptides-a novel putative player in alzheimer's disease[J]. Cells, 2020, 9(10): 2196. DOI: 10.3390/cells9102196.

[19] BHAGAT V, VERCHERE C B. A small molecule improves

diabetes in mice expressing human islet amyloid polypeptide [J]. Islets, 2023, 15(1): 12-15. DOI: 10.1080/19382014.2022.2163829.

[20] BOCCARDI V, MURASECCO I, MECOCCI P. Diabetes drugs in the fight against Alzheimer's disease[J]. Ageing Res Rev, 2019, 54: 100936. DOI: 10.1016/j.arr.2019.100936.

[21] YOSHIKAWA T, WU J F, OTSUKA M, *et al*. ROCK inhibition enhances microRNA function by promoting deadenylation of targeted mRNAs *via* increasing PAIP2 expression[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(15): 7577-7589. DOI: 10.1093/nar/gkv728.

[22] SHIM S M, KOH Y H, KIM J H, *et al*. Author Correction: a combination of multiple autoantibodies is associated with the risk of Alzheimer's disease and cognitive impairment [J]. Sci Rep, 2022, 12: 2328. DOI: 10.1038/s41598-021-04556-2.

[23] ULUCA B, LEKTEMUR ESEN C, SARITAS ERDOGAN S, *et al*. NFI transcriptionally represses CDON and is required for SH-SY$_5$Y cell survival[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2022, 1865(2): 194798. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2022.194798.

[24] CHAPOULY C, HOLLIER PL, GUIMBAL S, *et al*. Desert hedgehog-driven endothelium integrity is enhanced by Gas1 (growth arrest-specific 1) but negatively regulated by Cdon (cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes) [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(12): e336-e349. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314441.

[25] SOUSA J C, CARDOSO I, MARQUES F, *et al*. Transthyretin and Alzheimer's disease: where in the brain? [J]. Neurobiol Aging, 2007, 28(5): 713-718. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.03.015.

[26] ZISKIN J L, GREICIUS M D, ZHU W, *et al*. Neuropathologic analysis of Tyr69His TTR variant meningovascular amyloidosis with dementia [J]. Acta Neuropathol Commun, 2015,3:43. DOI:10.1186/s40478-015-0216-0.

[27] 张国新, 彭琴玉, 郭笑迪, 等. 胰岛淀粉样多肽在阿尔茨海默病发病机制中的作用研究进展[J]. 卒中与神经疾病, 2022, 29(3):291-295, 299. DOI: 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.03.019.

ZHANG G X, PENG Q Y, GUO X D, *et al*. Research progress on the role of islet amyloid polypeptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Stroke Nerv Dis, 2022, 29(3): 291-295, 299. DOI: 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.03.019.

[28] RYBAK-WOLF A, STOTTMEISTER C, GLAŽAR P, *et al*. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. Mol Cell, 2015, 58(5): 870-885. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.03.027.

[29] YANG X B, LI X Y, ZHONG C H, *et al*. Circular RNA circPHKA2 relieves OGD-induced human brain microvascular endothelial cell injuries through competitively binding miR-574-5p to modulate SOD2[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 3823122. DOI: 10.1155/2021/3823122.

[30] KU T, LI B, GAO R, *et al*. NF-κB-regulated microRNA-574-5p underlies synaptic and cognitive impairment in response to atmospheric PM2.5 aspiration[J]. Part Fibre Toxicol, 2017, 14(1): 34. DOI: 10.1186/s12989-017-0215-3.

[31] LU D, XU A D. Mini review: circular RNAs as potential clinical biomarkers for disorders in the central nervous system[J]. Front Genet, 2016, 7: 53. DOI: 10.3389/fgene.2016.00053.

[32] BRENDER J R, SALAMEKH S, RAMAMOORTHY A. Membrane disruption and early events in the aggregation of the diabetes related peptide IAPP from a molecular perspective[J]. Acc Chem Res, 2012, 45(3): 454-462. DOI: 10.1021/ar200189b.

[33] PRUZIN J J, NELSON P T, ABNER E L, *et al*. Review: Relationship of type 2 diabetes to human brain pathology [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2018, 44(4): 347-362. DOI: 10.1111/nan.12476.

[34] ANGUIANO M, NOWAK R J, LANSBURY P T Jr. Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type Ⅱ diabetes[J]. Biochemistry, 2002, 41(38): 11338-11343. DOI: 10.1021/bi020314u.

[35] ZHANG G, MENG L, WANG Z, *et al*. Islet amyloid polypeptide cross-seeds tau and drives the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease[J]. Mol Neurodegener, 2022,17(1):12. DOI: 10.1186/s13024-022-00518-y.

[36] WU H, HUANG M, LU M J, *et al*. Regulation of microtubule-associated protein tau (MAPT) by miR-34c-5p determines the chemosensitivity of gastric cancer to paclitaxel [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 71(5): 1159-1171. DOI: 10.1007/s00280-013-2108-y.

[37] BECKELMAN B C, YANG W Z, KASICA N P, *et al*. Genetic reduction of eEF2 kinase alleviates pathophysiology in Alzheimer's disease model mice[J]. J Clin Investig, 2019, 129(2): 820-833. DOI: 10.1172/jci122954.

[38] ANKARCRONA M, WINBLAD B, MONTEIRO C, *et al*. Current and future treatment of amyloid diseases [J]. J Intern Med, 2016, 280(2): 177-202. DOI: 10.1111/joim.12506.

(**收稿**:2023-04-21;**修回**:2023-05-17)

(编辑 吴培红)