DOI:10.16016/j.2097-0927.202211005

狭小空间约束慢性应激诱导的焦虑样小鼠杏仁核 miRNA 表达谱分析

骆昕玮[1],边 晨[1],杨婉君[1],周茂虎[2],杨国愉[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):医学心理系军人发展心理学教研室[1],基础医学院神经生物教研室[2]

[**摘要**] **目的** 分析慢性应激诱导的焦虑障碍模型小鼠杏仁核 miRNA 表达情况,探索在焦虑障碍中发挥作用的关键 miRNA 及其可能的作用靶点。**方法** 选取 24 只 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠(体质量为 18~22 g),采用区组随机法按照体质量分为焦虑障碍组(n=12)和对照组(n=12)。焦虑障碍组采用连续 10 d 的狭小空间约束方法(每天 2 h)用于制造焦虑障碍小鼠模型,对照组无应激。造模完成后采用高架十字迷宫实验、旷场实验、明暗箱实验检测小鼠的焦虑样行为。采用转录组测序方法检测并分析焦虑障碍组小鼠和对照组小鼠杏仁核 miRNAs 表达情况,结合 miRanda 对差异表达 miRNA 靶基因进行预测,并进行功能注释(Gene Ontology,GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库的信号通路分析,探索杏仁核中在焦虑障碍发挥作用的重要 miRNA,并对其中关键 miRNA 进行 RT-qPCR 检测。**结果** 焦虑障碍组小鼠在高架十字迷宫、旷场、明暗箱实验中均表现出显著的焦虑样行为。与对照组比较,焦虑障碍组小鼠杏仁核中共有 35 条差异表达 miRNA。GO 功能分析结果显示,预测靶基因在神经元突触可塑性相关功能显著富集。KEGG 信号通路分析结果显示,差异 miRNA 预测靶基因在信号传导、癌症相关信号通路富集显著。经 RT-qPCR 检测,miR-128-2-5p 在焦虑障碍组的表达显著降低(P<0.05),miR-10b-5p 、miR-200a-3p 、miR-200b-3p、miR-429-3p 在焦虑障碍组的表达显著升高(P<0.05)。其中,miR-128-2-5p 和 miR-200a-3p 的改变幅度与转录组测序结果基本一致。**结论** 基于生物信息学分析获得的关键 miRNA 分子 miR-128-2-5p 及其下游靶基因 *bmpr*2、*if*6、*rbfox*3 可能是焦虑障碍潜在的干预治疗靶点。

[**关键词**] 焦虑障碍;杏仁核;miRNA 表达谱;狭小空间约束

[**中图法分类号**] R338.26; R394.3; R749.72 [**文献标志码**] A

Analysis of miRNA expression profiles in amygdala of mice induced by chronic stress in narrow space confinement

LUO Xinwei[1], BIAN Chen[1], YANG Wanjun[1], ZHOU Maohu[2], YANG Guoyu[1] [1]Department of Military Developmental Psychology, Faculty of Medical Psychology, [2]Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the miRNAs expression profile of the amygdala of mice with chronic stress-induced anxiety disorder and explore the key miRNAs and their possible targets. **Methods** Eight-week-old C57BL/6 male mice with body weight ranging from 18 g to 22 g were randomly divided into anxiety disorder group (n = 12) and control group (n = 12). The anxiety disorder group have been restrained in narrow space for 10 consecutive days (2 h/d) to create a mouse model of anxiety disorder, while the control group accepted no stress. After the modeling was completed, the anxiety-like behavior of mice was detected by elevated cross maze experiment, open field experiment and light and dark box experiment. Transcriptome

[**通信作者**] 杨国愉,E-mail:gyyang0122@foxmail.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/)

sequencing was used to detect the expression of miRNAs in the amygdala of mice between the anxiety disorder group and the control group. The target genes of differentially expressed miRNA were predicted by miRanda. Functional annotation was conducted by Gene Ontology (GO) analysis, and signal pathway analysis by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database to explore the important miRNAs in the amygdala that play a role in anxiety disorders. The key miRNAs explored before were quantitatively detected by RT-qPCR. **Results** The anxiety disorder group showed significant anxiety-like behavior in elevated cross maze, open field and light and dark box experiments. Compared with the control group, the mice in the anxiety disorder group had 35 differentially expressed miRNAs in the amygdala. The results of GO function analysis showed that the predicted target genes were significantly enriched in the functions related to plasticity regulation of synaptic, while the results of KEGG signal pathway analysis showed that the differential miRNA predicted target genes were obviously enriched in signal transduction and cancer-related signaling pathways. The expression of miR-128-2-5p in the anxiety disorder group was significantly decreased ($P<0.05$), while the expression of miR-10b-5p, miR-200a-3p, miR-200b-3p and miR-429-3p in the anxiety disorder group were significantly increased ($P<0.05$). Among them, the extents of changes of miR-128-2-5p and miR-200a-3p were consistent with the transcriptome sequencing results. **Conclusion** The key miRNA molecule miR-128-2-5p and its downstream target genes bmpr2, irf6 and *rbfox3* may become the potential therapeutic targets for anxiety disorders.

[**Key words**] anxiety disorder; amygdala; miRNA expression profile; narrow space confinement

Corresponding author: YANG Guoyu, E-mail: gyyang0122@foxmail.com

焦虑障碍对个人的幸福感和工作效率有较大影响,除了对主观幸福体验产生威胁外,还与心血管疾病和过早死亡风险相关。但由于焦虑障碍的致病机制尚不明确,较难开发出有效性高、针对性强的药物或治疗方法,目前焦虑障碍的治疗效果有限[1-2]。大量研究提示,基底外侧杏仁核(basolateral amygdala,BLA)和杏仁核中央核(central amygdaloid,CeA)在焦虑障碍中具有关键作用,认为 BLA 能够整合处理来自皮层和皮层下的感觉信息,再通过谷氨酸能传出神经元刺激 CeA,杏仁核通过传出神经元投射至终纹核、海马体、腹侧纹状体、眶额叶皮层、导水管周围灰质等不同部位,触发焦虑情绪和一系列防御反应[3-4]。大脑的神经元可塑性在精神心理类疾病中作用突出,一些研究也聚焦于短链非编码 RNA,即 miRNA,认为 miRNA 是神经元可塑性、更高级大脑功能以及心理健康的主要调节机制,其调节包括焦虑障碍在内的精神疾病的可能突破点[5-7]。基于上述前提,本研究将杏仁核对焦虑障碍的调节机制与 miRNA 联系起来,通过分析狭小空间约束方法制作的焦虑障碍模型小鼠杏仁核 miRNA 和基因表达情况,结合 miRNA 靶基因的预测以及基于预测靶基因的功能注释(Gene Ontology,GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库的信号通路分析,探索杏仁核中与焦虑障碍的病理过程密切相关的 miRNA 分子,以期为将来焦虑障碍的诊断和治疗提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20 只 SPF 级健康雄性 8 周龄 C57BL/6 小鼠,体质量为(20±2)g,购于江苏华创信诺医药科技有限公司[SCXK(苏)2020-0009],所有实验动物按照 12 h∶12 h 昼夜交替节律,饲养在陆军军医大学基础医学院神经生物学教研室动物房,环境温度维持在 2~24 ℃,湿度保持在 60%~70%。动物饲养过程严格按照 SPF 级动物实验室操作规程细则执行。小鼠抵达实验室后,经适应性饲养 7 d 后开始实验。实验方案由陆军军医大学动物福利伦理委员会批准(AMUWEC20230370)。

1.1.2 主要材料与试剂 1.5 mL 离心管(大连德泰实验科技有限公司),2 mL 冻存管(重庆鼎今生物科技有限公司),水合氯醛(法国 Biowest 公司),PBS 缓冲液(美国 BOSTER 公司),组织 RNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司),RNA 反转录试剂盒(上海 TOYOBO 公司),RT-qPCR 试剂盒(美国 Omega 公司),无水乙醇(重庆基之宇生物科技有限公司),无酶水 DEPC(重

庆基之宇生物科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器和设备 本研究采用的主要仪器和设备:旷场箱、高架十字迷宫、明暗箱(上海欣欣公司),行为学分析软件,生物芯片分析系统(Agilent Technologies),测序仪(Illumina),低温离心机(四川蜀科仪器有限公司)。

1.2 *方法*

1.2.1 实验分组与模型制备 采用区组随机法将C57B2/6小鼠按体质量分为对照组、焦虑障碍组,每组各10只。采用狭小空间约束方法制备慢性束缚应激小鼠作为焦虑障碍模型,于每天早上10:00将小鼠束缚于专用的有机玻璃固定管中,将束缚管水平置于桌面持续2 h,连续10 d每天同一时间重复上述流程[8]。固定管内径3 cm,与小鼠大小相近,为一端封闭另一端可由活塞调节大小的通风良好有机玻璃管,根据小鼠的大小调节固定器活塞使其在固定器中几乎不能活动。

1.2.2 高架十字迷宫实验 焦虑障碍组小鼠在最后一次束缚结束后24 h进行测试。高架十字迷宫设备由两个相互垂直的臂组成,距离地面垂直高度为50 cm。其中一只臂周围没有挡板为开放臂,另一只臂的边缘有高10 cm的挡板为闭合臂。两臂相交形成的正方形区域(5 cm×5 cm)为中央区。在实验开始时,小鼠先被放置在中央区域,用手指轻轻按压使其保持头朝闭臂,松手的同时开始测试并记录300 s内小鼠的行动轨迹。每只小鼠记录结束后,用75%酒精擦拭装置,防止前一只动物的残留气味影响实验结果。观测指标为开放臂进入次数和开放臂停留时间。

1.2.3 旷场实验 实验时间与高架十字迷宫相同,每只小鼠记录结束后均使用75%酒精擦拭装置、并清洁箱体内尿液、粪便。旷场实验设备为无盖正方体箱子(50 cm×50 cm×50 cm),摄像头安放于旷场箱正上方。旷场箱底面被均匀划分为16个格子,正中间的4个格子共同组成中央区,其余环绕在中央区的12个格子组成周围区。实验开始时,小鼠被置于周围区,测试并记录300 s内的行动轨迹。观测指标为穿过中央区的次数、中央区平均速度、中央区停留时间、中央区路程。

1.2.4 明暗箱实验 实验时间与清理方法与上述实验相同,明暗箱实验设备由两个相同的、带盖的聚丙烯小室组成,两小室顶部各有一个红外摄影装置用于记录小鼠的活动情况。其中一个小室的内壁四周被漆成黑色且没有额外光源存在,即暗区,另一个小室的内壁四周为白色且顶部有光源,即亮区。小鼠可以通过一扇小门在明暗区两个小室之间自由穿梭。实验开始时,老鼠被放置在有光源照明的亮区,连通明暗两区的门用一块挡板阻断。盖上盖子后,点击记录的同时抽出隔离板使明暗两区互通,记录300 s内小鼠活动轨迹并分析。观测指标为明区停留时间和明暗两区间的穿梭次数。

1.2.5 测序及生物信息学分析 焦虑障碍组在最后一次束缚结束24 h后和对照组小鼠一同进行组织采集。按剂量0.1 mL/g体质量腹腔注射4%浓度的水合氯醛进行麻醉,断颈法处死小鼠后,将小鼠大脑快速剥出,置于冰面。4 ℃ PBS缓冲液冲洗表面血液后,用显微手术刀分离双侧杏仁核组织置于冻存管中,迅速将冻存管转移到液氮中进行低温保存。测序前先进行样品总体RNA质检,用安捷伦2100生物分析仪/安捷伦4200 TapeStation/检测RNA的完整性。用RNAClean XP Kit和RNAse-Free DNase Set进一步纯化合格的总RNA。纯化后的总RNA通过3'端连接器、5'端连接器、反转录、扩增、cDNA文库大小选择、纯化等步骤连接,完成测序样品文库的构建,测序采用Illumina NovaSeq6000测序仪,测序模式为PE150。质量控制标准为每个样品测序后提供不少于20 M的原始read,且基底质量大于20(Q20)的比例不低于90%。所有样品测序量满足要求、测序结果符合标准后进行后续数据分析。使用EdgeR方法对样本间差异mRNA及miRNA进行分析,结合FPKM值计算微分表达式倍数(Fold change)。差异RNA筛选条件如下:①$P<0.05$;② Fold change≥2。

1.2.6 miRNA的靶基因预测分析 将小鼠杏仁核中焦虑障碍组与对照组相比$P<0.05$、且Fold change≥2的miRNA作为差异miRNA进行靶基因预测,使用miRanda预测差异miRNA的靶基因,将预测得到的靶基因导入David数据库进行GO分析,并使用基于同源序列的KEGG注释系统(KEGG Orthology Based Annotation System, KOBAS)进行KEGG信号通路分析。

1.2.7 实时荧光定量PCR验证差异 为验证测序分析检测的miRNA表达的真实性,同时确保后续针对差异miRNAs所预测的靶基因有效性,用RT-qPCR筛选关键miRNA,包括miR-128-2-5p、miR-10b-5p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-429-3p等。首先进行Total RNA提取、浓度与纯度的测定;其次采用miRNA第一链cDNA合成试剂盒进行反转录,转录体系为5×miRNA RT buffer共4 μL、miRNA RT Enzyme共0.5 μL、Total miRNA共200 ng、RNase Inhibitor共0.5 μL、dNTPs共2 μL、反转录引物浓度为200 nmol/L、RNase-free water定容至20 μL;最后实时荧光定量PCR,反应体系为

SYBER Green Realtime PCR Master Mix 共 10 μL、10 μmol/L Forward Primer 共 0.8 μL、10 μmol/L Reverse Primer 共 0.8 μL、Template cDNA 共 2 μL、无酶水 6.4 μL;用比较 Ct 法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算每个 miRNA 的相对丰度。见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
miR-128-2-5p	正向:GGGGGCCGATGCACTGT
miR-10b-5p	正向:CGGCTACCCTGTAGAACCGAA
miR-200a-3p	正向:GCCGGCTAACACTGTCTGGTAA
miR-200b-3p	正向:CCGGCTAATACTGCCTGGTAA
miR-429-3p	正向:GCCGGCTAATACTGTCTGGTAA
U6	正向:AGCACATATACTAAAATTGGAACGAT
Universal Micro	反向:ACTGCAGGGTCCGAGGTATT

1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,定量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。焦虑障碍组与对照组进行比较,当数据符合正态分布用独立样本 t 检验(Student's t 检验);不符合正态分布的数据则采用非参数检验(Mann-Whitney U test)。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。GO 功能注释和 KEGG 通路分析时采用 Fisher 精确检验和多重比较检验计算每个功能的显著性水平(P 值),FDR 法调整多个比较的 P 值,以 $P<0.05$ 且 FDR<0.25 为阈值。

2 结果

2.1 行为学实验结果

按照图 1 所示的装置对焦虑障碍组小鼠进行建模后,在高架迷宫实验中,焦虑障碍组在开放臂停留时间($P<0.05$)、进入开放臂的次数($P<0.05$)显著减少;在旷场实验中,焦虑障碍组中央区平均速度增加($P<0.05$),在中央区的停留时间、进出次数、路程显著降低($P<0.05$);在明暗箱实验中,焦虑障碍组在明区停留时间($P<0.05$)、明暗区穿梭次数($P<0.05$)均显著降低,见图 2。焦虑障碍组小鼠在高架十字迷宫、旷场、明暗箱实验中均表现出显著的焦虑样行为。



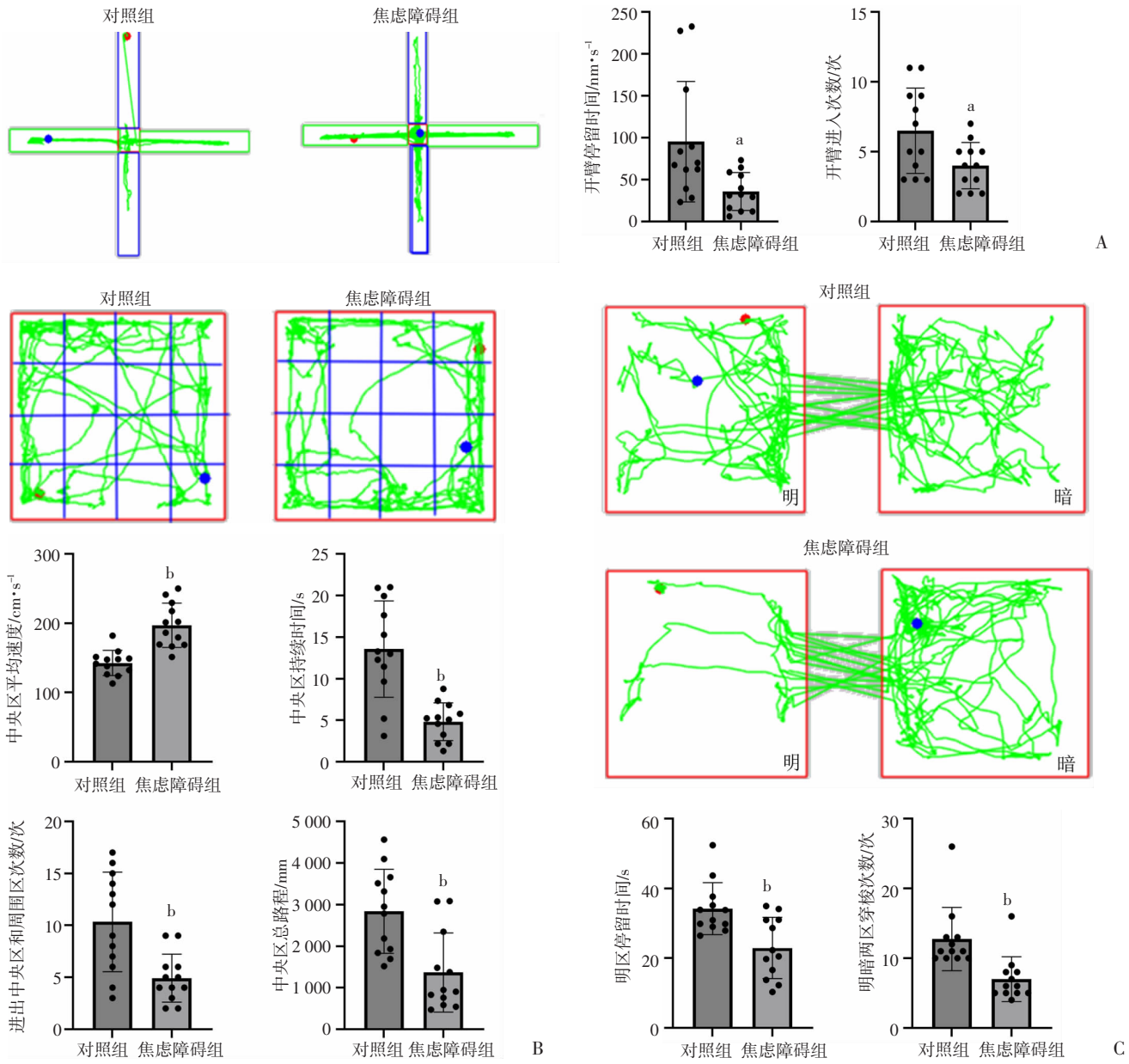
图 1 狭小空间约束模型及器材

2.2 miRNA 测序

根据 miRNA 测序结果,与对照组比较,焦虑障碍组小鼠杏仁核组织共 35 个 miRNA 存在表达差异,其中有 20 个上调,15 个下调。根据 P 值与 $\log_2$FC 值绘制的火山图将 35 个差异 miRNA 按照变化倍数从高到低排列,分别列出上调、下调 miRNA 中变化倍数最大的前 12 位,见表 2、图 3。

表 2 焦虑障碍组小鼠杏仁核 miRNA 改变情况

miRNAs	表达量(焦虑障碍组/对照组)	$\log_2$FC	miRNAs	表达量(焦虑障碍组/对照组)	$\log_2$FC
miR-202-5p ↑	10/1	3.340 8	miR-101a-5p ↓	1/11	−3.439 7
miR-6537-3p ↑	8/1	3.018 8	miR-103-2-5p ↓	1/9	−3.150 2
miR-3086-5p ↑	11/2	2.478 9	miR-3061-3p ↓	1/8	−2.980 2
miR-224-5p ↑	16/3	2.434 4	miR-23b-5p ↓	6/27	−2.150 4
miR-301b-5p ↑	14/3	2.241 7	miR-6769b-3p ↓	3/13	−2.095 7
miR-219a-1-3p ↑	26/6	2.135 1	miR-27a-5p ↓	10/41	−2.016 0
miR-344h-3p ↑	13/3	2.134 8	miR-1964-3p ↓	3/12	−1.980 2
miR-3078-3p ↑	17/4	2.107 1	miR-128-2-5p ↓	18/64	−1.810 5
miR-200a-3p ↑	562/155	2.077 2	miR-670-5p ↓	6/21	−1.787 8
miR-429-3p ↑	116/54	1.790 1	miR-193b-5p ↓	5/16	−1.658 6
miR-200b-3p ↑	74/31	1.585 1	miR-192-3p ↓	7/22	−1.632 5
miR-10b-5p ↑	128/61	1.088 9	miR-485-3p ↓	9/40	−1.601 9



A：高架十字迷宫实验统计和轨迹图；B：旷场试验统计和轨迹图；C：明暗箱实验统计和轨迹图　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图 2　焦虑障碍组小鼠和对照组小鼠行为学检测　（$n=12$）

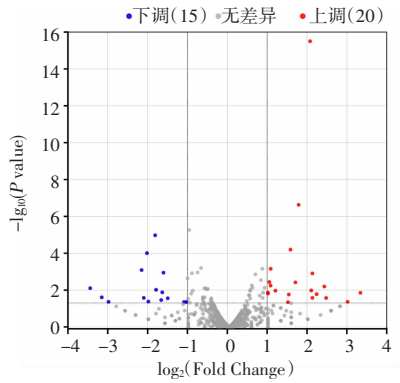


图 3　焦虑障碍组小鼠杏仁核 miRNA 的表达

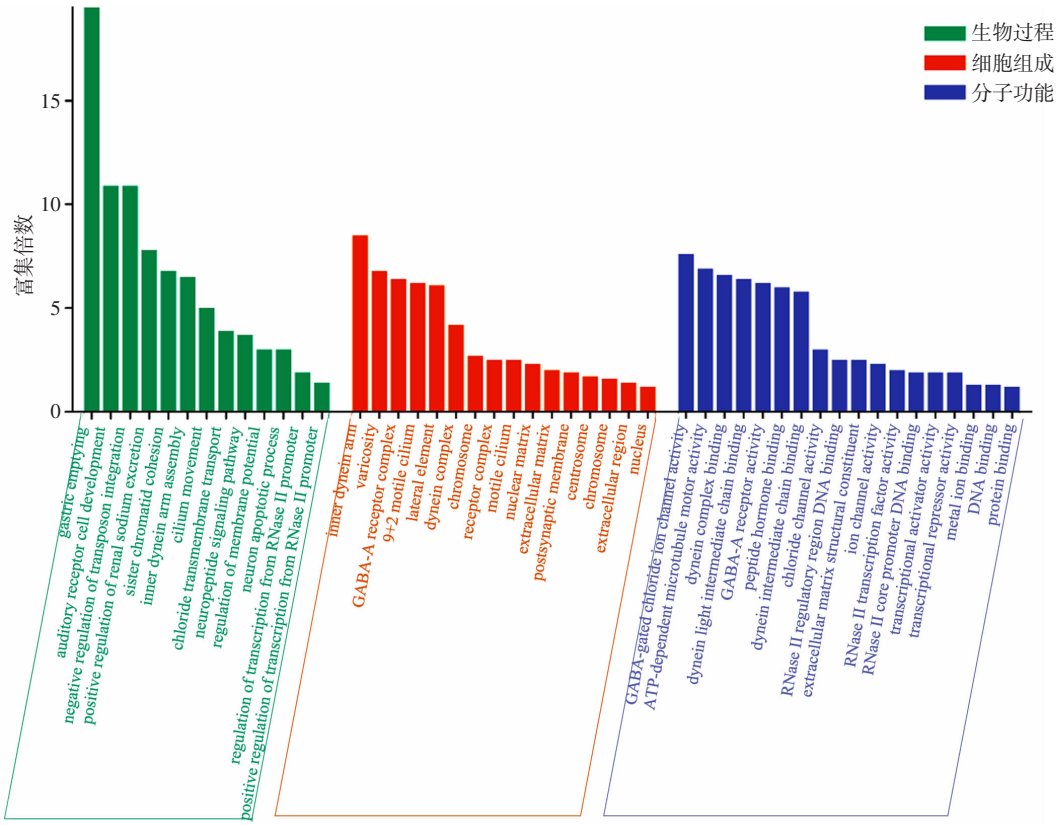


图 4　杏仁核差异 miRNA 预测靶基因的 GO 功能注释

2.3　miRNA 预测靶基因 GO 功能注释

使用 miRanda 预测上述差异 miRNA 的靶基因,得到差异表达 miRNA 预测靶基因 6 527 个。将以上靶基因进行 GO 数据库基因功能注释后得到如下结果(图 4),焦虑障碍组小鼠杏仁核差异表达 miRNA 的预测靶基因在分子功能(molecular function)、生物过程(biological process)、和细胞组成(cellular component)三大类中均有不同程度的分布,根据 *P* 值由小到大的顺序对注释结果进行排列后发现 RNAP Ⅱ活性调节、细胞运动、神经系统发生发育、神经元分化、胞内信号传导、神经元突触可塑性、细胞外结构功能上 GO 的富集程度尤其明显。

2.4　miRNA 预测靶基因 KEGG 富集分析

对 miRanda 预测所得靶基因进行 KEGG 信号通路富集分析发现,与对照组比较,焦虑障碍组小鼠杏仁核差异 miRNA 的预测靶基因在 275 个信号通路上存在显著富集,其中包含 6 个高级分类、42 个中级分类。6 个高级分类中生物系统类别 69 个,人类疾病类有 64 个、环境信息处理类有 27 个、代谢类有 78 个、细胞过程类有 15 个、遗传信息处理类有 22 个显著性信号通路。其中轴突引导通路、癌症通路、细胞黏附通路、MAPK 信号通路、Hipo 信号通路、FoxO 信号通路磷脂酰肌醇信号通路、泛素水解通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路、谷氨酸能突触通路、多巴胺能突触通路富集程度最为显著。将富集结果根据富集因子值大小排序,列出位于前 30 位的富集通路情况(图 5A),将以上信号通路按照 KEGG 二级分类整理后发现:以上信号通路主要集中在信号传导、信号分子相互作用、转运分解代谢、内分泌系统、免疫系统、神经系统以及物质依赖性疾病等 42 个 KEGG 中级分类(图 5B)。

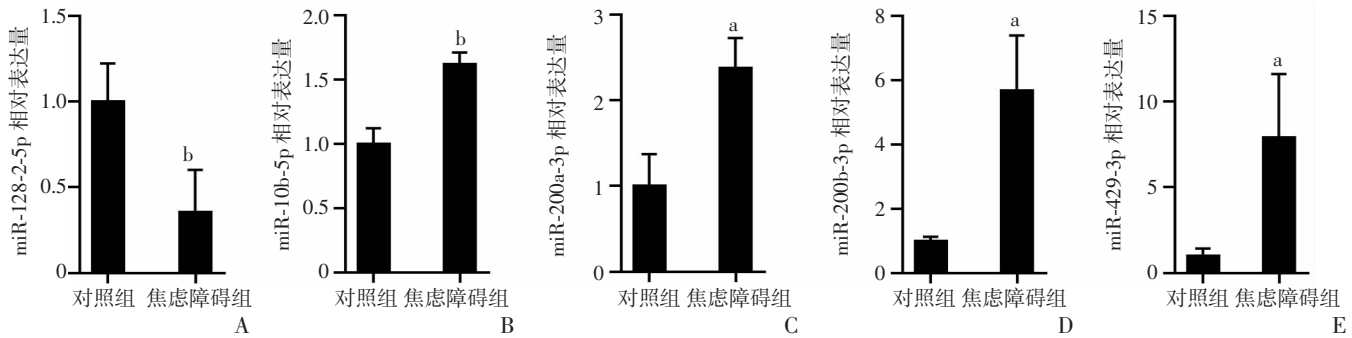
2.5　实时荧光定量 PCR 结果

在差异表达 miRNA 中,按照 Log_2FC 绝对值从大到小排列,选取 count 值>10 的 miRNA 分子:miR-128-2-5p、miR-10b-5p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-429-3p 进行实时荧光定量 PCR 验证。在显著下调的 miRNA 分子中,与对照组比较,焦虑障碍组 miR-128-2-5p 的表达水平显著下降,变化倍数为 2.86($P<0.05$),与测序结果高度一致(变化倍数为 3.56)。在显著上调的 miRNA 分子中,miR-10b-5p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-429-3p 在焦虑障碍组的表达水平显著升高($P<0.05$)。其中,miR-200a-3p 的变化与测序结果基本一致(变化倍数 2.38 *vs* 3.63),miR-200b-3p、miR-429-3p 的变化与测序结果差异较大(变化倍数 5.68 *vs* 2.38,7.89 *vs* 2.15);miR-10b-5p 在两种检测中的变化幅度最小(1.62 *vs* 2.10),miRNA 相对表达量见图 6。



A:富集程度最高的前 30 条通路;B: KEGG 信号通路按照二级分类归纳情况

图 5 杏仁核差异 miRNA 预测靶基因的 KEGG 分类情况



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较 A~E:分别为 miR-128-2-5p、miR-10b-5p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-429-3p 的相对表达量

图 6 焦虑障碍组和对照组杏仁核 miRNA 相对表达情况 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

焦虑障碍症是常见的精神障碍疾病之一,由于其发病机制一直难以廓清,使得针对焦虑障碍的治疗存在诸多困难[2]。许多研究认为突触可塑性以及神经系统的重塑是神经精神类疾病的发病关键,既往研究也已将杏仁核视为焦虑障碍的核心调节脑区[9-11]。miRNA 作为短链非编码 RNA 在情绪相关研究中多次被提及,通过对多种生物功能的调节参与神经精神类疾病进程[5, 12-15]。有研究发现,抑郁症患者经西酞普兰治疗后血浆中的 miR-132 水平显著降低,且 miR-132 表达水平与抑郁常用评分量表汉密尔顿抑郁量表、汉密尔顿焦虑量表得分存在正相关关系[16]。一项以惊恐障碍和强迫症患者为研究对象的关联分析发现,多种 miRNA 作为 NTRK3 的关键转录后调节因子在焦虑障碍中发挥作用[17],而对 miRNA 与精神分裂症相关的研究也不少[18-21]。尽管 miRNA 与许多神经精神类疾病的关联性已逐渐被注意到,但其在焦虑障碍中的作用,尤其是杏仁核参与焦虑障碍的具体分子机制仍不清楚。

本研究通过对焦虑障碍模型小鼠的杏仁核 miRNA 表达情况进行检测,共发现 35 个差异表达的 miRNA,其中有 20 个上调,15 个下调。后续将差异表达的 miRNA 按照 Lg_2FC 绝对值从大到小进行排列后,再选取 count 值>10 的 miRNA 分子进行 RT-qPCR 验证分析,得到两个密切相关的 miRNAs,分别是 miR-128-2-5p 和 miR-200a-3p。研究显示,miR-128-2-5p 和 miR-200a-3p 在精神心理疾病的发病机制中发挥作用:miR-128 其中一条成熟体 miRNA,即 miR-128-2-3p,在大鼠杏仁核的抑郁模型中显著上调,通过下调 Dvl1 和 Lef1 基因表达,从而介导 Wnt 信号通路对抑郁易感性的影响,杏仁核中的转录抑制因子 Snai1 也有可能作为 miR-128-2-3p 的下游靶点,在抑郁易感性中发挥作用[22]。中央杏仁核 miR-128-3p 可以下调 SIRT1 表达在保留神经损伤(spared nerve injury, SNI)的大鼠神经性疼痛模型中诱导抑郁样行为[23]。另外,前额叶皮层的 miR-200a-3p 水平在长期应激下持续升高,通过神经发生减少、炎症激活、昼夜节律改变等机制,参与到抑郁和慢性疼痛间的共同环节[24]。miR-200a-3p 可能通过靶向 SLc6a4 基因来调节前额叶皮层参与的抑郁模型[25]。miR-128-2-5p 在 qRT-PCR 和测序中的表达变化差异显著且高度一致,因此推测 miR-128-2-5p 可能与焦虑障碍的发生发展更为密切,而具体作用机制有待进一步验证。

为深入了解 miR-128-2-5p 的分子机制,采用常见的预测软件 miRanda、PITA、RNAhybrid 对 miR-128-2-5p 进行靶基因预测,并将预测结果进行 GO、KEGG 分析。GO 分析结果显示,miR-128-2-5p 的预测靶基因在 RNAP Ⅱ 活性调节、细胞运动、神经系统发生发育、神经元分化、胞内信号传导、突触形态结构、细胞外结构等一系列与神经元突触可塑性相关的功能上显著富集。而 KEGG 分析结果则显示,差异 miRNA 预测靶基因在轴突引导、癌症通路、钙信号通路、MAPK 信号通路、磷脂酰肌醇信号通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路、谷氨酸能突触通路、多巴胺能突触通路存在显著富集。归类分析发现,以上富集通路主要归属于信号传导以及癌症相关通路。这也与既往研究的观点相符,即认为焦虑障碍的病理生理过程与轴突引导、脑源性神经营养因子转导、突触传递信号通路的改变密切相关[26-28]。表明本研究发现的一些关键 miRNAs 与慢性应激诱导的焦虑障碍的分子机制可能是共通的。值得注意的是,miR-128-2-5p 的预测靶基因在通路分析中排在最前面的两条通路分别是轴突引导、MAPK 信号通路,与本研究所有的差异靶基因富集结果高度吻合,这也为 miR-128-2-5p 可能在焦虑障碍中发挥重要作用提供了可靠依据。

通过预测软件分析,本研究认为 *bmpr*2、*irf*6、*rbfox*3 可能是 miR-128-2-5p 的靶基因。*Bmpr*2 是转化生长因子 β(TGF-β)超家族受体之一,在胚胎发育、血管生成和成骨过程中发挥不同的作用。有研究显示,在小鼠海马和前脑中组织特异性敲除 *bmpr*2,并不会破坏空间学习和记忆编码,而是会影响探索性和焦虑相关的行为[29]。发育期 BMP 信号增强了神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJs)的快速活动依赖性结构可塑性,此过程 bmpr2 通过效应蛋白 LIMK1 发出信号,以调节突触的萌发,而 LIMK1 通过控制肌动蛋白解聚蛋白 Cofilin 的活性而与结构可塑性对接[30]。*Irf*6 在多种人体器官中表达参与牙周及颌面部分的发育,介导表皮细胞的分化及钙黏蛋白功能的调节,同时也能通过减弱 Akt 磷酸化来促进创伤后脑损伤大鼠神经元凋亡[31-32]。*Rbfox*3 调控的外显子参与细胞骨架重塑,神经突触形成功能,有研究发现 *rbfox*3 与神经发育迟缓和认知障碍有关,其缺失导致兴奋性突触增加,小鼠海马齿状回得 *rbfox*3 基因缺失将产生突触可塑性缺陷,并在个体层面使小鼠焦虑相关行为减少[33-34]。以上研究提示这些基因调控某些疾病生理功能的机制可能与突触可塑性改变密切相关,而 miR-128-2-5p 是否通过靶向 *bmpr*2、*irf*6、*rbfox*3 参与焦虑障碍的发病过程还需要进一步实验证实。

综上所述,本研究利用转录组测序检测了慢性应

激导致焦虑障碍小鼠杏仁核中 miRNAs 的表达差异,并进一步分析预测了 miRNAs 的下游靶基因和靶基因富集的信号通路,最后通过 RT-qPCR 验证分析了关键分子 miR-128-2-5p 有潜力成为焦虑障碍诊断和治疗的新的分子标记物。

参考文献:

[1] KANDOLA A, VANCAMPFORT D, HERRING M, *et al*. Moving to beat anxiety: epidemiology and therapeutic issues with physical activity for anxiety[J]. Curr Psychiatry Rep, 2018, 20(8): 63. DOI: 10.1007/s11920-018-0923-x.

[2] ROBINSON O J, PIKE A C, CORNWELL B, *et al*. The translational neural circuitry of anxiety[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2019, 90(12): 1353-1360. DOI: 10.1136/jnnp-2019-321400.

[3] LEDOUX J E. Emotion circuits in the brain[J]. Annu Rev Neurosci, 2000, 23: 155-184. DOI: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155.

[4] JANAK P H, TYE K M. From circuits to behaviour in the amygdala[J]. Nature, 2015, 517(7534): 284-292. DOI: 10.1038/nature14188.

[5] ALLEN L, DWIVEDI Y. MicroRNA mediators of early life stress vulnerability to depression and suicidal behavior[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(2): 308-320. DOI: 10.1038/s41380-019-0597-8.

[6] BABENKO O, KOVALCHUK I, METZ G A S. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2015, 48: 70-91. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.11.013.

[7] NARAYANAN R, SCHRATT G. MiRNA regulation of social and anxiety-related behaviour[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(21): 4347-4364. DOI: 10.1007/s00018-020-03542-7.

[8] LIU W Z, ZHANG W H, ZHENG Z H, *et al*. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2221. DOI: 10.1038/s41467-020-15920-7.

[9] COPE E C, GOULD E. Adult neurogenesis, glia, and the extracellular matrix[J]. Cell Stem Cell, 2019, 24(5): 690-705. DOI: 10.1016/j.stem.2019.03.023.

[10] GIOTAKOS O. Neurobiology of emotional trauma[J]. Psychiatriki, 2020, 31(2): 162-171. DOI: 10.22365/jpsych.2020.312.162.

[11] GONDA X, PETSCHNER P, ESZLARI N, *et al*. Genetic variants in major depressive disorder: from pathophysiology to therapy[J]. Pharmacol Ther, 2019, 194: 22-43. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.09.002.

[12] DING Y Q, DAI J X. Advance in stress for depressive disorder[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1180: 147-178. DOI: 10.1007/978-981-32-9271-0_8.

[13] MURPHY C P, SINGEWALD N. Potential of microRNAs as novel targets in the alleviation of pathological fear[J]. Genes Brain Behav, 2018, 17(3): e12427. DOI: 10.1111/gbb.12427.

[14] HUANG X X, BAO C X, LV Q Y, *et al*. Sex difference in cognitive impairment in drug-free schizophrenia: association with miR-195 levels[J]. Psychoneuroendocrinology, 2020, 119: 104748. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2020.104748.

[15] RAGUSA M, SANTAGATI M, MIRABELLA F, *et al*. Potential associations among alteration of salivary miRNAs, saliva microbiome structure, and cognitive impairments in autistic children[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6203. DOI: 10.3390/ijms21176203.

[16] FANG Y, QIU Q, ZHANG S Y, *et al*. Changes in miRNA-132 and miR-124 levels in non-treated and citalopram-treated patients with depression[J]. J Affect Disord, 2018, 227: 745-751. DOI: 10.1016/j.jad.2017.11.090.

[17] MUIÑOS-GIMENO M, GUIDI M, KAGERBAUER B, *et al*. Allele variants in functional microRNA target sites of the neurotrophin-3 receptor gene (*NTRK3*) as susceptibility factors for anxiety disorders[J]. Hum Mutat, 2009, 30(7): 1062-1071. DOI: 10.1002/humu.21005.

[18] THOMAS K T, ZAKHARENKO S S. MicroRNAs in the onset of schizophrenia[J]. Cells, 2021, 10(10): 2679. DOI: 10.3390/cells10102679.

[19] PANJA D, LI Y, WARD M E, *et al*. MiR-936 is increased in schizophrenia and inhibits neural development and AMPA receptor-mediated synaptic transmission[J]. Schizophr Bull, 2021, 47(6): 1795-1805. DOI: 10.1093/schbul/sbab046.

[20] CHEN B Y, LIN J J, LU M K, *et al*. Neurodevelopment regulators miR-137 and miR-34 family as biomarkers for early and adult onset schizophrenia[J]. NPJ Schizophr, 2021, 7(1): 35. DOI: 10.1038/s41537-021-00164-1.

[21] VAN DEN BERG M M J, KRAUSKOPF J, RAMAEKERS J G, *et al*. Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders[J]. Prog Neurobiol, 2020, 185: 101732. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2019.101732.

[22] ROY B, DUNBAR M, AGRAWAL J, *et al*. Amygdala-based altered miRNome and epigenetic contribution of miR-128-3p in conferring susceptibility to depression-like behavior *via* wnt signaling[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2020, 23(3): 165-177. DOI: 10.1093/ijnp/pyz071.

[23] JIAO X W, WANG R Y, DING X B, *et al*. LncRNA-84277 is involved in chronic pain-related depressive behaviors through miR-128-3p/SIRT1 axis in central amygdala[J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 920216. DOI: 10.3389/fnmol.2022.920216.

[24] SATYANARAYANAN S K, SHIH Y H, WEN Y, *et al*. miR-200a-3p modulates gene expression in comorbid pain and depression: molecular implication for central sensitization[J]. Brain Behav Immun, 2019, 82: 230-238. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.08.190.

[25] MCKIBBEN L A, DWIVEDI Y. microRNA regulates early-life stress-induced depressive behavior *via* serotonin signaling in a sex-dependent manner in the prefrontal cortex of rats [J]. Biol Psychiatry Glob Open Sci, 2021, 1(3): 180-189. DOI: 10.1016/j.bpsgos.2021.05.009.

[26] ZHANG N, ZHANG L, FENG L Y, *et al*. *Cananga odorata* essential oil reverses the anxiety induced by 1-(3-chlorophenyl) piperazine through regulating the MAPK pathway and serotonin system in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 219: 23-30. DOI: 10.1016/j.jep.2018.03.013.

[27] DUMAN R S. BDNF, 5-HT, and anxiety: identification of a critical periadolescent developmental period[J]. Am J Psychiatry, 2017, 174(12): 1137-1139. DOI: 10.1176/appi.ajp.2017.17101084.

[28] KRITMAN M, MAROUN M. Inhibition of the PI_3 kinase cascade in corticolimbic circuit: temporal and differential effects on contextual fear and extinction[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2013, 16(4): 825-833. DOI: 10.1017/S1461145712000636.

[29] MCBRAYER Z L, DIMOVA J, PISANSKY M T, *et al*. Forebrain-specific loss of BMPRII in mice reduces anxiety and increases object exploration[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139860. DOI: 10.1371/journal.pone.0139860.

[30] PICCIOLI Z D, LITTLETON J T. Retrograde BMP signaling modulates rapid activity-dependent synaptic growth *via* presynaptic LIM kinase regulation of cofilin[J]. J Neurosci, 2014, 34(12): 4371-4381. DOI: 10.1523/jneurosci.4943-13.2014.

[31] LIN Y C, XU D Z, LI X H, *et al*. Upregulation of interferon regulatory factor 6 promotes neuronal apoptosis after traumatic brain injury in adult rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(1): 27-36. DOI: 10.1007/s10571-015-0217-3.

[32] OBERBECK N, PHAM V C, WEBSTER J D, *et al*. The RIPK4-IRF_6 signalling axis safeguards epidermal differentiation and barrier function[J]. Nature, 2019, 574(7777): 249-253. DOI: 10.1038/s41586-019-1615-3.

[33] WANG H Y, HSIEH P F, HUANG D F, *et al*. RBFOX3/NeuN is required for hippocampal circuit balance and function[J]. Sci Rep, 2015, 5: 17383. DOI: 10.1038/srep17383.

[34] JACKO M, WEYN-VANHENTENRYCK S M, SMERDON J W, *et al*. Rbfox splicing factors promote neuronal maturation and axon initial segment assembly[J]. Neuron, 2018, 97(4): 853-868.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.01.020.

(收稿:2022-11-01;修回:2022-12-05)

(编辑 张艺霖)