论 著

CircKat6b重组腺相关病毒制备及其在小鼠海马中的表达

胡　娜，刘　行，王敏睿，冯建国，贾　静，王晓斌
西南医科大学附属医院 麻醉科（泸州 646000）

【摘　要】**目的** 获得表达circKat6b的重组腺相关病毒（recombinant adeno-associated virus expressing circKat6b，rAVV-circKat6b），检测其在小鼠海马组织中的感染效率和表达水平。**方法** 将mmu-circKat6b基因片段插入腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）穿梭质粒中构建重组AAV质粒，将重组AAV质粒、包装质粒和辅助质粒通过脂质体LipoFiter™共同转染293T细胞包装rAAV-circKat6b。从转染的293T细胞中收集并通过柱纯化rAAV-circKat6b，采用实时荧光定量聚合酶链反应（qRT-PCR）测定rAAV-circKat6b滴度。最后通过小鼠脑立体定位仪注射rAAV-circKat6b至小鼠海马组织中，1个月后免疫荧光显微镜观察rAAV-circKat6b的感染效率，qRT-PCR检测rAAV-circKat6b表达水平。**结果** 包装成功的rAAV-circKat6b经过纯化后获得了高滴度的rAAV-circKat6b，qRT-PCR检测rAAV-circKat6b的病毒滴度达到1.2×10^{12} vg/mL。感染1个月后，脑组织海马区域绿色荧光表达明显，circKat6b表达水平明显增加。**结论** 成功构建的rAAV-circKat6b可使小鼠海马组织中circKat6b高表达，这一研究结果为进一步研究circKat6b的生物学功能提供了实验基础。

【关键词】腺相关病毒；circKat6b；小鼠海马组织；抑郁症
【中图分类号】R57　　文献标志码 A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.02.011

Construction of circKat6b recombinant adeno-associated virus and its expression in the hippocampus of mice

HU Na，LIU Xing，WANG Minrui，FENG Jianguo，JIA Jing，WANG Xiaobin
Department of Anesthesiology，the Affiliated Hospital of Southwest Medical University，Luzhou 646000，China

【**Abstract**】**Objective** Recombinant adeno-associated virus expressing circKat6b（rAVV-circKat6b）was obtained and its infection effect and expression level of circKat6b in the hippocampus of mice were examined. **Methods** The mmu-circKat6b gene fragment was inserted into AAV expression plasmid to construct a recombinant AAV plasmid. The recombinant AAV plasmid，packaging plasmid and helper plasmid were co-transfected into 293T cells by Lipofiter™ for rAAV-circKat6b packaging. The rAAV-circKat6b was collected from transfected 293T cells and purified by column，and the titer of the rAAV-circKat6b was tested by qRT-PCR. Finally，rAAV-circKat6b was injected into the hippocampus of mice by stereotactic apparatus. One month later，the infection effect of rAAV-circKat6b was observed by immunofluorescence microscope，and the expression level of rAAV-circKat6b was detected by qRT-PCR. **Results** The successfully packaged rAAV-circKat6b was purified to obtain high titer rAAV-circKat6b，and the virus titer of rAAV-circKat6b was detected by qRT-PCR and reached 1.2×10^{12} vg/mL. Strong green fluorescence and high level of circKat6b were observed in the infected hippocampus after one month of infection. **Conclusion**s The successfully constructed rAAV-circKat6b could highly increase the expression level of circKat6b in the hippocampus of mice，which provided an effective tool for further studying of the biological functions of circKat6b.

【**Key words**】Adeno-associated virus；CircKat6b；Hippocampus of mice；Depression

环状RNA（circRNA）是一种新型具有闭环结构的非编码RNA，可通过吸附微小RNA（miRNA）海绵功能、结合RNA结合蛋白（RNA-binding protein，RBP）以及翻译等功能发挥重要作用[1-2]。研究表明CircRNA与多种疾病的发病机制密切相关[3-5]，其中对于调节神经系统的生理和病理过程发挥着至关重要的作用，包括神经发育和可塑性、细胞生长、阿尔茨海默病、抑郁症等[6-9]。我们前期研究表明具有明显抗抑郁作用的亚麻醉剂量氯胺酮处理大鼠后海马组织中环状RNA rno-circRNA-005442水平显著下降[10]。经序列比对发现rno-circRNA-005442由大鼠基因赖氨酸乙酰基转移酶6B（lysine acetyltransferase 6B，*Kat6b*）外显子环化形成。在此，我们将该环状RNA命名为circKat6b。然而，其在氯胺酮抗抑郁作用中的机制尚不清楚。为了进一步

基金项目：四川省科技厅项目（2020YJ0493）
通信作者：王晓斌，E-mail：wangxiaobin67@163.com
引用本文：胡娜，刘行，王敏睿，等.CircKat6b重组腺相关病毒制备及其在小鼠海马中的表达[J].西南医科大学学报，2023，46（2）：141-146.DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.02.011

研究circKat6b的功能，克隆circKat6b的基因片段以及高表达circKat6b水平是重要的研究手段。

腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）是一种小的非致病性病毒，具有免疫原性低、无毒、转染率高等特点，是最常用的基因治疗载体之一[11]。目前AAV给药途径主要是外周给药和中枢给药。然而，血脑屏障由于其特殊的解剖和生理特性限制了外周给药的应用[12]。本研究经医院伦理委员会审核同意以构建过表达circKat6b的重组AAV为主要目的，通过小鼠脑立体定位仪注射rAVV-circKat6b至小鼠海马组织中，观察小鼠海马组织感染效率及circKat6b表达情况，为进一步研究circKat6B的生物学功能奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

总RNA提取试剂盒、实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）试剂盒购自美国赛默飞科技公司。HiScript III RT SuperMix for qPCR（+gDNA wiper）逆转录试剂盒、高保真DNA聚合酶、小提中量质粒试剂盒购自中国诺维赞公司。EcoRI和HindIII内切酶，T4连接酶购自英国NEB公司。文中引物均购自擎科生物有限公司。DH5α感受态细胞购买自天根生化科技（北京）有限公司。pHBAAV-GFAP-EGFP，pAAV-RC，pHelper载体质粒购自英国Cell Biolabs公司。人肾上皮细胞系293T cell、LipoFiter™转染试剂购自汉恒生物科技公司。胎牛血清（FBS）、胰酶和高糖DMEM培养基均购自美国Gibco公司。SPF级C57BL/6J小鼠（18～22g，6～8 W）购自重庆腾鑫生物技术有限公司。

1.2 *CircKat6b*的扩增

经过与人、小鼠*Kat6b*比对，可以发现该基因具有高度保守性（图1），该段序列为人*Kat6b*的3号外显子、小鼠*Kat6b*基因的2号外显子序列环化形成。通过PCR检测人、小鼠*Kat6b*基因，经片段测序人和小鼠的该部分外显子序列均可形成环状RNA，说明circKat6b在人、小鼠、大鼠中均存在（图2A-D）。以小鼠星型胶质细胞为样本，使用TRIzol试剂提取总RNA，逆转录试剂盒将提取的总RNA反转录成cDNA，以cDNA为模板，用特异性引物扩增出circKat6b的基因片段，将PCR反应程序设置为：预变性：95 ℃ 5 min；变性：95 ℃ 30 sec；退火 55 ℃ 30 sec；延伸 72 ℃ 30 sec；重复35个循环；最后 72 ℃ 10 min。

1.3 重组质粒构建

用EcoRI和HindIII内切酶同时酶切1.2中得到的circKat6b基因片段和pHBAAV-GFAP-EGFP质粒，37 ℃水浴锅中反应1～2 h，得到双酶切产物mmu-circKat6b-DD和pHBAAV-GFAP-EGFP-DD。将酶切后的基因片段与质粒在16 ℃连接2 h，4℃过夜。第2d将连接产物（不超过感受态体积1/10）转化入DH5α中，倒放37 ℃恒温箱培养12～16 h。次日从平板上挑取单菌落进行菌落PCR，1.5%琼脂糖凝胶电泳检查PCR产物，记录含目的条带的菌落号备用。将目的条带大小正确的菌落加入含有氨苄青霉素的10 mL LB液体培养基中，37 ℃摇菌过夜，用FastPure Plasmid Mini Kit（Vazyme）提取试剂盒提取质粒。将筛选出来的阳性克隆送擎科测序，经过序列比对，将比对结果正确的重组质粒命名为pHBAAV-GFAP-circKat6b-EGFP。

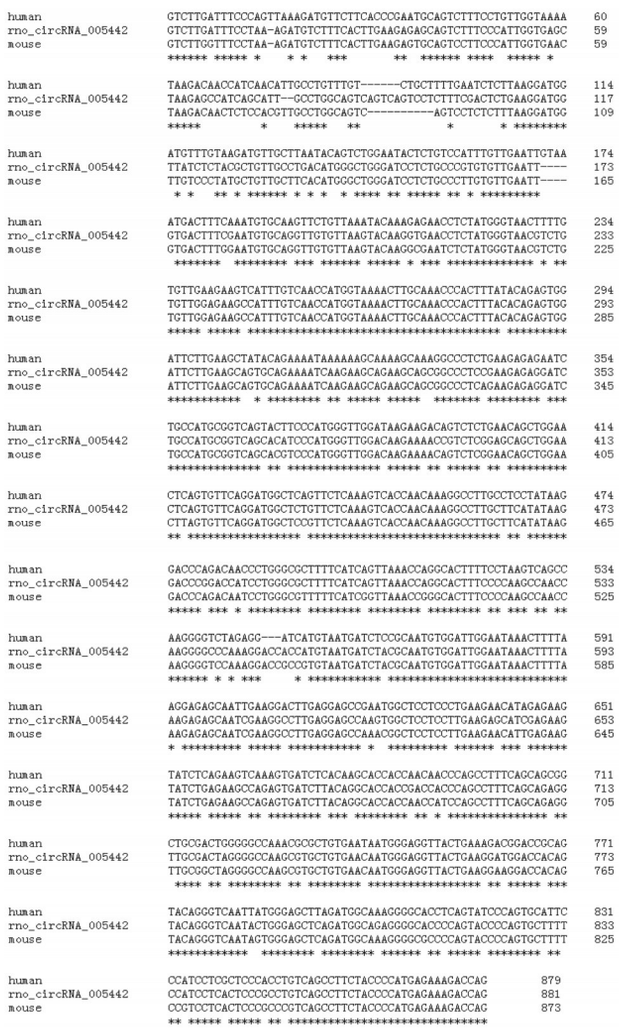


图1 人、大鼠、小鼠环状RNA的序列比对

Figure1 Sequence Alignment of CircRNA in Human, Rat, and Mouse

注：*代表相同的碱基。

1.4 重组腺相关病毒的包装、纯化及滴度检测

293T细胞用含有10%胎牛血清的高糖DMEM培养基在二氧化碳浓度为5%的细胞孵箱中培养，将细胞用胰蛋白酶消化后直接接种于细胞培养皿中，当细胞密度达到约80%～90%后即可进行转染。在37 ℃水浴中预热Opti MEM，LipoFiter™转染试剂恢复到室温即可使用，使用前需将两者摇匀。将pHBAAV-GFAP-circKat6b-EGFP重组表达质粒、pAAV-RC和pHelper

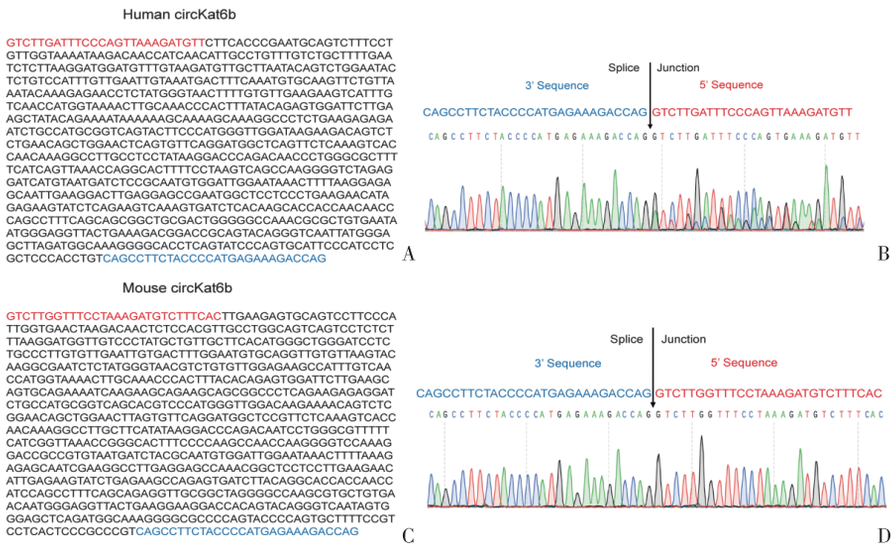


图2　人和小鼠circKat6b序列及测序结果

Figure2　Base sequences and sequencing results of circKat6b of human and mouse

注：A.人circKat6b的成环序列；B.人circKat6b PCR产物测序结果标记序列成环位点；C.小鼠circKat6b的成环序列；D.小鼠circKat6b PCR产物测序结果标记序列成环位点。

质粒共同转染到293T细胞中，6 h后更换新鲜的完全培养基，72 h后将含有AAV颗粒的细胞轻轻刮下并收集于15 mL离心管中，150 rpm/min离心3 min，去除上清液后保留细胞沉淀。用PBS洗涤细胞沉淀一次后用300 μL PBS重悬细胞。将装有细胞混悬液的离心管在液氮和37 ℃水浴反复冻融3次。4 ℃，3 000rpm/min离心5 min，将含有AAV颗粒的裂解上清通过0.45μM滤器过滤后收集起来。为去除病毒粗提物中残留的质粒DNA和细胞基因组，将0.1 μL Benonase酶加入到1 mL病毒液中，37 ℃水浴1 h。之后4 ℃，600rpm/min离心10 min，取上清。用Biomiga腺相关病毒纯化试剂盒对病毒进行纯化，柱纯化后的AAV病毒样本加入到超滤管中，1 500rpm/min离心30min后得到AAV约1mL。将最终纯化后的病毒保存于－80 ℃冰箱。使用ITR-F和ITR-R引物（表1）进行qRT-PCR效价鉴定，首先在37 ℃水浴中用DNase Ⅰ消化AAV病毒样本约1 h，然后在100 ℃中处理10 min。之后再加2 μL蛋白酶K，55 ℃水浴1 h，100 ℃，处理10 min，离心，最后10倍稀释待用。将标准品质粒进行稀释，标准品拷贝梯度设置为10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}。qRT-PCR反应程序：95 ℃ 180s，94 ℃ 30s；62 ℃ 30s；72 ℃ 30s，重复40个循坏。根据Ct值和对应的拷贝数，做1元1次函数曲线，将待测AAV样品Ct均值，代入所得函数曲线公式，计算所加入AAV模板拷贝数X，再换算成滴度。换算公式为：AAV病毒滴度= 10^x ×400 000（稀释倍数）vg/mL。

1.5　rAAV-circKat6b感染小鼠海马组织

将SPF级雄性C57BL/6J小鼠（18～22 g，6～8周）适应性饲养1周后按随机数字大小分为NC正常组（8只）：小鼠脑立体定位注射生理盐水；rAAV-circKat6b实验组（8只）：小鼠脑立体定位注射rAAV-circKat6b；rAAV-GFAP-EGFP对照组（8只）：小鼠脑立体注射rAAV-GFAP-EGFP对照腺相关病毒。操作步骤为：1%的戊巴比妥钠40 mg/kg进行腹腔注射后麻醉小鼠，小鼠固定于脑立体定位仪上，将前囟作为原点，以0.4 μL/min的速度向双侧海马区（AP-2.0 mm；ML ± 1.0 mm；DV 2.0 mm）立体定向注射1 μL的腺相关病毒，每次留针6 min后再慢慢出针，先从一侧注射，再按同样的步骤行另一侧注射。切口用碘伏消毒，缝合皮肤完毕后放回笼中继续饲养。1个月后，腹腔注射1%戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉小鼠后处死，每组随机挑选3只小鼠取出其脑组织，用4%的多聚甲醛固定24 h后，进行脱水、透明、浸蜡、包埋等处理；剩下5只小鼠的脑组织放入无酶EP管中，放至液氮罐中进行速冻，再转至-80 ℃冰箱保存。

表1　引物序列表

Table 1　Primer sequences

反应程序	引物名称	引物序列
circKat6b荧光定量PCR	mmu-circKat6b-F	AATGGGAGGTTACTGAAGGA
	mmu-circKat6b-R	AAGCAACAGCATAGGGACAA
	mmu-β-actin-F	CCTAAGGCCAACCGTGAAAA
	mmu-β-actin-R	GAGGCATACAGGGACAGCACA
病毒滴度荧光定量PCR	ITR-F	CGGCCTCAGTGAGCGA
	ITR-R	AGGAACCCCTAGTGATG

1.6　qRT-PCR

使用TRIzol提取各组的海马组织的总RNA，用逆转录试剂盒将总RNA反转录成cDNA，用circKat6b及β-actin引物（表1）进行qRT-PCR扩增。反应程序：50 ℃，2 min；95 ℃，2 min；40个PCR循环（95 ℃，1 s，60 ℃，30 s），扩增反应结束后，95 ℃，1 s；60 ℃，20 s；95℃，1 s，建立PCR产物的溶解曲线。最终数据采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$进行分析。

1.7 免疫荧光

将组织石蜡切片室温放置10 min后，依次将石蜡切片放入二甲苯10 min，洗涤3次；无水乙醇5 min，洗涤2次；90%乙醇5 min，洗涤1次；75%乙醇5 min，洗涤1次；70%乙醇5 min，洗涤1次；无菌无酶水5 min，洗涤2次。切片干燥后，用免疫组化笔在小鼠海马组织周围画圈，防止液体流失。随后在圈内滴加抗荧光淬灭的封片剂，室温孵育3～5 min后封片。荧光显微镜下观察切片并采集相关图像。

2 结果

2.1 circKat6b扩增

经NCBI查询后，circKat6b为小鼠2号外显子环化而成，其基因片段约873 bp。提取小鼠星型胶质细胞RNA后逆转录为cDNA，PCR扩增后的产物在1.5%的琼脂糖凝胶中进行电泳，在750~1 000 bp之间可见单一明亮条带（图3A），与预期基因片段的大小相符。

2.2 pHBAAV-GFAP-circKat6b-EGFP质粒构建结果

PCR扩增circKat6b的产物与pHBAAV-GFAP-EGFP载体质粒进行双酶切、连接后得到的pHBAAV-GFAP-circKat6b-EGFP重组质粒（图3B）。随机挑选15个转化后得到的菌落进行PCR扩增，经过琼脂糖凝胶电泳后可以看到菌落编号为U13-15的菌落在750 bp～1000 bp左右有明显的条带（图3C）。将菌落U13-15质粒重组片段的测序结果与目的序列进行比对，发现只有U13的比对结果与目的circKat6b的基因序列完全一致（图3D），这表明该目的质粒构建成功。

2.3 pHBAAV-GFAP-circKat6b -EGFP包装、纯化及滴度鉴定结果

根据qRT-PCR法测得得样品Ct值（图3E），再根据每组AAV标准品的Ct值对其拷贝数的对数做回归曲线，从而计算出标准曲线。通过函数公式计算AAV样

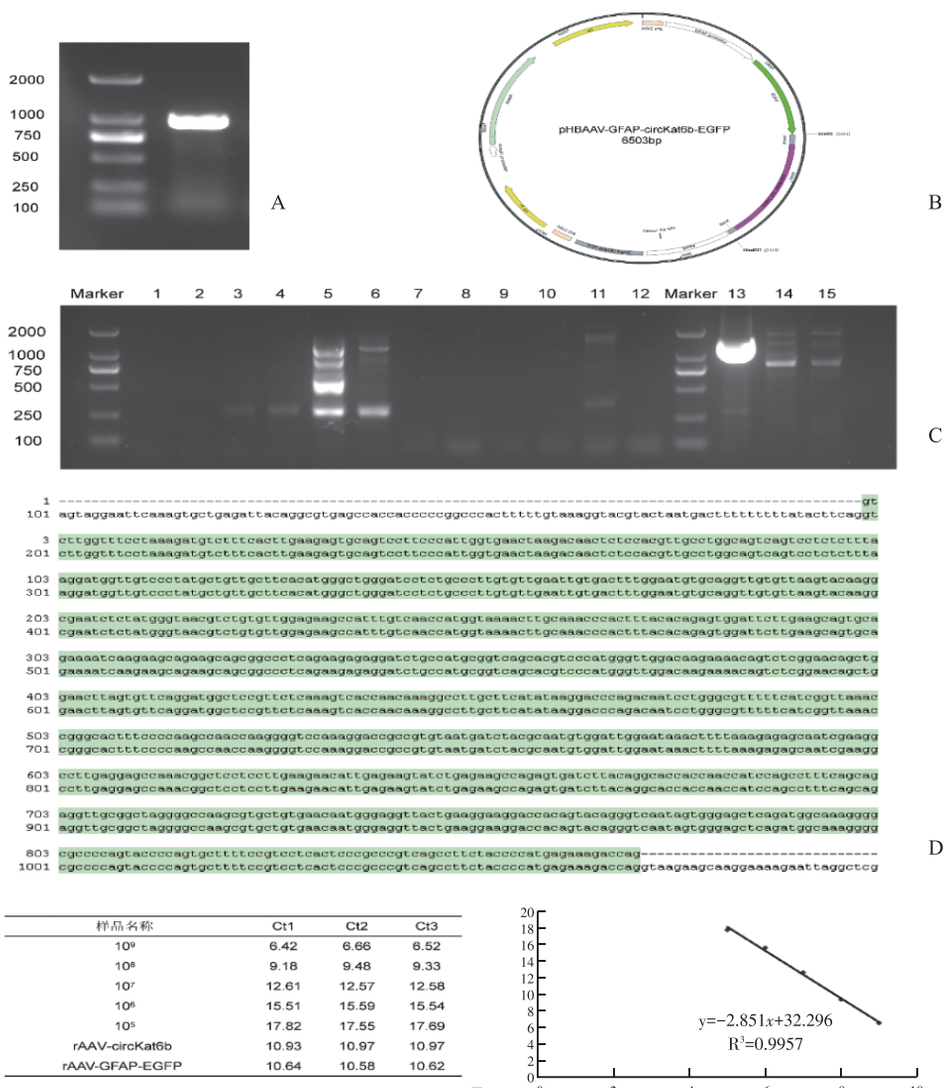


图3 pHBAAV-GFAP-circKat6b-EGFP质粒构建及rAAV-circKat6b的滴度测定

Figure3 Construction of pHBAAV-GFAP-circKat6b-EGFP plasmid and titer determination of rAAV-circKat6b

注：A:PCR扩增circKat6b的产物琼脂糖电泳条带；B:重组pHBAAV-GFAP-circKat6b-EGFP质粒；C: 菌落PCR结果；D: 菌落U13质粒的序列与circKat6b基因的序列比对完全相同，绿色区域与目的序列相匹配；E: 样品Ct值；F: 标准曲线及函数公式。

品相对应的拷贝数对数，换算成拷贝数10^x以及病毒滴度vg/mL，得到图3F标准曲线，计算其病毒滴度如下：rAAV-circKat6滴度= 1.2×10^{12} vg/mL，rAAV-GFAP-EGFP滴度 = 1.6×10^{12} vg/mL。

2.4 小鼠海马组织rAAV-circKat6b感染情况

小鼠海马组织石蜡切片，通过脱蜡、洗涤以及封片等处理后用荧光显微镜观察rAAV-circKat6b和rAAV-GFAP-EGFP在海马区域中表达明显，而NC组没有绿色荧光表达（图4 A）。

2.5 感染rAAV-circKat6b海马组织中circKat6b的表达情况

qRT-PCR检测感染的小鼠海马组织中circKat6b的相对表达量，结果显示rAAV-circKat6b实验组小鼠海马组织circKat6b表达水平较rAAV-GFAP-EGFP对照组上调约5倍（图4 B）。

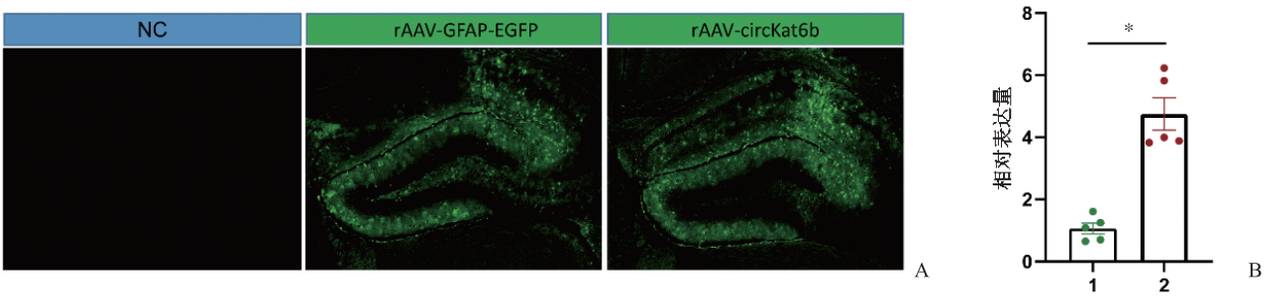


图4 小鼠海马组织rAAV-circKat6b感染情况及表达情况

Figure 4　Infection and expression of rAAV-circKat6b in the hippocampus of mice

注：A: NC组：小鼠海马组织未见绿色荧光；rAAV-GFAP-EGFP组：小鼠海马组织可观察到绿色荧光；rAAV-circKat6b组：小鼠海马组织可观察到绿色荧光。B: 1: rAAV-GFAP-EGFP组；2: rAAV-circKat6b组，与rAAV-GFAP-EGFP组相比，*$P < 0.05$。

3 讨论

circRNA是一类没有5′帽子结构和3′ poly A尾，具有闭合环状结构的非编码RNA分子，分布广泛且种类丰富[13~14]，具有高度保守性[15]和组织发育阶段特异性[16]。大量研究表明，circRNA可通过表观遗传修饰参与疾病的发生发展，如在临床研究方面，利用基因芯片筛选发现抑郁症病人外周血的circRNA含量水平显著改变并对抑郁症严重程度有较强的相关性[17~18]；其次服用抗抑郁药物（西酞普兰/舍曲林/氟伏沙明分别联合米氮平）的抑郁症病人外周血中的circRNA含量与未服用抗抑郁药物的抑郁症病人也具有显著差异[19]。动物实验方面，通过慢性不可预测温和刺激（chronic unpredictable mild stress，CUMS）或用脂多糖（LPS）诱发小鼠急性抑郁模型，发现抑郁小鼠模型中circRNAs可通过海绵吸附miRNAs[8]，结合RBP蛋白[20]等方式改善小鼠抑郁样行为。因此，circRNA在抑郁症发生发展中发挥着重要作用，可能成为抑郁症表观遗传的生物标记或药物治疗的靶点，但发挥关键作用的具体circRNA仍不明确，其作用机制也不清楚，因此构建在相应组织中高表达具体circRNAs工具非常重要。我们前期研究表明具有明显抗抑郁作用的亚麻醉剂量氯胺酮处理大鼠后海马组织中circRNA-005442（circKat6b）水平显著下降[10]，但circKat6b在氯胺酮抗抑郁作用中的机制尚不清楚，为了进一步研究circKat6b的生物学功能，本研究构建了能在小鼠海马组织中高表达circKat6b工具。

基因治疗是目前最火热的治疗领域之一，该疗法可以诱导病变细胞中的基因表达或沉默，并已在临床前期试验中取得成功，但其临床应用依然受到基因载体免疫原性、致癌性、脱靶效应和疗效的限制。因此如何选择低毒性、高效性、靶向性高等特性的载体，协助靶基因进入细胞并正确表达，是基因治疗过程中必须解决的难点问题[21]。腺相关病毒载体利用病毒对细胞的感染能力，将携带的外源基因转移到细胞中，对基因治疗具有一定的优越性。与其他病毒载体相比，AAV具有转染效率高、免疫原性低、长期表达外源基因等优势，在近几年的研究中发展迅速。目前以AAV为基础的基因转移载体已经可应用于神经系统疾病中。canavan病（CD）是一种由天冬氨酸酰基转移酶（*ASPA*）基因突变引起的脑白质营养不良症，是第一个被批准在中枢神经系统进行rAAV基因治疗的疾病，在I期临床研究中表明病人对rAAV基因重组药物具有较好的耐受性[22]。其次rAAV治疗对帕金森病表现出较为满意的效果，通过rAAV携带神经营养因子基因、多巴胺合成相关酶基因、谷氨酸脱羧酶（*GAD*）基因等手段可达到一定治疗效果，但这方面的基因治疗研究仍有许多问题亟待解决[23]。此外，rAVV跟抑郁症已有一些相关研究。MA等的研究显示，鼻腔注射*NT4-NAP*/AAV显著缩短了末次给药后第1 d的强迫游泳中的不动时间[24]。WANG等发现小鼠前额叶皮质内注射rAAV-*BICC1*后产生了抑郁样行为[25]。我们前期实验表明脑内注射rAAV-miR29b-3p可通过降低代谢型谷氨酸受体4（*GRM4*）的表达从而减轻大鼠抑郁样行为[26]。因此本

研究我们仍选用rAAV来构建能在组织中高表达circKat6b的工具，结果表明我们制备的rAAV-circKat6b能在小鼠海马组织中高效表达circKat6b，为今后进一步研究circKat6b的生理学功能提供了有效的手段与方法。

4 结论

本研究成功构建了circKat6b重组腺相关病毒，并在小鼠海马组织中高效表达，这一结果为后续研究circKat6b的生物学功能及其在体内外的过表达奠定了实验基础，可能为抑郁症的治疗提供一种新的思路。

5 参考文献

[1] TANG XZ, REN HY, GUO MJ, *et al*. Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2021, 19: 910-928.

[2] 李勇瑜, 宋健. 环状RNA对胃癌诊断及预后的影响[J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(3): 287-291.

[3] 徐康乔, 夏世金, 王坚, 等. 环状RNA与呼吸系统疾病[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2020, 19(6): 611-616.

[4] 史圣甲, 贾一凡, 季兴哲, 等. 沉默环状RNA_单酰甘油酯酶促进睾丸支持细胞增殖而抑制凋亡[J]. 西部医学, 2022, 34(2): 185-189, 194.

[5] 杨瑜, 刘耀河, 秦宁, 等. 环状RNAcirc-ccnb1通过抑制细胞周期蛋白核转位对食管鳞癌增殖和迁移的影响[J]. 西部医学, 2021, 33(8): 1101-1105.

[6] YOU XT, VLATKOVIC I, BABIC A, *et al*. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. Nat Neurosci, 2015, 18(4): 603-610.

[7] FLORIS G, ZHANG LB, FOLLESA P, *et al*. Regulatory role of circular RNAs and neurological disorders[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(7): 5156-5165.

[8] ZHANG Y, DU LF, BAI Y, *et al*. CircDYM ameliorates depressive-like behavior by targeting miR-9 to regulate microglial activation via HSP90 ubiquitination[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(6): 1175-1190.

[9] 谭桂凤, 肖颂华, 张涵, 等. 环状RNA在抑郁症中的研究进展[J]. 生命科学研究, 2021, 25(6): 509-513.

[10] MAO J, LI TM, FAN D, *et al*. Abnormal expression of rno_circRNA_014900 and rno_circRNA_005442 induced by ketamine in the rat hippocampus[J]. BMC Psychiatry, 2020, 20(1): 1.

[11] BUCK TM, WIJNHOLDS J. Recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV)-vector elements in ocular gene therapy clinical trials and transgene expression and bioactivity assays[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4197.

[12] MORIMOTO BH, FOX AW, STEWART AJ, *et al*. Davunetide: a review of safety and efficacy data with a focus on neurodegenerative diseases[J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2013, 6(5): 483-502.

[13] MAASS PG, GLAŽAR P, MEMCZAK S, *et al*. A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(11): 1179-1189.

[14] ZAGHLOOL A, AMEUR A, WU CL, *et al*. Expression profiling and in situ screening of circular RNAs in human tissues[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 16953.

[15] DONG ZF, DENG LN, PENG QX, *et al*. CircRNA expression profiles and function prediction in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute ischemic stroke[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(3): 2609-2618.

[16] HANAN M, SOREQ H, KADENER S. CircRNAs in the brain[J]. RNA Biol, 2017, 14(8): 1028-1034.

[17] 孔令明, 牛威, 朱晓丽, 等. 抑郁症病人外周血circRNA表达水平与认知功能障碍的相关性研究[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2018, 27(11): 1001-1005.

[18] 孔令明, 牛威, 姚高峰, 等. 外周血circRNA的差异表达及其与抑郁症严重程度的关系[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(6): 504-508.

[19] CUI XL, NIU W, KONG LM, *et al*. hsa_circRNA_103636: potential novel diagnostic and therapeutic biomarker in major depressive disorder[J]. Biomark Med, 2016, 10(9): 943-952.

[20] HUANG RR, ZHANG Y, BAI Y, *et al*. N 6-methyladenosine modification of fatty acid amide hydrolase messenger RNA in circular RNA STAG1-regulated astrocyte dysfunction and depressive-like behaviors[J]. Biol Psychiatry, 2020, 88(5): 392-404.

[21] ZHANG C, WANG KZ, QIANG H, *et al*. Angiopoiesis and bone regeneration via co-expression of the hVEGF and hBMP genes from an adeno-associated viral vector in vitro and in vivo [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(7): 821-830.

[22] MCPHEE SWJ, JANSON CG, LI C, *et al*. Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease[J]. J Gene Med, 2006, 8(5): 577-588.

[23] 陈阳, 吕颖慧, 李招发. 腺相关病毒在帕金森病基因治疗研究中的应用进展[J]. 药学学报, 2014, 49(5): 576-581.

[24] MA XC, CHU Z, ZHANG XL, *et al*. Intranasal delivery of recombinant NT4-NAP/AAV exerts potential antidepressant effect [J]. Neurochem Res, 2016, 41(6): 1375-1380.

[25] WANG ZC, ZHOU DS, LI ST, *et al*. Underlying mechanisms of recombinant adeno-associated virus-mediated bicaudal C homolog 1 overexpression in the medial prefrontal cortex of mice with induced depressive-like behaviors[J]. Brain Res Bull, 2019, 150: 35-41.

[26] WAN YQ, FENG JG, LI M, *et al*. Prefrontal cortex miR-29b-3p plays a key role in the antidepressant-like effect of ketamine in rats[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(10): 1-14.

（利益冲突：无）

（收稿日期：2022-12-02；修回日期：2022-12-29）