DOI:10.16016/j.2097-0927.202311088

阿尔茨海默病血清外泌体 miRNA 生物标志物的筛选研究

段 贤[1],郑 庆[1],梁力晖[1],周 琳[2,3] 410002 长沙,湖南省人民医院老年医学科[1];410008 长沙,中南大学湘雅医院老年神经内科[2];830063 乌鲁木齐,新疆医科大学第二附属医院神经内科[3]

[摘要] **目的** 通过比较阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)患者与健康对照者的血清外泌体中 miRNAs 的表达,筛选出差异表达的 miRNAs。**方法** 收集 2017 年 3 月至 2018 年 8 月就诊于中南大学湘雅医院老年神经内科的 AD 患者 71 例为研究组(AD),健康体检者 71 例为对照组(HC)。各组选取 4 例样本行血清外泌体 miRNAs 高通量二代测序,检测、分析 2 组间差异表达的 miRNAs,筛选出表达差异有统计学意义、表达量最高的前 4 种 miRNAs,在 71 例 AD 患者和 71 例健康体检者样本中用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)测定其相对浓度。**结果** 高通量二代测序共检测到 775 种 miRNAs,其中有 44 种 miRNAs 在 2 组间表达差异有统计学意义($P<0.05$)。与 HC 组相比,AD 组中有 34 种 miRNAs 表达上调,10 种 miRNAs 表达下调,其中表达量最高的前 4 种 miRNAs 为 miRNA-148a-3p、miRNA-16-5p、miRNA-19b-3p、miRNA-483-5p。MiRNA-148a-3p 表达在 AD 组中较 HC 组显著上调($P<0.01$),但 miRNA-16-5p、miRNA-19b-3p、miRNA-483-5p 在 2 组间表达差异无统计学意义。绘制 ROC 曲线,miRNA-148a-3p 的 AUC 为 0.7113(95%*CI*:0.622~0.801),灵感度为 71.6%,特异度为 69.7%。**结论** 血清外泌体 miRNA-148a-3p 可望作为 AD 诊断的生物标志物。

[关键词] 阿尔茨海默病;外泌体;miRNAs;生物标志物

[中图法分类号] Q522; R446.119; R745.7 [文献标志码] A

Screening of serum exosomal miRNAs as diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease

DUAN Xian[1], ZHENG Qing[1], LIANG Lihui[1], ZHOU Lin[2,3] [1]Department of Geriatrics, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan Province, 410002; [2]Department of Geriatric Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan Province, 410008; [3]Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830063, China

[**Abstract**] **Objective** To screen differentially expressed miRNAs (DEMs) by comparing the expression of miRNAs in serum exosomes between Alzheimer's disease (AD) patients and healthy controls. **Methods** A total of 71 AD patients admitted to Department of Geriatric Neurology of Xiangya Hospital from March 2017 to August 2018 and another 71 healthy individuals who taking physical examination in the hospital during same period were recruited and assigned into AD and HC groups, respectively. Four AD patients and four healthy subjects were selected for high-throughput second-generation sequencing of exosome miRNAs. The results were analyzed to obtain the DEMs between them, and the top 4 DEMs were finally selected. Then real-time quantitative real-time PCR was applied for all the subjects to detect the expression of the 4 DEMs. **Results** High-throughput second-generation sequencing detected 775 miRNAs, and 44 DEMs were found with statistical difference between the 2 groups ($P<0.05$). Compared with the HC group, 34 miRNAs were

[基金项目] 新疆神经系统疾病研究重点实验室开放课题(XJDX1711-2214)

[通信作者] 周 琳,E-mail:zhoulin90117@sina.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

up-regulated and 10 were down-regulated in the AD group. The top 4 DEMs were miRNA-148a-3p, miRNA-16-5p, miRNA-19b-3p and miRNA-483-5p. MiRNA-148a-3p was significantly up-regulated in the AD group than the HC group ($P<0.01$), but there were no significant differences in the expression level in the other 3 DEMs between the 2 groups. ROC curve analysis showed that the area under the curve of miRNA-148a-3p was 0.7113 (95%*CI*: 0.622~0.801), with a sensitivity of 71.6% and a specificity of 69.7%. **Conclusion** Serum exosome miRNA-148a-3p can be used as a biomarker for the diagnosis of AD.

[**Key words**] Alzheimer's disease; exosome; miRNAs; biomarker

Supported by the Open Project of Xinjiang Key Laboratory of Neurological Diseases (XJDX1711-2214). Corresponding author: ZHOU Lin, E-mail: zhoulin90117@sina.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种慢性、进展性的神经退行性疾病,俗称老年痴呆,临床表现主要为进行性记忆力下降及多认知领域功能减退[1]。最近的调查结果显示,我国有1 507万60岁及以上痴呆患者,其中983万人患有AD,392万人患有血管性痴呆,132万人患有其他形式的痴呆[2]。从1984年美国国立老年研究所与阿尔茨海默病协会(the National Institute on Aging and Alzheimer's Association,NIA-AA)制定AD的临床诊断标准,到2011年NIA-AA更新的AD诊断标准中,制定了临床前痴呆、轻度认知功能障碍(mild cognitive impairment,MCI)、AD 3个连续疾病阶段的相关诊断标准,从无症状期到晚期严重痴呆阶段全面覆盖,再到2018年NIA-AA再次更新了AD的诊断标准,提出"AT(N)"诊断参考标准,即Aβ、Tau及其他[3-5];2023年阿尔茨海默病国际会议上发布了《NIA-AA阿尔茨海默病临床诊断指南修订版》草案,再次更新,提出了"ATNIVS"诊断框架,新增了"I(炎症机制)"、"V(血管性脑损伤)"和"S(α-突触核蛋白)",相比于以往主要依据临床症状、影像学、认知评估量表来诊断AD,近年来相关的生物标志物在AD诊断中越来越重要。寻找诊断价值高的生物标志物来诊断和跟踪疾病进展,对AD的防治、新药研究都非常重要。

MiRNAs是一类内源性非编码小RNA,长度为20~25个核苷酸,具有高度保守性,在受体细胞中通过与靶mRNA3'UTR区序列互补结合,调节靶基因的翻译表达。外泌体是纳米级生物囊泡,直径约30~150 nm,典型形态为双凹圆碟形或杯口状,密度为1.13~1.19 g/mL,是miRNA等生物分子在细胞间交流的载体[6]。外泌体中的miRNAs在基因转录后发挥调控作用的miRNAs分子,有片段短、结构较稳定、时间及组织特异性等特点,有多种调控功能,因此,近年来外周miRNAs作为疾病诊断生物标志物的研究成为了国内外的热点。miRNAs与神经元分化、突触重塑等紧密相关,与Aβ等AD病理蛋白的调节紊乱密切相关。已有研究表明,外周血中外泌体miRNAs在AD的早期诊断中有巨大的作为生物标志物的潜能[7-9]。

虽然脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中Aβ和Tau等生物标志物在AD的诊断中敏感度和特异度均较高,其诊断价值已被全世界广泛认可[3],但是腰穿脑脊液检查有创伤且费用高,难以被患者及家属接受。因此,研究外周血清外泌体miRNAs作为AD诊断的生物标志物以及进一步研究AD防治的新药,有很大的临床意义。本研究通过高通量测序全面筛选AD患者和健康对照者血清外泌体miRNAs的差异表达,以期进一步通过qRT-PCR扩大样本量验证以寻找新的能作为AD诊断生物标志物的血清外泌体miRNAs。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2017年3月至2018年8月就诊于中南大学湘雅医院老年神经内科的AD患者为研究组,共71例,男性39例,女性32例,年龄(75.4±10.3)岁。纳入标准:①存在多个认知领域功能障碍,工作能力、社会功能、日常生活能力均明显下降;②MMSE评分≤24分、MOCA评分≤20分,其中受教育程度≤12年者,则评分时结果加1分;日常生活评定量表ADL>26分,临床痴呆量表CDR≥1分,Hachinski缺血量表HIS<4分,汉密尔顿抑郁量表HAMD<8分。排除标准:诊断为或合并有其他类型变性病痴呆、严重脑血管疾病、严重心肺肾疾病、精神疾病、恶性肿瘤、严重视听障碍、长期大量饮酒、毒物药物中毒史者。AD患者均由中南大学湘雅医院老年神经内科2名经验丰富的主治以上的医师诊断,符合2011年美国国家老年痴呆协会制定的AD诊断标准[10]。

收集同时期健康体检中心的健康体检人员71例

为对照组,男性 39 例,女性 32 例,年龄(72.2±7.98)岁,年龄、性别、受教育程度与研究组患者匹配。健康对照(HC)组符合:①无认知功能损害,日常生活能力完全正常;②MMSE 评分≥26 分、MOCA 评分≥24 分,其中受教育程度≤12 年者,则评分时结果加 1 分;日常生活评定量表 ADL≤26 分,临床痴呆量表 CDR 0 分,Hachinski 缺血量表 HIS<4 分,汉密尔顿抑郁量表 HAMD<8 分。

选取其中临床特征典型的 4 例 AD 患者及相匹配的 4 例健康体检人员额外抽取 10 mL 静脉血用于外泌体 miRNAs 高通量二代测序。所有患者和/或家属知情同意并签署知情同意书。本研究已被中南大学湘雅医院伦理委员会批准(201606289)。

1.2 *方法*

所有人收集 5 mL 外周静脉血,2 h 内于 4 ℃下 3 000×*g* 离心 20 min;收集上层淡黄色血清约 2.5 mL,-80 ℃冰箱中冻存备用。

1.2.1 血清外泌体提取并鉴定 取冰冻血清置于冰上解冻,4 ℃下 3 000×*g* 离心 15 min,去除细胞碎片;将 1 mL 澄清血清转移到新离心管中,并加入 ExoQuick™(SBI 公司,美国)血清外泌体提取试剂 250 μL,充分混匀;4 ℃冰箱中直立孵育 30 min,4 ℃下 1 500×*g* 离心 30 min,小心吸去上层清液;4 ℃下再次 1 500×*g* 离心 5 min,小心彻底吸去沉底上的残余液体,管底部米黄色沉淀物即为外泌体。

采用上海釜诚生物科技有限公司的 JEM1230(JEOL 公司,日本)型透射电镜行外泌体形态检测:将外泌体沉淀重悬于 100 μL 1×PBS 液中,用移液器吸取 20 μL 外泌体重悬液滴在铜网有支持膜的一面;外泌体稀释液在铜网上自然吸附 8 min,用滤纸从铜网边缘吸走多余液滴;用移液器吸取 20 μL 双蒸水滴在铜网上,尽快用滤纸吸走多余液滴,根据外泌体浓度,重复此步骤 1~3 次;用移液器吸取 20 μL 2%磷钨酸溶液滴在铜网上,染色 3 min,染色结束后吸走多余染色液;铜网自然晾干或红外灯烤干后至 JEM1230 型透射电镜上机观察。

采用湖南诺研生物科技有限公司全自动纳米粒径分析仪 ZetaView(Particle Metrix,德国)行外泌体纳米粒径分析(Nanoparticle Tracking Analysis,NTA):取 100 μL 1×PBS 重悬外泌体沉淀,充分重悬混匀后,取 10 μL 外泌体重悬液置于新的离心管(5 mL)中,用 1×PBS 稀释 200 倍至 2 mL;取适量外泌体稀释液,再次适度稀释(稀释 20 倍)后于全自动纳米粒径分析仪 ZetaView 上机分析。

1.2.2 Western blot 鉴定外泌体标志蛋白 在外泌体沉淀的离心管中加入 1 mL RIPA 裂解液、10 μL 100 nmol/L 苯甲磺酰氟,冰上充分震荡、裂解、超声波加强粉碎;于 4 ℃下 12 000×*g* 离心 10 min,上清液备用。采用北京鼎国昌盛生物技术有限公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测样品蛋白浓度。取 300 μL 左右上层清液转移至新的离心管中,加入 4×SDS 蛋白上样缓冲液 100 μL 混匀后煮沸 10 min;在预制胶孔中加样后 140 V 恒压电泳 45 min,再 250 mA 恒流 90 min 转膜到 PVDF 膜上,用 5%BSA 液室温封闭 2 h。一抗孵育:将 CD63(兔抗)、CD81(兔抗)抗体用一抗稀释液按 1∶5 000 配置 CD63、CD81 抗体稀释液,4 ℃下摇床孵育过夜。二抗孵育:将漂洗后的 PVDF 膜放入 1∶10 000 的二抗(兔抗兔)抗体稀释液中,室温摇床孵育 2 h。发光、显影:ECL 发光液覆盖 PVDF 膜表面 1~3 min,在 bio-rad ChemiDoc MP 凝胶成像系统暗室中曝光显影成像。

1.2.3 外泌体总 RNA 提取 取 1 mL TRIzol 裂解外泌体沉淀,加入 200 μL 氯仿萃取;4 ℃下 12 000×*g* 离心 15 min,取上层清液约 500 μL 转移到新的离心管中,加入等体积的异丙醇,充分混匀后,4 ℃静置沉淀 2 h 以充分沉淀 RNA;4 ℃下 12 000×*g* 离心 10 min,倒弃上清液,轻扣在滤纸上适当晾干,加入 1 mL 75%乙醇洗涤 RNA;自然控干乙醇后,加入 10 μL 无酶水,在管底及侧壁反复吹打溶解 RNA,-20 ℃冻存备用。RNA 浓度及纯度检测:在 Nanodrop 2000 分光光度计中检测所得 RNA 浓度及纯度。

1.2.4 外泌体 miRNAs 高通量二代测序 采用广州锐博生物有限公司 HiSeq™ 2500 测序系统行血清外泌体 miRNAs 高通量二代测序,步骤如下。

测序样本抽提及质检:本研究筛选出了 4 名临床特征典型的 AD 患者和 4 名年龄、性别、受教育程度基本匹配的健康对照者,收集到上层淡黄色血清约 6 mL,-80 ℃冻存。用外泌体试剂盒提取血清外泌体,具体操作步骤同前所述,用 ND-1000Nanodrop 和 Agilent2200 TapeStation 进行样品质检。

cDNA 文库制备及质检:用 TRIzol 提取外泌体总 RNA,具体操作步骤同前所述,总 RNA 分别连接 5'接头和 3'接头;第一链 cDNA 合成;PCR 扩增;用凝胶电泳法获取插入片段在 18~40 nt 左右的 cDNA 文库,并用 Agilent2200 TapeStation 进行文库质检;通过质检的文库,按照 HiSeq™ 2500 User Guide 中所述的方法进

行上机测序。

上机测序操作:使用 Single Read Flow Cell,按照 HiSeq™ 2500UserGuide 的指示进行 HiSeq™ 2500 上机操作,并运行 single-end(1×50)标准测序程序。

数据生物信息分析:Illumina HiSeq™ 2500 测序所得 50 nt 原始序列(raw reads)集,通过去掉序列两端的接头、去掉低质量序列、去污染等过程完成数据初步过滤,得到干净序列(clean reads),对干净序列进行序列长度分布的统计及样本间共有序列的统计。对干净序列进行分类注释,可以获得样本中各类 sRNA 的组分及表达量信息。将所有 sRNA 片段注释后,使用余下的未注释片段进行新 miRNAs 的预测。对 miRNAs 进行差异分析和功能分析。

1.2.5 外泌体 miRNAs 荧光定量 qRT-PCR 验证 实验每个样本作 3 个复孔,选用 U6 作为内参,使用 miRNA qRT-PCR 试剂盒(广州锐博生物科技有限公司)、PCR 仪(eppendorf 公司,德国)逆转录和 ABI Fast 7500 实时 PCR 系统(Applied Biosystems 公司,美国)进行定量实时 PCR,反应完成后记录内参基因 Ct 值和目标基因 Ct 值,应用 ΔCt=目标基因 Ct 值-内参基因 Ct 值,再计算 ΔΔCt =研究组 ΔCt-对照组 ΔCt,最后计算每个 miRNA 的相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software, 美国)进行数据分析。入组者年龄、受教育程度、简易精神状态量表(Mini-mental State Examination,MMSE)、蒙特利尔认知量表(Montreal Cognitive Assessment, MOCA)、日常生活能力量表(Activity of Daily Living Scale, ADL)、临床痴呆评定量表(Clinical Dementia Rating, CDR)、缺血指数量表(Hachinski Ischemic Scale,HIS)、汉密尔顿抑郁量表(Hamilton Depression Scale,HAMD)评分分布的离散程度用 $\bar{x}\pm s$ 表示,对 AD 组患者和 HC 组体检者血清外泌体 miRNAs 表达水平的差异分析使用非参数检验 Mann-Whitney 检验进行分析。$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。通过绘制受试者工作特征曲线(ROC)评价血清外泌体 miRNAs 在 AD 诊断中的临床应用价值。

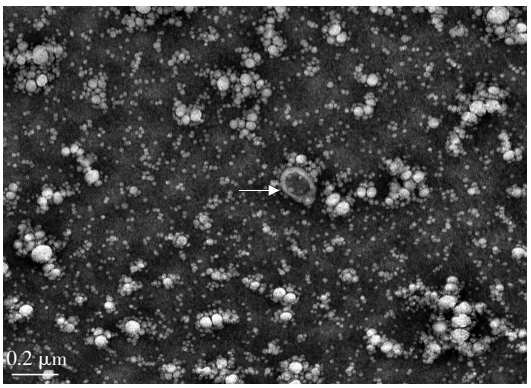
2 结果

2.1 一般情况

纳入患者及体检者评分(表 1)。2 组人群的受教育年限无差异,AD 组的 MMSE 评分、MOCA 评分、ADL 评分、CDR 评分明显低于 HC 组($P<0.01$),2 组人群 HIS 评分均<4 分、HAMD 评分均<8 分。

2.2 血清外泌体鉴定

2.2.1 透射电镜观察外泌体形态 外泌体大小约为 60~150 nm,形态呈“杯口状”或“凹圆碟形”的膜性结构,所见多为单个分布,有的多个成群聚集(图 1)。



箭头示双凹圆蝶形的外泌体

图 1 透射电镜观察外泌体形态

2.2.2 纳米粒径分析外泌体大小 外泌体粒径大小为(88.2±42.2)nm(图 2)。

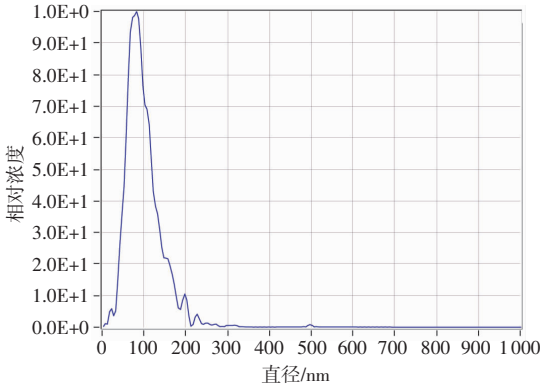


图 2 纳米粒径分析外泌体大小及相对浓度

表 1 AD 患者及健康体检者量表评分($n=75$, $\bar{x}\pm s$)

组别	受教育年限/年	MMSE/分	MOCA/分	ADL/分	CDR/分	HIS/分	HAMD/分
AD 组	9.5±4.3	13.0±7.3	6.2±6.6	38.0±14.7	1.8±0.7	2.2±1.0	3.3±2.6
HC 组	9.4±6.2	27.3±1.4	25.1±3.4	21.0±1.3	0.0±0.0	1.7±0.8	1.0±1.3
P	0.368	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2.3　Western blot 鉴定外泌体标志蛋白　　在 3 个外泌体样本中均检测到特异性标志物 CD63、CD81 分子表达,CD63 分子的分子量在 55×10^3 左右,CD81 分子的分子量在 26×10^3 左右(图 3)。

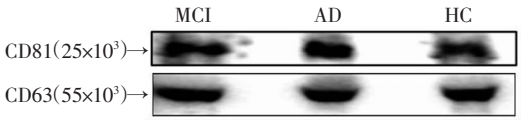
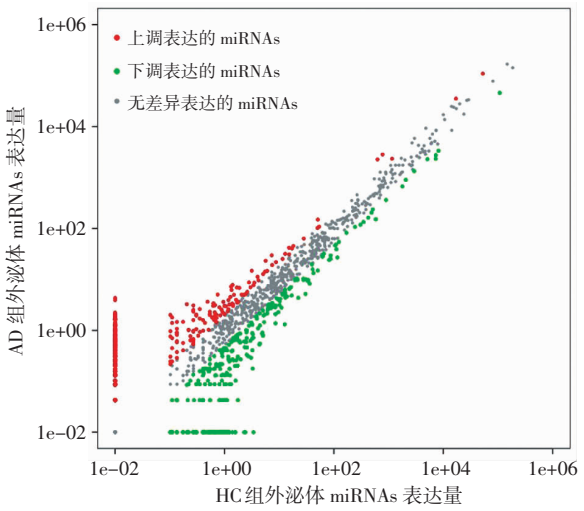


图 3　Western blot 检测血清外泌体中标志蛋白表达

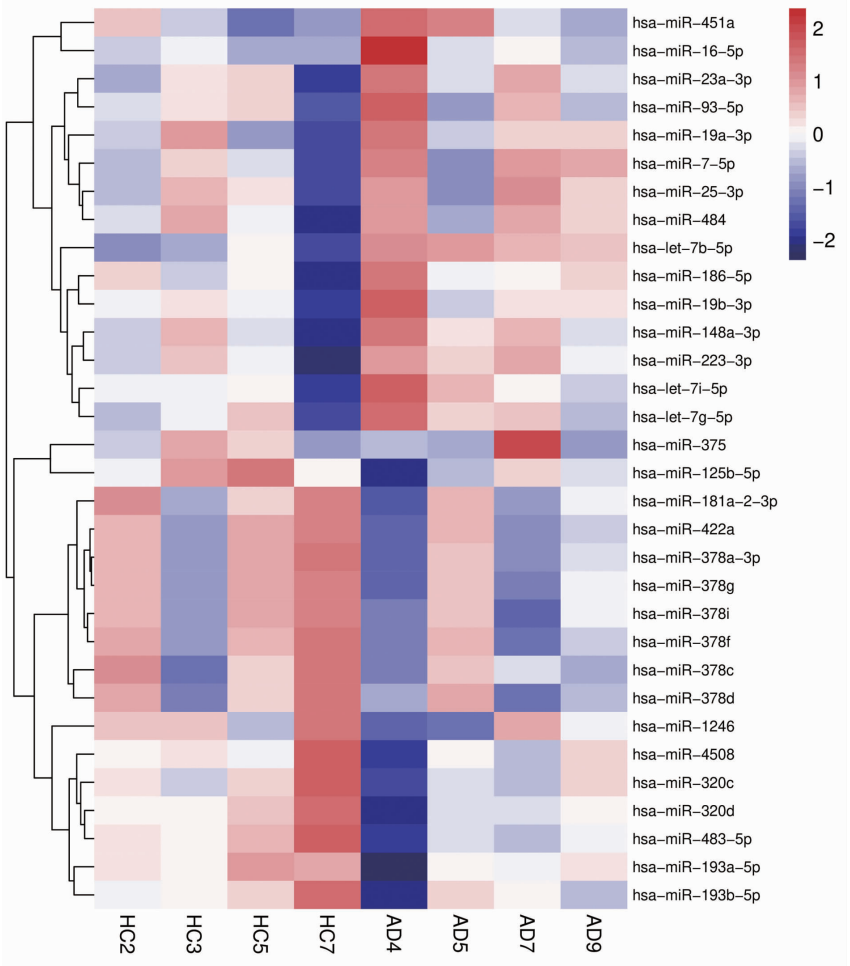
2.3　44 种外泌体 miRNAs 表达量在 2 组间有显著差异

在外泌体 miRNAs 高通量二代测序中,共检测到 775 种 miRNAs,AD 组与 HC 组相比,表达上调的 miRNAs 有 424 种,表达下调的 miRNAs 有 351 种,差异表达见图 4。在 2 组间表达差异显著者($P<0.05$)共有 44 种,其主要 miRNAs 表达差异见图 5;表达上调的有 34 种,表达下调的有 10 种,其中表达量靠前的 4 种 miRNAs 见表 2。



图中展示了所有 miRNAs 的表达差异,以 $|\log_2(\text{Fold Change})|\geq1$ 为阈值;绿色点表示 miRNAs 在 AD 组中表达下调;灰色点表示 miRNAs 在 AD 组中表达没有变化;红色点表示 miRNAs 在 AD 组中表达上调

图 4　AD 组与 HC 组间差异表达的外泌体 miRNAs



红色代表 miRNAs 在样本中高表达,蓝色代表 miRNAs 在样本中低表达

图 5　AD 组与 HC 组表达差异的外泌体 miRNAs

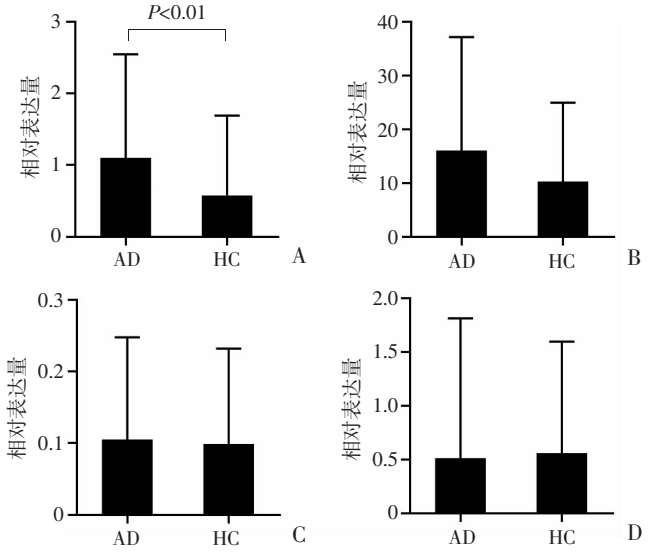
表 2 AD 组与 HC 组中表达差异前 4 种 miRNAs

miRNAs	HC 组	AD 组	AD/HC(log2)	*P*	Up/Down
hsa-miR-148a-3p	17 112.66	35 300.60	1.044 6	0.045 7	up
hsa-miR-16-5p	776.12	2 850.38	1.876 8	0.008 6	up
hsa-miR-19b-3p	626.87	2 269.56	1.856 2	0.009 4	up
hsa-miR-483-5p	583.11	151.86	−1.941 1	0.015 9	down

2.4 miRNA-148a-3p 在 AD 患者中表达增加

2.4.1 荧光定量 qRT-PCR 验证差异表达 miRNAs

根据高通量二代测序结果,筛选 AD 组与 HC 组间表达差异显著($P<0.05$)、表达量最高的前 4 种 miRNAs(miRNA-148a-3p、miRNA-16-5p、miRNA-19b-3p、miRNA-483-5p)进行荧光定量 qRT-PCR 验证。实验结果表明,AD 组患者血清外泌体中 miRNA-148a-3p 表达较 HC 组显著上调($P<0.01$),差异有统计学意义,但 miRNA-16-5p、miRNA-19b-3p、miRNA-483-5p 在 2 组间表达差异无统计学意义(图 6)。



A: miRNA-148a-3p; B: miRNA-16-5p; C: miRNA-19b-3p; D: miRNA-483-5p

图 6 qRT-PCR 检测血清外泌体表达($n=71$)

2.4.2 外泌体 miRNA-148a-3p 可望作为 AD 诊断的生物标志物

通过绘制 ROC 曲线、计算 ROC 曲线下面积(AUC)分析外泌体 miRNA-148a-3p 在 AD 诊断中的价值大小,结果显示,miRNA-148a-3p 的 AUC 为 0.7113(95%*CI*:0.622−0.801),灵感度 71.6%,特异度 69.7%,对 AD 诊断有较好的诊断预测价值(图 7)。

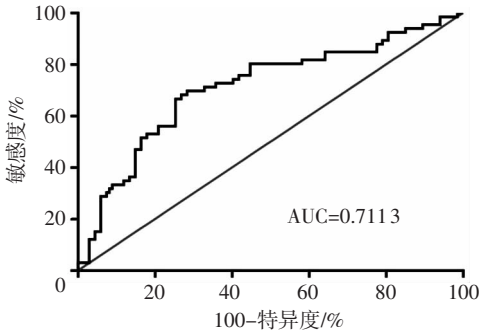


图 7 miRNA-148a-3p 的 ROC 曲线

3 讨论

目前已有的 AD 早期诊断标志物或为有创检查,或价格昂贵且有资质要求,临床上尚未得到广泛应用。近期沈璐教授在 AD 患者血清中寻找诊断生物标志物,最终确定了 7 种血清自身抗体(MAPT、DNAJC8、KDM4D、SERF、CDKN1A、AGER 和 ASXL1)作为 AD 诊断的候选生物标志物[11]。此外发现,通过检测人体呼出气中挥发性有机物以及双任务范式下的眼动、步态组合联合分析均可早期识别认知障碍患者,有望实现 AD 的早诊早治[4,12]。研究经济实惠、无创、能广泛应用于临床的 AD 外周生物标志物以及有效的治疗药物仍非常迫切。

本研究通过试剂盒免疫沉淀法分离得到的外泌体,形态结构呈“双凹圆碟形”,可见其膜性结构,NTA 分析结果示外泌体粒径大小为(88.2±42.2)nm,符合国内外研究报道结果,所测样本中外泌体浓度为 3.8×10^{11}/mL,与国内外研究报道结果相符[13]。血清外泌体 miRNAs 高通量二代测序结果与国内外报道[9,14-15]有较大差异,而且国内外已报道的文献之间,外泌体 miRNAs 高通量二代测序结果也存在很大差异。本研究认为,不同人种之间外泌体 miRNAs 表达可能存在较大差异,此外老年患者多合并有多种急慢性疾病,多数研究测序样本数偏低,血清样本在运输过程中不可

完全避免反复冻融过程等,均可以不同程度影响外泌体 miRNAs 的表达和降解。在实验样本收集的整个过程中,严格规范操作对本研究非常重要。

外泌体 miRNAs 通过各种途径参与基因表达的调控,如直接结合到 mRNA 3'UTR 抑制蛋白表达、与其他功能蛋白结合抑制蛋白质表达、直接激活 Toll 样受体(Toll-like receptors,TLRs)、上调蛋白质的表达、靶向调控线粒体相关基因 mRNA、直接激活基因转录过程及靶向负调控其他非编码 RNA 的前体 RNA 等[16]。有多项研究表明,外周血外泌体 miRNA-193b、miRNA-125b、miRNA-26b、miRNA-185、miRNA-9、miRNA-29、miRNA-107 等在 AD 中表达显著下调,其异常表达可能与 Aβ、p-Tau 等病理性蛋白呈负相关[10, 16-20]。外泌体 miRNA let-7、miRNA-155、miRNA-135a、miRNA-384 等表达显著上调,可能与诱导神经元变性、增强细胞炎症基因表达等相关,但具体致病机制、调控靶点均不清楚。本研究发现 miRNA-148a-3p 在 AD 中表达显著上调($P<0.01$),提示其可能参与 AD 发病的病理过程,有作为 AD 诊断生物标志物的潜能。ROC 曲线的 AUC 为 0.711 3(95%*CI*:0.622-0.801),灵感度 71.6%,特异度 69.7%,具有较好的诊断预测价值,具体调控机制及相关调控靶点、通路需要后续进一步研究。MiRNA-16-5p、miRNA-19b-3p、miRNA-483-5p 表达在 AD 组与 HC 组间差异无统计学意义,而高通量二代测序结果显示这 3 个 miRNAs 表达在 2 组间差异有统计学意义,可能的原因是测序样本量太小,但测序成本高,样本质量要求更为严格,大样本测序研究难以开展。本研究在测序基础上,通过 qRT-PCR 技术进行目标 miRNAs 大样本相对定量测定,结果可靠,成本相对较低。

MiRNA-148a 在肿瘤中的研究有很多[21-22],DNMT1 是 miRNA-148a 的靶基因,miRNA-148a 与 DNMT1 基因 3'UTR 区结合,负调控 DNMT1 基因的表达,导致 DNA 甲基转移酶 1(recombinant DNA methyltransferase 1,Dnmt1)下降。研究发现[23-24],DNMT1 表达下调,DNA 甲基化因子表达下调,APP、BACE1 基因表达上调。因此,我们推测 miRNA-148a 表达上调,可能是通过负调控靶基因 DNMT1 的表达,使得 APP、BACE1 增加,Aβ 沉积而导致 AD 发生。表达紊乱的 miRNAs 与 AD 的发病有关,具体机制需要国内外学者进一步研究证实。干预调节紊乱的 miRNA-148a 可能成为 AD 的潜在治疗方法,可通过使用 miRNAs 抑制剂等调节 miRNA-148a 的表达,抑制 Aβ 的生成,进而改善 AD 相关的病理过程,以此来开发治疗 AD 的药物,但仍需要更多的研究来验证其生物学意义和临床应用前景。大规模的临床研究、纵向研究和多中心研究是进一步推进 miRNA-148a 在 AD 诊断和治疗中应用的关键。同时,开发创新的技术方法和标准化的实验操作也是未来研究的重要方向,以提高检测灵敏度、特异性和结果的可靠性。

参考文献:

[1] BENNETT D A, YU L, YANG J Y, *et al*. Epigenomics of Alzheimer's disease[J]. Transl Res, 2015, 165(1): 200-220. DOI: 10.1016/j.trsl.2014.05.006.

[2] REN R J, QI J L, LIN S H, *et al*. The China Alzheimer Report 2022[J]. General Psychiatry, 2022, 35(1): e100751. DOI:10.1136/gpsych-2022-100751.

[3] MCKHANN G M, KNOPMAN D S, CHERTKOW H, *et al*. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2011, 7(3): 263-269. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.

[4] FENG Y H, ZHONG M Z, ZENG S, *et al*. Exosome-derived miRNAs as predictive biomarkers for diffuse large B-cell lymphoma chemotherapy resistance[J]. Epigenomics, 2019, 11(1): 35-51. DOI: 10.2217/epi-2018-0123.

[5] ALBERT M S, DEKOSKY S T, DICKSON D, *et al*. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2011, 7(3): 270-279. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.008.

[6] PAN B T, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: Selective externalization of the receptor[J]. Cell, 1983, 33(3):967-978. DOI: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.

[7] LIU Z, WANG C F, WANG X, *et al*. Therapeutic effects of transplantation of As-MiR-937-expressing mesenchymal stem cells in murine model of Alzheimer's disease[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(1): 321-330. DOI: 10.1159/000430356.

[8] YANG T T, LIU C G, GAO S C, *et al*. The serum exosome derived microRNA-135a, -193b, and-384 were potential Alzheimer's disease biomarkers[J]. Biomed Environ Sci, 2018, 31(2): 87-96. DOI: 10.3967/bes2018.011.

[9] LUGLI G, COHEN A M, BENNETT D A, *et al*. Plasma

exosomal miRNAs in persons with and without Alzheimer disease: altered expression and prospects for biomarkers[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139233. DOI: 10.1371/journal.pone.0139233.

[10] HAMPEL H, TEIPEL S J, FUCHSBERGER T, *et al*. Value of CSF beta-amyloid1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment[J]. Mol Psychiatry, 2004, 9(7): 705-710. DOI: 10.1038/sj.mp.4001473.

[11] FANG L J, JIAO B, LIU X X, *et al*. Specific serum autoantibodies predict the development and progression of Alzheimer's disease with high accuracy[J]. Brain Behav Immun, 2024, 115: 543-554. DOI: 10.1016/j.bbi.2023.11.018.

[12] LIN J Y, XU T Y, YANG X, *et al*. A detection model of cognitive impairment *via* the integrated gait and eye movement analysis from a large Chinese community cohort[J]. Alzheimers Dement, 2023. DOI: 10.1002/alz.13517.

[13] JIAO B, ZHANG S Z, BEI Y Z, *et al*. A detection model for cognitive dysfunction based on volatile organic compounds from a large Chinese community cohort[J]. Alzheimers Dement, 2023, 19(11): 4852-4862. DOI: 10.1002/alz.13053.

[14] WANG Z W, SHEN L, WANG Y, *et al*. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression in the blood of patients with Alzheimer's disease[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2): 1053-1062. DOI: 10.3892/mmr.2020.11162.

[15] XU A, KOUZNETSOVA V L, TSIGELNY I F. Alzheimer's disease diagnostics using miRNA biomarkers and machine learning[J]. J Alzheimers Dis, 2022, 86(2): 841-859. DOI: 10.3233/JAD-215502.

[16] MCKEEVER P M, SCHNEIDER R, TAGHDIRI F, *et al*. MicroRNA expression levels are altered in the cerebrospinal fluid of patients with young-onset Alzheimer's disease[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(12): 8826-8841. DOI: 10.1007/s12035-018-1032-x.

[17] DRAGOMIR M P, KNUTSEN E, CALIN G A. SnapShot: unconventional miRNA functions[J]. Cell, 2018, 174(4): 1038-1038.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.040.

[18] JACK C R Jr, BENNETT D A, BLENNOW K, *et al*. NIA-AA Research Framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2018, 14(4): 535-562. DOI: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.

[19] LIU C G, SONG J, ZHANG Y Q, *et al*. MicroRNA-193b is a regulator of amyloid precursor protein in the blood and cerebrospinal fluid derived exosomal microRNA-193b is a biomarker of Alzheimer's disease[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5): 2395-2400. DOI: 10.3892/mmr.2014.2484.

[20] HE H N, LIU A, ZHANG W, *et al*. Novel plasma miRNAs as biomarkers and therapeutic targets of Alzheimer's disease at the prodromal stage[J]. J Alzheimers Dis, 2021, 83(2): 779-790. DOI: 10.3233/JAD-210307.

[21] XU Y R, CHAO L, WANG J Y, *et al*. miRNA-148a regulates the expression of the estrogen receptor through DNMT1-mediated DNA methylation in breast cancer cells[J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 4736-4740. DOI: 10.3892/ol.2017.6803.

[22] REIF S, ELBAUM SHIFF Y, GOLAN-GERSTL R. Milk-derived exosomes (MDEs) have a different biological effect on normal fetal colon epithelial cells compared to colon tumor cells in a miRNA-dependent manner[J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 325. DOI: 10.1186/s12967-019-2072-3.

[23] BIHAQI S W, ZAWIA N H. Alzheimer's disease biomarkers and epigenetic intermediates following exposure to Pb *in vitro*[J]. Curr Alzheimer Res, 2012, 9(5): 555-562. DOI: 10.2174/156720512800617964.

[24] PEREZGROVAS-SALTIJERAL A, RAJKUMAR A P, KNIGHT H M. Differential expression of m^5C RNA methyltransferase genes *NSUN*6 and NSUN7 in Alzheimer's disease and traumatic brain injury[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(4): 2223-2235. DOI: 10.1007/s12035-022-03195-6.

(收稿:2023-11-18;修回:2023-12-12)

(编辑 吴培红)