



上海交通大学医学院
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

SHANGHAI JIAO TONG
UNIVERSITY
SCHOOL OF MEDICINE

学者介绍



王 涛 博士

WANG Tao M.D., Ph.D

主任医师、硕士生导师



Chief Physician, Master's Supervisor

ORCID ID: 0000-0003-2153-7328



王 涛 (1979—), 上海交通大学医学院附属精神卫生中心老年精神科副主任、学科带头人, 上海交通大学阿尔茨海默病诊治中心秘书。2012 年获上海交通大学医学院精神病与精神卫生博士学位。2013 年于美国亚利桑那州凤凰城班纳阿尔茨海默病研究所任访问学者。2015—2016 年于美国北卡罗来纳大学任访问学者。现任中国老年医学学会精神医学与心理健康分会青年委员会副主任委员、上海市医学会行为医学专科分会青年委员会副主任委员、上海市医学会精神医学专科分会委员、中国微循环学会神经变性病专业委员会青年委员会常务委员。

长期从事老年神经认知障碍和情感障碍等发病机制及诊断治疗研究。主持国家科技重大专项及国家自然科学基金等课题 4 项, 发表 SCI 收录论著 20 余篇。入选 2017 年上海市浦江人才计划、上海市卫生和计划生育委员会优秀学科带头人人才培养计划(“新百人计划”)、上海市教育委员会高峰高原学科建设计划, 2016 年上海交通大学 SMC-晨星青年学者奖励计划。曾获上海市卫生系统银蛇奖提名奖(2016 年)、高等学校科学研究优秀成果奖(科学技术)科技进步奖一等奖(2015 年)、上海市科技进步奖一等奖(2017 年)和中华医学奖二等奖(2019 年)。

WANG Tao (1979—), deputy director and subject leader of Department of Geriatric Psychiatry, Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, and secretary of Alzheimer's Disease and Related Disorders Center of Shanghai Jiao Tong University. He got his M.D and Ph.D in psychiatry and mental health from Shanghai Jiao Tong University School of Medicine in 2012. He worked in Banner Alzheimer's Institute, Phoenix City, Arizona in 2013 and in the University of North Carolina from 2015 to 2016 as a visiting scholar. Now, he is vice chairman of Youth Association of Psychiatry and Mental Health Branch of Chinese Geriatrics Society and Behavioral Medicine Branch of Shanghai Medical Association, a member of Psychiatry Branch of Shanghai Medical Association, a standing committee member of Youth Association of Chinese Society of Microcirculation Neurodegenerative Diseases Committee, et al.

Dr. WANG's main research areas are the pathogenesis, diagnosis and treatment of the elderly neurocognitive impairment and mood disorders. He has presided over 4 projects of National Science and Technology Major Project and National Natural Science Foundation of China, and published more than 20 SCI-indexed papers. He was enrolled into Shanghai Pujiang Plan, New Hundred Talents Program [Outstanding Academic Leader] from Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning and Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support in 2017, and Shanghai Jiao Tong University SMC-Morning Star Young Scholars in 2016. In addition, he was awarded by the nomination award of Shanghai Foundation for Eminent Youth Award of Health Care System (2016), the first prize of Scientific Research Outstanding Achievement Award in Institution of Higher Learning (2015), the first prize of Shanghai Science and Technology Advancement Award (2017) and the second prize of Chinese Medicine Prize (2019).



论著·基础研究

阿尔茨海默病引起的轻度认知功能损害的微小 RNA 表达谱的生物信息学分析

何海宁, 张 微, 严 峰, 史琰琛, 王静华, 肖世富[#], 王 涛[#]

上海交通大学医学院附属精神卫生中心老年精神科, 上海交通大学阿尔茨海默病诊治中心, 上海 200030

[摘要] **目的**·分析阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 所致轻度认知功能损害 (mild cognitive impairment, MCI) 患者的血浆微小 RNA (microRNA, miRNA) 表达谱, 并探讨 AD 所致 MCI 在遗传调控水平上的发病机制。**方法**·纳入 5 例 AD 所致 MCI 患者和 5 例对照受试者, 应用 miRNA 芯片测序技术分析血浆 miRNA 表达谱。采用 TargetScan 7.2 数据库分析显著上调 miRNA 的靶基因。采用 Cytoscape 软件分析显著上调 miRNA 的 miRNA-基因相互作用网络, 筛选关键 miRNA。运用 R 语言对关键 miRNA 的靶基因进行基因本体数据库 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。**结果**·AD 所致 MCI 患者的血浆中存在 13 个显著上调的 miRNA, 其中有 5 个是核心调控网络中的关键 miRNA, 其靶基因主要参与突触可塑性调节、Wnt 信号通路、突触间囊泡转运和突触间囊泡定位等生物学过程, 并调控 Ras 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路和糖酵解/糖异生等通路。**结论**·AD 所致 MCI 患者血浆中 5 个上调的 miRNA 可能作为关键调控因素参与 AD 相关的病理进程, 或可成为诊断 AD 所致 MCI 的潜在生物学标志物。

[关键词] 阿尔茨海默病; 轻度认知功能损害; 微小 RNA; 生物信息学

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.09.003 **[中图分类号]** R749.1^{*}6 **[文献标志码]** A

Bioinformatics analysis of miRNAs in mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease

HE Hai-ning, ZHANG Wei, YAN Feng, SHI Yan-chen, WANG Jing-hua, XIAO Shi-fu[#], WANG Tao[#]

Alzheimer's Disease and Related Disorders Center, Department of Geriatric Psychiatry, Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China

[Abstract] **Objective**·To analyze the expression profile of plasma microRNA (miRNA) in patients with mild cognitive impairment (MCI) due to Alzheimer's disease (AD) by bioinformatics method, and explore its pathogenesis at the level of genetic regulation. **Methods**·Five MCI patients due to AD and five control participants were recruited. The plasma miRNA expression profiles were analyzed by miRNA microarray sequencing. Target genes of significantly up-regulated miRNAs were detected by TargetScan 7.2 database. The miRNA-gene interaction network of significantly up-regulated miRNAs was established by Cytoscape software, and the key miRNAs of the network were analyzed. The target genes of key miRNAs were analyzed by Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) pathway analysis using R packages. **Results**·There are 13 up-regulated miRNAs in the plasma of MCI patients due to AD, and 5 of them were key miRNAs in miRNA-gene interaction network. Target genes of these miRNAs were mainly involved in biological process such as synaptic plasticity regulation, Wnt signaling pathway, synaptic vesicle transport and synaptic vesicle localization, as well as Ras signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and glycolysis/gluconeogenesis pathway. **Conclusion**·Five up-regulated miRNAs in plasma of MCI due to AD may be the main regulators involved in the pathological mechanism of AD, which can be used as potential biomarkers for diagnosis of MCI due to AD.

[Key words] Alzheimer's disease (AD); mild cognitive impairment (MCI); microRNA (miRNA); bioinformatics

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的老年疾病, 随着我国老龄化进程的加速, 由该病带来的医疗护理和经济负担问题将日益严峻。AD 的主要病

理特征为脑内 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积和神经纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT)^[1]。然而近 10 年来, 针对上述病理机制开发的药物Ⅲ期临床试验

[基金项目] 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20172029); 国家自然科学基金 (81571298); 上海市浦江人才计划 (17PJD038); 上海市卫生和计划生育委员会优秀学科带头人人才培养计划 (“新百人计划”) (2017BR054); 上海市精神卫生中心临床研究中心重点项目 (CRC2019ZD03, CRC2017ZD02)。

[作者简介] 何海宁 (1995—), 女, 硕士生; 电子信箱: haininghe0425@163.com。

[通信作者] 王 涛, 电子信箱: wtshhwy@163.com。肖世富, 电子信箱: xiaoshifu@msn.com。[#]为共同通信作者。

[Funding Information] Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support (20172029); National Nature Science Foundation of China (81571298); Shanghai Pujiang Talent Plan (17PJD038); New Hundred Talents Program (Outstanding Academic Leader) from Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2017BR054); Major Project of Clinical Research Center, Shanghai Mental Health Center (CRC2019ZD03, CRC2017ZD02)。

[Corresponding Author] WANG Tao, E-mail: wtshhwy@163.com. XIAO Shi-fu, E-mail: xiaoshifu@msn.com. [#]Co-corresponding authors.



均纷纷宣告失败,包括 A β 单克隆抗体^[2-3]、tau 蛋白拮抗剂^[4]、 β / γ -分泌酶抑制剂^[5-6]等,这提示我们需要进一步研究 AD 的病理机制以制定有效的干预策略。研究^[7-9]显示,AD 的认知衰退过程是一个疾病连续谱,AD 所致轻度认知功能损害(mild cognitive impairment, MCI)期(MCI due to AD)是 AD 所致痴呆(dementia due to AD)的前驱期,也是早期干预的最佳切入点。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小分子单链非编码 RNA,可在转录后水平调控基因表达^[10]。在神经元中特异表达的 miRNA 是促进神经元生长发育、分化成熟和保持突触功能的关键因子,对维持神经稳态发挥了重要作用^[11-12]。既往研究^[13-14]表明,AD 患者体内的某些特定 miRNA 可通过调节相关基因[如淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)、淀粉样前体蛋白 β 位点裂解酶 1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1)等]参与 AD 的病理过程,这可能是 AD 的发病机制之一。目前,大部分研究都仅针对 AD 患者,鲜少有针对 AD 的前驱期——AD 所致 MCI 患者的报道。而在疾病早期开展相关 miRNA 的表达及其调控机制的研究,将有助于深入了解 AD 的早期发病机制,亦可为其早期药物的开发提供理论依据。

基于此,本研究通过对受试者的外周血血浆行 miRNA 芯片测序,分析筛选出在 AD 所致 MCI 组血浆中显著上调的 miRNA,并对 miRNA 的预测靶基因进行生物信息学分析,以探究 miRNA 在 AD 早期病理过程中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象及其资料收集

本研究的纳入对象筛选自中国纵向老龄化队列研究(China Longitudinal Aging Study, CLAS)数据库。CLAS 的临床研究注册号为 NCT03672448,该研究经上海交通大学医学院附属精神卫生中心伦理委员会批准,并获得了所有受试者和/或其法定监护人的书面知情同意。

本研究共纳入 10 例研究对象,其中 AD 所致 MCI 患者 5 例(AD 所致 MCI 组),认知功能正常老人 5 名(对照组)。AD 所致 MCI 组入组标准:①年龄 60 ~ 90 岁。②符合 2011 年美国国立衰老研究所和阿尔茨海默病协会(National Institute Aging and Alzheimer's Association, NIA-AA)修订指南中“AD 所致 MCI-中度可能”的诊

断标准^[9]。③¹⁸F-Flumetamol 正电子发射计算机断层扫描(positron emission tomography, PET)检测 A β 阳性。排除标准:①躯体疾病、酒精、药物或理化因素所致的认知功能损害。②存在重性精神疾病或严重躯体疾病。③存在严重视力、听力障碍,不能配合完成认知功能评估。对照组入组标准:①年龄 60 ~ 90 岁。②认知功能正常。排除标准:①存在重性精神疾病或严重躯体疾病。②存在严重视力、听力障碍,不能配合完成认知功能评估。

收集所有受试者的人口学基本资料,包括性别、年龄和受教育年限,并采用蒙特利尔认知评估量表(Montreal Cognitive Assessment, MoCA)对患者的认知功能进行评估。

1.2 样本收集及 RNA 提取

每位受试者空腹 12 h 后,采集其静脉血于 EDTA 抗凝管中,4 ℃、1 207 $\times g$ 离心 20 min 后,收集上层血浆。使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国)提取血浆 RNA,具体操作步骤按照说明书进行。随后,使用 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher, 美国)测定 RNA 纯度,吸光度比值 $[D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})]$ 在 1.8 ~ 2.1 之间即为纯度达标。

1.3 miRNA 芯片测序及分析

采用 miRCURY LNATM miRNA 芯片(Exiqon 公司,丹麦)探测受试者血浆样本中 miRNA 的表达情况,根据使用说明书进行操作。使用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片, GenePix Pro 6.0 读取芯片扫描图像,提取探针的信号值。相同的探针信号值取中值合并,保留所有样本中均 ≥ 30.0 的探针值,对全部芯片进行中值标准化。使用独立样本 t 检验比较 AD 所致 MCI 组和对照组的组间差异。差异倍数(fold change, FC)的对数($\log_2 \text{FC}$) ≥ 1 被定义为上调, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,同时符合这 2 个标准的 miRNA 即为显著上调 miRNA。

本研究采用的芯片含有 3 100 种探针,覆盖所有在 miRBase 19.0 数据库中注释的人、小鼠和大鼠的 miRNA,同时也包括这些物种相关的病毒 miRNA。此外,还有 25 个独有的 miRPlus 的人源 miRNA 没有被收录在 miRBase 数据库中。

1.4 miRNA 的靶基因预测

显著上调 miRNA 的靶基因采用 TargetScan 7.2 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行预测,即通过搜索

和 miRNA 种子区域相匹配的保守 8mer 和 7mer 位点来预测其靶基因^[15], 并根据 cumulative weighted context++ scores 预测靶基因可信度, 该分数值越低提示预测可信度更高。

1.5 miRNA- 基因相互作用网络构建和关键 miRNA 筛选

miRNA- 基因相互作用网络可使多个 miRNA 与靶基因的相互作用可视化, 寻找调控网络中的关键 miRNA 及关键基因。采用 Cytoscape 软件构建 miRNA- 基因相互作用网络, 分析 miRNA 与靶基因之间的相互作用。靶基因的筛选阈值为 cumulative weighted context++ score<-0.6, 删去预测可信度低的靶基因, 使最终的网络能更直接地突出关键节点。采用 CytoNCA 计算网络中各节点的连接 (degree, DC) 值, 删去 DC 值 <2 的基因节点, 得到核心网络; 以 cumulative weighted context++ scores 为加权值, 计算 DC 值, 筛选核心网络中的关键 miRNA。

1.6 关键 miRNA 靶基因的功能分析

基因本体数据库 (Gene Ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome, KEGG) 通路分析是描述基因生物学功能的常用方法^[16]。使用 R 语言分析包对核心网络中关键 miRNA 的靶基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 采用 Benjamini-Hochberg 方法对多次比较的 *P* 值进行校正, 以 *P*<0.01 筛选富集分析条目和通路信息。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对研究数据进行统计分析。符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检验进行分析; 定性资料以频数和百分比表示, 采用 χ^2 检验分析。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者人口学资料及临床资料比较

结果 (表 1) 显示, 2 组受试者在年龄、性别、受教

育年限及 MoCA 评分间差异均无统计学意义。

表 1 2 组受试者人口学资料和临床资料比较
Tab 1 Comparison of demographic and clinical data between the two group

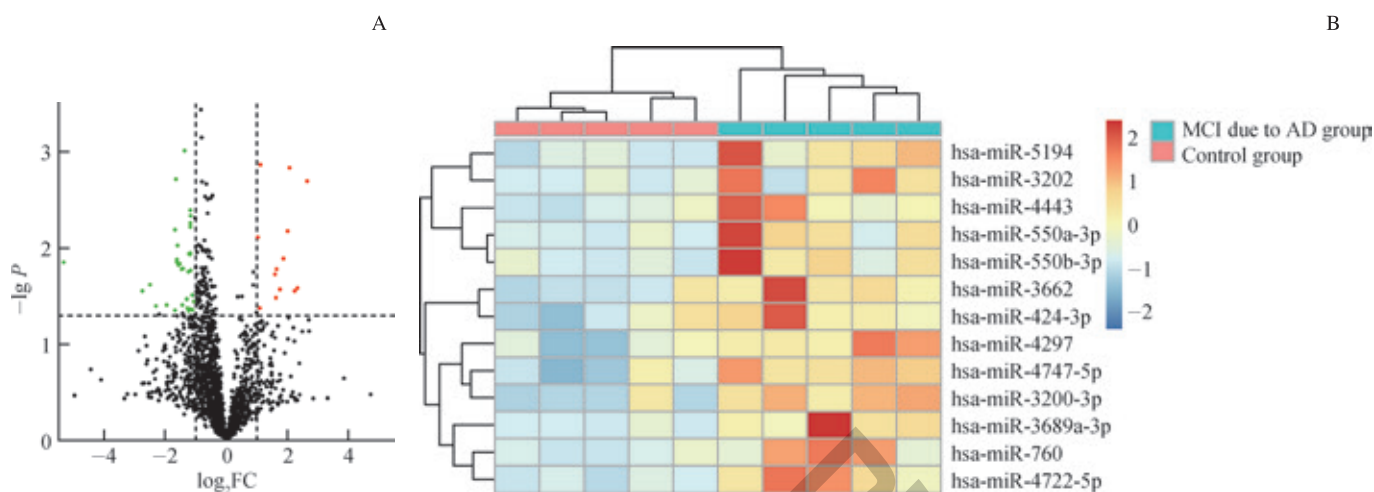
Item	MCI due to AD group (n=5)	Control group (n=5)	P value
Age/year	68.00 ± 2.83	70.00 ± 2.12	0.24
Gender (female) / n (%)	2 (40.0)	2 (40.0)	1.00
Educational duration/year	11.00 ± 3.08	11.60 ± 2.88	0.76
MoCA score/score	24.40 ± 2.19	26.40 ± 0.55	0.07

2.2 血浆 miRNA 的表达情况

根据 log₂FC 和 *P* 值筛选显著上调的 miRNA, 结果 (表 2) 显示, 与对照组相比, AD 所致 MCI 组的外周血血浆中存在 13 个显著上调的 miRNA, 且均为人源性 (hsa-miR)。显著上调 miRNA 的表达情况如图 1。

表 2 AD 所致 MCI 组患者的外周血血浆中显著上调的 miRNA
Tab 2 Significantly up-regulated miRNAs in peripheral blood plasma of MCI due to AD group

miRNA	FC	P value
hsa-miR-4722-5p	6.256	0.002
hsa-miR-550a-3p	5.030	0.026
hsa-miR-550b-3p	4.709	0.028
hsa-miR-3200-3p	4.188	0.001
hsa-miR-5194	4.000	0.007
hsa-miR-3689a-3p	3.652	0.013
hsa-miR-4443	3.375	0.027
hsa-miR-3662	3.115	0.016
hsa-miR-3202	3.067	0.033
hsa-miR-760	3.013	0.019
hsa-miR-4747-5p	2.157	0.001
hsa-miR-424-3p	2.129	0.042
hsa-miR-4297	2.040	0.008



Note: A. Volcano plot of plasma miRNAs. Red—significantly up-regulated miRNAs; Green—significantly down-regulated miRNAs. B. Heatmap of significantly up-regulated plasma miRNAs.

图 1 AD 所致 MCI 组患者的外周血血浆 miRNA 的表达情况

Fig 1 Expression of miRNAs in peripheral blood plasma of MCI due to AD group

2.3 miRNA- 基因相互作用网络及关键 miRNA 筛选

miRNA- 基因相互作用网络如图 2A, 其中 hsa-miR-550a-3p、hsa-miR-424-3p 独立于调控网络, 与其他 miRNA 无相互作用。移除 DC 值 <2 的基因节点和 2 个独立的 miRNA 节点后得到核心网络, 即包括 11 个 miRNA 和 65 个基因节点 (图 2B)。在核心网络中计算以 cumulative weighted context++ scores 加权的 DC 值, 排在前 5 位的 miRNA 分别为 hsa-miR-3202、hsa-miR-4443、hsa-miR-4747-5p、hsa-miR-4722-5p 和 hsa-miR-5194。该 5 个 miRNA 被确定为调控网络中的关键 miRNA。DC 值 >2 的基因节点有 CCHC 型锌指核酸结合蛋白 (CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein, *CNBP*)、泛素相关修饰物 1 (ubiquitin related modifier 1, *URM1*)、序列相似的 83 家族成员 F (family with sequence similarity 83 member F, *FAM83F*)、跨膜蛋白 14 (tetraspanin 14, *TSPAN14*)、视黄素 (retbindin, *RTBDN*)、包含 S1 的 pleckstrin 同源结构域 (pleckstrin homology domain containing S1, *PLEKHS1*) 和 argonaute RISC 催化组分 2 (argonaute RISC catalytic component 2, *AGO2*), 这 7 个关键基因被 2 个及以上 miRNA 同时调控。

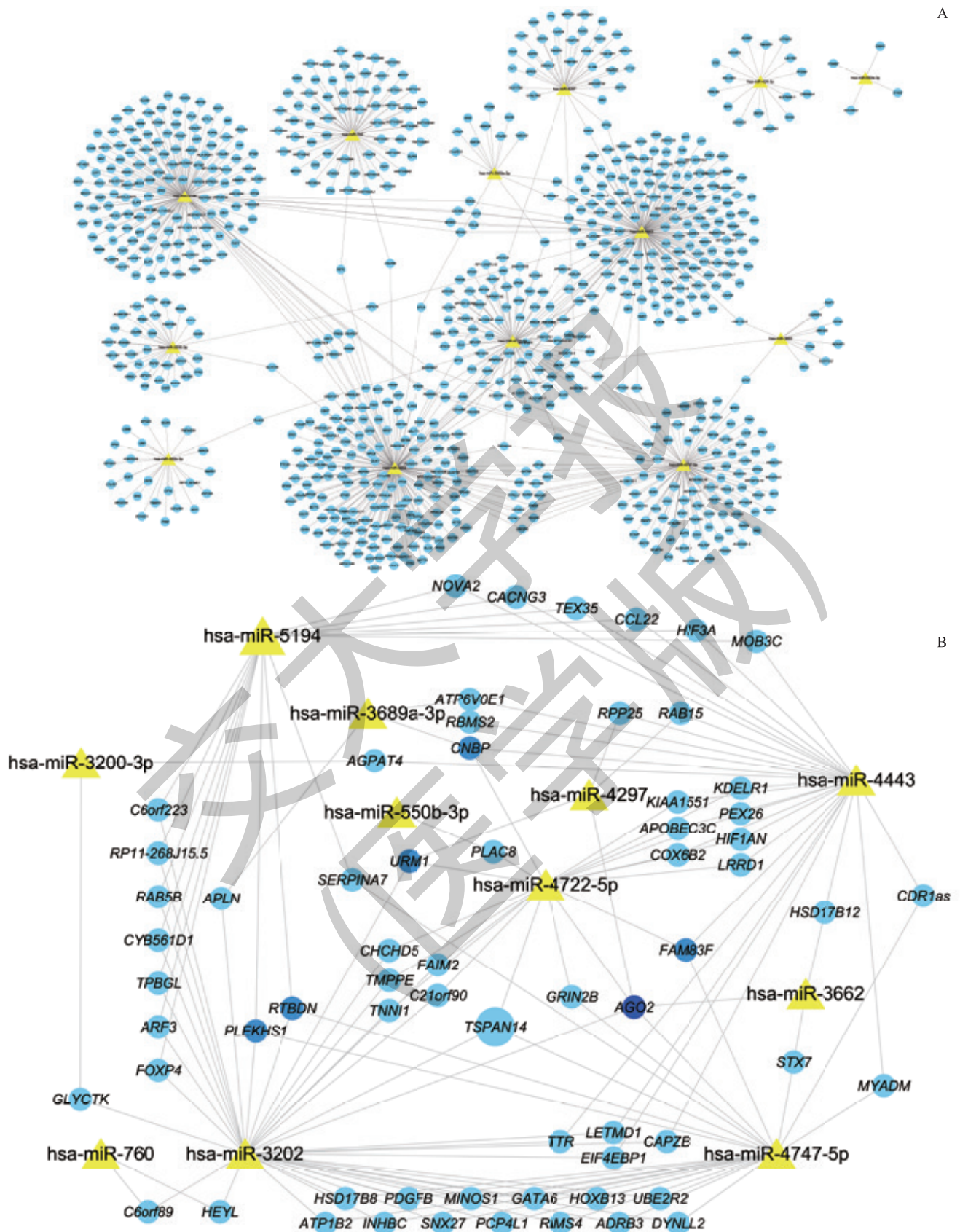
2.4 关键 miRNA 的靶基因 GO 富集分析

GO 富集分析结果 (图 3) 显示, hsa-miR-3202 的靶基因主要涉及突触可塑性的调节、Wnt 信号通路、甲

基化依赖的基因沉默等生物学过程, hsa-miR-4722-5p 的靶基因主要涉及高尔基体小囊泡的转运过程、多巴胺转运、抗原的加工提呈等生物学过程, hsa-miR-4747-3p 的靶基因主要涉及神经递质运输、突触间囊泡转运、突触间囊泡定位等生物学过程, hsa-miR-5194 的靶基因主要涉及 miRNA 前体 (pre-miRNA) 的翻译、谷氨酸受体信号通路、肌动蛋白纤维聚合、囊泡运输等生物学过程, hsa-miR-4443 的靶基因主要涉及 I- κ B 激酶 /NF- κ B 通路和调节淋巴细胞、单核细胞增殖等生物学过程。

2.5 关键 miRNA 的靶基因 KEGG 通路分析

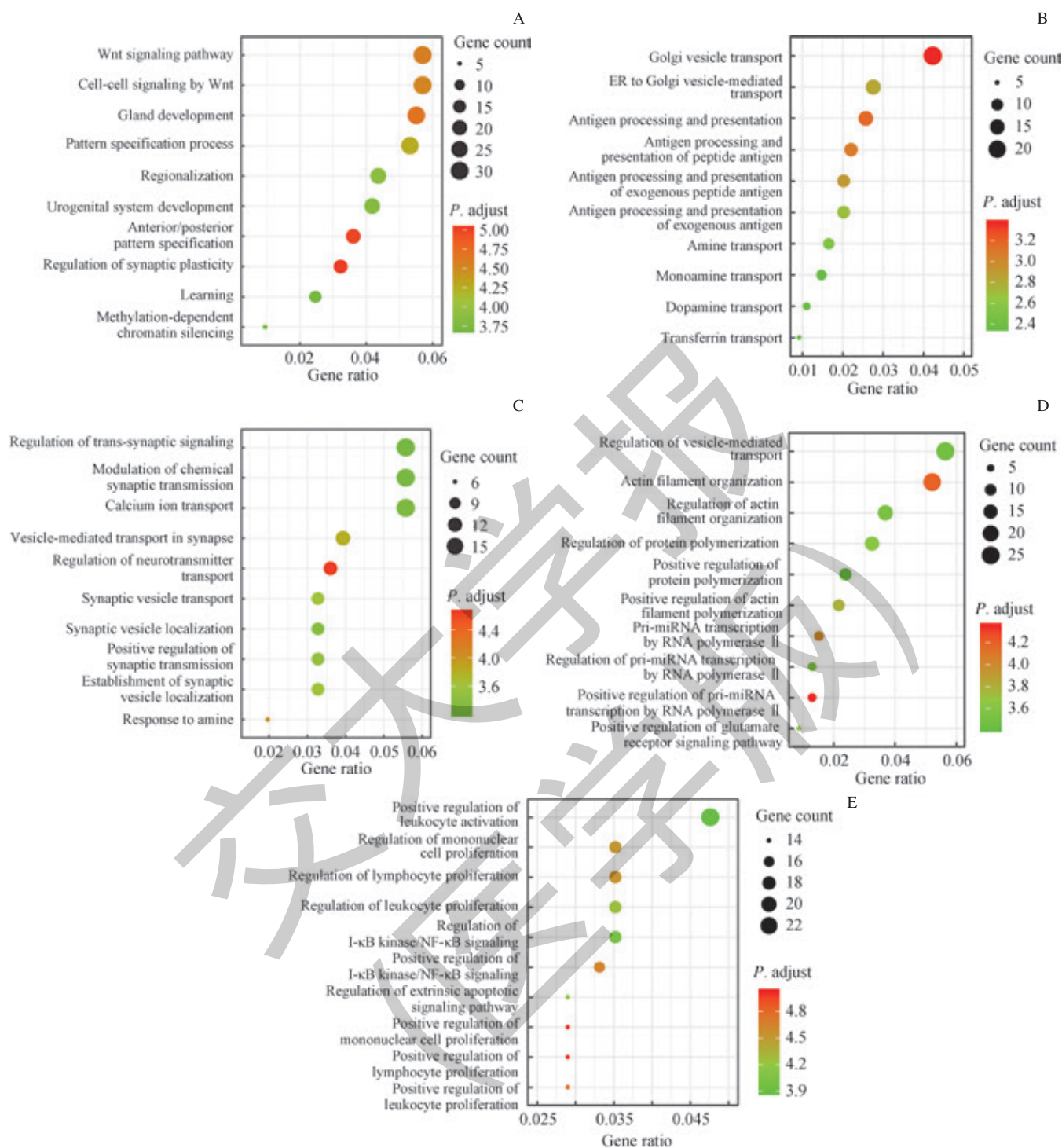
KEGG 通路分析结果 (图 4) 显示: hsa-miR-3202 的靶基因主要参与 Ras 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路和糖酵解 / 糖异生等通路, hsa-miR-4722-5p 的靶基因主要参与 Ras 信号通路、细胞因子受体信号通路和胰岛素信号通路等, hsa-miR-4747-3p 的靶基因主要参与 MAPK 信号通路、糖酵解 / 糖异生、嘌呤代谢等通路, hsa-miR-5194 的靶基因主要参与低氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、趋化因子信号通路和细胞内吞作用等通路, hsa-miR-4443 的靶基因主要参与 Ras 信号通路、氧化磷酸化、磷酸戊糖途径、果糖 / 甘露糖代谢等通路。



Note: A. miRNA-gene interaction network of 13 significantly up-regulated miRNAs. B. Core network of miRNA-gene interaction. Yellow—miRNA; Blue—target gene; the darker the color, the more miRNAs interacting with this gene.

图 2 miRNA- 基因相互作用网络

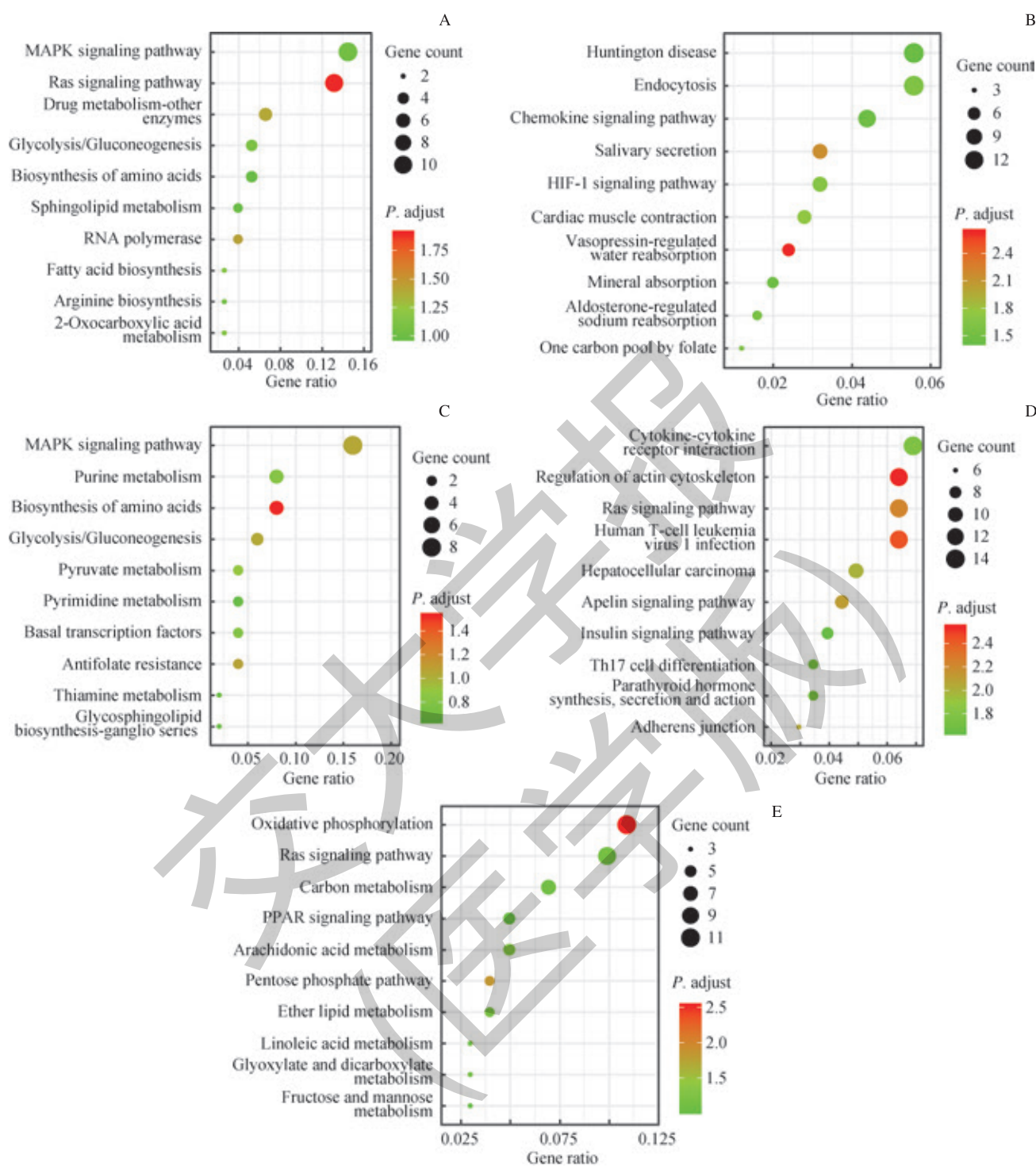
Fig 2 miRNA-target gene interaction network



Note: A. hsa-miR-3202. B. hsa-miR-4722-5p. C. hsa-miR-4747-3p. D. hsa-miR-5194. E. hsa-miR-4443. ER—endoplasmic reticulum. The first ten enrichment clusters were selected according to the adjusted *P* value.

图3 关键miRNA的靶基因GO富集分析

Figure 3 GO enrichment analyses of target genes of key miRNAs



Note: A. hsa-miR-3202. B. hsa-miR-4722-5p. C. hsa-miR-4747-3p. D. hsa-miR-5194. E. hsa-miR-4443. PPAR—peroxisome proliferators-activated receptor. The first ten pathways were selected according to the adjusted *P* value.

图4 关键 miRNA 的靶基因 KEGG 通路分析

Fig 4 KEGG pathway analyses of target genes of key miRNAs

3 讨论

目前, AD 的生物标志物主要分为脑脊液相关蛋白标志物 (A β 42、A β 40、总 tau 蛋白和磷酸化 tau 蛋白) 和神经影像学检测到的相关标志物 (A β PET、结构磁共振成像显示的脑萎缩)^[17-18]。其中, 腰椎穿刺获取脑脊液样本为有创操作, 神经影像学检查费用较为昂贵, 无法大规模应用于临床。然而目前, 血液样本的获取相对简便, 且为无创或微创操作, 较适用于 AD 的早期筛查和诊断。本研究针对 AD 所致 MCI 患者的血浆 miRNA 进行芯片测序及生物信息学分析, 发现有 13 个显著上调的 miRNA, 其中 5 个关键 miRNA 参与了 AD 的早期病理过程, 或可作为早期诊断 AD 所致 MCI 的潜在生物标志物。同时, 本研究纳入的 AD 所致 MCI 患者均经 ¹⁸F-Fluementamol PET 金标准确诊, 提升了临床诊断的可靠性^[9]。但上述 miRNA 的血浆表达水平尚需进一步验证, 将其作为生物标志物用于诊断 AD 所致 MCI 的诊断效力仍需大样本临床研究加以证实。

本研究针对关键 miRNA 的靶基因进行 GO 富集分析发现, 其主要参与突触可塑性的调节、Wnt 信号通路、突触间囊泡转运、突触间囊泡定位等生物学过程。突触损伤是 AD 疾病过程的早期事件, 即在早期 AD 患者和 MCI 患者的大脑新皮层和海马中均存在突触连接丧失和突触数量减少的情况^[19-20]。海马是记忆形成的关键脑区, 海马中的突触损伤与认知能力下降密切相关。因此, 我们推测 hsa-miR-3202 和 hsa-miR-4747-3p 可能通过抑制突触可塑性的调节、突触间囊泡转运和囊泡定位等生物学过程造成突触损伤, 进而引起 AD 的发生。Wnt 信号通路主要参与细胞增殖、细胞凋亡、轴突导向、突触形成和神经细胞再生等生物学过程^[21-22]。近年来研究^[23-24]发现, 经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路广泛参与神经元的增殖、分化、凋亡和突触可塑性调节, 在神经退行性疾病中发挥了重要作用。Tapia-Rojas 等^[25]研究发现, 抑制 Wnt 信号通路可以诱导海马中 Wnt 信号通路成分的改变和功能的丧失, 从而引发 tau 蛋白磷酸化和 A β 1-42 水平升高, 造成 APP 转基因小鼠认知下降。因此, 本研究结果提示 hsa-miR-3202 可能通过抑制 Wnt 信号

通路, 参与 AD 早期的病理过程。另外, 我们注意到 hsa-miR-5194 参与调节 miRNA 前体的翻译, 提示 hsa-miR-5194 可能参与调控一些 AD 相关 miRNA 的表达。

KEGG 通路分析发现, 关键 miRNA 的靶基因主要参与 Ras 信号通路、MAPK 信号通路、糖酵解/糖异生、磷酸戊糖途径、果糖/甘露糖代谢等通路。研究^[26-34]显示, Ras 信号通路和 MAPK 信号通路在 AD 病理过程中起着重要作用。MAPK 是一组能被不同细胞外刺激激活的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 主要由细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)、氨基末端激酶 (Jun N-terminal kinase, JNK) 和 p38-MAPK 共 3 条信号转导途径组成。脑内 MAPK/ERK 信号通路参与调节神经元的增殖和凋亡, 且 ERK 信号传导可激活糖原合成激酶-3 (glycogen synthesis kinase-3, GSK-3), 造成 APP 和 tau 蛋白磷酸化, 与 AD 的病理机制密切相关^[26]。ERK 的激活也可造成线粒体形态和功能异常, 增强氧化应激反应^[27]。而对 AD 患者脑组织进行尸检后发现, p38-MAPK 在与学习和记忆相关的脑区中高度表达^[28], 且其激活的发生是在疾病的早期^[29-30]。p38-MAPK 的激活可导致细胞内钙、活性氧产生, 线粒体应激增加^[31]。且体外研究^[32]表明, p38-MAPK 可促进神经细胞凋亡。而 Ras 蛋白可作为信号通路的分子开关, 调控下游 MAPK 信号通路; Ras/MAPK 级联通路可参与海马区 CA1、杏仁核、齿状回以及其他涉及学习和记忆的区域中突触可塑性的调节^[33]。同时, Ras 信号通路也可直接参与神经元生长发育过程, 促进皮层神经元之间的突触形成^[34]。因此, 针对本研究预测的上调 miRNA 在体内的调控网络和潜在的调控机制, 我们推测该 miRNA 可能通过调节这些相关的通路参与 AD 的发病过程。

总之, 本研究首次提出了 AD 所致 MCI 患者的血浆中存在 hsa-miR-3202 等 13 种上调 miRNA, 其或可作为潜在的生物标志物用于对 AD 所致 MCI 的诊断研究; 同时, 本研究还发现, 在 miRNA- 基因的调控网络中存在 5 个关键 miRNA, 其上调可能是 AD 发生的重要因素。通过调控相关通路影响 AD 的发生与发展, 对 AD 治疗的药物靶点研究和发病机制研究具有重要意义。

参·考·文·献

- [1] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 377(9770): 1019-1031.
- [2] Doody RS, Thomas RG, Farlow M, et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(4): 311-321.
- [3] Salloway S, Sperling R, Fox NC, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(4): 322-333.
- [4] Gauthier S, Feldman H, Schneider LS, et al. Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2016, 388(10062): 2873-2884.
- [5] Egan MF, Kost J, Voss T, et al. Randomized trial of verubecestat for prodromal Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1408-1420.
- [6] Henley D, Raghavan N, Sperling R, et al. Preliminary results of a trial of atabecestat in preclinical Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1483-1485.
- [7] Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. *Alzheimer's Dement*, 2011, 7(3): 280-292.
- [8] McKhann GM, Knopman DS, 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]. *Alzheimer's Dement*, 2011, 7(3): 263-269.
- [9] Albert MS, DeKosky ST, 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]. *Alzheimer's Dement*, 2011, 7(3): 270-279.
- [10] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [11] Schratt G. microRNAs at the synapse[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12): 842-849.
- [12] Fiore R, Siegel G, Schratt G. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(8): 471-478.
- [13] Tan L, Yu JT, Hu N, et al. Non-coding RNAs in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(1): 382-393.
- [14] Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. Role of miRNAs in Alzheimer's disease and possible fields of application[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): E3979.
- [15] Agarwal V, Bell GW, Nam JW, et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J]. *Elife*, 2015, 4: E05005.
- [16] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-29.
- [17] Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(7): 673-684.
- [18] Rabinovici GD, Gatsonis C, Apgar C, et al. Association of amyloid positron emission tomography with subsequent change in clinical management among medicare beneficiaries with mild cognitive impairment or dementia[J]. *JAMA*, 2019, 321(13): 1286-1294.
- [19] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, et al. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment[J]. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(10): 1372-1384.
- [20] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, et al. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment[J]. *Neurology*, 2007, 68(18): 1501-1508.
- [21] Salinas PC. Wnt signaling in the vertebrate central nervous system: from axon guidance to synaptic function[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(2): A008003.
- [22] Harrison-Uy SJ, Pleasure SJ. Wnt signaling and forebrain development[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(7): A008094.
- [23] Fortress AM, Frick KM. Hippocampal Wnt signaling: memory regulation and hormone interactions[J]. *Neuroscientist*, 2016, 22(3): 278-294.
- [24] Tiwari SK, Agarwal S, Seth B, et al. Curcumin-loaded nanoparticles potentially induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model *via* canonical Wnt/ β -catenin pathway[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(1): 76-103.
- [25] Tapia-Rojas C, Inestrosa NC. Wnt signaling loss accelerates the appearance of neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease in J20-APP transgenic and wild-type mice[J]. *J Neurochem*, 2018, 144(4): 443-465.
- [26] Kirouac L, Rajic AJ, Cribbs DH, et al. Activation of Ras-ERK signaling and GSK-3 by amyloid precursor protein and amyloid β facilitates neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *eNeuro*, 2017, 4(2). DOI: 10.1523/ENEURO.0149-16.2017.
- [27] Gan XQ, Huang SB, Wu L, et al. Inhibition of ERK-DLP1 signaling and mitochondrial division alleviates mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease cybrid cell[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(2): 220-231.
- [28] Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, et al. P38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases[J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2011, 11(1): 45-59.
- [29] Sun AY, Liu M, Nguyen XV, et al. P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain[J]. *Exp Neurol*, 2003, 183(2): 394-405.
- [30] Pei JJ, Braak E, Braak H, et al. Localization of active forms of C-Jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration[J]. *J Alzheimer's Dis*, 2001, 3(1): 41-48.
- [31] Calkins MJ, Reddy PH. Amyloid β impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(4): 507-513.
- [32] Chen B, Teng Y, Zhang XG, et al. Metformin alleviated A β -induced apoptosis *via* the suppression of JNK MAPK signaling pathway in cultured hippocampal neurons[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 1421430.
- [33] Selcher JC, Weeber EJ, Christian J, et al. A role for ERK MAP kinase in physiologic temporal integration in hippocampal area CA1[J]. *Learn Mem*, 2003, 10(1): 26-39.
- [34] Kim IJ, Drahushuk KM, Kim WY, et al. Extracellular signal-regulated kinases regulate dendritic growth in rat sympathetic neurons[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(13): 3304-3312.

[收稿日期] 2020-03-16

[本文编辑] 邢宇洋

