

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.09.001

· 基础研究 ·

慢性束缚诱导的广泛性焦虑障碍前额叶皮质中 miRNA 的表达 *

李梦佳 卢 涛 周 芹 佟常青 董佳敏 刘 燕[△] 宋月晗[△]

(北京中医药大学生命科学院 北京 100029)

摘要 目的:研究慢性束缚(Chronic restraint stress, CRS)诱导的广泛性焦虑障碍模型小鼠前额叶皮质 miRNA 表达谱的变化及其意义。**方法:**小鼠经过 7 天的 CRS, 通过旷场实验与高架十字迷宫实验检测小鼠是否能够表现出紧张和焦虑行为。采用高通量测序的方法, 定量分析对照组与模型组小鼠前额叶皮质组织中 miRNAs 的表达水平, 研究 CRS 诱导的焦虑有关的分子表达谱。通过 RT-PCR 对测序结果中差异表达的 miRNAs 进行验证。**结果:**经 CRS 诱导的广泛性焦虑障碍模型组小鼠, 模型组在活动总距离增多($P<0.05$)、平均速度($P<0.05$)增快、中央停留时间减少($P<0.05$)、开放臂进入次数百分比减少($P<0.01$)、开放臂停留时间减少($P<0.01$), 与对照组相比结果均具有统计学意义, 表明 GAD 小鼠造模成功。经高通量测序结果及生信学分析, 对照组与模型组相比较, 共 28 个上调 miRNAs, 34 个下调 miRNAs, 5388 个靶基因参与作用变化。上 / 下调的 miR-GO 分析结果中, 主要共同参与神经系统发育、突触后密度、神经元投射、蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性等过程; 上 / 下调 miR-KEGG 结果中, 参与共同通路主要包括轴突引导、神经营养因子信号通路、cAMP 信号通路、多巴胺能突触、MAPK 信号通路等过程。**结论:**前额叶皮质中 miR-7a-5p、miR-124-3p、miR-141-3p、miR-183-5p 等 miRNA 变化参与广泛性焦虑障碍的发病, 可能调控影响神经传导等功能。

关键词:广泛性焦虑症障碍; 前额叶皮质; miRNA

中图分类号:R-33; R749.72 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)09-1601-08

Discussion of the Mechanism of MiRNA about Generalized Anxiety Disorders by CRS-induced in the Prefrontal Cortex*

LI Meng-jia, LU Tao, ZHOU Qin, TONG Chang-qing, DONG Jia-min, LIU Yan[△], SONG Yue-han[△]

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: To study the changes and significance of miRNA expression profile in the prefrontal cortex of mice with generalized anxiety disorder induced by chronic restraint stress (CRS). **Methods:** After 7 days of CRS, the mice were tested by open field experiment and elevated plus maze experiment to detect whether the mice can show nervous and anxious behaviors. High-throughput sequencing was used to quantitatively analyze the expression levels of miRNAs in the prefrontal cortex of mice in the control and model groups, and to study the molecular expression profiles related to anxiety induced by CRS. The differentially expressed miRNAs in the sequencing results were verified by RT-PCR. **Results:** In mice in the CRS-induced generalized anxiety disorder model group, the total distance of activities in the model group increased ($P<0.05$), the average speed ($P<0.05$) increased, the central residence decreased ($P<0.05$), and the percentage of open arm entry times ($P<0.01$) and residence time of the open arm ($P<0.01$) are reduced. Compared with the control group, the results were statistically significant, indicating that the GAD mice were successfully modeled. Based on the results of high-throughput sequencing and bio-informatics analysis, compared with the control group, there were 28 up-regulated miRNAs and 34 down-regulated miRNAs in the model group and 5388 target genes participated in the changes. In the up/down-regulated miR-GO analysis results, they are mainly involved in the development of the nervous system, postsynaptic density, neuron projection, protein serine/threonine kinase activity and other processes; in the up/down-regulated miR-KEGG results, they participate in common pathways Mainly include axon guidance, neurotrophic factor signaling pathway, cAMP signaling pathway, dopaminergic synapse, MAPK signaling pathway and so on. **Conclusion:** The changes of miR-7a-5p, miR-124-3p, miR-141-3p, miR-183-5p and other miRNAs in the prefrontal cortex are involved in the pathogenesis of generalized anxiety disorder, and may regulate and affect nerve conduction functions.

Key words: Generalized anxiety disorder; The Prefrontal cortex; Micro RNAs

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R749.72 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)09-1601-08

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(8187150712)

作者简介:李梦佳(1993-),女,硕士研究生,研究方向:神经精神疾病病证结合研究,电话:18810628812, E-mail: jia1273814164@163.com

△ 通讯作者:刘燕,电话:13681493505, E-mail: liuy806@163.com;

宋月晗,电话:13426250071, E-mail: songyuehan1981@126.com

(收稿日期:2022-01-23 接受日期:2022-02-19)

前言

广泛性焦虑障碍(Generalized Anxiety Disorder, GAD)的发生与神经传导、内分泌及免疫系统存在着密切联系^[1],而大脑中的皮质是情绪与行为的调节中心之一^[2],焦虑和慢性压力会导致前额叶皮质的结构退化和功能受损^[3],广泛性焦虑障碍的发病需要我们逐渐重视。miRNAs 在大脑组织中的含量十分丰富^[4],主要参与神经系统的生长、发育及突触形成^[5],还与认知功能损伤及神经系统多种疾病的发生发展密切相关^[6,7]。研究显示,miR-124 调节包括 BDNF 在内的几种神经递质的表达,并且在神经元分化和大脑发育过程中被诱导并在成熟神经元中高表达,提示其在神经发生和神经元功能中具有独特而重要的作用^[8]。另有研究表明,如 miRNA-132、miRNA-134、miR-181-5p 的失调,大鼠的焦虑样行为增多^[9,10]。基于神经类疾病大前提下,将广泛性焦虑症障碍的发病机制与 miRNA 表达相关联,或许可以解释 GAD 中多级通路的失调是受到 miR 调控的影响。故本实验采用慢性束缚应激法制备焦虑模型小鼠,并观察其行为学、miRNA 分子表达谱的影响,从而探讨 GAD 模型小鼠中广泛性焦虑症障碍的发病机制,进而为新一代抗焦虑药的研发提供新的治疗思路与作用靶点的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠,体重(20 ± 2)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0006,饲养于中日友好医院临床医学研究所。饲养环境室温 22.0°C-24.0°C,光照节律 12L:12D,相对湿度 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。适应性饲养 7 日后开始正式实验。

1.1.2 主要材料与试剂 50 mL 离心管(北京鼎国昌盛),琼脂糖(Biowest Agarose, Biowest),核酸定量分析试剂盒(Qubit® RNA Assay Kit, Life Technologies),生物芯片分析系统配套试剂(RNA Nano 6000 Assay Kit, Agilent Technologies),测序试剂盒 (TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS, Illumina),组织细胞 RNA 小量提取试剂盒(HiPure Total RNA Mini Kit, Magen),反转录试剂盒(miRNA 第一链 cDNA 合成, 上海生工),qPCR 预混液 (2× SG Fast qPCR Master Mix, 生工),无水乙醇(HUIHANG, 北京鼎国昌盛)。

1.1.3 主要仪器和设备 旷场箱、高架十字迷宫(北京众实迪创科技发展有限责任公司),行为学分析软件 (EthoVision XT 15, 荷兰 Nuldus 公司),微型荧光计(Qubit® 2.0 Flurometer, Life Technologies),生物芯片分析系统 (Agilent Bioanalyzer 2100 system, Agilent Technologies),测序仪(Illumina Hiseq2500/2000, Illumina),超声破碎仪(VCX150, SONICS),超微量紫外分光光度计(Nana 3000, 杭州奥盛),八连排离心机(MINI G, 艾卡),梯度 PCR 仪(Bio-radT100, Bio-Rad),荧光定量 PCR 仪(CFX96 Touch, Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与模型制备 采用区组随机法按体重分为对照组、模型组每组 7 只。模型组采用慢性束缚应激法制备广泛

性焦虑障碍模型^[11,12],于每天早上 9:00 将小鼠束缚于 50 mL 扎孔离心管中,将离心管水平固定在桌面上,每天束缚 4 h,连续 14 天。

1.2.2 旷场实验 造模 14 天后对各组小鼠进行旷场实验测试。实验前,将小鼠放于行为学室内进行 30 分钟的适应。旷场箱为 50×50×50 cm 的正方体,摄像头安放于旷场箱正上方。旷场箱底面被均匀划分为 25 格,沿侧壁的为外周格,共 16 个,剩余为中央格,共 9 个。实验时将小鼠置于旷场箱中,进行 5 min 内小鼠运动情况的记录,随后取出小鼠,喷洒 75% 酒精到旷场箱中,然后清洗旷场箱内壁及底面,以防前只小鼠余留的尿或粪便影响下只小鼠测试结果。观测指标包括总距离、平均速度、中央格停留时间、穿格次数。

1.2.3 高架十字迷宫实验 造模 14 天后对各组小鼠进行高架十字迷宫实验测试。高架十字迷宫包括两条 66×5×13 cm 的闭合臂和 66×5 cm 的开放臂,中央为 5×5 cm 的开阔区,迷宫离地面 50 cm。测试时将小鼠头朝向开臂区放入中央的开阔区,用摄像系统记录小鼠 5 min 的行为变化,包括两臂区进入时间及进入次数,以小鼠前两爪均进入到臂内为准。每只小鼠记录结束后,用 75% 酒精擦拭迷宫装置,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百分比(开放臂进入次数 / 开放臂进入次数 + 闭合臂进入次数)和开放臂停留时间百分比(开放臂停留时间 / 开放臂停留时间 + 闭合臂停留时间)。

1.2.4 miRNA 测序及生物信息学分析 各组小鼠在行为学测试完成后第二天全部脱颈断头处死,冰盒上取出皮质组织,分别装入无菌冻存管中并立即放入液氮中,保存于 -80°C 冰箱待用。测序时首先将样本进行 Total RNA 样品检测,分析 RNA 降解程度、纯度、完整性以及是否有污染;其次进行 miRNA 测序文库构建及上机测序,文库检测合格后,按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina SE50 单端测序。

自定义 perl 和 python 脚本处理 fastq 格式的原始数据,同时计算原始数据的 Q20、Q30 和 GC 含量;将大小在 18-25 nt 的高质量的干净读数匹配到 miRBase 中相应物种碱基的 pre miRNA 中获得 miRNA 计数,在匹配过程中符合 miRNAs 能与 miRBase 中的 pre miRNA 相一致且不存在错配的标记,符合在 miRBase 中成熟的 miRNA 标记中至少有 16 nt 的重叠允许偏移则可以被计数,用以获得已鉴定的 miRNA 的表达。将 miREvo 和 mirdeep2 结合起来,再利用 miRNA 前体的发夹结构特征可以预测新的 miRNA。为了使每一个独特的 miRNA 只映射到一个注释,在基于负二项分布和生物学重复样本的 DESeq 软件算法上,对于有生物学重复的样品,使用 DESeqR 软件包(3.0.3)对两个条件 / 组进行差异表达分析,对于没有生物学重复的样品,使用 DEGseq(2010)R 包对两个样本进行差异表达分析。遵循规则:已知的 miRNA>rRNA>tRNA>snRNA>sno RNA>repeat>gene>NAT-siRNA>gene>novel miRNA>ta-siRNA。

1.2.5 miRNAs 的靶基因预测 将 P-value<0.05 的差异 miRNA 作为候选进行靶基因预测。使用 miWALK、TargetsScan 共同预测差异 miRNA 的靶基因,得到 miRNA 和靶基因间的对应关系。为了更准确的做靶向分析,按照以下两条标准用以鉴定潜在的 miRNA 调控的靶基因:1)应用 miWALK、TargetsScan 两

种软件共同可以预测靶基因 mRNAs; 2) miR 预测的靶基因富集数目大于 5。

1.2.6 miR 与靶基因的调控网络可视化 为了进一步确立 miR-mRNA 调控关系, 从确立的关键靶基因, 建立 miRNA 和靶基因的互作网络, 对关键靶基因进行可视化关联; 此关联由 cytoscape 3.8.1 软件构建。

1.2.7 miR-GO 与 miR-KEGG 分析网络 为了确定可能涉及的丰富功能和途径, 对各自的靶基因用 David 进行基因本体分析(Gene Ontology, GO), 用 KOBAS 进行信号通路分析(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway, KEGG Pathway), 进而找到更为关键的 miR 与靶基因。

1.2.8 实时荧光定量 PCR(qPCR)验证差异 miRNA 为了验证通过 deseq 测序分析检测到的 miRNA 表达的真实性和后续 miRNAs 预测的关键靶基因后续分析中的准确性, 用 qRT-PCR 筛选了关键 miR, 包括 mmu-miR-7a-5p、mmu-miR-183-5p、mmu-miR-182-5p、mmu-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 2× miRNA RT Solution mix 共

10 μL、miRNA RT Enzyme mix 共 2 μL、Total RNA/micro RNA 共 2 μg/100 ng、RNase-free water 定容至 20 μL; 然后进行引物的设计与合成, 最后实时荧光定量 PCR, 反应体系为 2× SG Fast qPCR Master Mix 共 10 μL、10 μM Forward Primer 共 0.4 μL、10 μM Reverse Primer 共 0.4 μL、Template DNA 共 3 μL、PCR-grade water 共 6.2 μL, 总计 20 μL; 用比较 Ct 法($2^{-\Delta \Delta Ct}$)计算每个 miRNA 的相对丰度。

1.2.9 统计学处理 所有定量数据均作为均值± 标准差呈现。两组间比较, 数据符合正态分布时, 采用两独立样本 t 检验 (Student's test); 数据不符合正态分布时, 采用非参数检验 (Mann-Whitney U test)。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 航场实验结果

由表 1 所得, 与对照组相比, 模型组在航场实验中的总距离($P < 0.01$)、平均速度($P < 0.05$)均显著增高, 中央格停留时间($P < 0.05$)减少, 穿格次数($P > 0.05$)相对减少。

表 1 对照组与模型组小鼠航场实验结果($\bar{x} \pm s$, n=7)

Table 1 Open field test results of control group and model group($\bar{x} \pm s$, n=7)

Groups	Total Distance (cm)	Average Velocity (cm/s)	Time of Central Zone (s)	Number of Central Zone (n)
Control Group	1636.00± 440.90	5.88± 1.86	88.09± 31.47	59.14± 14.93
Model Group	2208.00± 145.60**	8.01± 0.55*	48.30± 12.91*	45.43± 7.74

Note: compared with the control group, compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.2 高架十字迷宫实验结果

由表 2 所得, 模型组在开放臂进入次数百分比与对照组相比有明显减少($P < 0.01$); 开放臂停留时间百分比中, 与对照组

相比, 模型组开放臂停留时间百分比显著减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 对照组与模型组高架十字迷宫实验结果($\bar{x} \pm s$, n=7)

Table 2 Experimental results of elevated cross mazes of control group and model group($\bar{x} \pm s$, n=7)

Groups	OT(%)	OE(%)
Control Group	31.64± 7.65	2.45± 0.76
Model Group	20.57± 4.07**	0.94± 0.34**

Note: compared with the control group, compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.3 miRNA 测序及生物信息学分析

根据 miRNA 测序结果, 如图 1 所示共 34 个上调 miRNAs, 28 个下调 miRNAs, 共 5388 个靶基因; 按照预测标准下的数据库取交集, 数据如表 3、表 4 所示, 主要富集在 mmu-let-7i-5p、mmu-miR-93-5p、mmu-miR-320-3p、mmu-miR-182-5p、mmu-miR-183-5p 等。

2.4 关键 miRNAs 与靶基因的定位及调控网络可视化

miRNA 作为上游调控基因, 调控靶基因的富集程如表 5, 表 6 所示, 调控网络的核心 miRNA 中, 下调 miR 包括 mmu-miR-20a-5p、mmu-miR-93-5p、mmu-miR-320-3p 等; 上调 miR 主要包括 mmu-miR-200b-3p、mmu-miR-141-3p、mmu-miR-183-5p 等。

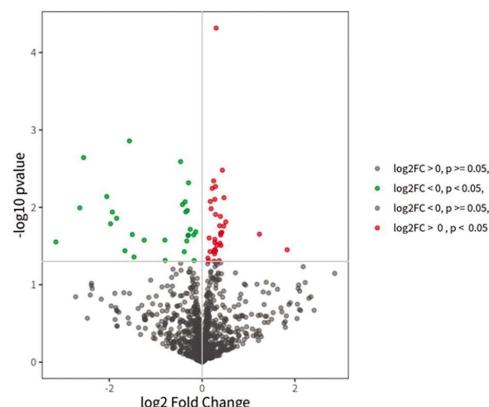


图 1 对照 vs 模型火山图

Fig.1 Volcanic map of control group vs model group

表 3 对照 vs 模型差异上调 miRNAs 筛选结果(count>5)

Table 3 Filter results of differentially up-regulated MiRNAs in control VS model (Count > 5)

miRNAs	Count	Regulate
mmu-miR-182-5p	185	↑
mmu-miR-96-5p	167	↑
mmu-miR-200c-3p	121	↑
mmu-miR-183-5p	118	↑
mmu-miR-200b-3p	98	↑
mmu-miR-141-3p	95	↑
mmu-miR-429-3p	85	↑
mmu-miR-200a-3p	82	↑
mmu-miR-323-3p	37	↑
mmu-miR-431-5p	31	↑
mmu-miR-409-5p	19	↑

表 4 对照 vs 模型差异下调 miR 筛选结果(count>5)

Table 4 Filter results of differentially down-regulated MiRNAs in control VS model (Count > 5)

miRNAs	Count	Regulate
mmu-let-7i-5p	217	↓
mmu-miR-93-5p	216	↓
mmu-miR-320-3p	211	↓
mmu-miR-125a-5p	178	↓
mmu-miR-20a-5p	172	↓
mmu-miR-23b-3p	164	↓
mmu-miR-204-5p	145	↓
mmu-miR-129-2-3p	126	↓
mmu-miR-30c-5p	99	↓
mmu-miR-132-3p	77	↓
mmu-miR-135a-5p	63	↓
mmu-miR-7a-5p	55	↓
mmu-miR-7b-5p	54	↓
mmu-miR-193a-5p	49	↓
mmu-miR-344d-3p	43	↓
mmu-miR-342-3p	38	↓
mmu-miR-495-3p	32	↓
mmu-miR-421-3p	25	↓
mmu-miR-21a-5p	23	↓
mmu-miR-146b-5p	22	↓
mmu-let-7f-1-3p	14	↓
mmu-miR-6516-5p	10	↓

2.5 miR-GO 与 miR-KEGG 分析网络

如图 2 显示, 上调 miR-GO 分析结果中, 下调靶基因参与 DNA 转录的正调控, 神经系统发育, 突触后密度, 神经元投射, 蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性等过程; 图 3 显示, 下调 miR-GO

分析结果中, 上调靶基因参与到肌动蛋白细胞骨架组织, 神经系统发育, RNA 聚合酶 II 启动子转录的正负调控, 蛋白质磷酸化, 树突棘, 突触, 神经元投射等过程。

表 5 对照 vs 模型差异上调关键 miRNAs 筛选结果(Count>4)

Table 5 Filter results of differentially up-regulated crucial MiRNAs in control VS model (Count > 4)

Down-regulated of MiRNAs	COUNT
mmu-miR-200b-3p	17
mmu-miR-200c-3p	17
mmu-miR-141-3p	13
mmu-miR-183-5p	13
mmu-miR-200a-3p	13
mmu-miR-429-3p	13
mmu-miR-182-5p	10
mmu-miR-96-5p	10
mmu-miR-124-3p	10

表 6 对照 vs 模型差异下调关键 MiRNAs 筛选结果(Count>4)

Table 6 Filter results of differentially down-regulated crucial MiR in control VS model (Count > 4)

UP-regulated of miR	COUNT
mmu-miR-20a-5p	40
mmu-miR-93-5p	39
mmu-miR-320-3p	32
mmu-let-7i-5p	28
mmu-miR-23b-3p	27
mmu-miR-204-5p	20
mmu-miR-129-2-3p	17
mmu-miR-30c-5p	14
mmu-miR-125a-5p	13
mmu-miR-7b-5p	12
mmu-miR-132-3p	10
mmu-miR-135a-5p	8
mmu-miR-344d-3p	8
mmu-miR-342-3p	7
mmu-miR-7a-5p	7
mmu-miR-21a-5p	6
mmu-miR-193a-5p	5
mmu-miR-495-3p	5
mmu-miR-421-3p	7

如图 4 所示,上调 miR-KEGG 结果中,通路分析主要包括轴突引导、Ras 信号通路、胶质瘤、FoxO 信号通路、神经营养因子信号通路、cAMP 信号通路、多巴胺能突触、MAPK 信号通路、长效增效等过程;图 5 所示,下调 miR-KEGG 结果中,通路分析主要包括 cGMP-PKG 信号通路、轴突引导、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、胆碱能突触、TOR 信号通路、神经营养因子信号通路等过程。

2.6 实时荧光定量 PCR 结果

根据重叠差异 miRNA 中随机选取 miR-7a-5p、miR-124-3p、miR-141-3p、miR-183-5p 等进行实时荧光定量 PCR 验证。实验结果如图所示,与对照组相比,模型组中 miR-124-3p (1.18 ± 0.62 vs $6.87 \pm 4.2, P < 0.01$)、miR-141-3p (0.88 ± 0.39 vs $4.20 \pm 2.40, P < 0.05$)、miR-183-5p (2.26 ± 0.56 vs $4.80 \pm 1.83, P < 0.05$) 的相对表达量显著上调 ($P < 0.05$);在 miR-7a-5p 中,模型组比对照组相对表达量明显上调 (2.84 ± 2.00 vs $0.29 \pm 0.18, P < 0.05$),以上指标与 miRNA 测序结果中变化趋势基本相同。

3 讨论

慢性束缚应激法(CRS)诱导的紧张、惊恐记忆会导致焦虑或抑郁症的发生^[13],而焦虑可能影响 PFC 以及依赖 PFC 认知与记忆的作用机制^[14],但是在形成与唤起焦虑相关的症状时,对 PFC 内的 miRNAs 分子表达谱变化的研究相对较少。

在本实验中,我们重点研究了 CRS 诱导的广泛性焦虑障碍模型小鼠 PFC 中行为学变化、miRNA 表达谱的变化以及探索各个 miRNA 与靶基因参与不同的生物功能过程的关键机制以及重要性。在行为学旷场实验与高架实验中,模型组比对照组都表现出焦虑样的行为与趋势,证实 CRS 诱导的广泛性焦虑障碍模型对行为学的影响,这与之前文献报道相一致^[15,16]。

接下来我们通过建立 miRNA 与其靶基因之间的相关性,来更好地了解焦虑症的分子机制。我们基于之前数据库算法等^[17,18]筛选出一系列中心基因,从 miRNA 调控靶基因的富集程度为切入点,建立紧密的 miRNA- 靶基因互作调控,进而筛选出更为重要的关键 miRNAs 与 mRNAs,为我们做关键 miRNAs 的验证做好理论基础,进而确定最具有价值意义的上游调控下游的基因通路网络,这有助于我们研究下游通路中起到关键作用。将靶基因进行通路富集分析,从上 / 下调的 GO 与 KEGG 富集分析中,得出更为关键 KEGG 通路与关键 GO。我们知道 miRNA 的功能主要通过其靶点发挥^[19],这些预测的靶基因在 DNA 转录的正调控、神经系统发育、突触后密度、神经元投射中显著富集,重要的生物调控也被整合在几种主要的 KEGG 途径中,其中我们发现上调 miR-KEGG 中参与到的轴突引导、神经营养因子信号通路、MAPK 信号通路与下调 miR-KEGG 共同调控以上通路,miRNA 调控其靶基因所产生的的生物过程有部分相同,说明我们其中的一些关键 miRNAs 对于 CRS 引起的焦虑的分子机制可能是共通的,基于以上的分析依据,我们将通过 qRT-PCR 来证实我们的猜想。

有相关研究表示 miR-124-3p 在海马中的过度表达显著加剧了重复行为、社会障碍和焦虑样的行为,同时 BDNF 表达与 miR-124 表达呈负相关^[20,21]。而在验证中 miR-124-3p 的表达量相比对照组上调,得到的趋势与高通量测序基本一致,miR-124-3p 的增多有可能是通过此通路机制发挥最终发挥生物学效应:在 cGMP-PKG 信号通路中,PKA 激活会使其下游靶标环磷腺苷反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化,CREB 磷酸化从而促进了 BDNF 的表达,也就意味着此 miR-124-3p 在调控 BDNF 的机制下,导致 GAD 发病中起到重要作用,这将是后续实验中做关键通路验证的基础依据,实验结果 miR-KEGG

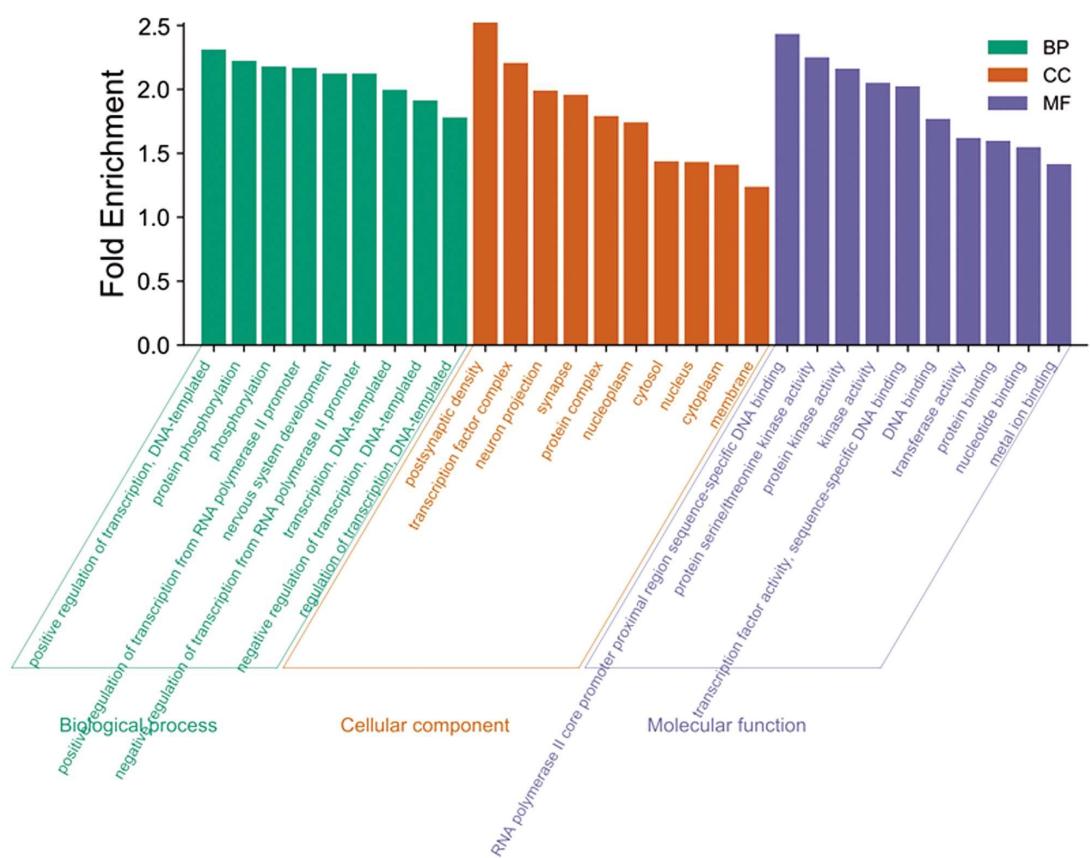


图 2 对照 vs 模型差异上调 miR-GO 分析结果

Fig. 2 Analysis results of differentially up-regulated MiR-GO in the control VS model

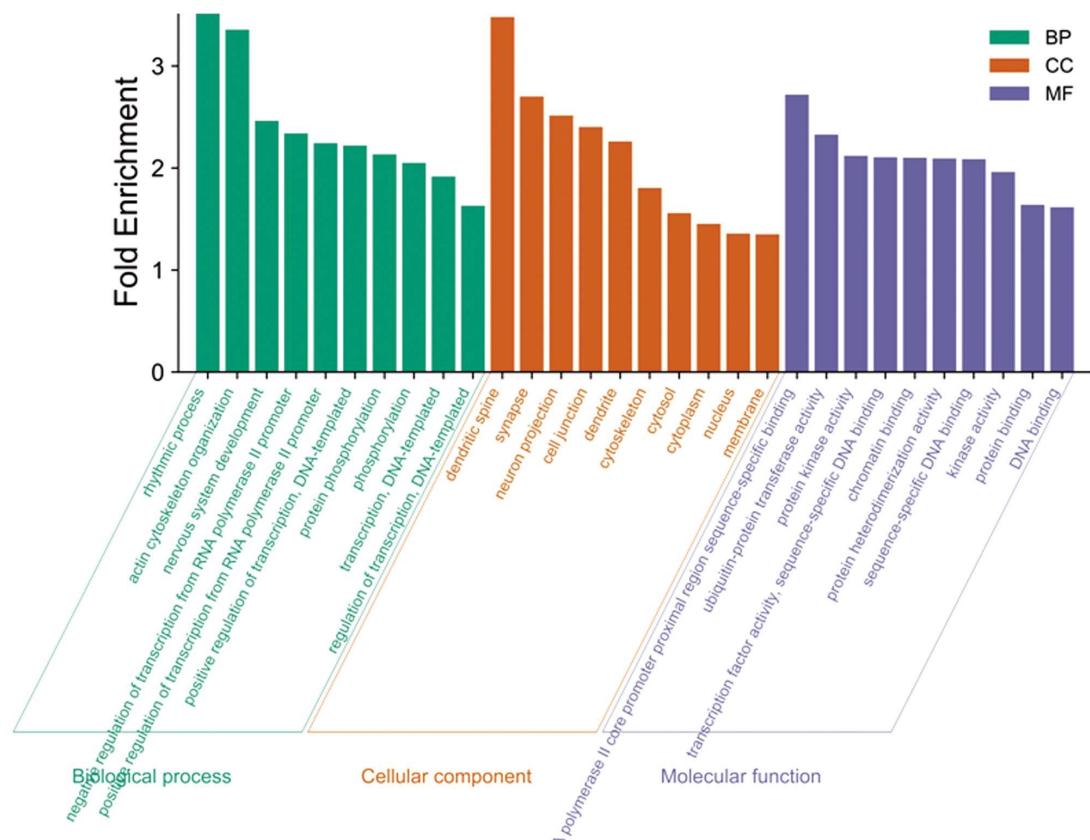


图 3 对照 vs 模型差异下调 miR-GO 分析结果

Fig. 3 Analysis results of differentially down-regulated MiR-GO in the control VS model

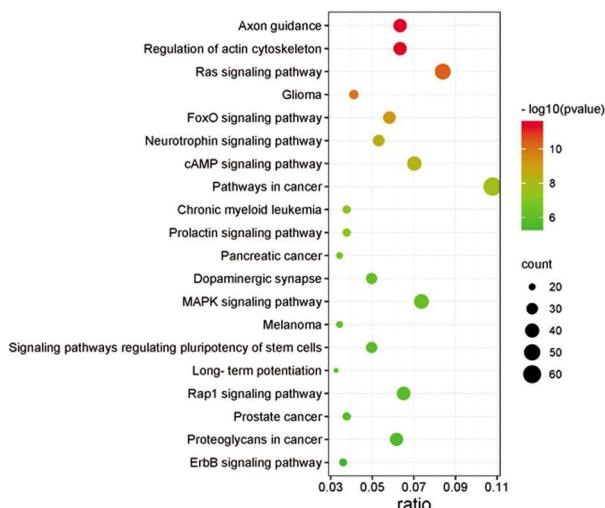


图 4 对照 vs 模型差异上调 miR-KEGG 网络分析结果

Fig. 4 Analysis results of differentially up-regulated MiR-KEGG in the control VS model

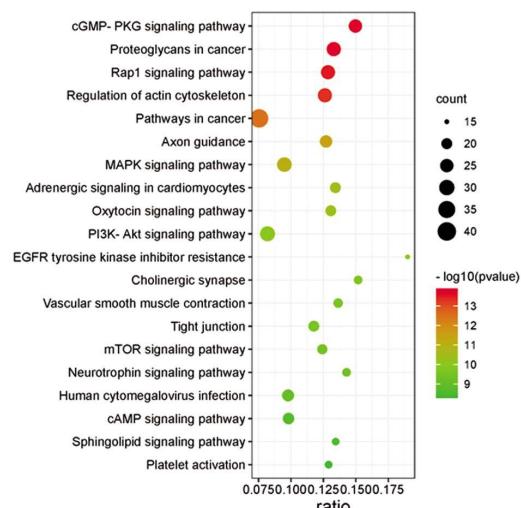


图 5 对照 vs 模型差异下调 miR-KEGG 网络分析结果

Fig. 5 Analysis results of differentially down-regulated MiR-KEGG in the control VS model

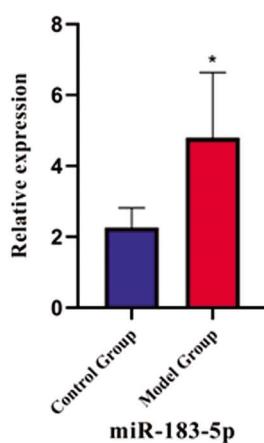
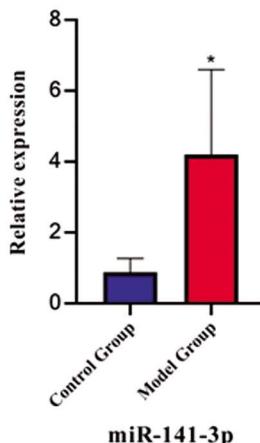
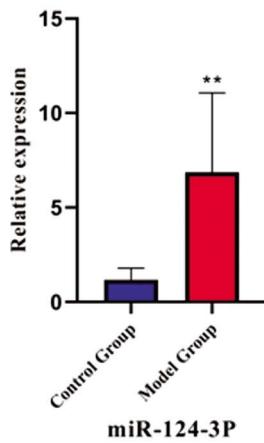
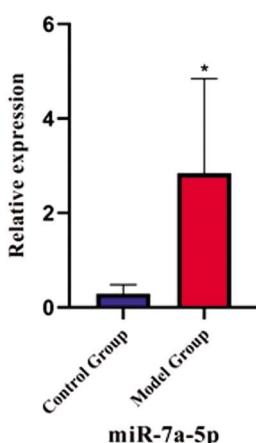


图 6 对照 vs 模型差异关键 miRNAs 结果
Fig. 6 Results of differentially MiRNAs in the control VS model

在于参与 cGMP-PKG 通路以及验证结果，我们推论 miR-124-3p 可能是治疗广泛性焦虑症障碍皮质中的潜在靶点，也有可能是海马与前额叶皮质共同的调控 miRNA。有报道研究称应激反应会导致小鼠 miR-183 表达水平升高，这表明 miR-183 表达可能在应激中发挥生理作用^[22]，而此前报道称 Zeb2 靶基因调节神经元发育的各个方面的表达^[23,24]，那么是否在 miR-183-5p 的调控下，Zeb2 受到影响进而调控其下游基因引发广泛性焦虑障碍，我们将后续做进一步验证。同时 miR-7a 被发现与神经肽 Y(NPY)也十分相关^[25]。

总之，本研究表明前额叶皮质中 miR-7a-5p、miR-124-3p、miR-141-3p、miR-183-5p 等 miRNA 变化参与广泛性焦虑障碍的发病，可能调控影响神经传导等功能，尚需进一步深入研究。

参考文献(References)

- Martinetz S. MicroRNA's impact on neurotransmitter and neuropeptide systems: small but mighty mediators of anxiety [J]. Pflugers Arch, 2016, 468(6): 1061-1069
- Heiss CN, Olofsson LE. The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system [J]. J Neuroendocrinol, 2019, 31(5): e12684
- Hoban AE, Stilling RM, Moloney G, et al. Microbial regulation of microRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex [J]. Microbiome, 2017, 5(1): 102
- Malan-Müller S, Hemmings SM. The Big Role of Small RNAs in Anxiety and Stress-Related Disorders [J]. Vitam Horm, 2017, 103: 85-129
- Díaz NF, Cruz-Reséndiz MS, Flores-Herrera H, et al. MicroRNAs in central nervous system development[J]. Reviews in the neurosciences, 2014, 25(5): 675-686
- Juzwik CA, Drake S, Lecuyer MA, et al. Neuronal microRNA regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Scientific reports, 2018, 8(1): 134-137
- Meydan C, Shenhari-Tsarfaty S, Soreq H. MicroRNA Regulators of Anxiety and Metabolic Disorders [J]. Trends Mol Med, 2016, 22(9): 798-812
- Chandrasekar V, Dreyer JL. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity [J]. Mol Cell Neurosci, 2009, 42(4): 350-362
- Liu Q, Sun NN, Wu ZZ, et al. Chaihu-Shugan-San exerts an antidepressive

- effect by downregulating miR-124 and releasing inhibition of the MAPK14 and Gria3 signaling pathways [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(5): 837-845
- [10] Fang Y, Qiu Q, Zhang S, et al. Changes in miRNA-132 and miR-124 levels in non-treated and citalopram-treated patients with depression [J]. *Affect Disord*, 2018, 227: 745-751
- [11] Ennab W, Mustafa S, Wei Q, et al. Resveratrol Protects against Restraint Stress Effects on Stomach and Spleen in Adult Male Mice [J]. *Animals (Basel)*, 2019, 9(10): 736
- [12] Moreno-Martínez S, Tendilla-Beltrán H, Sandoval V, et al. Chronic restraint stress induces anxiety-like behavior and re-modeling of dendritic spines in the central nucleus of the amygdala [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 416: 113523
- [13] Zhang WH, Liu WZ, He Y, et al. Chronic Stress Causes Projection-Specific Adaptation of Amygdala Neurons via Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel Downregulation [J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 85(10): 812-828
- [14] Liu WZ, Zhang WH, Zheng ZH, et al. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2221
- [15] Fernández-Calle R, Vicente-Rodríguez M, Gramage E, Pita J, et al. Pleiotrophin regulates microglia-mediated neuroinflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 46
- [16] 贾晶晶, 石天尧, 周文霞. 束缚应激与单程长时应激致小鼠焦虑障碍的应激参数比较与优化 [J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(02): 109-115
- [17] 黄海涛, 王龙锦, 熊健. 帕罗西汀在广泛性焦虑症治疗中的效果观察[J]. 当代医学, 2019, 25(03): 86-88
- [18] Chuffa LGA, Carvalho RF, Justulin LA, et al. A meta-analysis of microRNA networks regulated by melatonin in cancer: Portrait of potential candidates for breast cancer treatment[J]. *J Pineal Res*, 2020, 69(4): e12693
- [19] Coutinho de Almeida R, Ramos YFM, Mahfouz A, et al. RNA sequencing data integration reveals an miRNA interactome of osteoarthritis cartilage[J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(2): 270-277
- [20] Kumari A, Singh P, Baghel MS, et al. Social isolation mediated anxiety like behavior is associated with enhanced expression and regulation of BDNF in the female mouse brain [J]. *Physiol Behav*, 2016, 158: 34-42
- [21] Martinetz S. MicroRNA's impact on neurotransmitter and neuropeptide systems: small but mighty mediators of anxiety [J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(6): 1061-1069
- [22] Ragu Varman D, Marimuthu G, Rajan KE. Environmental enrichment upregulates micro-RNA-183 and alters acetylcholinesterase splice variants to reduce anxiety-like behavior in the little Indian field mouse (*Mus booduga*)[J]. *Neurosci Res*, 2013, 91(3): 426-35
- [23] Epifanova E, Babaev A, Newman AG, et al. Role of Zeb2/Sip1 in neuronal development[J]. *Brain Res*, 2019, 1705: 24-31
- [24] Yang S, Toledo EM, Rosmaninho P, et al. A Zeb2-miR-200c loop controls midbrain dopaminergic neuron neurogenesis and migration [J]. *Commun Biol*, 2018, 1: 75
- [25] Meng J, Ding T, Chen Y, et al. LncRNA-Meg3 promotes Nlrp3-mediated microglial inflammation by targeting miR-7a-5p[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107141

(上接第 1619 页)

- [22] 张文钊, 田洪昭, 左军, 等. 右归丸对肾阳虚模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(11): 2893-289
- [23] Fischer TW, Bergmann A, Kruse N, et al. New effects of caffeine on corticotropin-releasing hormone (CRH)-induced stress along the intrafollicular classical hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (CRH-R1/2, IP3-R, ACTH, MC-R2) and the neurogenic non-HPA axis (substance P, p75NTR and TrkA) in ex vivo human male androgenetic scalp hair follicles [J]. *Br J Dermatol*, 2021, 184(1): 96-110
- [24] Toorie AM, Cyr NE, Steger JS, et al. The Nutrient and Energy Sensor Sirt1 Regulates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis by Altering the Production of the Prohormone Convertase 2 (PC2) Essential in the Maturation of Corticotropin-releasing Hormone (CRH) from Its Prohormone in Male Rats[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11): 5844-5859
- [25] Shrivastava S, Chen B, Dworkin LD, et al. Relapse of Nephrotic Syndrome after Adrenocorticotrophic Hormone-Induced Remission:

- Implications of Adrenocorticotrophic Hormone Antibodies [J]. *Am J Nephrol*, 2020, 51(5): 390-394
- [26] Melau C, Riis ML, Nielsen JE, et al. The effects of selected inhibitors on human fetal adrenal steroidogenesis differs under basal and ACTH-stimulated conditions[J]. *BMC Med*, 2021, 19(1): 204
- [27] 刘浩龙, 王家典, 卢鑒, 等. 右归丸“阴中求阳”配伍对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的作用 [J]. *环球中医药*, 2017, 10(9): 1050-1053
- [28] Sun Y, Liu Z, Cao X, et al. Activation of P-TEFb by cAMP-PKA signaling in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(6): eaaw3593
- [29] Wang R, Wu ST, Yang X, et al. Pcdl10-Stk24/25 complex controls kidney water reabsorption by regulating Aqp2 membrane targeting[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(12): e142838
- [30] Oshikawa-Hori S, Yokota-Ikeda N, Sonoda H, et al. Reduced urinary release of AQP1- and AQP2-bearing extracellular vesicles in patients with advanced chronic kidney disease [J]. *Physiol Rep*, 2021, 9(17): e15005