

本文引文格式:陈依烛,李莎莎,廉春容,等.高通量测序技术筛选铝矿区
认知障碍老年人群外周血 circRNAs 的差异表达谱及分
析[J].右江民族医学院学报,2023,45(1):79-84.

【论著与临床报道】

高通量测序技术筛选铝矿区认知障碍老年人群 外周血 circRNAs 的差异表达谱及分析

陈依烛¹,李莎莎²,廉春容²,甘珏方²,凌雁武²

(1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院基础学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 通过高通量测序技术筛选铝致认知障碍人群和正常人血液中差异表达的环状 RNA(circRNA),以探讨 circRNA 在铝致认知障碍中的作用。**方法** 运用简易智力状态检查量表(mimi-mental state examination,MMSE)判断铝矿区老年人群认知水平,采集血液并测定血铝含量,选取高血铝水平认知正常人群为对照组(NC组),高血铝水平认知功能障碍人群为实验组(CI组),基于高通量测序技术获得差异表达的 circRNA,运用生物信息学方法对上调最显著的 circRNA 可能结合的微小 RNA(miRNA)及其可能参与铝致认知障碍的调控通路进行预估。**结果** 研究人员共收集十二个老年人的血液样品,其中 3 例高血铝认知正常,3 例高血铝认知障碍,共筛查出差异表达的 circRNA 539 个,其中在 CI 组上调最突出的四种 circRNA,依次为 novel_circ_000349、novel_circ_004316、novel_circ_011663、novel_circ_017724,对其中结合匹配值最高的 16 个 miRNA 家族位点进行了分析,GO 分析显示这些靶基因与转录调控、神经元的生长发育及神经系统的发展相关,KEGG 分析表明其与多条认知功能障碍通路有关。**结论** 本研究筛选到的 circRNA 以及与之结合的 miRNA 可能与铝致认知障碍的发生发展相关,可以此为靶点进行后续相关的研究,并为铝致认知障碍发病机制提供基础信息。

关键词:高通量核苷酸序列分析;铝;认知障碍;RNA,环状;计算生物学

中图分类号:R342

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)01-0079-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.01.014

Screening and analysis of the differential expression profile of circRNAs in peripheral blood of elderly people with cognitive impairment in aluminum mining areas via high-throughput sequencing technology

Chen Yizhu¹, Li Shasha², Lian Chunrong², Gan Yufang², Ling Yanwu²

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To screen the differentially expressed circRNA in the blood of people with aluminum-induced cognitive impairment and healthy people by high-throughput sequencing technology, so as to explore the role of circRNA in aluminum-induced cognitive impairment. **Methods** The simple mimi-mental

第一作者简介:陈依烛(1998-),女,在读硕士研究生,研究方向:神经系统退行性病变及微量元素,E-mail:cyzyjyx@163.com

通讯作者简介:凌雁武(1975-),男,硕士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:神经系统退行性病变及微量元素,E-mail:lyw

@ymun.edu.cn

state examination (MMSE) was used to evaluate the cognitive level of elderly people in the aluminum mining area, and their blood was collected to have the aluminum content detected. People with high blood aluminum level and normal cognition were selected as the control group (NC group), and those with high blood aluminum level and cognitive dysfunction were selected as the experimental group (CI group). Differentially expressed circRNAs were obtained by high-throughput sequencing. Bioinformatic methods were employed to evaluate the microRNA (miRNA) that may bind to the most up-regulated circRNAs and the regulatory pathways that may be involved in aluminum-induced cognitive impairment. **Results** The researchers collected blood samples from 12 elderly people, including 3 cases of hyperaluminemia with normal cognition and 3 cases of hyperaluminemia with cognitive impairment. A total of 539 differentially expressed circRNAs were screened, among which novel_circ_000349, novel_circ_004316, novel_circ_011663, and novel_circ_017724 were the fourmost significantly up-regulated in the CI group. 16 miRNA family loci with the highest binding matching value were analyzed. GO analysis showed that these target genes were related to transcription regulation, the growth and development of neurons, as well as the development of the nervous system. KEGG analysis showed that they were related to multiple pathways of cognitive dysfunction. **Conclusion** The circRNAs screened out in this study and the miRNAs combined with them may be related to the occurrence and development of aluminium-induced cognitive impairment. They can be used as the targets for subsequent relevant studies and provide basic information for the pathogenesis of aluminium-induced cognitive impairment.

Key words: high-throughput nucleotide sequence analysis; aluminum; cognitive impairment; RNA, circular; computational biology

研究发现^[1-3],铝进入人体后会在体内不断积累,主要在脑内蓄存并通过神经递质、信使分子、激酶等,其对神经系统产生慢性毒性作用,导致神经退行性疾病的发生。随着我国西部大开发的进展,广西铝矿的开发扩建不断进行,矿区人民高铝暴露的压力日渐增大。以往的调查发现,与正常地区老年人相比,铝矿区内老年人发铝及饮用水中铝含量显著升高、简易智力状态检查量表(mimi-mental state examination, MMSE)评分显著降低,提示高铝环境可能是矿区内老年人认知功能下降、罹患阿尔兹海默症的危险环境诱因之一^[4]。因此,探寻铝致认知障碍早期诊断的生物标志物对于预防疾病以及控制疾病加重至关重要。

circRNA 是一种非编码 RNA,主要特点是具有共价链的尾端,在不同生物中存在着保守度和组织结构的不同。因为特殊的分子结构使得它对核酸酶并不敏感,也使得其比线性的 RNA 结构更加复杂安全^[5],因此,这些独特优势使得 circRNA 作为疾病诊断与治疗的新型靶点成为可能。circRNAs 的重要在于它能够成为 miRNA 海绵,通过控制 miRNA 家族活动而控制靶基因的传递^[6-7],对各种生物过程具有调节特性。研究表明 circRNA 在神经系统中大量存在并动态表达,其与神经系统疾病发生发展密切相关^[8]。然而,国内外关于 circRNA 在铝致认知障碍人群血液中的表达变化少有研究。基于此,本实验采用了高通量测序技术检测在较高血铝浓度下的认知障碍以及在意识正常患者血浆中不同表达的 circRNA,以及采用了生物

信息技术检测由明显不同的 circRNA 调控的 miRNA 和 mRNA,对寻找高铝致认知功能障碍的生物标志物提出了一条新途径,并为 circRNA 调节通路研究提供了必要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 血液样本 以往的研究发现,广西铝矿区内饮用水的铝含量远大于国家制定的标准 200 $\mu\text{g}/\text{L}$,其中,在铝矿区内的平果县饮用水的铝浓度显著高于非铝矿区^[4]。基于此,以广西铝矿主产区平果县 60 岁以上老年人群作为研究对象,通过 MMSE 评分判定认知能力,并测定血铝含量,同时采集每户的日常饮用水,测定铝浓度。所有受试者均签署知情同意书。

1.2 主要实验仪器及试剂 Trizol 试剂(Thermo Fisher,12183555);QiaQuick PCR 试剂盒(QIAGEN,28106);实时荧光定量 PCR 仪(Roche,LightCycler 96)。

1.3 circRNA 的提取和测序 用 TRizol 方法获得的样本总 RNA 后,先除去核糖体 RNA,再用 Rnase R 酶分解非环状 RNA。向已制备的 circRNA 中添加了 fragmentation buffer,使之断开形成短片段,然后再以断开后的 circRNA 为模版,加随机引物(random primer)形成 cDNA 的第一链,再加缓冲液、dNTPs、RNase h 和 DNA polymerase I 组成的 cDNA 二链,加以 QiaQuick PCR 测定试剂盒,纯化后再用 EB 缓冲液洗脱并经尾端修复、加 A 碱基,加定序连接,最后用琼脂多糖凝胶电泳法收集目的大小基因,加以 PCR 扩

增,就这样完成了文库制备功能,而构建后的文库可用 Illumina HiSeqTM2500 进行检测。

1.4 circRNA 信息分析 获得序列的信息之后,首先对其加以检测,从而获得高优质序列(high quality clean reads)。各个样本的高优质序列与参照遗传组依次通过分 TopHat 对照,得出各个样本的对照结果。从结果中提取 Unmapped Reads(未比对到指定的参照遗传组上的 Reads),随后再截取每一个 Unmapped Reads 的末端,从而获得高 Anchors Reads。将 Anchors Reads 重复一次对照到同一基因体上,将所获得的对照数据提供给 find_circ 软件以识别 circRNA 并完成 circRNA 计算,包括统计 Reads 类型、circRNA 类型、circRNA 分布等。

1.5 差异表达 circRNA 的筛选 在检测不同的表达 circRNA 过程中,以 $|\log_2(FC)| \geq 1$ 、 $P < 0.05$ 为主要筛选水准。差别倍数(fold change, FC)代表了各组间表现量的百分比。从 NC 组、CI 组中可以找到共同差异表达的 circRNA,并展开后续的分析。

1.6 数据库预测与 circRNA 结合的 miRNA 及 mRNA CircRNA 分子中存在着大量的 miRNA 融合位

点,这种内源竞争性 RNA(competing endogenous RNAs, ceRNA)在胞内发挥 miRNA“海绵”(miRNA sponge)的功能,并通过竞争性消除 miRNA 对其 mRNA 的抑制作用,上调 mRNA 的表达量,从而在一定程度上对目标基因进行了控制。使用 RNAhybrid 数据库对与 circRNA 结合的 miRNA 进行预测分析,构建网络图,并运用 MirTarBase 在线数据库预测出分析 miRNA 调控的 mRNA。

1.7 靶基因生物信息学分析 利用 David 6.8 数据库可以对靶基因组实现 GO(Gene Ontology)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)的富集与解析,选择标识符为 ENSEMBL_GENE_ID,列表类型为 Gene List。按 P 值排序,列出 $P < 0.05$ 的 GO 功能族和 KEGG 信号通路。

2 结果

2.1 铝矿区老年人群血铝含量较高,MMSE 评分较低 初步评分得到 6 例认知障碍和 6 例对照人群的血样本,以血铝水平 $> 3.900 \mu\text{g/L}$ 为标准,筛选得到 3 例高血铝认知障碍和 3 例高血铝认知正常样本。如表 1 所示。

表 1 认知障碍组与对照组 MMSE 评分、发铝、饮水铝及血铝含量

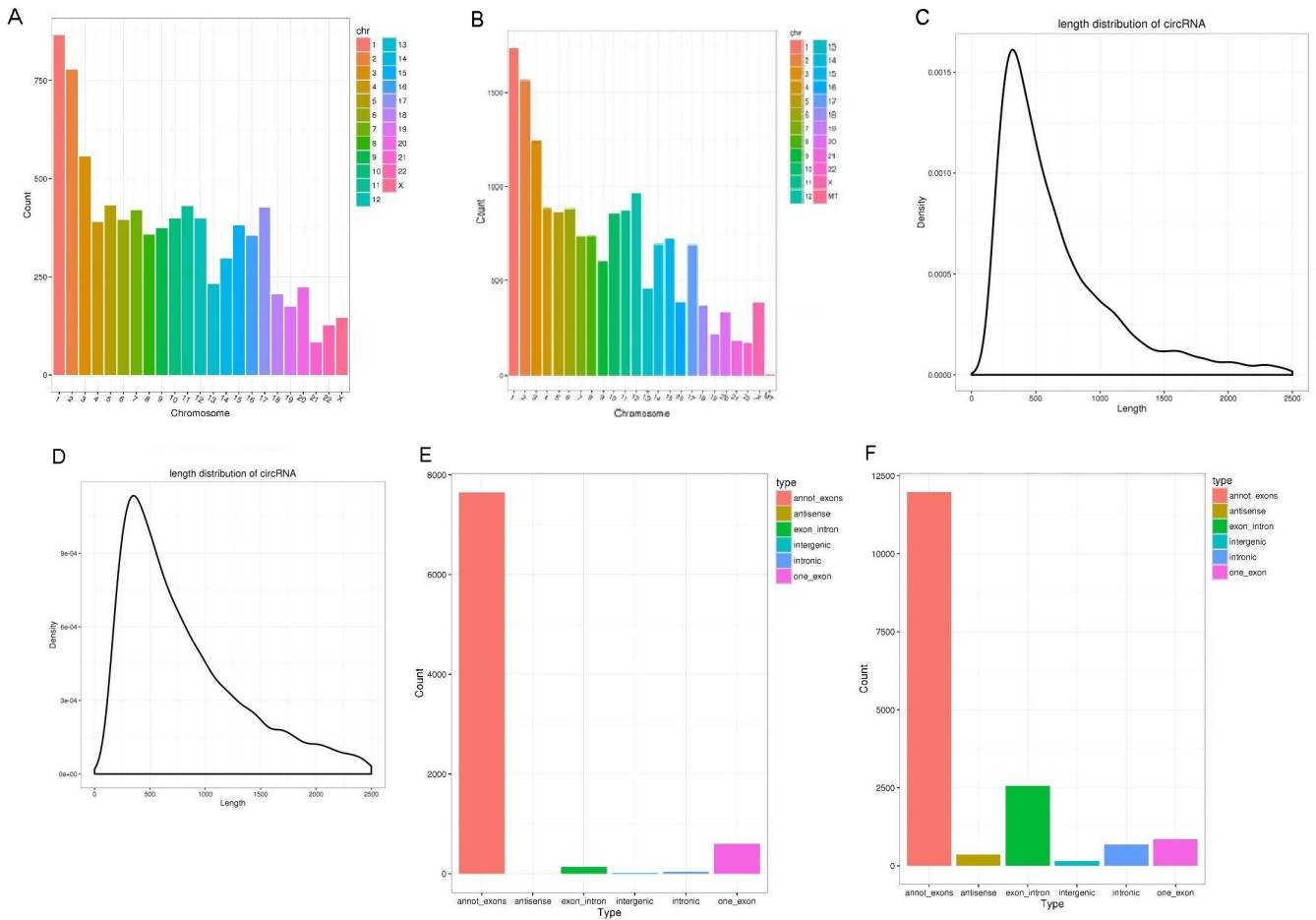
年龄/岁	性别	文盲 0 小学 1	MMSE/分	发铝/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	血铝/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	水铝/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
85	女	0	4	34.68	5.11	208.58
61	男	0	17	47.83	4.45	727.88
74	女	0	10	43.04	5.18	478.44
78	男	0	6	51.64	2.60	640.88
68	女	0	14	37.54	1.01	511.41
82	男	1	3	55.58	2.38	1061.91
60	女	0	19	39.45	4.82	502.41
64	女	0	19	35.23	4.10	219.36
60	男	1	26	22.33	3.92	527.82
60	女	0	19	37.84	1.70	146.38
68	男	0	19	18.74	1.39	501.92
67	男	1	22	26.66	1.05	155.51

2.2 circRNA 鉴定及来源统计 通过 Illumina 高通量测序,比对到已知 circRNA 8 400 个,预测到新的 circRNA 16 591 个。将它和参考基因组进行了序列比对,结果表明大多数基因组都在同一外显子上(见图 1A、图 1B);计算 circRNA 在各个染色体上的情况,在所有染色体上都有散布,但大多数聚集在第 1、2、3 号染色体上(见图 1C、图 1D);对各样本中 circRNA 大小进行分布统计(见图 1E、图 1F),对各样本的 Reads 值和参照基因组的比对效率在 99.73%~99.97%不等,如果数据利用率结果正常,则所选的参照基因组就可

以适应未来的大数据分析需要。

2.3 circRNA 的差异表达分析 CI 组与 NC 组差异表达的 circRNA 有 539 个,其中表达上调的有 182 个,表达下调的有 357 个,见图 2,筛选条件为 $P < 0.05$, $|\log_2FC| > 1$ 。红色表示上升的 circRNA,蓝色表示下降的 circRNA,灰色的点表示无差异表达的 circRNA。

2.4 circRNA 在染色体定位及基因定位 分析发现,在 CI 组升高最为显著的前 4 位 circRNA 分别是 novel_circ_000349、novel_circ_004316、novel_circ_011663、novel_circ_017724,其染色体定位及基因定位见表 2。



注: A. 已存在 circRNA 染色体分布, B. 新预测 circRNA 染色体分布, C. 已存在 circRNA 长度分布, D. 新预测 circRNA 长度分布, E. 已存在 circRNA 类型分布, F. 新预测 circRNA 类型分布。

图 1 已存在和新预测 circRNA 统计图

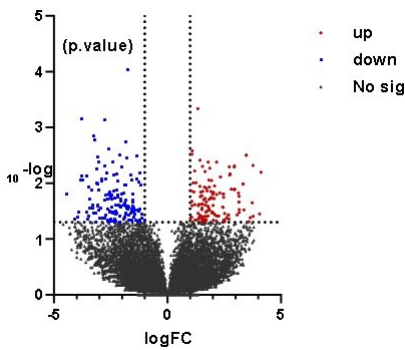


图 2 CI 组与 NC 组差异表达的 circRNA 火山图

2.5 circRNA 靶基因预测及生物信息学分析 circRNA 基因分子中具有 miRNA 的融合位置,成为内源竞争性 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 在胞内充分发挥 miRNA “海绵”(miRNA sponge)的功能,通过竞争性地消除 miRNA 对其 mRNA 的控制,上调 mRNA 的数量,进而在转录水平上对 mRNA 进行调控。本课题中对上述 4 个 circRNA 使用 RNAhybrid 数据库进行预测分析,分别找到与之

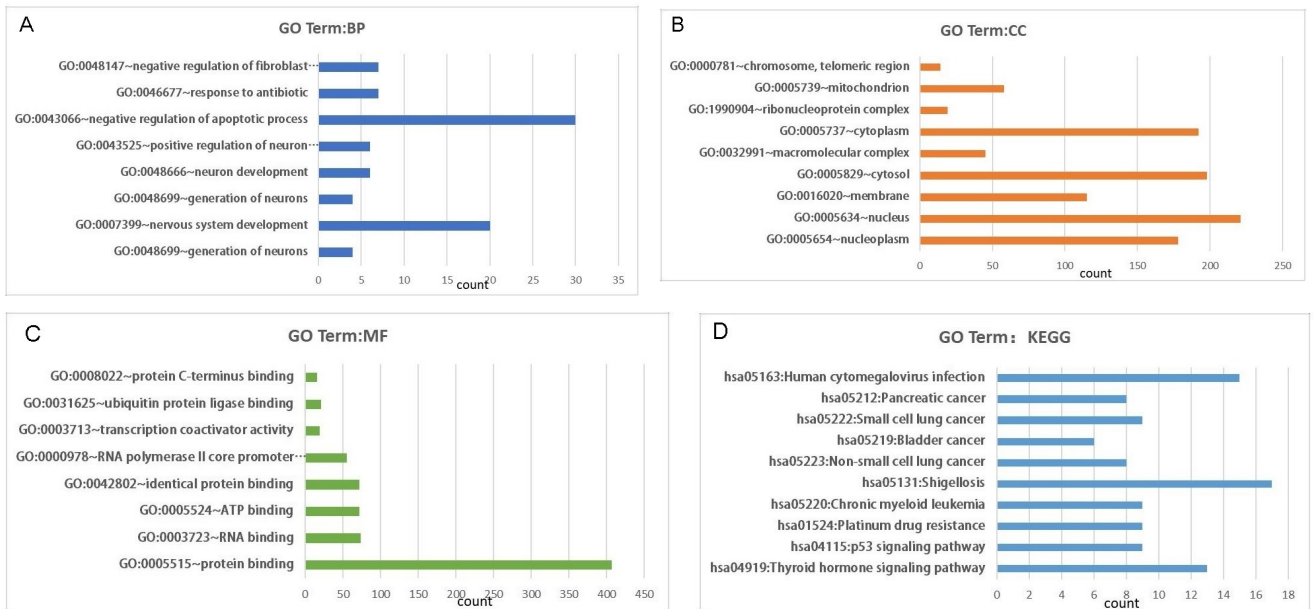
结合位点匹配度较高的 4 个靶向 miRNA,见表 3。MirTarBase 在线数据库预测出分析 miRNA 调控的 mRNA 共 1 283 个,对这 1 283 个 mRNA 进行生物信息学分析,以期深入了解 circRNA 在铝致认知障碍中的潜在功能。GO 分析结果表明,在 BP 方面,其主要和转录调节、神经元的成长、神经的发展以及蛋白质磷酸化相关;在 CC 方面,其主要出现于细胞核、胞液当中;在 MF 方面,其和蛋白质的融合、RNA 融合、ATP 融合、RNA 整合酶 II 与核心启动子以及近端区序列与特异性 DNA 的融合等有关,这些途径都与铝致认知障碍的发生与发展密切相关。通过 KEGG 分析富集的分子通路中,靶基因显著丰富于甲状腺激素信息通道、P53 信息通道、TGF-β 信息通道等,与细胞周期、慢性粒细胞白血病、中小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、甲状腺癌等有关,如图 3 所示,这说明这些差异表达的 circRNA 很可能与相应 miRNA 结合,像“海绵”吸附 miRNA,使 miRNA 无法与 mRNA 结合,进而共同参与细胞调控机制,影响 mRNA 的表达。

表 2 基因定位及染色体定位

Gene ID	起源基因	起源染色体	circRNA 种类	新预测/已存在 RNA
novel_circ_000349	ENSG00000048991	chr2:135602500-135632001	annot_exons	novel
novel_circ_004316	ENSG00000133195	chr17:72924415-72925830	intronic	novel
novel_circ_011663	ENSG00000169946	chr8:105419144-105444381	annot_exons	hsa_circ_0003380
novel_circ_017724	ENSG00000131023	chr6:149679875-149680457	one_exon	novel

表 3 与 circRNA 结合位点匹配度较高的 miRNA

Gene ID	miRNA			
novel_circ_000349	has-miR-188-3p	has-miR-141-5p	has-miR-197-3p	has-miR-20B-3p
novel_circ_004316	has-miR-3606-5p	has-miR-205-3p	has-miR-193A-3p	has-miR-4293
novel_circ_011663	has-miR-670-3p	has-miR-548L	has-miR-620	has-miR-656-5p
novel_circ_017724	has-miR-6731-3p	has-miR-499b-5p	has-miR-1285-3p	has-miR-3187-5p



注: A~C. miRNA 靶基因的 GO 富集分析 ($P < 0.05$), D. miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析 ($P < 0.05$).

图 3 miRNA 相关的靶基因的富集分析

3 讨论

铝可增加血脑屏障的渗透性,促进其进一步进入脑组织,研究发现,铝诱导的神经毒性涉及多种途径,如炎症、氧化应激、DNA 损伤和线粒体功能障碍,大脑中铝的积累会导致认知功能障碍^[9-12],铝致认知障碍涉及多条信号通路,如铝通过激活 ddx3x-nlrp3 介导的焦亡信号通路而损害认知功能^[9],铝通过细胞外调节蛋白激酶(ERK)通路导致学习记忆缺陷^[13]。铝诱导认知障碍的相关信号通路还有许多,探索铝致认知障碍作用机制的具体信号通路,对于预防及延缓疾病的发展意义重大。

作为非编码 RNA 家族的一个特殊成员,circRNA 在不同器官或组织中的差异表达,特别是在神经系统中丰富且动态表达,表明其在神经系统疾病的发病和进展中发挥重要作用^[14]。如 circHomer1 通过抑制

Bbc3 的表达来调节甲基苯丙胺 (METH) 诱导的神经元损伤^[15],circSLC8A1 调节 miR-128 功能和活性,影响帕金森病的发展^[16],circDLGAP4 过表达通过海绵化 miR-503-3p 升高 NEGR1 来缓解氧-葡萄糖剥夺诱导的神经元损伤^[17],circRNA NF1-419 通过结合蛋白 Dynamin-1 和 AP2B1 增强自噬以改善老年性痴呆症等相关疾病和症状^[18]。但尚未有关于 circRNA 在铝致认知障碍中的报道,其在铝致认知障碍中的调节机制还有待进一步挖掘。

本实验首先获得了高血铝条件下不同认知水平老年人群的 circRNA 差异表达谱。结果显示有 539 个 circRNA 呈现相反趋势表达,选取在认知障碍组升高最为显著的 4 个 circRNA 用于后续分析。为深入研究这些不同表达的 circRNA 的生物功能,本文中对于不同表达的 circRNA 相匹配值较高的 miRNA 结合位

点进行了预测,并对靶基因进行了 GO 和 KEGG 富集分析,其结论包含有神经元的生长发育、周围神经系统的发展、对神经元的正向调控等生物学过程,还有 TGF- β 信息通道、p53 信息通道、甲状腺激素等信息通道,有研究表明^[19-20], p53 通道和 TGF- β 1 等信息通道与阿尔茨海默症的共同发生发展有关,大量临床证据表明甲状腺功能的异常与认知损害等有关^[21]。这些均与神经退行性疾病相关,提示预测到的 circRNA 可能参与铝致认知障碍的进程。

综上所述,本实验选择广西铝矿区老年人群作为研究对象,选择高血铝认知障碍人群作为实验组,高血铝认知正常人群作为对照组,并获得了 circRNA 差异表达谱,结果显示共有 539 个 circRNA 差异表达,选择在认知障碍组上升最显著的 4 个 circRNA 作为分析对象,为了进一步探索这些差异性表达的 circRNA 的生物学功能,对差异表达的 circRNA 的 16 个匹配值最高的 miRNA 下游的靶基因进行了预估,并通过生物信息学途径探索了其在铝致认知障碍发生发展中可能参与的调控通路。该试验具有一定的限制性,由于纳入的研究样品范围较小,因此有助于未来在更大的研究样品区域中验证不同基因的 circRNA,并研究 circRNA 靶基因与通路之间的互作关联,以便于进一步探讨铝致认知障碍的早期诊断标志物及其发生机理,寻求可能的诊断靶点。

参考文献:

- [1] SANAJOU S, ERKEKOĞLU P, ŞAHİN G, et al. Role of aluminum exposure on Alzheimer's disease and related glycogen synthase kinase pathway[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022; 1-13.
- [2] 刘佳喜, 张立丰. 铝的毒性作用研究进展[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(5): 806-809, 871.
- [3] AL-HAZMI M A, RAWI S M, HAMZA R Z. Biochemical, histological, and neuro-physiological effects of long-term aluminum chloride exposure in rats[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(3): 429-436.
- [4] 凌雁武, 张秀华, 韦学玉, 等. 广西铝矿区老年人群认知能力与头发及饮水中铝含量关系研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2008, 24(5): 508-513.
- [5] 张爱君, 李艳宁, 高倩, 等. RAW264. 7 细胞自噬相关 circRNA 检测及分析[J]. *免疫学杂志*, 2022, 38(2): 177-184.
- [6] CHEN L, WANG C L, SUN H Y, et al. The bioinformatics toolbox for circRNA discovery and analysis[J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(2): 1706-1728.
- [7] YE Y L, ZHANG L P, HU T, et al. CircRNA_103765 acts as a proinflammatory factor via sponging miR-30 family in Crohn's disease[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 565.
- [8] LI J W, SUN C Y, CUI H R, et al. Role of circRNAs in neurodevelopment and neurodegenerative diseases [J]. *J*

Mol Neurosci, 2021, 71(9): 1743-1751.

- [9] HAO W D, HAO C Y, WU C R, et al. Aluminum impairs cognitive function by activating DDX3X-NLRP3-mediated pyroptosis signaling pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 157: 112591.
- [10] ALEXANDROV P N, HILL J M, ZHAO Y, et al. Aluminum-induced generation of lipopolysaccharide (LPS) from the human gastrointestinal (GI)-tract microbiome-resident *Bacteroides fragilis* [J]. *J Inorg Biochem*, 2020, 203: 110886.
- [11] SALKOV V N, KHUDOERKOV R M. The role of aluminum and lead in the development of Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. *Arkh Patol*, 2021, 83(3): 56-61.
- [12] DÓREA J G. Neurotoxic effects of combined exposures to aluminum and mercury in early life (infancy) [J]. *Environ Res*, 2020, 188: 109734.
- [13] LI J, ZHANG D D, WANG C Q, et al. Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on aluminum overload-induced cerebral damage through epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor expression [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(1): BSR20181185.
- [14] KNUPP D, COOPER D A, SAITO Y, et al. NOVA₂ regulates neural circRNA biogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(12): 6849-6862.
- [15] LI J W, SUN Q Y, ZHU S W, et al. Knockdown of circHomer1 ameliorates METH-induced neuronal injury through inhibiting Bbc3 expression [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 732: 135050.
- [16] HANAN M, SIMCHOVITZ A, YAYON N, et al. A Parkinson's disease circRNAs resource reveals a link between circSLC8A1 and oxidative stress [J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(11): e13551.
- [17] QIU L L, HE J F, CHEN H, et al. CircDLGAP4 overexpression relieves oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury by elevating NEGR1 through sponging miR-503-3p [J]. *J Mol Histol*, 2022, 53(2): 321-332.
- [18] CHEN D L, CUO Y R, QI L K, et al. Circular RNA NF1-419 enhances autophagy to ameliorate senile dementia by binding dynamin-1 and adaptor protein 2 B1 in AD-like mice [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24): 12002-12031.
- [19] SHI Z L, ZHANG K X, ZHOU H, et al. Increased miR-34c mediates synaptic deficits by targeting synaptotagmin 1 through ROS-JNK-p53 pathway in Alzheimer's Disease [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13125.
- [20] HAMPEL H, CARACI F, CUELLO A C, et al. A path toward precision medicine for neuroinflammatory mechanisms in Alzheimer's Disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 456.
- [21] MISIAK B, STAŃCZYKIEWICZ B, WIŚNIEWSKI M, et al. Thyroid hormones in persons with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 111: 110402.

收稿日期: 2022-10-13; 修回日期: 2022-11-02