

circRIMS2 靶向 miR-186 调控 BDNF 表达减轻 CRS 诱发的小鼠抑郁样行为

贾丽 魏东 梁路

830001 乌鲁木齐市第四人民医院临床心理一科(贾丽), 精神活性物质依赖科(梁路);

830001 乌鲁木齐, 新疆医科大学教务处(魏东)

通信作者: 梁路, Email: 53504195@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2024.02.005

【摘要】目的 探讨抑郁样行为小鼠体内中 circRIMS2 变化及 circRIMS2 对糖氧剥夺(OGD)诱导 HT22 细胞凋亡的影响。**方法** (1) 将 45 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为对照组、模型组与氟西汀组, 每组 15 只。通过慢性束缚应激(CRS)对模型组和氟西汀组小鼠构建抑郁样行为模型, 对氟西汀组小鼠给予 10 mg/kg 的氟西汀治疗。采用糖水偏好测试、悬尾测试、强迫游泳测试和开野测试评估小鼠抑郁样行为。评估后取小鼠血清和大脑海马组织, 采用逆转录实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测环状 RNA、miR-186 及 BDNF mRNA 的表达水平。采用 Western blot 法检测小鼠海马组织中 BDNF 蛋白表达情况。(2) 在 HT22 细胞中分别加入慢病毒载体 pLO-circCon、pLO-circRIMS2 转染试剂后, 取一部分 HT22 细胞进行 OGD 处理以构建体外凋亡模型。根据进行过的细胞转染和 OGD 操作, 将 HT22 细胞分为 Control+pLO-circCon 组、Control+pLO-circRIMS2 组、OGD+pLO-circCon 组和 OGD+pLO-circRIMS2 组。采用 RT-qPCR 检测 4 组细胞中 circRIMS2、miR-186 及 BDNF mRNA 的表达水平, 通过流式细胞术检测并计算 4 组细胞凋亡率。采用 Western blot 法检测细胞中 BDNF 蛋白表达情况。**结果** (1) 与对照组相比, 模型组小鼠糖水偏好率低, 悬尾与强迫游泳不动时间长, 开野测试得分低, 血清中 circTRAM2、circTNIK 与 circTFRC 表达水平高, circDOCK4、circRIMS2、circSTAG1 表达水平低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与模型组相比, 氟西汀组小鼠糖水偏好率高, 悬尾与强迫游泳不动时间短, 开野测试得分高, 血清中 circRIMS2 表达水平高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。(2) 与 Control+pLO-circCon 组相比, Control+pLO-circRIMS2 组细胞中 circRIMS2、BDNF mRNA 表达水平高, miR-186 表达水平和细胞凋亡率低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与 OGD+pLO-circCon 组相比, OGD+pLO-circRIMS2 组细胞中 circRIMS2、BDNF mRNA 表达水平高, miR-186 表达水平和细胞凋亡率低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。**结论** circRIMS2 基因与小鼠抑郁样行为存在关联, 抑郁样行为小鼠血清中 circRIMS2 表达降低, 氟西汀治疗能提高 circRIMS2 表达。慢病毒质粒提高细胞中 circRIMS2 基因表达, 能通过 miR-186/BDNF 信号减轻 OGD 诱发的神经元凋亡。

【关键词】 抑郁症; 慢性束缚应激; 氟西汀; 环状 RNA; 糖氧剥夺

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2022D01C419)

CircRIMS2 targeting miR-186 to regulate BDNF expression and alleviate CRS induced depression like behavior in mice Jia Li, Wei Dong, Liang Lu

First Department of Clinical Psychology, Urumqi Fourth People's Hospital, Urumqi 830001, China (Jia L); Department of Psychoactive Substance Dependence, Urumqi Fourth People's Hospital, Urumqi 830001, China (Liang L); Academic Affairs Office, Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, China (Wei D)

Corresponding author: Liang Lu, Email: 53504195@qq.com

【Abstract】Objective To explore the changes of circRIMS2 in mice with depression like behavior and the influence of circRIMS2 on oxygen-glucose deprivation (OGD) induced apoptosis of HT22 cells. **Methods** (1) Forty-five C57BL/6 female mice were randomly divided into the control group, model group,

and fluoxetine group, with 15 mice in each group. A depression like behavior model was constructed in both the model group and fluoxetine group mice through chronic restraint stress (CRS), and fluoxetine group mice were treated with 10 mg/kg of fluoxetine. Depression like behavior in mice was evaluated using the sucrose preference test, tail suspension test, forced swimming test, and open field test. After evaluation, mouse serum and hippocampal tissue were collected, and the expression of circular RNA, miR-186, and BDNF mRNA were detected using reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Western blot was used to detect the expression of BDNF protein in mice hippocampus. (2) After adding lentiviral vectors pLO-circCon and pLO-circRIMS2 transfection reagents to HT22 cells, a portion of HT22 cells were subjected to OGD treatment to construct an in vitro apoptosis model. Based on the cell transfection and OGD procedures, HT22 cells were divided into Control+pLO-circCon group, Control+pLO-circRIMS2 group, OGD+pLO-circCon group, and OGD+pLO-circRIMS2 group. RT-qPCR was used to detect the expression of circRIMS2, miR-186, and BDNF mRNA in four groups of cells, and flow cytometry was used to detect and calculate the apoptosis rate of the four groups of cells. **Results** (1) Compared with the control group, the model group mice had a lower preference for sucrose, longer tail suspension and forced immobility time, lower open field test scores, higher expression levels of circTRAM2, circTNIK, and circTFRC in serum, and lower expression levels of circDOCK4, circRIMS2, and circSTAG1, and the differences were statistically significant (all $P < 0.01$). Compared with the model group, the fluoxetine group mice had a higher preference for sucrose, shorter tail suspension and forced swimming immobility time, higher open field test scores, and higher level of circRIMS2 expression in serum, with statistical differences (all $P < 0.01$). (2) Compared with the Control+pLO-circCon group, the Control+pLO-circRIMS2 group had higher levels of circRIMS2 and BDNF mRNA expression, lower level of miR-186 expression, and lower cell apoptosis rate, with statistically significant differences (all $P < 0.01$). Compared with the OGD+pLO-circCon group, the OGD+pLO-circRIMS2 group had higher levels of circRIMS2 and BDNF mRNA expression, lower level of miR-186 expression, and lower cell apoptosis rate, with statistically significant differences (all $P < 0.01$). **Conclusions** The circRIMS2 gene is associated with depression like behavior in mice. The expression of circRIMS2 in the serum of mice with depression like behavior is reduced, and fluoxetine can increase the expression of circRIMS2. The lentiviral plasmid enhances the expression of circRIMS2 gene in cells and can alleviate OGD induced neuronal apoptosis through miR-186/BDNF signaling.

【Key words】 Depressive disorder; Chronic restraint stress; Fluoxetine; RNA, circular; Oxyglucose deprivation

Fund program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uyghur Autonomous Region (2022D01C419)

全球约3.4亿人罹患抑郁症^[1]。抑郁症的发病机制复杂,涉及遗传、生物化学、免疫、神经内分泌、电生理、神经结构、心理社会因素和表观遗传调控等因素^[2]。环状RNA是一类非编码RNA,已有证据表明,环状RNA参与多种疾病进展,包括抑郁症、癌症、心血管疾病^[3-5]。转录组学分析显示,环状RNA在抑郁患者和抑郁样行为模型动物外周血中异常表达^[2],其在抑郁症发病机制中的作用备受关注。

目前,环状RNA调控的DNA甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑等表观遗传调控机制与抑郁症相关^[6-7]。与mRNA不同,环状RNA是一个没有5'-cap结构和3'-poly-A尾的共价闭环^[8]。研究表明,抑郁样行为模型体内存在多种异常表达的环状RNA,包括circHIPK2、circKALRN、circTRAM2、circTNIK、circTFRC、circDOCK4、circRIMS2和circSTAG1等^[9-10]。然而,目前仍不明确哪些环状RNA在抑郁症的发生与缓解过程中存在抑郁调控作用,其发挥调控作用的机制有待进一步研究。

本研究采用慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)构建抑郁样行为模型,通过氟西汀治疗,探索不同环状RNA在抑郁样行为模型小鼠血清中的含量变化。此外,本研究采用体外细胞模型,通过慢病毒质粒诱导环状RNA过表达,探讨其对细胞凋亡影响的作用机制。以期环状RNA作为改善抑郁样症状的治疗靶点提供基础研究支持。

一、材料与方法

1. 实验材料与仪器: 盐酸氟西汀(礼来苏州制药有限公司); Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司); 逆转录试剂盒(日本Takara公司); Lipofectamine™ 3000转染试剂(美国Life Technologies公司); 蛋白裂解液(上海碧云天); 抗鼠BDNF抗体(武汉proteintech公司); 抗鼠β-actin抗体(武汉proteintech公司); HT22细胞(大连美仑生物技术有限公司); DMEM无糖/高糖培养基(美国Gibco公司); RT-qPCR引物(南京金斯瑞生物科技有限公司); 悬尾测试装置、强迫游泳测试装置、开野测试装置(江苏赛昂斯生物科技有限公司); PCR仪(美国Bio-Rad公司); SDS-PAGE电泳仪(美国

Bio-Rad公司); 化学发光成像仪(上海天能科技有限公司)。

2. 实验小鼠来源与分组: 选择45只C57BL/6品系小鼠, 因雄性C57BL/6小鼠好斗, 易出现互相咬伤的情况, 故选择性格较温和的SPF级雌性小鼠进行研究。入组小鼠饲养于新疆医科大学动物实验中心, 饲养环境为SPF级动物房, 环境温度23~25℃, 湿度45%~75%。所有小鼠适应性喂养1周后, 随机分为对照组、模型组与氟西汀组, 每组15只。本研究已经乌鲁木齐市第四人民医院伦理委员会审核批准(伦理批号: 20220506128)。

3. 束缚行为造模与氟西汀治疗^[11-12]: 模型组与氟西汀组小鼠分组后即给予CRS。两组小鼠束缚期间, 对照组小鼠禁食禁水。造模方式是将小鼠束缚在圆柱形容器内, 每天束缚10 h(22:00—次日8:00), 持续观察动物行为状态。束缚器由50 ml离心管改造, 离心管顶部和周身打有多个通气孔, 保证小鼠呼吸。束缚完成后, 氟西汀组小鼠灌胃给药氟西汀溶液, 其他两组小鼠灌胃生理盐水。连续束缚和给药21 d后, 开展行为学检测, 行为学检测期间, 维持束缚刺激和给药。氟西汀给药剂量为10 mg/kg, 其他两组给予等剂量的生理盐水。模型构建流程见图1。

4. 行为学检测^[13]: 行为学检测过程中, 首先开展糖水偏好测试。小鼠恢复1 d后, 开展悬尾测试, 再进行强迫游泳测试, 最后进行开野测试, 每项测试间隔时间 ≥ 1 h。(1)糖水偏好测试: 提前24 h, 分别给每只小鼠一瓶纯净水和一瓶1%蔗糖水适应。将小鼠禁食、禁水12 h, 单独饲养在安静环境中。分别给予每只小鼠一瓶纯净水和一瓶1%蔗糖水, 小鼠随意饮用12 h。记录小鼠饮用前后纯净水与蔗糖水重量的差值, 并计算小鼠的糖水偏好率。糖水偏好率(%)=蔗糖水重量差值/(纯净水重量差值+蔗糖水重量差值) $\times 100\%$ 。(2)悬尾测试: 安静环境下, 用胶带将小鼠悬挂在高于地面约50 cm的铁架台上, 侧向摄像机拍摄小鼠。先让小鼠适应2 min, 再记录小鼠接下来4 min内悬挂时保持不动姿势的时间,

测试持续6 min。(3)强迫游泳测试: 安静环境下, 将小鼠投入高60 cm, 直径30 cm, 水深25 cm, 水温23~25℃的水池中, 用顶部摄像机拍摄小鼠。先让小鼠适应2 min, 再记录小鼠接下来4 min内在水中保持同一位点的时间, 测试持续6 min。(4)开野测试: 安静环境下, 将小鼠放入边长30 cm的正方体装置中, 底部通过电脑软件分为25个小正方形, 用顶部摄像机拍摄小鼠。先让小鼠提前适应10 min, 再记录小鼠接下来5 min内在旷场中穿越小正方形的次数。

5. 细胞转染与糖氧剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)操作: (1)细胞转染。根据LipofectamineTM 3000转染试剂盒说明书, 取生长状态良好, 处于对数生长期的HT22细胞, 0.25%胰酶消化后, 加入完全培养基调整细胞浓度至 1×10^5 /ml, 加入6孔板中培养。待细胞生长至50%融合时, 分别加入慢病毒载体pLO-circCon、pLO-circRIMS2转染试剂, 继续培养72 h。通过RT-qPCR验证circRIMS2过表达情况。(2)OGD处理。取转染circRIMS2的HT22细胞与正常HT22细胞给予OGD处理, 将HT22细胞接种于96孔微孔板中, 弃去原培养基, PBS洗涤3次, 用DMEM无糖培养基替代原培养基, 将细胞放置在预设的厌氧培养箱(1%O₂, 94%N₂, 5%CO₂)中培养。稳定培养3 h后, 重新用完全培养基替代DMEM无糖培养基, 于常规条件下继续培养24 h。非OGD处理的HT22细胞整个培养周期都处于5% CO₂混合95%空气条件下, 使用DMEM高糖培养基培养。通过细胞转染和OGD操作将HT22细胞分为Control+pLO-circCon组、Control+pLO-circRIMS2组、OGD+pLO-circCon组和OGD+pLO-circRIMS2组。

6. 逆转录实时定量聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)实验: 行为学测试结束后, 每组随机取6只小鼠, 脱颈椎处死, 心脏采血收集小鼠血液, 离心获得血清作为检测样本, 取大脑中海马组织作为检测样本。细胞模型中, 转染circRIMS2的细胞与正常HT22细胞经历OGD模型构建24 h后, 经胰酶消化后收集, 作为检测样本。通过Trizol试剂提取各检测样本中总RNA, 根

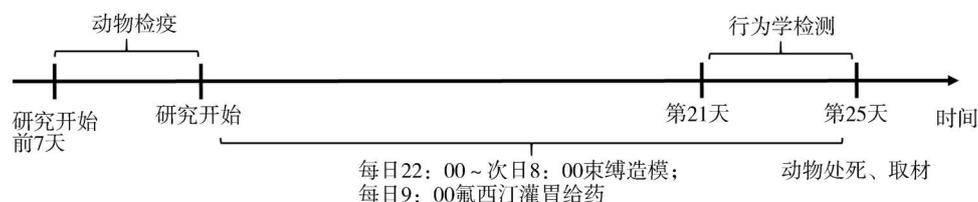


图1 抑郁样行为小鼠模型的构建流程图

据逆转录试剂盒流程将总RNA逆转录为环状DNA。将获得的环状DNA与试剂盒中试剂、正向引物和反向引物混合,微型离心机上混匀后,在RT-qPCR仪上扩增,扩增程序:95℃ 10 min 预变性,95℃ 15 s 变性,58℃ 25 s 退火,72℃ 35 s 延伸。实验中使用的引物由南京金斯瑞生物技术公司设计合成,引物序列见表1。根据RT-qPCR扩增曲线获取对应CT值(阈值循环数),以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算环状RNA与mRNA的相对表达量。

7. Western blot法检测BDNF蛋白表达:行为学测试结束后,每组随机取6只小鼠,脱颈椎处死,取大脑中海马组织作为检测样本。细胞模型中,转染circRISM2的细胞与正常HT22细胞经历OGD模型构建24 h后,经胰酶消化后收集,作为检测样本。使用蛋白裂解液分别提取各个检测样本中蛋白,经BCA检测蛋白浓度,沸水浴灭活蛋白,与上样缓冲液混合、上样。采用SDS-PAGE凝胶电泳,通过湿法将凝胶上蛋白转移至蛋白膜上,加入抗鼠BDNF抗体稀释液(1:1 000)或抗鼠 β -actin抗体稀释液(1:1 000),4℃孵育过夜。次日,洗去蛋白膜表面多余抗体,使用HRP偶联IgG(H+L)抗体(1:2 000),室温孵育30 min。洗去蛋白膜表面多余抗体,膜表面滴加超敏发光液,经化学发光成像仪显影获得对应蛋白条带。通过BDNF与 β -actin条带灰度值比较,获得各组BDNF蛋白相对表达值。

8. 流式细胞术检测细胞凋亡:OGD操作完成后,待4组HT22细胞消化后在各个细胞孔中加入Annexin V/PI试剂,室温孵育2 min,流式细胞仪上机。检测FITC与PE通道下各个细胞分布,以FITC⁺/PE⁺细胞百分比作为细胞凋亡率。

9. 统计学方法:采用SPSS 22.0软件进行统计分析,Graphpad prism 7.0软件进行图表制作。采用Shapiro-Wilktest法对计量资料进行正态性检验,所有计量资料符合正态分布,用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较使用LSD法检验。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 抑郁样行为模型构建与氟西汀治疗对小鼠行为学的影响:观察期内,各组小鼠饮食、摄水、外观形态等一切正常,模型组小鼠体重部分降低,但未超过10%。3组小鼠的糖水偏好率、悬尾测试不动时间、强迫游泳不动时间、开野测试得分比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。与对照组相比,模型组小鼠糖水偏好率、开野测试得分低,悬尾测试与强迫游泳不动时间长,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。与模型组相比,氟西汀组小鼠糖水偏好率、开野测试得分高,悬尾与强迫游泳不动时间短,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。见表2。

2. 3组小鼠血清中环状RNA水平比较:3组小鼠血清中circHIPK2、circKALRN水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。3组小鼠血清中circTRAM2、circTNIK、circTFRC、circDOCK4、circRIMS2、circSTAG1水平比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。模型组小鼠血清中circTRAM2、circTNIK与circTFRC的表达水平高于对照组, circDOCK4、circRIMS2、circSTAG1表达水平低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。氟西汀组小鼠血清中circRIMS2表达水平高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表1 各基因引物序列

基因名称	引物序列
circHIPK2	正向: CAAGACAGGGACATCGCACT; 反向: AGCATCGGAATGGGCAGTAG
circKALRN	正向: GGGACATCGCACTTCTGGAT; 反向: GCATCAGAGTGGGCAGTAGTT
circTRAM2	正向: TGACCTCAACTACATGCTCTACA; 反向: CAAATCCGTTTCACACCGACCT
circTNIK	正向: CAGGTCGTGGAAGAGCCAAT; 反向: CTCTTCCCCAGTTCCACCAC
circTFRC	正向: AACTACTGCCACTCTGATGC; 反向: ATCCAGAAGTGGCATGTCCC
circDOCK4	正向: TGTGCTCAGTGGGTATGCTG; 反向: CTGACAGCGGATCTGAAGCA
circRIMS2	正向: GCACTGCAGCCCATCTATT; 反向: CTGTAGGAGTCCAGGGGAGG
circSTAG1	正向: GGGACATCGCACTTCTGGAT; 反向: GCATCAGAGTGGGCAGTAGTT
miR-186	正向: CCAGGACATGCCCTCCATAA; 反向: AGAGTAGGGGTCAGGATGG
BDNF	正向: CCTAGGCCATCACCCACAAG; 反向: GGGCCCAATCTGAACAAGGA
GAPDH	正向: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG; 反向: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

注: BDNF 脑源性神经生长因子; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

3. 3组小鼠体内mRNA与BDNF水平的比较: 3组小鼠海马组织中circRIMS2表达水平、海马组织和血清中miR-186与BDNF mRNA表达水平比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。模型组小鼠海马组织中circRIMS2、海马组织和血清中BDNF mRNA表达水平低于对照组, 海马组织和血清中miR-186表达水平高于对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。氟西汀组小鼠海马组织中circRIMS2、海马组织和血清中BDNF mRNA表达水平高于模型组, 海马组织和血清中miR-186表达水平低于模型组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。见表4。

3组小鼠的BDNF和 β -actin蛋白条带见图2。对照组小鼠的BDNF蛋白相对表达量为(0.88 ± 0.12), 模型组为(0.21 ± 0.06), 氟西汀组为(0.57 ± 0.07), 3组比较差异有统计学意义($F=62.41, P < 0.001$); 对照组和氟西汀组的BDNF蛋白相对表达量均高于模型组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

4. OGD对circRIMS2过表达HT22细胞中mRNA与BDNF蛋白的影响: 4组HT22细胞circRIMS2、

miR-186与BDNF mRNA表达水平比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。Control+pLO-circRIMS2组细胞中circRIMS2、BDNF mRNA表达水平高于Control+pLO-circCon组, miR-186表达水平低于Control+pLO-circCon组, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。OGD+pLO-circCon组细胞中circRIMS2、BDNF mRNA表达水平低于Control+pLO-circCon组, miR-186表达水平高于Control+pLO-circCon组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。OGD+pLO-circRIMS2组circRIMS2、BDNF mRNA表达水平高于OGD+pLO-circCon组, miR-186表达水平低于OGD+pLO-circCon组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。见表5。

4组HT22细胞的BDNF和 β -actin蛋白条带见图3。Control+pLO-circCon组BDNF蛋白相对表达量为(0.64 ± 0.14), Control+pLO-circRIMS2组为(1.39 ± 0.22), OGD+pLO-circCon组为(0.15 ± 0.06), OGD+pLO-circRIMS2组为(1.58 ± 0.15), 4组比较差异有统计学意义($F=76.07, P < 0.001$)。与Control+pLO-

表2 3组小鼠行为学实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	糖水偏好率(%)	悬尾测试不动时间(s)	强迫游泳不动时间(s)	开野测试得分(分)
对照组	15	88.72 ± 6.07	23.83 ± 11.16	27.50 ± 11.97	88.92 ± 25.54
模型组	15	49.44 ± 8.99 ^a	77.50 ± 30.30 ^a	87.58 ± 34.80 ^a	33.17 ± 14.62 ^a
氟西汀组	15	72.26 ± 12.44 ^b	46.50 ± 25.30 ^b	43.33 ± 27.63 ^b	72.58 ± 25.67 ^b
F值		51.41	15.53	16.49	19.39
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a与对照组比较, $P < 0.001$; ^b与模型组比较, $P < 0.01$

表3 3组小鼠血清中环状RNA水平比较($\bar{x} \pm s$)

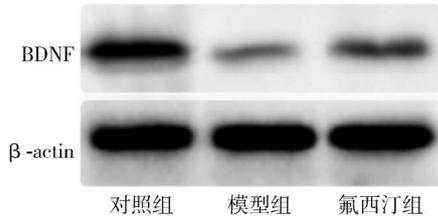
组别	只数	circHIPK2	circKALRN	circTRAM2	circTNIK	circTFRC	circDOCK4	circRIMS2	circSTAG1
对照组	6	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.36	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.28	1.00 ± 0.07
模型组	6	0.87 ± 0.12	1.05 ± 0.23	2.08 ± 0.41 ^a	2.26 ± 0.64 ^a	1.97 ± 0.24 ^a	0.43 ± 0.06 ^a	0.33 ± 0.06 ^a	0.69 ± 0.08 ^a
氟西汀组	6	0.94 ± 0.33	1.07 ± 0.25	1.78 ± 0.15	2.34 ± 0.26	2.11 ± 0.39	0.43 ± 0.15	0.55 ± 0.08 ^b	0.66 ± 0.14
F值		0.41	0.11	18.62	13.16	13.03	20.29	15.65	13.91
P值		0.680	0.900	<0.001	0.002	0.002	<0.001	0.001	0.001

注: ^a与对照组比较, $P < 0.05$; ^b与模型组比较, $P < 0.05$

表4 3组小鼠体内circRIMS2、miR-186与BDNF mRNA水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	海马组织			血清	
		circRIMS2	miR-186	BDNF mRNA	miR-186	BDNF mRNA
对照组	6	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.31	1.00 ± 0.33	1.00 ± 0.39	1.00 ± 0.27
模型组	6	0.27 ± 0.05 ^a	2.47 ± 0.45 ^a	0.34 ± 0.11 ^a	3.09 ± 0.56 ^a	0.46 ± 0.09 ^a
氟西汀组	6	0.62 ± 0.07 ^b	1.38 ± 0.26 ^b	0.71 ± 0.13 ^b	1.22 ± 0.40 ^b	0.81 ± 0.13 ^b
F值		31.82	18.84	9.46	25.09	8.69
P值		<0.001	<0.001	0.006	<0.001	0.008

注: BDNF 脑源性神经生长因子; ^a与对照组比较, $P < 0.01$; ^b与模型组比较, $P < 0.01$



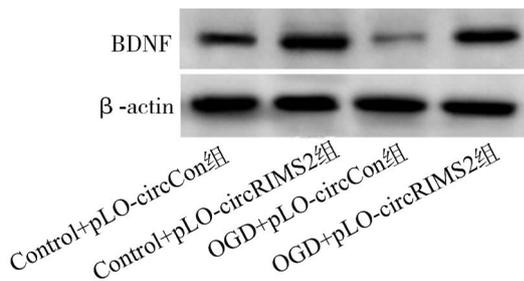
注: BDNF 脑源性神经营养因子

图2 3组小鼠海马组织中BDNF和β-actin蛋白Western blot电泳条带

表5 4组HT22细胞circRIMS2、miR-186与BDNF mRNA水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	circRIMS2	miR-186	BDNF mRNA
Control+pLO-circCon组	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.33
Control+pLO-circRIMS2组	3.91 ± 0.74 ^a	0.47 ± 0.31 ^a	1.75 ± 0.42 ^a
OGD+pLO-circCon组	0.35 ± 0.08 ^a	3.97 ± 0.84 ^a	0.20 ± 0.12 ^a
OGD+pLO-circRIMS2组	3.48 ± 1.26 ^b	1.33 ± 0.41 ^b	1.89 ± 0.31 ^b
F值	23.14	37.53	24.73
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注: BDNF 脑源性神经营养因子; OGD 糖氧剥夺; ^a与Control+pLO-circCon组比较, $P < 0.001$; ^b与OGD+pLO-circCon组比较, $P < 0.001$



注: BDNF 脑源性神经营养因子; OGD 糖氧剥夺

图3 4组HT22细胞BDNF和β-actin蛋白Western blot电泳条带

circCon相比, Control+pLO-circRIMS2组BDNF蛋白相对表达量高, OGD+pLO-circCon组BDNF蛋白相对表达量低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。OGD+pLO-circRIMS2组BDNF蛋白相对表达量高于OGD+pLO-circCon组, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

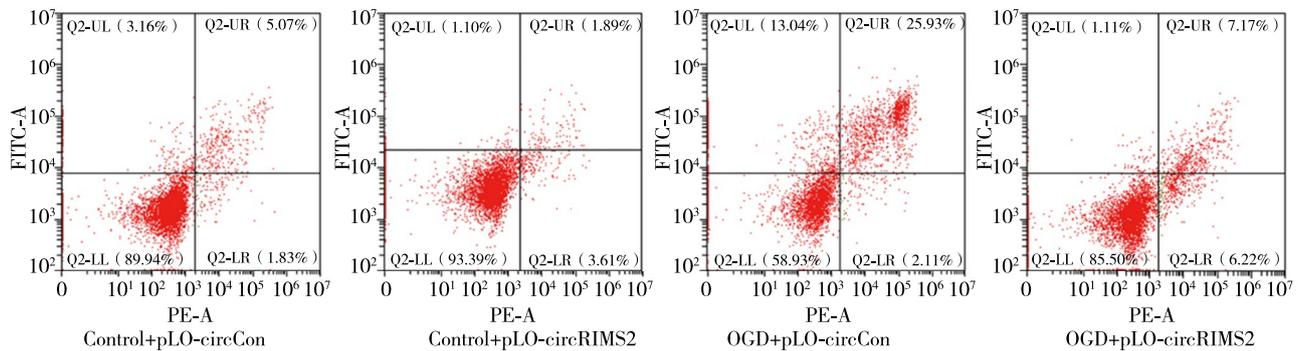
5. OGD对circRIMS2过表达的HT22细胞凋亡的影响: 4组HT22细胞凋亡流式细胞检测结果见图4。Control+pLO-circCon组细胞凋亡率为(5.18 ± 1.58)%, Control+pLO-circRIMS2组为(3.94 ± 1.38)%, OGD+pLO-circCon组为(27.43 ± 6.54)%, OGD+pLO-circRIMS2组为(9.39 ± 3.29)%, 4组比较差异有统计学意义($F = 32.65, P < 0.001$)。Control+pLO-circCon组和OGD+pLO-circ-RIMS2组细胞凋亡率低于OGD+pLO-circCon组, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

讨论 本研究通过CRS构建小鼠抑郁样行为模型, 结果显示模型组小鼠糖水偏好率减低, 即小

鼠出现与临床抑郁症患者兴趣缺失类似的症状^[14]。此外, 模型组小鼠悬尾不动时间与强迫游泳不动时间增加, 提示小鼠出现了与临床抑郁症患者求生欲丧失相似的症状。同时, 开野测试中小鼠评分降低, 提示小鼠空间探索欲降低。与模型组相比, 氟西汀组小鼠糖水偏好率增加, 悬尾与强迫游泳不动时间减少, 开野测试评分增加, 表明小鼠抑郁样行为模型构建成功, 且氟西汀给药治疗可改善小鼠抑郁样行为。

为研究环状RNA与抑郁样行为小鼠的关系, 本研究检测了抑郁症中一些易感环状RNA含量^[9-10]。结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠血清中circTRAM2、circTNIK、circTFRC含量高于对照组, circDOCK4、circRIMS2、circSTAG1含量低于对照组, circHIPK2与circKALRN含量与对照组比较差异无统计学意义。本研究结果与Huang等^[10]的研究结果存在部分差异。Huang等^[10]的研究结果显示, circSTAG1、circDOCK4、circKALRN与circDOCK2基因在慢性应激诱发的抑郁样模型小鼠中表达明显降低。一方面可能与慢性应激中情绪因素诱发N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine)在细胞核中表达降低相关, 另一方面也可能与Huang^[10]等在研究中使用雄性动物, 与本研究中雌性动物之间的性别存在差异有关。此外, 本研究结果显示, 氟西汀组小鼠血清中仅circRIMS2低于模型组, 提示氟西汀在小鼠体内发挥抗抑郁行为的作用可能与circRIMS2相关。

与竞争性内源RNA类似, 环状RNA作为海绵与miRNA结合并限制miRNA活性^[15-16]。相关研究显示, miR-186过表达会导致LUC-cRIMS2转染细胞荧光素酶活性明显降低, 但LUC-cRIMS2-mutant并无明显变化, 提示circRIMS2可与miR-186结合^[17]。此外, miR-186已被报道在多种中枢神经系统疾病中与神经功能密切相关。Sato等^[18]证实miR-186在AD患者血液和前额皮层中的表达水平高于健康人, 与AD的病理发展密切相关。另外, Niu等^[17]也证实了血管认知功能障碍患者及模型小鼠脑组织中miR-186含量增加。本研究结果显示, miR-186在模型组小鼠血清和脑组织中表达水平低于对照组。本研究结果还显示, circRIMS2过表达的Control+pLO-circRIMS2组、OGD+pLO-circRIMS2组HT22细胞的miR-186含量分别低于Control+pLO-circCon组和OGD+pLO-circCon组。以上结果提示miR-186含量与circRIMS2含量存在一定的相关性。



注: OGD糖氧剥夺

图4 4组HT22细胞凋亡流式细胞图

miRNA通过与靶基因mRNA结合,调控靶蛋白的翻译与表达,参与多种细胞生长、分化、凋亡等下游信号转导,在人类疾病的发生、发展中发挥重要的调控作用^[19]。生物信息学研究显示, BDNF mRNA表达受miR-186调控影响^[14]。BDNF是一类促进神经元存活、维持突触完整性的神经营养物质,可提高记忆储存和发挥神经保护作用^[20]。有证据表明, BDNF是抑郁症患者脑脊液中缺失的关键介质, BDNF缺乏诱发的神经元凋亡是造成抑郁症的重要因素^[21]。本研究结果显示,模型组小鼠血清和海马组织中BDNF mRNA与蛋白表达水平低于对照组,氟西汀组小鼠血清中BDNF mRNA与蛋白表达水平高于模型组。此外,过表达circRIMS2组BDNF mRNA表达,减轻OGD造成的细胞凋亡。提示circRIMS2含量减少造成的BDNF mRNA含量降低可能是诱发小鼠抑郁样行为的重要原因。

综上所述, circRIMS2基因与小鼠抑郁样行为的发展和改善存在关联,其机制可能是circRIMS2表达降低,解除了对miR-186的海绵作用,导致BDNF mRNA转录与翻译减少,最终诱发神经元凋亡,造成小鼠出现抑郁样行为。通过慢病毒载体pLO-circCon、pLO-circRIMS2转染提高circRIMS2基因表达, miR-186含量降低, BDNF mRNA表达提高,神经元凋亡率降低。然而,本研究也存在一定局限性,本研究未通过生物信息学分析,在本实验室平台利用双荧光素酶实验和质粒转染验证circRIMS2与miR-186及BDNF mRNA之间的结合关系,且并未对BDNF蛋白表达水平进行检测。此外,本研究也并未在动物基础上,利用质粒诱导小鼠海马组织中circRIMS2基因过表达,验证circRIMS2过表达对小鼠抑郁样行为的正向调节作用。因此,仍有大量结果有待进一步探索分析。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计为贾丽、梁路, 研究实施、资料收集为贾丽、魏东、梁路, 论文撰写、修订为贾丽, 梁路审核

参 考 文 献

- [1] GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Psychiatry*, 2022, 9(2): 137-150. DOI: 10.1016/S2215-0366(21)00395-3.
- [2] Peng GJ, Tian JS, Gao XX, et al. Research on the pathological mechanism and drug treatment mechanism of depression [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13(4): 514-523. DOI: 10.2174/1570159x1304150831120428.
- [3] Shi Y, Wang Q, Song R, et al. Non-coding RNAs in depression: Promising diagnostic and therapeutic biomarkers [J]. *EBioMedicine*, 2021, 71: 103569. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103569.
- [4] Xue C, Li G, Lu J, et al. Crosstalk between circRNAs and the PI3K/AKT signaling pathway in cancer progression [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 400. DOI: 10.1038/s41392-021-00788-w.
- [5] Zhang Z, Guo R, Wang Y, et al. Diagnostic value of circRNAs as effective biomarkers in human cardiovascular disease: an updated meta-analysis [J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(3): 446-459. DOI: 10.7150/ijms.67094.
- [6] Januar V, Saffery R, Ryan J. Epigenetics and depressive disorders: a review of current progress and future directions [J]. *Int J Epidemiol*, 2015, 44(4): 1364-1387. DOI: 10.1093/ije/dyu273.
- [7] Huang R, Zhang Y, Bai Y, et al. N6-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. DOI: 10.1016/j.biopsych.2020.02.018.
- [8] Danan M, Schwartz S, Edelheit S, et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): 3131-3142. DOI: 10.1093/nar/gkr1009.
- [9] Gan H, Lei Y, Yuan N, et al. Circular RNAs in depression: biogenesis, function, expression, and therapeutic potential [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111244. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111244.

- [10] Huang R, Zhang Y, Bai Y, et al. N6-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. DOI: 10.1016/j.biopsych.2020.02.018
- [11] Duan N, Zhang Y, Tan S, et al. Therapeutic targeting of STING-TBK1-IRF3 signalling ameliorates chronic stress induced depression-like behaviours by modulating neuroinflammation and microglia phagocytosis[J]. Neurobiol Dis, 2022, 169: 105739. DOI: 10.1016/j.nbd.2022.105739.
- [12] Menezes EC, Shah R, Laughlin L, et al. Reduced motivation in perinatal fluoxetine-treated mice: a hypodopaminergic phenotype[J]. J Neurosci, 2021, 41(12): 2723-2732. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2608-20.2021.
- [13] 杨娜娜, 汤耀辉, 卢国华, 等. 建立糖尿病并发抑郁症小鼠模型及其行为学评价[C]. 中国实验动物学会. 第十六届中国实验动物科学年会论文集, 2023: 2. DOI: 10.26914/c.cnkihy.2023.023702.
- [14] Toenders YJ, Schmaal L, Nawijn L, et al. The association between clinical and biological characteristics of depression and structural brain alterations[J]. J Affect Disord, 2022, 312: 268-274. DOI: 10.1016/j.jad.2022.06.056.
- [15] Lu S, Zhu N, Guo W, et al. RNA-Seq revealed a circular RNA-microRNA-mRNA regulatory network in hantaan virus infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 97. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00097.
- [16] Du WW, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(6): 2846-2858. DOI: 10.1093/nar/gkw027.
- [17] Niu Y, Wan C, Zhang J, et al. Aerobic exercise improves VCI through circRIMS2/miR-186/BDNF-mediated neuronal apoptosis[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 4. DOI: 10.1186/s10020-020-00258-z.
- [18] Satoh J, Kino Y, Niida S. MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data[J]. Biomark Insights, 2015, 10: 21-31. DOI: 10.4137/BMLS25132.
- [19] Hailu FT, Karimpour-Fard A, Toni LS, et al. Integrated analysis of miRNA-mRNA interaction in pediatric dilated cardiomyopathy[J]. Pediatr Res, 2022, 92(1): 98-108. DOI: 10.1038/s41390-021-01548-w.
- [20] Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor[J]. Cell, 2013, 155(7): 1596-1609. DOI: 10.1016/j.cell.2013.11.030.
- [21] Yang B, Wang L, Nie Y, et al. proBDNF expression induces apoptosis and inhibits synaptic regeneration by regulating the RhoA-JNK pathway in an in vitro post-stroke depression model[J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 578. DOI: 10.1038/s41398-021-01667-2.

(收稿日期: 2023-09-26)

(本文编辑: 郑圣洁)

· 消息 ·

欢迎订阅2024年《神经疾病与精神卫生》杂志

《神经疾病与精神卫生》杂志是神经、精神科学及精神卫生领域的学术性期刊,国内外公开发行人,2006年被中国科学技术信息研究所收录为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。本刊坚持党的出版方针和卫生工作方针,遵循学科发展规律,以提高杂志质量、扩大社会效益为使命,及时反映科学研究的重大进展,更好地促进国内外学术交流。主要读者对象为广大神经科学、精神科学及精神卫生领域中从事基础、临床医学、教学、科研的工作者及学生。报道内容包括相关各学科领先的教学、科研成果及临床诊疗经验。主要栏目有专家论坛(述评)、论著、学术交流、短篇报道、综述、病例报告、会议纪要、国内外学术动态等。

《神经疾病与精神卫生》杂志国内邮发代号为82-353,由北京市邮政局发行;国外发行代号M1690,由中国国际图书贸易总公司发行。每期定价15.00元,全年180.00元。欢迎直接通过本社订阅。

银行汇款: 开户行: 中国建设银行建华支行 户名: 《神经疾病与精神卫生》杂志社

账号: 23001626251050500949

联系电话: (010)83191160