DOI:10.16016/j.2097-0927.202503077

circ-Tns3/miR-671-5p/sirt1轴介导阿尔茨海默病神经元损伤的分子机制

卢 静[1],刘雅婷[1],冯祥谦[1],王东林[1],廖旗荣[1],杨红岩[1],周华东[1,2] [1]蚌埠医科大学第一附属医院神经内科,安徽 蚌埠;[2]陆军特色医学中心(第三军医大学大坪医院)神经内科,重庆

[**摘要**] **目的** 探讨环状RNA circ-Tns3在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)小鼠中的表达水平和在Aβ诱导的神经元损伤中的作用。**方法** 选取6月龄雄性体质量23~26 g的APP/PS1转基因AD小鼠和野生型(WT)小鼠各5只。采用Morris水迷宫检测学习记忆能力,免疫组化染色观察脑海马组织Aβ斑块数量。提取小鼠脑总RNA检测circRNA的差异表达,并进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路分析。通过RT-qPCR验证前6位差异显著的circRNA。用Aβ1-42处理神经元细胞建立AD体外细胞模型,转染circ-Tns3小干扰RNA(si-circ-Tns3)进入Aβ1-42处理神经元细胞中达到敲低circ-Tns3的目的。RT-qPCR测定circ-Tns3和miR-671-5p表达水平。CCK-8和TUNEL染色检测细胞活力和凋亡细胞数量,ELISA检测炎性因子IL-6、IL-1β和TNF-α的水平。双荧光素酶报告实验和RNA结合蛋白免疫沉淀法(RIP测定)验证circ-Tns3和miR-671-5p之间的相互作用。Western Blot检测sirt1蛋白表达水平。**结果** 6月龄AD小鼠出现明显认知障碍和脑Aβ过度沉积($P<0.01$)。AD小鼠和WT小鼠鉴定出269个差异表达的circRNA,其中159个上调,110个下调。GO和KEGG的富集分析显示,差异表达的circRNA主要参与突触传递、记忆功能和胆碱能突触等信号通路。circ-Tns3表达不仅在AD小鼠脑组织中显著增加,也在Aβ1-42处理的神经元中表达增加。在细胞实验中,敲低circ-Tns3显著增加了Aβ1-42处理的神经元的细胞活力和减少了凋亡细胞,降低MDA含量,增加SOD活性,降低了IL-6、IL-1β和TNF-α的含量($P<0.01$)。通过starBase数据库预测circ-Tns3和miR-671-5p具有互补序列,双荧光素酶报告实验和RIP测定证实circ-Tns3和miR-671-5p之间存在相互作用。生信数据库预测miR-671-5p和sirt1具有互补序列。Western Blot检测显示,在Aβ1-42处理的神经元中,敲低circ-Tns3后,sirt1蛋白表达增加($P<0.01$)。此外,在Aβ1-42处理的神经元中,敲低circ-Tns3后再加入miR-671-5p抑制剂,sirt1蛋白表达水平明显下降($P<0.01$)。**结论** circ-Tns3在AD小鼠和AD体外细胞模型中高表达,敲低circ-Tns3改善了神经元损伤,circ-Tns3可能通过结合miR-671-5p调节sirt1蛋白表达参与神经元的损伤机制。

[**关键词**] 阿尔茨海默病;环状RNA;神经元

[**中图法分类号**] R341;R394.3;R745.7 [**文献标志码**] A

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81771177)

[**通信作者**] 周华东,E-mail:zhouhuad@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2025, 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/)

引用格式:卢静,刘雅婷,冯祥谦,等. circ-Tns3/miR-671-5p/sirt1轴介导阿尔茨海默病神经元损伤的分子机制[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(16):1872-1882. DOI:10.16016/j.2097-0927.202503077.

Citation:LU J,LIU Y T,FENG X Q,*et al*. Molecular mechanism of circ-Tns3/miR-671-5p/sirt1 axis mediating neuronal damage in Alzheimer's disease[J]. J Army Med Univ,2025,47(16):1872-1882. DOI:10.16016/j.2097-0927.202503077.

Molecular mechanism of circ-Tns3/miR-671-5p/sirt1 axis mediating neuronal damage in Alzheimer's disease

LU Jing[1], LIU Yating[1], FENG Xiangqian[1], WANG Donglin[1], LIAO Qirong[1], YANG Hongyan[1], ZHOU Huadong[1,2]
[1]Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu, Anhui; [2]Department of Neurology, Army Medical Center of PLA/Daping Hospital of Third Military Medical University, Chongqing, China

[**Abstract**] Objective To investigate the expression level of circular RNA circ-Tns3 in Alzheimer's disease (AD) mice and its role in Aβ-induced neuronal damage. Methods Five APP/PS1 transgenic AD mice and 5 wild-type (WT) mice, weighting of 23~26 g and aged 6 months were subjected in the study. Morris water maze test was used to assess learning and memory abilities, and immunohistochemical staining was performed to observe the number of Aβ plaques in the hippocampal tissue. Subsequently, total RNA was extracted from the brains to detect the differential expression of circRNAs between AD and WT mice, and the results were further analyzed with Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. The top 6 differentially expressed circRNAs were validated by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). In *in vitro* experiments, Aβ1-42 was used to treat neuronal cells to establish AD cell model, and si-circ-Tns3 was transfected into Aβ1-42-treated neuronal cells to knock down circ-Tns3. RT-qPCR was used to determine the expression levels of circ-Tns3 and miR-671-5p. Cell viability and apoptotic rate were detected by CCK-8 assay and TUNEL staining, respectively. The levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured using corresponding kits, and the levels of inflammatory factors IL-6, IL-1β, and TNF-α were detected with ELISA. The interaction between circ-Tns3 and miR-671-5p was verified by dual-luciferase reporter assay and RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) assay. The expression level of Sirt1 protein was detected by Western blotting. Results The 6-month-old AD mice exhibited significant cognitive impairment and Aβ deposition (P<0.01). There were 269 differentially expressed circRNAs identified between AD and WT mice, of which 159 were up-regulated and 110 down-regulated. GO and KEGG enrichment analyses showed that these differentially expressed circRNAs were mainly involved in synaptic transmission, memory, and cholinergic synapse signaling pathways. The expression of circ-Tns3 was significantly increased not only in the brain tissue of AD mice but also in neuronal cells after Aβ1-42 treatment. In cellular experiments, knockdown of circ-Tns3 significantly reduced cell viability and number of apoptotic cells in Aβ1-42-treated neuronal cells, decreased MDA content, increased SOD activity, and reduced the levels of IL-6, IL-1β, and TNF-α (P<0.01). The starBase database predicted that circ-Tns3 and miR-671-5p have complementary sequences, and dual-luciferase reporter and RIP assays confirmed their interaction. The bioinformatics database predicted that miR-671-5p and sirt1 have complementary sequences. Western blotting indicated that in neuronal cells treated with Aβ1-42, the expression of sirt1 was increased after knockdown of circ-Tns3 (P<0.01). In Aβ1-42-treated neuronal cells, after knockdown of circ-Tns3, addition of miR-671-5p inhibitor significantly decreased the expression level of sirt1 protein (P<0.01). Conclusions circ-Tns3 is highly expressed in AD mice and cell model of AD. Knocking circ-Tns3 down improves neuronal damage. circ-Tns3 may be involved in the neuronal damage through regulating sirt 1 protein by binding to miR-671-5p.

[**Key words**] Alzheimer's disease; circular RNA; Neuron

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81771177). Corresponding author: ZHOU Huadong, E-mail: zhouhuad@tmmu.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是最常见的神经退行性疾病,伴有认知障碍和记忆力减退[1]。其病理特征是脑组织β淀粉样蛋白(amyloid β,Aβ)过度沉积,以及神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles,NFT)中的tau蛋白过度磷酸化(p-tau)[2]。尽管过去对AD的病理机制和治疗进行了大量研究,但目前还没有效果显著的治疗策略。

circRNA是一种具有高度稳定的环状结构的单链非编码RNA分子,可以通过多种机制调控蛋白质编码基因的表达,可以与miRNA竞争性结合,进而影响微调mRNA的表达[3]。近年来的研究发现,circRNA在神经元和突触体中含量丰富[4],并且在AD、帕金森等衰老相关的神经退行性疾病中发挥重要的调节作用。例如,circ-0003611通过与miR-885-5p结合加重Aβ诱导的神经元细胞的神经元损伤[5],circ-BPTF可以通过miR-138-5p/p62轴改善AD小鼠的学习和记忆障碍[6]。除此之外,miRNA在脑部疾病中的关键作用也已被广泛发现[7-8]。这些研究为circRNA作为AD诊断和治疗的潜在生物标志物提供了新的研究方向。

目前circRNA在AD中的作用机制仍有待探索,本研究通过基因测序筛选AD中差异表达的circRNA,发现circ-Tns3在AD中显著上调。有研究证明circ-Tns3在肿瘤等疾病中起重要作用[9-10],但是否在AD中发挥作用尚不清楚。本研究假设circ-Tns3可能在AD的发生机制中有重要作用,以Aβ1-42处理的神经元建立体外AD细胞模型,探究circ-Tns3对神经元损伤的作用机制,以期为AD的诊断和治疗靶点提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取5只6月龄APP/PS1转基因雄性小鼠作为AD组,同窝6月龄C57BL小鼠雄性小鼠5只作为WT组。实验动物均购自南京君科生物工程有限公司,动物许可证号:SYXK(渝)2017-0002。由陆军特色医学中心国家重点实验室饲养,室内温度控制在20~25 ℃,湿度50%~60%,饲喂标准鼠用饲料。实验过程中遵循实验动物伦理规定。

1.2 细胞培养、转染、分组

取刚出生的小鼠,用75%乙醇消毒后无菌条件分离小鼠脑组织,剪碎,胰蛋白酶37 ℃消化,30 min后用含10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化,过筛,1 000 r/min离心5 min,去上清,加入神经元培养基,接种于已用0.1 mg/mL多聚赖氨酸包被的96孔板,培养48 h后加2.5 mg/L阿糖胞苷纯化神经细胞,取第7天细胞用于实验。用30 μmol/L的Aβ1-42寡聚体作用于神经元细胞24 h复制AD细胞模型[11]。采用脂质体Lipofectamin2000将si-NC、si-circ-Tns3分别转染至神经元细胞。转染48 h后收集细胞样本。用含30 μmol/L Aβ1-42的DMEM培养基对转染细胞进行24 h诱导处理。接受Aβ处理的转染细胞根据转染序列差异分为Aβ+si-NC组和Aβ+si-circ-Tns3组;未转染但经相同浓度Aβ处理的神经元细胞设为Aβ组;正常培养未作处理的神经元作为空白对照组(control)。

1.3 主要试剂

胎牛血清、DMEM培养基、100 μg/mL青霉素-链霉素购自美国Gibco公司;Aβ1-42购自美国Sigma-Aldrich公司;小干扰RNA(si-circ-Tns3)、miR-671-5p模拟物(miR-671-5pmimics)、miR-671-5p抑制物(anti-miR-671-5p)由上海吉玛公司设计合成;Trizol试剂和SuperScript™IIIRTmastermix试剂盒购自美国Invitrogen公司;CCK-8试剂盒购自长沙艾碧维生物科技有限公司;MDA和SOD检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;IL-1β、IL6和TNF-α的ELISA试剂盒购自ABclonal公司;TUNEL试剂盒购于上海碧云天生物技术公司;双荧光素酶试剂盒购自美国Promega公司;兔源一抗sirt1、GAPDH和HRP标记的山羊抗兔二抗购自Abcam公司。

1.4 水迷宫实验

采用Morrise水迷宫实验对WT组和AD组小鼠进行学习和记忆功能评估。在装满水的圆形水池中,水池顺时针分为4个相等的象限。包含一个黑色圆柱形平台,平台置于第二象限且水面高度在平台上方1 cm左右。实验分为定位航行实验和空间探索实验两部分,第1到第5天进行定位航行实验,将每只小鼠(面向池壁)分别从第三、第四象限放入水中,小鼠从入水到成功爬上平台所需的时间即为逃避潜伏期。每次测试时间为60 s,若超过60 s小鼠仍未找到平台,则在实验者的帮助下引导它登上平台,并在平台上停留15 s。第6天撤去平台进行空间探索实验,选取第四象限作为小鼠入水点,记录60 s内小鼠穿越平台次数及目标象限停留时间并进行统计分析。

1.5 免疫组化

将小鼠海马组织的石蜡切片依次进行脱蜡处理,随后用PBS缓冲液进行清洗,再经过抗原修复步骤,再次使用PBS缓冲液进行清洗。之后,使用封闭液在室温条件下对切片进行封闭,以减少非特异性结合。接着,分别加入稀释比例为1∶100的兔抗小鼠一抗和稀释比例为1∶200的二抗,在室温下孵育1 h,使抗体

与目标抗原充分结合。随后采用DAB显色反应使抗原-抗体复合物可见,再对细胞核进行复染以便于观察和定位。完成显色后,进行常规的脱水处理和封片步骤,最后在显微镜下对染色后的切片进行观察和拍照。

1.6 RT-qPCR检测

采用Trizol试剂从WT、APP/PS1小鼠和神经元中提取RNA,按照SuperScript™IIIRT转录试剂盒说明书步骤,反转录为cDNA,利用2×PCRmastermix试剂盒对cDNA产物进行RT-qPCR,分别以GAPDH和U6作为内参。采用$2^{-\triangle\triangle ct}$方法计算相对表达水平,引物序列信息见表1。

表1 目的基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes

目的基因	引物序列
circ-Tns3	正向:5′-CACGTGTCCGCACAACTTTA-3′
	反向:5′-GGAATACTTGCAGGCTCGGC-3′
miR-671-5p	正向:5′-TATAGGAAGCCCTGGAGGG-3′
	反向:5′-CTCAACTGGTGTCGTGGA-3′
sirt1	正向:5′-GCCTCATCTGCATTTTGATG-3′
	反向:5′-TCTGGCATGTCCCACTATCA-3′
circ-Snca	正向:5′-CTCCCTAGGAAGAGGAGCGAA-3′
	反向:5′-GGCACATTGGAACTGAGCAC-3′
circ-Gabra5	正向:5′-GGACGTTCCTCAAACCCAGA-3′
	反向:5′-GACAAGGAGGGTTTGGGTCA-3′
circ-Pbx3	正向:5′-CAGGAAGCAGGACATCGGC-3′
	反向:5′-GGCTCCTCTGATGCTGAGAC-3′
circ-Gm11892	正向:5′-TCTTGTCATCGAAGACCTGCT-3′
	反向:5′-TCAACATTGAGGCACATTCCT-3′
circ-Meg3	正向:5′-CAGAGCGCTTCTGAAGACCAA-3′
	反向:5′-GCAGTAGGGACAGCCTCATTG-3′
U6	正向:5′-AGAGCCTGTGGTGTCCG-3′
	反向:5′-CATCTTCAAAGCACTTCCCT-3′
GAPDH	正向:5′-AATGGTGAAGGTCGGTGTGA-3′
	反向:5′-CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA-3′

1.7 GO功能分析和KEGG通路富集分析

GO分析是一种常用的筛选潜在生物过程的方法,包括生物过程(biological process,BP)、细胞成分(cellular component,CC)和分子功能(molecular function,MF)三个方面。KEGG通路富集分析则用于系统地注释基因功能,并实现生物通路的可视化。为了对筛选出的差异表达基因(DEGs)进行深入分析,我们采用了DAVID在线数据库(David,http://david.abcc.ncifcrf.gov/)中的GO功能及KEGG通路富集分析模块对筛选出的DEGs进行分析。

1.8 ELISA检测细胞因子

使用ELISA试剂盒分析IL-1β、IL-6和TNF-α细胞因子的水平。通过离心收集细胞上清液,然后与ELISA板中的抗体混合物在37 ℃下孵育1 h。洗涤细胞,然后与100 μL反应在ELISA板中避光10 min的底物。加入终止溶液(100 μL)后,测试吸光度以评估细胞因子水平。

1.9 试剂盒检测SOD、MDA水平

各组神经元细胞处理完毕后,分别收集细胞培养液和细胞。向含有神经元细胞沉淀的离心管中加入1 mL提取液,超声波破碎细胞,超低温离心机10 000 r/min离心10 min收集上清液,严格按照试剂盒说明书操作方法,使用MDA、SOD试剂盒测定。

1.10 CCK-8法检测细胞活力

将转染并处理的细胞以5×10³个/孔的数接种到96孔板中,孵育24 h后,向每个孔中加入10 μL CCK-8溶液。随后,将细胞在5% CO_2、37 ℃下孵育4 h。采用酶标仪检测450 nm各孔吸光度值。

1.11 TUNEL染色

将细胞于4%中性甲醛室温中固定10 min,加入PBS洗涤细胞3次,每次5 min。随后进行透化和封闭处理。滴加按1∶200稀释的一抗MAP2(50 μL)4 ℃过夜;PBS洗涤3次,滴加1∶200稀释的山羊抗兔荧光二抗避光室温孵育2 h,PBS洗涤3次,在样品上加50 μL的TUNEL检测液37 ℃避光孵育60 min,PBS洗涤3次,用含DAPI的抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。

1.12 Western blot分析sirt1蛋白表达

各组神经元细胞处理完毕后收集细胞样本,加入RIPA裂解缓冲液提取蛋白质,蛋白质浓度用BCA蛋白质测定试剂盒测定。用8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离40 μg蛋白质并转移到PVDF膜上。将膜在室温下封闭在5%脱脂牛奶中1 h,分别使用兔源一抗sirt1和GAPDH,4 ℃孵育12 h。接着使用TBST洗涤3次,除去未结合的一抗。使用HRP标记的山羊抗兔二抗室温下孵育1~2 h,ECL发光试剂盒显色并分析条带。

1.13 双荧光素酶报告实验

通过在线数据库Starbase预测显示circ-Tns3与miR-671-5p存在结合位点。设计并合成circ-Tns3的野生型荧光素酶质粒(circ-Tns3WT)和突变型荧光素酶质粒(circ-Tns3MUT),然后将相应质粒分别与miR-NC和miR-671-5p mimics共转染至神经元细胞中,严格按照试剂盒说明书操作方法,48 h后使用双荧光素酶报告试剂盒分析转染后细胞相对荧光素酶活性。

1.14　RNA结合蛋白免疫沉淀实验

采用蛋白质免疫沉淀试剂盒对神经元细胞进行处理。将细胞裂解物置于含有磁珠的RIP缓冲液中进行孵育，其中磁珠已与人抗Ago2抗体结合，而正常IgG则作为对照组。通过蛋白酶K的作用，分离出免疫沉淀的RNA。之后，提取并纯化得到的RNA，再利用实时PCR进行测量。

1.15　统计学处理

使用GraphPad Prism10.0进行统计分析。结果采用$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用独立样本t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　APP/PS1转基因小鼠学习记忆下降和Aβ沉积增加

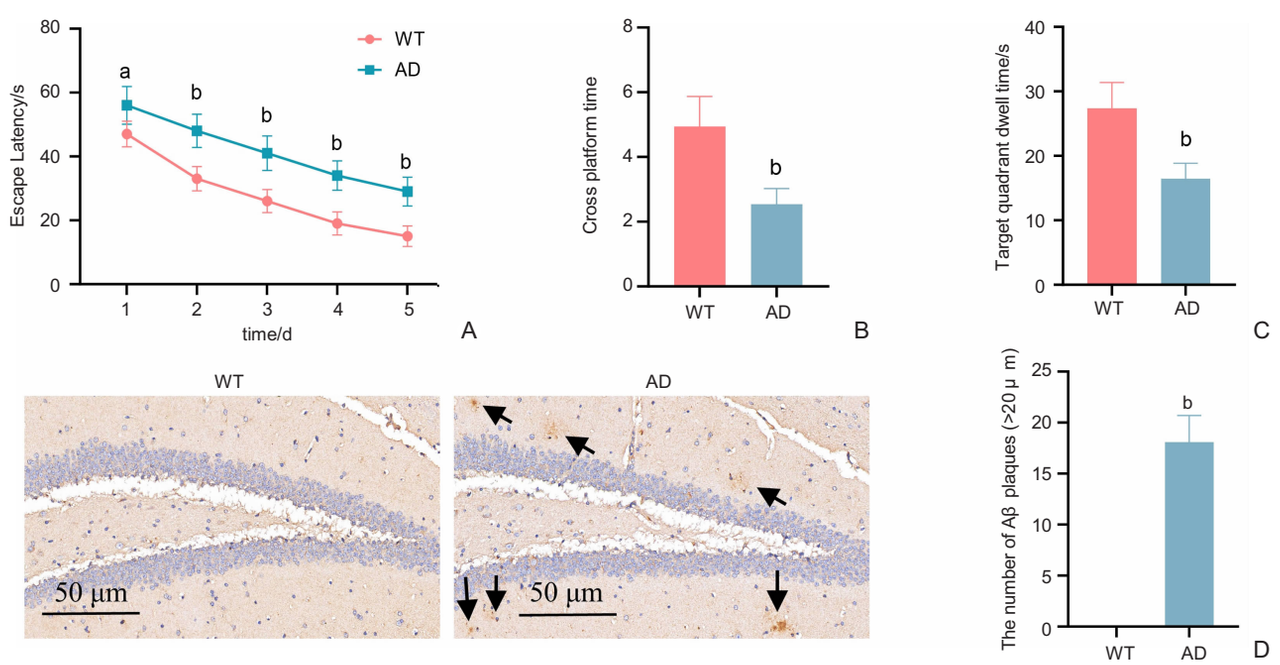
Morris水迷宫行为学检测显示，2组小鼠的逃避潜伏期连续5 d均呈现下降趋势，与WT组小鼠比较，AD组小鼠的逃避潜伏期明显延长($P<0.05$，$P<0.01$，图1A)，同时AD组小鼠穿越平台次数明显减少和目标象限停留时间明显缩短($P<0.01$，图1B、C)。免疫组化检测显示，与WT组小鼠比较，AD组小鼠海马组织Aβ斑块数量显著增加($P<0.01$，图1D)。以上结果提示6月龄AD小鼠脑内Aβ含量显著增高，存在明显的学习记忆障碍。

2.2　circ-Tns3在AD鼠脑组织及AD体外细胞模型中表达上调

通过对6月龄AD小鼠和WT小鼠的脑组织进行了circRNA测序，并根据差异倍数的绝对值>1.2(|log2FC|>0.263)且$P<0.05$，共筛选出269个差异有统计学意义的circRNA，其中159个上调，110个下调。根据差异表达的circRNA绘制热图和火山图(图2A、B)。差异表达前10位的circRNA基本信息见表2。

GO分析提示AD小鼠与WT小鼠差异表达的circRNA主要富集于突触传递、蛋白质结合和记忆等方面。KEGG分析提示AD小鼠与WT小鼠差异表达的circRNA主要富集于焦点粘连、胆碱能突触、磷脂酰肌醇等信号通路(图2C、D)。选取差异表达显著的前6位circRNA进行qRT-PCR验证，图2E结果显示，与WT鼠相比，AD小鼠脑组织中circRNA-Gabra5、circRNA-Snca、circRNA-Tns3表达明显上调($P<0.05$)，circRNA-Pbx3、circRNA-Gm11892表达明显下调($P<0.01$)，除了circRNA-Meg3有下调趋势但差异无统计学意义($P>0.05$)，其余circRNA的变化趋势与基因芯片结果一致，并且circRNA-Tns3在AD脑组织表达更明显。

上述研究证实circRNA-Tns3在AD小鼠脑组织中较对照组明显上调。通过Aβ1-42诱导神经元细胞构建AD细胞模型，进一步分析circ-Tns3在Aβ1-42处理的



A: water maze test detecting the escape latency of mice in each group; B: water maze test detecting the platform crossings of mice in each group; C: water maze test detecting the time in the target quadrant of mice in each group; D: Immunohistochemical assay of the number of Aβ plaques in each group of mice. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, in comparison with the WT group; Arrow indicates Aβ plaque

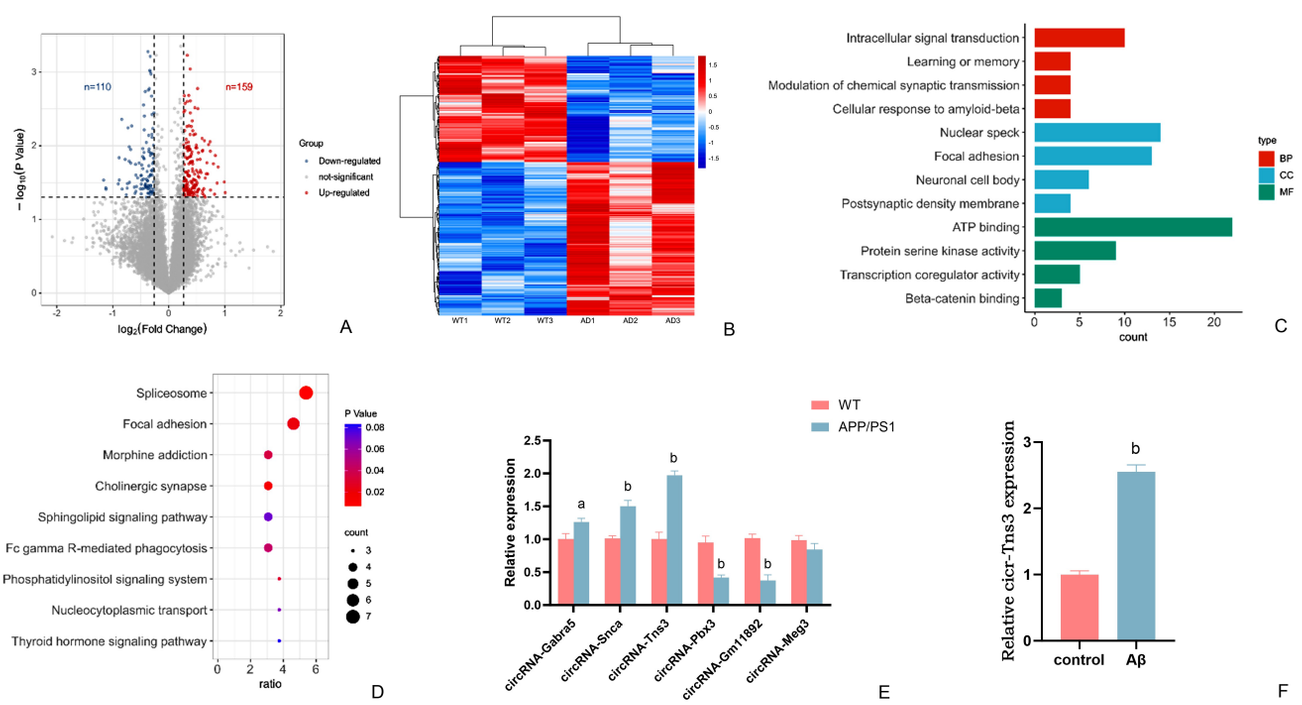
图1　APP/PS1转基因小鼠行为学和病理学改变 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Figure 1　Behavioral and pathological changes in APP/PS1 transgenic mice (n=5, $\bar{x}\pm s$)

表 2　差异表达的前 10 位的 circRNA 的基本信息

Table 2　Basic information of the top 10 differentially expressed circRNAs

circRNA 名称	log2FC	*P* 值	基因名称	circRNA 名称	log2FC	*P* 值	基因名称
circRNA-41461	1.007	0.043	*Gabra5*	circRNA-012503	−1.163	0.029	*Pbx3*
circRNA-40341	0.990	0.031	*Snca*	circRNA-36555	−1.123	0.037	*Gm11892*
circRNA-44786	0.910	0.014	*Tns3*	circRNA-25826	−1.120	0.039	*Meg3*
circRNA-43589	0.880	0.019	*Rasgrf1*	circRNA-35922	−0.902	0.033	*Syt6*
circRNA-000787	0.862	0.032	*cpne7*	circRNA-44628	−0.888	0.015	*Unc13c*
circRNA-41462	0.817	0.046	*Gabra5*	circRNA-31872	−0.884	0.029	*Gnal*
circRNA-26775	0.797	0.018	*Iqgap2*	circRNA-29357	−0.839	0.004	*Hic2*
circRNA-33631	0.744	0.040	*Tanc1*	circRNA-21495	−0.833	0.039	*Rab3gap2*
circRNA-29980	0.742	0.012	*App*	circRNA-28035	−0.778	0.015	*Uggt2*
circRNA-28239	0.737	0.009	*Npr3*	circRNA-24012	−0.759	0.046	*Trim37*



A: volcanic map of circRNAs differential expression in brain tissue of WT and AD group mice; B: heat map of differentially expressed circRNAs; C: GO functional enrichment analysis of differentially expressed circRNAs; D: KEGG functional enrichment analysis of differentially expressed circRNAs; E: The relative expression levels of the top 6 circRNAs with differential expression; F: RT-qPCR detection of circ-Tns3 expression in neuronal cells and neurons treated with A β 1-42. a:*P*<0.05, b:*P*<0.01 in comparison with the WT group; c:*P*<0.01 in comparison with the control group

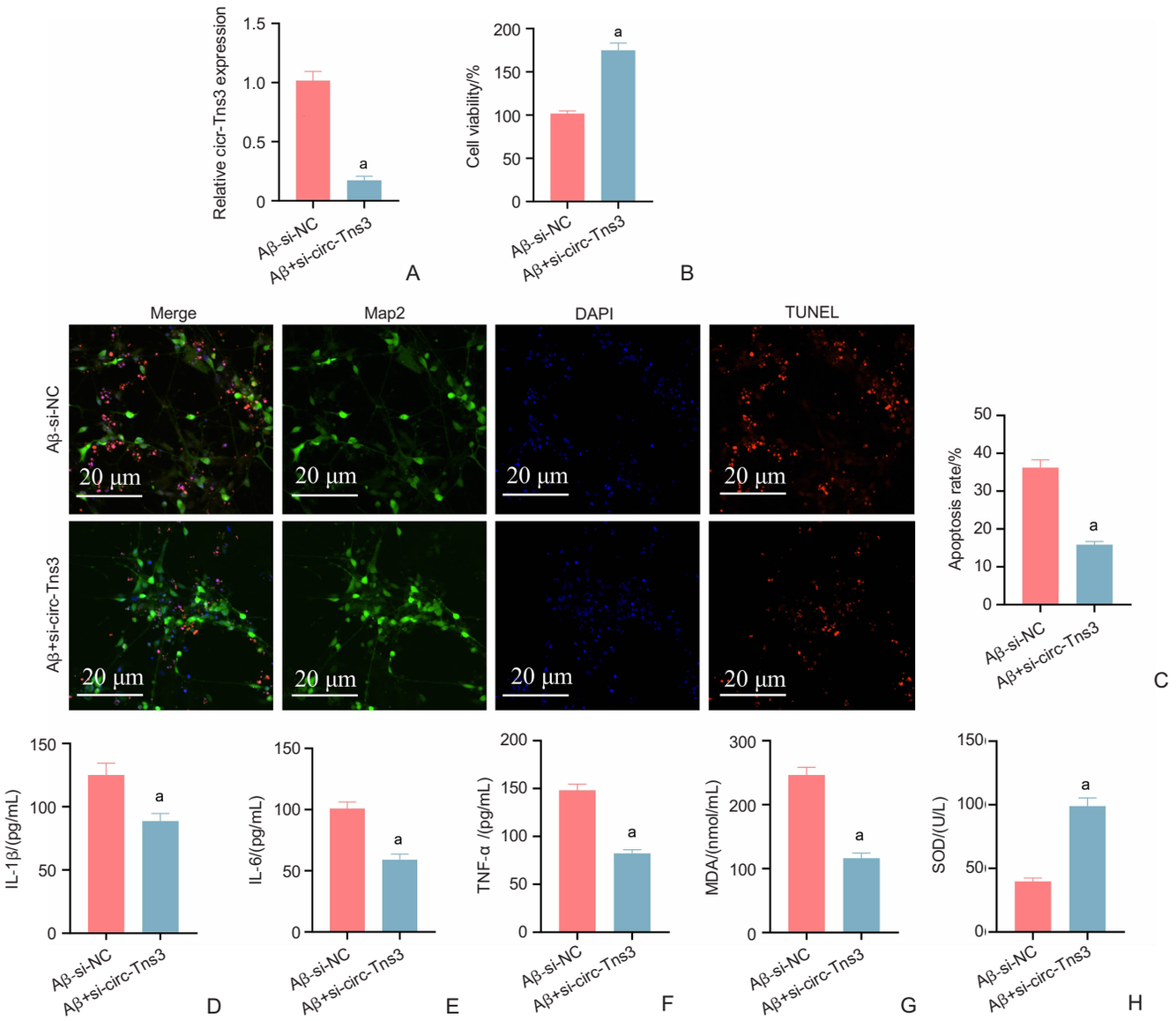
图 2　circ-Tns3 在 AD 组织中表达明显上调 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Figure 2　Circ-Tns3 is significantly upregulated in AD tissues (n=3, $\bar{x}\pm s$)

神经元细胞中的表达。结果显示:在神经元细胞中,加入 Aβ1-42 后 circ-Tns3 表达量显著增加(*P*<0.01,图 2F)

2.3　敲低 circ-Tns3 改善 Aβ1-42 处理的神经元细胞损伤

为了确定 circ-Tns3 在 Aβ1-42 处理的神经元细胞中的作用,转染靶向 circ-Tns3 的 siRNA 进入 Aβ1-42 处理的神经元细胞。qRT-PCR 结果显示,与 Aβ+si-Nc 相比,Aβ+si-circ-Tns3 组显著降低了 circ-Tns3 的表达(*P*<0.01,图 3A),表明 circ-Tns3 敲低成功。CCK8 测定和 TUNEL 染色分析显示,与 Aβ+si-Nc 组相比,Aβ+si-circ-Tns3 组细胞活力显著增加,凋亡细胞百分比显著降低(*P*<0.01,图 3B、C)。ELISA 显示,与 Aβ+si-Nc 组相比,Aβ+si-circ-Tns3 组 IL-1β、IL-6、TNF-α 的含量比 Aβ+si-Nc 组显著降低(*P*<0.01,图 3D~F)。此外,



A: RT-qPCR detecting the relative expression level of circ-Tns3 in neuronal cells treated with Aβ1-42 after transfection with si-circ-Tns3; B: CCK-8 assay detecting the effect of knocking down circ-Tns3 on cell viability; C: TUNEL assay determining the effect of circ-Tns3 knockdown on cell apoptosis; D-F: ELISA detecting the effect of knocking down circ-Tns3 on the expression levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α; G, H: effect of knocking down circ-Tns3 on the MDA content and SOD activity. a: $P<0.01$ in comparison with Aβ+si-NC group

图3 敲低circ-Tns3改善AD细胞模型损伤 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Figure 3 Knocking down circ-Tns3 improves damage in AD cell model ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

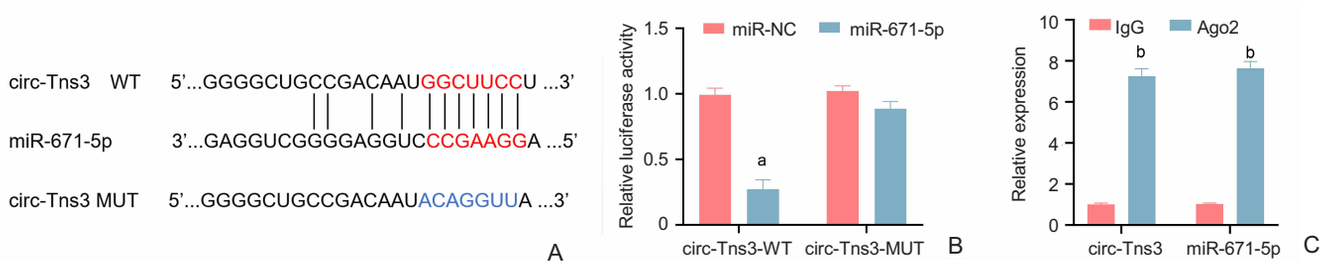
Aβ+si-circ-Tns3组MDA的含量显著降低,SOD活性显著升高($P<0.01$,图3G、H)。以上结果表明,敲低circ-Tns3可以增加Aβ1-42处理的神经元细胞活力和减少细胞凋亡,降低炎症因子和氧化应激水平。

2.4 miR-671-5p是circ-Tns3的靶点

使用Starbase(http://starbase.sysu.edu.cn/)数据库对circ-Tns3进行靶基因预测,发现circ-Tns3与miR-671-5p序列间存在特异性结合序列(图4A)。双荧光素酶报告显示,与转染miR-Nc相比,转染miR-671-5pmimics仅能降低circ-Tns3-WT的相对荧光素酶活性($P<0.01$),但不能降低circ-Tns3-MUT的相对荧光素酶活性(图4B)。此外,RIP检测结果显示,相对于IgG对照组,Ago2组中的circ-Tns3和miR-671-5p mRNA表达显著增加($P<0.01$,图4C)。综上所述,circ-Tns3与miR-671-5p之间存在直接相互作用。

2.5　circ-Tns3通过miR-671-5p调节sirt1蛋白表达

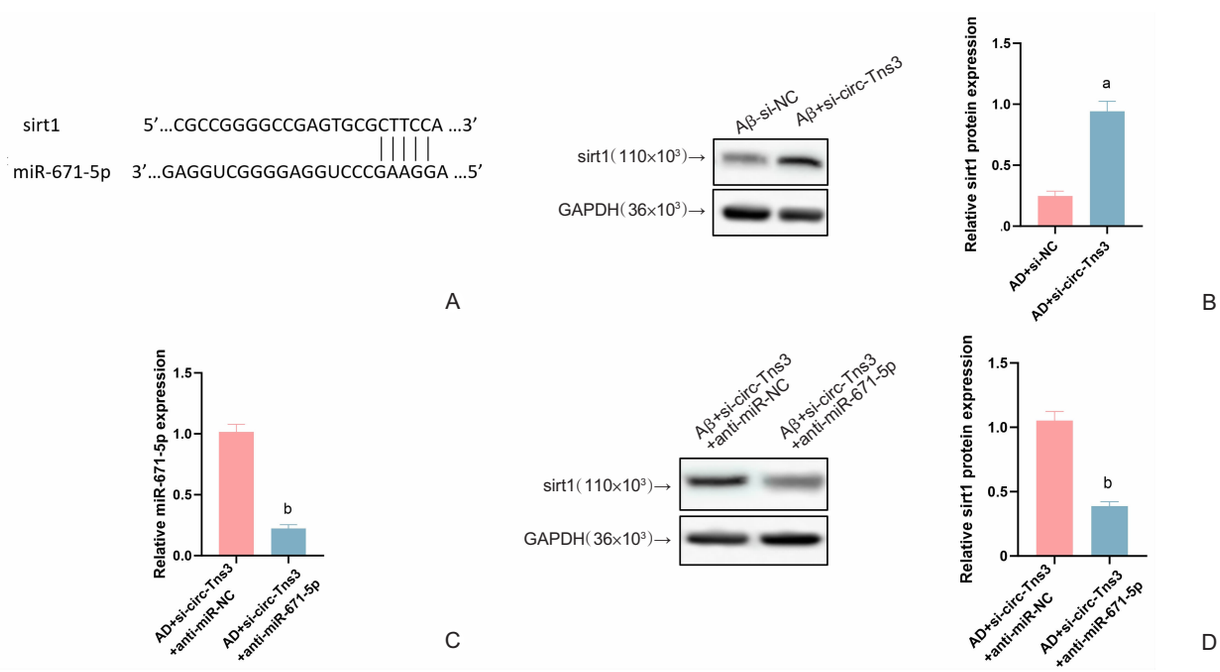
根据生物信息学数据库预测,sirt1被预测为miR-671-5p的下游靶标,存在互补结合位点(图5A)。Westernblot检测结果显示,与Aβ+si-Nc组相比,Aβ+si-circ-Tns3组sirt1蛋白表达明显增加(P<0.01,图5B)。为了探究miR-671-5p能否与circ-Tns3相互作用调节sirt1蛋白的表达,在Aβ1-42处理的神经元细胞中沉默cicr-Tns3后,再加入miR-671-5p抑制剂,通过RT-qPCR结果显示,与Aβ+si-circ-Tns3+anti-miR-Nc组相比,Aβ+si-circ-Tns3+anti-miR-671-5p组细胞中miR-671-5p表达量显著下降(P<0.01,图5C),提示miR-671-5p抑制成功。通过Western blot检测结果显示,与Aβ+si-circ-Tns3+anti-miR-Nc组相比,Aβ+si-circ-Tns3+anti-miR-671-5p组细胞中sirt1蛋白表达明显下降(P<0.01,图5D)。以上结果表明敲低circ-Tns3能上调Aβ1-42处理的神经元细胞中sirt1的蛋白表达,抑制miR-671-5p的表达可以逆转敲低circ-Tns3对sirt1蛋白的表达。提示circ-Tns3可以结合miR-671-5p调节sirt1蛋白表达。



A: the complementary nucleotide sequences between circ-Tns3 and miR-671-5p; B: double luciferase reporter assay detecting the binding of circ-Tns3 to miR-671-5p; C: RNA-binding protein immunoprecipitation assay confirming the interaction between circ-Tns3 and miR-671-5p. a: P<0.01 in comparison with miR-NC; b: P<0.01 in comparison with IgG

图4　miR-671-5p是circ-Tns3的靶点 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Figure 4　miR-671-5p is the target of circ-Tns3 (n=3, $\bar{x}\pm s$)



A: the complementary nucleotide sequences between circ-Tns3 and miR-671-5p; B: Western blotting showing the effect of circ-Tns3 knockdown on sirt1 protein expression; C: RT-qPCR revealing the expression level of miR-671-5p in neuronal cells treated with Aβ 1-42 after silencing circ-Tns3, in presence and absence of miR-671-5p inhibitor; D: Western blotting indicating sirt1 protein. a: P<0.01 in comparison with Aβ+si NC; b: P<0.01 in comparison with Aβ+si-cicr-Tns3+anti miR-NC

图5　circ-Tns3通过miR-671-5p调节sirt1蛋白表达 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Figure 5　Circ-Tns3 regulates Sirt1 protein expression through miR-671-5p (n=3, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

3.1 circ-Tns3表达上调可能与AD发生相关

一项研究证明,在正常大鼠和老化大鼠的大脑中高表达的circRNA与神经递质功能、神经元成熟和突触活动相关[12],在AD中,有研究证明,circRNA可能促进了AD的病理发展。例如,SHI等[13]发现CDR1as对NF-κB翻译的依赖性抑制会去抑制泛素羧基末端水解酶L1,从而促进APP和BACE1降解,降低APP和BACE1的蛋白水平。目前对circ-Tns3的研究报道较少,一项研究证明TNS3在食管癌中高表达,抑制其可降低肿瘤细胞增殖和增强对组蛋白脱乙酰酶抑制剂LMK-235治疗的敏感性[9],但另一项研究证明,RNA结合蛋白Musashi-1通过调控Tns3参与胶质细胞瘤细胞迁移[14]。关于circ-Tns3在AD中的作用尚不确定,本研究通过对存在认知功能障碍的6月龄AD小鼠进行非编码RNA差异性检测,发现差异表达的circRNA有269个,其中159个上调,110个下调。其中circ-Tns3差异表达明显上调,并在AD鼠脑组织和Aβ1-42诱导的神经元中高表达。提示circ-Tns3表达上调可能与AD发生相关。

3.2 circ-Tns3可能通过调控氧化应激和炎性反应影响神经元功能

神经炎症和氧化应激是参与AD病因学和发病机制的重要因素。长期暴露在炎症环境中会导致神经元细胞慢性炎症,进而导致神经元细胞凋亡[15-16]。一项研究发现,老年斑附近的促炎因子和ROS水平异常升高,进一步导致神经元细胞凋亡[17]。炎症通常伴随着免疫系统激活,促炎细胞因子如IL-1β、IL-6和TNF-α的含量在AD血清和脑中增加,并激活胶质细胞来影响AD的神经变性来延长神经炎症[18]。当细胞中的氧化剂和抗氧化剂水平不平衡导致活性氧产生增加超出机体清除能力时,就会发生氧化应激[19]。由于大脑对氧气高需求,但抗氧化剂水平低。因此更容易受到氧化应激的影响[20]。氧化应激与Aβ相互作用,共同参与着AD的病理过程。氧化应激下产生的氧化剂和氧化产物可增加APP的表达,导致Aβ的聚集[21-22]。而Aβ本身也可以促进ROS的增加并诱导氧化应激的发生[23-25]。但目前关于circ-Tns3在氧化应激和炎性反应方面的文献报道较少,具体机制尚不明确。本研究通过转染si-circ-Tns3进行功能缺失验证结果显示,敲低circ-Tns3表达可显著增加Aβ1-42诱导的神经元细胞的细胞活力和降低凋亡细胞百分比。提示敲低circ-Tns3能够改善AD体外细胞模型的神经元凋亡,具有神经保护作用。此外,敲低circ-Tns3表达可显著降低AD体外细胞模型的IL-1β、IL-6、TNF-α和MDA的水平,升高抗氧化物酶SOD的活性,提示敲低circ-Tns3能够减轻Aβ1-42诱导的神经元细胞的炎症因子水平和氧化应激损伤。以上研究证实敲低circ-Tns3通过抗凋亡、降低炎性因子水平和抗氧化作用保护神经元免受Aβ1-42诱导的细胞损伤。

3.3 circ-Tns3结合miR-671-5p调节sirt1的表达

有研究报道miR-671-5p在脑疾病中发挥着重要的作用,例如,在MPP+处理的SK-N-SH细胞中,miR-671-5p过表达改善了细胞凋亡、氧化应激和炎症反应[26]。另一项研究发现,miR-671-5p通过抑制体外和体内急性缺血性卒中模型中NF-κB的表达而降低促炎细胞因子的水平[27]。本研究通过数据库分析发现miR-671-5p与circ-Tns3和sirt1含有预测的结合位点,提示miR-671-5p是circ-Tns3的下游靶基因,而sirt1是miR-671-5p下游靶基因。通过双荧光素酶报告实验和RIP实验证实miR-671-5p与circ-Tns3存在相互作用。

sirt1是一种依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的III族组蛋白脱乙酰酶,属于Sirtuins家族[28-29]。既往研究证实,sirt1在AD发生和发展的许多过程中发挥作用,例如APP加工、神经炎症和线粒体功能障碍[30-31]。此外,sirt1还可以减少小胶质细胞活化后促炎因子IL-6和TNF-α的产生[32]。另一项研究发现,sirt1可以通过上调α分泌酶的表达来减少由Aβ聚集引起的氧化性脑损伤[33]。本研究发现,在Aβ1-42诱导的神经元细胞中,敲低circ-Tns3能增加sirt1的蛋白表达,后再加入miR-671-5p抑制剂,降低了sirt1蛋白表达,提示circ-Tns3可以通过竞争性结合miR-671-5p调控sirt1蛋白表达。

综上所述,本项研究通过基因测序发现circ-Tns3在AD鼠脑组织显著上调,并在AD鼠和AD体外细胞模型中高表达,提示circ-Tns3表达上调可能与AD发生相关。进一步研究发现,在Aβ1-42诱导的神经元中,敲低circ-Tns3减少细胞凋亡和降低氧化应激和炎性因子水平。提示circ-Tns3可能通过氧化应激和炎性反应途径引起AD神经元损伤。此外,本研究还发现circ-Tns3能够与miR-671-5p结合,并对sirt1蛋白的表达进行调控,提示circ-Tns3可能通过结合miR-671-5p调节sirt1蛋白表达参与神经元的损伤机制。基于以上发现,circ-Tns3有望成为阿尔茨海默病的潜在治疗靶点。然而,为了更深入地探究其在AD中的具体作用机制,仍需开展更多后续的实验研究。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] SRIVASTAVA S, AHMAD R, KHARE S K. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: a review [J]. Eur J Med Chem, 2021, 216: 113320. DOI:10.1016/j.ejmech.2021.113320.

[2] WINBLAD B, AMOUYEL P, ANDRIEU S, *et al*. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: *a* priority for European science and society[J]. Lancet Neurol, 2016, 15(5): 455-532. DOI:10.1016/S1474-4422(16)00062-4.

[3] HUANG J L, SU M, WU D P. Functional roles of circular RNAs in Alzheimer's disease[J]. Ageing Res Rev, 2020, 60:101058. DOI:10.1016/j.arr.2020.101058.

[4] YOU X T, VLATKOVIC I, BABIC A, *et al*. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. Nat Neurosci, 2015, 18(4): 603-610. DOI:10.1038/nn.3975.

[5] PAN W H, HU Y R, WANG L H, *et al*. Circ_0003611 acts as a miR-885-5p sponge to aggravate the amyloid-β-induced neuronal injury in Alzheimer's disease[J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(4):961-971. DOI:10.1007/s11011-022-00912-x.

[6] WANG H F, LI Y B, LIU Z Y, *et al*. Circ-bptf ameliorates learning and memory impairments *via* the miR-138-5p/p62 axis in APP/PS1 mice[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(11): 8575-8589. DOI:10.1007/s12035-024-04066-y.

[7] LIU Q, HU Y H, JIE H H, *et al*. CircHDAC9 regulates myocardial ischemia-reperfusion injury *via* miR-671-5p/SOX4 signaling axis[J]. Am J Med Sci, 2024, 367(1): 49-60. DOI:10.1016/j.amjms.2023.11.001.

[8] SONG X M, XUE Y M, CAI H R. Down-regulation of miR-181a-5p prevents cerebral ischemic injury by upregulating En2 and activating Wnt/β -catenin pathway [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2021, 30(3): 105485. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105485.

[9] SHI Y, XIANG Z, YANG H Y, *et al*. Pharmacological targeting of TNS3 with histone deacetylase inhibitor as a therapeutic strategy in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Aging, 2021, 13(11): 15336-15352. DOI: 10.18632/aging.203091.

[10] CHEN W N, GUO S N, LI X M, *et al*. The regulated profile of noncoding RNAs associated with inflammation by tanshinone IIA on atherosclerosis[J]. J Leukoc Biol, 2020, 108(1):243-252. DOI:10.1002/JLB.3MA0320-327RRR.

[11] 谭峰浪, 任宏丽, 王宏飞. 黄柏提取物对$A\beta_{1-42}$诱导的海马神经细胞的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(11): 1213-1220. DOI: 10.12092/j. issn. 1009-2501.2022.11.002.

TAN F L, REN H L, WANG H F. Effect of Phellodendri amurense extract on hippocampal nerve cells induced by $A\beta_{1-42}$[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2022, 27(11): 1213-1220. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2022.11.002.

[12] MAHMOUDI E, CAIRNS M J. Circular RNAs are temporospatially regulated throughout development and ageing in the rat[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 2564. DOI: 10.1038/s41598-019-38860-9.

[13] SHI Z M, CHEN T, YAO Q B, *et al*. The circular RNA ciRS-7 promotes APP and BACE1 degradation in an NF-κB-dependent manner[J]. FEBS J, 2017, 284(7): 1096-1109. DOI:10.1111/febs.14045.

[14] CHEN H Y, LIN L T, WANG M L, *et al*. Musashi-1 enhances glioblastoma cell migration and cytoskeletal dynamics through translational inhibition of Tensin3[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):8710. DOI:10.1038/s41598-017-09504-7.

[15] LIAO S, WU J N, LIU R M, *et al*. A novel compound DBZ ameliorates neuroinflammation in LPS-stimulated microglia and ischemic stroke rats: Role of Akt (Ser473)/GSK3β (Ser9)-mediated Nrf2 activation[J]. Redox Biol, 2020, 36: 101644. DOI:10.1016/j.redox.2020.101644.

[16] HENEKA M T, CARSON M J, EL KHOURY J, *et al*. Neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. Lancet Neurol, 2015, 14(4): 388-405. DOI:10.1016/S1474-4422(15)70016-5.

[17] OZBEN T, OZBEN S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease[J]. Clin Biochem, 2019, 72:87-89. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2019.04.001.

[18] AKIYAMA H, BARGER S, BARNUM S, *et al*. Inflammation and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2000, 21(3): 383-421. DOI: 10.1016/s0197-4580(00)00124-x.

[19] BERMEJO P, MARTÍN-ARAGÓN S, BENEDÍ J, *et al*. Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment[J]. Free Radic Res, 2008, 42(2):162-170. DOI:10.1080/10715760701861373.

[20] CHO C H, KIM E A, KIM J, *et al*. N-Adamantyl-4-methylthiazol-2-amine suppresses amyloid β -induced neuronal oxidative damage in cortical neurons [J]. Free Radic Res, 2016, 50(6): 678-690. DOI:10.3109/10715762.2016.1167277.

[21] TAMAGNO E, GUGLIELMOTTO M, MONTELEONE D, *et al*. Amyloid-β production: major link between oxidative stress and BACE1[J]. Neurotox Res, 2012, 22(3): 208-219. DOI:10.1007/s12640-011-9283-6.

[22] MURRAY I V J, LIU L, KOMATSU H, *et al*. Membrane-

mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid beta proteins[J]. J Biol Chem, 2007, 282(13): 9335-9345. DOI:10.1074/jbc.M608589200.

[23] CAI Z Y, ZHAO B, RATKA A. Oxidative stress and β-amyloid protein in Alzheimer's disease[J]. Neuromolecular Med, 2011, 13(4): 223-250. DOI: 10.1007/s12017-011-8155-9.

[24] SHELAT P B, CHALIMONIUK M, WANG J H, *et al*. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons[J]. J Neurochem, 2008, 106(1): 45-55. DOI:10.1111/j.1471-4159.2008.05347.x.

[25] WAN L, NIE G J, ZHANG J, *et al*. β-Amyloid peptide increases levels of iron content and oxidative stress in human cell and Caenorhabditis elegans models of Alzheimer disease[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(1): 122-129. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.707.

[26] DENG L, GUO Y, LIU J D, *et al*. miR-671-5p attenuates neuroinflammation *via* suppressing NF-κB expression in an acute ischemic stroke model[J]. Neurochem Res, 2021, 46(7): 1801-1813. DOI:10.1007/s11064-021-03321-1.

[27] ZHANG X J, LUAN N, SHI J. A novel LINC00943/miR-671-5p/ELAVL1 *CeRNA* crosstalk regulates MPP^+ toxicity in SK-N-SH cells[J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(7): 2349-2362. DOI:10.1007/s11011-022-01034-0.

[28] SHEN P, DENG X, CHEN Z, *et al*. SIRT1: a potential therapeutic target in autoimmune diseases[J]. Front Immunol, 2021, 12: 779177. DOI: 10.3389/fimmu.2021.779177.

[29] XU C Y, WANG L, FOZOUNI P, *et al*. SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(10): 1170-1179. DOI: 10.1038/s41556-020-00579-5.

[30] GOMES B A Q, SILVA J P B, ROMEIRO C F R, *et al*. Neuroprotective mechanisms of resveratrol in Alzheimer's disease: role of SIRT1[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:8152373. DOI:10.1155/2018/8152373.

[31] HUBBARD B P, SINCLAIR D A. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35(3): 146-154. DOI: 10.1016/j.tips.2013.12.004.

[32] YE J M, LIU Z H, WEI J P, *et al*. Protective effect of SIRT1 on toxicity of microglial-derived factors induced by LPS to PC12 cells *via* the p53-caspase-3-dependent apoptotic pathway[J]. Neurosci Lett, 2013, 553: 72-77. DOI:10.1016/j.neulet.2013.08.020.

[33] DONG Y T, CAO K, TAN L C, *et al*. Stimulation of SIRT1 attenuates the level of oxidative stress in the brains of APP/PS1 double transgenic mice and in primary neurons exposed to oligomers of the amyloid-β peptide[J]. J Alzheimers Dis, 2018, 63(1):283-301. DOI:10.3233/JAD-171020.

(收稿:2025-03-27;修回:2025-04-03)

(编辑 严 涵)