

多个 GEO 芯片联合分析阿尔茨海默病内嗅皮层的关键基因

邵康梅¹, 张 凡², 蔡宏斌¹, 魏海萍¹, 陈圆圆¹, 葛朝明^{1*}

(1. 兰州大学第二医院 神经内科, 中国甘肃 兰州 730030; 2. 甘肃省消化系肿瘤重点实验室, 中国甘肃 兰州 730030)

摘要: 运用生物信息学方法筛选阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)在内嗅皮层部位的关键基因和通路, 探讨 AD 发生发展的潜在机制。从 GEO 数据库下载 AD 的内嗅皮层芯片数据, 利用 R 软件中的 sva 包和 limma 包进行批次矫正, 并筛选差异基因; 运用 Cytoscape 软件中的 ClueGO 插件进行 GO (Gene Ontology)与 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)富集分析; 使用 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 并利用 Cytoscape 软件中的 cytoHubba 插件分析关键基因。对于关键基因在脑组织不同部位及无症状 AD 与 AD 患者内嗅皮层表达的差异分析均采用 Mann-Whitney *U* 检验。分析发现, 白细胞-细胞间黏附的正调控、细胞外基质组织、皮质类固醇反应、卟啉和叶绿素代谢等与 AD 发生发展关系密切。在差异分析筛选的 17 个基因中, *VCAM1*、*CD44*、*FOS* 和 *SPARC* 在 AD 发生发展中发挥关键作用。这 4 个基因的表达水平在内嗅皮层和海马显著高于中央后回、颞叶皮层、小脑、额叶皮层($P < 0.05$), 且其在 AD 患者内嗅皮层中的表达水平显著高于无症状 AD 患者($P < 0.01$)。以上研究结果表明, *VCAM1*、*CD44*、*FOS* 和 *SPARC* 可能是 AD 在内嗅皮层部位发病的关键基因。这些关键基因可作为 AD 早期治疗的潜在靶点, 并为阐明 AD 在内嗅皮层部位的发病机制提供了理论基础。

关键词: 阿尔茨海默病(AD); 内嗅皮层; 生物信息学

中图分类号: Q811.4, R741.02

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2021)01-0080-09

Decoding Hub Genes Related to Alzheimer's Disease in the Entorhinal Cortex Based on a Comprehensive Analysis of Multiple GEO Chip Databases

SHAO Kang-mei¹, ZHANG Fan², CAI Hong-bin¹, WEI Hai-ping¹,
CHEN Yuan-yuan¹, GE Zhao-ming^{1*}

(1. Department of Neurology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China; 2. Key Laboratory of Digestive System Tumors of Gansu Province, Lanzhou 730030, Gansu, China)

Abstract: To explore the potential pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), critical pathways and hub genes associated with AD in the entorhinal cortex were selected by bioinformatic analysis. The data related to AD in the entorhinal cortex was downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO). By using R packages sva and limma, batch normalization and differentially expressed genes (DEGs) were analyzed. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed by using the plugin of ClueGO in the software of Cytoscape. Protein-protein interaction (PPI) network analysis was performed using STRING database, and hub genes were selected by cytoHubba plugin in Cytoscape software.

收稿日期: 2020-07-20; 修回日期: 2020-10-05

基金项目: 兰州市科技计划项目(2016-3-118)

作者简介: 邵康梅(1994—), 女, 甘肃天水人, 硕士研究生, 主要从事中枢神经系统退行性疾病研究, E-mail: 328963894@qq.com; *通信作者: 葛朝明(1973—), 男, 甘肃兰州人, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脑血管疾病方面的研究, E-mail: 13893285120@163.com。

The differential expressions of key genes in different cerebral tissues and entorhinal cortex tissues of AD patients and asymptomatic patients were identified using Mann-Whitney *U* test. Enrichment analysis indicated that DEGs were mainly enriched in positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion, extracellular matrix tissue, corticosteroid reaction and porphyrin and chlorophyll metabolic signaling pathways. The hub genes, like *VCAM1*, *CD44*, *FOS* and *SPARC*, were identified by PPI analysis. The expressions of *VCAM1*, *CD44*, *FOS* and *SPARC* in the entorhinal cortex and hippocampus were significantly higher than those in the post-central gyrus, temporal cortex, cerebellum and frontal cortex ($P < 0.05$). And the expressions of hub genes in AD patients were significantly higher than those in asymptomatic AD patients ($P < 0.01$). Based on the bioinformatic analysis related to the entorhinal cortex with AD, the *VCAM1*, *CD44*, *FOS* and *SPARC* were found to play critical roles in the progression of AD in the entorhinal cortex. These hub genes may be potential targets for AD early intervention. This study may provide a theoretical basis for exploring pathogenesis of AD in the entorhinal cortex.

Key words: Alzheimer's disease (AD); entorhinal cortex; bioinformatics

(*Life Science Research*, 2021, 25(1): 080~088)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性神经退行性疾病,其发病机制可归因于大脑皮质和边缘区 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)斑块的胞外聚集和过度磷酸化的 tau 蛋白构成的细胞内神经原纤维缠结,其特点是记忆丧失和进行性神经认知功能障碍^[1]。AD 是老年期最常见的痴呆类型,占老年期痴呆的 60%~80%^[2]。目前,AD 的治疗无特效药物,寻找 AD 早期的治疗靶点对疾病的治疗至关重要。研究证实内嗅皮层是 AD 进展中最早发生病变的部位^[3-4]。

内嗅皮层位于颞叶内侧,参与最初的情景编码,在记忆形成过程中起着不可或缺的作用,而且是海马体 and 大脑皮质之间的关键通道^[5]。AD 中 tau 蛋白相关神经原纤维缠结病理遵循一定的顺序,首先影响内嗅皮层,然后发展到边缘系统和联合皮层^[5]。因此,在 AD 早期针对内嗅皮层寻找其潜在治疗靶点,对 AD 的治疗具有重要的临床意义。

本研究收集了 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库中 AD 的内嗅皮层表达谱数据集 GSE-48350^[6]、GSE26972^[7]和 GSE118553^[8]。通过批次矫正对多组数据联合分析,筛选出差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并对其进行 GO (Gene Ontology)分析、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析以及蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络分析,结果提示血管细胞黏附分子 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*, *VCAM1*)基因、*CD44*、原癌基因 *FOS* 和富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(*secreted protein acidic and rich in cysteine*, *SPARC*)基因在 AD 发生发展中发挥关键作用。*VCAM1* 属于黏附分子免疫球蛋白超家族,在衰老中与记忆和认知密切相关^[9-10]。*CD44* 是一种跨膜糖蛋白,参与透明质酸代谢、激活淋巴细胞和释放细胞因子过程,并且参与海马记忆编码、存储或检索过程^[11-12]。*c-Fos* 蛋白由 *FOS* 基因转录后翻译产生,其参与了记忆的形成^[13]。*SPARC* 是调节细胞与其周围细胞外基质相互作用的细胞分子,其异常表达与脑组织炎症的发生相关^[14]。本研究阐明了 AD 在内嗅皮层部位的发病机制并筛选出了 AD 治疗的潜在靶点,为 AD 的防治提供了新的思路与线索。

1 材料与方法

1.1 资料来源

本文使用的数据来自于美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)公共数据平台的 GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)。检索关键词为“entorhinal cortex”,检索条件为“*Homo sapiens*”和“expression profiling by array”,共检索到 13 个数据集,排除缺乏正常对照组、晚发性 AD、非 AD 研究的数据集,最终纳入 GSE48350、GSE26972、GSE118553 数据集进行下一步分析。

1.2 数据预处理和差异基因分析

在 GEO 数据库中下载 GSE48350、GSE26972、GSE118553 矩阵数据^[6-8]。运用 R 软件处理芯片数据,limma 包用于数据的标准化以及内嗅皮层和正常对照组的基因差异分析^[15];利用 K 近邻法(K-

nearest neighbor, KNN)填充缺失值, 采用 impute包进行芯片数据缺失值的处理^[16]。运用 R 软件中的 sva 包和 limma 包进行批次矫正^[17], 消除数据集间存在的异质性。以 $|\log_2FC| > 1$ (FC: fold change) 和 $P < 0.05$ 为筛选条件筛选 DEGs。

1.3 GO 富集与 KEGG 通路富集分析

为了在功能层面上分析 DEGs, 利用 Cytoscape 软件中的 ClueGO 插件对其进行 GO/KEGG 富集分析及数据可视化^[18], 得到 DEGs 富集的生物过程及通路, 筛选标准为 $P < 0.05$ 。

1.4 PPI 网络构建及关键基因分析

本研究通过 STRING 数据库 (<http://www.string-db.org/>), 以互作评分 combination score > 0.4 为条件构建 PPI 网络^[9], 使用 Cytoscape 软件对 DEGs 所编码蛋白质的相互作用进行可视化展示^[20]。其中, cytoHubba 插件用于分析生物网络中的关键基因^[21], 它包括最大集团中心度(maximal clique centrality, MCC)、最大邻域组件密度(density of maximum neighborhood component, DMNC)、度(degree)、边缘渗透组件(edge percolated component, EPC)、中介中心性(betweenness)、离心率(eccentricity)等拓扑分析方法^[9]。为了提高预测结果的可靠性, 运用不同的算法探索本研究的关键基因。

1.5 关键基因在脑组织不同部位的表达分析

结合 GSE48350 和 GSE118553 数据集验证关键基因在内嗅皮层、海马、中央后回、额上回、额叶皮层、颞叶皮层和小脑组织的表达水平是否有差异, 并分析 GSE118553 数据集中无症状 AD (asymptomatic Alzheimer's disease, AsymAD) 和 AD 患者内嗅皮层数据。其中, AsymAD 患者为认知功能正常但有明显 AD 神经病变的个体^[8]。比较 AsymAD 和 AD 患者的基因表达差异可能有助于阐明 AD 早期进展的特定生物学机制。

1.6 数据处理

所有数据录入 SPSS 23.0 软件进行分析, 对关键基因在脑组织不同部位的表达分析采用 Mann-Whitney U 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AD 内嗅皮层 DEGs 的筛选

从 GEO 数据库中下载的 3 个 AD 相关的内嗅皮层芯片数据集的具体信息见表 1。对 3 个数据集分别进行 DEGs 筛选, 结果显示: GSE48350 中有 43 个 DEGs, 包括 37 个上调基因和 6 个下调基因; GSE26972 中有 266 个 DEGs, 包括 127 个上调基因和 139 个下调基因; GSE118553 中有 93 个 DEGs, 包括 78 个上调基因和 15 个下调基因。对 3 个数据集的 DEGs 绘制韦恩图, 结果提示三者间未见共同 DEGs, 说明这 3 个数据集之间存在异质性, 可能是由于发表时间不同、芯片检测水平不一致, 故需对 GSE48350、GSE26972、GSE-118553 数据集的数据进行批次矫正。对合并的数据进行标准化处理后, 结果显示有 17 个 DEGs, 且均为上调基因(图 1)。

2.2 DEGs 的富集分析

对 17 个 DEGs 进行 GO 富集和 KEGG 通路富集在线分析。GO 富集分析提示, DEGs 主要富集在白细胞-细胞间黏附的正调控、细胞外基质组织、皮质类固醇反应等 11 个生物过程(表 2, 图2)。KEGG 通路富集分析结果显示, DEGs 在卟啉和叶绿素代谢信号通路上显著富集。

2.3 DEGs 所编码蛋白质的 PPI 网络分析

对分析获得的 DEGs 进行 PPI 网络分析, 结果如图 3 所示, 包含 13 个节点和 31 条相互作用关系。进一步基于 cytoHubba 插件中的多种计算

表 1 AD 内嗅皮层各数据集的基本情况

Table 1 Basic information of data sets of the entorhinal cortex with AD

Item	GSE48350		P value	GSE26972		P value	GSE118553		P value
	Control	AD		Control	AD		Control	AD	
Sample size	39	15		3	3		24	37	
Gender			0.636 3			Not applicable			0.348 1
Male	21	7		0	0		12	14	
Female	18	8		3	3		12	23	
Age			0.000 2			1.000			0.005 7
≥ 60	18	15		2	2		18	37	
< 60	21	0		1	1		6	0	
Platform	GPL570			GPL5188			GPL10558		

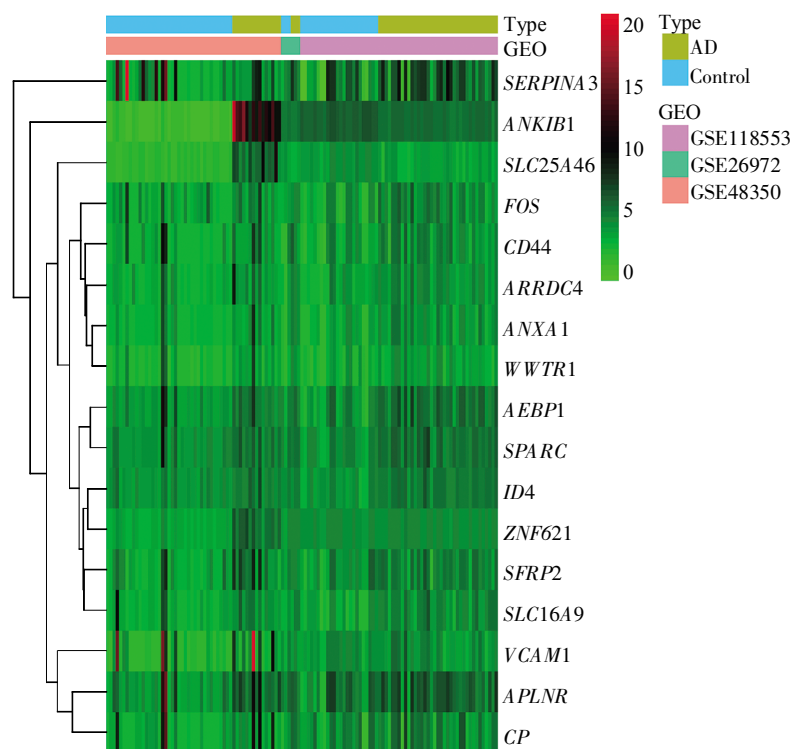


图 1 AD 内嗅皮层 DEGs 的分布热图

红色代表表达水平高, 绿色代表表达水平低。

Fig.1 Heat map of DEGs in the entorhinal cortex with AD

Red means higher expression, and green means lower expression.

表 2 DEGs 的 GO 富集分析
Table 2 GO analysis of DEGs

GO ID	GO term	P value	Associated gene
GO: 1903039	Positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	0.000 1	<i>ANXA1</i> , <i>CD44</i> , <i>VCAM1</i>
GO: 0030198	Extracellular matrix organization	<0.000 1	<i>AEBP1</i> , <i>CD44</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SPARC</i> , <i>VCAM1</i>
GO: 0031960	Response to corticosteroid	0.001 5	<i>ANXA1</i> , <i>FOS</i> , <i>SPARC</i>
GO: 0051384	Response to glucocorticoid	0.001 5	<i>ANXA1</i> , <i>FOS</i> , <i>SPARC</i>
GO: 0001649	Osteoblast differentiation	0.011 0	<i>ID4</i> , <i>SFRP2</i> , <i>WWTR1</i>
GO: 0045444	Fat cell differentiation	0.011 0	<i>ID4</i> , <i>SFRP2</i> , <i>WWTR1</i>
GO: 0045598	Regulation of fat cell differentiation	0.011 0	<i>ID4</i> , <i>SFRP2</i> , <i>WWTR1</i>
GO: 0010212	Response to ionizing radiation	0.000 1	<i>ANXA1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>VCAM1</i>
GO: 1904018	Positive regulation of vasculature development	0.000 1	<i>ANXA1</i> , <i>APLNR</i> , <i>SFRP2</i>
GO: 0045765	Regulation of angiogenesis	0.000 1	<i>ANXA1</i> , <i>APLNR</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SPARC</i>
GO: 0045766	Positive regulation of angiogenesis	0.000 1	<i>ANXA1</i> , <i>APLNR</i> , <i>SFRP2</i>

方法, 得到互作网络中的关键基因为 *VCAM1*、*CD44*、*FOS* 和 *SPARC* (表 3)。

2.4 关键基因在内嗅皮层及海马中显著高表达

运用 GSE48350 数据集验证 *VCAM1*、*CD44*、*FOS* 和 *SPARC* 基因在内嗅皮层、海马、中央后回和额上回的表达是否有差异。研究发现, *VCAM1* 在内嗅皮层的表达水平显著高于中央后回和额上回($P<0.01$, 图 4A); *CD44* 和 *SPARC* 在海马的表达水平显著高于内嗅皮层($P<0.05$), 但在内嗅皮层的表达水平显著高于中央后回和额上回($P<0.01$,

图 4B 和图 4D); *FOS* 在海马中的表达水平显著高于中央后回和额上回($P<0.01$), 而海马中的表达水平高于内嗅皮层, 但差异无统计学意义($P>0.05$, 图 4C)。结合 GSE118553 数据集再次探究关键基因在内嗅皮层、额叶皮层、颞叶皮层和小脑组织中的表达情况。我们发现 *VCAM1*、*CD44*、*FOS* 和 *SPARC* 基因在内嗅皮层的表达水平显著高于其他部位($P<0.01$, 图 5)。

2.5 关键基因在 AD 中的表达显著高于 AsymAD

AsymAD 是 AD 的前驱阶段, 我们结合 GSE-

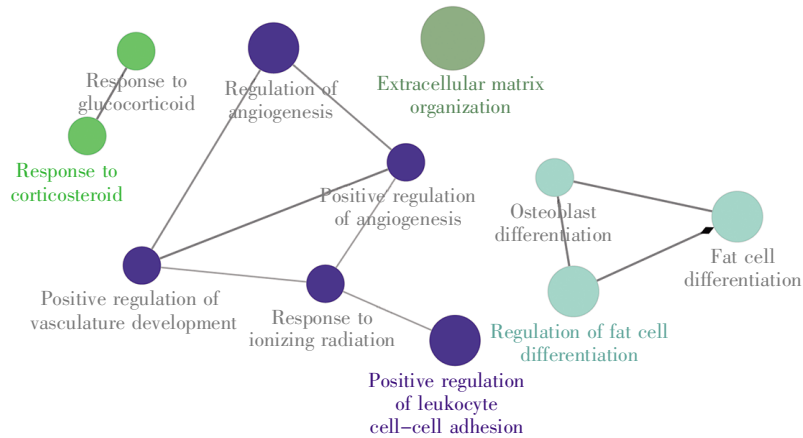


图 2 DEGs 的 GO 富集分析

圆形代表富集到的条目, 连线代表两个 GO 富集条目之间存在相同的 DEGs, 图形越大表明富集到的基因数目越多。

Fig.2 GO analysis of DEGs

Nodes represent GO terms. Lines indicate that overlapping DEGs exist between two GO terms. Larger nodes indicate more enriched DEGs.

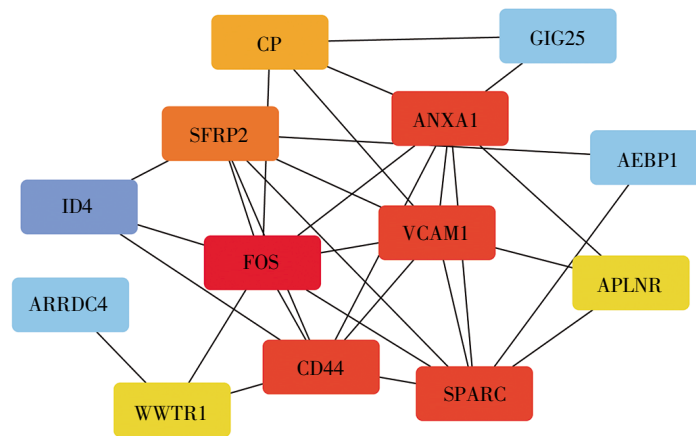


图 3 DEGs 的 PPI 网络

图中颜色由红到黄到蓝表明相应基因得分由高到低。

Fig.3 PPI network of DEGs

Colors ranging from red to yellow to blue indicate gene scores from high to low.

表 3 基于 cytoHubba 中各算法筛选的关键基因
Table 3 Hub genes screened based on cytoHubba algorithm

Node	MCC	DMNC	Degree	EPC	Betweenness	Eccentricity
ID4	6	0.463 46	3	4.896	0	0.333 33
SFRP2	32	0.427 94	6	6.177	9.633 33	0.333 33
AEBP1	2	0.307 79	2	4.052	0	0.250 00
ARRDC4	1	0	1	2.175	0	0.250 00
WWTR1	3	0.307 79	3	4.260	22.000 00	0.333 33
FOS	62	0.408 20	8	6.662	31.383 33	0.500 00
SPARC	56	0.439 05	7	6.601	17.450 00	0.333 33
CP	8	0.378 93	4	5.392	4.666 67	0.333 33
GIG25	2	0.307 79	2	3.838	0	0.250 00
VCAM1	60	0.475 64	7	6.689	9.716 67	0.333 33
CD44	56	0.439 05	7	6.535	19.916 67	0.500 00
ANXA1	38	0.402 46	7	6.436	21.233 33	0.333 33
APLNR	6	0.463 46	3	4.967	0	0.250 00

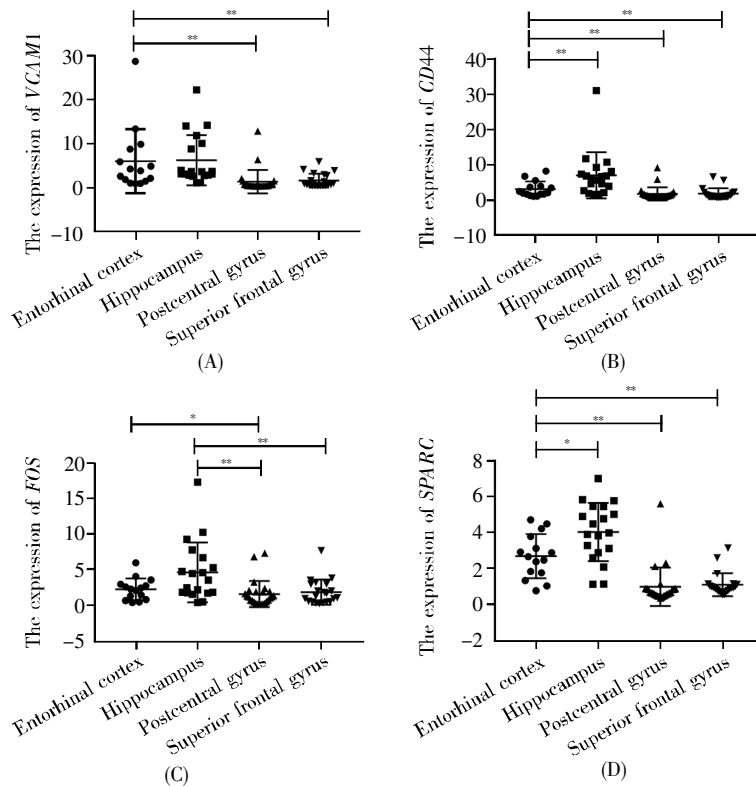


图 4 关键基因在内嗅皮层、海马、中央后回和额上回组织中的表达水平

Fig.4 The expression levels of hub genes in the entorhinal cortex, hippocampus, postcentral gyrus and superior frontal gyrus

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

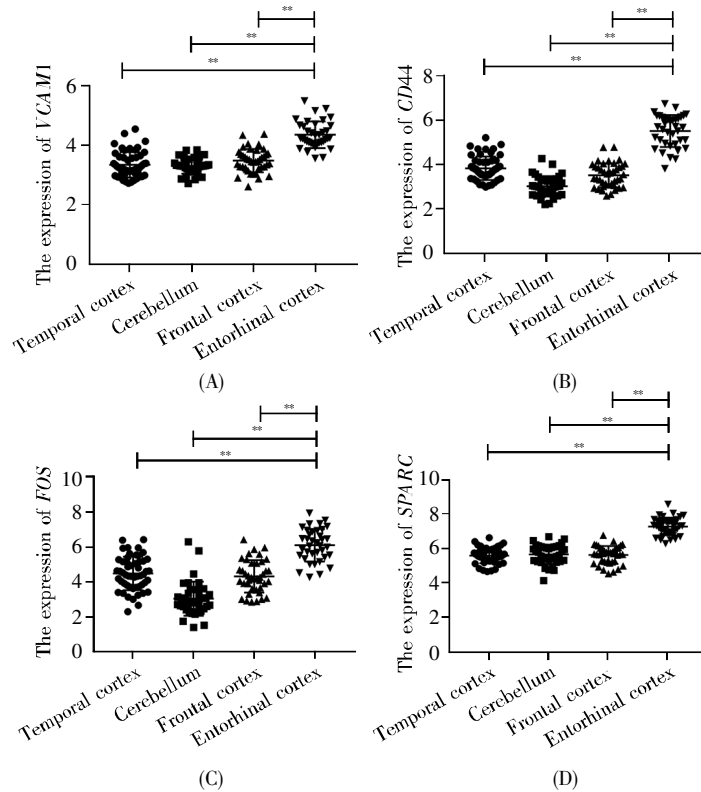


图 5 关键基因在颞叶皮层、小脑、额叶皮层和内嗅皮层组织中的表达水平

Fig.5 The expression levels of hub genes in the temporal cortex, cerebellum, frontal cortex and entorhinal cortex

** : $P < 0.01$.

118553数据集对 AsymAD 和 AD 患者内嗅皮层中关键基因的表达做进一步分析。结果显示,与 AsymAD 患者相比, *VCAM1*、*CD44*、*FOS* 和 *SPARC* 基因在 AD 患者内嗅皮层中显著高表达($P<0.01$, 图 6)。

3 讨论

近年来大量研究者探究 AD 发生发展的潜在机制和筛选治疗靶点,构建了一系列生物大数据集。GSE48350 数据集包含来自正常人(20-99岁)和 AD 患者海马、内嗅皮层、额叶上回、中央后回 4 个脑区的微阵列数据^[6]。通过对该数据的分析, Berchtold 等^[22]发现在衰老和 AD 进展中突触相关基因的表达逐渐下调。此外,通过构建正常老年人、AsymAD 和 AD 患者的内嗅皮层、额叶皮层、颞叶皮层和小脑组织微阵列表达谱芯片(GSE118553), Patel 等^[8]发现 AsymAD 和 AD 患者的能量代谢与谷氨酸-谷氨酰胺循环失调有关。Berson 等^[7]通过对来源于 AD 患者内嗅皮层的芯片数据(GSE26972)展开分析发现,核内不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP) A/B 剪接因子在 AD 患者内嗅皮层中选择性缺失,而且敲除 hnRNP A/B 可导致初级神经元选择性剪接损伤和树突损失。

为探究内嗅皮层在 AD 发生发展过程中的机制,本研究对 GEO 数据库中 3 个 AD 患者内嗅皮层数据集(GSE48350、GSE26972、GSE118553)进行

了整合和差异基因筛选,并针对筛选出的差异基因进行了 GO/KEGG 富集分析和 PPI 分析,结果提示 *VCAM1*、*CD44*、*FOS* 和 *SPARC* 参与多条信号通路并在 AD 中发挥关键作用。*VCAM1* 是黏附分子免疫球蛋白超家族的成员,于 1989 年首次被鉴定为位于内皮细胞表面的一种 90 kD 糖蛋白,其功能主要是介导单核细胞和淋巴细胞对内皮细胞的黏附^[9, 23]。多项研究证实, *VCAM1* 在 AD 患者血液、脑脊液标本中异常高表达^[24-27]。最新研究发现,在年老小鼠海马区的脑内皮细胞中 *VCAM1* 高表达,通过抑制 *VCAM1* 基因或使用抗 *VCAM1* 抗体可逆转年老小鼠脑内小胶质细胞活性和认知功能障碍等衰老方面的变化^[10]。另有研究报道, *VCAM1* 水平与短期记忆和绘画得分呈显著负相关,即血浆中 *VCAM1* 表达越高,AD 患者记忆力及视空间功能越差^[28]。焦谷氨酸- $A\beta$ 是 AD 中 $A\beta$ 斑块的主要成分,在谷氨酰基环化酶催化下,截短的 $A\beta$ 肽发生吡咯酰化反应,产生焦谷氨酸- $A\beta$,增强其聚集倾向^[29]。相关研究报道, *VCAM1* 与 AD 患者谷氨酰基环化酶活性密切相关,是抑制谷氨酰基环化酶的潜在药理学指标^[30]。目前,探究 *VCAM1* 在 AD 内嗅皮层部位的相关研究很少报道,仅 Pang 等^[26]研究提示 *VCAM1* 在内嗅皮层及海马中高表达,这与我们的结果(图 4A)一致。此外,我们首次发现 *VCAM1* 在 AD 患者内嗅皮层中的表达水平显著高于 AsymAD 患者(图 6A),提

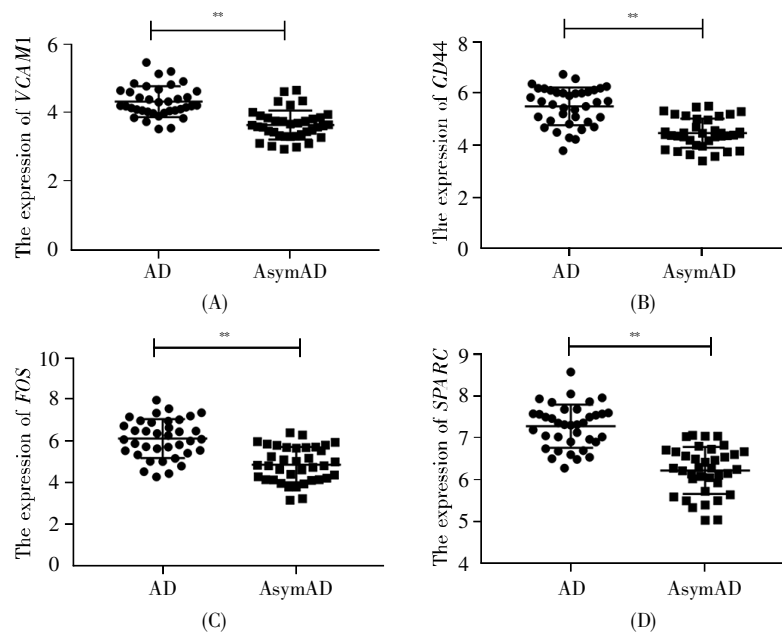


图 6 关键基因在 AD 和 AsymAD 患者内嗅皮层中的表达水平

Fig.6 The expression levels of hub genes in the entorhinal cortex between AD and asymptomatic patients

** : $P < 0.01$.

示在 AD 早期 VCAM1 在内嗅皮层部位出现表达异常。

CD44 是一种跨膜糖蛋白,正常组织中 CD44 在调节透明质酸代谢、激活淋巴细胞和释放细胞因子方面起着至关重要的作用^[1]。Uberti 等^[31]证实 AD 患者淋巴细胞 CD44 基因的表达水平较正常人升高。小胶质细胞是中枢神经系统的天然免疫细胞,在 AD 小鼠早期,小胶质细胞 CD44 的表达升高^[32]。另一项研究发现,CD44S 和 CD44 剪接变体(CD44V6 和 CD44V10)在 AD 患者的神经母细胞瘤细胞和原代神经元中被 A β 肽诱导表达,其中 CD44V10 特异性干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA)和抗 CD44V10 抗体都能保护神经细胞使其免受 A β 诱导的毒性^[33]。目前,关于 CD44 在 AD 患者内嗅皮层部位的相关研究未见报道。本研究发现 CD44 在 AD 内嗅皮层部位高表达,且在 AD 患者内嗅皮层中的表达水平高于 AsymAD 患者。其与 VCAM1 共同参与白细胞-细胞间黏附的正调控通路和细胞外基质组织通路。研究报道,CD44 作为糖胺多糖透明质酸的受体,参与海马记忆编码、存储或检索过程^[12]。我们发现,CD44 在内嗅皮层及海马显著富集,且在海马的表达水平显著高于内嗅皮层(图 4B)。因此,我们推断 CD44 在内嗅皮层和海马记忆形成及储存中发挥关键作用。

FOS 基因编码产生 c-Fos 蛋白。研究证实,c-Fos 蛋白是神经可塑性的关键蛋白质,参与了记忆的形成^[13,34]。有研究表明,海马神经元的突触可塑性变化在老年痴呆的病理过程中占据重要的地位,可能是 AD 学习和记忆障碍的神经生物学基础^[35]。此外,FOS 还可通过调节肠道微生物-GLP-1 (glucagon-like peptide-1)/GLP-1R (glucagon-like peptide-1 receptor)通路,发挥良好的抗 AD 作用^[36]。通过对 AD 患者外周血单个核细胞的基因表达谱进行测定,Leandro 等^[37]不仅发现炎症和免疫相关信号通路显著上调,而且发现 FOS 可作为 AD 患者外周血的潜在生物标志物。为进一步分析 AD 中不同细胞亚型的特异性调节机制和各细胞亚群的功能差异,Grubman 等^[38]构建了 AD 内嗅皮层的单细胞图谱,其研究证实 FOS 在 AD 患者的星形胶质细胞亚群中显著高表达,而且星形胶质细胞也是 AD 早期的生物标志物并参与 AD 疾病进展^[39]。本研究发现 FOS 在海马及内嗅皮层组织中显著富集(图 4C),且 FOS 在 AD 患者内嗅皮层中

的表达水平显著高于 AsymAD 患者(图 6C)。

SPARC 是调节细胞与其周围细胞外基质相互作用的细胞分子,同时参与细胞外基质的组装、沉积和生长因子信号^[40]。针对 AD 患者脑脊液的蛋白质组学分析发现,SPARC 表达升高,且可能具有预测早期 AD 发生的作用^[41]。Strunz 等^[42]通过分析 AD 患者颞皮质发现,SPARC 显著高表达,并与 A β 蛋白相结合,参与脑组织炎症的发生。本研究发现,SPARC 在 AD 患者内嗅皮层和海马组织中显著高表达,且其在海马的表达水平显著高于内嗅皮层(图 4D)。同样,SPARC 在 AD 患者内嗅皮层中的表达水平显著高于 AsymAD 患者(图 6D)。

综上所述,本研究运用多芯片联合分析,发现 VCAM1、FOS、CD44 和 SPARC 在 AD 患者内嗅皮层部位发挥重要作用。此外,本研究结合相关数据再次验证了关键基因在脑组织不同部位及 AD 患者与 AsymAD 患者之间的表达水平具有差异性。研究结果为阐明 AD 疾病发生发展的潜在机制提供了新的思路,也为筛选 AD 的治疗药物提供了新的靶点。但该结论仍需要进一步的临床大样本验证及机制探究。

参考文献(References):

- [1] SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETHER M M, *et al.* Alzheimer's disease[J]. *The Lancet*, 2016, 388(10043): 505-517.
- [2] BELL J F, FITZPATRICK A L, COPELAND C, *et al.* Existing data sets to support studies of dementia or significant cognitive impairment and comorbid chronic conditions[J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(6): 622-638.
- [3] BRAAK H, BRAAK E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes[J]. *Acta Neuropathologica*, 1991, 82(4): 239-259.
- [4] MEDA S A, KORAN M E, PRYWELLER J R, *et al.* Genetic interactions associated with 12-month atrophy in hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative[J]. *Neurobiology of Aging*, 2013, 34(5): 1518.e9-e18.
- [5] THAKER A A, WEINBERG B D, DILLON W P, *et al.* Entorhinal cortex: antemortem cortical thickness and postmortem neurofibrillary tangles and amyloid pathology[J]. *American Journal of Neurora Diology*, 2017, 38(5): 961-965.
- [6] BERCHTOLD N C, CRIBBS D H, COLEMAN P D, *et al.* Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2008, 105(40): 15605-15610.
- [7] BERSON A, BARBASH S, SHALTIEL G, *et al.* Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2012, 4(8): 730-742.
- [8] PATEL H, HODGES A K, CURTIS C, *et al.* Transcriptomic analysis of probable asymptomatic and symptomatic alzheimer brains[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2019, 80: 644-656.

- [9] OSBORN L, HESSION C, TIZARD R, *et al.* Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes[J]. *Cell*, 1989, 59(6): 1203–1211.
- [10] YOUSEF H, CZUPALLA C J, LEE D, *et al.* Aged blood impairs hippocampal neural precursor activity and activates microglia via brain endothelial cell VCAM1[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(6): 988–1000.
- [11] SENBANJO L T, CHELLAIAH M A. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2017, 5: 18.
- [12] SU W, FOSTER S C, XING R, *et al.* CD44 transmembrane receptor and hyaluronan regulate adult hippocampal neural stem cell quiescence and differentiation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(11): 4434–4445.
- [13] BROWN A G, THAPA M, HOOKER J W T, *et al.* Impaired chemoreflex correlates with decreased c-Fos in respiratory brainstem centers of the streptozotocin-induced Alzheimer's disease rat model[J]. *Experimental Neurology*, 2019, 311: 285–292.
- [14] STRUNZ M, JARRELL J T, COHEN D S, *et al.* Modulation of SPARC/Hevin proteins in Alzheimer's disease brain injury[J]. *Journal of Alzheimer's disease*, 2019, 68(2): 695–710.
- [15] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(7): e47.
- [16] XU X, ZHANG C, XIA Y, *et al.* Over expression of METRN predicts poor clinical prognosis in colorectal cancer[J]. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2020, 8(3): e1102.
- [17] ZHANG X, JIANG Y, XIE Y, *et al.* Comprehensive analysis of lncRNAs associated with the pathogenesis and prognosis of gastric cancer[J]. *DNA and Cell Biology*, 2020, 39(2): 299–309.
- [18] BINDEA G, MLECNIK B, HACKL H, *et al.* ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1091–1093.
- [19] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D607–D613.
- [20] SMOOT M E, ONO K, RUSCHEINSKI J, *et al.* Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431–432.
- [21] CHIN C H, CHEN S H, WU H H, *et al.* cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. *BMC Systems Biology*, 2014, 8(Suppl. 4): S11.
- [22] BERCHTOLD N C, COLEMAN P D, CRIBBS D H, *et al.* Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease[J]. *Neurobiology of Aging*, 2013, 34(6): 1653–1661.
- [23] RICE G E, BEVILACQUA M P. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion[J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1303–1306.
- [24] BARBER R C, PHILLIPS N R, TILSON J L, *et al.* Can genetic analysis of putative blood Alzheimer's disease biomarkers lead to identification of susceptibility loci?[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0142360.
- [25] EWERS M, MIELKE M M, HAMPEL H. Blood-based biomarkers of microvascular pathology in Alzheimer's disease[J]. *Experimental Gerontology*, 2010, 45(1): 75–79.
- [26] PANG X, ZHAO Y, WANG J, *et al.* The bioinformatic analysis of the dysregulated genes and microRNAs in entorhinal cortex, hippocampus, and blood for Alzheimer's disease[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 9084507.
- [27] TROMBETTA B A, CARLYLE B C, KOENIG A M, *et al.* The technical reliability and biotemporal stability of cerebrospinal fluid biomarkers for profiling multiple pathophysiologies in Alzheimer's disease[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193707.
- [28] HUANG C W, TSAI M H, CHEN N C, *et al.* Clinical significance of circulating vascular cell adhesion molecule-1 to white matter disintegrity in Alzheimer's dementia[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2015, 114(6): 1230–1240.
- [29] COIMBRA J R, SOBRAL P J, SANTOS A E, *et al.* An overview of glutamyl cyclase inhibitors for Alzheimer's disease[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2019, 11(24): 3179–3194.
- [30] BRIDEL C, HOFFMANN T, MEYER A, *et al.* Glutamyl cyclase activity correlates with levels of Abeta peptides and mediators of angiogenesis in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients[J]. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2017, 9(1): 38.
- [31] UBERTI D, CENINI G, BONINI S A, *et al.* Increased CD44 gene expression in lymphocytes derived from Alzheimer disease patients[J]. *Neurodegenerative Diseases*, 2010, 7(1–3): 143–147.
- [32] RANGARAJU S, DAMMER E B, RAZA S A, *et al.* Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease[J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2018, 13(1): 24.
- [33] PINNER E, GRUPER Y, BEN ZIMRA M, *et al.* CD44 splice variants as potential players in Alzheimer's disease pathology[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, 58(4): 1137–1149.
- [34] JAWORSKI J, KALITA K, KNAPSKA E. c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory[J]. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 2018, 78(4): 287–296.
- [35] 刘慧莉, 赵刚. 运动-阿尔茨海默病与突触可塑性[J]. *中国康复理论与实践* (LIU Hui-li, ZHAO Gang. Exercise, Alzheimer's disease and synaptic plasticity[J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice*), 2012, 18(3): 244–246.
- [36] SUN J, LIU S, LING Z, *et al.* Fructooligosaccharides ameliorating cognitive deficits and neurodegeneration in APP/PS1 transgenic mice through modulating gut microbiota[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(10): 3006–3017.
- [37] LEANDRO G S, EVANGELISTA A F, LOBO R R, *et al.* Changes in expression profiles revealed by transcriptomic analysis in peripheral blood mononuclear cells of Alzheimer's disease patients[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2018, 66(4): 1483–1495.
- [38] GRUBMAN A, CHEW G, OUYANG J F, *et al.* A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation[J]. *Nature Neuroscience*, 2019, 22(12): 2087–2097.
- [39] CARTER S F, HERHOLZ K, ROSA-NETO P, *et al.* Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2019, 25(2): 77–95.
- [40] WONG S L, SUKKAR M B. The SPARC protein: an overview of its role in lung cancer and pulmonary fibrosis and its potential role in chronic airways disease[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174(1): 3–14.
- [41] VAFADAR-ISFAHANI B, BALL G, COVENEY C, *et al.* Identification of SPARC-like 1 protein as part of a biomarker panel for Alzheimer's disease in cerebrospinal fluid[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 28(3): 625–636.