

·基础研究·

circRNA-miRNA-mRNA 调控网络的挖掘以筛选缺血性脑卒中的潜在治疗药物

吴玉敏, 王钟兴, 于 瑜

(中山大学附属第一医院麻醉科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】挖掘缺血性脑卒中潜在的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络及其相应的治疗药物。【方法】利用 GEO 数据库发布的数据并选择研究大脑中动脉栓塞(MCAO)小鼠 RNA 表达水平的 3 个数据集 GSE115697、GSE51586 和 GSE137482, 使用 R 中的 Limma 包来筛选差异表达的 mRNA (DEmRNA)、DEcircRNA 和 DEmiRNA。采用 MiRWalk、StarBase 等多种生物信息学方法结合的综合策略来挖掘与脑卒中相关的 circRNA-miRNA-mRNA 网络, 由 Cytoscape 软件完成核心子网络的筛选和可视化输出。通过基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析研究 ceRNA 网络的功能, 以富集超过 10 个基因且假发现率(FDR) < 0.05 的通路认为具有统计学意义。最后使用药物基因组学数据库 connectivity map (CMap) 筛选潜在的脑卒中治疗药物, 并对野生型小鼠构建 MCAO 模型验证药物治疗效果。【结果】共筛选得出 1 249 个 DEmRNA, 294 个 DEmiRNA 和 70 个 DEcircRNA, 并发现 3 个 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络可能与缺血性脑卒中密切相关。根据上述结果筛选得出 Austricine、Metyrapone 和 Desoxypeganine 这 3 种最有可能逆转由脑卒中相关 ceRNA 网络引起的改变的药物, 并以 Metyrapone 为例验证所筛选药物对缺血性脑卒中确实可以改善术后第一($P=0.0014$)、二天($P=0.0161$)的神经功能损伤和减少脑梗死体积($P=0.0049$), 发挥脑保护作用。【结论】本研究从 circRNA-miRNA-mRNA 网络视角为缺血性脑卒中的发病机制提供了新的见解, 本文预测得出的 3 种药物为缺血性脑卒中的治疗方法提供了新的线索。

关键词: 缺血性脑卒中; circRNA; mRNA; 竞争性内源性 RNA; CMap 数据库

中图分类号: R743.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2025)03-0456-10

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ.(med.sci).2025.0310

Identification of circRNA-miRNA-mRNA Regulatory Networks for Exploring Potential Therapeutic Drugs of Ischemic Stroke

WU Yumin, WANG Zhongxing, YU Yu

(Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: WANG Zhongxing, E-mail: wzhxing@mail.sysu.edu.cn; YU Yu, E-mail: yuyu25@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】To unearth novel circRNA-miRNA-mRNA network and potential drugs in ischemic stroke. 【Methods】Data from the GEO database were utilized, focusing on three datasets (GSE115697, GSE51586, and GSE137482) that examine RNA expression levels in middle cerebral artery occlusion (MCAO) mouse models. Differentially expressed mRNA (DEmRNA), DEcircRNA, and DEmiRNA were identified using the Limma package in R. A comprehensive strategy combining bioinformatics tools such as MiRWalk and StarBase was employed to identify circRNA-miRNA-mRNA networks associated with ischemic stroke. Hub sub-networks were screened and visualized using Cytoscape software. Functional analyses of the ceRNA networks were performed using Gene Ontology (GO) enrichment

收稿日期: 2025-02-06

录用日期: 2025-04-02

基金项目: 国家自然科学基金(82272224, 82472219); 广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515012475, 2021A1515220042)

作者简介: 吴玉敏, 第一作者, 研究方向: 脑缺血再灌注损伤的保护, E-mail: wuymin39@mial2.sysu.edu.cn; 王钟兴, 通信作者, 博士生导师, 主任医师, E-mail: wzhxing@mail.sysu.edu.cn; 于瑜, 通信作者, E-mail: yuyu25@mail.sysu.edu.cn

and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) pathway analysis, with pathways containing more than 10 enriched genes and an false discovery rate (FDR) < 0.05 considered statistically significant. Lastly, the Connectivity Map (CMap) was applied to identify potential therapeutic drugs for ischemic stroke and the MCAO model was established in wild-type mice to verify the therapeutic effect. **[Results]** Totally, 1,249 DEmRNA, 294 DEmiRNA and 70 DEcircRNA were identified and it was found that 3 circRNA-miRNA-mRNA networks might be closely related to ischemic stroke. Based on these findings, Austricine, Metyrapone and Desoxyepaganine were the most likely drugs that able to reverse the changes caused by stroke-related ceRNA networks. Metyrapone, taken as an example, was validated to improve neurological function damage on the first ($P=0.0014$) and second ($P=0.0161$) days post-surgery and reduce infarct volume ($P=0.0049$), thereby exerting a neuroprotective effect in ischemic stroke. **[Conclusions]** Our study provides a novel insight into the pathogenesis and therapy of ischemic stroke from the perspective of circRNA-miRNA-mRNA regulatory network. The three drugs predicted in our research provide new clues for the treatment of ischemic stroke.

Key words: ischemic stroke; circRNA; mRNA; competitive endogenous RNA; connectivity map database

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2025, 46(3):456-465]

脑卒中是全球第2大死亡原因,也是致残的主要原因^[1]。其特点是发病率高、死亡率高和致残率高^[2]。缺血性脑卒中是最常见的脑卒中类型,约占80%^[1],其治疗重点是快速血管再通和神经保护,但效果不尽如人意。目前针对发病机制所开发的治疗方法疗效有限,理解缺血性脑卒中背后的分子机制可为疾病治疗提供新线索。RNA可分为编码蛋白的信使RNA(messenger RNA, mRNA)及微小RNA(microRNA, miRNA)和环状RNA(circular RNA, circRNA)等非编码RNA。miRNA长度约为22个核苷酸,是具有进化保守性的内源性单链RNA,通过抑制翻译来调节转录后基因表达^[3]。circRNA具有单链、共价闭合环状结构,通过不同的机制调节一系列生物过程,如miRNA海绵作用、形成剪接mRNA和表达它们的宿主基因^[4]。circRNA和mRNA都含一段可与相应miRNA结合的序列,可以作为连接其他类型RNA的桥梁^[5]。一对circRNA-mRNA通过竞争性结合共享的miRNA实现相互通讯,形成竞争性内源性RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA)^[5]。一对ceRNA内circRNA和mRNA相互竞争结合miRNA的不平衡状态与包括脑卒中在内的多种疾病相关^[6-8],例如circTTC3作为内源性miR372-3p海绵,可抑制神经干细胞中的Toll样受体4从而减轻脑缺血损伤^[9];circRNA DLGAP4可以调节miR-143以维持血脑屏障完整性^[10];circPTP4A2结合has-miR-942-5p后调节下游基因FCGR3A可减轻炎症反应^[11]。以上ceRNA网络相关研究对脑卒中新治

疗手段的开发具有启示作用,因此在本研究中将利用公共数据库,对非编码RNA表达谱进行综合分析,旨在挖掘出缺血性脑卒中潜在的调控网络及诊治靶点。

1 材料与方法

1.1 数据收集

我们从GEO数据库获取表达谱数据集,并选择了研究大脑中动脉栓塞小鼠RNA表达水平的3个数据集。circRNA数据来自GSE115697。miRNA和mRNA数据分别来自GSE51586和GSE137482。

1.2 circRNA、miRNA和mRNA差异表达分析

数据标准化后,我们使用R中的Limma包来筛选DEmRNA和DEcircRNA。由于miRNA表达的原始数据表示为缺血/对照倍数变化比值,我们使用单样本 t 检验进行分析,并通过Benjamini-Hochberg方法将值校正为FDR(false discovery rate)。DEmRNA的选择标准为 $FDR < 0.01$ 和 $|\log_2FC| > 2$ 。由于大多数circRNA和miRNA的 $|\log_2FC| < 1$ 且大多数 $FDR > 0.05$,我们将DEcircRNA和DEmiRNA的选择标准设定为 $P < 0.05$ 。

1.3 构建circRNA-miRNA-mRNA调控网络

从miRWalk^[12](<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)收集DEmiRNA的潜在靶基因,并通过starBase^[13](starbase.sysu.edu.cn/)预测DEcircRNA-miRNA之间的潜在调控关系。我们使用R进行超几何检验来衡量每个候选ceRNA对之

间共享 miRNA 的显著性^[14]。P 值的计算算式如下:

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{x-1} \frac{\binom{k}{i} \binom{T-k}{M-i}}{\binom{T}{M}}$$

T 表示 miRNA 的总数; M 表示与该特定 circRNA 相互作用的 miRNA 数量; k 是与 mRNA 相互作用的 miRNA 数量; x 是 circRNA 和 mRNA 共享的 miRNA 数量。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。另外计算相关性得分, 等于 circRNA 倍数变化乘以 mRNA 倍数变化。正相关性得分意味着这对 ceRNA 同步增加或减少, 符合 ceRNA 对的特征。我们根据超几何检验和相关性得分筛选 ceRNA。最终使用 Cytoscape 3.7.1 完成 ceRNA 网络构建和可视化。

1.4 核心子网络筛选

分子复合物检测(molecular complex detection, MCODE)是 Cytoscape 软件中常用的聚类算法, 可以识别大型网络中高度相互作用的核心簇。Cytoscape 另一个插件 CytoHubba 可以通过计算每个点的度、接近度和边渗透组分(edge percolated component, EPC)得分来选择核心基因。我们使用 MCODE 插件获取核心 ceRNA 网络, 截止值为 2。由度、接近度得分和 EPC 得分最高的前 20 个节点组成的子网络也被视为核心子网络。

1.5 功能富集分析

使用 clusterProfiler 包进行 GO 分析和 KEGG 通路分析^[15]。富集超过 10 个基因且 $FDR < 0.05$ 的通路被认为具有统计学意义。通过调整 P 值对显著富集的 GO 基因集和 KEGG 通路进行排序, 并使用 ggplots2 包进行可视化。

1.6 预测潜在药物

药物基因组学数据库 connectivity map(CMap) 在线 Web 工具(<https://clue.io/>)测量了超过 1 000 种小分子化合物处理前后多种细胞系的基因表达变化^[16]。上传感兴趣的基因集后, 可以找到 CMap 数据库中促进或抑制该基因的药物, 并计算出一个范围从 -100 到 100 的连接得分。负得分表示化合物对查询基因的逆转效应, 意味着这种化合物可能对疾病具有治疗效果, 负得分越低, 逆转遗传变化的机会越大。本文将核心 ceRNA 网络中的基因上传到 CMap Web 工具, 以寻找可能逆转脑缺血后这些 ceRNA 异常变化的药物。

1.7 小鼠大脑中动脉栓塞模型建立及治疗药物验证

1.7.1 大脑中动脉栓塞模型建立及药物治疗 14 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠购自广东南模生物科技有限公司, 小鼠体质量为 21~25 g, 许可证号: SCXK(粤)-2022-0062。本实验已获得广州医科大学附属第一医院伦理委员会批准, 伦理审批号为 20250058。体积分数 3% 异氟烷麻醉后将小鼠仰卧固定于操作台上, 用麻醉面罩以体积分数 1.5% 异氟烷维持麻醉。取颈正中切口, 小心暴露小鼠左侧颈动脉鞘, 夹闭颈总动脉, 分离颈外、颈内动脉后于远心端结扎颈外动脉, 血管夹夹闭颈内动脉并穿一根线用于后续固定线栓。于颈外动脉近心端剪一小口, 将线栓插入颈外动脉后松开颈内动脉的血管夹, 将线栓顺着血管缓缓插入至约 1 cm 处, 以感受到阻力为插栓终点。固定线栓, 松开颈总动脉夹后清理术野并缝合伤口。将小鼠侧卧位放于笼中, 维持体温。缺血 90 min 后将线栓拔出实现再灌注。于再灌注后、术后 1 d、术后 2 d 进行药物治疗, 分别对给药组/对照组小鼠进行腹腔注射 Metyrapone(100 mg/kg)/PBS 缓冲液。

1.7.2 神经功能评分和脑梗死体积测定 术后第 1、2 天对小鼠进行改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS), 从运动、平衡、反射等多个方面评估小鼠神经功能, 评分范围为 0~14 分, 评分越高表示神经功能损伤越重。术后第 3 天采用 3% 异氟烷对小鼠进行麻醉诱导后将小鼠仰卧固定于操作台上, 经左心室灌注 20 mL 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液快速冲净血液后取下小鼠脑组织, 放入小鼠脑模具中沿冠状面用刀片均匀切成 2 mm 厚度脑切片, 浸泡于 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)溶液中, 37 °C 孵育 20 min 左右待脑组织变色后将 TTC 溶液回收, 加入 40 g/L 多聚甲醛溶液于 4 °C 固定过夜后将脑组织取出拍照, 后续通过 image j 软件进行梗死面积分析和测定。红色区域为正常组织, 白色区域为梗死组织。相关计算算式如下, 梗死程度: 梗死体积百分比=(对侧正常组织体积-梗死侧正常组织体积)/对侧正常组织体积×100%。水肿程度: 水肿指数=梗死侧脑组织体积/对侧脑组织体积×100%。

1.8 统计方法

通过 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析。神经功能评分、脑梗死体积和水肿指数结果均

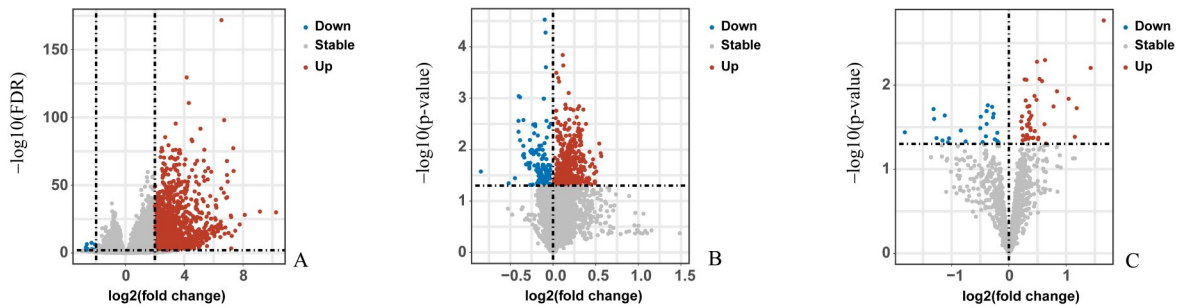
以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,为正态分布的计量结果,满足方差齐性,组间比较使用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺血性脑卒中差异表达 RNA 的筛选

本研究包括 3 个数据集 (GSE137482、

GSE115697、GSE51586)。根据上述筛选标准,我们在 GSE137482 数据集中共筛选出 1 249 个 DE mRNA,其中 1 236 个为上调基因、13 个为下调基因(图 1A);在 GSE51586 数据集中共筛选出 294 个 DE miRNA,其中 209 个为上调基因、85 个为下调基因(图 1B);在 GSE115697 数据集中共筛选出 70 个 DE circRNA,其中 45 个为上调基因、25 个为下调基因(图 1C)。



A: Volcano map of DEG in the GSE137482 (mRNA) dataset. B: Volcano map of DEG in the GSE51586 (miRNA) dataset. C: Volcano map of DEG in the GSE115697 (circRNA) dataset. Red dots represented up-regulated genes while blue ones represented down-regulated. DE mRNA were selected with the cutoff criteria of $FDR < 0.01$ and $|\log_2FC| > 2$. DE circRNA and DE miRNA were selected with the cutoff criteria of $P < 0.05$. DEG: differently expressed gene.

图 1 缺血性脑卒中差异表达基因的火山图

Fig. 1 Volcano plots for DEG in ischemic stroke

2.2 circRNA-miRNA-mRNA 网络构建

我们使用在线数据库 miRWalk 和 starBase 分别预测 DE miRNA 和 DE circRNA 的潜在靶基因。经过超几何检验筛选后,共发现了 181 个 circRNA-mRNA ceRNA 对,其中包括 161 个 mRNA 和 22 个 circRNA,连同 72 个 miRNA,三者共同构成了一个巨大的 ceRNA 网络,如图 2 所示。

为了进一步筛选核心子网络,我们利用 Cytoscape 软件中的多个插件对原始 ceRNA 网络进行了分析。通过设置 MCODE 分析的节点度阈值为 2,筛选得到一个子网络,为 mmu_circ_0001529/mmu-miR-883a-3p/mmu-miR-1981-3p/mmu-miR-877-3p/Cybb(图 3A)。同时, cytoHubba 插件基于度(degree)、接近度(closeness)和 EPC 得分 3 种不同算法得到 3 个模块,每个模块筛选得出的前 20 个基因如图 3B-3D 所示。

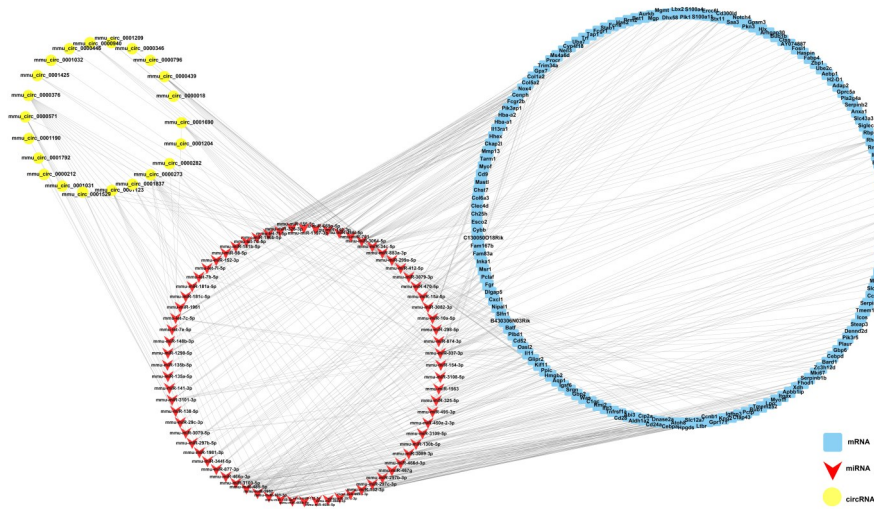
2.3 GO 分析和 KEGG 通路分析

为了研究与脑卒中相关的潜在 ceRNA 网络的功能,我们对图 2 中 DE circRNA-DE miRNA-DE mRNA 三元网络中的所有基因进行了 GO 分析

和 KEGG 功能富集分析, $FDR < 0.05$ 。GO 分析包括 3 个方面:生物过程(biological process, GO-BP)、分子功能(molecular function, GO-MF)和细胞组分(cellular component, GO-CC),最终获得了 1 698 个富集结果。图 4A 展示了按 FDR 排名的显著富集的 GO-BP、GO-MF 和 GO-CC 结果。GOBP 分析表明,在缺血性脑卒中时,与白细胞相关的生理和病理过程如激活、趋化和迁移被上调。GOCC 及 GOMF 分析表明图 2 中的 ceRNA 网络主要功能定位在细胞外基质和溶酶体,并涉及许多与脑卒中相关的分子功能,如细胞因子受体活性和细胞黏附分子结合反应。在 KEGG 通路分析中,总共获得了 72 个结果,图 4B 展示了按照显著程度从高到低排列的前 10 个通路,其中大多数与细胞因子-细胞因子受体相互作用、NF- κ B 信号通路、趋化因子信号通路和补体以及凝血级联反应相关。

2.4 核心 circRNA-miRNA-mRNA 网络选择

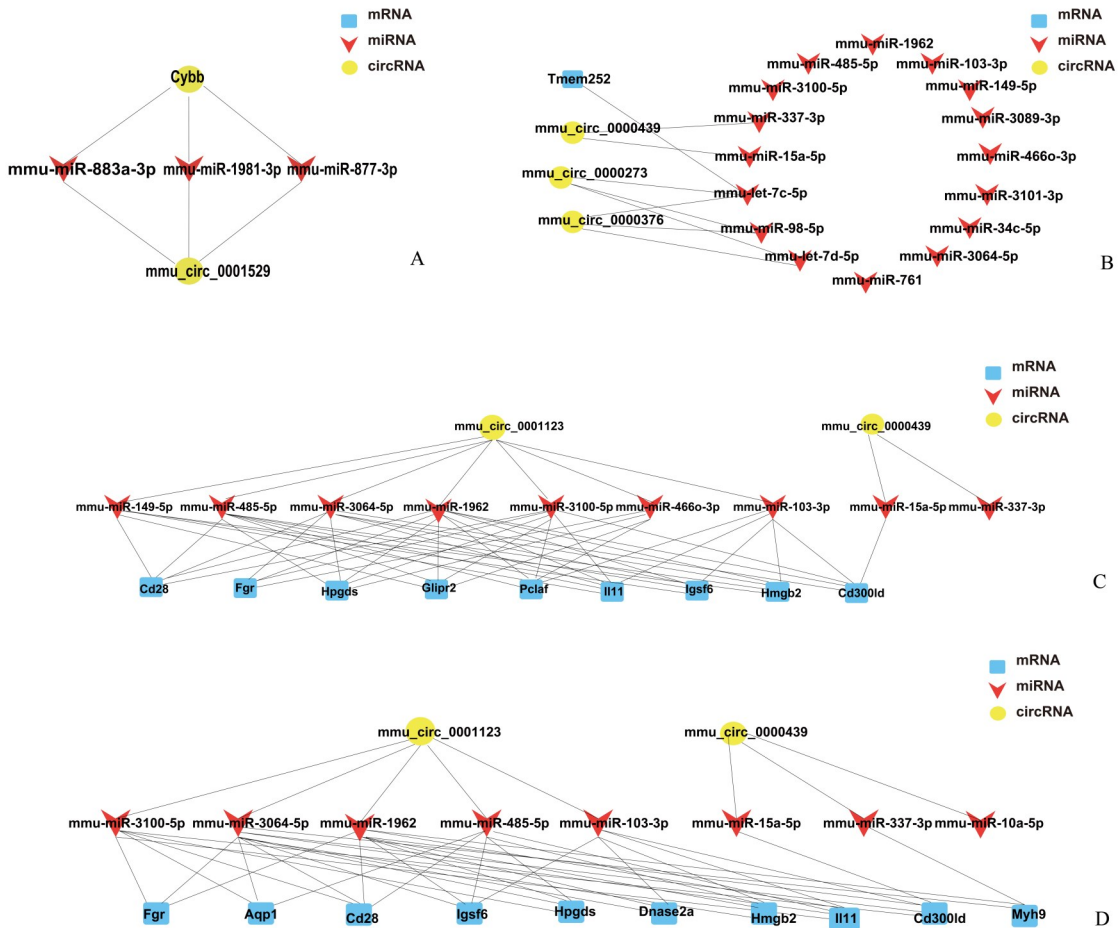
为了进一步缩小核心 ceRNA 的范围,我们选择了多个核心子网络的交集作为最终与脑卒中相关的 ceRNA 网络,最终筛选得到 3 个关键的脑卒中



The blue rectangles, yellow circles and red arrows indicated mRNA, circRNA and miRNA respectively. This circRNA-miRNA-mRNA network was comprised of 161 mRNA, 72 miRNA and 22 circRNA.

图2 缺血性脑卒中 ceRNA 网络的构建

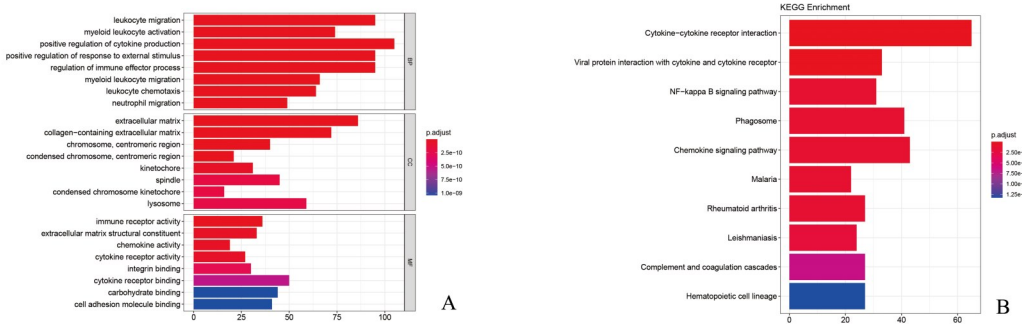
Fig. 2 Construction of ceRNA network in ischemic stroke



A: The sub-network selected by MCODE. B: Top 20 genes in CytoHubba degree score. C: Top 20 genes in CytoHubba closeness score. D: Top 20 genes in CytoHubba EPC score.

图3 缺血性脑卒中核心子网络的筛选

Fig. 3 Identification of hub sub-network in ischemic stroke



A: GO enrichment analysis of all genes in the DEcircRNA-DEmiRNA-DEmRNA network. BP: biological process; CC: cellular component; MF: molecular function. B: KEGG pathway enrichment analysis of all genes in the DEcircRNA-DEmiRNA-DEmRNA network.

图4 缺血性脑卒中相关 ceRNA 网络功能性分析

Fig. 4 Functional analysis of ischemic stroke-related ceRNA networks

相关 ceRNA 网络 (表 1)。mmu_circ_0001529、mmu_circ_0000273 和 mmu_circ_0001123 是基于以上分析结果得出的关键 circRNA。

2.5 Cmap 药物预测

从 CMap 下载预测药物结果后,根据药物的连通性评分从低到高对所有药物进行排序。图 5 展示了得分最低的 30 种药物。根据 CMap 的计算原理,Austricine、Metyrapone 和 Desoxypeganine 获得了最低的连接得分 (即-99.93),可能有效逆转由核心 ceRNA 网络引起的改变,是治疗缺血性脑卒中的潜在药物。其中,Austricine 是降血脂药物,Metyrapone 可以作为细胞色素 P450 抑制剂、11-β

羟类固醇脱氢酶抑制剂、盐皮质激素受体拮抗剂,并用于诊断肾上腺功能不全和治疗高皮质醇血症,而 Desoxypeganine 则是一种乙酰胆碱酯酶。

2.6 药物治疗效果验证

在 3 种药物中,本研究选择 Metyrapone 作为代表药物展开实验以验证所筛选出的药物对于缺血性脑卒中的治疗效果。图 6A 为使用线栓法对小鼠构建大脑中动脉栓塞模型的示意图。接受 Metyrapone (100 mg/kg) 治疗的小鼠术后第 1 天的神经功能评分 (4.25±0.96) 明显优于对照组 (9.00±1.41),术后第 2 天 Metyrapone 治疗组的 mNSS 评分 (3.25±0.96) 仍低于对照组 (7.50±2.38),说明神经

Connectivity score	Drug	Description
-99.93	desoxypeganine	acetylcholinesterase inhibitor, monoamine oxidase inhibitor
-99.93	metyrapone	cytochrome P450 inhibitor, 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor, mineralocorticoid receptor antagonist
-99.93	austricine	hypolipidemic
-99.89	nicergoline	adrenergic receptor antagonist
-99.89	temozolomide	DNA alkylating drug, DNA damage inducer, DNA inhibitor, topoisomerase inhibitor
-99.89	BRD-K14048378	lysophospholipid receptor agonist
-99.86	griseofulvin	microtubule inhibitor, microtubule stabilizing agent, mitosis inhibitor
-99.86	isoxicam	cyclooxygenase inhibitor
-99.86	lidocaine	histamine receptor agonist, voltage-gated sodium channel modulator
-99.86	fluoropyruvate	PDH inhibitor
-99.82	diethylcarbamazine	lipoygenase inhibitor
-99.82	necrostatin-1	RIPK inhibitor, indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor
-99.79	sildenafil	phosphodiesterase inhibitor
-99.78	VX-222	HCV inhibitor, RNA-directed RNA polymerase inhibitor
-99.75	homochlorcyclizine	antihistamine
-99.75	zileuton	leukotriene synthesis inhibitor, lipoygenase inhibitor
-99.72	phenotamine	adrenergic receptor antagonist
-99.72	clofibrate	PPAR receptor agonist
-99.72	danazol	estrogen receptor antagonist, luteinizing hormone releasing hormone antagonist, progesterone receptor agonist, steroid derivative with antigonadotropic and anti-estrogenic activities, tumor necrosis factor modulate
-99.72	spiperone	dopamine receptor antagonist
-99.72	atomoxetine	norepinephrine transporter inhibitor, adrenergic transmitter uptake inhibitor
-99.68	rucaparib	PARP inhibitor
-99.68	PRL-3-inhibitor-1	PRL phosphatase inhibitor, tyrosine phosphatase inhibitor
-99.68	lapatinib	EGFR inhibitor, EGFR antagonist, epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, receptor tyrosine protein kinase inhibitor, tyrosine kinase inhibitor
-99.65	guanfacine	adrenergic receptor agonist, HCN (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated) channel blocker
-99.65	piperidolate	acetylcholine receptor antagonist
-99.61	butoconazole	cell wall synthesis inhibitor, sterol demethylase inhibitor
-99.61	actarit	interleukin receptor agonist
-99.51	evoxine	antagonist of strychnine and pentylenetetrazole; enhances effects of narcotics

More negative in connectivity score means the higher possibility to reverse the DEG. CMap: connectivity map.

图5 CMap 分析药物预测结果

Fig. 5 Drug prediction analysis from CMap

表1 脑卒中相关核心 ceRNA 网络结果
Table 1 Results of stroke-related hub ceRNA network

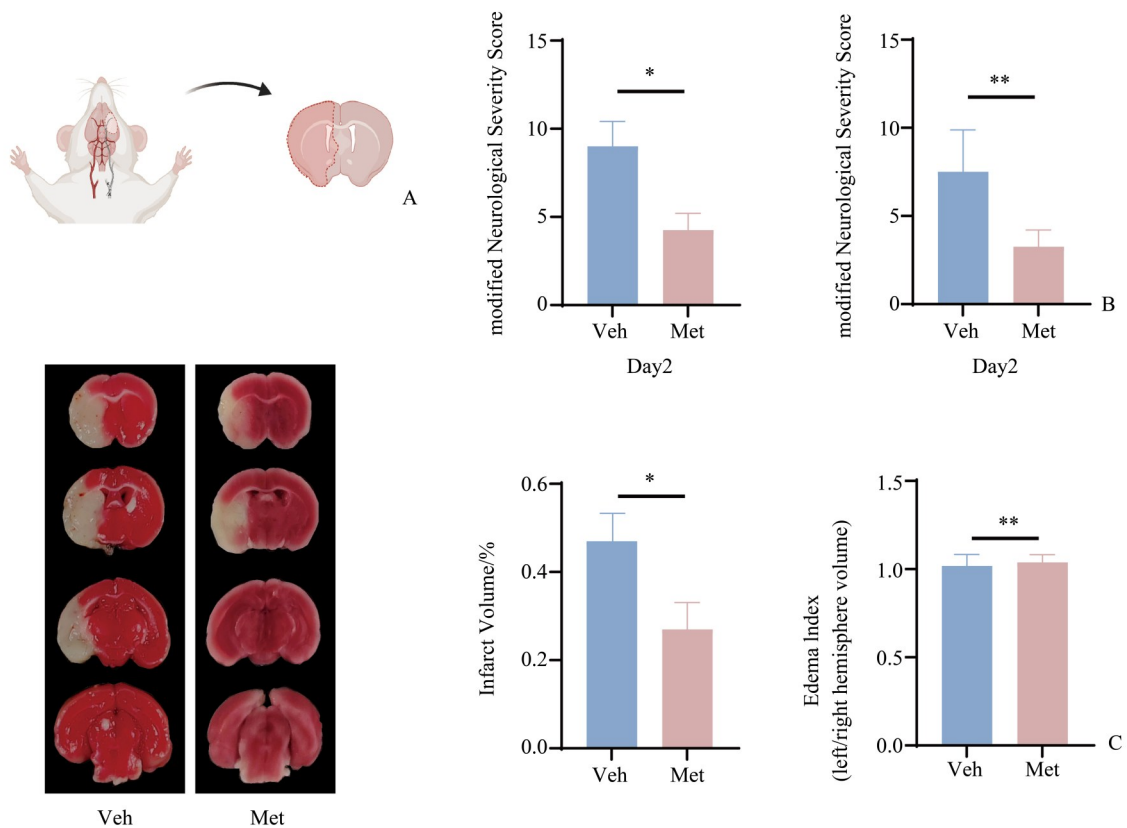
ceRNA	circRNA	mRNA	<i>P</i>	DEmiRNA	Correlation score
1	mmu_circ_0001529	Cybb	0.01	mmu-miR-1981-3p, mmu-miR-883a-3p, mmu-miR-877-3p	1.61
2	mmu_circ_0000273	Tmem252	0.00	mmu-let-7c-5p	1.27
		Cd300ld	0.03	mmu-miR-103-3p, mmu-miR-3100-5p, mmu-miR-3064-5p, mmu-miR-1962	2.36
		Il11	0.04	mmu-miR-103-3p, mmu-miR-149-5p, mmu-miR-3100-5p, mmu-miR-485-5p, mmu-miR-3064-5p, mmu-miR-1962	1.42
		Cd28	0.03	mmu-miR-149-5p, mmu-miR-3100-5p, mmu-miR-485-5p, mmu-miR-3064-5p, mmu-miR-1962	0.98
		Hpgds	0.01	mmu-miR-466o-3p, mmu-miR-3100-5p, mmu-miR-485-5p, mmu-miR-3064-5p, mmu-miR-1962	0.84
		Fgr	0.03	mmu-miR-466o-3p, mmu-miR-3100-5p, mmu-miR-3064-5p, mmu-miR-1962	1.90
		Dnase2a	0.02	mmu-miR-103-3p, mmu-miR-3064-5p, mmu-miR-1962	0.92
3	mmu_circ_0001123	Glipr2	0.01	mmu-miR-149-5p, mmu-miR-466o-3p, mmu-miR-3100-5p, mmu-miR-485-5p, mmu-miR-1962	1.40
		Pclaf	0.02	mmu-miR-103-3p, mmu-miR-466o-3p, mmu-miR-3100-5p, mmu-miR-485-5p, mmu-miR-1962	2.76
		Hmgb2	0.00	mmu-miR-103-3p, mmu-miR-149-5p, mmu-miR-485-5p, mmu-miR-3064-5p, mmu-miR-1962	1.22
		Igsf6	0.00	mmu-miR-103-3p, mmu-miR-149-5p, mmu-miR-485-5p, mmu-miR-3064-5p, mmu-miR-1962	1.16
		Aqp1	0.04	mmu-miR-3100-5p, mmu-miR-485-5p, mmu-miR-3064-5p	1.20

correlation score = circRNA Fold Change * mRNA Fold Change. correlation score >0 means the pair of ceRNA increase or decrease simultaneously.

功能的改善作用在术后第2天时仍较为显著(图6B)。于术后第3天取脑组织进行TTC染色评估脑梗死体积, Metyrapone 治疗组小鼠的脑梗死体积(0.270 ± 0.061)明显小于对照组(0.470 ± 0.069), 脑水肿程度方面 Metyrapone 治疗组(1.038 ± 0.044)与对照组(1.018 ± 0.065)之间则差异无统计学意义(图6C)。以上结果表明, Metyrapone 对于缺血性脑卒中产生的神经损伤具有明确的改善作用, 通过 circRNA 相关 ceRNA 网络寻求缺血性脑卒中治疗药物的策略具有一定的可行性。

3 讨论

缺血性脑卒中是一种多因素引起的复杂疾病, 更好地理解缺血性脑卒中背后的分子机制可以为探索治疗方法提供新策略。由 circRNA、miRNA 和 mRNA 组成的 ceRNA 网络近来引起了人们的关注^[17-18]。因此, 本研究建立了 circRNA 参与调控的 ceRNA 网络, 尝试为探索有效的治疗方法提供新的视角。在本研究中, 共挖掘出 1 249 个 DEmRNA、294 个 DEmiRNA 和 70 个 DEcircRNA。功能分析表明其主要涉及神经炎症反应, 如与白细胞相关的病



A: Schematic diagram depicts the middle cerebral artery occlusion mouse model. B: Modified neurological severity score of mice treated with vehicle or metyrapone at 1 and 2 days after surgery. * $P=0.0014$, ** $P=0.0161$, compared with vehicle group, respectively. $n=4$ per group. Means \pm SD, student's t -test. C: Infarct volume and edema index were measured with TTC staining. * $P=0.0049$, ** $P=0.6325$, compared with vehicle group. $n=4$ per group. Means \pm SD, student's t -test. Veh: mice treated with vehicle. Met: mice treated with Metyrapone.

图6 Metyrapone 治疗作用的验证结果

Fig 6 Validation of the therapeutic effect of Metyrapone

理过程和趋化因子信号通路。在此基础上,本文进一步筛选得到3个关键的 ceRNA 网络和3种可能对脑缺血有效的潜在药物。

在本文提出的核心 ceRNA 网络中,有部分基因在之前就被报道过与脑卒中相关。如 LRP6 (mmu_circ_0001529)可能通过抑制 GSK-3 途径、激活内源性神经保护途径和减少有害的线粒体和促炎效应来发挥神经保护作用^[19]。而部分基因则是首次被揭示与缺血性脑卒中相关,如 Tmem252、Pclaf、Fgr、Dnase2、Cd300ld,其功能还需要进一步研究。

ceRNA 网络是一种新的基因调控方法,在脑卒中的疾病进展过程中产生着重大影响^[20]。本研究中筛选出的3对关键 ceRNA 对可能在脑缺血/再灌注损伤中发挥重要作用。第一对是 mmu_circ_0001529 和 Cybb。在 MCAO 模型小鼠中 Cybb

mRNA 的相对表达水平显著下降,而右美托咪啶可能通过逆转 Cybb 表达水平变化显著减少 MCAO 诱导的细胞死亡从而在缺血性脑卒中中发挥保护作用^[21]。mmu_circ_0001529 可能作为内源性 miRNA 海绵来调节 Cybb 表达水平,这意味着两者可能共同参与上述过程。第二对 ceRNA 是 mmu_circ_0000273 和 Tmem252。目前并未找到讨论其两者之间调控关系的公开文章,因此这对 ceRNA 对缺血性脑卒中的影响需要被进一步研究。mmu_circ_0001123 和 Cd300ld/Ill1/Cd28/Hpgds/Fgr/Dnase2a/Glpr2/Pclaf/Hmgb2/Igsf6/Aqp1 则是最后一对 ceRNA。mmu_circ_0001123 可以调节总共 11 个靶 mRNA,其中个别对脑卒中具有神经保护作用,而个别则具有神经毒性。CD28 激动剂可诱导调节性 T 细胞扩增并减少小鼠脑卒中损伤^[22]。而在软脑膜血管中广泛存在的 AQP1 与 NKCC1 在小鼠脑和

脊髓的血管中的共分布可能与脑卒中诱导的脑水肿相关^[23-24]。目前没有文章阐述HMGB2对脑缺血的影响,但高水平的HMGB2与心肌缺血损伤的梗死区保护作用相关^[25]。鉴于mmu_circ_0001123调节的多个下游靶基因作用相反,其功能相当复杂。

基于Austriacine已被证实的降脂和抗炎特性^[26],患者可能会从服用这种药物中受益,但这一猜测仍需要进一步的实验来证实。Metyrapone可以抑制细胞色素P450和皮质酮合成,在缺血性脑卒中发生后给予Metyrapone治疗可以减轻炎症反应并减小糖尿病小鼠的脑梗死面积^[27]。Desoxypeganine是一种胆碱酯酶抑制剂和单胺氧化酶A的选择性抑制剂,对治疗阿尔茨海默病有效^[28]。进一步研究这3种药物并确认其有效性时,需要阐明它们是否有助于治疗缺血性脑卒中及其背后的具体治疗机制。

由于脑缺血的复杂病理机制,从调控网络出发更有利于找到其治疗方法。值得注意的是,目前在

脑卒中领域中已有较多非编码RNA相关ceRNA网络的研究,但目前围绕circRNA相关ceRNA的相关研究仍较少,进一步明确circRNA相关ceRNA网络对小鼠缺血性脑卒中发生发展的潜在影响有助于进一步开发有效的药物治疗方案。本研究主要完成了数据挖掘和数据分析的工作,在初步结果的基础上以Metyrapone为例展开动物实验验证其在缺血性脑卒中中的脑保护作用,在一定程度上证实本研究提出的从circRNA相关ceRNA网络出发寻求脑卒中治疗方法的策略具有一定的真实性和可行性。但同时也具有一定的局限性,如本研究中关于3个关键ceRNA网络及其涉及基因是否在缺血性脑卒中的不同阶段发挥不同作用并未进行深入研究,以及3种潜在药物的具体作用机制未能进行进一步探索,在未来的研究中可进一步验证上述核心基因的表达及探索药物的具体作用机制,并验证这些circRNA/miRNA/mRNA与缺血性脑卒中之间的关系,以期完善优化本研究。

参考文献

- [1] Zhang LY, Hu YY, Liu XY, et al. The role of astrocytic mitochondria in the pathogenesis of brain ischemia [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(4): 2270-2282.
- [2] Cheng S, Xu Z, Bian SZ, et al. The STROMICS genome study: deep whole-genome sequencing and analysis of 10 K Chinese patients with ischemic stroke reveal complex genetic and phenotypic interplay [EB/OL]. (2023-7-21) [2025-01-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37479695/>.
- [3] Shang R, Lee S, Senavirathne G, et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(12): 816-833.
- [4] Dong JN, Zeng ZE, Huang Y, et al. Challenges and opportunities for circRNA identification and delivery [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2023, 58(1): 19-35.
- [5] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 344-352.
- [6] Kohansal M, Alghanimi YK, Banoon SR, et al. CircRNA-associated ceRNA regulatory networks as emerging mechanisms governing the development and biopathology of epilepsy [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(4): e14735.
- [7] He L, Zhang FR, Zhu YL, et al. A crosstalk between circular RNA, microRNA, and messenger RNA in the development of various brain cognitive disorders [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 960657.
- [8] Piergiorgio RM, Vasconcelos ATR, Santos-Rebouças CB. Understanding the (epi)genetic dysregulation in Parkinson's disease through an integrative brain competitive endogenous RNA network [J]. *Mech Ageing Dev*, 2024, 219: 111942.
- [9] Yang B, Zang L, Cui J, et al. Circular RNA TTC3 regulates cerebral ischemia-reperfusion injury and neural stem cells by miR-372-3p/TLR4 axis in cerebral infarction [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 125.
- [10] Bai Y, Zhang Y, Han B, et al. Circular RNA DLGAP4 ameliorates ischemic stroke outcomes by targeting miR-143 to regulate endothelial-mesenchymal transition associated with blood-brain barrier integrity [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(1): 32-50.
- [11] Wang X, Li S, Liu Y, et al. Construction of circRNA-mediated immune-related ceRNA network and identification of circulating circRNAs as diagnostic biomarkers in acute ischemic stroke [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 4087-4104.
- [12] Sticht C, De La Torre C, Parveen A, et al. miRWalk: an online resource for prediction of microRNA binding sites [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0206239.
- [13] Li JH, Liu S, Zhou H, et al. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D92-97.
- [14] Wang WL, Yang Z, Zhang YJ, et al. Competing endogenous

- RNA analysis reveals the regulatory potency of circRNA_036186 in HNSCC [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(4): 1529-1543.
- [15] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287.
- [16] Subramanian A, Narayan R, Corsello S M, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles [J]. *Cell*, 2017, 171(6): 1437-1452.e17.
- [17] 李晓凤, 唐明政, 刘禧禧, 等. 肺缺血-再灌注核心基因介导的竞争性内源性RNA网络的构建 [J]. *器官移植*, 2024, 15(1): 70-81.
- Li XF, Tang MZ, Liu XX, et al. Construction of competitive endogenous RNA network mediated by lung ischemia-reperfusion core genes [J]. *Organ Transpl*, 2024, 15(1): 70-81.
- [18] 李燕, 杨柳, 张勇, 等. 循环外泌体源性微RNA用于胃癌早期诊断的筛选和鉴定 [J/OL]. *重庆医科大学学报*, 1-6 [2025-03-30].
- Li Y, Yang L, Zhang Y, et al. Identification and validation of circulating exosome-derived microRNAs for the early diagnosis of gastric cancer [J/OL]. *J Chongqing Med Univ*, 1-6 [2025-03-30].
- [19] Abe T, Zhou P, Jackman K, et al. Lipoprotein receptor-related protein-6 protects the brain from ischemic injury [J]. *Stroke*, 2013, 44(8): 2284-2291.
- [20] Liu J, Zhang KS, Hu B, et al. Systematic analysis of RNA regulatory network in rat brain after ischemic stroke [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 8354350.
- [21] Liu C, Li ZX, Xi HJ. Bioinformatics analysis and in vivo validation of ferroptosis-related genes in ischemic stroke [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 940260.
- [22] Na SY, Mracsko E, Liesz A, et al. Amplification of regulatory T cells using a CD28 superagonist reduces brain damage after ischemic stroke in mice [J]. *Stroke*, 2015, 46(1): 212-220.
- [23] Li QL, Aalling NN, Förster B, et al. Aquaporin 1 and the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter 1 are present in the leptomeningeal vasculature of the adult rodent central nervous system [J]. *Fluids Barriers CNS*, 2020, 17(1): 15.
- [24] Toader C, Tataru CP, Florian IA, et al. From homeostasis to pathology: decoding the multifaceted impact of aquaporins in the central nervous system [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 14340.
- [25] Liu ZH, Dai DP, Ding FH, et al. Association of serum HMGB2 level with MACE at 1 mo of myocardial infarction: Aggravation of myocardial ischemic injury in rats by HMGB2 via ROS [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312(3): H422-H436.
- [26] Sreeja PS, Arunachalam K, Martins DTO, et al. *Sphenodesme involucrata* var. *paniculata* (C. B. Clarke) Munir.: chemical characterization, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of methanol extract of leaves [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 225: 71-80.
- [27] Kim S, Park ES, Chen PR, et al. Dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis is associated with increased inflammation and worse outcomes after ischemic stroke in diabetic mice [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 864858.
- [28] Brunhofer G, Fallarero A, Karlsson D, et al. Exploration of natural compounds as sources of new bifunctional scaffolds targeting cholinesterases and beta amyloid aggregation: the case of chelerythrine [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(22): 6669-6679.

(编辑 余菁)