

韩雪,顾小萍.生物信息学分析昼夜节律基因脑细胞类型特异性改变对衰老的影响[J].中国比较医学杂志,2025,35(3):15-29.

Han X, Gu XP. Bioinformatics analysis of circadian rhythm gene alterations in relation to brain-cell types and their impact on aging [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(3): 15-29.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.03.002

生物信息学分析昼夜节律基因脑细胞类型 特异性改变对衰老的影响

韩 雪^{1,2}, 顾小萍^{1*}

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院麻醉科, 南京 210008; 2. 南京大学医学院, 南京 210093)

【摘要】 目的 面对人口老龄化带来的挑战,衰老相关神经退行性疾病的发病率持续攀升,而其发病机制尚不明晰,治疗手段有限。本研究聚焦于衰老这一发病基础,采用生物信息学方法,探索衰老过程中脑细胞类型特异性基因表达变化及其对衰老的影响,为深入研究脑衰老的生物学机制提供更多依据。**方法** 利用 R 软件中的 Seurat 对青年和老年小鼠脑组织单细胞测序数据集 GSE169606 进行整合、质量控制、数据标准化和统计分析,通过细胞类型注释与差异基因分析,识别出不同细胞类型下的差异表达基因,并借助基因本体论 (Gene Ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 进行功能注释和富集分析,通过蛋白质相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI) 分析差异基因之间的相互作用,最后利用 cytoHubba 插件中 MCC、MNC、DMNC 和 Dgree 4 种算法确定每种细胞中的枢纽基因。**结果** 通过细胞注释共确定了 13 个细胞种类,在老年组和青年组比较后,本研究重点对神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞和内皮细胞 4 种主要细胞类型中筛选出的差异基因进行了深入分析。GO 分析发现神经元、星形胶质细胞及内皮细胞的差异基因均显著富集于昼夜节律相关生物学途径,KEGG 分析发现小胶质细胞和内皮细胞的差异基因均在昼夜节律相关信号通路富集,PPI 分析发现神经元、小胶质细胞和内皮细胞的差异基因生物学网络均显著富集于昼夜节律功能聚类模块。进一步,通过对 4 种算法取交集,筛选出上述细胞类型中的核心基因,在这一过程中,本研究还发现小胶质细胞、星形胶质细胞以及内皮细胞中昼夜节律基因的特异性变化。**结论** 本研究运用单细胞转录组学技术,揭示了衰老过程中神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞及内皮细胞中基因差异表达情况。鉴定出了小胶质细胞、星形胶质细胞及内皮细胞中的枢纽基因,特别是 3 种细胞类型中特异性昼夜节律基因改变,为深入探索大脑衰老的分子机制及开发相关干预措施奠定基础。

【关键词】 昼夜节律基因;昼夜节律;衰老;脑细胞;生物信息学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 03-0015-15

Bioinformatics analysis of circadian rhythm gene alterations in relation to brain-cell types and their impact on aging

HAN Xue^{1,2}, GU Xiaoping^{1*}

(1. Department of Anesthesiology, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008, China. 2. Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093)

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (82171193); 江苏省医学重点学科项目 (ZDXK202232)。

【作者简介】 韩雪 (1993—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 围术期神经认知功能障碍。E-mail: 15722875589@163.com

【通信作者】 顾小萍 (1970—), 女, 博士, 博士生导师, 教授, 研究方向: 围术期神经认知功能障碍。E-mail: xiaopinggu@nju.edu.cn

【Abstract】 Objective With the intensification of population aging, the incidence of aging-related neurodegenerative diseases continues to rise, however, their pathogenesis remains elusive and therapeutic options are limited. This study used bioinformatics approaches to explore brain cell-type-specific changes in gene expression during brain aging and their impacts, to provide further insights into the biological mechanisms of brain aging. **Methods** We analyzed single-cell sequencing datasets (GSE169606) from young and old mouse brains, including integration, quality control, normalization, conduct cell-type annotation and differential gene expression analysis to identify differentially expressed genes (DEGs) across various cell types, using the Seurat package in R software. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) were used for functional annotation and enrichment analyses, and interactions between DEGs were analyzed by protein-protein interaction (PPI) networks. The hub genes in each cell type were identified using the MCC, MNC, DMNC, and Dgree algorithms in the cyto Hubba plugin. **Results** A total of 13 cell types were identified through cell annotation. After comparing the aged and young groups, we focused on in-depth analyses of the DEGs screened from four major cell types: neurons, microglia, astrocytes, and endothelia. GO analysis revealed that DEGs in neurons, astrocytes, and endothelial cells were significantly enriched in biological pathways related to circadian rhythm, and KEGG analysis indicated that DEGs in microglia and endothelial cells were enriched in circadian rhythm-related signaling pathways. PPI analysis also demonstrated that the biological networks of DEGs in neurons, microglia, and endothelial cells were significantly enriched in circadian rhythm functional clustering modules. Furthermore, based on the intersection of the four algorithms, we identified core genes within these cell types and also identified specific variations in circadian rhythm genes in microglia, astrocytes, and endothelial cells. **Conclusions** This study employed single-cell transcriptomics technology to reveal the differential expression of genes in neurons, microglia, astrocytes, and endothelial cells during aging. The identification of hub genes in microglia, astrocytes, and endothelial cells indicated specific changes in circadian rhythm genes across these three cell types. These findings provide a foundation for further studies of the molecular mechanisms involved in brain aging and for the development of related intervention strategies.

【Keywords】 circadian rhythm genes; circadian rhythm; aging; brain cells; bioinformatics

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

衰老是以多系统生理机能逐渐衰退为特征的复杂生物过程,会增加罹患癌症、代谢紊乱和神经退行性病变等疾病的风险,导致死亡风险增加。影响哺乳动物衰老过程的一个重要机制是昼夜节律,衰老的许多特征,如表观遗传改变、营养感知失调和线粒体功能障碍等,既会影响昼夜节律功能,同时还受到生物钟调节^[1]。因此,衰老与昼夜节律机制之间存在双向关系。昼夜节律紊乱也越来越多地被认为是衰老和年龄相关神经退行性疾病的重要症状,临床和动物模型研究进一步揭示了在这些疾病的整个过程中存在进行性昼夜节律功能障碍。衰老与昼夜节律的衰退和分子变化有关,这些变化通过与年龄相关的途径发生,从而加剧衰老过程^[2]。

昼夜节律背后的机制涉及基因表达、蛋白质修饰和分泌的昼夜节律振荡,这些振荡由核心昼夜节律基因的产物控制^[3]。在模型生物体中干预昼夜节律基因揭示了对运动、行为、生理等的

昼夜节律至关重要的基因列表,这些昼夜节律基因及其产物可连接至转录-翻译反馈环路^[4]。该环路包括正向转录调节因子 (brain and muscle arnt like protein 1, BMAL1) 和其相互作用伴侣 (circadian locomotor output cycles kaput, CLOCK) 或 (neuronal PAS domain-containing protein 2, NPAS2), 以及负向转录调节因子 (cryptochromes, CRY) 和 period (PER)^[5]。下丘脑 SCN 区是关键昼夜节律调节器,昼夜节律基因也会在其他脑区^[6]和外周器官^[7]中发生振荡。昼夜节律基因振荡失衡介导的昼夜节律破坏和功能障碍会导致体内稳态失衡和年龄相关疾病,研究昼夜节律在衰老过程中的作用对于促进健康衰老和长寿是必要的。在哺乳动物中,几乎每个细胞都表达与核心昼夜节律机制有关的基因,然而,很少有研究探索衰老过程中昼夜节律基因脑细胞类型特异性改变及其介导的细胞功能变化对衰老的影响。

近年来,随着高通量基因芯片技术和转录组

测序方法的发展,越来越多的生物信息学技术应用用于揭示疾病的发病机制、分子诊断和临床治疗等方面^[8]。本研究利用来自公共平台基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)中的高通量测序数据集 GSE169606,通过生物信息学方法解析衰老小鼠全脑组织细胞类型特异性变化。研究发现,昼夜节律调控相关的信号通路在多个脑细胞群体中显著改变,且昼夜节律基因展现出细胞类型特异性变异。上述发现有助于深入理解昼夜节律与衰老之间的复杂关系,为实现延缓衰老进程、开发针对衰老相关疾病治疗策略的科学探索提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据获取

单细胞测序数据集 GSE169606 来自于公共数据库 GEO 的官方网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)^[9],该数据集基于 GPL24247 Illumina NovaSeq 6000 平台,包含了 1 月龄、6 月龄和 20 月龄 C57BL/6J 成年雄性小鼠全脑组织样本,本研究选择对 6 月龄和 20 月龄小鼠的全脑组织样本数据进行进一步分析。

1.2 小鼠脑组织单细胞测序数据(scRNA-seq)预处理

利用 R 软件(v4.4.1)中的 Seurat 软件包对 6 月龄(青年组)和 20 月龄(老年组)小鼠脑组织 scRNA-seq 数据进行整合、质量控制、数据标准化和统计分析^[10-11]。为了保证数据质量,本研究选定的细胞筛选标准为基因特征 >200 且 <2500 的细胞,线粒体基因少于 5%。利用“LogNormalize”方法对筛选出的 scRNA-seq 表达数据进行标准化处理,并用“FindVariable Features”方法计算样本之间的高变异基因。进行主成分分析(PCA)以确定显著的主成分,并使用 FindNeighbors 和 FindClusters 函数评估细胞簇的数量。在 $\text{min.pct} = 0.25$ 和 $\text{logfc.threshold} = 0.25$ 的阈值下,使用 Seurat 中的 FindAllMarkers 函数识别每个细胞簇的标记基因。

1.3 细胞类型聚类与鉴定

为了进一步识别每个细胞簇中的细胞类型,根据排名前 10 的高表达的标记基因,在细胞注释数据库(<http://biocc.hrbmu.edu.cn/CellMarker/>)

中对每个细胞簇进行细胞类型注释。15 个簇最终被确定为小胶质细胞、内皮细胞、周细胞、中性粒细胞、星形胶质细胞、伯格曼胶质细胞、神经元、T 细胞、上皮细胞、少突胶质前体细胞、成熟少突胶质细胞、非典型单核细胞和神经母细胞 13 种细胞类型,使用 R 包 RunTSNE 和 DimPlot 执行 t 分布随机邻域嵌入法(t-SNE)将上述结果可视化,使用默认设置。我们主要对小胶质细胞、内皮细胞、星形胶质细胞和神经元 4 种主要的细胞类型进行后续的生物信息学分析。

1.4 筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)

老年组和青年组样本进行比较后的差异基因按照 edgeR 筛选标准($P < 0.05$, $\log_2|\text{fold change}| > 1$, Fold change 为老年组和青年组基因表达量的比值)。筛选出每个细胞类型下的差异基因,其中 $\log_2\text{FC} > 1$ 代表基因表达上调, $\log_2\text{FC} < -1$ 代表基因表达下调,用火山图展示筛选结果,横坐标为 $\log_2(\text{fold change})$,纵坐标为 $-\lg(P)$,红色表示显著上调,蓝色表示显著下调。

1.5 差异基因功能和通路的富集分析

为了更好地了解差异基因的功能,本研究使用 DAVID 在线数据库(<https://David.Neiferf.gov/list.jsp>)对其进行 GO 和 KEGG 功能富集分析。GO 功能术语富集分析包含 3 个方面,主要从生物学过程(biological process, BP)进行基因功能的生物学分析,KEGG 信号通路富集分析阐明了差异基因功能和生物学通路以及相关疾病的详细信息, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。另外,利用 Hiplot(<https://hiplot.com.cn/basic>)对得到的结果进行可视化。

1.6 蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络的功能聚类分析

STRING 在线数据库(<http://string-db.org/>)是一个用于识别已知和预测蛋白质之间相互作用的数据库,我们将差异表达基因引入 STRING 数据库构建 PPI。Cytoscape 软件(v3.10.3, <http://www.cytoscape.org/>)常用于可视化 PPI 网络、miRNA-基因网络和 ceRNA 网络等,我们将 PPI 数据导入至 Cytoscape 软件中,利用 MCODE 插件进一步挖掘生物网络中的功能聚类模块并进行可视化^[12],MCODE 插件的参数设置如下:节

点度数 (degree) = 2, 节点分数 (node score) = 0.2, k-核 (k-core) = 5, 最大深度 (max. depth) = 100。

1.7 筛选枢纽基因

使用 Cytoscape 软件中的 cytoHubba 插件筛选枢纽基因。首先利用最大团中心性 (maximal clique centrality, MCC), 最大邻域成分密度 (density of maximum neighborhood component, DMNC), 最大邻域成分 (maximum neighborhood component, MNC) 和节点度数 (Degree) 4 种算法计算 PPI 网络数据得到排序前 30 的基因, 对 4 种算法的结果取交集得到每种细胞类型下的枢纽基因, 最后利用韦恩图对枢纽基因进行可视化^[13]。

1.8 枢纽基因细胞类型特异性鉴定

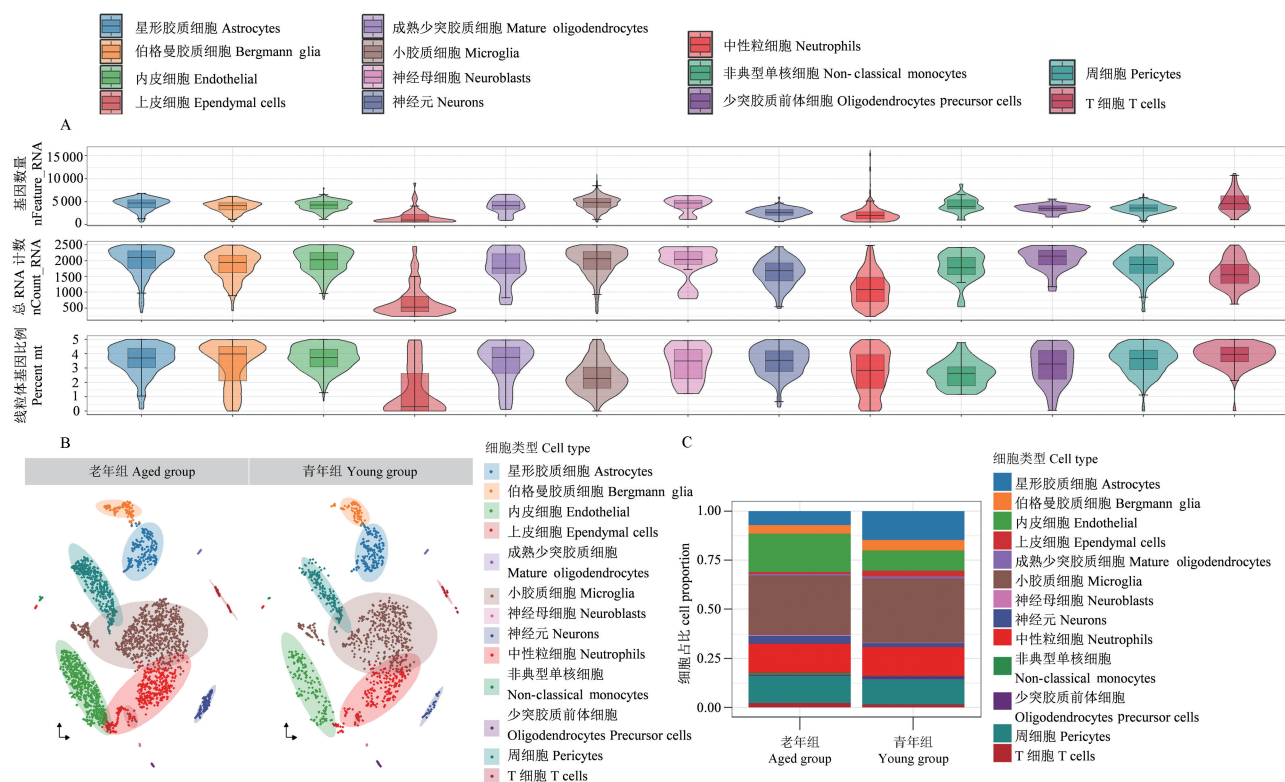
为验证筛选出的关键基因在青年组和老年组小鼠脑组织小胶质细胞、星形胶质细胞和内皮细胞中的表达变化, 本文探索了这些基因在

scRNA 谱中不同分组中的具体表达水平, 利用 R 软件中的 dplyr、reshape2 和 ggplot2 包将结果可视化。

2 结果

2.1 单细胞测序数据预处理和细胞类型注释

为了解读衰老过程中不同脑细胞内基因表达变化及其引发的年龄相关功能障碍, 我们从 GEO 数据库中检索了青年和老年小鼠脑组织 scRNA-seq 数据集 GSE169606。首先通过对 nCount_RNA、nFeature_RNA 和 percent. mt 等关键指标进行质量控制分析, 过滤掉低质量细胞, 保留高质量的细胞用于后续分析, 确保单细胞 RNA 测序数据的准确性和可靠性, 为后续的降维、聚类分析奠定基础 (图 1A)。经过 PCA 和 t-SNE 降维处理后, “FindCluster” 函数识别出 15 个聚类, 根据每种细胞类型的特征基因, 确定了 13 种



注: A: 从 RNA 数量和线粒体比例对单细胞测序数据进行质量控制; B: 通过 tSNE 降维分析对老年组和青年组脑组织测序数据进行聚类分析和细胞注释; C: 老年组和青年组脑组织各类细胞占比。

图 1 数据预处理和细胞类型注释

Note. A, Perform quality control on single-cell sequencing data based on RNA count and mitochondrial percentage. B, Conduct t-SNE dimensionality reduction analysis for clustering and cell annotation of brain tissue sequencing data from the aged and young groups. C, Proportion of different cell types in the brain tissue of aged and young groups.

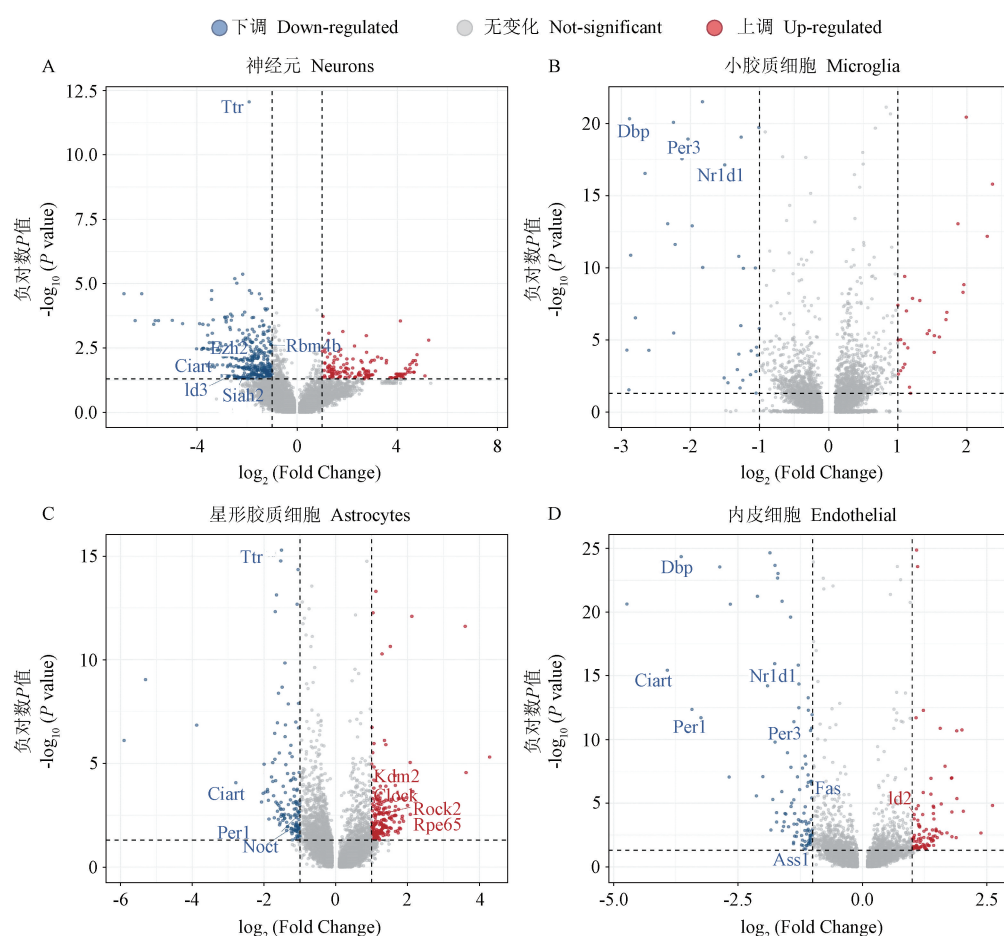
Figure 1 Data preprocessing and cell type annotation

主要细胞类型,包括小胶质细胞、内皮细胞、周细胞、中性粒细胞、星形胶质细胞、伯格曼胶质细胞、神经元、T 细胞、上皮细胞、少突胶质前体细胞、成熟少突胶质细胞、非典型单核细胞和神经母细胞(图 1B)。此外,本研究还统计了不同样本中各种细胞亚型的比例,发现不同样本中的细胞占比各不相同(图 1C)。

2.2 确定细胞类型特异性差异基因

明确细胞类型后,对小鼠脑组织样本中 4 种主要细胞类型神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞和内皮细胞进行了差异基因表达分析,来解读衰老过程中差异基因的细胞异质性。筛选标准

为 $P < 0.05$ 且 $\log_2 |\text{fold change}| > 1$, 每种细胞类型中的差异基因用火山图展示,红色表示显著上调,蓝色表示显著下调。在神经元中发现差异表达基因 535 个,其中上调基因 140 个,下调基因 395 个,如图 2A 所示。在小胶质细胞中发现差异表达基因 64 个,其中上调基因 28 个,下调基因 36 个,如图 2B 所示。在星形胶质细胞中发现差异表达基因 320 个,其中上调基因 183 个,下调基因 137 个,如图 2C 所示。在内皮细胞中发现差异表达基因 195 个,其中上调基因 92 个,下调基因 103 个,如图 2D 所示。其中,几种细胞类型的差异基因中均出现了昼夜节律基因的显著改变,细胞类



注:A:对老年组和青年组脑组织中神经元进行差异基因筛选;B:对老年组和青年组脑组织中小胶质细胞进行差异基因筛选;C:对老年组和青年组脑组织中星形胶质细胞进行差异基因筛选;D:对老年组和青年组脑组织中内皮细胞进行差异基因筛选。红色代表基因表达上调,蓝色代表基因表达下调,灰色代表基因表达无变化。

图 2 细胞类型特异性差异基因分析

Note. A, Differential gene screening of neurons in the brain tissue of the aged and young groups. B, Differential gene screening of microglia in the brain tissue of the aged and young groups. C, Differential gene screening of astrocytes in the brain tissue of the aged and young groups. D, Differential gene screening of endothelial cells in the brain tissue of the aged and young groups. Red indicates upregulated gene expression, blue indicates downregulated gene expression, and gray indicates no change in gene expression.

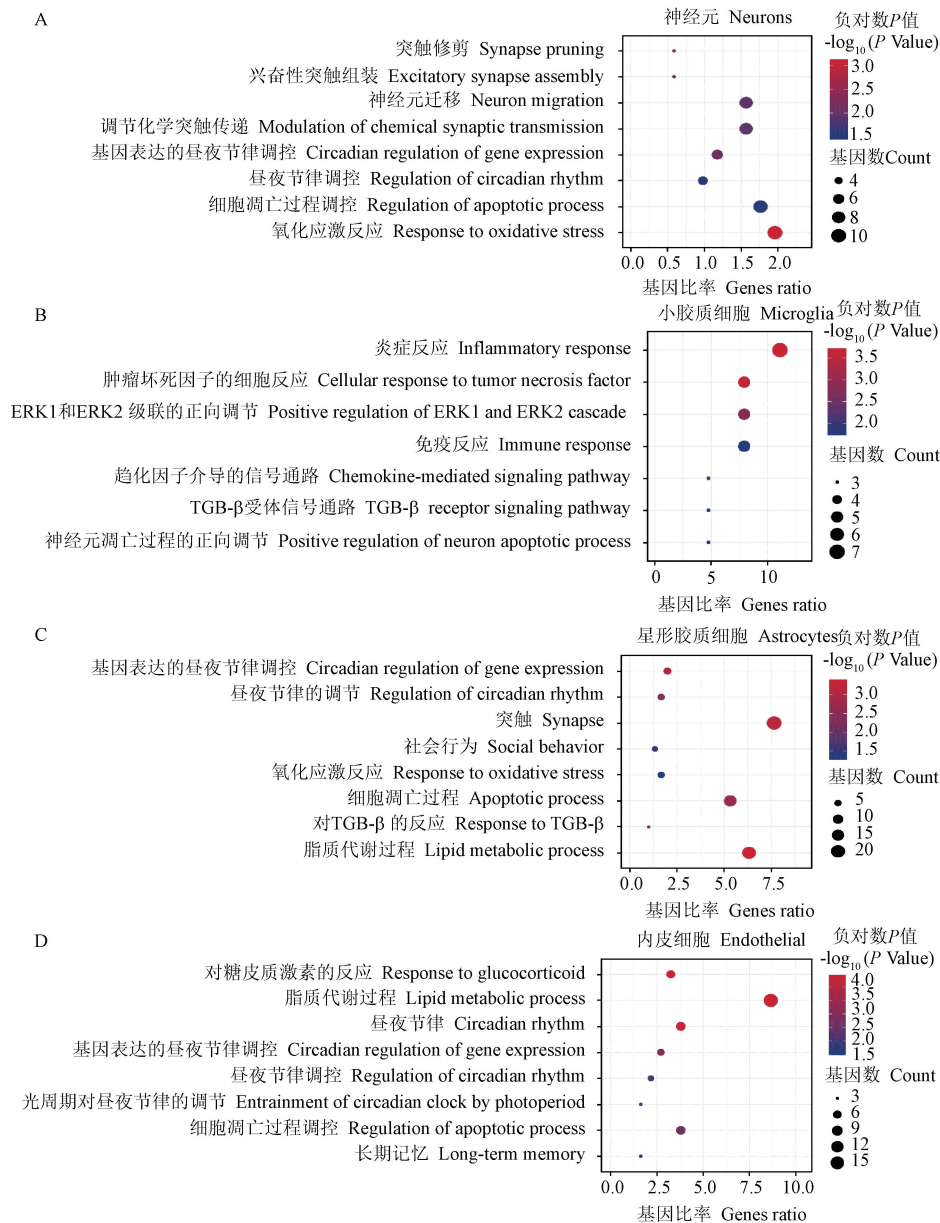
Figure 2 Cell type-specific differential gene analysis

型特异性差异基因可能反映了细胞相关的特异性功能,如昼夜节律、自噬、代谢、炎症等,我们接下来对差异基因进行了富集分析探索其具体的功能模块。

2.3 细胞类型特异性差异基因功能和通路富集分析

通过对差异基因进行 GO 和 KEGG 分析,阐

明差异基因的功能和通路富集情况。GO 结果显示,在 BP 中显著富集的神经元差异基因与昼夜节律、氧化应激和神经元迁移等相关(图 3A)。在 BP 中显著富集的小胶质细胞差异基因与炎症反应、免疫反应和神经元凋亡等相关(图 3B)。在 BP 中显著富集的星形胶质细胞差异基因与昼夜节律、脂代谢和突触等相关(图 3C)。在 BP 中显



注:A:对筛选出的神经元差异基因进行 GO BP 富集分析;B:对筛选出的小胶质细胞差异基因进行 GO BP 富集分析;C:对筛选出的星形胶质细胞差异基因进行 GO BP 富集分析;D:对筛选出的内皮细胞差异基因进行 GO BP 富集分析。

图 3 差异基因 GO 生物学过程分析

Note. A, Perform GO BP enrichment analysis on the differentially expressed genes of neurons. B, Perform GO BP enrichment analysis on the differentially expressed genes of microglia. C, Perform GO BP enrichment analysis on the differentially expressed genes of astrocytes. D, Perform GO BP enrichment analysis on the differentially expressed genes of endothelial cells.

Figure 3 Differential gene GO biological process analysis

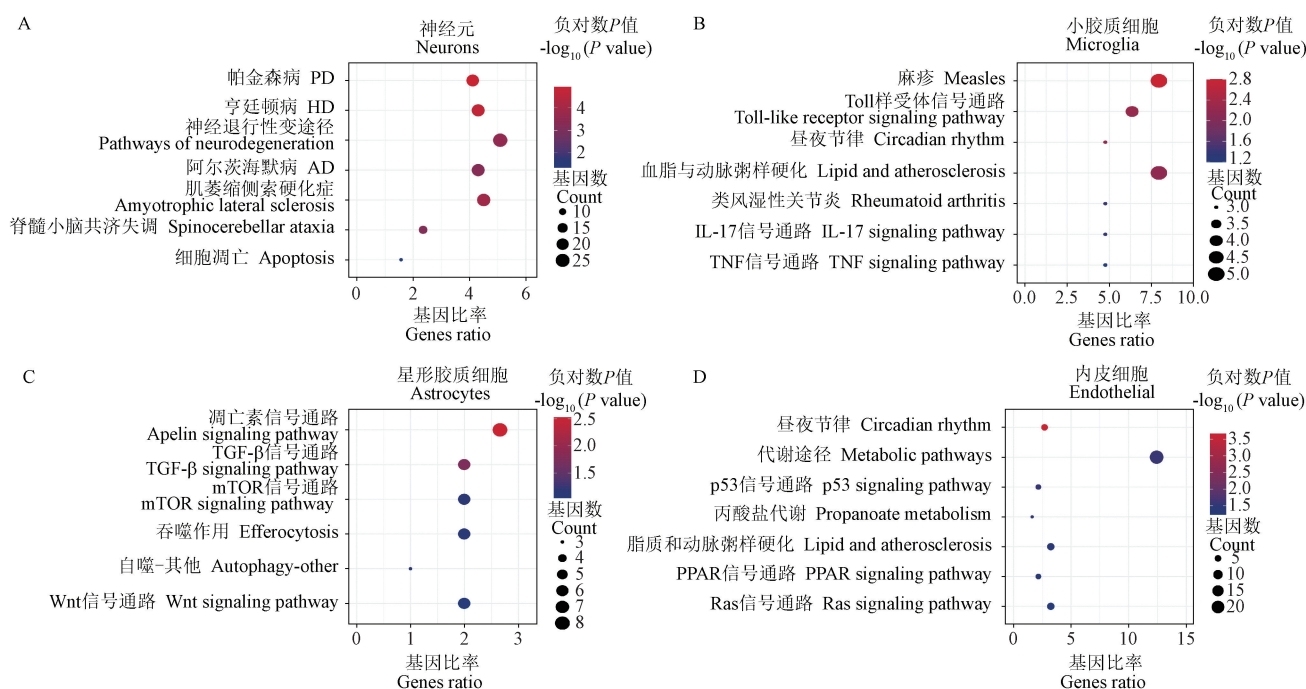
著富集的内皮细胞差异基因与昼夜节律、脂代谢和凋亡等相关(图 3D)。

KEGG 通路分析表明神经元差异基因主要在神经退行性疾病包括阿尔兹海默病(Alzheimer's Disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)和亨廷顿病(Huntington's disease, HD)等方面富集(图 4A)。小胶质细胞差异基因主要在昼夜节律、TNF 信号通路和 IL-17 信号通路等方面富集(图 4B)。星形胶质细胞差异基因主要在 TGF- β 信号通路、mTOR 信号通路和 wnt 信号通路等方面富集(图 4C)。内皮细胞差异基因主要在昼夜节律、脂代谢相关信号通路和 p53 信号通路等方面富集(图 4D)。GO 功能富集分析发现衰老过程中神经元、星形胶质细胞和内皮细胞的差异基因显著富集于与昼夜节律相关的生物学过程,同时,KEGG 通路富集分析发现小胶质细胞和内皮细胞的差异基因在昼夜节律相关的信号

通路上也存在显著富集,提示由差异表达基因介导的昼夜节律调节可能在衰老进程中发挥重要作用。这些发现为进一步解析衰老过程中不同脑细胞类型差异基因的具体分子生物学功能提供了新的探索路径和理论视角。

2.4 细胞类型特异性差异基因蛋白互作网络的功能聚类分析

为了探索不同细胞类型中差异表达基因之间的相互作用,本研究进行了 PPI 分析。将 PPI 数据导入至 Cytoscape 软件中,利用 MCODE 插件进一步挖掘生物学网络中富集的功能聚类模块。在神经元差异基因的 PPI 网络中富集的功能聚类模块主要是代谢和昼夜节律调节,网络中的核心蛋白主要有 Crebbp 作为昼夜节律转录共激活因子,可增强昼夜节律转录激活因子 NPAS2-BMAL1 和 CLOCK-BMAL1 异二聚体的活性,以及核心蛋白 Ppargc1a 通过 RORA 和 RORC 的共激



注:A:对筛选出的神经元差异基因进行 KEGG 信号通路富集分析;B:对筛选出的小胶质细胞差异基因进行 KEGG 信号通路富集分析;C:对筛选出的星形胶质细胞差异基因进行 KEGG 信号通路富集分析;D:对筛选出的内皮细胞差异基因进行 KEGG 信号通路富集分析。

图 4 差异基因 KEGG 功能富集分析

Note. A, Perform KEGG signaling pathway enrichment analysis on the differentially expressed genes of neurons. B, Perform KEGG signaling pathway enrichment analysis on the differentially expressed genes of microglia. C, Perform KEGG signaling pathway enrichment analysis on the differentially expressed genes of astrocytes. D, Perform KEGG signaling pathway enrichment analysis on the differentially expressed genes of endothelial cells.

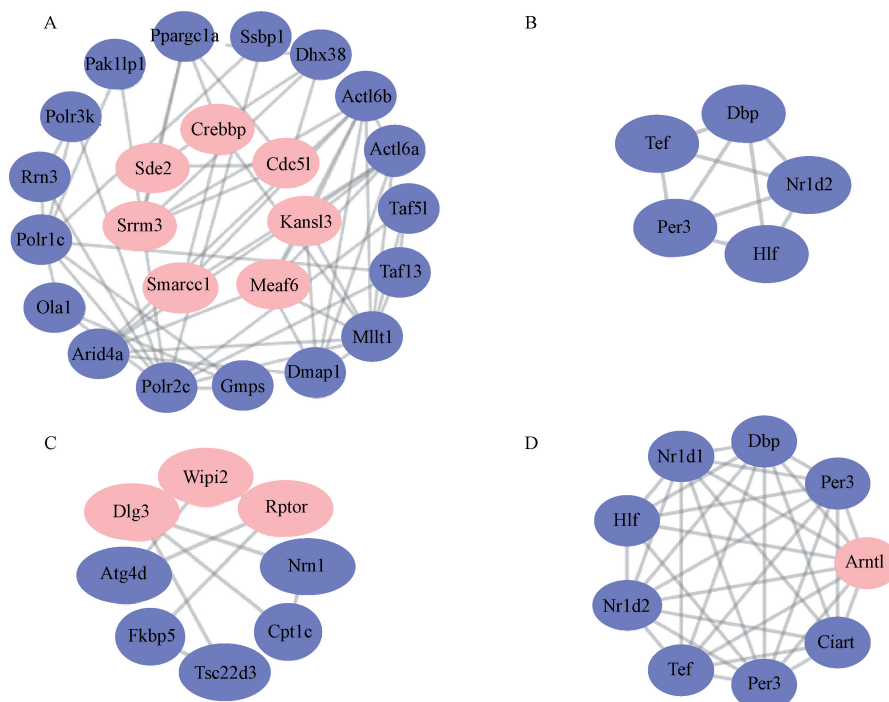
Figure 4 Differential gene KEGG functional enrichment analysis

活,协调时钟基因(如 *Bmal1* 和 *Nr1d1*)和代谢基因(如 *Pdk4* 和 *Pepck*)的振荡表达,从而参与昼夜节律和能量代谢的整合(图 5A)。在小胶质细胞中差异基因的 PPI 网络中富集的功能聚类模块主要是昼夜节律调节,网络中的核心蛋白主要有 *Dbp*、*Nr1d2* 和 *Per3* 等(图 5B)。在星形胶质细胞中差异基因的 PPI 网络中富集的功能聚类模块主要是突触可塑性调节,网络中的核心蛋白主要有 *Dlg3* 和 *Nrn1* 等(图 5C)。在内皮细胞中差异基因的 PPI 网络中富集的功能聚类模块主要是昼夜节律调节,网络中的核心蛋白主要有 *Arntl*、*Per1* 和 *Ciart* 等(图 5D)。PPI 网络的功能聚类分析系统地解析了不同脑细胞类型中特异性差异基因及其编码的蛋白质所参与的特定细胞功能。除了各自独有的功能特性外,值得注意的是,神经元、小胶质细胞以及内皮细胞的差异基因均涉及昼夜节律相关的功能模块。上述发现为深入探

究细胞类型特异性的分子机制奠定了基础。

2.5 确定细胞类型特异性枢纽基因

为了进一步明确不同脑细胞类型中的枢纽基因,本研究在 Cytoscape 软件中,通过 cytoHubba 插件的 MNC、DMNC、MCC 和 Degree 4 种算法对不同细胞 PPI 网络进行分析,每种算法取排名前 30 的差异基因,然后 4 种算法的结果取交集,最终分别确定了 4 种主要细胞类型的枢纽基因(图 6,表 1~表 4)。有趣的是,在小胶质细胞、星形胶质细胞和内皮细胞的枢纽基因中均存在昼夜节律基因。其中小胶质细胞中的昼夜节律基因为 *Dbp*、*Per3*、*Nr1d2* 和 *Hlf*(图 7A),星形胶质细胞中的昼夜节律基因为 *Per1*、*Rock2* 和 *Clock*(图 7B),内皮细胞中的昼夜节律基因为 *Dbp*、*Per1*、*Arntl*、*Per3*、*Ciart*、*Nr1d2*、*Hlf* 和 *Nr1d1*(图 7C)。而在神经元中四种算法取交集后的枢纽基因数目为 0,考虑到可能是神经元功能复杂且差异基因繁多

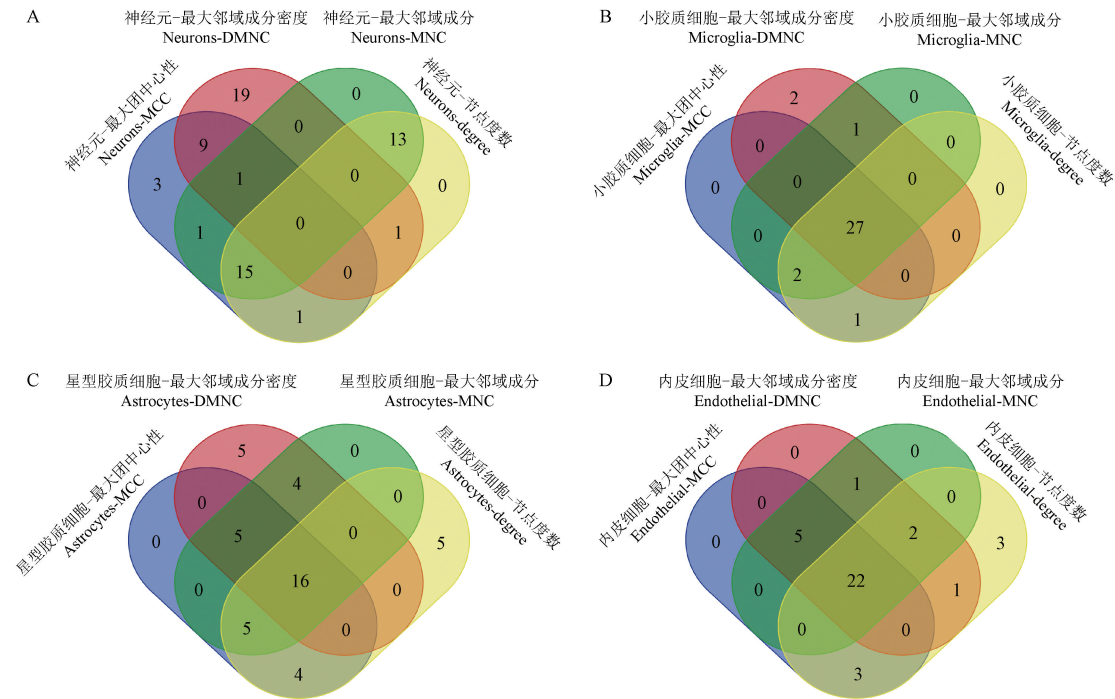


注:A:对筛选出的神经元差异基因进行 PPI 及功能聚类模块分析;B:对筛选出的小胶质细胞差异基因进行 PPI 及功能聚类模块分析;C:对筛选出的星形胶质细胞差异基因进行 PPI 及功能聚类模块分析;D:对筛选出的内皮细胞差异基因进行 PPI 及功能聚类模块分析。

图 5 差异基因 PPI 的功能聚类分析

Note. A, Perform PPI network and functional clustering module analysis on the differentially expressed genes of neurons. B, Perform PPI network and functional clustering module analysis on the differentially expressed genes of microglia. C, Perform PPI network and functional clustering module analysis on the differentially expressed genes of astrocytes. D, Perform PPI network and functional clustering module analysis on the differentially expressed genes of endothelial cells.

Figure 5 Functional clustering analysis of the PPI network of differential genes



注:A:根据神经元差异基因的 PPI,利用 cytoHubba 插件中的 degree、DMNC、MNC、MCC 4 种算法筛选枢纽基因;B:根据小胶质细胞差异基因的 PPI,利用上述 4 种算法筛选枢纽基因;C:根据星形胶质细胞差异基因的 PPI,利用上述 4 种算法筛选枢纽基因;D:根据内皮细胞差异基因的 PPI,利用上述 4 种算法筛选枢纽基因。

图 6 MNC、DMNC、MCC 和 degree 4 种算法分析细胞类型特异性差异基因

Note. A, Based on the PPI network of differential genes in neurons, use the degree, DMNC, MNC, and MCC algorithms in the cytoHubba plugin to identify hub genes. B, Based on the PPI network of differential genes in microglia, use the aforementioned algorithms to identify hub genes. C, Based on the PPI network of differential genes in astrocytes, use the aforementioned algorithms to identify hub genes. D, Based on the PPI network of differential genes in endothelial cells, use the aforementioned algorithms to identify hub genes.

Figure 6 Analysis of cell type-specific differential genes using 4 algorithms: MNC, DMNC, MCC, and degree

表 1 神经元枢纽基因
Table 1 Neuronal hub genes

算法 Algorithms	枢纽基因 Hub genes
神经元-最大团中心性 Neurons-MCC	<i>Mrpl2</i> 、 <i>Mrpl13</i> 、 <i>Mrpl30</i> 、 <i>Mrps18a</i> 、 <i>Mrpl34</i> 、 <i>Chchd1</i> 、 <i>Mrpl54</i> 、 <i>Mrpl42</i> 、 <i>Mrps31</i> 、 <i>Mrps24</i> 、 <i>Ndufs8</i> 、 <i>Ndufi2</i> 、 <i>Ndufb3</i> 、 <i>Pmpcb</i> 、 <i>Ndufa11</i> 、 <i>Ndufb7</i> 、 <i>Ndufs5</i> 、 <i>Atp5c1</i> 、 <i>Ndufa3</i> 、 <i>mt-Nd4l</i> 、 <i>Nmral1</i> 、 <i>Rps17</i> 、 <i>Tmed3</i> 、 <i>Tmed7</i> 、 <i>Tpi1</i> 、 <i>Polr1c</i> 、 <i>Polr2c</i> 、 <i>Eef1g</i> 、 <i>Gmps</i> 、 <i>Prdx3</i>
神经元-最大邻域成分 Neurons-MNC	<i>Mrpl2</i> 、 <i>Polr2f</i> 、 <i>Mrpl13</i> 、 <i>Atp5c1</i> 、 <i>Polr1c</i> 、 <i>Tpi1</i> 、 <i>Polr2c</i> 、 <i>Ndufs8</i> 、 <i>Park7</i> 、 <i>Nedd8</i> 、 <i>Ndufi2</i> 、 <i>Crebbp</i> 、 <i>Ezh2</i> 、 <i>Eef1g</i> 、 <i>Mllt1</i> 、 <i>H2az1</i> 、 <i>Pisma2</i> 、 <i>Pmpcb</i> 、 <i>Chchd1</i> 、 <i>Eif3i</i> 、 <i>Kdm1a</i> 、 <i>Ndufb7</i> 、 <i>Vdac2</i> 、 <i>Mrps18a</i> 、 <i>Ncbp2</i> 、 <i>Ndufa11</i> 、 <i>Ndufb3</i> 、 <i>Dkc1</i> 、 <i>Mrpl30</i> 、 <i>Prdx3</i>
神经元-最大邻域成分密度 Neurons-DMNC	<i>Nmral1</i> 、 <i>Mrpl54</i> 、 <i>Nd4l</i> 、 <i>Mrpl34</i> 、 <i>Ndufa3</i> 、 <i>Ppargc1a</i> 、 <i>Gcn1</i> 、 <i>Dot1l</i> 、 <i>Idh3b</i> 、 <i>Cox14</i> 、 <i>Rrn3</i> 、 <i>Taf5l</i> 、 <i>Kansl3</i> 、 <i>Mrpl42</i> 、 <i>Polr3k</i> 、 <i>Taf13</i> 、 <i>Srrm3</i> 、 <i>Mrps31</i> 、 <i>Ola1</i> 、 <i>Ndufa11</i> 、 <i>Ube2e1</i> 、 <i>Mrps24</i> 、 <i>Cdk12</i> 、 <i>Ndufs5</i> 、 <i>Rbbp5</i> 、 <i>Srrm2</i> 、 <i>Dpfl</i> 、 <i>Babam2</i> 、 <i>Cbx6</i> 、 <i>Pex2</i>
神经元-节点度数 Neurons-degree	<i>Mrpl2</i> 、 <i>Polr2f</i> 、 <i>Atp5c1</i> 、 <i>Mrpl13</i> 、 <i>Nedd8</i> 、 <i>Tpi1</i> 、 <i>Park7</i> 、 <i>Crebbp</i> 、 <i>Polr1c</i> 、 <i>Ezh2</i> 、 <i>Ndufs8</i> 、 <i>Ncbp2</i> 、 <i>Polr2c</i> 、 <i>Eef1g</i> 、 <i>H2az1</i> 、 <i>Ndufi2</i> 、 <i>Mllt1</i> 、 <i>Ppargc1a</i> 、 <i>Dkc1</i> 、 <i>Pmpcb</i> 、 <i>Pisma2</i> 、 <i>Chchd1</i> 、 <i>Vdac2</i> 、 <i>Ndufb7</i> 、 <i>Mrpl30</i> 、 <i>Eif3i</i> 、 <i>Mrps18a</i> 、 <i>Kdm1a</i> 、 <i>Ndufb3</i> 、 <i>Gmps</i>
交集 Intersection	-

的原因,所以我们主要对另外 3 种细胞的枢纽基因进行进一步探讨。在枢纽基因的筛选中发现特定细胞类型中存在昼夜节律基因的差异性表

达,而昼夜节律基因的特异性可能在不同细胞类型中通过调控细胞代谢、免疫应答和神经递质释放等功能,参与维持中枢神经系统的正常生理功

能和稳态。可为未来进一步揭示昼夜节律基因 依据,也为衰老相关神经退行性疾病的治疗和预防提供新的思路。

表 2 小胶质细胞枢纽基因

Table 2 Microglial hub genes

算法 Algorithms	枢纽基因 Hub genes
小胶质细胞-最大团中心性 Microglia-MCC	<i>Jun, Fos, Atf3, Egr1, Socs3, Zfp36, Ier3, Hspa1a, Fosb, Ccl4, Ccl3, Hspa1b, Il7r, Acta2, Per3, Ccl2, Nr1d2, Dbp, Rgs1, Vim, Fkbp5, Tpm2, Cxcl16, Hlf, Tef, Axl, Tagln, Ddit4, Ifi204, Ttr</i>
小胶质细胞-最大邻域成分 Microglia-MNC	<i>Jun, Atf3, Fos, Ccl4, Egr1, Socs3, Ccl3, Acta2, Zfp36, Hspa1a, Ier3, Fosb, Hspa1b, Il7r, Fkbp5, Ccl2, Per3, Nr1d2, Tpm2, Axl, Vim, Dbp, Rgs1, Cxcl16, Hlf, Tef, Ddit4, Tagln, Ifi204, Ifitm3</i>
小胶质细胞-最大邻域成分密度 Microglia-DMNC	<i>Ier3, Zfp36, Fosb, Hspa1a, Hspa1b, Egr1, Socs3, Ccl2, Per3, Nr1d2, Dbp, Rgs1, Atf3, Fos, Cxcl16, Hlf, Tef, Tagln, Il7r, Ccl3, Jun, Ccl4, Tpm2, Vim, Fkbp5, Ddit4, Ifi204, Ifitm3, Ifi2712a, Tsc22d3</i>
小胶质细胞-节点度数 Microglia-degree	<i>Jun, Fos, Atf3, Ccl4, Egr1, Socs3, Ccl3, Acta2, Hspa1b, Zfp36, Hspa1a, Vim, Ier3, Fosb, Il7r, Per3, Fkbp5, Ccl2, Nr1d2, Tpm2, Axl, Dbp, Rgs1, Ifi204, Cxcl16, Hlf, Ttr, Tef, Ddit4, Tagln</i>
交集 Intersection	<i>Rgs1, Fosb, Tagln, Hspa1b, Fos, Jun, Vim, Per3, Ifi204, Ddit4, Socs3, Cxcl16, Nr1d2, Dbp, Il7r, Ccl3, Ier3, Ccl4, Tef, Tpm2, Zfp36, Hspa1a, Egr1, Atf3, Hlf, Fkbp5, Ccl2</i>

表 3 星形胶质细胞枢纽基因

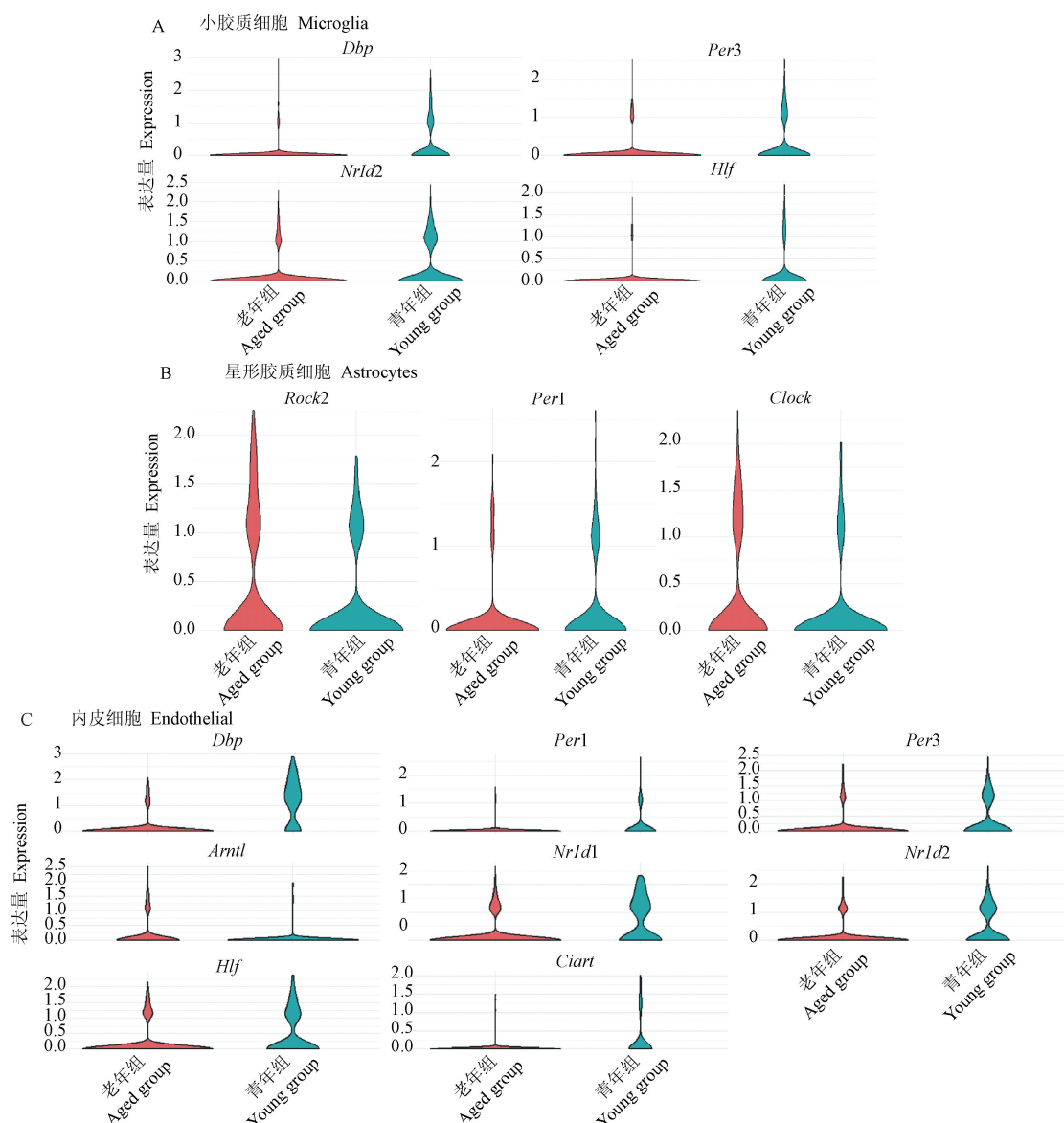
Table 3 Astrocyte hub genes

算法 Algorithms	枢纽基因 Hub genes
星形胶质细胞-最大团中心性 Astrocytes-MCC	<i>Rptor, Acta2, Rps6kb1, Tagln, Hdac4, Tsc2, Ap2b1, Cdkn1a, Rock2, Jag1, Prr5, Tgfbr1, Ccnd3, Aak1, Lrrn3, Epn2, Sparc, Ttr, Castor1, Lars2, Per1, Tpm2, Fkbp5, Clock, Wdr77, Vldlr, Mmp14, Metap1, Cars, Apod</i>
星形胶质细胞-最大邻域成分 Astrocytes-MNC	<i>Acta2, Rptor, Tagln, Rps6kb1, Tsc2, Sparc, Jag1, Castor1, Prr5, Aak1, Ap2b1, Lrrn3, Epn2, Tgfbr1, Tpm2, Rock2, Cdkn1a, Mmp14, Lars2, Per1, Clock, Ccnd3, Ciart, Abca1, Vldlr, Fkbp5, Cryab, Cars, Atg4d, Apod</i>
星形胶质细胞-最大邻域成分密度 Astrocytes-DMNC	<i>Aak1, Ap2b1, Lrrn3, Epn2, Tgfbr1, Jag1, Prr5, Rps6kb1, Tsc2, Tpm2, Rock2, Cdkn1a, Mmp14, Lars2, Per1, Clock, Ccnd3, Ciart, Abca1, Vldlr, Fkbp5, Cryab, Cars, Atg4d, Apod, Wipi2, Atxn7, Kcnn3, Zfhx3, Bnip2</i>
星形胶质细胞-节点度数 Astrocytes-degree	<i>Rptor, Acta2, Hdac4, Rock2, Cdkn1a, Rps6kb1, Tagln, Ap2b1, Ttr, Ccnd3, Fkbp5, Lars2, Tsc2, Per1, Wdr77, Vldlr, Tgfbr1, Sparc, Tpm2, Jag1, Metap1, Cars, Apod, Castor1, Mef2d, Ctss, Larp1, Mars2, Mapk6, Clock</i>
交集 Intersection	<i>Rps6kb1, Tgfbr1, Rock2, Jag1, Ccnd3, Clock, Fkbp5, Cdkn1a, Tsc2, Lars2, Apod, Ap2b1, Cars, Vldlr, Tpm2, Per1</i>

表 4 内皮细胞枢纽基因

Table 4 Endothelial cell hub genes

算法 Algorithms	枢纽基因 Hub genes
内皮细胞-最大团中心性 Endothelial-MCC	<i>Per3, Nr1d1, Per1, Arntl, Nr1d2, Dbp, Ciart, Tef, Hlf, Acta2, Tagln, Ccn2, Gja1, Vwf, Edn1, Hspa8, Stip1, Hspa1a, Nlc1, Timp3, Bcl2l1, Tpm2, Imp4, Pes1, Rrs1, Myl9, Ldha, H4c11, Cldn5, Hsph1</i>
内皮细胞-最大邻域成分 Endothelial-MNC	<i>Acta2, Per3, Tagln, Nr1d1, Nr1d2, Per1, Dbp, Arntl, Ccn2, Ciart, Tef, Hlf, Edn1, Gja1, Vwf, Hspa8, Stip1, Imp4, Pes1, Rrs1, Timp3, Myl9, Hspa1a, Nlc1, Cldn5, Tpm2, Idl1, Hmgcs1, Hsph1, Rcc2</i>
内皮细胞-最大邻域成分密度 Endothelial-DMNC	<i>Ciart, Tef, Nr1d2, Per1, Dbp, Arntl, Hlf, Per3, Nr1d1, Gja1, Vwf, Edn1, Ccn2, Imp4, Pes1, Rrs1, Timp3, Myl9, Hspa1a, Nlc1, Cldn5, Tpm2, Hsph1, Tagln, Hspa8, Stip1, Acta2, Idl1, Hmgcs1, Rcc2</i>
内皮细胞-节点度数 Endothelial-degree	<i>Acta2, Tagln, Per3, Per1, Ccn2, Arntl, Nr1d1, Hspa8, Nr1d2, Dbp, Edn1, Gja1, Vwf, Ciart, Bcl2l1, Tef, Hlf, Ldha, H4c11, Ldlr, Hspa1a, Nlc1, Stip1, P4ha1, Timp3, Ehmt2, Tpm2, Idl1, Hmgcs1, Imp4</i>
交集 Intersection	<i>Nlc1, Hspa8, Arntl, Stip1, Nr1d2, Ciart, Dbp, Edn1, Hspa1a, Vwf, Gja1, Tagln, Ccn2, Per3, Nr1d1, Acta2, Timp3, Tef, Tpm2, Per1, Imp4, Hlf</i>



注:A:明确小胶质细胞枢纽基因中的昼夜节律基因,并分析昼夜节律基因在老年组和青年组中的表达变化;B:明确星形胶质细胞枢纽基因中的昼夜节律基因,并分析昼夜节律基因在老年组和青年组中的表达变化;C:明确内皮细胞枢纽基因中的昼夜节律基因,并分析昼夜节律基因在老年组和青年组中的表达变化。

图7 明确细胞类型特异性昼夜节律枢纽基因

Note. A, Identify the circadian rhythm genes within the hub genes of microglia, and analyze the expression changes of these circadian rhythm genes in the aged and young groups. B, Identify the circadian rhythm genes within the hub genes of astrocytes, and analyze the expression changes of these circadian rhythm genes in aged and young groups. C, Identify the circadian rhythm genes within the hub genes of endothelial cells, and analyze the expression changes of these circadian rhythm genes in the aged and young groups.

Figure 7 Identify cell type-specific circadian rhythm hub genes

3 讨论

基于实验动物与人类研究的数据揭示了衰老进程中存在的昼夜节律失调现象,包括振幅减弱、对光及非光刺激的敏感性下降、节律碎片化加剧及与环境同步性丧失等^[14]。值得注意的是,

尽管昼夜节律紊乱长期以来被认为是衰老的结果,但昼夜节律系统的功能障碍会加速衰老,并加剧与年龄相关的病理生理改变^[15],表明衰老和衰老相关疾病与昼夜节律密不可分^[16]。通过对衰老小鼠脑组织单细胞数据集的深入分析,本研究发现不同脑细胞(神经元、小胶质细胞、星形胶

质细胞及内皮细胞)均经历了与昼夜节律相关的生物学过程或信号通路的显著改变,进一步的生物信息学分析揭示了小胶质细胞、星形胶质细胞及内皮细胞的关键调控网络中,昼夜节律基因占据了重要位置,表明这些基因在维持细胞昼夜节律或其他功能中发挥着不可或缺的作用。昼夜节律基因表达模式随着年龄的增长发生深刻变化,这些变化可能通过影响细胞的能量代谢、损伤修复机制、免疫系统的响应能力等多个层面,形成一个正反馈循环,进一步加速衰老的步伐。为了深入理解这一复杂关系,本研究进一步剖析了衰老进程中小胶质细胞、星形胶质细胞及内皮细胞昼夜节律基因的特异性改变,以及这些变化如何具体影响或介导各细胞类型的特定功能衰退,有助于揭示这些基因如何精确调控脑细胞的基本生命活动,以及它们在维持或破坏大脑健康稳态中的具体作用机制,为未来开发基于昼夜节律基因调控的抗衰老策略提供科学依据和创新思路。

小胶质细胞作为负责免疫监视的脑免疫细胞,主要参与大脑发育、神经网络维护和损伤修复^[17-18]。小胶质细胞有节奏地表达昼夜节律基因,这些基因参与调节神经炎症反应、吞噬作用和自噬等功能^[19-20]。研究发现,老年与年轻大鼠在 LPS 刺激及小胶质细胞活化上呈现昼夜不同反应,这表明加强昼夜节律调节可能是重置老年大脑神经炎症反应的有效策略^[21]。分析结果显示衰老进程中小胶质细胞中发生显著改变的昼夜节律基因主要为 *Dbp*、*Per3*、*Nr1d2* 和 *Hlf*。在人口老龄化的推动下,衰老相关神经退行性疾病阿尔茨海默病带来了日益严峻的社会挑战,其特征是与 β 淀粉样蛋白和 tau 蛋白聚集相关的神经变性^[22], *Nr1d2* 编码昼夜节律基因 REV-ERB β , 药理抑制或敲低 REV-ERB α/β 可刺激小胶质细胞 β 淀粉样蛋白的吞噬清除,并减少 5XFAD 小鼠淀粉样蛋白斑块沉积^[23]。除了 β 淀粉样蛋白等纤维化标志物升高外,低度慢性炎症也是衰老的重要特征^[24]。先前的研究表明,刺激大脑皮层小胶质细胞中 REV-ERBs 表达可发挥抗炎作用^[25]。利用 REV-ERB α/β 激动剂 SR9009 处理大鼠脊髓小胶质细胞可阻断 LPS 诱导的白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 mRNA 表达的增

加^[26]。昼夜节律因子白蛋白 D 位点结合蛋白 (albumin D-site-binding protein, DBP) 和肝白血因子 (hepatic leukemia factor, HLF) 均属于脯氨酸和富含酸性氨基酸的碱性亮氨酸拉链 (proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper, PAR bZIP) 家族, *Dbp* 由昼夜节律振荡器 BMAL1 和 CLOCK 激活,并由 CRY 和 PER 蛋白抑制^[27], *Hlf* 转录可能受类似机制调控。DBP 可介导小胶质细胞活化和神经炎症,进而引起慢性牙周炎相关的海马中神经元凋亡和神经发生障碍,最终导致抑郁样行为和空间学习记忆缺陷^[28]。包括 *Dbp* 和 *Hlf* 在内的 3 种 PAR bZIP 转录因子敲除小鼠缺乏外源性解毒,表现出高发病率、高死亡率和加速衰老^[29]。上述研究表明,昼夜节律系统通过调节 REV-ERBs、*Dbp* 等昼夜节律基因密切控制小胶质细胞的激活,而衰老过程中这些基因在小胶质细胞内的显著变化与神经炎症、吞噬作用及代谢的紧密联系,提示它们或能成为治疗因衰老导致的小胶质细胞功能异常所引发的神经退行性病变的关键靶点,对于延缓衰老进程和衰老相关神经系统疾病的治疗具有重要意义。

星形胶质细胞是哺乳动物大脑中最丰富的细胞之一,在维持神经元离子稳态^[30]、为神经元提供代谢支持^[31]以及促进神经回路的发育^[32]中都是不可或缺的参与者。星形胶质细胞内在昼夜节律基因的节律性和非节律性振荡对维持细胞亚型中的独特功能至关重要,分析结果显示衰老过程中星形胶质细胞中发生显著改变的昼夜节律基因主要为 *Clock*、*Rock2* 和 *Per1*。谷氨酸是中枢神经系统内含量最高、分布最广的兴奋性神经递质,参与大脑的学习和记忆等功能,对神经传递起着至关重要的作用^[33]。星形胶质细胞中的谷氨酸吸收受 *Clock* 调控,然而,研究没有发现谷氨酸吸收存在昼夜节律变化的证据,提示 CLOCK 可能通过激活参与此过程的基因(例如谷氨酸转运蛋白 Glast)的转录来增强谷氨酸吸收^[34],衰老过程中, *Clock* 基因的表达改变,可影响其对谷氨酸转运蛋白的转录调控,导致谷氨酸吸收能力受损,加快大脑衰老和认知障碍的进程。氧化应激是指细胞内 ROS 或活性氧物质水平超过细胞抗氧化能力,最终导致抗氧化系统和氧化系统失衡,造成 DNA、蛋白质和细胞损伤,是

介导衰老的核心机制之一^[35]。MUSIEK 等^[36]发现, BMAL1 或 NPAS2 和 CLOCK 的靶向缺失, 会诱导氧化应激、广泛的星形胶质细胞活化。而 ZHONG 等^[37]发现 CLOCK 敲低可提高抗氧化酶活性, 减少 ROS 产生, 并通过恢复自噬通量来减轻软骨细胞衰老, 提示不同细胞中 CLOCK 的差异表达通过不同的机制对抗氧化应激, 在抗衰老中发挥关键作用。Rho 相关蛋白激酶 2 (Rho-associated protein kinase 2, ROCK2) 在星形胶质细胞中高度表达^[38]。ROCK2 的上调标志着衰老相关神经退行性疾病的进展^[39], 这与本研究分析结果衰老过程中其表达明显升高相一致。星形胶质细胞中 ROCK2 蛋白表达增加可促进星形胶质细胞增生进而抑制神经元存活和再生, 在 PD 病理中起着重要作用, 而这种作用在正常衰老中已经开始^[40]。ROCK2 的下调可减弱星形胶质细胞中酒精诱导的炎症和氧化应激^[41]。上述研究提示 ROCK2 可能通过参与星形胶质细胞增生、炎症和氧化应激调节在衰老进程中发挥作用。在衰老过程中, 昼夜节律基因表达失衡, 节律性振荡可能减弱, 非节律性振荡可能增加, 导致星形胶质细胞对环境变化的响应能力下降, 神经保护和支持功能受损。通过调控衰老进程中星形胶质细胞内显著变化的昼夜节律基因, 有望改善星形胶质细胞的功能, 促进神经元的健康与再生, 从而延缓大脑的衰老进程。

衰老过程中, 除小胶质细胞和星形胶质细胞外, 内皮细胞的昼夜节律基因表达也发生了显著变化, 主要包括 *Arntl*、*Per1*、*Per3*、*Ciart*、*Nr1d2*、*Nr1d1*、*Dbp* 和 *Hlf* 等。脑内皮细胞参与形成血管壁, 是构成血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的主要结构元素, 严格调节中枢神经系统的化学微环境, 对于维持脑稳态和神经保护至关重要^[42]。尽管 BBB 特性主要由脑内皮细胞所具备, 但它们是由来自中枢神经系统微环境的线索诱导和维持的, 包括来自神经干细胞、周细胞和星形胶质细胞的信号, 其完整性受昼夜节律的影响^[43-44]。随着年龄的增长, 脑内皮细胞功能障碍导致 BBB 的完整性受损, 促进衰老相关疾病的发生发展, 因此保持 BBB 的正确功能是健康老龄化的重要决定因素^[45-46]。研究发现血脑屏障内皮细胞外排转运体 P-糖蛋白的表达和功能与神经元活动

呈负相关, 而特异性敲除内皮细胞中的 *Arntl* (*Bmal1*) 基因后, 转运体 P-糖蛋白外排的功能性变化受到了抑制^[47], 神经元活动还与脑内皮细胞昼夜节律基因 *Dbp* 和 *Hlf* 呈负相关^[48], 表明神经元活动会影响大脑内皮细胞昼夜节律基因的表达, 进而通过调节转运蛋白来驱动 BBB 外排功能。因此, 通过调节昼夜节律基因来改善因衰老造成的 BBB 功能障碍, 对于衰老过程中形成的中枢神经系统废物包括 A β 的清除具有重要的临床意义。昼夜节律相关转录抑制因子 (circadian-associated transcriptional repressor, CIART) 也称计算机模拟的生物节律抑制因子 (computationally highlighted repressor of the network oscillator, CHRONO) 可直接与 BMAL1 相互作用并抑制 CLOCK-BMAL1 活性^[49]。有研究指出 *Ciart* 相关通路可能通过昼夜节律调控在衰老过程中发挥保护作用^[50], 正常衰老过程中观察到的年龄依赖性认知障碍往往与 BBB 的结构和功能变化有关, 而阿尔茨海默病小鼠模型中观察到的 *Ciart* 基因表达失调可能通过破坏 BBB 完整性加剧了这种认知障碍^[51]。在衰老进程中, 深入探索脑内皮细胞昼夜节律基因的重编程如何影响血脑屏障的昼夜节律通透性和药物输送效率以及其他脑血管功能, 是揭示昼夜节律基因、BBB/脑血管健康与衰老相关退行性疾病间复杂交织关系的重要方向。

综上所述, 昼夜节律基因在特定脑细胞类型中的存在与表达模式, 对于神经生理学的功能维持至关重要。具体而言, 小胶质细胞内昼夜节律基因的精细表达调控炎症反应的节律以及突触的清除与重塑过程, 对保持神经网络稳态不可或缺。星形胶质细胞内的节律性分子则承担着协调全脑昼夜节律同步性及调控谷氨酸神经传递的重任。同时, 内皮细胞中的昼夜节律基因调控对于维护血脑屏障的功能和结构稳定亦至关重要。值得注意的是, 脑细胞昼夜节律的紊乱可能会以区域特异的方式影响上述关键生理过程, 进而波及衰老及其相关疾病的病理生理机制, 包括但不限于睡眠-觉醒节律的调控、神经递质传递的效率、炎症反应的平衡, 以及突触回路的精细调控。当前研究更进一步指出, 昼夜节律基因表达的变化可能超越了对单纯行为及生理昼夜节律随年龄变化的解释范畴, 而是广泛关联于衰老

过程的多维度,即便这些维度并不直接依赖于昼夜节律的周期性特征。这一发现提示了系统层面调控昼夜节律基因的可能性,尽管其产生的表型效应可能不完全归因于昼夜节律时钟的直接紊乱。因此,深入剖析昼夜节律基因在衰老过程中的复杂角色,对于增进对衰老相关疾病的理解及开发有效干预策略具有重要价值。

参考文献:

- [1] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. The hallmarks of aging [J]. *Cell*, 2013, 153 (6): 1194–217.
- [2] ACOSTA-RODRÍGUEZ V A, RIJO-FERREIRA F, GREEN C B, et al. Importance of circadian timing for aging and longevity [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2862.
- [3] KO C H, TAKAHASHI J S. Molecular components of the mammalian circadian clock [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15 (suppl_2): R271–R277.
- [4] NAKAHATA Y, GRIMALDI B, SAHAR S, et al. Signaling to the circadian clock: plasticity by chromatin remodeling [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2): 230–237.
- [5] BROWN S A, KOWALSKA E, DALLMANN R. (Re) inventing the circadian feedback loop [J]. *Dev Cell*, 2012, 22(3): 477–487.
- [6] JILG A, LESNY S, PERUZKI N, et al. Temporal dynamics of mouse hippocampal clock gene expression support memory processing [J]. *Hippocampus*, 2010, 20(3): 377–388.
- [7] YAMAMOTO T, NAKAHATA Y, SOMA H, et al. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues [J]. *BMC Mol Biol*, 2004, 5: 18.
- [8] HUANG X, LIU S, WU L, et al. High throughput single cell RNA sequencing, bioinformatics analysis and applications [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1068: 33–43.
- [9] BARRETT T, WILHITE S E, LEDOUX P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: D991–D995.
- [10] PEREIRA W J, ALMEIDA F M, CONDE D, et al. Asc-Seurat: analytical single-cell Seurat-based web application [J]. *BMC Bioinformatics*, 2021, 22(1): 556.
- [11] MANGIOLA S, DOYLE M A, PAPENFUSS A T. Interfacing seurat with the R tidy universe [J]. *Bioinformatics*, 2021, 37(22): 4100–4107.
- [12] KOHL M, WIESE S, WARSCHIED B. Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 696: 291–303.
- [13] LIN C Y, CHIN C H, WU H H, et al. Hubba: hub objects analyzer—a framework of interactome hubs identification for network biology [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: W438–W443.
- [14] DUNCAN M J. Aging of the mammalian circadian timing system: changes in the central pacemaker and its regulation by photic and nonphotic signals [J]. *Neuroembryol Aging*, 2007, 4(1/2): 85–101.
- [15] DE NOBREGA A K, LUZ K V, LYONS L C. Resetting the aging clock: implications for managing age-related diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1260: 193–265.
- [16] ZHAO J, WARMAN G R, CHEESEMAN J F. The functional changes of the circadian system organization in aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 52: 64–71.
- [17] XU J, DONG H, QIAN Q, et al. Astrocyte-derived CCL2 participates in surgery-induced cognitive dysfunction and neuroinflammation via evoking microglia activation [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 332: 145–153.
- [18] PETTAS S, KARAGIANNI K, KANATA E, et al. Profiling microglia through single-cell RNA sequencing over the course of development, aging, and disease [J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2383.
- [19] FONKEN L K, FRANK M G, KITT M M, et al. Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 45: 171–179.
- [20] MA D, LI S, MOLUSKY M M, et al. Circadian autophagy rhythm: a link between clock and metabolism? [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(7): 319–325.
- [21] FONKEN L K, KITT M M, GAUDET A D, et al. Diminished circadian rhythms in hippocampal microglia may contribute to age-related neuroinflammatory sensitization [J]. *Neurobiol Aging*, 2016, 47: 102–112.
- [22] ZHANG H, LI X, WANG X, et al. Cellular response to β -amyloid neurotoxicity in Alzheimer's disease and implications in new therapeutics [J]. *Anim Model Exp Med*, 2023, 6(1): 3–9.
- [23] LEE J, KIM D E, GRIFFIN P, et al. Inhibition of REV-ERBs stimulates microglial amyloid-beta clearance and reduces amyloid plaque deposition in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Aging Cell*, 2020, 19 (2): e13078.
- [24] INOKAWA H, UMEMURA Y, SHIMBA A, et al. Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 2569.
- [25] NAKAZATO R, HOTTA S, YAMADA D, et al. The intrinsic microglial clock system regulates interleukin-6 expression [J]. *Glia*, 2017, 65(1): 198–208.
- [26] MORIOKA N, KODAMA K, TSURUTA M, et al. Stimulation of nuclear receptor REV-ERBs suppresses inflammatory responses in spinal microglia [J]. *Neurochem*

- Int, 2021, 151: 105216.
- [27] STRATMANN M, SUTER D M, MOLINA N, et al. Circadian Dbp transcription relies on highly dynamic BMAL1-CLOCK interaction with E boxes and requires the proteasome [J]. Mol Cell, 2012, 48(2): 277-287.
- [28] CAO T, TIAN D, WANG S Y, et al. Microglial DBP signaling mediates behavioral abnormality induced by chronic periodontitis in mice [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(46): e2406269.
- [29] GACHON F. Physiological function of PARbZip circadian clock-controlled transcription factors [J]. Ann Med, 2007, 39(8): 562-571.
- [30] SIMARD M, NEDERGAARD M. The neurobiology of *Glia* in the context of water and ion homeostasis [J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 877-896.
- [31] BROWN A M, RANSOM B R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism [J]. Glia, 2007, 55(12): 1263-1271.
- [32] CLARKE L E, BARRES B A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development [J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14(5): 311-321.
- [33] REIS H J, GUATIMOSIM C, PAQUET M, et al. Neurotransmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(7): 796-840.
- [34] BEAULÉ C, SWANSTROM A, LEONE M J, et al. Circadian modulation of gene expression, but not glutamate uptake, in mouse and rat cortical astrocytes [J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7476.
- [35] FINKEL T, HOLBROOK N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247.
- [36] MUSIEK E S, LIM M M, YANG G, et al. Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration [J]. J Clin Invest, 2013, 123(12): 5389-5400.
- [37] ZHONG J, WANG B, WU B, et al. Clock knockdown attenuated reactive oxygen species-mediated senescence of chondrocytes through restoring autophagic flux [J]. Life Sci, 2021, 269: 119036.
- [38] NIEGO B, LEE N, LARSSON P, et al. Selective inhibition of brain endothelial Rho-kinase-2 provides optimal protection of an *in vitro* blood-brain barrier from tissue-type plasminogen activator and plasmin [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177332.
- [39] CHEN B, ZHENG W. Epigenetic control of rho-associated protein kinase 2 in neurodegeneration [J]. J Alzheimers Dis, 2019, 72(3): 815-822.
- [40] SAAL K A, GALTER D, ROEBER S, et al. Altered expression of growth associated protein-43 and rho kinase in human patients with Parkinson's disease [J]. Brain Pathol, 2017, 27(1): 13-25.
- [41] LI X, TONG J, LIU J, et al. Downregulation of ROCK2 attenuates alcohol-induced inflammation and oxidative stress in astrocytes [J]. Int J Neurosci, 2020: 1-10.
- [42] 钟高亮, 张晶晶. 多物种血脑屏障结构与功能研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 702-707.
- ZHONG G L, ZHANG J J. Research progress on the structural and functional studies of blood brain barrier in different species [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 702-707.
- [43] DOHGU S, TAKATA F, KATAOKA Y. Brain pericytes regulate the blood-brain barrier function [J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2015, 146(1): 63-65.
- [44] GARVIN J, SEMENIKHINA M, LIU Q, et al. Astrocytic responses to high glucose impair barrier formation in cerebral microvessel endothelial cells [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2022, 322(6): R571-R580.
- [45] YANG A C, STEVENS M Y, CHEN M B, et al. Physiological blood-brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis [J]. Nature, 2020, 583(7816): 425-430.
- [46] EL ASSAR M, ANGULO J, VALLEJO S, et al. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction [J]. Front Physiol, 2012, 3: 132.
- [47] PULIDO R S, MUNJI R N, CHAN T C, et al. Neuronal activity regulates blood-brain barrier efflux transport through endothelial circadian genes [J]. Neuron, 2020, 108(5): 937-952.
- [48] KIM M, KEEP R F, ZHANG S L. Circadian rhythms of the blood-brain barrier and drug delivery [J]. Circ Res, 2024, 134(6): 727-747.
- [49] GORI KI A, HATANAKA F, MYUNG J, et al. A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock [J]. PLoS Biol, 2014, 12(4): e1001839.
- [50] YE L, YUAN J, ZHU S, et al. Swimming exercise reverses transcriptomic changes in aging mouse lens [J]. BMC Med Genomics, 2024, 17(1): 67.
- [51] MARTÍN-SÁNCHEZ A, PIÑERO J, NONELL L, et al. Comorbidity between Alzheimer's disease and major depression: a behavioural and transcriptomic characterization study in mice [J]. Alzheimers Res Ther, 2021, 13(1): 73.

[收稿日期]2024-09-26