

MiR-320a作为阿尔茨海默氏病的诊断生物标志物，对 β 淀粉样蛋白诱导的神经毒性具有保护作用

张 群^{1*}, 侯莉芳², 钟月红¹, 沈 菊¹

¹宝山区老年护理院, 上海

²宝山区庙行镇社区卫生服务中心, 上海

Email: opqun7086@163.com

收稿日期: 2021年1月17日; 录用日期: 2021年2月2日; 发布日期: 2021年2月24日

摘 要

目的: MicroRNA (miRNA)在包括阿尔兹海默症(AD)在内的多种人类疾病中异常表达。本研究分析了miR-320a在AD患者中的表达变化和临床价值,并进一步研究了miR-320a在 $A\beta$ 诱导的SH-SY5Y细胞神经毒性中的作用。方法: qRT-PCR用于测量miR-320a表达水平。建立ROC曲线以评估miR-320a对AD的诊断潜力。CCK-8和流式细胞仪用于细胞活力和凋亡的检测。荧光素酶报告基因测定进行靶基因确定。结果: AD患者的血清miR-320a低于健康对照组,并且与患者的MMSE评分呈正相关。血清miR-320a可以将AD患者与对照组区分开,在0.827的临界值下,诊断敏感性和特异性分别为85.5%和87.0%。MiR-320a减弱了 $A\beta$ 25-35对SH-SY5Y细胞的神经毒性,而PTEN是被证明是其靶基因。结论: 本结果为miR-320a作为诊断AD的有前途的生物标志物提供了依据, miR-320a的过表达通过靶向PTEN减弱了 $A\beta$ 诱导的神经毒性。

关键词

MiR-320a, 阿尔兹海默症, 诊断, 神经毒性, PTEN

MiR-320a as a Diagnostic Biomarker for Alzheimer's Disease and Its Protective Role against Amyloid- β Induced Neurotoxicity

Qun Zhang^{1*}, Lifang Hou², Yuehong Zhong¹, Ju Shen¹

¹Baoshan District Nursing Home for the Elderly, Shanghai

*通讯作者。

文章引用: 张群, 侯莉芳, 钟月红, 沈菊. MiR-320a作为阿尔茨海默氏病的诊断生物标志物, 对 β 淀粉样蛋白诱导的神经毒性具有保护作用[J]. 临床医学进展, 2021, 11(2): 646-654. DOI: [10.12677/acm.2021.112094](https://doi.org/10.12677/acm.2021.112094)

²Baoshan District Miaohang Town Community Health Service Center, Shanghai
Email: opqun7086@163.com

Received: Jan. 17th, 2021; accepted: Feb. 2nd, 2021; published: Feb. 24th, 2021

Abstract

Objective: A large amount of microRNAs (miRNAs) have been found to be abnormally expressed in various human diseases, including Alzheimer's disease (AD). The current study investigated the expression change and clinical value of miR-320a in AD patients, and further examined the role of miR-320a in A β -induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. **Methods:** qRT-PCR was used for the measurement of miR-320a expression levels. ROC curve was established to calculate the diagnostic potential of miR-320a for AD. CCK-8 and flow cytometry assay was applied for the detection of cell viability and apoptosis. Luciferase reporter assay was performed to confirm whether PTEN was the target gene of miR-320a. **Results:** Serum miR-320a was lower in AD patients than that in healthy controls, and was positively associated with the MMSE score in patients with AD. Serum miR-320a had the potential to distinguish AD patients from controls, and the diagnostic sensitivity and specificity were respectively 85.5% and 87.0% at a cutoff value of 0.827. MiR-320a attenuated A β ₂₅₋₃₅ induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells, and PTEN was the target gene. **Conclusion:** The present results provide evidence for miR-320a as promising biomarker for the diagnosis of AD, and overexpression of miR-320a attenuated A β induced neurotoxicity in AD by targeting PTEN.

Keywords

MiR-320a, Alzheimer's Disease, Diagnosis, Neurotoxicity, PTEN

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

阿尔茨海默症(AD)是一种慢性进行性神经退行性疾病,被认为是痴呆症最常见的原因之一[1]。患有AD的患者在临床上以记忆力丧失和认知能力下降为特征,给家庭和社会带来沉重负担。迄今为止,尚无针对AD患者的治疗方法。通常,AD患者的最初症状是轻度的记忆困难,并逐渐演变为认知障碍和痴呆[2]。在AD临床表现发展之前,大脑的许多区域已经发生了神经元丢失和神经病理学损害。因此,挖掘敏感的生物标志物有助于AD的早期诊断,对于AD的干预治疗至关重要。

近年来,microRNA(miRNA)在人类疾病中的作用受到越来越多的关注,其在各个领域的生物调节中起着至关重要的作用[3]。MiRNA是一类小的非编码RNA,通过与靶基因的3'-非翻译区(UTR)结合,参与生物中基因表达的转录后调控[4]。越来越多的证据表明,miR-320a参与神经发育的调控[5]。近期的文章发现,miR-320a在AD患者的血清和脑脊液(CSF)中均显著下调[6]。但是,miR-320a在AD发生中的作用和潜在机制尚不清楚。

在本研究中,我们调查了miR-320a在AD患者中的表达变化和临床价值。根据qRT-PCR结果,确定AD患者血清中的miR-320a被下调。此外,我们进一步研究了miR-320a在A β 诱导的SH-SY5Y细胞神经毒性中的作用。

2. 材料和方法

2.1. 研究对象和样品收集

本研究共招募 110 名 AD 患者, 并收集另外 100 名健康志愿者作为对照组。所有个人均签署了知情同意书, 该研究已获得上海市宝山区老年护理院伦理委员会的批准。

2017 年 1 月至 2019 年 12 月, 所有患者均根据 NINCDS-ADRDA 标准确诊[7]。根据病史, 一般检查, 实验室检查和迷你精神状态检查(MMSE)的测量结果, 确定对照组人群神经系统健康。排除标准如下, 将具有冠心病, 传染病, 癌症, 青光眼, 缺血性或出血性中风以及 2 型糖尿病史的患者排除在研究范围之外。禁食 12~14 小时后, 从每个参与者中收集 5 ml 外周血样品, 离心, 收集血清样品, 并在-80℃下保存以进行进一步实验。

2.2. 细胞培养和转染

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞由美国典型培养物保藏中心(ATCC)提供。将细胞在加有 10%胎牛血清(FBS; PAN, Aidenbach, 德国)的 Dulbecco 改良版 Eagle 培养基(DEME; Gibco, CA, 美国)中进行培养, 培养稳定为 37℃。培养 24 小时后, 加入 A β 25-35 (25 μ M/L; Sigma-Aldrich, 美国密苏里州圣路易斯), 孵育 24 小时, 随后进行细胞转染。

为了调节 miR-320a 在细胞中的表达, 用 Gene-Pharma 公司(上海, 中国)提供的 miR-320a 模拟物, miR-320a 抑制剂或阴性对照(miR-NC)转染 SH-SY5Y 细胞。在 A β 25-35 处理之前, 按照制造商的说明, 使用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)将 miR-320a 模拟物(miR-mimic), miR-320a 抑制剂(miR-inhibitor)或 miR-NC 转染到细胞中。转染后 24 小时, 收获不同组的细胞用于随后的实验。

2.3. RNA 提取和实时定量 PCR (qRT-PCR)

TRIzol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国)用于从血清和细胞中提取总 RNA。确定 RNA 的纯度和浓度后, 使用 PrimeScript RT 试剂盒(Takara, 东京, 日本)将 RNA 逆转录为 cDNA。然后使用 SYBR green I Master Mix Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)进行 qRT-PCR 以测量 miR-320a 表达。miR-320a 的相对表达通过使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算, 使用 U6 作为内参。PCR 反应条件如下: 94℃ 预变性 2 min, 然后 94℃ 变性 20 秒, 60℃ 变性 34 秒, 循环 40 次。

2.4. CCK-8 测定

CCK-8 分析用于细胞活力的检测。将细胞以 2 × 10⁴ 细胞/孔的密度接种到 96 孔板中。转染后 24 小时, 将 10 μ l CCK-8 溶液混合到培养基中, 再孵育 1 小时。然后, 通过使用微孔板读取器(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)读取 450 nm 处的吸光度来检测光密度。并且计算细胞存活率作为对照组的百分比。

2.5. 凋亡分析

Annexin VFITC 细胞凋亡检测试剂盒(Keygen Biotechnology, 中国南京)用于计算细胞凋亡。首先将不同组的细胞在黑暗中于孵育 10 分钟, 温度 2~8℃。然后使用 FACSCalibur 流式细胞仪(BD Biosciences, 美国加利福尼亚州圣何塞)计算细胞凋亡。

2.6. 荧光素酶报告基因检测

TargetScan 分析结果表明, PTEN 在 3'-UTR 处具有 miR-320a 的潜在结合位点。进行荧光素酶报告基因测定以证实 PTEN 是否是 SH-SY5Y 细胞中 miR-320a 的靶基因。合成了包含 miR-320a 结合位点的

PTEN 3'-UTR 序列的野生型(Wt)或突变型(Mut), 并将其克隆到 pGL3 荧光素酶载体(Promega, 麦迪逊, 威斯康星州, 美国)中, 将其共转染到具有 miR-320a 模拟物, miR-320a 抑制剂或模拟 NC, 抑制剂 NC 的 SH-SY5Y 细胞。荧光素酶活性通过使用双重荧光素酶报告试剂盒(Promega Corporation, Wisconsin, USA) 测量, 并且使用海肾荧光素酶用作内部对照以进行标准化。未进行任何处理的细胞被确定为对照组。

2.7. 统计分析

连续变量表示平均值 \pm 标准差(SD)。卡方检验用于比较分类变量, 而学生 t 检验用于比较连续变量。使用单向方差分析(ANOVA), 然后进行 Tukey 进行多重比较检验, 比较组之间的差异。采用 Kolmogorov-Smirnov (K-S) 正态检验对数据进行正态检验, 发现血清 miR-320a 水平与 MMSE 评分符合正态分布。通过确定 Pearson 相关系数来评估血清 miR-320a 水平与 MMSE 评分之间的关系。绘制受试者工作特性(ROC)曲线, 并计算该曲线下的面积(AUC)以评估 miR-320a 对 AD 的诊断准确性。 $P < 0.05$ 被确定为差异具有统计学意义。使用 SPSS 18.0 版软件(SPSS Inc.)和 GraphPad Prism 5.0 软件(GraphPad Software, Inc.)进行所有数据分析。

3. 结果

3.1. 受试者的基本特征

如表 1 所示, 该研究招募了 110 名 AD 患者和 100 名健康对照。比较受试者的人口统计学和临床特征, 两组之间在年龄和性别分布上均无显著差异($P > 0.05$)。但是, AD 患者的 MMSE 评分(17.33 ± 3.96)与健康个体(27.40 ± 1.62)相比明显降低。此外, 健康对照组的血清 miR-320a 水平为 0.59 ± 0.15 , 而 AD 患者的相对较低水平为 1.00 ± 0.29 。

Table 1. Clinical characteristics

表 1. 临床特征

变量	健康组(n = 100)	AD 组(n = 110)	P-值
年龄	70.93 \pm 3.21	70.61 \pm 2.82	0.441
性别(男性/女性)	52/48	64/46	0.368
MMSE 评分	27.40 \pm 1.62	17.33 \pm 3.96	<0.001
miR-320a	1.00 \pm 0.29	0.59 \pm 0.15	<0.001

3.2. MiR-320a 在 AD 中被下调

进行 qRT-PCR 以计算 miR-320a 在 AD 患者血清中的表达。如图 1 所示, AD 患者的血清 miR-320a 水平显著低于健康对照组($P < 0.001$)。

3.3. 血清 miR-320a 与 MMSE 评分的关系

MMSE 分数是广泛使用的认知功能测验, 它可以反映个人的心理状态。在本研究中, 我们分析了 MMSE 评分与 AD 患者血清 miR-320a 表达的相关性。结果表明, AD 患者的血清 miR-320a 与 MMSE 评分呈正相关($r = 0.651$, $P < 0.001$, 图 2)。

3.4. MiR-320a 对 AD 患者的诊断价值

由于 AD 患者的 miR-320a 血清水平与健康个体存在显著差异, 并且在患者组中观察到 miR-320a 血

清表达与 MMSE 评分呈正相关, 因此我们进一步研究了诊断方法 miR-320a 对 AD 的诊断潜力。根据 miR-320a 的血清水平, 建立了 ROC 曲线, 发现 AUC 为 0.885, 临界值为 0.774 的情况下, 诊断灵敏度和特异性分别为 90.0% 和 81.0% (图 3)。

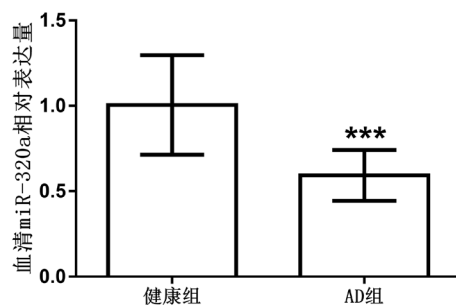


Figure 1. Expression of miR-320a in serum of patients with AD. *** $P < 0.001$

图 1. miR-320a 在 AD 患者血清中的表达。*** $P < 0.001$

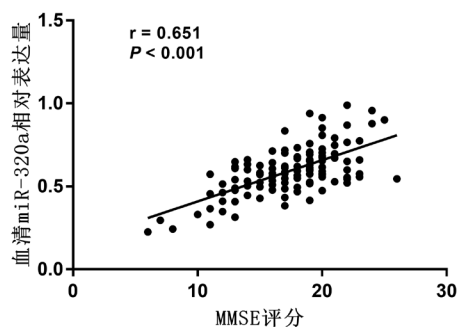


Figure 2. Correlation between serum miR-320a level and MMSE score in patients with AD. $r = 0.651$, $P < 0.001$

图 2. AD 患者的血清 miR-320a 水平与 MMSE 评分的相关性。 $r = 0.651$, $P < 0.001$

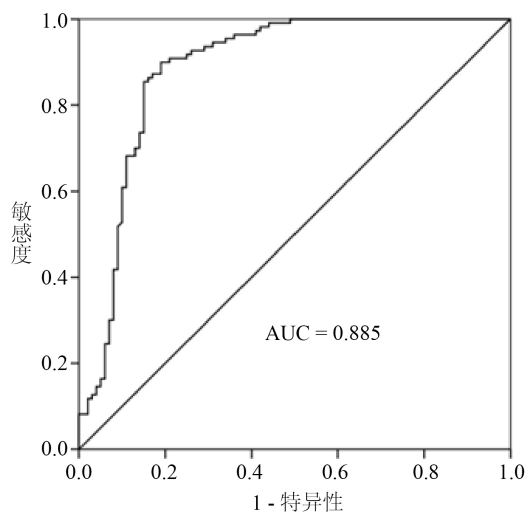


Figure 3. ROC curves were constructed to evaluate the diagnostic potential of miR-320a for AD

图 3. 构建了 ROC 曲线以评估 miR-320a 对 AD 的诊断潜力

3.5. MiR-320a 减弱了 A β 25-35 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞毒性

在这项研究中,用 A β 25-35 处理 SH-SY5Y 细胞以建立细胞 AD 模型,以进一步探索 miR-320a 在 AD 中的功能。从图 4(a)发现,在 A β 25-35 处理后,SH-SY5Y 细胞中 miR-320a 表达显著降低。另外,与对照组相比,A β 25-35 处理的神经元细胞的细胞活力将受到显著抑制(图 4(b))。同样,A β 25-35 处理可显著促进细胞凋亡(图 4(c))。这些结果表明,成功建立了细胞 AD 模型。此外,与 AD 患者的血清表达数据相似,A β 25-35 处理也降低了神经元细胞中 miR-320a 的表达水平。

我们进一步探讨了 miR-320a 的调节对神经元细胞活力和凋亡的影响。通过转染,miR-320a 模拟物可上调 miR-320a 的表达,但 miR-320a 抑制剂可下调其表达(图 4(a))。根据 CCK-8,注意到 miR-320a 的过表达抑制了 A β 25-35 处理诱导的细胞活力降低,而 miR-320a 的下调则加剧了细胞活力的抑制(图 4(b))。此外,miR-320a 的上调抑制了 A β 25-35 诱导的细胞凋亡,而 miR-320a 的下调则加剧了 A β 25-35 对细胞凋亡的诱导作用(图 4(c))。这些数据表明,miR-320a 减弱了 A β 25-35 对 SH-SY5Y 细胞的神经毒性。

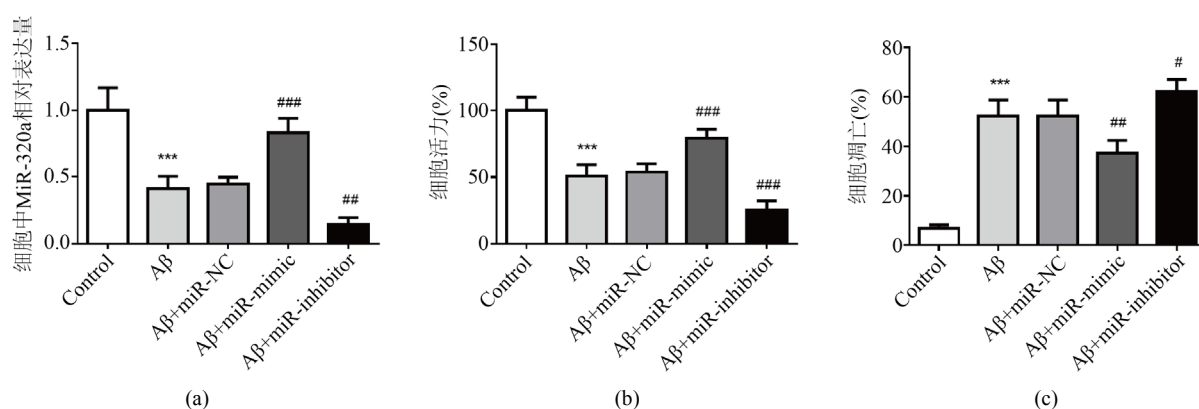


Figure 4. MiR-320a attenuated the neurotoxicity of SH-SY5Y cells induced by A β 25-35. *** $P < 0.001$, compared with the control group; Compared with A β group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, and ### $P < 0.001$

图 4. MiR-320a 减弱了 A β 25-35 诱导的 SH-SY5Y 细胞神经毒性。*** $P < 0.001$, 与对照组相比; 与 A β 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

3.6. PTEN 是 SH-SY5Y 细胞中 miR-320a 的靶基因

根据 TargetScan 分析结果,我们注意到 miR-320a 可以与 PTEN 的 3'-UTR 结合,这表明 PTEN 可能是 miR-320a 的候选靶向基因(图 5(a))。然后,我们进行了荧光素酶报告基因检测,以进一步验证 PTEN 是否是 miR-320a 的直接靶标。如图 5(b)所示,结果表明 miR-320a 的上调抑制了细胞的荧光素酶活性,而 miR-320a 的下调则促进了荧光素酶的活性。但是转染 PTEN 突变质粒的 SH-SY5Y 细胞,其荧光素酶活性不受 miR-320a 表达量的影响。因此,PTEN 是 SH-SY5Y 细胞中 miR-320a 的靶基因。

4. 讨论

AD 是不治之症,通常在老年中发作,可严重影响患者的短期和长期记忆[8]。目前,AD 的确切病因仍未确定,但是 A β 和过磷酸化的 tau 蛋白在神经原纤维缠结中的积累被认为是 AD 的根本原因[8]。在本研究中,我们调查了 AD 患者血清中 miR-320a 的表达变化和临床价值,并进一步探讨了 miR-320a 对 A β 25-35 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力和凋亡的调节作用。结果表明,与健康组相比,AD 患者血清中 miR-320a 的表达明显降低。血清 miR-320a 的表达与 AD 患者的 MMSE 评分呈正相关,对 AD 有一定的诊断价值。此外,体外实验进一步确定,miR-320a 减弱了 A β 25-35 诱导的 SH-SY5Y 细胞的神经毒性,

而 PTEN 可能是其靶基因。

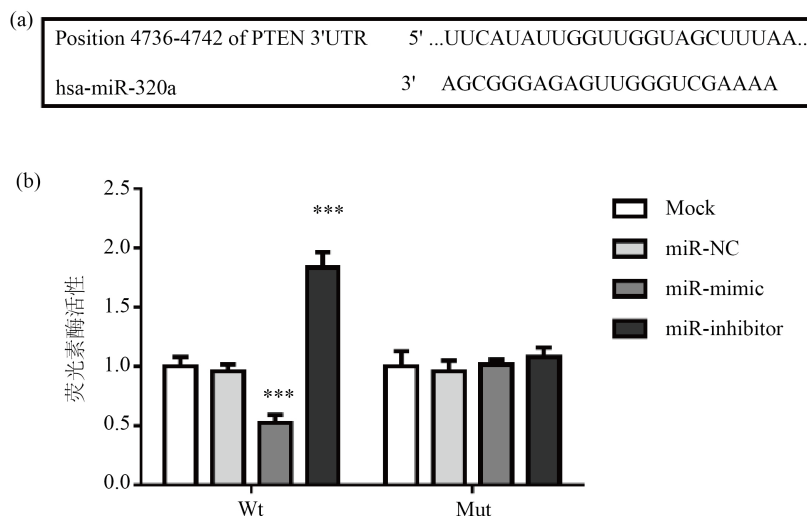


Figure 5. PTEN is the target gene of miR-320a in SH-SY5Y cells. (a) MiR-320a binding site in PTEN; (b) Overexpression of miR-320a inhibited the activity of wild-type PTEN transfected cells, while down-regulation of miR-320a promoted luciferase activity. *** $P < 0.01$, compared with the simulation group.

图 5. PTEN 是 SH-SY5Y 细胞中 miR-320a 的靶基因。(a) PTEN 中的 MiR-320a 结合位点; (b) miR-320a 的过表达抑制了转染野生型 PTEN 的细胞的活性, 而 miR-320a 的下调则促进了荧光素酶的活性。*** $P < 0.01$, 与模拟组相比

已发现大量 miRNA 在 AD 患者中异常表达, 例如 miR-29c-3p, miR-19b-3p, miR-34a-5p [9] [10], 反映了 miRNA 在 AD 发展中的关键作用。在本研究中, 我们发现与健康对照组相比, AD 患者血清中的 miR-320a 显著降低。与我们的观察结果一致, 先前已报道 miR-320a 的循环水平在 AD 患者中异常表达[6]。MMSE 分数是广泛使用的认知功能测验, 它可以反映个人的心理状态[11]。我们还发现, AD 患者的血清 miR-320a 与 MMSE 得分呈正相关。所有证据表明, miR-320a 在神经退行性疾病的发生和发展中具有至关重要的作用。

MiRNA 在血清中稳定表达, 在血清中检测 miRNA 标志物被认为是许多人类疾病的潜在策略, 近年来受到越来越多的关注[12]。已确定 miR-320a 是许多癌症进展中的重要调控因子[13] [14]。鉴于 AD 患者中血清 miR-320a 的异常表达, 及其与 MMSE 评分的显著相关, 我们进一步研究了 miR-320a 对 AD 的诊断潜力。ROC 曲线分析结果表明 miR-320a 具有较高的诊断准确性, 可将 AD 患者与健康对照区分开。

淀粉样蛋白 β 肽(A β 25-35)是 AD 中淀粉样蛋白 β 肽的片段, 据报道在神经元细胞中表现出神经毒性作用[15]。在这项研究中, 用 A β 25-35 处理 SH-SY5Y 细胞建立细胞 AD 模型, 以进一步探索 miR-320a 在 AD 中的功能。与 AD 患者血清表达数据一致, 神经元细胞中 A β 25-35 处理也降低了 miR-320a 的表达水平。进一步的回复实验表明, miR-320a 的过表达可减弱 A β 25-35 诱导的 SH-SY5Y 细胞的神经毒性。考虑到该研究揭示的 miR-320a 的作用, 我们试图鉴定 SH-SY5Y 细胞中 miR-320a 的靶基因。根据通过 TargetScan 进行在线预测, PTEN 被确定为 miR-320a 的合适候选基因。此外, 我们进一步进行了荧光素酶报告基因检测, 并确定 PTEN 是 SH-SY5Y 细胞中 miR-320a 的靶基因。

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), 位于 10 号染色体上, 是一种脂质和蛋白质磷酸酶, 具有蛋白质和脂质磷酸酶的活性。它在调节细胞生长, 存活和代谢中起重要作用[16]。PTEN 参与神经发生, 神经突向外生长, 突触形成和突触可塑性的调节[17]。已有大量文献证明, PTEN

可以抑制与细胞生长和存活相关的细胞信号通路, 包括 PI3K/AKT 信号通路, 这在 AD 的发生和发展中起着至关重要的作用[18] [19]。此外, 在 AD 中有针对性地抑制 PTEN 活性可以促进神经保护并抵抗细胞氧化应激, 内质网应激和神经毒性[20]。此外, 已证明在 $A\beta$ 25-35 处理的 PC12 细胞中 PTEN 的表达水平被上调[21]。结合上述结论, 我们推测 miR-320a 可能通过靶向 PTEN 作用于 PI3K/AKT 信号通路, 从而减弱 AD 中 β -淀粉样蛋白诱导的神经毒性。但是, 这一推断需要进一步的研究来验证我们的假设, 并且应该探索具体的机制。

综上所述, 本研究的结果提出血清 miR-320a 可以作为诊断 AD 的有前途的生物标志物, 并且 miR-320a 的过表达通过靶向 PTEN 减弱了 $A\beta$ 诱导的 AD 的神经毒性。这些数据为 miR-320a 参与 AD 的发病机理提供了重要的理论基础, 且 miR-320a 的上调可能具有一定治疗 AD 的潜力。

基金项目

本研究由宝山区科技创新基金“基于精准代谢组学方法的阿尔兹海默症早期预测生物标志物探索研究”资助(19-E-29)。

参考文献

- [1] Bondi, M.W., Edmonds, E.C. and Salmon, D.P. (2017) Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society*, **23**, 818-831. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29198280>
- [2] Jeong, S. (2017) Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Molecules and Cells*, **40**, 613-620. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0096>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28927263>
- [3] Akhter, R. (2018) Circular RNA and Alzheimer's Disease. In: Xiao, J. Ed., *Circular RNAs*, Vol. 1087, Springer, Singapore, 239-243. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_19
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30259371>
- [4] An, F., Gong, G., Wang, Y., Bian, M., Yu, L. and Wei, C. (2017) MiR-124 Acts as a Target for Alzheimer's Disease by Regulating BACE1. *Oncotarget*, **8**, 114065-114071. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23119>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371969>
- [5] White, R.E. and Giffard, R.G. (2012) MicroRNA-320 Induces Neurite Outgrowth by Targeting ARPP-19. *NeuroReport*, **23**, 590-595. <https://doi.org/10.1097/wnr.0b013e3283540394>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22617447>
- [6] Denk, J., Oberhauser, F., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Fassbender, K., Schroeter, M.L., et al. (2018) Specific Serum and CSF microRNA Profiles Distinguish Sporadic Behavioural Variant of Frontotemporal Dementia Compared with Alzheimer Patients and Cognitively Healthy Controls. *PLoS ONE*, **13**, e0197329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197329>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29746584>
- [7] McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. and Stadlan, E.M. (1984) Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the Auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, **34**, 939-944. <https://doi.org/10.1212/WNL.34.7.939>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6610841>
- [8] Bu, X.L., Xiang, Y., Jin, W.S., Wang, J., Shen, L.-L., Huang, Z.-L., et al. (2018) Blood-Derived Amyloid-Beta Protein Induces Alzheimer's Disease Pathologies. *Molecular Psychiatry*, **23**, 1948-1956. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.204>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29086767>
- [9] Wu, Y., Xu, J., Xu, J., Cheng, J., Jiao, D., Zhou, C., et al. (2017) Lower Serum Levels of miR-29c-3p and miR-19b-3p as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **242**, 129-136. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28626163>
- [10] Cosin-Tomas, M., Antonell, A., Llado, A., Alcolea, D., Fortea, J., Ezquerro, M., et al. (2017) Plasma miR-34a-5p and miR-545-3p as Early Biomarkers of Alzheimer's Disease: Potential and Limitations. *Molecular Neurobiology*, **54**, 5550-5562. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0088-8>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27631879>
- [11] Arevalo-Rodriguez, I., Smailagic, N., Roque, I.F.M., Ciapponi, A., Sanchez-Perez, E., Giannakou, A., et al. (2015)

- Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of Alzheimer's Disease and Other Dementias in People with Mild Cognitive Impairment (MCI). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, No. 3, Article ID: CD010783. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010783.pub2>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25740785>
- [12] Han, J., Li, J., Qian, Y., Liu, W.P., Liang, J.G., Huang, Z.G., *et al.* (2019) Identification of Plasma miR-148a as a Noninvasive Biomarker for Hepatocellular Carcinoma. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, **43**, 585-593. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.12.008>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30824368>
- [13] Shu, S., Liu, X., Xu, M., Gao, X., Chen, S., Zhang, L., *et al.* (2019) MicroRNA-320a Acts as a Tumor Suppressor in Endometrial Carcinoma by Targeting IGF-1R. *International Journal of Molecular Medicine*, **43**, 1505-1512. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4051>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30628637>
- [14] Costa, C., Indovina, P., Mattioli, E., Forte, I.M., Iannuzzi, C.A., Luzzi, L., *et al.* (2020) P53-Regulated miR-320a Targets PDL1 and Is Downregulated in Malignant Mesothelioma. *Cell Death & Disease*, **11**, Article No. 748. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02940-w>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32929059>
- [15] Liu, N., Yu, Z., Xun, Y., Shu, P., Yue, Y., Yuan, S., *et al.* (2018) Amyloid-Beta25-35 Upregulates Endogenous Neuroprotectant Neuroglobin via NFκB Activation *in Vitro*. *Journal of Alzheimer's Disease*, **64**, 1163-1174. <https://doi.org/10.3233/jad-180163>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30010125>
- [16] Heydarzadeh, S., Moshtaghie, A.A., Daneshpoor, M. and Hedayati, M. (2020) Regulators of Glucose Uptake in Thyroid Cancer Cell Lines. *Cell Communication and Signaling*, **18**, Article No. 83. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00586-x>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32493394>
- [17] Secondo, A., Esposito, A., Petrozziello, T., Boscia, F., Molinaro, P., Tedeschi, V., *et al.* (2018) Na⁺/Ca²⁺ Exchanger 1 on Nuclear Envelope Controls PTEN/Akt Pathway via Nucleoplasmic Ca²⁺ Regulation during Neuronal Differentiation. *Cell Death Discovery*, **4**, Article No. 12. <https://doi.org/10.1038/s41420-017-0018-1>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29531809>
- [18] Robbins, H.L. and Hague, A. (2015) The PI3K/Akt Pathway in Tumors of Endocrine Tissues. *Frontiers in Endocrinology*, **6**, 188. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00188>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26793165>
- [19] Zheng, R., Zhang, Z.H., Chen, C., Chen, Y., Jia, S.-Z., Liu, Q., *et al.* (2017) Selenomethionine Promoted Hippocampal Neurogenesis via the PI3K-Akt-gsk3beta-Wnt Pathway in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **485**, 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.069>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28109879>
- [20] Cui, W., Wang, S., Wang, Z., Wang, Z.Y., Sun, C.L. and Zhang, Y.H. (2017) Inhibition of PTEN Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis via Activation of PI3K/AKT Pathway in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, **42**, 3052-3060. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2338-1>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28819903>
- [21] Yao, K., Zhao, Y.F. and Zu, H.B. (2019) Melatonin Receptor Stimulation by Agomelatine Prevents Aβ-Induced tau Phosphorylation and Oxidative Damage in PC12 Cells. *Drug Design, Development and Therapy*, **13**, 387-396. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S182684>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30718944>