

网络出版时间:2022-08-30 13:19 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220829.1636.003.html

EFhd1/2 在 AD 患者及模型小鼠中的表达对比研究

谢 非¹, 李晓恒², 程金波², 任振华¹, 袁增强^{1,2}

摘要 目的 研究螺旋-环-螺旋手型结构域蛋白家族成员 D1/2 (EFhd1/2) 在阿尔茨海默病 (AD) 患者和模型小鼠中的表达差异。方法 引用 AD 数据库 (AlzData) 中的数据信息, 比较 AD 患者中 EFhd1/2 的表达变化; 通过荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 AD 患者与健康对照者脑组织中 EFhd1/2 的 mRNA 水平及蛋白水平变化; 检测 3 月龄及 6 月龄 AD 模型小鼠及野生型小鼠脑组织中 mRNA 及蛋白表达变化; 分离 AD 模型小鼠的小胶质细胞, 通过 RNA 高通量测序 (RNA-seq) 检测小胶质细胞中 EFhd1/2 的变化。结果 AD 数据库数据分析显示, 在转录水平上, AD 患者 EFhd1 表达上升, 而 EFhd2 则下降。AD 患者脑组织样品检测显示, 与健康对照者相比, AD 患者不同脑区中 EFhd1 的表达均有上升趋势, 而 EFhd2 则无差异。在 AD 小鼠模型中, 与野生型小鼠相比, 在 3 月龄及 6 月龄的 AD 模型小鼠中 EFhd1 的转录水平无改变, 但其蛋白水平上升; 在 3 月龄 AD 模型小鼠中 EFhd2 的转录水平上升, 在 3 月龄及 6 月龄的 AD 模型小鼠脑组织中 EFhd2 蛋白水平无改变, 但 EFhd2 在 6 月龄的 AD 模型小鼠的小胶质细胞中水平上升。结论 在 AD 模型小鼠及 AD 患者脑组织中 EFhd1 水平均上升, 提示 EFhd1 可能在 AD 发生发展中起到重要作用; 而在 AD 模型小鼠的小胶质细胞中 EFhd2 水平上升, 提示 EFhd2 在 AD 病理相关的小胶质细胞激活和神经炎症中可能发挥重要作用。

关键词 阿尔茨海默病; EFhd1; EFhd2; 小胶质细胞; 钙结合蛋白

中图分类号 R 749.16

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)10-1529-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.004

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者常

2022-05-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81930029)

作者单位: ¹ 安徽医科大学基础医学院人体解剖学教研室, 合肥 230032² 北京基础医学研究所脑科学中心, 北京 100850

作者简介: 谢 非, 男, 硕士研究生;

程金波, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: cheng_jinbo@126.com;

任振华, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: renzhenhua@ahmu.edu.cn;

袁增强, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zqyuan@bmi.ac.cn

伴有 β 淀粉样蛋白沉积, 神经纤维缠结, 小胶质细胞激活导致的神经炎症等病理特征^[1-2], 但致病的具体机制仍亟待阐释清楚。研究表明钙稳态在神经退行性疾病中扮演重要角色^[3-4], 小胶质细胞钙离子稳态失衡加剧了神经炎症的发生, 进而加重 AD 模型小鼠的病理及行为表现^[5]。

钙离子稳态的维持离不开钙离子结合蛋白的调控^[6-7], EFhd1/2 是钙离子结合蛋白中的两个重要成员^[6,8]。研究表明, 神经元 EFhd1 缺失会导致线粒体功能障碍, 轴突 ATP 水平降低, 进而影响轴突的形态发生, 导致神经元的死亡^[9]; 而 EFhd2 则被发现具有潜在的参与 AD 病理进程的作用^[10]。但关于二者在 AD 进程中的中枢神经系统内尤其是小胶质细胞的具体变化尚不明确。因而, 该研究利用 AD 患者及模型小鼠的组织样品, 观察在 AD 进程中 EFhd1/2 的表达改变, 并对比二者之间变化的差异, 为阐明 AD 发生发展的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 AD 患者大脑额叶、颞叶和海马组织各 5 例, 健康对照者大脑额叶、颞叶和海马组织各 5 例, 样品均来自于中国医学科学院北京协和医学院国家发育和功能人脑组织资源库; AD 模型小鼠 (过表达人 APP 基因的 K70 N/M 671 L、I 716 V 和 V 171 I 突变及 PS 1 基因 M 146 L 和 L 286 V 突变) 购于 Jackson 实验室, 并由实验室繁育。野生型小鼠 11 只, AD 模型小鼠 8 只, 体质量 20~30 g, 饲养于 SPF 级动物房, 饲养温度为 23℃, 执行 12 h 昼夜周期, 小鼠可自由摄食及饮水。所有动物相关实验均经军事医学研究院动物福利委员会审查和批准。

1.1.2 试剂及仪器 TRIzol (美国 Life Technologies 公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠及兔的二抗 (天津三箭生物技术股份有限公司), 荧光二抗 (美国 Invitrogen 公司), BCA 法检测蛋白含量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 反转录试剂盒 (莫纳生物科技有限公司), 荧光定量 PCR 试剂盒

(北京康润诚业生物科技有限公司),成年鼠脑解离分选试剂盒(德国 Miltenyi Biotec 公司),所使用的其他抗体见表 1。低温离心机(美国 Thermo Scientific 公司),微量分光光度计(德国 IMPLIN 公司),实时荧光定量 PCR 分析仪(美国 Applied Biosystems 公司),酶标仪(瑞士 TECAN 公司),单细胞解离器(德国 Miltenyi Biotec 公司)。

表 1 实验所用的主要抗体

抗体名称	生产商	货号	稀释比例
EFhd2	成都正能生物科技有限责任公司	163761	1 : 1 000
β -actin	美国 Engibody 公司	AT 0001	1 : 5 000
EFhd1	美国 NOVUS 公司	NBP 1 - 77134	1 : 250
IBA 1	美国 NOVUS 公司	NB 100 - 1028	1 : 400

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 实验 分取大脑组织,加入 500 μ l TRIzol,匀浆机震荡裂解 3 min,冰上孵育 15 min,重复震荡一次后冰浴 15 min,加入 100 μ l 氯仿萃取,充分混匀后冰上静置至液体出现清晰分层,14 000 r/min 离心 15 min 后吸取 200 μ l 上清液至加有 300 μ l 异丙醇的新离心管中,混匀之后在冰上静置 20 min,14 000 r/min 离心 15 min 后弃上清液,加入 500 μ l 70% 乙醇溶液,混匀后 14 000 r/min 离心 15 min,弃掉上清液后再次 14 000 r/min 离心 1 min,吸弃上清液后晾干,加入 30 μ l 无 RNA 酶纯水溶解,微量分光光度计测定浓度,取 1 μ g 总 RNA 利用反转录试剂盒进行反转录,SYBR Green 荧光染料法进行荧光定量 PCR 检测分析,引物序列见表 2。

表 2 qRT-PCR 引物序列

引物名称	序列	产物长度 (bp)
Mouse-EFhd1	F:5'-CGGACTCCGAACCTC-3' R:5'-AACTCCGGGAACCTCGGTGA-3'	109
Human-EFhd1	F:5'-TGGGAGAGTTGCAGTATGACG-3' R:5'-AGCTTCCCATCGAAGTCCCTC-3'	148
Mouse-EFhd2	F:5'-CAGGGATGGCTTCATCGACC-3' R:5'-CACCTCCTGCATCATCTCTGA-3'	100
Human-EFhd2	F:5'-AAGGACATGGAGAAGATGTTCAAGCAG-3' R:5'-AAGTTTCTCCATCATGAGTTTATGCTCC-3'	90
Mouse- β -actin	F:5'-GGCTGTATTCCCTCCATCG-3' R:5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	154
Human- β -actin	F:5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' R:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'	250

1.2.2 Western blot 实验 分别取小鼠/人大脑组织,加入 500 μ l RIPA 组织裂解液(已加好蛋白酶抑

制剂),匀浆机震荡裂解 3 min,冰上孵育 15 min,重复震荡一次,冰浴 15 min,4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液后使用 BCA 法测定蛋白含量,使用上述裂解液将各样品蛋白浓度调至一致,加入适量体积 6 $\times$ SDS 上样缓冲液制备好蛋白样品。进行常规 Western blot 实验步骤,包括上样 80 V 电泳 30 min,120 V 电泳 1 h,250 mA 转膜电泳 2 h,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,HRP 标记的二抗 1 : 5 000 稀释后室温孵育 1 h,使用 ECL 化学发光液显影,X 射线胶片压片。将获得的 X 射线胶片扫描成像,Image J 软件分析灰度值并统计。

1.2.3 小鼠基因型鉴定 剪取小鼠脚趾或鼠尾约 3 mm 至离心管中,每管加入鼠尾组织裂解液及蛋白酶 K,55 $^{\circ}$ C 水浴裂解过夜;震荡充分后 14 000 r/min 离心 15 min,将上清液转移至 200 μ l 异丙醇中沉淀核酸;而后 14 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液;加入 500 μ l 75% 乙醇溶液洗沉淀,充分震荡后 14 000 r/min 离心 15 min,弃上清液;14 000 r/min 离心 5 min 后将上清液悉数弃去,开盖置于空气中晾干 15 min,加入 80 μ l 蒸馏水溶解沉淀 15 min;利用诺唯赞 PCR 试剂鉴定小鼠基因型,鉴定的引物为 F: 5'-AATAGAGAACGGCAGGAGCA-3'; R: 5'-GC-CATGAGGGCACTAATCAT-3';PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 2 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 硫磺素 S(thioflavine S,TS)与免疫荧光染色

0.7% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,生理盐水灌流后取脑组织,4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h,15% ~ 30% 梯度蔗糖溶液各脱水 12 h 后 O. C. T 包埋, -80 $^{\circ}$ C 速冻后,于冰冻切片机切取 40 μ m 厚冰冻切片,PBS 清洗 3 次后用 0.002% TS 染色,50% 乙醇溶液漂洗,PBS 漂洗 3 次,10% 马血清、0.03% Triton X-100 的 PBS 封闭 1 h,封闭液稀释 IBA 1 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,荧光二抗 1 : 400 室温孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,封片后晾干,激光共聚焦显微镜观察并拍摄图片。

1.2.5 成年小鼠原代小胶质细胞分选 小鼠麻醉后灌流取脑组织,预冷的 DPBS 润洗后切碎,转移至 C 管加入 2 ml mix 1(试剂盒内酶 P: 缓冲液 Z = 1 : 39)和 30 μ l mix 2(试剂盒内酶 A: 缓冲液 Y = 1 : 2)后安装至单细胞解离器,运行 ABDK-1 程序 30 min,10 ml DPBS 将裂解产物重悬,经 70 μ m 滤网过滤后转移至 50 ml 离心管,1 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液后加入 3 100 μ l DPBS 重悬,转移至

15 ml 离心管,加入 900 μ l 去髓鞘液混匀,轻柔加入 4 ml DPBS,离心机升降速率均调整为零,5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液后加入 0.5 ml 裂红液重悬,冰上孵育 10 min,加入 5 ml PB 缓冲液,重悬后 1 000 r/min 离心 10 min,80 μ l PB 缓冲液重悬,20 μ l anti-CD 11 b-beads 孵育 10 min,2 ml PB 缓冲液重悬,1 000 r/min 离心 10 min,过润洗好的吸附柱,2 ml PB 缓冲液润洗,最后用 1 ml PB 缓冲液洗脱,3 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,加入 TRIzol 后提取 RNA 送样进行 RNA-seq。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,定量数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间的数据比较采用非配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库中 AD 患者 EFhd1/2 蛋白表达变化

为了研究 EFhd1/2 蛋白是否与 AD 相关,本研究调取了 AD 数据库 (AlzData, <http://www.alzdata.org/>) 中 AD 患者及健康对照者的数据信息,将数据信息筛选分类后进行统计分析作图,结果如图 1 所示,与健康对照者相比,AD 患者额叶 (图 1A – 1C)、海马 (图 1D – 1F) 和颞叶 (图 1G – 1I) 组织中,EFhd1 的表达水平呈增加的趋势,不同数据集中则略有差异;EFhd2 的表达水平呈减少的趋势,同样在不同数据集中略有不同。

2.2 AD 患者样品中 EFhd1/2 的表达变化 本研究收集了 5 对 AD 患者及健康对照者的脑组织样品 (表 3),并检测了 EFhd1/2 表达水平的变化。共检测了包括人脑的额叶、海马和颞叶在内的 3 个不同脑区 (图 2A)。与健康对照者 (1.185 ± 0.562) 相比,在 AD 患者额叶中 EFhd1 转录水平 (6.412 ± 1.797) 上升 (图 2B),差异有统计学意义 ($t = 2.909$, $P = 0.020$);与健康对照者 (1.361 ± 0.900) 相比,

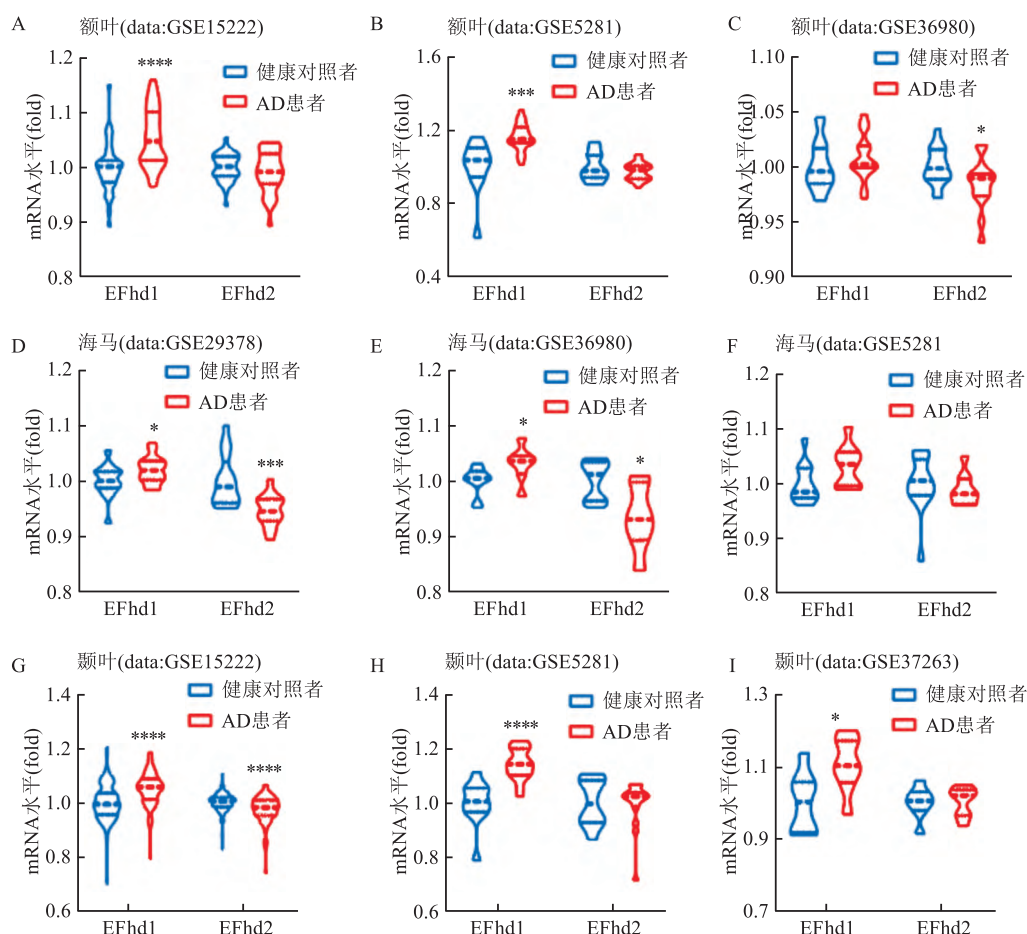


图 1 AlzData 数据库中 EFhd1/2 在 AD 患者和健康对照者脑内的表达变化

A – C: 额叶中 EFhd1/2 mRNA 变化 (GSE 15222: 健康对照者, $n = 40$; AD 患者, $n = 31$) (GSE 5281: 健康对照者, $n = 11$; AD 患者, $n = 23$) (GSE 36980: 健康对照者, $n = 18$; AD 患者, $n = 15$); D – F: 海马中 EFhd1/2 mRNA 变化 (GSE 29378: 健康对照者, $n = 16$; AD 患者, $n = 16$); G – I: 颞叶中 EFhd1/2 mRNA 变化 (GSE 37263: 健康对照者, $n = 8$; AD 患者, $n = 8$); 与健康对照者比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

表3 组织样品信息

类别	性别	年龄(岁)	组织
健康对照者	男	78	额叶、海马、颞叶
健康对照者	男	93	额叶、海马、颞叶
健康对照者	男	95	额叶、海马、颞叶
健康对照者	男	89	额叶、海马、颞叶
健康对照者	男	70	额叶、海马、颞叶
AD患者	男	94	额叶、海马、颞叶
AD患者	男	87	额叶、海马、颞叶
AD患者	男	93	额叶、海马、颞叶
AD患者	男	77	额叶、海马、颞叶
AD患者	男	78	额叶、海马、颞叶

AD患者颞叶中EFhd1转录水平(8.799 ± 3.772)有升高的趋势($t = 1.972, P = 0.084$,图2D);而在海马区无变化(图2C);EFhd2均无变化(图2B-2D);未检测到EFhd1蛋白表达,EFhd2蛋白则与mRNA

结果一致,在AD患者中无变化(图2E-2H)。

2.3 3月龄AD模型小鼠中EFhd1/2蛋白的表达变化 考虑到个体差异的影响,本研究选用基因背景一致的AD模型小鼠进行分析。选用3月龄的野生型及AD模型小鼠,TS染色结果表明AD模型小鼠在3个月时海马DG区A β 斑块较少(图3A)。进一步对EFhd1/2的表达变化进行检测,结果显示,在AD病程早期即3月龄时,与野生型小鼠(1.000 ± 0.083)相比,AD模型小鼠中EFhd2 mRNA水平(1.288 ± 0.099)升高($t = 2.897, P = 0.018$),见图3B,EFhd1则无变化;但较野生型小鼠EFhd1的蛋白水平(1.000 ± 0.118),AD模型小鼠EFhd1的蛋白水平(1.527 ± 0.100)升高($t = 5.261, P < 0.0001$),见图3C-3D,EFhd2则无变化。

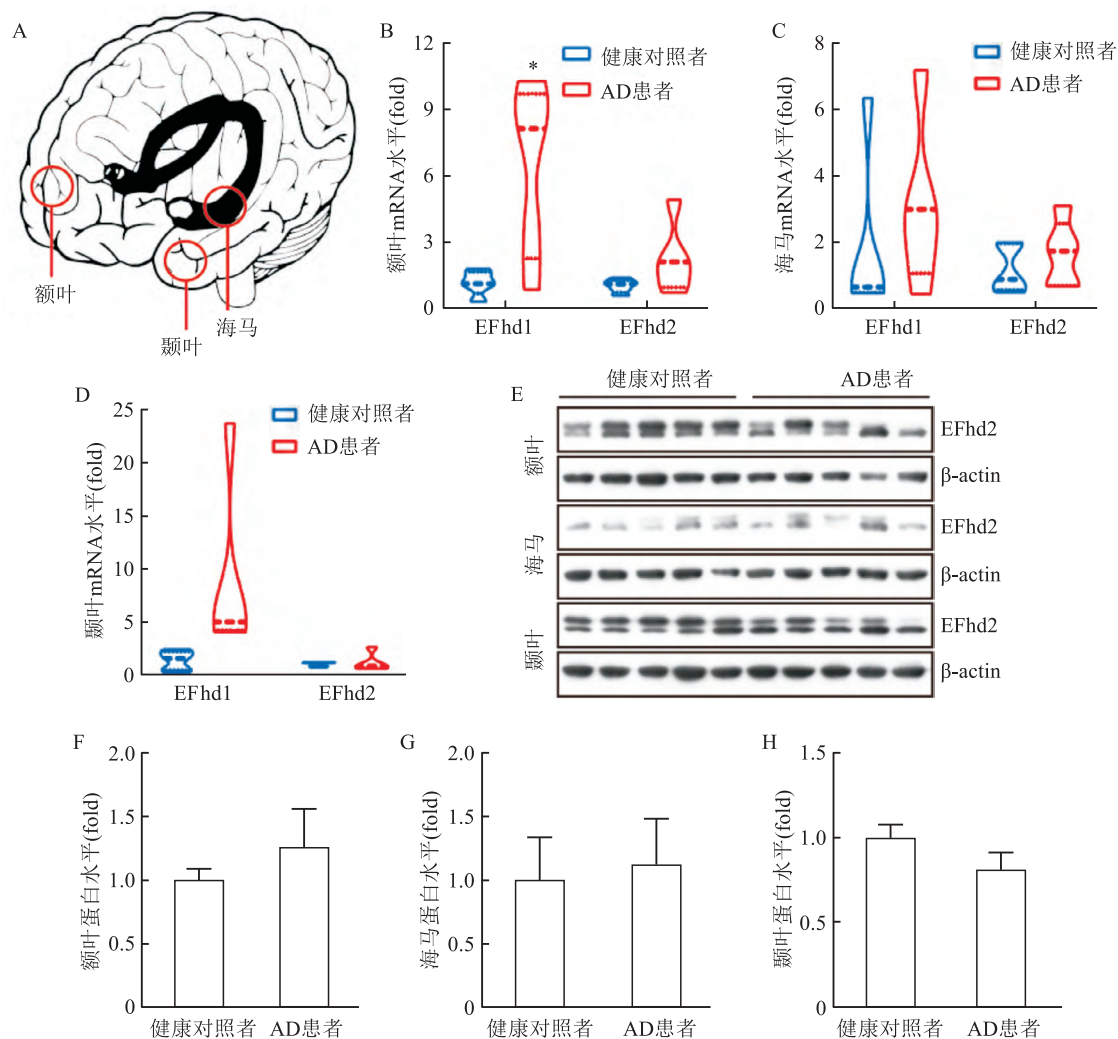


图2 AD患者中EFhd1/2表达变化

A:组织样品部位模式图;B-D:各部位组织EFhd2 mRNA表达变化($n = 5$);E-H:各部位组织EFhd2蛋白水平变化及统计分析;与健康对照者比较; * $P < 0.05$

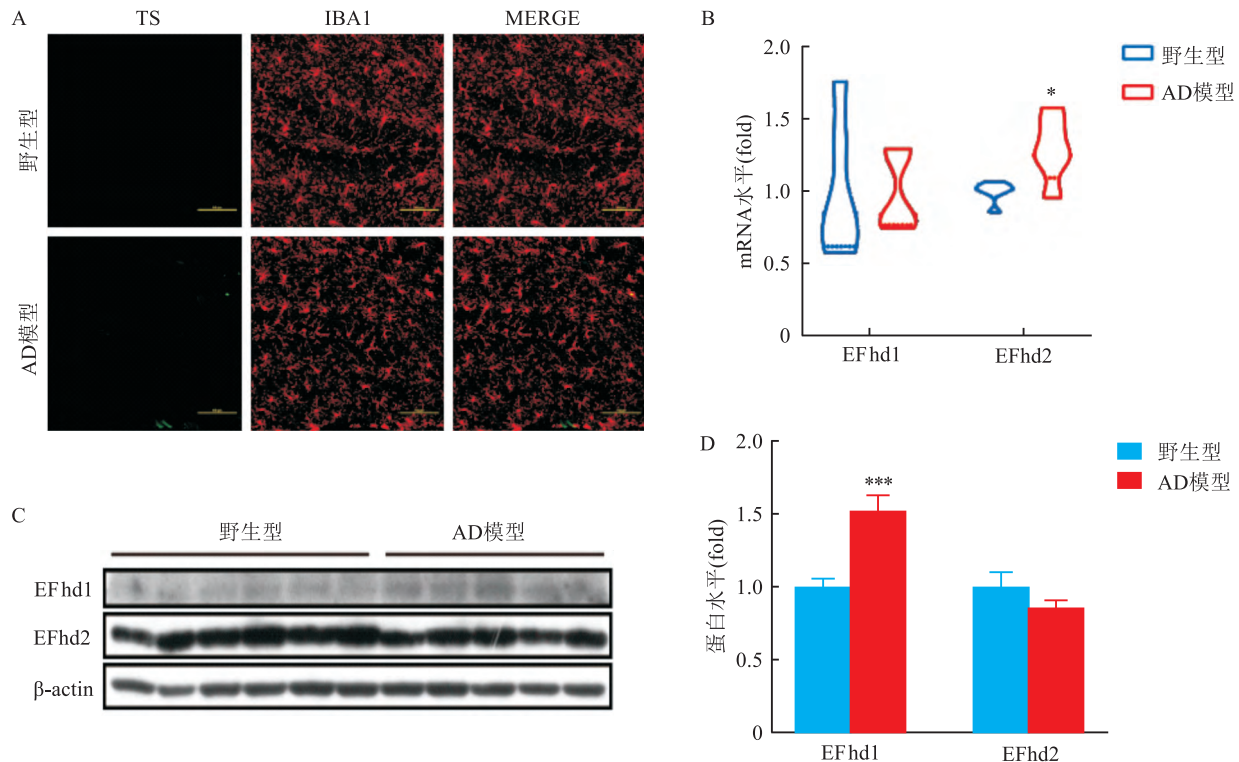


图3 3月龄AD模型小鼠EFhd1/2变化

A: 脑切片 TS 和免疫荧光染色结果 $\times 200$; B: EFhd1/2 mRNA 表达变化(野生型, $n=6$; AD 模型, $n=5$); C-D: EFhd1/2 蛋白水平变化及统计分析;与野生型比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.4 6月龄AD模型小鼠及其小胶质细胞中EFhd1/2蛋白表达变化 小鼠脑组织 TS 染色结果表明,6月龄AD模型小鼠脑组织中已有大量 $A\beta$ 斑块沉积(图4A)。同时相较野生型(1.000 ± 0.352),6月龄AD模型小鼠 EFhd1 mRNA 水平(1.492 ± 0.238)有上升的趋势($t = 2.067$, $P = 0.084$),见图4B,但 EFhd2 无变化;而相较野生型(1.000 ± 0.109),EFhd1 蛋白水平(1.357 ± 0.122)上升($t = 2.930$, $P = 0.026$),EFhd2 无变化,见图4C、4D。考虑到小胶质细胞只占中枢神经系统细胞的10%左右,整体脑组织中 EFhd1/2 的表达变化并不能代表其在小胶质细胞中的表达改变。因此,本研究分离了6月龄野生型和AD模型小鼠的小胶质细胞,通过 RNA-seq 检测 EFhd1/2 的表达变化。6月龄小鼠小胶质细胞测序结果显示,EFhd1 表达水平差异无统计学意义;相较野生型(1.000 ± 0.074),AD模型小鼠小胶质细胞 EFhd2 表达水平(1.511 ± 0.093)升高($t = 5.529$, $P = 0.031$),见图4E。

3 讨论

随着人口老龄化的加剧,神经退行性疾病尤其

AD 成为倍受大家关注的重大疾病。AD 的发病机制目前有很多假说,包括 $A\beta$ 沉积、神经纤维缠结、胆碱能神经元假说等,但都不能全面解释疾病的发生发展。研究^[5]表明,小胶质细胞的过度活化可能是 AD 病理过程中重要的一环,而在此过程中,小胶质细胞的钙稳态紊乱在其激活过程中的作用不容忽视,而通过调节小胶质细胞内钙离子平衡可以改善 AD 小鼠出现的认知功能下降。

细胞钙稳态离不开钙离子结合蛋白的作用,钙离子结合蛋白超家族包括 200 多个成员^[11],其中包括近些年发现的 EFhd1/2 蛋白。EFhd1 主要被认为与线粒体关联,进而调节肌肉前体细胞和神经元的分化和凋亡,提示其在神经退行性疾病中可能存在的作用;EFhd2 则已有许多 AD 相关的研究,多数伴随着细胞骨架,尤其是 Tau 蛋白的缠结^[12]。研究^[12]表明,在 AD 进程中,EFhd2 发生变化,但有的研究表明 AD 病程中 EFhd2 表达水平是上升的,另有研究则是下降的。为了研究在 AD 进程中,EFhd1/2 蛋白的变化情况,本研究采用来自北京协和医院的临床患者标本及不同 AD 病理时期的模型小鼠,检测了这两种蛋白 mRNA 及蛋白水平的变化,

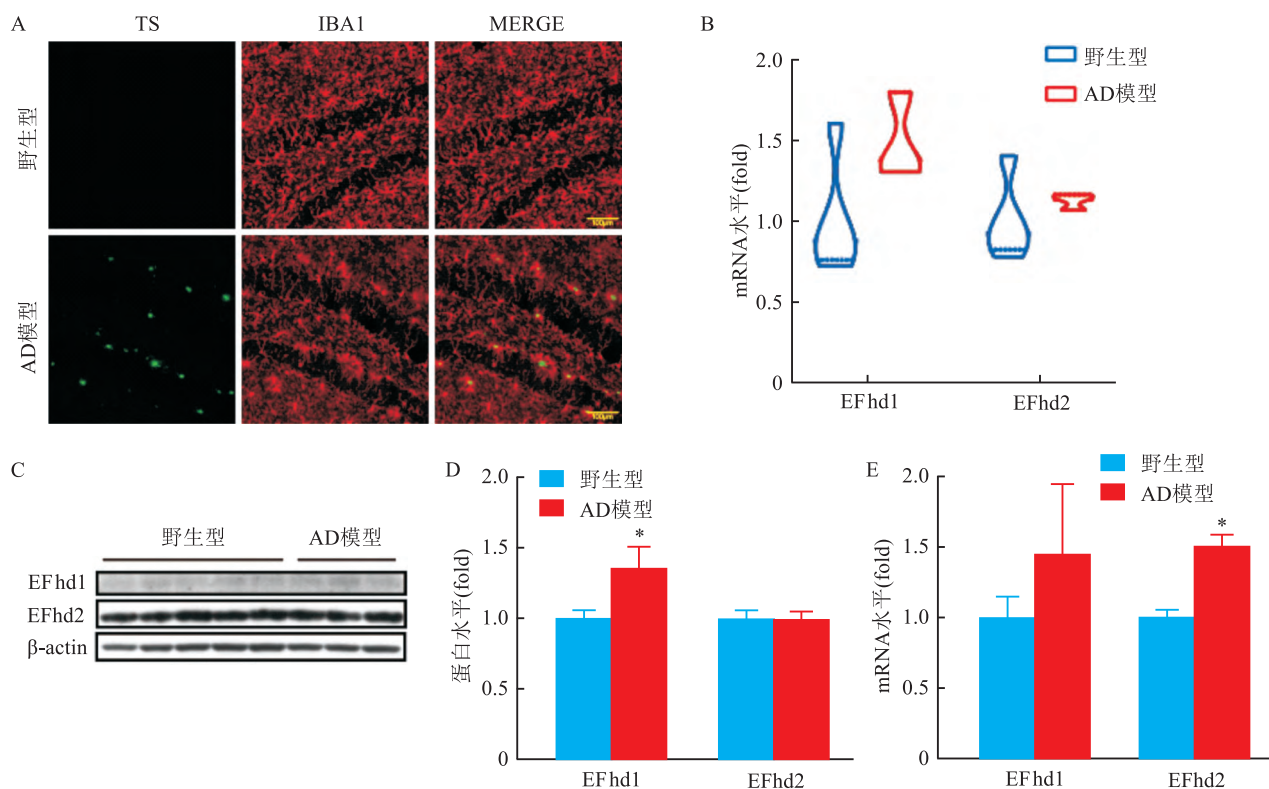


图4 6月龄AD模型小鼠EFhd1/2表达变化及小胶质细胞测序结果

A: 脑切片 TS 和免疫荧光染色结果 $\times 200$; B: EFhd1/2 mRNA 表达变化(野生型, $n=5$; AD 模型, $n=3$); C-D: EFhd1/2 蛋白表达变化及统计学分析; E: 小胶质细胞 EFhd1/2 表达变化(野生型, $n=6$; AD, $n=6$); 与野生型比较: $*P<0.05$

结果显示在 AD 发展时,不同部位脑区的 EFhd1 转录水平都是上升的。有研究^[9]表明 EFhd1 与线粒体功能相关,提示 EFhd1 的改变可能与 AD 病理条件下线粒体的功能紊乱相关;本研究中 EFhd2 转录及蛋白水平均无变化,这与之前的研究有所不同,这可能是由于不同的 AD 病理分期以及实验方法和抗体等的差异造成的。在 AD 模型小鼠中,EFhd1 在 3 月龄及 6 月龄小鼠中蛋白含量上升,但 mRNA 水平却无变化,提示在 AD 病理条件下 EFhd1 可能存在转录后修饰的调控过程,从而介导了 EFhd1 蛋白的稳定;EFhd2 则在 3 月龄小鼠和 6 月龄小鼠中 mRNA 和蛋白水平差异均无统计学意义,提示在 AD 模型小鼠中,EFhd2 变化与 AD 患者表现一致,整体蛋白表达水平无变化。

在 AD 发展过程中,脑内不同神经细胞的变化是不同的。小胶质细胞作为脑内的一类免疫细胞,在 AD 的发生发展过程中发挥重要作用^[5]。同时有研究^[13]利用单细胞测序技术检测发现,随着 AD 的进程,脑内出现一类与疾病密切相关的小胶质细胞,并命名为 disease-associated microglia (DAM)。本研究利用小鼠脑组织解离及细胞分选技术,将 6 月龄

的野生型和 AD 模型小鼠的小胶质细胞分选出来,提取 RNA 之后进行 RNA-seq 分析,结果显示小胶质细胞内与小鼠脑组织整体的变化趋势存在不同,即 EFhd1 的 RNA 水平在野生型和 AD 模型小鼠中并无差异,但 EFhd2 则上升。在 AD 病理条件下,大量 A β 的刺激促使小胶质细胞迁移能力增加,以便快速迁移到斑块周围发挥吞噬作用。有研究^[14]表明 EFhd2 与 F-actin 存在密切联系,进而介导细胞的迁移,因此提示 EFhd2 可能在小胶质细胞迁移和吞噬 A β 斑块过程中发挥重要作用。

本研究对比了 EFhd1 和 EFhd2 在 AD 模型小鼠及 AD 患者中的表达变化,结果表明 EFhd1 表达均上升,而 EFhd2 变化趋势则不完全一致。6 月龄 AD 模型小鼠小胶质细胞中 EFhd2 表达上升,提示 AD 病理条件下脑内不同神经细胞分子表达和功能存在巨大差异,EFhd2 可能在小胶质细胞激活和神经炎症产生中发挥重要作用,但具体作用和分子机制需要进一步研究。

参考文献

[1] Zhang D F, Xu M, Bi R, et al. Genetic analyses of Alzheimer's

- disease in China: achievements and perspectives [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(2):890–901.
- [2] 李 交, 肖友元, 谢 沁, 等. 6-姜酚通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路对 A β 诱导的 AD 大鼠细胞凋亡、氧化应激和神经炎症的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(1): 95–100.
- [3] Puri B K. Calcium signaling and gene expression [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1131: 537–45.
- [4] Calvo-Rodriguez M, Bacskaï B J. Mitochondria and calcium in Alzheimer's disease: from cell signaling to neuronal cell death [J]. *Trends Neurosci*, 2021, 44(2): 136–51.
- [5] Cheng J, Dong Y, Ma J, et al. Microglial Calhm2 regulates neuroinflammation and contributes to Alzheimer's disease pathology [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(35): eabe3600.
- [6] Elías J, Yáñez M, Pereira T M C, et al. An update to calcium binding proteins [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1131: 183–213.
- [7] Fairless R, Williams S K, Diem R. Dysfunction of neuronal calcium signalling in neuroinflammation and neurodegeneration [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(2): 455–62.
- [8] Mun S A, Park J, Park K R, et al. Structural and biochemical characterization of EFhd1/Swiprosin-2, an actin-binding protein in mitochondria [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 628222.
- [9] Ulisse V, Dey S, Rothbard D E, et al. Regulation of axonal morphogenesis by the mitochondrial protein Efhd1 [J]. *Life Sci Alliance*, 2020, 3(7): e202000753.
- [10] Thylur R P, Gowda R, Mishra S, et al. Swiprosin-1: its expression and diverse biological functions [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 150–6.
- [11] Tang S, Deng X, Jiang J, et al. Design of calcium-binding proteins to sense calcium [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(9):2148.
- [12] Kogias G, Kornhuber J, Reimer D, et al. Swiprosin-1/EFhd2: from immune regulator to personality and brain disorders [J]. *Neurosignals*, 2019, 27(S1): 1–19.
- [13] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1276–90 e17.
- [14] Vega I E. EFhd2, a protein linked to Alzheimer's disease and other neurological disorders [J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 150.

A comparative study on the expression of EFhd1/2 in AD patients and model mice

Xie Fei¹, Li Xiaoheng², Cheng Jinbo², Ren Zhenhua¹, Yuan Zengqiang^{1,2}

(¹Dept of Anatomy, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²The Brain Science Center, Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract Objective To investigate the expression differences of helix-loop-helix hand domain family member D 1/2 (EFhd1/2) in Alzheimer's disease (AD) patients and model mice. **Methods** The expression changes of EFhd1/2 in AD patients were compared by using data from Alzheimer's disease database (AlzData), and the changes in mRNA levels and protein levels of EFhd1/2 in brain tissues of AD patients and healthy control group were detected by qPCR and Western blot. The changes of EFhd1/2 mRNA and protein expression in brain tissues of AD models and wild-type mice of 3-month-old and 6-month-old were detected. Microglia were isolated from AD models and detected the changes of EFhd1/2 by RNA-sequencing. **Results** The Analysis of Alzheimer's Disease Database data showed that the mRNA levels of EFhd1 in AD patients increased, while EFhd2 decreased. AD patients brain tissue samples showed an upward trend in the expression of EFhd1 in different brain regions of AD patients compared with healthy controls, while EFhd2 was not different. In the AD mice model, the mRNA levels of EFhd1 were similar in both 3-month-old and 6-month-old AD mice compared with wild-type mice, but the protein levels of EFhd1 increased; the mRNA levels of EFhd2 increased in 3-month-old AD mice, and protein levels remained similar in the brain tissue from AD mice aged 3 months and 6 months. However, EFhd2 increased in microglia from 6-month-old AD mice. **Conclusion** EFhd1 increased in both AD model mice and brain tissue of AD patients, suggesting that EFhd1 might play an important role in the development of AD, while EFhd2 increased in microglia in AD model mice, indicating that EFhd2 might be involved in AD related microglia activation and neuroinflammation.

Key words Alzheimer's disease; EFhd1; EFhd2; microglia; calcium binding proteins