

# CREB 与 miR-132-3p 在铝致大鼠海马 tau 蛋白异常磷酸化过程中的作用

肖雯洁<sup>1</sup>, 徐旭<sup>1</sup>, 雷敏敏<sup>2</sup>, 杨晓娟<sup>1,2</sup>

1. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001

2. 山西医科大学第一医院老年科, 山西 太原 030001



DOI 10.11836/JEOM24114

## 摘要:

**[背景]** 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (CREB) 与 miR-132-3p 已被证实与认知功能障碍有关。课题组前期已证明铝的神经毒性与 tau 蛋白异常磷酸化有关, 但关于铝是否通过 CREB 与 miR-132-3p 影响 tau 蛋白异常磷酸化的研究尚未报道。

**[目的]** 探讨铝致大鼠海马 tau 蛋白异常磷酸化过程中 CREB 与 miR-132-3p 的变化情况。

**[方法]** 随机将 28 只体重相近的 2 月龄 SD 大鼠均匀划分为 4 个组, 包括对照组 (使用生理盐水) 和低、中、高剂量的铝染毒组 [使用 10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  麦芽酚铝  $\text{Al}(\text{mal})_3$ ]。大鼠隔天称重染毒, 染毒周期为 3 个月。染毒后通过水迷宫行为学实验反应大鼠学习记忆能力的变化情况; 运用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 技术来测定 miR-132-3p 基因的表达水平; 使用蛋白免疫印记 (WB) 技术来测定 CREB、磷酸化 CREB (p-CREB) (Ser133)、RAS GTP 酶激活蛋白 1 (RASA1)、tau 和 p-tau (Ser396) 蛋白的表达水平。

**[结果]** Morris 水迷宫行为学实验结果: 在定位航行实验阶段 (第 1 天至第 5 天) 记录实验动物的逃避潜伏期时长, 3 种剂量的铝染毒组大鼠的逃避潜伏期较于对照组大鼠均有延长 ( $P < 0.05$ ); 在第 6 天进行的空间探索实验中, 与对照组和低剂量铝染毒组的大鼠相比, 中、高剂量铝染毒组大鼠在目标象限的停留时间和穿越平台的次数均减少 ( $P < 0.05$ ), 且高剂量铝染毒组的大鼠在目标象限的停留时间比中剂量铝染毒组短 ( $P < 0.05$ )。qRT-PCR 结果: 随着  $\text{Al}(\text{mal})_3$  剂量的升高, 大鼠海马 miR-132-3p 基因表达水平递减 ( $P < 0.05$ )。WB 结果显示, 与对照组及低剂量铝染毒组相比, 中、高剂量铝染毒组大鼠海马的 CREB 和 p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平均降低 ( $P < 0.05$ ), 同时低剂量铝染毒组的 p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平也低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 经方差分析趋势检验和 Pearson 相关分析后发现铝染毒剂量的进一步升高将导致 CREB、p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平的进一步降低 ( $F=36.429, P < 0.001$ ;  $F=78.672, P < 0.001$ ), 铝染毒剂量与两种蛋白的表达水平呈负相关 ( $r=-0.848, P < 0.001$ ;  $r=-0.928, P < 0.001$ ); 各铝染毒组的 RASA1、tau 蛋白表达水平均高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 中剂量铝染毒组大鼠海马 tau 蛋白磷酸化水平高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而高剂量组大鼠海马 tau 蛋白磷酸化水平高于其余各组 ( $P < 0.05$ )。

**[结论]** 铝可能通过影响 CREB 和 miR-132-3p 促进 tau 蛋白异常磷酸化, 最终导致学习和记忆能力受损。

**关键词:** 铝; miR-132-3p; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; tau 蛋白磷酸化; 学习记忆

**Effects of CREB and miR-132-3p on aluminum-induced abnormal phosphorylation of tau protein in rat hippocampus** XIAO Wenjie<sup>1</sup>, XU Xu<sup>1</sup>, LEI Minmin<sup>2</sup>, YANG Xiaojuan<sup>1,2</sup> (1. School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Department of Geriatrics, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

## Abstract:

**[Background]** Cyclic AMP response element binding protein (CREB) and miR-132-3p have been proved to be related to many neurodegenerative diseases. Our research group previously has demonstrated that the neurotoxicity of aluminum is relevant to abnormal phosphorylation of tau protein, but whether aluminum affects the abnormal phosphorylation of tau protein through GREB and miR-132-3p has not been reported yet.

**[Objective]** To investigate the effect of aluminum on CREB and miR-132-3p during abnormal

## 基金项目

山西省留学人员科技活动择优资助项目 (20200008); 山西省基础研究计划项目 (202103021224398); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2023-188)

## 作者简介

肖雯洁 (1997-), 女, 硕士生;  
E-mail: xiaowenjie@sxmu.edu.cn

## 通信作者

杨晓娟, E-mail: yxj2011bs@126.com

## 作者中包含编委会成员 无

伦理审批 已获取  
利益冲突 无申报  
收稿日期 2024-03-22  
录用日期 2024-10-12

文章编号 2095-9982(2024)11-1270-07

中图分类号 R12

文献标志码 A

## 引用

肖雯洁, 徐旭, 雷敏敏, 等. CREB 与 miR-132-3p 在铝致大鼠海马 tau 蛋白异常磷酸化过程中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2024, 41(11): 1270-1276.

## 本文链接

[www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM24114](http://www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM24114)

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

YANG Xiaojuan, E-mail: yxj2011bs@126.com

## Editorial Board Members' authorship No

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2024-03-22

Accepted 2024-10-12

## To cite

XIAO Wenjie, XU Xu, LEI Minmin, et al. Effects of CREB and miR-132-3p on aluminum-induced abnormal phosphorylation of tau protein in rat hippocampus[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(11): 1270-1276.

## Link to this article

[www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM24114](http://www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM24114)

phosphorylation of tau protein in rat hippocampus.

**[Methods]** Twenty-eight two-month-old SD rats with comparable weight, were randomly assigned to four groups: control group (saline) and low, middle, and high dose exposure groups [10, 20, and 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$   $\text{Al}(\text{mal})_3$ ] with each group containing 7 rats, and the exposure period was 3 months by intraperitoneal injection every other day. After rats' exposure to aluminum, Morris water maze was employed to assess their capabilities of learning and memory. The *miR-132-3p* gene expression level was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The levels of CREB, phosphorylated CREB (p-CREB) (Ser133), RAS p21 protein activator 1 (RASA1) tau, and p-tau (Ser396) proteins were determined by Western blot.

**[Results]** The results of Morris water maze showed that in the navigation experiment (from first day to the fifth day), the average escape latency of the rats exposed to three doses of aluminum was longer than that of the control rats ( $P < 0.05$ ). The middle dose group and the high dose group demonstrated shorter duration and lower frequency of platform traversal in the designated quadrant when compared to the control group and the low dose group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the duration in the target quadrant of the rats exposed to high dose aluminum was shorter than that of the rats exposed to medium dose aluminum ( $P < 0.05$ ). The results of Morris water maze suggested that aluminum could damage the learning and memory ability of rats. The qRT-PCR findings indicated a decline in *miR-132-3p* gene expression in rat hippocampus correlating with higher  $\text{Al}(\text{mal})_3$  dose ( $P < 0.05$ ). The Western blot test showed that the protein expressions of CREB and p-CREB (Ser133) were reduced in both the middle dose group and the high dose group ( $P < 0.05$ ) when compared to the control group and the low dose group, and likewise, compared to the control group, the group receiving low dose exhibited lower level of p-CREB (Ser133) protein expression ( $P < 0.05$ ). It was found that the further increase of aluminum exposure dose would lead to the further decrease of CREB and p-CREB (Ser133) protein expression levels ( $F=36.429$ ,  $P < 0.001$ ;  $F=78.672$ ,  $P < 0.001$ ), aluminum exposure dose was negatively correlated with the expression levels of the two proteins ( $r=-0.848$ ,  $P < 0.001$ ;  $r=-0.928$ ,  $P < 0.001$ ). The expression levels of RASA1 protein and tau protein in the aluminum exposure groups surpassed those in the control group ( $P < 0.05$ ). The tau protein phosphorylation level was higher in the middle dose group than in the control group ( $P < 0.05$ ), while the high dose group showed elevated phosphorylation level relative to the control group, the low dose group, and the middle dose group ( $P < 0.05$ ).

**[Conclusion]** Aluminum may promote abnormal phosphorylation of tau protein by affecting CREB and *miR-132-3p*, which eventually leads to the impairment of learning and memory ability.

**Keywords:** aluminum; *miR-132-3p*; cyclic AMP response element binding protein; phosphorylation of tau protein; learning and memory

铝具有诸多良好的性能,广泛应用于生活与工业,然而,已有不少研究证实了铝的神经毒性。一些导致学习记忆能力受损的病理表现与铝有关,其中包括 tau 蛋白异常磷酸化<sup>[1]</sup>。课题组前期研究发现,急性铝暴露后,大鼠海马 RAS 蛋白活性显著降低,并且随着染毒剂量的递增而递减,呈现出一定的剂量依赖性<sup>[2]</sup>。RAS 蛋白是环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cyclic AMP response element binding protein, CREB)的上游,它能够正向调控 CREB,课题组前期研究也证实了铝可以下调 CREB 的表达<sup>[3]</sup>。CREB 是一种重要的转录因子, p-CREB(Ser133)是 CREB 的活化形式,调控多种基因的转录和蛋白的表达,已有研究指出 CREB 的失调与 tau 蛋白异常磷酸化有关<sup>[4]</sup>。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码单链 RNA 分子,它与多种神经退行性疾病有关<sup>[5]</sup>。Wanet 等<sup>[6]</sup>指出, CREB 在多种生物学过程中直接参与 *miR-132-3p* 转录。*miR-132-3p* 是脑中含量最丰富的 miRNA 之一,并且具有强神经保护活性,它可靶向调节多种导致 tau 蛋白异常磷酸化的激酶,如双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶(dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 2, DYRK2)、糖原合成激酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3 $\beta$ )<sup>[7]</sup>。有研究表明, *miR-*

*132-3p* 能够上调 CREB 表达, CREB 与 *miR-132-3p* 之间可形成正反馈环路<sup>[8]</sup>,其中的机制可能是由于 *miR-132-3p* 靶向调节 RAS GTP 酶激活蛋白 1(RAS p21 protein activator 1, RASA1)进而降低 RASA1 对 RAS 活性的抑制作用<sup>[9]</sup>。

本研究假设铝会通过 CREB 与 *miR-132-3p* 影响 tau 蛋白异常磷酸化。本实验拟通过检测不同铝染毒剂量大鼠海马中 CREB 和 *miR-132-3p* 正反馈环路上相关基因、蛋白的表达差异,进一步探究这条环路在铝诱发大鼠海马 tau 蛋白异常磷酸化过程中的作用。

## 1 对象与方法

### 1.1 动物及分组

本次实验选取的 28 只成年(2 月龄)SD 大鼠系山西医科大学动物医学中心提供,动物许可证编号为 [SCXK(晋)2019-0004]。大鼠饲养于劳动卫生学教研室动物房,环境温度在 18~26  $^{\circ}\text{C}$  范围内,湿度控制在 40%~70%之间,昼夜的光照时长都是 12 h。实验期间,大鼠自由饮食饮水。

随机将 28 只体重相近的 2 月龄 SD 大鼠均匀划分为四个组别,分别是对照组(使用生理盐水)和低、中、高剂量的铝染毒组,根据课题组前期研究经验<sup>[10]</sup>

将低、中、高剂量铝染毒组的  $\text{Al}(\text{mal})_3$  浓度定为 10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。大鼠隔天称重染毒，染毒周期为 3 个月。本实验已通过伦理审批，审查批准编号为 DWLL-2004-008。

## 1.2 主要仪器与试剂

TECAN 全波长酶标仪 (INFINITE E PLEX, 瑞士 TECAN), 实时荧光定量 PCR 仪 (Quant Studio™ 3, 美国 Life Technologies), 三氯化铝、氢氧化钠 (中国天津风船化学试剂), 麦芽酚 (美国 Sigma), 二辛宁可酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 (中国北京康为世纪), CREB 抗体 (中国沈阳万类生物), p-CREB (Ser133) 抗体 (中国武汉三鹰), tau、p-tau (Ser396) 抗体 (英国 Abcam)、RASA1 抗体 (美国 Santa Cruz), miR-132-3p、U6 引物 (中国广州复能基因)。

麦芽酚铝  $[\text{Al}(\text{mal})_3]$  染毒溶液的配制: 按宋珊珊等<sup>[11]</sup>的方法配制不同剂量组的  $\text{Al}(\text{mal})_3$  染毒溶液, 后用 10% 的 NaOH 调节 pH 值至 7.4 左右, 现配现用。

## 1.3 Morris 水迷宫行为学实验检测大鼠学习记忆能力

3 个月染毒期结束后进行水迷宫实验。在正式开始水迷宫实验前 1 天, 让大鼠在水池中自由游行 2 min 以适应实验环境。正式实验开始的第 1 天至第 5 天为定位航行实验, 记录每只大鼠的逃避潜伏期; 在第 6 天的空间探索实验中, 记录每只大鼠的平台穿越次数和在目标象限的停留时长。

## 1.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 测定 miR-132-3p 基因表达水平

大鼠处死后, 称取约 30 mg 大鼠海马组织后采用 TRIzol 法来提取 RNA, 随后检测 RNA 的浓度。利用 RNA 浓度计算出各组样本在逆转录体系中的用量, 在一定条件下进行逆转录与基因扩增 (引物序列见表 1)。miR-132-3p 的内参为 U6。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The qRT-PCR primer sequence

基因	上游引物	下游引物
miR-132-3p	5'CATTGTACAGGGCTATGAAA3'	—

## 1.5 蛋白免疫印记 (Western blot, WB) 测定通路蛋白的相对表达水平

称取适量大鼠海马组织, 加入预先配制好的蛋白提取液, 再通过超声技术将组织粉碎, 然后在冰上静置 30 min, 12000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 取上清, 再用 BCA 蛋白定量法来测定蛋白的浓度。依蛋白性质调整分离胶浓度以及电泳、转膜条件, 以 5% 的脱脂奶粉或

5% 的牛血清白蛋白标准品 (bovine serum albumin standard, BSA) 作为封闭液, 后于一定条件下孵育一抗、二抗 [CREB, 1:1000; p-CREB (Ser133), 1:4000; tau, 1:5000; p-tau (Ser396), 1:5000; RASA1, 1:200], 洗膜后显影。

## 1.6 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析, 以均数±标准差的形式描述数据处理结果。数据满足方差齐性条件时, 运用单因素方差分析进行组间比较, 事后比较采用 LSD-t 检验; 数据不满足方差齐性条件时, 运用 Kruskal-Wallis 检验进行组间比较, 事后比较采用 Bonferroni 检验。当  $P < 0.05$  时, 认为差异存在统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 亚慢性铝染毒对大鼠一般生理情况的影响

染毒期间, 对照组、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$   $\text{Al}(\text{mal})_3$  组大鼠毛发色泽及密度良好, 正常饮水、进食, 精神状态、活动度无明显差异; 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$   $\text{Al}(\text{mal})_3$  组大鼠毛发粗糙且略有脱落, 精神状态欠佳, 活动较为迟缓, 其他方面均正常。另外, 各组大鼠的体重均正常增长, 不同组间大鼠的体重在染毒前和染毒后均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。见图 1。

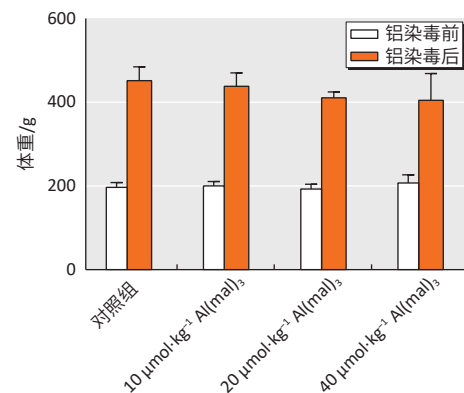


图 1 铝染毒前后各组大鼠体重 ( $n=7$ )

Figure 1 Body weight of rats in each group before and after aluminum exposure ( $n=7$ )

### 2.2 亚慢性铝染毒对大鼠学习记忆能力的影响

水迷宫实验第 1 天至第 5 天进行定位航行实验, 该阶段需要记录实验动物的逃避潜伏期时长。由表 2、图 2A 可见, 第 1、2 天, 大鼠逃避潜伏期长短在四组之间的差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 第 3 天, 与对照组相比, 中、高剂量铝染毒组的逃避潜伏期增加 ( $P < 0.05$ ), 此外, 高剂量铝染毒组逃避潜伏期长于低剂量铝染毒组 ( $P < 0.05$ ); 第 4、5 天, 与对照组相比, 三种剂量的铝染毒组大鼠较于对照组大鼠逃避潜

伏期时长均增加( $P < 0.05$ ), 其中, 中、高剂量铝染毒组的逃避潜伏期长于低剂量铝染毒组( $P < 0.05$ ), 高剂量铝染毒组的逃避潜伏期也长于中剂量铝染毒组( $P < 0.05$ )。在第 6 天进行的空间探索实验中, 与对照

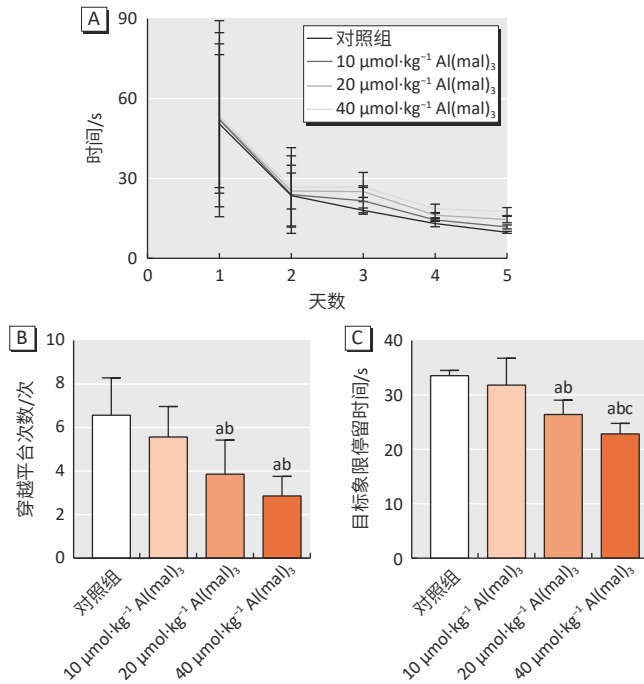
组和低剂量铝染毒组的大鼠相比, 中、高剂量铝染毒组的大鼠在目标象限的停留时间和穿越平台的次数减少( $P < 0.05$ ), 高剂量铝染毒组的大鼠在目标象限的停留时间比中剂量铝染毒组短( $P < 0.05$ ), 见图 2B、2C。

表 2 各组大鼠的逃避潜伏期 ( $n=7$ )  
Table 2 Escape latency of rats in each group ( $n=7$ )

单位: s

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组	50.54±26.04	23.56±11.42	18.01±0.94	13.05±1.26	9.79±0.35
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ Al(mal) <sub>3</sub>	52.08±32.67	23.94±14.54	21.61±5.04	14.40±0.53 <sup>a</sup>	11.78±0.77 <sup>a</sup>
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ Al(mal) <sub>3</sub>	52.44±36.84	25.31±6.77	25.05±2.23 <sup>a</sup>	16.20±1.04 <sup>ab</sup>	14.62±1.23 <sup>ab</sup>
40 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ Al(mal) <sub>3</sub>	53.58±27.00	26.67±14.94	26.81±5.46 <sup>ab</sup>	18.66±1.74 <sup>abc</sup>	17.56±1.54 <sup>abc</sup>
F	0.011	0.092	6.808	24.063	70.223
P	0.998	0.964	0.002	<0.001	<0.001

[注]a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ ; c: 与 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ 。



[注] a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ ; c: 与 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠的逃避潜伏期 (A)、穿越平台次数 (B) 和目标象限停留时间 (C) ( $n=7$ )

Figure 2 Escape latency (A), times of crossing platform (B), and retention time in target quadrant (C) of rats in each group ( $n=7$ )

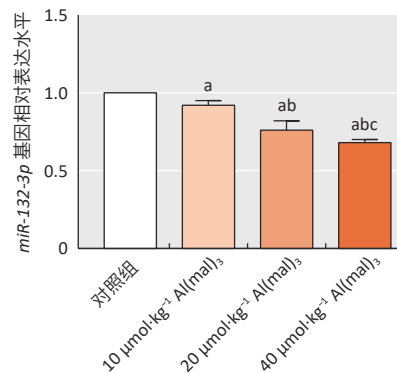
### 2.3 亚慢性铝染毒对大鼠海马 miR-132-3p 基因表达水平的影响

从图 3 可看出, 随着 Al(mal)<sub>3</sub> 剂量的升高, 大鼠海马 miR-132-3p 基因表达水平呈现出递减的趋势( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 所有铝染毒组的 miR-132-3p 基因表达水平都有所下降( $P < 0.05$ ); 中、高剂量铝染毒组的 miR-132-3p 基因表达水平低于低剂量铝染毒组( $P <$

0.05); 同时, 高剂量铝染毒组的 miR-132-3p 基因表达水平低于中剂量铝染毒组( $P < 0.05$ )。

### 2.4 亚慢性铝染毒对大鼠海马 CREB 和 p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平的影响

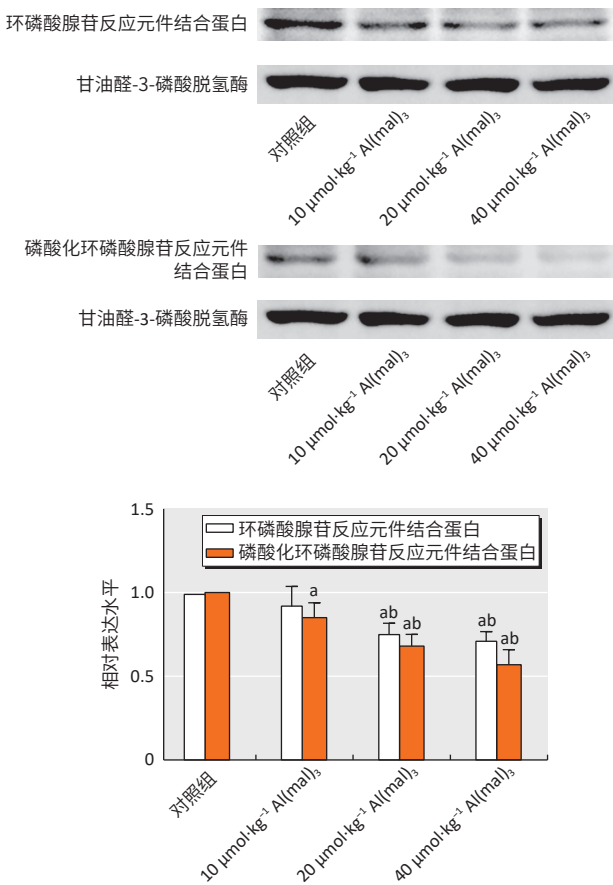
由图 4 可知, 与对照组和低剂量铝染毒组相比, 中、高剂量铝染毒组的 CREB 和 p-CREB (Ser133) 蛋白的表达水平都显著降低( $P < 0.05$ ), 另外, 低剂量铝染毒组的 p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平也低于对照组( $P < 0.05$ )。方差分析趋势检验的结果表明, 大鼠海马 CREB 和 p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平均随着铝染毒剂量的升高而降低( $F=36.429, P < 0.001$ ;  $F=78.672, P < 0.001$ ); Pearson 相关分析的结果也提示了铝染毒剂量与两种蛋白的表达水平呈负相关( $r=-0.848, P < 0.001$ ;  $r=-0.928, P < 0.001$ )。



[注] a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ ; c: 与 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ 。

图 3 亚慢性铝染毒对各组大鼠海马 miR-132-3p 基因表达水平的影响 ( $n=3$ )

Figure 3 The impact of subchronic exposure to aluminum on the miR-132-3p gene expression in the hippocampus of rats of each group ( $n=3$ )



[注] a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ 。

图4 亚慢性铝染毒对大鼠海马 CREB、p-CREB(Ser133) 蛋白表达水平的影响 ( $n=4$ )

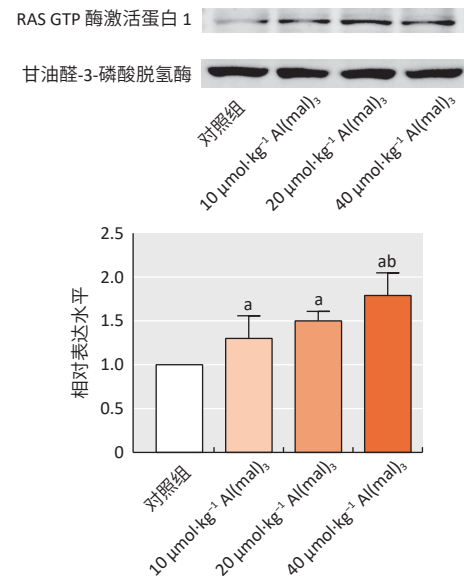
Figure 4 The impact of subchronic exposure to aluminum on the expression levels of CREB and p-CREB (Ser133) proteins in the hippocampus of rats ( $n=4$ )

### 2.5 亚慢性铝染毒对大鼠海马 RASA1 蛋白表达水平的影响

四组的 RASA1 蛋白表达水平见图 5, 可以看出, 与低、中、高剂量铝染毒组相比, 对照组的 RASA1 蛋白表达水平较低 ( $P < 0.05$ ); 此外, 与低剂量铝染毒组相比, 高剂量铝染毒组的 RASA1 蛋白表达也呈现出上升的趋势 ( $P < 0.05$ )。

### 2.6 亚慢性铝染毒对大鼠海马 tau 和 p-tau(Ser396) 蛋白表达水平的影响

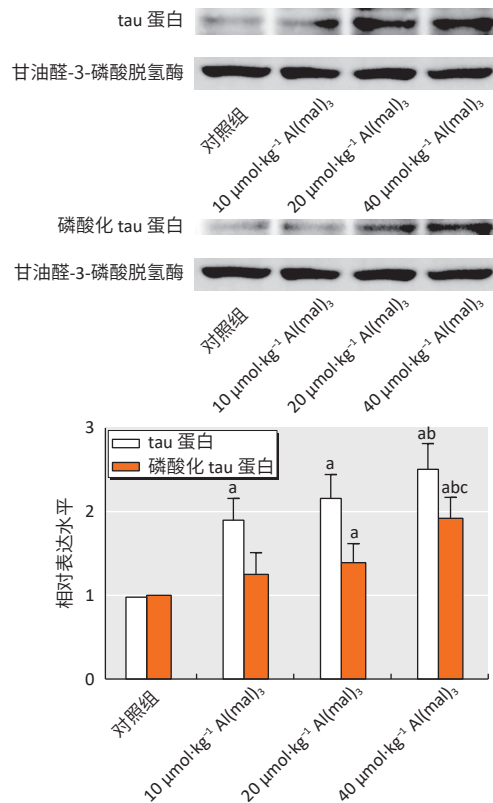
通过图 6 可看出, 随着铝染毒剂量升高, tau 蛋白以及 tau 蛋白的磷酸化水平升高。较之对照组, 各铝染毒组大鼠海马 tau 蛋白表达水平均升高 ( $P < 0.05$ ), 相较于低剂量铝染毒组, 高剂量铝染毒组的 tau 蛋白表达水平更高 ( $P < 0.05$ ); 中剂量铝染毒组大鼠海马的 tau 蛋白磷酸化水平 [p-tau(Ser396)] 高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 高剂量铝染毒组的 tau 蛋白磷酸化水平 [p-tau(Ser396)] 高于对照组及低、中剂量铝染毒组 ( $P < 0.05$ )。



[注] a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ 。

图5 亚慢性铝染毒对各组大鼠海马 RASA1 蛋白表达水平的影响 ( $n=4$ )

Figure 5 The impact of subchronic exposure to aluminum on the expression levels of RASA1 protein in the hippocampus of rats of each group ( $n=4$ )



[注] a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ ; c: 与 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Al(mal)<sub>3</sub> 组相比,  $P < 0.05$ 。

图6 亚慢性铝染毒对各组大鼠海马 tau 和 p-tau(Ser396) 蛋白表达水平的影响 ( $n=4$ )

Figure 6 The impact of subchronic exposure to aluminum on the expression levels of tau and p-tau(Ser396) proteins in the hippocampus of rats ( $n=4$ )

### 3 讨论

铝具有多种良好性能,从工业到生活都涉及铝的应用。然而,已有研究证实铝具有神经毒性和强蓄积性,随着时间的推移,铝能够在中枢神经系统中不断积累<sup>[12]</sup>。铝与多种神经退行性疾病有关<sup>[13]</sup>,在人类相关疾病的病灶上,学者们发现了较高浓度的铝并证明了铝与疾病之间存在联系<sup>[14]</sup>,Liang 等<sup>[15]</sup>的动物实验结果表明麦芽酚铝会损害学习和记忆能力。本次实验的水迷宫结果显示,经过 3 个月的铝染毒处理,大鼠的学习记忆能力受到影响,随着铝染毒剂量的升高,大鼠的学习记忆能力进一步下降,这种影响具有一定剂量依赖性。

CREB 作为一个关键的转录因子,对于神经细胞发生、生长分化的多个环节以及功能方面都有重要影响<sup>[16-17]</sup>。CREB 经激活后转化为磷酸化 CREB (p-CREB),并进一步增强其靶基因转录和蛋白表达<sup>[16-18]</sup>。课题组前期研究已证明一定剂量的麦芽酚铝能够减少 CREB 基因和蛋白的表达,从而导致大鼠的学习和记忆功能受到损害<sup>[3]</sup>。本次研究发现,与对照组相比,大鼠海马 CREB、p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平均降低,并且随着铝染毒剂量的升高,p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平进一步降低,由此判断,铝影响 CREB 蛋白的激活。

miRNA 是在转录后水平上调节基因表达,它被看作是转录网络的主要开关,并在正常神经元活动中发挥重要作用,当 miRNA 受到影响时,会导致多种异常改变<sup>[19]</sup>。miR-132-3p 是脑中含量最丰富的 miRNA 之一,并且具有强神经保护活性<sup>[7]</sup>,Cha 等<sup>[20]</sup>指出下调的 miR-132-3p 与神经退行性疾病病理有关。miR-132-3p 的神经保护作用可体现在它能够靶向调节多种导致 tau 蛋白异常磷酸化的激酶,如 GSK3 $\beta$ 、DYRK2<sup>[7]</sup>,史丽<sup>[21]</sup>通过动物实验和细胞实验验证了过表达 miR-132-3p 可减少 tau 蛋白异常磷酸化。铝暴露可使 GSK3 $\beta$  蛋白表达升高并且加重 tau 蛋白异常磷酸化,本次研究发现,铝暴露导致 miR-132-3p 表达下调,铝染毒浓度越高,下调程度越显著,另外,p-tau (Ser396) 蛋白表达量也逐步上升,这与前期研究结果一致<sup>[22-23]</sup>。有研究发现 CREB 能够通过调节 miR-132-3p 的转录来促进神经突触的生长<sup>[24]</sup>,Wanet 等<sup>[6]</sup>指出 CREB 在多种生物学过程中直接参与 miR-132-3p 转录。另有研究证实 CREB 与 miR-132-3p 之间并非单向调控关系,而是存在着一种正反馈调节关系<sup>[25]</sup>。CREB 的激活可以促进 miR-132-3p 的转录,同时,miR-132-3p 可以提高 CREB 的磷酸化水平从而激活 CREB,其中的具体机制可能与 miR-132-3p

对下游基因的靶向调节作用有关<sup>[8]</sup>。

RASA1 是 miR-132-3p 的靶点之一,miR-132-3p 过表达可下调 RASA1 的表达从而提高 CREB 的磷酸化水平<sup>[18]</sup>。这可能是因为 RASA1 能够使 RAS 失活,抑制 RAS 相关通路,而 CREB 正是 RAS 相关通路的下游。课题组已证明铝致 RAS 活性降低<sup>[2]</sup>,本实验检测了 RASA1 蛋白表达水平,结果发现经麦芽酚铝染毒大鼠的海马 RASA1 蛋白表达水平显著上升,与对照组相比,铝染毒组大鼠海马的 CREB、p-CREB (Ser133) 蛋白表达水平均降低,miR-132-3p 转录水平下降,激酶含量增多,促进 tau 蛋白异常磷酸化;与此同时,miR-132-3p 转录水平的下降还可能导致 RASA1 蛋白表达水平上升,引起 RAS 活性降低并再次减少 CREB 活化,进一步加剧 tau 蛋白异常磷酸化。

本研究结果提示,铝致 tau 蛋白异常磷酸化的机制同时与 CREB 和 miR-132-3p 有关,CREB、miR-132 和 RASA1 之间可能存在正反馈调控关系,铝对 CREB 和 miR-132-3p 的正反馈环路上相关基因、蛋白的影响,可能会进一步加重 tau 蛋白异常磷酸化的情况。本研究后期将补充干预实验,进一步验证 CREB 与 miR-132-3p 之间的正反馈调节关系,以及 miR-132-3p 对 tau 蛋白异常磷酸化的调控作用。

### 参考文献

- [1] HUAT TJ, CAMATS-PERNA J, NEWCOMBE EA, et al. Metal toxicity links to Alzheimer's disease and neuroinflammation[J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(9): 1843-1868.
- [2] 宋静. AMPA受体外化在铝致大鼠海马LTP损害中的作用及其信号转导机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2014.  
SONG J. The role and signal transduction pathway of AMPA receptor trafficking in aluminum-induced impairment of hippocampal LTP in rats[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2014.
- [3] 邢云朋. 麦芽酚铝致大鼠学习记忆损伤的剂量-效应关系及损伤过程中cAMP-CREB-BDNF通路研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2016.  
XING Y P. The study of the dose-effect relationship on memory impairment induced by Al(mal)<sub>3</sub> in rats and the effect of cAMP-CREB-BDNF pathway in the process of impairment[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2016.
- [4] ACQUARONE E, ARGYROUSI EK, VAN DEN BERG M, et al. Synaptic and memory dysfunction induced by tau oligomers is rescued by up-regulation of the nitric oxide cascade[J]. *Mol Neurodegener*, 2019, 14(1): 26.
- [5] JUŹWIK CA, SDRAKE SS, ZHANG Y, et al. microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: a systematic review[J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 182: 101664.
- [6] WANET A, TACHENY A, ARNOULD T, et al. miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(11): 4742-4753.
- [7] EL FATIMY R, LI S, CHEN Z, et al. MicroRNA-132 provides neuroprotection for tauopathies via multiple signaling pathways[J]. *Acta Neuropathol*,

- 2018, 136(4): 537-555.
- [8] HOU B, CUI X, LIU Y, et al. Positive feedback regulation between microRNA-132 and CREB in spinal cord contributes to bone cancer pain in mice[J]. *Eur J Pain*, 2016, 20(8): 1299-1308.
- [9] WESTENSKOW P D, KURIHARA T, AGUILAR E, et al. Ras pathway inhibition prevents neovascularization by repressing endothelial cell sprouting[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(11): 4900-4908.
- [10] 李欢. LNC001209通过CD36调节PI3K/AKT/mTOR信号通路参与铝致认知功能损害的机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2021.
- LI H. LNC001209 regulates PI3K/AKT/mTOR signaling pathway through CD36 and participates in the aluminum-induced cognitive impairment mechanism[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2021.
- [11] 宋珊珊. miR-497-5p调控Wnt3a/ $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$ 信号通路参与铝致学习记忆损害的机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2023.
- SONG S S. MiR-497-5p regulates Wnt3a/ $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$  signaling pathway and participates in learning and memory impairment induced by aluminum[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2023.
- [12] EXLEY C, MOLD M J. Aluminium in human brain tissue: how much is too much?[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2019, 24(8): 1279-1282.
- [13] YAN D, JIN C, CAO Y, et al. Effects of aluminium on long-term memory in rats and on SIRT1 mediating the transcription of CREB-dependent gene in hippocampus[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017, 121(4): 342-352.
- [14] RUSINA R, MATĚJ R, KAŠPAROVÁ L, et al. Higher aluminum concentration in Alzheimer's disease after Box-Cox data transformation[J]. *Neurotox Res*, 2011, 20(4): 329-333.
- [15] LIANG R F, LI W Q, WANG X H, et al. Aluminium-maltolate-induced impairment of learning, memory and hippocampal long-term potentiation in rats[J]. *Ind Health*, 2012, 50(5): 428-436.
- [16] 邱畅. 调节CREB磷酸化水平对APP和 $\gamma$ 分泌酶的影响及其在AD防治中的意义[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2020.
- DI C. Effects of regulating CREB phosphorylation level on APP and  $\gamma$  secretase and its significance in the prevention and treatment of AD[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2020.
- [17] LONZE B E, GINTY D D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system[J]. *Neuron*, 2002, 35(4): 605-623.
- [18] JIN W, REDDY M A, CHEN Z, et al. Small RNA sequencing reveals microRNAs that modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(19): 15672-15683.
- [19] SCHRATT G M, TUEBING F, NIGH E A, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development[J]. *Nature*, 2006, 439(7074): 283-289.
- [20] CHA D J, MENGEL D, MUSTAPIC M, et al. miR-212 and miR-132 Are down-regulated in neurally derived plasma exosomes of Alzheimer's patients[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1208.
- [21] 史丽. miR-132介导GSK-3 $\beta$ /Tau通路参与糖尿病脑病发病的分子机制[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- SHI L. Decreased miR-132 plays a crucial role in diabetic encephalopathy by regulating the GSK-3 $\beta$ /Tau pathway[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2021.
- [22] 宋珊珊, 徐旭, 许杨丹, 等. 铝暴露对大鼠PC12细胞tau蛋白异常磷酸化的影响[J]. *预防医学*, 2023, 35(3): 271-274.
- SONG S S, XU X, XU Y D, et al. Effect of aluminum exposure on abnormal phosphorylation of tau protein in PC12 cells of rats[J]. *Prev Med*, 2023, 35(3): 271-274.
- [23] 徐旭, 宋珊珊, 肖雯洁, 等. miR-103a-3p/RCAN1通路在铝致大鼠学习记忆损害的作用[J]. *现代预防医学*, 2023, 50(21): 3969-3973.
- XU X, SONG S S, XIAO W J, et al. Effect of miR-103a-3p/RCAN1 pathway on learning and memory impairment induced by aluminum in rats[J]. *Mod Prev Med*, 2023, 50(21): 3969-3973.
- [24] MAGILL S T, CAMBRONNE X A, LUIKART B W, et al. microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(47): 20382-20387.
- [25] HOLLANDER J A, IM H I, AMELIO A L, et al. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling[J]. *Nature*, 2010, 466(7303): 197-202.
- (英文编辑: 汪源; 责任编辑: 顾心怡, 汪源)

(上接第 1269 页)

- [32] 于海洋, 李登辉, 郑李超, 等. 双酚A与邻苯二甲酸二乙基己酯联合染毒对大鼠肝脏葡萄糖醛酸转移酶与细胞色素P450家族4A基因及蛋白表达的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2020, 37(3): 195-200.
- YU H Y, LI D H, ZHENG L C, et al. Effects of bisphenol A and di(2-ethylhexyl) phthalate in combination on UDP-glucuronosyl-transferases and cytochrome P450 4A gene and protein expression in liver of rats[J]. *J Environ Health*, 2020, 37(3): 195-200.
- [33] NAKAMURA M, YAMANAKA H, OGURO A, et al. Bisphenol A induces Nrf2-dependent drug-metabolizing enzymes through nitrosylation of Keap1[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2018, 33(4): 194-202.
- (英文编辑: 汪源; 责任编辑: 顾心怡, 汪源)