

微小 RNA-29a/PTEN 通路在铝致神经元网络损伤中的作用及机制

向长鑫, 韩颖超, 李萌, 卢丽媛, 牛侨, 张慧芳

山西医科大学公共卫生学院劳动卫生学教研室, 山西 太原 030001

摘要:

[背景] 铝可致海马突触可塑性损伤, 其机制可能是神经元间信号传递受阻。微小 RNA-29a(miR-29a)能够靶向调控第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(*PTEN*)的表达, 参与神经网络的生成, 并可能参与铝对神经网络电活动的影响。

[目的] 通过体外培养经过麦芽酚铝 $[Al(mal)_3]$ 处理的 ICR 小鼠原代海马神经元, 研究 miR-29a 靶向调控 *PTEN* 在铝对神经网络损伤中的作用及机制。

[方法] 体外培养 24 h 内新生的 ICR 乳鼠原代海马神经元, 在培养第 6 天时使用免疫荧光化学法标记神经元特异性蛋白微管相关蛋白 2(MAP2) 确定神经元的纯度; 使用不同浓度的 $Al(mal)_3$ 处理神经元, 将神经元分为对照组、10、20、40 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组, 采用 CCK-8 法检测神经元细胞活力, 后续实验选择 20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 建立神经网络损伤模型进行干预。采用慢病毒感染的方法转染 miR-29a 进入神经元, 分为 mNG 组、mNG+20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组、miR-29a 组、miR-29a+20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组, 使用微电极阵列(MEA)分析神经元及神经网络的放电情况, 使用实时定量 PCR(RT-PCR)检测各组 miR-29a 和 *PTEN* mRNA 的表达情况, 采用 Western blotting 检测各组神经元 *PTEN* 蛋白的表达情况。

[结果] 小鼠原代海马神经元的纯度大于 90%, 各组原代海马神经元细胞活力均在 80% 以上。在 $Al(mal)_3$ 处理 48 h 时, 接种于 MEA 板上的对照组神经元自发放电频率、簇发放电频率、网络簇发放电频率和同步指数变化幅度分别为 $207.56\% \pm 38.70\%$ 、 $73.19\% \pm 46.43\%$ 、 $75.42\% \pm 33.04\%$ 和 $117.13\% \pm 15.54\%$, $Al(mal)_3$ 处理组神经网络电活动呈现下降的趋势。与对照组相比, 20、40 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组的自发放电频率、簇发放电频率、网络簇发放电频率和同步指数明显下降(变化幅度分别为 $171.70\% \pm 28.08\%$ 、 $49.20\% \pm 23.23\%$ 、 $50.20\% \pm 18.18\%$ 、 $85.45\% \pm 20.30\%$ 和 $150.68\% \pm 26.15\%$ 、 $43.43\% \pm 15.54\%$ 、 $52.05\% \pm 26.31\%$ 、 $26.80\% \pm 8.29\%$, 均 $P < 0.05$)。与对照组(1.00)相比, 20、40 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组 miR-29a 的相对表达水平分别下降为 0.74 ± 0.09 和 0.62 ± 0.12 (均 $P < 0.05$), *PTEN* mRNA 的相对表达水平分别升高为 1.32 ± 0.12 和 1.48 ± 0.11 (均 $P < 0.05$), *PTEN* 蛋白相对表达量分别升高到 1.29 ± 0.12 和 1.82 ± 0.10 (均 $P < 0.05$)。使小鼠原代海马神经元过表达 miR-29a, 与 mNG 组相比, miR-29a 组的自发放电频率、簇发放电频率和网络簇发放电频率明显升高(变化幅度分别为 $252.80\% \pm 62.03\%$ 、 $171.65\% \pm 56.30\%$ 和 $197.75\% \pm 27.12\%$, 均 $P < 0.05$), mNG+20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组的神经网络电活动明显下降(各参数变化幅度分别为 $123.28\% \pm 47.31\%$ 、 $66.62\% \pm 31.53\%$ 、 $70.60\% \pm 12.48\%$ 和 $52.86\% \pm 20.26\%$, 均 $P < 0.05$)。与 mNG+20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组相比, miR-29a+20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组的神经网络电活动明显升高(各参数变化幅度分别为 $161.41\% \pm 42.13\%$ 、 $101.16\% \pm 30.63\%$ 、 $127.02\% \pm 29.58\%$ 和 $109.73\% \pm 15.61\%$, 均 $P < 0.05$)。与 mNG 组(1.00)相比, miR-29a 组神经元 *PTEN* mRNA 相对表达量(0.67 ± 0.11)明显下降($P < 0.05$), *PTEN* 蛋白表达(0.75 ± 0.08)下降($P < 0.05$); mNG+20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组 *PTEN* mRNA 相对表达量(1.32 ± 0.12)明显升高($P < 0.05$), *PTEN* 蛋白相对表达量(1.46 ± 0.15)上升($P < 0.05$)。与 mNG+20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组比较, miR-29a+20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $Al(mal)_3$ 组 *PTEN* mRNA 相对表达量(0.93 ± 0.06)降低($P < 0.05$), *PTEN* 蛋白相对表达量(0.92 ± 0.09)降低($P < 0.05$)。

[结论] 铝显著抑制海马神经网络电活动, miR-29a 通过调控 *PTEN* 的表达可能参与铝致海马神经网络电活动损伤。

关键词: 铝; 微小 RNA-29a; 第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因; 神经网络损伤



DOI 10.11836/JEOM21327

基金项目

国家自然科学基金(81703202)

作者简介

向长鑫(1996—), 男, 硕士生;

E-mail: x15735178532@163.com

通信作者

张慧芳, E-mail: zhf2008y@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-07-25

录用日期 2022-02-17

文章编号 2095-9982(2022)04-0397-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

补充材料

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21327

►引用

向长鑫, 韩颖超, 李萌, 等. 微小 RNA-29a/PTEN 通路在铝致神经网络损伤中的作用及机制[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(4): 397-403.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21327

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Huifang, E-mail: zhf2008y@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-07-25

Accepted 2022-02-17

Supplemental material

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21327

► To cite

XIANG Changxin, HAN Yingchao, LI Meng, et al. Role and mechanism of miRNA-29a/PTEN pathway in neuronal network damage caused by aluminum[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(4): 397-403.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21327

Role and mechanism of miRNA-29a/PTEN pathway in neuronal network damage caused by aluminum XIANG Changxin, HAN Yingchao, LI Meng, LU Liyuan, NIU Qiao, ZHANG Huifang (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Background] Aluminum can cause synaptic plasticity damage in the hippocampus, probably due to blocked interneuronal signal transmission. MicroRNA-29a (miR-29a) can target phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (*PTEN*) expression and participate in the generation of neuronal networks, and may be involved in the effect of aluminum on the electrical activity of neuronal networks.

[Objective] To study the role and mechanism of miR-29a-targeted *PTEN* in aluminum-induced neuronal network injury in primary hippocampal neurons of ICR mice treated with maltol aluminum [$\text{Al}(\text{mal})_3$] *in vitro*.

[Methods] Primary hippocampal neurons of ICR mice born within 24 h were cultured *in vitro*. The purity of neurons was determined by labeling neuron-specific microtubule-associated protein 2 (MAP2) by immunofluorescence staining on day six of the culture; neurons were treated with different concentrations of $\text{Al}(\text{mal})_3$, and divided into a control group, and 10, 20, and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ groups, and neuronal cell viability was detected by CCK-8 method. $\text{Al}(\text{mal})_3$ at 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was selected for subsequent experiments to establish a neuronal network injury model for intervention. The lentivirus infection method was used to transfect miR-29a into neurons, which were divided into mNG, mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$, miR-29a, and miR-29a+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ groups, and micro-electrode array (MEA) was used to analyze the firing of neuronal network. The expressions of miR-29a and *PTEN* mRNA in each group were detected by real-time PCR (RT-PCR), and the expression of PTEN protein in each group was detected by Western blotting.

[Results] The purity of primary mouse hippocampal neurons was greater than 90%, and the viability of the neurons was above 80% in all groups. At 48 h of the designed $\text{Al}(\text{mal})_3$ treatments, the changes in spike frequency, burst frequency, network burst frequency, and synchrony index of neurons cultivated on MEA plates in the control group were $207.56\%\pm 38.70\%$, $73.19\%\pm 46.43\%$, $75.42\%\pm 33.04\%$, and $117.13\%\pm 15.54\%$, respectively; the $\text{Al}(\text{mal})_3$ groups' neuronal network electrical activity showed a decreasing trend. Compared with the control group, the spike frequency, burst frequency, network burst frequency, and synchrony index of the 20 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ groups significantly decreased (The changes were $171.70\%\pm 28.08\%$, $49.20\%\pm 23.23\%$, $50.20\%\pm 18.18\%$, and $85.45\%\pm 20.30\%$; $150.68\%\pm 26.15\%$, $43.43\%\pm 15.54\%$, $52.05\%\pm 26.31\%$, and $26.80\%\pm 8.29\%$, respectively, $P < 0.05$). Compared with the control group (1.00), the miR-29a relative expression levels were significantly decreased in the 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group (0.74 ± 0.09) and the 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group (0.62 ± 0.12) ($P < 0.05$); the relative expression levels of *PTEN* mRNA were significantly increased in the 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group (1.32 ± 0.12) and the 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group (1.48 ± 0.11) ($P < 0.05$); the PTEN protein relative expression levels (1.29 ± 0.12 and 1.82 ± 0.10 , respectively) were also significantly increased ($P < 0.05$). By overexpressing miR-29a in mouse primary hippocampal neurons, the spike frequency, burst frequency, and network burst frequency were significantly higher in the miR-29a group compared with the mNG group (The changes were $252.80\%\pm 62.03\%$, $171.65\%\pm 56.30\%$, and $197.75\%\pm 27.12\%$, respectively, $P < 0.05$). The mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group showed a significant decrease in all indicators of neuronal network electrical activity (The changes were $123.28\%\pm 47.31\%$, $66.62\%\pm 31.53\%$, $70.60\%\pm 12.48\%$, and $52.86\%\pm 20.26\%$, respectively, $P < 0.05$). Compared with the mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group, the electrical activity indicators of neuronal network were significantly higher in the miR-29a+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group (The changes were $161.41\%\pm 42.13\%$, $101.16\%\pm 30.63\%$, $127.02\%\pm 29.58\%$, and $109.73\%\pm 15.61\%$, respectively, $P < 0.05$). Compared with the mNG group (1.00), the neuronal *PTEN* mRNA relative expression (0.67 ± 0.11) and the PTEN protein expression (0.75 ± 0.08) were decreased in the miR-29a group ($P < 0.05$); the *PTEN* mRNA relative expression (1.32 ± 0.12) and the PTEN protein relative expression (1.46 ± 0.15) in the mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group were increased ($P < 0.05$). Compared with the mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group, the *PTEN* mRNA relative expression (0.93 ± 0.06) and the PTEN protein relative expression (0.92 ± 0.09) were decreased in the miR-29a+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group ($P < 0.05$).

[Conclusion] Aluminum significantly inhibits the electrical activity of hippocampal neuronal networks, and miRNA-29a may be involved in the aluminum-induced impairment of hippocampal neuronal network electrical activity by regulating PTEN expression.

Keywords: aluminum; microRNA-29a; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; neuron network damage

铝是一种神经毒性金属元素,因其优良的物理化学特性,已广泛应用于工农业及日常生活中^[1]。铝已被证明对中枢神经系统具有损害作用,也被认为与多种神经退行性疾病相关^[2],其神经毒性症状主要有学习记忆能力的下降和轻度的认知功能障碍^[3]。据报道,铝可以改变血脑屏障的通透性^[4],并易于在海马组织中蓄积^[5],海马是大脑发挥学习和记忆作用的重要区域^[6]。课题组前期研究证实了铝会损害海马长时程增强

(long term potentiation, LTP)^[7]。铝诱导的 LTP 损伤可能是因神经元间信号传递受阻而致的神经元突触功能障碍。神经元之间通过突触连接形成神经网络,研究铝对神经网络电活动的影响有助于阐明铝致神经行为损伤的机制^[8]。

微小 RNA (micro RNA, miRNA, miR) 是一类长度为 20~24 个核苷酸的小分子非编码 RNA^[9],在机体中发挥着重要的作用。miRNA 能够通过与目标信使 RNA

(message RNA, mRNA)的 3' 非编码区(untranslated region, UTR)结合,使得目标 mRNA 降解或者抑制 mRNA 的翻译,从而负向调控靶基因的表达^[10-11]。近年来,有越来越多的研究者探索了 miRNA 在神经退行性疾病中的作用^[9],如 miR-219、miR-26 等参与 Tau 蛋白的磷酸化,参与阿尔兹海默病发展进程^[12-13]。miR-29 是 miRNA 家族中的一员,由 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c 构成^[14],其中 miR-29a 在小鼠大脑神经元中高表达^[15],且在阿尔茨海默病时有明显的降低^[16]。

第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)是一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因^[17],其主要功能是拮抗磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)依赖的蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)^[18-19],在神经元生长和可塑性等多种中枢神经系统功能中起关键作用^[20]。研究证实 miR-29a 与 *PTEN* 的 3' UTR 互补结合,且 miR-29a-3p 可以下调 *PTEN*-3' UTR 的荧光素酶的表达。同时又有研究发现,miR-29a 能够靶向调控 *PTEN* 的表达,从而促进神经突起的生长,促进神经元网络的生成^[21]。本实验拟通过建立体外小鼠原代海马神经元的麦芽酚铝 $[\text{Al}(\text{mal})_3]$ 染毒模型,利用微电极阵列(micro-electrode array, MEA)的方法来研究铝对神经元网络电活动的影响,并阐明 miR-29a/*PTEN* 通路在其中的作用。

1 对象与方法

1.1 动物

SPF 级雄性及雌性 ICR 小鼠购于北京斯贝福生物技术有限公司,小鼠生产许可证号为 SCXK(京)2019-0010,体重 25~30 g,饲养于温度为 22~25 °C、12 h/12 h 昼夜节律的洁净动物房,自由饮食饮水。本研究经山西医科大学实验动物伦理委员会审批(编号:2021-120),实验操作遵循国家有关实验动物管理和使用的规定。

1.2 试剂和仪器

Neurobasal-A 培养液、B-27 添加剂(美国 Gibco),阿糖胞苷、氯化铝、麦芽酚(美国 Sigma-Aldrich),miR-29a、U6 引物(中国广州复能),反转录试剂盒(RR047A)、聚合酶链反应(PCR)试剂盒(RR820A)(日本 Takara),*PTEN* 引物(中国北京奥科鼎盛),慢病毒包被的 miR-29a(中国上海吉凯),小鼠抗微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein2, MAP2)单克隆抗体(中国北京博奥森),二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂

盒(中国北京康为世纪),兔抗 *PTEN* 多克隆抗体(美国 Affinity Biosciences),羊抗兔 IgG 抗体(中国北京康为世纪),二氧化碳培养箱(美国 Thermo),超净工作台(SW-CJ-2F 型,中国苏州安泰),PCR 仪(美国 Applied Biosystems),MEA 分析仪(美国 Axion Biosystems),电泳仪(DYY-7C,中国北京六一),转膜仪(美国 Bio-Rad),高压灭菌锅(中国福建致微)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠原代海马神经元培养及纯度的鉴定 取雌雄小鼠交配自然孕育的新生 24 h 内 ICR 乳鼠,在乙醇消毒后断头处死乳鼠并迅速分离双侧海马,将海马切成 1 mm³ 小块。在杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)溶液中吹打混匀并加入胰酶,在 37 °C 水浴锅内消化 15 min 后加入完全培养基终止消化。用 200 目(孔径 75 μm)细胞网过滤制成单细胞悬液,200×g 离心 5 min,弃上清,加入适量无血清培养基将细胞悬液密度调为 5×10⁵ 个·mL⁻¹,接种于多聚赖氨酸包被的 12 孔板,培养 4 h 后,换液。以后每隔 3 d 半量换液。培养至第 3 天时,更换含阿糖胞苷的无血清培养基。培养至第 6 天时,利用神经元特异性标志物 MAP2 通过免疫荧光化学的方法鉴定神经元的纯度。在荧光显微镜下计数绿色荧光细胞占视野中总细胞数的比例,即为神经元的纯度。

1.3.2 $[\text{Al}(\text{mal})_3]$ 染毒并测定细胞活力 将原代神经元接种于多聚赖氨酸包被的 96 孔板中培养,取生长状态良好的细胞分为对照组,10、20、40 μmol·L⁻¹ $[\text{Al}(\text{mal})_3]$ 进行染毒,每组设置 3 个复孔,实验重复 3 次。48 h 后更换培养液,然后加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,37 °C 孵育 2 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度(*D*)。按照下面的公式计算细胞存活率。细胞存活率= $[(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{空白孔}})/(D_{\text{对照孔}} - D_{\text{空白孔}})] \times 100\%$ 。

1.3.3 慢病毒转染海马原代神经元细胞 用慢病毒载体建立神经元 miR-29a 高表达体系。该载体选择 *Syn* 基因作为特异性启动子以增强神经元特异性表达,并连接绿色荧光蛋白基因 *mNG*,以此作为对照组。选择生长状态良好带有绿色荧光 *mNG* 的细胞进行 $[\text{Al}(\text{mal})_3]$ 染毒,实验分组为: *mNG* 组、*mNG*+20 μmol·L⁻¹ $[\text{Al}(\text{mal})_3]$ 组、miR-29a 组、miR-29a+20 μmol·L⁻¹ $[\text{Al}(\text{mal})_3]$ 组。每孔接种 1 mL 密度为 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 的细胞悬液进行培养。待培养至第 6 天时,选择生长状态良好的细胞进行感染。弃上清液,每孔加入 20 μL 滴度为 1×10⁸ 的慢病毒,20 μL 的 25×感染试剂,加入无血清培养基使每孔的终体积为 500 μL,混匀。12 h 后换液,继续培养,72 h 后显微镜下观察荧光强度。

1.3.4 MEA 检测神经元电生理活动 按照上述方法培养原代神经元,培养至第 10 天时,使用不同浓度的 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理神经元,通过 MEA 分析仪检测^[22]并记录 0 h 和 48 h 的自发放电频率、簇发放电频率、网络簇发放电频率和同步指数等参数;将慢病毒转染的神经元培养至第 10 天时,用 MEA 分析仪检测并记录 0 h 和 48 h 的电生理活动。将 0 h 的神经网络兴奋性相关参数值标化为 100%作为基线值,48 h 时的各组参数值分别与 0 h 的各参数值相比(结果以百分数表示),即得到 48 h 时各组神经网络电活动的变化情况。

1.3.5 实时定量 PCR 测定 miR-29a 和 PTEN mRNA 收集各组细胞置于 1.5 mL 无酶的微量离心管(EP 管)中,按照总 RNA 提取试剂盒的说明书提取总 RNA,使用双蒸水(ddH_2O)作为参比溶液,测定 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的光密度比值,记录测定的总 RNA 浓度。以总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA,配置 20 μL 的 PCR 反应体系,反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,PCR 反应阶段为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,40 次循环;溶解曲线为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 和 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。基因的表达结果用 Ct 值来表示,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 确定基因的相对表达量,每次实验设置 3 个复孔,重复 3 次。各基因及 GAPDH 的引物见补充材料表 S1。

1.3.6 Western blotting 测定蛋白的表达 根据哺乳动物蛋白抽提试剂盒说明书提取样品的总蛋白,采用 BCA 蛋白定量法测定各组蛋白浓度,以 4:1 的比例加入 5 $\times$ 上样缓冲液,混匀,沸水煮 5 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。配置 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶在恒压 60 V 分离蛋白,然后在恒定电流 350 mA 下将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%的脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗(PTEN, 1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗(1:3 000)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,用电化学发光(ECL)超敏发光液显色,Quantity one 4.6.2 软件对灰度值进行分析。

1.4 统计学分析

所有的实验数据使用 SPSS 22.0 进行分析,数据分析前均进行正态性和方差齐性检验。对于比较组间的差异采用完全随机设计的单因素方差分析,两两比较用 LSD-t 分析,数据结果使用表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

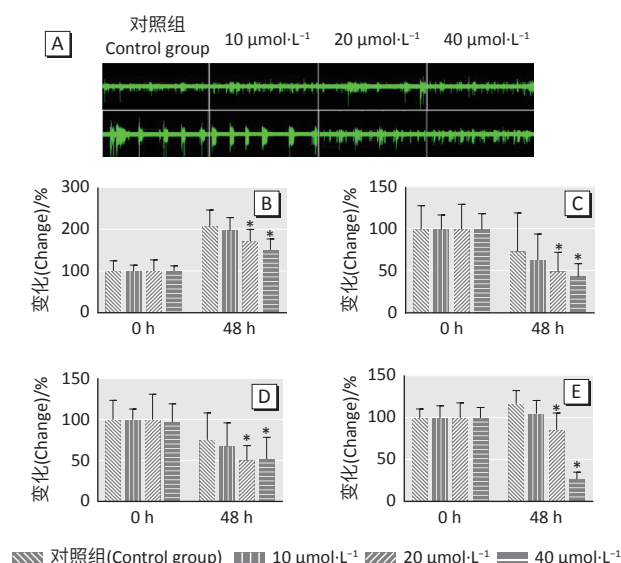
2.1 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 对原代海马神经元活力的影响

小鼠原代海马神经元的纯度大于 90%,结果见补充材料图 S1。不同浓度 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 作用于原代海马神

经元 48 h 后使用 CCK-8 检测神经元的存活率,细胞活力均在 80%以上,结果见补充材料表 S2。

2.2 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理对小鼠原代海马神经元网络兴奋性的影响

接种于 MEA 板上的小鼠海马原代神经元在 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理小鼠原代海马神经元 48 h 时,随着 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 浓度的升高,自发放电频率、簇发放电频率、网络簇发放电频率和同步指数均呈现下降的趋势。对照组神经元自发放电频率、簇发放电频率、网络簇发放电频率和同步指数变化幅度分别为 $207.56\%\pm38.70\%$ 、 $73.19\%\pm46.43\%$ 、 $75.42\%\pm33.04\%$ 和 $117.13\%\pm15.54\%$ 。20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组分别下降到 $171.70\%\pm28.08\%$ 、 $49.20\%\pm23.23\%$ 、 $50.20\%\pm18.18\%$ 、 $85.45\%\pm20.30\%$ 和 $150.68\%\pm26.15\%$ 、 $43.43\%\pm15.54\%$ 、 $52.05\%\pm26.31\%$ 、 $26.80\%\pm8.29\%$,与对照组间的差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。见图 1。



[注] A: 放电波形图; B: 自发放电频率; C: 簇发放电频率; D: 网络簇发放电频率; E: 同步指数。*: 与 48 h 的对照组相比, $P<0.05$ 。

[Note] A: Firing waveforms; B: Spike frequency; C: Burst frequency; D: Network burst frequency; E: Synchrony index. *: Compared with the control group at 48 h, $P<0.05$.

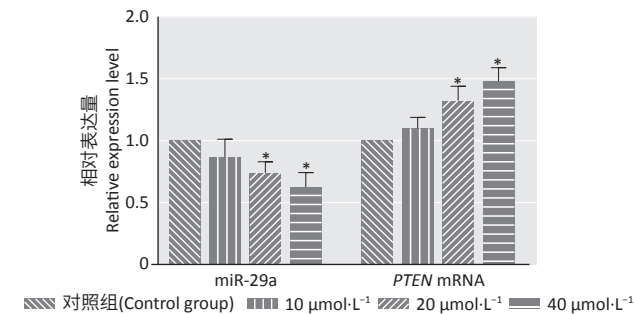
图 1 不同浓度 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理 48 h 后神经元的 MEA 测定结果 ($n=6$)

Figure 1 Results of MEA measurement of neurons after 48 h of designed concentrations of $\text{Al}(\text{mal})_3$ ($n=6$)

2.3 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 对小鼠原代海马神经元 miR-29a 和 PTEN mRNA 的表达的影响

小鼠原代海马神经元经 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理 48 h 后,随着 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 浓度的升高,miR-29a 的表达逐渐降低,PTEN mRNA 的表达水平逐渐升高。与对照组(1.00)相比,20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组 miR-29a 的相对表达水平分别下降为 0.74 ± 0.09 和 0.62 ± 0.12 (均 $P<0.05$),

PTEN mRNA 的相对表达水平分别升高为 1.32 ± 0.12 和 1.48 ± 0.11 (均 $P < 0.05$)。见图 2。



[注]: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

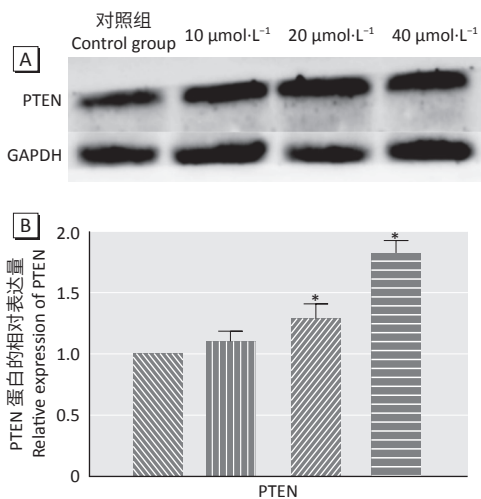
[Note]: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图 2 不同浓度 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理小鼠海马神经元 48 h 后 *miR-29a* 和 *PTEN* mRNA 的表达 ($n=6$)

Figure 2 *MiR-29a* and *PTEN* mRNA expressions in hippocampal neurons of mice after 48 h of designed concentrations of $\text{Al}(\text{mal})_3$ ($n=6$)

2.4 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 对小鼠原代海马神经元 *PTEN* 蛋白表达水平的影响

如图 3 所示, 小鼠原代海马神经元经 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理 48 h 后, 随着 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 浓度的升高, *PTEN* 蛋白的表达量呈升高趋势。与对照组 (1.00) 相比, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组的 *PTEN* 蛋白相对表达量分别升高到 1.29 ± 0.12 和 1.82 ± 0.10 (均 $P < 0.05$)。



[注]: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

[Note]: A: Protein bands; B: Grey analysis results. *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

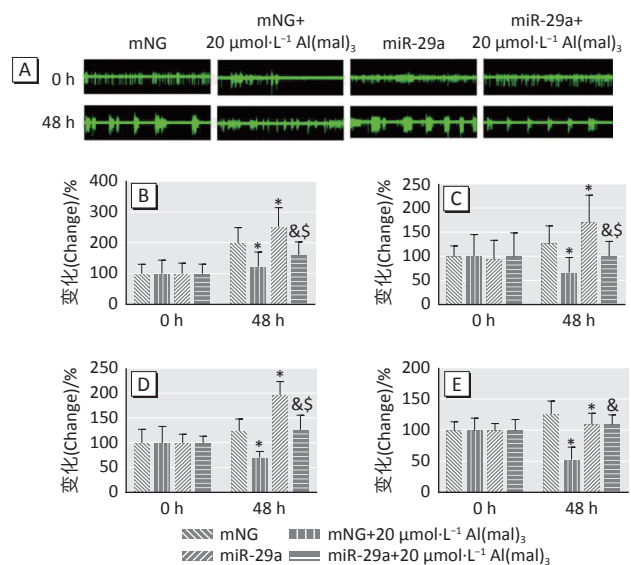
图 3 不同浓度 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理 48 h 后 *PTEN* 蛋白的表达 ($n=6$)

Figure 3 *PTEN* protein expression after 48 h of designed concentrations of $\text{Al}(\text{mal})_3$ ($n=6$)

2.5 *miR-29a* 可逆转 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 对小鼠海马神经元兴奋性的抑制作用

通过转染 *miR-29a* 后, 使小鼠原代海马神经元过表达 *miR-29a*, 并经过 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理 48 h 后, 与 mNG 组

相比, *miR-29a* 组的自发放电频率、簇发放电频率和网络簇发放电频率明显升高 (变化幅度分别为 $252.80\% \pm 62.03\%$ 、 $171.65\% \pm 56.30\%$ 和 $197.75\% \pm 27.12\%$, 均 $P < 0.05$), 而同步指数下降到 $109.88\% \pm 17.93\%$ ($P < 0.05$); mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组的自发放电频率、簇发放电频率、网络簇发放电频率和同步指数分别下降到 $123.28\% \pm 47.31\%$ 、 $66.62\% \pm 31.53\%$ 、 $70.60\% \pm 12.48\%$ 和 $52.86\% \pm 20.26\%$ (均 $P < 0.05$)。与 mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组相比, *miR-29a*+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组的自发放电频率、簇发放电频率、网络簇发放电频率和同步指数变化幅度分别升高至 $161.41\% \pm 42.13\%$ 、 $101.16\% \pm 30.63\%$ 、 $127.02\% \pm 29.58\%$ 和 $109.73\% \pm 15.61\%$ (均 $P < 0.05$)。见图 4。



[注]: A: 放电波形图; B: 自发放电频率; C: 簇发放电频率; D: 网络簇发放电频率; E: 同步指数。*: 与 mNG 组比较, $P < 0.05$; &: 与 mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组比较, $P < 0.05$; \$: 与 *miR-29a* 组比较, $P < 0.05$ 。

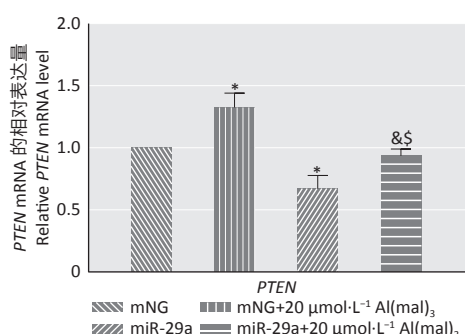
[Note]: A: Firing waveforms; B: Spike frequency; C: Burst frequency; D: Network burst frequency; E: Synchrony index. *: Compared with the mNG group, $P < 0.05$; &: Compared with the mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group, $P < 0.05$; \$: Compared with the *miR-29a* group, $P < 0.05$.

图 4 转染 *miR-29a* 后神经元的 MEA 检测结果 ($n=6$)

Figure 4 MEA results of neurons after transfection with *miR-29a* ($n=6$)

2.6 转染 *miR-29a* 后 *PTEN* mRNA 和 *PTEN* 蛋白表达情况

RT-PCR 结果如图 5 所示, 在小鼠原代海马神经元受到 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理 48 h 后, 与 mNG 组 (1.00) 相比, *miR-29a* 组神经元 *PTEN* mRNA 相对表达量 (0.67 ± 0.11) 明显下降 ($P < 0.05$); mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组表达量 (1.32 ± 0.12) 明显升高 ($P < 0.05$)。与 mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组比较, *miR-29a*+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组 *PTEN* mRNA 相对表达量降低为 0.93 ± 0.06 ($P < 0.05$)。



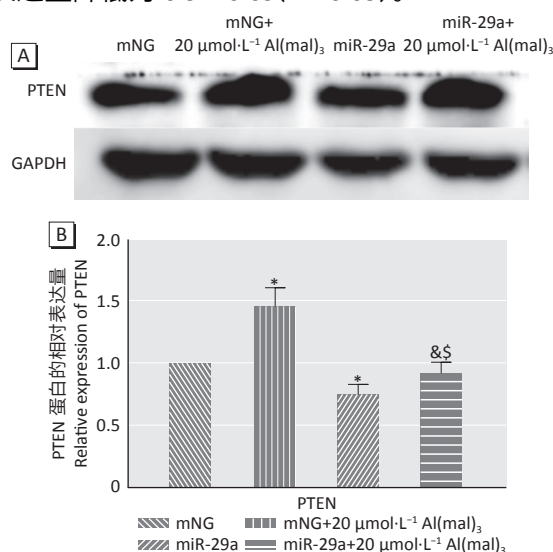
[注] *: 与 mNG 组比较, $P < 0.05$; &: 与 mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al(mal)₃ 组比较, $P < 0.05$; \$: 与 miR-29a 组比较, $P < 0.05$ 。

[Note] *: Compared with the mNG group, $P < 0.05$; &: Compared with the mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al(mal)₃ group, $P < 0.05$; \$: Compared with the miR-29a group, $P < 0.05$.

图5 转染 miR-29a 后 PTEN mRNA 的表达 ($n=6$)

Figure 5 Expression of PTEN mRNA after transfection with miR-29a ($n=6$)

Western blotting 检测结果显示(图6),与 mNG 组(1.00)相比,miR-29a 组 PTEN 蛋白相对表达量(0.75 ± 0.08)下降($P < 0.05$),mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al(mal)₃ 组上升为 1.46 ± 0.15 ($P < 0.05$)。与 mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al(mal)₃ 组比较,miR-29a+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al(mal)₃ 组 PTEN 蛋白相对表达量降低为 0.92 ± 0.09 ($P < 0.05$)。



[注] A: 蛋白条带; B: 条带灰度分析。*: 与 mNG 组比较, $P < 0.05$; &: 与 mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al(mal)₃ 组比较, $P < 0.05$; \$: 与 miR-29a 组比较, $P < 0.05$ 。

[Note] A: Protein bands; B: Grey analysis results. *: Compared with the mNG group, $P < 0.05$; &: Compared with the mNG+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al(mal)₃ group, $P < 0.05$; \$: Compared with the miR-29a group, $P < 0.05$.

图6 转染 miR-29a 后 PTEN 蛋白的表达 ($n=6$)

Figure 6 Expression of PTEN protein after transfection with miR-29a ($n=6$)

3 讨论

脑功能的正常发挥离不开神经元在脑内的信号传递,而脑内神经元信号传递的任一基本环节损伤,

都会引起神经元活动异常,进而导致脑部疾病的发生。研究指出铝可以透过血脑屏障进入脑海马区致神经突触结构及功能损伤,甚至诱导神经元的死亡^[7]。但是关于铝如何影响神经网络损伤的文献报道较少。本研究采用 ICR 小鼠原代海马神经元作为铝染毒细胞模型,以避免体内复杂内环境的干扰^[23-24],并采用 MEA 实时记录神经元电生理的特征。MEA 利用细胞与电极之间形成的互相接触来检测细胞的膜电位,具有空间分布微电极的优势,可以测量由大量神经元组成的神经网络,因而避免未知参数的困境^[22]。当神经元受到刺激后,可产生可扩布的动作电位,而锋电位是动作电位的主要组成成分,多个锋电位一起放电组成簇发放电^[25]。当突触学习率增加,提高神经元的兴奋性时,神经元簇放电活动增强,平均簇放电频率增加^[26]。1968 年, Blaustein 和 Goldman^[27]观察到铝显著降低了龙虾巨大轴突中去极化电流引起的动作电位,这是铝损伤神经传递的早期证据。在本次实验中,当铝作用于神经元后,神经元的自发放电频率、簇发放电频率和网络簇放电频率明显降低,表明铝可能提高了静息电位的阈值。当神经网络中神经元相互耦合,就会出现神经元同步放电的现象,当铝作用神经元后,发现神经元的同步放电指数降低。可见铝可显著抑制小鼠海马神经网络电活动。

miRNA 是一类广泛存在于生物体中的小分子 RNA,能够在转录后水平调控基因的表达^[28]。其主要是通过目标 mRNA 的 3' UTR 结合,抑制 mRNA 的翻译或促进 mRNA 的降解来调控靶基因的表达^[10]。miRNA 在生长发育、神经元突起生长、凋亡等过程中发挥着重要作用^[29]。研究者发现 miR-29a 表达降低与突触结构病理病变相关,miR-29a 上调可通过直接降低双肾上腺皮质激素(doublecortin, DCX)^[15],促进神经元突起分支化进程,促进 PC12 细胞^[30]和 N2a 细胞^[31]的突起生长,可见 miR-29a 参与神经元的生长及神经网络调节。本实验中,观察到 Al(mal)₃ 可使海马神经元 miR-29a 的表达降低,并且随着铝浓度的升高,miR-29a 的表达量逐渐下降,呈现一定的剂量-反应关系,miR-29a 可能是铝诱导的海马神经网络损伤重要靶调控因子。有研究证实 miR-29a 与 PTEN 的 3' UTR 互补结合,且 miR-29a-3p 可以下调 PTEN-3' UTR 荧光素酶的表达^[30]。课题组前期发现随着铝浓度的升高,大鼠海马神经元的 Akt 的表达逐渐下降,使下游的糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)磷酸化水平下降而活性升高,产生抑制大鼠海马 CA1 区

电生理活动的作用^[7]。通过查阅文献发现 Akt的上游分子 PTEN, 而 PTEN 在中枢神经系统高度表达; 同时前期实验研究发现大鼠海马神经元中 miR-29a 的表达水平随着染铝剂量的增加而下降^[32], 因此猜想 miR-29a 与 PTEN 可能存在关系, 并进行了本次实验研究。

综上所述, 本研究证明了铝染毒可引起小鼠原代海马神经网络的损伤, 并进一步以 miR-29a 为靶点证明了铝通过 miR-29a/PTEN 损伤海马神经网络的机制, 但海马神经网络损伤的具体机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] COLOMINA MT, PERIS-SAMPEDRO F. Aluminum and Alzheimer's disease[J]. *Adv Neurobiol*, 2017, 18: 183-197.
- [2] KAWAHARA M, KATO-NEGISHI M. Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses[J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 2011: 276393.
- [3] KLOTZ K, WEISTENHÖFER W, NEFF F, et al. The health effects of aluminum exposure[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2017, 114(39): 653-659.
- [4] BANKS WA, KASTIN AJ. Aluminum-induced neurotoxicity: alterations in membrane function at the blood-brain barrier[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1989, 13(1): 47-53.
- [5] KUMAR V, GILL KD. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: a review[J]. *Neurotoxicology*, 2014, 41: 154-166.
- [6] FATTORETTI P, BERTONI-FREDDARI C, BALIETTI M, et al. Chronic aluminum administration to old rats results in increased levels of brain metal ions and enlarged hippocampal mossy fibers[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1019(1): 44-47.
- [7] ZHANG H, YANG X, QIN X, et al. Caspase-3 is involved in aluminum-induced impairment of long-term potentiation in rats through the Akt/GSK-3 β pathway[J]. *Neurotox Res*, 2016, 29(4): 484-494.
- [8] PAN B, LI Y, ZHANG J, et al. Role of mGluR 1 in synaptic plasticity impairment induced by maltol aluminium in rats[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2020, 78: 103406.
- [9] VISHNOI A, RANI S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509: 1-10.
- [10] BERNARDO BC, OOI JY Y, LIN R C Y, et al. miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart[J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(13): 1771-1792.
- [11] SHEN H, LI L, YANG S, et al. MicroRNA-29a contributes to drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin through PTEN/AKT/GSK3 β signaling pathway[J]. *Gene*, 2016, 593(1): 84-90.
- [12] LI J, CHEN W, YI Y, et al. miR-219-5p inhibits tau phosphorylation by targeting TTBK1 and GSK-3 β in Alzheimer's disease[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9936-9946.
- [13] ABSALON S, KOCHANÉK DM, RAGHAVAN V, et al. MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(37): 14645-14659.
- [14] ZHANG X, GONG X, HAN S, et al. MiR-29b protects dorsal root ganglia neurons from diabetic rat[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2): 1105-1111.
- [15] LI H, MAO S, WANG H, et al. MicroRNA-29a modulates axon branching by targeting doublecortin in primary neurons[J]. *Protein Cell*, 2014, 5(2): 160-169.
- [16] MÜLLER M, JÄKEL L, BRUINSMA IB, et al. MicroRNA-29a is a candidate biomarker for Alzheimer's disease in cell-free cerebrospinal fluid[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 2894-2899.
- [17] CARNERO A, BLANCO-APARICIO C, RENNER O, et al. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(3): 187-198.
- [18] NADERALI E, KHAKEE AA, RAD JS, et al. Regulation and modulation of PTEN activity[J]. *Mol Biol Rep*, 2018, 45(6): 2869-2881.
- [19] HU M, ZHU S, XIONG S, et al. MicroRNAs and the PTEN/PI3K/Akt pathway in gastric cancer (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1439-1454.
- [20] LI L, LIU F, SALMONSEN RA, et al. PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 20(1): 21-29.
- [21] YIN H, SHEN L, XU C, et al. Lentivirus-mediated overexpression of miR-29a promotes axonal regeneration and functional recovery in experimental spinal cord injury via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(11): 2038-2046.
- [22] 张壮壮. 基于MEA的PC12细胞网络和海马脑片在盐酸利多卡因作用下电刺激响应特性研究[D]. 南京: 东南大学, 2016.
- [23] ZHANG Z Z. Response characteristics of PC12 cell cluster and rat hippocampal slice to electro-stimulate under the effect of lidocaine hydrochloride[D]. Nanjing: Southeast University, 2016.
- [24] GRABRUCKER A, VAIDA B, BOCKMANN J, et al. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture[J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 338(3): 333-341.
- [25] MATTEOLI M, VERDERIO C, KRAWZESKI K, et al. Mechanisms of synaptogenesis in hippocampal neurons in primary culture[J]. *J Physiol Paris*, 1995, 89(1): 51-55.
- [26] RINZEL J, LEE YS. Dissection of a model for neuronal parabolic bursting[J]. *J Math Biol*, 1987, 25(6): 653-675.
- [27] 王嘉怡. 具有突触可塑性模块神经网络的簇放电动力学特性[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018.
- [28] WANG J Y. Cluster discharge electrodynamic properties of neuronal networks with synaptic plasticity modules[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2018.
- [29] BLAUSTEIN MP, GOLDMAN DE. The action of certain polyvalent cations on the voltage-clamped lobster axon[J]. *J Gen Physiol*, 1968, 51(3): 279-291.
- [30] FABIAN MR, SONENBERG N, FILIPOWICZ W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs[J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 351-379.
- [31] SALIMINEJAD K, KHORSHID HR K, FARD SS, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [32] ZOU H, DING Y, WANG K, et al. MicroRNA-29a/PTEN pathway modulates neurite outgrowth in PC12 cells[J]. *Neuroscience*, 2015, 291: 289-300.
- [33] TAN C, YU C, SONG Z, et al. Expression of MicroRNA-29a regulated by yes-associated protein modulates the neurite outgrowth in N2a cells[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 5251236.
- [34] 王林平. MiR29在铝致脑内 β 沉积过程中的作用[D]. 太原: 山西医科大学, 2015.
- [35] WANG L P. The mechanism of MiR29 during the deposition of amyloid- β induced by aluminum[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2015.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)