

# 慢性铝暴露致认知障碍血清外泌体miRNAs 差异表达及作用研究

甘珏方<sup>1\*</sup>, 李莎莎<sup>1</sup>, 王琦<sup>2</sup>, 廉春容<sup>1</sup>, 凌雁武<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>右江民族医学院人体解剖学教研室, 广西 百色

<sup>2</sup>右江民族医学院附属医院, 广西 百色

收稿日期: 2022年7月17日; 录用日期: 2022年8月16日; 发布日期: 2022年8月23日

## 摘要

目的: 筛选慢性铝暴露致认知障碍人群, 生信分析其血清外泌体miRNAs的差异表达, 构建铝致认知障碍miRNA-mRNA调控网络图, 预测其靶基因。方法: 筛选广西铝矿区周边某村庄符合慢性铝暴露常驻60岁以上人群, 根据MMSE评分表和血铅水平分为铝致认知障碍组6例和健康对照组6例; 提取并鉴定血清外泌体, 进行第二代高通量测序, 筛选出差异表达的miRNAs; 分别运用TargetScan数据库、miWalk数据库、miRDB数据库预测靶基因并取交集, 运用Cytoscape软件构建miRNAs-mRNA调控网络图; 对同时受到两个以上miRNAs调控的靶基因进行GO和KEGG功能富集分析。结果: 成功提取并鉴定血清外泌体; 完成第二代高通量测序, 按照 $|\log_{2}FC| \geq 1$ , P值 < 0.05的条件, 共筛选出130个差异表达的miRNAs, 其中表达下调118个, 上调12个; 根据文献检索筛选其中的5个miRNAs为目的miRNA, 即: hsa-miR-381-3p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-135b-5p、hsa-miR-708-3p、hsa-miR-1289; 生信分析构建miRNA-mRNA网络调控图中, 共有1170个节点、1232条边, 显示共有65个靶基因同时受到两个以上miRNAs的调控; 对这65个靶基因进行GO和KEGG功能富集后, 显示其主要参与调控的生物过程有3个, 即: 有丝分裂纺锤体形成、蛋白磷酸化及转录负调控、NDA模板形成; 细胞成分包括细胞质、轴突起始段、轴突旁节区、神经元投射等9个方面; 分子功能包括蛋白质结合、DNA结合、微管结合、蛋白激酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等6个方面; KEGG富集到MAPK信号通路。结论: miR-381-3p、miR-370-3p在铝致认知障碍中表达下调, 可能通过调控其靶基因FGF7在铝致认知障碍中发挥重要作用, 为铝致认知障碍的诊断提供候选靶点。

## 关键词

铝暴露, 认知障碍, 血清外泌体, microRNAs, MAPK信号通路

\*第一作者。

#通讯作者。

# Differential Expression and Role of Serum Exosomes miRNAs in Cognitive Impairment Caused by Chronic Aluminum Exposure

Juefang Gan<sup>1\*</sup>, Shasha Li<sup>1</sup>, Qi Wang<sup>2</sup>, Chunrong Lian<sup>1</sup>, Yanwu Ling<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Department of Human Anatomy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise Guangxi

<sup>2</sup>Affiliated Hospital of Youjiang University for Nationalities, Baise Guangxi

Received: Jul. 17<sup>th</sup>, 2022; accepted: Aug. 16<sup>th</sup>, 2022; published: Aug. 23<sup>rd</sup>, 2022

## Abstract

**Objectives:** To screen people with cognitive impairment caused by chronic aluminum exposure, analyze the differential expression of serum exosomes miRNAs, construct the miRNA-mRNA regulatory network diagram of cognitive impairment caused by aluminum, and predict its target genes. **Methods:** People over 60 years old in a village around Guangxi aluminum mining area were selected and divided into 6 aluminum-induced cognitive impairment groups and 6 healthy control groups according to MMSE scale and blood aluminum level. The serum exosomes were extracted and identified, and the second generation high-throughput sequencing was performed to screen out the differentially expressed miRNAs. The target genes were predicted by TargetScan database, miWalk database and miRDB database respectively, and the intersection was obtained. The miRNAs-mRNA regulatory network diagram was constructed by Cytoscape software. GO and KEGG function enrichment analysis of target genes was regulated by more than two miRNAs at the same time. **Results:** Serum exosomes were successfully extracted and identified. The second generation of high-throughput sequencing was completed. According to the condition of  $|\log_{2}FC| \geq 1$ ,  $P$  value  $< 0.05$ , 130 differentially expressed miRNAs were screened out, of which 118 were down-regulated and 12 were up-regulated. According to the literature search, five miRNAs were selected as the target miRNAs, namely: hsa-miR-381-3p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-708-3p, HSA-mir-1289. There are 1170 nodes and 1232 edges in the miRNA-mRNA network regulation map constructed by the bio-analysis, which shows that 65 target genes are regulated by more than two miRNAs at the same time. After the enrichment of GO and KEGG functions of these 65 target genes, it shows that there are three biological processes that are mainly involved in regulation, namely, mitotic spindle formation, negative regulation of protein phosphorylation and transcription, and NDA template formation; Cell components include cytoplasm, axon initiation segment, axon paraganglion region and neuron projection. Molecular functions include protein binding, DNA binding, microtubule binding, protein kinase activity and protein serine/threonine kinase activity. KEGG is enriched to MAPK signal pathway. **Conclusions:** The expression of miR-381-3p and miR-370-3p is down-regulated in aluminum-induced cognitive impairment, which may play an important role in aluminum-induced cognitive impairment by regulating its target gene FGF7, thus providing candidate targets for the diagnosis of aluminum-induced cognitive impairment.

## Keywords

Exposure of Aluminum, Cognitive Impairment, Serum Exosomes, microRNAs, MAPK Signal Pathway

Copyright © 2022 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

铝(Aluminum, AL)是地壳中第三大化学元素,在自然界中大量存在,铝及其化合物在日常生活、生产中应用广泛,可通过饮水、食物、烹饪用具及粉尘等多种途径进入人体。铝是人体非必需元素,进入人体后会在体内不断积累,特别是在脑内蓄积,造成的健康危害也愈来愈多[1]。研究表明铝主要危害神经系统,引起认知功能障碍,尤其是损害学习记忆能力,与阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)等多种神经退行性疾病密切相关[2]。长期铝暴露会导致人群出现神经系统症状,如学习记忆能力减退,轻度认知功能障碍(Mild-Cognitive Impairment, MCI) [3]。

外泌体是一类膜结合囊泡,在生理条件下所有活细胞都能产生,可随着体液广泛分布于全身各处。外泌体能携带蛋白质、脂质和非编码 RNA 等多种生物成分,可介导体内细胞远程通讯,通过转运和传递非编码 RNA 和编码 RNA,继而参与细胞间的信息交流[4]。MicroRNAs (简称 miRNAs)是一类在生命进展中具有保守性和稳定性的内源性非编码 RNA,主要存在于细胞核和细胞质中,参与基因表达调节,参与细胞分化与发育过程。miRNAs 在生物体内普遍存在,而在中枢神经系统中表达丰富,其与神经元的形成、分化以及突触的重塑等密切相关。当神经元发生异常改变后,会伴随具有相应基因调控功能的 miRNAs 表达的改变,也关联神经系统生理功能能否正常发挥。AD 是常见认知障碍性疾病类型之一,与多种因素相关,而铝是诱导类 AD 认知障碍的因素之一。参照临床诊断 AD 的常用诊断标准[5] (“NINCDS-ADRDA”或 2011 版“NIA-AA”提出的诊断标准),严格筛选铝致类 AD 认知障碍人群。而 AD 的诊断依赖于一定的生物标志物,分为诊断标志物和进展标志物两种;其中 AD 诊断标志物主要是脑脊液 A $\beta$  淀粉样蛋白、tau 蛋白测定(表现为前者降低,后者升高),脑部断层显像(PET)显示脑淀粉样蛋白扫描;进展标志物主要是脑结构磁共振成像(MRI)显示颞叶基底部分、内侧或外侧萎缩,顶叶内侧皮质萎缩和 FDG-PET 显示颞顶叶皮质葡萄糖代谢下降[6] [7] [8]。miRNAs 存在各种体液中,从外周血中获得较为简单,其改变状态能在一定程度上反映机体的状态。故与以往常用的脑脊液检查相比较,脑脊液采集有创性大,外周血采样会比较安全方便,可减少病人痛苦。因此,与上述既往的 AD 诊断标志物[8]相比,通过采集外周循环血中 miRNAs 来研究疾病机制有优势。miRNAs 由细胞而生,出现更早,检测的阈值低,具有疾病早期预警、诊断的应用前景和意义[9] [10] [11] [12] [13]。

随着我国西部大开发的进展及广西铝矿的开发建设不断进行,铝矿区环境的巨变,矿区人民高铝暴露的压力增大,研究高铝暴露对当地居民健康的影响显得十分的重要和紧迫。因此,本文就铝致认知障碍者的血清外泌体 miRNAs 表达情况,并对差异表达的 miRNAs 靶基因进行分析,为铝致认知障碍的发病机制、筛选早期诊断标志物提供基础研究依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 研究对象

选取广西某铝矿区周边村庄 60 岁以上的老年人作为研究对象,铝致认知障碍组的纳入标准:① 年龄介于 60 至 90 岁之间;② MMSE 评分评定:采用上海精神卫生中心制定的标准,文盲得分  $\leq 17$  分、小学文化得分  $\leq 20$  分、中学文化得分  $\leq 22$  分、大学文化得分  $\leq 23$  分。③ 血铝水平  $\geq 3357.19 \mu\text{g/L}$ 。

排除标准：① 存在其他类型的痴呆或认知障碍，如帕金森病痴呆；或其他可引起痴呆的中枢神经系统疾病，如脑肿瘤、脑创伤、中枢神经系统炎性疾病；② 存在显著的精神疾病，如精神分裂症或严重的抑郁症等；③ 存在酒精或药物滥用等情况；④ 有严重的视力、听力障碍而不能配合完成 MMSE 检查。健康对照组的纳入标准：① 年龄  $\geq 60$  岁；② 既往体健、无重大疾病史；③ 近 3 个月内未服用过任何药物；④ MMSE 评分正常；⑤ 血铝水平  $< 3357.19 \mu\text{g/L}$ 。

## 2.2. 主要试剂

外泌体提取试剂盒(ribo EXO<sup>TM</sup> Exosome Isolation Reagent for plasma or serum)购自锐博生物科技有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、ECL 超敏化学发光液均购自碧云天生物技术有限公司；兔单克隆抗 CD63 (Anti-CD63 antibody[SY21-02] ET1607-2)、ALIX 抗体(Anti-ALIX antibody[JM85-31 ET1705-74])、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗 IgG (Alpaca anti-rabbit IgG-HRP antibody HA1031)均购自华安生物技术有限公司。

## 2.3. 主要仪器

-80℃超低温冰箱(美菱, 型号: DW-HL340), 4℃冰箱(容声, 型号: BCD-575WYM), 高速冷冻离心机(湘仪, 型号: H2500R), 去离子纯水机(和泰, 型号: Medium-RS30UF), western 电泳仪(天津诺禾致源生物信息科技有限公司, 型号: EA600)。

## 2.4. 主要方法

### 2.4.1. 血清标本的采集

所有受试对象禁食 12 h 后, 于次日上午 8 点空腹状态用采血管采集外周静脉血 5 ml/人, 血液样本室温静置 30 min, 接着放 4℃冰箱保存; 取出置高速冷冻离心机内, 以  $3000\times g$  离心 5 min 后, 取上层淡黄色血清, 在冰上操作分装于 1.5 ml EP 管中, 后置于-80℃冰箱备用。

### 2.4.2. 血铝水平的测定

取出储存在-80℃冰箱的血清样本并置于-20℃、4℃、冰上依次解冻, 取 400  $\mu\text{l}$ , 加 1600  $\mu\text{l}$  去离子水和 20  $\mu\text{l}$  的 1%  $\text{HNO}_3$ ,  $2000\times g$  离心 5 min, 4℃保存一周待测。采用石墨炉原子吸收法测定血清铝含量。

### 2.4.3. 血清外泌体的收集

取出储存在-80℃冰箱的血清置于冰上解冻, 室温下,  $2000\times g$  离心 20 min, 去除残留细胞、碎片, 转移上清至新管。使用血清外泌体提取试剂盒进行血清外泌体的提取, 严格按照试剂盒说明书的操作进行。加入 1/3 体积的外泌体分离试剂, 颠倒混匀或移液器吹打混匀, 直至完全混匀样本(此时溶液呈浑浊), 将样品放入 4℃冰箱, 静置 30 min。接着 4℃,  $15,000\times g$  离心 2 min, 移液器小心地吸去上清, 离心获得外泌体沉淀, 放入-80℃冰箱保存用于后续实验。

### 2.4.4. Western Blot 检测外泌体标记蛋白

将提取的外泌体沉淀经 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转印至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入按 1:800 比例稀释的兔单克隆抗 CD63、ALIX 抗体, 4℃摇床过夜, 漂洗 3 次, 每次 5 min; 二抗室温孵育 2 h 后, 漂洗 3 次, 每次 5 min; 均匀滴上 ECL 超敏化学发光液, 进行曝光拍照。

### 2.4.5. 高通量测序

用 Trizol 从样本中提取 total RNA, 琼脂糖凝胶电泳切胶选择 18~30 nt 的片段。分别连接 3'接头和 5'

接头, 然后对连接了两侧接头的 small RNA 进行反转录和 PCR 扩增。最后琼脂糖凝胶电泳回收并纯化约 140 bp 的条带, 完成文库构建。构建好的文库使用 Agilent 2100 以及 qPCR 进行质控, 并上机测序。测序过程由基迪奥生物有限公司完成。

#### 2.4.6. 筛选差异表达 miRNA

对上述数据运用 R/Bioconductor 统计语言对芯片数据进行处理, 将表达谱中的原始数据读入 R 操作平台, 对数据进行标准化处理, 运用 limma 包分析并筛选差异表达基因, 筛选条件为  $P < 0.05$ ,  $|\log FC| \geq 1$ ; 并绘制火山图。

#### 2.4.7. miRNA-mRNA 调控网络的构建

筛选出差异表达 miRNA 之后, 进行 miRNA 靶基因预测。分别运用 Target Scan 数据库, miRDB 数据库、miWalk 数据库进行靶基因预测, 选取 3 个数据库中均存在的基因作为靶基因。运用 cytoscape3.8.2 软件构建 miRNA-mRNA 调控网络图, 筛选出由 2 个或多个 miRNAs 共同调控的靶基因。

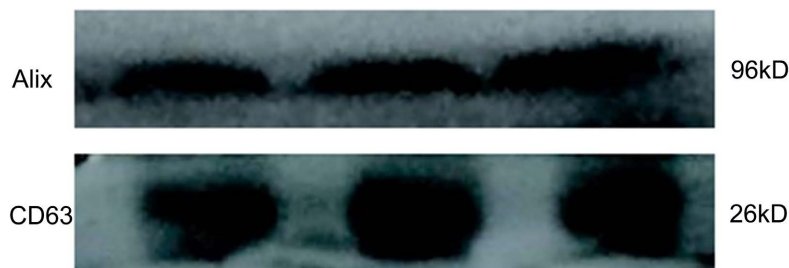
#### 2.4.8. 对靶基因进行 GO 和 KEGG 分析

使用 DAVID6.8 生物信息学资源数据库对靶基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3. 结果

#### 3.1. 血清外泌体的分离鉴定

蛋白免疫印迹(Western Blot, WB)检测外泌体标记蛋白分子, 表明提取的外泌体均表达 CD63, ALIX 标记蛋白分子, 如图 1。纯化的样品中含有外泌体颗粒。



**Figure 1.** WB Identification of the expression of exosome marker protein molecules  
**图 1.** WB 鉴定外泌体标记蛋白分子的表达

#### 3.2. 差异表达 miRNA 的筛选结果

筛选铝致认知障碍组和健康对照组血清外泌体差异表达的 miRNA, 筛选条件为  $|\log FC| \geq 1$ ,  $P < 0.05$ , 共筛选出 130 个差异表达的 miRNAs, 其中 118 个下调表达, 12 个上调表达, 并绘制火山图, 如图 2。经文献检索选择尚未在铝致认知障碍中报道, 且参与 AD 致认知功能障碍的 hsa-miR-381-3p (下调)、hsa-miR-370-3p (下调)、hsa-miR-135b-5p (下调)、hsa-miR-708-3p (下调)、hsa-miR-1289 (上调)作为本研究的候选 miRNA。

#### 3.3. miRNA-mRNA 调控网络分析

对候选 miRNA 进行靶基因预测。选择在 Target Scan 数据库, miRDB 数据库、miWalk 数据库中均预测到的基因作为靶基因, 对 5 个 miRNAs 靶基因作调控网络图, 如图 3。该网络中共有 1170 个节点,

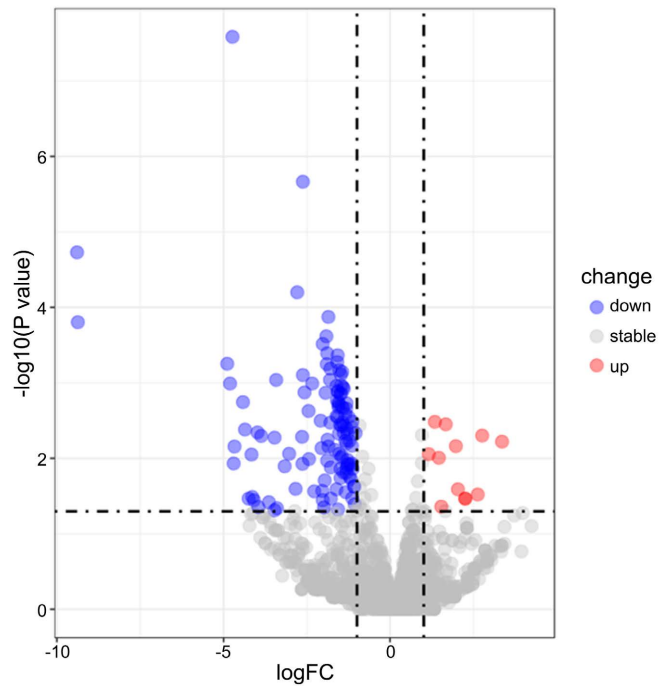


Figure 2. Volcanic map of difference miRNA  
图 2. 差异 miRNA 的火山图

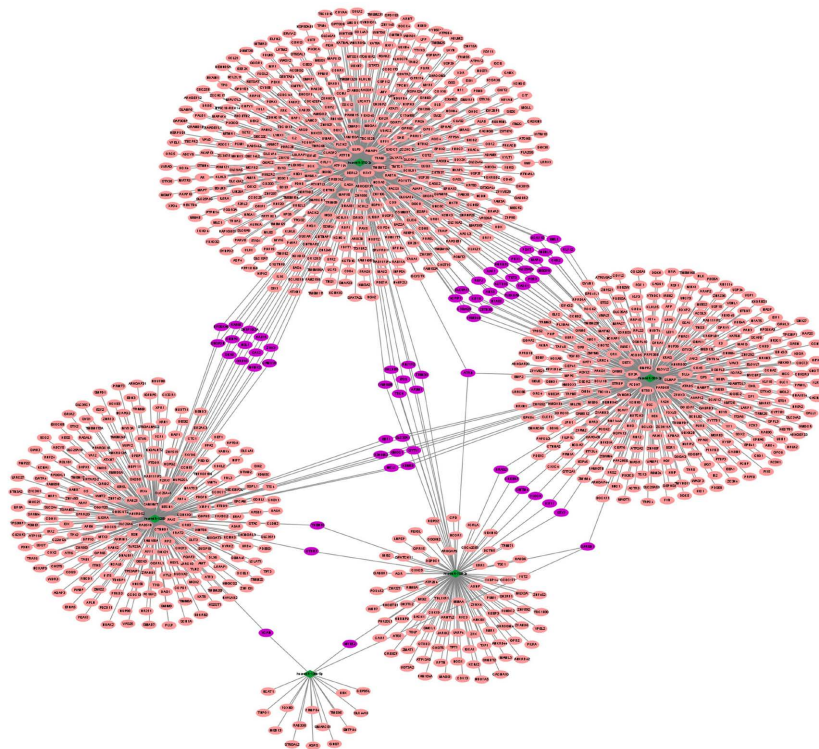


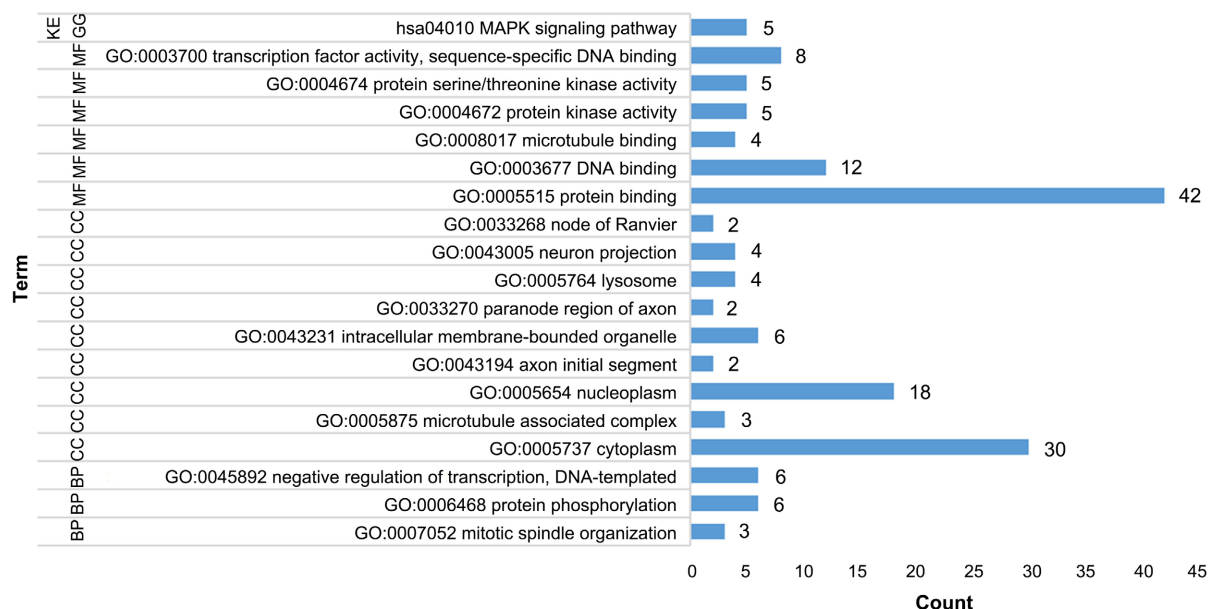
Figure 3. Regulatory network diagram of miRNA target gene. Note: the green diamond is miRNA, and the oval is miRNA target gene predicted in the Target Scan database, miRDB database and miWalk database, among which purple is the target gene regulated by two miRNAs

图 3. miRNA 靶基因调控网络图。注：绿色菱形为 miRNA，椭圆形为 Target Scan 数据库、miRDB 数据库、miWalk 数据库中均预测到的 miRNA 靶基因，其中紫色为受到 2 个 miRNA 调控的靶基因

1232 条边。该网络共含有 1165 个靶基因，其中受到了两个或多个 miRNA 共同调控靶基因有 65 个，分别是：AAK1、ANK3、AP3M1、ATRNL1、BHLHB9、C18orf25、CA12、CAMK1D、CENPO、CHD2、CLOCK、CMTM4、CREBRF、DCAF10、EBF1、EML1、FAM168B、FGF7、FRMD4B、GRB10、HNRNPL、IPO9、KCTD15、KDM5B、KIF11、KIF1B、KLF12、MAP4、MBNL1、MCL1、MEGF9、MKNK2、MYEF2、NFASC、NSL1、PBX1、PLEKHA6、PSD3、R3HDM2、RAB15、RAB6B、RBPJ、RNF170、RPS6KA6、RRAS2、SBSPON、SH3PXD2A、SLC25A24、SLC30A4、SLC6A17、SMOC1、SNX8、SPRED1、STRN3、STX7、SYT11、TAOK1、TBCK、TET3、THEMIS、TRIM33、VCAN、VCIPI1、ZBTB39、ZHX3。

### 3.4. 靶基因的 GO 和 KEGG 分析

将受到两个或多个 miRNAs 共同调控的 65 个靶基因进行 GO 和 KEGG 通路分析得到 19 条功能注释，结果显示，生物过程包括有丝分裂纺锤体组织、蛋白磷酸化及转录负调控，NDA 模板共 3 个方面。细胞成分包括细胞质、轴突起始段、轴突旁节区、溶酶体、神经元投射等 9 个方面，分子功能包括蛋白质结合、DNA 结合、微管结合、蛋白激酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、转录因子活性，序列特异性 DNA 结合共 6 个方面，KEGG 富集到 MAPK 信号通路 1 个信号通路。如图 4。



**Figure 4.** Target genes GO and KEGG, Remarks: BP: biological process; CC: Cell components; MF: Molecular function

**图 4.** 靶基因 GO 和 KEGG，备注：BP：生物过程；CC：细胞成分；MF：分子功能

## 4. 讨论

环境铝暴露可能导致机体铝的蓄积，造成神经细胞形态学的改变，从而影响学习记忆能力，导致认知功能障碍。流行病学研究发现，暴露于高铝饮水环境可使人 AD 发病率明显升高[14]，且减少铝暴露可减少 AD 的发生[15]。动物实验证实摄入过量铝可引起实验动物大脑铝含量增加，学习记忆能力下降，出现与 AD 病理过程相似的形态学改变[16] [17]。广西铝矿区的快速发展给周边村庄带来经济发展的同时也给居民带来了持续增加的铝暴露压力。我们课题组在以往研究中也发现了矿区老年人的认知能力与非矿区老年人的认知能力有显著性差异[18]。

MCI 是介于正常衰老和痴呆之间的一种认知缺损状态[19]，表现为记忆力减退与年龄不相称，但没

有达到 AD 的标准。MCI 常常是 AD 发病的预警状态, 是进行预防性干预的最佳状态[20]。如果能够早期发现和监护 MCI, 并在此阶段进行干预, 延缓 MCI 发展成为 AD 的可能具有重要意义。因此, 研究铝与 MCI 的关联, 对 MCI 的早期生物标记物的检测尤为重要。

miRNA 是一种稳定存在于组织和体液中的小分子非编码 RNA。越来越多的研究表明, 疾病中异常表达的 miRNA 有作为疾病早期诊断生物标记物的价值。本研究中对广西某铝矿区周边的村庄的老年人进行血清样本的收集、提取并鉴定外泌体后进行高通量测序; 筛选出 130 个差异表达的血清外泌体 miRNA。结果显示, 与健康对照组相比, 铝致认知障碍组差异表达 miRNA 中表达下调的 miRNA 居多, 有 118 个 miRNAs 表达下调, 12 个 miRNAs 表达上调。根据文献检索进行筛选, 我们确定研究其中 5 个与认知障碍相关的显著差异表达 miRNAs, 即 4 个下调表达: hsa-miR-381-3p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-135b-5p、hsa-miR-708-3p, 1 个上调表达的 hsa-miR-1289。

miRNA 通过与其靶基因序列互补从而抑制靶基因表达, 在基因转录和转录后水平发挥重要的调控作用。本研究中通过 3 个数据库预测了在铝致认知障碍中存在差异表达的 5 个 miRNA 靶基因, 并绘制了 miRNA-mRNA 调控网络图, 网络图中有 65 个靶基因同时受到多个 miRNA 共同调控。Jain 等[21]的研究表明 STRN3 是参与维持内质网稳态的内在调节途径的一个组成部分。VCAN (versican) 属于硫酸软骨素蛋白聚糖, 能够调节细胞迁移和突触生长, 积极参与神经系统的发展与成熟[22]; 张建鹏等[23]的研究显示糖基化的 VCAN 在帕金森患者脑组织和血浆中表达上调, VCAN 糖基化促使 VCAN 表达量升高, 从而抑制帕金森患者受损的神经再生。因此, 推测调控网络中 miRNA 及受到多个 miRNA 调控的靶基因可能参与了铝致认知障碍的发病与进展。

铝致认知障碍的机制可能是铝诱导多种细胞器(如内质网、线粒体)损伤, 或蛋白质功能障碍, 导致细胞内钙稳态的失调, 激活一系列信号通路。对受到多个 miRNA 调控的靶基因中进行 GO 和 KEGG 分析, 结果富集在 MAPK 信号通路, 参与 MAPK 信号通路的靶基因包括 RPS6KA6, FGF7, TAOK1, MKNK2, RRAS2。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一类丝氨酸/苏氨酸激酶, 由多种同工酶组成, 主要包括细胞外调节蛋白(ERK)、c-Jun N-末端激酶(JNK)和 p38MAPK。MAPK 信号通路与细胞的生长、发育、分化、凋亡等均有密切联系, MAPK 在中枢神经系统广泛表达, 各种细胞外刺激信号, 包括神经递质、神经营养因子、生长因子等均可通过 MAPK 通路影响突触传递、神经元的重塑、形态分化和生存等, 从而参与神经系统多种疾病的病理过程。有研究表明 MAPK 信号通路参与 A $\beta$  的沉积和 tau 蛋白的过度磷酸化过程[24]。

hsa-miR-381-3p 的编码基因位于 14 号染色体的长臂上, 属于 miR-154 基因家族, 多项研究表明, hsa-miR-381-3p 在肺癌、肝癌、结肠癌等恶性肿瘤中异常表达。同时也有研究发现 miR-381-3p 序列在不同物种之间高度保守, 其靶基因富集于 MAPK、Wnt、mTOR 等信号通路[25]。研究表明, 在宫颈癌组织中 miR-381-3p 低表达而 FGF7 高表达, 且明确提示了 miR-381-3p 和 FGF7 之间存在直接的靶向作用关系, 且呈负相关, miR-381-3p 下调 FGF7 的表达, 从而抑制了宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭, 阻滞了细胞周期以及促进细胞凋亡[26]。成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGFs)是由多种组织释放的具有广泛生理和生物学特性的信号分子家族。FGF7 属于该家族, 且 FGFR2b 是其高亲和力受体[27]。FGF7 结合促进 FGFR2b 二聚化, 然后快速诱导一些信号通路, 如 RAS-MAPK 和 PI3K/Akt, 他们在肿瘤发展中起着重要作用[28]。Chen W 等[29]在 AD 患者和 A $\beta$  诱导的 SH-SY5Y 细胞中 miR-107 的表达水平显著降低, 证实 miR-107 可降低 FGF7 的表达水平, 随后使 FGFR2/PI3K/Akt 通路失活。我们的研究中 miR-381-3p 也是低表达, 在预测靶基因时 hsa-miR-381-3p、hsa-miR-370-3p 都预测到了 FGF7, 且 FGF7 也参与了 MAPK 信号通路, 因此, 我们推测在铝致认知障碍中 hsa-miR-381-3p、hsa-miR-370-3p 与 FGF7 存在靶向关系, 且在 MAPK 信号通路中发挥着作用。



综上所述, 环境铝暴露可能导致机体铝蓄积, 损害人体学习记忆能力导致 MCI, 筛选出铝致认知障碍差异表达的血清外泌体 miRNA 及其预测的靶基因, hsa-miR-381-3p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-135b-5p、hsa-miR-708-3p、hsa-miR-1289 有望成为铝致认知障碍早期诊断的靶点。

## 5. 研究的局限性与展望

本研究有实际的参考价值, 但也存在一定的局限性。前期, 本课题组主要通过横断面调查广西某铝矿区周边村庄 60 岁以上老年人群的认知能力, 缺少纵向调研资料, 也就缺少长期铝暴露致认知障碍的横向、纵向对比; 本研究采用的认知力量表作为评定认知功能水平的一种辅助工具, 研究对象是否为确诊的铝致类 AD 认知障碍人群, 尚需要结合严谨、充足的临床检查指标, 如脑部影像学变化、脑部电生理学变化等检查; 本研究开展期间受到疫情管控限制, 采集血样本数量有限, 可选取并用于基因测序的样本不足; 测序结果尚需要更多体内外实验进行相关基因表达调控的验证等。鉴于此, 本课题组接下来的工作将围绕上述不足展开。我们会针对铝矿区常驻老年人群进行纵向随访调研, 以更好地了解其认知能力变化与铝暴露周期的相关性情况; 并通过增加多元化认知能力评估量表来评价老年人群的认知水平, 增加临床诊断所需相关临床检查指标; 通过 qPCR 检测法对动物铝暴露实验、细胞铝暴露实验验证测序结果, 目标验证候选 miRNAs 与其靶基因的靶向关系; 此外, 还可通过与乡镇卫生院联结共建, 加强入村入户调研, 进一步收集并增加样本量以继续进一步的研究。从而为减轻铝矿区工作者及周边高铝暴露认知障碍居民的家庭负担, 为区域性健康稳步发展做出积极探索和贡献。

## 基金项目

国家自然科学基金地区基金项目(编号: 31560294); 广西少数民族人类学研究重点实验室。

## 参考文献

- [1] He, S., Niu, Q., Niu, P., *et al.* (2008) Protective Effects of *Gastrodia elata* on Aluminium Chloride-Induced Learning Impairments and Alterations of Amino acid Neurotransmitter Release in Adult Rats. *Restorative Neurology and Neuroscience*, **26**, 467-473.
- [2] 夏佳蕊, 刘佳琪, 李宗高, 等. 铝过量接触与蓄积对脑功能及阿尔茨海默病发生影响的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2018, 34(4): 535-539.
- [3] Lu, X., Liang, R., Jia, Z., *et al.* (2014) Cognitive Disorders and Tau-Protein Expression among Retired Aluminum Smelting Workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, **56**, 155-160. <https://doi.org/10.1097/JOM.000000000000100>
- [4] Mathieu, M., Martin, J.L., Lavieu, G., *et al.* (2019) Specificities of Secretion and Uptake of Exosomes and Other Extracellular Vesicles for Cell-to-Cell Communication. *Nature Cell Biology*, **21**, 9-17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- [5] Porsteinsson, A.P., Isaacson, R.S., Knox, S., *et al.* (2021) Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, **8**, 371-386. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.23>
- [6] Ausó, E., Gómez-Vicente, V. and Esquivá, G. (2020) Biomarkers for Alzheimer's Disease Early Diagnosis. *Journal of Personalized Medicine*, **10**, Article No. 114. <https://doi.org/10.3390/jpm10030114>
- [7] Taragano, F.E., Castro, D.M., Serrano, C.M., *et al.* (2015) A Survey on Biomarkers and Early Diagnosis in Alzheimer's Disease. *Medicina Buenos Aires*, **75**, 282-288.
- [8] 孙雪莲, 邓一平, 董碧蓉. 痴呆及阿尔茨海默病进展要点简析[J]. 现代临床医学, 2022, 48(4): 310-313.
- [9] Ho, P.T.B., Clark, I.M. and Le, L.T.T. (2022) MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article No. 7167. <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>
- [10] Cogoni, C., Ruberti, F. and Barbato, C. (2015) MicroRNA Landscape in Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, **14**, 168-175. <https://doi.org/10.2174/1871527314666150116123305>
- [11] Cui, G.H., Zhu, J., Wang, Y.C., *et al.* (2021) Effects of Exosomal miRNAs in the Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, **200**, Article ID: 111593.

- <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111593>
- [12] Wu, Y., Li, Q., Zhang, R., *et al.* (2021) Circulating MicroRNAs: Biomarkers of Disease. *Clinica Chimica Acta*, **516**, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.008>
- [13] Zhang, W.T., Zhang, G.X. and Gao, S.S. (2021) The Potential Diagnostic Accuracy of Circulating MicroRNAs for Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Neurología* (In Press). <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2021.06.001>
- [14] Bharathi, Shamasundar, N.M., Sathyanarayana, R.T.S., *et al.* (2006) A New Insight on AI-Maltolate. Treated Aged Rabbit as Alzheimer7S Animal Model. *Brain Research Reviews*, **52**, 275-292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.04.003>
- [15] Sethi, P., Jyoti, A., Singh, R., *et al.* (2008) Aluminium-Induced Electrophysiological, Biochemical and Cognitive Modifications in the Hippocampus of Aging Rats. *Neurotoxicology*, **29**, 1069-1079. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.08.005>
- [16] Johnson, V.J., Kim, S.H. and Sharma, R.P. (2005) Aluminum-Maltolate Induces Apoptosis and Necrosis in Neuro-2A Cells: Potential Role for p53 signaling. *Toxicological Sciences*, **83**, 329-339. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi028>
- [17] Baydar, T., Papp, A., Aydin, A., *et al.* (2003) Accumulation of Aluminum in Rat Brain: Does It Lead to Behavioral and Electrophysiological Changes? *Biological Trace Element Research*, **92**, 231-244. <https://doi.org/10.1385/BTER:92:3:231>
- [18] 凌雁武, 张秀华, 韦学玉, 等. 广西铝矿区老年人群认知能力与头发及饮水中铝含量关系研究[J]. 神经解剖学杂志, 2008, 24(5): 508-513.
- [19] Fjell, A.M., Walhovd, K.B., Fennema-Notestine, C., *et al.* (2010) CSF Biomarkers in Prediction of Cerebral and Clinical Change in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, **30**, 2088-2101. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3785-09.2010>
- [20] Hughes, T.F., Snitz, B.E. and Ganguli, M. (2011) Should Mild Cognitive Impairment Be Subtyped? *Current Opinion in Psychiatry*, **24**, 237-242. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e328344696b>
- [21] Jain, B.P., Pandey, S., Saleem, N., Tanti, G.K., Mishra, S. and Goswami, S.K. (2017) SG2NA Is a Regulator of Endoplasmic Reticulum (ER) Homeostasis as Its Depletion Leads to ER Stress. *Cell Stress and Chaperones*, **22**, 853-866. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0816-7>
- [22] Popp, S., Andersen, J.S., Maurel, P. and Margolis, R.U. (2003) Localization of Aggrecan and Versican in the Developing Rat Central Nervous System. *Developmental Dynamics*, **227**, 143-149. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10282>
- [23] 张建鹏. 帕金森病及其发展过程中候选糖蛋白标志物的筛选与鉴定[D]: [博士学位论文]. 重庆: 第二军医大学, 2009.
- [24] Sundaramjan, S., Gambea, J.L., Victor, N.A., *et al.* (2005) Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma Ligands Reduce Inflammation and Infarction Size in Transient Focal Isehemia. *Neuroscience*, **130**, 685-696. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.021>
- [25] 唐乖, 龙鼎新. hsa-miR-381-3p 靶基因预测及其相关信号通路的生物信息学分析[J]. 生命科学研究, 2018, 22(3): 222-228.
- [26] 卞千霞. MiR-381-3P 通过靶向 FGF7 抑制宫颈癌细胞的增殖与转移[D]: [硕士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [27] Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H. and Chan, A. and Aaronson, S.A. (1992) Determination of Ligand-Binding Specificity by Alternative Splicing: Two Distinct Growth Factor Receptors Encoded by a Single Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 246-250. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.246>
- [28] Grose, R. and Dickson, C. (2005) Fibroblast Growth Factor Signaling in Tumorigenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **16**, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.003>
- [29] Chen, W., Wu, L., Hu, Y., Jiang, L., Liang, N., Chen, J., Qin, H. and Tang, N. (2020) MicroRNA-107 Ameliorates Damage in a Cell Model of Alzheimer's Disease by Mediating the FGF7/FGFR2/PI3K/Akt Pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*, **70**, 1589-1597. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01600-0>