**分类号: R13 学校代码： 10114**

**密** 级**:**   **学** **号：BS2010036**

**MiR29 在铝致脑内 Aβ 沉积过程中的作用**

**The Mechenism of MiR29 Involved in the Deposition of Amyloid-β Induced by Aluminum**

**研 究 生：王林平**

**指导教师：牛** 侨 **教授**

**专业名称：劳动卫生与环境卫生学研究方向：化学物的神经毒性**

**学位类型：学术学位**

**所在学院：公共卫生学院**

**中国 ft西**

**二〇一五年三月十八日**

**目** 录

**中文摘要** I

**英文摘要**VII

[**常用缩写词中英文对照表** XIII](#_TOC_250013)

[**前 言** 1](#_TOC_250012)

[**第一部分 铝对大鼠脑内 miR29、BACE 和 Aβ 的影响** 6](#_TOC_250011)

[1 **材料与方法** 6](#_TOC_250010)

[1.1 实验材料 6](#_TOC_250009)

[1.2 实验方法 8](#_TOC_250008)

[1.3 统计分析方法 17](#_TOC_250007)

[**2结 *果*** 17](#_TOC_250006)

2.1 实验动物基本情况 17

2.2 染铝大鼠血铝、脑皮质和海马铝水平 19

2.3 染铝大鼠脑皮质和海马内 Aβ 的水平 21

2.4 染铝大鼠脑皮质和海马内 BACEmRNA 和 BACE 蛋白表达的变化 24

2.5 染铝大鼠脑皮质和海马内 miRNA29 的表达 26

[**3讨 *论*** 30](#_TOC_250005)

**4结 *论*** 34

**第二部分 MiR29a, b1 调控 BACE 在铝致 Aβ 沉积过程中的机制** 35

[1 **材料与方法**35](#_TOC_250004)

[1.1 实验材料 35](#_TOC_250003)

[1.2 实验方法 37](#_TOC_250002)

[1.3 统计分析方法 41](#_TOC_250001)

[**2结 *果*** 41](#_TOC_250000)

2.1 转染后不同时点 miR29a, miR29b1 的表达情况 41

2.2 各组细胞的形态学变化 43

2.3 各组细胞活力的变化 45

2.4 各组细胞染毒后 BACEmRNA 和 BACE 水平的变化 46

2.5 各组细胞染毒后 Aβ 的含量的变化 50

**3** **讨** 论 56

**4** **结** 论 58

**第三部分NF-κB在miR29a, b1调节铝致脑内Aβ沉积过程的作用** 59

1 **材料与方法** 60

1.1 实验材料 60

1.2 实验方法 61

1.3 统计分析方法 63

**2** **结** 果 63

2.1 大鼠脑皮质和海马中 NF-κB/p65 表达的变化 63

2.2 各组细胞形态学变化情况 64

2.3 各组细胞活力的变化 65

2.4 各组细胞 miR29a, miR29b1 的变化 66

2.5 各组细胞 BACEmRNA 和 BACE 水平的变化 67

2.6 各组细胞 Aβ 的含量的变化 68

**3** **讨** 论 70

**4** **结** 论 73

**参考文献** 75

**综** 述 82

**在学期间承担/参与的科研课题与研究成果** 99

**致** 谢 97

**个人简历** 100

**MiR29在铝引起脑内Aβ沉积过程中的作用机制研究摘 要**

**目的：**

1、通过动物体内实验，研究铝对大鼠脑内miR29各亚型，BACE基因、蛋白及Aβ1-40和Aβ1-42的影响情况，筛选和分辨可能参与铝致脑内Aβ沉积过程的miR29类型；

2、通过细胞培养，确定miR29通过影响BACE水平在铝引起脑内Aβ沉积过程中的作用机制；

3、通过动物体内实验和细胞培养干预实验，探索miR29调节铝致脑内Aβ沉积

过程的上游机制。

**方法：**

1、取40只健康的，雄性的SD大鼠，按体重随机分为4组，生理盐水组（对照组），15μmol/kgBW组（低剂量组），30μmol/kgBW组（中剂量组）和45μmol/kgBW组（高剂量组），每组10只。采用腹腔注射的方式进行染毒两个月。染毒期结束后，采用石墨炉原子吸收法检测大鼠血铝、脑皮质和海马内铝含量；采用ELISA检测大鼠皮质和海马Aβ1-40，Aβ1-42的量；采用RT-PCR检测大鼠脑皮质和海马*BACEmRNA*，miR29a，miR29a\*，miR29b1，miR29b2, miR29c1, miR29c2的表达水平；Western-blot检测大鼠脑皮质和海马中BACE蛋白，NF-κB的表达激活情况。并分析各型miR29与BACE的关系，从中筛选出可能参与调节铝致脑内Aβ沉积作用的miR29的类型。

2、选择肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系（PC12）细胞进行体外培养，根据动物实验结果，采用脂质体转染技术将miR29a mimics或者miR29b1 mimics转染入细胞内，实验组分别分为空白对照组，未转染染毒组（包括100μmol/l麦芽酚铝组，200μmol/l麦芽酚铝组，400μmol/l麦芽酚铝组），转染阴性对照组和目的基因转染组，目的基因转染组再分为四组：对照组（给予磷酸盐缓冲液（PBS）），100μmol/l 麦芽酚铝

组，200μmol/l麦芽酚铝组，400μmol/l麦芽酚铝组。转染基因24小时后进行染毒，染毒后24小时收集细胞及细胞上液进行各项指标检测。采用CCK-8法测定细胞活力；RT-PCR检测*BACEmRNA*水平；ELISA检测BACE蛋白，Aβ1-40，Aβ1-42水平。

3、依据动物体内实验结果，选择PC12细胞进行体外培养干预实验，将实验组分为对照组（给予PBS），PDTC100μmol/L组，200μmol/l麦芽酚铝组，200μmol/l麦芽酚铝+PDTC100μmol/l组。染毒和干预后24小时收集细胞及细胞培养液测定各项指标。采用CCK-8法测定细胞活力；RT-PCR检测miR29a，miR29b1, *BACEmRNA*水平；ELISA检测BACE蛋白水平，Aβ1-40，Aβ1-42水平。

**结果：**

1、动物整体实验结果：

##### （1）随着染毒剂量的不断增加，染毒剂量组大鼠血铝明显升高。低、中、高剂量组的血铝水平分别为（92.05±5.63）μg/l，（111.74±5.88）μg/l，（165.50±9.79）μg/l，较对照组（47.76±6.58）μg/l相比明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；脑皮质中铝含量在低、中、高剂量组（31.40±5.74）ng/g，（72.36±4.79）ng/g，（93.37±3.04）

ng/g，较对照组（12.11±1.42）ng/g明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；大鼠脑海马中铝含量在低中高剂量组分别为（51.72±6.04）ng/g，(86.92±5.38) ng/g，

（106.24±6.18）ng/g，较对照组（11.67±1.04）ng/g明显升高，差异均具有统计学意义（*P*<0.05）。

（2）随染毒剂量的增高，皮质和海马内Aβ总量（Aβ1-40和Aβ1-42总和）增高，与对照组相比，皮质内高剂量组Aβ总量增高有统计学意义（*P*<0.05），在海马内中、高剂量组Aβ总量增高有统计学意义（*P*<0.05）；其中Aβ1-40变化不明显，在皮质和海马内各染毒组与对照组相比没有统计学意义（*P*>0.05）；而Aβ1-42有显著增高，与对照组相比，皮质内高剂量组增高有统计学意义（*P*<0.05），海马内低、中、高剂量组Aβ1-42增高均有统计学意义（*P*<0.05）。

（3）随着染毒剂量的增高，皮质和海马内*BACEmRNA,* BACE蛋白成升高趋势。与对照组相比，在大鼠脑皮质内，低剂量组*BACEmRNA,* BACE蛋白增高没有统计学意义，中、高剂量组*BACEmRNA和*BACE蛋白增高均有统计学意义（*P*<0.05）；在大鼠脑海马内，*BACEmRNA和*BACE蛋白增高在各染毒剂量组均有统计学意义

（*P*<0.05）。且BACE蛋白与Aβ总量相关，（皮质中R=0.618，P<0.01，海马中R=0.796,

P<0.01）；BACE蛋白与Aβ1-42相关（皮质中R=0.608, P<0.01海马中R=0.804, P<0.01）。

（4）miR29a，miR29a\*，miR29b1, miRb2, miRc1, miRc2均呈现降低趋势。在皮质和海马内，各染毒组miR29a\*，miRb2，miRc1, miRc2较对照组降低均有统计学意义（*P*<0.01）；但经过相关分析，在皮质内miR29a\*, miRb2, miRc1, miRc2均与*BACEmRNA*及BACE蛋白均无相关性（r=-0.238, -0.261，*P*> 0.05；r=-0.235，

-0.238，*P*> 0.05；r=-0.216，-0.297，*P*> 0.05；r=-0.237，-0.296，*P*> 0.05），在海马内

miR29a\*，miRb2, miRc1, miRc2均与*BACEmRNA*及BACE蛋白均无相关性

( r=-0.332, -0.317, *P*> 0.05; r=-0.323, -0.317, *P*> 0.05; r=-0.404, -0.479, *P*> 0.05;

r=-0.370, -0.353，*P*> 0.05）。在皮质和海马内，与对照组相比，miR29a，miR29b1低，中剂量组升高无统计学意义（*P*> 0.05），高剂量组升高有统计学意义（*P*<0.05），且经过相关分析，在皮质内miR29a与*BACEmRNA*及BACE蛋白均有显著相关性

（r=-0.991, -0.987, *P*<0.05），miR29b1与*BACEmRNA*及BACE蛋白均有显著相关性（r=-0.969, -0.992, *P*<0.05）；在海马内miR29a与*BACEmRNA*及BACE蛋白均有显著相关性（r=-0.963, -0.981, *P*<0.05），miR29b1与*BACEmRNA*及BACE蛋白均有显著相关性（r=-0.983, -0.991, *P*<0.05）。

（5）核蛋白NF-κB/P65在皮质和海马中呈升高趋势。在皮质和海马中，与对照组相比较，NF-κB/P65在低剂量组升高无统计学意义（*P*> 0.05），NF-κB/P65在中、高剂量组升高有统计学意义（*P*<0.05）。

2、细胞转染实验结果：miR29a, miR29b1转染后24h后，转染水平达到最高，目的基因转染组与转染阴性对照组比较，转染组miR29a, miR29b1水平可升高500倍左右。随后逐渐下降，72h后降至100倍水平左右。当转染组miR29a, miR29b1水平到达最高，即24h时，进行染毒，染毒后24h（转染后48 h）收集细胞核细胞上液进行实验。

（1）各组细胞的形态学改变：对照组，转染阴性对照组、转染阳性对照组（转染目的基因miR29a或miR29b1，给予PBS组）细胞生长状态良好，细胞大小一致、均匀，贴壁良好，细胞密集，连接较多；转染低剂量组有少数死亡细胞，连接减少，其余变化不明显；转染中剂量组细胞状态稍有变差，细胞数量减少，细胞贴壁性变差，出现部分细胞皱缩呈圆形，连接减少；转染高剂量组细胞形态变化较为明显，数量进

一步减少，较多细胞皱缩呈圆形，细胞贴壁不紧，细胞间连接极为松散。各未转染细胞状态较转染组细胞状态差。转染miR29a, miR29b1细胞形态表现相似。

（2）细胞活力测定结果显示，对照组，转染阴性对照组、转染阳性对照组各组细胞活力无明显差别（*P*> 0.05），与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，细胞活力明显降低，与对照组相比，各组降低均有统计学意义（*P*<0.05）；转染染毒组与对照组相比，细胞活力有一定降低（*P*<0.05），低、中剂量组无统计学意义（*P*> 0.05），高剂量组降低有统计学意义（*P*<0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞活力较未转染组细胞活力明显回升（*P*<0.05）。转染miR29a, miR29b1细胞活力结果相似。

##### （3）各组细胞*BACEmRNA*，BACE水平的变化：空白对照组，转染阴性对照组

*BACEmRNA*, BACE表达水平无明显差别（*P*> 0.05）；与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，*BACEmRNA*，BACE明显升高（*P*<0.05）；转染组各组与对照组相比，*BACEmRNA*差异无统计学意义（P> 0.05），阳性对照组、转染低剂量组较空白对照组BACE水平降低，有统计学意义（*P*<0.05），转染中、高剂量组BACE水平降低无统计学意义（*P*> 0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞中*BACEmRNA*，

BACE较未转染组细胞*BACEmRNA*, BACE表达水平明显降低，且差异有统计学意义（*P*<0.05）。转染miR29a, miR29b1细胞*BACEmRNA*, BACE表达水平结果相似。

（4）各组细胞Aβ含量的变化：与空白对照组相比，各组Aβ总量有变化（*P*<0.05），空白对照组，转染阴性对照组Aβ总量无明显差别（*P*> 0.05）；转染阳性对照组Aβ总量较空白对照组水平出现降低（*P*<0.05），与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，Aβ总量明显升高，与对照组相比，Aβ总量各组升高均有统计学意义

（*P*<0.05）；转染染毒组与对照组相比，Aβ总量水平降低（*P*<0.05），低剂量组有统计学意义（*P*<0.05），中、高剂量组降低无统计学意义（*P*> 0.05）；其中，与空白对照组相比，各组Aβ1-40含量有变化（*P*<0.05），未转染中、高剂量染毒组较对照组Aβ1-40含量升高（*P*<0.05），阳性转染对照组，转染低剂量组较空白对照组相比Aβ1-40含量明显降低（*P*<0.05），转染中、高剂量染毒组较空白对照组Aβ1-40含量无明显差异（*P*<0.05），各相同染毒剂量组相比，转染组细胞中Aβ1-40含量较未转染组细胞Aβ总量水平明显降低，且差异有统计学意义（*P*<0.05）；与空白对照组相比，各组Aβ1-42含量有变化（*P*<0.05），空白对照组，转染阴性对照组Aβ1-42含量无明显差别（*P*> 0.05）；与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，Aβ1-42 含

量出现明显升高（*P*<0.05），转染阳性对照组、转染低剂量组Aβ1-42含量较空白对照组水平出现降低（*P*<0.05），转染中、高剂量组Aβ1-42含量降低无统计学意义

（*P*> 0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞中Aβ1-42含量较未转染组细胞

Aβ1-42含量水平明显降低，且差异有统计学意义（*P*<0.05）；

3、细胞干预实验结果：

##### （1）各组细胞形态学变化情况：对照组，100μmol/l PDTC组细胞生长状态良好，细胞大小一致、均匀，贴壁性良好，细胞密集，细胞凸起长而多，连接丰富紧密；

200μmol/l麦芽酚铝组细胞状态较差，细胞数量减少，细胞贴壁性变差，出现部分细胞皱缩呈圆形，连接减少松散；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞状态转好，细胞凸起增多，连接增加且密集型也增加。

##### （2）各组细胞活力变化情况：各组细胞细胞活力有差异（*P*<0.05）；对照组，100μmol/l PDTC组细胞活力无明显差异（*P*> 0.05），与对照组相比，200μmol/l麦芽酚铝组细胞活力明显降低（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞活力较200μmol/l麦芽酚铝组升高（*P*<0.05），但较对照组低（*P*<0.05）。

##### （3）各组细胞miR29a，miR29b1水平：各组细胞中mi29a表达有差异（*P*<0.05）；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞中miR29a表达有升高，差异有统计学意义

（*P*<0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中miR29a表达明显降低（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中miR29a较200μmol/l麦芽酚铝组升高（*P*<0.05），但较对照组低（*P*<0.05）。各组细胞中miR29b1有差异（*P*<0.05）；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞miR29b1表达有升高，差异有统计学意义（*P*<0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中mi29b1明显降低（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中mi29b1较200μmol/l麦芽酚铝组升高（*P*<0.05），但较对照组低（*P*<0.05）。

##### （4）各组细胞*BACEmRNA*，BACE水平的变化：各组细胞中*BACEmRNA*有差异

（*P*<0.05）；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞中*BACEmRNA*表达有降低，但没有统计学意义（*P*> 0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中*BACEmRNA*表达明显升高

（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中*BACEmRNA*较200μmol/l麦芽酚铝组降低，但无统计学差异（*P*> 0.05）。各组细胞中BACE有差异（*P*<0.05）；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞BACE表达有降低，差异有统计学意义

（*P*> 0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中BACE明显升高，200μmol/l麦芽酚铝

+100μmol/l PDTC组细胞中BACE较200μmol/l麦芽酚铝组降低（*P*<0.05），但较对照组高（*P*<0.05）。

（5）各组细胞染毒后Aβ含量的变化：各组细胞中Aβ总量有差异（*P*<0.05）；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞中Aβ总量有降低（*P*<0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中Aβ总量明显升高（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中Aβ总量较200μmol/l麦芽酚铝组降低（*P*<0.05），但较对照组高（*P*<0.05）。其中Aβ1-40含量在各组细胞中有差异（*P*<0.05）；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞Aβ1-40含量有降低，但没有统计学意义(*P*> 0.05)，200μmol/l麦芽酚铝组细胞中Aβ1-40含量明显增加（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中Aβ1-40含量较200μmol/l麦芽酚铝组降低（*P*<0.05），但较对照组高（*P*<0.05）。各组Aβ1-42有变化（*P*<0.05），与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞Aβ1-42含量降低（*P*<0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中Aβ1-42含量明显增加（*P*<0.05）；

200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中Aβ1-42含量较200μmol/l麦芽酚铝组降低（*P*<0.05），但较对照组高（*P*<0.05）。

结论：

1、麦芽酚铝可以提高大鼠血铝和脑铝水平，在脑皮质和海马中蓄积均比较明显。

2、麦芽酚铝可以引起大鼠脑皮质和海马内Aβ1-42沉积，其机制可能与铝可以降低miR29a, miR29b1水平，从而引起大鼠脑内*BACEmRNA*, BACE水平升高有关。

3、铝可能通过影响脑内NF-κB从而影响大鼠脑内miR29水平。

**关键词：**麦芽酚铝； Aβ； 沉积； BACE； miR29； NF-κB

**The Mechenism of MiR29 During the Deposition of Amyloid-βInduced by Aluminum**

**Abstract**

**Objective:**

(1) To study the effects of aluminum on miR29a, miR29a\*, miR29b1, miR29b2, miR29c1, miR29c2, *BACEmRNA*, BACE, amyloid-β(Aβ) 1-40 and Aβ1-42 in rats *in vivo*.

(2) To calrify the effect of miR29 during the deposition of via BACE induced by aluminum *in vitro*.

(3) To explore the effect mechenism upstream of miR29 which regulated the

Deposition of Aβthrough BACE experiments in vivo and *in vitro*.

**Methods:**

(1) Forty healthy, male adult Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to four groups: control groups with saline treatment and aluminum-maltolate( Al(mal) 3) groups with 15μmol/kgBW (low-dose group), 30μmol/kgB(middle-dose group), and45μmol/kgBW (high-dose group). Saline and Al(mal) 3were administered to the rats via intraperitoneal injections for eight weeks. After exposure, the rats were anaesthetised, perfused and sacrificed. The brains were rapidly removed from the skulls and dissected into different regions. Aluminium levels in rat blood and brains were detected using graphite furnace atomic absorption spectrometry following that the serum, cortical (Co) and hippocampal (Hi) tissues of the rats were digested using a microwave. Aβ1-40, Aβ1-42 were detected with ELISA. miR29a, miR29a\*, miR29b1, miR29b2, miR29c1, miR29c2, *BACEmRNA*were detemined with RT-PCR. BACE, NF-κB were analyzed with Western-blot. Then the relationship between BACE and miR29 were analysised.

(2) PC12-pheochromocytoma(PC12) were selected *in vitro* for miR29 mimics tranferation experiments. PC12 were cultured and miR29a mimics or miR29b1 mimics were transfered into PC12 using liposome transfection technology. The experimental group were divided into control group, 100μmol/l Al(mal) 3), 200μmol/l Al(mal) 3, 400μmol/l

Al(mal) 3, negative mimics transfection group and miR29a mimics or miR29b1 mimics transfection + phosphate buffered saline(PBS), 100μmol/l Al(mal) 3, 200μmol/lAl(mal) 3and 400μmol/lAl(mal) 3 group. PC12 and the cell medium were collected for further analysis after exposed to aluminum at 24h. Cell viability was determined with CCK-8. *BACEmRNA* was detected withRT-PCR. BACE, Aβ1-40 and Aβ1-42 were analysed with ELISA.

(3) PC12 was cultured for intervetion experiment. PC12 were divided into control group with PBS, intervetion control group with PDTC100μmol/L, exposed group with 200μmol/l Al(mal) 3, andintervervetion group200μmol/l Al(mal) 3+PDTC100μmol/l. PC12 and the cell medium were collected for further analysis after exposed to aluminum after 24h. Cell viability was determined with CCK-8; miR29a, miR29b1, *BACEmRNA* was detected withRT-PCR; BACE, Aβ1-40 and Aβ1-42 were analysed withELISA.

**Results:**

(1) The results of experiments *in vivo*:

I The serum aluminum levels in low-dose, middle-dose and high-highAl(mal) 3-treated groups are (92.05±5.63)μg/l, (111.74±5.88)μg/l with (165.50±9.79)μg/l, respectively, which increased significantly compared with the control groups, that is(47.76±6.58)μg/l (*P*<0.05). The content of aluminium in rats cotex in low-dose, middle-dose and high-dose Al(mal) 3-treated groups are (31.40±5.74) ng/g, (72.36±4.79) ng/g and (93.37±3.04) ng/g, respectively, which increased significantly compared with control groups, that is (12.11±1.42) ng/g (*P*<0.05). The content of aluminium in rats cotex in low-dose, middle-dose and high-high Al(mal) 3-treated groups are (51.72±6.04) ng/g, (86.92±5.38) ng/g, (106.24±6.18) ng/g and (12.11±1.42) ng/g,

Respectively, which also increased significantly compared with control groups, that is (11.67±1.04) ng/g (*P*<0.05).

ⅠⅠThere was no signiﬁcant difference in the Aβ1-40 content between the Co and Hi of the Al(mal) 3-treated rats and control rats (*P*> 0.05 ). In contrast, a significant increase in Aβ1-42 and the total Aβ contents were observed in both Co and Hi (*P*<0.05), the content of Aβ1-42 significantly increased in middle-dose Al(mal) 3-treated group and high-dose Al(mal) 3-treated group in Co(*P*<0.05), and it increased significantly in all Al(mal) 3-treated groups in Hi(*P*<0.05). The tolal content of Aβ increased in high-dose Al(mal) 3-treated group in Co(*P*<0.05), and increased in middle-dose and high-dose Al(mal) 3-treated group

In Hi(*P*<0.05).

ⅠⅠⅠCompared with the control group, the expression of *BACEmRNA,* BACE increased in middle-dose and high-dose Al(mal) 3-treated in Co(*P*<0.05), and increased in all Al(mal) 3-treated groups in Hi(*P*<0.05).

ⅠⅤmiR29a, miR29a\*, miR29b1, miRb2, miRc1, miRc2 decreased in Al(mal) 3-treated groups. miR29a\*, miRb2, miRc1, miRc2 all decreased in Co and Hi in all Al(mal) 3-treated groups, compared to the control group(*P*<0.01). But there were not correclation between miR29a\*, miRb2, miRc1, miRc2 and *BACEmRNA* or BACE in Co ( r=-0.638, 0.661, *P*> 0.05. r=-0.635, -0.638, *P*> 0.05. r=-0.616, -0.697, *P*> 0.05. r=-0.637,

-0.696, *P*> 0.05), also there were not correclation between miR29a\*, miRb2, miRc1, miRc2 and *BACEmRNA* or BACE in Hi( r=-0.732, -0.717, *P*> 0.05. r=-0.723, -0.717, *P*> 0.05. r=-0.804, -0.779, *P*> 0.05. r=-0.770, -0.753, *P*> 0.05). The expression of miR29a,

MiR29b1 increased in high-dose Al(mal) 3-treatedgroup in both Co and Hi(*P*<0.05). And miR29a correclated with *BACEmRNA* and BACE in Co(r=-0.991, -0.987, *P*<0.05), miR29b1 correclated with *BACEmRNA* and BACE in Co(r=-0.969, -0.992, *P*<0.05). The correclation between miR29a and *BACEmRNA* and BACE was abserved in Hi(r=-0.963,

-0.981, *P*<0.05), also the correclation between miR29b1 and *BACEmRNA* and BACE was abserved in Hi(r=-0.983, -0.991, *P*<0.05).

ⅤTransfer factor NF-κB/P65 increased in Al(mal) 3-treated groups in Co and Hi. The expression of NF-κB/P65 increased in middle-dose Al(mal) 3-treated group and high-dose Al(mal) 3-treated group in Co and Hi(*P*<0.05).

(2) The results of experiments in vitro which miR29 mimics were tranfered into PC12: the level of miR29a mimics, miR29b1 mimics were highest at 24h which transferred into PC12, the levels of miR29a mimics, miR29b1 mimics were 500 times than the negative control group. Then the levels of miR29a mimics, miR29b1 mimics decreased gradually, and it were 100 times at 72h. PC12 were exposed to PBS or Al(mal) 3 at 24h which transferred into PC12, then the following experiments were administed after 24h when PC12 were exposed to PBS or Al(mal) 3.

I The morphological changes of cells: the size of cell was consistent, the quantity and junction were normal in the control group, negative control group and positive transfected control group (and PBS were exposed to PC12). A few dead cells, cell junction reduced in the low dose Al(mal) 3-treated group that miR29a mimics, miR29b1 mimics were transfected into cells. The number and junction of cells decreased, some cells shrunken in

The middle dose Al(mal) 3-treated group. The number of cells were reduced significantly, the cell junction reduced significantly, more cells shrunken in high dose Al(mal) 3-treated group. The morphological changes of cells were more evident in groups which miR29a mimics or miR29b1 mimics were not transfected into PC12 than which miR29a mimics or miR29b1 mimics were transfected. The morphological changes of cells in Al(mal) 3-treated groups were similar that cells were transfected by miR29a mimics or miR29b1 mimics.

ⅠⅠThere were not difference in Cell viability amomg the control, negative mimics transfection group and the transfer control group which was miR29a mimics or miR29b1 mimics transfection + PBS (*P*> 0.05). Cell viability decreased with the raising of Al(mal) 3 dose in the groups which have not tranfered the miR29a mimics or miR29b1 mimics(*P*<0.05). Cell viability decreased in every groups which tranfered the miR29a mimics or miR29b1 mimics and treated with Al(mal) 3 and cell viability decreased significantly in 400μmol/lAl(mal) 3 tranfered group(*P*<0.05). Cell viability significantly increased in 100μmol/lAl(mal) 3, 200μmol/lAl(mal) 3, and 400μmol/lAl(mal) 3 tranfered groups compared to 100μmol/lAl(mal) 3, 200μmol/lAl(mal) 3, and 400μmol/lAl(mal) 3 groups which miR29a mimics or miR29b1 mimics were not transfered.

ⅠⅠⅠThere were not difference in the expression of *BACEmRNA* and BACE amomg the control, negative mimics transfected group group (*P*> 0.05). The expression of *BACEmRNA* and BACE with the raising of Al(mal) 3 dose in the groups which have not tranfered the miR29a mimics or miR29b1 mimics (*P*<0.05). The expression of *BACEmRNA* were similar in every groups which miR29a mimics or miR29b1 mimics were transfered into PC12. The expression ofBACE decreased in the transfer control and in low-dose Al(mal) 3-treated group which miR29a mimics or miR29b1 mimics were transfered into PC12(*P*<0.05). There were not significant differece in BACE among200μmol/lAl(mal) 3group, 400μmol/lAl(mal) 3and the transfer control(*P*> 0.05). The expression of *BACEmRNA* and BACE decreased in 100μmol/lAl(mal) 3, 200μmol/lAl(mal) 3, and 400μmol/lAl(mal) 3 tranfered groups compared to the same dose group which miR29a mimics or miR29b1 mimics were not transfered.

ⅠⅤThere were notsignificantly differece in the content of total Aβbetween the control, negative mimics transfection group(*P*> 0.05), the content of total Aβ increased with the raising of Al(mal) 3 dose in the groups which have not tranfered the miR29a mimics or miR29b1 mimics(*P*<0.05). the content of total Aβdecreased in the transfer control group

And 100μmol/lAl(mal) 3 tranfered group (*P*<0.05). There were not significant differece in

The content of total Aβamong200μmol/lAl(mal) 3group, 400μmol/lAl(mal) 3and the transfer control groups(*P*> 0.05). The content of total Aβ decreased in 100μmol/lAl(mal) 3, 200μmol/lAl(mal) 3, and 400μmol/lAl(mal) 3 tranfered group compared to the same dose group which miR29a mimics or miR29b1 mimics were not transfered. There were notsignificant differece in the content of Aβ1-40 between the control and negative mimics transfection group(*P*> 0.05). The content of Aβ1-40 increased in the groups of 200μmol/lAl(mal) 3 and 400μmol/lAl(mal) 3 which have not tranfered the miR29a mimics or miR29b1 mimics(*P*<0.05). the content of Aβ1-40 decreased in the transfer control group and 100μmol/lAl(mal) 3 tranfered group (*P*<0.05). There were not significant differece in the content of Aβ1-40 among200μmol/lAl(mal) 3group, 400μmol/lAl(mal) 3and the transfer control(*P*> 0.05). The content of Aβ1-40decreased in 100μmol/lAl(mal) 3, 200μmol/lAl(mal) 3, and 400μmol/lAl(mal) 3 tranfered group compared to the same dose group which miR29a mimics or miR29b1 mimics were not transfered (*P*<0.05). There were notsignificant differece in the content of Aβ1-42 betweem the control and negative mimics transfection group(*P*> 0.05), the content of Aβ1-42 decreased in the transfer control group(*P*<0.05). The content of Aβ1-42 increased in every groups exposed to Al(mal) 3 which have not tranfered the miR29a mimics or miR29b1 mimics(*P*<0.05). The content of Aβ1-42 decreased in the transfer control group and 100μmol/lAl(mal) 3 tranfered group (*P*<0.05). There were not significantly differece in the content of total Aβ1-42 among200μmol/lAl(mal) 3group, 400μmol/lAl(mal) 3and the transfer control(*P*> 0.05). The content of Aβ1-42decreased in 100μmol/lAl(mal) 3, 200μmol/lAl(mal) 3, and 400μmol/lAl(mal) 3 tranfered groups compared to the same dose group which miR29a mimics or miR29b1 mimics were not transfered.

(3) The results of intervetion experiment:

ⅠThe morphological changes of cells: the size of cell was consistent, the quantity and junction of cells, were normal, the protuberances of cells were plentiful in the control group andthe group of 100μmol/l PDTC. But some cells were dead, the number of cells decreased, cell junction reduced and some cells shrunken in 200μmol/lAl(mal) 3. the number and junction of cells increases, while the protuberances of cells increased in 200μmol/lAl(mal) 3+100μmol/l PDTC group.

ⅠⅠThere were not difference in Cell viabilitybetween control group and 100μmol/L

PDTC group. Cell viability significantly decreased in 200μmol/l Al(mal) 3

Group(*P*<0.05), butcontrodictarly, increased in 200μmol/l Al(mal) 3+PDTC100μmol/l group

Compared to 200μmol/l Al(mal) 3 group(*P*<0.05). (3) The expression of miR29a or miR29b increased significantly in 100μmol/L PDTC group (*P*<0.05, but in 200μmol/l Al(mal) 3 group decreased significantly(*P*<0.05), and increased in 200μmol/l Al(mal) 3+PDTC100μmol/l group compared to 200μmol/l Al(mal) 3 group(*P*<0.05).

ⅠⅠⅠThere were not difference between control group and100μmol/L PDTC group The expression of *BACEmRNA*, BACE in 200μmol/l Al(mal) 3 group increased significantly(*P*<0.05), but not significantly different with that in 200μmol/l Al(mal) 3+PDTC100μmol/l group which showed a little higher expression level (*P*> 0.05). BACEdecreased in Al(mal) 3+PDTC100μmol/l group than that in 200μmol/l Al(mal) 3 group. (*P*<0.05).

ⅠⅤThe content of total Aβdecreased in 100μmol/l PDTC group(*P*<0.05), and it increased significantly in 200μmol/l Al(mal) 3group (*P*<0.05), and it decreased in 200μmol/l Al(mal) 3+PDTC100μmol/l group compared to 200μmol/l Al(mal) 3 group(*P*<0.05). The decreasing of the content of Aβ1-40 did not have statistical significance in PDTC100μmol/l group(*P*> 0.05, butincreased significantly in 200μmol/l Al(mal) 3group (*P*<0.05). The content of Aβ1-40 decreased in 200μmol/l Al(mal) 3+PDTC100μmol/l group compared to 200μmol/l Al(mal) 3 group(*P*<0.05). The content of Aβ1-42 decreased in 100μmol/l PDTC group(*P*<0.05), but increased significantly in 200μmol/l Al(mal) 3group (*P*<0.05). While decreased again in 200μmol/l Al(mal) 3+PDTC100μmol/l group compared to 200μmol/l Al(mal) 3 group(*P*<0.05)

**Conclusions:**

Al(mal) 3increases the serum aluminum levels and the content of aluminium in rats Co and Hi, induces the deposition of Aβ1-42 in rats Co and Hi, which are regulated by miR29a, miR29b1 via *BACEmRNA* and BACE, and regulates miR29 through effecting the expression of NF-κB.

**Key words:** Al(mal) 3; Aβ; BACE; MiR29; NF-κB

# 常用缩写词中英文对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文名称** | **中文名称** |
| Al | aluminum | 铝 |
| AD | Alzheimer’s disease | 阿尔茨海默病 |
| Aβ | amyloid protein-β | β-淀粉样蛋白 |
| miRNA | microRNA | 微小核苷酸 |
| SD | Sprague-Dawley | 斯泼累格·多雷大鼠 |
| APP | Amyloid precursor protein | 淀粉样前体蛋白 |
| SPs | Senile plaques | 老年斑 |
| NFTs | Neurofibrillary tangles | 神经纤维缠结 |
| AlCl3·6H2O | Aluminum chloride hexahydrate | 六水合氯化铝 |
| Maltol | 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone | 麦芽酚 |
| Al(mal)3 | Aluminum-maltolate complex | 麦芽酚铝 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| AP | Ammonium Persulfat-e | 过硫酸胺 |
| ACR | Bis-Acrylamid | 亚甲丙烯酰铵 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |
| PMSF | Phenylmethanesulfonyl [fluoride](http://www.bing.com/knows/fluoride) | [苯甲基磺酰氟](http://www.bing.com/knows/%E7%8C%AB%E8%81%A5%E7%82%89%E8%8E%BD%E8%81%B0%E8%99%8F%E6%B0%93%E8%81%BC%E6%BD%9E%E8%8E%BD%E6%8B%A2%E6%BD%9E%E8%8C%85%E8%81%9F%E6%8E%B3%E5%BF%99%E6%8E%B3%E8%81%BC) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine | N,N,N',N'-四甲基乙二胺 |
| PC12 | Pheochromocytoma-derived cell | 肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 |
| BACE-1 | β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 | β-分泌酶 |
| PS-1 | presenilin-1 | 早老素 1 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | DMEM | Dulbecco's modiﬁed Eagle's medium | 改良的 Eagle 培养基 |  |
|  | PMSF | Phenylmethanesulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |  |
|  | FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |  |
|  | PDTC | Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate/ Pyrrolidinedithiocarbamic acid | 二硫氨基甲酸肽吡咯烷 |  |
|  | NF-κB | [Nuclear Factor Kappa B](http://cn.bing.com/search?q=Nuclear%2BFactor%2BKappa%2BB&amp;FORM=QSRE1) | 核转录因子 κB |  |
|  | ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附实验 |  |
|  | CNS | Central nervous system | 中枢神经系统 |  |
|  | qRT-PCR | Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction | 实时荧光定量聚合酶链反应 |  |
|  | BCA | Bicinchoninic acid | 二羧基二喹啉 |  |
|  | DTT | DL-Dithiothreitol | 二硫苏糖醇 |  |
|  | endo-siRNAs | Endogenous small interfering RNAs | 小干扰 RNA |  |
|  | piRNAs | Piwi-interacting RNAs | 前体相互作用RNAs |  |

前 言

铝是地壳中蕴藏量最高的金属，其在地壳中质量比例高达的7.45%，在地壳土壤、地表岩层以及各类地下矿物中具有广泛的存在和分布。铝具有质量轻、污染小、良好的导电性、导热性、可延展性、耐热性，便于加工，并且能够循环利用，甚至具有耐核辐射性等诸多优良的理化特性，而且一直以来铝都被人类认为是一种毒性极低的金属。所以铝被广泛运用于汽车、航天、军工行业，甚至食品加工等多个领域，是世界各国国民生产和经济发展的重要基础原材料。因此，全球铝的生产量也在呈逐年增长趋势，在我国尤为明显。自2007年始，中国原铝产量逐年刷新历史高位。国家统计局数据显示，2012年中国原铝产量同比增长10.6%[；电解铝](http://www.alu.cn/aluNews/NewsList_k%E7%A2%8C%E8%8E%BD%E9%99%86%E8%8A%92%E8%84%97%E8%84%95.html)产量同比增长了9.7%，增幅同比上升了4.1%；[氧化铝](http://b2b.cnal.com/supply/class-204.shtml)总产量在2012同比增长9.67%；2013年我国电解铝产量更是跃居世界第一；2014年我国铝产量预计增至2800万吨（来自中国铝业网）。这些数据提示我们，随着铝生产规模大幅度地扩大，职业性铝接触人群在不断增多，在日常生产和生活中接触铝及其制品的人群也日渐增多。因此，各种形式的铝通过各种途径进入人体内的总量也在不z断k增q加2.0151125

随着铝的广泛应用和接触，铝对健康的影响也已成为人们关注的热点。在我国为

预防铝对人群健康造成危害，由国家卫生计生委等5部门联合发文对含铝食品添加剂

的使用已做出调整，新标准要求从2014年7月1日起，酸性磷酸铝钠、硅铝酸钠和辛烯基琥珀酸铝淀粉不能再用于食品加工和生产；馒头、发糕等面制品（油炸面制品、挂浆用的面糊、裹粉、煎炸粉除外）不得添加硫酸铝钾和硫酸铝铵，而膨化食品中也不再允许使用任何含铝食品添加剂。虽然这些措施对降低人体内铝负荷有一定作用，但来源于职业和其它途径的铝仍是影响人群的健康的一个重要环境因素。

众多研究结果证实，长期接触铝可以对神经、骨骼、肝脏、肾脏、造血系统以及免疫系统等机体多个系统器官产生毒性，其中对神经系统的毒性尤为明显[1, 2]。

从1886年科学家Siem首先发现铝的神经毒性至今，人群流行病学和动物体内外实验研究均表明铝对神经系统具有毒性作用[3, 4]。早在1986年，挪威学者Vogt等调查发现老年性痴呆患病率在饮水中铝浓度较高的地区明显高于饮水中铝浓度较低的地区[5]。在随后几十年中，又有研究发现长期饮用铝超标的饮水可使老年人群中AD的患病率明显升高，在患者尸体解剖后发现其大脑皮层和软脑膜血管内有大量的老年

斑、神经纤维缠结以及黑色素小体（Lewy小体）[6,7]。提示铝与神经系统损伤之间是密切相关的。另外，动物实验研究证实，铝可以引起大鼠，小鼠以及家兔学习记忆功能降低，在动物脑内可出现各种神经递质、基因蛋白等的变化[8, 9]。

研究表明，铝除了引起神经系统以上损伤之外，还可以引起脑内发生多种病理改变[10]，如神经细胞结构改变，神经元数目减少等。近年来越来越多的学者研究证实铝可以引起动物脑内出现老年斑的早期改变β-淀粉样蛋白( amyloid protein-β, Aβ)蓄积。

Yumoto等通过透射电镜观察AD患者脑海马和颞叶切片，发现在老年斑中有铝的沉积，且这种铝的沉积与年龄没有关系，而在老年斑之外的神经细胞内外均没发现铝的存在[11]。D. Pratico研究发现在小鼠食物中添加铝后，可以引起Tg2576小鼠皮层Aβ水平升高。Rodella [12]等也发现铝可以使小鼠脑内Aβ反应性明显增高。Castorina等学者通过体外实验发现铝可以使原代培养神经元中Aβ的生成增多[13]。这些研究结果均显示，铝与老年斑具有密切的关系，并可以引起动物脑内出现Aβ生成增多和沉积的改变。

Aβ生成增多和沉积是神经系统退行性疾病的主要病理改变，并且是神经系统多种功能损伤的诱发因素。Malin[14z]等kq将A2β0注15入1大12鼠5或猴的大脑皮质中，发现注射部位出现了组织坏死，周围神经元缺失及神经胶质增生等变化，并与剂量有明显的相关性。

而且Aβ诱导的神经元退行性变与阿尔茨海默病的病理改变十分相似。另外，Aβ寡聚体还可以自行插入到细胞膜脂质双分子层中，促使脂质重新分布，直接或间接影响细胞膜生理过程，从而影响脂质代谢和神经细胞的功能[15]。Kagan等人认为Aβ可聚集成离子通道引发神经退行性变[16]，他们在大鼠海马齿状回的背侧细胞带微量注射Aβ后，[发现大鼠迷宫学习](http://baike.baidu.com/view/930748.htm)记忆功能明显降低，表现为获得记忆的尝试次数约为正常对照组的

3[倍；在注射区出现了神经元死亡、胶质细胞](http://baike.baidu.com/view/1979262.htm)浸润；背侧细胞带受损的长度约为生理盐水注射组的4～5倍；以及Aβ的沉积。还有大量研究表明，Aβ可以通过多种途径导致神经细胞凋亡，从而损伤神经系统[17, 18]。体外实验也证实了Aβ的神经毒性作用。

Heredia[19]将Aβ与培养的脑皮质神经元长期共同培育，发现其中一部分Aβ可形成致密的β-淀粉样沉淀，导致神经元退行性变。这些研究均表明Aβ具有明确的神经毒性作用。铝引起Aβ生成增多和沉积也是其产生神经毒性的重要表现和机制之一。因此，探讨Aβ生成增多和沉积的机制，进而对其进行干预，对于铝毒性的预防和治疗具有极为重要的意义。

Aβ，是由淀粉样蛋白前体( amyloid protein precursor, APP)经过β分泌酶(BACE1或

BACE、Memapsin2）和γ分泌酶连续裂解而产生，在神经细胞外沉积。其主要形态包括包括可溶性的Aβ1-40和难溶性的Aβ1-42. Aβ沉积是AD患者最主要的病理改变之一老年斑的早期改变。在正常情况下，APP主要被α分泌酶和γ分泌酶连续裂解形成为p3和AICD，因此机体内只有极少量Aβ产生。

β-分泌酶已被证实是Aβ生成过程中起决定作用的、关键性的限速酶，在整个Aβ生成机制中具有至关重要的作用。因此，对于铝引起脑内Aβ沉积的机制研究，主要集中在铝对BACE的的研究方面[20-22]，Yun等[20]对小鼠进行铝染毒，发现小鼠脑内

BACE1的mRNA和蛋白水平均增高。通过培养SH-SY5Y细胞系发现氯化铝可以使

BACE1基因水平发生变化[21]。但这些研究多集中在BACE基因和蛋白水平，而对于铝如何引起BACE发生变化的机制尚不是很明确。

近年来有研究发现miRNA可以调节BACE的表达。研究发现[23,24] AD患者体内

Aβ生成增多与BACE增高有关，而BACE的变化又受到miR29的调控。miR29a，

miR29b1可以靶向的于BACE1基因的3'-UTR区相结合，从而调节BACE的表达，

在正常脑组织中，二者以负反馈z的kq式2调01控5表11达25。在散发性AD 患者（SAD）中，

miRNA29a, miRNAb1的表达明显下降，而BACE1蛋白的表达则明显上升。综上，细胞中的miRNA29a, miRNAb1缺失可能导致Aβ的积累和SAD的发生，其作用途径可能是通过升高BACE1蛋白的表达实现的。Wang等[25]通过利用miRNA表达谱、生物信息学预测、原位杂交和生化检测等手段发现miRNA107，在AD发病早期表达量出现下降，提示miR107也可能通过调控BACE1蛋白的表达加速AD的病理进程。上述研究结果显示，特定miRNA的异常表达可能导致BACE1和Aβ的增加，从而引起AD的发生或恶化。近年来有研究者通过细胞实验发现，硫酸铝可以改变细胞内一些miRNA的水平，从而参与了神经退行性疾病的发病和病情进展[26, 27]。依据以上信息，因此推断铝引起脑内Aβ沉积可能也通过特定的miRNA对BACE调节。

MicroRNAs(miRNAs)是一类单链的，非编码RNA，长度大约为22nt，在进化上具有高度的保守性、时序性以及组织特异性。它也是一类广泛存在于真核生物中极为重要的基因表达调控因子。miRNA基因通常是在核内由[RNA聚合酶II](http://baike.baidu.com/view/3874221.htm)(polII)转录形成，最初产物为大的、具有帽子结构(7MGpppG)、多聚腺苷酸尾巴(AAAAA)的pri-miRNA. pri-miRNA在细胞核内核酸酶Drosha以及辅助因子Pasha的作用下被切

割呈具有发夹状的前体产物pre-miRNA, pre-miRNA在转运蛋白Exportin-5的作用下由细胞核内转移到细胞质中，然后由另一种RNA内切酶Dicer对其进行进一步的切割，形成成熟的miRNA。成熟miRNA主要通过与mRNA的3’UTR区序列的进行不完全互补配对，最终，引起靶mRNA的降解或者翻译抑制。从而实现转录后水平反向调控其相关靶基因的表达。在哺乳动物中，miRNA具有非常广泛的基因调节功能。它可以对基因活动（如细胞生长、分化、凋亡及应激反应等）的各个层面进行调节，而且参与了生命活动中的一系列重要的过程，包括早期胚胎发育、细胞增殖、细胞的命运决定、形态发生、细胞凋亡、细胞应激应答、生理节律、血管生成、免疫调节以及内分泌调节等，甚至调节干细胞的分化。miRNA在神经细胞中也同样发挥着广泛的调节作用，如神经干细胞的命运决定、认知和记忆的调控等。大量实验证明了miRNA在神经保护及其在神经退行性疾病中的具有显著的调控功能，为这些相关疾病的诊断、治疗提供了重要的思路。

miRNA29（miR29）是一类在不同动物、不同组织中均有表达的miRNA，并在进化上保持高度的保守性。人类细胞中miRNA29 由miRNA29a、miRNA29b1、

miRNA29b2和miRNA29c组成。zk在q胚胎20期15组1织12呈5现不表达或者为低表达，而在生物体成熟组织细胞中则有广泛的表达。miRNA29与人类疾病密切相关，miR29在多种肿瘤细胞、心肌梗塞与散发性阿尔茨海默病等病变组织细胞中表达受抑。在AD患者

体内及细胞研究中均发现miR29降低可引起BACE表达的升高[25, 26]。

有实验证实，在不同组织及生理环境下中miRNA29的表达又受到不同因子的调控。在白血病患者体内[28]，在成肌细胞及横纹肌肉瘤细胞[29]中，NF-κB可以负调控

miRNA29的表达，在胆囊炎和胆管癌细胞[30]中，肝纤维化[31]过程中miRNA29表达也受NF-κB信号通路调控。另有报道心肌成纤维细胞中及肝纤维化[31,32]中，NF-κB，TGF-β参与了miRNA29b表达下调，由此提示NF-κB信号通路也参与了miRNA29表达调控。这些研究结果提示，NF-κB作为转录因子在多种疾病损伤或组织中参与了

miRNA29转录水平的调控。

综合国内外研究现状，该课题拟通过建立麦芽酚铝大鼠动物模型，观察动物脑组织内Aβ，BACE，miR29a/b/c，NF-κB等的变化，并进行细胞培养，通过脂质体转染技术进行miRNA29转染的干预研究，选择miR29可能的上游机制进行阻断，较系统的研究miRNA29在铝引起脑内Aβ的生成增多和沉积过程中的机制，并初步探讨其

上游机制。从而完善铝神经毒性发生的机制，并为铝毒性从miRNA水平进行预防及治疗提供新的思路和理论基础。

zkq 20151125

# 第一部分 铝对大鼠脑内**miR29**、**BACE**和Aβ的影响

铝作为一种慢性的、环境神经毒物，其危害已成为人们关注的热点。并且也与

AD的发生发展有着一定的关系。研究发现，AD患者脑内老年斑中有铝的存在。这些发现说明铝与老年斑形成有关[11]。而Aβ沉积是老年斑形成的前期病变表现。研究者通过不同的给药途径证实，铝可以引起大鼠、小鼠和家兔等多种动物脑内出现这种老年斑这种前期表现[12, 20, 33]，也即Aβ蓄积。另外，也有研究者通过培养神经母细胞瘤细胞系、PC12细胞系甚至原代培养神经元，并染铝后，也证实了都有Aβ的生成增多[13, 34]。

众多研究证实，BACE1是Aβ生成过程中起决定作用的、最关键性的限速酶，在整个Aβ生成机制中具有至关重要、甚至决定性的作用。因此，对于铝引起脑内Aβ沉积的机制的研究多集中在铝对BACE的影响方面[21,22]，但这些研究多集中在对于

BACE蛋白和基因本身的影响，而对于铝引起BACE发生变化的机制尚不是很明确。

研究发现[23,24]AD患者体内Aβ生成增多与BACE增高有关，而BACE的变化又受到

zkq 20151125

miR29的一些亚型的调控。因此，本实验通过建立麦芽酚铝大鼠实验模型，观察铝是

否可以影响miR29，对miR29各型影响的情况，并初步分析和辨别可能参与铝影响

BACE及Aβ表达miR29的分型。

## **1** 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物及分组[94]

健康的、雄性的SD（Sprague-Dawley）大鼠40只，由ft西医科大学实验动物中心提供（合格证号SCXK（晋）2009-0001，ft西太原），所选大鼠活动能力基本相近，体重选择180-220g之间，在动物室进行适应性喂养一周。随后，将动物按体重进行随机分组，分为对照组（生理盐水组），低剂量组(15μmol/kgBW)，中剂量组

（30μmol/kgBW）和高剂量（45μmol/kgBW）组，每组10只。

#### 1.1.2 主要试剂

（1）氯化铝（aluminium chloride, AlCl3），分析纯，购自于sigma-aldrich公司；

（德国，斯德海姆）

（2）麦芽酚（maltolate），分析纯，购自于sigma-aldrich公司；（德国，斯德海姆）

（3）Aβ1-40, Aβ1-42 ELISA试剂盒，Uscn life science Inc；（中国武汉）

（4）BACE单克隆抗体，EPITOMICS公司；（美国，加利福尼亚）

（5）β-actin单克隆抗体，二抗，BCA蛋白定量试剂盒，ECL发光液，康为世纪公司；（中国，北京）

（6）预染蛋白Marker, FERMENTAS公司；（立陶宛）

（7）Tris，甘油(Glycerol)，甘氨酸(Glycine)，过硫酸胺(Ammonium Persulfat-e，

AP)，亚甲丙烯酰铵(Bis-Acrylamide, ACR)，十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate，

SDS)，[苯甲基磺酰氟](http://www.bing.com/knows/%E7%8C%AB%E8%81%A5%E7%82%89%E8%8E%BD%E8%81%B0%E8%99%8F%E6%B0%93%E8%81%BC%E6%BD%9E%E8%8E%BD%E6%8B%A2%E6%BD%9E%E8%8C%85%E8%81%9F%E6%8E%B3%E5%BF%99%E6%8E%B3%E8%81%BC)（Phenylmethanesulfonyl [fluoride](http://www.bing.com/knows/fluoride), Phenylmethylsulfonyl fluoride或α-Toluenesulfonyl fluoride, PMSF），TEMED，β-巯基乙醇，Amresco公司；（美国，俄亥俄）

（8）显影定影液、显影胶片，伊士曼柯达公司；（中国，上海）

（9）聚偏二氟乙烯膜（PVDF膜），Millipore公司；（美国）

（10）Bulge-LoopTM miR29a\*，miR29b2, miR29c1，miR29c2，u6 qRT-PCR引物，广州市锐博生物科技有限公司；（中国，广州）

（11）Trizol试剂盒，RNA酶抑制剂，HiFi-MMLV逆转录酶（HiFi-MMLV Reverse Transcriptase(RNase H-))(RNase H-)，HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒(HiFi-MMLV cDNA Kit), dNTP Mix, RNase Free dH2O，康为世纪公司；（中国，北京）

（12）BACE引物，β-actin引物，PrimeScript®RT reagent Kit Perfect Real Time，宝生物工程有限公司；（中国，大连）

（13）MiR29a，miR29b1, u6引物，All-in-OneTM miRNA qRT-PCR Detection Kit；广州复能基因有限公司；（中国，广州）

（14）硝酸，优级纯，风船化学试剂科技有限公司；（中国，天津）

（15）铝标准液，傲然精细化工作研究所；（中国，天津）

#### 1.1.3 主要仪器

（1）SpectraMax M5酶标仪及SoftMax Pro v5.0.1软件，Molecular Devices；（美国）

（2）压片暗盒（5×7英寸），普利来基因技术有限公司；（中国，北京）

（3）DYY-7C型电泳仪，北京市六一仪器厂；（中国，北京）

（4）2600C自动X线胶片洗片机，上海申贝电影机械厂；（中国，上海）

（5）捷达801专业数码凝胶成像与分析系统3.3，江苏省捷达科技发展有限公司；

（中国，南京）

（6）-80℃超低温冰箱，中科美菱低温科技有限责任公司；（中国，合肥）

（7）PCR扩增仪，BIO-RAD公司；（美国，加州）

（8）AB104－N电子天平，上海电子仪器厂；（中国，上海）

（9）微波消解仪，CEM公司；（美国，卡罗莱娜）

（10）电热板，Botonyc仪器公司；（美国）

（11）石墨炉原子吸收仪，Thermo fisher scientific；（美国，沃尔瑟姆）

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 试剂的制备

（1）将AlCl3•6H2O使用蒸馏水配制终浓度分别为15μmol/L、30μmol/L、90μmol/L，麦芽酚使用0.01M PBS进行配制，终浓度分别为45μmol/L、90μmol/L、

270μmol/L. 使用前将两种溶液按体积比1: 1 进行混合，使溶液终浓度分别为

10μmol/L、30μmol/L、45μmol/L，使用1 mol/L NaOH将麦芽酚铝溶液的pH值调节至7.4，并用抽滤器进行抽滤，待用。

（2）0.01M PBS: 称取NaCl 8g, 0.2g KCl, 0.24g KH2PO4, 1.44g Na2HPO4，加蒸馏水800ml，调节溶液的pH值至7.4，最后加双蒸水定容至1L。

（3）100mM PMSF：称取17.42mg PMSF粉剂，加异丙醇定容至1ml，充分混匀。

(4) 0.02M PBST: 称取Na2HPO4•12H2O 14.0g, KH2PO4•2H2O 1.0g, NaCl 18.0g，

Tween-20 1.0ml，加双蒸水至2000ml, pH值调节至7.2～7.4.

（5）5×样品缓冲液：取Tris-HCl(250mM, PH值为6.8) 25ml，甘油50ml, SDS

10.0g，溴酚兰50mg，2-巯基乙醇40.0ml，加双蒸水至100ml，-20℃分装保存，使用时将其稀释至2×样品缓冲液。

（6）5×电泳缓冲液：称取Tris 15.1g，甘氨酸94g，十二烷基磺酸钠(SDS) 5g加双蒸水定容至1000ml。

（7）30%丙烯酰胺：丙烯酰胺29.0g，N，N'-亚甲双丙烯酰胺1.0g，加双蒸水定容至100ml，转移入棕色瓶中室温保存。

（8）20%SDS：称取SDS 200g，加双蒸水90ml，稍加热进行溶解，以稀HCl调节pH至7.2，定容至100ml。

（9）10%AP：称取过硫酸铵(AP) 1g，加双蒸水10ml充分溶解，4℃保存2周。

（10）1.5M Tris 缓冲液(pH 8.8): 称取Tris 18.171g加双蒸水50ml，用1M HCl

调节pH至8.8，定容至100ml。

（11）1.0M Tris 缓冲液(pH 6.8): 称取Tris 12.114g，加双蒸水40ml，用0.1M HCl

调节pH至6.8，定容至100ml。

（12）5×转膜液：甘氨酸14.4g, Tris 3.03g，甲醇200ml，定容至1000ml。

(13) 10%分离胶：H2O 6.25 ml, 30%ACR 5.0 ml, 1.5 M Tris(pH8.8) 3.75ml, 20%

SDS 75μl，10%AP50μl，TEMED 10μl，混匀。

(14) 5%积层胶：H2O 6.1ml, 30%ACR 1.3ml, 1.0MTris(pH6.8) 2.5ml, 20%SDS

70μl，10%AP50μl，TEMED 10μl，混匀。

（15）封闭液：称取5g脱脂奶粉，加0.02M PBST 100ml，充分混匀，4℃保存。

（16）抗体稀释液：称取2 g脱脂奶粉，加0.02M PBST 100ml，混匀后4℃保存。

#### 1.2.2 动物染毒方法

动物采用腹腔注射的方式给予染毒，对照组给予生理盐水，生理盐水通过高压进行消毒，染毒组给予不同浓度的麦芽酚铝，麦芽酚铝进行抽滤消毒，按照

0.1ml/100gBW进行注射，每周称量动物的体重，并根据各组的动物体重调节相应麦芽酚铝的浓度，每天染毒时间限制在每日上午9: 00-11:00之间，每连续染毒5天，间隔

2天，染毒时间为8周。整个实验期间，实验动物自由进食和饮水。饲养大鼠所使用的笼具、饮水瓶等均使用不含铝的器具。动物室内以昼夜自然交替的节律方式进行采光，

温度控制为23℃±3℃，相对湿度控制为50%±10%。

#### 1.2.3 实验样品收集

染毒期结束后，大鼠在麻醉状态下，断头采血。处死，冰上将大鼠的脑皮质和海马进行迅速分离，将所有组织分存置于-80℃冰箱中待用。

#### 1.2.4 血铝和脑皮质和海马铝的测定

（1）血样处理：大鼠断头采血2ml，静置分层，离心，2000r/min，5min，取上清500μl，加1500μl去离子水和20μl的1%HNO3，2000r/min，离心5分钟，4℃保存待测。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Stage | power |  | RAMP | control | hold |
|  | MAX | % | min | ℃ | min |
| 1 | 1600 | 100 | 05.00 | 120 | 01.00 |
| 2 | 1600 | 100 | 05.00 | 160 | 05.00 |
| 3 | 1600 | 100 | 04.00 | 190 | 15.00 |
| 4 | 400 | 100 | 00.00 | 80 | 200.00 |

（2）大鼠脑皮质和海马消化[94]：取大脑皮质或海马0.2g，置于微波消解仪的20ml消解管中，加入8ml混酸（6ml硝酸+2ml过氧化氢）24h过夜。然后进行微波消解，消解程序为：

消化完毕后，在通风橱中将消化管置于电热板中，120℃赶酸至无酸雾逸出为止。用0.5g/L稀硝酸定容至0.4ml。该消解过程所使用的相关容器、器具，均经过3%硝酸浸泡48h，并使用纯净水反复冲洗并烘干。

（3）石墨炉原子吸收法检测血铝、脑铝含量[94]

校正曲线用线性最小二乘法拟合法，将铝标准液配制为40μg/μl，自动稀释浓度梯度为：40.00μg/μl、30.00μg/μl、20.00μg/μl、10.00μg/μl、0.00μg/μl，可接受拟合为

0.99. 光谱仪设置条件为：重复测量次数2次，测量时间为3s，波长为309.3nm，电流为80%，通带0.5nm，瞬间峰测量为0.00s-3.00s，背景校正四线氘灯[94]。石墨炉检测程序设置为：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 步骤 | 温度 | 时间 | 斜坡（℃/秒） | 气体类型 | 气体流量 | RD | RS | TC | NL |  |
| 1 | 100 | 15.0 | 5 | 惰性 | 0.2L/min | - | - | - | - |  |
| 2 | 110 | 01.0 | 2 | 惰性 | 0.2L/min | - | - | - | - |  |
| 3 | 600 | 05.0 | 20 | 惰性 | 0.2L/min | - | - | - | - |  |
| 4 | 1400 | 05.0 | 50 | 惰性 | 0.2L/min | - | - | - | - |  |
| 5 | 2600 | 03.0 | 0 | 惰性 | 0.2L/min | + |  | + | - |  |
| 6 | 1750 | 03.0 | 0 | 惰性 | 0.2L/min | - | - | + | - |  |

血铝含量的计算公式：(A-A0)×V×1000/ V0

脑铝含量的计算公式为：(A-A0)×V×1000/(m×1000)

（血铝含量单位：μg/l，脑铝含量单位：ng/g，A：消化液中检测的铝质量浓度μg/l，A0：空白液中检测的铝质量浓度μg/l，V0：血样体积ml，V：样品消化液的总体积ml，m：样品的质量g）

#### 1.2.5 Aβ1-40，Aβ1-42的检测

##### （1）脑皮质和海马中总蛋白的提取

取0.08g于-80℃保存的大鼠脑皮质或者海马，加入0.8ml组织蛋白提取剂和蛋白酶抑制剂复合物，使用超声波碎细胞仪在冰浴中将组织进行破碎，破碎时尽量避免气泡的产生。于冰上放置20分钟。4℃，12000r/min，离心15min，取上清待用。

##### （2）蛋白定量

按照BCA试剂盒说明书操作，使用酶标仪于波长450nm测定吸光度值，并根据标准曲线，计算各样品蛋白浓度。将各样品浓度调节至一致。

##### （3）ELISA检测大鼠脑皮质和海马中的Aβ1-40，Aβ1-42的含量[95]

操作前将各样品蛋白进行200倍稀释，按照ELISA说明书进行操作，将酶标板分为标准孔、空白孔、待测样品孔，所有反应孔均设立3个复孔进行加样，标准7个，依次加入100μl不同浓度的标准品，设空白一个，空白孔加100μl稀释液，待测样品孔分别加入各样品100μl，盖上覆膜，37℃温育2 h弃去液体，甩干，每孔加

A工作液100μl，盖上覆膜，37℃温育1 h；弃去孔内液体，每孔用250μl洗液洗涤

1-2 min，吸去并甩干反应孔内液体，重复清洗3遍；每孔加100μl B工作液，盖上

覆膜，37℃温育30 min；弃去孔内液体，甩干，重复清洗反应板5次；每孔加底物

溶液90μl，加盖覆膜，37℃避光显色15 min，每孔加50μl终止液，此时反应液颜色呈黄色；用酶标仪在450 nm波长处测量各孔光密度值；使用SoftMax Pro v5.0.1软件，计算每个样品Aβ1-40，Aβ1-42浓度。

#### 1.2.6 miRNA29、*BACEmRNA*的检测

##### （1）总RNA的提取

称取于-80℃保存的大鼠脑皮质或海马组织0.1mg，加入1 mlTrizol，利用超声波碎细胞仪将组织破碎呈匀浆；室温条件下放置5分钟，向以上溶液中加入0.2ml氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15秒，室温放置3分钟；于4℃，12000转/分，离心15分钟，样品分成三层：红色有机相，中间层和上层无色水相，RNA主要在水相中，把将上层水相转移到一个新的RNase-Free离心管中；在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇，颠倒混匀，室温放置10分钟；4℃，12000转/分，离心10分钟，弃上清。沉淀为总RNA，加入75%乙醇（用无RNase的水配制）洗涤沉淀；每使用1mlTRIzon用1ml75%乙醇对沉淀进行洗涤；4℃，12000转/分，离心3分钟，小心吸弃上清，室温放置3分钟，晾干。加入30μl无RNase的水，充分溶解RNA。

##### （2）总RNA浓度测定[95]

取5μl RNA溶液，用无RNase水100倍稀释，以无RNase水作为空白对照，用紫外分光光度计测定在260nm 处的光密度值。用紫外分光光度计测定在260 nm、

280nm处的光密度值，并计算OD260/OD280比值。纯RNA样品的OD260/OD280应在

1.8-2.0。总RNA浓度计算公式为：RNA（μg/ml）=A260光密度值×40×稀释倍数/1000，无RNase水调整各组核酸浓度基本一致。得到的RNA保存在-80℃，待用。

##### （3）miRNA29a\*，miRNA29b2，miRNA29c1，miRNA29c2反转录反应反转录反应50μl体系：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reagent | 体积 | 终浓度 |
| RNA 模板 2μg | 1μl |  |
| RT 引物工作液（62.5nM） | 4μl | 5nM |
| RNase-free dH2O | 19μl |  |

终浓度为5nM，以上反应体系混匀后，瞬时离心，70℃，10min，然后冰浴2min，

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reagent | 体积 | 终浓度 |
| RT buffer 5× | 10μl | 1× |
| DNTP mix(2.5nM) | 4μl | 0.2mM |
| RNase intribitor(40u/μl) | 1μl |  |
| RT ase(200 u/μl) | 1μl |  |
| RNase-free dH2O | 至 50μl |  |

再加入以下试剂：

反应体系混匀后，42℃，60min，70℃，10min，反应结束后，将cDNA产物取出快速置冰上冷却。

##### （4）miRNA29a\*，miRNA29b2，miRNA29c1，miRNA29c2扩增反应

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reagent | 体积 | 终浓度 |
| SYBR Green Mix | 22.5μl | 1× |
| RT product | 2μl |  |
| Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Forword Primer(5μM) | 5μl | 500nM |
| Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Reverse Primer(5μM) | 5μl | 500nM |
| RNase-free dH2O | 至 50μl |  |

Bulge-LoopTM qRT-PCR反应体系

PCR反应设置条件为：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 循环 | 步骤 | 温度 | 时间 | 内容 |
| 1× | 预变性 | 95℃ | 20sec | 起始模板变性 |
|  | 变性 | 95℃ | 10sec | PCR 模板变性 |
| 40× | 退火 | 60℃ | 20sec | 退火 |
|  | 延伸 | 70℃ | 10sec | 延伸 |

循环结束后进行融解曲线分析，检测温度为70℃-95℃，升温速率为0.4℃/次，恒温时间为1 sec。

##### （5）miRNA29a，miRNA29b1反转录反应反转录反应50μl体系：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reagent | 体积 | 终浓度 |
| RNA 模板 2μg | 1μl |  |
| 2.5u/μl polyA polymerase | 2μl |  |
| RT ase mix | 2μl |  |
| 5×PAP/RT buffer | 5μl | 1× |
| RNase-free dH2O | 19μl |  |

37℃，60min，混匀离心后进行反转录，85℃，5min，所有操作与冰上进行，反转录产物扩增前进行稀释。

##### （6）miRNA29a，miRNA29b1PCR扩增反应扩增反应20μl体系：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reagent | 体积 | 终浓度 |
| All-in-one qPCR Mix | 10μl | 1× |
| All-in-oneTM miRNA RT qPCRPrimer  （2μM） | 2μl | 200nM |
| Universal Adaptor PCRPrimer (2μM) | 2μl | 200nM |
| First-stand cDNA(1:5 倍稀释) | 2μl |  |
| 5×ROX Reference Dye | 0.4μl | 1× |
| RNase-free dH2O | 至 20μl |  |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 循环 | 步骤 | 温度 | 时间 | 内容 |
| 1× | 预变性 | 95℃ | 10min | 起始模板变性 |
|  | 变性 | 95℃ | 10sec | PCR 模板变性 |
| 40× |  |  |  |  |
|  | 退火 | 58℃ | 20sec | 退火 |
|  | 延伸 | 72℃ | 10sec | 延伸 |

PCR扩增条件：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 检测温度 | 升温速率 | 恒温时间 | 检测 |
| 65℃-95℃ | 0.4℃/次 | 6sec/次 | 是 |
| 30℃ |  | 10sec | 否 |

循环结束后进行融解曲线分析，条件为：

##### （7）*BACEmRNA*反转录反应反转录体系：

|  |  |
| --- | --- |
| Reagent | 体积 |
| Total RNA | 3 μl |
| 5×PrimeScript Buffer | 4μl |
| PrimeScript RT Enzyme Mix | 1μl |
| Oligo dT primer | 1μl |
| Random 6 mers | 1 μl |
| RNase Free dH2O | 至 20μl |

反转录反应条件：37°C，15 min；85°C，5 sec

##### （8）*BACEmRNA* PCR扩增反应

|  |  |
| --- | --- |
| Reagent | 体积 |
| SYBR Premix Ex Taq II | 10 μl |
| 反转录产物 | 2 μl |
| 上游引物 | 1μl |
| 下游引物 | 1μl |
| ROX Reference Dye II | 0.4 μl |
| RNase Free dH2O | 至 20μl |

扩增反应20μl体系：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 循环 | 步骤 | 温度 | 时间 | 内容 |
| 1× | 预变性 | 95℃ | 30sec | 起始模板变性 |
|  | 变性 | 95℃ | 5sec | PCR 模板变性 |
| 40× | 退火 | 60℃ | 30sec | 退火 |
|  | 延伸 | 72℃ | 10sec | 延伸 |

PCR扩增条件：

循环结束后进行融解曲线分析，95°C，15 sec；60°C，1 min；95°C，15 sec。所有扩增实验，每个样品的目的基因和内参基因都做3复孔，得到每个样本的熔

解曲线和循环阈值（Ct值）。采用2-ΔΔCt计算相对定量方法分析各基因表达情况。

#### 1.2.7 BACE的检测

（1）脑皮质和海马中总蛋白的提取方法见1.2.5 （1）

（2）蛋白定量方法见1.2.5 （2）

（3）蛋白印迹

将蛋白样品中加入等体积的2×样品缓冲液，煮沸5 min，待用。配制10%的分离胶和5%的积层胶，根据蛋白浓度确定上样体积，每孔上样量为20μg，蛋白在积层胶内以80V 的电压进行电泳，当蛋白电泳至分离胶与积层胶分界处时，增大电压至

120V，保持恒定电压至蛋白完全电泳到分离胶下缘；将电泳完毕的分离胶，于400mA恒定电流的作用下进行转膜，70 min，将蛋白完全转移至PVDF膜上；PVDF膜室温条件下于常温下、在摇床上封闭120 min；根据预染marker条带的相应位置，将目标条带位置的膜剪下，加入BACE单克隆抗体或者β-actin单克隆抗体（抗体滴度均为1: 2000），4℃冰箱中过夜；0.02MPBST洗膜，15min，4次；加入二抗（抗体滴度为1: 2000），37℃温箱中孵育1h；0.02MPBST洗膜，15min，4次；用ECL超敏发光液进行化学发光，在使用前将A液和B液等量混合，混合后尽快使用；在X光胶片盒内平铺一张面积大于膜的保鲜膜，下层使用胶带将其固定在暗盒内使其折起来完全包裹PVDF膜，；用镊子取出PVDF膜，置于胶片盒内保鲜膜上，滴加发光液，折叠保鲜膜，去除气泡和褶皱；在暗室内放入X光胶片进行曝光，然后于洗片机中进行显影、冲洗和固定。

（4）结果扫描计算

使用扫描仪将显影胶片进行扫描，采用捷达801系列凝胶电泳图像分析系统对Western-blot结果条带进行分析，然后计算待测蛋白与β-actin光密度(IOD)的比值，为该样品中BACE的相对表达量。

### 1.3 统计方法

所有结果均采用均数±标准差（*x*±*s*）表示，应用SPSS17.0统计软件对数据进行单因素方差分析（ANOVA），相关分析采用pearson相关分析，以*P*<0.05作为差异有统计学意义的标准。

## **2** 结 果

### 2.1 实验动物基本情况

#### 2.1.1 动物染毒期间表现

实验期间每日对动物进食、进水、动物精神状态、行为、有无死亡等基本情况进行观察。在染毒过程中，对照组生长发育情况良好，未出现任何异常表现；高剂量组大鼠出现进和进水减少，活动逐渐减少，昏睡等表现。随着染毒时间延长，高剂量组

大鼠皮毛欠光滑、光泽度变差，反应变迟钝，运动减少，并有少数表现有烦躁、易惊，且出现1只动物死亡；低、中剂量组状态介于对照和高剂量组之间，未出现烦躁表现、也没有出现死亡；所有染毒动物腹腔注射部位皮肤正常，未出现红肿、鼓包、溃烂等变化。

#### 2.1.2 动物体重及脑体系数变化

经多组比较的单因素方差分析，对照组与低、中、高剂量组动物体重无显著性差异(F(3, 38) =12.191，*P*> 0.05)。与对照组相比，低、中、高剂量组动物的脑体系数无显著性差异(F(3, 38) =0.157，*P*> 0.05)。见表1-1，图1-1-1，1-1-2。

表 1-1 染铝大鼠体重及脑体系数的变化( xs )

| 分组 | 动物数 | 体重（g） | 脑体系数（%） |
| --- | --- | --- | --- |
| 对照组 | 10 | 474.37±53.65 | 0.43±0.06 |
| 低剂量组 | 10 | 451.44±26.88 | 0.43±0.03 |
| 中剂量组 | 10 | 449.19±30.67 | 0.43±0.05 |
| 高剂量组 | 9 | 445.33±40.03 | 0.43±0.03 |

注：\*表示与对照组比较，*P*<0.05。

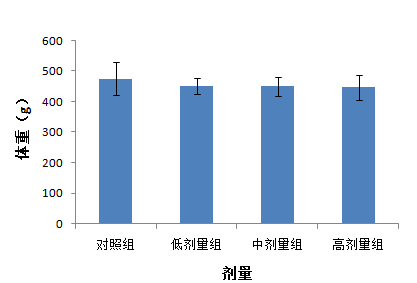


图 1-1-1 染铝大鼠体重变化

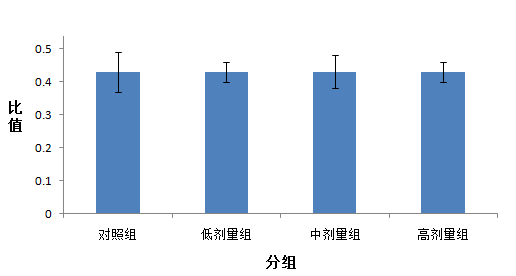


图 1-1-2 各剂量组大鼠脑体系数

### 2.2 染铝大鼠血铝、脑皮质和海马铝水平

随着染毒剂量的不断增加，染毒剂量组大鼠血铝明显升高(F(3, 31) = 212.79，

*P*<0.05）。低、中、高剂量组的血铝水平，较对照组相比明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；染毒剂量脑皮质中铝含量明显升高（F(3, 31) = 212.79，*P*<0.05），在低、中、高剂量组，较对照组明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；染毒剂量脑海马中铝含量明显升高（F(3, 31) =265.09，*P*<0.05）大鼠脑海马中铝含量在低、中、高剂量组，较对照组明显升高，差异均具有统计学意义（*P*<0.05）。见表1-2，图1-2-1，1-2-2，1-2-3。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 表 | -2 染铝大鼠血铝 | 、脑铝水平（ *x*  *s* ） |  |
| 分组 | 动物数 | 血铝(μg/l) | 皮质铝(ng/g) | 海马铝(ng/g) |
| 对照组 | 8 | 47.76±6.58 | 12.11±1.42 | 11.67±1.04 |
| 低剂量组 | 8 | 92.05±5.63\* | 31.40±5.74\* | 51.72±6.04\* |
| 中剂量组 | 8 | 111.74±5.88\* | 72.36±4.79 | 86.92±5.38\* |
| 高剂量组 | 8 | 165.50±9.79\* | 93.37±3.04\* | 106.24±6.18 |

1

注：\*与对照组相比，*P*<0.05

?

图 1-2-1 染铝大鼠血铝水平

?

图 1-2-2 染铝大鼠脑皮质中铝水平

?

图 1-2-3 染铝大鼠脑海马中铝水平

### 2.3 染铝大鼠脑皮质和海马内Aβ的水平

#### 2.3.1 染铝大鼠脑皮质中Aβ的水平

随染毒剂量的增高，皮质内Aβ总量（Aβ1-40和Aβ1-42总和）增高(F(3, 31) =3.439，

*P*<0.05），与对照组相比，高剂量组Aβ总量增高有统计学意义（*P*<0.05）；其中Aβ1-40含量变化不明显，与对照组相比，在各染铝组没有统计学意义（F(3, 31) =0.880，*P*> 0.05）；各染铝组Aβ1-42含量较对照组有显著增高（F(3, 31) =6.422，*P*<0.05），与对照组相比，皮质内高剂量组增高有统计学意义（*P*<0.05）。见表1-3，图1-3-1，1-3-2，1-3-3。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 表 1-3 | 染铝大鼠脑皮质中 | Aβ的水平(pg/ml)( | *x* |  *s* ) |
| 分组 | 动物数 | 血铝(ngm/l) | 皮质铝(ng/g) |  | 海马铝(ng/g) |
| 对照组 | 8 | 47.76±6.58 | 12.11±1.42 |  | 11.67±1.04 |
| 低剂量组 | 8 | 92.05±5.63\* | 31.40±5.74\* |  | 51.72±6.04\* |
| 中剂量组 | 8 | 111.74±5.88\* | 72.36±4.79 |  | 86.92±5.38\* |
| 高剂量组 | 8 | 165.50±9.79\* | 93.37±3.04\* |  | 106.24±6.18 |

注：\*表示与对照组相比，*P*<0.05

?

图 1-3-1 铝大鼠脑皮质中Aβ1-40的水平

?

图 1-3-2 染铝大鼠脑皮质中Aβ1-42的水平

?

图 1-3-3 染铝大鼠脑皮质中Aβ总量

#### 2.3.2 染铝大鼠脑海马中Aβ的水平

随染毒剂量的增高，海马内Aβ总量增高(F(3, 31) =3.621，*P*<0.05)，与对照组相比，在中、高剂量组Aβ总量增高有统计学意义（*P*<0.05）；其中Aβ1-40含量变化不明显，与对照组相比，在各染铝组没有统计学意义（F(3, 31) =1.590，*P*>0.05）；而Aβ1-42含量则在各染铝组较对照组出现显著升高（F(3, 31) =29.908，*P*<0.05），低、中、高剂量组Aβ1-42含量增高均有统计学意义（*P*<0.05）。见表1-4，图1-4-1，1-4-2，1-4-3。

表 1-4 染铝大鼠脑海马Aβ的表达(pg/ml)（xs ）

| 分组 | 动物数 | Aβ1-40 | Aβ1-42 | Aβ 总 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 对照组 | 9 | 77.29±10.05 | 9.79±7.44 | 87.08±10.68 |
| 低剂量组 | 9 | 71.52±9.24 | 16.12±13.67 | 87.64±20.06 |
| 中剂量组 | 9 | 72.34±4.41 | 23.60±18.63 | 95.94±18.93 |
| 高剂量组 | 9 | 69.55±6.30 | 51.02±20.90\* | 120.58±23.65\* |

注：\*表示与对照组相比，*P*<0.05

?

图 1-4-1 染铝大鼠脑海马中Aβ1-40的水平

?

图 1-4-2 染铝大鼠脑海马中Aβ1-42的水平

?

图 1-4-3 染铝大鼠脑海马中Aβ总量

### 2.4 染铝大鼠脑皮质和海马内*BACEmRNA*和BACE蛋白表达的变化

#### 2.4.1 大鼠脑皮质和海马内*BACEmRNA*表达的变化

随着染毒剂量的增高，皮质和海马内*BACEmRNA*呈升高趋势（皮质F（3，

31）=11.429，*P*<0.05；海马F(3, 31) =46.697，*P*<0.05)。与对照组相比，在大鼠脑皮质内，低剂量组*BACEmRNA*增高没有统计学意义（*P*> 0.05），中、高剂量组*BACEmRNA*增高均有统计学意义（*P*<0.05）；在大鼠脑海马内，*BACEmRNA*增高在各染毒剂量组均有统计学意义（*P*<0.05）。见表1-5，图1-5。

表 1-5 BACEmRNA在大鼠脑皮质与海马中的表达量（xs ）

| 分组 | 动物数 | 皮质 | 海马 |
| --- | --- | --- | --- |
| 对照组 | 8 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 低剂量组 | 8 | 1.05±0.14 | 1.15±0.12\* |
| 中剂量组 | 8 | 1.10±019\* | 1.21±0.14\* |
| 高剂量组 | 8 | 1.27±0.25\* | 1.34±0.19\* |

\*表示与对照组相比，*P*<0.05

?

图 1-5 BACEmRNA在大鼠脑皮质与海马中的表达量

#### 2.4.2 大鼠脑皮质和海马内BACE蛋白表达的变化

随着染毒剂量的增高，皮质和海马内BACE 蛋白成升高趋势（皮质内F（3，

31）=62.200，*P*<0.05；海马内F(3, 31) =114.358，*P*<0.05)。与对照组相比，在大鼠脑皮质内，低剂量组BACE蛋白增高没有统计学意义，中、高剂量组BACE蛋白增高均有统计学意义（*P*<0.05）；在大鼠脑海马内，BACE蛋白增高在各染毒剂量组均有统计学意义（*P*<0.05）。见表1-6，图1-6-1, 1-6-2. BACE蛋白与Aβ总量相关，

（皮质中R=0.618, P<0.01, 海马中R=0.796, P<0.01）；且BACE蛋白与Aβ1-42相关（皮质中R=0.608, P<0.01海马中R=0.804, P<0.01）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 1-6 | BACE 在大鼠脑皮质 | 与海马中的表达量( | *x* |  *s* ) |
| 分组 | 动物数 | 皮质 |  | 海马 |
| 对照组 | 8 | 1.23±0.17 |  | 1.17±0.14 |
| 低剂量组 | 8 | 1.30±0.13 |  | 1.41±0.12\* |
| 中剂量组 | 8 | 2.04±0.25\* |  | 1.95±0.13\* |
| 高剂量组 | 8 | 2.36±0.09\* |  | 2.43±0.09\* |

注：\*表示与对照组相比，*P*<0.05。

?

图 1-6-1 BACE在大鼠脑皮质与海马中的表达

?

图 1-6-2 BACE在大鼠脑皮质与海马表达量

### 2.5 染铝大鼠脑皮质和海马中miRNA29的表达

#### 2.5.1 染铝大鼠脑皮质和海马中miRNA29a，miRNA29b1的表达

在皮质和海马内，miR29a均呈现降低趋势（皮质内F(3, 31) =10.360，海马内F（3，

31）=29.339，*P*<0.05）。在皮质和海马内，miR29b1均呈现降低趋势（皮质内F（3，

31) =21.745，海马内F(3, 31) =13.535，*P*<0.05)。在皮质和海马内，与对照组相比，miR29a, miR29b1在低，中剂量组升高无统计学意义（*P*> 0.05），高剂量组升高有统计学意义（*P*<0.05）。见表1-6，图1-6-1,1-6-2. 且经过相关分析，在皮质内，miR29a与*BACEmRNA*及BACE蛋白均有显著的相关性（r=-0.991, -0.987, *P*<0.05），miR29b1与*BACEmRNA*及BACE蛋白均有显著的相关性（r=-0.969, -0.992, *P*<0.05）；在海马内，miR29a与*BACEmRNA*及BACE蛋白均有显著相关性（r=-0.963，-0.981，

*P*<0.05），miR29b1与*BACEmRNA*及BACE蛋白均有显著相关性（r=-0.983，-0.991，

*P*<0.05）。见表1-7，图1-7-1，1-7-2.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 | 1-7 染铝 | 大鼠脑皮质和海马中 m | iR29a, miR29b1 的 | 表达（ *x*  *s* ） |  |
| 分组 | 动物数 | mi29a(皮质) | mi29a(海马) | mi29b1(皮质) | mi29b1(海马) |
| 对照组 | 8 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 低剂量组 | 8 | 0.85±0.13 | 0.87±0.25 | 0.89±0.18 | 0.99±0.33 |
| 中剂量组 | 8 | 0.71±0.22 | 0.67±0.17 | 0.62±0.21 | 0.69±0.04 |
| 高剂量组 | 8 | 0.35±0.07\* | 0.24±0.07\* | 0.25±0.12\* | 0.37±0.11\* |

注：\*表示与对照组相比，P<0.05。

?

图 1-7-1 染铝大鼠脑皮质和海马中miR29a的表达

?

图 1-7-2 染铝大鼠脑皮质和海马中miR29b1的表达

#### 2.5.2 染铝大鼠脑皮质和海马中miR29a\*，miRb2，miRc1，miRc2的表达

在皮质和海马内，miR29a\*呈现降低趋势（皮质内F(3, 31) =37.645，海马内F(3, 31) =42.948，*P*<0.05）；在皮质和海马内，miRb2呈现降低趋势（皮质内F（3，

## 31) =101.421，海马内F(3，31) =135.308，*P*<0.05）；在皮质和海马内，miRc1均呈现降低趋势（皮质内F(3，31) = 35.798，海马内F(3，31) = 31.797，*P*<0.05）；在皮质和海马内，miRc2均呈现降低趋势（皮质内F(3，31) =78.654，海马内F(3，31) =91.306，*P*<0.05）；在皮质和海马内，各染毒组miR29a\*，miRb2，miRc1，miRc2较对照组降低均有统计学意义（*P*<0.01）；但经过相关分析，在皮质内miR29a\*，miRb2，miRc1，miRc2均与*BACEmRNA*及BACE蛋白无相关性（r=-0.238，-0.261，*P*> 0.05；r=-0.235，

-0.238，*P*> 0.05；r=-0.216，-0.297，*P*> 0.05；r=-0.237，-0.296，*P*> 0.05），在海马内

miR29a\*，miRb2，miRc1, miRc2均与*BACEmRNA*及BACE蛋白无相关性（r=-0.332,

-0.317, *P*> 0.05; r=-0.323, -0.317, *P*> 0.05; r=-0.404, -0.379, *P*> 0.05; r=-0.370, -0.353,

*P*> 0.05）。见表1-8，1-9，图1-8，1-9.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 1- | 8 染铝 | 大鼠脑皮质中 miR | 29A\*, miRb2, mi | Rc1, miRc2 的表达( | *x* |  *s* ) |
| 分组 | 动  物数 | miR29a\* | miR29b2 | miR29c1 |  | miR29c2 |
| 对照组 | 8 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |  | 1.00±0.00 |
| 低剂量组 | 8 | 0.73±0.37 | 0.07±0.02\* | 0.03±0.02\* |  | 0.06±0.04\* |
| 中剂量组 | 8 | 0.67±0.43 | 0.06±0.03\* | 0.03±0.01\* |  | 0.03±0.01\* |
| 高剂量组 | 8 | 0.22±0.15\* | 0.01±0.005\* | 0.006±0.001\* |  | 0.008±0.001\* |

注：\*表示与对照组相比，*P*<0.05

?

图 1-8 染铝大鼠脑皮质中miR29a\*，miRb2，miRc1，miRc2的表达

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 1-9 | 染铝大 | 鼠脑海马中 miR29a\* | ，miRb2，miRc1， | miRc2 的表达( | *x* |  *s* ) |
| 分组 | 动物数 | miR29a\* | miR29b2 | miR29c1 |  | miR29c2 |
| 对照组 | 8 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |  | 1.00±0.00 |
| 低剂量组 | 8 | 0.25±0.08\* | 0.15±0.0\* | 0.23±0.02\* |  | 0.17±0.02\* |
| 中剂量组 | 8 | 0.17±0.05\* | 0.08±0.03\* | 0.04±0.00\* |  | 0.02±0.007\* |
| 高剂量组 | 8 | 0.17±0.06\* | 0.07±0.003\* | 0.01±0.001\* |  | 0.01±0.006\* |

注：\*表示与对照组相比，*P*<0.05。

?

图 1-9 染铝大鼠脑海马中miR29a\*，miRb2，miRc1，miRc2的表达

## **3** 讨论

铝是一种慢性的、具有蓄积性的神经毒物，可以引起人群以及动物学习记忆功能功能的明显下降，而且与神经退行性的疾病阿尔茨海默病（Alzheimer's Disease, AD）等有着密不可分的关系。它是这些损伤和疾病的重要环境因素[1, 2, 3]。虽然铝对神经系统的毒性非常之明确，但其损伤的很多机制仍不是非常明确。因此选择合适的铝制剂进行动物实验，对于研究铝的神经毒性十分重要，课题组以往选择三氯化铝进行动物实验发现其酸性极大，对于动物的刺激性损伤非常明显，动物注射部位出现红肿、鼓包、溃烂，甚至可引起腹部肠道粘连等。麦芽酚铝是一种呈中性的含铝复合物，Al(mal) 3在生理条件的pH值时即能形成亚稳溶液，然后释放出大量Al3+，有利于进行铝神经毒性的相关研究[95]。且麦芽酚也是人类饮食中较为常见的一种成分，它为蔗糖水解以及淀粉热降解过程中形成的副产物[95]，在大豆、咖啡以及烘烤的谷类食品中广泛存在。由于麦芽酚对铝具有极高的亲和力，能够和铝在胃肠道中形成麦芽酚铝，也提示麦芽酚铝在体内存在的可能性。因此，在本课题中选择麦芽酚铝作为铝制剂进行造模，虽然动物出现了毛皮色泽等一些差异，但从注射部位皮肤，腹部变化，动物体重增长，及脑体比重等方面均没有明显差异。发现Al(mal) 3对动物机体刺激性较小，是适合的研究制剂。

铝作为一种慢性神经性毒物，其危害的产生基础是铝可以在生物体内产生蓄积作

用[35]。血铝一直被认为是反映铝接触情况的指标，Akila等人检测离退休10年左右，从事铝铸造的职业人群的血铝，结果发现这些人群的血铝浓度还是明显高于对照人群约3倍左右[36]。课题组前期研究显示铝作业退休工人脱离铝接触7年左右后，测定其血铝浓度，仍能在一定程度上反映其体内铝负荷情况。在动物实验中，课题组前期对大鼠进行腹腔注射铝后，发现其血铝明显升高。另外，食物中添加铝，随着时间的延长和剂量的增加，小鼠血铝水平也明显升高。这些研究结果说明了血铝在一定程度上可以反映铝接触的情况。

铝作为阿尔茨海默病的环境因素之一，虽这些患者多数未发现有血铝的明显升高，但对其尸体进行解剖检发现，老年斑以及神经纤维缠结中均可以检测到有铝的存在，且脑铝含量较年轻人和同龄非痴呆者有明显升高[37, 95]。中、重度AD患者脑海马铝含量出现明显升高[38]。Walton等学者研究发现在AD患者脑海马神经元可以检测到铝的存在，而且铝在AD患者神经病变中具有明显的增强作用[39, 95]。有研究证实脑内铝蓄积可以诱发神经变性，诱导AD发生，减少铝接触可以减少AD的发生[37]。因此，脑铝水平更能反映铝在脑内蓄积和对神经系统损伤的情况，该检测方法在动物实验中也更容易实现。研究显示，慢性麦芽酚铝染毒小鼠可以导致脑铝含量升高[40,95]。[Huh JW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Huh%20JW%22%5BAuthor%5D)等制作大鼠动物模型也发现，大鼠饮用含100μM Al(mal) 3的饮水1年后，其脑铝含量也出现了明显的升高[41]。研究还发现腹腔注射AlCl3可以导致大鼠脑铝含量的明显增加[42]。课题组前期研究在食物中添加铝，随着时间的延长和剂量的增加，小鼠脑铝水平也明显升高；腹腔注射麦芽酚铝引起大鼠脑内铝含量增高。

本次课题研究结果显示，随着染毒剂量的不断增加，染毒剂量组大鼠血铝明显升高。低、中、高剂量组的血铝水平较对照组明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；脑皮质和脑海马中铝含量在低、中、高剂量组较对照组明显升高，差异有统计学意义

（*P*<0.05）。与之前研究结果相一致，该结果提示，亚慢性腹腔注射麦芽酚铝可以引起铝在大鼠体内发生蓄积，在血铝和脑铝水平上均可体现；亦说明亚慢性接触铝后，短期内使用血铝和脑铝指标都可以反映体内铝负荷；该结果也提示此次实验动物模型中铝在体内有显著的蓄积，这为后期实验顺利进展的奠定了基础。

Aβ主要包括可溶性的Aβ1-40和难溶性的Aβ1-42两种成分，它们是含有40-43个氨基酸的多肽。该类多肽是由APP经过β分泌酶和γ分泌酶连续裂解而产生，并会在神经细胞外发生沉积。正常情况下，有少量的Aβ存在于脑脊液和血浆中及脑组

织中。对机体没有危害，但当各种原因导致Aβ局部浓度增加，出现Aβ聚集，斑块形成时，就会引起神经系统退行性变[95]。研究证实，聚集态Aβ对神经系统具有明显毒性作用[43]。Aβ1-42和Aβ1-40作为Aβ的两种主要成分，其中Aβ1-42由于更易聚集形成淀粉样蛋白，而它也是形成老年斑的主要成分，在AD发病机制中占有更重要的作用。而Aβ1-40则更容易溶解和清除，在老年斑中含量极低，在AD的发病中的作用并不明显。GalBitan等的实验结果显示Aβ1-42由于具有Ile-41残基，因此较Aβ1-40易于形成寡聚体，所以认为Aβ1-42可能在淀粉样蛋白的沉积过程中起主要作用。大量研究表明，这种聚集态的Aβ过度产生和蓄积在AD发病过程中起关键作用，可能是各种因素导致AD的共同途径[21, 95]。

研究也证实铝与Aβ 的沉积及老年斑的形成具有密不可分的联系。1973 年，

Crapper发现AD患者老年斑中有铝的蓄积。随后其他学者在AD患者的老年斑中也发现有铝的沉积[44]。研究还表明铝可以引起动物脑内出现老年斑的早期改变Aβ蓄积。

Yun等将铝和D-半乳糖联合作用于小鼠，结果发现小鼠皮层和海马的Aβ沉积出现了增多[20]。House等研究也证明铝可以诱导大鼠脑内Aβ的聚集[33]。体外实验发现铝可以使神经母细胞瘤细胞及PC12细胞系中Aβ的生成增多[34]。在本课题中研究结果发现，随着染铝剂量的升高，皮质和海马内Aβ总量（Aβ1-40和Aβ1-42总和）增高，在海马内更为明显；其中主要升高的成分为Aβ1-42，Aβ1-42在皮质和海马内均有显著增高（*P*<0.05），同时结果也显示Aβ1-40变化不明显，在皮质和海马内各染毒组与对照组相比没有统计学意义（*P*> 0.05）。因此，该结果也证实，麦芽酚铝可以引起动物脑内Aβ增多和沉积，而这种沉积是以不溶性的Aβ1-42为主，Aβ1-42是神经系统各类损伤的诱因之一，它也是老年斑组成的主要成分。这也证实了铝的损伤类似于

AD的老年斑病理变化，也是铝成为AD环境致病因素的原因之一。而其中Aβ1-40

升高不明显，可能与其可溶性和清除有关。

BACE1是β-分泌酶的一种类型，它具有β-分泌酶的全部活性，在Aβ产生过程中起到关键酶和限速酶和限速酶的作用[23, 45]，在整个Aβ生成过程中具有至关重要的作用。它是一类由501个氨基酸组成的I型跨膜天冬氨酸蛋白酶，体内实验和外实验均证实

BACE1具有β-分泌酶已知的所有特征和功能。BACE1在很多类型的细胞中广泛表达，在原代培养的脑细胞中其活性较在外周细胞、胶质细胞中高[95]。BACE1主要结构域包括：前蛋白(22～45)、信号肽(1～21)、跨膜区(461～477)、成熟蛋白的催化区（46～

460）以及C末端(478～501)。BACE1在其催化区有两个活性的位点，分别位于93～96和289～292氨基酸残基的位置，两个活化位点都包括有天冬氨酸蛋白酶的高度保守序列DT(S) GS（T），是BACE1结合和催化APP水解的活性位点[46]，任何一个活性位点的突变都将会使酶失去活性[95]。

研究发现BACE1过度表达可以使Aβ产生增多，相反，如果抑制BACE1的表达，

Aβ的产生则会明显的减少。在人和动物正常老化的过程中，BACE1表达会有轻微的增加，但在AD患者脑中BACE1的表达和活性会有明显的、进一步的增加，且脑内同样会有Aβ水平的升高及老年斑的形成[47,95]。在AD病人脑内BACE1 *mRNA*水平明显增加，且BACE1活性升高与脑内Aβ1-42的沉积量明显相关[23]。在有Aβ沉积的额叶皮层区，BACE1的表达量是无Aβ沉积的小脑区的3倍之多[48]。对AD患者进行尸体解剖还发现，脑中β-分泌酶的mRNA与蛋白表达明显增加，β-分泌酶的活性明显增高[49,95]。有学者研究发现，铝可引起记忆损害和皮质、海马Aβ和BACE1表达增强[48,95][。有研究发现](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&amp;Cmd=Search&amp;Term=%22Prakash%20A%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus)慢性铝暴露可以诱导体内Aβ含量增加[50]。在本课题中，结果显示，随着染毒剂量的增高，皮质和海马内*BACEmRNA*，BACE蛋白成升高趋势（*P*<0.05）。且BACE与Aβ总量以及Aβ1-42均有显著相关性（*P*<0.05），结果同样提示，铝可以从基因和蛋白水平影响BACE的表达，从而引起Aβ，尤其是Aβ1-42在脑内的沉积。

miR29是一类在不同动物、不同组织中均有表达的miRNA，其在进化上保持高度保守。人类细胞中miR29由miR29a、miR29a\*、miR29b1、miR29b2、miR29c1 和

miR29c2组成。在胚胎期的组织细胞中呈现不表达或低表达，而在生物体成熟组织细胞中则有较为广泛的表达。miR29与人类健康与疾病密切相关，miR29的正常表达是多种正常生物功能维持的基础，miR29在多种肿瘤细胞、心肌梗塞以及散发性阿尔茨海默病等病变组织细胞中表达受抑。在AD患者体内及细胞研究中均发现miR29可以调节BACE的表达。Hébert等[23]也发现，miR29a和miR29b1能够靶向性的抑制神经纤维母细胞瘤细胞中的BACE1表达，miR29a和miR29 b1在HEK293细胞中的过度表达后，会引起内源性BACE1蛋白及其切割产物Aβ表达的表达生成减少；相反，

miR29a和miR29b1的缺失可能会引起BACE1蛋白表达增多，切割Aβ产物的积累。宗园媛等[92]将miR29c转染进入小鼠体内，发现miR29c可以负调控BACE和APP的表达。在本课题中研究发现，接触麦芽酚铝的大鼠脑皮质和海马内miR29a, miR29a\*，miR29b1, miRb2, miRc1, miRc2均呈现降低趋势（*P*<0.01）。且经过相关分析，

在皮质和海马内仅有miR29a, miR29b1与*BACEmRNA*及BACE蛋白呈现显著相关

（*P*<0.05）。而其它各型无论在皮质还是海马中，它们与*BACEmRNA*及BACE蛋白均无相关性。该结果提示，铝可以影响大鼠脑内各型miRNA29，但仅有miR29a，

miR29b1参与影响BACE表达和Aβ的生成以及聚集，而miR29a\*, miR29c ，miR29b2虽然出现了降低，但并没有参与铝影响BACE表达和Aβ的生成的过程和机制，其降低的机制和原因有待进一步研究。

**4**结论

1、麦芽酚铝作为一种蓄积性神经毒物，其可以是动物血铝，脑铝（包括脑皮质和海马）水平明显升高。

2、铝可以使动物脑皮质和海马中Aβ水平出现明显升高，其中升高的主要成分是不溶性的Aβ1-42，而可溶性的Aβ1-40则在脑内变化不明显。

3、铝可以使动物脑皮质和海马中的*BACEmRNA,* BACE蛋白水平明显升高。

4、铝可以影响各型miR29，但仅有miR29a, miR29b1可能参与铝影响

*BACEmRNA,* BACE及Aβ水平的调节。

# 第二部分 **MiR29a, b1**调控**BACE**在铝致Aβ沉积过程中的机制

在生物胚胎期组织细胞不表达或者呈现低表达，而在生物体成熟组织细胞中广泛表达的miR29，与人类的多种疾病密切相关。在人类细胞中，miR29包括miR29a、

miR29b1、miR29b2、miR29c1和miR29c2。在多种肿瘤细胞、心血管疾病、糖尿病与散发性阿尔茨海默病等病变组织细胞中miR29不同亚型的表达均受到抑制。在AD患者体内及细胞实验研究中均发现miR29调节BACE的表达。Hébert等[23]发现miR29a，

miR29b1在HEK293细胞中的过度表达会引起内源性BACE1蛋白及Aβ表达的明显下调，也可以靶向抑制神经纤维母细胞瘤细胞系中的BACE1表达；相反，miR29a，miR29b的缺失则会引起BACE1表达和其切割产物Aβ产物的积累。

在本课题中，第一部分研究结果显示，接触不同剂量麦芽酚铝的大鼠脑皮质和海马内miR29a，miR29a\*，miR29b1，miRb2，miRc1，miRc2均呈现降低趋势（*P*<0.01）。且经过相关分析，发现在皮质和海马内仅有miR29a，miR29b1与*BACEmRNA*及BACE蛋白均显著相关（*P*<0.05）。该结果提示，铝可以影响大鼠脑内各型miR29，但仅有

miR29a，miR29b1参与影响BACE表达和Aβ的生成以及聚集，而在本课题中miR29c虽然出现了降低，但与BACE并无相关性，提示其可能没有参与铝影响BACE表达和Aβ的生成的过程和机制。为了明确miR29a，miR29b1在铝引起脑内Aβ的生成以及聚集中的作用，本实验将miR29a，miR29b1mimics（成熟片段模拟物）通过脂质体转染技术，转染进入PC12细胞，并给予麦芽酚处理，分析观察BACE及Aβ的生成的变化，从而确定miR29a，miR29b1在Aβ的生成以及聚集中的作用机制。

## **1** 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验细胞及其分组

PC12细胞系，获ft西医科大学药学院老师惠赠。根据动物体内实验结果，采用

脂质体转染技术将miR29a mimics或miR29b1 mimics分别转染入细胞内，实验分别分为空白对照组，未转染染毒组，转染阴性对照组和目的基因转染组。其中未转染染毒组分为100μmol/l麦芽酚铝组，200μmol/l麦芽酚铝组，400μmol/l麦芽酚铝组；目的基因转染组包括四组：对照组（给予磷酸盐缓冲液（PBS）），100μmol/l麦芽酚铝组，200μmol/l 麦芽酚铝组，400μmol/l麦芽酚铝组。

#### 1.1.2 主要试剂

（1）DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) /HIGH GLUCOSE(1X)，赛默飞世尔生物化学制品有限公司，（中国北京）；

（2）胰蛋白酶，北京索来宝生物科技有限公司，（中国北京）；

（3）胎牛血清，杭州四季青生物工程材料有限公司，（中国杭州）；

（4）Cell Counting Kit-8试剂盒，同仁化学研究所（日本九州）；

（5）miR29a mimics, miR29b1 mimics, riboFECTTM Reagent，锐博生物科技有限公司，（中国广州）

（6）Lipofectamine®RNAiMAX Reagent，INVITROGEN生命科技（美国加利福尼亚）

其余试剂同第一部分。

#### 1.1.3 主要仪器器材[95]

（1）二氧化碳培养箱，Thermo公司，（美国沃尔瑟姆）；

（2）SW-CJ-2F型超净工作台，安泰空气技术有限公司，（中国苏州）；

（3）KY-I 型空气压缩机，卫星医疗设备制造有限公司，（中国绍兴）；

（4）X71OLYMPUS荧光倒置显微镜，C5060数码照相机，OLYMPUS公司，

（日本东京）；

（5）HH数显恒温水浴锅，金城国胜实验仪器厂，（中国金坛）；

（6）TGL-16G台式离心机，安亭科学仪器厂，（中国上海）；

（7）AB104型分析天平，METTLER TOLEDO有限公司，（中国上海）；

（8）LS-B50L型立式压力蒸汽灭菌器，滨江医疗设备厂，（中国江阴）；

（9）Nefuge 15R高速冷冻离心机，上海力康科学仪器有限公司，（中国上海）；

（10）25cm2细胞培养瓶，6孔板，96孔板，CORNING公司，（美国）；其余仪器同第一部分内容。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 溶液配制

（1）D-hank's溶液：Nacl 4.0g, Kcl 0.2g, NaHPO4.12H2O 0.06g, KH2PO4 0.03g，将各成分溶解于三蒸水中，定容至500ml，进行高压灭菌。待溶液冷却后将0.5g葡萄糖溶于其中，进行抽滤灭菌，分装，4℃储存备用。

##### （2）0.25%胰酶：胰酶0.25 g，溶于100 ml D-Hank’s中，充分溶解后抽滤灭菌，

4℃储存备用。

（3）DMEM细胞培养液；DMEM培养基一袋，NaHCO3 3.7 g，谷氨酰胺100 mg，葡萄糖3.96 g, Hepes 2.831 g，溶解于800ml高压灭菌的三蒸水中，将100 ml胎牛血清、80万单位的青霉素100 mg，100万单位的链霉素100 mg加入其中，搅拌均匀，调节pH值至7.4，用灭菌的抽滤器进行抽滤灭菌，分装，于4存储备用。

##### （4）冻存液：10%DMSO，20%胎牛血清加入到70% DMEM中，配制成1ml

冻存液，使用时临时配制。

##### （5）麦芽酚铝溶液：氯化铝用高压灭菌的三蒸水配制成浓度为20mmol/L的溶液，并将麦芽酚溶解于灭菌三蒸水中，使其终浓度为60mmol/L的溶液，之后将两种溶液等体积混合配制成终浓度为10mmol/L的Al(mal) 3溶液，用NaHCO3调节pH值为7.4。

其余溶液配制同第一部分内容。

#### 1.2.2 细胞培养[94]

##### （1）细胞复苏

将冻存的细胞从-80℃冰箱中取出，立即置于37℃水浴箱中，1min以内水浴快速复温溶解，将冻存管中复温的细胞转移至培养瓶中，加入3ml DMEM培养液，置37℃、饱和湿度、5%CO2的条件下放置培养箱中培养，第二天观察细胞贴壁情况并进行换液。

##### （2）细胞培养

将复苏以后的贴壁细胞进行培养，每日观察其生长情况，待培养液变色即可换液，

2-3天进行一次传代。

##### （3）细胞传代[94，95]

当细胞生长增殖至成为单层细胞后、80%细胞汇合成片，将旧培养液吸弃，用D-hank's清洗2-3次。加入0.25%胰蛋白酶消化液1ml，放置37℃、饱和湿度、5%CO2的培养箱中，放置时间长短决定于胰酶对细胞的消化情况。镜下可观察到细胞质回缩，细胞间隙变大，当细胞被消化后成为悬浮状态时，立刻用加入2 ml含有胎牛血清的培养液进行终止消化。1000r/mim，室温离心3min，弃上清。按1: 3比例进行细胞接种传代，每瓶细胞加入DMEM培养液3ml。放置于37℃、饱和湿度和5%CO2的条件的培养箱中进行培养。

##### （4）细胞冻存

取对数生长期的细胞，0.25%胰酶消化完毕收集后后，1000 r/min室温离心3 min，弃掉上清。每一瓶细胞加入1ml冻存液，封口膜进行封口后，对日期和细胞名称的加以标记，立即放入4℃冰箱中20min，其次放置-20℃冰箱中40min，最后转移至-80℃冰箱保存备用。

##### （5）细胞计数[94]

混匀消化完毕的细胞，吸取几滴细胞悬液加一滴台盼蓝染色，静置2min后，取

1滴从计数板侧面滴入，着色的细胞不作计数，四角大格内的细胞进行计数（计左和计上压线的细胞，细胞团≥2个细胞，按一个细胞计数）。依照以下公式计算浓度：细胞数/ml=四大格细胞总数/4×104×稀释倍数。

#### 1.2.3 脂质体转染

（1）转染前准备将miR29a mimics，或将miR29b1 mimics粉末用RNase-free H2O配制成20μM储存液，分装，-20℃保存，将对数生长期的细胞传代于96孔板或者6孔板内，当细胞融合至70%左右时，进行脂质体转染，每个样品设三个平行样。

##### （2）miR29a mimics的转染（使用riboFECTTM Reagent进行转染，6孔板）

1）mimics稀释：用30μl 1×riboFECTTM CP Buffer 稀释10μl 20μM miR29amimics，轻轻混匀。

2）混合液制备：加入12μl riboFECTTM CP Reagent，轻轻吹打混匀，室温孵育

10min。

3）将riboFECTTM CP混合液加入1858μl细胞培养基中，将细胞培养板置于37℃、饱和湿度、5%CO2的条件下放置培养箱中进行培养。

转染体系：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 6 孔板 | 96 孔板 |
| 1×riboFECTTM CP Buffer | 30μl | 6μl |
| RiboFECTTM CP Reagent | 12μl | 0.6μl |
| 完全细胞培养基 | 1858μl | 92.5μl |
| MiR29a mimics | 10μl | 0.5μl |
| 总体积 | 2000μl | 100μl |
| miR29a mimics 终浓度 | 100nM | 100nM |

##### （3）miR29b1 mimics的转染（使用Lipofectamine®RNAiMAX Reagent进行转染）

1）溶液 1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reagent | 96 孔板 | 6 孔板 |
| 无血清及抗生素培养基 | 25μl | 150μl |
| Lipofectamine® RNAiMAX Reagent | 1.5μl | 9μl |

2）溶液 2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reagent | 96 孔板 | 6 孔板 |
| 无血清及抗生素培养基 | 25μl | 150μl |
| MiR b1 mimics | 0.5μl | 10μl |

室温下孵育5min，将上述两种溶液按1: 1比例混合加入细胞中，进行转染，加无血清培养基至2ml。

（4）检测转染效果转染12，24h，48h，72h后分别收集细胞采用RT-PCR检测转染细胞中miR29a, miR29b1的水平。

#### 1.2.4 细胞染毒

细胞转染成功24h后，按实验分组（见第二部分1.2.1）进行染毒。麦芽酚铝的终浓度分别为100μmol/L，200μmol/L，400μmol/L。染毒后24 h收集细胞上液和细胞进行试验。

#### 1.2.5 细胞活力测定（CCK-8法）[94]

取对数生长的细胞，消化后制成细胞悬液，细胞计数，将细胞接种在96孔板内，各孔加入100μl细胞悬液（细胞数量大致约为5-10×104个/ml），放置于37℃、CO2培养箱中培养24h。观察细胞贴壁以及生长状况，按1.2.6（1），（2）所述方法进行转染，转染24h后按照前文分组进行染毒，每个样品设三个平行样。并设对照样和空白样，于37℃、饱和湿度、5%CO2的条件下放置培养箱中培养24 h。在各孔中加入

10μl的CCK8溶液，放置于37℃、饱和湿度、5%CO2的条件的培养箱中进行孵育2h，于450nm波长处测定吸光度值。计算公式：细胞活力（%）=A（加药）-A（空白）

/A0(加药) -A（空白）（A加药：有细胞CCK-8溶液和染铝孔的吸光度；A空白：有培养基和CCK8溶液而没有细胞的孔的吸光度；A0加药：有细胞和CCK8溶液而没有染铝的孔内的吸光度）。

#### 1.2.6 miR29a，miR29b1转染效果的检测

（1）提取细胞总RNA细胞转染24h后，收集细胞，弃掉培养液，每个样品加入0.5mlTRIzon，反复吹打使细胞裂解。

（2）miR29a，miR29b1反转录和扩增反应见第一部分1.2.6

#### 1.2.7 ELISA检测BACE和Aβ含量

（1）BACE的检测细胞染毒后继续放置在37℃、饱和湿度、5%CO2的条件的培养箱中培养24h，消化后于1000转/分，室温条件下离心3min，弃上清。用D-Hanks吹起细胞清洗1次，再次进行离心，弃上清。加入适量的细胞裂解液，吹打使其溶解，置于冰上1h，12000转/分，离心10min,取上清液移入新管，BCA试剂盒检测蛋白浓度，并调节个样品浓度至一致。-80℃保存于冰箱备用。实验前将蛋白进行40倍稀释，

ELISA检测BACE浓度，方法同第一部分1.2中Aβ1-40，Aβ1-42的检测。

（2）Aβ1-40，Aβ1-42的检测细胞染毒24h后，收集细胞上液，用ELISA检测Aβ1-40，Aβ1-42的含量，方法同第一部分1.2中Aβ1-40，Aβ1-42的检测。

#### 1.2.8 *BACEmRNA*的检测

细胞染毒24h后，吸弃培养液，加入适量TRIzon，每10cm2面积需要TRlzon 约

1ml，反复吹打使细胞裂解。其余方法同第一部分1.2中BACEmRNA的检测。

### 1.3 统计分析方法

实验数据采用均数±标准差（*x* *s*

）表示，应用SPSS17.0统计软件对数据

进行单因素方差分析ONE-ANOVA、组间比较用LSD检验，以P<0.05作为差异有统计学意义的标准。

## **2** 结果

### 2.1 转染后不同时点miR29a，miR29b1的表达情况

#### 2.1.1 转染后不同时点miR29a的表达情况

转染后12h、24h、48 h、72 h对PC12细胞内miR29a水平进行检测，结果显示，与转染阴性对照组相比，在12 h时刻，miR29a出现升高，平均升高倍数为93倍，随着时间的延长升高倍数也随之增长，在24h时，平均升高倍数可达695倍，随后细胞中miR29a水平会逐渐降低，当时间到48 h时，miR29a转染细胞中miR29a水平较转染阴性增高的倍数平均为381倍。当时间到72 h时，miR29a转染细胞中miR29a水平较转染阴性增高的倍数平均为102倍。见表2-1，图2-1。

表 2-1 转染后不同时点miR29a的表达情况

| 分组 | 0 h | 12h | 24h | 48 h | 72 h |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2-ΔΔCt 平均值 | 1 | 93 | 695 | 381 | 102 |
| 平均升高倍数 | 1 | 93 | 695 | 381 | 102 |

?

图 2-1 转染后不同时点miR29a的升高倍数

#### 2.1.2 转染后不同时点miR29b1的表达情况

转染后12h、24h、48h、72h对PC12细胞内miR29b1水平进行检测，结果显示，与转染阴性对照组相比，在12 h时刻，miR29b1出现升高，平均升高倍数为103倍；随着时间的延长升高倍数也随之增长，在24h时，平均升高倍数约为798倍，随后细胞中miR29

b1水平会逐渐降低；当时间到48 h时，miR29b1转染细胞中miR29 b1水平较转染阴性增高的倍数平均为387倍；当时间到72 h时，miR29b1转染细胞中miR29 b1水平较转染阴性增高的倍数平均降低为168倍。见表2-2，图2-2。

表 2-2 转染后不同时点miR29 b1的表达情况

| 分组 | 0 h | 12h | 24h | 48 h | 72 h |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2-ΔΔCt 平均值 | 1 | 103 | 798 | 387 | 168 |
| 平均升高倍数 | 1 | 103 | 798 | 387 | 168 |

?

图 2-2 转染后不同时点miR29 b1的表达情况

### 2.2 各组细胞的形态学改变

对照组，转染阴性对照组、转染阳性对照组（转染目的基因miR29a或miR29b1，给予PBS组）细胞生长状态良好，细胞大小一致、均匀，贴壁良好，细胞密集，连接丰富；转染低剂量组有少数死亡细胞，连接减少，其余变化不明显；中剂量组细胞状态稍有变差，细胞数量有减少，细胞贴壁性变差，出现部分细胞皱缩，连接减少；高剂量组细胞数量进一步减少，较多细胞皱缩呈圆形，细胞贴壁不紧，细胞间连接极为松散，变化较为明显。各未转染细胞状态较相应转染组细胞状态差。转染目的基因

miR29a或miR29b1后细胞形态学变化相似。见图2-3。

正常空白对照组100μM Al(mal) 3组×200 倍

?

?

?200μM Al(mal) 3组×200倍400μM Al(mal) 3组×200 倍

阴性转染对照组×200 倍

?

转染对照组×200倍转染+100μM Al(mal) 3组×200 倍

转染+200μM Al(mal) 3组×200倍转染+400μM Al(mal) 3组×200 倍

?

图 2-3 转染及染毒前后神经细胞的形态学变化

### 2.3 各组细胞活力的变化

#### 2.3.1 转染miR29a细胞活力变化

对照组，转染阴性对照组、转染阳性对照组各组细胞活力无明显差别（*P*> 0.05），与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，细胞活力明显降低（F(8, 47) =28.456，

*P*<0.05），与对照组相比，各组降低均有统计学意义；转染染毒组与对照组相比，细胞活力有一定降低（*P*<0.05），低、中剂量组无统计学意义（*P*> 0.05），高剂量组降低有统计学意义（*P*<0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞活力较未转染组细胞活力明显回升（*P*<0.05）。见表2-3-1。

表 2-3-1 转染miR29a各组细胞活力的变化

| 分组 | OD 值 | 抑制率（%） |
| --- | --- | --- |
| 空白对照组 | 1.69±0.08 | — |
| 100 μM Al(mal)3 组 | 1.34±0.06\* | 21.63 |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 1.20±0.08\* | 29.82 |
| 400 μM Al(mal)3 组 | 0.92±0.03\* | 46.19 |
| 转染阴性对照组 | 1.69±0.05 | — |
| 转染阳性对照组 | 1.68±0.07 | 0.59 |
| 转染 miR29a+100 μM Al(mal)3 组 | 1.62±0.04# | 4.14 |
| 转染 miR29a+200 μM Al(mal)3 组 | 1.53±0.09# | 9.46 |
| 转染 miR29a+400 μM Al(mal)3 组 | 1.38±0.04\*# | 18.3 |

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与相同剂量未转染组相比*P*<0.05

#### 2.3.2 转染miR29b1细胞活力变化

各组细胞活力有差异(F(8, 47) =33.654，*P*<0.05)，对照组，转染阴性对照组、转染阳性对照组各组细胞活力无明显差别（*P*> 0.05），与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，细胞活力明显降低，与对照组相比，各组降低均有统计学意义

（*P*<0.05）；转染染毒组与对照组相比，细胞活力有一定降低，低、中剂量组无统计学意义（*P*> 0.05），高剂量组降低有统计学意义（*P*<0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞活力较未转染组细胞活力明显回升（*P*<0.05）。见表2-4。

表 2-4 转染miR29b1各组细胞活力的变化

| 分组 | OD 值 | 抑制率（%） |
| --- | --- | --- |
| 空白对照组 | 1.69±0.08 | — |
| 100 μM Al(mal)3 组 | 1.34±0.06\* | 21.63 |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 1.20±0.08\* | 29.82 |
| 400 μM Al(mal)3 组 | 0.92±0.03\* | 46.19 |
| 转染阴性对照组 | 1.70±0.08 | — |
| 转染阳性对照组 | 1.70±0.11 | — |
| 转染 miR29b1+100 μM Al(mal)3 组 | 1.59±0.10# | 5.92 |
| 转染 miR29b1+200 μM Al(mal)3 组 | 1.57±0.07# | 7.10 |
| 转染 miR29b1+400 μM Al(mal)3 组 | 1.41±0.05\*# | 16.5 |

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与相同剂量未转染组相比*P*<0.05

### 2.4 各组细胞染毒后*BACEmRNA*，BACE水平的变化

#### 2.4.1 各组细胞转染miR29a mimics后*BACEmRNA*，BACE水平的变化

转染miR29a mimics后各组细胞中*BACEmRNA*, BACE水平变化有差异(F(8, 47) =68.678，*P*<0.05，F(8, 47) =79.327，*P*<0.05)，空白对照组，转染阴性对照组细胞*BACEmRNA*, BACE表达水平无明显差别（*P*> 0.05）；与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，*BACEmRNA*，BACE明显升高，与对照组相比，*BACEmRNA，*BACE表达水平各组升高均有统计学意义（*P*<0.05）；转染染毒组与对照组相比，*BACEmRNA*各组差异无统计学意义（P> 0.05），转染阳性对照组、转染低剂量组较空白对照组BACE表达水平出现降低（*P*<0.05），转染中、高剂量组降低无统计学意义（P> 0.05）；转染组细胞中*BACEmRNA,* BACE较未转染组细胞*BACEmRNA*, BACE表达水平明显降低，且差异有统计学意义（*P*<0.05）。见表2-5，图2-5-1，2-5-2。

表 2-5 转染miR29a mimics后细

胞BACEmRNA, BACE

水平的变化表（xs ）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分组 | BACEmRNA  （2-ΔΔCt） | BACE(pg/ml) |
| 空白对照组 | 1.00±0.00 | 563.56±45.41 |
| 100 μM Al(mal)3 组 | 1.57±0.41\* | 635.23±53.54\* |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 2.15±0.56\* | 764.51±67.87\* |
| 400 μM Al(mal)3 组 | 2.78±0.96\* | 879.70±109.64\* |
| 转染阴性对照组 | 1.02±0.15 | 576.67±55.79 |
| 转染阳性对照组 | 0.81±0.09\* | 501.32±45.49\* |
| 转染 miR29a+100 μM Al(mal)3 组 | 0.92±0.36#\* | 509.52±46.87#\* |
| 转染 miR29a+200 μM Al(mal)3 组 | 1.03±0.45# | 578.37±95.39# |
| 转染 miR29a+400 μM Al(mal)3 组 | 1.10±0.80# | 577.35±95.33# |

注：\*表示与对照组相比P<0.05，#表示与相同剂量未转染组相比P<0.05

?

图 2-5-1 转染miR29a mimics后各组细胞染毒后BACEmRNA水平的变化

?

图 2-5-2 转染miR29a mimics后各组细胞染毒后BACE水平的变化

#### 2.4.2 转染miR29b1 mimics转染后*BACEmRNA*，BACE水平的变化

各组细胞中*BACEmRNA*, BACE表达水平表达有差别(F(8, 47) =79.976，*P*<0.05，

F(3, 35) =98.654，*P*<0.05)，空白对照组，转染阴性对照组细胞中*BACEmRNA*, BACE

表达水平无明显差别（*P*> 0.05）；与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，

*BACEmRNA,* BACE明显升高与对照组相比，*BACEmRNA*，BACE表达水平各组升高均有统计学意义（*P*<0.05）；转染染毒各组与对照组相比，*BACEmRNA*各组差异无统计学意义（P> 0.05），转染阳性对照组、转染低剂量组较空白对照组细胞中BACE表达水平出现降低（*P*<0.05），转染中、高剂量组降低无统计学意义（P> 0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞中*BACEmRNA,* BACE较未转染组细胞

*BACEmRNA,* BACE表达水平明显降低，且差异有统计学意义（*P*<0.05）。见表2-6，图2-6-1，图2-6-2。

表 2-6 转染miR29b1 mimics 后

细胞*BACEmRNA,* BACE水平

的变化表（xs ）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分组 | BACEmRNA(2-ΔΔCt) | BACE(pg/ml) |
| 空白对照组 | 1.00±0.00 | 563.56±45.41 |
| 100 μM Al(mal)3 组 | 1.57±0.41\* | 635.23±53.54\* |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 2.15±0.56\* | 764.51±67.87\* |
| 400 μM Al(mal)3 组 | 2.78±0.96\* | 879.70±109.64\* |
| 转染阴性对照组 | 1.01±0.11 | 555.90±55.09 |
| 转染阳性对照组 | 0.95±010\* | 498.17±56.87\* |
| 转染 miR29b1+100 μM Al(mal)3 组 | 0.93±0.08\*# | 508.03±42.17\*# |
| 转染 miR29b1+200 μM Al(mal)3 组 | 1.10±0.35# | 589.90±56.30# |
| 转染 miR29b1+400 μM Al(mal)3 组 | 1.09±0.51# | 589.67±68.35# |

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与相同剂量未转染组相比*P*<0.05

?

图 2-6-1 转染miR29b1 mimics各组细胞后BACEmRNA水平的变化

?

图 2-6-2 转染miR29b1 mimics各组细胞后BACE表达水平的变化

### 2.5 各组细胞染毒后Aβ含量的变化

#### 2.5.1 转染miR29a mimics后Aβ含量的变化

与空白对照组相比，各组细胞上液中Aβ总量有变化(F(8, 47) =85.734，*P*<0.05)，空白对照组，转染阴性对照组细胞上液中Aβ总量无明显差别（*P*> 0.05）；与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，细胞上液中Aβ总量明显升高（*P*<0.05），与对照组相比，Aβ总量各组降低均有统计学意义（*P*<0.05）；转染阳性对照组，转染低剂量组细胞上液中Aβ总量，较空白对照组水平出现降低（*P*<0.05），转染中、高剂量组细胞上液中Aβ总量无统计学差异（*P*> 0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞上液中Aβ总量较未转染组细胞上液中Aβ总量水平明显降低，且差异有统计学意义（*P*<0.05）；其中，与空白对照组相比，各组细胞上液中Aβ1-40含量有变化

（F(8, 47) =67.301，*P*<0.05），转染阴性对照组和未转染低剂量染毒组，与空白对照相比，Aβ1-40含量无显著性差异（*P*> 0.05）；未转染中、高剂量染毒组较对照组细胞上液中Aβ1-40含量升高（*P*<0.05），阳性转染对照组、转染低剂量组较空白对照组相比细胞上液中Aβ1-40含量明显降低（*P*<0.05），转染中、高剂量组细胞上液中Aβ1-40降低无统计学意义（*P*> 0.05）；各转染组较未转染相应剂量组细胞上液中Aβ1-40含量明显降低（*P*<0.05）；与空白对照组相比，各组细胞上液中Aβ1-42有变化(F(8, 47) =98.805，*P*<0.05)，空白对照组，转染阴性对照组细胞上液中Aβ1-42

无明显差别（*P*> 0.05）；与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，Aβ1-42出现明显升高，差异均具有统计学意义（*P*<0.05）；转染阳性对照组，转染低剂量组Aβ1-42较空白对照组水平出现降低（*P*<0.05），中、高剂量组降低无统计学意义

（*P*> 0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞中Aβ1-42较未转染组细胞Aβ1-42

水平明显降低，且差异具有统计学意义（*P*<0.05）。见表2-7，图2-7-1，2-7-2, 2-7-3。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 2-7 转 | 染 miR29a mimics 后各组 | Aβ含量的变化表( | *x* |  *s* ) |
| 分组 | Aβ 总量（pg/ml） | Aβ1-40(pg/ml) |  | Aβ1-42  （pg/ml） |
| 空白对照组 | 56.68±7.88 | 40.48±7.09 |  | 18.98±2.24 |
| 100 μM Al(mal)3 组 | 67.92±9.36\* | 42.67±6.56 |  | 27.09±3.17\* |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 75.89±6.44\* | 47.53±8.85\* |  | 29.99±3.01\* |
| 400 μM Al(mal)3 组 | 96.67±19.25\* | 53.07±7.81\* |  | 39.06±8.99\* |
| 转染阴性对照组 | 59.97±9.88 | 42.76±9.36 |  | 17.90±3.18 |
| 转染阳性对照组 | 48.91±4.90\* | 33.67±3.17\* |  | 15.13±3.95\* |
| 转染 miR29a+100 μM  Al(mal)3 组 | 46.70±3.63\*# | 33.63±4.84# |  | 13.05±3.01\*# |
| 转染 miR29a+200 μM  Al(mal)3 组 | 57.65±6.09# | 38.76±4.85# |  | 19.79±3.09# |
| 转染 miR29a+400 μM  Al(mal)3 组 | 65.79±16.95# | 45.61±9.81# |  | 20.18±6.53# |

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与相同剂量未转染组相比*P*<0.05

?

图 2-7-1 转染miR29a mimics后各组Aβ总量的变化

?

图 2-7-2 转染miR29a mimics后各组Aβ1-40含量的变化

?

图 2-7-3 转染miR29a mimics后各组Aβ1-42含量的变化

#### 2.5.2 转染miR29b1 mimics后Aβ含量的变化

与空白对照组相比，各组细胞中Aβ总量有变化(F(8, 47) =76.541，*P*<0.05)，空白对照组，转染阴性对照组细胞上液中Aβ总量无明显差别（*P*> 0.05）；与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，Aβ总量明显升高，差异具有明显的统计学意义（*P*<0.05）；转染阳性对照组，转染低剂量组细胞上液中Aβ总量，较空白对照组水平出现降低（*P*<0.05），转染中、高剂量组细胞上液中Aβ总量降低无统计学差异

（*P*> 0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞上液中Aβ总量较未转染组细胞上液中Aβ总量水平明显降低，且差异有显著的统计学意义（*P*<0.05）；其中，与空白对照组相比，各组细胞上液中Aβ1-40含量有变化(F(8, 47) =71.086，*P*<0.05)，与空白对照相比，转染阴性对照组和未转染低剂量染毒组细胞中，Aβ1-40含量无显著性差异（*P*> 0.05）；未转染中、高剂量染毒组较对照组细胞上液中Aβ1-40含量升高

（*P*<0.05），阳性转染对照组、转染低剂量组较空白对照组相比细胞上液中Aβ1-40含量明显降低（*P*<0.05），转染中、高剂量组降低无显著性差异（*P*> 0.05），各转染组细胞上液中Aβ1-40含量较未转染细胞中Aβ1-40含量明显降低（*P*<0.05）；与空白对照组相比，各组细胞上液中Aβ1-42有变化(F(8, 47) =68.805，*P*<0.05)，空白对照组，转染阴性对照组细胞上液中Aβ1-42无明显差别（*P*> 0.05）；与对照组相比，未转染组随着染毒剂量的升高，各组细胞上液中Aβ1-42出现明显升高，差异具有统

计学意义（*P*<0.05）；转染阳性对照组，转染低剂量组细胞上液中Aβ1-42较空白对照组水平出现降低（*P*<0.05），中、高剂量组无统计学意义（*P*> 0.05）；各相同染毒剂量组相比，转染组细胞上液中Aβ1-42较未转染组细胞上液中Aβ1-42水平明显降低，且差异有统计学意义（*P*<0.05）。表2-8，图2-8-1，2-8-2, 2-8-3。

表 2-8 转染miR29b1 mimics后各组Aβ含量的变化表（xs ）

| 分组 | Aβ 总量（pg/ml） | Aβ1-40(pg/ml) | Aβ1-42(pg/ml) |
| --- | --- | --- | --- |
| 空白对照组 | 61.87±6.88 | 45.61±6.91 | 16.25±1.24 |
| 100 μM Al(mal)3 组 | 73.56±4.36\* | 47.31±3.67 | 25.25±4.67\* |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 81.39±6.13\* | 52.12±5.85\* | 28.97±2.53 |
| 400 μM Al(mal)3 组 | 101.10±10.04\* | 59.06±6.43\* | 41.64±9.53\* |
| 转染阴性对照组 | 61.36±7.08 | 44.10±6.01 | 17.26±2.24 |
| 转染阳性对照组 | 49.91±6.91\* | 36.35±5.24\*# | 13.56±3.31\*# |
| 转染 miR29b1+100 μM  Al(mal)3 组 | 47.69±5.63\*# | 35.39±4.25# | 12.31±4.21\*# |
| 转染 miR29b1+200 μM  Al(mal)3 组 | 64.52±4.09# | 44.67±4.61# | 19.79±4.21# |
| 转染 miR29b1+400 μM  Al(mal)3 组 | 63.71±7.98\*# | 43.70±7.45\*# | 20.01±5.55\*# |

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与相同剂量未转染组相比*P*<0.05

?

图 2-8-1 转染miR29b1 mimics后各组Aβ总量的变化

?

图 2-8-2 转染miR29b1 mimics后各组Aβ1-40的变化

?

图 2-8-3 转染miR29b1 mimics后各组Aβ1-42的变化

## **3** 讨论

作为参与真核生物生长、发育和生理活动的重要调节因子，近年来发现有多种microRNA（miRNA）在神经组织中富集或者有特异性表达[51-54]。到目前为止，所有真核生物神经组织中可以检测到的miRNA占实验可以检测出的全部miRNA种类的约70%左右。在哺乳动物脑组织中，研究显示特异表达和富集的miRNA包括有miR9，miR9\*，miR15a，miR23b，miR26a，miR29a，miR29b，miR34a，miR124a，miR124b等有几十种之多。其中有些miRNA在胶质细胞中有特异性表达，而有些miRNA在神经系统所有组织中均普遍表达，也有些miRNA在神经前体细胞中特异表达。比如：常见的miR124, miR128主要在神经细胞中表达，miR23, miR29在神经胶质细胞中有强表达，miR9与miR125依据培养时间的不同，会在两种细胞中呈现不定的表达[55, 56]。而不同种类的miRNA在哺乳动物不同脑组织中、细胞中或不同时段存在广泛的表达，并参与了神经分化，突触可塑性以及记忆形成和持续等功能[57, 58]。

有研究发现，许多miRNA的与神经系统疾病及神经退行性病变相关[59, 60]。例如，多种miRNA在精神分裂症患者的大脑内呈现差异表达汇[61]。miR9, miR34，miR125b，和miR128a等在AD患者脑中表达上调[26]，miR29, miR107等microRNA

在AD患者脑内呈现缺失和下调现象[25]。铝和AD发病之间有着千丝万缕的联系，有相似的病理改变，并且铝也是AD发病的重要环境因素之一，在miRNA调节方面也有类似之处，本课题动物实验显示铝产生神经毒性的过程中，miR29各型均出现了显著降低（*P*<0.05）。

目前研究者普遍认为，miRNA与其靶mRNA的特异性结合主要是由“种子序列(Seed Sequenee)”来决定的[62]。所谓“种子”，即是指从成熟miRNA序列5'端第一个或第二个核苷酸起向3'末端延伸的连续七个核苷酸。miRNA识别靶标mRNA序列的特异性并不是很高。一个miRNA可以同时调控多个靶mRNA，有一些miRNA的靶mRNA甚至可以多达数百种之多[63]。同时，一个mRNA可以被多个miRNA调控，从而实现翻译调控的瞬时特异性[51]，最终达到抑制其靶mRNA的表达，翻译。在AD患者体内及细胞研究中均发现miR-29调节BACE的表达。本课题中，动物实验结果显示，在铝神经毒性机制中，降低的miR29分型中，只有miR29a, miR29b1参与了铝影响*BACEmRNA*, BACE水平，最终影响Aβ的生成以及蓄积，提示了在铝的毒性过程中*BACEmRNA*可能是miR29a, miR29b1的靶mRNA。

另外，研究显示，在植物中miRNA，通常通过碱基完全匹配引发靶mRNA的降解，在动物中miRNA通常通过碱基的不完全匹配抑制靶miRNA的翻译[65]。在哺乳动物体内通常miRNA只要与mRNA的3'UTR部分互补，miRNA与mRNA只要在3'UTR有7个核苷酸进行配对，RISC就会引发翻译阻遏并破坏靶mRNA的稳定性[66, 67]。在本课题这部分内容中，采用脂质体转染技术将miR29a, miR29b1转染进入细胞中，在转染24h时，细胞中miR29a, miR29b1的表达水平可以高达500倍以上，在染毒24h时（转染48h时）细胞中miR29a, miR29b1仍然高达300倍左右，适合进行实验。实验结果显示，在染毒24h时，各未转染组细胞中*BACEmRNA*表达水平随着染毒剂量的升高而升高（P<0.05），BACE蛋白水平也明显升高（P<0.05），最终导致Aβ生成的明显升高（P<0.05）。而转染后各组*BACEmRNA*表达水平均显著降低（P<0.05），但各组水平没有差异（*P*> 0.05），均处于正常状态水平。转染后各组BACE水平均降低（P<0.05），且转染阳性对照组以及转染低剂量组中BACE水平却有明显的降低（*P*<0.05），该结果提示，在miR29a, miR29b1调节BACEmRNA的过程中，其机制可能是miR29a, miR29b1与*BACEmRNA*的3'UTR部分互补，破坏了*BACEmRNA*的稳定性，使其水平降低，并且还有一部分是通过阻抑了

*BACEmRNA*的翻译，最终使BACE水平出现明显降低，从而降低了Aβ的水平。在转染中、高染毒剂量组中，*BACEmRNA*水平虽没有变化，但由于铝的损伤作用，BACE水平没有被明显抑制（*P*<0.05），因此Aβ水平也没有明显降低（*P*> 0.05）。

Aβ产生和蓄积作为铝损伤的重要表现之一。其中，Aβ1-42是沉积和引起老年斑最主要的成分，也是造成各类损伤的主要因素之一，在第一部分动物实验中显示，铝可以使动物脑内Aβ出现明显升高，其中Aβ1-40变化不明显，最主要升高的成分是Aβ1-42。而在细胞实验中发现在未转染各染毒组中，铝可以使细胞产生的Aβ水平发生变化（*P*<0.05），其中Aβ1-40和Aβ1-42均出现明显的改变现象（*P*<0.05），该结果提示，由于Aβ1-40的可溶性比较强，在动物体内生成的Aβ1-40可能通过各种途径将其转移至脑脊液、血液等组织中得到了清除，而在细胞实验中，未得到及时清除而使其水平升高。但在细胞转染后，无论是Aβ1-40和Aβ1-42，或是Aβ总量，均出现明显降低，该结果提示铝引起Aβ生成和蓄积与miR29a, miR29b1影响BACE水平有关。

结**论**

1、麦芽酚铝可以升高染铝细胞中*BACEmRNA*, BACE水平。

2、麦芽酚铝可以升高染铝细胞Aβ1-40，Aβ1-42以及Aβ总量，Aβ1-40与体内实验结果不一致可能与其溶解性及清除有关。

3、铝产生神经毒性过程中，转染miR29a, miR29b1均可以*BACEmRNA*, BACE水平明显降低，其中BACE水平降低更为明显，该结果提示，miR29a, miR29b1既可以破坏了*BACEmRNA*的稳定性，使其水平降低，也可以通过阻抑*BACEmRNA*的翻译成蛋白。

# **第三部分** **NF-κB**在**miR29a**，**miR29b1**调节铝致脑内**Aβ** 沉

**积过程的作用**

核转录因子NF-κB (nuclear factor kappa B)一种普遍存在于真核细胞中的快反应较为常见的核转录因子。在静息状态下，NF-κB位于存在于细胞质中，与抑制因子结合成复合物状态。抑制状态的NF-κB对环境的变化十分敏感，可以被炎症细胞因子，生长因子，免疫受体、细菌，病毒甚至神经毒素等许多激活因素所激活，包括致当NF-κB被激活后，即会转移进入核内调节一系列基因的表达。NF-κB可以对真核细胞内大量基因产生调节作用，对机体的正常生理状态和各种疾病的病理发生机制中都会产生极为重要的影响。它与机体多种疾病包括神经退行性疾病（如AD等）等众多疾病有着密切的联系。

NF-κB是属于NF-κB/ Rel蛋白家族的成员[69]。人们在哺乳动物的细胞中已经发现NF-κB/Rel蛋白家族的五个成员：NF-κB1(p50)、NF-κB2 (p52)、p65 (RelA)、RelB和c-Rel. p65、RelB和c-Rel的C端都含有转录激活域(transactivation domain)，能直接作用于转录元件而调控转录过程，而p50和p52则无此结构，并不具有转录活性。

NF-κB/Rel蛋白家族均以同源或异源二聚体形式存在，其中以p50/p65(也即NF-κB)是最普遍的一种。它由多肽P50和P65亚基形成P50/P65同源二聚体以及P50/P65异源二聚体。其中发挥主要生理功能的是P50/P65异源二聚体，其存在于几乎所有细胞中。从广义上讲，NF-κB是指能与DNA上能与把基因转录活性区相结合的NF-κB/Rel蛋白，但通常所说的NF-κB常常是只指具有生理功能的P50/P65异原二聚体。在静息状态下NF-κB通常与抑制因子IκB结合形成三聚体的形式存在于细胞质中，IκB与NF-κB结合时，即可阻止NF-κB由细胞质进入细胞核中，而NF-κB靶基因是位于细胞核内，二者无法结合，NF-κB也即无法发挥其转录调控的作用。被激活后的NF-κB即与抑制因子解离，NF-κB就会通过细胞核膜转移至细胞核内，并定位其靶基因的转录活性部位，其中发挥作用的主要是p65. p65亚基可以与其靶基因DNA的转录活性区相结合，从而发挥转录激活或者转录抑制的作用，最终决定调节靶基因的是否转录机转录水平，是NF-κB的主要功能单位[70]。因此，细胞核内的P65水平经常被用来表示有活性的NF-κB。

活化的NF-κB可以单独发挥作用，或者也可以与其他转录因子协同发挥作用，NF-κB可以通过调节多种炎症和免疫分子基因的转录，从而参与机体炎症反应的调节，也对机体的免疫反应有者重要的影响[71]。NF-κB调控的因子包括：细胞因子、免疫受体、各类白介素、急性期C反应蛋白（CRP）、生长因子、转录因子IκBα、p105、

p100、c-Rel、Bcl-3、组织因子、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）等。此外，NF-κB还与了细胞的分裂周期密切相关，当NF-κB正常表达或者激活的时候，细胞周期调控能够正常维持，而当机体受损，NF-κB出现异常表达时，则会引起细胞周期的异常，并引起机体出现各类疾病。

在神经系统中，NF-κB广泛存在并在神经系统的生长、发育、信号传导等方面均发挥着重要生物学功能。研究证实，NF-κB的异常激活与多种神经系统疾病的发生发展密切相关。比如，NF-κB通路的调节在阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD），脑缺血再灌注损伤（cerebral ischemia reperfusioninjury, CIRI），脑外伤（traumatic brain

injury，TBI）和肌萎缩侧索硬化（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）等一系列神经系统损伤与疾病以及神经退行性疾病的发病机制中发挥着重要作用。

有实验证实，NF-κB可以参与miRNA的调节。在神经胶质细胞培养中，NF-κB可以通过IL-1，Aβ42调控多种miRNA [72]。也有学者通过RT-PCR以及Northern-blot和LED-Northern dot-blot等技术检测后，发现NF-κB可以调节miR183，miR155, miR9，miR125b, miR146a [73-78]. miR29也是NF-κB的调控因子之一。在白血病患者中[28]，在成肌细胞及横纹肌肉瘤[29]中，NF-κB可以负调控miR29的表达，在胆囊炎和胆管癌细胞[30]中，肝纤维化[31]过程中miR29表达也受NF-κB信号通路调控。因此，在课题该部分通过动物实验和细胞干预实验，观察铝毒性的过程中miR29是否有通过NF-κB来调节。

## **1** 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物及分组

见第一部分

#### 1.1.2 实验细胞及分组

PC12细胞，获ft西医科大学药学院老师惠赠。将实验细胞分为对照组，100μmol/l

PDTC组，200μmol/l麦芽酚铝组，200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组。

#### 1.1.3 主要试剂

（1）PDTC，分析纯，购自于sigma-aldrich公司，（德国，斯德海姆）；

（2）NF-κB/P65单克隆抗体，Histone单克隆抗体，EPITOMICS公司，（美国，加利福尼亚）；

（3）DMEM，博士德生物科技有限公司，（中国武汉）；

（4）胎牛血清，博士德生物科技有限公司，（中国武汉）；其余试剂同第一、二部分。

#### 1.1.4 主要仪器器材

同第二部分。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 实验试剂的配制

##### （1）麦芽酚铝动物实验见第一部分

##### （2）麦芽酚铝细胞染毒见第二部分

##### （3）1mol/l PDTC母液准确称取1.64g PDTC，溶解于10ml，0.01M的PBS溶液中，过滤器过滤分装，-20℃避光保存，配制过程中注意避光，动作迅速。

#### 1.2.2 染铝大鼠脑皮质和海马中核转录因子NF-κB/P65的检测

##### （1）染铝大鼠脑皮质和海马中核蛋白的提取

1）在每1ml冷Hypotonic Buffer加入5μl磷酸酶抑制剂，10ul PMSF和1μlDTT混匀。冰上保存数分钟待用。

2）将200mg大鼠脑皮质和海马组织置于培养皿中，手术剪将小块充分剪碎，尽量去除脂肪组织和结缔组织等非目的组织，用PBS洗涤两次，离心，取沉淀后加入0.6ml冷Hypotonic Buffer混匀，冰浴下超声破碎细胞，每次30s，5次，每次间隔1 min，置

于冰上冷却。超声破碎细胞后应镜检，细胞破碎率不小于90％，同时没有明显的组织小块。

##### 3）转移至1.5ml预冷的离心管，用手指弹管壁使沉淀悬起，冰浴10分钟，震荡10

秒钟，混匀。

##### 4）4℃3000转/分，离心5分钟，立即弃上清，再加0.4ml冷Hypotonic Buffer震荡洗涤沉淀30秒，再4℃5000转/分离心5分钟。

##### 5）再沉淀中加0.2ml Lysis Buffer（每1ml Lysis Buffer冷加入5μl磷酸酶抑制剂，

10μlPMSF和1μlDTT）震荡将沉淀悬起，冰浴20分钟，再4℃1500G离心10分钟，弃沉淀。上清即为核蛋白提取物，用BCA试剂盒进行蛋白定量，并将浓度调节至一致，分装后-80℃保存。

##### （2）染铝大鼠脑皮质和海马中核转录因子NF-κB/P65的检测

使用前将蛋白加入2×buffer，沸水中煮5分钟至蛋白变性，进行SDS-PAGE分离检测蛋白相对含量。方法同第一部分BACE蛋白检测，

#### 1.2.3 细胞培养及细胞活力检测

方法见第二部分

#### 1.2.4 各组细胞miR29a，miR29b1水平的检测

（1）总RNA的提取吸取培养液，每瓶中加入适量0.5ml TRIzon，反复吹打使细胞裂解。室温条件下放置5分钟，向以上溶液中加入0.2ml氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15秒，室温放置3分钟；其余步骤同第一部分总RNA的提取。

（2）总RNA浓度测定方法同第一部分

（3）各组细胞miR29a, miR29b1水平的检测方法同第一部分miR29a, miR29b1水平

#### 1.2.5 BACEmRNA，BACE水平

方法同第二部分

#### 1.2.6 Aβ1-40，Aβ1-42的检测

方法同第二部分

### 1.3 统计分析方法

实验数据采用均数±标准差( *x**s*)表示，应用SPSS17.0统计软件对数据进行单因素方差分析ONE-ANOVA、组间比较用LSD检验，以P<0.05作为差异有统计学意义的标准。

## **2** 结果

### 2.1 大鼠脑组织中NF-κB/P65表达的变化

随着染毒剂量的升高，各染毒组皮质中核转录因子NF-κB/P65表达明显升高(F(3, 35) = 79.72, *P*<0.05)，与对照组相比，低剂量组升高没有意义（*P*> 0.05），中、高剂量组升高有统计学意义（*P*<0.05）；随着染毒剂量的升高，各染毒组海马中核转录因子NF-κB/P65表达明显升高(F(3, 35) = 79.72, *P*<0.05)，与对照组相比，低剂量组升高没有意义（*P*> 0.05），中、高剂量组升高有统计学意义（*P*<0.05）。见表3-1，图3-1-1, 3-1-2。

表 3-1 大鼠脑组织中NF-κB/P65的表达的变化表（xs ）

| 分组 | 动物数 | NF-κB/P65（皮质） | NF-κB/P65（海马） |
| --- | --- | --- | --- |
| 对照组 | 9 | 0.52±0.10 | 0.55±0.07 |
| 低剂量组 | 9 | 0.57±0.08 | 0.75±0.13 |
| 中剂量组 | 9 | 0.99±0.09\* | 0.93±0.05\* |
| 高剂量组 | 9 | 1.38±0.14\* | 1.32±0.23\* |

注：\*表示与对照组相比，*P*<0.05

?

图 3-1-1 大鼠脑组织中NF-κB/P65的表达的变化

?

图 3-1-2 大鼠脑组织中NF-κB/P65的表达的变化

### 2.2 各组细胞形态学变化情况

对照组，100μmol/l PDTC组细胞生长状态良好，细胞大小一致、均匀，贴壁良好，细胞密集，细胞凸起长而多，连接丰富紧密；200μmol/l麦芽酚铝组细胞状态较差，细胞数量减少，细胞贴壁性变差，出现部分细胞皱缩呈圆形，连接减少松散；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞状态转好，细胞凸起增多，连接增加且密集型也增加。见图3-2。

?

对照组×200倍100μmol/l PDTC组×200倍

200μmol/l麦芽酚铝×200倍麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组×200倍

?

图3-2 各组细胞形态学变化情况

### 2.3 各组细胞活力变化情况

各组细胞细胞活力有差异(F(3, 31) =97.69，*P*<0.05)；对照组，100μmol/l PDTC组细胞活力无明显差异（*P*> 0.05），与对照组相比，200μmol/l麦芽酚铝组细胞活力明显降低（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞活力较200μmol/l麦芽酚铝组升高（*P*<0.05），但较对照组低（*P*<0.05）。见表3-2。

表 3-2 各组细胞活

力的变化表（ *x*

S )

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分组 | OD 值 | 抑制率（%） |
| 空白对照组 | 1.59±0.08 | — |
| 100μmol/l PDTC | 1.61±0.10 | — |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 1.07±0.08\* | 32.70 |
| 100μmol/l PDTC+200 μM Al(mal)3 组 | 1.37±0.03\*# | 13.8 |

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与染毒组相比*P*<0.05

### 2.4 各组细胞miR29a，miR29b1水平

各组细胞中miR29a表达有差异(F(3, 31) =32.12，*P*<0.05)；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞中miR29a表达有升高，差异有统计学意义（*P*<0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中miR29a表达明显降低（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l

PDTC组细胞中miR29a较200μmol/l麦芽酚铝组升高（*P*<0.05），但较对照组低

（*P*<0.05）。各组细胞中miR29b1有差异(F(3, 31) =21.21，*P*<0.05)；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞miR29b1表达有升高，差异有统计学意义（*P*<0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中miR29b1明显降低(*P*<0.05)；200μmol/l 麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中miR29b1较200μmol/l麦芽酚铝组升高（*P*<0.05），但较对照组低（*P*<0.05）。见表3-3，图3-3-1，图3-3-2.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 3-3 各组细胞 miR29a， | miR29b1 的变化表( | *x* |  *s* ) |
| 分组 | mi29a |  | mi29b1 |
| 空白对照组 | 1.00±0.00 |  | 1.00±0.00 |
| 100μM PDTC | 1.18±0.13 |  | 1.19±0.16 |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 0.61±0.18\* |  | 0.62±0.21\* |
| 100μmol/l PDTC+200 μM Al(mal)3 组 | 0.85±0.07\*# |  | 0.81±0.12\*# |

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与染毒组相比*P*<0.05

?

图 3-3-1 各组细胞mi29a的变化

?

图 3-3-2 各组细胞miR29b1的变化

### 2.5 各组细胞*BACEmRNA*和BACE水平的变化

各组细胞中*BACEmRNA*有差异(F(3, 31) =17.09，*P*<0.05)；与对照组相比，

100μmol/l PDTC组细胞中*BACEmRNA*表达有降低，但没有统计学意义（*P*> 0.05），

200μmol/l麦芽酚铝组细胞中*BACEmRNA*表达明显升高（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中*BACEmRNA*较200μmol/l麦芽酚铝降低（*P*<0.05），较对照组高（*P*<0.05）。各组细胞中BACE有差异(F(3, 31) =26.09，*P*<0.05)；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞BACE表达有降低，差异有统计学意义（*P*<0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞中BACE明显升高（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝

+100μmol/l PDTC组细胞中BACE较200μmol/l麦芽酚铝组降低（*P*<0.05），较对照组高（*P*<0.05）。见表3-4，图3-4-1，3-4-2.

表 3-4 各组细胞染毒后BAC

EmRNA, BACE水平的变

化表（xs ）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分组 | BACEmRNA  （2-ΔΔCt） | BACE(pg/ml) |
| 空白对照组 | 1.00±0.00 | 563.56±45.41 |
| 100μM PDTC | 0.91±0.11 | 493.33±61.45\* |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 1.67±0.56\* | 707.67±56.87\* |
| 100μmol/l PDTC+200 μM Al(mal)3 组 | 1.31±0.26\*# | 608.25±51.09\*# |

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与染毒组相比*P*<0.05

?

图 3-4-1 各组细胞染毒后BACEmRNA水平的变化

?

图 3-4-2 各组细胞染毒后BACE水平的变化

### 2.6 各组细胞Aβ含量的变化

各组细胞上液中Aβ总量有差异(F(3, 31) =12.31，*P*<0.05)；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞上液中Aβ总量有降低（*P*<0.05），200μmol/l麦芽酚铝组细胞上液中Aβ总量明显升高（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中上液Aβ总量较200μmol/l麦芽酚铝组降低（*P*<0.05），较对照组高（*P*> 0.05）。其中Aβ1-40含量在各组细胞上液中有差异(F(3, 31) =7.17，*P*<0.05)；与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞上液中Aβ1-40含量有降低，但没有统计学意义（*P*> 0.05），

200μmol/l麦芽酚铝组细胞上液中Aβ1-40含量明显增加（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞上液中Aβ1-40含量较200μmol/l麦芽酚铝组降低

（*P*<0.05），但较对照组高（*P*<0.05）。各组细胞上液中Aβ1-42有变化(F(3, 31) =11.06，

*P*<0.05），与对照组相比，100μmol/l PDTC组细胞上液中Aβ1-42含量降低（*P*<0.05），

200μmol/l麦芽酚铝组细胞上液中Aβ1-42含量明显增加（*P*<0.05）；200μmol/l麦芽酚铝+100μmol/l PDTC组细胞中Aβ1-42含量较200μmol/l麦芽酚铝组降低（*P*<0.05），但较对照组高（*P*<0.05）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 3-5 | 干预后各组细胞上液中 | Aβ 含量的变化表（ |  |  *s* ） |
| 分组 | Aβ 总量（pg/ml） | Aβ1-40（pg/ml） |  | Aβ1-42（pg/ml） |
| 空白对照组 | 53.73±6. 45 | 45.13±9.89 |  | 18.63±2.25 |
| 100μM PDTC | 17.80±6.01\* | 43.67±7.07 |  | 14.13±1.30\* |
| 200 μM Al(mal)3 组 | 87.89±8.45\* | 57.35±10.01\* |  | 30.54±3.51\* |
| 100μmol/l  PDTC+200 μM Al(mal)3 组 | 85.10±9.25\*# | 50.56±8.31\*# |  | 24.60±8.27\*# |

*x*

注：\*表示与对照组相比*P*<0.05，#表示与染毒组组相比*P*<0.05

?

图3-5-1 干预后各组细胞上液中Aβ总量的变化

?

图3-5-2 干预后各组细胞上液中Aβ1-40的变化

?

图3-5-3 干预后各组细胞上液中Aβ1-42的变化

## **3** 讨论

NF-κB在真核生物各类的细胞中均有广泛存在，在神经系统各类细胞中也广泛存在。研究表明，在中枢神经系统内，包括大脑皮层神经细胞、小脑神经细胞以及海马神经细胞内的胞体、轴突、树突等位置存在有大量可激活的NF-κB，这些NF-κB正常激活时，维持这些部位的神经细胞中正常的代谢以及信号转导，保证这些细胞维持正

常的生物学功能。当机体受到各种外来损伤和刺激时，这些部位的NF-κB即可出现异常表达和激活，从而导致其所调节的基因出现异常的转录激活或者转录抑制，导致相关基因异常表达，最终引起一系列异常的生物学效应，神经系统出现不同程度的损伤表现[79]。

作为神经系统极为重要的生理功能调节因子，NF-κB异常的激活或者失活被广泛认为与许多神经系统疾病有着较为密切的关系。其中AD与NF-κB的关系更是一直受到人们广泛的关注。有研究这检测AD患者脑内的皮质和海马内神经细胞内的NF-κB，结果发现老年斑附近神经细胞中NF-κB/p65表达增高[80]，说明在AD患者脑内的受损细胞内有NF-κB的激活。还有学者对AD患者上颞叶回和基底核胆碱能神经细胞中

NF-κB进行检测，结果发现在AD患者大脑的这两个部位为均发现有NF-κB/p65表达升高并[81,82]。铝是AD发病的重要环境因素之一，铝的损伤表现和AD有着很高的相似之处，铝毒性的机制也发现有NF-κB的参与。研究表明，镁，铁和硫酸锌、硫酸铝具有激活NF-κB信号的作用，并可以使NF-κB发生定向的上调[83]。研究显示[84, 85]，铝可以影响NF-κB的表达，随着染毒剂量的升高，NF-κB的表达也会出现升高（*P*<0.05）。本课题动物实验研究结果发现，随着染铝剂量的升高，细胞核内的NF-κB/p65水平也随之升高（*P*<0.05），该结果提示，麦芽酚铝可以使大鼠脑内NF-κB出现异常激活，从而影响靶基因的转录的水平，最终诱发铝毒性的产生。

NF-κB在神经系统不同细胞部位可以起到不同的功能和作用，其可能原因包括有：第一，在不同部位神经细胞中，NF-κB各亚单位表达量存在明显不同，也就决定了二聚体的组成亚单位存在明显差异，决定了NF-κB结合特定的DNA序列，也即决定了其靶基因的特异性，决定相应靶基因表达状况，因此就发挥了不同的生物学功能和作用；第二，外界刺激的性质和强度不同会影响NF-kB在神经系统中所发挥的功能及作用，可以影响神经系统内NF-κB的主要刺激包括：神经营养因子、神经递质、神经毒性肽、细胞因子、氧化应激、紫外光、细菌和病毒产物以及化学性神经毒物等。例如，在生理情况下，当有谷氨酸信号传导时，只需要适量的转录因子激活，相关信号分子的量维持在正常水平，此时，NF-κB靶基因出现正常的表达以及激活，细胞发挥其正常的生理学功能；但是当外界有异常刺激时（如氧化应激、神经毒物等），谷氨酸受体就会被异常激活或持续保持激活状态，转录因子即会被大量的激活，NF-κB靶基因也会出现异常的表达和激活，最终改变细胞的生物学功能。第三，在不同部位

神经细胞中，NF-κB的最终效应有可能是转录激活作用，亦可以可能呈现转录抑制作用，有时在同一细胞中，细胞处于静息状态时，可能表现为转录抑制功能，当细胞处于激活状态时NF-κB则可能表现为转录激活的作用，研究表明，NF-κB对miR29的作用主要是转录抑制作用[28-31]。在本课题中，动物体内实验研究显示，铝引起细胞核NF-κB/p65表达增高时（*P*<0.05），miR29a，miR29b1均出现了降低（*P*<0.05），提示在铝毒性过程中，NF-κB可能对miR29a，miR29b1起到是转录抑制的作用。

目前的研究显示，活性氧( Reactive oxygen species, ROS)是激活NF-κB激活的最主要、最常见的因素，许多过氧化物都可以激活NF-κB. Clemens等在脑缺血以后应用了抗氧化剂LY 231617，NF-κB的活性活性就受到显著抑制，同时也在一定程度上减轻了脑缺血引起的脑损伤[86]。抗氧化剂可以抑制NF-κB的诱导合成、降低NF-κB与DNA的结合活性，并具有阻止IκB的磷酸化和降解过程。研究显示，外来各种因素刺激机体产生氧化损伤，产生大量的活性氧，活性氧可以作为关键的第二信使激活抑制因子IκK，IκK被激活后，使IκB快速磷酸化[87]。NO是氧化应激中比较常见、也比较重要的自由基有研究者通过原代细胞培养实验观察到，Aβ可以激活细胞中NF-κB，激活的的NF-κB可以诱导NO大量释放，从而引起细胞内出现氧化损伤[88]。还有研究者证实显示，在AD患者体内，可以检测到细胞膜上有脂质过氧化损伤改变，这种损伤可以使NF-κB的活性出现升高，而升高的NF-κB进一步引起细胞膜上出现脂质过氧化损伤，这种恶性循环会进一步的加快AD患者脑神经元的退行性变的进程。研究表明，硫酸铝可以激活ROS，导致氧化损伤[83]。铝可以诱导脑内活性氧，和氧自由基的产生是其重要毒性机制之一[93]。在本课题中，通过选用NF-κB的常用抑制剂，而该抑制剂是通过抑制氧化应激损伤来实现的。结果显示，使用抑制剂后，各组细胞中

mi29a，mi29b1表达明显回升（*P*<0.05），*BACEmRNA*，BACE水平明显降低（*P*<0.05），

Aβ含量明显降低（*P*<0.05）。而该结果也提示，NF-κB参与铝毒性过程的机制与其影响miR29a，miR29b1的表达，从而引起及*BACEmRNA*，BACE水平，最终导致Aβ的产生和沉积有关。而该过程可能是由铝的氧化损伤所激发的。

另外，也有研究表明，Aβ的沉积也是NF-κB激活的原因之一。Isaglia等研究证实Aβ可使培养神经元内的NF-κB出现显著的表达激活[89]。研究者使用淀粉样蛋白β肽

（也即）处理体外培养的神经元后，发现Aβ可以激活细胞中的NF-κB[90]. Walter J的研究发现Aβ1-42可以激活NF-κB，从而激活下游miRNA，最终再次引起现Aβ生成的增

多和沉积[91]。因此我们推断，在本课题动物体内实验和细胞干预实验证实了铝可能通过氧化应激损伤诱导NF-κB参与了miR29的调节，并最终导致Aβ沉积，而生成和沉积的Aβ也可能是NF-κB的重要激活因素，进一步激活NF-κB，最终导致铝损伤的进一步加重。但其机制有待进一步的证实。

结**论**

1、铝可以引起大鼠脑皮质和海马内NF-κB的激活。

2、NF-κB参与铝毒性过程的机制与其影响miR29a，miR29b1的表达，从而引起及*BACEmRNA*，BACE水平，最终导致Aβ的产生和沉积有关。而该过程可能是由铝的氧化损伤所激发的。

3、铝引起脑内Aβ的生成和沉积可能进一步激活NF-κB，使铝的损伤进一步加重。

总**结**

铝作为自然界中含量最丰富的金属，并在生产生活中广泛应用和存在，其可以通过多种途径进入动物和人体内，并产生蓄积毒性。目前认为，铝具有明显的神经毒性，也是引发AD等神经退行性疾病重要的环境危险因素之一[95]。铝可以引起AD典型病理变化老年斑早期类似的病变，铝可以在AD患者及动物染铝模型中引起Aβ的生成和蓄积。BACE1是该过程重要的关键性限速酶，因此明确其调节在铝的机制研究和神经毒性防治中具有重要的意义。而目前有研究提示miRNA在BACE1的调节中起到非常重要的作用。因此，本研究使用麦芽酚铝制作动物和细胞模型，利用RT-PCR、Western-blot、ELISA以及脂质体转染技术等研究miR29在铝引起脑内Aβ生成过程中的作用。并对其上游机制进行了初步探讨。

综合本课题以上研究，得出如下结论：

1、麦芽酚铝可以在动物血，脑皮质和海马中产生蓄积，从而产生慢性神经毒性。

2、动物体内外实验显示，麦芽酚铝可以通过影响miR29a, miR29b1 从而调节

BACE1的表达，最终引起Aβ生成增多和蓄积。

3、铝可能通过氧化应激损伤从而激活NF-κB，引起miR29a, miR29b1表达的降低，引起BACE1表达增多，最终引起Aβ的生成增多和蓄积，而生成和沉积的Aβ1-42会进一步激活NF-κB，继而加重铝损伤。

参考文献

[1] Shaw CA, Li D, Tomljenovic L. Are there negative CNS impacts of aluminum adjuvants used in vaccines and immunotherapy[J]. Immunotherapy, 2014, 6(10): 1055-1071.

[2] Kumar V, Gill KD. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicityand its amelioration: a review[J]. Neurotoxicology, 2014, 41: 154-166.

[3] Walton JR. Aluminum involvement in the progression of Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease[J]. JAD, 2013, 35(1): 7-43.

[4] Prakash D, Gopinath K, Sudhandiran G. Fisetin enhances behavioral performances and attenuates reactive gliosis and inflammation during aluminumchloride-induced neurotoxicity[J]. Neuromolecular medicine 2013, 15(1): 192-208.

[5] Shcherbatykh I, Carpenter DO. The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease. Journalof Alzheimer's disease[J]. JAD, 2007, 11(2): 191-205. 竺可桢. 物理学[M]. 北京: 科学出版社, 1973: 56~60.

[6] Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C, Dartigues JF. Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort[J]. American journal of epidemiology, 2009, 169(4): 489-496.

[7] Ferreira PC, Tonani KA, Juliao FC, Cupo P, Domingo JL, Segura-Munoz SI. Aluminum concentrations in water of elderly people's houses and retirement homes and its relation with elderly health[J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2009, 83(4): 565-569.

[8] Shati AA, Elsaid FG, Hafez EE. Biochemical and molecular aspects of aluminiumchloride-induced neurotoxicity in mice and the protective role of Crocus sativus L. extraction and honey syrup[J]. Neuroscience 2011, 175: 66-74.

[9] Erazi H, Ahboucha S, Gamrani H. Chronic exposure to aluminum reduces tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and locomotor performance in rats[J]. Neuroscience letters 2011, 487(1): 8-11.

[10] Kushkuley J, Metkar S, Chan WK, Lee S, Shea TB. Aluminum induces neurofilament aggregation by stabilizing cross-bridging of phosphorylated c-terminal sidearms[J]. Brain research, 2010, 1322: 118-123.

[11] Yumoto S, Kakimi S, Ohsaki A, Ishikawa A. Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease[J]. Journal of inorganic biochemistry 2009, 103(11): 1579-1584.

[12] Rodella LF, Ricci F, Borsani E, Stacchiotti A, Foglio E, Favero G, Rezzani R, Mariani C, Bianchi

R. Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse

Brain[J]. Histology and histopathology, 2008, 23(4):433-439.

[13] Castorina A, Tiralongo A, Giunta S, Carnazza ML, Scapagnini G, D'Agata V. Early effects of aluminum chloride on beta-secretase mRNA expression in a neuronal model of beta-amyloid toxicity[J]. Cell biology and toxicology, 2010, 26(4): 367-377.

[14] Malin DH, Crothers MK, Lake JR, Goyarzu P, Plotner RE, Garcia SA, Spell SH, Tomsic BJ, Giordano T, Kowall NW. Hippocampal injections of amyloid beta-peptide 1-40 impair subsequent one-trial/day reward learning[J]. Neurobiology of learning and memory, 2001, 76(2): 125-137.

[15] Ashley RH, Harroun TA, Hauss T, Breen KC, Bradshaw JP. Autoinsertion of soluble oligomers of Alzheimer's Abeta(1-42) peptide into cholesterol-containing membranes is accompanied by relocation of the sterol towards the bilayer surface[J]. BMC structural biology, 2006, 6: 21.

[16] Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC. The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status[J]. Peptides, 2002, 23(7): 1311-1315.

[17] Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons[J]. The Journal of cell biology, 2002, 156(3): 519-529.

[18] Heredia L, Helguera P, de Olmos S, Kedikian G, Sola Vigo F, LaFerla F, Staufenbiel M, de Olmos J, Busciglio J, Caceres A[, Lorenzo A.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lorenzo%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16775141) Phosphorylation of actin-depolymerizing factor/cofilin by LIM-kinase mediates amyloid beta-induced degeneration: a potential mechanism of neuronal dystrophy in Alzheimer's disease[J]. [J Neurosci,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Phosphorylation%2Bof%2Bactin-depolymerizing%2Bfactor%2Fcofilin%2Bby%2BLIM-kinase%2Bmediates%2Bamyloid%2Bbeta-induced%2Bdegeneration%3A%2Ba%2Bpotential%2Bmechanism%2Bof%2Bneuronal%2Bdystrophy%2Bin%2BAlzheimer%27s%2Bdisease) 2006, 26(24): 6533-6542.

[19] Flaten TP. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water[J]. Brain research bulletin, 2001, 55(2): 187-196.

[[20] Luo Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Luo%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622)1, [Niu F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Niu%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622) [Sun Z,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sun%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622) [Cao W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cao%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622) [Zhang X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622) [Guan D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Guan%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622) [Lv Z,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lv%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622) [Zhang B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622) [Xu Y.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Xu%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19150622) Altered expression of Aβmetabolism-associated molecules from D-galactose/AlCl3 induced mouse brain[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2009, 130(4): 248–252.

[[21] Castorina A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Castorina%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20111991) [Tiralongo A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tiralongo%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20111991) [Giunta S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Giunta%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20111991) [Carnazza ML,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Carnazza%20ML%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20111991) [Scapagnini G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Scapagnini%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20111991) [D'Agata V.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=D%27Agata%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20111991) Early effects of aluminum chloride on beta-secretase mRNA expression in a neuronal model ofß-amyloid toxicity[J]. Cell Biol Toxicol, 2010, 26(4): 367–377.

[22] Walton JR, Wang MX. APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2009; 103(11): 1548–1554.

[[23] Li R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Li%20R%22%5BAuthor%5D) [Lindholm K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Lindholm%20K%22%5BAuthor%5D) [Yang LB,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Yang%20LB%22%5BAuthor%5D) [Yue X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Yue%20X%22%5BAuthor%5D) [Citron M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Citron%20M%22%5BAuthor%5D) [Yan R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Yan%20R%22%5BAuthor%5D) [Beach T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Beach%20T%22%5BAuthor%5D), [Sue L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Sue%20L%22%5BAuthor%5D) [Sabbagh M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Sabbagh%20M%22%5BAuthor%5D), [Cai H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Cai%20H%22%5BAuthor%5D) [Wong P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Wong%20P%22%5BAuthor%5D) [Price D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Price%20D%22%5BAuthor%5D) [Shen Y.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Shen%20Y%22%5BAuthor%5D) Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(10): 3632-3637.

[24] Zohar O, Cavallaro S, D'Agata V, Alkon DL. Quantification and distribution of beta-secretase alternative splice variants in the rat and human brain[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2003, 115(1): 63- 68.

[25] Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, Rigoutsos I, Nelson PT. [The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234899) J Neurosci, 2008; 28(5): 1213-1223.

[[26] Lukiw WJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lukiw%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17629564) [Pogue AI](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pogue%20AI%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17629564). Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells[J]. [J Inorg Biochem,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629564#%23) 2007, 101(9): 1265-1269.

[[27] Pogue AI,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pogue%20AI%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Li YY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20YY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Cui JG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cui%20JG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Zhao Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhao%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Kruck TP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kruck%20TP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Percy ME,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Percy%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Tarr MA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tarr%20MA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Lukiw WJ.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lukiw%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) Characterization of an NF-kappaB-regulated, miRNA-146a-mediateddown-regulation of complementfactorH (CFH) in metal-sulfate-stressed human brain cells[J][. J Inorg Biochem,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Characterization%2Bof%2Ban%2BNF-kappaB-regulated%2C%2BmiRNA-146a-mediated%2Bdown-regulation%2B%2Bof%2B%2Bcomplement%2B%2Bfactor%2B%2BH%2B%2B(CFH)%2B%2Bin%2B%2Bmetal-sulfate-stressed%2B%2Bhumanbrain%2B%2Bcells) 2009.103(11): 1591–1595.

[28] Liu S, Wu LC, Pang J, Santhanam R, Schwind S, Wu YZ, Hickey CJ, Yu J, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Li C, Whitman SP, Mishra A, Stauffer N, Eiring AM, Briesewitz R, Baiocchi RA, Chan KK, Paschka P, Caligiuri MA, Byrd JC, Croce CM, Bloomfield CD, Perrotti D, Garzon R, Marcucci G. Sp1/NFkappaB/HDAC/miR-29b regulatory network in KIT-driven myeloid leukemia[J]. Cancer Cell, 2010, 17(4): 333-347.

[[29] Mott JL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Mott%20JL%22%5BAuthor%5D) [Kurita S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Kurita%20S%22%5BAuthor%5D) [Cazanave SC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Cazanave%20SC%22%5BAuthor%5D) [Bronk SF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Bronk%20SF%22%5BAuthor%5D) [Werneburg NW,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Werneburg%20NW%22%5BAuthor%5D) [Fernandez-Zapico ME.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Fernandez-Zapico%20ME%22%5BAuthor%5D) Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB[J]. [J Cell Biochem,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=miR-29%20%20Mott%20%202010) 2010, 110(5): 1155-1164.

[30] Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, Cheng A, Hall BM, Qualman SJ, Chandler DS, Croce CM, Guttridge DC. [NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18977326) Cancer Cell, 2008, 14(5): 369-381.

[[31] Roderburg C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Roderburg%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Urban GW,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Urban%20GW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Bettermann K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bettermann%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Vucur M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vucur%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Zimmermann H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zimmermann%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Schmidt S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schmidt%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Janssen J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Janssen%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Koppe C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Koppe%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Knolle P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Knolle%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Castoldi M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Castoldi%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Tacke F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tacke%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Trautwein C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Trautwein%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) [Luedde T.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Luedde%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20890893) Micro-RNA Proﬁling Reveals a Role for miR-29 in Human and Murine Liver Fibrosis[J]. Hepatology, 2011, 53(1): 209-218.

[32] Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. WidespreadmicroRNArepression by Myccontributes to tumorigenesis[J]. Nat Genet, 2008, 40(1): 43-50.

[[33] House E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=House%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15201484) [Collingwood J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Collingwood%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15201484) [Khan A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Khan%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15201484) [Korchazkina O,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Korchazkina%20O%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15201484) [Berthon G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Berthon%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15201484) [Exley C.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Exley%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15201484) Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of Abeta42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer'sdisease[J]. J Alzheimers Dis, 2004, 6(3): 291–301.

[[34] Jiang T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jiang%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22561904) [Zhi XL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhi%20XL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22561904) [Zhang YH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20YH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22561904) [Pan LF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pan%20LF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22561904) [Zhou P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhou%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22561904). Inhibitory effect of curcumin on the Al(III) -inducedAβ42 aggregation and neurotoxicity in vitro[J]. Biochim Biophys Acta, 20, 1822(8): 1207-1215.

[35] Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Parigi AD, Capurso SA, Torres F, Capurso A, Panza F. Macronutrients, aluminium from drinking water and foods, and other metals in cognitive decline and dementia[J]. Journal of Alzheimer's disease, JAD, 2006, 10(2-3): 303-330.

[36] Akila R, Stollery BT, Riihimaki V. Decrements in cognitive performance in metal inert gas welders exposed to aluminium[J]. Occupational and environmental medicine, 1999,

56(9):632-639.

[37] Ferreira PC, Piai Kde A, Takayanagui AM, Segura-Munoz SI. Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease[J]. Revista latino-americana de enfermagem, 2008, 16(1): 151-157.

[38] Vasudevaraju P, Govindaraju M, Palanisamy AP, Sambamurti K, Rao KS. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration[J]. The Indian journal of medical research, 2008, 128(4): 545-556.

[39] Walton JR. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease[J]. Neurotoxicology, 2006, 27(3): 385-394.

[40] Kaneko N, Yasui H, Takada J, Suzuki K, Sakurai H. Orally administrated aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice[J]. Journal of inorganic biochemistry 2004, 98(12): 2022-2031.

[41] Huh JW, Choi MM, Lee JH, Yang SJ, Kim MJ, Choi J, Lee KH, Lee JE, Cho SW. Activation of monoamine oxidase isotypes by prolonged intake of aluminum in rat brain[J]. Journal of inorganic biochemistry, 2005, 99(10): 2088-2091.

[42] Shuchang H, Qiao N, Piye N, Mingwei H, Xiaoshu S, Feng S, Sheng W, Opler M. Protective effects of gastrodia elata on aluminium-chloride-induced learning impairments and alterations of amino acid neurotransmitter release in adult rats[J]. Restorative neurology and neuroscience, 2008, 26(6): 467-473.

[43] Gouras GK, Olsson TT, Hansson O. beta-amyloid Peptides and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease[J]. [Neurotherapeutics.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25371168) 2015, 12(1): 3-11.

[44] Exley C. The aluminium-amyloid cascade hypothesis and Alzheimer's disease[J]. Sub-cellular biochemistry, 2005, 38: 225-234.

[45] Dislich B, Lichtenthaler SF. The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond[J]. Frontiers in physiology, 2012, 3: 8.

[46] Schmidt B. Aspartic proteases involved in Alzheimer's disease[J]. Chembiochem, 2003, 4(5): 366-378.

[47] Webb RL, Murphy M. beta-Secretases, Alzheimer's Disease, and Down Syndrome[J]. [Curr Gerontol Geriatr Res.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=beta-Secretases%2C%2BAlzheimer%27s%2BDisease%2C%2Band%2BDown%2BSyndrome.%2BCurrent%2Bgerontology%2Band%2Bgeriatrics%2Bresearch) 2012, 2012: 362839.

[48] Doehner J, Knuesel I. Reelin-mediated Signaling during Normal and Pathological Forms of Aging[J]. Aging and disease, 2010, 1(1): 12-29.

[49] Herring A, Donath A, Steiner KM, Widera MP, Hamzehian S, Kanakis D, Kolble K, ElAli A, Hermann DM, Paulus W [Keyvani K.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Keyvani%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22495348) Reelin depletion is an early phenomenon of Alzheimer's pathology. Journal of Alzheimer's disease[J]. JAD, 2012, 30(4): 963-979.

[50] Botella-Lopez A, Cuchillo-Ibanez I, Cotrufo T, Mok SS, Li QX, Barquero MS, Dierssen M, Soriano E, Saez-Valero J. Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease[J]. Neurobiology of disease, 2010, 37(3): 682-691.

[51] Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH. Noncoding RNAs in the mammalian central

Nervous system[J]. Annu Rev Neurosci,2006,29,77-103.

[[52] Miska EA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Miska%20EA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Alvarez-Saavedra E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Alvarez-Saavedra%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Townsend M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Townsend%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Yoshii A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yoshii%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Sestan N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sestan%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Rakic P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rakic%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Constantine-Paton M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Constantine-Paton%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Horvitz HR.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Horvitz%20HR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain[J]. Genome Biol, 2004, 5(9): R68.

[53] Hohjoh H, Fuktshima T. Expression Profile analysis of microRNA(miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA deteetion system that examines hybridization signals at every step of washing[J]. Gene, 2007, 391(1-2): 39-44.

[54] Mehler MF, MattiekJs. Noncoding RNAs in the nervous system[J]. J Physiol, 2006, 575: 333-341.

[[55] Saba R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Saba%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17164008) [Booth SA.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Booth%20SA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17164008) Target labelling for the deteetion and Profiling of microRNAs expressed in CNS tissue using microarrays[J]. BMC Biolotechnol, 2006, 6: 47.

[56] Kriehevs AM, Son-ntag KC, IsaesonO, Kosik KS. Specific microRNAs modulate ernbryonic stem cell-derived neurogenesis[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 857-864.

[57] Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME. A brain specific microRNA regulates dendritic spine development[J]. Nature, 2006, 439(7074): 283- 289.

[[58] Luo L.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Luo%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12142283) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and struetural plastieity[J]. Allllu RevCellDev Biol, 2002, 18: 601-635.

[59] Bian S, Sun T. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases[J]. Mol Neurobiol, 2011, 44: 359–373.

[60] Qurashi A, Jin P, Small RNA-mediated gene regulation in neurodevelopmental disorders[J]. Curr Psychiatry Rep, 2010, 12: 154–161.

[[61] Perkins DO,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Perkins%20DO%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) [Jeffries CD,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jeffries%20CD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) [Jarskog LF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jarskog%20LF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) [Thomson JM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Thomson%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) [Woods K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Woods%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) [Newman MA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Newman%20MA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) [Parker JS,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Parker%20JS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) [Jin J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jin%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) [Hammond SM.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hammond%20SM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17326821) microRNAexpression in the prefrontalcortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder[J]. GenomeBiol, 2007, 8(2): R27

[62] Kagan BL, Hirak UY, Azimov R. The channellly Pothesis of Alzeimer'sdisease: current status[J]. Peptides, 2002, 23(7): 1311-1315.

[[63] Pasquinelli AE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pasquinelli%20AE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512)1, [Reinhart BJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reinhart%20BJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Slack F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Slack%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Martindale MQ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Martindale%20MQ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Kuroda MI,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kuroda%20MI%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Maller B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Maller%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Hayward DC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hayward%20DC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Ball EE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ball%20EE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Degnan B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Degnan%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Müller P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=M%C3%BCller%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Spring J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Spring%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Srinivasan A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Srinivasan%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Fishman M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fishman%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Finnerty J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Finnerty%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Corbo J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Corbo%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Levine M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Levine%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Leahy P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Leahy%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Davidson E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Davidson%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) [Ruvkun G.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ruvkun%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11081512) Conservation of these quenee and temporal expression of let-7 heteroehlonie regulatory RNA[J]. Nature, 2000, 408(6808): 86--89.

[64] Hébert SS, HorréK, NicolaïL, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahtaroglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/β-secretase expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2008, 105(17): 6415-6420.

[65] Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H. [ABADdirectlylinksAbeta to mitochondrialtoxicity in Alzheimer'sdisease[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087549) Seience, 2004, 304(5669): 448-452.

[66] Adamezyk A, CzaPski GA, Jesko H, Strosznajder RP. Non A beta component of Alzheimer's disease amyloid and amyloid beta peptides evoked poly(ADP-ribose) polymerase-dependent release of apoptosis-inducing factor from rat brain mitochondria[J]. J Physiol Pharmacol. 2005, 56, SuPP2: 5-13.

[67] Lesne S, Koh MT, Kotilinek L. A specific amyloid-beta Protein assembly in the brain impairs memory[J]. Nature, 2006, 440(7082): 352-357.

[[68] Baldwin AS Jr.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Baldwin%20AS%20Jr%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8717528) The NF-kB and IkB proteins: new discoveries and insights[J]. Annu Rev Immunol, 1996, 14: 649-683.

[69] Thanos D, Maniatis T. NF- kappa B: a lesson in family values[J]. Cell, 1995, 80( 4): 529- 532.

[70] Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 225~260.

[71] May MJ, Ghosh S. Ikappa B kinases: kinsmen with different craffts[J]. Science, 1999, 284(5412): 271-273.

[72] Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-κB-sensitive micro RNA-146a-mediated infl ammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human braincells[J]. J Biol Chem 2008, 283: 31315-31322.

[73] Zhao Y, Cui JG, Lukiw WJ. Natural secretory products of human neural and microvessel endothelial cells: implications in pathogenic 'spreading' and Alzheimer's disease[J]. Mol Neurobiol, 2006, 34: 181-192.

[74] Lukiw WJ, Alexandrov PN, Zhao Y, Hill JM, Bhattacharjee S. Spreading of Alzheimer's disease infl ammatory signaling through soluble microRNA[J]. Neuroreport, 2012, 23: 621-626.

[75] Cui JG, Hill JM, Zhao Y, Lukiw WJ. Expression of infl ammatory genes in the primary visual cortex of late-stage Alzheimer's disease. Neuroreport 2007, 18: 115-119.

[76] Lukiw WJ, Dua P, Pogue AI, Eicken C, Hill JM. Up-regulation of micro RNA-146a(miRNA-146a), a marker for infl ammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler Scheinker (GSS) syndrome[J]. J Toxicol Environ Health, 2011, 74: 1460-1468.

[77] Pogue AI, Cui JG, Li YY, Zhao Y, Culicchia F, Lukiw WJ. miRNA-125b (miRNA-125b) function in astrogliosis and glial cell proliferation[J]. Neurosci Lett 2010, 476: 18-22. 59.

[78] Lukiw WJ. NF-кB-regulated micro RNAs (miRNAs) in primary human brain cells[J]. Exp Neurol 2012, 235: 484-490.

[79] 杨志华. 脑内NF- kB 及其病理生理学意义[J]. 国外医学, 生理, 病理科学与临床分册, 2000, 20( 6) : 504~ 506.

[80] O'NeillL AJ, Kaltschmidt C. NF-kB: acrucialtranscription factor forglial and neuronal cell function[J]. Trends Neurosci, 1997, 20: 252~258.

[81] Lukiw WJ, Bazan NG. Strong nuclear factor-kB-DNA binding parallelscyclo oxygenase-2 gene transcription in aging and in sporadic Alzheimer's disease superior temporallobe neocortex[J]. J Neurosci Res, 1998, 153(5): 583~592.

[82] [82] [Boissière F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Boissi%C3%A8re%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9376517) [Hunot S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hunot%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9376517) [Faucheux B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Faucheux%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9376517) [Duyckaerts C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Duyckaerts%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9376517) [Hauw JJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hauw%20JJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9376517) [Agid Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Agid%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9376517) [Hirsch EC.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hirsch%20EC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9376517) Nuclear translacation of NF-kB in cholinergic neurons of patients with Alzheimer's disease[J]. Neuroreport, 1997, 8: 2849~2852.

[[83] Pogue AI,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pogue%20AI%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Li YY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20YY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Cui JG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cui%20JG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Zhao Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhao%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Kruck TP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kruck%20TP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Percy ME,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Percy%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Tarr MA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tarr%20MA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) [Lukiw WJ.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lukiw%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19540598) Characterization of an NF-kB-regulated, miRNA-146a-mediated down-regulation of complement factor H (CFH) in metal-sulfate-stressed human brain cells[J]. [J Inorg Biochem,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Characterization%2Bof%2Ban%2BNF-kB-regulated%2C%2BmiRNA-146a-mediated%2Bdown-regulation%2Bof%2Bcomplement%2Bfactor%2BH%2B(CFH)%2Bin%2Bmetal-sulfate-stressed%2Bhuman%2Bbrain%2Bcells) 2009, 103(11): 1591–1595.

[84] 王林平; 牛侨. [铝致大鼠海马神经细胞凋亡分子机制的体内实验研究](http://acad.cnki.net/kns55/detail/detail.aspx?dbcode=CMFD&amp;QueryID=2&amp;CurRec=12&amp;dbname=CMFD0506&amp;filename=2005099564.nh): [硕士学位论文], 太原: ft西医科大学, 2005.

[85] 张勤丽; 牛侨. [铝致神经细胞凋亡机制的体外实验研究](http://acad.cnki.net/kns55/detail/detail.aspx?dbcode=CMFD&amp;QueryID=0&amp;CurRec=21&amp;dbname=CMFD0506&amp;filename=2005099507.nh): [硕士学位论文], 太原: ft西医科大学, 2005.

[[86] Clemens JA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Clemens%20JA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9332715) [Stephenson DT,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stephenson%20DT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9332715) [Dixon EP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dixon%20EP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9332715) [Smalstig EB,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Smalstig%20EB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9332715) [Mincy RE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mincy%20RE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9332715) [Rash KS,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rash%20KS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9332715) [Little SP.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Little%20SP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9332715) Global cerebral ischemia activatesnulear factor- kB prior to evidence of DNA fragmentation[J]. Mol Brain Res, 1997, 48: 187-196.

[87] Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor Kappa B: important transcription factor and therapeutic larget[J]. J Clin Pharmacal, 1998, 38(11): 981-993.

[[88] Akama KT,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Akama%20KT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9576964) [Albanese C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Albanese%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9576964) [Pestell RG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pestell%20RG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9576964) [Van Eldik LJ.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Eldik%20LJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9576964) Amyloidβ-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NF-kB-dependent mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 5795~5800.

[[89] Bisaglia M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bisaglia%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971)[, Venezia V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Venezia%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971) [Piccioli P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Piccioli%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971) [Stanzione S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stanzione%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971) [Porcile C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Porcile%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971), [Russo C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Russo%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971), [Mancini F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mancini%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971) [Milanese C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Milanese%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971), [Schettini G.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schettini%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11918971) Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF-kappaB activation[J]. Neurochem Int, 2002, 41(1): 43-45.

[[90] Kaltschmidt B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kaltschmidt%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9122249) [Uherek M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Uherek%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9122249) [Volk B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Volk%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9122249) [Baeuerle PA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Baeuerle%20PA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9122249) [Kaltschmidt C.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kaltschmidt%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9122249) Transcription factor NF-kB is activated in primary neurons by amyloid-βpeptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 96(4): 2642~2647.

[91] Lukiw WJ. NF-кB-regulated micro RNAs (miRNAs) in primary human brain cells[J]. Experimental Neurology, Exp Neurol. 2012, 235(2): 484-490.

[[92] 宗园媛](http://www.cnki.net/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CDFD&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%ae%97%e5%9b%ad%e5%aa%9b&amp;code=26388986%3B); 秦川. 阿尔茨海默病中microRNA29c对APP、BACE1蛋白的负性表达调控: [博士学位论文], 北京: 北京协和医学院, 2009.

[[93] 张勤丽,](http://www.cnki.net/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%bc%a0%e5%8b%a4%e4%b8%bd&amp;code=08433708%3B08492404%3B08433535%3B14736269%3B08440777%3B08492405%3B) [牛丕业,](http://www.cnki.net/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e7%89%9b%e4%b8%95%e4%b8%9a&amp;code=08433708%3B08492404%3B08433535%3B14736269%3B08440777%3B08492405%3B) [牛侨,](http://www.cnki.net/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e7%89%9b%e4%be%a8&amp;code=08433708%3B08492404%3B08433535%3B14736269%3B08440777%3B08492405%3B) [王林平,](http://www.cnki.net/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e7%8e%8b%e6%9e%97%e5%b9%b3&amp;code=08433708%3B08492404%3B08433535%3B14736269%3B08440777%3B08492405%3B) [何淑嫦,](http://www.cnki.net/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e4%bd%95%e6%b7%91%e5%ab%a6&amp;code=08433708%3B08492404%3B08433535%3B14736269%3B08440777%3B08492405%3B) [邬堂春.](http://www.cnki.net/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%82%ac%e5%a0%82%e6%98%a5&amp;code=08433708%3B08492404%3B08433535%3B14736269%3B08440777%3B08492405%3B) 铝对体外培养大鼠神经元线粒体的影响. 卫生研究, 2005, 34(6): 674-677.

[94] 胡佳丽; 牛侨. 探索维甲酸受体在铝致非淀粉样沉淀途径中的作用: [硕士学位论文], 太原: ft西医科大学, 2014.

[95] 梁瑞峰; 牛侨. 亚慢性铝暴露影响Aβ生成在铝致神经行为损伤中的作用: [硕士学位论文], 太原: ft西医科大学, 2012.

综述

**铝与miRNA的研究现状**

小RNAs为一类科学家们在动物、以及植物细胞中发现的长度约为20一30个核苷酸[1,2]。各类小RNAs根据它们不同的生物学功能、与其它相关的蛋白基因的相互作用以及其调节的靶目标，可以将其分为三个类别：小干扰RNAs (endogenous small interfering RNAs, endo-siRNAs)、微小（microRNAs, miRNAs）和前体相互作用RNAs (Piwi-interacting RNAs, piRNAs)。小干扰RNA是一类包含有21–23个核苷酸短的双链

RNAs，其中包含19核区，通过该区域，该类RNAs可以经过一种被称为RNA干扰的机制，从而来干预特定的基因蛋白的表达。前体相互作用RNAs是一类仅在原始生物和动物生殖细胞中丰富存在的来源于单链前体RNAs的小RNA，其携带有19个核苷酸复合区域[3]。MicroRNAs(miRNAs)是一类长度小分子的单链RNA，它不具有翻译成蛋白质的功能，在进化上较为保守[4-5]，成熟体的miRNA由位于细胞核内的前体miRNA (pre-miRNA)经过一系列剪切以及转运后生成，最终位于细胞质内，随后被细胞分泌在原始位置或者经过各种途径转移至其功能部位从而发生它相应的调节作用。

miRNAs能够影响靶mRNA的稳定性抑制其翻译，或者使靶mRNA降解，或者两种作用同时存在，而且具有配对性不特异，从而抑制许多不同的mRNA翻译[6]。miRNA对于物种进化、生物基因蛋白研究以及人类疾病发生、发展和机制的探索研究以及疾病的预防控制都有非常重要的研究意义。目前在人类中发现大约有1872种miRNAs可能参与调节人类约2/3基因的表达，几乎影响所有的基因通路。目前miRNA的靶基因已经可以通过计算机模型来进行预测[7]。

1 miRNA的合成

编码miRNA的基因，存在于基因组蛋白编码区和不同基因之间的基因间区。大部分的miRNAs是从同一种宿主基因促进子转录而形成，然而，也有约35%的miRNAs具有与前体促进子功能相一致的上游调控元件，进行调控转录[8]。

miRNAs基因最初来源于Pri-miRNAs，有大部分Pri-miRNAs由RNA聚合酶II (Pol

II）来进行转录[9]，少部分Pri-miRNAs由RNA聚合酶III (Pol III) [10]进行转录。它们的促进子包含转录起始点，CpG岛，表达序列结构和转录调节结合位点（包括转录沉默子以及转录增强子）[11-12]. Pri-miRNAs被存在于细胞核内的RNA聚合酶III (RNase III) Drosha [13]剪切成约70～90个碱基大小的片段，即Pre-miRNA，切割时需要结合被称为Pasha的辅助因子DGCR8[14]。而该切割同时又会受到Drosha–DGCR8复合物的调节[15-16]. Pre-miRNA随即被Exportin-5从细胞核转运到细胞质中，该过程需要中有蛋白因子Ran的参与[17]。最终，在胞质中Pre-miRNA被Dicer剪切成为成熟miRNA[18-19]，成熟的miRNA与其互补序列结合成双螺旋结构，随后在解旋酶的作用下，双螺旋解旋，其中一条链miRNA(miRNA被降解)与核蛋白复合体中的Ago蛋白(argonaute proteins)家族蛋白耦联，形成RNA诱导的沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC). miRNA引导Ago蛋白借助互补位点靶向mRNA. Ago蛋白发挥活性而导致mRNA翻转，抑制靶向转录物的翻译（见图1[1, 20]）。miRNA合成的每一步都受到酶的调控。包括miRNA前体合成、剪切成成熟的miRNA、对mRNA的翻译以及miRNA与靶基因的结合。这些酶广泛存在于成熟神经元的树突内，

?

图片1 [1,20]

2 miRNA的特征

miRNA广泛存在于真核生物中，主要特点包括有：（1）在不同物种间，序列进化高度保守，是一组不编码蛋白质的短序列的RNA；（2）表达具有严格的时空性以及组织特异性；（3）单链的RNA，不能够翻译成蛋白质；（4）通常的长度大约为22-25个核苷酸，极少数少于20个核苷酸，它的长度变化主要位于在3’端，存在有几个碱基长度的变化。（5）主要功能是调节特定蛋白质的基因表达量以及翻译成蛋白质的量。

3 miRNA的功能

miRNA的主要功能是调节各类蛋白质的基因[21]。它可以通过调节基因的表达量和翻译蛋白质的量，从而调节机体的生长、发育、细胞形态结构的维持、细胞正常功能的发挥、细胞的凋亡、死亡、坏死等各类细胞活动。

根据miRNA与靶基因3'UTR区互补程度的不同。miRNA作用机制可以分为两种：第一，介导mRNA降解。miRNA与相对应的靶mRNA完全或几乎完全互补时，沉默复合体结合靶基因，使得把基因发生降解。第二，抑制靶基因翻译。当miRNA不能与靶mRNA完全配对时，则通过翻译抑制的方式调控靶基因，且需要多种miRNA对同一靶基因协同作用。miRNA运用这两种机制通过影响mRNA来降低相应靶基因的蛋白表达水平。miRNA除了靶向调节mRNA调节蛋白翻译外。除此之外，miRNA发挥功能的部位与其产生的部位不一定一致，一项新的研究表明，特定的miRNA可能只在特定部位的细胞、或者特定种类的细胞内合成、并将其分泌到该部位，随后成熟的

miRNA会经过多种途径转移到相应的部位或者细胞发挥其调节功能。

miRNA作为调节基因，在控制生物正常的生长发育和调控生物细胞发挥正常生物学功能方面有不容忽视的作用。miRNA的种类有成千上万种，在结构上同一类型的

miRNA可能呈现不同的结构，在生物体内不同的器官、组织、细胞以及不同的发育阶段和不同的激活状态下都可以呈现不同的类型和表达方式。因此，在一系列生命过程中，均起到了至关重要对的作用，包括早期系统发育（如: miNAR14、miRNA23）

[22,23].、细胞增殖[24-26]、细胞凋亡[27]、细胞死亡[28-29]、脂肪代谢等。综合这些研究结

果发现，miRNA在基因表达以及其所决定的蛋白正常翻译的量和功能维持正常方面的调控领域中起着至关重要的作用。

当miRNA异常表达时，就会引起人类发生多种疾病，如肿瘤[30-34]、心血管疾病、糖尿病、人类遗传性疾病、神经系统疾病[35-37]。

4 miRNA与神经系统

目前发现的miRNA中大部分都可以在脑组织中出现不同程度的表达[38-39]。在哺乳类动物的神经系统中已经发现具有很多种类的miRNA。其中有一些miRNA为神经系统中所特有的，在其它系统中则不表现，如miRNA101、miRNA124a、miRNA128等，一些miRNA在所有系统中均有表达，但在神经系统中含量则非常的丰富，如miRNA34、miRNA125b [ 40,41]。无论是特异性的，还是含量丰富的miRNA，其与神经系统的发育、生物钟调节、神经细胞形态结构功能的维持以及学习记忆等功能密切相关[ 42-46] 。

神经系统中表达和存在的miRNA大约有30%左右的都参与了神经系统的发育。其发育的作用包括祖细胞向何种神经细胞分化、不同种类细胞呈现其特有的形态、不同细胞发挥特定的功能[ 47]。随着神经系统分化和发育，miRNA也会随着在种类、含量、分布上出现明显的变化[ 48-50]. miRNA还有可能参与了中枢神经系统发育的时间和空间性的调节和控制，以保证中枢神经系统在发育和分化是在时间上保持一定的先后顺序，在空间上维持正确的结构。例如，有研究[ 51-52]发现miRNA与多种动物中枢神经系统组织的前后生长的方式有着密切的关系，动物脑组织前后生长发育时，不同

miRNA在脑组织前后位置的表达是完全不同的。

miRNA还在维持各种不同神经细胞的正常形态结构的过程中起到至关重要的作用。在各类动物中枢神经系统发育的过程中，miRNA可以通过调节mRNA的水平以及翻译程度来调节神经祖细胞的分化方向并调节不同细胞的形态结构和功能[55]。不同的蛋白由其mRNA来决定，但mRNA的翻译过程中需要通过miRNA来调控，从而维持蛋白的正常水平以及功能，进一步是细胞维持正常形态并发生正常功能。miRNA还可以调节来自同一细胞祖系的不同类型细胞的在功能上及形态上呈现出细微的差别。

脑组织中不同类型的细胞存在有不同的miRNA表达谱[ 53]，如一些miRNA在神经元细胞中有高表达，如miRNA124、miRNA128等，一些miRNA在星形胶质细胞中有高表达，如miRNA23、miRNA26、miRNA29等，而另外有一些miRNA在这两种细胞中则均呈现高表达，如miRNA9、miRNA125。有文献报道[54]，miRNA9只在脑皮质成胶质细胞和成神经细胞中中呈现高表达，miRNA124a则只在脑皮质成熟神经元细胞中有高表达。miRNA具有明显的组织特异性，也就决定了其调节的mRNA和蛋白的不同编码，也可以在一定程度上反映蛋白的组织特异性[ 56-58]。

另有文献报道，miRNA可以通过调节促神经转录因子来促进神经祖细胞的向不同功能的神经细胞分化，例如，miRNA124可以[59]通过调节一些神经转录因子来决定神经祖细胞向不同的方向分化。有学者[60]研究发现在miRNA与树突棘的形态和大小具有密切的关系，如miRNA134表达升高时，其就会使Limk1呈现抑制，树突棘中维持结构的肌动蛋白结构破坏，树突棘就会随之变小。

也有研究发现，miRNA还具有调节生物钟的功能，研究者检测[61]发现多种miRNA可以通过多种途径调节视交叉上核的生物钟。

5 miRNA与AD及Aβ的关系

研究表明，miRNA的表达和功能的异常参与了在各种神经系统疾病的发生和进展，包括神经发育疾病和神经退行性疾病[62, 63]。其中，神经退行性疾病例如阿尔茨海默病，帕金森综合征等疾病发生、发展都与miRNA的异常表达和调节有着密切的关系。AD是一种复杂的神经退行性疾病，是老年痴呆症的最常见形式，最常见于中老年人群中。越来越多的研究证据表明，miRNA的异常表达影响了这种疾病的发生和病情进展[64-67]。

研究者[68]发现miRNA在AD病人的脑脊液及大脑皮层及海马内出现了异常的表达，且这种异常表达具有显著的部位特异性。有研究者对AD患者脑海马内miRNA表达进行检测后，发现miRNA9、miRNA125b和miRNA128等miRNA的表达出现了明显的增多。有学者[69]对检测了AD患者前颞叶皮层的miRNA表达，结果发现有

miRNA29a、miRNA29b等十多种miRNA出现了异常的升高或者降低的表现。研究发现，在啮齿类大脑衰老的过程中miR29a/b1出现了降低，与之伴随发生的有BACE水平

的升高，在脑内出现老年斑的表现。并证实miR29a/b1可以靶向的作用于BACE1基因的3*'-*UTR，当miR-29a/b1的表达则表现为明显的下调时，BACE1蛋白的表达则会出现明显的上调，也即二者以一种负反馈的方式进行调控表达。HEK293细胞系中miR29a/b1的过度表达同样会引起内源性BACE1蛋白表达出现下调，并随之引起Aβ表达也出现下调；相反，如果miR29a/b1的缺失则引起BACE1蛋白增加，其切割产物Aβ就会明显增加并发生沉积。在体外实验研究中，对培养细胞的荧光素酶进行分析后，同样可以证实miR29a、miR29b1可以BACEmRNA的3'-UTR，从而对BACE蛋白的表达进行调节。综上研究基础，细胞中miRNA29a，miRNA29b1的缺失会难溶性的Aβ在脑内的沉积，并与SAD的发生和进展相关，其作用途径可能是通过调节BACE1蛋白的表达升高来实现的。有学者[70]研究发现检测在AD患者的脑内的miRNA，结果发现miRNA107也出现了明显的下降。在AD的进展过程中，随着miRNA107水平和BACE蛋白呈现负性相关的关系。生物信息学方法也进一步证实了miRNA107可以与BACEmRNA的3'-UTR序列发生结合，从而调节BACE蛋白的表达。研究者[71]通过动物实验，检测结果发现miRNA298以及miRNA328可以调节BACE的蛋白水平，当miRNA298以及miRNA328出现降低时，BACE水平可能会出现升高，从而促进AD的发生和进展。进一步在体外细胞培养实验中，也证实了miRNA298和miRNA328亦可以与BACEmRNA的3'-UTRmRNA结合位点进行特异性结合，从而调节BACE蛋白的表达，最终引起Aβ在脑内的沉积。

Patel[72]等进行了体外细胞实验HEK-293细胞，并将miRNA106a转染进入细胞，结果显示miRNA106a以及miRNA520c都具有调节APP基因的作用，与未转染miRNA106a和miRNA520c成熟片段的细胞相比，在高表达miRNA106a和miRNA520c的细胞中，检测发现内源性APP水平可降低达到一半左右[72]。AD患者脑组织中检测发现miRNA106b表达出现下调，通过鼠原代神经元培养，并将miRNA20a、miRNA17p和miRNA106b片段转入细胞后，发现这些miRNA与APP表达的水平密切相关[73]。有研究表明，体内实验中，神经元缺乏某些miRNA与APP选择性剪切有关，该类miRNA最常见的如miRNA124 [74]。研究表明，miRNA124在AD患者脑组织中的表达显著降低[75]，它在AD患者脑中表达的下调，说明miRNA124也与神经元细胞中APP选择性剪接有关。另外，还有学者对AD患者脑组织的其它miRNA进行检测，结果发现在患者脑内还有miRNA181c、miRNA147等表达的下调[69]，其最终结果是导致其切割产物Aβ

在脑内不断沉积[76]。研究者[78]使用miRNA芯片对检测了APP转基因小鼠脑组织中的miRNA，结果显示其中约有150种miRNA出现了表达的显著性上调或者显著性的下调，出现这种损伤是可能是由Aβ增多是密不可分的。

目前一些研究者认为，AD患者脑组织中miRNA的整体性下调可能与Aβ的增多有关。如miRNA9和miRNA181c具有明显的抑制作用[79]。因此，一些miRNA可调控APP，BACE的蛋白表达，引起APP通过BACE剪切形成的降解产物之一Aβ在脑内出现明显沉积，而沉积的Aβ又可反过来对一些miRNA进行“强有力”[77]的调控，进一步促进APP，BACE水平增高和Aβ的沉积，这样就形成了由miRNA、APP、β分泌酶、Aβ为主要组成的调控网络。

6铝与miRNA的研究

越来越多的数据显示，miRNA参与了化学毒性物质暴露损伤的通路中基因表达的调控[80-82]. miRNAs在环境污染物特别是化学毒物暴露损伤中起到非常关键的作用[83, 84]。研究发现铝与miRNA有着密切的联系。但铝与miRNA的关系研究主要集中于miRNA在铝对植物中生长调控中的作用[85]。有学者[86]用不同浓度的三氧化二铝纳米粒子作用于烟草种子，观察烟草幼苗的平均根长、叶数、生物量减少。并对烟草幼苗中的miRNAs进行检测，结果发现多种miRNA的表达水平出现下调，而miRNA156、

miRNA157、miRNA172、miRNA395、miRNA397、miRNA398和miRNA399表达水平上调。因此，说明miRNA可能在纳米三氧化二铝对烟草幼苗的应激反应中起着重要的调控作用，三氧化二铝纳米粒子影响烟草幼苗的生长和发育。miRNA在铝毒性中的研究在动物中也可见到一些，Lukiw等[87]等培养原代神经细胞，使用硫酸铝铁处理培养细胞，结果发现硫酸铝可以诱导氧自由基的产生，并影响一系列表达的miRNA亚型，使其表达出现上调。

7展望

miRNA已经成为学者们研究探讨生物生长、发育以及疾病进展的一个重要的方向。研究者发现了多种miRNA在神经系统发育、分化过程起到至关重要的作用，而且在神经系统疾病中也起到的显著的调节和影响。并且与AD患者的发病和Aβ有着千

丝万缕的联系。在铝毒性研究过程中，铝与miRNA的研究还多集中在植物生长过程的机制影响。随着铝毒性研究的深入，miRNA在铝对人类毒性机制的研究也必将越来越多，该方面的研究对于铝的毒性机制研究完善和铝毒性的预防和控制有重要的意义。

**综述参考文献**

[1] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009,10(2):126–139.

[2] Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe[J]. Nat Rev Genet, 2009,10(2):94–108.

[3] Malone CD, Hannon GJ. Small RNAs as guardians of the genome[J]. Cell, 2009, 1364(4): 656–668.

[4] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature. 2004, 431 (7006): 350–355.

[5] Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease[J]. J Pathol, 2010, 220 (2): 126–139.

[6] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. Nature, 2010, 466 (7308): 835–840.

[7] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked byadenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell 2005, 120(1): 15–20.

[8]冯璐， 冷伏海. 共词分析方法理论进展[J]. 中国图书馆学报, 2006, (02): 88-92.

[9] Reichhardt T. It's sink or swim as a tidal wave of data approaches [J]. Nature, 1999, 399(6736): 517-520.

[10] Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, Davidson BL. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters[J]. RNA, 2013, 16(3): 495–505.

[11] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II[J]. EMBO J, 2004,23 (20):4051–4060.

[12] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol[J]. 2006,13 (12):1097–1101.

[13] Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. Annu Rev Pathol, 2009,4: 199–227.

[14] Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters[J]. Genes Dev. 2008, 22 (22):3172–3183.

[15] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, S. Kim, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. Nature 2003,425 (6956):415–419.

[16] Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The

Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs[J]. Nature, 2004,432 (7014):235–240.

[17] Triboulet R, Chang HM, Lapierre RJ, Gregory RI. Post-transcriptional con-trol of DGCR8 expression by the microprocessor[J]. RNA,2009,15 (6):1005–1011.

[18] Kadener S, Rodriguez J, Abruzzi KC, Khodor YL, Sugino K, Marr MT 2nd, Nelson S, Rosbash

M. Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex[J]. RNA,2009,15 (4):537–545.

[19] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentateribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001,409 (6818):363–366.

[20] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturationof the let-7 small temporal RNA[J]. Science,2001,293 (5531):834–838.

[21] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell 2009,136(2):215–233.

[22] Libri V, Miesen P, van Rij RP, Buck AH. Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70, 3525–3544.

[23] Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressots[J]. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1768.

[24] Gao FB. Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal developmen[J] t. Neural Dev, 2010,5:25.

[25] Lang MF, Shi Y, Dynamic roles of microRNAs in neurogenesis[J]. Front. Neurosci, 2012, 6:71.

[26] Chen CZ, Li L, Iodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentitatin[J]. Science, 2004, 303(5654):83-86.

[27] Rogaev E1. Small RNAs in human brain development and disorders[J]. Biochemistry, 2005, 70(12): 1404.

[28] Clop A, Marcq F, Takeda H[, Pirottin D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pirottin%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Tordoir X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tordoir%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [BibéB,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bib%C3%A9%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Bouix J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bouix%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Caiment F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Caiment%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Elsen JM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Elsen%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Eychenne F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Eychenne%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Larzul C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Larzul%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Laville E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Laville%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Meish F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Meish%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Milenkovic D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Milenkovic%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Tobin J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tobin%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Charlier C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Charlier%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) [Georges M.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Georges%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16751773) A mutation creating a potential illegitimate m icroRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep[J]. Nature Genet,2006,38(7):813-818

[29] Tanno B, Cesi V, Vitali R, [Sesti F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sesti%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15618969) [Giuffrida ML,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Giuffrida%20ML%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15618969) [Mancini C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mancini%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15618969) [Calabretta B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Calabretta%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15618969) [RaschellàG.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Raschell%C3%A0%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15618969) Silencing of endogenousIGFBP一5 by microRNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells[J]. Cel1 Death Differ, 2005,12(3):213-223.

[30] Zhang BH, Pan XP, Anderson TA. MicroRNA: a newplayer in stem cells[J]. Cell Physiol, 2006, 209(2): 266.

[31] Alvarez Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. Development, 2005, 132(21): 4653-4662.

[32] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, [Iorio MV,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Iorio%20MV%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Ferracin M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ferracin%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Shimizu M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shimizu%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Wojcik SE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wojcik%20SE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Aqeilan RI,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Aqeilan%20RI%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262)

[Zupo S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zupo%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Dono M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dono%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Rassenti L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rassenti%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Alder H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Alder%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Volinia S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Volinia%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Liu CG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liu%20CG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Kipps TJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kipps%20TJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Negrini M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Negrini%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [Croce](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Croce%20CM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) [CM.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Croce%20CM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16166262) miR15 and miR16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. [Proc Natl Acad Sci U S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166262) [A.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166262)2005,102(39): 13944-13949．

[33] Zhang Z, Tang H, W ang Z, [Zhang B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) [Liu W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liu%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) [Lu H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lu%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) [Xiao L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Xiao%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) [Liu X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liu%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) [Wang R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) [Li X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) [Wu M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wu%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) [Li G.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21962230) MiR185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma[J]. Mol Cancer,2011,10: l24.

[34] O'Donnell KA, [Wentzel EA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wentzel%20EA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15944709) [Zeller KI,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zeller%20KI%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15944709) [Dang CV,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dang%20CV%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15944709) [Mendell JT.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mendell%20JT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15944709) c-Myc regulated microRNAs modulate E2FI expression[J]. Natnre,2005,435(7043):839-843.

[35] Ding J, Huang S, Wu S, [Zhao Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhao%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Liang L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liang%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Yan M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yan%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Ge C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ge%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Yao J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yao%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Chen T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chen%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Wan D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wan%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Wang H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Gu J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gu%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Yao M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yao%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Li J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [Tu H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tu%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) [He X.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=He%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20305651) Gain of miR151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDIA[J]. Nat Cell Biol,2010,12(4):390-399.

[36] Horikawa Y, Wood CG, Yang H, [Zhao H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhao%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19047128) [Ye Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ye%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19047128) [Gu J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gu%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19047128) [Lin J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lin%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19047128) [Habuchi T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Habuchi%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19047128) [Wu X.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wu%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19047128) Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes, nodi~the risk of renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2008,14(23):7956-7962.

[37] Alvarez Garcia I, M iska E A. M icroRNA functions in animal development and human disease[J]. Development,2005,132(21):4653-4662.

[38] Esquela Kerscher A, Slack F J. Oncomirs-microRNAs with a role in cance[J]. Nat Rev Cancer,2006,6(4):259～269.

[39] Lim LP, Lau NC, Garrett Engele P, [Grimson A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Grimson%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15685193) [Schelter JM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schelter%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15685193) [Castle J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Castle%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15685193) [Bartel DP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bartel%20DP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15685193) [Linsley PS,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Linsley%20PS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15685193) [Johnson JM.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Johnson%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15685193) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. Nature,2005,433(7027):769~773.

[40] Burmistrova OA, Goltsov AY, Abramova LI, Kaleda VG, Orlova, VA, Rogaev EI. MicroRNA in schizophrenia: genetic and expression analysis of miR-130b(22q11) [J]. Biochemistry

(Mosc),2007,72 (5):578–582.

[41] Lukiw WJ, Pogue AI. Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROSgenerating metal sulfates in primary human brain cells[J]. J Inorg Biochem,2007,101 (9):1265–1269.

[[42] Lagos-Quintana M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lagos-Quintana%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12007417)1, [Rauhut R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rauhut%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12007417) [Yalcin A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yalcin%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12007417) [Meyer J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Meyer%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12007417) [Lendeckel W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lendeckel%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12007417) [Tuschl T.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tuschl%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12007417) Identification of tissue

Specific microRNAs from mouse[J][. Curr Biol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007417) 2002, 12(9): 735-7391.

[[43] Dostie J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dostie%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12554860) [Mourelatos Z,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mourelatos%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12554860) [Yang M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yang%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12554860) [Sharma A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sharma%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12554860) [Dreyfuss G.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dreyfuss%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12554860) Numerous microRNAs in neuronal cells containing novel microRNAs[J]. RNA, 2003, 9(2):180-186.

[[44] Okabe M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Okabe%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11333984) [Imai T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Imai%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11333984) [Kurusu M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kurusu%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11333984) [Hiromi Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hiromi%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11333984) [Okano H.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Okano%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11333984) Translational repression determines a neuronal potential in Drosophilaasym metric cell division[J]. Nature, 2001, 3411(6833): 94-981.

[[45] Miller S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Miller%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12408852) [Yasuda M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yasuda%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12408852) [Coats JK,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Coats%20JK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12408852) [Jones Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jones%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12408852) [Martone ME,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Martone%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12408852) [Mayford M.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mayford%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12408852) Disruption of dendritic translation of CaMK IIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation[J]. Neuron, 2002, 36(3): 507-5191

[46] Kosik KS. The neuronal microRNA system. Nat Rev Neurosci,2006,7, 911–920.

[47] Kosik KS, Krichevsky AM, The elegance of the microRNAs: a neuronal perspective[J]. Neuron,2005,47:779–782.

[48] Shi Y, Zhao X, Hsieh J, Wichterle H, Impey S, Banerjee S, Neveu P, Kosik KS. MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis[J]. J Neurosci, 2010,30,14931–14936.

[[49] Kapsimali M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kapsimali%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17711588) [Kloosterman WP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kloosterman%20WP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17711588) [de Bruijn E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=de%20Bruijn%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17711588) [Rosa F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rosa%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17711588) [Plasterk RH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Plasterk%20RH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17711588) [Wilson SW.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wilson%20SW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17711588) MicroRNA show a wide of expression profiles in the developing and matu re central nervous system[J]. Genome Bio, 2007, 8 (8):R1731.

[[50] Sempere LF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sempere%20LF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15003116) [Freemantle S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Freemantle%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15003116) [Pitha-Rowe I,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pitha-Rowe%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15003116) [Moss E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Moss%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15003116) [Dmitrovsky E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dmitrovsky%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15003116) [Ambros V.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ambros%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15003116) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal d ifferentiation[J]. Genome Bio, 2004, 5: R131

[[51] Miska EA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Miska%20EA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Alvarez-Saavedra E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Alvarez-Saavedra%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Townsend M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Townsend%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Yoshii A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yoshii%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Sestan N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sestan%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Rakic P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rakic%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Constantine-Paton M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Constantine-Paton%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) [Horvitz HR.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Horvitz%20HR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15345052) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain[J]. Genome Bio,2004, 5: R681.

[[52] Krichevsky AM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Krichevsky%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=13130141) [King KS,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=King%20KS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=13130141) [Donahue CP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Donahue%20CP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=13130141) [Khrapko K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Khrapko%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=13130141) [Kosik KS.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kosik%20KS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=13130141) A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development[J]. RNA, 2003, 9(10): 1274-1281.

[[53] Pearson JC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pearson%20JC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16341070) [Lemons D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lemons%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16341070) [McGinnis W.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=McGinnis%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16341070) Modulating Hox gene functions during animal body pattering[J]. Natu reRev Genet,2005, 6(12): 893-904.

[[54] Aboobaker AA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Aboobaker%20AA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16330759) [Tomancak P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tomancak%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16330759) [Patel N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Patel%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16330759) [Rubin GM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rubin%20GM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16330759) [Lai EC.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lai%20EC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16330759) Drosophila microRNA exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development[J][. Proc Natl Acad Sci U S A.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Drosophila%2BmicroRNA%2Bexhibit%2Bdiverse%2Bspatial) 2005, 10250): 18017-18022.

[[55] Smirnova L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Smirnova%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15845075) [Gräfe A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gr%C3%A4fe%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15845075) [Seiler A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Seiler%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15845075) [Schumacher S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schumacher%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15845075) [Nitsch R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nitsch%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15845075) [Wulczyn FG.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wulczyn%20FG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15845075) Regulation of microRNA expression during neural cell specification[J]. Eur J Neurosci 2005, 21(6): 1469-1477.

[[56] Nelson PT,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nelson%20PT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16373485) [Baldwin DA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Baldwin%20DA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16373485) [Kloosterman WP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kloosterman%20WP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16373485) [Kauppinen S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kauppinen%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16373485) [Plasterk RH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Plasterk%20RH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16373485) [Mourelatos Z.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mourelatos%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16373485) RAKE and LNA-ISH revealm icroRNA exp ression and local ization in archival human brain[J]. RNA, 2006, 12(2): 187-191.

[[57] Presutti C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Presutti%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17118159) [Rosati J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rosati%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17118159) [Vincenti S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vincenti%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17118159) [Nasi S.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nasi%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17118159) Non coding RNA and brain[J]. BMC Neurosci,2006, 7: S51.

[[58] Hobert O.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hobert%20O%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15337119) Common logic of transcription factor and microRNA action[J]. Trand Biochem Sci,2004, 29(9): 462-468.

[[59] Doench JG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Doench%20JG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15014042) [Sharp PA.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sharp%20PA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15014042) Specificity of microRNA target selection in trans lational repression[J]. Gene Dev, 2004, 18(5): 504-511.

[[60] Vo N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vo%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16260724) [Klein ME,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Klein%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16260724) [Varlamova O,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Varlamova%20O%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16260724) [Keller DM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Keller%20DM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16260724) [Yamamoto T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yamamoto%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16260724) [Goodman RH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Goodman%20RH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16260724) [Impey S.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Impey%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16260724) A cAM

P-response element binding protein induced microRNA regulates neuronal morphogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(45); 16426-16431.

[61] Turner D. The role of microRNA: miR124a in neuronal differentiation[J]. Soc Neurosci,2004, 36: 111.

[[62] Schratt GM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schratt%20GM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16421561) [Tuebing F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tuebing%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16421561) [Nigh EA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nigh%20EA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16421561) [Kane CG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kane%20CG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16421561) [Sabatini ME,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sabatini%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16421561) [Kiebler M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kiebler%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16421561) [Greenberg ME.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Greenberg%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16421561) A brain

Specific MicroRNA regulates dendritsine development[J]. Nature,2006, 439: (7074):283-289.

[[63] Cheng HY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cheng%20HY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Papp JW,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Papp%20JW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Varlamova O,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Varlamova%20O%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Dziema H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dziema%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Russell B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Russell%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Curfman JP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Curfman%20JP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Nakazawa T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nakazawa%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Shimizu K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shimizu%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Okamura H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Okamura%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Impey S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Impey%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) [Obrietan K.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Obrietan%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17553428) microRNA modulation of circadian-clock period and entrainmen[J]. Neuron,2007, 54(5): 813-829.

[64] Bian S, Sun T. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases[J]. Mol Neurobiol. 2011,44(3), 359–373.

[65] Qurashi A, Jin P. Small RNA-mediated gene regulation in neurodevelopmental disorders[J]. Curr. Psychiatry Rep. 2010,12(2), 154–161.

[[66] Colangelo V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Colangelo%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12391607) [Schurr J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schurr%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12391607) [Ball MJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ball%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12391607) [Pelaez RP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pelaez%20RP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12391607) [Bazan NG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bazan%20NG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12391607) [Lukiw WJ.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lukiw%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12391607) Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor

Down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling[J]. J Neurosci Res, 2002,70 (3): 462–473.

[[67] Loring JF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Loring%20JF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11788046) [Wen X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wen%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11788046) [Lee JM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11788046) [Seilhamer J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Seilhamer%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11788046) [Somogyi R.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Somogyi%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11788046) A gene expression profile of Alzheimer's disease[J]. DNA Cell Biol,2001, 20 (11):683–695.

[[68] Lukiw WJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lukiw%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15961160) [Percy ME,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Percy%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15961160) [Kruck TP.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kruck%20TP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15961160)2005a. Nanomolar aluminum induces proinflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primaryculture[J]. J Inorg Biochem. 99 (9):1895–1898.

[[69] Lukiw WJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lukiw%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151530) [Cui JG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cui%20JG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151530) [Marcheselli VL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Marcheselli%20VL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151530) [Bodker M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bodker%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151530) [Botkjaer A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Botkjaer%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151530) [Gotlinger K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gotlinger%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151530) [Serhan CN,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Serhan%20CN%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151530) [Bazan NG.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bazan%20NG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151530) A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease[J]. J Clin Invest,2005,115 (10):2774–2783.

[[70] Jiang Q,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jiang%20Q%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Lee CY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20CY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Mandrekar S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mandrekar%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Wilkinson B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wilkinson%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Cramer P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cramer%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Zelcer N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zelcer%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Mann K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mann%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Lamb B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lamb%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Willson TM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Willson%20TM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Collins JL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Collins%20JL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Richardson JC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Richardson%20JC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Smith JD,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Smith%20JD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Comery TA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Comery%20TA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Riddell D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Riddell%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Holtzman DM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Holtzman%20DM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Tontonoz P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tontonoz%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) [Landreth GE.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Landreth%20GE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18549781) ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta[J]. [Neuron,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18549781)2008,

58(5):681-93.

[71] Hébert SS, HorréK, NicolaïL, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahtaroglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/β-secretase expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA.2008,105(17):6415-6420.

[72] Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, Rigoutsos I, Nelson PT. [The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234899) J Neurosci,2008,28(5):1213-1223.

[[73] Boissonneault V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Boissonneault%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18986979) [Plante I,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Plante%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18986979) [Rivest S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rivest%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18986979) [Provost P.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Provost%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18986979) MicroRNA298 and MicroRNA328 regulate expression of mouseβ-Amyliod precursor protein-converting Enzyme1[J]. J Biol Chem, 2009,284(4): 1971-1981.

[[74] Patel N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Patel%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18684319) [Hoang D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hoang%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18684319) [Miller N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Miller%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18684319) [Ansaloni S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ansaloni%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18684319) [Huang Q,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Huang%20Q%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18684319) [Rogers JT,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rogers%20JT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18684319) [Lee JC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20JC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18684319) [Saunders AJ.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Saunders%20AJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18684319) MicroRNAs can regulate human APP levels[J]. Mol Neurodegener, 2008,3: 3-10.

[75] Hébert SS, HorréK, NicolaïL, Bergmans B, Papadopoulou AS, Delacourte A, De Strooper [B. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19110058) Neurobiol Dis, 2009,33(3):422-428.

[[76] Smith P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Smith%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21062284) [Al Hashimi A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Al%20Hashimi%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21062284) [Girard J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Girard%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21062284) [Delay C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Delay%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21062284) [Hébert SS.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=H%C3%A9bert%20SS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21062284) In vivo regulation of Amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs[J]. J Neurochem, 2011,116(2): 240-247.

[77] Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus[J]. Neuroreport, 2007, 18(3): 297-300.

[[78] Delay C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Delay%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21982160) [Calon F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Calon%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21982160) [Mathews P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mathews%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21982160) [Hébert SS.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=H%C3%A9bert%20SS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21982160) Alzheimer-specific variants inthe 3'UTR of amyloid precursor protein affect microRNA function[J]. Mol Neurodegener, 2011, 7(6): 70-76.

[[79] Schonrock N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schonrock%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20552018) [Ke YD,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ke%20YD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20552018) [Humphreys D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Humphreys%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20552018) [Staufenbiel M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Staufenbiel%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20552018) [Ittner LM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ittner%20LM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20552018) [Preiss T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Preiss%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20552018) [Götz J.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=G%C3%B6tz%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20552018) Neuronal microRNAderegulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta[J]. PLoS One, 2010, 5(6): 11070.

[[80] O'Carroll D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=O%27Carroll%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17626790) [Mecklenbrauker I,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mecklenbrauker%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17626790) [Das PP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Das%20PP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17626790) [Santana A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Santana%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17626790) [Koenig U,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Koenig%20U%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17626790) [Enright AJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Enright%20AJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17626790), [Miska EA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Miska%20EA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17626790), [Tarakhovsky A.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tarakhovsky%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17626790) A Slicer-independentrole for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway[J]. Genes Dev,2007,21(16):1999-2004.

[[81] Cogswell JP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cogswell%20JP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Ward J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ward%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Taylor IA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Taylor%20IA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Waters M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Waters%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Shi Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shi%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Cannon B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cannon%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Kelnar K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kelnar%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Kemppainen J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kemppainen%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Brown D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Brown%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Chen C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chen%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Prinjha RK,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Prinjha%20RK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Richardson JC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Richardson%20JC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Saunders AM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Saunders%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Roses AD,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Roses%20AD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) [Richards CA.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Richards%20CA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18525125) Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways[J]. J Alzheimers Dis,2008,14(1):27-41.

[82] M. Szyf. The dynamic epigenome and its implications in toxicology[J]. [Toxicol Sci.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The%2Bdynamic%2Bepigenome%2Band%2Bits%2Bimplications%2Bin%2Btoxicology) 2007,100(1):7-23.

[83] Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs inhuman cancer cells[J]. Cell Cycle,2006,5(19):2220–2222.

[[84] Meunier L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Meunier%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) [Siddeek B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Siddeek%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) [Vega A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vega%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) [Lakhdari N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lakhdari%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) [Inoubli L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Inoubli%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) [Bellon RP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bellon%20RP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) [Lemaire G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lemaire%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) [Mauduit C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mauduit%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) [Benahmed M.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Benahmed%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334722) Perinatal programming of adult rat germ cell deathafter exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in thedown-regulation of DNA methyltransferases and

Mcl-1[J][. Endocrinology,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Perinatal%2Bprogramming%2Bof%2Badult%2Brat%2Bgerm%2Bcell%2Bdeathafter%2Bexposure%2Bto%2Bxenoestrogens%3A%2Brole%2Bof%2BmicroRNA%2BmiR-29%2Bfamily%2Bin%2Bthedown-regulation%2Bof%2BDNA%2Bmethyltransferases%2Band%2BMcl-1)2012,153(4):1936–1947.

[85] LeBaron MJ, Rasoulpour RJ, Klapacz J, Ellis-Hutchings RG, Hollnagel HM, Gollapudi BB. Epigenetics and chemical safety assessment[J]. Mutat Res. 2010,705(2): 83–95.

[[86] Fabian MR,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fabian%20MR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22664986) [Sonenberg N.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sonenberg%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22664986) The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC[J]. Nat Struct Mol Biol, 2012,19(6): 586–593.

[87] He H, He L, Gu M. Role of microRNAs in aluminum stress in plants[J]. Minghua GuPlant Cell Rep. 2014,33(6): 831–836.

[[88] Burklew CE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Burklew%20CE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22606225) [Ashlock J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ashlock%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22606225) [Winfrey WB,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Winfrey%20WB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22606225) [Zhang B.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22606225) Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco[J]. PLos One,2012,7(5):e34783．

[89] Lukiw WJ, Pogue AI. Induction of specific micro RNA(miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells[J]. Journal of Inorganic

Biochemistry,2007,101(9):1265-1269.

致**谢**

时光飞逝，如驹过隙，漫长而又让人难忘的博士学习即将结束，值此博士课题以及博士毕业论文完成之际，向所有关心、支持和帮助我的人致以最诚挚的感谢和最美好的祝愿！

衷心感谢导师牛侨教授多年来对我耐心指导与严格要求。您知识渊博，科研作风严谨细致、为人正直的优良品德对我影响至深。您多年来对我的教育、指导、栽培和对我耳濡目染的影响让我树立了远大的人生理想，也让我养成了严谨进行科研的良好习惯，还教会了我诸多为人处世的方式方法。本课题在设计、实验、完成，以及实验方案调整、实验关键技术问题解决，甚至论文的撰写以及修改时时处处的的每一个环节都凝结着导师的心血。在此谨向我的导师致以最衷心的感谢和祝福！

本课题和论文是经过本课题组成员和教研室全体成员共同努力以后完成的。衷心感谢教研室各位教授、副教授在课题立题过程、实验过程中进行中给予我的全心全力的指导！衷心感谢ft西医科大学劳动卫生教研室其他各位老师在实验过程给予我的技术和操作上的指导和帮助！

也要感谢我的师妹胡佳丽同学、师弟赵越同学在实验过程中的认真细心的实验操作、不厌其烦的重复实验，因为你们的辛苦付出也换来了比较好的实验结果！谢谢你们！衷心感谢张慧芳、杨晓娟、潘宝龙、贾志建、葛翠翠、李伟庆、段蕾、贾晓芳、席华星、丁勇、李欢、李朝阳、陈文涛、原宇宙、聂小寒、王晓龙等教研室各位博士、硕士研究生以及本科生在我动物实验和细胞培养实验过程的技术修改上和实际耗材管理上的付出！

衷心感谢环境卫生教研室梁瑞峰副教授，衷心感谢药学院葛瑞老师和学生张佳丽、王效蕊在细胞培养过程中给予的无私的帮助和指导！

衷心感谢勤劳慈爱的父亲！衷心感谢勤俭善良的母亲！谢谢你们对陪伴我度过了无数个快乐而又艰难的日日夜夜！是你们给了我博大深沉而又细致入微的爱，成就了我今天的学业和成绩，你们的教育让我养成了爱学习、爱钻研的好习惯，你们的影响培养我形成了积极、乐观、不怕困难的性格，这也是我的学业能坚持走到今天的重要原因。你们的爱也将会点点滴滴渗透到今后的学习生活中！你们的幸福和健康是我最

大的心愿！

在此还要特别感谢我的爱人给予在我学习和工作上极大支持，我在课题是研究中需要投入大量的时间和精力，你给家庭投入诸多的时间和精力，也给了我无微不至的关怀和照顾，当我成功时，和我分享喜悦；当我遇到挫折时，给我不断的鼓励，让我重塑信心，继续奋斗！更要谢谢我聪明伶俐、乖巧懂事、活泼可爱的孩子！因为有你们的陪伴，让我有了努力前行的勇气和付诸实践的行动！谢谢你们！

在ft西医科大学度过的博士生活，既有成功的喜悦，也有失败的煎熬，不管遇到什么情况，总有家人、朋友、同事关心和帮助我。感谢一路走来所有关心、支持和帮助过我的每一个人！祝愿你们及你们的人永远健康、永远幸福！

本课题承蒙国家自然科学基金青年项目“miR29在铝引起脑内Aβ沉积过程中的作用机制研究（项目号：81302410）”资助，特此致谢！

**在学期间承担/参与的科研课题与研究成果**

**承担/参与的科研课题**

[1]国家自然科学基金项目：miR29在铝引起脑内Aβ沉积过程中的作用机制研究(项目号：81302410)。2014年1月—2016年12月，金额：23万. 在研. 主持.

[2]国家自然科学基金：ROS反馈环在哺乳期PBDEs暴露致大鼠神经发育毒性的机制研究(项目号：81001258)。2011年1月—2013年12月， 金额：18万. 结题. 参与.

[3]国家自然科学基金：铝致轻度认知障碍亚型及其与tau蛋白异常磷酸化位点的关系(项目号：81001241)。2011年1月—2013年12月，金额：18万. 结题. 参与.

[4]国家自然科学基金：组蛋白泛素化关键因子Ring2在苯并（a）芘致细胞周期阻滞中的作用(项目号：81273041)。2013年1月—2016年12月，金额：18万. 在研. 参与.

[5]国家自然科学基金：AMPA受体运输在铝致大鼠LTP损害中的作用及其信号转导机制研究(项目号：81202182)。2013年1月—2015年12月，金额：23万. 在研. 参与.

[6]国家自然科学基金：组蛋白赖氨酸甲基化修饰调控铝神经毒性的机制研究(项目号：81372968)。2013年1月—2015年12月，金额：85万. 在研. 参与.

**研究成果**

1. [Wang L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24792732)P, [Hu J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hu%20J%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24792732)L, [Zhao Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhao%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24792732) [Lu X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lu%20X%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24792732)T, [Zhang Q](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20Q%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24792732)L, [Niu Q](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Niu%20Q%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24792732). Effects of aluminium on

β-amyloid (1-42) and secretases (APP-cleaving enzymes) in rat brain.[Neurochem Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Effects%2Bof%2Baluminium%2Bon%2Bbeta-amyloid%2B(1-42)%2Band%2Bsecretases%2B(APP-cleaving%2Benzymes)%2Bin%2Brat%2Bbrain) 2014 Jul;39(7):1338-1345. (SCI,IF:2.551).

1. 王林平, 王静, 石樱桃, 张玲, 牛侨. 铝对大鼠脑内 Aβ 蓄积及 α-分泌酶各亚型表

达变化的影响. 毒理学杂志,2013,27(5):379-381,386.

1. 王林平, 王静, 石樱桃, 张玲, 牛侨. γ-分泌酶在铝致大鼠脑内 Aβ 蓄积中的作用. 中国公共卫生，2013；29(11)：1632-1634.
2. 王林平, 王静, 石樱桃, 张玲, 牛侨.γ-分泌酶在铝致大鼠脑内Aβ 蓄积中的作用[J]. 中国公共卫生,2013,29(11):1632-1634.

**个人简介**

王林平，女，1979年10月4日出生，汉族，ft西省柳林县人。

1997年9月考入ft西医科大学公共卫生学院预防医学系，2002年7月本科毕业并获得学士学位。

2002年9月考入ft西医科大学公共卫生学院预防医学系劳动卫生与环境卫生学专业，2005年7月研究生毕业并获得硕士学位。

2010年9月考入ft西医科大学公共卫生学院预防医学系劳动卫生与环境卫生学专业。