

· 实验技术 ·

铝暴露对大鼠PC12细胞tau蛋白异常磷酸化的影响

宋珊珊¹, 徐旭¹, 许杨丹², 肖雯洁¹, 杨晓娟^{1,2}

1.山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 2.山西医科大学第一医院, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 分析铝暴露对大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤分化细胞(PC12细胞)中miR-497-5p、无翅型鼠类乳腺癌病毒整合位点家族成员3a(Wnt3a)、 β 连环蛋白(β -catenin)、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)蛋白和tau蛋白表达的影响,为铝暴露致tau蛋白异常磷酸化的机制研究提供依据。**方法** 体外培养的PC12细胞分别暴露于0、100、200和400 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 溶液24 h,采用超敏型细胞增殖检测试剂(CCK-8)法检测细胞活力;采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测miR-497-5p和Wnt3a基因表达,采用免疫印迹法检测Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 、P-GSK-3 β (Ser9)、tau和P-tau(Ser396)蛋白相对表达量,分析各剂量组目的基因和蛋白的表达趋势。**结果** PC12细胞活力随铝暴露剂量的增加呈下降趋势($F_{\text{趋势}}=323.473$, $P=0.001$)。miR-497-5p相对表达量随铝暴露剂量的增加而上升($F_{\text{趋势}}=14.888$, $P=0.031$); Wnt3a基因相对表达量随铝暴露剂量的增加而下降($F_{\text{趋势}}=165.934$, $P<0.001$); miR-497-5p相对表达量与Wnt3a相对表达量呈负相关($r=-0.693$, $P=0.012$)。Wnt3a、 β -catenin和p-GSK-3 β (Ser9)蛋白相对表达量随铝暴露剂量的增加而下降($F_{\text{趋势}}=357.656$, $P=0.001$; $F_{\text{趋势}}=208.750$, $P=0.001$; $F_{\text{趋势}}=512.583$, $P<0.001$); GSK-3 β 、tau和p-tau(Ser396)蛋白相对表达量随铝暴露剂量的增加而上升($F_{\text{趋势}}=39.965$, $P<0.001$; $F_{\text{趋势}}=277.929$, $P=0.006$; $F_{\text{趋势}}=96.247$, $P=0.002$)。**结论** miR-497-5p表达上升和Wnt3a、 β -catenin表达下降, GSK-3 β 表达上升可能是铝暴露引起tau蛋白异常磷酸化的机制之一。

关键词: 无翅型鼠类乳腺癌病毒整合位点家族成员3a; tau蛋白; miR-497-5p; 糖原合成激酶-3 β ; β 连环蛋白; 铝; 阿尔茨海默病

中图分类号: R114 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087(2023)03-0271-04

Effect of aluminum exposure on abnormal phosphorylation of tau protein in PC12 cells of rats

SONG Shanshan¹, XU Xu¹, XU Yangdan², XIAO Wenjie¹, YANG Xiaojuan^{1,2}

1.School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2.The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of aluminum exposure on expression of miR-497-5p, wingless murine breast cancer virus integration site family member 3a (Wnt3a), β -catenin protein, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) protein and tau protein in rat adrenal pheochromocytoma PC12 cells, so as to provide insight into unraveling the mechanisms underlying aluminum exposure-induced abnormal phosphorylation of tau protein. **Methods** PC12 cells were exposed to $\text{Al}(\text{mal})_3$ at concentrations of 0, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. The viability of PC12 cells was measured using cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The relative expression of miR-497-5p and Wnt3a was detected using a real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) assay, and the expression of Wnt3a, β -catenin, GSK-3 β , P-GSK-3 β (Ser9), tau and p-tau (Ser396) proteins were determined using Western blotting. **Results** The viability of PC12 cells appeared a tendency towards a decline with the increase of aluminum dose ($F_{\text{trend}}=323.473$, $P=0.001$). RT-qPCR assay detected that the relative miR-497-5p expression appeared a tendency towards a rise with the increase of aluminum dose

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.03.020

基金项目: 山西省留学人员科技活动择优资助项目(20200008); 山西省基础研究计划(202103021224398)

作者简介: 宋珊珊, 硕士研究生在读

通信作者: 杨晓娟, E-mail: yxj2011bs@126.com

($F_{trend}=14.888$, $P=0.031$), and the relative Wnt3a expression appeared a tendency towards a decline with the increase of aluminum dose ($F_{trend}=165.934$, $P<0.001$). The miR-497-5p expression negatively correlated with the relative Wnt3a expression ($r=-0.693$, $P=0.012$). The expression of Wnt3a ($F_{trend}=357.656$, $P=0.001$), β -catenin ($F_{trend}=208.750$, $P=0.001$) and p-GSK-3 β (Ser9) proteins ($F_{trend}=512.583$, $P<0.001$) appeared a tendency towards a decline with the increase of aluminum dose, and the expression of GSK-3 β ($F_{trend}=39.965$, $P<0.001$), tau ($F_{trend}=277.929$, $P=0.006$) and p-tau (Ser396) proteins ($F_{trend}=96.247$, $P=0.002$) appeared a tendency towards a rise with the increase of aluminum dose. **Conclusion** Up-regulation of miR-497-5p and GSK-3 β expression and down-regulation of Wnt3a and β -catenin expression may be a mechanism underlying aluminum exposure-induced abnormal phosphorylation of tau protein.

Keywords: wingless murine breast cancer virus integration site family member 3a; tau protein; miR-497-5p; glycogen synthase kinase-3 β ; β -catenin; aluminum; Alzheimer's disease

铝是导致阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 等中枢神经退行性疾病的重要环境因素^[1]。神经原纤维缠结是 AD 的典型病理表现之一^[2], 由异常过度磷酸化的 tau 蛋白在神经细胞内聚集致神经原纤维增粗扭曲形成。糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 是调节 tau 蛋白磷酸化水平的关键激酶^[3]。研究表明, 无翅型小鼠乳房肿瘤病毒整合位点家族成员 3a (Wnt3a) / β -连环蛋白 (β -catenin) /GSK-3 β 信号通路是参与 AD 患者 tau 蛋白异常磷酸化的信号转导途径^[4-5], Wnt3a/ β -catenin 蛋白抑制可激活 GSK-3 β 活性, 导致 tau 蛋白异常磷酸化。微 RNA (microRNA, miRNA) 在中枢神经系统分布广泛, 对神经的发育、分化和成熟发挥重要作用, 部分 miRNA 可影响 tau 蛋白异常磷酸化, 与 AD 等神经退行性疾病的发生密切相关。TargetScan 和 miRanda 数据库的生物信息分析结果表明, miR-497-5p 与 Wnt3a 3' UTR 存在互补结合位点。肾上腺髓质嗜铬细胞瘤分化细胞 (adrenal pheochromocytoma cell, PC12) 具有与神经细胞相似的形态、生理和生化功能, 是研究神经毒性的经典细胞模型之一, 已被广泛应用于神经系统疾病的体外研究。本研究观察铝暴露对大鼠 PC12 细胞 tau 等相关蛋白表达的影响, 为铝暴露引起 tau 蛋白异常磷酸化机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 Applied Biosystems PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司); Universal Hood II 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); DYY-7C 凝胶电泳仪 (北京六一仪器厂); SpectraMaxM II 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。PC12 细胞 (高分化型, 厦门逸漠生物科技有限公司)。DMEM 高糖培养基 (北京海克隆生物化学制品有限公司), 青链霉素混合液、EDTA-胰蛋白酶消化液 (北京索莱宝科技有限公司), 胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司), 批号:

SH30022.01、P1400、T1300、21110701; 麦芽酚 (美国 Sigma 公司); 氯化铝 (天津飞船化学试剂科技有限公司); RNAiso Plus、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis and TB Green®qRT-PCR、TB Green®Premix Ex Taq™ II (日本 TaKaRa 生物工程公司), 批号: 9108、RR047A、638313、RR820A; BCA 蛋白定量试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (北京康为世纪生物科技有限公司), 批号: CW0014S、CW0103; Wnt3a、 β -catenin、tau、磷酸化 tau 蛋白 (p-tau) (Ser396)、 α -tubulin (英国 Abcam 公司), 批号: ab219412、ab32572、ab76128、ab109390、ab176560; GSK-3 β 、p-GSK-3 β (Ser9) (杭州华安生物技术有限公司), 批号: ET-1607-71、ET-1607-60。

1.2 方法

1.2.1 麦芽酚铝 [Al (mal)₃] 染毒液配制 取适量氯化铝、麦芽酚粉末分别溶解于高压灭菌双蒸水, 0.22 μ m 滤膜抽滤, -20 $^{\circ}$ C 保存。使用时将麦芽酚和氯化铝溶液等体积混合, 用 10% 的氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.4, 完全培养基稀释至所需浓度, 现用现配。

1.2.2 细胞培养及染毒 采用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、含 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。将处于对数生长期的细胞以每孔 1×10^6 浓度接种于 6 孔板, 16~24 h 后细胞密度为 50%~60% 时进行染毒, 分别暴露于 0、100、200 和 400 μ mol/L 的 Al (mal)₃ 溶液, 染毒 24 h, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 细胞活力检测 采用超敏型细胞增殖检测试剂 (CCK-8) 法检测各组细胞活力。将处于对数生长期的细胞以每孔 5×10^4 浓度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 每组 5 个复孔。24 h 后更换含不同浓度染毒液的完全培养基, 继续培养 24 h, 每孔加入 100 μ L 完全培养基和 10 μ L CCK-8 溶液, 同时增加 5 个空

白孔。1 h 后用酶标仪测定波长 450 nm 处吸光度 (optical density, OD)。细胞活力 (%) = [(OD_{实验} - OD_{空白}) / (OD_{对照} - OD_{空白})] × 100%。

1.2.4 miR-497-5p、Wnt3a 基因表达检测 弃去 6 孔板培养液, PBS 缓冲液清洗 2 遍, 每孔加入 500 μL RNAiso Plus 于 1.5 mL 离心管提取总 RNA,

采用微量比色皿测定 RNA 的纯度和浓度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间表示 RNA 纯度较好。按照说明书进行反转录和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR), miR-497-5p 和 Wnt3a 的内参分别为 U6 和 GAPDH, 每组 3 个平行孔, 用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-497-5p 和 Wnt3a 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers for RT-qPCR assay

基因	上游引物	下游引物
miR-497-5p	5' -CAGCAGCACACTGTGGTTTGTA-3'	
Wnt3a	5' -GTTCTTCTCTGGTCTGGCTGTG-3'	5' -GGCATGATCTCCACGTAGTTTCTCTG-3'
GAPDH	5' -AAACCCATCACCATCTTCCA-3'	5' -GTGGTTCACCCATCACAA-3'

1.2.5 tau 等相关蛋白表达检测 从 -80 °C 冰箱中取出细胞样品, 解冻后以离心半径 8.4 cm、7 000 r/min 离心 1 min。采用免疫印迹法, 向每组细胞沉淀中加入 75~90 μL 蛋白抽提液 (裂解液: 蛋白酶抑制剂: 磷酸酶抑制剂体积比为 98:1:1), 吹打混匀, 冰上孵育 25 min 后以离心半径 8.4 cm、14 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液于 1.5 mL 离心管, 采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。根据蛋白分子量大小配制相应浓度的分离胶, 同时调整电泳和转膜条件, 转膜后用 5% 质量分数的脱脂奶粉或 5% BSA (用于磷酸化蛋白) 室温封闭 2 h, 后加入相应的蛋白抗体 [稀释比例分别为: Wnt3a, 1:1 000; β-catenin, 1:5 000; GSK-3β, 1:1 000; p-GSK-3β (Ser9), 1:1 000; tau, 1:2 000; p-tau (Ser396), 1:4 000; GAPDH, 1:20 000; β-actin, 1:2 000; α-tubulin, 1:4 000], 4 °C 孵育过夜。第 2 天加入相应的二抗 (山羊抗兔 IgG, 稀释比例为 1:4 000), 37 °C 孵育 1 h 后 TBST 洗膜 3 次, 高敏电化学发光显影。采用 Image J 软件分析条带, 计算蛋白相对表达量, 分析目的蛋白变化趋势。

1.3 统计分析 采用 SPSS 25.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布, 采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 趋势分析采用方差分析趋势检验。剂量-效应关系采用 Pearson 相关分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PC12 细胞活力检测结果 随着铝暴露剂量的增加, PC12 细胞活力下降 ($F_{趋势}=323.473, P=0.001$); 0、100、200 和 400 μmol/L 铝暴露剂量组 PC12 细

胞活力分别为 100.00%、(97.55±0.10)%、(88.58±0.07)% 和 (81.57±0.02)%。

2.2 miR-497-5p 和 Wnt3a 基因表达检测结果 随铝暴露剂量的增加, miR-497-5p 相对表达量上升, Wnt3a 相对表达量下降 (均 P<0.05)。miR-497-5p 相对表达量与 Wnt3a 相对表达量呈负相关 ($r=-0.693, P=0.012$)。见表 2。

表 2 不同铝暴露剂量组 PC12 细胞 miR-497-5p 和 Wnt3a 基因相对表达量 (n=5)

Table 2 Relative expression of miR-497-5p and Wnt3a genes in PC12 cells exposed to aluminum at various concentrations (n=5)

铝浓度/ (μmol/L)	miR-497-5p	Wnt3a
0	1.00	1.00
100	1.37±0.10	0.82±0.06
200	1.89±0.44	0.62±0.02
400	2.65±0.44	0.49±0.01
$F_{趋势值}$	14.888	165.934
P 值	0.031	<0.001

2.3 tau 等相关蛋白表达检测结果 随着铝暴露剂量的增加, Wnt3a、β-catenin 和 p-GSK-3β (Ser9) 蛋白相对表达量下降, GSK-3β、tau 和 p-tau (Ser396) 蛋白相对表达量上升 (均 P<0.05)。见表 3。

3 讨论

多项研究显示, 铝对神经细胞的毒性主要通过 tau 蛋白异常磷酸化实现 [6-7]。预实验中分别将细胞暴露于 0、50、100、200、300、400、500、600、700 和 800 μmol/L 的 Al (mal)₃ 溶液, 结果显示在

表 3 不同铝暴露剂量组 PC12 细胞 tau 等相关蛋白相对表达量 (n=10)

Table 3 Relative expression of tau and related proteins in PC12 cells exposed to aluminum at various concentrations (n=10)

铝浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	Wnt3a	β -catenin	GSK-3 β	p-GSK-3 β (Ser9)	tau	p-tau (Ser396)
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
100	0.81 \pm 0.03	0.86 \pm 0.02	1.77 \pm 0.12	0.85 \pm 0.02	1.26 \pm 0.03	1.17 \pm 0.05
200	0.60 \pm 0.02	0.64 \pm 0.06	1.82 \pm 0.09	0.56 \pm 0.03	1.66 \pm 0.07	1.44 \pm 0.08
400	0.49 \pm 0.03	0.50 \pm 0.05	1.99 \pm 0.15	0.41 \pm 0.02	2.46 \pm 0.10	1.79 \pm 0.07
$F_{趋势}$ 值	357.656	208.750	39.965	512.583	277.929	96.247
P 值	0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.006	0.002

400 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力超过 80%，500~800 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力低于 80%。因此本研究将 Al (mal)₃ 暴露浓度分别设置为 0、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 。

本研究结果显示，随铝暴露剂量增加，miR-497-5p 表达上升，且 miR-497-5p 在低剂量铝暴露时即发挥作用。miRNA 在中枢神经系统中广泛分布，在神经发育、分化和成熟过程中发挥调节作用。miRNA 通过与靶 mRNA 的 3'UTR 或 5'UTR 结合，抑制靶基因翻译或促使其降解，起到转录后基因沉默的作用^[8]。研究发现，miRNA 在学习记忆和认知功能的调控作用中发挥重要作用，miR-15/107 家族成员的异常表达与 AD 的致病机制密切相关^[9]。miR-497-5p 与 Wnt3a 表达量呈负相关，提示铝抑制 Wnt3a/ β -catenin/GSK-3 β 信号通路可能与 miR-497-5p 表达上调有关。

随铝暴露剂量的增加，Wnt3a 和 β -catenin 蛋白相对表达量下降，Wnt3a/ β -catenin 下游蛋白 GSK-3 β 表达上升，与既往研究结果^[10]一致。Wnt 信号通路在神经干细胞的维持、轴突的发生、神经递质的释放和突触可塑性中发挥重要作用，包括 1 个经典通路 (Wnt3a/ β -catenin/GSK-3 β) 和 2 个非经典通路 (Wnt/PCP 和 Wnt/Ca²⁺) 及其级联分子，经典通路在 AD 患者 tau 蛋白异常磷酸化的发病机制中起重要作用。GSK-3 β 是 tau 蛋白异常磷酸化的主要激酶，在转基因模型中，GSK-3 β 过表达可导致 tau 蛋白异常磷酸化和认知障碍^[11]。GSK-3 β 在 AD 患者大脑中高表达，导致 tau 蛋白异常磷酸化和神经纤维缠结的形成^[12]，在散发性 AD 和家族性 AD 发病过程中发挥关键作用。

铝暴露可引起 tau 蛋白异常磷酸化，且随着铝暴露剂量的增加，p-tau 蛋白表达逐渐上升，提示铝产生的神经毒性可能通过 tau 蛋白异常磷酸化实现。tau 蛋白是微管相关蛋白中含量最高的一种，正常 tau 蛋白和微管蛋白结合形成微管并维持微管的稳定

性和完整性，tau 蛋白异常磷酸化可引起微管结构的破坏甚至解体，导致细胞结构异常产生神经毒性。

参考文献

- [1] DEY M, SINGH R K. Chronic oral exposure of aluminum chloride in rat modulates molecular and functional neurotoxic markers relevant to Alzheimer's disease [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2022, 32 (8): 616-627.
- [2] WOERMAN A L, AOYAGI A, PATEL S, et al. Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (50): E8187-E8196.
- [3] YAO Y, WANG Y, KONG L, et al. Osteohole decreases tau protein phosphorylation via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway in Alzheimer's disease [J]. *Life Sci*, 2019, 217: 16-24.
- [4] PAN B, LU X, HAN X, et al. Mechanism by which aluminum regulates the abnormal phosphorylation of the tau protein in different cell lines [J]. *ACS Omega*, 2021, 6 (47): 31782-31796.
- [5] TAPIA-ROJAS C, INESTROSA N C. Loss of canonical Wnt signaling is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13 (10): 1705-1710.
- [6] 王昊. 铝和 ApoE ϵ 4 联合作用对 SH-SY5Y 细胞 tau 蛋白磷酸化和 A β 表达的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2013.
- [7] 贾志建. 铝致 SH-SY5Y 细胞 tau 蛋白过度磷酸化的机制及 p25/Cdk5 相关信号通路的作用 [D]. 太原: 山西医科大学, 2012.
- [8] DA SACCO L, MASOTTI A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of microRNAs binding to 5' untranslated region [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 14 (1): 480-495.
- [9] HILL J M, LUKI W J. MicroRNA (miRNA) -mediated pathogenic signaling in Alzheimer's disease (AD) [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41 (1/2): 96-100.
- [10] 李伟庆. Wnt/ β -catenin 通路对麦芽酚铝致 PC-12 细胞凋亡的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2012.
- [11] SALCEDO-TELLO P, HERNÁNDEZ-ORTEGA K, ARIAS C. Susceptibility to GSK3 β -induced tau phosphorylation differs between the young and aged hippocampus after Wnt signaling inhibition [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 39 (4): 775-785.
- [12] ZHANG Z, GUO M, ZHANG J, et al. Leptin regulates tau phosphorylation through wnt signaling pathway in PC12 cells [J]. *Neurosignals*, 2016, 24 (1): 95-101.

收稿日期: 2022-10-25 修回日期: 2023-01-15 本文编辑: 吉兆洋