

# 核桃肽改善铝致认知功能损害大鼠信号通路的研究

张晓宇<sup>1</sup>, 王修峰<sup>3</sup>, 王泉月<sup>2</sup>, 王柄贻<sup>2</sup>, 林立<sup>2</sup>, 张璟<sup>1,2</sup>, 李欢<sup>2</sup>

1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)公共卫生与健康管理学院, 山东 济南 250117;

2. 济宁医学院公共卫生学院, 山东 济宁 272000; 3. 邹城市中医院

**摘要:**目的 观察探究核桃肽对铝暴露认知功能损害大鼠的 miR-124-3p、信号转导和转录激活因子 3(STAT3)、转化生长因子(TGF- $\beta$ 1)、SMAD 同源物 3(Smad3)重组蛋白的影响。方法 以 40 只健康雄性 SD 大鼠为对象, 分为对照组(腹腔注射生理盐水)、铝染毒模型组(腹腔注射 20  $\mu$ mol/kg 麦芽酚铝)、核桃肽 45 d 治疗组(腹腔注射 20  $\mu$ mol/kg 麦芽酚铝, 在染毒第 45 d 开始灌胃 800 mg/kg 核桃肽, 持续 45 d)、核桃肽 90 d 预防组(腹腔注射 20  $\mu$ mol/kg 麦芽酚铝, 在染毒第 1 d 开始灌胃 800 mg/kg 核桃肽, 持续 90 d), 每组 10 只。周一至五染毒, 连续 90 d。其后, 通过 Morris 水迷宫评估大鼠学习记忆功能, Western Blot 检测大鼠海马组织中 p-STAT3 Ser727、p-STAT3 Tyr705、TGF- $\beta$ 1、p-Smad3 Ser423、p-Smad3 Ser425 蛋白表达, 实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-124-3p 表达。以上计量资料各组比较时均使用方差分析方法, 体重变化比较用重复测量方差分析, 分子表达变化用单因素方差分析。结果 铝暴露各组大鼠从 Morris 水迷宫第 2 d 起逃避潜伏期均延长( $P < 0.05$ ), 其中核桃肽干预组大鼠的逃避潜伏期相较于模型组减少( $P < 0.05$ )。与对照组比, 铝暴露大鼠海马组织的 p-STAT3 Ser727、p-STAT3 Tyr705、TGF- $\beta$ 1、p-Smad3 Ser423、p-Smad3 Ser425 的相对表达水平升高, miR-124-3p 相对表达水平下降( $P < 0.05$ ); 与染毒模型组比, 核桃肽干预组大鼠海马组织的 p-STAT3 Ser727、p-STAT3 Tyr705、TGF- $\beta$ 1、p-Smad3 Ser423、p-Smad3 Ser425 的相对表达水平下降, miR-124-3p 相对表达水平上升( $P < 0.05$ )。结论 核桃肽可在 miR-124-3p 调节 STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3 通路, 对铝诱导大鼠的认知功能障碍发挥保护作用。

**关键词:** 铝; 核桃肽; 认知功能障碍; miR-124-3p; STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3

中图分类号: R741 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2025)13-2374-06

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202502076

## Walnut-derived peptides ameliorate aluminum-induced cognitive impairment via miR-124-3p/STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway in rats

ZHANG Xiao-yu\*, WANG Xiu-feng, WANG Quan-yue, WANG Bing-yi, LIN Li, ZHANG Jing, LI Huan

\*School of Public Health and Health Management, Shandong First Medical University and Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250117, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of walnut-derived peptides (WDP) on miR-124-3p, STAT3, TGF- $\beta$ 1, and Smad3 proteins in aluminum-induced cognitive impairment. **Methods** Forty male SD rats were divided into control (saline), aluminum model (20  $\mu$ mol/kg aluminum maltolate, Al(mal)3), 45-day WDP treatment (Al(mal)3 + 800 mg/kg WDP from day 45), and 90-day WDP prevention (Al(mal)3 + 800 mg/kg WDP from day 1) groups (n=10 each). Cognitive function was assessed by Morris water maze. Hippocampal protein expressions (p-STAT3 Ser727, p-STAT3 Tyr705, TGF- $\beta$ 1, p-Smad3 Ser423/425) and miR-124-3p levels were measured. **Results** Aluminum exposure prolonged escape latency from day 2 ( $P < 0.05$ ), which was attenuated by WDP ( $P < 0.05$ ). Aluminum increased hippocampal p-STAT3, TGF- $\beta$ 1, and p-Smad3 expressions while decreasing miR-124-3p ( $P < 0.05$  vs control). WDP interventions reversed these alterations ( $P < 0.05$  vs model). **Conclusion** WDP exerts protective effects against aluminum-induced cognitive dysfunction potentially through modulating miR-124-3p/STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway.

**Keywords:** Aluminum; Walnut-derived peptides; Cognitive dysfunction; MiR-124-3p; STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目(ZR2022QH114); 贺林院士新医学临床转化工作站科研基金立项项目(JYHL2022MS06); 济宁医学院博士科研启动基金项目(600941001)

作者简介: 张晓宇(1998—), 女, 硕士在读, 研究方向: 铝的神经毒性

通信作者: 张璟, E-mail: zhangj1976@163.com; 李欢, E-mail: lixiuhuan557@163.com; 张璟与李欢为共同通信作者

铝(aluminum)是地壳中含量最高的金属元素,已广泛应用于工业生产和日常生活,可从多种途径进入人体<sup>[1]</sup>。过量摄入的铝易在组织器官中积累,尤其是大脑,铝在脑组织的蓄积主要集中在海马体区域,长期铝暴露会引起认知功能损害,与神经退行性疾病如阿尔兹海默症(Alzheimer disease, AD),帕金森病(Parkinsonism disease, PD)等神经系统疾病的发病机制密切相关<sup>[2]</sup>。核桃肽(walnut peptide)作为植物源性活性物质,有多种生理调节功能<sup>[3]</sup>。现有研究显示,核桃肽可以有效增强小鼠空间学习记忆能力,并对 PC12 细胞氧化损伤表现出明显的保护作用<sup>[4]</sup>。

研究表明 miRNA 在铝诱导神经毒性的过程中发挥关键调控作用<sup>[5]</sup>。在认知功能障碍的大鼠中,海马区小胶质细胞外泌体 miR-124-3p 表达显著下调<sup>[6]</sup>。而且 miR-124-3p 低表达已经成为海马依赖性记忆障碍的共同特征<sup>[7]</sup>。STAT3 是信号转导和转录激活因子(STAT)蛋白家族的一员,是 miR-124-3p 的直接作用靶点,在中枢神经系统中扮演着重要角色<sup>[7]</sup>。STAT3 调节神经胶质细胞的活化、增殖和分化过程,进而影响整体神经功能<sup>[8]</sup>。分子机制研究表明,miR-124-3p 与 STAT3 在结合位点特异性结合,可进一步调控下游 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路<sup>[9]</sup>。TGF- $\beta$ 1 信号通路参与多种神经精神疾病的病理进程,特别是在 AD 的发病机制中,该通路的异常激活可导致 TGF- $\beta$ 1 和 Smad3 蛋白异常表达,影响神经元凋亡过程<sup>[10]</sup>。

基于上述研究背景,本研究提出 miR-124-3p 调控 STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路可能是核桃肽改善铝致认知功能障碍的关键分子机制,通过建立亚慢性铝暴露大鼠模型,用核桃肽进行干预,检测海马组织 miR-124-3p、STAT3、TGF- $\beta$ 1、Smad3 的表达变化,探讨 miR-124-3p 调控 STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3 通路在核桃肽改善铝致认知功能障碍的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

40 只 6 周龄健康雄性 SD 大鼠 [SPF 级,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)2022 0006],体重(190  $\pm$  20)g,动物房饲养,温度保持 22 ~ 26  $^{\circ}$ C,每天早上 8 点开灯到晚上 20 点,用普通饲料喂养。适应性喂养后,按重量随机分组:对照组(腹腔注射生理盐水)、模型组(腹腔注射 20  $\mu$ mol/kg 麦芽酚铝)、治疗组(腹腔注射 20  $\mu$ mol/kg 麦芽酚铝,在染毒第 45 d 开始灌胃 800 mg/kg 核桃肽,持续 45 d)、预防组(腹腔注射 20  $\mu$ mol/kg 麦芽酚铝,在染毒第 1 d 开始灌胃 800 mg/kg 核桃肽,持续 90 d)。周一至周五按照 1 ml/kg 腹腔注射麦芽酚铝染毒,连续 90 d。每周一对大鼠称重记录,

每天观察大鼠精神状态和生长情况以及腹腔注射的针口愈合程度。所有实验程序均得到济宁医学院动物伦理委员会的批准,实验动物伦理委员会批准编号:JNMC-2021-DW-013。

### 1.2 试剂与仪器

三氯化铝(结晶)( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,天津风船化学试剂有限公司);麦芽酚(分析纯,美国 Sigma-Aldrich);核桃肽(斯诺特生物);戊巴比妥钠(山东鲁抗辰欣药业有限公司);氯仿、异丙醇;Total RNA Extractor(Trizol)、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒、2Xsg Fast qPCR Master Mix(上海生工);RIPA 裂解液、蛋白酶、磷酸酶抑制剂、BCA 定量试剂盒、彩虹 180 广谱蛋白 marker(北京康为世纪生物公司);电泳、转膜液、TBS(武汉赛维尔生物科技有限公司);SDS-PAGE 制备试剂盒(上海雅酶);TGF- $\beta$ 1 一抗, Anti-GADPH antibody(ERP16891)、Goat Anti-Rabbit IgG HL(HRP)(英国 Abcam);p-Smad3 Ser423、p-Smad3 Ser425、p-STAT3 Ser727、p-STAT3 Tyr705 一抗(美国 Thermo Fisher Scientific);化学发光成像系统(Gelpro32)。

### 1.3 主要方法

#### 1.3.1 麦芽酚铝和核桃肽溶液的制备

麦芽酚铝溶液配制方法:将  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶于生理盐水配制 40 mmol/L 的氯化铝溶液;将麦芽酚溶于磷酸盐缓冲液(PBS)配制 120 mmol/L 的麦芽酚溶液。随后将两种溶液等体积混合,最终获得 20 mmol/L 的麦芽酚铝溶液。根据大鼠体质量的变化,每天称取相应的核桃肽粉末,溶解于灭菌的超纯水中,制得 800 mg/kg 的核桃肽溶液,现配现用。

#### 1.3.2 Morris 水迷宫实验

定位航行实验:将水池均匀划分为四个区域,把隐藏平台固定一个位置。每日随机选择不同区域放入大鼠,将大鼠入水到找到平台时间算作逃避潜伏期。如果大鼠在 120 s 内没找到,则带领到平台停留 10 s,记录为 120 s。空间探索实验:撤掉平台,观察 120 s 内穿越平台和平台象限的次数<sup>[11]</sup>。

#### 1.3.3 蛋白免疫印记(western blot, WB)

称取一定量的海马组织,提取蛋白测浓度。经 SDS-PAGE 凝胶电泳,结束后转模到 PVDF 膜,封闭 1.5 ~ 2 h,封闭液用浓度为 5% 的伊利脱脂奶粉或 5% 的牛血清白蛋白(BSA),再 Tris 缓冲盐溶液(TBST)漂洗 3 次。接着,分别加入一抗(p-STAT3 Ser727、p-STAT3 Tyr705、p-Smad3 Ser423、p-Smad3 Ser425、TGF- $\beta$ 1 的稀释比为 1 : 1 000;GADPH 的稀释比 1 : 2 000),过夜 4  $^{\circ}$ C 孵育 18 h,用 TBST 漂洗 3 次,加相应的二抗(稀释比为 1 : 2 000),洗涤后显色,打开电脑曝光显影,保存图片,根据蛋白条带进行分析。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (real time-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 取大鼠海马组织,提取 RNA,将 RNA 逆转录成 cDNA,逆转录完成后以 cDNA 为模板,进行扩增,根据说明书配置相应反应体系,溶解并混匀各组分,短暂离心,运行 qPCR,程序:95 ℃15 min;95 ℃34 s,60 ℃34 s,40 个循环,以 U6 为内参基因,用 2-ΔΔCt 公式法计算所求基因表达量,计算结果进行归一化处理。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of the primers

名称	引物序列(5'-3')
mo-miR-124-3p	F:TAAGGCACGCGGTGAATGCC
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA R:AACGCCTCACGAATTTGCGT

1.3.5 统计学分析 本研究最初始每组 10 只 SD 大鼠,去除实验过程中因 RNA 降解和蛋白提取失败等造成的样本损失及离群值,最终有效样本量为 6~8 只/组。获得的结果用 SPSS 26.0 进行统计分析,用 GraphPad Prism 制图,结果为计量资料且满足正态分布用( $\bar{x} \pm s$ )表示,重复测量资料则用双因素重复测量方差分析,多组间对比用 one-way ANOVA,组间两两比较方差齐用 LSD 检验,不齐用 Dunnett-T3 检验,双侧检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 基本情况 实验期间,观察发现各组大鼠的状态存在差异,对照组的大鼠发育良好,精神状态良好,活动自如,毛发柔顺,腹部柔软,摄食和饮水均正常,未见任何异常情况。铝暴露模型组大鼠精神状态最差,活动减少,皮毛粗糙暗淡,腹部硬,核桃肽干预组大鼠精神状态较好,毛发柔顺,腹部略硬,摄食饮水状

态较好。大鼠体质量结果显示,染毒前各组大鼠体质量基本一致,染毒后铝暴露的三组大鼠体质量与生理盐水对照组相比,均有不同程度的降低,铝暴露模型组大鼠体重最低( $P<0.01$ ),核桃肽预防组大鼠体重与生理盐水对照组大鼠体重相差最小。大鼠体重在染毒时间和核桃肽干预的主效应上,差异均有统计学意义( $F=2\ 435.662, 4.224, P<0.05$ ),在染毒时间和核桃肽干预的交互效应上无统计学差异( $F=2.822, P=0.052$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠铝暴露前后体重变化[g, n=10, ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 2 Changes of body weight before and after aluminum exposure in each group [g, n=10, ( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	暴露前	暴露三个月后
对照组	230.10 ± 3.37	403.30 ± 14.79*
模型组	229.10 ± 8.91	376.00 ± 15.97* <sup>#</sup>
治疗组	229.40 ± 6.47	387.90 ± 23.84*
预防组	230.70 ± 8.62	394.00 ± 16.58* <sup>+</sup>
总计	229.82 ± 6.97	390.30 ± 20.12*

注:与暴露前比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与同时时间点对对照组比较,\* $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与同时时间点模型组比较,\* $P<0.05$ ,<sup>+</sup> $P<0.01$ 。

2.2 Morris 水迷宫结果 定位巡航实验中,各处理组大鼠第 1 d 和第 2 d 的平均逃避潜伏期之间差异很小;第 3~5 d,铝暴露各组大鼠的逃避潜伏期与对照组大鼠的相比均增加( $P<0.01$ );其中,第 4、5 d 核桃肽治疗组和预防组的大鼠的逃避潜伏期和铝暴露模型组比较均下降( $P<0.05$ ),核桃肽治疗组和预防组之间亦有差异( $P<0.05$ )。空间探索实验中,与对照组大鼠相比,铝暴露各组通过平台和平台象限的次数均减少( $P<0.05$ ),核桃肽预防组大鼠与铝暴露模型组大鼠和核桃肽治疗组大鼠相比,通过平台和平台象限的次数均增加( $P<0.05$ )。见表 3、4。

表 3 各组大鼠定位巡航实验逃避潜伏期的结果[s, n=8, ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 3 Results of the escape latency in the positioning cruise experiment of rats in each group [s, n=8, ( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d
对照组	96.51 ± 3.70	83.01 ± 1.58	70.57 ± 0.20	58.84 ± 1.66	38.78 ± 2.00
模型组	109.51 ± 2.25*	101.95 ± 1.70**	86.14 ± 2.33**	74.35 ± 0.86**	63.38 ± 1.94**
治疗组	100.70 ± 3.14	94.60 ± 4.18**	81.49 ± 2.81*	69.23 ± 1.37** <sup>#</sup>	54.98 ± 0.66** <sup>#</sup>
预防组	99.27 ± 5.01	88.72 ± 2.13 <sup>#</sup>	75.15 ± 0.67** <sup>#</sup>	64.62 ± 1.08** <sup>#</sup> <sup>+</sup>	47.69 ± 0.90* <sup>#</sup> <sup>++</sup>
F 值	2.352	9.621	13.627	26.736	48.808
P 值	0.094	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与治疗组比较,\* $P<0.05$ ,<sup>+</sup> $P<0.01$ 。

2.3 蛋白免疫印记结果 实验结果显示,与对照组比,铝暴露各组大鼠海马组织的 p-STAT3 Ser727、p-STAT3 Tyr705、TGF-β1、p-Smad3 Ser423、p-Smad3

Ser425 蛋白表达水平均增加( $P<0.01$ );与模型组比,核桃肽治疗组和预防组大鼠的 p-STAT3 Ser727、p-STAT3 Tyr705、TGF-β1、p-Smad3 Ser423、p-Smad3

表 4 各组大鼠空间探索实验的结果[次,  $n=8, (\bar{x} \pm s)$ ]

Table 4 Results of space exploration experiment of rats in each group [time,  $n=8, (\bar{x} \pm s)$ ]

组别	穿越平台次数	穿越平台象限次数
对照组	9.63 ± 2.72	20.00 ± 3.63
模型组	3.38 ± 1.69**	8.38 ± 2.33**
治疗组	4.63 ± 2.13**	11.25 ± 4.06**
预防组	7.13 ± 1.96* <sup>##+</sup>	15.00 ± 4.28* <sup>##+</sup>
F 值	13.186	15.144
P 值	<0.001	<0.001

注:与对照组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与治疗组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Ser425 蛋白表达水平均下降( $P<0.01$ );其中预防组相较于治疗组蛋白表达量更低( $P<0.05$ )。见表 5、图 1。

### 2.4 RT-qPCR 结果 铝暴露组大鼠的 miR-124-3p

表 5 各组大鼠海马组织通路蛋白水平比较[ $n=6, (\bar{x} \pm s)$ ]

Table 5 Comparison of hippocampal pathway protein levels in each group [ $n=6, (\bar{x} \pm s)$ ]

组别	p-STAT3 Ser727	p-STAT3 Tyr705	TGF- $\beta$ 1	p-Smad3 Ser423	p-Smad3 Ser425
对照组	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.24	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.26
模型组	2.25 ± 0.53**	2.20 ± 0.53**	2.44 ± 0.01**	2.15 ± 0.07**	2.45 ± 0.24**
治疗组	1.90 ± 0.45** <sup>##</sup>	1.75 ± 0.42** <sup>##</sup>	1.73 ± 0.00** <sup>##</sup>	1.74 ± 0.05** <sup>##</sup>	1.90 ± 0.50** <sup>##</sup>
预防组	1.41 ± 0.33** <sup>##+</sup>	1.25 ± 0.30** <sup>##+</sup>	1.39 ± 0.01** <sup>##+</sup>	1.26 ± 0.04** <sup>##+</sup>	1.38 ± 0.36** <sup>##+</sup>
F 值	43.101	28.146	207.576	47.199	162.050
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与治疗组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

表 6 各组大鼠海马组织 miR-124-3p 的相对表达水平 [ $n=6, (\bar{x} \pm s)$ ]

Table 6 Levels of miR-124-3p expression in hippocampal tissue across different rat groups [ $n=6, (\bar{x} \pm s)$ ]

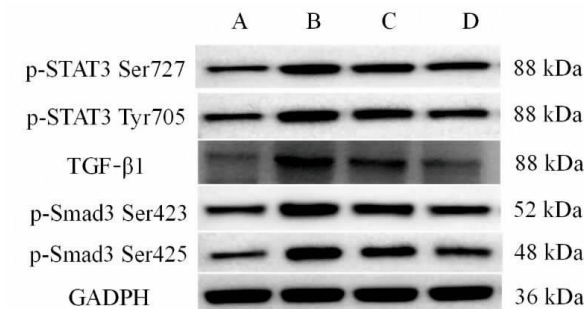
组别	miR-124-3p
对照组	1.00 ± 0.11
模型组	0.30 ± 0.06**
治疗组	0.63 ± 0.19* <sup>#</sup>
预防组	0.80 ± 0.11* <sup>##</sup>
F 值	32.635
P 值	<0.001

注:与对照组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与治疗组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

### 3 讨论

铝暴露可损害神经系统,引起神经发育障碍和神经退行性病变<sup>[2]</sup>。麦芽酚作为蔗糖水解或淀粉热解后的副产物,无神经毒性<sup>[12]</sup>,其与三氯化铝结合形成的麦芽酚铝,结构稳定,不易降解,也不易水解。在生理 pH 条件下,生物利用度较高,能释放大量铝离子,这些铝离子可通过血脑屏障并在脑中蓄积<sup>[13-14]</sup>。因此,在铝神经毒性的研究中,尤其是在探索认知和记忆功能障碍的机制时,麦芽酚铝是常用的染铝模型的实验

材料<sup>[15]</sup>。而且前期的研究发现,腹腔注射可使麦芽酚铝绕过胃肠道的吸收屏障直接通过腹膜吸收进入血液循环,生物利用度高,从而达到模拟铝在体内的蓄积效应<sup>[16]</sup>。



注:A 为生理盐水对照组;B 为铝暴露模型组;C 为核桃肽治疗组;D 为核桃肽预防组。

图 1 各组大鼠海马组织蛋白条带图

核桃除了制成核桃油外,分离纯化制成的核桃肽具有高吸收、高活性、高安全性的特点<sup>[17]</sup>。核桃肽不经消化即可在机体内被吸收,生物效价极高,能够增强小鼠的学习记忆功能,延缓小鼠的空间记忆衰退<sup>[18]</sup>。我们通过行为学水迷宫发现,随着实验进行铝暴露大鼠的逃避潜伏期显著增加,穿越平台次数降低,核桃肽干预大鼠逃避潜伏期显著减少,穿越平台次数增加。提示动物造模成功,亚慢性铝暴露破坏大鼠的学习能力,而核桃肽的干预可以显著改善铝暴露所致的学习能力缺陷,证实了核桃肽可以减小铝暴露造成的行为学损害。

miR-124-3p 参与中枢神经系统的发育,并在神经元中富集<sup>[7]</sup>。Esteves M 等人<sup>[19]</sup>发现以细胞外囊泡作为生物载体递送 miR-124-3p 到侧脑室可以显著改善 PD 小鼠模型的运动行为症状。Xu Y 等人<sup>[20]</sup>还发现在创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)后小胶质细胞外泌体中的 miR-124-3p 表达降低,无法抑制神经元自噬,造成神经受损。在本实验中,铝暴露大鼠

的海马 miR-124-3p 表达水平低于对照组,核桃肽干预组的大鼠海马 miR-124-3p 水平高于铝暴露模型组,表明核桃肽可以缓解铝暴露引起的 miR-124-3p 降低。

TargetScan 预测及双荧光素酶报告基因实验均证实,STAT3 是 miR-124-3p 的直接作用靶点<sup>[21]</sup>。STAT3 在神经退行性疾病中发挥重要的神经保护作用<sup>[22]</sup>。Yang W 等<sup>[16]</sup>的进一步研究表明,miR-124-3p 可通过靶向抑制 STAT3 的表达,削弱其在 PD 细胞模型中的神经保护效应。TGF- $\beta$ 1 在突触可塑性、神经血管稳态及认知功能调节中具有重要作用,其信号通路的异常激活与 AD 等神经系统疾病的进展密切相关<sup>[23]</sup>。研究表明,TGF- $\beta$ 1 可通过 Smad 非依赖性途径迅速诱导 STAT3 的磷酸化,其中磷酸化位点 Tyr705 和 Ser727 是 STAT3 激活的主要位置<sup>[9]</sup>。Smad3 是 TGF- $\beta$ 1 信号通路的核心下游信号分子,其结构包括 N 端(MH1 区域,负责 DNA 结合)、C 端(MH2 区域,含 Ser423 和 Ser425 磷酸化位点)及连接区(含多个丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点)<sup>[24]</sup>。TGF- $\beta$ 1 刺激可诱导 Smad3 在 Ser423/Ser425 位点的磷酸化,进而调控其核转位及转录活性<sup>[24]</sup>。本研究发现,亚慢性铝暴露显著上调大鼠海马中 p-STAT3 (Ser727/Tyr705)、p-Smad3 (Ser423/Ser425) 及 TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达水平,提示铝暴露可激活 STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路,可能通过促进神经炎症或突触功能障碍加剧神经损伤。值得注意的是,核桃肽干预可显著降低上述蛋白的异常表达,表明其可能通过抑制 STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3 通路的过度激活,缓解铝诱导的神经毒性。

综上,本研究成功建立了亚慢性铝暴露大鼠模型,揭示了铝暴露通过 miR-124-3p 调控 STAT3-TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路影响神经功能的潜在机制,并证实核桃肽的神经保护作用可能与该通路的调控相关。未来将进一步结合体内外干预实验探索核桃肽的具体活性成分及其分子靶点。

**利益冲突声明** 本研究不存在任何利益冲突

#### 参考文献

- [1] Russ TC, Killin L, Hannah J, et al. Aluminium and fluoride in drinking water in relation to later dementia risk[J]. *British Journal of Psychiatry*, 2020, 216(1): 29-34.
- [2] Yang LD, Wu CY, Parker E, et al. Non-invasive photobiomodulation treatment in an Alzheimer Disease-like transgenic rat model[J]. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2205-2231.
- [3] Liu R, Zhu N, Hao YT, et al. The protective effect of walnut oligopeptides against Indomethacin-Induced gastric ulcer in rats[J]. *Nutrients*, 2023, 15(7): 1675.
- [4] Chauhan A, Chauhan V. Beneficial effects of walnuts on cognition

and brain health[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 550.

- [5] Li H, Liu Y, Wang XM, et al. miR-128-3p is involved in aluminum-induced cognitive impairment by regulating the Sirt1-Keap1/Nrf2 pathway[J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2024, 271: 115966.
- [6] Kong EL, Geng XQ, Wu FX, et al. Microglial exosome miR-124-3p in hippocampus alleviates cognitive impairment induced by postoperative pain in elderly mice [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2024, 28(3): e18090.
- [7] Vuokila N, Lukasiuk K, Bot AM, et al. miR-124-3p is a chronic regulator of gene expression after brain injury[J]. *CMLS-Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(24): 4557-4581.
- [8] Priego N, Zhu L, Monteiro C, et al. STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(7): 1024-1035.
- [9] Itoh Y, Saitoh M, Miyazawa K. Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2018, 50(1): 82-90.
- [10] Su C, Miao J, Guo JH. The relationship between TGF- $\beta$ 1 and cognitive function in the brain [J]. *Brain Research Bulletin*, 2023, 205: 110820.
- [11] 刘衍,刘建华,萧非凡,等. 亚慢性铝暴露致大鼠认知障碍的 Sirt1-Keap1/Nrf2 信号通路机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(12): 2150-2157.  
Liu Y, Liu JH, Xiao FF, et al. Sirt1-Keap1/Nrf2 signaling pathway mechanism of cognitive dysfunction induced by subchronic Aluminum exposure in rats [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2023, 39(12): 2150-2157.(In Chinese)
- [12] Ahn H, Lee G, Han BC, et al. Maltol, a natural flavor enhancer, inhibits NLRP3 and Non-Canonical inflammasome activation [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(10): 1923.
- [13] Li H, Zhang QL, Xue XL, et al. Lnc001209 participates in aluminium-induced apoptosis of PC12 cells by regulating PI3K-AKT-mTOR signalling pathway [J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2023, 259: 115062.
- [14] Li H, Liu Q, Zhang QL, et al. miR-200a-3p regulates PRKACB and participates in Aluminium-Induced Tau phosphorylation in PC12 cells[J]. *Neurotoxicity Research*, 2022, 40(6): 1963-1978.
- [15] He CT, Ji JJ, Zhao XY, et al. The role of PKC in regulating NMDARs in Aluminum-Induced learning and memory impairment in rats[J]. *Neurotoxicity Research*, 2021, 39(6): 2042-2055.
- [16] He CT, Hu Q, Liu CY, et al. Aluminum induces neurotoxicity through the MicroRNA-98-5p/insulin-like growth factor 2 axis [J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2025, 16(3): 329-341.
- [17] 樊蕊,杜倩,郝云涛,等. 核桃肽提高 SAMP8 小鼠生存质量和寿命的研究[J]. *中国食物与营养*, 2020, 26(9): 49-55.  
Fan R, Du Q, Hao YT, et al. Effect of walnut peptides on improving the living quality and Life span for SAMP8 mouse [J]. *Food and Nutrition in China*, 2020, 26(9): 49-55.(In Chinese)
- [18] 成静,陈大伟,曲敏,等. 核桃肽制备工艺的优化及其改善记忆功能研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(11): 135-141.  
Cheng J, Chen DW, Qu M, et al. Study on the optimization of the preparation process of walnut peptide and the improvement of memory function[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(11): 135-141.(In Chinese)

- Chen XX, Bai YM, Lu ZL, et al. The influencing of reducing salt intervention on condiment salt intake in self-reported adult hypertension patients (18–69 years old) of Shandong Province[J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Diseases, 2020, 28(8): 570–573.(In Chinese)
- [ 12 ] 董静,徐建伟,刘海燕,等. 2011–2016 年山东省食品生产企业减盐干预效果评价[J]. 中国慢性病预防与控制, 2020, 28(7): 505–508.
- Dong J, Xu JW, Liu HY, et al. Evaluation on salt reduction intervention effects in food production enterprises of Shandong Province from 2011 to 2016 [J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Diseases, 2020, 28(7): 505–508.(In Chinese)
- [ 13 ] 高丛丛,陈先献,张晓畅,等. 2011–2016 年山东省餐饮单位减盐干预实施效果评价 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2020, 28(7): 500–504.
- Gao CC, Chen XX, Zhang XC, et al. Evaluation of salt reduction intervention effects on catering units of Shandong Province from 2011 to 2016 [J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Diseases, 2020, 28(7): 500–504.(In Chinese)
- [ 14 ] 崔洪春,王玉恒,陈小妹. 2011、2016 年济南市槐荫区居民减盐防控高血压知信行干预效果分析 [J]. 预防医学论坛, 2018, 24(10): 792–794.
- Cui HC, Wang YH, Chen XS. Analysis on intervention effects of knowledge, attitude and behavior related to salt and hypertension among residents, Huaiyin district, Jinan city, 2011 and 2016 [J]. Preventive Medicine Tribune, 2018, 24(10): 792–794.(In Chinese)
- [ 15 ] Hyseni L, Elliot–Green A, Lloyd–Williams F, et al. Systematic review of dietary salt reduction policies: Evidence for an effectiveness hierarchy?[J]. PLOS One, 2017, 12(5): e0177535.
- [ 16 ] Xu JW, Tang BW, Liu M, et al. A town level comprehensive intervention study to reduce salt intake in China: protocol for a cluster randomised controlled trial [J]. BMJ Open, 2020, 10(1): e032976.
- [ 17 ] 杨帆,谭华,彭玉林,等. 体重指数及中医体质与老年高血压相关性分析[J]. 中西医结合研究, 2024, 16(1): 1–5.
- Yang F, Tan H, Peng YL, et al. Study on the correlation between body mass index, constitutions of Chinese medicine and hypertension in the Elderly [J]. Research of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2024, 16(1): 1–5.(In Chinese)
- [ 18 ] Liu M, Xu J, Li Y, et al. A town-level comprehensive intervention study to reduce salt intake in China: cluster randomized controlled trial[J]. Nutrients, 2022, 14(21): 4698.
- [ 19 ] 陈彬. 关于中国南北方的综合划分 [J]. 科学中国人, 2015, (27): 115–116.
- Chen B. Comprehensive classification of China's South and North: an overview[J]. Scientific Chinese, 2015, (27): 115–116.(In Chinese)
- [ 20 ] 赵冬. 中国成人高血压流行病学现状[J]. 中国心血管杂志, 2020, 25(6): 513–515.
- Zhao D. Current epidemiology of adult hypertension in China [J]. Chinese Journal of Cardiovascular Medicine, 2020, 25(6): 513–515. (In Chinese)
- [ 21 ] 张晓帆,李园,杜文雯,等. 餐馆减盐干预对消费者减盐知信行的影响[J]. 营养学报, 2022, 44(2): 132–137.
- Zhang XF, Li Y, Du WW, et al. Influence of restaurant salt reduction intervention on salt related knowledge, attitude and behavior of consumers [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2022, 44 (2): 132–137.(In Chinese)
- [ 22 ] Armas AJM, Aranda JAE, Arcos HS, et al. Assessing dietary salt intake and Pilot–Testing a Home–Based intervention to lower salt intake among filipino college students [J]. Journal of Community Health Nursing, 2024, 41(1): 57–72.
- [ 23 ] 曾婧,任研,何邱平,等. 行为改变理论在大学生营养与食品类课程中的应用 [J]. 健康教育与健康促进, 2022, 17(5): 497–500.
- Zeng J, Ren Y, He QP, et al. Application of behavior change theory in college students' nutrition and food courses [J]. Health Education and Health Promotion, 2022, 17(5): 497–500.(In Chinese)

收稿日期: 2024–09–25

(上接第 2378 页)

- [ 19 ] Esteves M, Abreu R, Fernandes H, et al. MicroRNA–124–3p–enriched small extracellular vesicles as a therapeutic approach for Parkinson's disease [J]. Molecular Therapy, 2022, 30 (10): 3176–3192.
- [ 20 ] Xu YR, Zhang GH, Zhao YY, et al. Activation of PI3k/Akt/mTOR signaling induces deposition of p–tau to promote Aluminum neurotoxicity[J]. Neurotoxicity Research, 2022, 40(5): 1516–1525.
- [ 21 ] Liu FH, Qiu FY, Chen HY. miR–124–3p ameliorates Isoflurane–Induced learning and memory impairment via targeting STAT3 and inhibiting neuroinflammation[J]. Neuroimmunomodulation, 2021, 28 (4): 248–254.
- [ 22 ] Li HN, Yang J, Wang YB, et al. Neuroprotective effects of increasing levels of HSP70 against neuroinflammation in Parkinson's disease model by inhibition of NF–κB and STAT3 [J]. Life Sciences, 2019, 234: 116747.
- [ 23 ] Tang LY, Heller M, Meng ZJ, et al. Transforming growth factor–β (TGF–β) directly activates the JAK1–STAT3 axis to induce hepatic fibrosis in coordination with the SMAD pathway\* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(10): 4302–4312.
- [ 24 ] Moreau JM, Velegaki M, Bolyard C, et al. Transforming growth factor–β1 in regulatory T cell biology [J]. Sci Immunol, 2022, 7(69): eabi4613.

收稿日期: 2025–02–07