

活性氧和蛋白激酶 B 磷酸化在百草枯介导的小胶质细胞活化中的作用

肖洪喜^{a, b}, 李倩^{a, b}, 邵一鸣^{a, b}, 常秀丽^{a, b}, 周志俊^{a, b}

复旦大学 a. 公共卫生学院 b. 教育部公共卫生安全重点实验室, 上海 200032

摘要:

[背景] 百草枯 (PQ) 可诱导中枢神经系统的小胶质细胞活化, 但其机制尚不清楚。

[目的] 通过体外实验, 探究 PQ 介导的小胶质细胞活化的分子机制, 聚焦于活性氧 (ROS) 和蛋白激酶 B (Akt) 磷酸化在该过程中的作用。

[方法] 使用不同浓度的 PQ (0、1、3.3、10、33、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对小鼠小胶质细胞系 BV-2 细胞进行染毒 12 h, 采用细胞计数试剂盒 (CCK-8) 检测细胞活力。选择不引起细胞活性改变的最高染毒剂量 (33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行后续研究。用 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 染毒 12 h, 采用流式细胞技术检测小胶质细胞经典活化 (M1 活化) 的标志一氧化氮合酶 (iNOS)、选择性活化 (M2 活化) 的标志 CD206 的水平以及 ROS 和磷酸化-Akt 的水平; 采用 ELISA 方法检测 M1 活化分泌的促炎细胞因子 [白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白介素 1 β (IL-1 β)] 以及 M2 活化分泌的抑炎细胞因子 [白介素 4 (IL-4)、胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 和转化生长因子 β (TGF- β)] 的水平。采用 2 mmol·L⁻¹ 乙酰半胱氨酸 (NAC) 在 PQ 染毒前处理细胞 2 h 以干预 ROS, 再更换含 PQ 的培养基染毒 12 h 后, 用 RT-PCR 的方法检测 iNOS、CD206 及 IL-1 β 的基因表达。使用 Akt 抑制剂 (Akt inhibitor VIII, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和激活剂 (SC79, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 PQ 染毒前预处理细胞 2 h, 再更换含 PQ 的培养基染毒 12 h, 检测干预后 iNOS、CD206 和 IL-1 β 的水平。

[结果] 在 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 染毒 12 h 下, 小胶质细胞 iNOS 水平升高 ($t=8.912$, $P<0.001$), 促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 均升高 ($t=2.710$ 、3.342、5.078, P 值均 <0.05); 但 CD206 和抑炎因子水平改变差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 小胶质细胞胞内 ROS 水平升高 ($t=11.907$, $P<0.001$), 而 Akt 磷酸化则被抑制 ($t=6.152$, $P<0.001$)。NAC 预处理后, PQ 染毒引起的 iNOS、IL-1 β 和 CD206 基因表达水平的增加均被逆转 ($t=15.457$ 、6.912、9.106, 均 $P<0.001$)。Akt 抑制剂的使用, 使 iNOS 和 IL-1 β 水平相较于 PQ 染毒组进一步升高 ($t=8.021$ 、3.684, 分别 $P<0.001$ 、 $P<0.01$), CD206 的水平则降低 ($t=2.662$, $P<0.05$)。与之相反, Akt 激活剂预处理抑制了 PQ 染毒引起的 iNOS 和 IL-1 β 水平的升高 ($t=6.835$ 、4.325, 分别 $P<0.001$ 、 $P<0.01$), 而 CD206 的水平升高 ($t=17.471$, $P<0.001$)。在 ROS 与 Akt 的关系上, 使用 NAC 干预 ROS 时, PQ 引起的 Akt 磷酸化抑制得到恢复 ($t=6.438$, $P<0.001$); 而无论使用 Akt 抑制剂还是激活剂, 均不改变 ROS 的水平 ($P>0.05$)。

[结论] PQ 可通过升高 ROS, 进而抑制 Akt 磷酸化引起小胶质细胞的促炎活化。干预 ROS 可同时抑制小胶质细胞的 M1 和 M2 活化; 而 Akt 磷酸化的激活能调节 PQ 介导的小胶质细胞活化方向。

关键词: 百草枯; 小胶质细胞; 活性氧; 蛋白激酶 B; 磷酸化

Roles of reactive oxygen species and protein kinase B phosphorylation in paraquat-mediated microglia activation XIAO Hongxi^{a, b}, LI Qian^{a, b}, SHAO Yiming^{a, b}, CHANG Xiuli^{a, b}, ZHOU Zhijun^{a, b} (a.School of Public Health b.Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract:

[Background] Paraquat (PQ) can induce microglia activation in central nervous system (CNS). However, its associated mechanism is not clear yet.

[Objective] This study investigates the potential molecular mechanism of PQ-mediated microglia activation and focuses on the roles of reactive oxygen species (ROS) and protein kinase B (PKB, also called Akt) phosphorylation in this process through *in vitro* experiments.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20451

基金项目

国家自然科学基金项目 (81673202, 81773472)

作者简介

肖洪喜 (1994—), 男, 硕士生;
E-mail: 17211020016@fudan.edu.cn

通信作者

周志俊, E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-09-24

录用日期 2020-11-24

文章编号 2095-9982(2021)01-0044-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

肖洪喜, 李倩, 邵一鸣, 等. 活性氧和蛋白激酶 B 磷酸化在百草枯介导的小胶质细胞活化中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (1): 44-50.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20451

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHOU Zhijun, E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2020-09-24

Accepted 2020-11-24

►To cite

XIAO Hongxi, LI Qian, SHAO Yiming, et al. Roles of reactive oxygen species and protein kinase B phosphorylation in paraquat-mediated microglia activation[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(1): 44-50.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20451

[Methods] Mouse microglia cell line BV-2 cells were treated with different concentrations of PQ (0, 1, 3.3, 10, 33, and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 12 h and assessed for its viability with cell counting kit 8 (CCK8). The highest dose that did not damage the cell viability (33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was selected for further experiments. Then BV-2 cells were treated with 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ for 12 h to detect the levels of nitric oxide synthase (iNOS), a marker of microglia classical activation (M1 activation), CD206, a marker of microglia alternative activation (M2 activation), ROS, and phosphorylated Akt (p-Akt) by flow cytometry, as well as the levels of proinflammatory cytokines triggered via M1 activation [interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), and interleukin 1 β (IL-1 β)] and anti-inflammatory cytokines triggered via M2 activation [interleukin 4 (IL-4), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), and transforming growth factor β (TGF- β)] by ELISA. A batch of cells were pretreated with 2 mmol·L⁻¹ N-acetylcysteine (NAC) to inhibit ROS for 2 h, and then treated with PQ for 12 h to detect the expression levels of iNOS, CD206, and IL-1 β by RT-PCR. Another batch of cells were pretreated with Akt inhibitor (Akt inhibitor VIII, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and activator (SC79, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) respectively for 2 h, and then treated with PQ for another 12 h, to detect the expression levels of iNOS, CD206, and IL-1 β .

[Results] After the cells were exposed to 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ for 12 h, the levels of iNOS ($t=8.912$, $P<0.001$) and proinflammatory cytokines IL-6, TNF- α , and IL-1 β were increased ($t=2.710$, 3.342, and 5.078, $P<0.05$), while no significant difference was observed in the levels of CD206 and anti-inflammatory cytokines ($P>0.05$); in addition, intercellular ROS level was increased ($t=11.907$, $P<0.001$), and Akt phosphorylation was inhibited ($t=6.152$, $P<0.001$). After the NAC treatment, the increased levels of iNOS, IL-1 β , and CD206 gene expression induced by PQ were reversed ($t=15.457$, 6.912, 9.106, respectively; $P<0.001$). After the Akt inhibitor treatment, the levels of iNOS and IL-1 β were further increased compared with the PQ group ($t=8.021$, $P<0.001$; $t=3.684$, $P<0.01$, respectively), and the CD206 level was reduced ($t=2.662$, $P<0.05$). In contrast, compared with the PQ group, the levels of iNOS and IL-1 β were inhibited by the Akt activator ($t=6.835$, $P<0.001$; $t=4.325$, $P<0.01$, respectively), while CD206 was increased ($t=17.471$, $P<0.001$). As for the relationship between ROS and Akt, NAC restored the inhibited Akt phosphorylation induced by PQ ($t=6.438$, $P<0.001$), while neither Akt inhibitor nor Akt activator changed the level of ROS ($P<0.05$).

[Conclusion] PQ can induce pro-inflammatory activation of microglia by increasing ROS and inhibiting Akt phosphorylation. ROS intervention can inhibit both M1 and M2 phenotypes of microglia. And Akt activation can regulate PQ-mediated microglia activation.

Keywords: paraquat; microglia; reactive oxygen species; protein kinase B; phosphorylation

百草枯 (paraquat, PQ) 是一种于 1958 年开发出来的季铵盐类除草剂, 其化学结构与神经毒物 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 的活性代谢产物 N-甲基-4-苯基吡啶阳离子盐 (1-methyl-4-phenylpyridinium ion, MPP⁺) 相似, 是一种公认的具有神经毒性的化合物。流行病学与动物实验均显示, PQ 的长期低剂量暴露与帕金森病的发生和发展有关^[1-2]。

帕金森病是临床常见的一种神经退行性疾病, 全球患者人数超过 600 万^[3], 但发病机制尚不明确。越来越多的研究表明, 神经炎症在神经退行性疾病的发生和发展过程中发挥重要作用^[4-5]。小胶质细胞是中枢神经系统的固有免疫细胞, 在中枢神经系统出现损伤或化学物侵袭时迅速活化, 产生神经炎症反应^[6]。小胶质细胞活化方式分为两种: 经典活化, 也称 M1 活化; 选择活化, 也称 M2 活化^[7]。M1 活化表型特征为分泌多种促炎因子 [如诱导型一氧化氮合酶 (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等]; M2 活化表型则分泌多种抑炎因子 [如白介素 4 (interleukin 4, IL-4)、精氨酸 1 (arginine 1, Arg1)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1)、转化生长

因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 等] 和神经生长因子^[8]。持续的 M1 活化介导的神经炎症反应所分泌的促炎因子对神经元产生损伤作用; 而 M2 活化产生的炎症调节因子和神经生长因子则可以抑制神经炎症, 并发挥组织修复作用^[9]。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 被认为与多种神经退行性疾病的发生有关, 如阿尔兹海默病、帕金森病等^[10]。在缺氧、营养缺乏、化学因素损伤等情况下, 细胞 ROS 的生成和清除平衡被打破, 造成 ROS 累积过多, 进而对细胞产生损伤作用^[11-12]。蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 也被称为 Akt, 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶, 在细胞内广泛存在, 参与多种生物过程, 如细胞生存、生长、信号转导和凋亡等^[13]。

研究发现, PQ 体内染毒能够引起小鼠大脑小胶质细胞活化, 并产生以多种炎症因子浸润为特征的神炎症反应^[14]。而已有研究多以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为刺激小胶质细胞活化的化学物来探究小胶质细胞的活化机制^[15-16], 且多个研究发现, ROS 和 Akt 均参与了小胶质细胞的活化过程^[17-18]。但目前对于 PQ 引起的小胶质细胞活化机制研究较少, ROS 和 Akt 在 PQ 引起的小胶质细胞活化中的作用和关系尚需要进一步阐述。因此, 本研究拟通过体外染毒和干预实验, 检测 PQ 介导的小胶质质

胞活化状态及细胞因子的改变,探究ROS和Akt磷酸化在PQ介导的小胶质细胞活化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂:PQ、L-谷氨酰胺、青霉素-链霉素(Sigma公司,美国),胎牛血清(fatal bovine serum, FBS; Gibco公司,美国),RPMI 1640培养基(Cytiva公司,美国),细胞因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、TGF- β 、IGF-1)ELISA试剂盒(达科为生物技术有限公司,中国),2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)ROS荧光探针、细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)(碧云天生物科技有限公司,中国),PCR引物(生工生物有限公司,中国),流式穿膜试剂(BD公司,美国)。流式细胞抗体包括:异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)-抗-iNOS抗体,别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)-抗-甘露糖受体(mannose receptor, 又称CD206)抗体,兔抗鼠-p-Akt抗体及FITC标记的二抗,均购自美国Thermo Fisher公司。常见的ROS干预试剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)、Akt干预试剂Akt抑制剂(Akt inhibitor VIII)和Akt激活剂(SC79)均购自碧云天生物科技有限公司。主要仪器:荧光酶标仪(Biotech公司,美国),BD LSR Fortessa流式细胞仪(BD公司,美国)。

1.2 细胞培养与处理

小鼠小胶质细胞系BV-2细胞购自中国盖宁生物公司。细胞采用RPMI 1640培养基(含10%FBS, 2 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺和100 U·L⁻¹的青霉素-链霉素),在5%CO₂、37℃恒温细胞培养箱中培养。PQ用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)溶解,制备20 mg·mL⁻¹的储备液,于-80℃保存,在细胞处理时用培养基进行稀释。为进行细胞活力的检测,设置0、1、3.3、10、33、100 μ mol·L⁻¹浓度梯度,在96孔板中进行PQ染毒12 h。选择不引起细胞活力改变的最高浓度进行后续实验。后续实验均在48孔板中进行细胞处理。以培养基组作为阴性对照,设置PQ染毒组,2 mmol·L⁻¹ NAC干预组和5 μ mol·L⁻¹ Akt抑制剂干预组及20 μ mol·L⁻¹ Akt激活剂干预组,干预组均采用干预试剂处理细胞2 h后,更换含33 μ mol·L⁻¹ PQ培养基染毒12 h的方式进行处理。NAC处理后,检测小胶质细胞ROS、p-Akt相对水平的改变及不同表型的标志(M1

活化表型为iNOS, M2活化表型为CD206)和IL-1 β 的基因表达水平;Akt抑制剂/激活剂处理后,检测细胞ROS、p-Akt、iNOS、CD206和IL-1 β 相对水平的改变。

1.3 CCK-8法检测细胞活性

将BV-2细胞悬液接种于96孔板中,每孔100 μ L,接种密度约为 5×10^4 孔⁻¹,培养12 h使细胞良好贴壁后,按照上述方法进行细胞处理。在细胞染毒后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,孵育1 h。培养结束后,采用酶标仪在450 nm波长下进行检测,采用实验组与对照组光密度的比值计算细胞相对活性。

1.4 ELISA法检测细胞因子水平

将细胞悬液接种于48孔板中,每孔500 μ L,接种细胞密度约为 2.5×10^5 孔⁻¹,培养12 h使细胞稳定贴壁后,按照上述方法进行处理,收集上清,在500 $\times g$ 转速下离心5 min以去除上清中可能存在的细胞,按照不同试剂盒的说明进行ELISA,检测细胞分泌的细胞因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、TGF- β 、IGF-1)。

1.5 DCFH-DA法检测胞内ROS

细胞处理结束后,用胰蛋白酶消化细胞,消化结束后用小牛血清(fetal calf serum, FCS)缓冲液(体积分数为FCS:PBS=1:19)重悬,并转移到流式细胞板中(200 μ L·孔⁻¹),向各孔加入荧光探针DCFH-DA至终浓度为10 μ mol·L⁻¹,于37℃培养箱中孵育20 min,采用LSR Fortessa流式细胞仪检测荧光强度,采用FlowJo V10.0.7进行数据分析。

1.6 流式细胞技术

48孔板培养并进行相应处理后,用胰蛋白酶消化, FCS缓冲液重悬,并转移到流式细胞板中(200 μ L·孔⁻¹)。使用Fc封闭抗体在冰上封闭30 min,再进行膜蛋白CD206染色,加入相应抗体,在避光条件下反应30 min。对于胞内蛋白,采用穿膜试剂处理20~30 min后,加入相应抗体。处理好的样品采用LSR Fortessa流式细胞仪检测,并使用FlowJo V10.0.7进行数据分析。所使用的抗体包括FITC-抗-iNOS抗体(1:400), APC-抗-CD206抗体(1:400),兔抗鼠-p-AKT抗体(1:400)及FITC标记的二抗(1:400)。

1.7 逆转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)检测iNOS、CD206、IL-1 β 的mRNA表达

NAC处理后的细胞经胰蛋白酶消化后,用1 mL Trizol试剂进行细胞裂解和RNA的提取,根据反转录试剂盒说明进行cDNA的合成。合成好的cDNA按照以下流程进行PCR反应程序:95℃ 30 s, 95℃ 5 s,

60℃ 34 s, 共设置40个循环;在循环完成后,95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s获得溶解曲线。以磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)为内参,采用比较 C_t 值法进行计算。RT-PCR所使用的引物序列如表1所示。

表1 RT-PCR引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequences

基因名称 (Gene)	引物序列 (Primer sequences) (5'→3')
<i>iNOS</i>	正向引物 (Forward): CTGCCCCCTGCTCACTC
	反向引物 (Backward): TGGGAGGGGTCGTAATGTCC
<i>CD206</i>	正向引物 (Forward): AAGGAAGGTTGGCATTGT
	反向引物 (Backward): CCTTTCAATCCTATGCAAGC
<i>IL-1β</i>	正向引物 (Forward): CTGGTGTGTGACGTTCCATTA
	反向引物 (Backward): CCGACAGCACGAGGCTTT
<i>GAPDH</i>	正向引物 (Forward): TTCAACGGCACAGTCAAGGC
	反向引物 (Backward): GACTCCACGACATACTCAGCACC

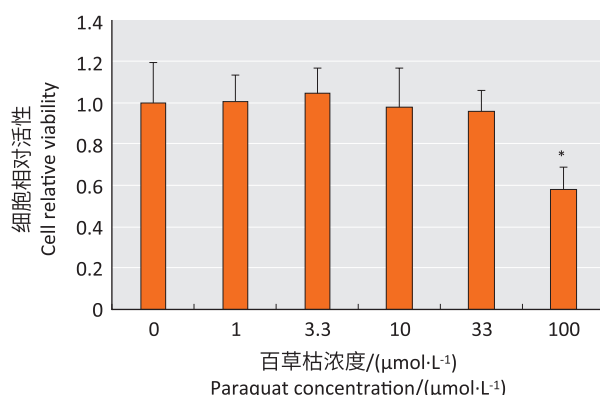
1.8 统计学分析

采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,数据以均值±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析,LSD法进行事后两两比较。检验水准为 $\alpha=0.05$ (双侧检验)。

2 结果

2.1 PQ对细胞活性的影响

以培养基组作为阴性对照组,设置1、3.3、10、33、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度梯度进行PQ染毒12 h后,CCK-8结果显示,在100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理12 h时,细胞活力下降。见图1。参考相关研究的浓度设置^[19],选择不引起小胶质细胞活性改变的最高浓度(33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行后续实验。



[注]*: 与阴性对照(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组比, $P<0.05$ 。

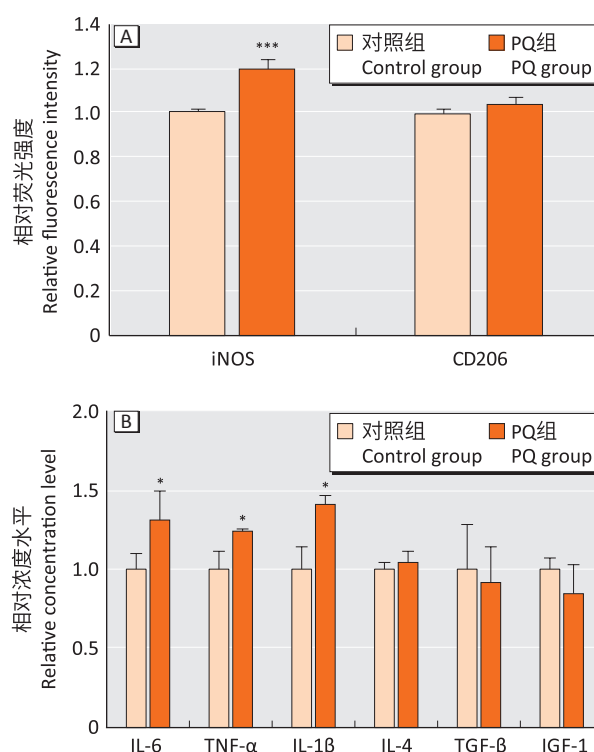
[Note]*: Compared with the negative control (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, $P<0.05$.

图1 PQ对小胶质细胞相对活性的影响($n=5$)

Figure 1 Effects of PQ on cell viability of microglia ($n=5$)

2.2 PQ对小胶质细胞活化及细胞因子分泌的影响

与对照组相比, *iNOS*水平升高($t=8.912$, $P<0.001$),而CD206未见改变($P>0.05$) (图2A)。与表型改变结果一致, M1活化表型分泌的促炎细胞因子IL-6、TNF- α 、IL-1 β 均升高(t 值分别为2.710、3.342、5.078,均 $P<0.05$),而M2表型分泌的细胞因子IL-4、TGF- β 、IGF-1则未见改变(图2B)。



[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; ***: 与对照组相比, $P<0.001$ 。

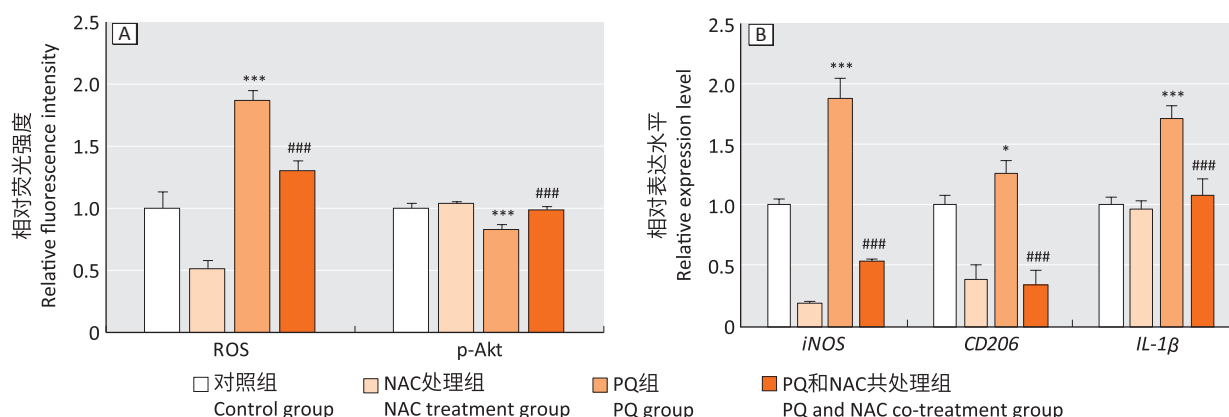
[Note]*: Compared with the control group, $P<0.05$; ***: Compared with the control group, $P<0.001$.

图2 PQ对小胶质细胞活化表型(A, $n=6$)和细胞因子分泌(B, $n\geq 3$)的影响

Figure 2 Effects of PQ on microglia phenotypes (A, $n=6$) and cytokine secretion (B, $n\geq 3$)

2.3 ROS在PQ介导的小胶质细胞活化中的作用

相比于对照组, PQ染毒组胞内ROS升高($t=11.907$, $P<0.001$),而Akt磷酸化则受到抑制($t=6.152$, $P<0.001$)。在使用NAC干预胞内ROS后,相比于PQ染毒组, p-Akt得到恢复($t=6.438$, $P<0.001$) (图3A)。在基因表达上,相比于对照组, PQ染毒组的*iNOS*、*CD206*和*IL-1β*基因表达均增加($t=9.648$ 、3.098、10.802, 分别 $P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.001$)。在使用NAC预处理后,三者的基因表达水平均受到抑制(与PQ染毒组相比, $t=15.457$ 、9.106、6.912, 均 $P<0.001$) (图3B)。



[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$; ***: 与对照组相比, $P < 0.001$; ###: 与PQ组相比, $P < 0.001$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$; ***: Compared with the control group, $P < 0.001$; ###: Compared with the PQ group, $P < 0.001$.

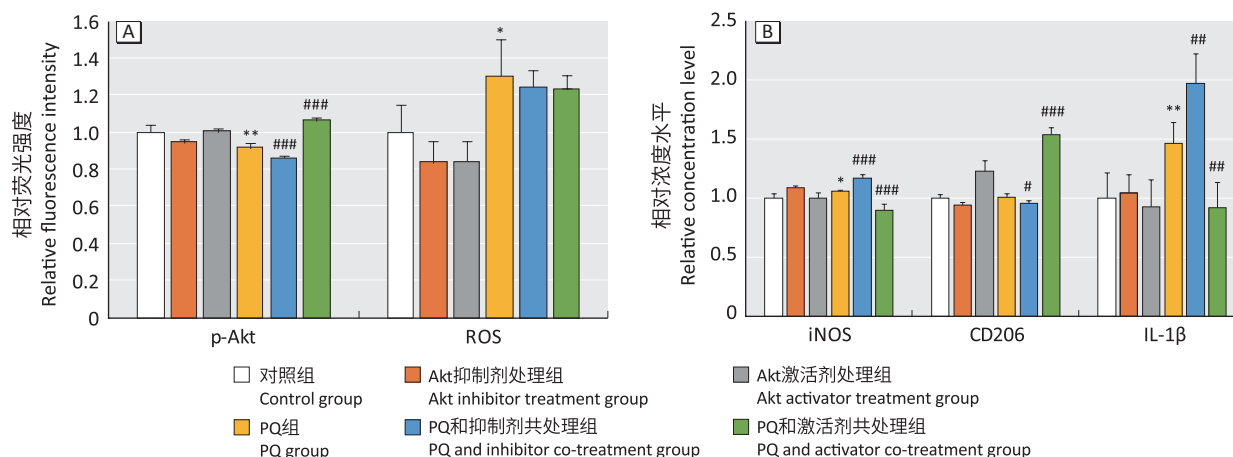
图3 ROS干预对PQ引起的Akt磷酸化(A, $n=6$)和细胞表型相关基因表达(B, $n=5$)改变的影响

Figure 3 Effects of ROS intervention on changes of Akt phosphorylation (A, $n=6$) and microglia activation associated-gene expression (B, $n=5$) induced by PQ

2.4 Akt磷酸化在PQ介导的小胶质细胞活化中的作用

与PQ染毒组相比, p-Akt的改变与抑制剂和激活剂的干预预期一致; 对于ROS, 无论是Akt抑制剂干预组还是激活剂干预组, ROS均未见改变($t=0.597$ 、 0.722 , 均 $P > 0.05$) (图4A)。对于细胞活化表型和细胞因子分泌, 与PQ染毒组相比, iNOS水平和IL-1 β 的

分泌在使用Akt抑制剂干预后进一步升高($t=8.021$ 、 3.684 , 分别 $P < 0.001$, $P < 0.01$), 而CD206水平降低($t=2.662$, $P < 0.05$)。使用Akt激活剂干预后, iNOS降低($t=6.438$, $P < 0.001$), IL-1 β 减少($t=4.325$, $P < 0.01$), PQ介导的M1活化被抑制; 同时, CD206升高($t=17.471$, $P < 0.001$), M2表型被激活(图4B)。



[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$; **: 与对照组相比, $P < 0.01$; #: 与PQ组相比, $P < 0.05$; ###: 与PQ组相比, $P < 0.01$; ####: 与PQ组相比, $P < 0.001$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$; **: Compared with the control group, $P < 0.01$; #: Compared with the PQ group, $P < 0.05$; ###: Compared with the PQ group, $P < 0.01$; ####: Compared with the PQ group, $P < 0.001$.

图4 Akt干预对PQ引起的p-Akt和ROS(A)及细胞活化表型和因子分泌(iNOS、CD206和IL-1 β)(B)改变的影响($n=6$)

Figure 4 Effects of Akt intervention on changes of p-Akt and ROS (A), and microglia phenotypes and cytokines (iNOS, CD206 and IL-1 β) (B) induced by PQ ($n=6$)

3 讨论

PQ是一种具有神经毒性的除草剂, 可引起小胶质细胞的促炎活化^[20], 但其机制尚不明确。本研究观察到PQ介导了小胶质细胞的M1活化和多种促炎因子的分泌; 同时, 胞内ROS升高, 但Akt的磷酸化受到抑制。在使用ROS抑制剂处理后, 小胶质细胞的两

种活化表型均被抑制, 使小胶质细胞倾向于恢复静息状态。Akt的干预实验揭示了Akt磷酸化能够调节PQ介导的小胶质细胞活化方向。

小胶质细胞的促炎活化能分泌大量的细胞因子, 产生中枢神经系统的免疫应答, 对神经元产生损伤作用^[21]。许多研究发现, PQ在较低浓度下即可激活小

胶质细胞,使其向M1活化表型转变^[22-23]。本研究观察到PQ能够引起BV-2细胞M1活化标志iNOS的升高及促炎细胞因子分泌的增加,表明PQ能够介导小胶质细胞向M1活化表型转变,与上述研究结果一致。IL-6、TNF- α 和IL-1 β 是典型的小胶质细胞M1活化表型大量分泌的细胞因子,在神经炎症相关疾病中发挥作用^[24]。本研究观察到促炎细胞因子的明显升高。IL-1 β 的大量释放是神经免疫的共同特征。本课题组的动物实验研究发现,对小鼠腹腔注射PQ,可引起小鼠脑中小胶质细胞的M1活化和IL-1 β 水平升高,影响神经干细胞增殖,并进而影响小鼠记忆功能^[25]。因此,在后续实验中,IL-1 β 可作为典型促炎因子代表性反映细胞因子的改变。

PQ进入细胞后能引起烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶的活化,并诱导ROS的产生^[26],ROS的过量生成在小胶质细胞促炎反应中发挥重要作用。研究发现,线粒体ROS能够调节多种胞内信号通路,如丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路和核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路等,进而促进小胶质细胞的炎性活化^[27-28]。本研究观察到PQ可引起小胶质细胞胞内ROS的增加,并最终引起小胶质细胞的M1活化。在使用NAC干预ROS后,PQ引起的小胶质细胞的M1表型被抑制,有趣的是,小胶质细胞M2活化标志CD206的基因表达也受到抑制,说明抑制ROS可同时抑制小胶质细胞的M1和M2活化,提示ROS的升高可能是PQ介导的小胶质细胞活化的初始事件。

研究发现,Akt在不同化学物引起的小胶质细胞活化中的作用不同。 β 淀粉样蛋白可抑制Akt磷酸化,进而引起小胶质细胞的促炎活化^[29];而LPS则能增强Akt的磷酸化,促进小胶质细胞的促炎活化^[30]。本研究发现,PQ能够抑制Akt的磷酸化,引起小胶质细胞M1活化标志的升高,且使用Akt抑制剂干预后,M1活化进一步增强;而使用Akt激活剂干预后,小胶质细胞M1活化表型被抑制,同时,M2活化表型升高。这些结果提示,Akt磷酸化能够有效改善PQ引起的促炎活化,并使活化表型向抑炎和修复表型转变。因此,Akt磷酸化在小胶质细胞活化过程中可能发挥着调节作用,是一个潜在的治疗靶点。目前关于Akt在PQ产生的小胶质细胞活化中的作用未见报道,本研究初步发现并报道了Akt磷酸化在PQ与常用模型LPS之间存

在差异。

由于ROS与Akt磷酸化在PQ介导的小胶质细胞活化中的关系相关研究缺乏,因此二者的关系在本研究中也探讨。在LPS的相关研究中,LPS刺激引起的ROS升高能够激活磷酸肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)-Akt通路,进而促进小胶质细胞的M1活化^[17]。而在本研究中,PQ引起的ROS升高抑制了Akt磷酸化,且这种抑制能够被NAC逆转。此外,Akt亦能够通过激活抗氧化应激的重要因子,如核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2),增强细胞抗氧化能力^[31]。但在本研究中,Akt的干预不影响PQ诱导的ROS的生成。其原因可能是,PQ在染毒期间持续存在,因此能够持续刺激ROS的生成,产生无法逆转的ROS升高。

综上,PQ能够引起小胶质细胞的促炎活化和细胞因子升高,ROS和Akt磷酸化在这个过程中发挥重要作用。ROS的升高抑制了Akt的磷酸化,削弱了Akt对小胶质细胞表型的调节作用。本研究仅从体外实验探究了ROS和Akt磷酸化的作用,而PQ在机体内引起神经炎症反应的机制很复杂,需要进一步研究。

参考文献

- [1] BERRY C, LA VECCHIA C, NICOTERA P. Paraquat and Parkinson's disease [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17 (7): 1115-1125.
- [2] FRIGERIO R, SANFT KR, GROSSARDT BR, et al. Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study [J]. *Mov Disord*, 2006, 21 (10): 1688-1692.
- [3] GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17 (11): 939-953.
- [4] GAN L, JOHNSON JA. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842 (8): 1208-1218.
- [5] LI Q, BARRES BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18 (4): 225-242.
- [6] YANG QQ, ZHOU JW. Neuroinflammation in the central nervous system: symphony of glial cells [J]. *Glia*, 2019, 67 (6): 1017-1035.
- [7] MOEHLE MS, WEST AB. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: foe and ally? [J]. *Neuroscience*, 2015, 302: 59-73.

- [8] TANG Y, LE W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (2) : 1181-1194.
- [9] HENEKA M T, KUMMER M P, LATZ E. Innate immune activation in neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14 (7) : 463-477.
- [10] ANGELOVA P R, ABRAMOV A Y. Role of mitochondrial ROS in the brain : from physiology to neurodegeneration [J]. *FEBS Letters*, 2018, 592 (5) : 692-702.
- [11] DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82 (1) : 47-95.
- [12] BÓRQUEZ D A, URRUTIA P J, WILSON C, et al. Dissecting the role of redox signaling in neuronal development [J]. *J Neurochem*, 2016, 137 (4) : 506-517.
- [13] RAI S N, DILNASHIN H, BIRLA H, et al. The role of PI3K/Akt and ERK in neurodegenerative disorders [J]. *Neurotox Res*, 2019, 35 (3) : 775-795.
- [14] CHE Y, HOU L, SUN F, et al. Taurine protects dopaminergic neurons in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial M1 polarization [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (4) : 435.
- [15] JUNG J S, CHOI M J, LEE Y Y, et al. Suppression of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by Morin via MAPK, PI3K/Akt, and PKA/HO-1 signaling pathway modulation [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65 (2) : 373-382.
- [16] BURGUILLOS M A, DEIERBORG T, KAVANAGH E, et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity [J]. *Nature*, 2011, 472 (7343) : 319-324.
- [17] JIANG K, GUO S, YANG C, et al. Barbaloin protects against lipopolysaccharide (LPS) -induced acute lung injury by inhibiting the ROS-mediated PI3K/AKT/NF-κB pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 64 : 140-150.
- [18] HUANG B, LIU J, MENG T, et al. Polydatin Prevents Lipopolysaccharide (LPS) -Induced Parkinson's Disease via Regulation of the AKT/GSK3β-Nrf2/NF-κB Signaling Axis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9 : 2527.
- [19] SUN Y, ZHENG J, XU Y, et al. Paraquat-induced inflammatory response of microglia through HSP60/TLR4 signaling [J]. *Human Exp Toxicol*, 2018, 37 (11) : 1161-1168.
- [20] PURISAI M G, MCCORMACK A L, CUMINE S, et al. Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration [J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 25 (2) : 392-400.
- [21] BUTOVSKY O, WEINER H L. Microglial signatures and their role in health and disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19 (10) : 622-635.
- [22] HUANG M, LI Y, WU K, et al. Paraquat modulates microglia M1/M2 polarization via activation of TLR4-mediated NF-κB signaling pathway [J]. *Chem-Biol Interact*, 2019, 310 : 108743.
- [23] MITRA S, CHAKRABARTI N, BHATTACHARYA A. Differential regional expression patterns of α-synuclein, TNF-α, and IL-1β; and variable status of dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after Paraquat treatment [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8 (1) : 163.
- [24] VAY S U, FLITSCH L J, RABENSTEIN M, et al. The plasticity of primary microglia and their multifaceted effects on endogenous neural stem cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15 (1) : 226.
- [25] LI Q, XIAO H, SHAO Y, et al. Paraquat increases Interleukin-1β in hippocampal dentate gyrus to impair hippocampal neurogenesis in adult mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 200 : 110733.
- [26] HOU L, HUANG R, SUN F, et al. NADPH oxidase regulates paraquat and maneb-induced dopaminergic neurodegeneration through ferroptosis [J]. *Toxicology*, 2019, 417 : 64-73.
- [27] PARK J, MIN J S, KIM B, et al. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF-κB pathways [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 584 : 191-196.
- [28] PENG J, STEVENSON F F, OO M L, et al. Iron-enhanced paraquat-mediated dopaminergic cell death due to increased oxidative stress as a consequence of microglial activation [J]. *Free Rad Biol Med*, 2009, 46 (2) : 312-320.
- [29] SHI X, CAI X, DI W, et al. MFG-E8 selectively inhibited Aβ-induced microglial M1 polarization via NF-κB and PI3K-Akt pathways [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54 (10) : 7777-7788.
- [30] CIANCIULLI A, CALVELLO R, PORRO C, et al. PI3k/Akt signalling pathway plays a crucial role in the anti-inflammatory effects of curcumin in LPS-activated microglia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36 : 282-290.
- [31] HUANG B, HE D, CHEN G, et al. α-Cyperone inhibits LPS-induced inflammation in BV-2 cells through activation of Akt/Nrf2/HO-1 and suppression of the NF-κB pathway [J]. *Food Funct*, 2018, 9 (5) : 2735-2743.

(英文编辑：汪源；责任编辑：丁瑾瑜)