

铅和脂多糖暴露致小鼠神经炎症的损伤机制

王伟轩^a, 李爽^b, 陈松^b, 曹福源^b, 张学彦^a, 张洋^a, 庞淑兰^a, 张艳淑^{a, b}

华北理工大学 a. 公共卫生学院 b. 实验动物中心, 河北 唐山 063210

摘要:

[背景] 铅和脂多糖 (LPS) 暴露均可以引起神经炎症和小胶质细胞极化, 但是铅和 LPS 联合暴露是否会导致神经炎症加剧以及小胶质细胞的极化情况还未见报道。

[目的] 探讨铅和 LPS 联合暴露对小鼠神经炎症的影响以及机制。

[方法] SPF 级雄性 C57 小鼠 64 只随机分为 8 个组: 对照组、LPS 组、低铅组、中铅组、高铅组、低铅+LPS 组、中铅+LPS 组和高铅+LPS 组。铅染毒: 分别给予 0.25、0.50、1.00 g·L⁻¹ 的乙酸铅饮水 9 周; LPS 处理: 乙酸铅染毒结束前一周, 每天腹腔注射 250 g·kg⁻¹ (以体重计), 每天注射一次, 共 7 次, 末次注射 24 h 后处死动物。用 ELISA 法检测皮质中炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白介素 (IL)-1 β 和 IL-6 的变化情况。用荧光定量 PCR 方法检测小胶质细胞 M1 型标志物 [诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、NADPH 氧化酶 2 (NOX2)、趋化因子受体 7 (CCR7)]、M2 型标志物 [精氨酸-1 (Arg-1)、转化生长因子- β (TGF- β)、趋化因子受体 2 (CCR2)]、髓样细胞触发受体 2 (TREM2) mRNA 和微小 RNA-34a (*miR-34a*) 的表达情况。用 Western blotting 法检测 TREM2、iNOS 和 Arg-1 蛋白的表达情况。

[结果] 与对照组相比, LPS 组、中铅组和高铅组小鼠皮质中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达量均增加; 与 LPS 组或者同剂量的铅组相比, 中铅+LPS 组和高铅+LPS 组皮质中 TNF- α (7.82 \pm 0.60, 8.79 \pm 1.62)、IL-1 β (8.80 \pm 0.95, 11.18 \pm 0.92) 和 IL-6 (7.53 \pm 0.90, 8.66 \pm 0.93) 含量增加 ($P < 0.05$)。LPS 组、中铅、高铅组皮质中 M1 标志物 *iNOS*、*NOX2*、*CCR7* mRNA 和 iNOS 蛋白表达高于对照组, 而 M2 标志物 *Arg-1*、*TGF- β* 、*CCR2* mRNA 和 Arg-1 蛋白表达明显低于对照组, 尤其是 *CCR2* mRNA 表达下降尤为显著 ($P < 0.05$)。与 LPS 组或者同剂量的铅组相比, 中铅+LPS 组和高铅+LPS 组皮质中 *iNOS*、*CCR7* mRNA 和 iNOS 蛋白表达升高较为明显, 而 *Arg-1* mRNA 表达减少。此外, 中铅+LPS 和高铅+LPS 组皮质中 *TREM2* mRNA (0.20 \pm 0.03, 0.04 \pm 0.01) 和蛋白 (0.32 \pm 0.02, 0.21 \pm 0.02) 表达均低于 LPS 组或相同剂量的铅组, 而 *miR-34a* 表达升高 ($P < 0.05$)。

[结论] 铅和 LPS 联合暴露后加剧了神经炎症损伤, 小胶质细胞 M1 标志物增加显著, 这可能与 *miR-34a* 表达升高导致 TREM2 表达有关。

关键词: 铅; 脂多糖; 神经炎症; 小胶质细胞极化; 髓样细胞触发受体 2; 微小 RNA-34a

Mechanism of neuroinflammatory injury induced by lead and lipopolysaccharide in mice
WANG Weixuan^a, LI Shuang^b, CHEN Song^b, CAO Fuyuan^b, ZHANG Xueyan^b, ZHANG Yang^b, PANG Shulan^b, ZHANG Yanshu^{a, b} (a.School of Public Health b.Laboratory Animal Center, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

Abstract:

[Background] Both lead and lipopolysaccharide (LPS) exposures can result in neuroinflammation and microglia polarization, but it is not clear whether the combined exposure to lead and LPS will aggravate neuroinflammation and the polarization of microglia.

[Objective] The *in vivo* experiment investigates the effect and mechanism of combined exposure to lead and LPS on neuroinflammation in mice.

[Methods] A total of 64 SPF male C57 mice were randomly divided into eight groups: control group, LPS group, low lead group, medium lead group, high lead group, low lead+LPS group, medium lead+LPS group, and high lead+LPS group. Mice in the lead exposure groups were given 0.25, 0.50, and 1.00 g·L⁻¹ lead acetate through drinking water for nine weeks respectively. The LPS treatment was administered at a dose of 250 g·kg⁻¹ (by weight) for 7 d at the 9th week of lead exposure. The animals were sacrificed 24 h after the last injection. The changes of

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20583

基金项目

国家自然科学基金项目 (82073598); 河北省自然科学基金项目 (H2020209250)

作者简介

王伟轩 (1989—), 男, 博士生;
E-mail: wangwx@ncst.edu.cn

通信作者

张艳淑, E-mail: yanshu_zhang@163.com

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2020-12-16

录用日期

2021-05-24

文章编号

2095-9982(2021)07-0763-06

中图分类号

R114

文献标志码

A

► 引用

王伟轩, 李爽, 陈松, 等. 铅和脂多糖暴露致小鼠神经炎症的损伤机制 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (7): 763-768.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20583

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Yanshu, E-mail: yanshu_zhang@163.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2020-12-16

Accepted

2021-05-24

► To cite

WANG Weixuan, LI Shuang, CHEN Song, et al. Mechanism of neuroinflammatory injury induced by lead and lipopolysaccharide in mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(7): 763-768.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20583

inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) in the cortex were detected by ELLSA. The expressions of M1 markers [induced nitric oxide synthase (iNOS), NADPH oxidase 2 (NOX2), and chemokine receptor 7 (CCR7)], M2 markers [arginase 1 (Arg-1), transforming growth factor- β (TGF- β), and chemokine receptor 2 (CCR2)], triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) mRNA and microRNA-34a (*miR-34a*) were detected by quantitative PCR. The protein expressions of TREM2, iNOS, and Arg-1 were detected by Western blotting.

[Results] Compared with the control group, the levels of inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the cortex of mice were increased in the LPS group, the medium lead group, and the high lead group. Compared with the LPS group or the corresponding lead group, the levels of TNF- α (7.82 ± 0.60 , 8.79 ± 1.62), IL-1 β (8.80 ± 0.95 , 11.18 ± 0.92), and IL-6 (7.53 ± 0.90 , 8.66 ± 0.93) were elevated in the medium lead+LPS group and the high lead+LPS group. The expression levels of M1 markers *iNOS*, *NOX2*, and *CCR7* mRNA and iNOS protein in the cortex of the LPS group, the medium lead group, and the high lead group were higher than those of the control group, while the expression levels of M2 markers *Arg-1*, *TGF- β* , and *CCR2* mRNA and Arg-1 protein were lower, especially the expression of *CCR2* mRNA ($P < 0.05$). Compared with the LPS group or the corresponding lead group, the mRNA and protein expression levels of *iNOS* and the *CCR7* mRNA expression levels of the medium lead+LPS group and the high lead+LPS group were increased, while the expression levels of *Arg-1* mRNA were decreased. In addition, the *TREM2* mRNA (0.20 ± 0.03 , 0.04 ± 0.01) and protein (0.32 ± 0.02 , 0.21 ± 0.02) expression levels in the cortex of the medium lead+LPS and the high lead+LPS groups were lower than those of the LPS group or the corresponding lead group, while the expression level of *miR-34a* was increased ($P < 0.05$).

[Conclusion] Combined exposure to lead and LPS aggravates neuroinflammatory injury and increases M1 polarization of microglia, which may be related to the increased expression of TREM2 up-regulated by *miR-34a*.

Keywords: lead; LPS; neuroinflammation; microglia polarization; TREM2; *miR-34a*

中国是世界铅生产和消费大国, 长期慢性铅暴露可导致神经炎症, 脑组织中促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等表达升高, 引起学习记忆等能力缺陷或下降^[1-2]。此外, 日常生活中革兰氏阴性菌感染比较广泛, 如食物污染、水源污染等。革兰氏阴性菌感染导致的疾病与其释放的内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 密切相关。研究显示脂多糖也可引起神经炎症^[3-4], 然而, 环境中铅和 LPS 共同暴露是否可以导致神经炎症加剧还未见报道。

神经炎症的重要标志之一是小胶质细胞过度活化。小胶质细胞是中枢神经系统中固有免疫细胞, 参与大脑发育、神经环境维持、损伤反应和修复。研究显示小胶质细胞具有两种明显不同的极化方式: 一是经典激活途径, 即 M1 表型, 释放 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等, 促进诱导型一氧化氮合酶 (induced nitric oxide synthase, iNOS)、NADPH 氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, NOX2)、趋化因子受体 7 (chemokine receptor 7, CCR7) 等高表达, 加重炎症反应, 破坏血脑屏障, 促进神经元死亡; 二是替代激活途径, 即 M2 表型, 释放转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 等, 并高表达精氨酸-1 (arginase 1, Arg-1)、趋化因子受体 2 (chemokine receptor 2, CCR2) 等, 抑制炎症反应、促进神经修复、保护神经元^[5-6]。小胶质细胞活化过程中, 髓样细胞触发受体 2 (triggering receptor expressed

on myeloid cells 2, TREM2) 可参与其过程且主要在小胶质细胞膜上特异表达^[7], 可通过促进小胶质细胞向 M2 表型转化, 从而维持脑环境稳定, 参与阿兹海默症、帕金森病等神经退行性病变^[8-9]。TREM2 的表达变化可受微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 的调控, 有研究显示, 微小 RNA-34a (microRNA-34a, miR-34a) 靶向 *TREM2* mRNA 3' 非翻译区, 并显著下调小胶质细胞中 TREM2 的表达^[10]。然而, miR-34a 在铅和 LPS 联合暴露小鼠皮质中的变化未见报道。

本研究通过建立铅和 LPS 联合暴露小鼠模型, 探讨铅和 LPS 联合暴露后皮质中炎症因子和小胶质细胞 M1、M2 标志物及 TREM2 和 *miR-34a* 表达的变化, 以期为铅和 LPS 联合暴露导致的神经损伤防治提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 实验动物分组及处理

SPF 级雄性 C57 小鼠 64 只, 适应性喂养 1 周后将小鼠随机均分为对照组、LPS 组、低铅组、中铅组、高铅组、低铅+LPS 组、中铅+LPS 组和高铅+LPS 组, 每组 8 只。铅染毒剂量为: 0.25、0.50、1.00 g·L⁻¹ 乙酸铅饮水, 共 9 周, 对照组给予等量的双蒸水。LPS 处理方式: 在铅染毒结束前一周, 每天腹腔注射一次 LPS (250 g·kg⁻¹, 以体重计), 共 7 次, 末次注射 24 h 后处死动物。小鼠麻醉处死, 迅速分离脑组织, 并在冰上分离出皮质, -80℃ 保存备用。本研究已获华北理工大学实验动物伦理委员会批准 (审批号: LAEC-NCST-2020082)。

1.2 ELISA 法检测小鼠皮质组织中炎症因子

采用 ELISA 试剂盒 (Solarbio, 中国), 检测皮质组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平, 具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。最低检出限为 31.25 ng·L⁻¹。

1.3 实时荧光定量 PCR 法检测 M1、M2 型标志物 *TREM2* mRNA、*miR-34a* 的表达水平

取小鼠皮质 30 mg, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR 分析。*miR-34a* 购买于广州锐博生物科技有限公司。内参基因为 *U6*、 *β -actin*, 引物由上海生工生物技术服务有限公司合成, 各引物序列见表 1。扩增反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预热 60 s, 然后按 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s 进行 50 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 1 目的基因引物序列
Table 1 Primer sequences of target genes

基因	引物序列 (5'-3')
<i>iNOS</i>	正向: CTCAGCACAGAGGGCTCAA 反向: AAAGTGGTAGCCACATCCCG
<i>NOX2</i>	正向: CGTGGACAGACTTCGGACAG 反向: CCTTCTGCTGAGATCGCCAA
<i>CCR7</i>	正向: GGAAGCCACGAAAAACGTG 反向: CTCGCCGATGTAGTCGCTCTG
<i>Arg-1</i>	正向: GGTGGAGACCACAGTATGGC 反向: GCAAGCCGATGTACACGATG
<i>TGF-β</i>	正向: CTGGAAAGGGCTCAACACCT 反向: AGAAGTTGGCATGGTAGCC
<i>CCR2</i>	正向: ATTGGAGCTTGGATCCTGCC 反向: AGATGGCCAGGTTGAACAGG
<i>TREM2</i>	正向: TAGTCTGGCTGTGGTTGC 反向: AGGGGTCCCTGTGTGAGAT
<i>β-actin</i>	正向: GTGGATCAGCAAGCAGGAGT 反向: CGCAGCTCAGTAACAGTCCG
<i>miR-34a</i>	正向: CCTCACGGTCCAGTTTCC 反向: CCATGACCTCAAGAACAGTATTTCC
<i>U6</i>	正向: GCTCGCTTCGGCAGCAC 反向: GAGGTATTTCGACCAGAGGA

1.4 Western blotting 法检测 *TREM2*、*iNOS* 和 *Arg-1* 蛋白表达

将皮质组织充分裂解并研磨, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r·min⁻¹ 离心 (离心半径为 4 cm) 15 min 后取上清液, 取 2 μ L 样品放入 96 孔板, 加入 18 μ L 的 PBS 稀释, 最终体积为 20 μ L, 将 200 μ L BCA 工作液 (BCA 试剂: Cu 体积比 = 50 : 1, 提前配制, 室温稳定 2 h) 分别加入标准品和样品孔中, 使其充分混匀后于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育 30 min。冷却至室温后用酶标仪在波长为 592 nm 处检测各孔的光密度 (*D*) 值, 将 96 孔板放进酶标仪, 摇板 5 s。根据各孔 *D* 值绘制标准曲线, 在标准曲线中计算各组样品蛋白浓度。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白 (分离胶和浓缩胶体积分数分别为 10.00% 和 5.00%), 转膜后进行封闭, 洗膜, 加入 *TREM2*、*Arg-1* 和 *iNOS* 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜, 加二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 显影。内参蛋白为 *β -actin*。

1.5 统计学分析

所有数据采用均数 \pm 标准差表示。采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析, LPS 组、低铅组、中铅组和高铅组与对照组比较, 低铅 + LPS 组、中铅 + LPS 组和高铅 + LPS 组与相应剂量的铅暴露组比较采用 LSD-*t* 检验。采用析因分析法探讨铅与 LPS 之间的关系。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达

与对照组相比, LPS 组、中铅组和高铅组皮质中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达均升高, 低铅组 TNF- α 、IL-1 β 表达升高 ($P < 0.05$)。与 LPS 组相比, 中铅 + LPS 组和高铅 + LPS 组小鼠皮质中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达增加 ($P < 0.05$)。分别与低铅组、中铅组和高铅组相比, 低铅 + LPS 组、中铅 + LPS 组、高铅 + LPS 组的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达均升高。结果见表 2。析因分析研究结果显示, 低铅、中铅、高铅与 LPS 在 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子中均不存在交互作用 ($P > 0.05$)。

表 2 铅和 LPS 暴露对皮质中炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of lead and LPS exposures on inflammatory cytokines in the cortex of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)
单位 (Unit): ng·g⁻¹

组别	IL-1 β	TNF- α	IL-6
对照组	2.04 \pm 0.20	2.41 \pm 0.32	1.88 \pm 0.09
LPS 组	7.76 \pm 0.88 ^a	6.50 \pm 0.79 ^a	6.28 \pm 0.71 ^a
低铅组	2.80 \pm 0.53 ^a	3.15 \pm 0.43 ^a	2.11 \pm 0.22
中铅组	3.99 \pm 0.63 ^a	4.34 \pm 0.66 ^a	3.32 \pm 0.12 ^a
高铅组	5.65 \pm 0.54 ^a	5.98 \pm 0.75 ^a	4.97 \pm 0.59 ^a
低铅 + LPS 组	7.83 \pm 0.93 ^c	7.21 \pm 1.18 ^c	6.72 \pm 1.24 ^c
中铅 + LPS 组	8.80 \pm 0.95 ^{bd}	7.82 \pm 0.60 ^{bd}	7.53 \pm 0.90 ^{bd}
高铅 + LPS 组	11.18 \pm 0.92 ^{be}	8.79 \pm 1.62 ^{be}	8.66 \pm 0.93 ^{be}

[注] a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 LPS 组比较, $P < 0.05$; c: 与低铅组比较, $P < 0.05$; d: 与中铅组比较, $P < 0.05$; e: 与高铅组比较, $P < 0.05$ 。中铅组的 IL-1 β 有 2 个异常值故剔除。

2.2 *iNOS*、*NOX2*、*CCR7* mRNA 变化

与对照组相比, LPS 组、中铅组和高铅组小鼠皮质中 *iNOS*、*NOX2*、*CCR7* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), 低铅组中 *NOX2* mRNA 表达也增加 ($P < 0.05$)。与 LPS 组相比, 中铅 + LPS 组和高铅 + LPS 组 *iNOS*、*NOX2*、*CCR7* mRNA 表达增加。与低铅组相比, 低铅 + LPS 组中 *iNOS*、*NOX2* mRNA 表达未见明显升高。与中铅组相比, 中铅 + LPS 组 *iNOS*、*CCR7* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), *NOX2* 未见明显变化。与高铅组相比, 高铅 + LPS 组 *iNOS*、*NOX2*、*CCR7* mRNA 表达均增加。结果见图 1。

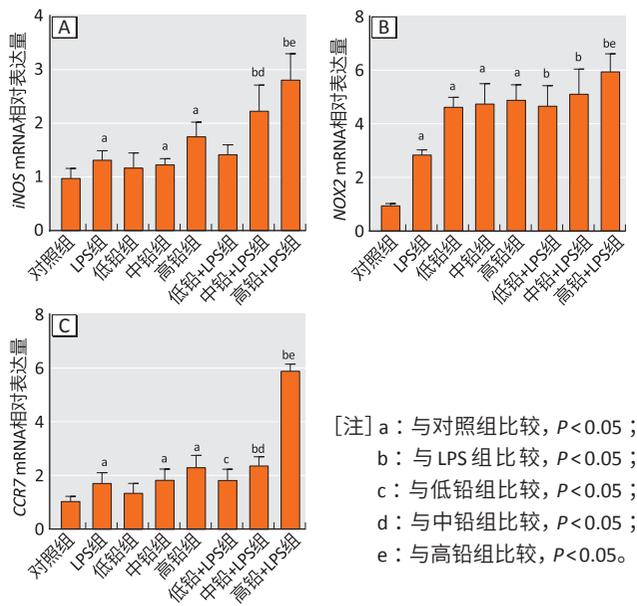


图1 各组小鼠皮质中M1标志物*iNOS* (A)、*NOX2* (B)、*CCR7* (C) mRNA表达情况 ($n=6$)

Figure 1 Expressions of M1 markers *iNOS* (A), *NOX2* (B), and *CCR7* (C) mRNA in the cortex of mice ($n=6$)

2.3 *Arg-1*、*TGF-β*、*CCR2* mRNA变化

与对照组相比,低铅组*Arg-1* mRNA表达未见明显变化,LPS组、中铅组和高铅组*Arg-1*、*TGF-β*、*CCR2* mRNA表达降低 ($P < 0.05$)。与LPS组相比,中铅+LPS组和高铅+LPS组中*Arg-1* mRNA表达明显减少。与铅暴露组相比,铅和LPS联合暴露组中*Arg-1* mRNA表达降低最为明显,未见*TGF-β*、*CCR2* mRNA表达有明显差异。结果见图2。

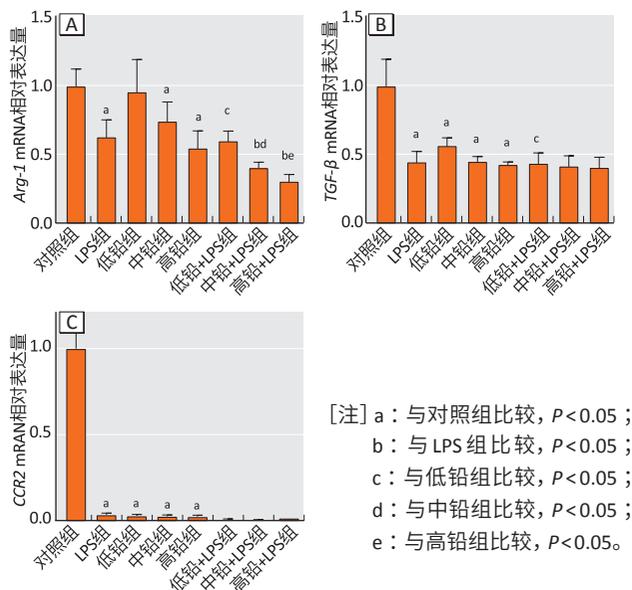


图2 各组小鼠皮质中M2标志物*Arg-1* (A)、*TGF-β* (B)和*CCR2* (C) mRNA表达情况 ($n=6$)

Figure 2 Expressions of M2 markers *Arg-1* (A), *TGF-β* (B), and *CCR2* (C) mRNA in the cortex of mice ($n=6$)

2.4 *iNOS*和*Arg-1*蛋白变化

与对照组相比,铅暴露组*iNOS*蛋白表达量升高;与LPS组、同剂量铅暴露组相比,LPS和铅联合暴露组中*iNOS*蛋白表达量升高。与对照组相比,LPS组和铅暴露组*Arg-1*蛋白表达降低 ($P < 0.05$);与LPS组相比,联合暴露组*Arg-1*蛋白表达降低;与低铅组相比,低铅+LPS组*Arg-1*蛋白表达明显减少,中铅+LPS组和高铅+LPS组差异无统计学意义。结果见图3。

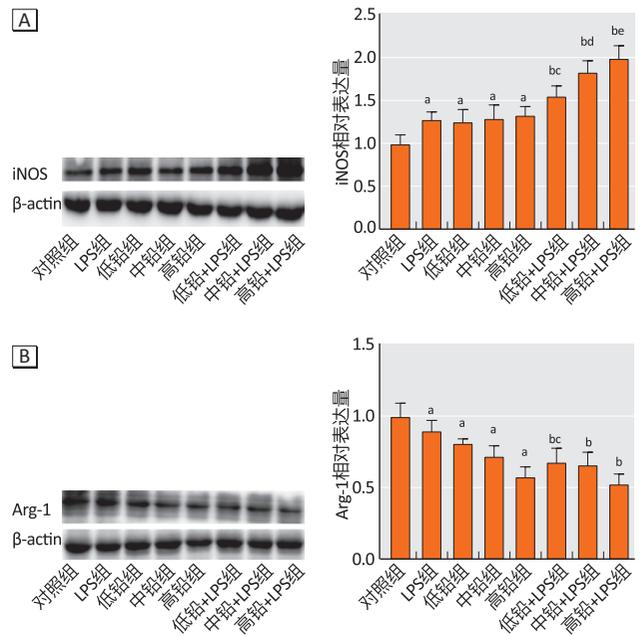


图3 各组小鼠皮质中*iNOS* (A)和*Arg-1* (B)蛋白表达 ($n=3$)

Figure 3 Expressions of *iNOS* (A) and *Arg-1* (B) protein in the cortex of mice ($n=3$)

2.5 *TREM2* mRNA和蛋白表达

与对照组相比,LPS组、低铅组、中铅组和高铅组*TREM2* mRNA和蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与LPS组相比,低铅+LPS、中铅+LPS和高铅+LPS组*TREM2* mRNA和蛋白表达降低明显。分别与低铅组、中铅组和高铅组相比,低铅+LPS、中铅+LPS、高铅+LPS组*TREM2* mRNA和蛋白表达减少 ($P < 0.05$)。结果见图4。

2.6 对皮质中*miR-34a*表达的影响

与对照组相比,LPS组、低铅组、中铅组和高铅组*miR-34a*表达升高 ($P < 0.05$)。与LPS组相比,低铅+LPS组、中铅+LPS组和高铅+LPS组*miR-34a*表达升高1.5倍多。分别与低铅组、中铅组和高铅组相比,低铅+LPS组、中铅+LPS组和高铅+LPS组*miR-34a*表达增加。结果见图5。

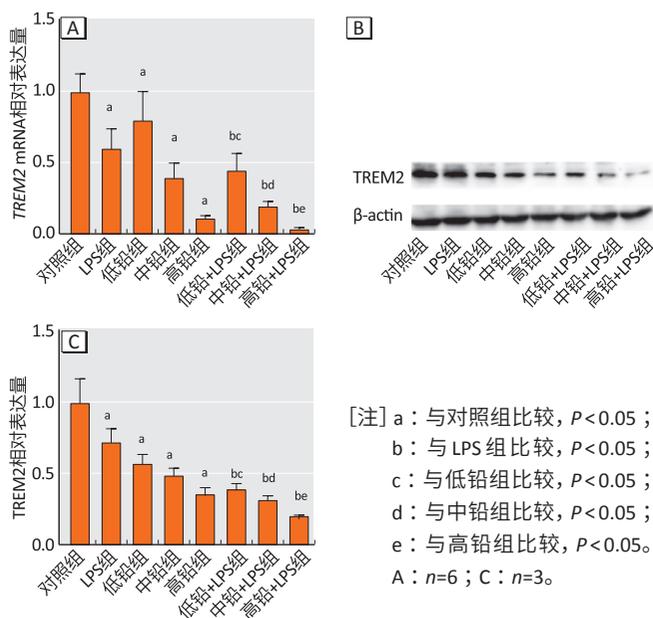
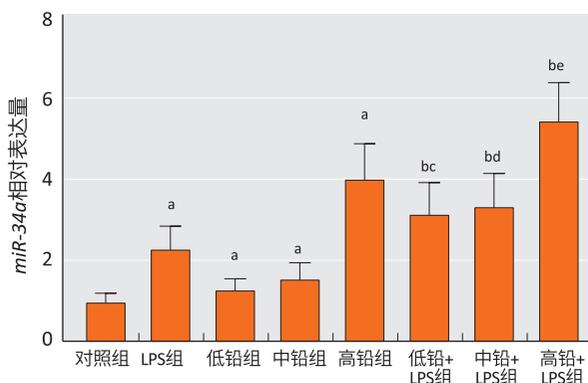


图4 各组小鼠皮质中 *TREM2* mRNA (A) 和蛋白 (B、C) 表达
Figure 4 Expressions of *TREM2* mRNA (A) and protein (B and C) in the cortex of mice in each group



[注] a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与LPS组比较, $P < 0.05$; c: 与低铅组比较, $P < 0.05$; d: 与中铅组比较, $P < 0.05$; e: 与高铅组比较, $P < 0.05$.

图5 各组小鼠皮质中 *miR-34a* 表达情况 ($n=6$)

Figure 5 Expressions of *miR-34a* in the cortex of mice in each group ($n=6$)

3 讨论

中枢神经系统炎症以神经胶质细胞的异常激活和中枢系统微环境中炎症介质的存在为特征。神经炎症的特征为在脑组织中积累大量的炎症细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 IL-6 等, 这些炎症因子长期积累在大脑中可引发神经炎症级联反应, 进而加速中枢神经系统的病变过程。 $\text{TNF-}\alpha$ 在脑组织中过度积累会损伤神经元, $\text{IL-1}\beta$ 可诱导小胶质细胞的活化, 分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 等促炎因子, 进一步引发神经炎症反应, 加速脑损伤。本研究结果显示铅和LPS单独暴露后小鼠皮质中炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 IL-6 表达均升高。这与胡蒙蒙等^[11] 研究

中LPS暴露后脑组中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 表达升高的结果是一致的。本研究结果还显示铅和LPS联合暴露后皮质中炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 IL-6 表达高于单独暴露组, 提示铅和LPS联合暴露加剧了神经炎症损伤。

小胶质细胞是中枢神经炎症反应的重要招募者和执行者。在健康的大脑中, 小胶质细胞表现出“稳态”表型, 其表达表面分子和分泌可溶性因子影响其他神经细胞, 促进细胞碎片和聚集蛋白的清除, 维持中枢神经系统稳态。但外环境发生改变时或者刺激反应发生时, 小胶质细胞表型可由稳态 (M0) 型转变为 M1 或者 M2。在疾病的不同发展阶段, 小胶质细胞对外界刺激的反应在炎症、组织修复、突触可塑性及神经再生中起着不同的作用^[12]。在神经退行性病变中, 小胶质细胞呈 M1 型, 释放炎症介质, 诱导神经元丢失。M1 型小胶质细胞增加, 可促进神经退行性疾病如阿尔茨海默病、帕金森病的发生发展^[13-14]。有研究显示铅和LPS可以引起小胶质细胞活化^[2, 4], 促进小胶质细胞向 M1 型极化, 释放出大量炎症细胞因子、抗炎因子、趋化因子、生长因素等, 维持中枢神经系统的慢性炎症^[15-16], 本研究结果显示, 中剂量铅 ($0.50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和高剂量铅 ($1.00\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及LPS单独暴露后, M1 型标志基因和 *iNOS* 蛋白表达增加, 而 M2 标志基因和 *Arg-1* 蛋白表达下降; 这与 Li 等^[17] 的研究中LPS处理原代小胶质细胞后呈 M1 型, *iNOS*、 $\text{IL-1}\beta$ 等表达增加的结果一致。而铅和LPS联合暴露与单独暴露相比, M1 型小胶质细胞标志物升高, M2 型标志物明显降低, 推测铅和LPS联合暴露加剧了小胶质细胞向 M1 型转变, 进而加剧神经炎症。

小胶质细胞极化受到 *TREM2* 等关键蛋白的调控。*TREM2* 仅表达于小胶质细胞上, 且在神经退行性病变不同阶段发挥不同作用^[18]。有研究显示 *TREM2* 在 M2 型小胶质细胞上表达升高, 而在 M1 型小胶质细胞上表达降低, 且上调 *TREM2* 的表达促进小胶质细胞向 M2 型转变, 而下调 *TREM2* 促进小胶质细胞向 M1 型转变。在本研究中, LPS 和铅单独暴露后, 皮质中 *TREM2* mRNA 和蛋白表达下降; 铅和LPS联合暴露后 *TREM2* 表达更加降低。推测在铅和LPS暴露后 *TREM2* 调控小胶质细胞向 M1 极化, 而且铅和LPS联合暴露加剧了极化程度, 加速了神经炎症的发生。这与伍敏^[19] 的研究中LPS刺激后 *TREM2* 表达下降, BV-2 细胞 M1 标志物表达增加一致。*TREM2* 的表达受到非编码 RNA 的调控, 本研究中铅和LPS单独暴露可使 *miR-34a* 表达量升高, 且联合暴露后 *miR-34a* 表达明显增加, 推

测铅和LPS暴露后 *miR-34a* 增加, 从而调控TREM2的表达下降。这Bhattacharjee等^[20]的研究在老年性黄斑变性中 *miR-34a* 靶向TREM2 mRNA 3' 非编码区, 并下调小胶质细胞中TREM2的发现一致。

综上所述, 铅和LPS联合暴露后小鼠炎症损伤加剧, 小胶质细胞M1标志物表达增加, 小胶质细胞可能向M1极化, 推测其机制可能与 *miR-34a* 表达升高和TREM2表达降低有关。

参考文献

- [1] PAULIS MG, HASSAN OA, ABBASS MF, et al. Structural and lipid peroxidation effects of lead on rat hippocampus and its attenuation by hydrogen rich water [J]. J Chem Neuroanat, 2018, 91 : 55-62.
- [2] 薛玲, 李政垚, 张可欣, 等. 铅暴露对快速衰老小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (7) : 586-592.
XUE L, LI ZY, ZHANG KX, et al. Effects of lead exposure on learning and memory ability of senescence accelerated mice [J]. J Environ Occup Med, 2017, 34 (7) : 586-592.
- [3] YANG L, ZHOU RY, TONG Y, et al. Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation [J]. Neurobiol Dis, 2020, 140 : 104814.
- [4] BAO Y, ZHU YJ, HE GB, et al. Dexmedetomidine attenuates neuroinflammation in LPS-stimulated BV2 microglia cells through upregulation of miR-340 [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13 : 3465-3475.
- [5] JHA MK, LEE WH, SUK K. Functional polarization of neuroglia : Implications in neuroinflammation and neurological disorders [J]. Biochem Pharmacol, 2016, 103 : 1-16.
- [6] AJMONE-CAT MA, MANCINI M, DE SIMONE R, et al. Microglial polarization and plasticity : evidence from organotypic hippocampal slice cultures [J]. Glia, 2013, 61 (10) : 1698-1711.
- [7] HICKMAN SE, KINGERY ND, OHSUMI TK, et al. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing [J]. Nat Neurosci, 2013, 16 (12) : 1896-1905.
- [8] ZHANG YW, FENG SJ, NIE K, et al. TREM2 modulates microglia phenotypes in the neuroinflammation of Parkinson's disease [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 499 (4) : 797-802.
- [9] REN MR, GUO Y, WEI XB, et al. TREM2 overexpression attenuates neuroinflammation and protects dopaminergic neurons in experimental models of Parkinson's disease [J]. Exp Neurol, 2018, 302 : 205-213.
- [10] BHATTACHARJEE S, ZHAO Y, DUA P, et al. microRNA-34a-mediated down-regulation of the microglial-enriched triggering receptor and phagocytosis-sensor TREM2 in age-related macular degeneration [J]. PLoS One, 2016, 11 (3) : e0150211.
- [11] 胡蒙蒙, 刘起发, 臧小豪, 等. 吴茱萸次碱抑制脂多糖诱导的BV2小胶质细胞炎症反应并改善神经炎症模型小鼠学习记忆功能损伤 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (3) : 110-115, 267-268.
HU MM, LIU QF, ZANG XH, et al. Rutaecarpine inhibits LPS-induced inflammation of microglia BV2 cells and improves learning and memory impairment in neuroinflammatory mice [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39 (3) : 110-115, 267-268.
- [12] GOMES-LEAL W. Why microglia kill neurons after neural disorders? The friendly fire hypothesis [J]. Neural Regen Res, 2019, 14 (9) : 1499-1502.
- [13] LEE E, HWANG I, PARK S, et al. MPTP-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia plays a central role in dopaminergic neurodegeneration [J]. Cell Death Differ, 2019, 26 (2) : 213-228.
- [14] XU Y, JIN MZ, YANG ZY, et al. Microglia in neurodegenerative diseases [J]. Neural Regen Res, 2021, 16 (2) : 270-280.
- [15] TANG Y, LE WD. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53 (2) : 1181-1194.
- [16] KOH YC, YANG GL, LAI CS, et al. Chemopreventive effects of phytochemicals and medicines on M1/M2 polarized macrophage role in inflammation-related diseases [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (8) : 2208.
- [17] LI B, DASGUPTA C, HUANG L, et al. MiRNA-210 induces microglial activation and regulates microglia-mediated neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17 (9) : 976-991.
- [18] 翟茜. TREM2 调控小胶质细胞功能活化状态参与脑保护作用机制的研究 [D]. 陕西 : 第四军医大学, 2015.
ZHAO Q. TREM2, A new target for regulating microglia activation state, involved in neuroprotective effect by relieving neuroinflammation [D]. Shaanxi : Fourth Military Medical University, 2015.
- [19] 伍敏. 小胶质细胞 TREM2 在糖尿病小鼠认知障碍中的作用及机制研究 [D]. 重庆 : 重庆医科大学, 2020.
WU M. The role of microglial TREM2 in diabetic cognitive impairment mice and related mechanism [D]. ChongQing : ChongQing Medical University, 2020.
- [20] BHATTACHARJEE S, ZHAO YH, DUA P, et al. microRNA-34a-mediated down-regulation of the microglial-enriched triggering receptor and phagocytosis-sensor TREM2 in age-related macular degeneration [J]. PLoS One, 2016, 11 (3) : e0150211.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣)