

醋酸铅暴露致小胶质细胞系 BV-2 细胞铁死亡的机制研究

赵宇威^a, 王伟轩^a, 师凡^a, 付治嘉^b, 吴桐^b, 张艳淑^{a,c}

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



DOI 10.11836/JEOM21531

摘要:

[背景] 铅暴露可诱导小胶质细胞死亡, 但是机制尚不清楚。铁死亡是新发现的一种细胞死亡方式, 在铅暴露导致的小胶质细胞死亡中的作用还未见报道。

[目的] 探讨铁死亡在铅暴露致小胶质细胞死亡中的作用, 以期对铅的神经毒性机制研究提供理论依据。

[方法] 小胶质细胞系 BV-2 细胞与 0、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅共同培养 24 h, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组中加入铁螯合剂 (DFO), 即为 40+DFO 组; 用倒置显微镜观察铅暴露后 BV-2 细胞形态的变化; 组织铁试剂盒、谷胱甘肽试剂盒分别检测细胞内铁、谷胱甘肽 (GSH); 流式细胞术检测脂质活性氧 (ROS) 荧光强度。Western Blotting、qPCR 检测谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、转铁蛋白受体 1 (TFR-1)、二价金属转运蛋白 1 (DMT1)、膜铁转运蛋白 1 (FPN1) 蛋白及 mRNA 的表达。

[结果] 与对照组比较, 随着铅染毒剂量的增加, BV-2 细胞数量减少, 且形态呈大而圆的阿米巴状; 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组 BV-2 细胞内铁的水平分别为 (1.08 ± 0.04) 、 (1.29 ± 0.03) 、 (1.72 ± 0.10) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (以蛋白计, 后同), 均高于对照组 ($P<0.05$), 且 40+DFO 组细胞内铁水平为 (1.34 ± 0.10) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 低于 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组的 (1.72 ± 0.03) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ($P<0.05$); 与对照组比较, 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组的 BV-2 细胞中 TFR-1、DMT1 蛋白和 mRNA 表达均增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 且 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组尤为显著; FPN1 蛋白表达无明显变化, 但 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组 BV-2 细胞中 FPN1 mRNA 的表达均明显下降 ($P<0.05$)。与对照组比较, 三个铅染毒组 BV-2 细胞内 GSH 水平均下降, 脂质 ROS 水平升高; 相比于 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组, 40+DFO 组中 GSH 升高了 12.30%, 脂质 ROS 含量下降了 13.00% ($P<0.05$)。10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组中 GPX4 蛋白表达分别降低为对照组的 50.00%、35.00%、17.00%, 同时 GPX4 mRNA 表达也下降; 20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组中 SLC7 A11 蛋白和 mRNA 表达均低于对照组, 其中, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组下降最为明显 ($P<0.05$)。

[结论] 铅暴露诱导 BV-2 细胞发生铁死亡, 铁转运失衡及氧化损伤可能参与了铅诱导 BV-2 细胞铁死亡的发生发展。

关键词: 铅; BV-2 细胞; 铁死亡; 氧化损伤; 铁转运

Mechanisms of ferroptosis in microglial cell line BV-2 cells after lead acetate exposure ZHAO Yuwei^a, WANG Weixuan^a, SHI Fan^a, FU Zhijia^b, WU Tong^b, ZHANG Yanshu^{a,c} (a. School of Public Health b. School of Medical Sciences c. Laboratory Animal Center, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

Abstract:

[Background] Lead exposure induces microglial cell death, of which the mechanism is unclear. Ferroptosis is a new death form and its role in microglia death has not been reported.

[Objective] To investigate the role of ferroptosis in microglia following lead exposure in order to provide a theoretical basis for the mechanism of lead neurotoxicity.

[Methods] Microglial cell line BV-2 cells were co-cultured with 0, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lead acetate for 24 h. The 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lead acetate group with iron chelator (DFO) was named the 40+DFO group. Changes in BV-2 cell morphology after lead exposure were observed under an inverted microscope; tissue iron kit and glutathione kit were used to detect intracellular iron and glutathione (GSH) respectively; flow cytometry was applied to detect lipid reactive oxygen species (lipid ROS) immunofluorescence intensity. Western blotting and qPCR were adopted to detect

基金项目

河北省自然科学基金(H2020209250); 河北省教育厅课题(ZD2020113, QN2021121); 国家自然科学基金(82073598); 河北省研究生创新资助项目(CXZZBS2022111)

作者简介

赵宇威(1997—), 女, 硕士生;

E-mail: yuweizhao@stu.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

2021-11-07

录用日期

2022-06-16

文章编号 2095-9982(2022)08-0895-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

赵宇威, 王伟轩, 师凡, 等. 醋酸铅暴露致小胶质细胞系 BV-2 细胞铁死亡的机制研究[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(8): 895-901.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21531

Funding

This study was funded.

Correspondence to

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

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2021-11-07

Accepted

2022-06-16

To cite

ZHAO Yuwei, WANG Weixuan, SHI Fan, et al. Mechanisms of ferroptosis in microglial cell line BV-2 cells after lead acetate exposure[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(8): 895-901.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21531

the expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), transferrin receptor 1 (TFR-1), divalent metal transporter 1 (DMT1), ferroportin 1 (FPN1) protein and mRNA.

[Results] Compared with the control group, the number of BV-2 cells decreased with increasing doses of lead and the cells showed a large, round amoeboid shape. The intracellular levels of iron of BV-2 cells were (1.08 ± 0.04) , (1.29 ± 0.03) , and (1.72 ± 0.10) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (calculated by protein, thereafter) in the 10, 20, and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate groups, respectively, significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the intracellular level of iron in the 40+DFO group, (1.34 ± 0.10) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, was lower than that in the 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate group, (1.72 ± 0.03) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$). Compared with the control group, the TFR-1 and DMT1 protein and mRNA expressions were increased in BV-2 cells in the 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate groups ($P < 0.05$), especially in the 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate group; the FPN1 protein expression did not change significantly, but the FPN1 mRNA expressions in BV-2 cells in the 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the intracellular GSH level decreased and the lipid ROS content increased in all three lead acetate groups; compared with the 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate group, the GSH level increased by 12.30% and the lipid ROS content decreased by 13.00% in the 40+DFO group ($P < 0.05$). The expressions of GPX4 protein were reduced to 50.00%, 35.00%, and 17.00% of that of the control group in the 10, 20, and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate groups respectively, while the expressions of GPX4 mRNA were also significantly reduced; the expressions of SLC7A11 protein and mRNA in the 20 and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate groups were lower than that in the control group, with the most significant decrease in the 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lead acetate group ($P < 0.05$).

[Conclusion] Lead exposure could induce ferroptosis in BV-2 cells, in which iron transport imbalance and oxidative damage might be involved.

Keywords: lead; BV-2 cells; ferroptosis; oxidative damage; iron transport

长期低剂量的铅暴露与神经退行性疾病如阿尔兹海默病、帕金森病进程密切相关^[1-2]。研究显示铅暴露可导致小胶质细胞活化,引起神经炎症。小胶质细胞是中枢神经系统的免疫细胞,具有吞噬清除细胞碎片、调节神经元代谢,并维持神经系统稳定的功能,在神经退行性病变中发挥着重要的作用^[3]。小胶质细胞静息状态下为分枝状,呈现梭形或椭圆形,当其受到外界刺激时会迅速被激活,胞体变大,呈现阿米巴样,并具有吞噬功能。在小胶质细胞活化中,自噬、凋亡和程序性坏死均发挥了重要作用^[3-5],但是机制尚不明确。铁是人体丰富的微量元素之一,参与大脑许多代谢过程,而铁的沉积也可能是引起大脑神经退行性疾病的原因之一^[6]。铅是否通过铁沉积导致小胶质细胞铁死亡进而参与了铅神经毒性还未见报道。

铁死亡是一种铁依赖性和脂质过氧化的非凋亡细胞死亡形式^[6-7],并且能被铁抑制剂和铁螯合剂去铁胺(deferoxamine, DFO)抑制^[8]。此外,胱氨酸/谷氨酸反向转运体 System Xc- (由 SLC7A11 和 SLC3A2 组成),也在铁死亡中发挥重要作用,它可将胱氨酸转至胞内,用以合成谷胱甘肽(glutathione, GSH),当 SLC7A11 被抑制, GSH 耗竭,触发谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)失活,导致脂质过氧化,并使脂质活性氧(ROS)积累,导致铁死亡的发生。细胞内铁含量的平衡由转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, TFR-1)、二价金属转运体(divalent metal transporter 1, DMT1)^[9-10]和膜铁转运蛋白(ferroportin 1, FPN1)^[11]调控,但铅暴露是否影响 SLC7A11、GPX4 和铁转运蛋白的表达鲜有报道。

本研究应用铅染毒小胶质细胞系 BV-2 细胞建立细胞模型,探讨铅暴露后 BV-2 细胞的铁死亡状况及其作用机制,以期为铅神经毒性的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

组织铁测试盒、GSH 试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国), C11BODIPY581/591 脂质过氧化荧光探针(上海懋物生物科技有限公司,中国), 高糖 DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco, 美国), DFO(Med-ChemExpress, 美国)。

1.2 BV-2 细胞培养与染毒

将 BV-2 细胞接种于 90%DMEM 培养基和 10%胎牛血清配成的完全培养基,于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,当细胞增长至 80%~90%时,进行细胞传代。

将 0、10、20、30、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅染毒 BV-2 细胞 24 h, CCK8 检测细胞活性,筛选染毒剂量;随后将 BV-2 细胞分为:(1)醋酸铅染毒组(0、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅);(2)抑制剂组(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DFO^[12]、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅+DFO)。将醋酸铅及 DFO 处理细胞 24 h,收集细胞进行后续实验。

1.3 CCK8 法检测细胞活性

BV-2 细胞染毒结束后,每孔加入 10%的 CCK8 溶剂 100 μL ,孵育 1~4 h,在 450 nm 处测定光密度(D)值。细胞存活率 = $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.4 细胞内铁水平的检测

采用比色法,收集染毒后细胞,加入 PBS 制备成细胞悬液,超声破碎后,2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 4 cm)

离心 10 min, 按照说明书测定上清液中铁水平, 在波长 520 nm 处测定各孔的光密度值(D), 剩余上清根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白浓度测定, 再根据以下公式计算。细胞内铁水平 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 以蛋白计)= $(D_{\text{测定组}}-D_{\text{空白组}})/(D_{\text{标准组}}-D_{\text{空白组}})\times\text{标准品浓度}(2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1})/\text{待测样本蛋白浓度}(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ 。

1.5 细胞内 GSH 质量浓度的检测

采用比色法, 收集染毒后细胞, 加入 PBS 制备成细胞悬液, 超声破碎后, $2500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径 4 cm) 离心 10 min, 取上清按照 GSH 试剂盒说明书进行测定, 在波长 420 nm 处测定各孔的光密度值(D), 根据以下公式计算 GSH 质量浓度。 $\text{GSH}(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})=(D_{\text{测定组}}-D_{\text{空白组}})/(D_{\text{标准组}}-D_{\text{空白组}})\times\text{标准品浓度}(20\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})\times\text{GSH 相对分子质量}(307)\times\text{样品测定前稀释倍数}(10)$ 。

1.6 脂质 ROS 含量检测

将细胞用 $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C11-BODIPY 荧光探针染料, 孵育 20 min, 收集细胞, 用 $1\times\text{PBS}$ 洗涤 2 次, 重悬于 $500\text{ }\mu\text{L}$ 的 PBS 中。C11-BODIPY 的多不饱和丁二烯部分被氧化导致其最大发射荧光从 $\sim 590\text{ nm}$ 迁移到 $\sim 510\text{ nm}$, 通过流式细胞仪来分析。

1.7 SLC7A11、GPX4、FPN1、TFR-1、DMT1 蛋白检测

Western blotting 法检测。醋酸铅染毒 BV-2 细胞后, 收集细胞, 裂解液充分裂解, $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径 4 cm) 离心 10 min, 提取上清液作为样品, 采用 BCA 试剂盒进行细胞蛋白定量, 计算得出最终总蛋白含量。按照 SDS-PAGE 凝胶制备说明书配置 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 进行电泳, 然后转膜、封闭, 加入一抗孵育, 同时以 β -actin 作为内参, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗膜 3 次, 加入二抗 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 洗膜 3 次, 显影。

1.8 SLC7A11、GPX4、FPN1、TFR-1、DMT1 mRNA 相对表达量测定

实时荧光定量 PCR 方法检测。醋酸铅染毒 BV-2 细胞 24 h 后, 收集细胞, Trizol 法提取细胞的总 RNA, 反转录为 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR。根据试剂盒说明书制备反应体系, 样品设置 6 个复孔, 内参基因为 β -actin, 各基因引物序列见表 1。扩增反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 60 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s 进行 40 个循环, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.9 统计学分析

所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差表示, 应用 SPSS 23.0 进行统计分析。实验研究为成组设计, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步的两两比较采用 LSD 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, 双侧检验。

表 1 目的基因特异性引物序列

Table 1 Target gene specific primer sequences

引物名称	引物序列(5'→3')	
	正向	反向
GPX4	GTACTGCAACAGCTCCGAGT	GTGACGATGCACAGAAACC
SLC7A11	AGCTGGCAGTAGGTGTCAGT	TCTCTCACCTCACCTCTAA
FPN1	CCATGCCAGCAAAGATGGT	TACACAGCTGACTGCCTCT
TFR-1	TGGTCAGCACTTGCAACTTAG	CACAACCTCACTGCACTTAGGA
DMT1	CTGTAGCATTAGGCAGCACCTT	AGCCATCCTGGTCTACAGAGTA
β -actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG

2 结果

2.1 铅暴露对 BV-2 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 用 0、10、20、30、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅染毒细胞 24 h 后, BV-2 细胞存活率依次下降。其中 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅染毒后细胞存活率分别为 93%、81%、76%, 细胞存活率均高于 75%, 因此选择醋酸铅浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 用于后续实验。

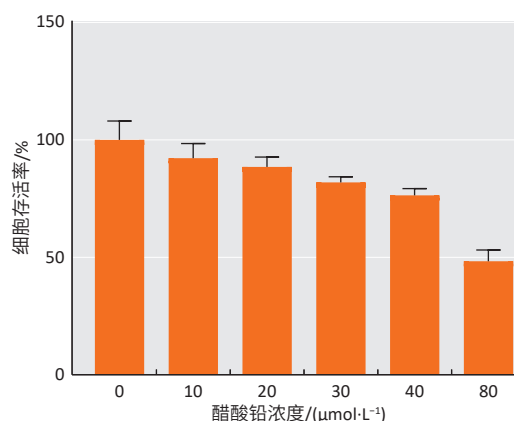


图 1 铅染毒 BV-2 细胞 24 h 的存活率 ($n=8$)

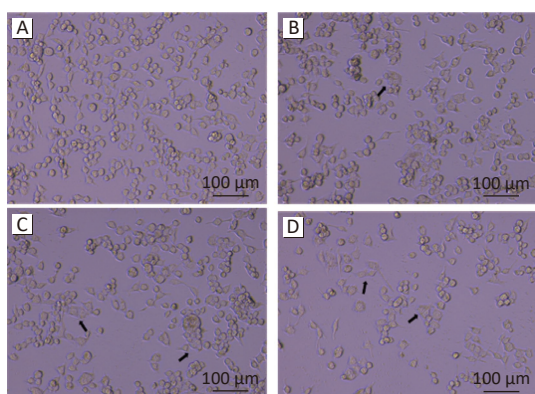
Figure 1 Viability of lead-exposed BV-2 cells for 24 h ($n=8$)

2.2 铅暴露对 BV-2 细胞数量及形态的影响

如图 2 黑色箭头所示, 三个铅染毒组 BV-2 细胞与对照组比较, 细胞胞体变大变圆, 呈现阿米巴状。在 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组中, BV-2 细胞数量依次减少。

2.3 铅暴露对 BV-2 细胞中铁水平的影响

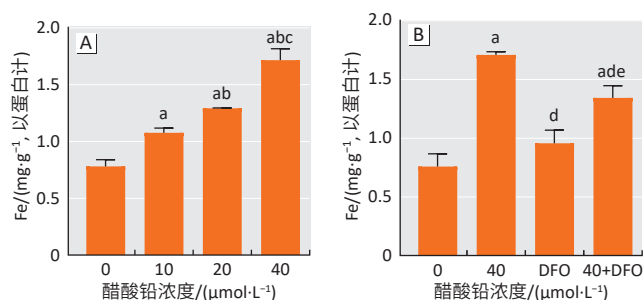
与对照组比较, 三个铅染毒组中细胞内铁水平明显升高, 且差异有统计学意义 ($F=122.00, P<0.001$), 其中 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组细胞内铁的水平为对照组的 2.2 倍。铁螯合剂 (DFO) 可以与铁形成稳定的络合物, 在 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅染毒 BV-2 细胞同时加入 DFO, 可见其细胞内铁水平显著低于 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组 ($F=59.89, P<0.01$)。见图 3。



[注] A: 对照组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); B: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组; C: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组; D: $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组。黑色箭头表示细胞胞体变大变圆, 呈现阿米巴状。

图 2 不同浓度醋酸铅染毒 BV-2 细胞 24 h 后的形态学变化

Figure 2 Morphological changes of BV-2 cells exposed to lead acetate at designed concentrations for 24 h



[注] a: 与对照组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, $P<0.01$; b: 与 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P<0.01$; c: 与 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P<0.01$; d: 与 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P<0.01$; e: 与 DFO 组比较, $P<0.05$ 。

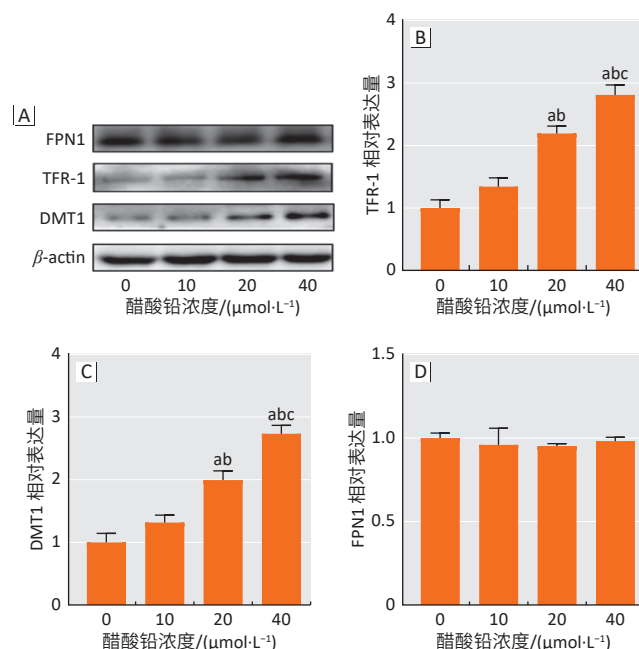
图 3 不同浓度醋酸铅 (A) 及 DFO (B) 对 BV-2 细胞内铁水平的影响 ($n=3$)

Figure 3 Effects of designed concentrations of lead acetate (A) and DFO (B) on Fe in BV-2 cells ($n=3$)

2.4 铅暴露对 BV-2 细胞铁转运相关蛋白及 mRNA 表达的影响

图 4 为 TFR-1、DMT1 和 FPN1 蛋白条带及其灰度

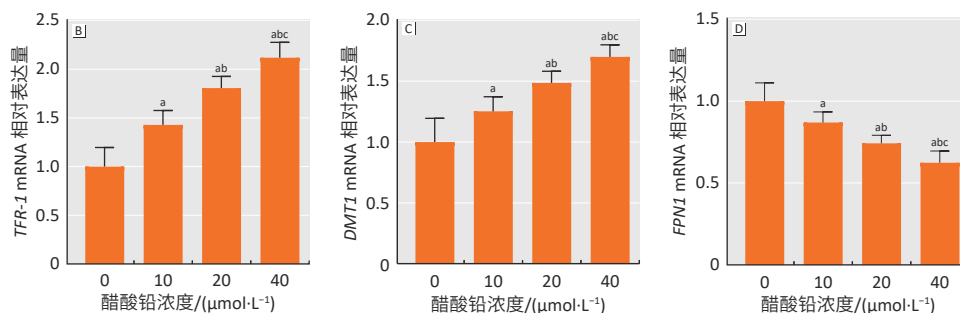
值的比较, 图中可见, 不同染毒组中 DMT1 和 TFR-1 蛋白(均 $P<0.001$)表达有差异, 与对照组比较, 20 、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组蛋白均升高($P<0.05$); 但未见铅染毒组的 FPN1 蛋白发生改变。图 5 为 TFR-1、DMT1 和 FPN1 mRNA 的相对表达量, 图中显示: 不同染毒组中 DMT1、TFR-1 和 FPN1 的 mRNA 表达均有差异(均 $P<0.001$); 随着染毒剂量升高, 各组 TFR-1、DMT1 mRNA 均逐步升高($P<0.05$), 而 FPN1 mRNA 表达逐步下降($F=25.76$, $P<0.05$)。



[注] a: 与对照组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, $P<0.05$; b: 与 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P<0.05$; c: 与 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P<0.05$ 。

图 4 铅染毒 BV-2 细胞 24 h 后铁转运相关蛋白 TFR-1、DMT1、FPN1 蛋白条带 (A) 及其灰度值 (B、C、D) ($n=3$)

Figure 4 Protein bands (A) and gray values (B, C, and D) of iron transport-related proteins TFR-1, DMT1, and FPN1 in BV-2 cells after 24 h of lead exposure ($n=3$)



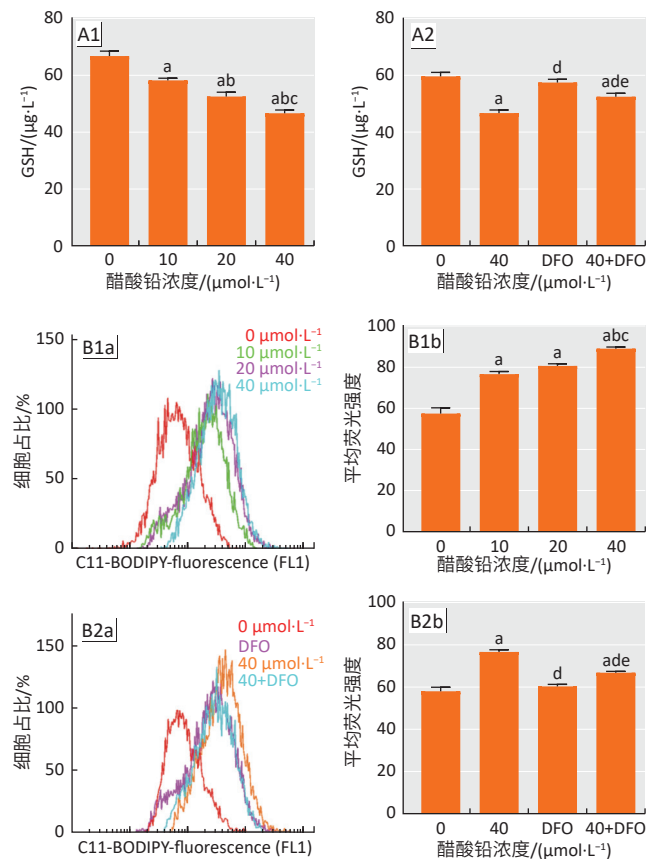
[注] a: 与对照组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, $P<0.05$; b: 与 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P<0.05$; c: 与 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P<0.05$ 。

图 5 铅染毒 BV-2 细胞 24 h 后铁转运相关蛋白 TFR-1、DMT1、FPN1 mRNA (B、C、D) 的表达 ($n=6$)

Figure 5 Expressions of iron transport-related proteins TFR-1, DMT1, and FPN1 mRNA (B, C, and D) in BV-2 cells after 24 h of lead exposure ($n=6$)

2.5 铅暴露对 BV-2 细胞铁死亡相关氧化损伤的影响

图 6A1、A2 显示：与对照组比较，三个铅染毒组细胞内 GSH 均下降，且 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组较其他组均有下降；40+DFO 组细胞中 GSH 比 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组升高了 12.30% (图 6A2)。此外，10、20、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组细胞内脂质 ROS 水平均增加，且差别有统计学意义；与 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组相比，40+DFO 组的脂质 ROS 水平降低了 13.00% (图 6B1、B2) ($P < 0.05$)。



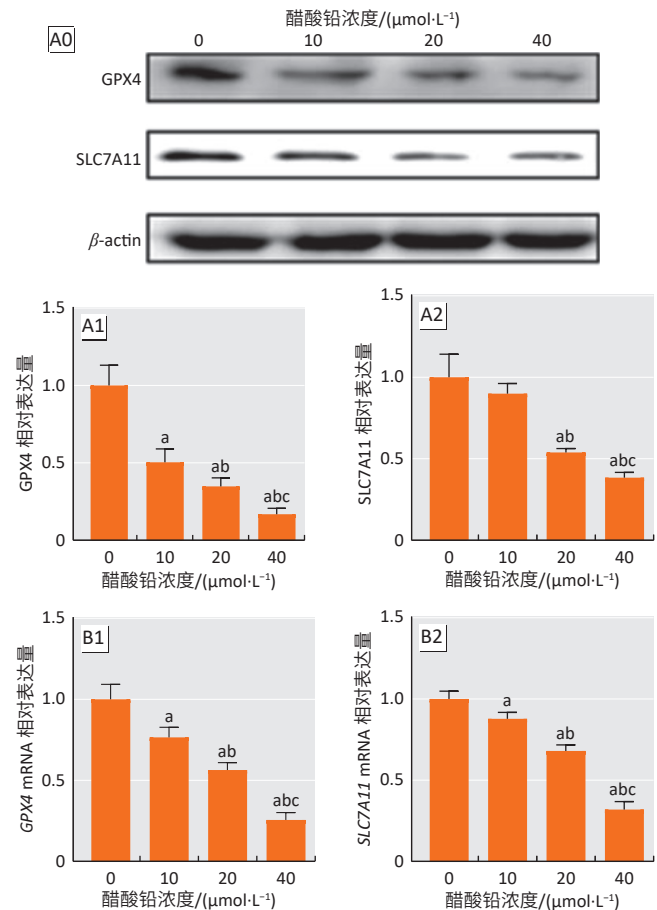
[注] A1-A2: 不同染毒组细胞内 GSH 质量浓度; B1a、B2a 和 B1b、B2b: 分别为不同染毒组细胞内 ROS 平均荧光强度的流式细胞图和相应柱状图; a: 与对照组 ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 比较, $P < 0.01$; b: 与 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P < 0.01$; c: 与 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P < 0.01$; d: 与 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P < 0.01$; e: 与 DFO 组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 铅染毒 BV-2 细胞及 DFO 对细胞内 GSH、脂质 ROS 含量的影响 ($n=3$)

Figure 6 Effects of lead acetate and DFO on intracellular GSH and lipid ROS contents in BV-2 cells ($n=3$)

此外，与对照组比较，10、20、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组细胞中 GPX4 蛋白 ($F=52.83$, $P < 0.001$) 表达均降低，依次降低为对照组的 50%、35%、17%；而 SLC7A11 蛋白只有 20、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅下降 ($F=39.84$, $P < 0.001$)， $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组差异未见统计学意义 (图 7A0、A1、A2)。从图 7B1、B2 可见，随着醋酸铅染毒浓度的升高，三个铅染毒组 GPX4、SLC7A11 mRNA 表达均逐步下降；

从相应比值看， $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组中 GPX4 mRNA 表达比 SLC7A11 下降更为明显 ($P < 0.05$)。



[注] a: 与对照组 ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 比较, $P < 0.01$; b: 与 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P < 0.01$; c: 与 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组比较, $P < 0.01$ 。

图 7 铅染毒 BV-2 细胞 24 h 后 GPX4、SCL7 A11 蛋白条带 (A0)、灰度值 (A1、A2) ($n=3$) 以及相应 mRNA (B1、B2) 表达 ($n=6$)

Figure 7 GPX4 and SCL7 A11 protein bands (A0), gray values (A1 and A2) ($n=3$) and corresponding mRNA expressions (B1 and B2) ($n=6$) in BV-2 cells exposed to lead for 24 h

3 讨论

铅是一种工业生产和生活中常见的重金属，如铅尘污染的大气，被铅污染的食物和水^[13-14]。铅暴露可造成中枢神经系统损伤，同时也参与了阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化等神经退行性疾病的进程^[15-19]。小胶质细胞在维持中枢神经系统发育和组织稳态中发挥重要作用^[20]，本研究主要探讨了铅暴露致小胶质细胞铁死亡状况及其可能的作用机制，研究结果显示铅暴露可使 BV-2 细胞胞体变大变圆，呈现阿米巴状，并且存在铁死亡现象，表现为 BV-2 细胞数量减少，细胞内铁增加，脂质 ROS 积累，GSH 水平降低，且此现象均可被 DFO 挽救。另外，铅暴露可导致铁转运

相关蛋白 TFR-1、DMT1 的表达下降,下调氧化应激相关调控蛋白 GPX4、SLC7A11 的表达。上述结果提示铅可能通过调控铁转运蛋白 TFR-1、DMT1 和氧化应激相关蛋白 GPX4、SCL7A11 的表达,进而影响细胞内 Fe^{2+} 、GSH、脂质 ROS 的含量,最终导致 BV-2 细胞发生铁死亡。

铁死亡的特征之一是细胞内铁水平的增加。 Fe^{3+} 可与细胞表面 TFR-1 形成内吞小体,被内吞小体膜上 H^+ 泵还原至 Fe^{2+} ,之后通过二价金属转运蛋白 1(DMT1) 转入细胞质;此外膜铁转运蛋白(FPN1)可调控细胞内铁的转出^[21-24]。本研究结果显示,铅暴露可导致小胶质细胞内铁的水平明显升高;但加入铁螯合剂 DFO 后,细胞内的铁明显降低,细胞存活率明显增加,表明铅暴露引起的细胞死亡与铁增加相关。Wang 等^[25] 研究显示 DFO 可缓解缺氧所诱导的细胞铁死亡,这与本研究结果相一致。此外,本研究还探讨了铅暴露后小胶质细胞中铁转运相关蛋白的变化,结果显示铅染毒后铁结合蛋白 TFR-1、铁转入蛋白 DMT1 及 mRNA 表达均增加,这可能是铅暴露后细胞内铁沉积的原因之一。本研究结果与 Chen 等^[26] 研究中关于抗氧化剂及抑制炎症损伤药物 α -硫辛酸通过调控 TFR-1 和 DMT1 进而影响 BV-2 细胞对铁的摄取,而与铁释放蛋白 FPN1 无明显关系的结果相似。

铁死亡的另一个特征即脂质过氧化物的发生。GSH 是一种小分子抗氧化剂,GPX4 可将 GSH 转化为氧化谷胱甘肽,从而抑制了脂质过氧化来保护细胞,缓解铁增加引起的氧化损伤^[7,27];GPX4 受 SystemXc-调节,在 GSH 的合成中发挥着重要的作用。SystemXc-是一种氨基酸反转运体,由 SCL7A11 和 SCL3A2 组成,其中 SCL7A11 发挥主要作用^[28]。SystemXc-将胞外胱氨酸转运至细胞内,用以合成 GSH,当 SystemXc-被抑制,导致胞内 GSH 含量下降,继而 GPX4 活性降低^[7,29],细胞的抗氧化能力下降,致使脂质 ROS 增多,从而引发了铁死亡。本研究结果显示,随着铅染毒剂量的增加,BV-2 细胞内 GSH 含量降低,脂质 ROS 升高。本研究结果显示铅暴露的 BV-2 细胞中加入 DFO 后,可见细胞内 GSH 含量比单独铅暴露组明显升高,脂质 ROS 明显降低。氧化损伤相关蛋白结果表明 GPX4、SCL7A11 蛋白表达均下降。上述结果提示铅可能通过下调 GPX4、SCL7A11,诱导了氧化损伤,致 BV-2 细胞发生铁死亡。这一结果与 Lan 等^[30] 研究的急性脑缺血引起神经元铁死亡中 GPX4、SCL7A11 表达下降的结果相一致。本研究的染毒为醋酸铅,这些变化与铅和醋酸根均有关,由于本研究中的对照为完全培养基,因此醋酸根的影响有待于进一步深入探讨。

综上所述,铅暴露能够引起 BV-2 细胞发生铁死亡,这可能与铅暴露后引起小胶质细胞铁转运失衡以及氧化损伤相关蛋白 GPX4、SCL7A11 下降有关。

参考文献

- [1] WEUVE J, PRESS D Z, GRODSTEIN F, et al. Cumulative exposure to lead and cognition in persons with Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2013, 28(2): 176-182.
- [2] WU S, LIU H, ZHAO H, et al. Environmental lead exposure aggravates the progression of Alzheimer's disease in mice by targeting on blood brain barrier[J]. *Toxicol Lett*, 2020, 319: 138-147.
- [3] SPITERI A G, TERRY R L, WISHART C L, et al. High-parameter cytometry unmasks microglial cell spatio-temporal response kinetics in severe neuroinflammatory disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 166.
- [4] JIANG C, WANG Z N, KANG Y C, et al. Ki20227 aggravates apoptosis, inflammatory response, and oxidative stress after focal cerebral ischemia injury[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(1): 137-143.
- [5] RICKMAN A D, HILYARD A, HECKMANN B L. Dying by fire: noncanonical functions of autophagy proteins in neuroinflammation and neurodegeneration[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(2): 246-250.
- [6] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [7] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369-379.
- [8] LI Y, ZENG X, LU D, et al. Erastin induces ferroptosis via ferroportin-mediated iron accumulation in endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(4): 951-964.
- [9] KE Y, QIAN Z M. Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry[J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83(3): 149-173.
- [10] SKJØRRINGE T, BURKHART A, JOHNSEN K B, et al. Divalent metal transporter 1 (DMT1) in the brain: implications for a role in iron transport at the blood-brain barrier, and neuronal and glial pathology[J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 19.
- [11] BOGDAN A R, MIYAZAWA M, HASHIMOTO K, et al. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 274-286.
- [12] YANG J, ZHOU Y, XIE S, et al. Metformin induces ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7 A11 in breast cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 206.
- [13] OLYMPIO K P K, GONÇALVES C, GÜNTHER W M R, et al. Neurotoxicity and aggressiveness triggered by low-level lead in children: a review[J]. *Rev Panam Salud Publica*, 2009, 26(3): 266-275.
- [14] SENUT M C, CINGOLANI P, SEN A, et al. Epigenetics of early-life lead exposure and effects on brain development[J]. *Epigenomics*, 2012, 4(6): 665-674.
- [15] FANG Y, LU L, LIANG Y, et al. Signal transduction associated with lead-induced neurological disorders: a review[J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 150: 112063.
- [16] BIHAQI S W, HUANG H, WU J, et al. Infant exposure to lead (Pb) and epigenetic modifications in the aging primate brain: implications for Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 27(4): 819-833.
- [17] EID A, BIHAQI S W, RENEHAN W E, et al. Developmental lead exposure and

- lifespan alterations in epigenetic regulators and their correspondence to biomarkers of Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement (Amst)*, 2016, 2(1): 123-131.
- [18] MENG E, MAO Y, YAO Q, et al. Population-based study of environmental/occupational lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Neurol Sci*, 2020, 41(1): 35-40.
- [19] DONZELLI G, LLOPIS-GONZALEZ A, LLOPIS-MORALES A, et al. Particulate matter exposure and attention-deficit/hyperactivity disorder in children: a systematic review of epidemiological studies[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 17(1): 67.
- [20] SANKOWSKI R, MADER S, VALDÉS-FERRER SI. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 28.
- [21] 刘金丽, 佟雷, 罗焱, 等. 隐丹参酮可能具有诱导人肝癌HepG2细胞铁死亡的作用[J]. *中国医学科学院学报*, 2021, 43(3): 366-370.
- LIU JL, TONG L, LUO Y, et al. Cryptotanshinone may induce ferroptosis of human liver cancer HepG2 cells[J]. *Acta Acad Med Sin*, 2021, 43(3): 366-370.
- [22] MANZ DH, BLANCHETTE NL, PAUL BT, et al. Iron and cancer: recent insights[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 68(1): 149-161.
- [23] GARRICK LM, DOLAN KG, ROMANO MA, et al. Non-transferrin-bound iron uptake in Belgrade and normal rat erythroid cells[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 178(3): 349-358.
- [24] OOKO E, SAEED ME M, KADIOGLU O, et al. Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(11): 1045-1054.
- [25] WANG Y, ZHANG L, ZHOU X. Activation of Nrf2 signaling protects hypoxia-induced HTR-8/SVneo cells against ferroptosis[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2021, 47(11): 3797-3806.
- [26] CHEN P, LI FM, ZHOU YF, et al. Effects of alpha-lipoic acid on expression of iron transport and storage proteins in BV-2 microglia cells[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(1): 1-5.
- [27] IMAI H, MATSUOKA M, KUMAGAI T, et al. Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis[M]//NAGATA S, NAKANO H. Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death. Cham: Springer, 2017: 143-170.
- [28] BRIDGES RJ, NATALE NR, PATEL SA. System x_c^- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(1): 20-34.
- [29] 毛庆祥, 杨天德. 胱氨酸/谷氨酸反向转运体的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2014, 45(6): 434-438.
- MAO QY, YANG TD. Advances in the study of cystine/glutamate reverse transporters[J]. *Prog Physiol Sci*, 2014, 45(6): 434-438.
- [30] LAN B, GE JW, CHENG SW, et al. Extract of Naotai Tang, a compound Chinese herbal medicine, protects neuron ferroptosis induced by acute cerebral ischemia in rats[J]. *J Integr Med*, 2020, 18(4): 344-350.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)

(上接第 894 页)

- [13] U. S. Environmental Protection Agency. Risk assessment guidance for superfund volume I: human health evaluation manual (Part E, supplemental guidance for dermal risk assessment)[R]. Washington: Office of Superfund Remediation and Technology Innovation, 2004.
- [14] HRUDEY SE, BULL RJ, COTRUVO JA, et al. Drinking water as a proportion of total human exposure to volatile N-nitrosamines[J]. *Risk Anal*, 2013, 33(12): 2179-2208.
- [15] CHARROIS JW A, BOYD JM, FROESE KL, et al. Occurrence of N-nitrosamines in Alberta public drinking-water distribution systems[J]. *J Environ Eng Sci*, 2007, 6(1): 103-114.
- [16] WOODS GC, DICKENSON ER V. Evaluation of the Final UCMR2 database: nationwide trends in NDMA[J]. *J AWWA*, 2015, 107(1): E58-E68.
- [17] ASAMI M, OYA M, KOSAKA K. A nationwide survey of NDMA in raw and drinking water in Japan[J]. *Sci Total Environ*, 2009, 407(11): 3540-3545.
- [18] 蔡宏铨, 裴赛峰, 张昀, 等. 我国城市饮用水中N-亚硝基二甲胺分布水平与健康风险评估[J]. *环境与职业医学*, 2021, 38(11): 1231-1236, 1243.
- CAI HQ, PEI SF, ZHANG Y, et al. Distribution and health risk assessment of N-nitrosodimethylamine in urban drinking water in China[J]. *J Environ Occup Med*, 2021, 38(11): 1231-1236, 1243.
- [19] SGROI M, VAGLIASINDI FG A, SNYDER SA, et al. N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and its precursors in water and wastewater: A review on formation and removal[J]. *Chemosphere*, 2018, 191: 685-703.
- [20] 罗曼, 李凌, 张付刚, 等. 2019年长江江苏段饮用水中二甲基亚硝胺的现状调查[J]. *环境与健康杂志*, 2019, 36(11): 1025-1028.
- LUO M, LI L, ZHANG FG, et al. Dimethylnitrosamine contamination in drinking water in Jiangsu reach of Yangtze River[J]. *J Environ Health*, 2019, 36(11): 1025-1028.
- [21] WANG X, LIU Z, WANG C, et al. Occurrence and formation potential of nitrosamines in river water and ground water along the Songhua River, China[J]. *J Environ Sci*, 2016, 50: 65-71.
- [22] LUO Q, WANG D, WANG Z. Occurrences of nitrosamines in chlorinated and chloraminated drinking water in three representative cities, China[J]. *Sci Total Environ*, 2012, 437: 219-225.
- [23] LUO Q, BEI E, LIU C, et al. Spatial, temporal variability and carcinogenic health risk assessment of nitrosamines in a drinking water system in China[J]. *Sci Total Environ*, 2020, 736: 139695.
- [24] WOODS GC, TRENHOLM RA, HALE B, et al. Seasonal and spatial variability of nitrosamines and their precursor sources at a large-scale urban drinking water system[J]. *Sci Total Environ*, 2015, 520: 120-126.
- [25] MA F, WAN Y, YUAN G, et al. Occurrence and source of nitrosamines and secondary amines in groundwater and its adjacent Jialu River Basin, China[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(6): 3236-3243.
- [26] FAN CC, LIN TF. N-nitrosamines in drinking water and beer: detection and risk assessment[J]. *Chemosphere*, 2018, 200: 48-56.
- [27] KIM H, HAN K. Ingestion exposure to nitrosamines in chlorinated drinking water[J]. *Environ Health Toxicol*, 2011, 26: e2011003.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)