

百草枯促进小胶质细胞分泌 IL-1 β 对神经干细胞增殖和神经元生成的影响

李倩¹, 肖洪喜², 李睿³, 唐黎明³, 常秀丽², 周志俊²

1. 上海中医药大学公共健康学院预防医学教研室, 上海 201203

2. 复旦大学, 公共卫生学院/公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032

3. 上海市食品药品检验所药理毒理室, 上海 201203

摘要:

[背景] 百草枯(PQ)是广泛使用的除草剂,具有神经毒性。PQ介导的神经炎症对神经干细胞的影响研究仍然有限。

[目的] 探讨 PQ 通过小胶质细胞介导的神经炎症对神经干细胞增殖和神经元生成的影响。

[方法] 选用小胶质细胞系(BV2 细胞)和原代神经干细胞作为研究对象。将 BV2 细胞置于 PQ 终浓度分别为 0、1、3.3、10、33、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的完全培养基中培养 6 h,检测其细胞存活率,选择对细胞活力没有影响的最高 PQ 浓度作为最终染毒浓度(33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。为了排除 PQ 对神经干细胞的直接影响,将 BV2 细胞置于 PQ 终浓度为 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的完全培养基中培养 6 h,再将培养基换成不含 PQ 的神经干细胞完全培养基继续培养 24 h,用酶联免疫吸附法检测上清液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)的浓度。此外,为了检测 IL-1 β 对神经干细胞增殖和神经元生成的影响,从成年小鼠海马区分离提取的神经干细胞用上述 BV2 细胞上清液培养,分为 4 组:对照组上清+对照抗体组,对照组上清+IL-1 β 中和抗体组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),PQ 组上清+对照抗体组,PQ 组上清+IL-1 β 中和抗体组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),培养 24 h 后用流式细胞和免疫荧光法检测 Ki67 阳性的神经干细胞的比率,培养 3~7 d 后用流式细胞和免疫荧光法检测新生神经元的比例。

[结果] 与对照组相比,BV2 细胞经过 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 处理后上清液中 IL-1 β 含量上升($t=3.020$, $P<0.05$)。用 PQ 处理过的 BV2 细胞上清液培养小鼠神经干细胞,与对照组相比,Ki67 阳性的神经干细胞的比率下降($t=9.129$, $P<0.01$),新生神经元的比例与对照组相比下降($t=4.638$, $P<0.01$)。中和 IL-1 β 后,共培养的神经干细胞中 Ki67 阳性的神经干细胞百分比高于未中和组($t=22.05$, $P<0.01$),新生神经元的比例也高于未中和组($t=11.09$, $P<0.01$)。免疫荧光技术检测同样显示,中和 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 处理的 BV2 细胞上清液中的 IL-1 β 后,Ki67 阳性的神经干细胞数量高于未中和组,神经元的数量也高于未中和组。

[结论] PQ 促进小胶质细胞分泌 IL-1 β ,导致神经干细胞增殖下降,神经元生成减少。研究结果提示小胶质细胞介导的神经炎症参与 PQ 导致的神经干细胞损伤。

关键词: 百草枯;小胶质细胞;白介素-1 β ;神经干细胞;神经元生成

Effects of paraquat on proliferation and neurogenesis of neural stem cells by promoting secretion of IL-1 β by microglia LI Qian¹, XIAO Hongxi², LI Rui³, TANG Liming³, CHANG Xiuli², ZHOU Zhijun² (1. Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. School of Public Health/Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Pharmacology and Toxicology Department, Shanghai Institute for Drug and Food Control, Shanghai 201203, China)

Abstract:

[Background] Paraquat (PQ) is a widely used herbicide that exerts neurotoxicity. The effects of PQ on neural stem cells (NSCs) through microglia mediated neuroinflammation remain limitedly studied.

[Objective] To investigate the effects of PQ on the proliferation and neurogenesis of NSCs through neuroinflammation mediated by microglia.

[Methods] Microglial cell lines (BV2 cells) and primary NSCs were used. BV2 cells were exposed to 0, 1, 3.3, 10, 33, and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of PQ for 6 h followed by viability assessment. The highest



DOI 10.11836/JEOM21605

基金项目

国家自然科学基金项目(81673202,81773472)

作者简介

李倩(1992—),女,博士,讲师;

E-mail: 17111020021@fudan.edu.cn

通信作者

周志俊, E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-12-27

录用日期 2022-08-09

文章编号 2095-9982(2022)09-1045-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

李倩,肖洪喜,李睿,等.百草枯促进小胶质细胞分泌 IL-1 β 对神经干细胞增殖和神经元生成的影响[J].环境与职业医学,2022,39(9):1045-1050.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21605

Funding

This study was funded.

Correspondence to

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

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-12-27

Accepted 2022-08-09

► To cite

LI Qian, XIAO Hongxi, LI Rui, et al. Effects of paraquat on proliferation and neurogenesis of neural stem cells by promoting secretion of IL-1 β by microglia[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(9): 1045-1050.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21605

PQ concentration that had no effect on cell viability was selected as the final exposure concentration ($33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). To exclude the direct effect of PQ on NSCs, after the BV2 cells were cultured in complete medium containing $33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ for 6 h, the BV2 culture medium was replaced by NSCs complete medium without PQ for 24 h. The concentration of interleukin-1 β (IL-1 β) in supernatant was detected by enzyme-linked immune sorbent assay. Besides, in order to detect the effects of IL-1 β on NSCs proliferation and neurogenesis, NSCs isolated from hippocampus of adult mice were cultured in the supernatant obtained above and divided into four groups: control supernatant + control antibody, control supernatant + IL-1 β neutralizing antibody ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), PQ supernatant + control antibody, PQ supernatant + IL-1 β neutralizing antibody ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Proportion of Ki67-positive NSCs was detected by flow cytometry (FCS) and immunofluorescence after 24 h culture, and neurogenesis was detected by FCS and immunofluorescence after 3-7 d of culture.

[Results] The IL-1 β concentration in the supernatant of BV2 cells was significantly increased after the $33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ exposure compared with the control group ($t=3.020$, $P<0.05$). After the NSCs were cultured with the supernatant of PQ-treated BV2 cells, the proportion of Ki67-positive NSCs ($t=9.129$, $P<0.01$) and the proportion of newborn neurons ($t=4.638$, $P<0.01$) were significantly decreased compared to the control group. After neutralizing IL-1 β , the proportion of Ki67-positive NSCs ($t=22.05$, $P<0.01$) and the proportion of newborn neurons ($t=11.09$, $P<0.01$) were significantly higher than those in the un-neutralized group. The results of immunofluorescence detection also showed that after neutralizing IL-1 β secreted by $33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ-treated BV2 cells, the number of Ki67-positive NSCs and the number of newborn neurons were significantly higher than those in the un-neutralized group.

[Conclusion] The secretion of IL-1 β by microglia is increased after PQ treatment, resulting in a decrease in the proliferation and neurogenesis of NSCs. These results suggest that neuroinflammation is involved in NSCs damage caused by PQ.

Keywords: paraquat; microglia; interleukin-1 β ; neural stem cell; neurogenesis

百草枯(paraquat, PQ), 化学名为 1,1-二甲基-4,4-联吡啶二氯化物, 是广泛使用的有机杂环类接触性脱叶剂, 是一种非选择性的高效除草剂^[1]。近年来流行病学研究显示, 长期暴露于 PQ 可引起神经系统的损害^[2]。PQ 可破坏黑质致密部的多巴胺神经元, 引起神经元凋亡, 进而可能导致帕金森病^[3]。PQ 除了可引起成熟神经元的凋亡和损伤以外, 还可引起神经干细胞的损伤^[4]。

成年小鼠神经干细胞主要分布在脑室下区和颗粒下区, 具有自我更新和分化成各种成熟神经细胞(包括神经元和星形胶质细胞等)的功能^[5]。神经干细胞增殖和神经元生成异常与多种神经退行性疾病有关, 包括帕金森病^[6-7]、阿尔茨海默病^[8]、亨廷顿病^[9]、精神分裂症等^[10-11]。神经干细胞的增殖和神经元的生成过程受很多因素的影响, 神经炎症在其中起重要作用^[12-13]。小胶质细胞是中枢神经系统中固有免疫细胞, 与神经干细胞相互作用, 影响神经干细胞增殖和分化过程^[14]。小胶质细胞分泌的促炎因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)是研究最广泛并可导致多种神经退行性疾病的关键细胞因子^[15-16]。在阿尔茨海默病小鼠中, 小胶质细胞产生 IL-1 β , 从而促进具有神经毒性的 β -淀粉样蛋白肽的产生和沉积^[17]。将 IL-1 β 注射到大脑中会损害小鼠的学习能力和记忆能力, 并影响海马区神经元的生成^[18]。体外实验显示, IL-1 β 导致神经干细胞生成的神经元减少^[19]。

目前 PQ 通过小胶质细胞介导的神经炎症对神经干细胞增殖和神经元生成的影响研究尚不完善。因此本研究利用体外实验, 将小鼠小胶质细胞(BV2 细胞)和成年小鼠海马区分离出的神经干细胞作为离体细

胞模型, 研究 BV2 细胞分泌的促炎因子 IL-1 β 对神经干细胞增殖和神经元生成的影响, 为 PQ 的神经毒性的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞与实验动物

小鼠小胶质细胞系(BV2 细胞)购自中国盖宁生物公司, 采用 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清和 $100 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素-链霉素), 在 5% CO_2 、 37°C 恒温细胞培养箱中培养。用于分离原代神经干细胞的无特定病原体雌性 C57BL/6 小鼠(6~8 周龄, 20~25 g)购于中国上海斯莱克实验动物有限责任公司(许可证号: 2015000559939)。本研究通过上海市食品药品检验所实验动物福利伦理审查(批准号: F-MT-162-II-00)。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 倒置相差显微镜、单细胞工作站(日本 Olympus), 细胞培养箱、超净工作台(美国 Thermo), 倒置荧光显微镜(日本 Nikon), LSR-Fortessa 流式细胞仪(美国 BD), 荧光酶标仪(美国 Biotech)。

1.2.2 主要试剂 PQ(分析纯)、 $100 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素-链霉素、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; 美国 Sigma), 胎牛血清、DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、0.25%胰酶-EDTA 溶液、Accutase 消化酶、B27 补充剂、N2 补充剂、细胞穿孔试剂盒(美国 Gibco), 小鼠 IL-1 β 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA)试剂盒(中国达科为生物技术有限公司), 细胞计数试剂盒 8(Cell Counting Kit-8, CCK8)、对照抗体和 IL-1 β 中和抗体(美国 bioXcell), 免

疫荧光封闭液(中国碧云天生物科技有限公司), 流式穿核试剂(美国 BD), 人重组碱性成纤维细胞生长因子、人重组表皮生长因子、层粘连蛋白、多聚赖氨酸(美国 PeproTech), 兔抗小鼠双肾上腺皮质激素(doublecortin, DCX)、兔抗小鼠 DCX-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、山羊抗小鼠性别决定区 Y 框 2(sex determining region Y box 2, SOX2)、山羊抗小鼠 Ki67-FITC(美国 Cell Signaling Technology), 山羊抗兔 IgG(H+L)-AF-488、驴抗山羊 IgG(H+L) 菁类荧光染料 3(sulfo-cyanine3, Cy3)(中国碧云天生物科技公司)。

1.3 实验设计与方法

1.3.1 实验设计 BV2 细胞中加入等体积的含有 0、1、3.3、10、33、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 的完全培养基, 培养 6 h 后检测细胞活力, 筛选出对 BV2 细胞活力无影响的最高 PQ 浓度组用于后续实验。为了排除 PQ 对神经干细胞的直接影响, BV2 细胞中加入含有 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 的 DMEM 完全培养基, 培养 6 h 后, 将培养基换成不含有 PQ 的神经干细胞培养基再继续培养 24 h, 检测上清液中 IL-1 β 的质量浓度(后简称为浓度)。

从成年小鼠海马区分离提取神经干细胞, 将其分为 4 组: 对照组上清+对照抗体组、对照组上清+IL-1 β 中和抗体组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、PQ 组上清+对照抗体组、PQ 组上清+IL-1 β 中和抗体组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 完全培养基培养 24 h 后, 用流式细胞术和免疫荧光法检测神经干细胞的增殖, 用分化培养基培养 3~7 d 后用流式细胞术和免疫荧光法检测神经元的生成。

1.3.2 CCK8 法检测 BV2 细胞活力 对数生长期的 BV2 细胞, 以每孔 100 μL 、 10^5 孔 $^{-1}$ 接种于 96 孔细胞培养板中, 按上述方法(见 1.3.1 实验设计)进行细胞染色后每孔加入 110 μL CCK8 检测液(10 μL CCK8 储备溶液+100 μL 完全培养基), 放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 2~4 h, 用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度值, 记录并计算细胞存活率。细胞存活率(%)=处理组光密度均值/对照组光密度均值 $\times 100\%$ 。

1.3.3 ELISA 法检测 BV2 上清液 IL-1 β 浓度 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 处理 BV2 细胞 24 h 后, 将细胞培养液收集到 15 mL 离心管中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 $\times g$ 离心 10 min, 待测。根据 ELISA 试剂盒提供的步骤检测 IL-1 β 的浓度。

1.3.4 神经干细胞的分离、培养与鉴定 根据课题组前期报道, 对神经干细胞进行分离、培养处理与鉴定^[20-22]。

1.3.5 流式细胞术检测神经干细胞的增殖和神经元的生成 第三代神经干细胞以 10^6 孔 $^{-1}$ 接种到 48 孔板上, 培养 24 h 后, 磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate

buffered saline, PBS)清洗 2 次细胞, 用 Accutase 酶消化细胞 5 min, 加入终止液并将细胞转入离心管中, 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清并重悬细胞。取细胞重悬液, 置于 96 孔板中, 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 室温避光穿孔 1 h。每孔加入 100 μL 稀释好的抗小鼠 Ki67-FITC (1:100), 室温避光孵育 1 h, 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清。每孔加入 DAPI 工作液, 采用流式细胞术检测神经干细胞增殖, 经 Flowjo 软件(v7.6.5)进行数据分析。

第三代神经干细胞以 10^6 孔 $^{-1}$ 接种到 48 孔板上, 用完全培养基培养 24 h 后, 换成分化培养基, 培养 3~7 d 后检测神经元的生成。用消化酶消化细胞 5 min, 加入终止液并将细胞转入 15 mL 离心管中, 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清并重悬细胞。取细胞重悬液, 置于 96 孔板中(每孔 100 μL), 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 室温避光穿孔 1 h。穿孔后每孔加入 100 μL 稀释好的抗小鼠 DCX-FITC (1:100), 室温避光孵育 1 h, 500 $\times g$ 离心 5 min 后每孔加入 100 μL DAPI 使用液, 采用流式细胞术检测神经元的生成, 经 Flowjo 软件(v7.6.5)进行数据分析。

1.3.6 免疫荧光法检测神经干细胞的增殖和神经元的生成 第三代神经干细胞以 10^6 孔 $^{-1}$ 接种到 24 孔细胞爬片上, 用完全培养基培养 24 h 后吸去细胞培养基, PBS 轻柔吹打细胞 2 次, 将 4%多聚甲醛滴加在细胞爬片上, 室温固定细胞 5~10 min; 滴加适量 0.5% Triton X-100 溶液于细胞爬片上静置 15~30 min, 去除透化液; 滴加适量封闭液室温静置 30 min, 去除封闭液; 滴加适量一抗工作液(抗小鼠 Ki67)置于保湿盒中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 清洗 3 遍后, 滴加适量二抗工作液(山羊抗兔 IgG(H+L)-AF-488)于样品片上, 置于保湿盒避光, 常温静置 2 h 后洗涤, 用 DAPI 工作液染色 15 min 后洗涤, 滴加 50 μL 封片剂于载玻片上, 取出细胞爬片, 单细胞工作站进行拍照检测神经干细胞的增殖。

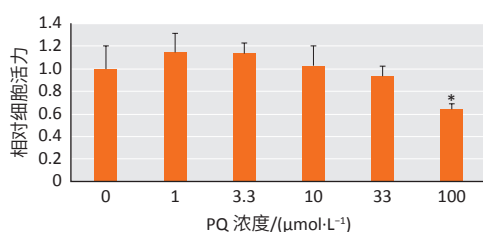
第三代神经干细胞以 10^6 孔 $^{-1}$ 接种到 24 孔细胞爬片上, 用完全培养基培养 24 h 后换成分化培养基, 培养 3~7 d。吸去细胞培养基, 将 4%多聚甲醛滴加在细胞爬片上, 室温固定细胞 5~10 min; 滴加适量 0.5% Triton X-100 溶液于细胞爬片上静置 15~30 min, 去除透化液, 滴加适量封闭液于样品片上, 室温静置 30 min, 去除封闭液, 滴加适量一抗工作液(抗小鼠 DCX)于样品片上, 置于保湿盒中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。加适量二抗工作液(山羊抗兔 IgG(H+L)-AF-488)于样品片上, 置于保湿盒避光, 常温静置 2 h 后洗涤, 用 DAPI 工作液染色, 常温静置 15 min 后洗涤, 滴加 50 μL 封片剂于载玻片上, 取出细胞爬片, 单细胞工作站拍照检测神经元的生成。

1.3.7 统计学分析 实验数据以均数±标准差表示,并采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。多组数据的组间比较用单因素方差分析,事后两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 时,认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PQ 处理对 BV2 细胞活力的影响

图 1 显示,与对照组相比,PQ 浓度在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,BV2 细胞活力降低($t=3.832, P < 0.05$)。选择不引起细胞活力下降的最高浓度($33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行后续实验。



[注]*: 与对照组比, $P < 0.05$ 。

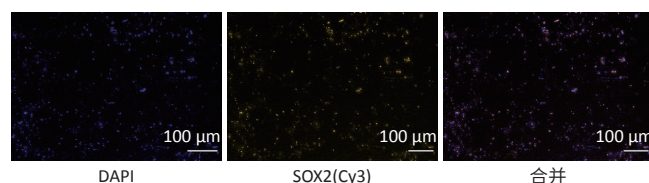
图 1 PQ 处理对 BV2 细胞活力的影响
Figure 1 Effect of PQ on the viability of BV2 cells

2.2 PQ 处理对 BV2 细胞分泌 IL-1 β 的影响

BV2 细胞经过 $33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 处理后上清液中 IL-1 β 浓度为 $(10.25 \pm 2.40) \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 较对照组的 $(6.45 \pm 0.73) \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 升高($t=3.020, P < 0.05$)。

2.3 免疫荧光法鉴定原代神经干细胞

鉴定结果如图 2 所示,细胞生长良好(神经干细胞纯度大于 90%),可以用于后续实验。

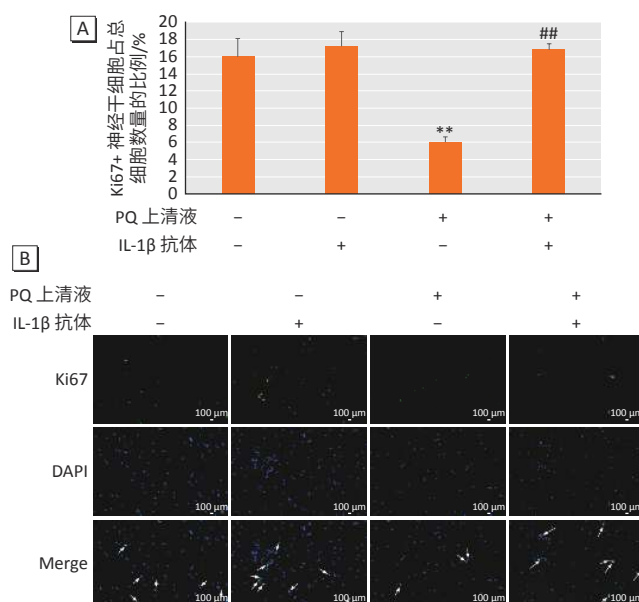


[注] 原代神经干细胞,黄色荧光为 Cy3 标记的 SOX2 蛋白,蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核。

图 2 原代神经干细胞
Figure 2 Primary neural stem cells

2.4 BV2 细胞上清液中的 IL-1 β 对神经干细胞增殖的影响

流式细胞术检测结果显示,用 PQ 处理过的 BV2 细胞上清液培养神经干细胞,Ki67 阳性的神经干细胞比例与对照相比下降($t=9.129, P < 0.01$)。中和 IL-1 β 之后,Ki67 阳性的神经干细胞百分比高于未中和组($t=22.05, P < 0.01$) (图 3A)。免疫荧光技术检测同样显示,中和 $33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 处理的 BV2 细胞分泌的 IL-1 β 之后,Ki67 阳性的神经干细胞比例也高于未中和组(图 3B)。

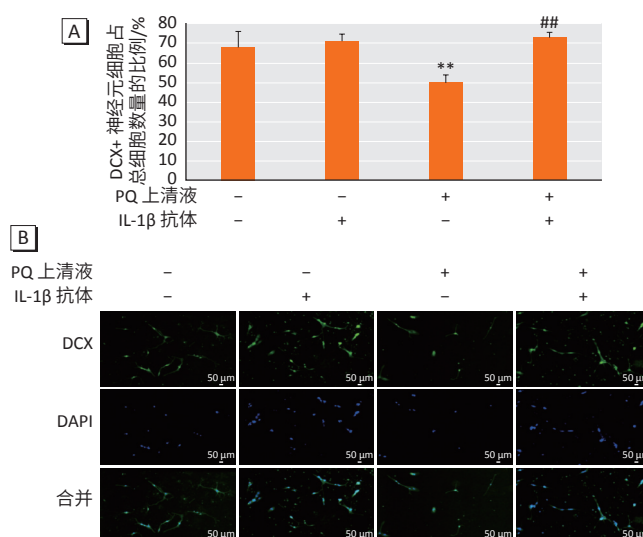


[注] A: Ki67+神经干细胞百分比; B: 各组免疫荧光图,绿色代表 Ki67,蓝色代表 DAPI,白色箭头指示合并后的结果。**: 与对照组相比, $P < 0.01$; #: 和 PQ 上清液组比较, $P < 0.01$ 。

图 3 各处理组神经干细胞增殖比较
Figure 3 Comparison of proliferation of NSCs in each treatment group

2.5 BV2 细胞上清液中的 IL-1 β 对神经元生成的影响

流式细胞术检测显示,用 PQ 处理过的 BV2 细胞上清液培养神经干细胞,新生神经元的比例与对照相比下降($t=4.638, P < 0.01$)。中和 IL-1 β 之后,新生神经元的比例高于未中和组($t=11.09, P < 0.01$) (图 4A)。免疫荧光技术检测显示,中和 IL-1 β 之后,神经元的数量也高于未中和组(图 4B)。



[注] A: DCX+神经元百分比; B: 各组免疫荧光图。绿色代表 DCX,蓝色代表 DAPI,白色箭头指示合并后的结果。**: 与对照组相比, $P < 0.01$; #: 和 PQ 上清液组比较, $P < 0.01$ 。

图 4 各处理组神经元生成比较
Figure 4 Comparison of neurogenesis in each treatment group

3 讨论

PQ 暴露可导致神经行为缺陷和帕金森病等神经退行性疾病,其中神经炎症是导致神经变性和神经毒性损伤的重要过程,多种神经退行性疾病中均可发现神经炎症因子增多的现象^[23]。在本研究中,PQ 处理导致小胶质分泌的 IL-1 β 增加,从而抑制神经干细胞增殖,并导致神经元生成下降。

小胶质细胞作为脑中的固有的免疫细胞,在受到外界刺激后会发一系列的改变。已经有研究证实,小胶质细胞在 PQ 的刺激下分泌促炎因子^[24],进而对神经系统产生损伤作用,其中 IL-1 β 是介导神经系统损伤的关键细胞因子。在神经退行性疾病的发生发展过程中,脑内始终存在以胶质细胞激活为主要特征的神经炎症反应^[25]。本实验研究发现,BV2 在受到 PQ 刺激后,上清液中的 IL-1 β 含量升高。有研究显示,PQ 处理可导致神经干细胞损伤^[22],本研究为了探究 IL-1 β 对神经干细胞的影响,在 BV2 细胞处理 6 h 后将培养液换成不含有 PQ 的神经干细胞增殖培养基,后续用该培养基进一步培养神经干细胞。

研究表明,PQ 可导致多巴胺能神经元细胞的丢失,也可直接引起神经干细胞的增殖下降^[26]。神经干细胞是 IL-1 β 的重要靶标,IL-1 β 可以降低体外培养神经前体的活性和增殖能力,并且具有抗神经元的发生作用^[27]。本研究发现,PQ 引起 BV2 细胞分泌的 IL-1 β 升高。为了研究 PQ 处理后小胶质细胞分泌的 IL-1 β 的作用,将 BV2 的上清液和神经干细胞共培养,并且用 IL-1 β 的中和抗体进行干预实验。结果发现,IL-1 β 导致海马区的神经干细胞增殖下降,神经元生成减少,这提示,小胶质细胞介导的神经炎症在 PQ 导致的神经干细胞损伤过程中具有重要作用。

中和 IL-1 β 可逆转 PQ 引起的神经干细胞增殖下降和神经元生成减少这一现象,说明 IL-1 β 在 PQ 引起的神经干细胞损伤中起到主要作用。值得注意的是,除了 IL-1 β ,PQ 还可诱导肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)^[28]。有体外研究发现,TNF α 能抑制神经元的生成^[29]。因此,其他促炎细胞因子也可能参与了 PQ 导致的神经干细胞和小鼠记忆功能的损伤,具体作用有待进一步探讨。另外,最近的研究表明,IL-1 β 对神经干细胞的作用需要通过激活 SAPK/JNK 通路发挥作用^[30]。因此,IL-1 β 对神经干细胞和记忆功能影响的分子机制有待进一步研究。

综上,PQ 导致小胶质细胞分泌的 IL-1 β 增多,从而抑制神经干细胞的增殖和神经元的生成。本研究重点

探讨神经炎症在 PQ 导致神经干细胞损伤的作用,聚焦 IL-1 β 这一炎症因子对神经干细胞的影响,完善了 PQ 导致神经损伤的机制,为治疗因 PQ 暴露引起的神经退行性疾病提供了依据,为深入研究 PQ 的神经毒性机制提出了新的思路。

参考文献

- [1] PRASAD K, TARASEWICZ E, MATHEW J, et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat accumulation in mouse brain[J]. *Exp Neurol*, 2009, 215(2): 358-367.
- [2] KONTTHONBUT P, KONGTIP P, NANKONGNAB N, et al. Paraquat exposure of pregnant women and neonates in agricultural areas in Thailand[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(6): 1163.
- [3] ZHAO F, WANG W, WANG C, et al. Mfn2 protects dopaminergic neurons exposed to paraquat both *in vitro* and *in vivo*: implications for idiopathic Parkinson's disease[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Basis Dis*, 2017, 1863(6): 1359-1370.
- [4] HUANG M, CAI Q, XU Y, et al. Paraquat affects the differentiation of neural stem cells and impairs the function of vascular endothelial cells: a study of molecular mechanism[J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(4): 548-555.
- [5] PAEZ-GONZALEZ P, ASRICAN B, RODRIGUEZ E, et al. Identification of distinct ChAT⁺ neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(7): 934-942.
- [6] HÖGLINGER GU, RIZK P, MURIEL MP, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease[J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(7): 726-735.
- [7] VAN DEN BERGE SA, VAN STRIEN ME, KORECKA JA, et al. The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain[J]. *Brain*, 2011, 134(11): 3249-3263.
- [8] MU Y, GAGE FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6: 85.
- [9] KANDASAMY M, COUILLARD-DESPRES S, RABER KA, et al. Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor- β signaling in an animal model of Huntington disease[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(7): 717-728.
- [10] MURAKI K, TANIGAKI K. Neuronal migration abnormalities and its possible implications for schizophrenia[J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 74.
- [11] REIF A, FRITZEN S, FINGER M, et al. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression[J]. *Mol Psychiatry*, 2006, 11(5): 514-522.
- [12] SUNG PS, LIN PY, LIU CH, et al. Neuroinflammation and neurogenesis in Alzheimer's disease and potential therapeutic approaches[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 701.
- [13] KLEIN R, SOUNG A, SISSOKO C, et al. COVID-19 induces neuroinflammation and loss of hippocampal neurogenesis[J]. *Res Sq*, 2021,doi: 10.21203/rs.3.rs-1031824/v1.
- [14] SZEPESI Z, MANOUCHEHRIAN O, BACHILLER S, et al. Bidirectional microglia-neuron communication in health and disease[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 323.
- [15] ZHU L, LIU X, NEMETH DP, et al. Interleukin-1 causes CNS inflammatory cytokine expression via endothelial-microglia bi-cellular signaling[J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 81: 292-304.
- [16] VAY SU, FLITSCH LJ, RABENSTEIN M, et al. The plasticity of primary mi-

- croglia and their multifaceted effects on endogenous neural stem cells in vitro and in vivo[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 226.
- [17] HENKA MT, KUMMER MP, STUTZ A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice[J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-678.
- [18] GARBER C, VASEK MJ, VOLLMER LL, et al. Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via IL-1[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(2): 151-161.
- [19] GREEN HF, TREACY E, KEOHANE AK, et al. A role for interleukin-1 β in determining the lineage fate of embryonic rat hippocampal neural precursor cells[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2012, 49(3): 311-321.
- [20] ZHAO L, YAN M, WANG X, et al. Modification of Wnt signaling pathway on paraquat-induced inhibition of neural progenitor cell proliferation[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 121: 311-325.
- [21] LUO H, SONG B, XIONG G, et al. Cadmium inhibits neural stem/progenitor cells proliferation via MitoROS-dependent AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *J Appl Toxicol*, 2021, 41(12): 1998-2010.
- [22] XIONG G, ZHAO L, YAN M, et al. N-acetylcysteine alleviated paraquat-induced mitochondrial fragmentation and autophagy in primary murine neural progenitor cells[J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(11): 1557-1567.
- [23] ZOKAEI N, HUSAIN M. Working memory in Alzheimer's disease and parkinson's disease[M]//HODGSON T. Processes of Visuospatial Attention and Working Memory. Cham: Springer, 2019: 325-344.
- [24] SUN Y, ZHENG J, XU Y, et al. Paraquat-induced inflammatory response of microglia through HSP60/TLR4 signaling[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(11): 1161-1168.
- [25] SEFIANI A, GEOFFROY CG. The potential role of inflammation in modulating endogenous hippocampal neurogenesis after spinal cord injury[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 682259.
- [26] LI K, CHENG X, JIANG J, et al. The toxic influence of paraquat on hippocampal neurogenesis in adult mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 106: 356-366.
- [27] KEMPURAJ D, THANGAVEL R, NATTERU PA, et al. Neuroinflammation Induces neurodegeneration[J]. *J Neurol Neurosurg Spine*, 2016, 1(1): 1003.
- [28] SUN J, TIAN T, WANG Y, et al. Paraquat-activated BV-2 microglia induces neuroinflammatory responses in the neuron model through NF- κ B signaling pathway[J]. *Toxicol in Vitro*, 2021, 72: 105076.
- [29] IOSIF RE, AHLENIUS H, EKDAHL CT, et al. Suppression of stroke-induced progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(9): 1574-1587.
- [30] WANG X, FU S, WANG Y, et al. Interleukin-1 β mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 36(3): 343-354.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》出版伦理声明

《环境与职业医学》遵循出版道德委员会(Committee on Publication Ethics, COPE)的指导方针调查和处理不当行为的指控或怀疑。

对于作者: ①所投稿件必须是作者的原创作品, 之前不得以印刷或在线形式发表, 或同时投给其他出版物, 如文中使用先前发表的资料(如图、表格)需要提供相关的归属权和许可证明; ②作者应保证所投稿件不存在任何学术不端行为, 学术不端行为定义见 CY/T 174—2019《学术出版规范—期刊学术不端行为界定》; ③所有作者在投稿时需签署“利益冲突声明”, 声明是否存在实际或潜在的利益冲突。

对于编辑与审稿人: 编辑和审稿人必须公开任何实际或潜在的竞争性利益, 包括所有被合理视为与审稿有关的经济利益或非经济利益; 有关竞争性利益和其他道德问题的更详细信息, 请参阅 COPE 指导方针。

《环境与职业医学》编辑部

2022 年 9 月 25 日