

程序性坏死抑制剂 Nec-1 对铅致 BV2 细胞损伤的影响

易湘, 杨纯, 彭东杰, 区仕燕, 姜岳明, 李少军

广西医科大学 a. 公共卫生学院卫生毒理学教研室 b. 高校高发疾病预防与控制研究重点实验室, 广西南宁 530021

摘要:

[背景] 程序性坏死与神经退行性疾病的发生和发展关系密切, 但铅是否引起神经细胞程序性坏死尚未见报道。

[目的] 探讨程序性坏死在铅诱导神经小胶质细胞(BV2 细胞)损伤中的作用及其抑制剂对铅诱导 BV2 细胞损伤的影响。

[方法] 取生长良好的对数生长期 BV2 细胞, 经 0、1、5、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅分别处理 12、24、36、48 h 后, 采用噻唑蓝法测定细胞存活率。BV2 细胞经 0、25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅处理 24 h 后, 分别采用酶联免疫吸附试验法、蛋白质免疫印迹法和流式细胞术测定细胞内肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、受体相互作用蛋白激酶 3 (RIPK3)、受体相互作用蛋白激酶 1 (RIPK1) 和混合谱系激酶结构域样蛋白 (MLKL) 的表达情况; 并经 RIPK1 抑制剂 Nec-1 预处理 1 h, 检测 Nec-1 对铅诱导 BV2 细胞损伤的影响。

[结果] BV2 细胞的存活率随着铅染毒浓度的增加 ($r_{12\text{ h}}=-0.995$, $r_{24\text{ h}}=-0.984$, $r_{36\text{ h}}=-0.983$, $r_{48\text{ h}}=-0.981$, 均 $P<0.01$) 而下降, 在 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅染毒下, 细胞存活率也随着染毒时间的延长 ($r=-0.994$, $P<0.01$) 而下降。与对照组比较, 同一染毒时间, 当铅染毒浓度达到 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即可引起 BV2 细胞存活率下降 ($P<0.01$)。与对照组比较, 25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅处理组细胞程序性坏死相关蛋白 RIPK1、MLKL 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 0.01), 并伴有炎症细胞因子 TNF- α 含量升高, 以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组最高 ($P<0.01$); 50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅处理组 p-RIPK1、p-MLKL 及 RIPK3 表达水平平均升高 ($P<0.01$)。此外, 与相应染铅组比较, Nec-1 预处理使染铅 BV2 细胞活性升高, 坏死及晚调率降低 ($P<0.05$ 或 0.01)。

[结论] 铅可致 BV2 细胞活性降低, 坏死率升高, 并伴有 RIPK3 和 RIPK1、MLKL 蛋白及其磷酸化的表达上调, 而 RIPK1 抑制剂 Nec-1 对铅引起的 BV2 细胞损伤具有一定的干预作用, 提示程序性坏死可能在铅神经毒性中发挥着重要作用。

关键词: 铅; BV2 细胞; 程序性坏死; 受体相互作用蛋白激酶 1; 受体相互作用蛋白激酶 3; 混合谱系激酶结构域样蛋白; 程序性坏死抑制剂

Effect of programmed necrosis inhibitor Nec-1 on lead-induced BV2 cell injury Yi Xiang, YANG Chun, PENG Dongjie, OU Shiyan, JIANG Yue-ming, LI Shaojun (a. Department of Health Toxicology, School of Public Health b. Key Laboratory of Prevention and Control of High-incidence Diseases, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract:

[Background] Programmed necrosis is closely related to the occurrence and development of neurodegenerative diseases, but whether lead causes programmed cell necrosis has not been reported.

[Objective] This experiment is designed to probe into the function of programmed necrosis and the effect of its inhibitor on lead-induced microglia (BV2 cell) injury.

[Methods] The BV2 cells at logarithmic growth phase were treated with 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lead acetate for 12, 24, 36, and 48 h, respectively, and methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) was used to determine cell viability. After treatment with 0, 25, 50, and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lead acetate for 24 h, enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, and flow cytometry were used to determine the expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3), receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1), and

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21175

基金项目

广西自然科学基金 (2018GXNSFBA050060); 国家自然科学基金 (NSFC81803281); 广西自然科学基金创新科研团队 (2019GXNSFGA245002)

作者简介

易湘 (1996—), 女, 硕士生;
E-mail: irene1996yx@163.com

通信作者

李少军, E-mail: lishaojun0613@163.com
姜岳明, E-mail: ymjiaing@163.com

伦理审批

不需要

利益冲突

无申报

收稿日期

2021-04-25

录用日期

2021-11-19

文章编号

2095-9982(2021)12-1370-06

中图分类号

R114

文献标志码

A

►引用

易湘, 杨纯, 彭东杰, 等. 程序性坏死抑制剂 Nec-1 对铅致 BV2 细胞损伤的影响 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38(12): 1370-1375.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21175

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LI Shao-jun, E-mail: lishaojun0613@163.com
JIANG Yue-ming, E-mail: ymjiaing@163.com

Ethics approval

Not required

Competing interests

None declared

Received

2021-04-25

Accepted

2021-11-19

► To cite

Yi Xiang, YANG Chun, PENG Dongjie, et al. Effect of programmed necrosis inhibitor Nec-1 on lead-induced BV2 cell injury[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(12): 1370-1375.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21175

mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) in the cells, and the effect of RIPK1 inhibitor Nec-1 pretreatment on lead-induced BV2 cell injury.

[Results] The BV2 cell viability decreased with higher lead concentration ($r_{12h}=-0.995$, $r_{24h}=-0.984$, $r_{36h}=-0.983$, $r_{48h}=-0.981$, all $P<0.01$) and time extension (only for $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lead acetate, $r=-0.994$, $P<0.01$). Compared with the control group, the BV2 cell viability decreased at the same exposure time when the concentration of lead was above $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.01$). Compared with the control group, the expressions of RIPK1 and MLKL were increased in the 25, 50, and $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lead groups ($P<0.05$ or 0.01), accompanied by an increase in the contents of inflammatory cytokine TNF- α , especially in the $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lead group, the increment was the highest ($P<0.01$). The expression levels of p-RIPK1 and p-MLKL in BV2 cells were both increased when the concentration of lead acetate was above $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.01$). In addition, pretreatment with Nec-1 increased the cell viability rate and decreased the necrosis and late apoptosis rate of BV2 cells exposed to lead compared with corresponding lead exposure groups ($P<0.05$).

[Conclusions] Lead can reduce BV2 cell viability, increase necrosis rate, and up-regulate the expressions of RIPK1, RIPK3, and MLKL, and the phosphorylation levels of RIPK1 and MLKL. The RIPK1 inhibitor Nec-1 has an intervention effect on lead-induced damage in BV2 cells, indicating that programmed necrosis may play a role in lead neurotoxicity.

Keywords: lead; BV2 cell; programmed necrosis; receptor-interacting protein kinase 1; receptor-interacting protein kinase 3; mixed lineage kinase domain-like protein; programmed necrosis inhibitor

铅(lead, Pb)是环境中广泛存在的重金属污染物^[1],长期过量铅暴露可引起神经系统损伤^[2],低水平铅暴露可损害发育中的中枢神经系统,导致各种神经生理和行为改变^[3]。值得关注的是,联合国儿童基金会一项报告显示,全球约有8亿儿童及19岁以下的年轻人血铅质量浓度超过 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$,其中我国血铅质量浓度超过 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ 的儿童人数超过3000万^[4]。此外,世界卫生组织表示,没有已知的“安全”血铅水平,血铅超标严重危害人体健康,即使血铅质量浓度低至 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ 也可引起脑损伤,包括损害神经发育以及致儿童智力下降和行为改变^[5]。因此,阐明铅暴露对中枢神经系统的不良影响并揭示其潜在的神经毒性机制非常重要。程序性坏死是一种以细胞器肿胀、细胞膜完整性被破坏和大量炎症因子释放为特征的细胞死亡方式,是最近几年细胞死亡领域的研究热点之一^[6]。程序性坏死与神经退行性疾病的发生和发展关系密切^[7-8],但铅是否引起神经细胞程序性坏死尚未见报道。BV2细胞是来源于RAF/myc永生化的新生小胶质细胞,是原代小胶质细胞最常用的替代品^[9]。本研究通过建立BV2细胞铅毒性模型,探讨程序性坏死在铅神经毒性中的作用及其抑制剂对铅诱导BV2细胞损伤的影响,以此探寻铅致神经退行性病变的新机制,为重金属致神经退行性病变的防治提供新的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂

醋酸铅(成都金山化学试剂有限公司,中国);胎牛血清、DMEM培养基、青链霉素、磷酸盐缓冲液、0.25%(体积分数)胰蛋白酶、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl

sulfoxide, DMSO)(Gibco, 美国); β -actin、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、受体相互作用蛋白激酶1(receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)、磷酸化RIPK1(phosphorylation of RIPK1, p-RIPK1)、混合谱系蛋白激酶样结构域蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)、磷酸化MLKL(phosphorylation of MLKL, p-MLKL)、受体相互作用蛋白激酶3(receptor-interacting protein kinase 3, RIPK3)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)(CST, 美国);程序性坏死抑制剂(Necrostatin-1, Nec-1; MCE, 美国);酶联免疫吸附检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,中国);BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,中国);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物技术有限公司,中国)。

1.2 细胞培养与传代

小鼠BV2细胞复苏后置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%(体积分数) CO_2 、饱和水蒸气的培养箱中培养,其完全培养基为含有10%(体积分数)胎牛血清和1%(体积分数)青链霉素混合液的DMEM培养基。每天观察细胞状态,每隔一天更换一次培养基。待细胞密度达到80%~85%(体积分数)时,采用胰蛋白酶消化,按照1:4的比例进行传代。取生长良好的对数生长期细胞用于后续实验。

1.3 MTT法测定细胞存活率

处于生长期的BV2细胞经0、1、5、10、25、50、100、 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅处理12、24、36、48 h后,更换新的培养基($100\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$),再加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ MTT($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%(体积分数) CO_2 、饱和湿度培养箱孵育4 h,弃掉孔内液体,并在每孔加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ DMSO。摇床

震荡 10 min, 充分溶解结晶后, 用波长 490 nm 的酶联免疫检测仪测定光密度(D)值; 每个样品设置 6 个复孔, 独立重复实验 3 次, 细胞存活率= $(D_{\text{各浓度组}}-D_{\text{空白组}})/(D_{\text{对照组}}-D_{\text{空白组}})$ 。根据 MTT 的结果及以往研究, 后续实验的染铅浓度设置为 25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [10-11]。

1.4 酶联免疫吸附法测定 TNF- α 浓度

BV2 细胞经 0、25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅处理 24 h, 离心后收集上清液。按照酶联免疫吸附检测试剂盒说明, 每个样品设置 3 个复孔, 独立重复实验 3 次, 用酶联免疫检测仪在 492 nm 处测量样本的 D 值, 计算样本中 TNF- α 的浓度。计算方法: 以标准品 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D 值在 Excel 中作图, 得出标准曲线和公式。所有 D 值减去空白管的值后, 根据标准曲线公式换算出相应样品中 TNF- α 浓度。

1.5 蛋白免疫印记法测定 RIPK3、RIPK1、MLKL 及其磷酸化蛋白的表达

BV2 细胞用 0、25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅处理 24 h 后, 提取细胞蛋白, 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明测定每个样品蛋白的浓度, 再将各组蛋白调整到同一浓度, 加入 1 $\times$ SDS 蛋白示踪上样缓冲液, 充分混匀后置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 制备样品, 使蛋白变性。根据目标蛋白分子量选择合适的分离胶浓度, 按照 SDS-PAGE 凝胶试剂盒说明书依次加入试剂制胶, 加样后进行凝胶电泳分离蛋白, 采用湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上, 5% (体积分数) 脱脂牛奶 (50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 摇床封闭 1 h 后, 用 TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次, 加入一抗 (稀释比例 1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。用 TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次, 加入二抗 (稀释比例 1:5000), 摇床室温孵育 1 h。滴加适量化学发光底物, 用凝胶成像仪进行扫描成像和拍照。采用 Image J 软件进一步分析蛋白条带的灰度值, 检测蛋白的相对表达量, 记录数据。

1.6 流式细胞术检测细胞坏死及凋亡率

将 BV2 细胞以 2.5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于 12 孔板, 每孔加入 1 mL 细胞培养液, 用 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Nec-1 处理 BV2 细胞 1 h (Nec-1 浓度和处理时间的设置参考文献 [12-14]), 然后将培养液弃掉, 分别加入 0、25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅处理 24 h, 具体分组如下: (A) 溶剂对照 (DMSO) 组; (B) Nec-1 组; (C) 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 组; (D) 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 组; (E) 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 组; (F) 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb+ Nec-1 组; (G) 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb+ Nec-1 组; (H) 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb+ Nec-1 组。各处理组的 BV2 细胞用磷酸盐缓冲液清洗 1 次, 加入 0.25% (体积分数)

胰酶消化, 转移至离心管, 3000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径 140 mm) 离心 5 min, 弃上清, 用 100 μL 结合缓冲液重悬细胞, 每管分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液各 5 μL , 吹打混匀, 室温避光孵育 20 min, 加入 400 μL 结合缓冲液, 上机, 用流式细胞仪检测细胞坏死及凋亡情况。

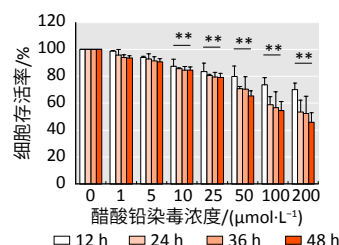
1.7 统计学分析

计量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 23.0 进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用最小显著差异法, 两组研究变量之间的线性相关程度采用 Pearson 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 醋酸铅对 BV2 细胞存活率的影响

MTT 结果显示, 与对照组比较, 染毒 12、24、36、48 h 后, 当醋酸铅染毒浓度达到 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即可引起 BV2 细胞存活率下降 ($P<0.01$); 且各染毒时间的细胞存活率均随着染毒浓度的增加而下降 ($r_{12\text{h}}=-0.995$, $r_{24\text{h}}=-0.984$, $r_{36\text{h}}=-0.983$, $r_{48\text{h}}=-0.981$, 均 $P<0.01$), 而在 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅染毒浓度下, 细胞存活率也随着染毒时间的延长而下降 ($r=-0.994$, $P<0.01$) (图 1)。



[注]**: 与相同处理时间的对照组比较, $P<0.01$ 。

图 1 醋酸铅对 BV2 细胞活性的影响 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Figure 1 Effect of lead acetate on BV2 cell viability ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

2.2 醋酸铅对 BV2 细胞 TNF- α 浓度的影响

染毒 24 h 后, 酶联免疫吸附检测结果显示, 与对照组比较, 25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅染毒 BV2 细胞的 TNF- α 浓度升高, 其中以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组最高 ($P<0.01$, 图 2)。

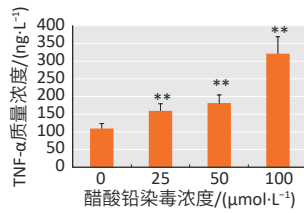
2.3 醋酸铅对 BV2 细胞程序性坏死相关蛋白 RIPK3、RIPK1、MLKL 及其磷酸化表达的影响

染毒 24 h 后, 与对照组比较, 25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组 BV2 细胞 RIPK1 及 MLKL 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$ 或 0.01, 图 3A、B、D); 当染铅浓度达到 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 即可使 BV2 细胞 p-RIPK1、p-MLKL 及 RIPK3 表达水平升高 ($P<0.01$, 图 3A、C、E、F)。

2.4 Nec-1 对染醋酸铅 BV2 细胞活性的影响

染毒 24 h 后, 与对照组比较, 25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

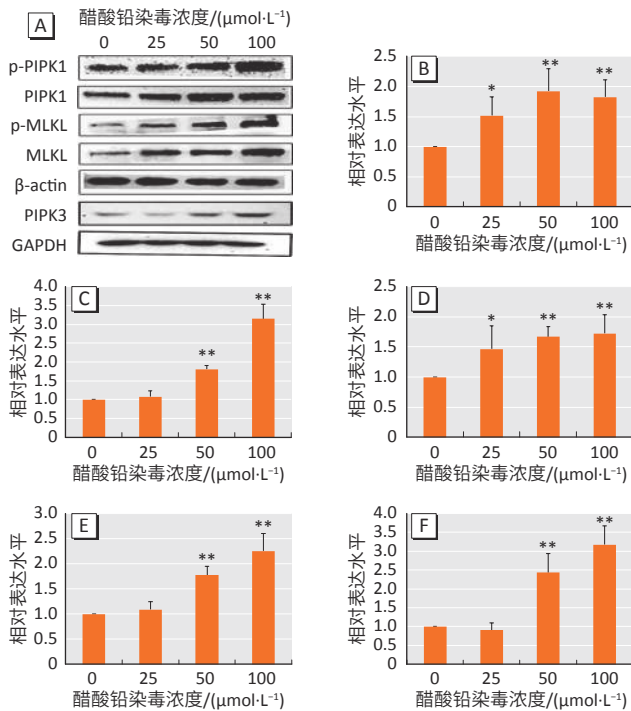
醋酸铅组 BV2 细胞活性降低, 而 Nec-1 预处理可使染铅 BV2 细胞活性升高($P < 0.05$ 或 0.01 , 图 4)。



[注] **: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

图 2 醋酸铅染毒 24h 对 BV2 细胞 TNF-α 浓度的影响 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

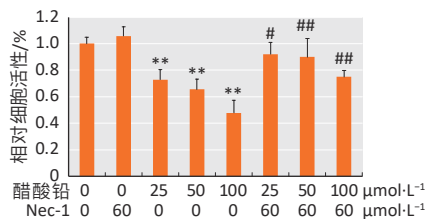
Figure 2 Effect of lead acetate exposure for 24 h on TNF-α concentration in BV2 cells ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)



[注] A: 蛋白条带图; B: RIPK1; C: p-RIPK1; D: MLKL; E: p-MLKL; F: RIPK3。与对照组比较, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

图 3 醋酸铅染毒 24h 对 BV2 细胞 RIPK3 和 RIPK1、MLKL 及其磷酸化表达的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Figure 3 Effects of lead acetate exposure for 24 h on expressions of RIPK3, RIPK1, MLKL, and their phosphorylation in BV2 cells ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)



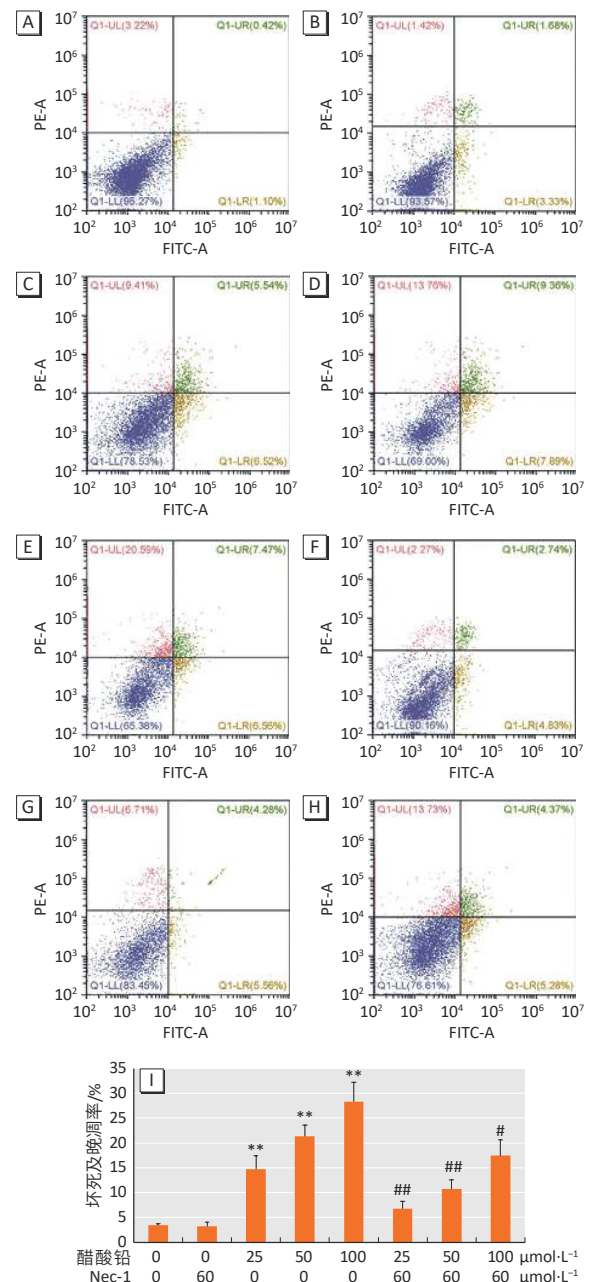
[注] 与对照组比较, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; 与相应的染铅组比较, #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$ 。

图 4 Nec-1 对染铅 BV2 细胞活性的影响 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Figure 4 Effects of Nec-1 on the lead-exposed BV2 cell viability ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

2.5 Nec-1 对染醋酸铅 BV2 细胞坏死及晚调率的影响

25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅组 BV2 细胞坏死及晚调率比对照组高($P < 0.01$); 与相应铅浓度组比较, Nec-1 可使染铅 BV2 细胞坏死及晚调率降低, 其中以 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 最为明显($P < 0.05$ 或 0.01 , 图 5)。



[注] A~H 为流式细胞图。A: 溶剂对照(DMSO)组; B: Nec-1 组; C: 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 组; D: 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 组; E: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 组; F: 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb+Nec-1 组; G: 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb+Nec-1 组; H: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb+Nec-1 组; I: 坏死及晚调率柱状图。与对照组比较, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; 与对应染铅组比较, #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$ 。

图 5 Nec-1 对染铅 BV2 细胞坏死及晚调率的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Figure 5 Effects of Nec-1 on necrosis and late apoptosis rate of lead-exposed BV2 cells ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

3 讨论

铅作为一种剧毒重金属,对各种器官和组织,特别是对中枢神经系统有许多有害影响。我国是全球最大的铅生产国和铅消费国(产量和消费量均居全球总产量和总消费量第一),导致我国人均铅暴露水平高于发达国家^[15]。因此,需要对铅中毒机制进行深入研究,提供可靠的科学信息支撑,以完善对铅中毒的预防和治疗体系。

小胶质细胞是中枢神经系统中驻留的巨噬细胞样细胞,在大脑的先天免疫和炎性神经病理中起着不可替代的作用^[16]。原代小胶质细胞对铅暴露的敏感性比星形胶质细胞更大^[17]。它在碎片的吞噬、突触的保护和维持以及中枢神经系统的免疫反应中扮演不同角色,特别是在神经退行性疾病及重金属神经毒性作用中发挥着“双刃剑”的作用^[18-19],包括铅的神经毒性。体内和体外研究结果均表明,铅可能通过破坏神经免疫系统功能而促进神经毒性^[20]。Wu 等^[21]的研究也发现,铅暴露可引起中枢神经系统损伤,并伴有小胶质细胞的激活。Liu 等^[22]的研究显示,铅可致成年大鼠海马小胶质细胞激活增多,进而出现神经元死亡。这与本研究的结果一致。此外, Sobin 等^[23]的研究结果提示,长期铅暴露可致小鼠小胶质细胞受损、增殖减慢,进而减少 C57BL/6 J 小鼠海马/齿状回小胶质细胞的数量。低剂量铅暴露与高剂量铅暴露小鼠的小胶质细胞平均体积存在差异,提示不同剂量铅暴露引起的神经免疫破坏类型不同^[24-25]。本研究结果显示,当染铅浓度高于 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 即可使 BV2 细胞存活率降低,并呈一定剂量依赖性。为进一步揭示铅诱导 BV2 细胞损伤的时间效应,本研究通过设计不同染毒时间,发现在醋酸铅染毒浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, BV2 细胞活性随染毒时间的增加而呈下降趋势,提示铅对 BV2 细胞的损伤程度随着染毒时间延长而增大。而其他较高染毒浓度组的时间-效应均无统计学意义,这可能与染毒浓度增大时 BV2 细胞死亡率过高有关。

程序性细胞坏死由 RIP1/RIP3/MLKL 途径介导,与多种神经退行性疾病有关^[26-27]。例如,尸检结果发现阿尔茨海默病病人脑出现程序性坏死,表现为 RIPK1、MLKL 及 p-MLKL 蛋白表达升高,其坏死程度与脑重和认知评分呈负相关^[28]。本研究结果发现,当铅染毒浓度大于 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, BV2 细胞程序性坏死标志蛋白 RIPK3 和 RIPK1、MLKL 及其磷酸化的表达水平均升高,并伴有上清液 TNF- α 含量升高。RIPK1 和 RIPK3 在激活细胞死亡和炎症信号的传导中具有重要作用,

而 TNF- α 是一种重要的促炎细胞因子,参与介导多种人类炎症和退行性疾病。本研究结果提示,铅可能通过引起神经细胞程序性坏死降低小胶质细胞活性,而 TNF- α 可能是参与铅中毒引起的神经细胞程序性坏死的重要因子之一。

以往研究显示,程序性坏死可能在重金属(包括铝和锰等)引起的神经退行性病变中起到重要作用^[29];而 Nec-1 可抑制铝引起的神经细胞坏死,从而改善该毒物引起的认知行为障碍^[30]。体外研究显示,低氧环境可诱导小鼠原代小胶质细胞和小胶质细胞系上调 RIP1/RIP3/MLKL 发生程序性坏死,并发现该过程可被 RIPK1 抑制剂 Nec-1 阻断^[31]。Nec-1 可通过降低 β -淀粉样蛋白和 tau 蛋白异常减轻 APP/PS1 小鼠模型的认知障碍^[32]。本研究结果发现, Nec-1 预处理可以使染铅的 BV2 细胞活性升高,坏死及晚调率降低,提示 Nec-1 对铅中毒引起的小胶质细胞程序性死亡具有一定的干预作用。上述均表明,抑制 RIPK1 可能是神经退行性疾病的一个治疗新靶点^[33]。而 Nec-1 是否在体外和体内水平分别对 RIPK1、MLKL 及其磷酸化表达产生影响以及其机制,还需要进一步探讨。

综上,铅暴露可致 BV2 细胞活性降低,坏死及晚调率升高,细胞程序性坏死标志蛋白 RIPK1、RIPK3 及 MLKL 表达上升,而 RIPK1 抑制剂 Nec-1 对铅引起的细胞存活率降低和坏死及晚调率升高具有一定的干预作用,提示程序性坏死可能在铅神经毒性中发挥重要作用。

参考文献

- [1] WILLIAMS RJ, HOLLADAY SD, WILLIAMS SM, et al. Environmental lead and wild birds: a review[J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2018, 245: 157-180.
- [2] SANTA MARIA MP, HILL BD, KLINE J. Lead (Pb) neurotoxicology and cognition[J]. *Appl Neuropsychol Child*, 2019, 8(3): 272-293.
- [3] ZHOU CC, HE YQ, GAO ZY, et al. Sex differences in the effects of lead exposure on growth and development in young children[J]. *Chemosphere*, 2020, 250: 126294.
- [4] United Nations International Children's Emergency Fund and Pure Earth. The Toxic Truth: Children's Exposure to Lead Pollution Undermines a Generation of Future Potential[R]. New York: UNICEF and Pure Earth, 2020.
- [5] 世界卫生组织. 铅中毒[EB/OL]. [2021-11-10]. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>.
World Health Organization. Lead poisoning and health [EB/OL]. [2021-11-10]. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>.
- [6] SHAN B, PAN H, NAJAFOV A, et al. Necroptosis in develo-

- pment and diseases[J]. *Genes Dev*, 2018, 32(5/6): 327-340.
- [7] ZHANG S, TANG MB, LUO HY, et al. Necroptosis in neurodegenerative diseases: a potential therapeutic target[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): e2905.
- [8] MOTAWI TM K, ABDEL-NASSER ZM, SHAHIN NN. Ameliorative effect of necrosulfonamide in a rat model of Alzheimer's disease: targeting mixed lineage kinase domain-like protein-mediated necroptosis[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(20): 3386-3397.
- [9] SONG GJ, SUK K. Pharmacological modulation of functional phenotypes of microglia in neurodegenerative diseases[J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 139.
- [10] ZHANG J, ZHENG Y, LUO Y, et al. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/TLR4/NF- κ B pathways in BV2 cells[J]. *Mol Immunol*, 2019, 116: 29-37.
- [11] ZHANG C, ZHAN J, ZHAO M, et al. Protective mechanism of Taxifolin for chlorpyrifos neurotoxicity in BV2 cells[J]. *Neurotoxicology*, 2019, 74: 74-80.
- [12] HAN XA, JIE HY, WANG JH, et al. Necrostatin-1 ameliorates neutrophilic inflammation in asthma by suppressing MLKL phosphorylation to inhibiting NETs release[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 666.
- [13] HSU TS, YANG PM, TSAI JS, et al. Attenuation of cadmium-induced necrotic cell death by necrostatin-1: potential necrostatin-1 acting sites[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 235(2): 153-162.
- [14] LUO J, TAO Y, LIANG X, et al. Flow control effect of necrostatin-1 on cell death of the NRK-52 E renal tubular epithelial cell line[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 57-62.
- [15] OBENG-GYASI E. Sources of lead exposure in various countries[J]. *Rev Environ Health*, 2019, 34(1): 25-34.
- [16] REGEN F, HELLMANN-REGEN J, COSTANTINI E, et al. Neuroinflammation and Alzheimer's disease: implications for microglial activation[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14(11): 1140-1148.
- [17] PENG J, ZHOU F, WANG Y, et al. Differential response to lead toxicity in rat primary microglia and astrocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 363: 64-71.
- [18] LIDDELOW SA, GUTTENPLAN KA, CLARKE LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.
- [19] BAIK SH, KANG S, LEE W, et al. A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(3): 493-507.e6.
- [20] KRAFT AD, HARRY GJ. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2011, 8(7): 2980-3018.
- [21] WU L, LI S, PANG S, et al. Effects of lead exposure on the activation of microglia in mice fed with high-fat diets[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(9): 1923-1931.
- [22] LIU JT, CHEN BY, ZHANG JQ, et al. Lead exposure induced microgliosis and astrogliosis in hippocampus of young mice potentially by triggering TLR4-MyD88-NF κ B signaling cascades[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 239(2): 97-107.
- [23] SOBIN C, MONTOYA MG, PARISI N, et al. Microglial disruption in young mice with early chronic lead exposure[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 220(1): 44-52.
- [24] FLORES-MONTOYA MG, BILL CA, VINES CM, et al. Early chronic low-level lead exposure reduced C-C chemokine receptor 7 in hippocampal microglia[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 314: 106-116.
- [25] BAKULSKI KM, DOU JF, THOMPSON RC, et al. Single-cell analysis of the gene expression effects of developmental lead (Pb) exposure on the mouse hippocampus[J]. *Toxicol Sci*, 2020, 176(2): 396-409.
- [26] LIN QS, CHEN P, WANG WX, et al. RIP1/RIP3/MLKL mediates dopaminergic neuron necroptosis in a mouse model of Parkinson disease[J]. *Lab Invest*, 2020, 100(3): 503-511.
- [27] YUAN J, AMIN P, OFENGEIM D. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(1): 19-33.
- [28] CACCAMO A, BRANCA C, PIRAS IS, et al. Necroptosis activation in Alzheimer's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(9): 1236-1246.
- [29] OU CY, LUO YN, HE SN, et al. Sodium *P*-aminosalicylic acid improved manganese-induced learning and memory dysfunction via restoring the ultrastructural alterations and γ -aminobutyric acid metabolism imbalance in the basal ganglia[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 176(1): 143-153.
- [30] ZHANG QL, LI MQ, JIA X, et al. Necrostatin-1 inhibits the degeneration of neural cells induced by aluminum exposure[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2013, 31(5): 543-555.
- [31] HE C, LIU Y, HUANG Z, et al. A specific RIP³⁺ subpopulation of microglia promotes retinopathy through a hypoxia-triggered necroptotic mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(11): e2023290118.
- [32] OFENGEIM D, MAZZITELLI S, ITO Y, et al. RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(41): E8788-E8797.
- [33] ITO Y, OFENGEIM D, NAJAFOV A, et al. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS[J]. *Science*, 2016, 353(6299): 603-608.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)