

利福平预处理通过 Nrf2 减轻帕金森病小胶质细胞的氧化损伤

梁嫣然¹, 林淡钰¹, 陈颖¹, 毕伟², 曾志芬¹, 井秀娜¹, 伍霞¹, 陶恩祥^{1*}

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院神经内科, 广东广州 510120; 2. 暨南大学附属第一医院神经内科, 广东广州 510630)

摘要:【目的】探讨利福平对鱼藤酮诱导的 BV2 小胶质细胞氧化损伤中的核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)信号通路的影响。【方法】利用鱼藤酮刺激的 BV2 小胶质细胞建立帕金森病氧化应激的模型, 分别用不同浓度的利福平预处理 BV2 小胶质细胞, CCK-8 法检测细胞存活率; 分别用双氯荧光素(DCFH-DA)、罗丹明 123 染色后使用流式细胞仪检测活性氧(ROS)水平和线粒体膜电位(MMP); 使用脂质氧化检测试剂盒测定细胞内脂质过氧化终产物丙二醛(MDA)的含量。采用 Western Blot 法检测利福平对小胶质细胞 Nrf2 核转位以及血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白表达的影响。用 siRNA 抑制 HO-1 基因表达后用 CCK-8 法检测利福平对鱼藤酮诱导的氧化损伤的影响。【结果】与空白对照组相比, 鱼藤酮刺激下 BV2 小胶质细胞的细胞活力明显降低。鱼藤酮可引起 BV2 细胞内 ROS 和 MDA 的水平显著升高以及 MMP 明显下降。利福平预处理可以降低鱼藤酮所引起的 ROS 和 MDA 的产生, 以及逆转鱼藤酮对 MMP 的降低作用; 利福平能够诱导 Nrf2 的核转位及上调 HO-1 蛋白的表达。使用 siRNA 抑制 HO-1 基因表达后, 可逆转利福平预处理对鱼藤酮诱导的氧化损伤的抑制作用。【结论】利福平可能通过激活 Nrf2 信号通路, 减轻鱼藤酮诱导的帕金森病小胶质细胞模型的氧化损伤。

关键词: 帕金森病; 利福平; 鱼藤酮; 核因子 E2 相关因子 2; 小胶质细胞

中图分类号: R74 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2016)02-0190-07

Rifampicin Pretreatment Inhibits Oxidative Damage of Microglia via Nrf2 Signaling Pathway in Parkinson's Disease

LIANG Yan-ran¹, LIN Dan-yu¹, CHEN Ying¹, BI Wei², ZENG Zhi-fen¹, JING Xiu-na¹, WU Xia¹, TAO En-xiang^{1*}

(1. Department of Neurology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: TAO En-xiang; E-mail: taoenxiang@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of rifampicin on Nrf2 signal pathway during protection against rotenone-induced oxidative damage in BV2 microglia. 【Methods】 The in vitro model to assess the mechanism of oxidative stress in Parkinson's disease (PD) was established by adding rotenone to BV2 cells. The cell viability was measured by CCK-8 assay. Furthermore, the intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membranepotential (MMP) were detected by flow cytometry after dyed with DCFH-DA and Rhodamine123, respectively. The level of malondialdehyde(MDA) was measured according to the protocol of Lipid Oxidation Products Detection Kit. The effects of rifampicin on nuclear translocation of Nrf2 and protein expression of hemeoxygenase-1 (HO-1) were measured by western blot. After transfection with siRNA targeting HO-1 gene, the effect of rifampicin on rotenone-induced cytotoxicity was evaluated by CCK-8 assay. 【Results】 Compared with the control group, the cell viability of BV2 cells decreased obviously, and intracellular ROS and MDA levels increased significantly, but MMP decreased markedly in rotenone group. However, such trends could be reversed in the rifampicin pretreatment group. Moreover, rifampicin could induce nuclear translocation of Nrf2

收稿日期: 2015-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(81503052); 广东省医学科研基金(B2014130); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201410558098); 广东省自然科学基金(2014A030313202); 2014年广东省公益研究与能力建设专项资金(2014A020212164)

作者简介: 梁嫣然, 医学博士, E-mail: xiaoquezizi@163.com; 陶恩祥, 通信作者, 教授, 主任医师, E-mail: taoenxiang@163.com

and significantly increase protein expression of HO-1 when compared with rotenone group. After knocking down the expression of HO-1 using siRNA, the inhibitory effect of rifampicin on cytotoxicity induced by rotenone was reversed. 【Conclusion】 Rifampicin may protect against damage of oxidative stress in PD via activation of Nrf2 signaling pathway.

Key word: Parkinson's disease; rifampicin; rotenone; Nrf2; microglia

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2016, 37(2): 190-196]

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的神经系统变性疾病, 主要表现为静止性震颤, 运动迟缓, 肌强直, 姿势步态异常等。PD 的病理改变主要表现为中脑黑质致密部多巴胺能神经元进行性缺失, 纹状体多巴胺能水平下降等等。尽管 PD 的研究已有 190 多年的历史, 但是目前其发病机制尚未完全明确, 可能是多种因素, 如氧化应激、线粒体功能障碍^[1]、蛋白质错误折叠和聚集^[2]、细胞凋亡^[3]等共同参与的结果。由于各种致病因素均可能通过氧化应激这一共同的通路造成神经元的损伤, 所以对氧化应激的研究是目前 PD 防治的研究热点^[4-5]。小胶质细胞是机体固有免疫的重要组成部分, 在 PD 中是产生氧自由基 (ROS) 的重要来源^[6]。本课题组既往的研究表明利福平在体内外有神经保护作用以及调控免疫的功能^[7-8]。所以, 为了进一步探索利福平如何调控神经毒素对小胶质细胞产生的氧化应激损伤, 本研究拟采用 BV2 小胶质细胞为研究对象, 研究利福平在拮抗鱼藤酮刺激对小胶质细胞产生氧化应激损伤的影响, 并探讨其保护作用是否与核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路有关, 从而明确利福平在帕金森病治疗中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

小鼠的 BV2 小胶质细胞由本实验保存; DMEM-F12 培养基、胎牛血清购自美国 Life Technologies 公司; 利福平、鱼藤酮购自美国 sigma 公司; CCK-8 试剂购自日本 Dojindo 公司; DCFH-DA 染液、罗丹明 123 染液、脂质氧化检测试剂盒、核蛋白抽提试剂盒以及 BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒购自上海碧云天公司; HO-1、Nrf2、 β -actin、Histone H3 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 靶向 Nrf2、HO-1 的 siRNA 和阴性对照 siRNA 购自吉格生物公司。FACS Calibur 流式细胞仪购自美

国 Becton Dickinson 公司。

1.2 细胞培养

在 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂ 孵育条件下, 将小鼠来源的 BV2 小胶质细胞培养在含有体积分数 10% 小牛血清的 DMEM-F12 培养基中。当单层细胞融合度达 85% 时, 用胰酶消化后以 1:5 传代。

1.3 细胞活力测定

选取对数生长期的 BV2 细胞, 以 5×10^4 /mL 的密度接种在 96 孔培养板中, 细胞贴壁 24 h 后, 根据实验需要给予不同的药物处理, 每个处理组有 6 个复孔。在相应的检测时间点终止反应, 每孔分别加入 10 μ L CCK-8 试剂, 在 37 °C 继续孵育 2 h 后, 用酶标仪检测 490 nm 波长处每孔的吸光度 (absorbance, A), 计算细胞存活率。细胞存活率 = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{处理组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.4 细胞内 ROS 含量的定量检测

将 BV2 细胞以 2×10^5 /mL 的密度接种在 24 孔培养板中贴壁 24 h 后, 给予 50 μ mol/L 利福平预处理 2 h, 然后给予 1 μ mol/L 鱼藤酮刺激 2 h, 弃去上清并用 1 \times PBS 清洗 3 次, 每孔加入 10 μ mol/L DCFH-DA 染液, 在 37 °C 孵育 30 min 后使用流式细胞仪检测各组细胞的平均荧光强度。

1.5 线粒体膜电位的检测

将 BV2 细胞以 2×10^5 /mL 的密度接种在 24 孔培养板中贴壁 24 h 后, 给予 50 μ mol/L 利福平预处理 2 h, 然后给予 1 μ mol/L 鱼藤酮刺激 2 h, 弃去上清并用 1 \times PBS 清洗 3 次, 每孔加入罗丹明 123 染液, 在 37 °C 孵育 30 min 后用流式细胞仪检测各组细胞的平均荧光强度。

1.6 细胞内 MDA 含量的定量检测

将 BV2 细胞以 5×10^5 /mL 的密度接种在 6 孔培养板中贴壁 24 h 后, 给予 50 μ mol/L 利福平预处理 2 h, 然后给予 1 μ mol/L 鱼藤酮刺激 12 h 后, 弃去上清并用 1 \times PBS 清洗 3 次, 根据 MDA 试剂盒说明书的方法制备蛋白样品。具体步骤如下: 在冰浴下用 RIPA 细胞裂解液裂解, 12 000 \times g 离

心 10 min 取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,然后将样品蛋白上清与 MDA 工作液混合后,用酶标仪在 532 nm 测定样本吸光度,结合标准品制备的标准曲线测得各组细胞 MDA 的浓度。

1.7 核蛋白提取

细胞经过处理后,在相应的检测时间点使用细胞核蛋白抽提试剂盒提取样品的核蛋白。具体步骤如下:收集细胞后加入含有 PMSF 的细胞浆蛋白抽提试剂 A,最高速剧烈涡旋振荡 5 s,把细胞沉淀完全悬浮并分散开。冰浴 10 min 后加入细胞浆蛋白抽提试剂 B,最高速涡旋振荡 5 s,冰浴 1 min 后涡旋振荡 5 s,在离心 5 min(4 °C, 12 000 ×g)。立即吸取上清至一预冷的塑料管中,即为抽提得到的细胞浆蛋白。然后向沉淀加入 50 μL 含 PMSF 的细胞核蛋白抽提试剂,最高速剧烈涡旋振荡 30 s,然后放回冰浴中,每隔 1 ~ 2 min 再高速剧烈涡旋振荡 30 s,共 30 min。离心 10 min(4 °C, 12 000 ×g),立即吸取上清至一预冷的塑料管中,即为抽提得到的细胞核蛋白。目的蛋白相对表达量为目的条带与内参 Histone H3 的光密度比值。

1.8 Western Blot

BCA 法测定蛋白浓度后,将等量的各组蛋白分别上样,经过 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和电转后将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,使用 Nrf2 抗体(1:500)、HO-1 抗体(1:1 000)、β-actin 抗体(1:1 000)和 Histone H3 抗体(1:1 000)4 °C 孵育过夜后,分别加入相应的二抗(1:5000)室温孵育 1 h, TBST 漂洗(10 min × 3 次),碱性磷酸酶法显色。目的蛋白相对表达量为目的条带与内参 β-actin 的光密度比值。

1.9 siRNA 转染

将 BV2 细胞接种到 6 孔板上,密度为 1×10^6 个/孔,培养 24 h 后细胞汇合达 30% ~ 50%,根据 Lipo2000 说明书,取 5 μL 的 Lipo2000 与 100 pmol siRNA 加入孔板中,进行细胞转染 4 h 后重新换入新鲜的、且与实验组相同的细胞培养液中继续培养 20 h,送流式细胞仪检测转染率。

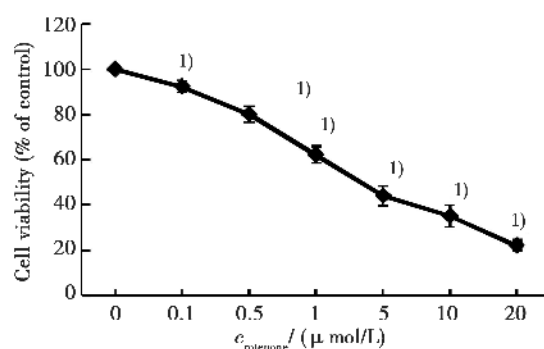
1.10 统计分析

实验重复测定 3 次。应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。计量数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鱼藤酮诱导的细胞毒性呈剂量依赖性

如图 1 所示,将未处理组的细胞设为对照组,其存活率设为 100%,不同浓度的鱼藤酮(0.1 ~ 20 μmol/L)作用于 BV2 小胶质细胞的 24 h 后,与对照组比较,可明显降低小胶质细胞的细胞活力,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而且 1 μmol/L 鱼藤酮的处理可以使细胞存活率下降至 50%,所以主要采用该浓度进行后续实验。



The BV2 cells were stimulated by rotenone for 24 h. The cell viability is represented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). 1) $P < 0.05$ in comparison to blank control.

图 1 鱼藤酮对 BV2 细胞活力的影响

Fig.1 Effect of rotenone on cell viability of BV2 cells

2.2 利福平保护 BV2 小胶质细胞对抗鱼藤酮诱导的细胞活力下降

我们使用不同浓度利福平(0 ~ 50 μmol/L)预处理 2 h 后加入 1 μmol/L 鱼藤酮,24 h 后使用 CCK-8 法检测细胞活力。与空白对照组相比,1 μmol/L 鱼藤酮可明显降低细胞生存率,差异有统计学意义($P < 0.05$);与鱼藤酮单独处理组相比,50 μmol/L 利福平可使 BV2 小胶质细胞的存活率明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。所以,主要采用 50 μmol/L 利福平进行后续实验。

2.3 利福平减少鱼藤酮引起的细胞内 ROS 的产生

荧光探针 DCFH-DA 是一种细胞穿透性强而没有荧光的活细胞染料,进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCF。而 DCF 的细胞通透性弱,从而使探针很容易被装载到细胞内。在细胞内的活性氧作用下,无荧光的 DCFH 可以被氧化生成发出荧光的 DCF。因此,检测 DCF 的荧光可了

表 1 利福平对鱼藤酮诱导的 BV2 细胞活力的影响

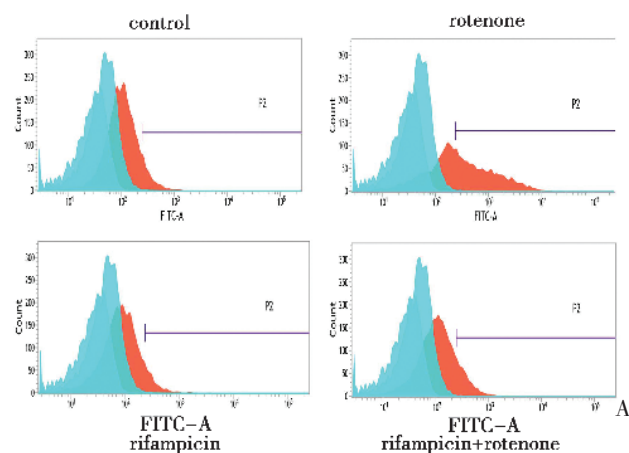
Group	Cell viability (% of control) ($\bar{x} \pm s$)
Control	100.00 \pm 0.00
Rotenone	62.27 \pm 3.78 ¹⁾
Rifampicin 50 μ mol/L	98.57 \pm 1.26 ²⁾
Rifampicin 25 μ mol/L + Rotenone	71.83 \pm 3.27 ^{1) 2)}
Rifampicin 50 μ mol/L + Rotenone	84.27 \pm 2.35 ²⁾

The BV2 cells were subjected to rifampicin with different concentrations for 2 h, followed by exposure to rotenone for 24 h. Cell viability is represented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). 1) $P < 0.05$ in comparison to control; 2) $P < 0.05$ in comparison to rotenone group.

解细胞内活性氧的水平。BV2 细胞经过相应处理后进行 DCFH-DA 染色以及流式细胞仪检测平均荧光强度, 结果如图 2A 所示。然后将各实验组与空白对照组相比后获得 DCF 相对荧光强度, 图 2B 反映了 3 次重复实验的统计结果。与对照组相比, 1 μ mol/L 鱼藤酮可显著增加细胞内 ROS 的产生, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。当 50 μ mol/L 利福平预处理后再加入 1 μ mol/L 鱼藤酮刺激细胞, 与鱼藤酮组相比, 可抑制细胞内 ROS 的水平, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 利福平对鱼藤酮介导的线粒体膜电位改变的影响

罗丹明 123 的荧光强度可间接提示线粒体膜



The BV2 cells were pretreated with rifampicin for 2 h, followed by exposure to rotenone for 24 h. A: Green fluorescence of DCF of each group was detected by flow cytometry. B: Intracellular ROS is represented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). 1) $P < 0.05$ in comparison to control; 2) $P < 0.05$ in comparison to rotenone group. Abbreviation: Rot—rotenone, Rif—rifampicin.

图 2 流式细胞术检测不同处理组 BV2 细胞内 DCF 荧光强度

Fig.2 The measurement of average fluorescence intensity of DCF in BV2 cells treated by rotenone using flow cytometry

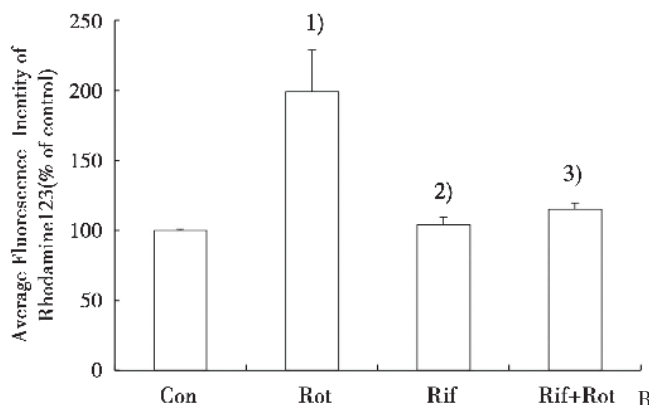
电位的改变, 我们进一步使用流式细胞仪进行荧光强度定量, 并获得各组的平均荧光强度与空白对照组平均荧光强度的相对比。如流式细胞术结果(图 3A)和源自 3 次实验的统计分析(图 3B)所示, 空白对照组、鱼藤酮组、50 μ mol/L 利福平+鱼藤酮组、50 μ mol/L 利福平组的平均荧光强度相对比分别为 (99.60 \pm 0.53)%、(62.65 \pm 7.51)%、(79.81 \pm 4.45)%、(93.14 \pm 5.83)%。

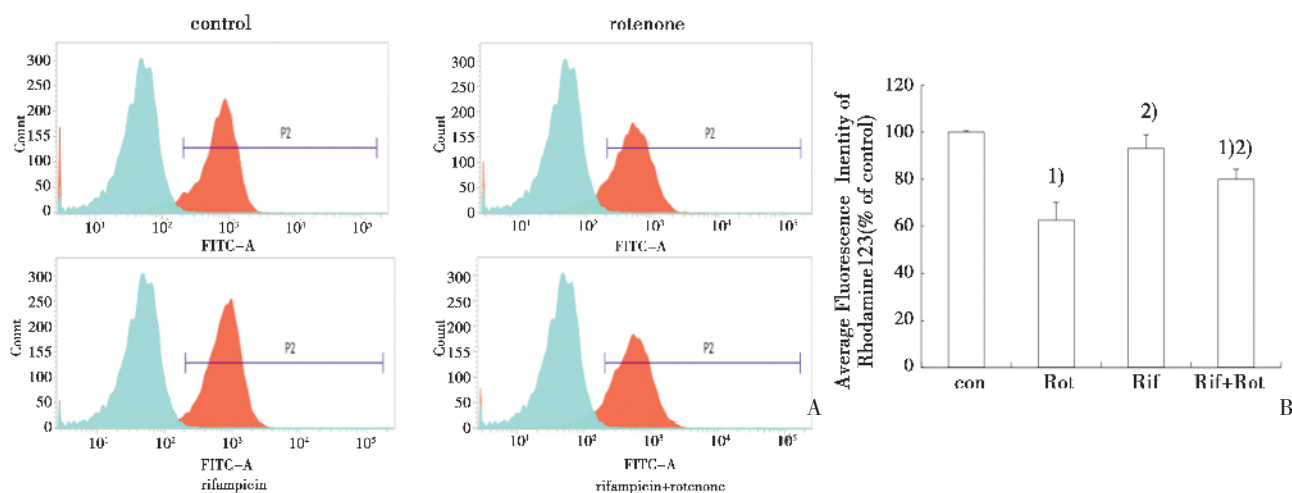
2.5 利福平减少鱼藤酮引起的 BV2 细胞内 MDA 的产生

接受不同实验组处理后 BV2 细胞内的 MDA 含量变化可通过 MDA 试剂盒反应后酶标仪测定的吸光度计算得到, 可测得空白对照组的细胞内 MDA 含量为 (2.65 \pm 0.38) nmol/mg。将各组实验组与空白对照组相比后获得 MDA 相对含量, 图 4 反映了 3 次重复实验的统计结果。与对照组相比, 1 μ mol/L 鱼藤酮可显著增加细胞内 MDA 的产生, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。当 50 μ mol/L 利福平预处理后再加入 1 μ mol/L 鱼藤酮刺激细胞, 与鱼藤酮组相比, 可抑制细胞内 MDA 的水平, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 利福平对 Nrf2 活化与核转位的影响

将利福平 (50 μ mol/L) 作用于 BV2 细胞不同时间 (0.5, 1, 2 h) 后用核蛋白抽提试剂盒提取各组细胞的核蛋白, 使用 Western Blot 检测核蛋白内 Nrf2 的表达, 以核蛋白 Histone H3 作为内参。与空

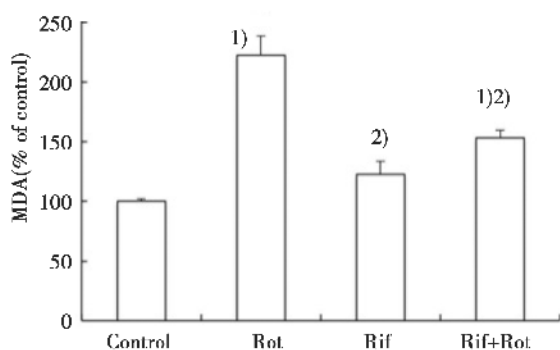




The BV2 cells were subjected to rifampicin for 2 h, followed by exposure to rotenone for 24 h. A. Fluorescence intensity of Rhodamine123 of each group was evaluated by flow cytometry. B. Mitochondrial membrane potential of each group is represented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). 1) $P < 0.05$ in comparison to control; 2) $P < 0.05$ in comparison to rotenone group. Abbreviation: Rot-rotenone, Rif-rifampicin.

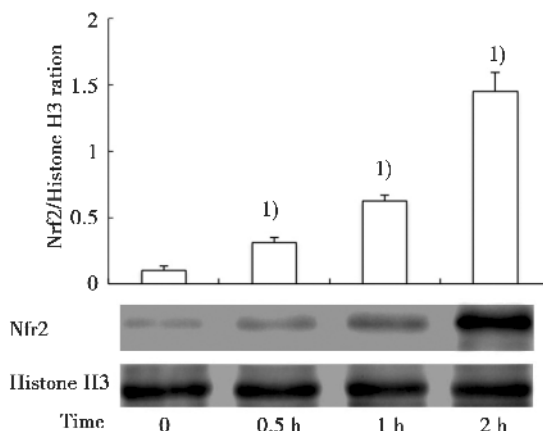
图 3 不同处理组 BV2 细胞内罗丹明 123 荧光强度对比

Fig.3 The comparison of Rhodamine 123 relative intensity of fluorescence in BV2 cells exposed to different treatment groups



The BV2 cells were subjected to rifampicin for 2 h, followed by exposure to rotenone for 24h. Intracellular MDA are represented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). 1) $P < 0.05$ in comparison to control; 2) $P < 0.05$ in comparison to rotenone group. Abbreviation: Rot-rotenone, Rif-rifampicin.

图 4 利福平对鱼藤酮诱导的 BV2 细胞内 MDA 含量的影响
Fig.4 Effect of rifampicin on MDA of rotenone-induced BV2 cells



Rifampicin was added into BV2 cell culture for different time duration, and then nuclear expression of Nrf2 was detected by Western blot. 1) $P < 0.05$ in comparison to blank control group.

图 5 利福平对 Nrf2 核转位的影响
Fig.5 Effect of rifampicin on nuclear translocation of Nrf2

HO-1 蛋白表达 ($P < 0.05$)。

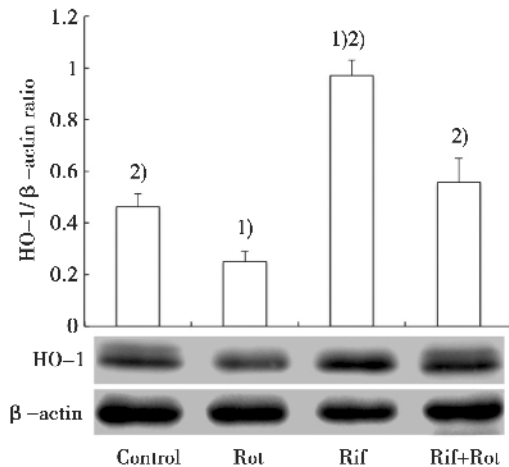
2.8 利福平通过激活 Nrf2 诱导 HO-1 表达

分别将 Nrf2-siRNA 与 Negative control siRNA (NC-siRNA) 转染 BV2 细胞 24 h 后检测 Nrf2 的蛋白表达。如图 7A 所示, 与 Control 组和 NC-siRNA 组相比, Nrf2-siRNA 组的 Nrf2 蛋白明显降低。我们进一步将细胞分为: 对照组、利福平组、Nrf2-

白对照组相比, 在 2 h 内, 利福平可呈时间依赖性促进 Nrf2 转位进入细胞核内 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.7 利福平对 HO-1 表达的影响

如图 6 所示, 与空白对照组相比, 鱼藤酮组中 HO-1 表达明显下降 ($P < 0.05$); 与鱼藤酮组相比, 利福平预处理组与利福平单药处理组可显著增加



The protein expressions of HO-1 were analyzed by Western blot. β -actin was employed as an internal control. HO-1/ β -actin ratios are represented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). 1) $P < 0.05$ in comparison to control; 2) $P < 0.05$ in comparison to rotenone group. Abbreviation: Rot - rotenone, Rif - rifampicin.

图 6 利福平对 HO-1 蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of rifampicin on protein expression of HO-1

siRNA+利福平组和 NC-siRNA+利福平组,检测各组细胞 HO-1 的蛋白表达。如图 7B 所示,与对照组和 Nrf2-siRNA+利福平组相比,利福平组中 HO-1 表达明显上升($P < 0.05$),而与 NC-siRNA+利福平组相比,利福平组中 HO-1 表达无明显差异。

2.9 HO-1 siRNA 和利福平对鱼藤酮诱导的细胞毒性的影响

如图 8A 所示,与 Control 组和 NC-siRNA 组相比,HO-1 siRNA 组的 HO-1 蛋白明显降低。将 HO-1 siRNA 与 Negative control siRNA (NC-siRNA) 转染 BV2 细胞 24 h 后分别给予“鱼藤酮”及“利福平预处理+鱼藤酮”干预。如图 8B 所示,与 NC-siRNA+鱼藤酮组相比,NC-siRNA+利福平+鱼藤酮组的细胞活力显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 NC-siRNA+利福平+鱼藤酮组相比,HO-1 siRNA+利福平+鱼藤酮组的细胞活力降至(69.0 ± 3.95)%,差异有统计学意义($P < 0.05$),HO-1 siRNA 可逆转利福平对鱼藤酮细胞毒性的拮抗作用。与 NC-siRNA+鱼藤酮组相比,HO-1 siRNA+鱼藤酮组的细胞活力无明显改变。

3 讨论

目前有充分的证据表明 PD 患者的黑质多巴

胺神经元受到氧化应激的损害^[5]。对 PD 患者死后的大脑尸检研究发现,黑质中一些氧化损害的标志物是显著增加的,包括脂质过氧化物丙二醛(MDA)及过氧化氢(H_2O_2)等等。流行病学调查也发现一些危险因素,如接触锰、杀虫剂及除草剂等外源性神经毒素,可增加 PD 的患病风险,其中氧化应激损伤是关键的参与机制之一^[9]。所以,使用安全有效的药物拮抗氧化应激,可能为 PD 的防治带来曙光。

利福平是一种广泛应用于治疗结核病和麻风病的传统药物,近年来研究表明,除了经典的杀菌作用外,利福平还具有调控免疫、抗凋亡和神经保护作用^[10]。我们及其他研究团队在 PD 的细胞和动物模型中发现利福平可有效抑制鱼藤酮等神经毒性药物对多巴胺神经元的损伤^[11-13]。由于小胶质细胞介导的神经炎症和氧化应激损伤被公认为是 PD 发病的重要机制。因此我们进一步研究利福平对鱼藤酮诱导的小胶质细胞氧化损伤的影响。

本实验结果表明,与对照组相比,鱼藤酮组可显著增加小胶质细胞内 ROS 和 MDA 的水平,以及引起线粒体膜电位的降低。而经过利福平预处理后,可降低小胶质细胞内 ROS 和 MDA 的含量,以及可逆转鱼藤酮对细胞线粒体膜电位的损害,这说明在小胶质细胞内,利福平可减轻鱼藤酮引起的氧化损伤。而这些结果与我们既往利用类神经元 PC12 细胞作为研究对象的结果是一致的^[8]。

Nrf2 是一种与细胞自我保护作用相关的重要转录因子,在拮抗氧化应激过程中发挥关键的调控作用^[14]。在细胞受到 ROS 或外源性毒物攻击时,Nrf2 可转位至细胞核,与抗氧化反应元件(antioxidant response elements,ARE)形成 Nrf2/ARE 通路,启动多种 II 相代谢酶及抗氧化酶的表达。其中,血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是受 Nrf2 信号通路调控的下游靶基因之一,作为内源性抗氧化蛋白酶参与维持机体氧化还原状态平衡。研究发现,在 PD 患者的黑质致密部 HO-1 蛋白表达增高^[15],过表达的 HO-1 可保护多巴胺神经元对抗 MPTP 介导的神经毒性^[16]。

所以我们进一步研究利福平是否通过 Nrf2 信号通路发挥拮抗小胶质细胞氧化损伤的作用。实验结果表明,鱼藤酮可抑制内源性抗氧化酶 HO-1 的表达,加重了小胶质细胞的氧化损伤。而利福平预处理可显著增加 Nrf2 的核转位,诱导下游解毒

酶和抗氧化靶基因酶,如 HO-1 的表达,增强小胶质细胞的抗氧化能力,减轻鱼藤酮诱导的氧化应激对小胶质细胞的损害,从而抑制其介导的下游一系列级联炎症反应而在 PD 中发挥神经保护作用。

综上所述,利福平预处理可减轻鱼藤酮对小胶质细胞的毒性,这可能与利福平通过 Nrf2 信号通路调控氧化应激而减少细胞损伤有关,本研究为利福平这种安全有效的“老药”治疗帕金森病等神经退行性疾病提供新思路和理论依据。

参考文献:

- [1] ANTONY PM, BOYD O, TREFOIS C, et al. Platelet mitochondrial membrane potential in Parkinson's disease [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2015, 2(1): 67-73.
- [2] PAIN C, DUMONT J, DUMOULIN M. Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena [J]. *Biochimie*, 2015, 111: 82-106.
- [3] YIN L, XIE Y, YIN S, et al. The S-Nitrosylation status of PCNA localized in cytosol impacts the apoptotic pathway in a Parkinson's Disease Paradigm [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117546.
- [4] GAKI GS, PAPAVALASSILOU AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's Disease [J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(2): 217-230.
- [5] BLESJA J, TRIGO-DAMAS I, QUIROGA-VARELA A, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease [J]. *Front Neuroanat*, 2015, 9:91.
- [6] SUZUMURA A. Microglia in neurodegenerative disorders and neuroinflammation [J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2014, 54(12): 1119-1121.
- [7] BI W, ZHU L, JING X, et al. Rifampicin and Parkinson's disease [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(2): 137-141.
- [8] 陈世文,孙元林,曾志芬,等.利福平对鱼藤酮致分化 PC12 细胞氧化应激的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2009, 30(04): 377-380.
- [9] CHEN S, SUN Y, ZENG Z, et al. Effects of rifampicin on rotenone-induced oxidative stress in differentiated PC12 cells [J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2009, 30(04): 377-380.
- [10] SANDERS LH, GREENAMYRE JT. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62: 111-120.
- [11] OIDA Y, KITAICHI K, NAKAYAMA H, et al. Rifampicin attenuates the MPTP-induced neurotoxicity in mouse brain [J]. *Brain Res*, 2006, 1082(1): 196-204.
- [12] XU J, WEI C, XU C, et al. Rifampicin protects PC12 cells against MPP+-induced apoptosis and inhibits the expression of an alpha-Synuclein multimer [J]. *Brain Res*, 2007, 1139: 220-225.
- [13] LIANG Y, LIU Z, SHUAI X, et al. Delivery of cationic polymer-siRNA nanoparticles for gene therapies in neural regeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(2012): 690-695.
- [14] 徐黎明,王涛.利福平对鱼藤酮诱导的神经细胞 SH-SY5Y 凋亡的抑制作用 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2008, 37(3): 329-331.
- [15] XU J, WANG T. Inhibitory effect of rifampicin on rotenone-induced apoptosis of SH-SY5Y cells [J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2008, 37(3): 329-331.
- [16] KUMAR H, KOPPULA S, KIM IS, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling in Parkinson disease: a promising multi therapeutic target against oxidative stress, neuroinflammation and cell death [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(8): 1015-1029.
- [17] SCHIPPER HM, LIBERMAN A, STOPA EG. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 1998, 150(1): 60-68.
- [18] HUNG SY, LIU HC, KANG KH, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 protects dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenylpyridinium [J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(6): 1564-1575.

(编辑 刘清海)