

尼古丁通过 PI3K/AKT 信号通路上调星形胶质细胞 HSF1 的表达*

董智慧^{1,2}, 任真奎^{1,2,3}, 吕 菊^{1,2}, 谢 鹏^{1,2}, 官志忠^{1,2,4}, 吴昌学^{1,2**}, 禹文峰^{1,2**}

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 黔西南州人民医院 检验科, 贵州 兴义 562400; 4. 贵州医科大学 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 研究尼古丁对星形胶质细胞热休克转录因子 1 (HSF1) 的表达的影响, 并探讨其机制。方法: 分离新出生 24 h 内乳鼠大脑皮质, 进行原代培养并鉴定为星形胶质细胞, 待细胞成熟后分为正常对照组、尼古丁处理组、PI3K/AKT 信号通路阻断剂 LY294002 处理组和尼古丁 + LY294002 处理组, 正常对照组不做任何处理; 尼古丁处理组用 5 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁分别处理星形胶质细胞 6、12、18、24 h; LY294002 处理组只加 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 处理; 尼古丁 + LY294002 处理组是先加 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 处理 2 h 后, 再加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁共同处理 18 h, 免疫印迹法观察各组 HSF1 蛋白的表达。结果: 与正常对照组相比, 尼古丁处理组星形胶质细胞内 HSF1 蛋白的表达上调 ($P < 0.05$); 与尼古丁处理组比较, LY294002 + 尼古丁处理组星形胶质细胞内 HSF1 表达明显受到抑制 ($P < 0.05$)。结论: 尼古丁通过 PI3K/AKT 信号通路上调星形胶质细胞 HSF1 蛋白表达。

[关键词] 原代星形胶质细胞; 热休克核转录因子 1; 尼古丁; PI3K/AKT 信号通路; 阿尔茨海默症

[中图分类号] R749.16 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)03-0259-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.03.003

Nicotine Upregulates HSF1 Expression via PI3K/AKT Signaling Pathway in Astrocytes

DONG Zhihui^{1,2}, REN Zhenkui^{1,2,3}, LV Ju^{1,2}, XIE Peng^{1,2}, GUAN Zhizhong^{1,2,4},
WU Changxue^{1,2}, YU Wenfeng^{1,2}

(1. Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital, Qianxinan Buyei and Miao Autonomous Prefecture, Xingyi 562400, Guizhou, China; 4. Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of nicotine on the expression of heat shock transcription factor 1 (HSF1) in astrocytes and explore its mechanism. **Methods:** To get primary rat astrocytes, the cerebral cortexes of newborn rats within 24 h were isolated, prepared for single cell suspension, cultured and verified using GFAP immunostaining. After astrocytes matured, they were divided into four groups: control group, nicotine group, LY294002 (PI3K/AKT inhibitor) group and the nicotine + LY294002 group. The control group was not given any treatment, ; the nicotine group was treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ nicotine for 6 h, 12 h, 18 h and 24 h, respectively; LY294002 group was given 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002; nicotine + LY294002 group was pretreated with 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 for 2 h and then

*[基金项目] 国家自然科学基金(批准号:81360199); 教育部科学技术研究项目(213032A); 贵州省国际科技合作计划项目[黔科合外 G 字(2013)7026 号]; 贵州省创新计划项目[黔教合协同创新中心(2014)06]; 贵州省教育厅项目(2015 年贵州省普通高等学校地方病和少数民族疾病防控创新团队); 贵州省科技厅计划课题[黔科合重大专项字(2014)6008]; 贵州省教育厅项目[黔教合外 G 字(2013)63]

** 通信作者 E-mail: 348921576@qq.com; wenfengyu2013@126.com

网络出版时间: 2019-03-23 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190323.1455.003.html>

treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ nicotine for 18 h. The expression levels of HSF1 protein were detected by immunoblotting. **Results:** Compared with the control group, HSF-1 level was upregulated in nicotine group ($P < 0.05$). HSF1 expression level was remarkably lower in LY294002 + nicotine group than that in nicotine group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Nicotine upregulates HSF1 expression through PI3K/AKT signaling pathway in astrocytes.

[**Key words**] primary astrocytes; heat shock nuclear transcription factor 1; nicotine; PI3K/AKT pathway; Alzheimer's disease

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以渐进性认知功能障碍,记忆力减退为特征的神经退行性疾病。研究证明,AD 是一种蛋白质错误折叠的神经退行性疾病^[1]。热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 是在应激条件下产生的一组分子伴侣蛋白质,在蛋白质错误折叠中起至关重要的作用。有研究证明,HSP 的表达保护细胞免受 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 毒性的影响^[2-4]。热休克蛋白转录因子 1 (HSF1) 是细胞 HSP 表达的主要调控因子,可激活多种 HSP 基因调控 HSP 的表达^[5-6]。在 AD 患者大脑中,HSF1 的活性显著降低。 $\alpha 7$ 胆碱能受体 ($\alpha 7$ cholinergic receptor, $\alpha 7$ nAChR) 是在神经细胞中高表达的一种门控受体,在 AD 中具有神经保护作用^[7]。有研究表明, $A\beta$ 会导致细胞内 HSF1 蛋白表达水平降低,过表达 HSF1 可以减轻 $A\beta$ 诱导的细胞凋亡和内质网应激^[8]。本课题组前期研究表明,用 $\alpha 7$ nAChR 激动剂尼古丁激活星形胶质细胞后能通过 PI3K/AKT 信号通路上调 HSP70,HSF1 是 HSP70 的上游调控因子,因此推测,是否星形胶质细胞也可以通过 $\alpha 7$ nAChR 调控 HSF1 的表达。因此,本研究培养原代星形胶质细胞,然后通过尼古丁激活星形胶质细胞的 $\alpha 7$ nAChR,通过免疫印迹法检测蛋白表达 HSF1 蛋白表达水平的变化,观察激活 $\alpha 7$ nAChR 对 HSF1 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

1~24 h 新生的 SD 大鼠由贵州医科大学动物实验中心提供,动物许可证号为 SCXK (黔) 2012-0004。胎牛血清、DMEM 培养基购于美国 Gico 公司, $\alpha 7$ nAChRs 激动剂尼古丁购于美国 sigma 公司,PI3K/AKT 信号通路阻断剂 LY294002、兔抗单克隆抗体 HSF1、HRP 标记的抗兔的二抗 (#7076) 和鼠抗 β -actin 单克隆抗体兔抗 (#7074) 购于美国 260

CST 公司,超敏电化学发光法 (ECL) 发光试剂盒和聚乙烯二氟 (PVDF) 膜购于美国 Millipore 公司,BCA 蛋白定量试剂盒和蛋白 Marker 买于美国 Thermo 公司,抗体稀释液、封闭液、十二烷基苯硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶配置试剂盒购自碧云天公司。

1.2 星形胶质细胞培养及鉴定

参照 McCarthy 等^[9] 和 Schildge 等^[10] 的方法分离培养星形胶质细胞并进行改良,分离新生 SD 大鼠大脑皮质组织,剪成约 1 cm^3 左右,用 0.25% 的胰酶消化并进行漂洗后,加入含 1% 双抗以及含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基,继续吹打成制成细胞悬液后接种于 25 cm^2 的培养瓶内,在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 恒温的条件下培养 24 h 后换液,之后每隔 2~3 d 换一次液直到细胞铺满整个瓶底,纯化后将细胞传 1~3 代。将细胞接种于 12 孔板内,用胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 进行细胞免疫荧光染色鉴定星形胶质细胞的纯度。

1.3 分组及加药处理

将培养好的星形胶质细胞纯化传代并鉴定后,以 3×10^8 个/L 的密度接种于 6 孔板内,待细胞密度长到约 80 % 后,分为对照组、尼古丁组、LY294002 组及尼古丁 + LY294002 组;对照组不做任何处理,尼古丁组用 5 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁分别处理星形胶质细胞 6、12、18 及 24 h,LY294002 组加入 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 星形胶质细胞 2 h,尼古丁 + LY294002 组先加 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 处理 2 h、再加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁共同处理 18 h。

1.4 免疫印迹法检测 HSF1 和 P-AKT (ser473) 蛋白表达水平

收集 6 孔板中的细胞,加入适量细胞裂解液,细胞冰上裂解 2 h 后,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液中的总蛋白,通过 BCA 蛋白定量试剂盒检测所提取细胞蛋白浓度。然后,通过免疫印迹法检测目的蛋白 HSF1 和 P-AKT (ser473) 蛋白表达

水平,以内参蛋白(β -actin/GAPDH)为内对照。用 ImageJ 软件分析出结果后计算 HSF1 和 P-AKT (ser473) 蛋白条带与 β -actin 或 GAPDH 像素灰度的比值作为蛋白表达相对水平。实验各重复 3 次,每次 3 个复孔。

1.5 统计学分析

用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析。组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 星形胶质细胞免疫荧光鉴定

星形胶质细胞纯化并传 3~4 代后,免疫荧光法检测星形胶质细胞标志性蛋白 GFAP 表达,在倒置荧光显微镜下观察,星形胶质细胞占有细胞的 95% 以上,可用于后续实验。见图 1。

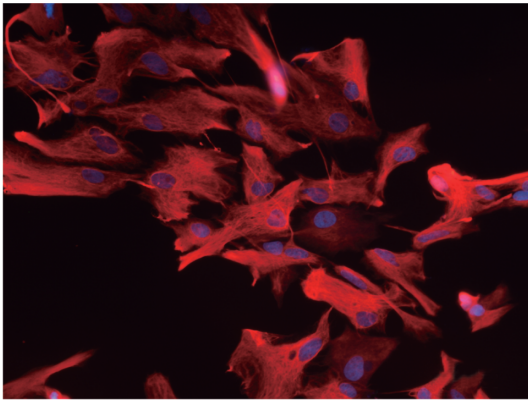


图 1 原代培养星形胶质细胞 GFAP 免疫荧光染色(200 ×)

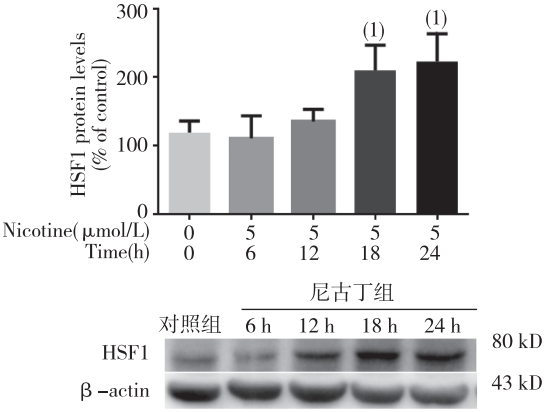
Fig. 1 GFAP expression in primary astrocytes detected by immunostaining

2.2 尼古丁上调 HSF1 蛋白表达水平

用 5 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁分别处理星形胶质细胞 6、12、18 及 24 h 后,通过免疫印迹法检测 HSF1 蛋白表达水平。结果显示,与对照组相比,尼古丁组 HSF1 蛋白表达水平均不同程度的升高,在 18 及 24 h 时升高最为明显($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 尼古丁显著上调 P-AKT (ser473) 蛋白表达水平

用 5 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁处理星形胶质细胞 18 h 后,通过免疫印迹法检测 P-AKT (ser473) 蛋白表达水平。结果显示,与对照组相比,尼古丁组 P-

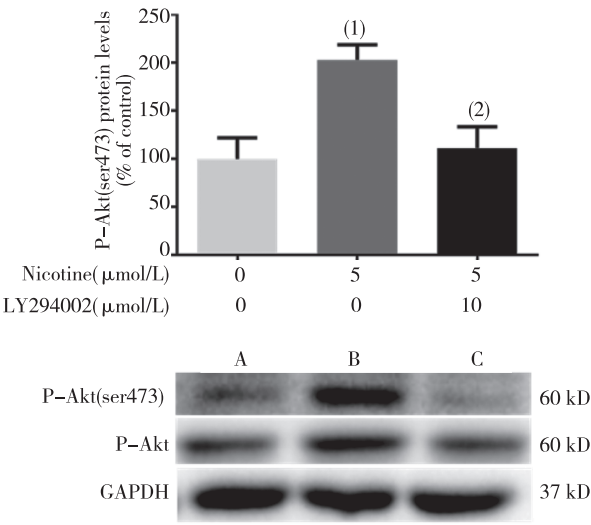


⁽¹⁾与对照组相比, $P < 0.05$

图 2 尼古丁上调 HSF1 蛋白表达水平

Fig. 2 Nicotine upregulated the HSF1 expression

AKT (ser473) 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。PI3K/AKT 信号通路阻断剂 LY294002 可以抑制尼古丁对 P-AKT (ser473) 蛋白表达的上调($P < 0.01$)。见图 3。



注:A 为对照组,B 为尼古丁组,C 为尼古丁 + LY294002 组;
⁽¹⁾与对照组相比, $P < 0.01$;⁽²⁾与尼古丁组相比, $P < 0.01$

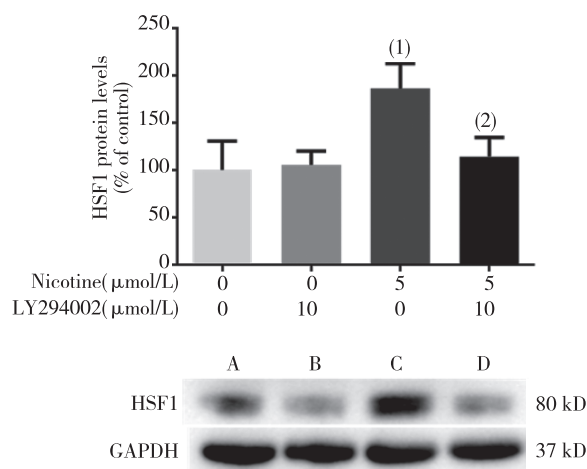
图 3 尼古丁对 P-AKT (ser473) 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Nicotine upregulated P-Ser473-AKT expression

2.4 PI3K/AKT 信号通路参与尼古丁上调星形胶质细胞内 HSF1 蛋白表达水平

为进一步研究 PI3K/AKT 信号通路阻断剂 LY294002 是否能抑制星形胶质细胞 HSF1 的上调,用 LY294002 预处理星形胶质细胞 2 h,再加入尼古丁 5 $\mu\text{mol/L}$ 培养 18 h 后,过免疫印迹法检测

HSF1 蛋白表达水平。结果显示,与尼古丁组比较,尼古丁 + LY294002 组 HSF1 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),说明 LY294002 可以抑制尼古丁上调 HSF1 蛋白表达。见图 4。



注:A 为对照组,B 为 LY294002 组,C 为尼古丁组, D 为尼古丁 + LY294002 组;⁽¹⁾与对照组相比, $P < 0.05$;⁽²⁾与尼古丁组相比, $P < 0.05$

图 4 LY294002 对尼古丁上调 HSF1 蛋白质水平的影响

Fig. 4 LY294002 inhibited nicotine-upregulated HSF1 expression

3 讨论

AD 被认为是影响老年人群的最常见的神经退行性疾病之一。随着预期寿命的延长,预计 AD 患者的数量将在未来几十年显著增加^[11]。星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的神经胶质细胞^[12],在 AD 的发病机制中既可以释放炎症介质和诱导氧化应激^[13],也可通过多种途径有效的吞噬和降解 $A\beta$ ^[14-15]。 $A\beta$ 聚集在 AD 中起重要作用,AD 的认知缺陷主要来自 $A\beta$ 的积累。 $A\beta$ 是 β -淀粉样蛋白前体蛋白水解后释放的毒性肽,其错误折叠和聚集,导致海马和小脑中神经元丢失^[16]。因此,促进星形胶质细胞对 $A\beta$ 的吞噬和降解可能是未来治疗 AD 的一个重要方向。

HSP 是一类分子伴侣蛋白,有研究证明,HSP 的表达可以保护细胞免受 $A\beta$ 毒性的影响^[2-4]。HSF1 是细胞 HSP 表达的主要调控因子。在 AD 大鼠的小脑中,HSF1 以及一些 HSP 如 HSP60, HSP70 等在其中以低水平表达。大鼠或小鼠模型中 HSF1 的过表达增加小脑中的 HSP 水平并使 AD 小鼠模

型中浦肯野细胞数量的增加,降低 $A\beta$ 水平和改善与 AD 相关的认知缺陷^[17-18]。HSF1 也可通过抑制 $A\beta$ 聚集和 $A\beta$ 寡聚体解聚而激活转甲状腺素蛋白(TTR)的转录,该蛋白可以影响小鼠 AD 模型的症状^[19]。

$\alpha 7$ nAChRs 是一种在神经细胞中对认知和记忆能力以及调节突触可塑性起着重要的作用并且高表达的一种门控受体,在 AD 中具有神经保护作用而成为 AD 的重要研究对象^[7]。此外,有研究表明 PI3K/AKT 信号通路参与了 $\alpha 7$ nAChRs 的神经保护作用,在 AD 的海马神经元中发现 AKT 表达明显减少,从而导致神经元细胞的凋亡^[20]。

在本研究中,使用 5 μ mol/L 尼古丁作用星形胶质细胞 6、12、18、24 h 后 HSF1 蛋白表达水平不同程度的升高,说明使用尼古丁可以上调 HSF1 蛋白的表达水平。另外,用尼古丁处理原代星形胶质细胞能显著上调 P- AKT(ser473) 的蛋白表达水平,该上调作用可以被 PI3K/AKT 信号通路的抑制剂 LY294002 所抑制。这说明尼古丁可能参与 PI3K/AKT 信号通路活化,激活 PI3K/AKT 信号通路引起细胞内相应蛋白的表达变化,该研究结果与前期结果相一致^[21]。进一步的研究也发现,用 PI3K/AKT 信号通路阻断剂 LY294002 能显著降低 HSF1 的蛋白表达水平,说明尼古丁很有可能通过激活 PI3K/AKT/HSF1 信号通路来发挥对 AD 的保护作用。

综上所述,尼古丁通过激活 PI3K/AKT 信号通路上调星形胶质细胞 HSP70 表达,从而发挥对 AD 的保护作用,为后续对 AD 的基础研究奠定了一定的基础。

4 参考文献

- [1] KNOWLES T P J, MICHELE V, DOBSON C M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(6):384-396.
- [2] BOBKOVA N V, GARBUZ D G, NESTEROVA I, et al. Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease[J]. Journal of Alzheimers Disease Jad, 2014, 38(2):425-435.
- [3] TÓTH M E, SZEGEDI V, VARGA E, et al. Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice[J]. Cell Stress & Chaperones, 2013, 18(6):759-771.
- [4] RIVERA I, CAPONE R, CAUVI D M, et al. Modulation of Alzheimer's amyloid β peptide oligomerization and tox-

- icity by extracellular Hsp70[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2018,23(2):269–279.
- [5] GOMEZ-PASTOR R, BURCHFIEL E T, THIELE D J. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017,19(1):4–19.
- [6] NEEF D W, JAEGER A M, THIELE D J. Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011,10(12):930–944.
- [7] JIANXIN S, JIE W. Nicotinic cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease[J]. *International Review of Neurobiology*, 2015,124(4):275–292.
- [8] ZHANG B, HE P, LU Y, et al. HSF1 relieves amyloid- β -induced cardiomyocytes apoptosis[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2015,72(2):579–587.
- [9] MCCARTHY K D, VELLIS J D. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. [J]. *Journal of Cell Biology*, 1980,85(3):890–902.
- [10] SCHILDGE S, BOHRER C, BECK K, et al. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes[J]. *Journal of Visualized Experiments Jove*, 2013,71(71):e50079.
- [11] CUMMINGS J, LEE G, MORTSDORF T, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017 [J]. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2017,3(3):367–384.
- [12] ASSEFA B T, GEBRE A K, ALTAYE B M. Reactive astrocytes as drug target in alzheimer's disease[J]. *BioMed Research International*, 2018,2018:4160247.
- [13] LIAN H, LITVINCHUK A, CHIANG A C A, et al. Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Journal of Neuroscience*, 2016,36(2):577–589.
- [14] FROST G R, LI Y. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease [J]. *Open Biology*, 2017,7(12):170–228.
- [15] 孔欣, 禹文峰, 官志忠. 激活星形胶质细胞 $\alpha 7$ 乙酰胆碱能受体抑制 β -淀粉样蛋白的聚集[J]. *中国老年学*, 2016, 36(13):3112–3115.
- [16] MAVROUDIS I A, FOTIOU D F, ADIPEPE L F, et al. Morphological changes of the human purkinje cells and deposition of neuritic plaques and neurofibrillary tangles on the cerebellar cortex of Alzheimer's disease [J]. *American Journal of Alzheimers Disease & Other Dementias*, 2010,25(7):585–591.
- [17] JIANG Y Q, WANG X L, CAO X H, et al. Increased heat shock transcription factor 1 in the cerebellum reverses the deficiency of Purkinje cells in Alzheimer's disease [J]. *Brain Research*, 2013,1519:105–111.
- [18] ANSON P, NATALIA P, HALLORAN J J, et al. Overexpression of heat shock factor 1 phenocopies the effect of chronic inhibition of TOR by rapamycin and is sufficient to ameliorate Alzheimer's-like deficits in mice modeling the disease [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2013,124(6):880–893.
- [19] CHONG W, JIN-TAI Y, DAN M, et al. Targeting the mTOR signaling network for Alzheimer's disease therapy [J]. *Molecular Neurobiology*, 2014,49(1):120–135.
- [20] KAWAMATA J, SHIMOHAMA S. Stimulating nicotinic receptors trigger multiple pathways attenuating cytotoxicity in models of Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. *Journal of Alzheimers Disease* Jad, 2011,24(Suppl 2):95–109.
- [21] 任真奎, 杨梅, 官志忠, 等. PNU 上调大鼠皮质星形胶质细胞内源性 Cryab 抑制 A β 聚集[J]. *中国老年学*, 2016,36(22):5506–5509.
- (2018-12-23 收稿,2019-03-09 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张启芳

(上接第 258 页)

- [20] MANNELLI L D C, TENCI B, ZANARDELLI M, et al. $\alpha 7$ Nicotinic receptor promotes the neuroprotective functions of astrocytes against oxaliplatin neurotoxicity [J]. *Neural Plasticity*, 2015,2015:1–10.
- [21] JIN Y, TSUCHIYA A, KANNO T, et al. Amyloid- β peptide increases cell surface localization of $\alpha 7$ ACh receptor to protect neurons from amyloid β -induced damage [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015,468(1):157–160.
- [22] VICENS P, HEREDIA L, TORRENTE M, et al. Behavioural effects of PNU-282987 and stress in an animal model of Alzheimer's disease [J]. *Psychogeriatrics*, 2017,17(1):33–42.
- [23] ZHENKUI REN M Y Z G. Astrocytic $\alpha 7$ nicotinic receptor activation inhibits amyloid- β aggregation by upregulating endogenous αB -crystallin through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Current Alzheimer Research*, 2019,16(1):324–332.
- [24] LEE K, JEONG J, YOO C. Positive feedback regulation of heat shock protein 70 (Hsp70) is mediated through Toll-like receptor 4-PI3K/Akt-glycogen synthase kinase-3 β pathway[J]. *Experimental Cell Research*, 2013,319(1):88–95.
- (2018-12-25 收稿,2019-03-08 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张启芳