

三甲基腺嘌呤和雷帕霉素对染尘大鼠肺巨噬细胞自噬及凋亡的影响

时亚欣, 王晓艳, 陈颖, 寇杰, 宋瑞瑞, 李清钊, 沈福海, 金玉兰

摘要: [目的] 观察三甲基腺嘌呤(3-MA)和雷帕霉素对染尘大鼠肺巨噬细胞自噬活动的调控以及对细胞凋亡的影响。[方法] 120只雄性Wistar大鼠均采取非暴露气管滴注的方法一次性灌注50 mg/mL SiO₂粉尘进行染毒, 然后随机分为3组: 对照组、3-MA组和雷帕霉素组。其中后两组以1.5 mg/(kg·d)和2 μg/(kg·d)的剂量腹腔注射3-MA或雷帕霉素, 隔日给药持续28 d, 3-MA组和雷帕霉素组大鼠分别在染毒7、14、28、60、90 d处死, 收集其肺灌洗液, 离心获取肺巨噬细胞, 测定其凋亡率。采用蛋白免疫印迹方法检测自噬标志性蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3)及自噬调控蛋白Beclin1。[结果] 雷帕霉素组大鼠染尘不同时间LC3蛋白表达均增加且比对照组高; 5个观察时点大鼠肺巨噬细胞凋亡率分别为(1.74±0.73)%、(1.25±0.35)%、(1.44±1.24)%、(3.70±1.51)%、(36.98±11.91)%与对照组(5.63±1.01)%、(4.95±0.63)%、(4.10±0.43)%、(6.75±4.19)%、(30.23±11.05)%相比, 除90 d高于对照组低($P<0.05$), 其他各时期均比对照组低; 3-MA组在给药期间LC3蛋白表达比对照组低, 停药后蛋白表达有所增高, 90 d时蛋白表达水平与对照组接近; 而该组肺巨噬细胞的凋亡率为(2.86±1.13)%、(8.80±0.28)%、(6.84±1.29)%、(2.54±1.65)%、(37.22±16.22)%, 7 d时凋亡率低于其他时期; 14 d和28 d时凋亡率增加且比同时期对照组高($P<0.05$); 60 d时凋亡率再次降低; 90 d时凋亡率与对照组无明显差异。[结论] 3-MA和雷帕霉素干预后, 染尘大鼠自噬活动强弱不同, 且与肺巨噬细胞的凋亡率呈负相关。

关键词: 三甲基腺嘌呤; 雷帕霉素; 肺巨噬细胞; 自噬; 凋亡

Effects on Autophagy and Apoptosis of Lung Macrophages in Dust Exposed Rats of 3-Methyladenine and Rapamycin SHI Ya-xin, WANG Xiao-yan, CHEN Ying, KOU Jie, SONG Rui-rui, LI Qing-zhao, SHEN Fu-hai, JIN Yu-lan (Laboratory of Coal Mine Health and Safety/School of Public Health and Preventive Medicine, North China University of Science and Technology, Hebei 063000, China). Address correspondence to JIN Yu-lan, E-mail: 1241797044@qq.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To observe the effects of 3-methyladenine (3-MA) and rapamycin on autophagy activity and cell apoptosis of dust exposed rat pulmonary macrophages. [Methods] A total of 120 male Wistar rats were administered with 50 mg/mL SiO₂ dust by intratracheal intubation and divided into control, 3-MA, and rapamycin groups. The 3-MA and rapamycin groups were intraperitoneally injected with 1.5 mg/(kg·d) 3-MA and 2 μg/(kg·d) rapamycin every other day, for 28 d. Then the rats were neutralized on day 7, 14, 28, 60, and 90 to collect lung lavage followed by determining apoptosis rate of macrophages after centrifugation. Western blotting was used to detect the expression of autophagy protein light chain 3 (LC3) and autophagy regulatory protein Beclin1. [Results] In the rapamycin group, the LC3 protein expressions at various time points were higher as compared with the control group; the early apoptosis rates of pulmonary macrophage sampled at five selected time points were lower for the former four time points but higher for the latter time point than the corresponding values in the control group [(1.74±0.73)%, (1.25±0.35)%, (1.44±1.24)%, (3.70±1.51)% and (36.98±11.91)% vs. (5.63±1.01)%, (4.95±0.63)%, (4.10±0.43)%, (6.75±4.19)%, and (30.23±11.05)%, respectively], all $P_s<0.05$ except for day 90. In the 3-MA group, the LC3 protein expression levels were lower than those of the control group during exposure, but increased when the drug stopped, and returned to the level of the control group on day 90. In the 3-MA group, the early apoptosis rates of pulmonary macrophage were (2.86±1.13)%, (8.80±0.28)%, (6.84±1.29)%, (2.54±1.65)%, and (37.22±16.22)%, the lowest value was found on day 7; the apoptosis rates were higher than those of the control

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14743

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81202161); 教育部重点项目(编号: 212013)

[作者简介] 时亚欣(1987—), 女, 硕士生; 研究方向: 劳动卫生与环境健康; E-mail: 719459801@qq.com

[通信作者] 金玉兰, E-mail: 1241797044@qq.com

[作者单位] 华北理工大学公共卫生学院, 煤矿卫生与安全实验室, 河北 063000

group on day 14 and 28 ($P<0.05$), lowered again on day 60, and showed no significant difference from the control group on day 90. [Conclusion] The findings suggest that 3-MA or rapamycin interventions could induce pulmonary macrophage autophagy activity to varied degrees and in negative association with the apoptosis rate of pulmonary macrophages.

Key Words: 3-methyladenine; rapamycin; pulmonary macrophage; autophagy; apoptosis

自噬是生物降解胞内蛋白,完成细胞器转化,保持内环境稳定的重要方式^[1]。它在很多生理过程如清除损伤、衰老的细胞器以及冗余蛋白中发挥着重要作用^[2]。自噬是溶酶体降解途径的主要步骤,通过对自噬体的检测,可了解自噬体形态和发生过程、分子机制、与细胞凋亡的关系及其在某些疾病发生中的作用^[3]。凋亡是细胞的一种基本生物学现象,在多细胞生物体去除异常的或不需要的细胞过程中起重要作用。它在生物体内环境的稳定、进化,及多个系统的发育中也发挥作用。细胞自噬和凋亡相互依赖、相互制约。研究表明,尘粒沉积可引起巨噬细胞的自噬功能增强^[4]。自噬对沉积物的清除功能渐渐受到关注,其在心、肝、肾等器官纤维化中的作用已有报道^[5-12]。自噬在肺纤维化的形成机制中同样发挥着一定作用。越来越多的动物实验结果表明,晶体二氧化硅(SiO_2)能够对机体造成损害,并且与肺组织细胞的凋亡、肺部炎症的发生以及纤维化的形成关系紧密。本实验利用游离 SiO_2 粉尘对大鼠进行染毒,观察大鼠在肺纤维化的发生、发展过程中,三甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)和雷帕霉素对大鼠肺巨噬细胞自噬及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

雷帕霉素、3-MA、无定型 SiO_2 粉尘、磷脂结合蛋白V-异硫氰基荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染色法流式细胞检测试剂盒(均为美国Sigma公司产品);LC3抗体和Bcl-2抗体(美国Cell Signaling公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(江苏艾菲生物科技有限公司);蛋白定量试剂盒(西安晶彩生物有限公司);化学发光底物反应液(ECL,美国Thermo Fisher公司)。

50 mg/mL SiO_2 悬液的配制:称取6 g SiO_2 粉尘,将其在玛瑙研钵中充分研磨,制备成粒径0.5~5 μm 的粉尘。随后加入120 mL生理盐水充分混匀。1.2 mg/L雷帕霉素溶液的配制:瓶装雷帕霉素,浓度为2.5 mg/mL,每次抽取雷帕霉素储备液0.006 mL,加生理盐水稀释至12.5 mL。0.6 mg/mL 3-MA溶液的配制:瓶装3-MA,

浓度为50 $\mu\text{mol/mL}$,每次抽取3-MA储备液0.001 mL,加入生理盐水稀释至12.5 mL。

1.2 仪器设备

Accuri C6流式细胞仪(美国BD公司);超纯水系统RO-3.2G 130513(西安优普仪器设备有限公司);Eppendorf 5424离心机(德国Eppendorf公司);Fluoro Chem HD2凝胶成像系统(美国Protein Simple公司);半干转运系统(美国BIO-RAD公司);电泳仪(美国伯乐生物技术有限公司);37℃二氧化碳孵箱(美国Shellab公司);脱色摇床(江苏省金坛市医疗仪器厂);酶标仪(美国Molecular Device公司);H-7650型透射电镜(日本日立公司)。

1.3 实验动物

无特定病原体(SPF)的雄性Wistar大鼠,体重180~200 g,由国家啮齿类实验动物种子中心提供[生产许可证号:SYXK(冀)2010-0038],实验动物种子中心屏障及实验动物设施符合GB 14925—2010《实验动物 环境及设施》的要求,湿度40%~70%,温度20~26℃,噪声 ≤ 60 dB,实验动物使用许可证号0184664。动物购入后在SPF级动物房中检疫驯化饲养一周,自由摄食和饮用去离子水。

1.4 动物分组、染毒及给药

50 mg/mL的 SiO_2 混悬液经高压灭菌后加入2000 U/mL青霉素和链霉素备用。大鼠吸入乙醚轻度麻醉,120只大鼠按照50 mg/kg的剂量气管内灌注 SiO_2 混悬液1 mL进行一次性染毒,然后将120只大鼠随机分为对照组、3-MA组、雷帕霉素组,每组40只。对照组生理盐水腹腔注射;3-MA组、雷帕霉素组分别以1.5 mg/(kg·d)和2 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的剂量隔日腹腔注射给药,持续28 d。各组大鼠均观察90 d。

1.5 标本采集

于染毒7、14、28、60、90 d时分别处死各组8只大鼠;用10%的水合氯醛腹腔注射1.5 mL麻醉大鼠后,心脏取血,暴露出气管,结扎左侧主支气管,用生理盐水灌洗右侧肺,将灌洗液合并于离心管中,离心获取肺巨噬细胞;取左肺上叶粟粒大小肺组织置于2.5%的戊二醛溶液中用于做电镜片;取左肺下叶肺组织,将其直接放入-30℃冰箱里冻存用于测定蛋白含量。

1.6 检测方法

1.6.1 电镜观察 取粟粒大小肺组织经2.5%的戊二醛溶液固定4h,盐酸盐缓冲液(PBS, pH=7.2)冲洗。1%锇酸固定后,乙醇梯度脱水,100%丙酮浸透,环氧树脂包埋、做超薄切片,将铺于铜网上的切片经枸橼酸铅及醋酸双氧铀染色后,每个时点每组均取5只大鼠肺组织切片用于透射电镜观察自噬前体、自噬体、自噬溶酶体。

1.6.2 肺巨噬细胞凋亡率检测 应用Annexin V-FITC/PI双染法流式细胞仪检测肺泡巨噬细胞早期凋亡率。①样品前处理:将收集的细胞灌洗液用离心10min(半径12.4 cm, 1500 r/min),弃上清;再用PBS重悬,分装在1.5 mL的EP管中,再用上述离心机按照1000 r/min离心3 min,弃上清。②测定:先加入100 μ L Annexin V-FITC结合液,再加入5 μ L Annexin V-FITC染液,1 μ L稀释的PI染液,37℃恒温箱中避光放置10 min,再加入100 μ L Annexin V-FITC结合液,测定细胞凋亡率,直接读数。

1.6.3 肺组织中蛋白含量测定 准确称取肺组织100~200 mg,加入10倍体积组织蛋白裂解液,在液氮中将组织剪碎,用VCX130型超声波细胞破碎仪匀浆组织混悬液,冰浴放置20 min,离心20 min(半径12.4 cm、3000 r/min),收集上清,采用二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒按照说明书步骤进行蛋白定量。依次灌注体积分数为12%的分离胶和体积分数为5%的浓缩胶,于浓缩胶上插上10孔加样梳,30 min后移去加样梳,每孔蛋白上样60 μ g,上样体积15 μ L,80 V电泳30 min,130 V电泳80 min,按200 mA、10 V条件转膜80 min,用质量分数7%脱脂奶粉封闭90 min,一抗孵育过夜,漂洗3次,每次8 min,室温二抗孵育90 min,漂洗3次,每次8 min,ECL显影,Fluro-Chem HD2凝胶成像系统成像。由于LC3是哺乳动物细胞中酵母菌atg8基因的同源物,包括I型和II型。在哺乳动物自噬体形成过程中,I型LC3协同了由Atg3、Atg5、Atg7、Atg10、Atg12参与组成的两条泛素样蛋白的加工修饰过程,形成LC3 II。LC3 II为膜结合型LC3,位于自噬体膜上,它的多少更能反映自噬活动强弱。因此,用II型LC3与I型LC3蛋白的比值表示自噬活动水平。而Beclin为酵母菌Atg6在哺乳类的同源基因^[13],是第一个被发现参与上述自噬过程的基因,其编码的Beclin蛋白可调控自噬前体的形成,引导相关蛋白定位于自噬体膜^[14]。本实验检测LC3、

Beclin1两种目的蛋白,以各自的 β -肌动蛋白(β -actin)为内参蛋白,以目的蛋白与相应内参的灰度值比值定量分析自噬活动的强弱。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对各实验组的凋亡率以及LC3和Beclin1蛋白灰度值进行单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

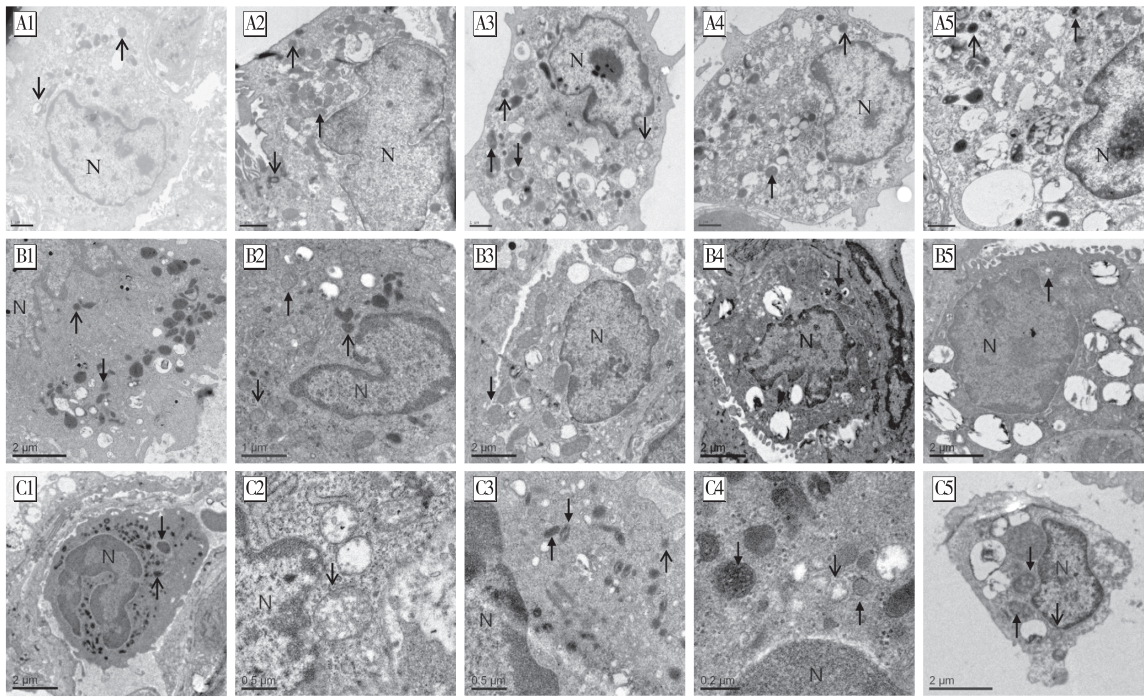
2 结果

2.1 肺组织自噬活动

染尘后将大鼠的肺组织进行苏木精-伊红染色,观察各时点的病理切片。结果发现大鼠肺组织在染尘14 d时炎症反应比较明显;在染尘28 d时肺组织的炎症反应减轻,肺泡内成纤维细胞增加;在染尘60 d后,肺组织内胶原纤维增生,且形成明显的矽结节,这说明大鼠染毒成功,矽肺模型建成。在此基础上,对大鼠肺组织制作电镜切片,观察自噬活动。结果显示,对照组大鼠7 d时可观察到自噬前体和初级溶酶体;14 d时均可见自噬前体、自噬体;28 d时细胞中出现大量的自噬体、自噬溶酶体;60 d和90 d时对照组中自噬溶酶体浊肿、膨胀、大部分呈空泡化。雷帕霉素组大鼠7 d时观察到细胞核周围出现大量初级溶酶体;14 d时肺组织中双层膜的自噬前体较多见;28 d和60 d时细胞胞浆内出现大量自噬体、初级溶酶体以及正在消化的自噬溶酶体,自噬体的数量多于对照组;90 d时细胞内可见较多空泡及膨胀的自噬溶酶体。3-MA组大鼠肺组织第7 d与雷帕霉素组大鼠一致,均能观察到细胞核周围出现大量初级溶酶体;14 d和28 d时出现少量双层膜的自噬前体、自噬体和大量膨胀的自噬溶酶体;60 d时可见细胞表面伪足增多且胞浆中自噬溶酶体、自噬体明显减少;90 d时可见细胞中出现大量板层小体。见图1。

2.2 肺组织中蛋白含量

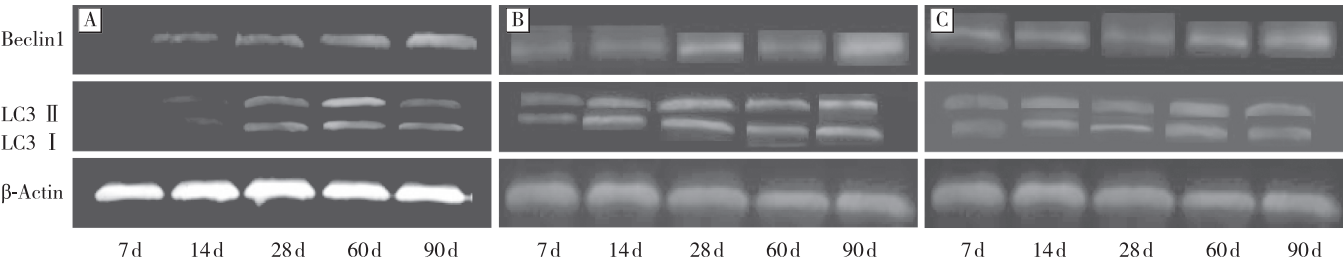
本实验经过对自噬标志性蛋白LC3 II、LC3 I的测定,发现7 d时,3-MA组大鼠肺组织蛋白含量比对照组高,但比雷帕霉素组低;而在14 d和28 d两个时间3-MA组蛋白含量降低,且均低于对照组和雷帕霉素组;停药后3-MA组蛋白含量再次增高,且60 d时高于对照组,而90 d时3组差异无统计学意义(均 $P>0.05$);雷帕霉素组大鼠肺组织蛋白含量一直呈升高趋势,且雷帕霉素组7 d和60 d的蛋白含量均高于对照组;Beclin1蛋白含量的趋势与LC3类似。见图2、表1、表2。



[注]A: 对照组; B: 3-MA组; C: 雷帕霉素组; 1~5: 染毒7、14、28、60、90d; ↑: 初级溶酶体; ↑: 自噬体; ↓: 自噬溶酶体; ↓: 自噬前体; N: 细胞核。
[Note]A: Control group; B: 3-MA group; C: Rapamycin group; 1-5: Prion of 7, 14, 28, 60, and 90 d; ↑: Primary lysosome; ↑: Autophagy; ↓: Autolysosome; ↓: Autophagy precursor; N: Nucleus.

图1 3组不同观察时点的电镜观察结果

Figure 1 Samples of three groups at different time spots presented under transmission electron microscope



[注]A: 雷帕霉素组; B: 对照组; C: 3-MA组。
[Note]A: Rapamycin group; B: Control group; C: 3-MA group.

图2 3组不同观察时间LC3 II、LC3 I、Beclin1蛋白条带比较

Figure 2 LC3 II, LC3 I, and Beclin1 protein bands of the same group at different time spots

表1 3组不同观察时间LC3蛋白表达水平

Table 1 LC3 protein expression changes of three groups over time

组别 Group	7d 7 days	14d 14 days	28d 28 days	60d 60 days	90d 90 days	F	P
对照组 Control group	0.24 ± 0.06	1.00 ± 0.02 ^a	1.17 ± 0.03 ^{ab}	0.91 ± 0.16 ^{ac}	1.09 ± 0.14 ^a	11.86	0.00
3-MA组 3-MA group	0.77 ± 0.12 [#]	0.65 ± 0.23 [#]	0.59 ± 0.04 [#]	1.27 ± 0.16 ^{#a}	1.07 ± 0.26	9.78	0.00
雷帕霉素组 Rapamycin group	0.84 ± 0.04 ^{**}	1.05 ± 0.05 [*]	1.13 ± 0.06 ^{*a}	1.54 ± 0.27 ^{**ab}	1.12 ± 0.14 ^{ad}	9.80	0.00
F	45.05	7.02	132.72	13.83	0.10		
P	0.00	0.02	0.00	0.00	0.89		

[注]#: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。*: 与3-MA组比较, $P < 0.05$ 。a: 与7d比较, $P < 0.05$ 。b: 与14d比较, $P < 0.05$ 。c: 与28d比较, $P < 0.05$ 。d: 与60d比较, $P < 0.05$ 。
[Note]#: Compared with the control group, $P < 0.05$. *: Compared with the 3-MA group, $P < 0.05$. a: Compared with 7 days, $P < 0.05$. b: Compared with 14 days, $P < 0.05$. c: Compared with 28 days, $P < 0.05$. d: Compared with 60 days, $P < 0.05$.

表2 3组不同观察时间Beclin1蛋白表达水平

Table 2 Beclin1 protein expression changes of three exposure groups over time

组别 Group	7d 7 days	14d 14 days	28d 28 days	60d 60 days	90d 90 days	F	P
对照组 Control group	0.51 ± 0.02	1.07 ± 0.13 ^{ab}	2.44 ± 0.12 ^{ab}	1.80 ± 0.15 ^{abc}	4.55 ± 0.28 ^{abcd}	323.85	0.00
3-MA组 3-MA group	1.02 ± 0.02 [*]	0.84 ± 0.06 [*]	0.95 ± 0.65 ^{ab}	1.88 ± 0.08 ^{abc}	4.53 ± 0.29 ^{abcd}	286.17	0.00
雷帕霉素组 Rapamycin group	0.91 ± 0.13 [*]	1.38 ± 0.03 ^{**}	1.55 ± 0.04 ^{**}	2.24 ± 0.38 ^{ab}	5.91 ± 0.76 ^{**abcd}	83.41	0.00
F	35.14	29.78	211.48	3.62	9.94		
P	0.00	0.03	0.00	0.07	0.00		

[注]#: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。*: 与3-MA组比较, $P < 0.05$ 。a: 与7d比较, $P < 0.05$ 。b: 与14d比较, $P < 0.05$ 。c: 与28d比较, $P < 0.05$ 。d: 与60d比较, $P < 0.05$ 。

[Note]#: Compared with the control group, $P < 0.05$ 。*: Compared with the 3-MA group, $P < 0.05$ 。a: Compared with 7 days, $P < 0.05$ 。b: Compared with 14 days, $P < 0.05$ 。c: Compared with 28 days, $P < 0.05$ 。d: Compared with 60 days, $P < 0.05$ 。

2.3 肺巨噬细胞凋亡水平

对照组染毒7d后肺巨噬细胞的凋亡率比较高, 染毒14d和28d天凋亡率下降, 至60d时再次升高; 3-MA组大鼠染毒7d凋亡率低于对照组, 染毒14d和28d凋亡率升高, 均高于对照组, 至90d时明显升

高; 雷帕霉素组大鼠细胞的凋亡率28d之前均低于对照组, 60d和90d时3组差异无统计学意义($P=0.23$, $P=0.71$)。各组在观察90d时的细胞凋亡率明显比观察初期升高。见表3。

表3 3组染毒不同时间细胞凋亡率的比较(%)

Table 3 Apoptosis rates of three exposure groups over time

组别 Group	7d 7 days	14d 14 days	28d 28 days	60d 60 days	90d 90 days	F	P
对照组 Control group	5.63 ± 1.01	4.95 ± 0.63 ^{ab}	4.10 ± 0.43	6.75 ± 4.19	30.23 ± 11.05 ^{abcd}	10.36	0.00
3-MA组 3-MA group	2.86 ± 1.13 [*]	8.80 ± 0.28 ^{ba}	6.84 ± 1.29 ^{ba}	2.54 ± 1.65 ^{bc}	37.22 ± 16.22 ^{abcd}	16.58	0.00
雷帕霉素组 Rapamycin group	1.74 ± 0.73 [*]	1.25 ± 0.35 ^{**}	1.44 ± 1.24 ^{**}	3.70 ± 1.51	36.98 ± 11.91 ^{abcd}	34.74	0.00
F	15.49	140.18	211.48	3.09	0.29		
P	0.00	0.00	0.00	0.23	0.71		

[注]#: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。*: 与3-MA组比较, $P < 0.05$ 。a: 与7d比较, $P < 0.05$ 。b: 与14d比较, $P < 0.05$ 。c: 与28d比较, $P < 0.05$ 。d: 与60d比较, $P < 0.05$ 。

[Note]#: Compared with the control group, $P < 0.05$ 。*: Compared with the 3-MA group, $P < 0.05$ 。a: Compared with 7 days, $P < 0.05$ 。b: Compared with 14 days, $P < 0.05$ 。c: Compared with 28 days, $P < 0.05$ 。d: Compared with 60 days, $P < 0.05$ 。

3 讨论

调控细胞自噬的信号蛋白有很多, 其中研究比较广泛的是磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)和哺乳类动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路。PI3K对于早期吞噬泡的形成至关重要, 而mTOR则对吞噬泡的形成及成熟起抑制作用^[15]。目前对自噬调控研究最广泛的诱导剂是雷帕霉素, 而自噬经典的抑制剂则是3-MA。雷帕霉素是一种新型的大环内酯类免疫抑制剂, 具有高效免疫抑制作用。该药清除缓慢, 半衰期为57~62h。推荐剂量国外负荷量为15mg, 维持量为5mg/d, 国内

分别为2~6mg/d, 疗程至少28d。研究发现雷帕霉素有强效免疫抑制活性^[3], 它通过抑制mTOR通路诱导自噬的发生。3-MA是一种有免疫抑制作用的抗代谢药物。PI3K是3-MA目前报道的唯一作用靶点。有研究发现, 3-MA通过阻断Ⅲ型PI3K通路, 从而干扰或阻断自噬体的形成, 可延缓或部分地抑制细胞自噬性死亡^[16]。在人体中, 通过实验3-MA的药物浓度为5mmol/L时效果最佳, 而且在给药24、48、72h后效果均比较明显^[17]。本实验中雷帕霉素的药物剂量2μg/(kg·d)是其治疗量的1/250, 3-MA的药物剂量1.5mg/(kg·d)是其治疗量的1/1250, 我们利用雷帕

霉素和3-MA分别作为自噬的诱导剂和抑制剂来观察矽肺纤维化与自噬的联系。

本研究发现,对照组在7d时LC3蛋白表达比较少,14d和28d LC3蛋白表达增加;60d降低。而雷帕霉素组的蛋白表达在给药期间一直呈增高的趋势,且各个时期均比对照组高;停药后的60d蛋白表达还在增加,但90d时蛋白表达有所降低,且与对照组差异无统计学意义。这一结果与之前文献所提到的“雷帕霉素可诱导自噬”的说法相一致。这进一步证实了雷帕霉素可以诱导染尘大鼠的自噬活动。3-MA组给药7d的LC3蛋白表达比其他时期要高,14d和28d含量明显降低,60d时再次升高,且90d的LC3蛋白含量与对照组接近;而本实验结果中显示3-MA组Beclin蛋白给药初期即7d时含量比对照组高;在给药期即14d和28d蛋白含量明显降低且比对照组与雷帕霉素组均低;停止染毒后蛋白含量有所增加。这与之前研究证实的3-MA能抑制自噬现象相吻合,而且我们的实验结果也可以推断出3-MA在染尘大鼠的自噬活动中起到了抑制的作用。

既往实验证明,自噬激活可限制多种药物及应激诱导的凋亡,这与自噬可直接特异性降解那些可诱导凋亡的异常蛋白或细胞器有关^[18]。然而,研究也发现自噬在某些情况下会促进凋亡。例如,凋亡前常先出现自噬激活,且有时这是凋亡起始所必需的^[19]。自噬先于凋亡出现并不难理解,因为许多诱导凋亡的机制可同时激活自噬,这也是细胞避免死亡的生存努力。自噬是凋亡的必要条件则表明凋亡受到自噬的严格控制。本实验条件下,我们发现3组大鼠肺巨噬细胞凋亡率随着自噬活动强弱的不同呈现不同的变化趋势。对照组大鼠凋亡率呈现升高-降低循环出现的变化趋势,而雷帕霉素组凋亡率一直呈现上升的趋势。

综上所述,雷帕霉素可以诱导染尘大鼠自噬活动,在整个给药期间LC3和Beclin1蛋白表达均增加,说明自噬活动在不断的加强,而该组的凋亡率一直在降低;3-MA可以抑制自噬活动,在前期由于药物的作用,蛋白表达一直不高且比对照组低,自噬活动比较弱,而凋亡率比较高。这一趋势有力的论证了自噬与凋亡有着密不可分的联系。

矽肺是由于长期吸入游离SiO₂粉尘导致的以肺组织弥漫性间质纤维化为主要特点的疾病^[20]。SiO₂粉尘进入机体组织后可导致巨噬细胞受损,而细胞膜破损后释放出的SiO₂粉尘又被肺泡巨噬细胞再吞噬;

如此反复释放许多炎性因子和致纤维化因子是矽肺纤维化的最直接原因。目前关于矽肺纤维化发病机制尚未完全了解。自噬具有清除沉积物的功能,本实验在矽肺模型的基础上研究细胞自噬与凋亡的关系,可以从细胞自噬和凋亡这一新的角度探讨矽肺纤维化的治疗方法,为临床治疗矽肺纤维化提供新的理论依据。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double edged sword[J]. Science, 2004, 306(5698): 990-995.
- [2] 张志才, 邵增务. 自噬分子机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(1): 177-179.
- [3] Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 823-830.
- [4] Monastyrska, Klinsky DJ. Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover[J]. Mol Aspects Med, 2006, 27(5/6): 483-494.
- [5] 王海杰, 谭玉珍, 何韬. 尘粒对巨噬细胞自噬的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8): 1524-1528.
- [6] Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, et al. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(28): 9745-9750.
- [7] Georgescu SP, Aronovitz MJ, Iovanna JL, et al. Decreased metalloprotease 9 induction, cardiac fibrosis, and higher autophagy after pressure overload in mice lacking the transcriptional regulator p8[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 301(5): C1046-C1056.
- [8] Mellor KM, Bell JR, Young MJ, et al. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(6): 1035-1043.
- [9] Aránguiz-Urroz P, Canales J, Copaja M, et al. Beta(2)-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(1): 23-31.
- [10] 毛一雷, 陈蓉蓉, 杨华瑜, 等. 自噬现象在肝纤维化和肝切除时的表现形式[J]. 中国医学科学院学报, 2008, 30(4): 421-425.

- [11] Biecker E, De Gottardi A, Neef M, et al. Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: analysis of the underlying mechanisms[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 313(3): 952-961.
- [12] Koesters R, Kaissling B, Lehir M, et al. Tubular overexpression of transforming growth factor-1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells[J]. Am J Pathol, 2010, 177(2): 632-643.
- [13] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting[J]. Autophagy, 2007, 3(6): 542.
- [14] Kondo Y, Kondo S. Autophagy and cancer therapy[J]. Autophagy, 2006, 2(2): 85-90.
- [15] Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast[J]. J Biol Chem, 1998, 273(7): 3963-3966.
- [16] 晏森, 朱正秋, 卞保祥, 等. Akt/mTOR 信号通路蛋白在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国全科医学, 2011, 14(10C): 3442-3444.
- [17] 孔晓霞, 张宏宇, 钟加滕, 等. 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤在 H₂O₂ 引起的神经胶质瘤 U251 细胞损伤中的作用[J]. 中国病理生理, 2011, 27(4): 695-698.
- [18] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death[J]. Curr Top Dev Biol, 2007, 78: 217-245.
- [19] Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, et al. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy[J]. J Biol Chem, 2006, 281(41): 30373-30382.
- [20] 王发选, 杨婷, 张洋, 等. 矽肺模型大鼠肺组织中 IL-17A 的表达[J]. 工业卫生与职业病, 2013, 39(6): 328-331.

(收稿日期: 2014-11-27)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 王晓宇)

【EHP 专栏】

注意力缺陷/多动症和儿童期自闭症与产前暴露于全氟烷基物质之间的关联: 丹麦全国出生队列的一项巢式病例对照研究

Zeyan Liew, Beate Ritz, Ondine S. von Ehrenstein, Bodil Hammer Bech, Ellen Aagaard Nohr, Chunyuan Fei, Rossana Bossi, Tine Brink Henriksen, Eva Cecilie Bonefeld-Jørgensen, Jørn Olsen

摘要: [背景] 全氟烷基物质(PFASs)是持久性污染物, 动物实验中具有内分泌干扰性和神经毒性。一些横断面数据显示 PFASs 与儿童神经行为的问题之间存在正向关联, 但是来自前瞻性研究的结果仍然有限。[目的] 研究产前暴露于 PFASs 是否与儿童中的注意力缺陷/多动障碍(ADHD)或儿童期自闭症之间有关联。[方法] 在 1996—2002 年丹麦全国出生队列的 83389 对母子中, 根据丹麦国家医院登记和丹麦精神病中心登记, 确定了 890 名 ADHD 病例和 301 名儿童自闭症病例。从这个队列中, 随机各选择 220 例多动症和自闭症病例, 并随机选择 550 例性别相匹配的对照儿童。测量在妊娠早期或中期采集的母体血浆中 16 种 PFASs, 使用广义线性模型计算风险比(RRs), 模型中考虑到了抽样权重。[结果] 在所有样品中均检测到全氟辛烷磺酸(PFOS)和全氟辛酸(PFOA), 在 ≥ 90% 的样本中可以定量其他 4 种 PFASs。没有发现母亲 PFAS 血浆水平和 ADHD 之间关联的一致性证据[浓度(ng/mL)的自然对数值每增加一个单位, PFOS 对应的 RR=0.87(95%CI: 0.74, 1.02), PFOA 对应的 RR=0.98(95%CI: 0.82, 1.16)], 对于自闭症也是如此[浓度(ng/mL)的自然对数值每增加一个单位, PFOS 对应的 RR=0.92(95%CI: 0.69, 1.22), PFOA 对应的 RR=0.98(95%CI: 0.73, 1.31)]。在同时校正所有 PFASs 的模型中, 较高的 PFAS 分位数和 ADHD 之间既有阳性关联也有阴性关联, 但是这些关联的估计值并不精确。[结论] 在这项研究中, 没有发现一致性的证据能够提示产前 PFAS 暴露增加儿童中 ADHD 或儿童期自闭症儿的风险。

原文详见: *Environmental Health Perspectives*, 123(4): 367-373.