

氧化应激诱导 AMPK/ULK1 通路激活及溶酶体功能障碍在砷致大鼠肝损伤中的作用

毕顶念, 时明阳, 胡倩, 汪红玲, 田旭娇, 游安波, 林秀宪, 胡勇

贵州医科大学公共卫生与健康学院/环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21136

摘要:

[背景] 地方性砷中毒较为突出的特点为肝损伤严重。研究发现肝损伤与氧化应激、溶酶体及自噬密切相关。

[目的] 通过建立亚砷酸钠 (NaAsO_2) 致大鼠肝损伤模型, 观察氧化应激、溶酶体功能以及 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK)/自噬启动激酶 1 (ULK1) 通路在 NaAsO_2 致大鼠肝损伤中的作用。

[方法] SPF 级 Wistar 大鼠 24 只, 雌雄各半, 随机分为 4 组, 每组 6 只: 对照组以及 25、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组。自由饮用不同剂量的 NaAsO_2 水溶液 24 周建立砷中毒大鼠肝损伤模型。染毒 24 周后解剖大鼠取肝脏, 采用试剂盒检测肝组织丙氨酸转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆汁酸 (TBA)、过氧化氢酶 (CAT)、脂质过氧化物 (LPO)、总抗氧化能力 (T-AOC) 水平; 酶联免疫吸附法检测肝组织溶酶体相关膜蛋白 2 (LAMP2)、组织蛋白酶 B (CTSB) 以及酸性磷酸酶 2 (ACP2) 的水平; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测肝组织 AMPK、ULK1、自噬微管相关蛋白轻链 3 (LC3)、泛素结合蛋白 (p62) mRNA 转录水平; 免疫组化法检测肝组织 p-AMPK、p-ULK1、LC3 和 p62 蛋白表达。

[结果] NaAsO_2 染毒后, 各组间 ALT、ALP、TBA 水平差异均具有统计学意义 ($F=12.09$ 、 72.11 和 23.58 , $P<0.05$)。与对照组相比, 50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组大鼠肝组织 ALT 水平升高 ($P<0.05$); 25、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组 ALP、TBA 水平升高 ($P<0.05$); 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组大鼠肝组织 LPO 水平升高 ($P<0.05$); 25、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组大鼠肝组织 CAT、T-AOC 水平降低 ($P<0.05$)。酶联免疫吸附检测结果显示, 25、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组 ACP2、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组 CTSB, 以及 50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组 LAMP2 质量浓度与对照组相比均下降 ($P<0.05$)。RT-qPCR 与免疫组化结果显示, 部分染砷组 AMPK、ULK1、LC3 mRNA 转录和蛋白表达水平较对照组有不同程度的升高, 且 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组的升高均具有统计学意义 ($P<0.05$); 25、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组大鼠肝组织 p62 mRNA 转录表达水平和 50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组大鼠肝组织 p62 蛋白表达水平与对照组相比也增加 ($P<0.05$)。Pearson 相关性分析结果显示, 肝组织 T-AOC 与 LAMP2、CTSB、ACP2 呈正相关 ($r=0.651$ 、 0.673 、 0.626 , $P<0.05$); LPO 与 CTSB、ACP2 呈负相关 ($r=-0.468$ 、 -0.482 , $P<0.05$); p62 与 LAMP2、CTSB、ACP2 呈负相关 ($r=-0.570$ 、 -0.626 、 -0.591 , $P<0.05$), 与 ALT、ALP、TBA 呈正相关 ($r=0.709$ 、 0.897 、 0.857 , $P<0.05$)。

[结论] NaAsO_2 长期暴露可诱导氧化应激发生, 损伤溶酶体功能和激活 AMPK/ULK1 通路, 使自噬通路正常发生受阻, 进而造成肝脏损伤。

关键词: 砷; 氧化应激; 溶酶体; AMP 活化的蛋白激酶; Unc51 样激酶 1; 自噬; 肝损伤

Role of oxidative stress-induced AMPK/ULK1 pathway activation and lysosomal dysfunction in arsenic-induced liver injury in rats BI Dingnian, SHI Mingyang, HU Qian, WANG Hongling, TIAN Xujiao, YOU Anbo, LIN Xiuxian, HU Yong (Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education/School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract:

[Background] A prominent feature of endemic arsenic poisoning is severe liver damage. Studies have found that liver injury is closely related to oxidative stress, lysosomes, and autophagy.

[Objective] Through establishing a liver injury model of rats by sodium arsenite (NaAsO_2)

基金项目

国家自然科学基金 (81860561, 82160649)

作者简介

毕顶念 (1996—), 女, 硕士生;

E-mail: 1563260749@qq.com

通信作者

胡勇, E-mail: brucehu1979@163.com

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2021-04-05

录用日期

2021-11-19

文章编号 2095-9982(2021)12-1376-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

► 引用

毕顶念, 时明阳, 胡倩, 等. 氧化应激诱导 AMPK/ULK1 通路激活及溶酶体功能障碍在砷致大鼠肝损伤中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38(12): 1376-1382.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21136

Funding

This study was funded.

Correspondence to

HU Yong, E-mail: brucehu1979@163.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2021-04-05

Accepted

2021-11-19

► To cite

BI Dingnian, SHI Mingyang, HU Qian, et al. Role of oxidative stress-induced AMPK/ULK1 pathway activation and lysosomal dysfunction in arsenic-induced liver injury in rats [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(12): 1376-1382.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21136

administration in drinking water, this experiment is designed to explore the roles of oxidative stress, lysosomes, and AMP activated protein kinase (AMPK)/Unc-51 like kinase 1 (ULK1) pathway in this model.

[Methods] Twenty-four Wistar rats were randomly divided into four groups with six rats in each group (half male and half female), including control group and 25, 50, 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ groups. A rat liver injury model was established by drinking water containing NaAsO₂ freely for 24 weeks. Then liver of rats was dissected after sacrificed, and the levels of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and total bile acid (TBA), catalase (CAT), lipid peroxidation (LPO), and total antioxidant capacity (T-AOC) in liver tissues were detected by assay kits. The levels of lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), cathepsin B (CTSB), and acid phosphatase (ACP2) were determined by enzyme linked immunosorbent assay. The mRNA transcriptional expressions of AMPK, ULK1, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), and sequestosome 1 (p62) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The protein expressions of p-AMPK, p-ULK1, LC3, and p62 were detected by immunohistochemistry.

[Results] Following the NaAsO₂ administration, significant differences were found in the levels of ALT, ALP, and TBA among the designed groups ($F=12.09, 72.11, \text{ and } 23.58, P<0.05$). Compared with the control group, the levels of ALT in the 50mg·L⁻¹ and 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ groups were increased ($P<0.05$); the levels of ALP and TBA in the 25, 50, and 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ groups were increased ($P<0.05$); the level of LPO in the 100 mg·L⁻¹ group was increased ($P<0.05$); the levels of CAT and T-AOC in the 25, 50, and 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ groups were decreased ($P<0.05$). According to the results of enzyme linked immunosorbent assay, the levels of ACP2 in the 25, 50, and 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ groups, the level of CTSB in the 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ group, and the levels of LAMP2 in the 50 and 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ groups were decreased compared with the control group ($P<0.05$). Based on the results of RT-qPCR and immunohistochemistry, the mRNA transcriptional and protein expressions of AMPK, ULK1, and LC3 in some arsenic groups were elevated to varying degrees compared with the control group, and the increment in the 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ group was significant for all the indicators ($P<0.05$); the mRNA transcriptional expressions of p62 in the three arsenic groups and the protein expressions of p62 in the 50 and 100mg·L⁻¹ NaAsO₂ groups also increased compared with the control group ($P<0.05$). Besides, the results of Pearson correlation analysis showed that there was a positive correlation of T-AOC with LAMP2, CTSB, and ACP2 ($r=0.651, 0.673, 0.626; P<0.05$), a negative correlation of LPO with CTSB and ACP2 ($r=-0.468, -0.482; P<0.05$), a negative correlation of p62 with LAMP2, CTSB, and ACP2 ($r=-0.57, -0.626, -0.591; P<0.05$), and a positive correlation of p62 with ALT, ALP, and TBA ($r=0.709, 0.897, \text{ and } 0.857, P<0.05$).

[Conclusion] Long-term arsenic exposure may induce oxidative stress, damage lysosomes, and activate the AMPK/ULK1 pathway, which can lead to the blockage of autophagy process, and eventually result in liver damage.

Keywords: arsenic; oxidative stress; lysosome; AMP activated protein kinase; Unc-51 like kinase 1; autophagy; liver injury

世界卫生组织报道全球有 2 亿多人口遭受砷危害, 砷污染已成为全球关注的公共卫生问题^[1]。研究表明, 地方性砷中毒以多系统、多脏器损害为主要特点; 除典型的皮肤损害以外, 突出特点还有肝损害较重, 死亡率较高; 氧化应激是其主要的损伤机制^[2]。

自噬是受损的蛋白质及细胞器等大分子物质被双层膜自噬体隔离, 最后被运送到溶酶体中进行降解的过程^[3]。有研究报道, 砷可通过诱导氧化应激, 持续激活自噬或诱导自噬发生缺陷, 加重肝损伤^[4]。溶酶体作为自噬发生过程中的重要细胞器, 在长期氧化应激状态下会受到损伤, 最终影响自噬^[5]。AMP 活化的蛋白激酶(AMP activated protein kinase, AMPK)、Unc51 样激酶 1(Unc-51 like kinase 1, ULK1)、自噬微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、泛素结合蛋白 p62是参与自噬发生过程中的重要蛋白。氧化应激状态下, AMPK 可被磷酸化激活, 继而通过调控其下游因子 ULK1 的表达来调控自噬的发生^[6]。LC3 作为哺乳动物细胞自噬发生的标志, 其表达水平与自噬活性呈正相关, 可直接反映自噬发生的强弱^[7]。p62 作为一种自噬底物, 可与 LC3 相互作用, 随

LC3 被整合到自噬体中, 最后随自噬体进入溶酶体中降解; 其含量随自噬的增强而降低, 所以 p62 表达水平的高低在一定程度上可表示自噬是否正常发生^[8]。

本实验通过自由饮用不同浓度的亚砷酸钠(NaAsO₂)建立砷中毒大鼠肝损伤模型, 探讨氧化应激、溶酶体功能以及 AMPK/ULK1 通路在 NaAsO₂ 致大鼠肝损伤中的作用, 旨在为砷暴露致肝损伤机制的研究提供实验依据。

1 对象与方法

1.1 主要仪器试剂

PB303-N 电子天平(中国梅特菲力-托勒多仪器上海有限公司)、微量移液器(德国 Eppendorf 公司)、μQuant-Max200 超级酶标仪(美国 BioTek 公司)、Z36HK 高速冷冻离心机(德国 Hermle 公司)、倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

NaAsO₂(分析纯, 美国 Sigma 公司); p-AMPK(T-172)、p-ULK1(S555)、LC3、p62 一抗以及二抗(英国 Abcam 公司); Trizol、实时荧光定量 PCR 试剂盒、反转录试剂盒(日本 Takara 公司); 过氧化氢酶(catalase,

CAT)、脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和总胆汁酸(total bile acid, TBA)检测试剂盒(中国南京建成生物工程研究所);溶酶体相关膜蛋白 2(lysosomal-associated membrane protein 2, LAMP2)、组织蛋白酶 B(cathepsin B, CTSB)以及酸性磷酸酶 2(acid phosphatase 2, ACP2)酶联免疫吸附检测试剂盒(中国上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 剂量设计依据

经预实验获得 NaAsO_2 大鼠经口半数致死剂量(LD_{50})为 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 结合本课题组前期人群砷暴露量的估算结果, 理论上应设立 2.5、5.0、 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个砷剂量组^[9]。按每只大鼠平均体重 200 g, 每日平均饮水量 20 mL 计算, 则 3 个组饮水中 NaAsO_2 质量浓度依次为 25、50、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 实验动物分组及处理

SPF 级 80~100 g Wistar 大鼠 24 只, 雌雄各半, 购自贵州医科大学实验动物中心, 动物生产许可证编号: SCXK(辽)2015-0003; 质量合格证编号: SCXK(辽)2015-0001; 动物使用许可证编号: SYXK(黔)2018-0001。本研究经贵州医科大学实验动物伦理委员会审查批准(批准编号: 1900250)。本研究利用课题组时明阳等^[10]建立的砷中毒大鼠肝损伤模型, 具体分组及染毒方法如下: 适应性喂养一周后, 大鼠按体重随机分为对照组以及 25、50、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO_2 组(组内、组间大鼠体重差异符合实验要求), 每组 6 只(为防止大鼠意外死亡, 每组实际饲养 12 只动物, 最后按照编号随机每组选择 6 只大鼠进行相关指标的检测); 采用自由饮水方式进行染毒(染砷组饮用不同浓度无色无味的 NaAsO_2 水溶液, 对照组饮用矿泉水), 连续染毒 24 周。饲养温度(25 ± 3) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45%~65%(体积分数), 自然光线。

1.4 大鼠肝脏的收集及石蜡切片制备

大鼠染毒结束后处死, 剖离肝脏。取肝组织最大叶部分置于 4%(体积分数)多聚甲醛中固定 24 h 后脱水, 使用石蜡包埋, 制作 $5 \mu\text{m}$ 石蜡切片。其余肝脏分别冻于 -80°C 储存、备用。

1.5 肝组织肝损伤指标和氧化应激指标的测定

准确称取肝组织 50 μg , 按重量体积比加 9 倍生理盐水制成 10%(质量分数)的匀浆, $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min(离心半径 6 cm), 取上清液。采用相关试剂盒检测肝组织 ALP、ALT、TBA、LPO、T-AOC 和 CAT 水平。

1.6 肝组织溶酶体相关指标的测定

将冻存的肝脏取出, 同“1.5”制备肝匀浆; 采用酶联免疫吸附检测试剂盒分别检测 LAMP2、CTSB、ACP2 水平。

1.7 实时荧光定量 PCR 法检测肝组织 AMPK、ULK1、LC3、p62 转录水平

取肝脏, Trizol 法提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 然后进行扩增反应。反应条件为 95°C 变性 35 s, 40 个循环(95°C 变性 5 s、 56°C 退火 1 min), 每个标本重复实验 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 表达量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因作为对照, AMPK、ULK1、LC3、p62 以及 GAPDH 基因引物序列由上海捷瑞生物工程公司合成, 引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	正向(5'-3')	反向(5'-3')
GAPDH	TCTCTGCTCCTCCCTGTTC	ACACCGACCTTCACCATCT
AMPK	TACCTCGCTCCAGTCC	GTGCTTTGGGGCTGTCT
ULK1	CAGCAAGGGCATCATTC	GTACCGGGCAAATCCAAA
LC3	GGCAACAGCAACAGGAA	GGGGATGGTCTGAGTGTC
p62	TTACAGCCAGAGTCAAGGG	GGTCCCATTCAGTCATCT

1.8 免疫组化法检测肝组织 p-AMPK、p-ULK1、LC3、p62 蛋白表达

石蜡切片常规脱蜡、抗原修复, 3%(体积分数)过氧化氢室温孵育 25 min, 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 山羊血清室温封闭 30 min; 分别加入一抗(p-AMPK, 1:40、p-ULK1, 1:100、LC3, 1:100、p62, 1:100) 4°C 孵育过夜。磷酸盐缓冲液洗 3 次, 每次 5 min; 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:200), 室温孵育 50 min 后去除, 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 每次 5 min; 然后加入 DAB 工作液, 显微镜下控制显色时间, 纯水冲洗切片终止染色; 苏木素复染, 1%(体积分数)盐酸乙醇快速分化液分化后自来水冲洗反蓝, 最后进行脱水封片, 镜下观察染色效果并拍照。采用 Image Pro Plus 6.0 软件观察 p-AMPK、p-ULK1、LC3、p62 的表达情况。阳性表达呈棕黄色或褐色, 在 200 倍光镜下采集免疫组化图像, 每张切片随机采 3 个不重叠视野, 计算平均光密度值, 平均光密度=积分光密度/测量总面积^[10]。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对实验结果进行分析, 计量资料经正态性检验后符合正态分布, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表

示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;指标间相关性分析采用 Pearson 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠肝组织肝损伤指标水平

单因素方差分析结果显示,各组间 ALT、ALP、TBA 水平差异均具有统计学意义($F=12.09$ 、 72.11 和 23.58 , 均 $P<0.05$)。如表 2 所示, $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组与对照组之间 ALT 水平差异并无统计学意义($P>0.05$); 50 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组 ALT 水平较对照组升高($P<0.05$)。与对照组相比,各染毒组中 ALP 和 TBA 水平均升高,且呈现随染毒浓度的增加逐渐上升的趋势($P<0.05$)。

表 2 亚砷酸钠染毒 24 周后大鼠肝组织 ALT、ALP 和 TBA 水平变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Changes in the levels of ALT, ALP, and TBA in liver tissues of rats after 24 weeks of sodium arsenite treatment ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	ALT/(U·g ⁻¹) ^a	ALP/(U·g ⁻¹) ^a	TBA/(μmol·L ⁻¹)
对照组	26.44±2.60	5.17±0.21	102.67±4.47
25 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	25.66±3.47	6.00±0.16 ^a	105.75±3.56 ^a
50 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	29.11±2.17 ^a	6.64±0.35 ^{ab}	114.66±5.28 ^{ab}
100 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	34.76±3.18 ^{abc}	7.34±0.30 ^{abc}	121.74±3.99 ^{abc}
<i>F</i>	12.09	72.11	23.58
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

[注] &: 以蛋白计。a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组比较, $P<0.05$; c: 与 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组比较, $P<0.05$ 。

2.2 大鼠肝组织氧化应激指标

各组间 CAT、LPO、T-AOC 水平差异均有统计学意义($F=13.51$ 、 23.35 、 18.84 , 均 $P<0.05$)。如表 3 所示, 25 、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组 LPO 水平与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$); $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组 LPO 水平较对照组升高($P<0.05$)。与对照组相比,各染毒组中 CAT 和 T-AOC 水平均降低($P<0.05$)。

2.3 大鼠肝组织溶酶体相关指标

单因素方差分析显示,各组间 LAMP2、CTSB 及 ACP2 质量浓度差异均有统计学意义($F=3.90$ 、 6.94 、 6.35 , 均 $P<0.05$)。如表 4 所示,在染毒剂量为 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,染毒组与对照组之间 LAMP2 质量浓度差异并无统计学意义($P>0.05$); 50 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组 LAMP2 质量浓度较对照组下降($P<0.05$)。 25 、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组 CTSB 质量浓度与对照组相比差异都不具有统计学

意义($P>0.05$); $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组 CTSB 质量浓度较对照组降低($P<0.05$)。与对照组相比,各染毒组 ACP2 质量浓度均降低($P<0.05$)。

表 3 亚砷酸钠染毒 24 周后大鼠肝组织 CAT、LPO 和 T-AOC 水平变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Changes in the levels of CAT, LPO, and T-AOC in liver tissues of rats after 24 weeks of sodium arsenite treatment($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	CAT/(U·mg ⁻¹) ^a	T-AOC/(U·mg ⁻¹) ^a	LPO/(μmol·g ⁻¹) ^a
对照组	57.73±2.76	0.85±0.07	0.18±0.05
25 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	54.09±3.17 ^a	0.64±0.06 ^a	0.17±0.07
50 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	50.01±2.17 ^{ab}	0.62±0.05 ^a	0.20±0.03
100 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	49.00±2.48 ^{ab}	0.60±0.05 ^a	0.35±0.04 ^{abc}
<i>F</i>	13.51	23.35	18.84
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

[注] &: 以蛋白计。a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组比较, $P<0.05$; c: 与 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组比较, $P<0.05$ 。

表 4 亚砷酸钠染毒 24 周后大鼠肝组织 LAMP2、CTSB 和 ACP2 水平变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Changes in the levels of LAMP2, CTSB, and ACP2 in liver tissues of rats after 24 weeks of sodium arsenite treatment ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	LAMP2/(μg·L ⁻¹)	CTSB/(μg·L ⁻¹)	ACP2/(μg·L ⁻¹)
对照组	102.30±7.51	2882.16±218.57	7994.76±389.77
25 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	97.44±6.50	2705.69±156.85	7806.67±409.04 ^a
50 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	92.70±7.12 ^a	2747.84±171.20	7556.67±208.16 ^a
100 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	93.51±5.40 ^a	2434.12±142.93 ^{abc}	7297.14±206.80 ^{ab}
<i>F</i>	3.90	6.94	6.35
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组比较, $P<0.05$; c: 与 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组比较, $P<0.05$ 。

2.4 大鼠肝组织 AMPK、ULK1、LC3、p62 mRNA 转录水平

单因素方差分析显示,各组间 AMPK、ULK1、LC3、p62 的 mRNA 转录水平差异均存在统计学意义($F=23.22$ 、 20.18 、 5.46 、 7.70 , 均 $P<0.05$)。如表 5 所示,与对照组相比,各染毒组中 AMPK 和 p62 的 mRNA 表达量均上升($P<0.05$)。 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组与对照组之间 ULK1 mRNA 转录水平差异无统计学意义($P>0.05$); 50 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组 ULK1 mRNA 转录水平较对照组升高($P<0.05$)。在染毒剂量为 25 、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,染毒组与对照组之间 LC3 mRNA 转录水平差异均无统计学意义($P>0.05$); $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 组 LC3 mRNA 转录水平较对照组升高($P<0.05$)。

表 5 亚砷酸钠染毒 24 周后大鼠肝组织 AMPK、ULK1、LC3 和 p62 mRNA 转录水平变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

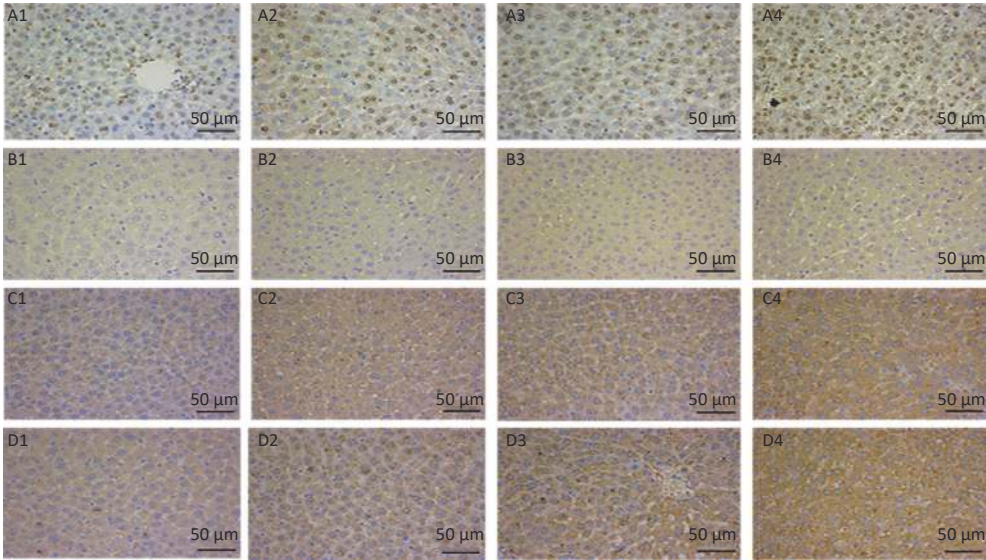
Table 5 Changes in mRNA transcriptional expressions of AMPK, ULK1, LC3, and p62 in liver tissues of rats after 24 weeks of sodium arsenite treatment ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	AMPK	ULK1	LC3	p62
对照组	0.80±0.08	0.81±0.06	0.90±0.05	0.87±0.20
25 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	1.09±0.16 ^a	0.93±0.09	0.98±0.11	1.11±0.62 ^a
50 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	1.24±0.18 ^a	0.98±0.10 ^a	1.00±0.15	1.19±0.18 ^a
100 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	1.57±0.21 ^{abc}	1.31±0.18 ^{abc}	1.16±0.12 ^{abc}	1.40±0.28 ^{ab}
F	23.22	20.18	5.46	7.70
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

[注] a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 25 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组比较, $P < 0.05$; c: 与 50 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 大鼠肝组织 p-AMPK、p-ULK1、LC3、p62 蛋白表达水平

如图 1 所示, NaAsO₂ 染毒后, 大鼠肝组织 p-AMPK、p-ULK1、LC3、p62 蛋白的免疫组化染色结果呈棕黄色或褐色, 且颜色逐渐加深。单因素方差分析结果表明, 各组间差异均有统计学意义 ($F=577.17$ 、 262.2 、 296.67 、 163.43 , 均 $P < 0.05$)。25、50、100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组 p-AMPK、p-ULK1、LC3 的蛋白表达水平较对照组升高, 且呈现随染毒浓度增加逐渐升高的趋势 ($P < 0.05$)。25 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组 p62 蛋白表达水平与对照组相比差异并无统计学意义 ($P > 0.05$), 50、100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组 p62 蛋白表达水平较对照组升高 ($P < 0.05$)。见表 6。



[注] A: p-AMPK; B: p-ULK1; C: LC3; D: p62。1: 对照组; 2: 25 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组; 3: 50 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组; 4: 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组。阳性产物呈棕黄色或褐色, 染色深浅表示阳性程度。

图 1 亚砷酸钠染毒 24 周后各组大鼠肝组织 p-AMPK、p-ULK1、LC3 和 p62 的免疫组化结果

Figure 1 IHC results of p-AMPK, p-ULK1, LC3, and p62 in liver tissues of rats after 24 weeks of sodium arsenite treatment

表 6 亚砷酸钠染毒 24 周后各组大鼠肝组织 p-AMPK、p-ULK1、LC3 和 p62 蛋白表达水平变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Changes in protein expressions of p-AMPK, p-ULK1, LC3, and p62 in liver tissues of rats after 24 weeks of sodium arsenite treatment ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	p-AMPK	p-ULK1	LC3	p62
对照组	0.0024±0.0004	0.0149±0.0025	0.0107±0.0013	0.0061±0.0036
25 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	0.0083±0.0007 ^a	0.0251±0.0011 ^a	0.0220±0.0051 ^a	0.0219±0.0049
50 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	0.0166±0.0011 ^{ab}	0.0435±0.0043 ^{ab}	0.0408±0.0030 ^{ab}	0.0470±0.0042 ^{ab}
100 mg·L ⁻¹ NaAsO ₂ 组	0.0213±0.0010 ^{abc}	0.0646±0.0042 ^{abc}	0.0695±0.0041 ^{abc}	0.0566±0.0049 ^{abc}
F	577.17	262.2	296.67	163.43
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

[注] a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 25 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组比较, $P < 0.05$; c: 与 50 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 各指标间的相关性分析

Pearson 相关分析结果显示, NaAsO₂ 染毒 24 周

后, 氧化应激指标 T-AOC 与溶酶体功能指标 LAMP2、CTSB、ACP2 呈正相关(均 $P < 0.05$); LPO 与溶酶体功

能指标 CTSB、ACP2 呈负相关(均 $P < 0.05$)。大鼠肝组织自噬相关指标 p62 与溶酶体功能指标 LAMP2、CTSB、ACP2 呈负相关(均 $P < 0.05$), 与肝损伤相关指标 ALT、ALP、TBA 呈正相关(均 $P < 0.05$)。见表 7。

表 7 各指标间的相关性(r)
Table 7 Correlations of selected indexes (r)

指标	p62	T-AOC	LPO
溶酶体相关指标			
LAMP2	-0.570 [*]	0.651 [*]	-0.200
CTSB	-0.626 [*]	0.673 [*]	-0.468 [*]
ACP2	-0.591 [*]	0.626 [*]	-0.482 [*]
肝损伤相关指标			
ALT	0.722 [*]	—	—
ALP	0.897 [*]	—	—
TBA	0.857 [*]	—	—

[注]*: $P < 0.05$ 。

3 讨论

砷中毒肝损伤病情较严重, 砷的毒作用复杂, 发病机制不清, 这些因素已成为制约其防控的难点和瓶颈^[11]。本研究利用课题组前期建立的砷中毒大鼠肝损伤模型^[9], 探讨氧化应激、溶酶体功能、AMPK/ULK1 通路和肝损伤的关系, 旨在为砷暴露致肝损伤机制的研究提供实验依据。

研究发现, NaAsO₂ 染毒 24 周后, 砷染毒组肝脏 CAT、T-AOC 水平下降, LPO 水平上升, 提示 NaAsO₂ 暴露可诱导氧化应激发生。此外, 大鼠肝组织 ALT、ALP、TBA 水平均升高, 该结果提示长期砷暴露导致机体内氧化与抗氧化系统失衡, 过氧化物不能被及时清除而大量堆积, 可能造成肝脏损伤。

周建华等^[12] 研究发现, 在早期 2 型糖尿病肾病患者中, 血糖波动可通过激活氧化应激而引起自噬发生, 但持续的血糖波动可引起氧化应激持续发生, 进而导致自噬缺陷。Tai 等^[13] 研究发现, 在衰老细胞中过表达活性氧会导致溶酶体膜完整性和功能性受到损害。自噬作为一种依赖溶酶体进行降解的途径, 溶酶体功能受损与否与自噬能否正常发生息息相关。溶酶体是一种由单层脂蛋白膜包裹的细胞器, 富含多种适于酸性环境中的水解酶。LAMP2 是位于溶酶体膜上的一类特异性蛋白质, 被称为溶酶体功能标志^[14]。ACP2、CTSB 分别是溶酶体水解酶中的一种酸性磷酸酶类和半胱氨酸蛋白酶类, 常被用于溶酶体功能的检测^[15]。本研究结果显示, 各染砷组大鼠肝组织 LAMP2、CTSB 以及 ACP2 水平均下降, 提示 NaAsO₂ 所

致的大鼠肝损伤模型中存在溶酶体功能障碍。为进一步了解氧化应激与溶酶体功能损伤之间的关系, 本研究对氧化应激指标与溶酶体功能指标进行相关性分析, 结果显示, T-AOC 与 LAMP2、CTSB 以及 ACP2 之间存在正相关关系, LPO 与 CTSB、ACP2 呈负相关关系, 提示氧化应激状态下可能导致溶酶体损伤。

AMPK 是细胞生长和自噬发生的关键调节剂。有报道称氧化应激下 AMPK 可被磷酸化激活以调控其下游因子 ULK1 来促进自噬发生^[16]。ULK1 是自噬启动步骤中的主要调控因子, 可通过调控自噬体的形成与成熟过程, 启动自噬发生^[17]。本研究结果显示, NaAsO₂ 染毒后大鼠肝组织 AMPK 及 ULK1 mRNA 转录水平及其磷酸化蛋白表达水平均升高, 提示 AMPK/ULK1 通路激活。此外, 本研究还检测了自噬发生过程中的经典蛋白 LC3 及 p62, 发现 NaAsO₂ 染毒后, LC3 转录及蛋白表达均增加, 提示砷暴露可导致自噬激活; 但 p62 的蛋白表达也增加, 这可能因为氧化应激状态下, 溶酶体功能受损, 导致自噬溶酶体降解失败。相关性分析结果显示, 自噬指标 p62 与 LAMP2、CTSB、ACP2 之间呈负相关, 提示溶酶体功能受损可能导致自噬发生损伤。此外, p62 与 ALT、ALP、TBA 水平呈正相关, 表明自噬受损可能参与了砷致肝损伤的调节。

综上, NaAsO₂ 长期暴露可诱导氧化应激发生, 损伤溶酶体功能和激活 AMPK/ULK1 通路, 使自噬通路正常发生受阻, 进而造成肝脏损伤。该结果对氧化应激诱导肝损伤的机制有了进一步认识, 但氧化应激、溶酶体功能以及自噬受损如何诱导肝损伤发生的具体机制尚不清楚, 还需进一步研究。

参考文献

- [1] SAHA N, RAHMAN MS. Groundwater hydrogeochemistry and probabilistic health risk assessment through exposure to arsenic-contaminated groundwater of Meghna floodplain, central-east Bangladesh[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 206: 111349.
- [2] NURCHI VM, DJORDJEVIC AB, CRISPONI G, et al. Arsenic toxicity: molecular targets and therapeutic agents[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 235.
- [3] GALLUZZI L, GREEN DR. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery[J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1682-1699.
- [4] OMMATI MM, HEIDARI R, MANTHARI RK, et al. Paternal exposure to arsenic resulted in oxidative stress, autophagy, and mitochondrial impairments in the HPG axis of pubertal male offspring[J]. *Chemosphere*, 2019, 236: 124325.
- [5] NGUYEN NT, SHIN HY, KIM YH, et al. Toxicity detection using lysosomal enzymes, glycoamylase and thioredoxin

- fused with fluorescent protein in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biotechnol*, 2015, 214: 141-146.
- [6] LI RL, WU SS, WU Y, et al. Irisin alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inducing protective autophagy via mTOR-independent activation of the AMPK-ULK1 pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 242-255.
- [7] WANG P, ISRAELIAN L, XUE Y, et al. SGK1 (glucose transport), dishevelled2 (wnt signaling), LC3/p62 (autophagy) and p53 (apoptosis) proteins are unaltered in Lafora disease [J]. *All Results J Biol*, 2016, 7(3): 28-33.
- [8] NIKLAUS M, ADAMS O, BEREZOWSKA S, et al. Expression analysis of LC3 B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 54604-54615.
- [9] 姚茂琳, 张爱华, 于春, 等. 高砷煤烘玉米粉致大鼠砷中毒模型的建立 [J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(9): 799-805.
YAO ML, ZHANG AH, YU C, et al. The establishment of the arsenic poisoning rats model caused by corn flour baked by high-arsenic coal [J]. *Chin J Prev Med*, 2013, 47(9): 799-805.
- [10] 时明阳, 胡倩, 毕顶念, 等. Dicer1、miR-155表达在亚砷酸钠致大鼠肝损伤中的作用 [J]. *环境与职业医学*, 2021, 38(6): 643-648.
SHI MY, HU Q, BI DN, et al. Roles of Dicer1 and miR-155 expression in sodium arsenite-induced liver damage in rats [J]. *J Environ Occup Med*, 2021, 38(6): 643-648.
- [11] 薄立华, 杨绍娟, 郭志良, 等. 免疫组化图像计算机定量分析中若干问题的探讨 [J]. *中国体视学与图像分析*, 2012, 17(2): 180-184.
BO LH, YANG SJ, GUO ZL, et al. Explorations on a number of issues in the computer quantitative analysis of immunohistochemical images [J]. *Chin J Stereol Image Anal*, 2012, 17(2): 180-184.
- [12] 周建华, 李晓华, 贝鹏剑, 等. 早期2型糖尿病肾病患者血糖波动与氧化应激、炎症及单核细胞自噬的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(1): 32-36.
ZHOU JH, LI XH, BEI PJ, et al. Correlation between blood glucose fluctuation and oxidative stress, inflammation and monocyte autophagy in patients with early type 2 diabetic nephropathy [J]. *Chine J Gerontol*, 2021, 41(1): 32-36.
- [13] TAI H, WANG Z, GONG H, et al. Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence [J]. *Autophagy*, 2017, 13(1): 99-113.
- [14] 熊静薇, 毛雨, 李荣荣, 等. 布比卡因增强小鼠成肌细胞溶酶体的活性 [J]. *实用老年医学*, 2015, 29(6): 461-463, 470.
XIONG JW, MAO Y, LI RR, et al. Bupivacaine can enhance lysosomal activity in mouse muscle myoblasts [J]. *Pract Geriatr*, 2015, 29(6): 461-463, 470.
- [15] LASSEN KG, MCKENZIE CI, MARI M, et al. Genetic coding variant in GPR65 alters lysosomal pH and links lysosomal dysfunction with colitis risk [J]. *Immunity*, 2016, 44(6): 1392-1405.
- [16] SUVOROVA II, POSPELOV VA. AMPK/ULK1-dependent autophagy as a key mTOR regulator in the context of cell pluripotency [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4): 260.
- [17] ZACHARI M, GANLEY IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 585-596.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)