

细胞自噬在亚慢性锰染毒致 C57BL/6 小鼠肝脏损伤中的作用研究

申向丽¹, 刘春燕², 张建彬², 刘启玲¹

1. 陕西中医药大学公共卫生学院, 陕西 咸阳 712046

2. 空军军医大学预防医学系, 陕西 西安 710032

摘要:

[背景] 近年来研究发现锰与肝脏疾病的发生发展密切相关, 但其发病机制一直未明。自噬在肝脏疾病中发挥的作用一直具有争议。3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 是自噬功能阻断剂, 可通过调控自噬水平为锰致肝损伤的机制研究提供依据。

[目的] 揭示亚慢性锰染毒对 C57BL/6 小鼠肝脏的损伤效应, 阐明细胞自噬在其中的关键作用及机制。

[方法] 利用 C57BL/6 小鼠建立亚慢性锰染毒模型, 随机分为 4 组, 每组 14 只, 分别为对照组、锰染毒组、3-MA 处理组、锰染毒联合 3-MA 干预组。对照组腹腔注射生理盐水 ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 锰染毒组腹腔注射剂量为 $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的氯化锰 (每周 4 次), 3-MA 处理组腹腔注射 $7.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 3-MA (每周 3 次), 锰染毒联合 3-MA 干预组先注射 $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的氯化锰, 30 min 后注射 $7.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 3-MA。造模结束后随即进行相关指标检测。运用 HE 染色法观察小鼠肝脏形态学的改变; 透射电子显微镜下观察各组小鼠肝细胞的损伤及自噬溶酶体的改变; 运用原子吸收分光光度计对各组小鼠血锰含量进行检测; 使用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 水平的变化; 使用细胞凋亡 (TUNEL) 染色技术评估各组肝细胞的凋亡水平; 使用 Western blotting 检测自噬相关蛋白 LC3-II、Beclin1 的表达情况。

[结果] HE 染色发现与对照组相比, 锰染毒组肝细胞间隙有较多炎性细胞浸润, 且双核细胞数量增多; 3-MA 干预后, 锰染毒对肝脏的炎性浸润及损伤效应有所降低。透射电镜观察发现锰染毒组小鼠肝细胞内线粒体呈现肿胀空泡化现象, 并发现较多待降解的自噬溶酶体; 锰染毒联合 3-MA 干预后线粒体空泡化减少, 自噬溶酶体数量降低。与对照组相比, 锰染毒组血锰、ALT、AST 水平增高 ($P < 0.01$), 注射 3-MA 干预后能够降低锰染毒对 ALT、AST 水平的增高效应 ($P < 0.01$)。Western blotting 检测发现与对照组相比, 锰染毒组自噬相关蛋白 LC3-II、Beclin1 表达水平增高 ($P < 0.01$); 与锰染毒组相比, 锰染毒联合 3-MA 干预组自噬相关蛋白 LC3-II、Beclin1 表达水平降低 ($P < 0.01$)。TUNEL 染色发现与对照组相比, 锰染毒组肝细胞凋亡数量增高 ($P < 0.01$); 3-MA 干预后肝细胞凋亡数量较锰染毒组减少 ($P < 0.01$)。

[结论] 亚慢性锰染毒能够诱导小鼠肝细胞自噬水平升高, 并伴随着肝细胞损伤及肝脏功能下降, 运用自噬抑制剂干预后可改善锰染毒对小鼠的肝脏损伤, 提示锰染毒诱导的肝细胞损伤部分可能是通过自噬途径实现的。

关键词: 锰染毒; 自噬; 肝损伤; 3-甲基腺嘌呤

Role of cell autophagy in liver injury in C57BL/6 mice after subchronic manganese exposure

SHEN Xiang-li¹, LIU Chun-yan², ZHANG Jian-bin², LIU Qi-ling¹ (1.School of Public Health, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China; 2.Department of Preventive Medicine, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract:

[Background] Recent studies have found that manganese is closely related to the development of liver disease, but its pathogenesis has not been elucidated. The role of autophagy in liver diseases is controversial. As an autophagy blocker, 3-methyladenine (3-MA) can regulate autophagy levels, which provides clues for revealing the mechanism of manganese-induced liver injury.

[Objective] This study is designed to reveal the damage effect of subchronic manganese exposure on the liver of C57BL/6 mice, and to elucidate the key role and mechanism of subsequent autophagy in cells.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19545

基金项目

国家自然科学基金青年项目 (81602815); 陕西省自然科学基金青年项目 (2018JQ8005)

作者简介

申向丽 (1993—), 女, 硕士生; E-mail: 582356214@qq.com

通信作者

刘启玲, E-mail: liuqilingsan@163.com

伦理审批

已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-08-06

录用日期 2019-12-30

文章编号

2095-9982(2020)02-0168-06

中图分类号 R135.1

文献标志码 A

引用

申向丽, 刘春燕, 张建彬, 等. 细胞自噬在亚慢性锰染毒致 C57BL/6 小鼠肝脏损伤中的作用研究[J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (2): 168-173.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19545

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIU Qi-ling, E-mail: liuqilingsan@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-08-06

Accepted 2019-12-30

To cite

SHEN Xiang-li, LIU Chun-yan, ZHANG Jian-bin, et al. Role of cell autophagy in liver injury in C57BL/6 mice after subchronic manganese exposure[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(2): 168-173.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19545

[Methods] C57BL/6 mice were used to establish a subchronic manganese exposure model. The animals were randomly divided into four groups with 14 animals in each group: control group, manganese exposure group, 3-MA treatment group, and manganese exposure combined with 3-MA intervention group. The control group was intraperitoneally injected with normal saline ($0.01 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$); the manganese group was intraperitoneally injected with $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ manganese chloride (four times per week); the 3-MA treatment group was intraperitoneally injected with $7.33 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 3-MA (three times per week); the manganese exposure combined with 3-MA intervention group was injected with $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ manganese chloride for 30 min before $7.33 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 3-MA. Relevant indicators were tested immediately after modeling. Liver histological changes were observed with HE staining. The injury of hepatocytes and the changes of autophagic lysosomes in liver tissues were observed under transmission electron microscope. Blood manganese level was detected using atomic absorption spectrophotometer. The changes of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were detected using automatic biochemical analyzer. The apoptosis level of hepatocytes was evaluated with TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. The expressions of autophagy related proteins LC3-II and Beclin1 were detected by Western blotting.

[Results] The HE staining results showed that compared with the control group, there were more inflammatory cell infiltration in the intracellular space and more binucleate cells in the manganese exposure group; after 3-MA intervention, the liver inflammatory infiltration and liver injury induced by manganese exposure were reduced. The transmission electron microscopy observation showed that mitochondria in liver cells of mice exposed to manganese were swollen and vacuolated, and more autophagic lysosomes were to be degraded; after 3-MA intervention, the vacuolization of mitochondria and the number of autophagic lysosomes were decreased. Compared with the control group, the levels of blood manganese, ALT, and AST in the manganese exposure group were increased ($P < 0.01$); after 3-MA intervention, the increased ALT and AST levels were reduced ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with the control group, the expression levels of autophagy related proteins LC3-II and Beclin1 were increased in the manganese exposure group ($P < 0.01$); compared with the manganese exposure group, the protein expression levels were reduced in the combined 3-MA intervention group ($P < 0.01$). The TUNEL staining results showed that compared with the control group, the apoptosis hepatocytes in the manganese exposure group were increased ($P < 0.01$); compared with the manganese exposure group, the apoptosis hepatocytes in the combined 3-MA intervention group were reduced ($P < 0.01$).

[Conclusion] Subchronic manganese exposure can induce an elevation of autophagy in mouse hepatocytes, accompanied by liver injury and liver function decline, and treatment with autophagy inhibitor can reduce liver damage in manganese exposed mice, suggesting that liver cell damage induced by manganese exposure may be partially resulted from autophagy.

Keywords: manganese exposure; autophagy; liver injury; 3-methyladenine

锰(Mn)在环境中普遍存在,也是机体内重要的微量元素。锰对于许多生理过程如三磷酸腺苷产生和凝血以及调节和维持其正常功能至关重要;它是许多酶的辅助因子和激活剂,如谷氨酰胺合成酶、半乳糖转移酶、精氨酸酶、超氧化物歧化酶和丙酮酸羧化酶;它在骨骼发育、细胞代谢、线粒体抗氧化系统与细胞死亡中也均有一定作用^[1]。尽管它具有营养价值,但锰过量或锰缺乏均会对机体产生不良影响。首次在鸡体内报告有锰缺乏症病例,研究发现是糖基转移酶活性不足导致的骨头畸形,这种锰缺乏的症状主要在骨骼和结缔组织的形成和生长过程中表现出来,其特点主要表现为体重减轻、骨骼生长不良、骨骼异常、血液凝结和低胆固醇血症^[2]。在人类与成年动物中锰缺乏症极为罕见,因此锰生物学相关疾病的研究主要围绕着锰的过量暴露而不是锰缺乏。无机锰被用于许多行业,包括钢铁生产、汽油防震添加剂制造、采矿、焊接、电池组装以及玻璃和陶瓷制造^[3]。由于锰的广泛应用,越来越多的锰接触人群出现了锰中毒症状,并且发现患有肝病的人血液中锰水平有所上升。除了接触水平和持续时间外,年龄、性别、种族、遗传、地域等也均为锰中毒的相关危险因素。

Klaassen^[4]于1976年最早提出锰可阻碍胆汁排泄,表明锰可能有一定的肝毒性。肝脏是已知最大的锰储存器官,锰的吸收主要发生在肝脏,通过肝胆管排出是人体清除锰的主要途径,占锰清除量的80%,锰过量积累则会使肝功能减弱;多项动物实验也表明大鼠在锰染毒后出现了肝肿大,体重减轻,血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)异常升高等肝损伤表现^[5]。

细胞自噬是参与细胞稳态和存活机制的正常生理过程,形成的自噬溶酶体负责降解微生物(病毒、细菌、真菌)、受损的细胞器和受损的蛋白质^[6]。由于向溶酶体传递物质的通道有所差异,自噬分为三种类型,即巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。目前实验室中的大部分研究主要集中在巨自噬(以下简称自噬)。在自噬发生过程中,自噬相关蛋白LC3合成后,其羧基端被自噬相关基因Atg4剪切,产生位于细胞浆的LC3-I, LC3-I会被Atg7和Atg3修饰并加工,产生附着于自噬小体的LC3-II。自噬过程被认为是内源性防御机制的一种形式,它允许细胞在恶劣的条件下生存,包括缺氧、高温、饥饿和氧化应激等^[7]。当机体受到损伤和刺激时,如营养缺乏、细胞器损伤、蛋

白质蓄积、组织损伤,可以引起细胞自噬水平增强。但研究发现过度自噬则会损伤细胞,以前被称为II型程序性细胞死亡,现在被称为自噬性细胞死亡^[8]。阻碍正常自噬过程可能会导致各种疾病,如肝脏相关疾病、神经退行性疾病、癌症和心血管疾病。如今自噬已被认为是一种疾病相关因素,异常的自噬可以促进各种肝脏疾病的发生和发展,包括肝炎、纤维化、脂肪变性、肝硬化甚至肝癌^[9]。最重要的是,对自噬的调节已被广泛证明可以改变与肝脏有关疾病的发生和结果,这意味着它代表了一种预防和治疗肝脏疾病的新方法。虽然自噬在疾病中的确切作用仍有待确定,但改变自噬水平已成为各种疾病治疗方法的潜在目标。

在本课题前期的研究中已经发现亚慢性锰染毒可使小鼠肝细胞自噬水平增高,但是自噬水平的改变在锰致小鼠肝损伤的过程中具体扮演了怎样的角色仍是未知的。为了阐明这一点,本研究拟使用自噬抑制剂三甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)进行自噬过程的干预,从而探讨细胞自噬在锰致肝脏损伤的发生发展过程中可能发挥的作用,进一步为亚慢性锰暴露所致肝损伤的防治提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

在该研究中共使用56只6周龄雄性C57BL/6小鼠,体重(20±2)g,购自第四军医大学实验动物中心。实验动物伦理批准号为20190503。将C57BL/6小鼠饲养在标准条件下(每笼3~4只小鼠,20~24℃,相对湿度45%~65%,12h光照/黑暗循环),并在整个研究过程中给予充足的食物和水。

用电子秤称取90mg MnCl₂·4H₂O(分子量:197.91,美国ACROS ORGANICS),随即溶于30mL去离子水中,混匀后用孔径为0.22μm的过滤器滤过杂质,最后分装在2.5mL EP管中,保存于4℃备用。自噬抑制剂3-MA(分子量:149.15)购自美国Sigma公司。称量22mg 3-MA溶于30mL PBS中,使其充分溶解后分装在2.5mL EP管中,保存于4℃备用。本实验过程中所需的LC3-II、Beclin1、β-actin抗体均购自CST中国分公司。

1.2 建立亚慢性锰染毒小鼠模型

适应性喂养7d后将C57BL/6小鼠随机分为4组:对照组、锰染毒组、3-MA处理组、锰染毒联合3-MA

干预组,每组14只。锰染毒组按照15mg·kg⁻¹的剂量腹腔注射MnCl₂·4H₂O,注射体积按0.01mL·g⁻¹计;对照组给予相同体积的0.9%(质量分数)NaCl,采用相同的给药方式;3-MA处理组按照7.33mg·kg⁻¹的剂量腹腔注射3-MA;锰染毒联合3-MA组先给予15mg·kg⁻¹的MnCl₂·4H₂O,半小时后再给予7.33mg·kg⁻¹的3-MA。各组MnCl₂·4H₂O一周注射4次,注射时间为每周一、二、四、五;3-MA一周注射3次,注射时间为每周一、四、五,造模时间一共为4周。

1.3 HE染色检测肝组织损伤

造模4周后,用5%的水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,充分麻醉后将小鼠放于泡沫板上用剪刀剖开胸腹,使心脏完全暴露,使用1mL注射器穿刺小鼠右心室并缓慢抽取全血,立即存于促凝管,静置5min后对称放于离心机内,将离心机转速设置为3000r·min⁻¹,离心半径为5cm,离心时间为15min。待血清完全分离后用1mL移液器缓慢吸出上层血清,保存于冻存管内,暂放于-80℃冰箱。

抽取全血后用0.9%NaCl冲洗心脏与血管,用4%的多聚甲醛对心脏进行灌注固定,迅速分离肝脏组织,浸泡于多聚甲醛液中48h,用15%蔗糖脱水24h,取出组织再用25%蔗糖脱水24h之后行冰冻连续切片,进行常规HE染色。在光镜下评估肝脏组织损伤程度。

1.4 电镜观察

各组动物解剖并心脏抽血后,剪破小鼠右心耳,抽取生理盐水穿刺左心室后将小鼠心血管中残存的血液冲干净,直至小鼠肝脏从红色渐变至棕色,立即取出肝脏组织块,在固定液中剪切成1mm³的小正方体后放入提前准备好的小瓶固定液中,送电镜室切片,染色,将染色后的超薄切片放到单孔铜网盒上,在透射电镜下观察肝细胞超微结构并拍照。

1.5 血锰含量检测

在各组小鼠血样中加入1%硝酸溶液稀释贮备液,运用原子吸收分光光度计检测稀释后各组血锰浓度,并依据稀释倍数计算血锰含量。

1.6 ALT和AST含量测定

用全自动生化分析仪测定肝功能生化指标ALT、AST含量。

1.7 Western blotting检测自噬相关蛋白LC3-II、Beclin1

在取得小鼠新鲜肝组织后进行蛋白提取,按照晶

彩生物公司 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒的说明书配置需测定蛋白对应浓度的凝胶, LC3-II 配置 15% 的凝胶, Beclin1 配置 12% 的凝胶, 在不同膜上分别发光。保证每个泳道的上样量相等, 常规设置恒压 80V, 电泳 25 min 后调整电压为 120V, 继续电泳直到溴酚蓝到达胶的底部, 之后调整电流为 250 mA 恒流, 在提前配好并预冷的电转液中湿转, LC3-II 电转 45 min, Beclin1 电转 80 min, 电转结束后取出聚偏二氟乙烯膜用 5% 封闭液常温封闭 90 min, 放入相应的一抗中 4°C 孵育过夜, 次日用 TBST 缓冲液将聚偏二氟乙烯膜在摇床上洗 3 次, 每次 10 min, 二抗常温孵育 2 h 并再次用 TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 10 min。最后按照 A 液: B 液=1:1 的比例配制适量的发光液, 把膜放入凝胶成像系统中, 将发光液均匀地滴加在聚偏二氟乙烯膜上, 设置参数, 进行曝光。

1.8 TUNEL 染色

肝组织标本经石蜡包埋后常规切片, 依次将切片放入二甲苯、无水乙醇、85% 酒精、75% 酒精中浸洗 1 次, 每次 5 min。切片脱水后滴加蛋白酶 K 工作液覆盖组织, 37°C 温盒孵育 25 min。将玻片置于 PBS 中洗 3 次, 每次 5 min。按玻片数量和组织大小取 TUNEL 试剂盒 (上海 Roche) 内适量试剂 1 末端脱氧核苷酸转移酶和试剂 2 脱氧尿嘧啶, 按 1:9 比例混合后滴加在组织上, 37°C 恒温箱孵育 2 h, 湿盒内加少量水保持湿度。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。滴加 4, 6-二氨基-2-苯基吲哚染液, 避光室温孵育 10 min。玻片置于 PBS 中洗 3 次, 每次 5 min。最后用抗荧光淬灭封片剂封片。显微镜下观察, 凋亡细胞的细胞核为绿色, 非凋亡细胞的细胞核呈蓝色。在高倍镜下, 每张切片随机选取 3 个视野, 计算每个视野的凋亡率, 凋亡率 (%) = 凋亡细胞数 / 总细胞数。

1.9 统计学分析

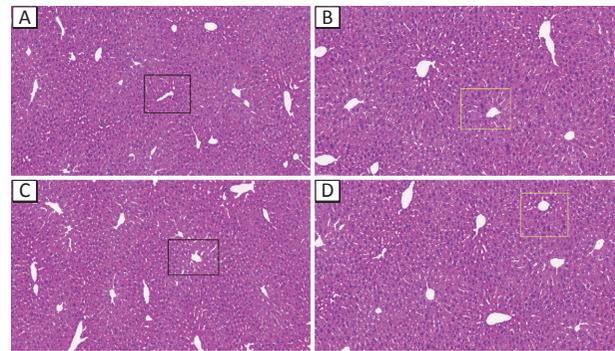
所有统计分析均使用 SPSS 22.0 进行。所有检测结果均以均数 ± 标准差表示, 经正态性检验和方差齐性检验。多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HE 染色结果

HE 染色结果显示对照组小鼠肝细胞结构正常, 几乎无炎性细胞, 未见双核细胞。锰染毒组小鼠肝细胞间隙有较多炎性细胞浸润, 且双核细胞数量异常增多。与锰染毒组相比, 锰染毒联合 3-MA 干预组炎性

细胞浸润减少, 双核细胞数量有所降低。见图 1。

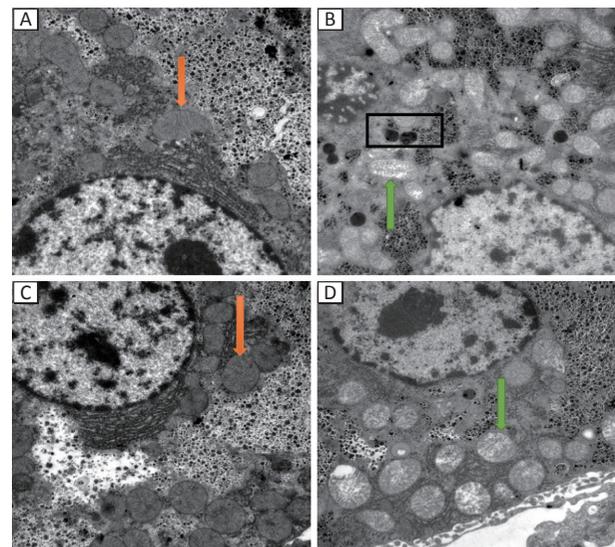


[注] A: 对照组; B: 锰染毒组; C: 3-MA 处理组; D: 锰染毒联合 3-MA 干预组。黑色方框: 正常细胞; 黄色方框: 炎性细胞, 双核细胞。

图 1 各组小鼠肝细胞病理变化 (HE 染色, ×20)

2.2 电镜观察结果

镜下观察到对照组与 3-MA 处理组肝细胞形态正常, 线粒体丰富, 嵴饱满清晰, 偶见自噬小体或自噬溶酶体出现。锰染毒组肝细胞胞质内线粒体严重空泡化, 嵴完全消失, 可见到较多的具有双层膜结构的待降解自噬溶酶体。锰染毒联合 3-MA 干预组线粒体轻度空泡化, 偶见待降解自噬溶酶体。见图 2。



[注] A: 对照组; B: 锰染毒组; C: 3-MA 干预处理组; D: 锰染毒联合 3-MA 干预组。橙色箭头: 正常线粒体; 绿色箭头: 空泡化线粒体; 黑色方框: 自噬溶酶体。

图 2 透射电镜观察各组小鼠肝细胞超微结构 (×15000)

2.3 血锰结果

与对照组相比, 锰染毒组与锰染毒联合 3-MA 干预组血锰水平增高 ($P<0.01$); 3-MA 处理组与对照组血锰水平差异没有统计学意义 ($P>0.05$); 锰染毒组与锰染毒联合 3-MA 干预组血锰水平没有统计学差异 ($P>0.05$)。见表 1。

表1 各组小鼠血锰水平 ($n=14$)

组别	血锰质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
对照组	36.22±8.74
锰染毒组	657.05±109.85*
3-MA处理组	35.57±8.58
锰染毒联合3-MA干预组	636.59±110.11*
<i>F</i>	122.72
<i>P</i>	<0.001

[注] *: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

2.4 ALT、AST 测定结果

与对照组相比, 锰染毒组 ALT、AST 水平增高 ($P<0.01$); 3-MA 处理组与对照组结果差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与锰染毒组相比, 锰染毒联合 3-MA 干预组 ALT、AST 水平有所降低 ($P<0.01$)。见表 2。

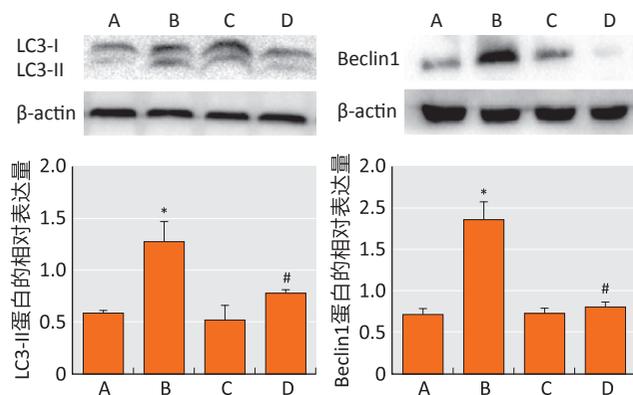
表2 各组小鼠血清 ALT、AST 含量变化 ($n=14$)

组别	ALT 含量/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	AST 含量/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
对照组	35.86±3.79	70.33±7.96
锰染毒组	47.83±3.18*	155.08±8.74*
3-MA处理组	33.05±1.64	64.83±9.41
锰染毒联合3-MA干预组	42.83±3.18#	109.16±6.11#
<i>F</i>	28.81	157.53
<i>P</i>	<0.001	<0.001

[注] *: 与对照组比较, $P<0.01$; #: 与锰染毒组比较, $P<0.01$ 。

2.5 Western blotting 结果

与对照组相比, 锰染毒后小鼠肝细胞中自噬溶酶体相关蛋白 LC3-II、Beclin1 表达水平升高 ($P<0.01$)。与锰染毒组相比, 锰染毒联合 3-MA 干预组自噬相关蛋白表达水平有所降低。见图 3。



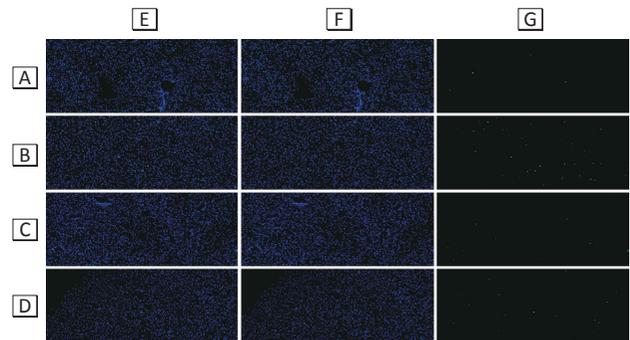
[注] A: 对照组; B: 锰染毒组; C: 3-MA 处理组; D: 锰染毒联合 3-MA 干预组。*: 与对照组比较, $P<0.01$; #: 与锰染毒组比较, $P<0.01$ 。

图3 Western blotting 方法检测各组小鼠肝细胞 LC3 II、Beclin1 蛋白表达的变化

2.6 TUNEL 染色结果

TUNEL 染色发现与对照组相比, 锰染毒组肝细胞凋亡数量增加 ($P<0.01$)。锰染毒联合 3-MA 干预组肝细胞凋亡数量较锰染毒组有所减少 ($P<0.01$)。见图 4

和表 3。



[注] A: 对照组; B: 锰染毒组; C: 3-MA 处理组; D: 锰染毒联合 3-MA 干预组。E: 合成; F: 细胞核; G: 凋亡细胞。

图4 TUNEL 染色观察各组肝细胞凋亡水平 ($\times 20$)

表3 TUNEL 检测各组小鼠肝细胞凋亡改变 ($n=3$)

组别	肝细胞凋亡率/%
对照组	3.30±0.60
锰染毒组	9.96±1.95*
3-MA处理组	3.46±0.89
锰染毒联合3-MA干预组	7.33±0.66*#
<i>F</i>	23.04
<i>P</i>	<0.001

[注] *: 与对照组比较, $P<0.01$; #: 与锰染毒组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

锰摄入过量对机体具有潜在毒性, 锰主要在肝脏代谢, 因此过量锰染毒首先对肝脏造成损伤。本研究对 C57BL/6 小鼠进行亚慢性锰染毒后, 锰染毒组小鼠血锰浓度较对照组上升, 并伴随着两种氨基转移酶 (AST 和 ALT) 的异常升高。ALT、AST 是与肝功能密切相关的肝功能酶, 当细胞内过多的肝功能酶转移到血液循环中时, 可作为肝细胞损伤诊断的依据, 因此 ALT、AST 是反映许多慢性肝疾病严重程度的生物标志物^[10]。此结果证实在造模成功的基础上亚慢性锰染毒确实对小鼠的肝脏有一定程度的损害。HE 染色发现锰染毒组小鼠肝细胞炎性因子与异常双核细胞明显增多, 与肝功能结果相一致。然而, 锰对肝细胞的损伤机制尚未完全阐明。关于锰中毒的机制, 目前的研究发现可能与以下方面有关: 氧化应激、线粒体功能障碍、蛋白质错叠、内质网应激、自噬失调、凋亡和其他金属稳态的破坏^[11]。

在生理学上, 自噬是由溶酶体介导的蛋白质和细胞器的降解过程, 并参与细胞代谢和存活的调节^[12]。自噬功能紊乱与许多疾病有关。在本研究中, 透射电镜结果显示锰染毒组小鼠肝细胞中自噬小体较对照组明显增多, 线粒体有明显损伤, 未降解溶酶体增

加。*BECN1* 基因编码的蛋白 (Beclin1) 是重要的调控自噬的分子, 可介导相关自噬蛋白作用于自噬泡, 并可与多种蛋白反应从而调控自噬体的形成和成熟。微管相关蛋白 LC3 是自噬相关的标志性蛋白质, LC3-II 阳性的定量化可用于评估细胞中自噬体的数量^[13]。分子生物学检测发现小鼠在慢性锰染毒后肝细胞 LC3-II、Beclin1 的表达水平明显增高, 结合电镜结果说明锰染毒可使小鼠肝细胞自噬增强。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路是调节自噬的重要通路, 3-MA 是 PI3K 抑制剂, 它可通过影响自噬体的形成过程从而抑制自噬^[14], 所以本研究使用自噬抑制剂 3-MA 对锰染毒小鼠的自噬状态进行干预, 探索细胞自噬在亚慢性锰染毒致小鼠肝损伤过程中发挥的作用。研究表明, 小鼠在染锰的同时注射 3-MA 后, 血清 AST 和 ALT 活性较单纯锰染毒组降低, 电镜结果显示自噬小体明显减少, 线粒体空泡化减轻, 同时小鼠肝细胞中 LC3-II 和 Beclin1 的表达水平降低, HE 染色显示锰染毒联合 3-MA 干预组可见少量炎性细胞浸润, 双核现象较少, TUNEL 结果显示锰染毒的同时给予 3-MA 干预, 肝细胞凋亡水平有所改善, 说明 3-MA 对肝损伤的发生发展具有抑制作用。综合结果表明锰染毒诱导的肝脏细胞损伤有一部分可能是通过自噬途径实现的。

综上, 锰诱导的自噬参与了肝损伤的发展, 抑制自噬可能成为锰致肝毒性潜在治疗的策略。自噬在多种肝脏疾病的肝细胞中受到调节, 一方面肝细胞自噬的增强在维持细胞稳态和消除肝脏细胞中不需要的细胞内物质 (如蛋白质和细胞器) 中起着关键作用, 另一方面自噬也与促进肝损伤诱导的细胞死亡和肝脏相关疾病的发展有关, 这表明干扰自噬可能是减轻肝脏疾病进展的新途径。因此, 自噬在肝脏疾病中的生理意义仍然存在争议, 并且在很大程度上受到不同原因所致的肝毒性以及研究之间差异的阻碍, 需要进一步全面剖析自噬在肝脏相关疾病的诱导和进展中的详细作用。此外, 需要更好地研究自噬在肝病进展的不同阶段的临床相关性, 进而制定可行的治疗策略, 以有效治愈临床环境中的肝脏疾病。

参考文献

[1] AVILA DS, PUNTEL RL, ASCHNER M. Manganese in health

and disease [J]. *Met Ions Life Sci*, 2013, 13 (7) : 199-227.

[2] ASCHNER M, ERIKSON K. Manganese [J]. *Adv Nutr*, 2017, 8 (3) : 520-521.

[3] MICHALKE B, FERNSEBNER K. New insights into manganese toxicity and speciation [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2014, 28 (2) : 106-116.

[4] KLAASSEN CD. Biliary excretion of metals [J]. *Drug Metab Rev*, 1976, 5 (2) : 165-196.

[5] O'NEAL SL, ZHENG W. Manganese toxicity upon overexposure : a decade in review [J]. *Curr Environ Health Rep*, 2015, 2 (3) : 315-328.

[6] RAVANAN P, SRIKUMAR IF, TALWAR P. Autophagy : the spotlight for cellular stress responses [J]. *Life Sci*, 2017, 188 : 53-67.

[7] VIRY E, PAGGETTI J, BAGINSKA J, et al. Autophagy : an adaptive metabolic response to stress shaping the antitumor immunity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 92 (1) : 31-42.

[8] FITZWALTER BE, THORBURN A. Recent insights into cell death and autophagy [J]. *FEBS J*, 2015, 282 (22) : 4279-4288.

[9] KE P Y. Diverse functions of autophagy in liver physiology and liver diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (2) : 300.

[10] LIU Y, ZHAO P, CHENG M, et al. AST to ALT ratio and arterial stiffness in non-fatty liver Japanese population : a secondary analysis based on a cross-sectional study [J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17 (1) : 275.

[11] CHEN P, BORNHORST J, ASCHNER M. Manganese metabolism in humans [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018, 23 : 1655-1679.

[12] PARZYCH KR, KLIONSKY DJ. An overview of autophagy : morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20 (3) : 460-473.

[13] SCHAAF MB, KEULERS TG, VOOIJS MA, et al. LC3/GABARAP family proteins : autophagy- (un) related functions [J]. *FASEB J*, 2016, 30 (12) : 3961-3978.

[14] SLAVIN SA, LEONARD A, GROSE V, et al. Autophagy inhibitor 3-methyladenine protects against endothelial cell barrier dysfunction in acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314 (3) : L388-L396.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 韩凤娟, 汪源 ; 校对 : 陈姣)