# 氧化应激、PSMB5、TFEB 和溶酶体在 亚砷酸钠致大鼠肝损伤中的作用

汪红铃,时明阳,毕顶念,支海燕,胡倩,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

#### 摘要:

[背景] 地方性砷中毒肝损伤较为严重。研究表明,氧化应激、蛋白酶体 β5 亚基(PSMB5)、调 节转录因子 EB(TFEB)和溶酶体与肝损伤有关,但它们与砷中毒肝损伤的具体联系尚不清楚。

[目的] 利用课题组前期建立的亚砷酸钠(NaAsO<sub>2</sub>)致大鼠肝损伤模型, 检测肝组织中 PSMB5、 TFEB 和溶酶体关联膜蛋白 1(LAMP1)的表达。

[方法] 24 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为对照组,低、中、高浓度组,每组 6 只,雌雄各半;染 毒浓度分别为 0、25、50、100 mg·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> 水溶液,染毒 24 周。染毒结束后,麻醉大鼠取肝 脏。采用化学比色法检测肝组织碱性磷酸酶(ALP)、谷丙转氨酶(ALT)、总胆汁酸(TBA)、过氧 化氢酶(CAT)水平;采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测肝组织脂质过氧化物(LPO)、4-羟基 壬烯醛(4-HNE)、LAMP1、组织蛋白酶 D(CTSD)水平;采用实时荧光定量 PCR 法检测肝组织 *PSMB5、TFEB* 转录表达水平;采用免疫组化检测肝组织 PSMB5、TFEB、磷酸化 TFEB(p-TFEB) 蛋白表达情况。

[结果] 化学比色法和 ELISA 法结果显示:与对照组相比,各染砷组大鼠肝匀浆 ALP、TBA、 LAMP1,中、高浓度组 ALT、LPO,高浓度组 4-HNE、CTSD 水平均升高,而各染砷组 CAT 活性均 降低(P<0.05)。实时荧光定量 PCR 结果显示:各染砷组肝组织 PSMB5、TFEB 转录水平与对 照组相比均下降(P<0.05)。免疫组化结果显示:与对照组比较,各染砷组肝组织 PSMB5,中、 高浓度组 TFEB 蛋白表达均下降,而各染砷组 p-TFEB 蛋白表达均升高(P<0.05);随染砷浓度 增加,TFEB 蛋白表达在胞核逐渐减弱,p-TFEB 蛋白表达在细胞质中逐渐增强,p-TFEB 在胞核 未见表达。Pearson 相关性分析结果显示: 肝组织 PSMB5 与 CAT 呈正相关(r=0.818,P<0.05), 与 4-HNE、p-TFEB 呈负相关(r=-0.582,r=-0.899;P<0.05); TFEB 与 CTSD、LAMP1 均呈负相关 (r=-0.457,r=-0.564;P<0.05); CTSD 与 ALT、ALP 均呈正相关(r=0.529、r=0.485;P<0.05)。

[结论] NaAsO<sub>2</sub> 长期暴露可诱导氧化应激发生,抑制 PSMB5 和 TFEB 表达,促使细胞质中 p-TFEB 累积增多,活性 TFEB 入核减少,溶酶体受损,引起肝脏损伤。

关键词:砷;氧化应激;肝损伤;溶酶体;蛋白酶体β5亚基;转录因子EB

Effects of oxidative stress, PSMB5, TFEB, and lysosomes on sodium arsenite-induced liver injury in rats WANG Hongling, SHI Mingyang, BI Dingnian, ZHI Haiyan, HU Qian, HU Yong (School of Public Health/ Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China) Abstract:

**[Background]** Liver damage presented in endemic arsenic poisoning is usually serious. Studies have shown that oxidative stress, proteasome beta 5 subunit (PSMB5), regulatory transcription factor EB (TFEB), and lysosomes are associated with liver injury, but their specific links to arsenic-induced liver injury remain unclear.

**[Objective]** Using a sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>)-induced rat liver injury model established earlier by the research group, the expressions of PSMB5, TFEB, and lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1) in liver tissues were detected.

**[Methods]** Twenty-four SPF Wistar rats were randomly divided into control group, and low, medium, and high dose groups, with 6 rats in each group, half male and half female. The exposure concentrations were 0, 25, 50, and 100 mg·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> solutions for 24 weeks. At the end of the experiment, liver was dissected after rats were anesthetized. The levels of alkaline phosphatase



DOI 10.11836/JEOM22128

#### 基金项目

国家自然科学基金项目(82160649,81860561); 贵州省科学技术基金项目(黔科合基础-ZK[2022] 一般 351)

作者简介 汪红铃(1998—),女,硕士生; E-mail: 724594090@gg.com

通信作者 胡勇,E-mail: huyong1979@gmc.edu.cn

伦理审批 不需要 利益冲突 无申报 收稿日期 2022-05-02 录用日期 2022-08-16

文章编号 2095-9982(2022)10-1134-06 中图分类号 R114 文献标志码 A

#### ▶引用

注红铃,时明阳,毕顶念,等.氧化应激、 PSMB5、TFEB 和溶酶体在亚砷酸钠致大鼠肝 损伤中的作用 [J].环境与职业医学,2022, 39(10):1134-1139.

#### ▶本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22128

Funding This study was funded.

Correspondence to HU Yong, E-mail: huyong1979@gmc.edu.cn

Ethics approval Not required Competing interests None declared Received 2022-05-02 Accepted 2022-08-16

#### To cite

WANG Hongling, SHI Mingyang, BI Dingnian, et al. Effects of oxidative stress, PSMB5, TFEB, and lysosomes on sodium arsenite-induced liver injury in rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(10): 1134-1139.

#### Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22128

(ALP), alanine aminotransferase (ALT), total bile acid (TBA), and catalase (CAT) in liver tissues were detected by chemical colorimetry, and the levels of lipid peroxide (LPO), 4-hydroxynonenal (4-HNE), LAMP1, and cathepsin D (CTSD) in liver tissues were detected by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA); the transcriptional expression levels of *PSMB5* and *TFEB* in liver tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), and the protein expressions of PSMB5, TFEB, and phosphorylated TFEB (p-TFEB) in liver tissues were detected by immunohistochemistry.

**[Results]** The results of chemical colorimetry and ELISA showed that compared with the control group, the liver homogenate levels of ALP, TBA, and LAMP1 of each arsenic-exposed group, the ALT and LPO in the medium and high concentration groups, the 4-HNE and CTSD in the high concentration group were increased, while the CAT activity of each arsenic-exposed group was decreased (P < 0.05). The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the transcription levels of *PSMB5* and *TFEB* in the liver tissues of each arsenic-exposed group were decreased compared with those of the control group (P < 0.05). The results of immunohistochemistry showed that compared with the control group, the expression of PSMB5 of each arsenic-exposed group were decreased, the expression of TFEB in the medium and high concentration groups was decreased, while the expression of p-TFEB of each arsenic-exposed group was increased (P < 0.05). The results of reach arsenic-exposed group was increased (P < 0.05). The expression of TFEB protein gradually decreased in the nucleus, while the expression of p-TFEB protein gradually increased in the cytoplasm, but no expression of p-TFEB was found in the nucleus. The results of Pearson correlation analysis showed that PSMB5 in liver tissues was positively correlated with CAT (r=0.818, P < 0.05), and negatively correlated with 4-HNE and p-TFEB (r=-0.582, r=-0.899; P < 0.05); TFEB was negatively correlated with CTSD and LAMP1 (r=-0.457, r=-0.564; P < 0.05); CTSD was positively correlated with ALT and ALP (r=0.529, r=0.485; P < 0.05).

[Conclusion] Long-term exposure to NaAsO<sub>2</sub> can induce oxidative stress, inhibit the expression of PSMB5 and TFEB, promote the accumulation of p-TFEB in the cytoplasm, decrease the nuclear entry of active TFEB, damage the lysosome, and cause liver damage.

Keywords: arsenic; oxidative stress; liver injury; lysosome; proteasome beta 5 subunit; transcription factor EB

砷是广泛分布于自然界中的一类微量元素,被国际癌症研究机构划分为一类致癌物<sup>[1]</sup>。地方性砷中毒 (以下简称地砷病)是一类由砷引起,以多系统、多脏 器损害为主的慢性疾病,至少危害 22 个国家和地区 约 2 亿人口的健康。肝脏是地砷病的重要靶器官,地 砷病肝损伤具有发病率和死亡率较高的特点,给患者 带来了巨大的身心痛苦,也给国家和地方造成了巨大 的经济损失。砷致肝损伤的发病机制尚不完全清楚, 已成为地砷病防控工作的瓶颈和难点,也是亟待解决 的关键问题。砷诱导氧化应激导致肝损伤得到广泛认 可,但具体机制尚不明确。

课题组前期研究发现,亚砷酸钠(NaAsO<sub>2</sub>)染毒 可使 L-O2 肝细胞发生氧化应激,抑制蛋白酶体 β5 亚 基(proteasome subunit beta type-5, PSMB5)蛋白表达<sup>[2]</sup>。 PSMB5 是泛素蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)发挥水解活性的重要组成部分, UPP 通过介导目标蛋白降解或改变蛋白活性维持机体蛋 白平衡, PSMB5 在蛋白酶体水解底物时发挥重要作 用<sup>[3]</sup>。溶酶体也是一个重要的蛋白质降解途径,通过 降解自身受损的细胞器和生物大分子,参与蛋白质 等物质以及细胞器更新过程,其在人类疾病的发生 发展过程中发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>。泛素蛋白酶体途 径与溶酶体途径是真核生物体内两大蛋白质降解途 径,这两大系统并不是独立存在,而是相互调控,相 互影响。

转录因子 EB(transcription factor EB, TFEB)是小眼

畸形相关转录因子家族的一员,在溶酶体生物发生及 下游基因的表达中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。TFEB 的细胞定 位和活性主要受其磷酸化状态控制: TFEB 以磷酸化状 态存在于细胞质,在饥饿或溶酶体功能障碍时,TFEB 去磷酸化并迅速易位到细胞核,激活其靶基因的转 录<sup>66</sup>。有研究显示,氧化应激状态下,UPP 可降解磷酸 化 TFEB(phosphorylated TFEB, p-TFEB),从而调节 TFEB 的活性与细胞定位,进一步参与调节溶酶体生物活 性<sup>[7]</sup>。Chao 等<sup>[8]</sup>研究表明,乙醇干预后,与正常小鼠相 比, TFEB 基因敲除小鼠组肝细胞内溶酶体数量减少 30%,且肝脏脂肪性病变更为严重。溶酶体关联膜蛋 白 1(lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1) 是维持溶酶体膜稳定性和完整性的主要蛋白<sup>99</sup>,当细 胞受到外界损伤时,溶酶体膜被破坏,稳定性和完整 性发生改变,发生溶酶体膜通透化<sup>[10]</sup>。溶酶体膜通透 化的发生会使溶酶体内的各种水解酶释放到细胞质 中,引发细胞凋亡、死亡等过程;其中组织蛋白酶 D(cathepsin D, CTSD)是溶酶体中降解作用最为突出的 一种水解酶<sup>[11]</sup>。LAMP1 和 CTSD 是反映溶酶体结构的 特征性指标<sup>[12]</sup>,但在亚砷酸钠致大鼠肝损伤作用中, 氧化应激、PSMB5、TFEB 和溶酶体结构变化的机制尚 不清楚。

为进一步探讨砷致肝损伤发病机制,本研究利用 课题组前期建立的 NaAsO<sub>2</sub> 致大鼠肝损伤模型,探讨 氧化应激、PSMB5、TFEB 和溶酶体损伤在 NaAsO<sub>2</sub> 致 大鼠肝损伤中的作用。

# 1 对象与方法

# 1.1 主要试剂

NaAsO<sub>2</sub>(分析纯,美国 Sigma), PrimeScriptTM RT reagent Kit with Gdna Eraser、TB green<sup>®</sup> Premix Ex Taq II(日本 Takara),兔抗 PSMB5(武汉博士德),兔抗 TFEB、p-TFEB(北京博奥森)一抗以及山羊抗兔二抗(英 国 Abcam),二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色剂(武汉塞维尔),谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO) 检测试剂盒(南京建成),4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)检测试剂盒(上海酶芪)。

# 1.2 实验动物分组及处理

24 只 SPF 级 80~100 g 断乳 Wistar 大鼠,雌雄各 半 [购自辽宁长生生物技术股份有限公司,合格证号 SCXK(辽)2015-0001],于贵州医科大学实验动物中心 清洁级动物房喂养 [动物使用许可证号 SYSK(黔) 2018-0001]。依据本课题组建立的砷中毒大鼠肝损伤 模型<sup>[13]</sup>,具体分组及染毒方法如下:本课题组预实验 测得大鼠经口 NaAsO,半数致死剂量为 45 mg·L<sup>-1</sup>,结 合课题组前期人群砷暴露量估算结果,理论上设立 2.5、5.0、10 mg·kg<sup>-1</sup> 为本实验低、中、高浓度组; 按每 只大鼠平均体重 200 g,每日平均饮水量为 20 mL 计算, 即低、中、高浓度组染砷质量浓度(浓度)分别为 25、 50、100 mg·L<sup>-1</sup>。大鼠适应性喂养1周后,随机分为 4组(对照组,低、中、高浓度组),每组6只,雌雄各半, 分别自由饮用浓度为 0、25、50、100 mg·L<sup>-1</sup> NaAsO, 水 溶液染毒 24 周。本实验经贵州医科大学实验动物中 心伦理委员会批准,审批编号为 1900250。

# 1.3 大鼠肝脏的收集及石蜡切片制备

大鼠染毒结束后,用 0.9%戊巴比妥钠麻醉大鼠, 剖离肝脏,取肝脏最大叶中间位置,于多聚甲醛中固 定 24 h 后脱水,使用石蜡包埋,制作 5 µm 石蜡切片。 其余肝脏分别于-80 ℃ 冰箱储存、备用。

# 1.4 大鼠肝脏损伤及氧化应激指标检测

称取肝组织 50 μg,按体积比 1:9 与预冷生理盐 水混合,加入研磨珠,采用低温组织研磨机进行研磨, 研磨后以 3000 r·min<sup>-1</sup>,离心半径 6 cm,4 ℃ 离心 10 min, 取上清;随后按照试剂盒说明书,采用化学比色检测 ALP、ALT、TBA、CAT、LPO 水平,采用 ELISA 法检测 4-HNE 含量。

### 1.5 大鼠溶酶体结构指标检测

同"1.4"制备肝匀浆。CTSD、LAMP1 水平检测按照 CTSD、LAMP1 试剂盒说明书步骤进行。

### 1.6 大鼠肝组织 PAMB5、TFEB 转录表达检测

常规 Trizol 法提取肝脏总 RNA, 逆转录为 cDNA。 采用实时荧光定量 PCR 法检测 *PSMB5、TFEB* 转录表 达情况。*PSMB5* 正向引物: 5'-CCTACATTGCTTCCCAGA-CA-3';反向引物: 5'-ACCGAGATGCGTTCCTT G-3'。*TFEB* 正向引物: 5'-GATGCCTAACACGCTACCC-3';反向引物: 5'-TTTCTTCTGCCGTTCCTT-3';内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 正向引物: 5'-GGCACACGTCAAGGCTGAGA-3';反向引 物: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'。反应条件: 95 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 15 s, 共 40 个循环。每个标本重复实验 3 次, 采 用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算 mRNA 相对表达量。

# 1.7 大鼠肝组织 PSMB5、TFEB 及 p-TFEB 蛋白表达 检测

采用免疫组化法检测大鼠肝组织蛋白表达量。肝 组织经固定、脱水、石蜡包埋、切片后,进行脱蜡、抗 原修复以及 3%(体积分数)过氧化氢阻断内源性过氧 化物酶,分别加入一抗(PSMB5、TFEB、p-TFEB),体积 比均为 1: 200,4 ℃ 孵育过夜,磷酸盐缓冲液清洗 5 min(重复 3 次);加入山羊抗兔二抗(HRP 标记)室温 孵育 50 min 后,磷酸盐缓冲液清洗 5 min(重复 3 次), DAB 显色后自来水冲洗终止显色反应,使用苏木素复 染胞核后,脱水封片,中性树脂封片镜下观察。阳性表 达呈棕黄色或褐色,光学显微镜(BX51 显微镜,日本 Olympus)400 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,Image Pro Plus 图像处理系统 分析 PSMB5、TFEB 及 p-TFEB 蛋白表达平均光密度值。 平均光密度=积分光密度/测量总面积<sup>[13]</sup>。

# 1.8 统计学分析

实验数据以x ± s表示,使用 SPSS 25.0 软件进行统 计学分析。首先进行正态检验与方差齐性检验,服从 正态分布、方差齐,多组间比较使用单因素方差分析, 两两比较使用 LSD-t 检验;指标间相关性分析采用 Pearson 相关分析。检验水准 α=0.05。

# 2 结果

## 2.1 大鼠肝组织肝损伤指标的变化

各组间肝损伤指标 ALP、ALT、TBA 水平差异均具 有统计学意义(F=30.15、14.08、53.48, P<0.05)。与对 照组相比,各染砷组 ALP、TBA 水平均升高,中、高浓 度组 ALT 酶活性升高(P<0.05)。与低浓度组相比,中、 高浓度组 ALP、TBA 水平均升高(P<0.05)。与中浓度 组相比,高浓度组 ALP、ALT、TBA 水平均升高(P<0.05)。 结果见图 1。



[注] a: 与对照组相比, P<0.05; b: 与低浓度组相比, P<0.05; c: 与中浓度组相比, P<0.05。

图 1 NaAsO<sub>2</sub> 染毒 24 周后大鼠肝匀浆 ALT、ALP 及 TBA 水平变化 (x ± s, n = 6)

Figure 1 Changes in liver homogenate levels of ALT, ALP, and TBA in rats after 24 weeks of NaAsO<sub>2</sub> treatment ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

# 2.2 大鼠肝组织氧化应激指标的变化

各组间氧化应激指标 4-HNE、LPO、CAT 水平差异 均具有统计学意义(F=17.04、50.89、17.94, P<0.05)。 与对照组相比,中、高浓度组 LPO 水平升高,高浓度 组 4-HNE 水平升高,各染砷组 CAT 酶活性均下降 (P<0.05)。随着染砷浓度增加,4-HNE、LPO 水平呈现 逐渐升高的趋势,而 CAT 酶活性呈现逐渐下降趋势。 结果见图 2。



[注] a: 与对照组相比, P<0.05; b: 与低浓度组相比, P<0.05; c: 与中浓度组相比, P<0.05。

图 2 NaAsO<sub>2</sub> 染毒 24 周后大鼠肝匀浆 4-HNE、LPO、CAT 水平变化 (x ± s, n = 6)

Figure 2 Changes in liver homogenate levels of 4-HNE, LPO, and CAT in rats after 24 weeks of NaAsO<sub>2</sub> treatment ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

# 2.3 大鼠肝组织溶酶体结构相关指标变化

各组间溶酶体结构指标 LAMP1、CTSD 水平差异

均具有统计学意义(F=8.95、3.94, P<0.05)。与对照组 相比,各染砷组 LAMP1 水平均升高,高浓度组 CTSD 水 平升高(P<0.05)。与低浓度组相比,高浓度组 CTSD 水 平升高(P<0.05)。结果见图 3。



[注] a: 与对照组相比, P<0.05; b: 与低浓度组相比, P<0.05; c: 与中浓度组相比, P<0.05。

图 3 NaAsO<sub>2</sub> 染毒 24 周后大鼠肝匀浆 LAMP1 及 CTSD 含量 变化 (x ± s, n = 6)

Figure 3 Changes in liver homogenate contents of LAMP1 and CTSD in rats after 24 weeks of NaAsO<sub>2</sub> treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 2.4 大鼠肝组织 PSMB5、TFEB mRNA 表达情况

各组间 PSMB5、TFEB mRNA 表达差异均具有统计 学意义(F=9.65、62.19, P<0.05)。与对照组相比,各染 砷组 PSMB5、TFEB mRNA 表达均降低(P<0.05)。与低 浓度组相比,中、高浓度组 TFEB mRNA 表达均降低 (P<0.05)。结果见图 4。



[注] a: 与对照组相比, P<0.05; b: 与低浓度组相比, P<0.05。</li>
 图 4 NaAsO<sub>2</sub> 染毒 24 周后大鼠肝组织 PSMB5、TFEB mRNA 表达变化 (x ± s, n = 6)

Figure 4 Changes in mRNA expressions of *PSMB5* and *TFEB* in liver tissues of rats after 24 weeks of NaAsO<sub>2</sub> treatment ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

# 2.5 大鼠肝组织 PSMB5、TFEB、p-TFEB 蛋白表达情况

NaAsO<sub>2</sub> 染毒 24 周后,各组大鼠肝组织免疫结果 见图 5。染毒后,大鼠肝组织 PSMB5、TFEB、p-TFEB 蛋 白免疫组化染色呈棕黄色,随染毒浓度增大,PSMB5 蛋白表达逐渐减弱,TFEB 蛋白在胞核表达逐渐减弱, p-TFEB 蛋白表达在细胞质中逐渐增强,且 p-TFEB 在胞 核未见表达。各组大鼠肝组织 PSMB5、TFEB、p-TFEB 蛋白表达差异均具有统计学意义(*F*=48.33、148.14、 405.39, *P* < 0.05)。与对照组相比,各染砷组 PSMB5, 中、高浓度组 TFEB 蛋白表达均下降(P<0.05),各染砷 组 p-TFEB 表达升高(P<0.05);且呈现随浓度增加, PSMB5、TFEB 蛋白表达逐渐降低的趋势。结果见图 6。



[注] A: 对照组; B: 低浓度组; C: 中浓度组; D: 高浓度组。1: PSMB5;
 2: TFEB; 3: p-TFEB。阳性表达呈棕黄色或褐色,着色程度代表阳性程度。

#### 图 5 NaAsO<sub>2</sub> 染毒 24 周后大鼠肝组织 PSMB5、TFEB、 p-TFEB 免疫组化结果 (x ± s, n = 6)

Figure 5 Immunohistochemical results of PSMB5, TFEB, and p-TFEB in liver tissues of rats after 24 weeks of NaAsO<sub>2</sub> treatment  $(\bar{x} \pm s, n = 6)$ 



 [注] a: 与对照组相比, P < 0.05; b: 与低浓度组相比, P < 0.05。</li>
 图 6 NaAsO<sub>2</sub> 染毒 24 周后大鼠肝组织 PSMB5、TFEB、 p-TFEB 平均光密度值 (x ± s, n = 6)
 Figure 6 Mean optical density values of PSMB5, TFEB, and p-TFEB in liver tissues of rats after 24 weeks of NaAsO<sub>2</sub> treatment (x ± s, n = 6)

# 2.6 各指标间的相关性分析

Pearson 相关分析结果显示,大鼠经 NaAsO<sub>2</sub> 染毒 24 周后,PSMB5 与氧化应激指标 CAT 与呈正相关(*r*= 0.818,*P* < 0.05),与 4-HNE 呈负相关(*r*=0.582,*P* < 0.05), 与溶酶体相关指标 p-TFEB 呈负相关(*r*=-0.899,*P* < 0.05)。溶酶体调控因子 TFEB 与溶酶体结构指标 CTSD、 LAMP1 呈负相关(*r*=-0.450, *r*=-0.564; *P* < 0.05),CTSD 与肝损伤相关指标 ALT、ALP 呈正相关(*r*=0.529, *r*= 0.485; *P* < 0.05)。

### 3 讨论

地砷病肝损伤病情较严重,致病机制不清,已成为我国地砷病预防控制的关键环节。本研究发现, NaAsO<sub>2</sub>染毒后,大鼠肝组织 *PSMB5、TFEB* 转录和蛋白 表达均下降。

LPO 和 4-HNE 是体内两种重要的过氧化产物,它 们的水平与机体氧化损伤程度呈正相关,可反映机体 氧化损伤程度<sup>[14-15]</sup>。CAT 是机体的一种重要抗氧化酶, 在维持体内氧化/抗氧化系统平衡中发挥着重要的作 用<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,随着染毒浓度升高,大鼠肝组 织 LPO、4-HNE 水平升高,而 CAT 酶活性逐渐降低。该 结果提示长期砷暴露引起大鼠发生氧化应激,过氧化 产物不能被及时清除而大量堆积,可能造成肝脏损伤。

PSMB5 是 UPP 中 20S 蛋白酶体的活性中心,在蛋 白酶体的结构形成,发挥蛋白水解功能,对细胞内发 生错误折叠或组装的蛋白质、氧化损伤的蛋白质进行 修饰或降解中起着主导作用<sup>[17]</sup>。课题组前期研究发现, 砷染毒 L-02 肝细胞后,可诱导氧化应激,使 PSMB5 转 录、蛋白表达水平和蛋白酶活力均降低。本研究也发 现,NaAsO,染毒后,大鼠肝组织 PSMB5 转录和蛋白表 达均下降。为进一步探究氧化应激与 PSMB5 之间的 关系,对氧化应激指标与 PSMB5 进行相关性分析,结 果显示 PSMB5 与 CAT 之间存在正相关关系, 与 4-HNE 之间存在负相关关系。Kwak 等<sup>[18]</sup>研究发现,用抗氧化 剂 D3T 处理后, 与野生型相比, 小鼠肝脏中 PSMB5 蛋 白水平升高了 3.2 倍; 在人晶状体上皮细胞中过表达 PSMB5,增加蛋白酶活性后,可减少氧化蛋白累积而缓 解氧化应激损伤<sup>[19]</sup>。上述结果提示,砷暴露诱导氧化 应激后,可能导致了 PSMB5 表达降低和水解作用减弱。

TFEB 是调控溶酶体生物发生、自噬、溶酶体胞吐 过程的重要转录因子,在溶酶体生物发生及其下游基 因的表达中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。Chen 等<sup>[20]</sup>发现,将核 TFEB 抑制后,溶酶体的生物发生与功能也受到抑制。 UPP 系统可靶向降解 p-TFEB 从而调控 TFEB 活性,在 泛素连接酶缺失细胞中,TFEB 核易位减少,活性降低; 相反,在泛素连接酶过表达的细胞中,p-TFEB 蛋白表 达减少,TFEB 活性增加<sup>[7]</sup>;这提示,UPP 途径在通过靶 向降解 p-TFEB 从而调节其生物活性方面发挥了重要 作用,但这种降解作用是否与 PSMB5 有关尚不清楚。 为探究 *TFEB* 基因在砷致肝损伤中的作用,本研究检 测了 *TFEB* 转录及蛋白表达水平。结果发现,各染砷组 *TFEB* 转录和蛋白表达水平均明显下降,且随染毒浓度 增高,大鼠肝组织胞核中 TFEB 蛋白表达呈现逐渐减 少的趋势; 未见 p-TFEB 蛋白在胞核表达, 而 p-TFEB 蛋 白在细胞质中表达逐渐增加; 这提示, TFEB 蛋白表达 减少和 p-TFEB 蛋白在细胞质中累积, 可能进一步引起 非磷酸化 TFEB 蛋白表达和入核减少而影响其生物学 功能, 本研究与 Chao 等<sup>[8]</sup>研究结果相符。为了进一步 探讨 PSMB5 与 TFEB 之间的关系, 我们分析了两者之 间的相关性。结果显示, PSMB5 与 p-TFEB 之间呈负相 关。结合 UPP 可靶向降解 p-TFEB 的研究结果<sup>[7]</sup>与本实 验结果提示, 砷暴露使 PSMB5 表达降低, 可能减少了 UPP 对细胞质中 p-TFEB 蛋白的降解, 继而引起非磷酸 化 TFEB 蛋白表达和入核减少, 从而影响其生物学功能。

Fang 等<sup>[21]</sup>研究发现,在非酒精性脂肪肝病小鼠模型中,提取 TFEB 基因低表达小鼠肝细胞,发现 TFEB 蛋白核易位减少,溶酶体生物发生减少。为探究氧化应激下,溶酶体结构是否损伤,本研究检测了大鼠肝组织中LAMP1、CTSD 水平。结果发现,各染砷组LAMP1、CTSD 水平高于对照组水平。相关性分析显示,TFEB 与溶酶体结构指标LAMP1、CTSD 均呈负相关关系,本研究结果表明 TFEB 蛋白表达降低可能损伤了溶酶体结构,该结果与 Fang 等<sup>[21]</sup>研究结果相似。进一步相关性分析显示,肝损伤指标 ALP、ALT 与 CTSD 之间呈正相关关系,提示溶酶体结构受损后可能导致肝损伤。

综上,本研究结果表明,砷暴露诱导大鼠发生氧 化应激后,一方面,PSMB5 被抑制后可能减少了 p-TFEB 水解导致其在细胞质中累积,引起非磷酸化 TFEB 减 少;另一方面,氧化应激直接抑制了 TFEB 表达;两个 因素共同作用导致非磷酸化 TFEB 入核减少,无法正 常启动其相应的基因转录,可能导致溶酶体结构破坏, 引起肝脏损伤。本研究对砷致肝损伤的致病机制有了 进一步的认识,但尚不能确切阐明氧化应激、PSMB5、 TFEB 与溶酶体之间的具体关系,还需进一步通过细胞 实验抑制氧化应激,高表达 PSMB5 和 TFEB 等实验进 行验证。

### 参考文献

- [1] LIU J, WAALKES M P. Liver is a target of arsenic carcinogenesis [J]. Toxicol Sci, 2008, 105(1): 24-32.
- [2] LV Y, HU Q, SHI M, et al. The role of PSMB5 in sodium arsenite-induced oxidative stress in L-02 cells[J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(3): 533-540.
- [3] HARSHBARGER W, MILLER C, DIEDRICH C, et al. Crystal structure of the human 20S proteasome in complex with carfilzomib[J]. Structure, 2015, 23(2): 418-424.
- [4] LAMMING DW, BAR-PELED L. Lysosome: the metabolic signaling hub[J]. Traffic, 2019, 20(1): 27-38.

- [5] NNAH I C, WANG B, SAQCENA C, et al. TFEB-driven endocytosis coordinates MTORC1 signaling and autophagy[J]. Autophagy, 2019, 15(1): 151-164.
- [6] JIANG J, ZHAO P, ZHANG X. Apelin promotes ECM synthesis by enhancing autophagy flux via TFEB in Human degenerative NP cells under oxidative stress[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 4897170.
- [7] SHA Y, RAO L, SETTEMBRE C, et al. STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway [J]. EMBO J, 2017, 36(17): 2544-2552.
- [8] CHAO X, WANG S, ZHAO K, et al. Impaired TFEB-mediated lysosome biogenesis and autophagy promote chronic ethanol-induced liver injury and steatosis in mice [J]. Gastroenterology, 2018, 155(3): 865-879.
- [9] CAWLEY NX, SOJKA C, COUGNOUX A, et al. Abnormal LAMP1 glycosylation may play a role in Niemann-Pick disease, type C pathology[J]. PLoS One, 2020, 15(1): e0227829.
- [10] LIU Y, ZHOU W, CHEN F F, et al. Overexpression of LMP-1 decreases apoptosis in human nucleus pulposus cells via suppressing the NF-κB signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 8189706.
- [11] MARQUES A R A, DI SPIEZIO A. THIEßEN N, et al. Enzyme replacement therapy with recombinant pro-CTSD (cathepsin D) corrects defective proteolysis and autophagy in neuronal ceroid lipofuscinosis[J]. Autophagy, 2020, 16(5): 811-825.
- [12] CÁRCEL-TRULLOLS J, KOVÁCS AD, PEARCE DA. Role of the lysosomal membrane protein, CLN3, in the regulation of cathepsin D activity[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(11): 3883-3890.
- [13] 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.
- [14] REYES-JIMÉNEZ E, RAMÍREZ-HERNÁNDEZ A A, SANTOS-ÁLVAREZ J C, et al. Involvement of 4-hydroxy-2-nonenal in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(12): 4405-4419.
- [15] ZHONG H, YIN H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria[J]. Redox Biol, 2015, 4: 193-199.
- [16] XIAO M, ZHONG H, XIA L, et al. Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: role of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and other bioactive lipids in mitochondria [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 111: 316-327.
- [17] VANGALA JR, DUDEM S, JAIN N, et al. Regulation of PSMB5 protein and  $\beta$  subunits of mammalian proteasome by constitutively activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3): potential role in bortezomib-mediated anticancer therapy[J]. J Biol Chem, 2014, 289(18): 12612-12622.
- [18] KWAK M K, WAKABAYASHI N, GREENLAW JL, et al. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(23): 8786-8794.
- [19] LIU Y, LIU X, ZHANG T, et al. Cytoprotective effects of proteasome beta5 subunit overexpression in lens epithelial cells[J]. Mol Vis, 2007, 13: 31-38.
- [20] CHEN X, GUAN Y, ZHANG Y, et al. Programmed cell death 4 modulates lysosomal function by inhibiting TFEB translation[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(4): 1237-1250.
- [21] FANG Y, JI L, ZHU C, et al. Liraglutide alleviates hepatic steatosis by activating the TFEB-regulated autophagy-lysosomal pathway[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 602574.

(英文编辑:汪源; 责任编辑:王晓宇)