实验研究
Experiment

大气 $PM_{2.5}$ 加重 2 型糖尿病模型小鼠肝损伤与 AMPK 抑制的相关性

张佳[1]，蒋硕[1, 2]，潘坤[1]，宋丽莹[1]，赵金镯[1, 3]

1. 复旦大学公共卫生学院环境卫生学教研室，上海 200032
2. 上海市长宁区疾病预防控制中心，上海 200050
3. 上海市气象与健康重点实验室，上海 200032

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19076

摘要：

[背景] 有研究发现大气细颗粒物（$PM_{2.5}$）暴露会导致肝纤维化和非酒精性脂肪肝。2 型糖尿病（T2DM）患者本身因出现胰岛素抵抗、脂质堆积及炎症而致肝脏损伤严重。大气 $PM_{2.5}$ 暴露是否会加重 T2DM 患者肝损伤目前还不清楚，对该机制的研究较少。

[目的] 探索腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）在大气 $PM_{2.5}$ 所致 T2DM 小鼠肝脏损伤中的作用。

[方法] 将 32 只 6 周龄的 db/db 小鼠随机分为 4 组：洁净空气暴露组（FA 组）、洁净空气暴露 +5- 氨基 -4- 甲酰胺咪唑核糖核苷酸（AICAR）干预组（FA-AIC 组）、浓缩 $PM_{2.5}$ 暴露组（PM 组）和浓缩 $PM_{2.5}$ 暴露 +AICAR 干预组（PM-AIC 组）。小鼠在气象 - 环境动物暴露系统中每天暴露 10 h，共 12 周，FA-AIC 和 PM-AIC 组在第 11 周开始每天腹腔注射 AICAR（250 mg/kg），共 2 周。采用苏木精 - 伊红（HE）染色法检测肝脏病理变化；采用实时荧光定量 PCR 法测定肝脏组织中 *AMPK*、白细胞介素（*IL*）*-6* 和肿瘤坏死因子（*TNF-α*）的 mRNA 表达水平；通过 Western blot 法检测 AMPK、P-AMPK、沉默信息调节因子 2 同源酶 1（SIRT1）、P38- 丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）、P-P38-MAPK、蛋白激酶 B（AKT）、P-AKT 蛋白表达水平。

[结果] PM 组肝脏脂肪变性分数、肿大分数、小叶和门管区炎症分数分别为 1.50±0.42、1.10±0.35、0.80±0.12、0.70±0.16；PM-AIC 组肝脏脂肪变性分数、肿大分数、小叶和门管区炎症分数分别为 1.40±0.31、1.20±0.29、0.70±0.22、0.60±0.18，均大于相应的 FA 组（$P<0.05$）；FA-AIC 组肝脏肿大分数和肝小叶炎症分数均小于 FA 组（$P<0.05$）；PM-AIC 组和 PM 组肝脏脂肪变性分数、肿胀分数、小叶和门管区炎症分数的差异不具有统计学意义。结果显示，$PM_{2.5}$ 抑制了肝脏 *AMPK* mRNA 的表达，促进了 *IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 的表达。无论是暴露于浓缩 $PM_{2.5}$ 还是清洁空气，注射 AICAR 后均能增加 *AMPK* 的 mRNA 表达（$P<0.05$）。此外，暴露于浓缩 PM2.5 的小鼠肝脏 SIRT1 蛋白表达水平以及 AMPK 和 AKT 的磷酸化水平与暴露于清洁空气的小鼠相比，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。在注射了 AICAR 后，暴露于洁净空气的小鼠肝脏 AMPK 和 AKT 的磷酸化水平增加（$P<0.05$），但暴露于浓缩 $PM_{2.5}$ 的小鼠在注射 AICAR 后，肝脏内这些蛋白表达水平变化均无统计学意义（$P>0.05$）。

[结论] 大气 $PM_{2.5}$ 加重 2 型糖尿病模型小鼠肝损伤与 AMPK 抑制相关。

关键词： $PM_{2.5}$；肝脏；腺苷酸活化蛋白激酶；5- 氨基 -4 甲酰胺咪唑核糖核苷酸

Liver injury in type 2 diabetes mellitus model mice aggravated by ambient $PM_{2.5}$ in association with AMPK inhibition

ZHANG Jia[1], *JIANG Shuo*[1, 2], *PAN Kun*[1], *SONG Li-ying*[1], *ZHAO Jin-zhuo*[1, 3] (1.*Department of Environmental Health, School of Public Health, Fudan University, Shanghai* 200032, *China;* 2.*Shanghai Changning Center for Disease Control and Prevention, Shanghai* 200050, *China;* 3.*Shanghai Key Laboratory of Meteorology and Health, Shanghai* 200032, *China*)

Abstract:

[Background] Studies have found that exposure to ambient fine particulate matters ($PM_{2.5}$) could lead to liver fibrosis and non-alcoholic fatty liver disease. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients have severe liver damage due to insulin resistance, lipid accumulation, and inflammation in the liver. It is not clear whether ambient $PM_{2.5}$ exposure would aggravate liver damage in T2DM patients. Currently, there are few studies on its mechanism.

基金项目
国家自然科学基金面上项目（81673125）

作者简介
张佳（1994—），女，硕士生；
E-mail：jiazhang16@fudan.edu.cn

通信作者
赵金镯，E-mail：jinzhuozhao@fudan.edu.cn

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2019-02-19
录用日期 2019-05-13

文章编号 2095-9982(2019)06-0576-07
中图分类号 R122.7
文献标志码 A

▸引用
张佳，蒋硕，潘坤，等. 大气 $PM_{2.5}$ 加重 2 型糖尿病模型小鼠肝损伤与 AMPK 抑制的相关性 [J]. 环境与职业医学，2019，36（6）：576-582.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19076

Funding
This study was funded.

Correspondence to
ZHAO Jin-zhuo, Email: jinzhuozhao@fudan.edu.cn

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2019-02-19
Accepted 2019-05-13

▸To cite
ZHANG Jia, JIANG Shuo, PAN Kun, et al. Liver injury in type 2 diabetes mellitus model mice aggravated by ambient $PM_{2.5}$ in association with AMPK inhibition[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(6): 576-582.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19076

[Objective] This experiment is designed to explore the role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in liver injury of T2DM mice caused by ambient $PM_{2.5}$.

[Methods] Thirty-two six-week-old db/db mice were randomly divided into four groups: filtered air (FA) group, filtered air plus 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) (FA-AIC) group, concentrated $PM_{2.5}$ (PM) group, and concentrated $PM_{2.5}$ plus AICAR (PM-AIC) group. The mice were exposed using Shanghai Meteorological and Environmental Animal Exposure System (Shanghai-METAS) 10 h per day for 12 weeks. The FA-AIC and PM-AIC groups received daily intraperitoneal injection of AICAR (250 mg/kg) at week 11 for a total of 2 weeks. The pathological changes of liver were determined after hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA expression levels of *AMPK*, tumor necrosis factor-α (*TNF-α*), and interleukin-6 (*IL-6*) were determined by real-time fluorescent quantitative PCR. The protein expression levels of AMPK, P-AMPK, silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1), P38-mitogen-activated protein kinase (MAPK), P-P38-MAPK, protein kinase B (AKT), and P-AKT were detected by Western blot.

[Results] The scores of the PM group of liver steatosis, ballooning, lobular inflammation, and portal inflammation were 1.50±0.42, 1.10±0.35, 0.80±0.12, and 0.70±0.16, respectively; the scores of the PM-ACI group were 1.40±0.31, 1.20±0.29, 0.70±0.22,and 0.60±0.18, respectively, which were all higher than those of the FA group ($P<0.05$); the FA-AIC group showed lower scores of liver ballooning and lobular inflammation than the FA group ($P<0.05$); there were no differences in the above four indicators between the PM-AIC and the PM groups ($P>0.05$). The expression of *AMPK* mRNA in liver was inhibited by $PM_{2.5}$ exposure; however, the expressions of *IL-6* and *TNF-α* mRNA in liver were elevated by $PM_{2.5}$ exposure. The mRNA expression of *AMPK* was increased after AICAR injection in both groups treated with concentrated $PM_{2.5}$ and filtered air ($P<0.05$). The protein expressions of SIRT1 and phosphorylation of AMPK and AKT in the mice exposed to concentrated $PM_{2.5}$ were significantly lower than those in the mice treated with filtered air ($P<0.05$). After AICAR injection, the phosphorylation levels of AMPK and AKT in liver of the mice treated with filtered air increased significantly ($P<0.05$), but there was no significant difference in the PM-AIC group ($P>0.05$).

[Conclusion] AMPK inhibition is in association with liver injury in type 2 diabetes mellitus model mice aggravated by ambient $PM_{2.5}$.

Keywords: $PM_{2.5}$; liver; AMP-activated protein kinase; 5-aminoimidazole-4-carboxyamide ribonucleoside

世界上有91%的人口居住于空气质量超过WHO空气质量基准值的地方，2016年全世界420万人过早死亡与室外空气污染有关[1]。颗粒物，特别是空气动力学直径小于2.5 μm的细颗粒物（fine particulate matter，$PM_{2.5}$），作为一类对人体健康具有极大危害的空气污染物受到越来越多的关注。在我国，政府采取了一系列措施后，空气质量状况有了很大改善[2]，但许多地区$PM_{2.5}$的年平均质量浓度（后称“浓度”）仍高于我国空气质量标准[3]，特别是在中国北方的大部分地区，$PM_{2.5}$污染仍相当严重[4]。

目前已有研究发现环境$PM_{2.5}$不仅影响呼吸系统[5]，对心血管系统、免疫系统和生殖系统等也都有严重的损害[6-8]。研究显示$PM_{2.5}$暴露会造成肝损伤：miR-26a-脂肪酸转移酶（fatty acid translocase，CD36）通路介导$PM_{2.5}$脂溶性提取物诱导肝细胞脂质积累，进而导致非酒精性脂肪肝的形成[9]。$PM_{2.5}$暴露还会造成肝脏炎症细胞堆积以及纤维化[10]。2型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM）患者本身因出现胰岛素抵抗、脂质堆积及炎症而致肝脏损伤严重[11]，如何减轻T2DM患者的肝损害程度，受到越来越多关注。目前大气$PM_{2.5}$暴露与T2DM患者肝损伤之间的关联尚不清晰，关于大气$PM_{2.5}$暴露致T2DM肝损伤机制的研究还较少。腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）在调节与T2DM相关的糖脂代谢、能量代谢、胰岛素信号通路方面扮演着重要的角色[12-14]。有研究发现$PM_{2.5}$可能是通过依赖CC趋化因子受体2（CC-chemokine receptor 2，CCR2）调节脂肪组织中P38-丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）活性、AMPK磷酸化水平以及骨骼肌中的炎症反应等，从而导致胰岛素抵抗[15]。但是目前AMPK在大气$PM_{2.5}$致T2DM肝损伤中的作用机制尚不清楚，与AMPK相关的防治机制也不明确。5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖核苷酸（5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside，AICAR）是AMPK激动剂，能够调控AMPK的活性，是临床上治疗T2DM药物的主要成分。因此本研究通过给予T2DM模型小鼠（db/db小鼠）$PM_{2.5}$暴露以及AICAR干预，探讨AMPK在$PM_{2.5}$所致肝脏损伤中的作用。

1 对象与方法

1.1 实验动物

从北京大学实验动物科学部购置32只6周龄雄性db/db小鼠随机均分为洁净空气组（FA组）、洁净空气+AICAR干预组（FA-AIC组）、$PM_{2.5}$组（PM组）、$PM_{2.5}$+AICAR干预组（PM-AIC组）4组。所有小鼠均给予正常饮食，在不进行$PM_{2.5}$暴露时均饲养在控制温度

[(22±2) ℃] 和湿度 [(60±5) %] 的动物房内。AICAR 干预方案在不同研究有所不同：有研究为 250~500 mg/kg，每天 2 次，共注射 8 d [16]；也有研究为 100 mg/kg，每天 1 次，共注射 4 周 [17]。参考文献内容后确定 AICAR 干预方案为：FA-AIC 和 PM-AIC 组在第 11 周开始每天腹腔注射 1 次 AICAR (250 mg/kg)，共 2 周。本研究经复旦大学伦理委员会审查和批准 (伦理审批件号：20160947A267)，所有实验均遵循复旦大学实验动物管理和使用规定。

1.2 主要试剂与仪器

一抗 AMPK、P-AMPK (Thr172)、蛋白激酶 B (protein kinase B，AKT)、P-AKT (Ser473)、沉默信息调节因子 2 同源酶 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1，SIRT1)、P-P38-MAPK、P38-MAPK (Cell Signaling Technology，美国)，AICAR (SANTA，美国)，PrimeScript RT Reagent Kit 试剂盒 (TaKaRa，日本)，异丙醇、吐温 20、三氯甲烷、甘氨酸、水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司，中国)，聚偏氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride，PVDF) (Merck，德国)，蛋白预染 maker、ECL 发光液 (Thermo，美国)，低温高速离心机 Sigma 3-30KS (Sigma，德国)，超低温冰箱 (Thermo，美国)，ABI-7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific，美国)，电泳槽、转印槽、显影系统 (Bio-Rad，美国)。

1.3 研究方法

1.3.1 实验动物暴露方法

本研究的暴露和实验在上海市徐家汇 (复旦大学上海医学院校园内) 进行，气象 - 环境动物暴露系统安装于距地面约 10 m 的室内，通过暴露系统将大气环境中的 $PM_{2.5}$ 进行过滤或浓缩，分别进入对照仓及暴露仓。暴露系统周边无其他明显污染源，环境中 $PM_{2.5}$ 的主要来源是交通排放。PM、PM-AIC、FA 和 FA-AIC 组小鼠使用气象 - 环境动物暴露系统暴露于浓缩 $PM_{2.5}$ 的空气或过滤 $PM_{2.5}$ 的空气，10 h/d，每周 7 d，从 2016 年 2 月开始到 2016 年 5 月结束，共暴露 12 周。暴露过程中使用两个 $PM_{2.5}$ 监测仪 (pDR-1500，Thermo Scientific，美国) 分别测量暴露仓和对照仓的实时浓度。同时通过滤膜称量法测量 $PM_{2.5}$ 的准确浓度：每周收集一次滤膜称重，将获得的大气 $PM_{2.5}$ 总重量与暴露时间及滤膜面积相除得到每周的平均暴露浓度。

1.3.2 病理组织学观察

12 周暴露结束后处死小鼠，收集肝脏组织，经 4% 多聚甲醛固定后，在冰冻切片机上进行切片，组织厚度为 5 μm。然后进行苏木精 - 伊红染色 (hematoxylin and eosin，HE)，在显微镜下观察肝脏组织的病理学改变及炎性细胞的聚集情况。计算病理分数，包括脂肪变性分数、肿大分数、小叶炎症分数和门管区炎症分数。

1.3.3 实时荧光定量 PCR

对肝脏组织采用 Trizol 常规提取总 RNA，逆转录成 cDNA。以 Primer Premier 6.0 软件设计引物，*GAPDH* 基因作为内参基因，分析目的基因表达情况。

表 1 实时荧光定量 PCR 基因引物序列

基因	正向引物	反向引物
IL-6	5′-ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3′	5′-TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT-3′
TNF-α	5′-TTCCGAATTCACTGGAGCCTCGAA-3′	5′-TGCACCTCAGGGAAGAATCTGGAA-3′
AMPK	5′-TACTCAACCGGCAGAAGATTCG-3′	5′-AGACGGCGGCTTTCCTTTT-3′
GAPDH	5′- TGCATCCTGCACCACCAACTGCTT-3′	5′- ACAGCCTTGGCAGCACCAGTGGAT-3′

1.3.4 Western blot 测定组织中蛋白的表达

从肝脏组织中提取蛋白后，电泳分离相同质量的蛋白质，然后转移至 PVDF 膜。在室温下用 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h 后，将膜与不同的一抗孵育：AMPK、P-AMPK (Thr172)、AKT、P-AKT (Ser473)、SIRT1、P-P38-MAPK、P38-MAPK，在 4 ℃ 下过夜。次日，在室温下与二抗 (1∶5 000) 孵育 2 h 后，检测蛋白质条带，然后由 Quantity One 进行定量分析。

1.4 统计学分析

使用 IBM SPSS statistics 22.0 软件对 FA、FA-AIC、PM 和 PM-AIC 组进行方差齐性检验和单因素方差分析。多组之间的两两比较使用最小显著差法 (least significance difference，LSD) 检验。双侧检验，检验水准 α=0.05。使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行图形绘制。

2 结果

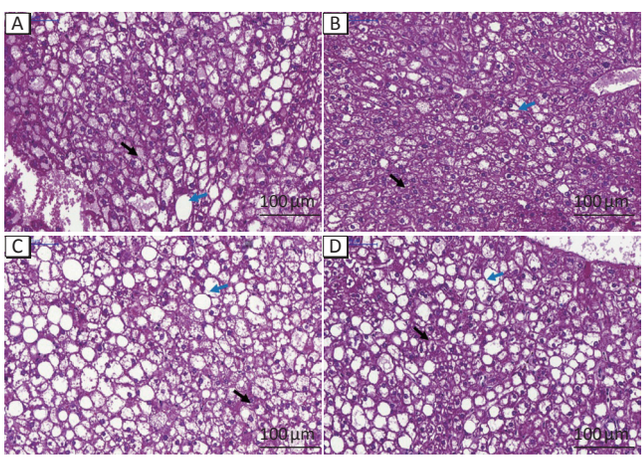
2.1 暴露仓中 $PM_{2.5}$ 浓度

在整个暴露期间，室外环境中 $PM_{2.5}$ 平均浓度为 (65.6±5.3) μg/m^3，暴露仓中 $PM_{2.5}$ 平均浓度为 (324.2±45.2) μg/m^3，对照仓中 $PM_{2.5}$ 平均浓度为 (17.3±3.7) μg/m^3。

2.2 $PM_{2.5}$ 暴露对肝脏组织的影响

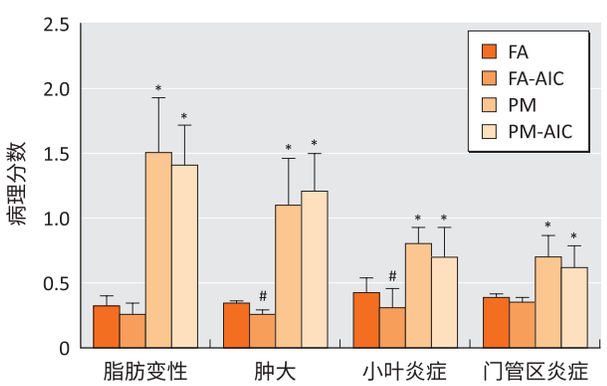
由于本次研究使用的是糖尿病模型小鼠 (db/db 小鼠)，所以在 FA 组，小鼠也存在着一定的肝脏损伤，如图 1、2。PM 组肝脏脂肪变性、肿大、小叶和门管区炎症分数分别为 1.50±0.42、1.10±0.35、0.80±0.12、

0.70±0.16均大于FA组（脂肪变性、肿大、小叶和门管区炎症分数分别为0.32±0.08、0.34±0.02、0.42±0.11、0.38±0.02）（$P<0.05$）；PM-AIC组肝脏脂肪变性、肿大、小叶和门管区炎症分数分别为1.40±0.31、1.20±0.29、0.70±0.22、0.60±0.18也均大于FA-AIC组（0.25±0.09、0.25±0.04、0.30±0.15、0.35±0.03）（$P<0.05$）。FA-AIC组肝脏肿大分数和小叶炎症分数均小于FA组，且差异有统计学意义（$P<0.05$）；脂肪变性和门管区炎症分数差异无统计学意义（$P>0.05$）。PM-AIC组小鼠与PM组小鼠脂肪变性、肿大、小叶和门管区炎症分数差异均无统计学意义（$P>0.05$）。



［注］A：FA；B：FA-AIC；C：PM；D：PM-AIC。黑色箭头：炎性细胞浸润；蓝色箭头：肝脏脂肪变性。

图1 肝脏组织病理学结果（HE染色）

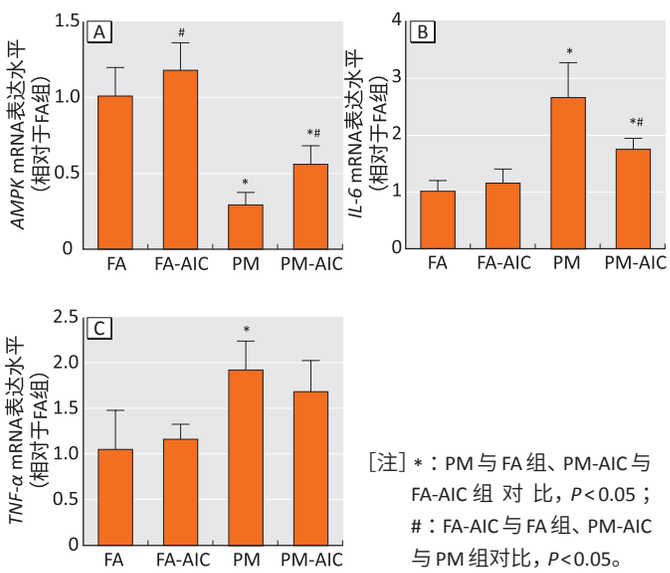


［注］*：PM与FA组、PM-AIC与FA-AIC组对比，$P<0.05$；#：FA-AIC与FA组对比，$P<0.05$。

图2 肝脏组织病理分数

2.3 $PM_{2.5}$暴露对肝脏*AMPK*、*IL-6*和*TNF-α* mRNA表达的影响

如图3所示，PM组和PM-AIC组*AMPK* mRNA表达水平（分别为0.30±0.08和0.57±0.12）低于FA组（1.00±0.19）和FA-AIC组（1.18±0.18），差异均具有统计学意义（$P<0.05$）；无论是暴露于浓缩$PM_{2.5}$还是洁净空气，注射AICAR后，*AMPK* mRNA表达水平均升高（$P<0.05$）。在$PM_{2.5}$暴露后，无论是否进行AICAR干预，肝脏中*IL-6* mRNA表达水平均升高（FA组：1.00±0.18，PM组：2.64±0.64，FA-AIC组：1.15±0.26，PM-AIC组：1.76±0.19，$P<0.05$）；PM-AIC组*IL-6* mRNA表达水平低于PM组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。PM组*TNF-α* mRNA表达水平为1.92±0.31高于FA组（1.00±0.42，$P<0.05$）；PM-AIC组*TNF-α* mRNA表达水平为1.69±0.33，与FA-AIC组（1.17±0.16）差异不具有统计学意义（$P>0.05$）。AICAR的干预对炎症因子*TNF-α* mRNA表达水平基本无影响（$P>0.05$）。

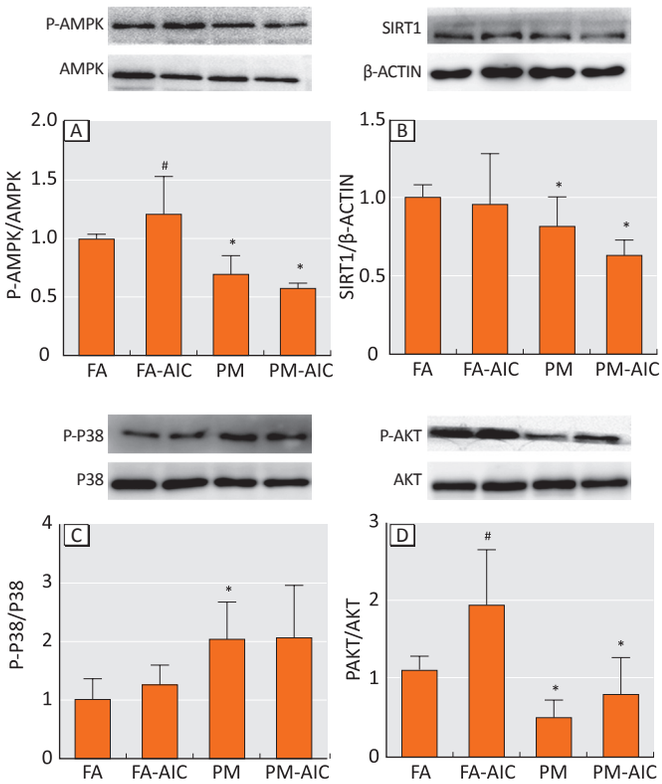


［注］*：PM与FA组、PM-AIC与FA-AIC组对比，$P<0.05$；#：FA-AIC与FA组、PM-AIC与PM组对比，$P<0.05$。

图3 肝脏组织*AMPK*、*IL-6*和*TNF-α* mRNA表达水平

2.4 $PM_{2.5}$暴露对肝脏组织中AMPK相关蛋白表达水平的影响

在小鼠的肝脏组织中测定AMPK、P-AMPK（Thr172）、AKT、P-AKT（Ser473）、SIRT1、P38-MAPK和P-P38-MAPK的蛋白表达水平（图4）。结果显示：$PM_{2.5}$组小鼠肝脏SIRT1蛋白表达水平（0.81±0.19）、AMPK（0.70±0.15）和AKT（0.48±0.24）的磷酸化水平低于FA组小鼠（1.00±0.07，1.00±0.03，1.00±0.18），P38-MAPK磷酸化水平为2.01±0.66高于FA组小鼠（1.00±0.36），差别具有统计学意义（$P<0.05$）；FA-AIC组小鼠肝脏AMPK（1.28±0.26）和AKT（1.92±0.72）的磷酸化水平高于FA组（$P<0.05$）；注射AICAR后，PM组和FA组SIRT1蛋白表达水平和p38-MAPK的磷酸化水平变化差异无统计学意义（$P>0.05$）。



[注] A：P-AMPK 与 AMPK 蛋白表达量比值；B：SIRT1 蛋白表达水平；C：P-P38-MAPK 与 P38-MAPK 蛋白表达量比值；D：P-AKT 与 AKT 蛋白表达量比值。*：PM 与 FA 组、PM-AIC 与 FA-AIC 组对比，$P<0.05$；#：FA-AIC 与 FA 组、PM-AIC 与 PM 组对比，$P<0.05$.

图 4 $PM_{2.5}$ 暴露后肝脏组织中 AMPK 相关蛋白的表达水平

3 讨论

普遍认为，T2DM 是一种慢性低度炎症状态[18-19]。流行病学和毒理学研究均发现 T2DM 患者或动物体内 IL-6、TNF-α 和 IL-18 等炎症因子水平升高[20-22]。体内炎症因子水平高低还可以用于预测心血管疾病，研究显示 IL-6 和 TNF-α 对糖尿病动脉粥样硬化发展具有较强的预测价值，糖尿病合并粥样硬化患者体内 IL-6 和 TNF-α 水平高于非糖尿病合并动脉粥样硬化患者（$P<0.05$）[22]。炎症因子不仅在心血管疾病中起着重要的作用，当暴露于 $PM_{2.5}$ 时，炎症因子也是较为灵敏的指标，研究发现 $PM_{2.5}$ 暴露使得肝脏中 *IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 水平升高，肝脏组织病理学发生改变，肝功能下降[23]。本研究结果显示无论是否进行 AICAR 干预，大气 $PM_{2.5}$ 的暴露均使肝脏中 *IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 水平升高，组织病理学结果也显示 $PM_{2.5}$ 暴露会加重 T2DM 小鼠肝脏炎性细胞浸润、肿大以及脂肪变性，表明 $PM_{2.5}$ 暴露会加重肝脏的损伤。这与之前的研究发现 $PM_{2.5}$ 暴露会造成肝脏炎症细胞堆积及纤维化的结果相似[10]。HE 染色结果显示在注射 AICAR 后，与 FA 组小鼠相比，FA-AIC 组小鼠肝脏肿大和小叶炎症分数均降低，但 PM-AIC 组与 PM 组相比，小鼠肝脏损伤程度改善不明显，表明大气 $PM_{2.5}$ 可能减弱了 AICAR 对 T2DM 小鼠肝损伤的改善作用。更为重要的是，本次研究结果显示，无论是否暴露于大气 $PM_{2.5}$，AICAR 的干预对 T2DM 小鼠肝脏 *IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 表达水平的影响均较小，可能由于 AICAR 干预是 $PM_{2.5}$ 暴露 10 周后才开始的，而 2 周的 AICAR 注射对于已经升高的 *IL-6* 和 *TNF-α* 影响较小。但已有研究发现 AICAR 可以降低由脂多糖导致的肝脏 *IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 水平的升高[24]。目前关于 AICAR 对暴露于大气 $PM_{2.5}$ 的 T2DM 小鼠炎症反应作用的研究还较少，AICAR 对于 T2DM 小鼠肝损伤的改善作用是否与其他组织系统的炎症反应减轻有关还需进一步探究。

AMPK 是真核生物在进化过程中保存下来的一种能够感知细胞内三磷酸腺苷 / 二磷酸腺苷（ATP/ADP）值变化的酶，它可以通过增强氧化代谢及关闭消耗 ATP 的代谢途径等方式来维持细胞的能量储存，也可与 SIRT1 协同作用控制小鼠骨骼肌能量代谢相关基因的表达[12]。有研究表明，SIRT1 与机体内炎症反应的重要启动因子 NF-κB 的表达相关[25]，其可以通过调控 NF-κB 的表达，进而影响机体促炎因子的分泌[26]。AMPK 可以通过促进 AKT 的磷酸化影响葡萄糖转运体的运作，从而调节机体的糖代谢[27]。P38-MAPK 是 AMPK 调控糖代谢通路上一个重要的作用靶点[28]，有研究发现 T2DM 患者的 MAPK 的磷酸化水平较正常健康人偏高，在使用 P38-MAPK 抑制剂后，葡萄糖转运体蛋白的水平升高[29]。因此 AMPK 可能通过抑制 P38-MAPK 的磷酸化进而影响葡萄糖转运体的转运功能[30]。本研究发现 $PM_{2.5}$ 的暴露降低了肝脏的 *AMPK* mRNA 表达水平，抑制 SIRT1、AKT 和 AMPK 磷酸化，促进 P38-MAPK 磷酸化。同样的，有研究发现大气 $PM_{2.5}$ 暴露会激活 P38-MAPK 的磷酸化，从而导致细胞的死亡和溶酶体的失稳[31]。AICAR 作为 AMPK 激动剂可以减少因长期高脂饮食导致的胰岛素抵抗[17]，增加葡萄糖摄取，改善 T2DM 小鼠血糖水平[16]。本研究结果表明，$PM_{2.5}$ 暴露可能会通过抑制肝脏 AMPK 的磷酸化，进而加重 T2DM 小鼠的肝脏损伤。在注射了 AICAR 后，暴露于洁净空气的小鼠 *AMPK* mRNA 表达水平以及蛋白磷酸化水平均出现升高，同时 AKT 磷酸化水平明显升高，肝脏肿大及炎症也有所减轻。PM 组与 PM-AIC 组相比，SIRT1 蛋白表达水平、AMPK、P38-MAPK 和 AKT 磷酸化水平差异均无统计学意义，肝脏脂肪变性、肿大和炎

性浸润情况也没有得到明显改善，表明$PM_{2.5}$暴露可能通过抑制AMPK的激活，进而调节其他蛋白的活性而导致肝脏损伤。本研究结果表明，肝脏AMPK激活可能会对肝脏具有保护作用，但$PM_{2.5}$可能通过抑制AMPK激活而加重对肝脏的损伤。

综上，本研究的结果表明，$PM_{2.5}$的暴露可能是通过抑制肝脏AMPK的激活而加重T2DM模型小鼠的肝损伤。这可能为今后治疗及预防与$PM_{2.5}$相关的T2DM肝损伤提供新的药理靶点。本研究还存在不足，如对肝脏炎症因子水平的探索仅在mRNA层面，最终炎症因子的表达水平没有进行检测，同时对AMPK相关蛋白通路的探索还较为浅显，下游一些蛋白的表达水平没有进行检测，因此要阐明大气$PM_{2.5}$暴露与T2DM患者肝脏损伤之间的关联，相关机制还需要更深入的探索。

参考文献

[1] World Health Organization. Ambient（outdoor）air quality and health［EB/OL］.［2019-02-19］. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-（outdoor）-air-quality-and-health.

[2] ZENG Y，CAO Y，QIAO X，et al. Air pollution reduction in China：recent success but great challenge for the future［J］. Sci Total Environ，2019，663：329-337.

[3] HE M Z，ZENG X，ZHANG K，et al. Fine particulate matter concentrations in urban Chinese cities，2005-2016：a systematic review［J］. Int J Environ Res Public Health，2017，14（2）：191.

[4] WANG X，CHEN J，SUN J，et al. Severe haze episodes and seriously polluted fog water in Ji'nan，China［J］. Sci Total Environ，2014，493：133-137.

[5] PALLESCHI S，ROSSI B，ARMIENTO G，et al. Toxicity of the readily leachable fraction of urban PM2.5 to human lung epithelial cells：role of soluble metals［J］. Chemosphere，2018，196：35-44.

[6] CHEN G，GUO Y，ABRAMSON M J，et al. Exposure to low concentrations of air pollutants and adverse birth outcomes in Brisbane，Australia，2003-2013［J］. Sci Total Environ，2018，622-623：721-726.

[7] BROOK R D，NEWBY D E，RAJAGOPALAN S. The global threat of outdoor ambient air pollution to cardiovascular health：time for intervention［J］. JAMA Cardiol，2017，2（4）：353-354.

[8] HABERZETTL P，O'TOOLE T E，BHATNAGAR A，et al. Exposure to fine particulate air pollution causes vascular insulin resistance by inducing pulmonary oxidative stress［J］. Environ Health Perspect，2016，124（12）：1830-1839.

[9] DING D，YE G，LIN Y，et al. MicroRNA-26a-CD36 signaling pathway：pivotal role in lipid accumulation in hepatocytes induced by $PM_{2.5}$ liposoluble extracts［J］. Environ Pollut，2019，248：269-278.

[10] ZHENG Z，ZHANG X，WANG J，et al. Exposure to fine airborne particulate matters induces hepatic fibrosis in murine models［J］. J Hepatol，2015，63（6）：1397-1404.

[11] CAI D，YUAN M，FRANTZ D F，et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-β and NF-κB［J］. Nat Med，2005，11（2）：183-190.

[12] CANTÓ C，GERHART-HINES Z，FEIGE J N，et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD^+ metabolism and SIRT1 activity［J］. Nature，2009，458（7241）：1056-1060.

[13] VLAVCHESKI F，BARON D，VLACHOGIANNIS I A，et al. Carnosol increases skeletal muscle cell glucose uptake via AMPK-dependent GLUT4 glucose transporter translocation［J］. Int J Mol Sci，2018，19（5）：1321.

[14] GOH K P，LEE H Y，LAU D P，et al. Effects of resveratrol in patients with type 2 diabetes mellitus on skeletal muscle SIRT1 expression and energy expenditure［J］. Int J Sport Nutr Exerc Metab，2014，24（1）：2-13.

[15] LIU C，XU X，BAI Y，et al. Air pollution-mediated susceptibility to inflammation and insulin resistance：influence of CCR2 pathways in mice［J］. Environ Health Perspect，2014，122（1）：17-26.

[16] HALSETH A E，ENSOR N J，WHITE T A，et al. Acute and chronic treatment of ob/ob and db/db mice with AICAR decreases blood glucose concentrations［J］. Biochem Biophys Res Commun，2002，294（4）：798-805.

[17] LIU W，ZHAI X，LI H，et al. Depression-like behaviors in mice subjected to co-treatment of high-fat diet and corticosterone are ameliorated by AICAR and exercise［J］. J Affect Disord，2014，156：171-177.

[18] DUNCAN B B，SCHMIDT M I，PANKOW J S，et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes：the atherosclerosis risk in communities study［J］.

Diabetes，2003，52（7）：1799-1805.

[19] WELLEN K E，HOTAMISLIGIL G S. Inflammation，stress，and diabetes [J] . J Clin Invest，2005，115（5）：1111-1119.

[20] VANDANMAGSAR B，YOUM Y H，RAVUSSIN A，et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance [J] . Nat Med，2011，17（2）：179-188.

[21] CHUNG M M，NICOL C J，CHENG Y C，et al. Metformin activation of AMPK suppresses AGE-induced inflammatory response in hNSCs [J] . Exp Cell Res，2017，352（1）：75-83.

[22] WU W，WANG M，SUN Z，et al. The predictive value of TNF-α and IL-6 and the incidence of macrovascular complications in patients with type 2 diabetes [J] . Acta Diabetol，2012，49（1）：3-7.

[23] LI R，ZHANG M，WANG Y，et al. Effects of sub-chronic exposure to atmospheric PM2.5 on fibrosis，inflammation，endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the livers of rats [J] . Toxicol Res，2018，7（2）：271-282.

[24] LIU Y M，LV J，ZENG Q L，et al. AMPK activation ameliorates D-GalN/LPS-induced acute liver failure by upregulating Foxo3A to induce autophagy [J] . Exp Cell Res，2017，358（2）：335-342.

[25] SHEN T，SANCHEZ H N，ZAN H，et al. Sirt1 modulates AID expression，class switch DNA recombination and somatic hypermutation by repressing NF-kB activity [J] . J Immunol，2016，196（1S）：198.11.

[26] MATSUSHITA T，SASAKI H，TAKAYAMA K，et al. The overexpression of SIRT1 inhibited osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1β in human chondrocytes [J] . J Orthop Res，2013，31（4）：531-537.

[27] SIQUES P，BRITO J，FLORES K，et al. Long-term chronic intermittent hypobaric hypoxia induces glucose transporter（GLUT4）translocation through AMP-activated protein kinase（AMPK）in the soleus muscle in lean rats [J] . Front Physiol，2018，9：799.

[28] XI X，HAN J，ZHANG J Z. Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase [J] . J Biol Chem，2001，276（44）：41029-41034.

[29] CARLSON C J，KOTERSKI S，SCIOTTI R J，et al. Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes：potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression [J] . Diabetes，2003，52（3）：634-641.

[30] LEEM K H，KIM M G，HAHM Y T，et al. Hypoglycemic effect of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* is due to enhanced peripheral glucose uptake through activation of AMPK/p38 MAPK pathway [J] . Nutrients，2016，8（12）：800.

[31] DORNHOF R，MASCHOWSKI C，OSIPOVA A，et al. Stress fibers，autophagy and necrosis by persistent exposure to $PM_{2.5}$ from biomass combustion [J] . PLoS One，2017，12（7）：e0180291.

（**英文编辑**：汪源；**编辑**：汪源；**校对**：丁瑾瑜）