实验研究
Experiment

亚砷酸钠对人正常肝细胞线粒体功能及 SIRT1/PGC-1α 通路相关蛋白表达的影响

王祺，马璐，张爱华

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

DOI 10.11836/JEOM22152

摘要：

[背景] 长期砷暴露可引起不同程度的肝损伤，线粒体损伤可能是砷致肝损伤的早期关键事件，沉默信息调节因子 2（sir2）相关酶 1（SIRT1）/过氧化物酶体增殖物受体辅助激活因子-1α（PGC-1α）是调控线粒体质量和功能的重要通路，而砷所致肝损伤是否与 SIRT1/PGC-1α 通路介导的线粒体功能障碍有关目前尚不清楚。

[目的] 探讨亚砷酸钠（$NaAsO_2$）对人正常肝细胞线粒体功能及 SIRT1/PGC-1α 通路相关蛋白表达的影响及机制。

[方法] 以人正常肝细胞（MIHA 细胞）为研究对象，分别以不同浓度的 $NaAsO_2$（0、5、10、20 μmol·L^{-1}）处理 MIHA 细胞 24 h 后收集细胞进行研究。采用透射电镜观察线粒体超微结构，荧光法检测三磷酸腺苷（ATP）浓度，流式细胞术检测线粒体膜电位（MMP）水平，免疫印迹法检测 SIRT1、PGC-1α 及其下游核呼吸因子 1（NRF1）抗体、线粒体转录因子 A（TFAM）蛋白表达水平。采用单因素方差分析及趋势性检验进行数据统计分析。

[结果] MIHA 细胞活力随 $NaAsO_2$ 浓度的升高逐渐降低（F=6 495.47，P<0.001）。透射电镜结果显示 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组线粒体大小不一、肿胀或伸长呈棒状，20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组线粒体肿胀呈气球状或空泡状。MIHA 细胞 ATP 浓度及 MMP 水平均随 $NaAsO_2$ 浓度的升高逐渐降低（$F_{ATP\ 趋势}$=172.28，$F_{MMP\ 趋势}$=59.91；均 P<0.001）。与对照组相比，5 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 SIRT1、PGC-1α、NRF1 及 TFAM 蛋白表达水平均无明显变化，但 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 SIRT1、PGC-1α 及 TFAM 蛋白表达水平降低（P<0.05），20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 SIRT1、PGC-1α 及 NRF1 蛋白表达水平降低（P<0.05）；趋势性检验结果显示，SIRT1、PGC-1α、NRF1 及 TFAM 蛋白表达水平均随 $NaAsO_2$ 浓度的升高逐渐降低（$F_{SIRT1\ 趋势}$=47.07，P<0.001；$F_{PGC\text{-}1\alpha\ 趋势}$=15.17，$P$<0.01；$F_{NRF1\ 趋势}$=13.54，$P$<0.01；$F_{TFAM\ 趋势}$=4.20，$P$<0.05）。

[结论] SIRT1/PGC-1α 及其下游 NRF1 和 TFAM 的表达下调可能参与了 $NaAsO_2$ 诱导肝细胞线粒体功能障碍。

关键词：亚砷酸钠；人正常肝细胞；线粒体；沉默信息调节因子 2 相关酶 1；过氧化物酶体增殖物受体辅助激活因子-1α

Effects of sodium arsenite on mitochondrial function and expression of SIRT1/PGC-1α pathway-related proteins in human normal liver cell

WANG Qi, MA Lu, ZHANG Aihua (Department of Toxicology, 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] Long-term exposure to arsenic can cause liver injury of varying degrees. Mitochondrial damage may be an early key event of arsenic-induced liver injury. Silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1)/ recombinant peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1α) is an important pathway regulating mitochondrial mass and function. However, whether arsenic-induced liver injury is related to mitochondrial dysfunction mediated by SIRT1/PGC-1α pathway remains unclear.

[Objective] To investigate potential effects of sodium arsenite ($NaAsO_2$) on mitochondrial function and expressions of SIRT1/PGC-1α pathway-related proteins in human normal liver cell.

[Methods] Human normal liver cells (MIHA cells) were used as the research object. MIHA cells were

基金项目
国家自然科学基金项目（U1812403）；贵州省教育厅青年科技人才成长项目（黔教合 KY 字 [2018]189）；贵州医科大学国家自然科学基金培育项目（19NSP027）；贵州省区域内一流学科建设项目-公共卫生与预防医学（黔教科研发 2017[85] 号）

作者简介
王祺（1988—），女，硕士，讲师；
E-mail：wqgzykd@163.com

通信作者
张爱华，E-mail：aihuagzykd@163.com

伦理审批 不需要
利益冲突 无申报
收稿日期 2022-04-20
录用日期 2022-10-30

文章编号 2095-9982(2022)12-1411-06
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
王祺，马璐，张爱华. 亚砷酸钠对人正常肝细胞线粒体功能及 SIRT1/PGC-1α 通路相关蛋白表达的影响 [J]. 环境与职业医学，2022，39（12）：1411-1416.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22152

Funding
This study was funded.

Correspondence to
ZHANG Aihua, E-mail: aihuagzykd@163.com

Ethics approval Not required
Competing interests None declared
Received 2022-04-20
Accepted 2022-10-30

▸ To cite
WANG Qi, MA Lu, ZHANG Aihua. Effects of sodium arsenite on mitochondrial function and expression of SIRT1/PGC-1α pathway-related proteins in human normal liver cell[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(12): 1411-1416.

▸ Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22152

treated with different concentrations of $NaAsO_2$ (0, 5, 10 and 20 μmol·L^{-1}) for 24 h, and the cells were collected for study. The ultrastructure of mitochondria was observed by transmission electron microscopy, adenosine triphosphate (ATP) concentration by fluorescence method, mitochondrial membrane potential (MMP) level by flow cytometry, and SIRT1, PGC-1α and their downstream nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) protein expression levels by Western blotting. One-way analysis of variance and trend test were used for data statistical analysis.

[Results] The viability of MIHA cells decreased gradually with the increase of $NaAsO_2$ concentration (F=6 495.47, P < 0.001). The transmission electron microscope observation showed that the size of mitochondria in the 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ treatment group was different, and the mitochondria were swollen or elongated in a rod-like shape. The mitochondria in the 20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ treatment group swelled like air spheres or vacuoles. The ATP concentration and MMP level of MIHA cells gradually decreased with the increase of $NaAsO_2$ concentration ($F_{\text{trend of ATP}}$=172.28, $F_{\text{trend of MMP}}$=59.91, both Ps < 0.001). Compared with the control group, the protein expression levels of SIRT1, PGC-1α, NRF1, and TFAM were not significantly changed in the 5 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ treatment group, while the protein expression levels of SIRT1, PGC-1α, and TFAM were decreased in the 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ treatment group, and the protein expression levels of SIRT1, PGC-1α, and NRF1 were decreased in the 20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ treatment group. The results of trend test showed that the protein expression levels of SIRT1, PGC-1α, NRF1, and TFAM decreased gradually with the increase of $NaAsO_2$ concentration ($F_{\text{trend of SIRT1}}$=47.07, P < 0.001; $F_{\text{trend of PGC-1α}}$= 15.17, P < 0.01; $F_{\text{trend of NRF1}}$=13.54, P < 0.01; $F_{\text{trend of TFAM}}$=4.20, P < 0.05).

[Conclusion] The down-regulation of SIRT1/PGC-1α and its downstream NRF1 and TFAM may be involved in $NaAsO_2$-induced mitochondrial dysfunction in liver cells.

Keywords: sodium arsenite; human normal liver cell; mitochondrial; silent mating type information regulation 2 homolog 1; recombinant peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator 1 alpha

砷是自然界中普遍存在的环境毒物，是国际癌症研究机构确认的人类（Ⅰ类）致癌物及美国毒物与疾病登记署（Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR）认定的最高级优先管理化学毒物[1]。目前全球有超过 2 亿的人口受到砷暴露的威胁，环境砷污染仍是当今全球十分严重的环境与健康问题之一[2]。砷暴露可引起机体多系统多脏器损害，肝脏作为无机砷在体内代谢的主要场所，是砷主要的靶器官之一[3–5]。研究表明，肝细胞线粒体损伤可能是砷致肝损伤的早期关键事件，而线粒体生物合成是线粒体损伤修复的重要步骤，是控制线粒体“质”和“量”的关键途径[6]。过氧化物酶体增殖物受体辅助激活因子-1α（recombinant peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator 1 alpha, PGC-1α）是线粒体生物合成的关键调控因子，其可与细胞能量代谢重要调控因子-核呼吸因子 1（nuclear respiratory factor 1, NRF1）结合形成共激活因子，激活线粒体转录因子 A（mitochondrial transcription factor A, TFAM）调控线粒体的生物发生。当受到外界刺激时，PGC-1α 由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的去乙酰化酶沉默信息调节因子 2 相关酶 1（silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1）激活，SIRT1 使 PGC-1α 的多个残基去乙酰化，在维持线粒体功能中发挥重要作用[7]。虽有研究在砷诱导的大鼠脑损伤模型[8]、小鼠心脏损伤模型[9]及砷中毒患者皮肤病变组织[10]中观察到 SIRT1/PGC-1α 通路相关分子表达水平的改变，而砷所致肝损伤是否与 SIRT1/PGC-1α 通路介导的线粒体功能障碍有关目前尚不清楚。鉴于 SIRT1/PGC-1α 通路在线粒体质量控制过程中发挥重要作用，本研究采用亚砷酸钠（$NaAsO_2$）处理人正常肝细胞（MIHA 细胞），检测细胞线粒体损伤情况及 SIRT1/PGC-1α 通路相关蛋白的表达，探讨 $NaAsO_2$ 致 MIHA 细胞线粒体功能障碍的可能机制，旨在为进一步阐明砷致肝损伤机制，揭示以线粒体为靶点的砷致肝损伤早期关键分子通路，针对性地采取干预和治疗措施提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

MIHA 细胞（湖南丰晖生物科技有限公司，中国），$NaAsO_2$（Sigma，美国）。主要试剂：胎牛血清、胰酶（Gibco，美国），高糖 DMEM 培养基、青霉素-链霉素双抗（Procell，中国），Cell Counting Kit-8（CCK8）细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒（Biosharp，中国），JC-1 检测试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（碧云天生物技术有限公司，中国），三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所，中国），SIRT1 抗体（Cell Signaling Technology，美国），PGC-1α 抗体、NRF1 抗体、TFAM 抗体（Abcam，英国），磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体（杭州贤至生物有限公司，中国）。

1.2 仪器

主要仪器：CO_2 恒温培养箱（SANYO，日本），倒置显微镜（Nikon，日本），透射电镜（FEI，美国），Multiskan GO 酶标仪（Thermo Scientific，美国），流式细胞仪

（Beckmancoulter，美国）。

1.3 MIHA 细胞培养及处理

MIHA 细胞接种于含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素双抗的高糖 DMEM 培养基中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。取对数期生长的细胞接种于 6 孔板，每孔加入配制好的细胞悬液 2 mL，常规培养 24 h。根据课题组既往试验获得的半数抑制浓度及最佳染毒结果[11]确定 $NaAsO_2$ 处理剂量梯度及时间，将各皿细胞随机分为 4 组，分别加入 2 mL 含终浓度为 0（对照）、5、10、20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 的高糖 DMEM 培养基培养 24 h，每个剂量设 3 个复孔。

1.4 细胞活力检测

分别取对数期生长状态良好的 MIHA 细胞，调整细胞密度为 1×10^4 个·mL^{-1}，接种于 96 孔板，每孔加入细胞悬液 100 μL，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中过夜培养；分别采用 0、5、10、20 μmol·L^{-1} 的 $NaAsO_2$ 处理 MIHA 细胞 24 h 后，每孔加入 10 μL CCK8，37 ℃ 培养 2 h，酶标仪测定 450 nm 处各孔光密度值，计算各组细胞活力。重复实验 3 次。

1.5 线粒体超微结构观察

收集细胞于 2.5%戊二醛（0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液配制）4 ℃ 固定 4 h，0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液漂洗，1%锇酸固定液（0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液配制）室温固定 2 h，0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液漂洗，脱水，渗透，树脂包埋，切片，醋酸铀及硝酸铅染色后室温干燥过夜，透射电镜观察线粒体超微结构。

1.6 ATP 浓度检测

弃培养液，每孔加入 200 μL 裂解液，裂解细胞，在室温条件下离心弃上清，保留细胞沉淀，采用磷钼酸比色法按 ATP 测定试剂盒操作步骤检测细胞 ATP 浓度。重复实验 3 次。

1.7 线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential, MMP）检测

使用不含 EDTA 的 0.25%胰酶消化、收集细胞，每孔加入 0.5 mL JC-1 染色工作液，颠倒数次混匀，细胞培养箱中孵育 20 min，孵育结束后离心弃上清，加入 500 μL JC-1 染色缓冲液重悬后，采用流式细胞仪分析，以红色荧光强度（H1-UR 象限数值）/绿色荧光强度（H1-LR 象限数值）值表示 MMP 水平。

1.8 SIRT1、PGC-1α、NRF1、TFAM 蛋白表达水平检测

弃培养液，加入预冷 PBS 清洗 3 次，加入 RIPA 细胞裂解液，冰上裂解 30 min 后，4 ℃ 下，离心力 13.8×*g* 离心 5 min，取上清，BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，免疫印迹法检测 SIRT1、PGC-1α、NRF1、TFAM 蛋白表达水平，蛋白上样量为 40 μg。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后转至 PVDF 膜，用含 5%脱脂奶粉的 TBST（封闭液）浸泡 PVDF 膜，室温摇床封闭 2 h；将 SIRT1、PGC-1α、NRF1 蛋白抗体及内参 GAPDH 抗体分别按 1∶1 000 稀释，TFAM 蛋白抗体按 1∶10 000 稀释，4 ℃ 孵育过夜；采用 1∶5 000 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h 后，滴加 ECL 电化学发光液于 PVDF 膜上，反应数分钟待荧光带明显后，用滤纸吸去多余的 ECL 液，覆上保鲜膜，X 光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影，冲洗胶片，晾干胶片，扫描胶片，用 Image Pro Plus 6.0 软件分析蛋白灰度值。

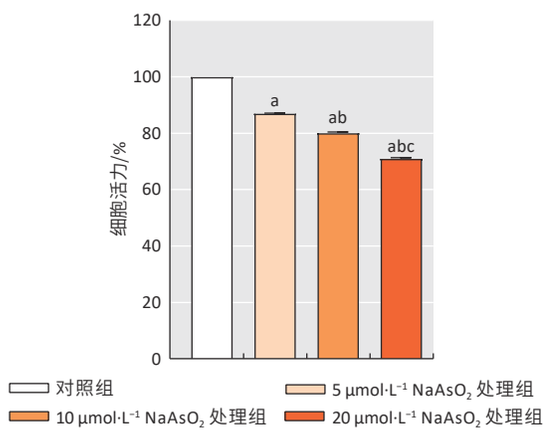
1.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析，所有数据均属于计量资料呈正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较，ATP 含量及 SIRT1、PGC-1α、TFAM 蛋白表达水平方差齐采用 LSD-*t* 法，细胞活力、MMP 水平及 NRF1 蛋白表达水平方差不齐采用 Dunnett's T3 法。剂量-反应关系分析采用趋势性检验。均采用双侧检验，检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 $NaAsO_2$ 对 MIHA 细胞活力的影响

与对照组相比，各剂量 $NaAsO_2$ 处理组的细胞活力均降低，且随 $NaAsO_2$ 浓度的升高逐渐降低（F=6 495.47，P < 0.001）。见图 1。



[注] a：与对照组相比，P<0.05；b：与 5 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组相比，P<0.05；c：与 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组相比，P<0.05。

图 1 $NaAsO_2$ 处理 24 h 后 MIHA 细胞活力（n=3）

Figure 1 Viability of $NaAsO_2$-exposed MIHA cell for 24 h (n=3)

2.2 $NaAsO_2$ 对 MIHA 细胞线粒体超微结构的影响

透射电镜观察可见 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组线粒体大小不一，线粒体肿胀或伸长呈棒状，20 μmol·L^{-1}

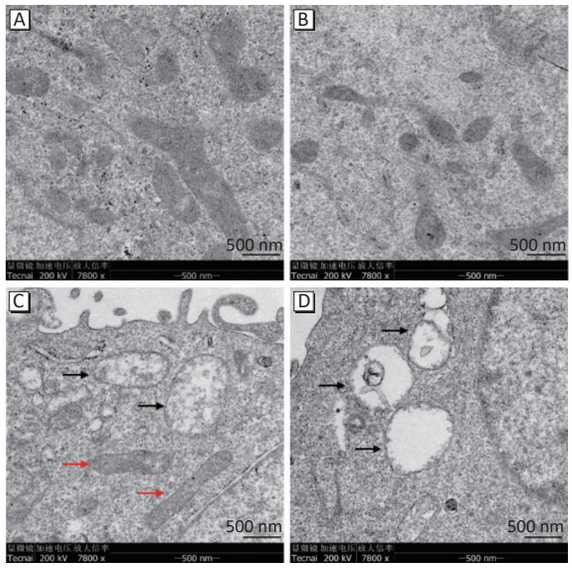
$NaAsO_2$ 处理组线粒体肿胀呈气球状或空泡状。见图 2。

2.3 $NaAsO_2$ 对 MIHA 细胞 ATP 浓度及 MMP 水平的影响

与对照组相比，各剂量 $NaAsO_2$ 处理组 MIHA 细胞 ATP 浓度及 MMP 水平均降低；且随 $NaAsO_2$ 浓度的升高逐渐降低（$F_{ATP\,趋势}$=172.28，$F_{MMP\,趋势}$=59.91，均 $P<0.001$）。见图 3。

2.4 $NaAsO_2$ 对 MIHA 细胞 SIRT1、PGC-1α、NRF1 及 TFAM 蛋白表达水平的影响

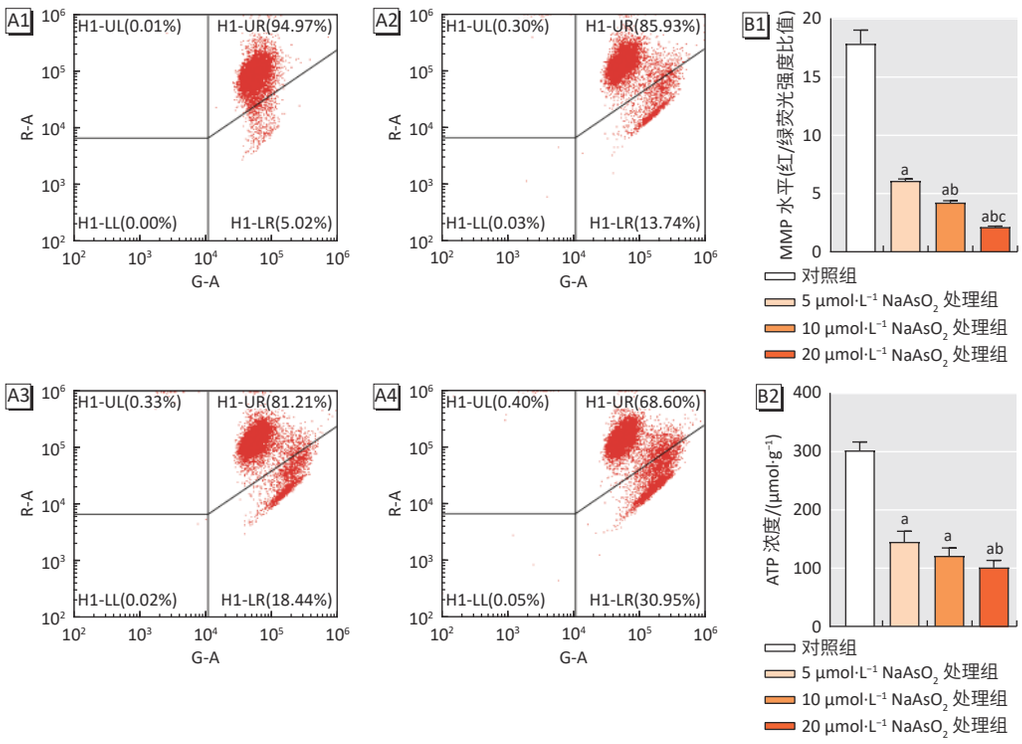
与对照组相比，5 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 SIRT1、PGC-1α、NRF1 及 TFAM 蛋白表达水平均无明显变化，10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 SIRT1、PGC-1α 及 TFAM 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 SIRT1、PGC-1α 及 NRF1 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；与 5 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组相比，10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 MIHA 细胞 SIRT1 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 SIRT1、PGC-1α 及 TFAM 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；与 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组相比，20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 MIHA 细胞 SIRT1、PGC-1α 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；其余各组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。此外，SIRT1、PGC-1α、NRF1 及 TFAM 蛋白表达水平均随 $NaAsO_2$ 浓度的升高逐渐降低（$F_{SIRT1\,趋势}$=47.07，$P<0.001$；$F_{PGC\text{-}1\alpha\,趋势}$=15.17，$P<0.01$；$F_{NRF1\,趋势}$=13.54，$P<0.01$；$F_{TFAM\,趋势}$=4.20，$P<0.05$）。见图 4。



[注] A：对照组；B：5 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组；C：10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组；D：20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组；红色箭头处：线粒体伸长呈棒状；黑色箭头处：线粒体肿胀呈气球状或空泡状。

图 2 $NaAsO_2$ 处理 24 h 后 MIHA 细胞线粒体超微结构变化

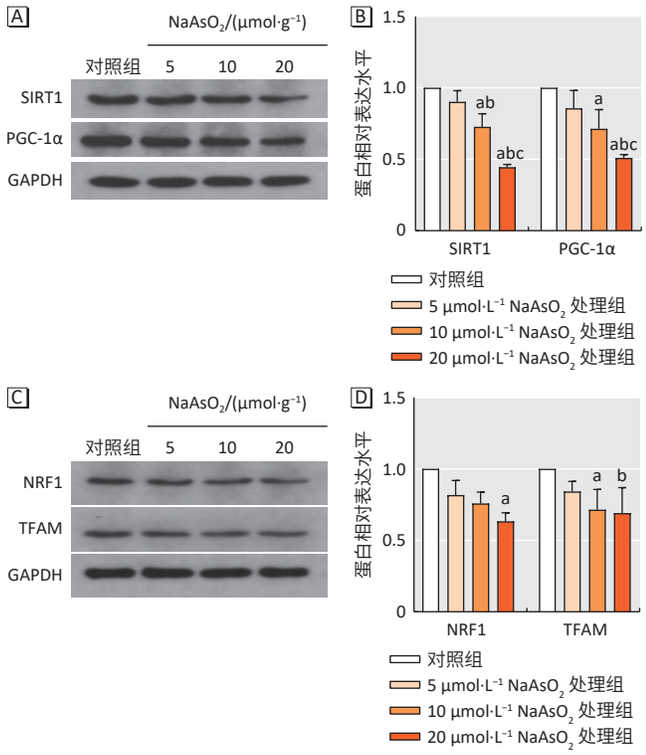
Figure 2 Ultrastructural changes of mitochondria of $NaAsO_2$-exposed MIHA cell for 24 h



[注] A1~A4：对照组、5、10、20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组 JC-1 检测流式细胞图。G-A：绿色荧光强度；R-A：红色荧光强度；H1-UR：JC-1 聚集于线粒体基质产生红色荧光；H1-LR：JC-1 未聚集于线粒体基质产生绿色荧光。B1：各组 MMP 水平（红/绿荧光强度比值）；B2：各组 ATP 浓度。a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与 5 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组相比，$P<0.05$；c：与 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组相比，$P<0.05$。

图 3 $NaAsO_2$ 处理 24 h 后 MIHA 细胞 ATP 浓度及 MMP 水平（n=3）

Figure 3 ATP concentration and MMP level of $NaAsO_2$-exposed MIHA cell for 24 h (n=3)



[注] A：SIRT1、PGC-1α 电泳条带图；B：SIRT1、PGC-1α 相对灰度值统计图；C：NRF1、TFAM 电泳条带图；D：NRF1、TFAM 相对灰度值统计图。a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与 5 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组相比，$P<0.05$；c：与 10 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 处理组相比，$P<0.05$。

图 4 $NaAsO_2$ 处理 24 h 后 MIHA 细胞 SIRT1、PGC-1α、NRF1、TFAM 蛋白表达水平 (n=3)

Figure 4 Protein expression levels of SIRT1, PGC-1α, NRF1, and TFAM of $NaAsO_2$-exposed MIHA cell for 24 h (n=3)

3 讨论

本研究发现，5~20 μmol·L^{-1} $NaAsO_2$ 可不同程度降低 MIHA 细胞 SIRT1、PGC-1α、NRF1 及 TFAM 的表达，并导致 MIHA 细胞线粒体超微结构改变及线粒体功能障碍。

长期砷暴露可引起肝细胞炎症、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌等不同程度的肝损伤，其发病机制至今尚未完成阐明。线粒体是细胞能量代谢的中心，在氨基酸和脂质代谢、细胞氧化应激、炎症反应、细胞信号转导和细胞凋亡中发挥重要功能，同时也是对外界有害刺激最敏感、最早被侵入的细胞器[12]。而线粒体在肝细胞中含量丰富，是维持肝细胞功能的重要细胞器，因此也成为各种环境污染物诱导肝毒性的关键靶点[13]。本研究在透射电镜下观察 MIHA 细胞线粒体超微结构变化，结果显示 $NaAsO_2$ 处理后线粒体伸长或肿胀继而呈气球状或空泡状。MMP 是线粒体进行氧化磷酸化及 ATP 合成的功能基础，其对外界刺激非常敏感，外界刺激可作用于线粒体膜而引起 MMP 下降，导致线粒体呼吸链断裂，影响线粒体的正常功能，因此 ATP、MMP 是反映线粒体代谢情况及线粒体功能状态的重要指标[14–15]。本研究发现，$NaAsO_2$ 处理后 MIHA 细胞 ATP 浓度和 MMP 水平均降低，且呈剂量依赖性。上述结果均表明，$NaAsO_2$ 可导致 MIHA 细胞线粒体损伤，破坏线粒体质量和功能。

PGC-1α 处于线粒体生物合成网状调节系统的上游，是衔接外界刺激信号与线粒体内部功能调节的枢纽，在线粒体生物合成的调节中发挥重要作用。研究表明，当外界因素刺激导致 PGC-1α 的表达降低时，线粒体生物合成减少，电子传递链以及氧化呼吸功能受到抑制，ATP 的产量明显降低[16–17]。SIRT1 是浓缩于核质、异染色质及核仁的功能独特的核心蛋白，能够通过去乙酰化组蛋白和许多非组蛋白因子调控染色质结构，进而完成基因修复、抗凋亡、抗应激、代谢等一系列细胞功能[18]。PGC-1α 即是受 SIRT1 调控的基因之一，PGC-1α 可在 SIRT1 的去乙酰化作用下被激活[19]。有研究发现，肝脏中 PGC-1α 蛋白表达的改变与 SIRT1 蛋白表达的改变密切相关，SIRT1 作为 PGC-1α 的上游蛋白，在氧化应激条件下两者相互作用调节线粒体生物合成及功能[20]。有研究在 II 型糖尿病肝损伤[21]、肝切除术后肝脏缺血再灌注损伤[22]及非酒精性脂肪性肝病[23]等疾病动物模型中观察到 PGC-1α 表达水平的降低及线粒体功能障碍，而激活 PGC-1α 表达可改善小鼠/大鼠线粒体功能和质量，减轻肝损伤，表明 PGC-1α 在肝脏线粒体功能和质量中具有重要作用，有望成为疾病治疗的关键靶点。本研究结果显示，$NaAsO_2$ 处理后 MIHA 细胞 SIRT1 和 PGC-1α 蛋白的表达降低，且呈剂量反应关系，提示 $NaAsO_2$ 诱导的肝细胞线粒体功能障碍可能与其抑制 SIRT1 和 PGC-1α 的表达有关。

NRF1 是 PGC-1α 下游调控线粒体生物合成最主要的转录因子，可促进线粒体氧化磷酸化，转录调控呼吸酶相关的核基因，影响线粒体基因组的复制、转录、相关蛋白的表达等；TFAM 是一种能影响线粒体 DNA 转录和复制的重要调节因子[24]。研究表明，PGC-1α 可诱导 NRF1 表达，进而激活 TFAM，直接调控线粒体的生成，维持线粒体功能[25–26]。另有研究发现，姜黄素通过增加 PGC-1α 和 NRF1 的表达来促进线粒体生物合成，改善线粒体功能，减轻酒精诱导的肝损伤[27]。本研究结果显示，$NaAsO_2$ 处理后 MIHA 细胞 NRF1 及 TFAM 蛋白表达水平降低，提示 SIRT1/PGC-1α 可能是 $NaAsO_2$ 导致肝细胞线粒体损伤的作用靶点，$NaAsO_2$ 通过下调 SIRT1/PGC-1α 的表达，进而抑制其下游维持线粒体

生物合成及功能的关键蛋白的表达。有研究证实，TFAM 是线粒体 DNA 转录、复制和功能维护的核心因子，TFAM 可结合和缠绕线粒体 DNA，保护其免于活性氧的降解，并可增加线粒体 DNA 的稳定性和完整性，而线粒体 DNA 通过编码氧化磷酸化的必要成分在线粒体生物合成和 ATP 产生过程中发挥重要作用[28]，因此推测 $NaAsO_2$ 诱导的 MIHA 细胞线粒体超微结构的改变、ATP 浓度及 MMP 水平的降低可能与其下调细胞 SIRT1、PGC-1α、NRF1 及 TFAM 的表达有关。本研究仅观察了 $NaAsO_2$ 对 MIHA 细胞线粒体功能障碍及 SIRT1/PGC-1α 通路相关蛋白表达的影响，尚需通过基因过表达或沉默揭示 SIRT1/PGC-1α/NRF1/TFAM 之间的调控机制，并结合线粒体 DNA 拷贝数的变化情况，进一步探讨该通路在 $NaAsO_2$ 诱导的线粒体功能障碍中的作用。

综上，本研究显示 SIRT1/PGC-1α 及其下游 NRF1 和 TFAM 的表达的下调可能是砷致肝细胞线粒体功能障碍进而导致肝损伤的机制之一。由于砷中毒肝损伤发生发展过程及影响因素复杂，致病机制尚不完全明确，缺乏有效的早期监测和干预手段，基于本研究发现 SIRT1/PGC-1α 可能成为砷中毒肝损伤的预防及防治靶点，但其具体作用机制尚需进一步深入研究。

参考文献

[1] CARLIN D J, NAUJOKAS M F, BRADHAM K D, et al. Arsenic and environmental health: state of the science and future research opportunities[J]. Environ Health Perspect, 2016, 124(7): 890-899.

[2] PODGORSKI J, BERG M. Global threat of arsenic in groundwater[J]. Science, 2020, 368(6493): 845-850.

[3] YAO M, ZENG Q, LUO P, et al. Assessing the risk of coal-burning arsenic-induced liver damage: a population-based study on hair arsenic and cumulative arsenic[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(36): 50489-50499.

[4] 邹忠兰, 王庆陵, 王祺, 等. 综合防控9年后贵州燃煤型砷中毒患者肝损害情况分析[J]. 贵州医科大学学报, 2018, 43(10): 1163-1168.
ZOU Z L, WANG Q L, WANG Q, et al. Liver damage in patients with coal-burning Arsenism in Guizhou after 9 years of comprehensive prevention and control[J]. J Guizhou Med Univ, 2018, 43(10): 1163-1168.

[5] LIU J, WAALKES M P. Liver is a target of arsenic carcinogenesis[J]. Toxicol Sci, 2008, 105(1): 24-32.

[6] TAO L C, WANG T T, ZHENG L, et al. The role of mitochondrial biogenesis dysfunction in diabetic cardiomyopathy[J]. Biomol Ther (Seoul), 2022, 30(5): 399-408.

[7] JIN P, QI D, CUI Y, et al. Activation of LRP6 with HLY78 attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis via GSK3β/SIRT1/PGC-1α pathway after ICH[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 7542468.

[8] PRAKASH C, KUMAR V. Arsenic-induced mitochondrial oxidative damage is mediated by decreased PGC-1α expression and its downstream targets in rat brain[J]. Chem Biol Interact, 2016, 256: 228-235.

[9] HAN X, YANG Y, ZHANG M, et al. Protective effects of 6-gingerol on cardiotoxicity induced by arsenic trioxide through AMPK/SIRT1/PGC-1α signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 868393.

[10] LEE C H, WU S B, HONG C H, et al. Aberrant Cell Proliferation by Enhanced Mitochondrial Biogenesis via mtTFA in Arsenical Skin Cancers[J]. Am J Pathol, 2011, 178(5): 2066-2076.

[11] XU Y, ZENG Q, SUN B, et al. Assessing the role of Nrf2/GPX4-mediated oxidative stress in arsenic-induced liver damage and the potential application value of Rosa roxburghii tratt [rosaceae][J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9865606.

[12] PRAKASH C, CHHIKARA S, KUMAR V. Mitochondrial dysfunction in arsenic-induced hepatotoxicity: pathogenic and therapeutic implications[J]. Biol Trace Elem Res, 2022, 200(1): 261-270.

[13] MEYER J N, LEUNG M C K, ROONEY J P, et al. Mitochondria as a target of environmental toxicants[J]. Toxicol Sci, 2013, 134(1): 1-17.

[14] TIMÓN-GÓMEZ A, NÝVLTOVÁ E, ABRIATA L A, et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: recent developments[J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 76: 163-178.

[15] SHIN D Y, SHIN H J, KIM G Y, et al. Streptochlorin isolated from Streptomyces sp. Induces apoptosis in human hepatocarcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(11): 1862-1867.

[16] YE D, WANG Y, LI H, et al. Fibroblast growth factor 21 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by potentiating peroxisome proliferator-activated receptor coactivator protein-1α-mediated antioxidant capacity in mice[J]. Hepatology, 2014, 60(3): 977-989.

[17] VILLENA J A. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond[J]. FEBS J, 2015, 282(4): 647-672.

[18] YANG Y, LIU Y, WANG Y, et al. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation[J]. Front Immunol, 2022, 13: 831168.

[19] YIN Z, GAO D, DU K, et al. Rhein ameliorates cognitive impairment in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease by relieving oxidative stress through activating the SIRT1/PGC-1α pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 2524832.

[20] ZHANG C, ZHONG T, LI Y, et al. The hepatic AMPK-TET1-SIRT1 axis regulates glucose homeostasis[J]. Elife, 2021, 10: e70672.

[21] ZHU Y, YANG H, DENG J, et al. Ginsenoside Rg5 improves insulin resistance and mitochondrial biogenesis of liver via regulation of the SIRT1/PGC-1α signaling pathway in db/db mice[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(30): 8428-8439.

[22] ZHANG Q, PIAO C, MA H, et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate liver ischaemia reperfusion injury subsequent to hepatectomy in rats by regulating mitochondrial dynamics and biogenesis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(21): 10152-10163.

[23] WANG L, KONG L, XU S, et al. Isoliquiritigenin-mediated miR-23a-3p inhibition activates PGC-1α to alleviate alcoholic liver injury[J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153845.

[24] SHEN P, LIN W, BA X, et al. Quercetin-mediated SIRT1 activation attenuates collagen-induced mice arthritis[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114213.

[25] ZHAO Q, TIAN Z, ZHOU G, et al. SIRT1-dependent mitochondrial biogenesis supports therapeutic effects of resveratrol against neurodevelopment damage by fluoride[J]. Theranostics, 2020, 10(11): 4822-4838.

[26] ZHANG T, CHI Y, KANG Y, et al. Resveratrol ameliorates podocyte damage in diabetic mice via SIRT1/PGC-1α mediated attenuation of mitochondrial oxidative stress[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 5033-5043.

[27] WANG B, GAO X, LIU B, et al. Protective effects of curcumin against chronic alcohol-induced liver injury in mice through modulating mitochondrial dysfunction and inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. Food Nutr Res, 2019, 63: 3567.

[28] KUNKEL G H, CHATURVEDI P, TYAGI S C. Mitochondrial pathways to cardiac recovery: TFAM[J]. Heart Fail Rev, 2016, 21(5): 499-517.

(**英文编辑**：汪源；**责任编辑**：陈姣，丁瑾瑜)