

NEDD4/PSMB5 介导的 BNIP3 降解减少在砷致 HepG2 细胞自噬通量受阻与损伤中的作用

杜春艳^{1,2}, 杨正海¹, 封华丽¹, 胡勇¹

1. 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;

2. 毕节医学高等专科学校医学技术系

摘要:目的 探讨神经前体细胞表达发育下调蛋白 4 (NEDD4) 和蛋白酶体 $\beta 5$ 亚基 (PSMB5) 介导的 Bcl-2/腺病毒 E1B-19-kDa 相互作用蛋白 3 (BNIP3) 降解减少在砷诱导人肝癌细胞 (HepG2) 自噬通量受阻及细胞损伤中的作用机制。方法 采用不同剂量亚砷酸钠 (NaAsO_2) 处理 HepG2 细胞不同时间, 结合细胞形态、超微结构、细胞活力及肝损伤指标丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 活性, 评价其细胞损伤效应; 免疫印记 (Western blot) 检测 NEDD4、PSMB5、BNIP3 及自噬相关蛋白 (Beclin-1、P62、LC3 II/LC3 I) 表达水平; 免疫共沉淀 (Co-IP) 检测 NEDD4、PSMB5 与 BNIP3 的作用; 以特异性抑制剂环己酰亚胺 (CHX)、氯喹 (CQ)、和蛋白酶体抑制剂 (MG132) 分别抑制蛋白质合成、溶酶体功能和泛素-蛋白酶体活性, 探索泛素蛋白酶体途径和自噬在砷致 HepG2 细胞损伤中的作用。结果 随着 NaAsO_2 暴露浓度增加和时间延长, HepG2 细胞活力降低, 形态发生显著变化, 自噬通量受阻和细胞损伤程度加重; NaAsO_2 暴露可下调 NEDD4 和 PSMB5 蛋白表达, 上调 BNIP3、Beclin-1、P62、LC3 II/LC3 I 蛋白表达 ($P < 0.05$), 且呈现一定时间-效应和剂量-效应关系; CQ 干预可加重 NaAsO_2 暴露引起的自噬通量受阻及细胞损伤 ($P < 0.05$); Co-IP 和 CHX 实验结果表明, NaAsO_2 暴露可减少 NEDD4 和 PSMB5 与 BNIP3 的相互作用, 使 BNIP3 降解减少 ($P < 0.05$); MG132 干预可加剧 NaAsO_2 暴露所致的 PSMB5 蛋白表达下调, 并上调 BNIP3、P62、Beclin1、LC3II/I 蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论 NaAsO_2 暴露可时间和剂量依赖性降低 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5 蛋白表达, 上调 BNIP3 蛋白, 并引起自噬通量受阻, 最终导致细胞损伤; 其机制可能与 NEDD4、PSMB5 结合 BNIP3 减少, 引起 BNIP3 降解减少而累积性增多有关。

关键词: 砷; 自噬; 肝损伤; 蛋白酶体 $\beta 5$ 亚基; BNIP3

中图分类号: R114 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-8507(2026)14-2553-10

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202601465

The role of reduced BNIP3 degradation mediated by NEDD4/PSMB5 in arsenic-induced autophagic flux impairment and damage in HepG2 Cells

DU Chun-yan*, YANG Zheng-hai, FENG Hua-li, 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: **Objective** To investigate the mechanism by which reduced degradation of Bcl-2/adenovirus E1B-19-kDa interacting protein 3 (BNIP3) mediated by neural precursor cell expression developmental downregulation protein 4 (NEDD4) and proteasome $\beta 5$ subunit (PSMB5) contributes to impaired autophagy flux and cellular damage in arsenic-induced human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). **Methods** The cytotoxic effects of different doses of sodium arsenite (NaAsO_2) treated HepG2 cells over varying time periods were evaluated by analyzing cell morphology, ultrastructure, cell viability, and hepatic injury enzyme levels (ALT, AST). Immunoprecipitation blotting (Western blot) was used to detect the expression levels of NEDD4, PSMB5, BNIP3, and autophagy-related proteins. Co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments were conducted to analyze the interactions among NEDD4, PSMB5, and BNIP3. Specific inhibitors including cycloheximide (CHX), chloroquine (CQ), and proteasome inhibitor (MG132) were employed to inhibit protein synthesis, lysosomal function, and the ubiquitin-proteasome pathway, respectively, to investigate the roles of the ubiquitin-proteasome pathway

基金项目: 国家自然科学基金 (82460628); 贵州医科大学国家自然科学基金培育项目 (24NSFCP08)

作者简介: 杜春艳 (1994—), 女, 硕士在读, 讲师, 研究方向: 环境毒理

通信作者: 胡勇, E-mail: huyong1979@gmc.edu.cn

and autophagy in arsenic - induced HepG2 cell damage. **Results** As the concentration and duration of NaAsO₂ exposure increased, the viability of HepG2 cells decreased and morphogenesis exhibited significant changes. Additionally, autophagy flux was impaired, and cellular damage worsened in a dose - and time - dependent manner. Different concentrations and durations of NaAsO₂ exposure down - regulated NEDD4 and PSMB5 protein expression while up - regulating BNIP3, Beclin - 1, P62, and LC3II/LC3I protein expression, showing time - effect and dose - effect relationships ($P < 0.05$). CQ intervention exacerbated NaAsO₂ - induced autophagy flux obstruction and cellular damage ($P < 0.05$). Co - IP and CHX experiments demonstrated that NaAsO₂ exposure reduced the interaction between NEDD4 and PSMB5 with BNIP3, thereby decreasing BNIP3 degradation ($P < 0.05$). MG132 intervention downregulated PSMB5 protein expression and up - regulated BNIP3, P62, Beclin - 1, and LC3II/LC3I protein expression, with all differences being statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** NaAsO₂ exposure can reduce the expression of NEDD4 and PSMB5 in HepG2 cells in a time - and dose - dependent manner, preclude BNIP3 protein levels, and impair autophagy flux, ultimately leading to cellular damage. The mechanism may involve reduced binding of NEDD4 and PSMB5 to BNIP3, leading to decreased BNIP3 degradation and consequent cumulative accumulation.

Keywords: Arsenic; Autophagy; Liver injury; Proteasome $\beta 5$ subunit; BNIP3

砷是自然界广泛存在的类金属元素,属 I 类致癌物,全球约 2 亿人受到砷暴露威胁^[1-2]。砷可导致肝脏发生病变^[3-4],但具体机制不清,且无特效治疗药物。因此,深入研究砷致肝损伤的毒作用机制,是亟待解决的关键问题。

自噬可通过形成自噬溶酶体来降解目的蛋白质,从而维持细胞内稳态^[5-6]。自噬早期,肌球蛋白样 BCL2 结合蛋白 (myosin - like BCL2 interacting protein, Beclin - 1) 参与自噬体形成,其高表达可刺激自噬发生;自噬中期,微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule - associated protein 1 light chain 3, LC3 I) 转化为 LC3 II 并协助自噬体膜延伸,LC3 II 增加与自噬体数量增加有关;自噬晚期,自噬受体蛋白 (Sequestosome 1, P62) 随底物一同被降解,其数量随自噬增强而减少。因此 Beclin - 1、LC3 II/LC3 I、P62 常被选做评估自噬通量的指标^[7-8]。当自噬发生障碍,无法完成正常的“生成-降解”循环,即称为自噬通量受阻。研究表明,自噬通量受阻会引起细胞损伤和疾病发生^[9-10]。自噬和泛素 - 蛋白酶体系统 (Ubiquitin - Proteasome System, UPS) 是真核细胞承担物质降解与循环利用功能的两大核心途径,可互相调节^[11-12]。UPS 的程序是底物蛋白质泛素化后被蛋白酶体识别和降解,该系统由泛素、泛素活化酶 (E1)、泛素转移酶 (E2)、泛素连接酶 (E3)、26S 蛋白酶体和去泛素化酶等组成^[13]。神经前体细胞表达发育下调蛋白 4 (neural precursor cell - expressed developmentally downregulated gene 4, NEDD4) 是 E3 酶,可泛素底物蛋白^[14-15],被泛素化的蛋白可被 26S 蛋白酶体水解;蛋白酶体 $\beta 5$ 亚单位 (proteasome subunit $\beta 5$, PSMB5) 是 26S 蛋白酶体的活性中心,在发挥蛋白质水解功能中起主导作用^[16]。研究显示,NEDD4、PSMB5 可通过降解自噬相关蛋白发挥调节作用^[17-18]。Bcl - 2/腺病毒 E1B - 19 - kDa 相

互作用蛋白 3 (Bcl - 2/adenovirus E1B - 19kD ainteracting protein 3, BNIP3) 是调节自噬的关键蛋白,其增加可引发自噬通量受阻,导致肝损^[19-20],砷也可阻断自噬通量和损伤肝细胞^[21]。然而,有关 NEDD4、PSMB5、BNIP3、自噬通量受阻与砷致肝细胞损伤的关系,目前尚未见报道。本实验通过构建 NaAsO₂ 暴露的人肝癌细胞 (HepG2) 损伤模型,并利用氯喹 (Chloroquine, CQ)、环己酰亚胺 (Cycloheximide, CHX) 和蛋白酶体抑制剂 MG132 等特异性抑制剂,共同探讨 NEDD4、PSMB5 与 BNIP3 降解在砷致 HepG2 细胞自噬通量受阻及损伤中的作用。

1 实验材料和方法

1.1 主要材料 特级胎牛血清 (美国 Gibco 公司); HepG2 细胞 (中国科学院); NaAsO₂ 试剂 (美国 Sigma 公司); BNIP3 和 LC3 抗体 (英国 Abcam 公司); NEDD4、PSMB5、P62、Beclin - 1、 β - actin 和对照 IgG 抗体 (中国武汉三鹰公司); Cell Counting Kit - 8 (CCK8) 试剂盒 (日本同仁化学研究所); 丙氨酸氨基转移酶 (alanine amino - transferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶试剂盒 (Aspartate aminotransferase, AST) (中国上海碧云天公司); CQ、CHX、MG132 (美国 MCE 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞计数绘制 HepG2 细胞生长曲线 取对数生长期 HepG2 细胞,胰酶消化后,以 5×10^5 个/皿浓度接种至培养皿,37℃、5% CO₂ 培养,每隔 24 h 胰酶消化计数,连续计数 7 天。

1.2.2 显微镜观察 NaAsO₂ 暴露后 HepG2 细胞形态变化 将 HepG2 细胞培养至对数生长期,以 0、4、8、16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用细胞 12 h、24 h、48 h、72 h,显微镜观察细胞形态特征。

1.2.3 多方法检测 NaAsO₂ 暴露对 HepG2 细胞的损伤情况 将 HepG2 细胞培养至对数生长期,以 0、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用细胞 12 h、24 h、48 h, CCK8 法检测细胞活力;荧光分光光度法检测 ALT、AST 活性;透射电镜观察细胞超微结构及自噬变化。

检测细胞活力的具体操作:弃培养基, PBS 洗涤, 每孔加入 100 μl (含 10 μl CCK8 溶液) 完全培养基, 孵育 2 h, 使用酶标仪于 490 nm 测定各孔的吸光度值, 以对照组为基准进行归一化计算得到细胞相对活力。

检测 ALT、AST 活性的具体操作:吸取 20 μl 细胞培养液于全黑 96 孔板, 根据试剂盒说明书分别配置标准曲线孔和反应工作液, 以荧光酶标仪 (激发波长 560 nm, 发射波长 590 nm) 检测荧光强度。酶活性为荧光强度和孵育时间之比, 根据标准曲线, 以对照组为基准进行归一化计算得到相对酶活性。

观察细胞超微结构及自噬变化的具体操作:弃培养基, PBS 洗涤, 胰酶消化得到细胞, 以戊二醛液固定后离心, 弃上清, 加入 1% OsO₄ 固定液回, 随后按照梯度程序, 依次用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 的丙酮液逐级脱水。按程序选用包埋剂进行包埋, 静置过夜后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中持续固化。用超薄切片机切片后, 以 3% 的醋酸铀-枸橼酸铅染液进行双染, 结束后将样本置于透射电子显微镜下观察并采片保存记录。

1.2.4 Western blot 实验检测 NaAsO₂ 暴露对 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5、BNIP3 和自噬相关蛋白表达的影响 将 HepG2 细胞培养至对数生长期, 选择 16 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用细胞 12 h、24 h、48 h, 0、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用细胞 48 h, Western blot 法测定 NEDD4、PSMB5、BNIP3 及自噬相关蛋白表达水平。

1.2.5 CQ 联合 NaAsO₂ 处理对 HepG2 细胞 BNIP3 及自噬相关蛋白表达的影响 将 HepG2 细胞培养至对数生长期, CQ (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理 6 h 后, 16 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用细胞 48 h, CCK8 法检测细胞活力;荧光分光光度法检测 ALT、AST 活性;透射电镜观察细胞超微结构及自噬变化;Western blot 检测各组 BNIP3 和自噬相关蛋白表达水平, 以验证 BNIP3 与自噬通量受阻和肝细胞损伤的关系。

1.2.6 CHX 联合 NaAsO₂ 处理对 HepG2 细胞 BNIP3 蛋白表达的影响 将 HepG2 细胞培养至对数生长期, CHX (200 $\mu\text{mol/L}$) 处理 6 h 后, 16 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用细胞 48 h, Western blot 检测各组 BNIP3 蛋白表达水平, 以验证 BNIP3 降解与 NaAsO₂ 作用的关系。

1.2.7 免疫共沉淀检测 NEDD4、PSMB5 和 BNIP3 蛋白的相互作用 将 HepG2 细胞培养至对数生长期,

以 16 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用细胞 48 h 后, 胰酶消化后离心得到细胞沉淀, 加入 1 mL 的 Lysis Buffer, 漩涡搅拌, 用 15% 超声充分裂解, 离心收集上清液作为细胞裂解物, 并吸取 50 μl 细胞裂解物用做阳性对照 (Input)。在新的微量离心管中加入 0.7 mL 细胞裂解物, 7 μl PMSF 和 1 μg 的 BNIP3 抗体或 IgG 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, 转移至已洗涤过的 Protein A - Agarose 柱中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, 离心弃上清, 以 IP 缓冲液洗涤和沉淀, 加入 1 $\times$ Loading Buffer, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 离心后所得的免疫沉淀物可通过 Western blot 检测蛋白表达, 以验证 NEDD4、PSMB5 与 BNIP3 的作用关系。

1.2.8 MG132 联合 NaAsO₂ 处理对 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5、BNIP3 和自噬相关蛋白表达的影响

将 HepG2 细胞培养至对数生长期, MG132 (2 $\mu\text{mol/L}$) 处理 6 h 后, 16 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用细胞 48 h, Western blot 检测相关 NEDD4、PSMB5、BNIP3 和自噬相关蛋白表达水平, 以验证 BNIP3 的降解途径。

1.2.9 数据处理 采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行绘图, 以 SPSS 25.0 对数据进行分析, 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; 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HepG2 细胞生长曲线 细胞对数生长期为 2 ~ 4 天, 结果见图 1。

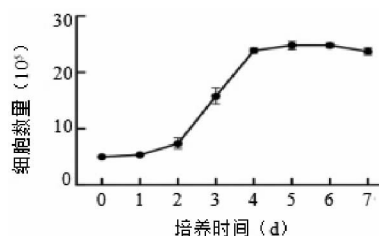


图 1 HepG2 细胞生长曲线

Fig. 1 Growth curve of HepG2 cells

2.2 NaAsO₂ 暴露引起 HepG2 细胞形态变化 显微镜结果显示: 4 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 作用后, 与空白组 HepG2 细胞形态无明显区别, 细胞均呈椭圆形或不规则形, 贴壁生长, 分布均匀, 随着时间延长细胞形态无明显变化, 直至作用时间达 72 h 后, 细胞增殖至培养孔承载上限, 视野内细胞密集, 已接近铺满孔底。随着 NaAsO₂ 暴露浓度增加和时间延长, HepG2 细胞形态发生改变, 细胞延展性降低, 贴壁能力减弱, 聚团现象加剧, 细胞皱缩变圆甚至溶解, 高浓度 64、128

$\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 暴露 24 h 及更长时间后,细胞大量漂浮死亡,具体见图 2。因此,后续实验,不再选择 72 h

作用时间以及 4、64、128 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 的作用浓度。

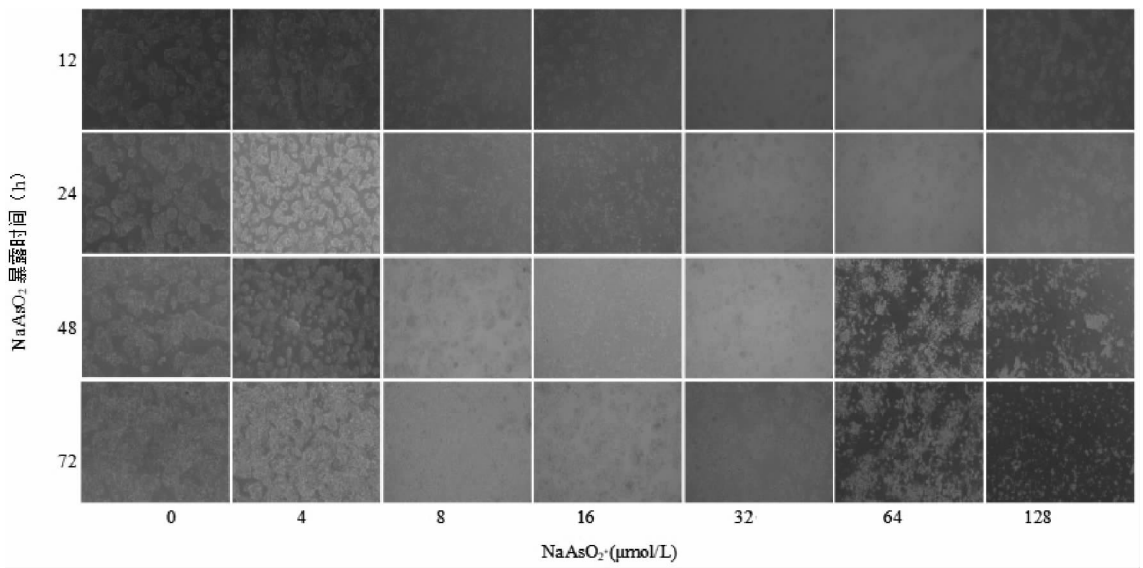


图 2 不同浓度不同时间 NaAsO_2 暴露后 HepG2 细胞形态变化 ($\times 100$)

Fig. 2 Effects of different concentrations and durations of NaAsO_2 exposure on morphological changes in HepG2 Cells ($\times 100$)

2.3 NaAsO_2 引起 HepG2 细胞活力、ALT 和 AST 活性及超微结构变化

2.3.1 NaAsO_2 抑制 HepG2 细胞增殖 CCK8 结果显示,与空白组相比,8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 作用 24 h 和 48 h 后,HepG2 细胞活力下降,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),详情见图 3(A、D)。

2.3.2 NaAsO_2 引起 HepG2 细胞 ALT 和 AST 活性变化 荧光分光光度法结果显示,在作用时间为 48 h 时,细胞培养液中 ALT 和 AST 活性随 NaAsO_2 暴露浓度增加而增高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);在 NaAsO_2 作用浓度为 16、32 $\mu\text{mol/L}$ 时,与作用 12 h 相比,作用 48 h 后细胞培养液中 ALT 和 AST 活性均增高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),如图 3(B、C、E、F)所示。

2.3.3 NaAsO_2 引起 HepG2 细胞超微结构变化 透射电镜结果显示:空白组 HepG2 细胞结构完整,染色质分布均匀核膜连续完整,胞浆中线粒体形态结构较正常,嵴清晰平直,基质电子密度均匀,呈灰色,粗面内质网正常,胞浆中未见明显自噬小体和自噬溶酶体。 NaAsO_2 暴露后,细胞结构发生改变,随着暴露浓度增加和时间延长,线粒体肿胀加重,自噬小体和自噬溶酶体增多,粗面内质网扩张,出现嵴减少和断裂,基质不同程度溶解,电子密度降低,部分暴露组出现脂滴,32 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 暴露 24 h 和 48 h 后,细胞膜出现穿孔破裂现象。详情见图 3G。

综上,后续剂量 - 效应选择 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 作用细胞 48 h;时间 - 效应选择 16 $\mu\text{mol/L}$

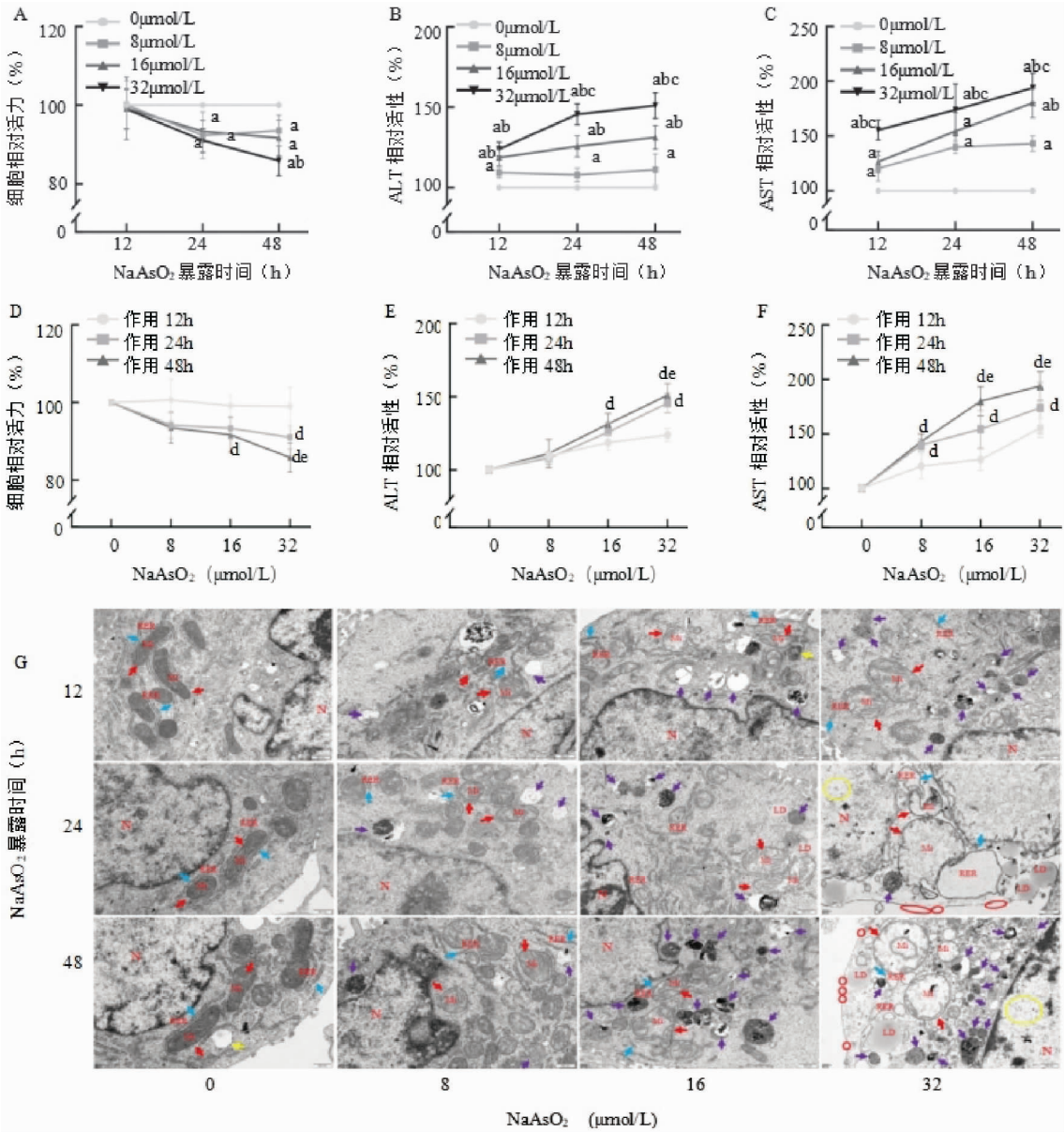
NaAsO_2 作用细胞 12 h、24 h、48 h。

2.4 NaAsO_2 暴露对 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5、BNIP3 及自噬相关蛋白表达的影响

2.4.1 不同浓度 NaAsO_2 暴露对 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5、BNIP3 及自噬相关蛋白表达影响 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 暴露 HepG2 细胞 48 h 后,Western blot 结果显示,与空白组和 8 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 比较,16、32 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 组 NEDD4 和 PSMB5 蛋白表达水平降低,BNIP3 蛋白表达水平增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与空白组比较,16、32 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 组 P62、Beclin - 1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达水平增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。详情见图 4。

2.4.2 不同时间 NaAsO_2 暴露对 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5、BNIP3 及自噬相关蛋白表达的影响

16 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 暴露 HepG2 细胞 12 h、24 h、48 h 后,Western blot 结果显示,随着 NaAsO_2 暴露时间延长,BNIP3、Beclin - 1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达水平逐步增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与空白组和 NaAsO_2 暴露 12 h 组相比, NaAsO_2 暴露 24 h、48 h 组 NEDD4 和 PSMB5 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与空白组、 NaAsO_2 暴露 12 h 组、 NaAsO_2 暴露 24 h 组相比, NaAsO_2 暴露 48 h 组 P62 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),空白组上述蛋白表达水平随时间变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),详情见图 5。



注:ABC 为不同浓度 NaAsO₂ 暴露后 HepG2 细胞的活力、ALT 和 AST 活性,a;与同时时间段空白组相比, $P<0.05$;b;与同时时间段 8 μmol/LNaAsO₂ 暴露组相比, $P<0.05$;c;与同时时间段 16 μmol/LNaAsO₂ 暴露组相比, $P<0.05$;DEF 为 NaAsO₂ 暴露不同时间后 HepG2 细胞的活力、ALT 和 AST 活性,d;与同剂量 NaAsO₂ 暴露 12 h 相比, $P<0.05$;e;与同剂量 NaAsO₂ 暴露 24 h 相比, $P<0.05$;G 为 NaAsO₂ 暴露后 HepG2 细胞超微结构改变及自噬改变($\times 15\,000$):细胞核(N)、线粒体(Mi)、粗面内质网(RER)、脂滴(LD)、常染色质丢失(□)、线粒体(↑)、粗面内质网(↑)、膜穿孔破裂(□)、自噬溶酶体(↑)、自噬小体(↑)。

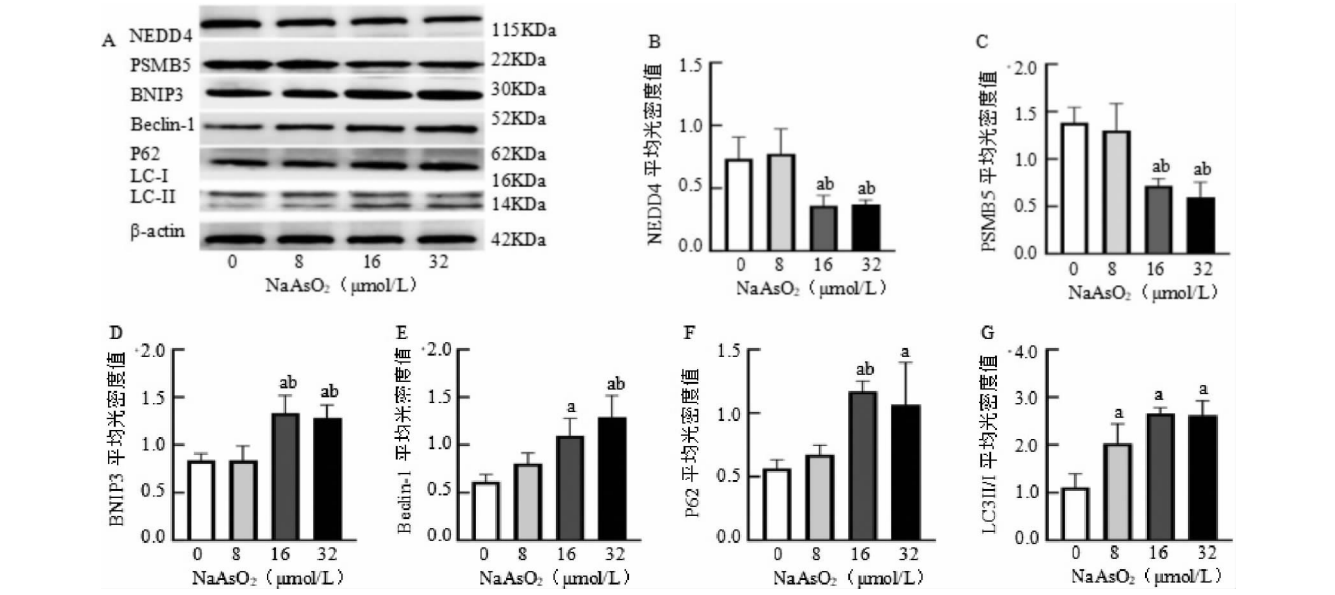
图 3 NaAsO₂暴露对 HepG2 细胞活力、ALT 和 AST 活性及超微结构变化

Fig. 3 NaAsO₂ exposure induces changes in HepG2 cell viability, ALT and AST activities, and ultrastructure

2.5 CQ 引起自噬通量受阻加重 NaAsO₂ 暴露引起的 HepG2 细胞损伤

2.5.1 CQ 影响 HepG2 细胞活力及 ALT、AST 活性
与空白组相比较,NaAsO₂、CQ、CQ + NaAsO₂组 HepG2 细胞活力降低,ALT、AST 活性升高;与 NaAsO₂组和 CQ 组相比较,CQ + NaAsO₂组 HepG2 细胞活力进一步降低,ALT、AST 活性进一步升高,且差异均具有统计学意义($P<0.05$),结果见图 6(B、C、D)。

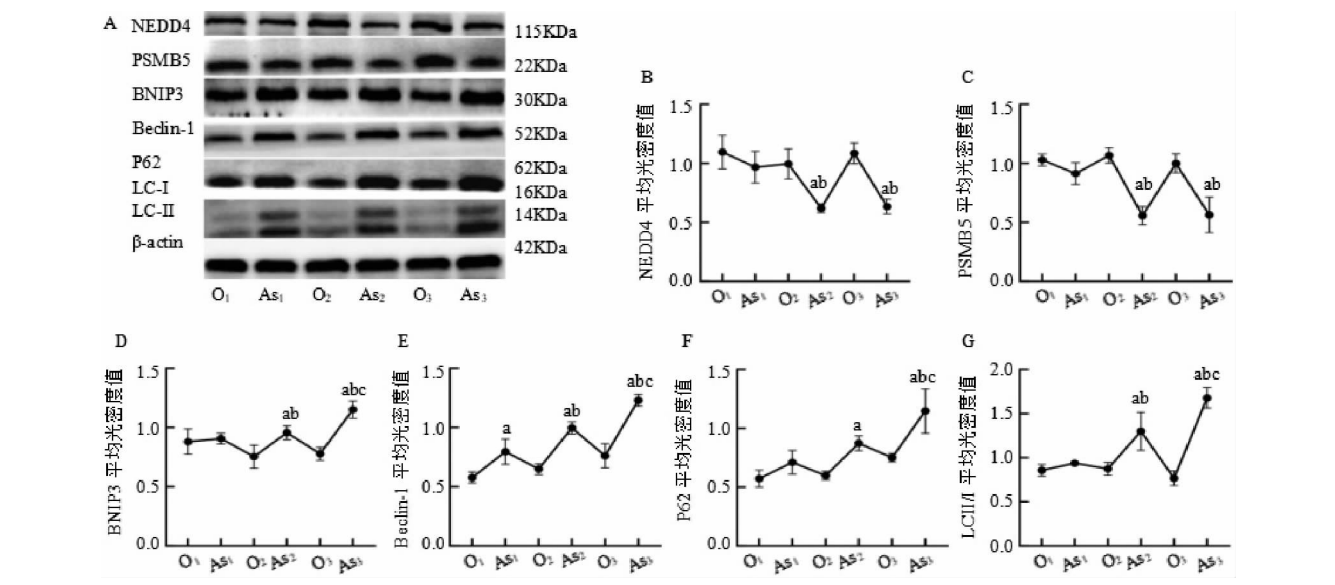
2.5.2 CQ 影响 HepG2 细胞超微结构 电镜结果显示,空白组和二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO)组细胞形态结构较正常:染色质分布均匀,核膜连续完整,线粒体形态结构正常,嵴清晰平直,基质电子密度均匀,粗面内质网正常,胞浆中可见少量自噬小体和自噬溶酶体。NaAsO₂组和 CQ 组形态结构出现异常:大量线粒体肿胀,嵴减少或断裂,大量溶解呈絮状甚至空泡状,电子密度降低,胞浆中可见较多的自噬



注:A为 Western blot 检测不同浓度 NaAsO₂暴露后 NEDD4、PSMB5、BNIP3 及自噬相关蛋白表达;BCDEFG 为相应蛋白表达的差异比较,a:与空白组相比, $P < 0.05$;b:与 8 μmol/L NaAsO₂暴露组相比, $P < 0.05$ 。

图 4 不同浓度 NaAsO₂暴露 HepG2 细胞 48 h 后 NEDD4、PSMB5、BNIP3 及自噬相关蛋白表达水平

Fig. 4 Expression levels of NEDD4, PSMB5, BNIP3, and autophagy – related proteins in HepG2 cells after 48 – hour exposure to different concentrations of NaAsO₂



注:O:空白组;As:NaAsO₂暴露组;1:作用 12 h;2:作用 24 h;3:作用 48 h。A 为 Western blot 检测 NaAsO₂暴露不同时间后 NEDD4、PSMB5、BNIP3 及自噬相关蛋白表达,BCDEFG 为相应蛋白表达的差异比较,a:与同时间段空白组相比, $P < 0.05$;b:与 NaAsO₂暴露 12 h 相比, $P < 0.05$;c:与 NaAsO₂暴露 24 h 相比, $P < 0.05$ 。

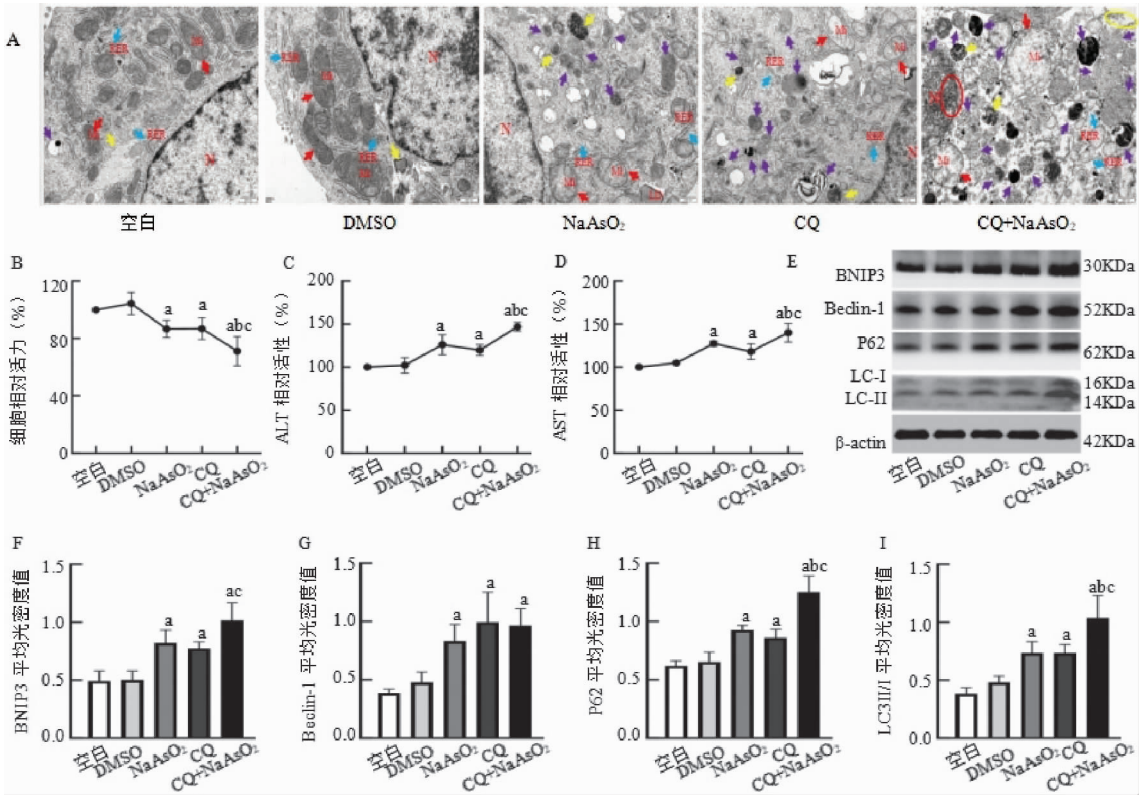
图 5 16 μmol/L NaAsO₂暴露不同时间后 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5、BNIP3 以及自噬相关蛋白表达水平

Fig. 5 Expression levels of NEDD4, PSMB5, BNIP3, and autophagy – related proteins in HepG2 cells exposed to 16 μmol/L NaAsO₂ at different time points

小体和自噬溶酶体以及少量的脂滴和空泡。CQ + NaAsO₂组形态结构明显异常:常染色质部分丢失,异染色质散在分布,核膜破裂,大量线粒体已发生明显肿胀,嵴减少、断裂或消失,基质大量溶解呈絮状甚至空泡状,电子密度降低,部分线粒体外膜破裂,粗面内质网扩张呈囊状,双层膜之间的间隙增宽,表面核糖体有脱粒,胞浆中还可可见大量的自噬小体和自噬溶酶体,且细胞膜出现穿孔破裂现象,结果见图 6A。

2.5.3 CQ 影响 HepG2 细胞 BNIP3 及自噬相关蛋白表达水平 与空白组比较,NaAsO₂组、CQ 组、CQ + NaAsO₂组 BNIP3、P62、LC3 II/LC3 I、Beclin-1 蛋白表达增加,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);与单

独 CQ 组比较,CQ + NaAsO₂组 BNIP3、LC3 II/LC3 I、P62 蛋白进一步增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。具体见图 6(E、F、G、H、I)。



注:A 为 CQ 干预后各组 HepG2 细胞超微结构及自噬改变 ($\times 20\,000$);BCD 为 CQ 干预后各组 HepG2 细胞活力和 ALT、AST 活性;EFGHI 为 CQ 干预后各组 HepG2 细胞 BNIP3 及自噬相关蛋白表达水平,a:与空白组相比, $P < 0.05$;b:与 NaAsO₂组相比, $P < 0.05$;c:与 CQ 组相比, $P < 0.05$ 。

图 6 CQ 干预对 HepG2 细胞损伤及相关蛋白表达影响

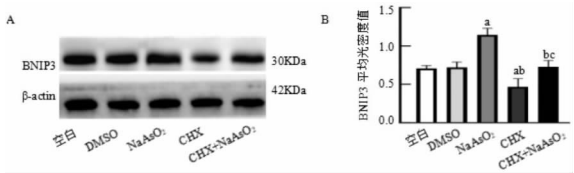
Fig. 6 Effect of CQ intervention on HepG2 cell injury and related protein expression

2.6 NaAsO₂ 暴露减少 BNIP3 蛋白降解 与空白组相比,NaAsO₂组 BNIP3 蛋白表达升高,CHX 组 BNIP3 蛋白表达降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 NaAsO₂组比较,CHX + NaAsO₂组 BNIP3 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 CHX 组相比,CHX + NaAsO₂组 BNIP3 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),具体见图 7。

2.7 免疫共沉淀验证 NEDD4、PSMB5 和 BNIP3 蛋白的相互作用 Co-IP 结果显示,NEDD4 和 PSMB5 均与 BNIP3 有作用,与空白组相比,NaAsO₂暴露后,NEDD4 和 PSMB5 均与 BNIP3 的结合减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$),具体见图 8。

2.8 MG132 干预加剧 NaAsO₂ 诱导的 BNIP3 和自噬相关蛋白表达上调 与空白组比较,NaAsO₂组、MG132 组、MG132 + NaAsO₂组 PSMB5 蛋白表达降低,BNIP3、P62、Beclin-1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 NaAsO₂组比

较,MG132 + NaAsO₂组 PSMB5 蛋白表达水平进一步降低,BNIP3、Beclin-1、P62、LC3 II/LC3 I 蛋白表达进一步增加,且差异均有统计学意义($P < 0.05$),与空白组相比,MG132 干预后 NEDD4 蛋白表达无统计学差异($P > 0.05$),具体见图 9。



注:A 为 Western blot 检测 CHX 干预后各组 BNIP3 蛋白表达情况;B 为 CHX 干预后各组 BNIP3 蛋白表达的差异比较,a:与空白组相比, $P < 0.05$;b:与 NaAsO₂组相比, $P < 0.05$;c:与 CHX 组相比, $P < 0.05$ 。

图 7 CHX 干预对 HepG2 细胞 BNIP3 蛋白表达影响

Fig. 7 Effect of CHX intervention on the expression of BNIP3 protein in HepG2 cells

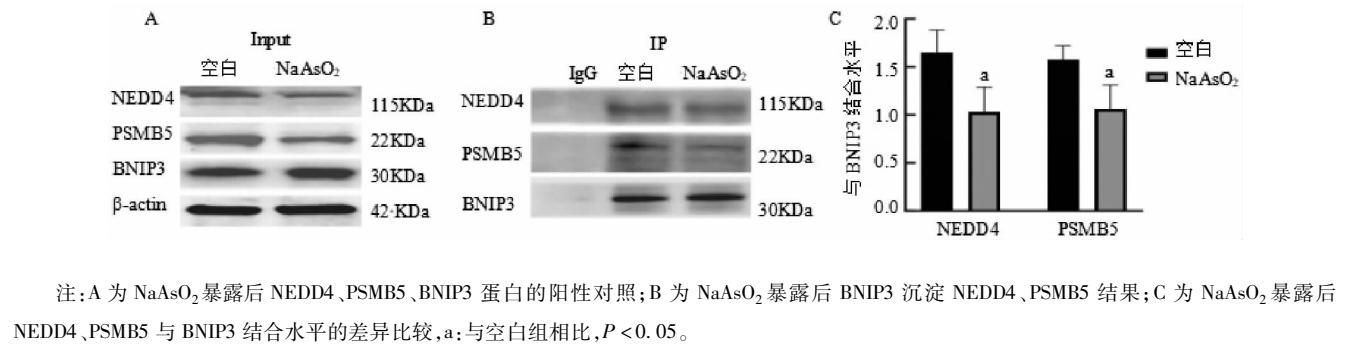


图 8 免疫共沉淀检测 NEDD4、PSMB5 与 BNIP3 的作用

Fig. 8 Validation of NEDD4, PSMB5, and BNIP3 interactions by immunoprecipitation

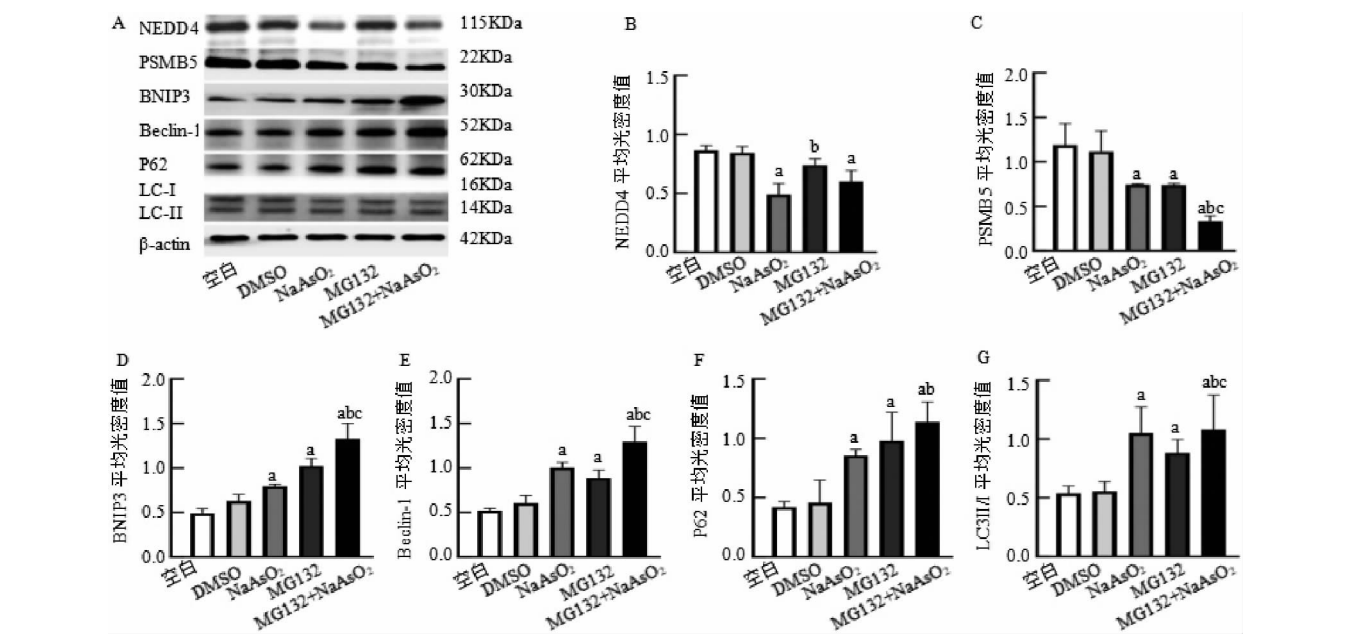


图 9 MG132 干预后各组 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5、BNIP3 和自噬相关蛋白表达水平

Fig. 9 Expression levels of NEDD4, PSMB5, BNIP3, and autophagy - related proteins in HepG2 cells after MG132 intervention in each group

3 讨论

砷中毒致肝损伤病情较严重,且砷的毒作用复杂,发病机制不清,已成为其防控工作的难点和瓶颈。本研究通过构建不同浓度、不同时间 NaAsO₂ 暴露的 HepG2 细胞损伤模型,聚焦 NEDD4/PSMB5 介导 BNIP3 降解的角度,探讨自噬在亚砷酸钠致 HepG2 细胞损伤中的作用,旨在为砷致肝损伤机制研究提供新视角。

HepG2 细胞损伤可表现为细胞增殖抑制、形态改变、超微结构破坏及酶活性指标异常等多种形式^[22-23]。本研究显示:NaAsO₂ 暴露后,细胞形态发生改变,且随着暴露浓度增加和时间延长,细胞贴壁能力下降、聚团皱缩甚至死亡。ALT 和 AST 是肝功能检

测中反映肝细胞损伤的关键指标,当细胞受损时释放入培养液^[24]。本研究发现,在一定范围内,随着 NaAsO₂ 暴露浓度增高和时间延长,细胞培养液 ALT 和 AST 活性逐渐升高,该结果提示 NaAsO₂ 暴露可引起 HepG2 细胞损伤。透射电镜是观察肝细胞损伤的金指标,为了验证 NaAsO₂ 暴露后细胞损伤情况,本研究采用透射电镜检查了肝细胞的超微结构,结果显示:NaAsO₂ 暴露后,细胞线粒体肿胀,粗面内质网扩张呈囊状结构,自噬小体和自噬溶酶体数量增加;随着暴露浓度增加和时间延长,上述变化更明显,且出现了细胞膜穿孔、破裂等不可逆损伤,细胞损伤程度进一步加重。该结果进一步证实了 NaAsO₂ 暴露可以引起 HepG2 细胞损伤,且具有一定的剂量 - 效应和时间 - 效应关系。

研究表明,自噬通路的紊乱可能是介导肝细胞损伤的重要分子机制^[25-26]。本研究结果显示:NaAsO₂暴露后,HepG2 细胞 BNIP3 和自噬相关蛋白(Beclin-1、LC3 II/LC3 I、P62)表达水平显著升高,提示NaAsO₂暴露所致损伤与自噬通量受阻密切相关。前面电镜结果也发现,NaAsO₂暴露后自噬小体和自噬溶酶体数量增加,进一步证实了NaAsO₂暴露可引起自噬通量受阻。CQ 作为自噬通量抑制剂,可抑制自噬小体与溶酶体结合以及后续自噬溶酶体的降解,从而阻断自噬流的完成,导致细胞内受损的细胞器、异常蛋白等自噬底物不能及时被降解,进而引发机体功能紊乱^[27-28]。因此,本研究利用 CQ 干预联合 NaAsO₂处理,探索自噬在砷致 HepG2 细胞损伤中的作用。结果发现:CQ 可显著加重 NaAsO₂暴露引起的 HepG2 细胞损伤和自噬通量受阻程度。

BNIP3 是调控自噬的关键蛋白,其异常过表达可诱发自噬通量受阻导致细胞损伤^[29-30],低表达 BNIP3 可一定程度上缓解自噬异常引起的疾病进展^[31]。本研究发现 BNIP3 蛋白表达水平随 NaAsO₂暴露剂量增加和时间延长而升高,且单独使用蛋白质合成抑制剂 CHX 干预后,BNIP3 降解增多,而 CHX 联合 NaAsO₂作用缓解了这一降解效应。上述结果提示:砷暴露可能通过抑制 BNIP3 蛋白降解,进而引起自噬通量阻滞和细胞损伤。

UPS 是细胞内蛋白质降解的主要途径,NEDD4 作为 E3 泛素连接酶,可识别底物蛋白并介导其泛素修饰,泛素化的底物蛋白被 26S 蛋白酶体识别和降解,PSMB5 作为 26S 蛋白酶体的关键活性亚基,其表达与活性可限制整个蛋白酶体系统的降解效率^[32-33]。本研究显示,NaAsO₂暴露后,HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5 蛋白表达降低,BNIP3 蛋白表达增高;免疫共沉淀结果证实了 NEDD4 与 PSMB5 可与 BNIP3 发生相互作用,且砷暴露后 NEDD4 和 PSMB5 均与 BNIP3 结合减少。以上结果提示 BNIP3 的异常蓄积可能与 NEDD4 和 PSMB5 依赖的蛋白酶体降解功能受抑密切相关。为此,本研究选用蛋白酶体抑制剂 MG132 联合 NaAsO₂处理 HepG2 细胞。结果发现,MG132 干预可加剧 NaAsO₂诱导的 PSMB5 蛋白表达降低并使 BNIP3 和自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I、Beclin-1、P62 表达进一步升高。该结果提示,当 PSMB5 下调、蛋白酶体功能受损时,BNIP3 的降解途径受到明显抑制,且自噬通量受阻程度加重。以上结果表明,砷可引起 NEDD4 和 PSMB5 表达降低,从而对 BNIP3 降解减少,导致 BNIP3 累积性增多和自噬通量受阻。

综上,本研究结果表明,砷暴露可时间和剂量依

赖性降低 HepG2 细胞 NEDD4、PSMB5 蛋白表达,上调 BNIP3 蛋白,并引起自噬通量受阻,最终导致细胞损伤;其机制可能与 NEDD4、PSMB5 结合 BNIP3 减少,引起 BNIP3 降解减少而累积性增多有关。

尽管本研究进一步揭示了砷暴露通过抑制泛素蛋白酶体系统中 NEDD4 和 PSMB5 的功能并上调 BNIP3 表达的潜在机制,但 NEDD4、PSMB5、BNIP3 三者之间的具体调控关系及其与自噬过程的相互作用机制仍有待进一步阐明。后续将构建基因过表达或敲低细胞模型、开展 BNIP3 泛素化水平等实验进一步探讨。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] ElGhiaty MA, ElKadi AOS. The duality of arsenic metabolism: impact on human health[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2023, 63(1): 341-358.
- [2] Podgorski J, Berg M. Global threat of Arsenic in groundwater[J]. *Science*, 2020, 368(6493): 845-850.
- [3] Nguyen CK, Alvarado M, Huh WJ, et al. Arsenic and young liver: a case report of hepatic steatosis due to arsenic toxicity[J]. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 2025, 18(1): 114-118.
- [4] 杨碧云,李虎宜,王凉梅.燃煤型砷中毒患者肝组织 B 超及血清 TP、ALB 以及 CHE 的变化情况[J]. *中国地方病防治杂志*, 2015,30(4):274.
Yang BY, Li HY, Wang LM. Changes in liver ultrasound, serum TP, ALB and CHE in patients with coal-burning arsenic poisoning [J]. *Chinese Journal of Control of Endemic Diseases*, 2015, 30(4): 274. (In Chinese)
- [5] Jiang S, Wang L, Han D, et al. TRIM38 suppresses breast cancer progression via modulating SQSTM1 ubiquitination and autophagic flux[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 13(11): e12725.
- [6] Tang HY, Ma C, Xu MC, et al. SGK1 triggers cartilage degradation in TMJOA via FoxO1/autophagy [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2025, 27(1): 231.
- [7] Xu FF, Sun HM, Liu Y, et al. LAMTOR5 promotes hepatoma growth in mice by disrupting LC3-p62-mediated autophagy and preventing p62 proteasome degradation [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2026, 47(4): 1042-1057.
- [8] Meena P, Uttara W, Anand P. Autophagy indicators in oral squamous cell carcinoma[J]. *Pathology*, 2023, 56(1): 59-64.
- [9] Walter S, Häseli SP, Baumgarten P, et al. Oxidized protein aggregate lipofuscin impairs cardiomyocyte contractility via late-stage autophagy inhibition [J]. *Redox Biology*, 2025, 81(3): 103559.
- [10] Xiao L, Sharma P, Yang XY, et al. Neurotrophic factor- α 1/carboxypeptidase E regulates critical protein networks to rescue neurodegeneration, defective synaptogenesis and impaired autophagy in alzheimer's disease mice [J]. *Translational Neurodegeneration*, 2025, 14(1): 59.
- [11] Kim M, Hong KS, Kim T, et al. Regulatory mechanisms for Snail protein stability: ubiquitin-proteasome system and chaperone-mediated autophagy [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2026, 58(2): 408-415.
- [12] Delrue C, Speckaert MM. Renal implications of dysregulated protein homeostasis: insights into ubiquitin-proteasome and

- autophagy systems[J]. *Biomolecules*, 2025, 15(3): 349.
- [13] Masaki N, Aoki Y, Obara K, et al. Targeting autophagy with the synergistic combination of chloroquine and rapamycin as a novel effective treatment for well - differentiated liposarcoma[J]. *Cancer Genomics & Proteomics*, 2023, 20(4): 317 - 322.
- [14] Tong Y, Wang Z, Wang Y, et al. The E3 ubiquitin ligase ARIH1 facilitates colorectal cancer progression by promoting oxidative phosphorylation via the mitochondrial trans - location of K63 - Linked ubiquitinated PHB1 [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(25): e2501017.
- [15] Kim Y, Kim N, Lee WJ, et al. More 26S and 30S proteasomes are beneficial in proteinopathy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2025, 122(38): e2422570122.
- [16] Wang Y, Wang Y, Iriki T, et al. The DYT6 dystonia causative protein THAP1 is responsible for proteasome activity via PSMB5 transcriptional regulation[J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 1600.
- [17] Plakoula E, Kalampounias G, Alexis S, et al. Prognostic value of PSMB5 and correlations with LC3II and reactive oxygen species levels in the bone marrow mononuclear cells of bortezomib - resistant multiple myeloma patients[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2025, 47(1): 32.
- [18] Lin JC, Huang TS, Chen YB, et al. Nedd4 family interacting protein 1 (NDFIP1) is a novel target of PF - 429242 in promoting autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2026, 794(2): 153065.
- [19] Cao Y, Zheng J, Wan HY, et al. A mitochondrial SCF - FBXL4 ubiquitin E3 ligase complex degrades BNIP3 and NIX to restrain mitophagy and prevent mitochondrial disease[J]. *EMBO Journal*, 2023, 42(13): e113033.
- [20] Shi CJ, Zhang ZH, Xu RF, et al. Contribution of HIF - 1 α /BNIP3 - mediated autophagy to lipid accumulation during irinotecan - induced liver injury [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 6528.
- [21] Zhao Y, Guo M, Pei T, et al. α - Lipoic acid ameliorates arsenic - induced lipid disorders by promoting peroxisomal β - Oxidation and reducing lipophagy in chicken hepatocyte [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(11): e2413255.
- [22] Mei S, Li Z, Wang Q, et al. Anticancer capacities of green - synthesized Zinc oxide nanoparticles loaded with mangiferin: mechanistic insights into membrane damage, pH change, oxidative stress, apoptosis, and nuclear lysis in HepG2 and Caco - 2 cells [J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 2026, 40(2): e70498.
- [23] Chen YJ, Zhang XL, Zheng ZH, et al. In silico prospecting of ADH activating peptides from Pacific oyster (*crassostrea gigas*) and protective effect on ethanol - induced damage in HepG2 cells[J]. *Food Chemistry*, 2025, 479(1): 143777.
- [24] Liu T, Sui S, An H, et al. Bavachalcone protects against Acetaminophen - Induced acute liver toxicity in mice by inhibiting inflammation and oxidative stress responses [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2025, 39(12): e70623.
- [25] Cheng Y, Rao P, Li SJ, et al. Alcohol promotes hepatocyte injury via ER stress sensor XBP1s mediated regulation of autophagy and lysosomal activity [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2024, 492(3): 117117.
- [26] Wu HF, Zhou M, Jin Q, et al. The upregulation of Annexin A2 by TLR4 pathway facilitates lipid accumulation and liver injury via blocking AMPK/mTOR - mediated autophagy flux during the development of non - alcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology International*, 2024, 18(4): 1144 - 1157.
- [27] Wang KJ, Wang Z, Peng WX, et al. Disulfiram activates autophagy via proteasome inhibition and c - Fos/beclin - 1 upregulation, synergizing with chloroquine[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 12(1): 43.
- [28] Javaid HMA, Lim H, Shin S, et al. Inhibition of autophagy with chloroquine dysregulates mitochondrial quality control and energetics in adipocytes [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2022, 45(10): 731 - 742.
- [29] Wang JJ, Su Q, Chen K, et al. Pyrimethamine upregulates BNIP3 to interfere SNARE - mediated autophagosome - lysosomal fusion in hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2024, 14(2): 211 - 224.
- [30] Chen YJ, Jiao DY, Liu Y, et al. FBXL4 mutations cause excessive mitophagy via BNIP3/BNIP3L accumulation leading to mitochondrial DNA depletion syndrome [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2023, 30(10): 2351 - 2363.
- [31] Li N, Khaket PT, Yang Y, et al. BNIP3L/BNIP3 - Mediated mitophagy contributes to the maintenance of ovarian cancer stem cells[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2025, 29(19): e70704.
- [32] Ramage DE, Grant DW, Timms RT. Loss - of - function mutations in the dystonia gene THAP1 impair proteasome function by inhibiting PSMB5 expression[J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 1511.
- [33] Nakano YSE, Bustos MA, Chong KK, et al. Ubiquitin E3 ligase KPC1 governs mesenchymal metastatic melanoma reprogramming via proteasomal degradation of ZEB1 [J]. *Cell Death & Disease*, 2025, 16(1): 897.

收稿日期:2026-01-29

(上接第 2530 页)

- [35] Bolu G, Sahin EK, Ugurlu M, et al. Untangling violent behavior in schizophrenia: the role of formal thought disorder and cognitive dysfunction[J]. *Asian Journal of Psychiatry*, 2026, 118(1): 104898.
- [36] Tahmazov E, Blachier A, Nabbe P, et al. Effect of early intervention for early - stage psychotic disorders on suicidal behaviours - a systematic review protocol [J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2024, 15(2): 1359764.
- [37] Che S, Gwon YG, Kim KH. Follow - Up timing after discharge and suicide risk among patients hospitalized with psychiatric illness [J]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(10): e2336767.
- [38] Leijala J, Kampman O, Gunnar T, et al. Treatment adherence in first - episode psychosis: a one - year follow - up study comparing self - reported adherence, pharmacy refill data, and therapeutic drug monitoring [J]. *Psychiatry Research*, 2025, 354(2): 116780.
- [39] Barlati S, Innamorati M, Vita A, et al. The interplay between childhood trauma, hopelessness, depressive symptoms, and mental pain in a large sample of patients with severe mental disorders: a network analysis [J]. *Journal of Affective Disorders*, 2025, 380(1): 545 - 551.

收稿日期:2026-01-05