

铁死亡在微塑料和锰联合暴露致小鼠纹状体损伤的实验研究

吴桐¹,倪凯月²,何新蕾²,焦柯影²,王玉君³,王伟轩^{2,4,5},
赵良君⁶,郝瀚²,张艳淑^{2,4}

1. 华北理工大学临床医学院,河北唐山 063210;2. 华北理工大学公共卫生学院;3. 唐山市传染病医院;
4. 华北理工大学河北省煤矿卫生与安全重点实验室;5. 华北理工大学实验动物中心;6. 华北理工大学基础医学院

摘要:目的 通过建立微塑料和锰联合暴露小鼠模型,探讨铁死亡在微塑料和锰联合暴露致纹状体损伤中的作用。方法 SPF 级雄性 C57 小鼠 40 只随机分为对照组、锰暴露组、微塑料暴露组和联合暴露组;应用转棒实验、旷场实验、糖水偏好实验检测小鼠神经行为变化;应用试剂盒检测小鼠纹状体中二价铁离子、丙二醛(malondialdehyde,MDA)和谷胱甘肽(glutathione,GSH)的含量;应用 Western blotting 法检测小鼠纹状体中铁死亡相关蛋白溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member,SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4,GPX4)、铁泵蛋白(Ferroportin1,FPN1)的蛋白表达;应用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-124 的表达。多组数据比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验。结果 行为学实验结果显示,与对照组比较,锰暴露组、微塑料暴露组小鼠的转棒停留时间(均 $P < 0.001$)、旷场实验中央区域停留时间(均 $P < 0.001$)、总路程(均 $P < 0.001$)、糖水偏好率($P_{\text{锰}} = 0.010$; $P_{\text{微塑料}} < 0.001$)均显著下降;与单独锰暴露组或微塑料暴露组比较,联合暴露组转棒停留时间、旷场实验中央区域停留时间、总路程均显著降低(均 $P < 0.001$);此外,联合暴露组小鼠的糖水偏好率低于锰暴露组($P = 0.001$)。同时,与对照组比较,锰暴露组、微塑料暴露组小鼠纹状体中 Fe^{2+} 含量升高($P_{\text{锰}} = 0.002$; $P_{\text{微塑料}} = 0.001$),GSH 含量降低($P_{\text{锰}} = 0.015$; $P_{\text{微塑料}} < 0.001$),且微塑料暴露组小鼠纹状体中 MDA 含量升高($P < 0.001$);此外,联合暴露组小鼠纹状体中 Fe^{2+} 、MDA 含量高于锰暴露组($P_{\text{Fe}^{2+}} = 0.004$; $P_{\text{MDA}} < 0.001$)和微塑料暴露组($P_{\text{Fe}^{2+}} = 0.008$; $P_{\text{MDA}} = 0.007$),GSH 含量低于锰暴露组($P < 0.001$);锰暴露组($P = 0.010$)、微塑料暴露组($P = 0.001$)小鼠纹状体中 SLC7A11 蛋白表达均低于对照组;微塑料暴露组 GPX4 蛋白表达低于对照组($P = 0.007$),联合暴露组 GPX4 蛋白表达低于锰暴露组($P = 0.006$);此外,锰暴露组($P = 0.005$)、微塑料暴露组($P = 0.002$)小鼠的 FPN1 蛋白表达均低于对照组;联合暴露组 FPN1 蛋白表达显著低于单独锰暴露组($P = 0.002$)和微塑料暴露组($P = 0.005$)。与对照组比较,锰暴露组($P = 0.002$)、微塑料暴露组($P < 0.001$)小鼠纹状体中 miR-124 表达均升高;同时联合暴露组小鼠纹状体中 miR-124 表达高于单独锰暴露组和微塑料暴露组(均 $P < 0.001$)。结论 微塑料和锰联合暴露可能通过 miR-124/FPN1 调控铁死亡促进小鼠纹状体损伤进而引起运动功能障碍和焦虑抑郁样行为。

关键词:微塑料;锰暴露;神经损伤

中图分类号:R-33 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2024)20-3774-08

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202405175

Experimental study of ferroptosis in striatum damage in mice induced by co-exposure of microplastics and manganese

WU Tong*, NI Kai-yue, HE Xin-lei, JIAO Ke-ying, WANG Yu-jun, WANG Wei-xuan,
ZHAO Liang-jun, HAO Han, ZHANG Yan-shu

* School of Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China

Abstract: Objective To investigate the role of ferroptosis in striatum damage induced by combined exposure of microplastics and manganese by establishing a mouse model following microplastics and manganese alone or combined exposure. **Methods** Forty SPF male C57 mice were randomly divided into control group, manganese exposure group, microplastics exposure group and combined exposure group. Neurobehavioral tests including rotarod test, open field test and sucrose preference test were performed. The contents of divalent iron, malondialdehyde and glutathione in striatum of mice were detected by using the kit. Western blotting was used to detect the protein expressions of SLC7A11, GPX4 and FPN1 in striatum of mice. Real-time PCR

基金项目:中央引导地方科技发展资金项目(236Z7728G)

作者简介:吴桐(2003—),女,本科在读,研究方向:临床医学

通信作者:郝瀚,E-mail:haohan@stu.ncust.edu.cn;张艳淑,E-mail:yanshu_zhang@163.com

was performed to detect the expression of miR - 124. Single factor analysis of variance was used for comparison of multiple groups of data, and LSD test was used for further pairwise comparison. **Results** Behavioral tests showed that the residence time of the rotating rod (all $P < 0.001$), the residence time in the central zone of open field test (all $P < 0.001$), total distance of open field test (all $P < 0.001$) and the sucrose preference rate ($P_{\text{manganese}} = 0.010$; $P_{\text{microplastics}} < 0.001$) in manganese exposure group and microplastics exposure group decreased significantly compared with that of the control group. Compared with the manganese exposure group and microplastics exposure group, the residence time of the rotating rod, the residence time in the central zone of the open field test and the total distance of the open field test of combined exposure group decreased significantly (all $P < 0.001$). In addition, the sucrose preference rate of the combined exposure group was lower than that of the manganese exposure group ($P = 0.001$). At the same time, compared with the control group, the contents of Fe^{2+} in striatum of mice in manganese exposure group and microplastics exposure group increased ($P_{\text{manganese}} = 0.002$; $P_{\text{microplastics}} = 0.001$), the contents of GSH decreased ($P_{\text{manganese}} = 0.015$; $P_{\text{microplastics}} < 0.001$). The content of MDA in the striatum of mice in microplastics exposure group increased ($P < 0.001$). Furthermore, the contents of Fe^{2+} and MDA in striatum of mice in combined exposure group were higher than those in manganese exposure group ($P_{\text{Fe}^{2+}} = 0.004$; $P_{\text{MDA}} < 0.001$) and microplastics exposure group ($P_{\text{Fe}^{2+}} = 0.008$; $P_{\text{MDA}} = 0.007$), while the content of GSH was lower than that in the manganese exposure group ($P < 0.001$). The protein expressions of SLC7A11 in manganese exposure group ($P = 0.010$) and microplastics exposure group ($P = 0.001$) were lower than that in the control group. The protein expression of GPX4 in microplastics exposure group was lower than that in the control group ($P = 0.007$), and the protein expression of GPX4 in the combined exposure group was lower than that in the manganese exposure group ($P = 0.006$). The protein expressions of FPN1 in the manganese exposure group ($P = 0.005$) and microplastics exposure group ($P = 0.002$) were lower than that in the control group and the protein expression of FPN1 in the combined exposure group was significantly lower than those in the manganese exposure group ($P = 0.008$) and microplastics exposure group ($P = 0.005$). Compared with the control group, the expressions of miR - 124 in striatum of mice in manganese exposure group ($P = 0.002$) and microplastics exposure group ($P < 0.001$) increased. At the same time, the expression of miR - 124 in the striatum of mice in the combined exposure group was higher than those in the manganese exposure group and microplastics exposure group (all $P < 0.001$). **Conclusion** Combined exposure of microplastics and manganese might lead to striatum damage in mice through the regulation of ferroptosis, and then cause motor dysfunction and anxiety - depression - like behavior.

Keywords: Microplastics; Manganese exposure; Nerve damage

微塑料是指直径小于 5 mm 的塑料颗粒,作为新兴且数量庞大的污染物,可通过饮食、呼吸或皮肤接触等方式进入机体^[1-3],此外,微塑料具有粒径较小,比表面积大的特性,可通过络合反应、静电作用等形式吸附锰、铅、镉等重金属成为环境重金属污染物载体。有研究显示,聚苯乙烯纳米微塑料暴露可引起小鼠黑质致密体和纹状体中的能量代谢紊乱,进而引起不同程度的帕金森样病变^[4]。锰暴露后可透过血脑屏障在黑质、纹状体等部位积累,引起纹状体损伤进而运动功能障碍。纹状体作为重要的皮层下结构,在运动功能、感觉运动整合等方面发挥着重要作用^[5]。纹状体是锰神经毒性的重要作用靶点,有研究表明,锰可以通过血脑屏障进入中枢神经系统,在纹状体积累并诱发锰中毒^[6]。但是有关微塑料和锰联合暴露后的对纹状体损伤机制还未见报道。

目前铁死亡在神经退行性病变中的作用受到广泛关注。铁死亡的发生依赖于细胞中铁蓄积和膜的脂质过氧化,其主要特征包括胞内 Fe^{2+} 蓄积、脂质过氧化水平增加、GPX4 和 GSH 含量降低等^[7-8]。在铁死亡调节途径中 System Xc - 作为定位于细胞外膜的氨基酸转运复合体,将胱氨酸由胞外转移至胞内,使

后者进一步还原为半胱氨酸,用于胞内抗氧化剂 GSH 的合成,起到抗氧化和保护作用。SLC7A11/GSH/GPX4 信号轴是最经典的铁死亡防御系统之一,其中 SLC7A11 是构成 System Xc - 的重要亚基。GPX4 是这条信号通路中的核心调控蛋白,能够直接降解脂质过氧化物,抑制脂质过氧化^[9]。铁死亡的发生与铁稳态密切相关,FPN1 是目前已知的唯一向细胞外运输铁的蛋白质。在人神经母细胞瘤中调控 FPN1 表达可调控细胞铁死亡的进程^[10]。FPN1 的表达可受到 MicroRNA 的调控,有研究表明,miR - 124 可下调脑内 FPN1 的表达,FPN1 过表达和 miR - 124 抑制均可减轻老年脑出血模型小鼠脑内铁积累^[11]。但是有关铁死亡是否参与微塑料和锰联合暴露致纹状体损伤有待于进一步研究。

因此,本研究通过建立微塑料和锰联合暴露小鼠模型,从铁死亡角度探讨微塑料和锰联合暴露对小鼠纹状体的损伤作用,以期微塑料和锰联合暴露致神经损伤研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 YLS-4D 转棒式疲劳仪(济南益延科技发展有限公司)、旷场实验视频分析系统(上海欣软公司)、Bio-rad 电泳系统(美国 Bio-rad 公司)、Synergy HT 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司)、VCX130 超声波破碎仪(美国 Sonics 公司)、Biometra Tone 96G 反转录仪(德国 Biometra 公司)、GBOX Chemi XRQ 显影仪(中国香港基因有限公司)、ABI 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司)。

1.1.2 试剂 纳米聚苯乙烯微塑料(平均粒径为 $0.2 \mu\text{m}$, 密度为 1.05 g/cm^3 , 固含量为 25 mg/ml , 折射率:1.6, 变异系数为 $3\% \sim 5\%$, 每克微球粒子数: $22\,748 \times 10^{10}$, 每毫升微球粒子数: $56\,870 \times 10^8$, 天津大鹅科技有限公司); 无水氯化锰(北京索莱宝生物科技有限公司); Fe^{2+} 检测试剂盒(日本同仁化学研究所); GSH 测定试剂盒, MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); BCA 试剂盒(碧云天生物技术有限公司); 蛋白裂解液, 上样缓冲液, 脱脂奶粉(北京索莱宝科技有限公司); ECL 发光试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司); GPX4 一抗、SLC7A11 一抗、FPN1 一抗、 β -actin, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 Affinity 公司); Trizol RNA 提取试剂(美国 MRC 公司); 实时荧光 PCR 试剂盒, DNA 第一链合成试剂盒(瑞士 Roche 公司)。

1.2 动物分组及处理 40 只 C57 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司[动物合格证号: SCXK(京)2019-0008], 饲养于华北理工大学 SPF 级屏障实验室[合格证号: SYXK(冀)2021-007], 实验动物伦理审批号为 No. LAEC-NCST-2020082。小鼠适应性饲养一周后, 根据小鼠体重随机分为对照组、锰暴露组、微塑料暴露组和联合暴露组, 每组 10 只。聚苯乙烯微塑料溶液由超纯水配制, 超声震荡后进行灌胃。微塑料组小鼠每天灌胃 50 mg/kg 聚苯乙烯微塑料溶液, 锰暴露组小鼠每天灌胃 10 mg/kg 氯化锰溶液, 联合暴露组小鼠灌胃 50 mg/kg 微塑料和 10 mg/kg 氯化锰, 对照组灌胃相同剂量的生理盐水, 连续染毒 8 周。

1.3 小鼠神经行为检测

1.3.1 转棒试验 实验前 3 天用转棒式疲劳仪对小鼠进行适应性训练, 第 4 天进行正式的耐疲劳能力检测, 设置好转棒式疲劳仪的初始转速、加速时间、运行时间。以小鼠在转棒上随着转棒旋转做协调运动而停留的时间作为评价其运动协调性的依据。

1.3.2 旷场试验 实验所用箱体为长宽高均为 50 cm 的无盖立方箱体, 箱体底部均分为 16 个方格, 中间 4 个方格定义为中央区域, 将小鼠从箱体的边缘放入实验箱体中, 观察小鼠在 5 min 内的运动情况。记

录每只小鼠中央区域的停留时间, 总路程, 站立次数和排便次数。

1.3.3 糖水偏好试验 实验前在鼠笼一侧放置 1% 的蔗糖水, 另一侧放置纯水, 24 h 后交换位置。正式实验开始前, 小鼠禁食禁水 24 h 。正式实验开始时, 每个鼠笼中均一侧放置 1% 的蔗糖水, 另一侧放置纯水, 每 12 h 更换水瓶位置, 记录糖水及纯水消耗量。

1.4 纹状体中 Fe^{2+} 、谷胱甘肽和丙二醛含量检测 称取纹状体组织 0.1 g , 剪碎、超声, 离心(离心半径为 4 cm , $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min)取上清, 应用 BCA 进行蛋白定量。取适量上清液严格按照试剂盒说明书进行实验, 测量每只小鼠纹状体中 Fe^{2+} 、GSH 和 MDA 含量。

1.5 Western blotting 法检测蛋白表达 每组各取 3 只小鼠纹状体组织, 用细胞裂解液充分裂解, BCA 法测定蛋白浓度, 煮沸变性 5 min 。选用 10% 的 SDS-PAGE 电泳(电压 80 V 电泳 20 min 后调至电压 110 V 电泳 1 h)分离蛋白, 转膜(电压 100 V 转膜 1 h)后用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h , 加入一抗 SLC7A11 ($1:1\,000$)、GPX4 ($1:1\,000$)、FPN1 ($1:1\,000$), 室温摇床 30 min 后 4°C 孵育过夜。次日室温摇床孵育 1 h 后使用 TBST 清洗蛋白条带 3 次, 每次 10 min ; 加入二抗(稀释比为 $1:5\,000$), 室温摇床孵育 2 h , TBST 洗涤后显影。

1.6 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-124 的表达 Trizol 法提取样本总 RNA, 按照 cDNA 第一链合成试剂盒按照说明书步骤将其逆转录为 cDNA, 使用特定引物对 cDNA 进行 PCR 扩增。扩增反应条件为: 95°C 预热 60 s , 然后按 95°C 、 10 s , 60°C 、 15 s , 72°C 进行 50 个 10 s 的循环, 72°C 延伸 10 min 。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 miR-124 的相对表达水平。各引物序列见表 1, 内参为 β -actin。

表 1 Real-time PCR 所用引物序列

Table 1 Primer sequences for Real-time PCR

名称	序列(5' - 3')
β -actin	
上游引物(F)	TGAGCTGCGTTTTACACCCT
下游引物(R)	TGTTTGCTCCAACCAACTGC
microRNA-124	
上游引物(F)	GGCATTACCCGCTGCCTTAATTGT
下游引物(R)	GGCAATGACCCCGTCCCTTAATTCT

1.7 统计分析 结果数据使用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 定量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 采用单因素方差分析的方法进行组间比较, 组间两两比较采用 LSD 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 微塑料和锰联合暴露对小鼠体重的影响 实验期间,各组小鼠毛色正常、精神状态良好、均无死亡发生,各组小鼠体重变化趋势均随时间增加而平稳上升,且不同组别的小鼠体重未见差异,结果见图 1。

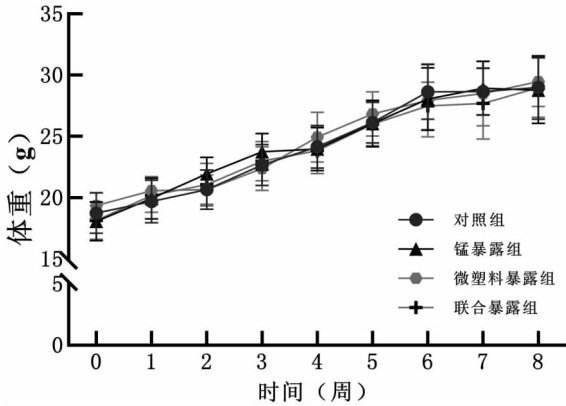


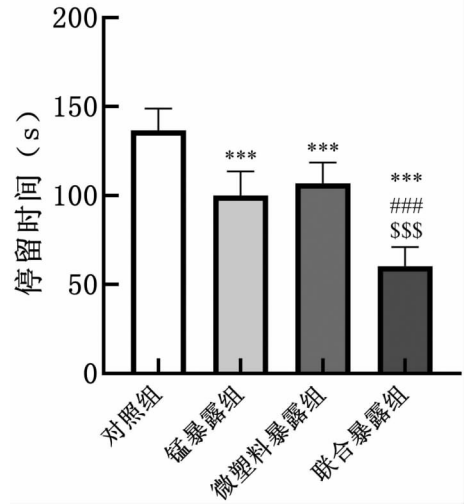
图 1 染毒期间各组小鼠体重变化情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Changes in body weight of mice in each group during toxicant exposure

2.2 微塑料和锰联合暴露对小鼠神经行为的影响

2.2.1 微塑料和锰联合暴露对小鼠运动能力的影响

4 组小鼠转棒实验停留时间两两比较,结果如图 2 所示。相比于对照组,锰暴露组、微塑料暴露组停留时间显著下降(均 $P < 0.001$);与单独锰暴露和微塑料暴露相比,联合暴露组停留时间显著降低(均 $P < 0.001$)。



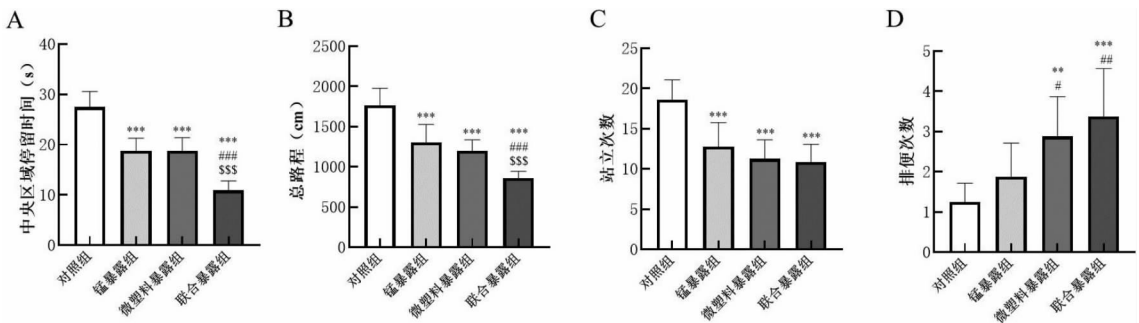
注: * * *:与对照组比较, $P < 0.001$; ###:与锰暴露组比较, $P < 0.001$; \$\$\$:与微塑料暴露组比较, $P < 0.001$ 。

图 2 实验小鼠转棒测试变化情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Changes of rotating rod test of experimental mice

2.2.2 微塑料和锰联合暴露对小鼠探究能力的影响

4 组小鼠中央区域停留时间、总路程、站立次数、排便次数分别比较,两两比较结果如图 3 所示。与对照组比较,锰暴露组、微塑料暴露组中央区域停留时间(均 $P < 0.001$)和 5 min 内运动总路程(均 $P < 0.001$)均显著下降,联合暴露组中央区域停留时间(均 $P < 0.001$)和 5 min 内运动总路程(均 $P < 0.001$)显著低于锰暴露组和微塑料暴露组;锰暴露组、微塑料暴露组、联合暴露组小鼠的站立次数均显著低于对照组(均 $P < 0.001$);联合暴露组排便次数高于对照组($P < 0.001$)和锰暴露组($P = 0.003$)。



注:(A)中央区域停留时间;(B)总路程;(C)站立次数;(D)排便次数。* *:与对照组比较, $P < 0.01$; * * *:与对照组比较, $P < 0.001$; #:与锰暴露组比较, $P < 0.05$; ###:与锰暴露组比较, $P < 0.01$; ####:与锰暴露组比较, $P < 0.001$; \$\$\$:与微塑料暴露组比较, $P < 0.001$ 。

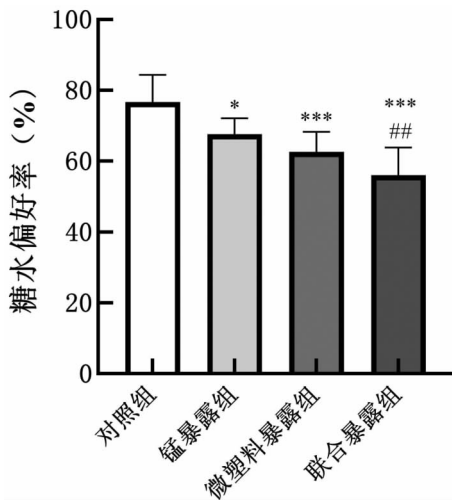
图 3 实验小鼠探究行为能力变化情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Changes of ability of exploratory behavior of experimental mice

2.2.3 微塑料和锰联合暴露对小鼠糖水偏好的影响

4 组小鼠糖水偏好率两两比较,结果如图 4 所示。与对照组比较,锰暴露组($P = 0.010$)、微塑料暴露组

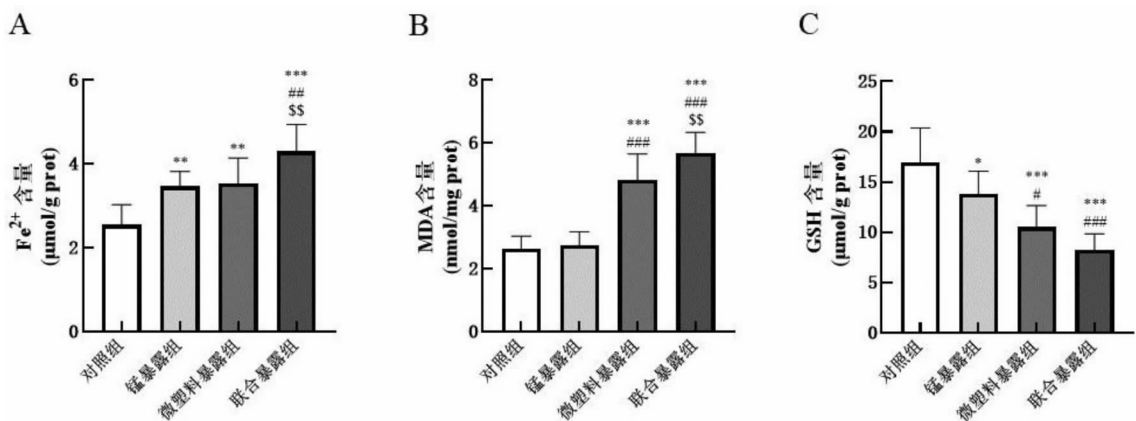
($P < 0.001$)和联合暴露组($P < 0.001$)糖水偏好率显著下降,联合暴露组低于锰暴露组($P = 0.001$)。



注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; ** *: 与对照组比较, $P < 0.001$; ##: 与锰暴露组比较, $P < 0.01$ 。

图 4 实验小鼠糖水偏好率变化情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Changes of sucrose preference rate of experimental mice



注:(A)小鼠纹状体 Fe²⁺ 含量;(B)小鼠纹状体 MDA 含量;(C)小鼠纹状体 GSH 含量。*: 与对照组比较, $P < 0.05$; **: 与对照组比较, $P < 0.01$; ***: 与对照组比较, $P < 0.001$; #: 与锰暴露组比较, $P < 0.05$; ##: 与锰暴露组比较, $P < 0.01$; ###: 与锰暴露组比较, $P < 0.001$; \$\$\$: 与微塑料暴露组比较, $P < 0.01$ 。

图 5 实验小鼠纹状体 Fe²⁺、MDA、GSH 含量的变化情况($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Changes of contents of Fe²⁺, MDA and GSH in striatum of experimental mice

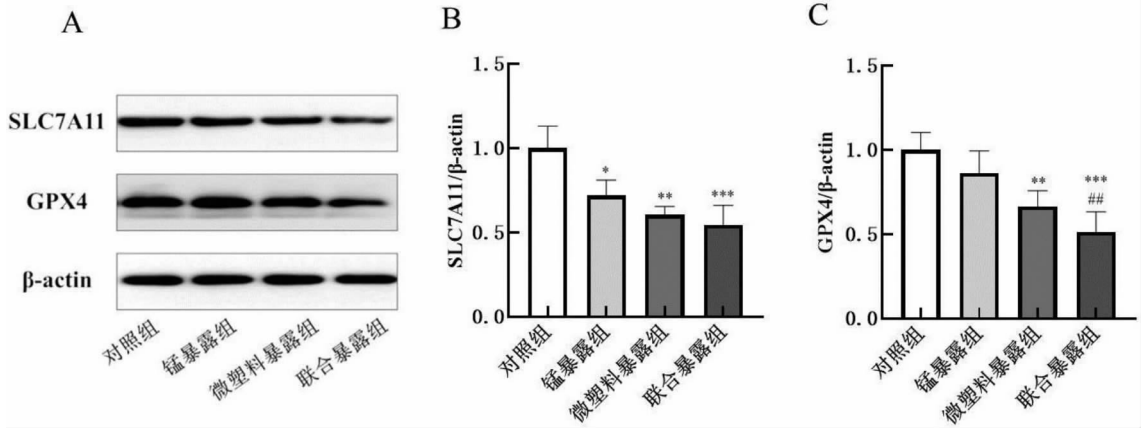
2.4 微塑料和锰联合暴露对小鼠纹状体中 SLC7A11、GPX4 蛋白表达的影响 4 组小鼠纹状体中 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平分别比较,两两比较结果如图 6 所示。锰暴露组 ($P = 0.010$)、微塑料暴露组 ($P = 0.001$) 小鼠纹状体 SLC7A11 蛋白表达均低于对照组;微塑料暴露组 GPX4 蛋白表达低于对照组 ($P = 0.007$),而联合暴露组 GPX4 蛋白表达还低于锰暴露组 ($P = 0.006$),微塑料和锰联合暴露后小鼠纹状体 GPX4 蛋白表达量为单独锰暴露组的 59.4%。

2.5 微塑料和锰联合暴露对小鼠纹状体中 FPN1 蛋白表达的影响 实验组小鼠纹状体 FPN1 蛋白表达水平两两比较,结果如图 7 所示。FPN1 蛋白表达在

2.3 微塑料和锰联合暴露对小鼠纹状体中 Fe²⁺、MDA、GSH 含量的影响 实验小鼠纹状体内 Fe²⁺、MDA、GSH 状况如图 5 所示。与对照组比较,锰暴露组 Fe²⁺ 含量显著升高 ($P = 0.002$),微塑料暴露组 Fe²⁺ 含量 ($P = 0.001$)、MDA 含量 ($P < 0.001$) 显著升高,锰暴露组 ($P = 0.015$) 和微塑料暴露组 ($P < 0.001$) GSH 含量明显降低;与单独锰暴露组和微塑料暴露组比较,联合暴露组小鼠纹状体中 Fe²⁺、MDA 含量高于锰暴露组 ($P_{Fe^{2+}} = 0.004$; $P_{MDA} < 0.001$) 和微塑料暴露组 ($P_{Fe^{2+}} = 0.008$; $P_{MDA} = 0.007$), Fe²⁺ 含量分别是锰暴露组和微塑料暴露组的 1.240 和 1.218 倍,MDA 含量分别是锰暴露组和微塑料暴露组的 2.062 和 1.182 倍,与单独锰暴露组比较,联合暴露组 GSH 含量显著降低 ($P < 0.001$),降低至单独锰暴露组小鼠纹状体 GSH 含量的 59.8%。

锰暴露组 ($P = 0.005$)、微塑料暴露组 ($P = 0.002$) 和联合暴露组 ($P < 0.001$) 均低于对照组,以联合暴露组尤为显著,是对照组的 34.0%;此外,联合暴露组 FPN1 蛋白表达低于单独锰暴露组 ($P = 0.002$) 和微塑料暴露组 ($P = 0.005$),联合暴露组 FPN1 蛋白表达量分别为单独锰暴露和单独微塑料暴露的 48.6% 和 53.4%。

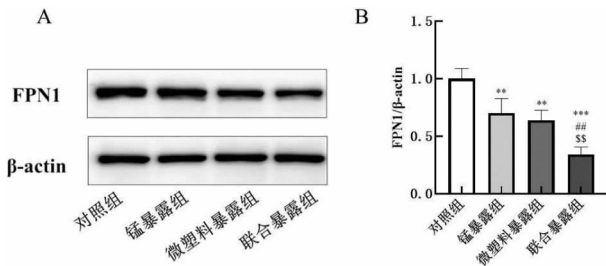
2.6 微塑料和锰联合暴露对小鼠纹状体中 miR-124 表达的影响 图 8 结果显示,与对照组比较,锰暴露组 ($P = 0.002$)、微塑料暴露组 ($P < 0.001$) 小鼠纹状体中 miR-124 表达均升高;同时联合暴露组小鼠纹状体中 miR-124 表达量分别为单独锰暴露组和微



注:(A)SLC7A11、GPX4 和 β -actin 的蛋白条带;(B)SLC7A11 的蛋白相对表达;(C)GPX4 的蛋白相对表达。*:与对照组比较, $P < 0.05$; **:与对照组比较, $P < 0.01$; ***:与对照组比较, $P < 0.001$;##:与锰暴露组比较, $P < 0.01$ 。

图 6 实验小鼠纹状体 SLC7A11、GPX4 蛋白的表达情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

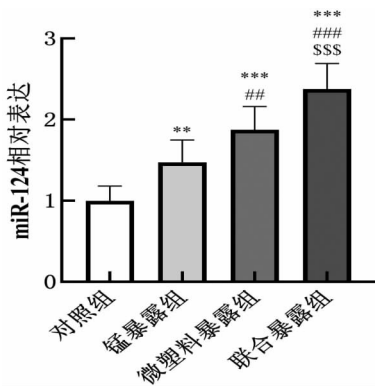
Fig. 6 Protein expressions of SLC7A11 and GPX4 in striatum of experimental mice



注:(A)FPN1 的蛋白条带;(B)FPN1 的蛋白相对表达; **:与对照组比较, $P < 0.01$; ***:与对照组比较, $P < 0.001$;##:与锰暴露组比较, $P < 0.01$; \$\$\$:与微塑料暴露组比较, $P < 0.01$ 。

图 7 实验小鼠纹状体 FPN1 蛋白的表达情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Protein expressions of FPN1 in striatum of experimental mice



注: **:与对照组比较, $P < 0.01$; ***:与对照组比较, $P < 0.001$;##:与锰暴露组比较, $P < 0.01$;###:与锰暴露组比较, $P < 0.001$; \$\$\$:与微塑料暴露组比较, $P < 0.001$ 。

图 8 实验小鼠纹状体 miR-124 的表达情况($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 8 Expressions of miR-124 in striatum of experimental mice

塑料暴露组的 1.612 和 1.268 倍,显著高于单独锰暴露组($P < 0.001$)和微塑料暴露组($P < 0.001$);此外

微塑料暴露组还要高于锰暴露组($P = 0.006$)。

3 讨论

微塑料在自然环境中广泛分布,如海洋、淡水、土壤、空气等,且可作为载体加速重金属在体内的积累,从而破坏正常的生物功能^[12-14]。本研究建立了微塑料和锰联合暴露小鼠模型,结果显示,锰暴露组、微塑料暴露组中央区域停留时间、总路程和站立次数、转棒停留时间、糖水偏好率均比对照组降低;与单独锰暴露组和微塑料暴露组比较,联合暴露组的中央区域停留时间、总路程、转棒停留时间均下降更为显著;此外,联合暴露组的糖水偏好率也低于锰暴露组;提示微塑料和锰联合暴露可加剧小鼠运动功能受损并伴随焦虑抑郁样行为。纹状体是基底神经节的主要组成部分,其在协调机体运动功能和调控焦虑抑郁样行为中发挥重要作用^[15]。本研究结果表明,联合暴露组小鼠海马中 Fe^{2+} 含量、MDA 含量显著高于单独暴露组,GPX4 含量显著低于锰暴露组;结果提示微塑料和锰联合暴露加重小鼠纹状体的铁死亡。本研究结果与微塑料和铁联合暴露会扰乱老年小鼠脑组织铁稳态,诱导海马和皮质的铁死亡来加重认知障碍的研究结果相似^[16]。总之,纹状体铁死亡在微塑料和锰暴露致小鼠运动功能障碍起着重要作用。

机体铁稳态与铁死亡密切相关,包括铁的吸收、转运、储存、利用和铁循环等过程。其中,FPN1 蛋白可以将细胞内过量的 Fe^{2+} 转运至细胞外而维持细胞内的铁稳态,从而对铁死亡过程起到了负向调控作用。阿尔茨海默症病模型 Tg2576 小鼠疾病发展过程的早期可见皮质和海马神经元中 FPN1 的缺失,铁蓄积在小鼠脑中的皮质斑块和神经原纤维缠结,参与氧

化应激反应并导致神经元氧化损伤^[17],且铁死亡抑制剂 liproxtatin1 (Lip - 1) 或 ferrostatin1 (Fer - 1) 和恢复 APP/PS1 双转基因小鼠模型脑组织的 FPN1 活性能有效改善小鼠神经元细胞铁死亡和记忆障碍^[18]。此外,有研究显示,帕金森患者脑组织中 FPN1 的表达也显著下调,与异常增强的铁浓度直接相关^[19]。这些发现提示 FPN1 可能是调控铁死亡的关键分子靶点。本研究中微塑料和锰联合暴露后小鼠纹状体中二价铁离子含量增加。本研究结果显示,与单独锰或微塑料暴露组比较,微塑料和锰联合暴露后小鼠纹状体中 FPN1 蛋白表达下调,提示微塑料和锰联合暴露可通过影响 FPN1 的表达参与二者联合暴露致纹状体神经细胞铁死亡。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类非编码调控单链小分子 RNA,可与靶基因 mRNA 的 3'UTR 序列结合,从而调控靶基因的表达,进而影响相关蛋白的表达情况。miRNAs 通过靶向调控 HMOX1、SENPI、EGR1、GSTZ1 等铁死亡的关键基因来调节铁死亡易感性^[20]。研究表明 miR - 124 在突触的形成、神经信号的传递以及神经元的生长发育过程中扮演着关键角色^[21],且 miR - 124 可直接与 FPN1 的 3' - UTR 结合来抑制其表达。研究显示在老年脑出血模型小鼠的神经细胞铁死亡中 miR - 124/FPN1 信号通路起重要作用^[11]。本研究结果显示,微塑料和锰联合暴露后 miR - 124 表达升高,提示微塑料和锰联合暴露可能通过 miR - 124 调控 FPN1 的表达参与二者联合暴露致纹状体神经细胞铁死亡。

综上,微塑料和锰联合暴露可加剧小鼠纹状体损伤进而引起运动功能障碍和焦虑抑郁样行为。本研究结果将进一步丰富微塑料和重金属联合暴露致神经损伤的机制,同时也为微塑料和重金属联合暴露致神经损伤的防治提供新的线索。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Town RM, Van LH, Duval J. Effect of polymer aging on uptake/release kinetics of metal Ions and organic molecules by micro - and nanoplastics: implications for the bioavailability of the associated compounds[J]. Environmental Science & Technology, 2023, 57(43): 16552 - 16563.
- [2] Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, et al. Lost at sea: where is all the plastic? [J]. Science, 2004, 304(5672): 838.
- [3] Xue Y, Cheng X, Ma ZQ, et al. Polystyrene nanoplastics induce apoptosis, autophagy, and steroidogenesis disruption in granulosa cells to reduce oocyte quality and fertility by inhibiting the PI3K/AKT pathway in female mice[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 460.
- [4] Huang YJ, Liang BX, Li ZM, et al. Polystyrene nanoplastic exposure induces excessive mitophagy by activating AMPK/ULK1 pathway in differentiated SH - SY5Y cells and dopaminergic neurons in vivo[J]. Particle and Fibre Toxicology, 2023, 20(1): 44.
- [5] Obeso JA, Rodríguez - Oroz MC, Benitez - Temino B, et al. Functional organization of the basal ganglia; therapeutic implications for Parkinson's disease[J]. Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society, 2008, 23 Suppl 3: S548 - S559.
- [6] Elder A, Gelein R, Silva V, et al. Translocation of inhaled ultrafine Manganese oxide particles to the central nervous system [J]. Environmental Health Perspectives, 2006, 114(8): 1172 - 1178.
- [7] Avcı B, Günaydın C, Güvenç T, et al. Idebenone ameliorates Rotenone - Induced parkinson's disease in rats through decreasing lipid peroxidation [J]. Neurochemical Research, 2021, 46(3): 513 - 522.
- [8] Yang WS, Sriramaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. Cell, 2014, 156(1/2): 317 - 331.
- [9] Dang Q, Sun ZQ, Wang Y, et al. Ferroptosis: a double - edged sword mediating immune tolerance of cancer [J]. Cell Death & Disease, 2022, 13(11): 925.
- [10] Geng N, Shi BJ, Li SL, et al. Knockdown of ferroportin accelerates erastin - induced ferroptosis in neuroblastoma cells [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(12): 3826 - 3836.
- [11] Bao WD, Zhou XT, Zhou LT, et al. Targeting miR - 124/ferroportin signaling ameliorated neuronal cell death through inhibiting apoptosis and ferroptosis in aged intracerebral hemorrhage murine model [J]. Aging Cell, 2020, 19(11): e13235.
- [12] Chen Q, Zhao H, Liu Y, et al. Factors affecting the adsorption of heavy metals by microplastics and their toxic effects on fish [J]. Toxics, 2023, 11(6): 490.
- [13] Xie Y, Irshad S, Jiang YQ, et al. Microplastic - mediated environmental behavior of metal contaminants: mechanism and implication [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2024, 31(31): 43524 - 43539.
- [14] Deng YF, Chen HX, Huang YC, et al. Long - Term exposure to environmentally relevant doses of large polystyrene microplastics disturbs lipid homeostasis via bowel function interference [J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(22): 15805 - 15817.
- [15] Ma YY. Striatal morphological and functional alterations induced by prenatal alcohol exposure [J]. Pharmacological Research, 2019, 142: 262 - 266.
- [16] Liu X, Yang HK, Yan XZ, et al. Co - exposure of polystyrene microplastics and Iron aggravates cognitive decline in aging mice via ferroptosis induction [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 233: 113342.
- [17] Raha AA, Vaishnav RA, Friedland RP, et al. The systemic iron - regulatory proteins hepcidin and ferroportin are reduced in the brain in Alzheimer's disease [J]. Acta Neuropathologica Communications, 2013, 1: 55.

- [10] Zhi MM, Zhu XY, Lugea A, et al. Incidence of new onset diabetes mellitus secondary to acute pancreatitis: a systematic review and Meta-Analysis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 637.
- [11] Petrov MS. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: post-pancreatitis diabetes mellitus; prime time for secondary disease [J]. *European Journal of Endocrinology*, 2021, 184(4): R137 - R149.
- [12] Lv YQ, Zhang J, Yang T, et al. Non-Alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an Independent risk factor for developing New-Onset diabetes after acute pancreatitis: a multicenter retrospective cohort study in Chinese population[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13: 903731.
- [13] Ma JH, Yuan YJ, Lin SH, et al. Nomogram for predicting diabetes mellitus after the first attack of acute pancreatitis[J]. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 31(3): 323 - 328.
- [14] García-Compeán D, Jiménez-Rodríguez AR, Muñoz-Ayala JM, et al. Post-acute pancreatitis diabetes: A complication waiting for more recognition and understanding[J]. *World Journal of Gastroenterology*; *WJG*, 2023, 29(28): 4405-4415.
- [15] 袁琳,李学良.急性胰腺炎与新发糖尿病的关系[J].*胃肠病学*, 2015,(8):500-502.
Yuan L, Li XL. Relationship between Acute Pancreatitis and New-onset Diabetes[J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*, 2015, (8): 500-502. (In Chinese)
- [16] Ning CH, Ouyang H, Shen DC, et al. Prediction of survival in patients with infected pancreatic necrosis: a prospective cohort study[J]. *International Journal of Surgery*, 2024, 110(2): 777 - 787.
- [17] 李赞,刘喜洋,贺卓佳,等.1999—2019年中国糖尿病疾病负担的调查研究[J].*解放军医学杂志*,2024,49(7):776-782.
Li Z, Liu XY, He ZJ, et al. A survey study on the disease burden of diabetes inChina from 1999 to 2019 [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2024, 49(7): 776 - 782. (In Chinese)
- [18] 赖锦佳,黄咏琪,马超群,等.我国中老年慢性病共病人群抑郁症状发展轨迹及影响因素研究[J].*现代预防医学*,2023,50(19):3589-3593,3648.
Lai JJ, Huang YQ, Ma CQ, et al. Study on the development trajectory and influencing factors of depressive symptoms in middle-aged and elderly chronic patients inChina [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2023, 50(19): 3589 - 3593, 3648. (In Chinese)
- [19] 王思晗,翟先国,黄诗睿.城乡健康老龄化差异及影响因素探究[J].*现代预防医学*,2022,49(21):3951-3956.
Wang SH, Qu XG, Huang SR. Study on the difference between urban and rural healthy aging and its influencing factors [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2022, 49(21): 3951 - 3956. (In Chinese)
- [20] 《中国老年型糖尿病防治临床指南》编写组.中国老年2型糖尿病防治临床指南(2022年版)[J].*中国糖尿病杂志*,2022,30(1):2-51.
Writing Group of the "Clinical Guidelines for the Prevention and Treatment of Elderly Type 2 Diabetes inChina". Clinical guidelines for the prevention and treatment of elderly type 2 diabetes in China (2022 Edition)[J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2022, 30(1): 2 - 51. (In Chinese)
- [21] 李冰清,张琪,毛涛,等.慢性胰腺炎后新发糖尿病的患病率及危险因素的荟萃分析[J].*中华胰腺病杂志*,2023,23(5):335-341.
Li BQ, Zhang Q, Mao T, et al. Meta-analysis of the prevalence and risk factors of new diabetes after chronic pancreatitis [J]. *Chinese Journal of Pancreatology*, 2023, 23(5): 335 - 341. (In Chinese)
- [22] Ureña-Bogartín EL, Martínez-Ramírez HR, Torres-Sánchez JR, et al. Prevalence of pre-diabetes in young Mexican adults in primary health care[J]. *Family Practice*, 2015, 32(2): 159 - 164.
- [23] Zhong VW, Yu DM, Zhao LY, et al. Achievement of guideline-recommended targets in diabetes care inChina: a nationwide cross-sectional study [J]. *Annals of Internal Medicine*, 2023, 176(8): 1037 - 1046.
- [24] Luo YX, Liu ZR, Luo JW, et al. BMI trajectories in late middle age, genetic risk, and incident diabetes in older adults: evidence from a 26-Year longitudinal study [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2024, 193(5): 685 - 694.

收稿日期:2024-06-25

(上接第 3780 页)

- [18] Bao WD, Pang P, Zhou XT, et al. Loss of ferroportin induces memory impairment by promoting ferroptosis in Alzheimer's disease [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2021, 28(5): 1548 - 1562.
- [19] Raha AA, Biswas A, Henderson J, et al. Interplay of ferritin accumulation and ferroportin loss in ageing brain: implication for protein aggregation in down syndrome dementia, alzheimer's, and parkinson's diseases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1060.
- [20] Jin SK, Liu PS, Zheng DH, et al. The interplay of miRNAs and ferroptosis in diseases related to Iron overload [J]. *Apoptosis*, 2024, 29(1/2): 45 - 65.
- [21] Lu YL, Liu YJ, McCoy MJ, et al. MiR-124 synergism with ELAVL3 enhances target gene expression to promote neuronal maturity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(22): e2015454118.

收稿日期:2024-05-12