· 实验研究 ·

线粒体自噬在铝暴露大鼠认知障碍中的作用

张晓宇[1]，刘衍[2]，胥超群[2]，袁峡[2]，谭凯文[2]，周珈铖[2]，王彬鸿[2]，陈薪茹[2]，姜斌[2]，陈欢[2]，林立[1,2]，张璟[1,2]，李欢[2]

1. 山东第一医科大学（山东省医学科学院）公共卫生与健康管理学院，济南 250117；
2. 济宁医学院公共卫生学院，济宁 272000
通信作者：张璟，E-mall：zhangj1976@163.com；李欢，E-mall：lixiuhuan557@163.com

【摘　要】目的 观察亚慢性铝暴露对大鼠海马线粒体自噬 PTEN 诱导激酶（PINK1）/E3 泛素连接酶（Parkin）途径微管相关蛋白 1 轻链 3B（LC3B）、选择性自噬接头蛋白 62（P62）和细胞色素 c 氧化酶 IV（COXIV）表达的影响，探讨铝暴露是否通过线粒体自噬 PINK1/Parkin 途径 LC3B/P62/COXIV 通路影响认知障碍的具体机制。**方法** 选取 32 只 6 周龄 SPF 级的健康雄性 SD 大鼠，体重（190±20）g，按照体重随机分为 4 组：对照、低剂量（10 μmol/kg）、中剂量（20 μmol/kg）和高剂量组（40 μmol/kg），每组 8 只。动物染毒模型采用麦芽酚铝腹腔注射 90 d。染毒完毕后，通过 Morris 水迷宫行为学实验测定大鼠学习记忆能力，通过冰冻切片测定大鼠大脑皮层活性氧（ROS）表达水平，通过免疫印迹法（WB）检测大鼠海马组织中 PINK1、Parkin、LC3B、P62、COXIV 蛋白的表达。**结果** Morris 水迷宫定位巡航实验的第 3、4、5 天，各组大鼠逃避潜伏期随着染毒剂量的增加逐渐延长（P<0.05），第 6 天，高剂量组较对照组和低中剂量组穿越平台及平台象限的次数均有所减少（P<0.05）。各组随着染毒剂量的升高，大鼠大脑皮层 ROS 水平逐渐增加（P<0.05），谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）含量逐渐减少（P<0.05）。各组大鼠大脑海马组织中 PINK1、Parkin、LC3B 的相对表达水平随着染毒剂量的增加逐渐上升（P<0.05），P62、COXIV 的相对表达水平随着染毒剂量的增加逐渐下降（P<0.05）。**结论** 亚慢性铝暴露可以损伤大鼠的学习记忆功能，并激活 PINK1/Parkin 途径 LC3B/P62/COXIV 通路，诱导线粒体自噬。

【关键词】 铝；线粒体自噬；PTEN 诱导激酶 1；认知障碍

The role of mitophagy in cognitive impairment in aluminum-exposed rats

ZHANG Xiaoyu[1], LIU Yan[2], XU Chaoqun[2], YUAN Xia[2], TAN Kaiwen[2], ZHOU Jiacheng[2], WANG Binhong[2], CHEN Xinru[2], JIANG Bin[2], CHEN Huan[2], LIN Li[1,2], ZHANG Jing[1,2], LI Huan[2]
(*1. School of Public Health*, *Shandong First Medical University and Shandong Academy of Medical Sciences*, *Jinan* 250117, *China*; *2. School of Public Health*, *Jining Medical University*, *Jining* 272000, *China*)
Corresponding authors: ZHANG Jing, E-mail: zhangj1976@163.com; LI Huan, E-mail: lixiuhuan557@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of subchronic aluminum exposure on the expression of PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/E3 ubiquitin ligase (Parkin) pathway microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), selective autophagy receptor protein 62 (P62), and cytochrome c oxidase IV (COXIV) in rat hippocampal mitochondria, and to explore the specific mechanism by which aluminum exposure affects cognitive impairment through the mitophagy PINK1/Parkin pathway LC3B/P62/COXIV pathway. **Methods** Thirty-two 6-week-old healthy male Sprague-Dawley (SD) rats of SPF grade, weighing (190±20) g, were randomly divided into four groups according to their body weight: control, low-dose (10 μmol/kg), medium-dose (20 μmol/kg), and high-dose (40 μmol/kg) groups, with 8 rats in each group. The animal intoxication model was established by intraperitoneal injection of aluminum maltolate for 90 days. After the exposure, the learning and memory abilities of the rats were measured by the Morris water maze behavioral test, the expression level of reactive oxygen species (ROS) in the cerebral cortex was measured by frozen sections, and the expression of PINK1, Parkin, LC3B, P62, and COXIV proteins in the hippocampal tissue was detected by Western blotting (WB). **Results** On days 3, 4, and 5 of the Morris water maze place navigation test, the escape latency of rats in each group gradually increased with the increase of the exposure dose (P<0.05). On day 6, the number of times the rats in the high-dose group crossed the platform and the platform quadrant decreased compared with the control group and the low- and medium-dose groups (P<0.05). With the increase of the exposure dose in each group, the ROS level in the cerebral cortex of rats gradually increased (P<0.05), and the content of glutathione peroxidase (GSH-Px) gradually decreased (P<0.05). The relative expression levels of PINK1, Parkin, and LC3B in the hippocampal tissue of rats in each group gradually increased with the increase of the exposure dose (P<0.05), while the relative expression levels of P62 and COXIV gradually decreased with the increase of the exposure dose (P<0.05). **Conclusions** Subchronic aluminum exposure can impair learning and memory function in rats, activate the PINK1/Parkin pathway LC3B/P62/COXIV

开放获取：CC BY-NC-ND 4.0 DOI：10.11847/zgggws1143914
基金项目：山东省自然科学基金青年项目（ZR2022QH114）；贺林院士新医学临床转化工作站科研基金立项项目（JYHL2022MS06）；济宁医学院博士科研启动基金项目（600941001）
第一作者：张晓宇（1998—），硕士，研究方向：劳动卫生与环境卫生学。
收稿日期：2024-08-21　修回日期：2024-09-17　录用日期：2025-02-21
利益冲突：不存在　伦理审查：已获取　出版授权：全体作者已与编辑部签署作者贡献声明及版权转让协议

pathway, and induce mitophagy.
【**Keywords**】 aluminum; mitophagy; *PTEN*-induced putative kinase 1; cognitive impairment

铝（aluminum，Al）是地壳中含量最高的金属，主要蓄积在人类神经系统，长期积累会造成认知功能障碍，表现为明显的学习记忆受损，与多种神经退行性疾病有很大的关系[1]。线粒体自噬在生理上负责线粒体质量控制和线粒体活性氧（reactive oxygen species, ROS）平衡，在受损时去除线粒体，其中 PINK1/Parkin 途径是较常见的经典机制[2–3]。但线粒体自噬与铝致认知功能障碍的关系并不十分清晰，本研究通过建立亚慢性麦芽酚铝暴露大鼠模型，观察麦芽酚铝暴露对大鼠线粒体自噬 PINK1/Parkin 途径 LC3B，P62，COXIV 表达的影响，探讨铝暴露是否通过线粒体自噬 PINK1/Parkin 途径 LC3B/P62/COXIV 通路影响认知障碍的具体机制。

1 材料与方法

1.1 *主要试剂与仪器*　三氯化铝（分子式：$AlCl_3 \cdot 6H_2O$，结晶型）（天津市风船化学试剂科技有限公司）；麦芽酚（分析纯，纯度 99.0%，美国 Sigma-Aldrich 公司）；Morris 水迷宫及视频轨迹跟踪分析系统（江苏赛昂斯生物科技有限公司）；高速冷冻离心机（赛默飞世尔科技（中国）有限公司）；脱色摇床、电泳仪（北京市六一仪器厂）；大鼠（Rat）谷胱甘肽过氧化酶（Glutathione peroxidase，GSH-Px）ELISA 检测试剂盒（上海酶联生物科技有限公司）；BCA 蛋白定量试剂盒（BCA Protein Assay Kit）、高灵敏度化学发光检测试剂盒（eECL Western Blot Kit）（北京康为世纪生物科技有限公司）；兔抗 Anti-GAPDH 抗体 [EPR16891]、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 Goat Anti-Mouse IgG H&L（HRP）[ab205719] 和山羊抗兔 Goat Anti-Rabbit IgG H&L（HRP）[ab205718]；鼠抗 PINK1 抗体 [N14/15]（ab186303）；鼠抗 Parkin 抗体 [PRK8]（ab77924）；兔抗 LC3B 抗体 [EPR18709]；兔抗 P62 抗体 [EPR4844]；兔抗 COXIV 抗体 [EPR9442（ABC）]（均为英国 Abcam 公司）。

1.2 *动物分组与处理*　32 只 6 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠（购置于济南朋悦实验动物繁育有限公司，动物生产许可证号：SCXK（鲁）20220006，动物质量合格证号：No.37072623110292474，动物实验单位：济宁医学院，实验单位使用许可证编号：SYXK（鲁）201210030，实验动物伦理委员会批准编号 JNMC-2021-DW-013），体重（190±20）g，动物房饲养，温度保持 22～26 ℃，黑暗-光照循环 12 h（8:00～20:00），普通饲料喂养，自由摄食和饮水。5 d 适应性喂养后，按重量随机分 4 组：生理盐水对照组（CG）、麦芽酚铝低、中、高剂量组（LG、MG、HG），低、中、高染毒剂量分别为 10、20 和 40 μmol/kg。周一～周五进行腹腔注射，按照 1 mL/kg 给药，连续 90 d。每周一对大鼠称重记录，每天观察大鼠精神状态和生长情况以及腹腔注射的针口愈合程度。本研究通过济宁医学院伦理委员会审核批准。

1.3 *实验方法*

1.3.1 Morris 水迷宫训练与测试　染毒结束后，按照实验方法参考文献 [4]，让大鼠进行定位巡航和空间探索实验，测定大鼠在 2 min 以内找到平台所需要的时间作为逃避潜伏期和 120 s 内穿越平台位置和平台象限的次数。

1.3.2 冰冻切片检测活性氧（ROS）　染毒结束后取大鼠大脑皮层，按照实验方法参考文献 [5] 制备冰冻切片，在荧光显微镜下观察和采集图像。（二氨基联苯吲哚 DAPI 紫外激发波长 330～380 nm，发射波长 420 nm，发蓝光；CY3 激发波长 510～560 nm，发射波长 590 nm，发红光）。

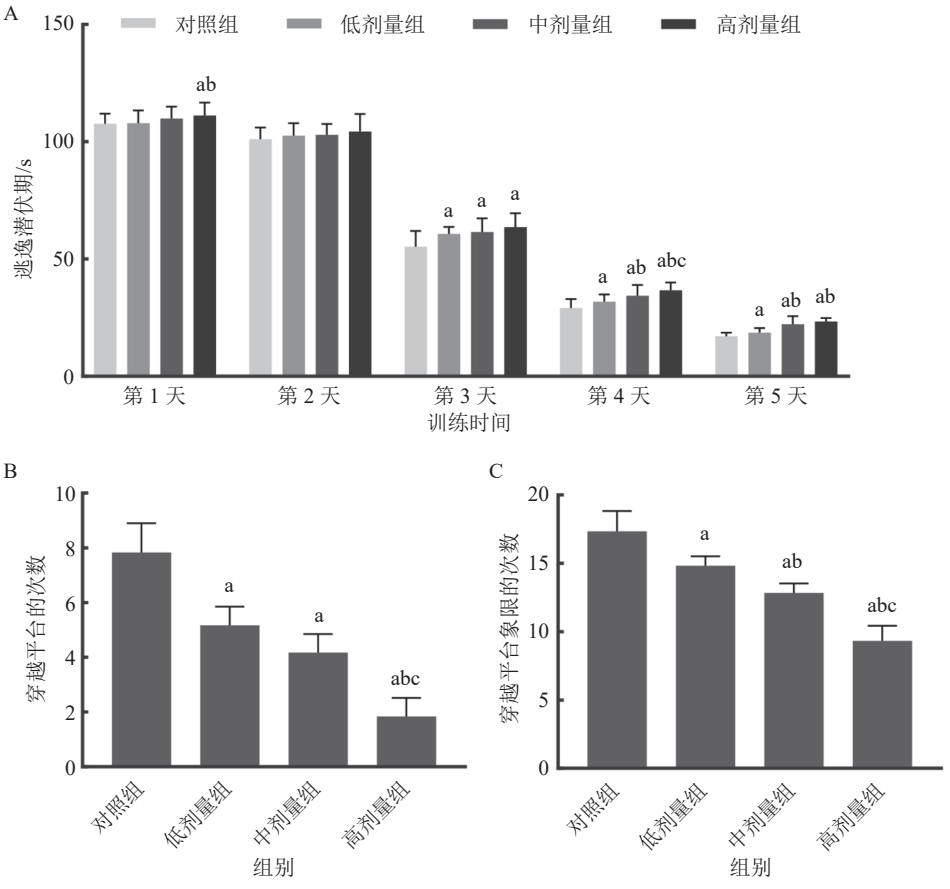
1.3.3 谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）检测　染毒结束后取大鼠海马组织，称重后加适量预冷的 PBS，在冰上充分磨碎后离心取上清，严格按照试剂盒使用说明检测海马组织 GSH-Px 含量。

1.3.4 免疫印迹法（western blot，WB）检测大鼠海马组织中 PINK1、Parkin、LC3B、P62 和 COXIV 蛋白的表达　染毒结束后取大鼠海马组织，按照实验方法参考文献 [6] 制备蛋白匀浆，测定相应蛋白的表达水平。

1.4 *统计分析*　采用 SPSS 25.0 对实验数据进行分析，图像制作用 GraphPad Prism 10.1.2，结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间对比用方差分析 one-way ANOVA，各组之间两两比较，方差齐用 LSD 检验，方差不齐用 Dunnett-T3 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 *Morris 水迷宫测试对大鼠空间学习和记忆能力影响（图 1）*　根据定位巡航实验，第 1、3 天麦芽酚铝暴露的高剂量组大鼠，逃避潜伏期超过对照组（$P<0.05$），尤其第 3 天，染铝组大鼠的逃避潜伏期均大于对照组（$P<0.05$）。第 2 天各组大鼠的平均逃避潜伏期相差无明显差异（$P>0.05$）。在第 4、5 天数据差异较明显，高剂量组大鼠的逃避潜伏期均显著超过对照组和低剂量组（$P<0.05$）（图 1A）。第 6 天空间探索试验，高剂量组与对照组、低剂量组和中剂量组比较，穿越平台和平台象限的次数均显著减少（$P<0.05$）（图 1B 和图 1C）。

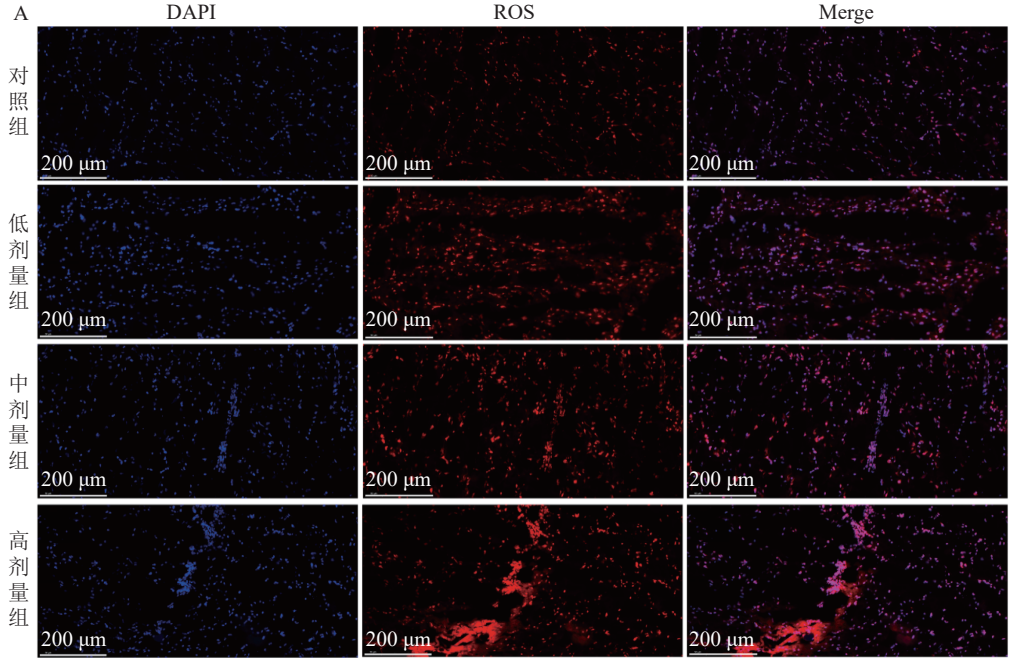


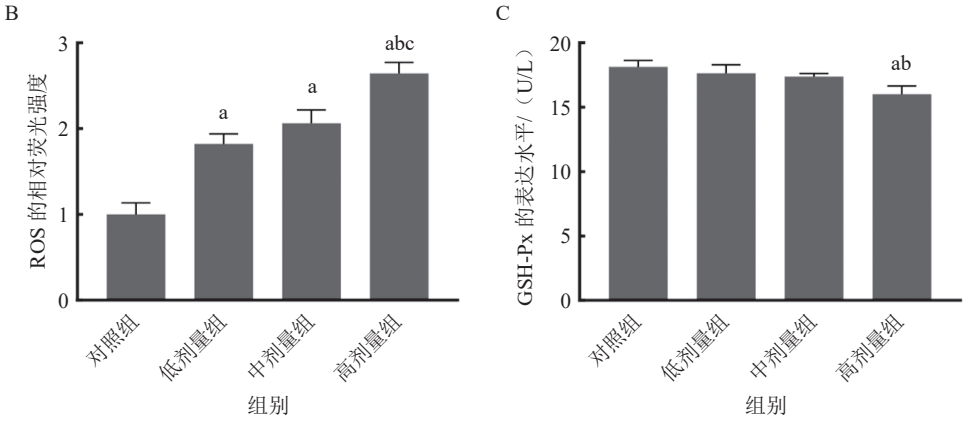
注：A：大鼠的逃避潜伏期（秒）；B：大鼠穿越平台的次数；C：大鼠穿越平台象限的次数；$\bar{x} \pm s$，n=6；与对照组 CG 相比，a P< 0.05；与低剂量组 LG 相比，b P< 0.05；与中剂量组 MG 相比，c P< 0.05。

图 1　各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果

Fig. 1　Morris water maze test results of rats in each group

2.2　ROS 表达升高和 GSH-Px 表达下降（图 2）　4 组大鼠大脑皮层中的红色荧光强度均随着染毒剂量的升高逐渐增强，表明 ROS 水平逐渐增加，而且与对照组相比，染毒的低、中、高剂量组 ROS 水平均明显增加（P<0.05）（图 2A 和图 2B）。4 组大鼠海马中 GSH-Px 的含量也随染毒剂量的增加逐渐下降，高剂量组与对照组和低剂量组相比，海马中 GSH-Px 含量明显下降（P<0.05）（图 2C）。



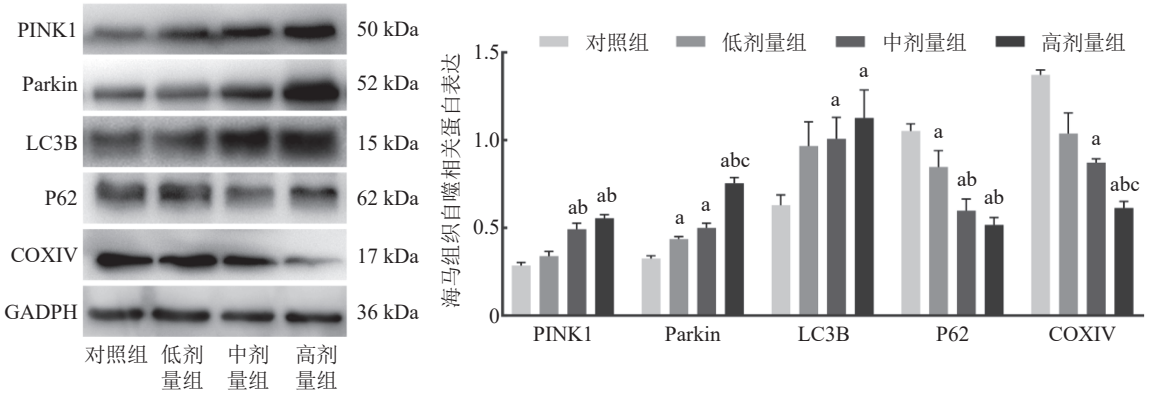


注：A：ROS 免疫荧光染色；B：ROS 的相对荧光强度；C：GSH-Px 的表达水平（U/L）；$\bar{x} \pm s$，n=8；与对照组 CG 相比，a P< 0.05；与低剂量组 LG 相比，b P< 0.05；与中剂量组 MG 相比 c P< 0.05。

图 2　各组大鼠 ROS 和 GSH-Px 结果

Fig. 2　ROS and GSH-Px results of rats in each group

2.3　各组大鼠的海马组织中 PINK1、Parkin、LC3B、P62、COXIV 的表达（图 3）　随着铝暴露剂量增加，各组大鼠大脑海马组织中 PINK1、Parkin、LC3B 的相对表达水平逐渐上升（P<0.05）；P62、COXIV 的相对表达水平逐渐下降（P<0.05）。大鼠海马组织中 PINK1、Parkin、LC3B 蛋白相对表达量在中高剂量染毒组均显著大于对照组（P<0.05），其中高剂量组 PINK1 和 Parkin 蛋白相对表达量显著大于低剂量组（P<0.05）；中高剂量染毒组 P62 和 COXIV 蛋白相对表达量均显著小于对照组（P< 0.05），高剂量组小于低剂量组（P<0.05）。



注：与对照组 CG 相比，a P< 0.05；与低剂量组 LG 相比，b P< 0.05；与中剂量组 MG 相比，c P< 0.05。

图 3　各组大鼠海马组织 PINK1、Parkin、LC3B、P62 和 COXIV 蛋白表达

Fig. 3　Protein expression of PINK1, Parkin, LC3B, P62, and COXIV in hippocampal tissues of rats in each group

3 讨　论

铝是一种慢行蓄积性神经毒物，流行病学研究结果证实，长期职业暴露会导致人出现神经毒性，表现为认知障碍[7]。铝的神经毒性在体内和体外实验均得到证实，亚慢性铝暴露可以降低大鼠模型的学习和记忆能力[8]。本研究结果也显示,随着染毒剂量增加,大鼠的逃避潜伏期明显延长,穿越平台和平台象限次数明显减少，表明亚慢性铝暴露对大鼠空间学习记忆能力产生明显损害作用，与之前的研究结果相似[4]。

健康的线粒体是健康大脑的重要内核，神经元中的线粒体功能障碍是所有神经退行性疾病的重要因素[9]。线粒体损伤导致能量产生不足，ROS 过度产生，氧化应激增加，引起神经元损伤，造成神经毒性[10–11]。氧化应激是机体被刺激后产生过多的 ROS，超过自身清除能力，机体氧化还原系统失衡，进而出现细胞损伤和组织凋亡[12]。线粒体是细胞内 ROS 的主要来源，在生理状态下，细胞维持了一定水平的 ROS 以保持稳态，调节生命活动，当机体受到刺激产生应激反应时，可刺激 ROS 过量生成[13]。GSH-Px 是体内广泛存在的抗氧化酶，主要作用是减少氧化应激损伤，维持 ROS 动态平衡[12]。本研究结果中，染毒后大鼠 ROS 含量明显升高，GSH-Px 含量降低。证明铝暴露会刺激大脑 ROS 过度产生，导致线粒体损伤、氧化应激和大脑抗氧化系统失衡。

线粒体功能障碍与不良神经结局密切相关。线粒体自噬可将有缺陷的线粒体去除，防止细胞

内功能受损的细胞器造成有害影响[14]。线粒体氧化应激调节 PINK1/Parkin 途径线粒体自噬，而 PINK1/Parkin 依赖的线粒体自噬又参与调节线粒体功能障碍[15]。PINK1/parkin 介导的线粒体自噬途径也是神经退行性疾病 PD 从机制到治疗的重要过程[16]。自噬过程中，自噬受体通过 LC3 相互作用区（LIR）基序与 ATG8 家族蛋白结合，将多聚泛素化的线粒体外膜链接至自噬体膜[17]。此外，线粒体与自噬装置之间相互作用还需要线粒体外膜的多聚泛素化蛋白 P62，P62 的功能性降低，使受损线粒体的清除降低，ROS 稳态失衡[18]。COXIV 是细胞色素 c 氧化酶 COX 的重要调节亚基，是线粒体呼吸链中的复合物，COXIV 是保护神经元免受线粒体氧化损伤的潜在机制[19]。本研究结果中，染铝组 PINK1，Parkin，LC3B 表达水平均随着染毒剂量增多，而 P62 和 COXIV 表达水平则降低。提示亚慢性铝暴露可能通过 PINK1/Parkin 途径的线粒体自噬，影响大鼠神经系统的氧化应激状态，进而造成氧化损伤，产生神经毒性。但 PINK1/Parkin 途径介导线粒体自噬并不能彻底改善大脑海马区的受损情况，对于损伤线粒体的清除程度和持久性也并不清晰，所以完全依靠线粒体自噬探索铝神经毒性仍有较大的空间。综上，亚慢性铝暴露可以激活线粒体自噬 PINK1/Parkin 途径 LC3B/P62/COXIV 通路，诱导线粒体自噬，损伤大鼠的学习记忆功能，导致认知障碍。

参考文献

[1] 梁瑞峰, 牛侨, 李伟庆, 等. 麦芽酚铝对大鼠学习记忆能力影响 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(11): 1429-1430.

[2] Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective[J]. Cell, 2019, 176(1/2): 11-42.

[3] Pickrell A M, Youle R J. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson′s disease[J]. Neuron, 2015, 85(2): 257-273.

[4] 纪晶晶. miRNA-351-5p 通过靶向调控 CPEB3 参与铝致学习记忆损害的机制研究 [D]. 吕梁: 山西医科大学, 2021.

[5] 高惠芳, 曹雅茹, 夏宏光, 等. 高脂饮食诱导 CYP4A 高表达参与小鼠非酒精性脂肪肝病程研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(11): 1678-1682.

[6] 崔一龙. 线粒体自噬在铝抑制骨形成中的作用及 ROS/PINK1/Parkin 信号通路的调控机制 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.

[7] 张靖琦, 姚亚秀, 李娟, 等. 职业铝暴露对作业工人记忆功能影响 [J]. 中国公共卫生, 2021, 37(9): 1405-1409.

[8] Xu Y R, Zhang G H, Zhao Y Y, et al. Activation of PI3k/Akt/mTOR signaling induces deposition of p-tau to promote aluminum neurotoxicity[J]. Neurotox Res, 2022, 40(5): 1516-1525.

[9] Cenini G, Voos W. Mitochondria as potential targets in Alzheimer disease therapy: an update[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 902.

[10] Bhat A H, Dar K B, Anees S, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 74: 101-110.

[11] Agrawal I, Jha S. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer′s disease: role of microglia[J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12: 252.

[12] Eftekharpour E, Fernyhough P. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction associated with peripheral neuropathy in type 1 diabetes[J]. Antioxid Redox Signal, 2022, 37(7/9): 578-596.

[13] Zhang B Y, Pan C Y, Feng C, et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation[J]. Redox Rep, 2022, 27(1): 45-52.

[14] Eldeeb M A, Thomas R A, Ragheb M A, et al. Mitochondrial quality control in health and in Parkinson′s disease[J]. Physiol Rev, 2022, 102(4): 1721-1755.

[15] Shang Y, Xue W L, Kong J X, et al. Ultrafine black carbon caused mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction and mitophagy in SH-SY5Y cells[J]. Sci Total Environ, 2022, 813: 151899. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151899.

[16] Malpartida A B, Williamson M, Narendra D P, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson′s disease: from mechanism to therapy[J]. Trends Biochem Sci, 2021, 46(4): 329-343.

[17] Sun S, Hou H Y, Ma G Q, et al. The interaction between E3 ubiquitin ligase Parkin and mitophagy receptor PHB2 links inner mitochondrial membrane ubiquitination to efficient mitophagy[J]. J Biol Chem, 2022, 298(12): 102704. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102704.

[18] Belousov D M, Mikhaylenko E V, Somasundaram S G, et al. The dawn of mitophagy: what do we know by now?[J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 19(2): 170-192. doi: 10.2174/1570159X18666200522202319.

[19] Hao Y H, Zhang J, Wang H, et al. HIF-1α regulates COXIV subunits, a potential mechanism of self-protective response to microwave induced mitochondrial damages in neurons[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10403.