章智冰,方艳艳,彭 锟,等.代森锰暴露诱导神经毒性和α-突触核蛋白聚集的机制 [J]. 中国环境科学, 2026,46(1):493-502.
Zhang Z B, Fang Y Y, Peng K, et al. Mechanisms of Maneb exposure-induced neurotoxicity and α-Synuclein aggregation [J]. China Environmental Science, 2026,46(1):493-502.

代森锰暴露诱导神经毒性和α-突触核蛋白聚集的机制

章智冰[1],方艳艳[1],彭 锟[1],高 翔[1],刘泽华[2],李 飞[1],刘朝阳[1,3*] (1.中南财经政法大学环境与健康研究中心,湖北 武汉 430073；2.北京大学城市与环境学院,地表过程分析与模拟重点实验室,北京 100871；3 武汉大学人民医院神经内科,湖北 武汉 430060)

摘要：以HEK293-α-syn细胞和野生型小鼠原代皮质神经元为实验模型,深入探讨了不同浓度(0,0.1,1.0,5.0mg/L)Maneb暴露的环境神经毒性及机制.结果表明,Maneb暴露浓度依赖性地抑制HEK293-α-syn细胞活性,诱导原代神经元损伤.Maneb暴露浓度越高,其毒性作用越显著,其中0.1mg/L实验组中神经元凋亡率接近60%.此外,Maneb暴露诱导HEK293-α-syn细胞和原代神经元内α-syn发生聚集,刺激其在S129位点发生异常磷酸化,不溶性磷酸化α-syn水平上调,进一步形成路易小体(LB)样聚集体,表明Maneb对帕金森(PD)样神经毒性的诱发作用.

关键词：代森锰；农药；α-突触核蛋白；神经毒性；帕金森病
中图分类号：X503.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2026)01-0493-10

Mechanisms of Maneb exposure-induced neurotoxicity and α-Synuclein aggregation. ZHANG Zhi-bing[1], FANG Yan-yan[1], PENG Kun[1], GAO Xiang[1], LIU Ze-hua[2], LI Fei[1], LIU Chao-yang[1,3*](1.Research Center for Environment and Health, Zhongnan University of Economics and Law, Wuhan 430073, China；2.Laboratory for Earth Surface Processes, College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China；3.Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China). *China Environmental Science*, 2026,46(1)：493~502

Abstract：HEK293-α-syn cells and primary cortical neurons of wild-type mice were used as experimental models to deeply explore the environmental neurotoxicity and mechanism of Maneb exposure at different concentrations (0, 0.1, 1.0, 5.0mg/L). The results showed that Maneb exposure inhibited the activity of HEK293-α-syn cells in a dose-dependent manner and induced primary neuronal damage. The higher the Maneb exposure concentration, the more significant its toxic effect. In the 0.1mg/L experimental group, the apoptosis rate of neurons was close to 60%. In addition, Maneb exposure induced the aggregation of α-syn in HEK293-α-syn cells and primary neurons, stimulated its abnormal phosphorylation at the S129 site, and upregulated the level of insoluble phosphorylated α-syn, further forming Lewy body (LB)-like aggregates, indicating that Maneb induces Parkinson's (PD)-like neurotoxicity.

Key words：Maneb；pesticide；α-synuclein；neurotoxicity；parkinson’s disease

代森锰(Maneb)是一种含锰的二硫代氨基甲酸酯杀菌剂,其在农业中被广泛用于控制作物病害和提高作物产量[1].然而,在施用过程中,Maneb 的滥用导致其在环境中以残留物的形式积累.近几十年来,在各种环境介质中都检测到了 Maneb 及其降解产物[2-3].例如,在巴基斯坦的饮用水中检测到Maneb的浓度为 1.5μg/L[2],加纳地表水中预测 Maneb 环境浓度为120μg/L[4],在番茄汁样本中,检测到的Maneb含量为 450μg/L[5].此外,欧盟关于食品中农药残留的报告证实,苹果、橘子、西红柿和豆类等水果和蔬菜中均含有 Maneb[6].因此,环境中的 Maneb 残留可能会危害人类健康和环境安全.

流行病学研究显示,环境因素已成为导致帕金森病(PD)发病的诱因之一.农药的施用与PD发病可能性增加之间存在明显的相关性[7-8],长期暴露于Maneb能增加人群PD患病的风险[9].PD是一种高发的神经退行性疾病[10],60 岁以上人群患病率约为1%[11].PD 典型病理特征中脑黑质致密部的多巴胺能神经元变性丢失,残存神经元中形成嗜酸性的包涵体——路易小体(LB),其主要成分是异常聚集

收稿日期：2025-05-27
基金项目：国家自然科学基金资助面上项目(82271447);湖北省自然科学基金面上项目(2023AFB942)
* 责任作者, 教授, lcy@zuel.edu.cn

的 α-突触核蛋白(α-syn).α-syn 可发生过度磷酸化和聚集,从而形成有害的寡聚体和纤维,最终损害神经元功能[12].其中,α-syn 的 Ser129 位点磷酸化(p-S129)是导致 PD 发病的关键机制[13].

毒理学研究表明,Maneb 长期暴露能诱导小鼠产生 PD 样行为学改变,并能造成小鼠线粒体功能障碍、氧化应激和神经细胞凋亡[14-18].Maneb 暴露还能诱导多巴胺能神经细胞中 α-syn 聚集体的形成[19-20],1μg/mL Maneb 导致 PC12 细胞发生凋亡、α-syn 聚集并导致线粒体通透性改变[20-21].Maneb 和百草枯联合暴露导致多巴胺能神经元数量减少,同时寡聚 α-syn 的表达明显增加[19].然而,目前对 Maneb 暴露诱导的神经毒性及 α-syn 聚集缺乏系统性的研究,多数研究仅通过免疫印迹实验检测 α-syn 在 Maneb 暴露后的表达水平变化[19-20,22],未对 α-syn 的聚集具体情况及 LB 样聚集体的形成机制进行系统研究[8,23-25].其次,Maneb 暴露后诱导 α-syn 发生的异常聚集以及 LB 样聚集体的形成,该过程是通过何种潜在机制导致 PD 样神经毒性尚不明确.因此,本研究以 HEK293-α-syn 细胞和野生型小鼠原代皮质神经元为实验模型[26],系统性地研究 Maneb 在体外暴露产生的环境神经毒性,评估 α-syn 在 Maneb 暴露后的聚集水平变化,并进一步对 LB 样聚集体典型的生物标记物泛素(Ubiquitin)、p62 以及 α-syn p-S129 进行荧光共定位分析,探究 α-syn 聚集的具体特征、部位、磷酸化位点及程度,分析 LB 样聚集体形成的原因,为后续研究 Maneb 的神经毒性分子机制提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料及化学试剂

Maneb 购自天津阿尔塔科技有限公司(1ST21098),在二甲基亚砜(DMSO)中溶解配置浓度为 2500mg/L 的储备液并保存,临用前在 DMEM 培养基(Solarbio,11995)中稀释至实验所需浓度.α-syn PFFs 按照以往研究中描述的方法,通过大肠杆菌(*E. coli*)表达系统表达人源 α-syn 单体,经纯化后聚集形成[27].本研究使用的抗体和试剂包括 p62(Abcam, Ab56416),泛素(Cell Signaling Technology, 39367), HRP-conjugated anti-rabbit IgG(Bio-Rad, 170-6515), HRP-conjugated anti-mouse IgG(Bio-Rad, 170-6516), p-S129(Cell Signaling Technology, 23706s), p-S129 (Biolegend, 825701), GAPDH (Proteintech, 60004-1-Ig), NeuN (Millipore, MAB3317), Map-2(Thermo Fisher Scientific, SF254293), Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG(Invitrogen, A-11012), Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen、A-11005), DAPI (Biofroxx, EZ3412B205), Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞活性检测试剂盒 (Solarbio, CK04), TUNEL BrightRed 细胞凋亡检测试剂盒(Vazyme, A113-03).

1.2 细胞培养和 Maneb 处理

本实验使用的 HEK293-α-syn 细胞是一种基于人胚胎肾细胞经基因工程改造的模型,改造后可产生 GFP-α-syn,表现出稳定和强烈的 α-syn 积累和磷酸化[28],便于系统且全面地观察 Maneb 暴露对 α-syn 聚集的诱导作用,常用于研究 PD 和其他突触核蛋白病中 α-syn 的功能、聚集、毒性及其调控机制.使用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清,100μg/mL 青霉素-链霉素溶液)于 37℃、5% CO_2 恒温培养箱内培养.为了促进内源性 α-syn 的积累,本研究采用了 α-syn 预成纤维(PFFs).PFFs 是在特定条件下通过体外重组人源 α-syn 形成的纤维状聚集体,它能够有效地触发细胞和神经元内 α-syn 纤维的生成,模拟病理性 α-syn 的构象[29].PFFs 诱导的 α-syn 聚集模型与帕金森病的相似度更高,目前被广泛用于 PD 等神经退行性疾病模型的建立和机制研究[28-29].采用 6μg α-syn PFFs 预处理 HEK293-α-syn 6h 后,加入不同环境浓度梯度(0,0.1,1.0,5.0mg/L)的 Maneb 于培养基中培养 24h,对照组加入等量 DMSO.为接近真实环境条件,Maneb 最低浓度的设置基于水生环境和食物样本的数据[4-5,30].

1.3 原代神经元培养和 Maneb 处理

野生型小鼠原代皮质神经元购自 Thermo Fisher Scientific 公司(A15586)并进行正常培养 7d 后[31],将神经元暴露于 α-syn PFFs 与 Maneb 再次培养 7d,第 14d 使用含 4%甲醛的溶液固定细胞,测定细胞通透性,随后通过免疫荧光技术进行分析.其中,α-syn PFFs 与 Maneb 浓度与 HEK293-α-syn 细胞中使用的浓度一致.

1.4 细胞活力

将 HEK293-α-syn 细胞接种于 96 孔板中.经 Maneb 处理 24h 后,每孔加入 10μL CCK-8 试剂并在培

养箱中培养 2h,随后在 450nm 波段采用酶标仪测定吸光度值,并计算相对于对照组的细胞活性百分比.

1.5　蛋白质免疫印迹

为提取可溶性和不可溶性 α-syn,使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 1% Triton X-100(体积比)溶液冲洗处理后的细胞两次,轻轻刮取细胞,经过 0.5s 的脉冲后,冰上裂解 30min,4℃、15,000r/min 转速下离心 1h.收集沉淀物上液体样本,即可溶部分.剩余的沉淀物即不溶部分,将其溶解在含有 2%SDS 的 TBS 溶液中,加入蛋白酶和磷酸酶活性抑制剂.超声处理,脉冲持续时间为 0.5s,振幅为 20%,共重复 15 次.室温下孵育 0.5h,离心后,保留含有不溶性组分的液体部分.BCA 法定量蛋白质浓度.进行 SDS-PAGE 凝胶电泳.随后将蛋白质转印至 NC 膜,5%脱脂牛奶常温封闭 1h,一抗 4℃孵育过夜.TBST 溶液洗涤 3 次,二抗室温孵育 1h,再次洗涤 3 次后,在化学发光成像系统中显影.采用 ImageJ 软件分析蛋白质条带灰度值.

1.6　细胞凋亡检测

使用 TUNEL BrightRed 细胞凋亡检测试剂盒检测原代神经元凋亡情况.将细胞载玻片用 1×PBS(含 0.2% Triton X-100)处理 5min 使其通透,含 5% BSA 的 1×PBS 溶液封闭 1h 后,将载玻片置于 TUNEL 检测试剂盒溶液中,标记后 37℃孵育 1h.PBS 洗涤 3 次后,一抗 4℃孵育过夜,洗涤后,荧光二抗孵育 1h,再次进行洗涤.为了观察细胞核,DAPI 染色 5min.PBS 洗涤 3 次后封片,通过荧光显微镜观察正常细胞核和凋亡细胞核.

1.7　免疫荧光染色

使用 4%多聚甲醛和 0.1% Triton X-100 固定细胞 15min.PBS 洗涤 3 次后,3% BSA 封闭 30min,一抗 4℃孵育过夜.二抗室温下孵育切片 2h.DAPI 染色 30s 后,PBS 洗涤 3 次.使用倒置荧光显微镜(TH4-200, Olympus)对密封玻片进行观察.统计分析重复 3 次,每次视野内不少于 120 个细胞.使用 ImageJ 软件计算细胞总数和荧光强度.

1.8　统计分析

通过 GraphPad Prism 8.0 对实验数据进行统计分析和图表绘制.采用单因素方差分析(ANOVA)和 Tukey 多重比较检验评估组间差异.所有数值均进行了正态性检验,以平均值±SEM 表示,$P<0.05$ 为具有统计学意义.每个实验重复 3 次,至少进行 3 次独立试验.

2　结果与分析

2.1　Maneb 在 HEK293-α-syn 细胞中诱导神经毒性和 α-syn 聚集

为评估 Maneb 对 HEK293-α-syn 细胞生长的潜在神经毒性,本研究测定了暴露于不同浓度梯度的 Maneb 24h 后的细胞活性和 α-syn 聚集情况,结果如图 1 所示.Maneb 浓度依赖性地降低细胞活性,与对照组相比,Maneb 处理组的细胞活性明显下降.经 0.1 和 5.0mg/L Maneb 处理的 HEK293-α-syn 细胞活力从 90%下降至 30%,细胞活性大幅降低(图 1(a)).此外,免疫荧光分析显示,1.0mg/L Maneb 暴露明显促进 HEK293-α-syn 细胞中 α-syn 聚集体的产生,而 0.1mg/L Maneb 组与 PFFs 组之间没有显著差异.当浓度达到 5.0mg/L 时,α-syn 的聚集程度与 PFFs 组相比显著增加(图 1(b,c)).这些结果表明,Maneb 暴露诱导 HEK293-α-syn 细胞神经毒性和 α-syn 聚集.

2.2　Maneb 暴露诱导 α-syn 形成 LB 样聚集体

为评估 Maneb 暴露对 LB 样聚集体形成的诱导作用,本研究对 α-syn、泛素和 p62 蛋白的水平变化进行检测并进行双标记免疫荧光分析,结果如图 2 所示.经不同浓度 Maneb 处理 24h 后,α-syn 与泛素共定位程度呈浓度依赖性增加.此外与 PFFs 组相比,5.0mg/L Maneb 实验组泛素化水平出现了显著变化(图 2(a,c)).同样,随着 Maneb 暴露浓度的增加,α-syn 和 p62 蛋白发生了共定位,浓度为 5.0mg/L 时的共定位程度最高(图 2(b,d)).泛素和 p62 是 LB 样聚集体的典型生物标记物[32-33],α-syn 与泛素和 p62 的共定位表明,Maneb 暴露不仅能促进 α-syn 的聚集,还能诱导 α-syn 形成类似 LB 样聚集体,且该影响呈浓度依赖性增加.

2.3　Maneb 暴露诱导 HEK293-α-syn 细胞中 α-syn 磷酸化

α-syn 中 S129 位点的磷酸化是 PD 发病的关键机制,为了评估 α-syn 磷酸化水平,探明 LB 样聚集体形成的原因,本研究从 HEK293-α-syn 细胞中分离出了可溶性和不可溶性的 α-syn,并对其进行蛋白质免疫印迹分析,结果如图 3 所示.Maneb 暴露诱导 α-syn 在 S129 位点磷酸化,并显著增加了 α-syn 的不溶部分.此外,暴露于高浓度 Maneb 后,不溶性磷酸化 α-syn 的表达明显上调,表明 Maneb 暴露诱导 α-syn

聚集体增加.因此,Maneb 暴露加剧 α-syn 的磷酸化, 并促进体外产生更多的 α-syn 聚集体.

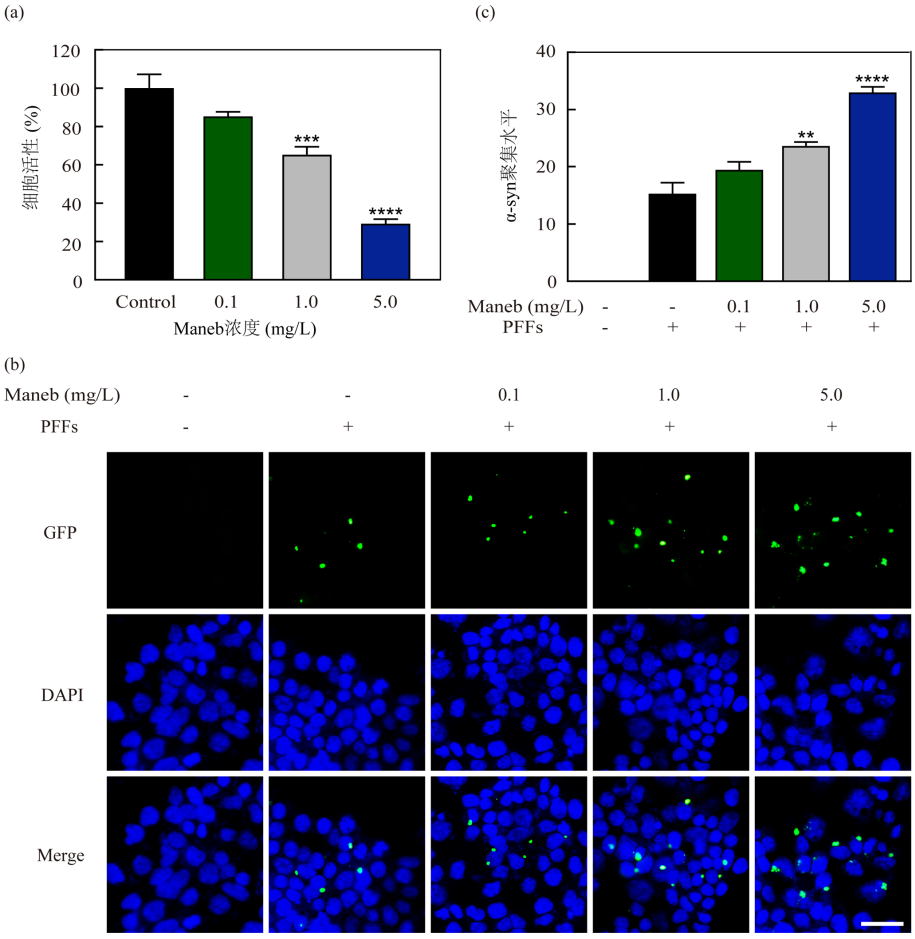
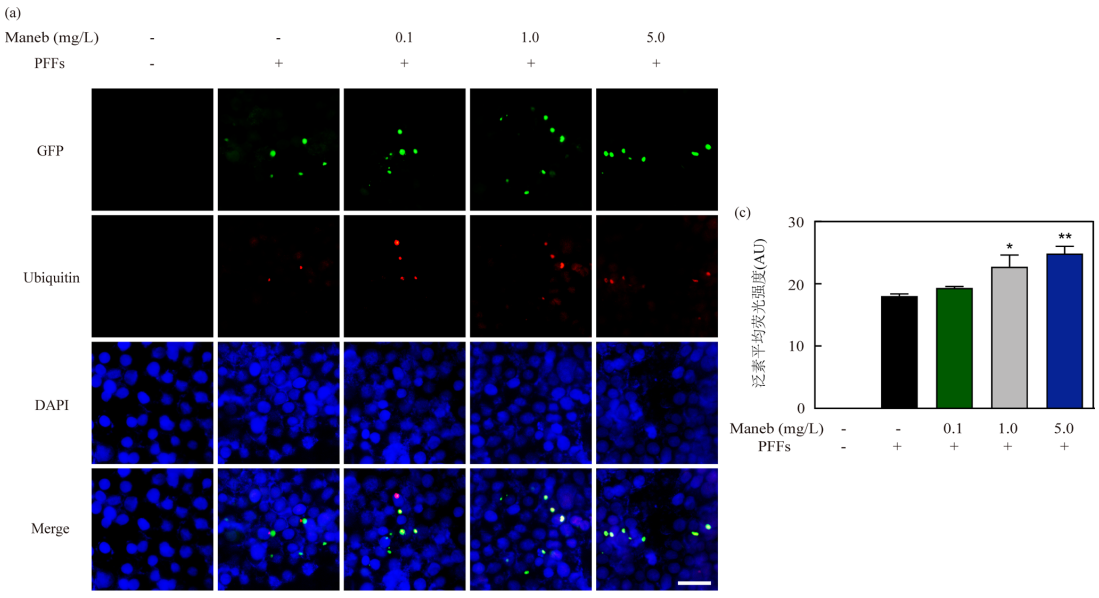


图 1 Maneb 暴露诱导 HEK293-α-syn 细胞活性和 α-syn 聚集水平变化

Fig.1 Cell viability and α-syn aggregation caused by maneb exposure in HEK293-α-syn cells

(a)为 Maneb 暴露 24h 后 HEK293-α-syn 细胞活性水平变化(***P< 0.001,****P< 0.0001,n = 4);(b)为 α-syn PFFs 及 Maneb 处理后免疫荧光分析 HEK293-α-syn 细胞中 α-syn 聚集情况,绿色荧光表示形成 α-syn 聚集体,比例尺=20μm;(c)为各实验组形成 α-syn 聚集体的柱形统计图(**P< 0.01,****P< 0.0001,n=4)



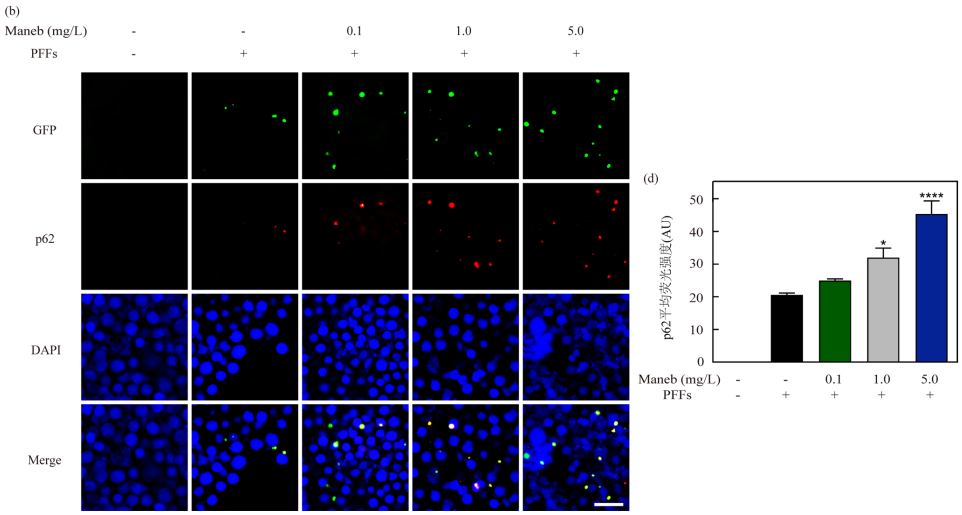


图 2　Maneb 暴露诱导 α-syn 形成 LB 样聚集体

Fig.2　Maneb induces α-syn to form LB-like aggregates

(a,b)分别为 α-syn PFFs 和 Maneb 处理后 HEK293-α-syn 细胞泛素和 p62 的荧光图.红色荧光分别代表泛素和 p62,比例尺=20μm;(c,d)分别为泛素和 p62 平均荧光强度的柱形统计图(*P<0.05,**P<0.01,****P<0.0001,n=4).

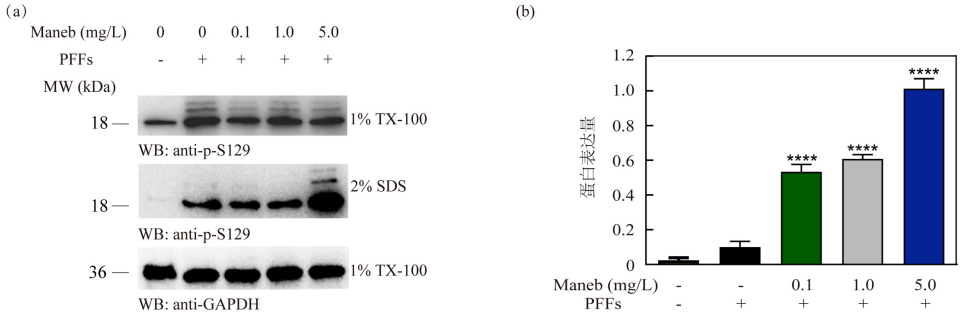


图 3　Maneb 暴露诱导 HEK293-α-syn 细胞中 α-syn 磷酸化

Fig.3　Phosphorylation of α-syn is induced by maneb in HEK293-α-syn cells

(a)为 α-syn PFFs 和 Maneb 处理后可溶性和不可溶性 p-S129 α-syn 的水平变化;(b)为不可溶性/可溶性 p-S129 α-syn 含量柱形统计图(****P<0.0001,n=3)

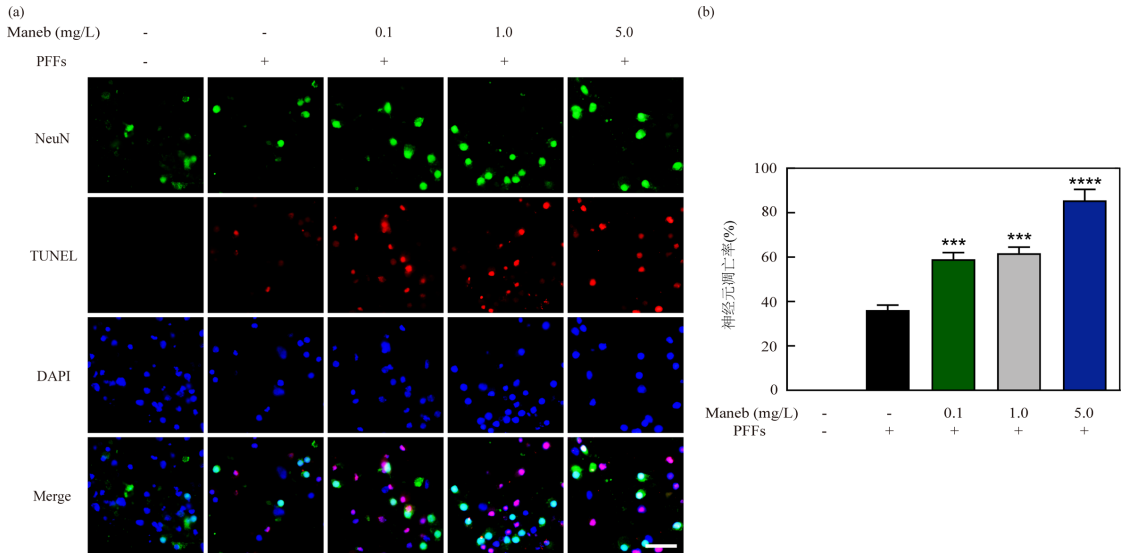


图 4　Maneb 暴露对原代神经元的神经毒性作用

Fig.4　Neurotoxic effects of maneb on primary neurons

(a)为 α-syn PFFs 和 Maneb 处理后的原代神经元中 NeuN 和 TUNEL 的共定位荧光图,比例尺=20μm;(b)为 TUNEL 荧光的柱形统计图(***P<0.001,****P<0.0001,n=4)

2.4 Maneb 暴露诱导原代神经元毒性损伤

海马体和皮层的神经元损伤是 PD 发病的关键机制之一[34-36].本研究进一步评估了 Maneb 对野生型小鼠原代皮质神经元的毒性作用.Anti-NeuN 是一种特异性神经元核抗原,常用于识别脑切片中的神经元.免疫荧光染色结果如图 4 所示,随着 Maneb 浓度的上升,Anti-NeuN 和 TUNEL 共定位的神经元数量增加.与单独暴露于 PFFs 相比,Maneb 暴露以浓度依赖性的方式显著诱导神经元发生凋亡.在 0.1mg/L 实验组中,凋亡神经元接近 60%.Maneb 暴露诱导小鼠皮质神经元神经变性,其中高浓度组 5.0mg/L Maneb 暴露表现出显著的神经毒性.

2.5 Maneb 暴露诱导原代神经元中 α-syn 磷酸化并形成 LB 样聚集体

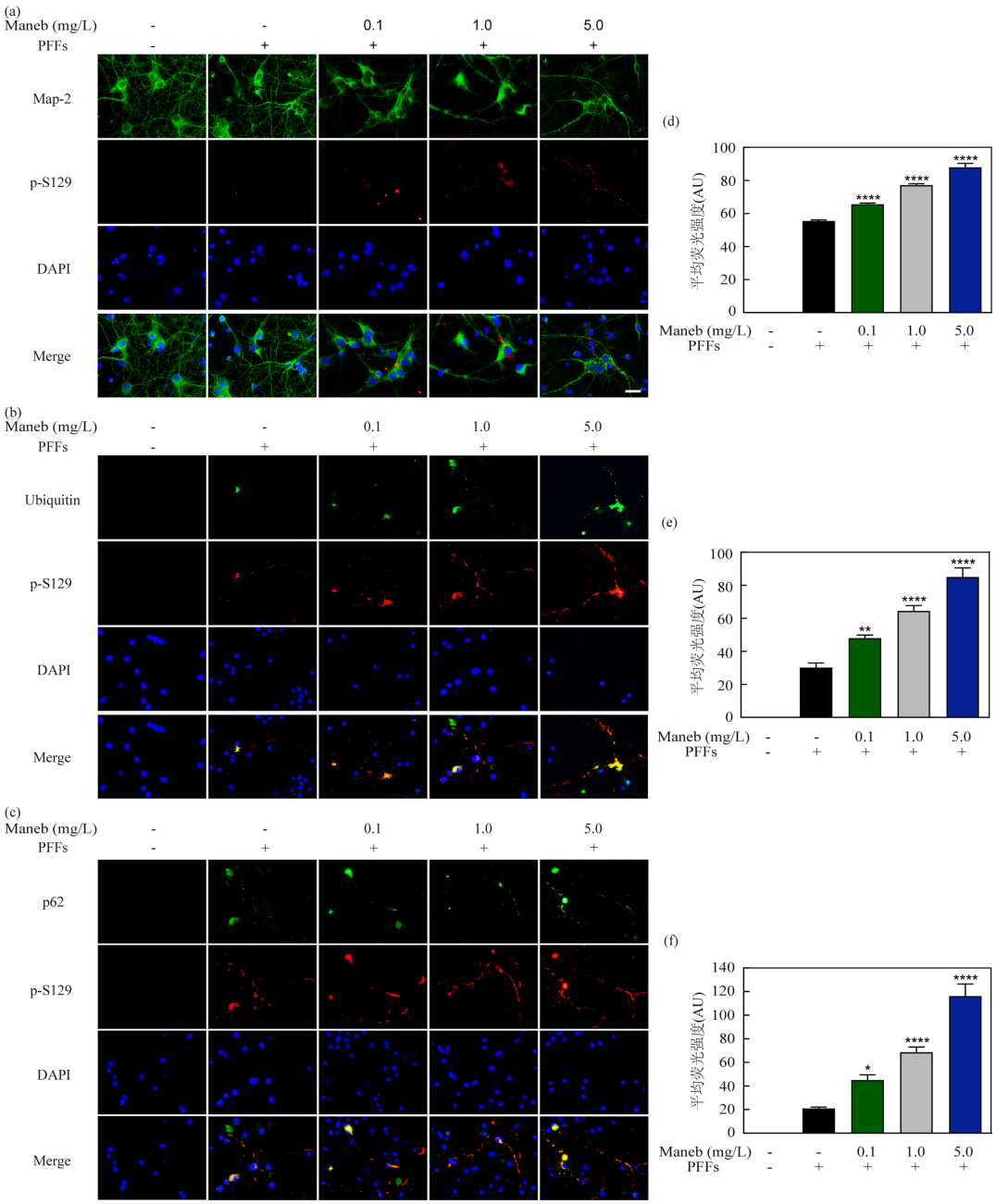


图 5 Maneb 暴露诱导原代神经元中 α-syn 磷酸化并形成 LB 样聚集体

Fig.5 Phosphorylation of α-syn and the formation of LB-like aggregates induced by maneb in primary neurons

(a)为 α-syn PFFs 和 Maneb 处理后的原代神经元 Map-2 和 p-S129 的荧光图,比例尺=10μm;(b)为原代神经元中 p-S129 和泛素的荧光图,比例尺=10μm.;(c)为原代神经元中 p-S129 和 p62 的荧光图,比例尺=10μm;(d,e,f)分别为 p-S129、泛素、p62 平均荧光强度的柱形统计图 (*P<0.05,**P<0.01,****P<0.0001,n=6).

为了研究 Maneb 暴露对野生型小鼠原代皮质神经元中 α-syn 的聚集机制,本研究评估了 Maneb 暴露 7d 后神经元中 p-S129、泛素和 p62 的水平变化,结果如图 5 所示.原代神经元的形态发生改变,α-syn 磷酸化水平提高,神经元聚集体变得更加突出,突触区缩小,形成球形聚集体.同样,在树突和轴突中也观察到了丝状或带状的α-syn聚集体,这些聚集体在原代神经元中形成了LB样聚集体(图5(a)).与 PFFs 处理组相比,Maneb 暴露诱导神经元内 p-S129水平呈浓度依赖性增加(图5(d)),即Maneb能促进原代神经元的 α-syn 磷酸化.此外,神经元在 Maneb 暴露下泛素和 p62 表达水平呈浓度依赖性升高(图 5(e,f)),表明神经元内形成了 LB 样聚集体.值得注意的是,神经元中的 p-S129 与泛素和 p62 标记的聚集体共定位,泛素和 p62 大多以球状结构在神经元突起和神经元细胞体附近被检测到(图 5(b,c)).结果表明,α-syn 最初以纤维状聚集,最终在核周区域以LB样聚集体的形式聚集.因此,Maneb暴露会浓度依赖性诱导神经元变性和 α-syn 在 S129 位点的磷酸化,原代神经元中 LB 样聚集体增多.

3　讨论

Maneb 作为一种广泛使用的杀菌剂,主要通过呼吸道、皮肤和消化道途径的吸收暴露对人类和其他生物造成潜在神经毒性.Maneb 暴露在空气或潮湿环境中易分解,主要降解物乙撑硫脲(ETU)具有多种致畸、致癌及免疫毒性[37,38].ETU 在常温常压下性质稳定,分解速率缓慢,在水中的溶解度很高,Maneb 及 ETU 进入生物体后,其残留物优先在甲状腺中累积,其次为肝脏,长期低剂量暴露可能具有累积性风险[39].此外,Maneb 还具有潜在间接放大风险,进入环境中的 Maneb 污染通过影响藻类、小型甲壳类、水生昆虫等低级生物,进一步影响鱼类、鸟类,最终在人体内进行蓄积.美国环境保护署指出,Maneb 暴露对水生物种构成急性风险,对鸟类和哺乳动物则具有一定的慢性风险[40].在神经毒性效应方面,毒理学研究表明,暴露于 Maneb 会降低斑马鱼的存活率和孵化率,从而导致发育毒性,而暴露于高浓度的 Maneb 则会诱导斑马鱼神经中毒和运动功能障碍[3,41].本课题组先前研究表明,Maneb 通过线粒体凋亡途径引发多巴胺能神经细胞凋亡.随着 Maneb 浓度增加,细胞中 Bcl-2 水平降低,Caspase-3 水平升高[42].此外,Maneb 还能特异性诱导多巴胺能神经细胞的毒性损伤,并导致小鼠出现类 PD 行为学和病理变化,表现为运动功能障碍和纹状体中多巴胺水平降低[43-44].然而,Maneb 诱发 PD 样神经毒性及潜在分子机制还需要进一步阐明.

3.1　Maneb 暴露诱导神经毒性和 α-syn 聚集

本课题组先前研究发现,暴露于 60mg/kg Maneb 的 α-syn A53T 转基因小鼠出现了类 PD 的运动功能障碍[46].鉴于 Maneb 与 PD 发病之间潜在的流行病学关联,为了进一步探索 Maneb 的毒性作用并阐明其神经毒性机制,本研究在体外评估了 Maneb 暴露引发的神经毒性以及其对 α-syn 聚集的诱导作用.结果表明,暴露于 Maneb 后,HEK293-α-syn 细胞活性水平显著降低,神经元凋亡水平显著提高,且均呈浓度依赖性.此外,暴露于 Maneb 诱导 α-syn 聚集,加剧 α-syn 在 S129 位点的磷酸化,并导致不溶性磷酸化 α-syn 的增加.值得注意的是,Maneb 暴露还诱导 α-syn 在 HEK293-α-syn 细胞和原代神经元中形成 LB 样聚集体.综上所述,本研究系统性研究了 Maneb 暴露对细胞中 α-syn 聚集并形成 LB 样聚集体的诱导作用,为 Maneb 暴露诱导 PD 的潜在危害和机制提供了新的证据.

泛素-蛋白酶体系统和自噬-溶酶体途径是细胞质中 α-syn 降解和消除的主要机制.正常情况下,α-syn 单体通过泛素-蛋白酶体系统降解,而自噬-溶酶体途径主要负责 PD 中不溶性 α-syn 的降解[47].这两条途径的功能障碍会导致α-syn的积累,最终促进 PD 发病[48].积累或细胞清除功能受损导致 α-syn 的分泌和释放,进一步导致了神经毒性.本研究发现,暴露于 1.0 和 5.0mg/L 的 Maneb 24h 后,HEK293-α-syn 细胞中 α-syn 聚集体含量显著增加.其他研究表明,1 μg/mL 的 Maneb 对 PC12 细胞产生神经毒性并导致细胞凋亡的同时,α-syn 出现了大量聚集[49].因此,α-syn 的病理性聚集在 Maneb 暴露诱发 PD 样神经毒性中起着至关重要的作用.此外,有研究指出在 Maneb 的低剂量(150nmol/L)暴露下,α-syn 的早期聚集反应可能呈现毒物兴奋效应(Hormesis),即低剂量激活适应性保护机制[50].这一观点有待未来通过组学分析等手段进行进一步验证.

3.2　Maneb 暴露诱导 α-syn 形成 LB 样聚集体

泛素和p62是LBs的典型标志物,它们的异常积累反映了蛋白质降解系统的功能障碍,这是PD的重要病理特征.本研究中,Maneb 能浓度依赖性诱导HEK293-α-syn 细胞和原代神经元中大量 α-syn 与泛素和p62出现共定位,并进一步形成LB样聚集体,该现象与PD样神经毒性损伤机制有密切联系.

3.3 Maneb 暴露诱导 α-syn 在 S129 位点磷酸化

为了研究 Maneb 暴露诱发 α-syn 聚集的机制,本研究评估了 Maneb 暴露后 α-syn 在 S129 位点磷酸化的表达水平.通过蛋白质免疫印迹法,本研究测定了 HEK293-α-syn 细胞中可溶性和不可溶性磷酸化 α-syn 的水平.α-syn 的积累和毒性受到磷酸化过程的显著影响,尤其是 S129 位点的磷酸化[51].通常,α-syn 在神经元突触前端以可溶性单体形式表达,然而,在病理条件下,α-syn 会在 S129 处发生异常磷酸化,导致其二级结构发生变化,错误折叠并形成富含 β-折叠的中间态,进一步形成稳定的交叉-β 片层,并引发一系列有害的生化事件,包括氧化应激、炎症和线粒体功能受损[28],最终导致多巴胺能神经元变性和损伤.本研究中,Maneb 暴露加剧了体外 α-syn 的磷酸化并提高了 α-syn 聚集体的水平.随后,本研究通过免疫荧光分析验证了 Maneb 对原代神经元的神经毒性作用,同样,Maneb 暴露显著诱导神经元内 p-S129 水平呈浓度依赖性增加.S129 位点的磷酸化状态影响着多巴胺能神经细胞病理进程.研究发现,在 SH-SY5Y 细胞中,通过构建 S129A 突变体对 S129 位点的磷酸化进行阻断后,S129A 突变体的表达减少了胞质溶胶中类似 LB 的嗜酸性细胞包涵体的形成[52].在大鼠模型中,构建 S129A 突变体形成了更大的 α-syn 病理性包涵体,延缓了病理进程[53].同样,在果蝇模型中阻断 S129 位点的磷酸化后,包涵体形成数量显著增加,但其形成时间更晚,同时抑制了 α-syn 诱导的多巴胺能神经元变性[54].此外,也有研究提出了相反的意见,p-S129 可能是一种病理标志物,而非病理驱动因子,阻断 S129 磷酸化后,大鼠黑质致密部和纹状体中的多巴胺能神经元病变加剧,多巴胺(DA)和酪氨酸羟化酶(TH)水平显著降低[55].目前,p-S129 的致病相关性仍然存在争议[56-57],在未来研究中将针对该问题展开深入探讨,以进一步完善相关机制的验证.

毒理学研究表明,Maneb 暴露可诱导蛋白质硫醇烷基化、氧化应激、细胞凋亡、线粒体功能损伤、破坏线粒体膜电位、抑制脱氢酶等[14,58-59].此外,Maneb 可通过活性半胱氨酸硫醇与线粒体酶发生特异性作用,并改变其硫醇氧化还原状态,从而导致线粒体正常功能受损[15].线粒体功能障碍在PD的病理进程中起着至关重要的作用.在大鼠体内,Maneb 选择性地与线粒体复合物 III 结合并抑制其活性[59].同时,活性氧(ROS)的积累也会干扰线粒体的正常生理功能,导致多巴胺能细胞发生凋亡[60-61].此外,Maneb 还会影响小鼠中与 PD 相关的生物标志物如多巴胺转运体(DAT)和 TH 的基因表达[62].通过利用靶向代谢组学和蛋白质免疫印迹分析,本课题组验证了 Maneb 暴露诱导了 PD 相关信号通路紊乱,包括苯丙氨酸和色氨酸的代谢通路,以及多巴胺能突触、突触囊泡循环、氧化应激和线粒体功能障碍[46].此外, Maneb 还能通过 PKA/CREB 信号通路和线粒体凋亡通路介导多巴胺能细胞凋亡[18].综上,Maneb 暴露诱导的神经毒性通过多种机制和信号通路联合作用引起.因此,关于 Maneb 对于 PD 样神经毒性的诱发及其具体机制有待进一步的研究.

本研究首次系统性研究了 Maneb 在体外诱导 α-syn 聚集的形态特征、具体部位和 Ser129 磷酸化位点及 LB 样聚集体的形成,为阐明 Maneb 的 PD 样神经毒性分子机制提供证据.未来的研究将聚焦于进一步阐明 Maneb 的神经毒性作用,并揭示 Maneb 诱导 PD 的深层次毒性机制.

4 结论

4.1 Maneb 暴露具有环境神经毒性,浓度依赖性地抑制 HEK293-α-syn 细胞活性,诱导野生型小鼠原代皮质神经元形态发生改变,凋亡水平上升并造成毒性损伤.Maneb 暴露浓度越高,其诱发的神经毒性越显著,其中 0.1mg/L 实验组中神经元凋亡率接近 60%.

4.2 Maneb 暴露诱导 HEK293-α-syn 细胞和野生型小鼠原代皮质神经元内 α-syn 聚集,泛素、p62 蛋白与 α-syn 共定位程度呈浓度依赖性增加,α-syn 最初以纤维状聚集,最终在核周区域形成 LB 样聚集体.

4.3 Maneb 暴露加剧 HEK293-α-syn 细胞和野生型小鼠原代皮质神经元内 α-syn 在 S129 位点磷酸

化,且不溶性磷酸化 α-syn 增加.

参考文献：

[1] Kubens L, Weishaupt A K, Michaelis V, et al. Exposure to the environmentally relevant fungicide Maneb: Studying toxicity in the soil nematode Caenorhabditis elegans [J]. Environment International, 2024,183:108372.

[2] Asghar M, Yaqoob M, Munawar N, et al. Determination of Mancozeb and Maneb using flow injection chemiluminescence detection [J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2022, 102(11):2586-2606.

[3] López-Fernández O, Pose-Juan E, Rial-Otero R, et al. Effects of hydrochemistry variables on the half-life of mancozeb and on the hazard index associated to the sum of mancozeb and ethylenethiourea [J]. Environmental Research, 2017,154:253-260.

[4] Onwona-Kwakye M, Hogarh J N, Van den Brink P J. Environmental risk assessment of pesticides currently applied in Ghana [J]. Chemosphere, 2020,254:126845.

[5] Özhan G, Alpertunga B. Liquid chromatographic analysis of maneb and its main degradation product, ethylenethiouera, in fruit juice [J]. Food Additives and Contaminants, 2008,25(8):961-970.

[6] European Food Safety Authority (EFSA), Carrasco Cabrera L, Medina Pastor P. The 2019 European Union report on pesticide residues in food [J]. EFSA Journal, 2021,19(4):e06491.

[7] Van Der Mark M, Brouwer M, Kromhout H, et al. Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results [J]. Environmental Health Perspectives, 2012,120(3):340-347.

[8] Wakabayashi K, Hayashi S, Kakita A, et al. Accumulation of α-synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy [J]. Acta Neuropathologica, 1998,96:445-452.

[9] Costello S, Cockburn M, Bronstein J, et al. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California [J]. American Journal of Epidemiology, 2009,169(8):919-926.

[10] Armstrong M J, Okun M S. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: a review [J]. Jama, 2020,323(6):548-560.

[11] Feigin V L, Abajobir A A, Abate K H, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990~2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. The Lancet Neurology, 2017,16(11):877-897.

[12] Visanji N P, Lang A E, Kovacs G G. Beyond the synucleinopathies: alpha synuclein as a driving force in neurodegenerative comorbidities [J]. Translational Neurodegeneration, 2019,8:1-13.

[13] Parra-Rivas L A, Madhivanan K, Aulston B D, et al. Serine-129 phosphorylation of α-synuclein is an activity-dependent trigger for physiologic protein-protein interactions and synaptic function [J]. Neuron, 2023,111(24):4006-4023.e10.

[14] Anderson C C, Aivazidis S, Kuzyk C L, et al. Acute maneb exposure significantly alters both glycolysis and mitochondrial function in neuroblastoma cells [J]. Toxicological Sciences, 2018,165(1):61-73.

[15] Anderson C C, Marentette J O, Rauniyar A K, et al. Maneb alters central carbon metabolism and thiol redox status in a toxicant model of Parkinson's disease [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2021,162:65-76.

[16] Colle D, Farina M, Ceccatelli S, et al. Paraquat and maneb exposure alters rat neural stem cell proliferation by inducing oxidative stress: New insights on pesticide-induced neurodevelopmental toxicity [J]. Neurotoxicity Research, 2018,34:820-833.

[17] Hoffman L, Trombetta L, Hardej D. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides Maneb and Mancozeb cause metal overload in human colon cells [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016,41: 78-88.

[18] Liu C Y, Liu Z H, Fang Y Y, et al. Exposure to dithiocarbamate fungicide maneb in vitro and in vivo: Neuronal apoptosis and underlying mechanisms [J]. Environment International, 2023,171: 107696.

[19] Hou L Y, Sun F Q, Huang R X, et al. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin prevents learning and memory deficits in a mouse Parkinson's disease model [J]. Redox Biology, 2019,22:101134.

[20] Ishido M. Melatonin inhibits maneb-induced aggregation of α-synuclein in rat pheochromocytoma cells [J]. Journal of Pineal Research, 2007,42(2):125-130.

[21] 张劲松,栾春业,王　强,等.代森锰锌对 PC-12 细胞凋亡的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011,25(4):349-353.
Zhang J S, Luan C Y, Wang Q, et al. Effect of mancozeb on apoptosis of PC-12cells [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2011,25(4):349-353.

[22] Che Y N, Hou L Y, Sun F Q, et al. Taurine protects dopaminergic neurons in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial M1polarization [J]. Cell Death & Disease, 2018,9(4):435.

[23] Forno L S, Norville R L. Ultrastructure of Lewy bodies in the stellate ganglion [J]. Acta Neuropathologica, 1976,34:183-197.

[24] Hayashida K, Oyanagi S, Mizutani Y, et al. An early cytoplasmic change before Lewy body maturation: an ultrastructural study of the substantia nigra from an autopsy case of juvenile parkinsonism [J]. Acta Neuropathologica, 1993,85:445-448.

[25] Shahmoradian S H, Lewis A J, Genoud C, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes [J]. Nature Neuroscience, 2019,22(7):1099-1109.

[26] Lin Z F, Huang L X, Cao Q Q, et al. Inhibition of abnormal C/EBPβ/α - Syn signaling pathway through activation of Nrf2ameliorates Parkinson's disease-like pathology [J]. Aging Cell, 2023,22(10): e13958.

[27] Volpicelli-Daley L A, Luk K C, Lee V M Y. Addition of exogenous α-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α-synuclein to Lewy body and Lewy neurite–like aggregates [J]. Nature Protocols, 2014,9(9):2135-2146.

[28] Dai L, Wang J N, He M Y, et al. Lovastatin alleviates α-synuclein aggregation and phosphorylation in cellular models of synucleinopathy [J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2021,14:682320.

[29] Yuan X, Yang Y X, Xia D H, et al. Silica nanoparticles promote α-synuclein aggregation and Parkinson's disease pathology [J]. Frontiers in Neuroscience, 2022,15:807988.

[30] 杨　潇,包志伟,韩晓雯,等.双酚 S 和双酚 F 诱导斑马鱼的神经发育毒性及联合作用分析 [J]. 中国环境科学, 2025,45(2):1088-1098.
Yang X, Bao Z W, Han X W, et al. Analysis of Bisphenol S and Bisphenol F-induced Neurodevelopmental Toxicity and Combined Effect in Zebrafish [J]. China Environmental Science, 2025,45(2): 1088-1098.

[31] Zhang X Y, Zou L, Meng L X, et al. Amphiphysin I cleavage by asparagine endopeptidase leads to tau hyperphosphorylation and synaptic dysfunction [J]. Elife, 2021,10:e65301.

[32] Lin Y S, Tempest P, Jang M K. Discovery of a - synuclein degraders

as potential therapeutics for Parkinson's disease [J]. Alzheimer's & Dementia, 2021,17:e055880.

[33] Alhneif M, Cherukuwada L, Keating M, et al. A challenging case of lewy body disease in a symptomatic patient negative for phosphorylated alpha-synuclein: Implications for lewy body spectrum disorders [J]. Alzheimer's & Dementia, 2024,20:e092800.

[34] Hanganu A, Bedetti C, Degroot C, et al. Mild cognitive impairment is linked with faster rate of cortical thinning in patients with Parkinson's disease longitudinally [J]. Brain, 2014,137(4):1120-1129.

[35] Cosgrove J, Alty J E, Jamieson S. Cognitive impairment in Parkinson's disease [J]. Postgraduate Medical Journal, 2015,91(1074):212-220.

[36] Gratwicke J, Jahanshahi M, Foltynie T. Parkinson's disease dementia: a neural networks perspective [J]. Brain, 2015,138(6):1454-1476.

[37] Maci R, Arias E. Teratogenic effects of the fungicide maneb on chick embryos [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1987,13(2): 169-173.

[38] Khera K S, Teramoto S. Ethylenethiourea: A review of teratogenicity and distribution studies and an assessment of reproduction risk [J]. CRC Critical Reviews in Toxicology, 1987,18(2):129-139.

[39] Houeto P, Bindoula G, Hoffman J R. Ethylenebisdithiocarbamates and ethylenethiourea: possible human health hazards [J]. Environmental Health Perspectives, 1995,103(6):568-573.

[40] Reregistration Eligibility Decision (RED) for Maneb [Z]. U.S. Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/maneb_red.pdf.

[41] Cao F J, Souders II C L, Li P F, et al. Developmental neurotoxicity of maneb: Notochord defects, mitochondrial dysfunction and hypoactivity in zebrafish (Danio rerio) embryos and larvae [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019,170:227-237.

[42] 刘朝阳,刘泽华,方艳艳,等.代森锰及其代谢物的神经毒性影响与机制研究 [J]. 中国环境科学, 2022,42(9):4399-4408.
Liu C Y, Liu Z H, Fang Y Y, et al. Neurotoxic effects and mechanisms of Maneb and its metabolites [J]. China Environmental Science, 2022, 42(9):4399-4408.

[43] Brouwer M, Huss A, van der Mark M, et al. Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands [J]. Environment International, 2017,107:100-110.

[44] Ding W B, Lin H Y, Hong X, et al. Poloxamer 188-mediated anti-inflammatory effect rescues cognitive deficits in paraquat and maneb-induced mouse model of Parkinson's disease [J]. Toxicology, 2020,436:152437.

[45] Hou L Y, Qu X Y, Qiu X F, et al. Integrin CD11b mediates locus coeruleus noradrenergic neurodegeneration in a mouse Parkinson's disease model [J]. Journal of Neuroinflammation, 2020,17:1-13.

[46] Liu C Y, Liu Z H, Fang Y Y, et al. Exposure to the environmentally toxic pesticide maneb induces Parkinson's disease-like neurotoxicity in mice: A combined proteomic and metabolomic analysis [J]. Chemosphere, 2022,308:136344.

[47] Pantazopoulou M, Brembati V, Kanellidi A, et al. Distinct alpha-Synuclein species induced by seeding are selectively cleared by the Lysosome or the Proteasome in neuronally differentiated SH-SY5Y cells [J]. Journal of Neurochemistry, 2021,156(6):880-896.

[48] Duffy M F, Collier T J, Patterson J R, et al. Quality over quantity: advantages of using alpha-synuclein preformed fibril triggered synucleinopathy to model idiopathic Parkinson's disease [J]. Frontiers in Neuroscience, 2018,12:621.

[49] Ishido M. Melatonin inhibits maneb-induced aggregation of α-synuclein in rat pheochromocytoma cells [J]. Journal of Pineal Research, 2007,42(2):125-130.

[50] Choong C J, Say Y H. Neuroprotection of α-synuclein under acute and chronic rotenone and maneb treatment is abolished by its familial Parkinson's disease mutations A30P, A53T and E46K [J]. Neuro Toxicology, 2011,32(6):857-863.

[51] Arawaka S, Sato H, Sasaki A, et al. Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in α-synuclein aggregates [J]. Acta Neuropathologica Communications, 2017,5:1-15.

[52] Smith W W. α-Synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells [J]. Journal of Neuroscience, 2005,25(23):5544-5552.

[53] Febbraro F, Sahin G, Farran A, et al. Ser129D mutant alpha-synuclein induces earlier motor dysfunction while S129A results in distinctive pathology in a rat model of Parkinson's disease [J]. Neurobiology of Disease, 2013,56:47-58.

[54] Chen L I, Feany M B. α-Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease [J]. Nature Neuroscience, 2005,8(5):657-663.

[55] Gorbatyuk O S, Li S, Sullivan L F, et al. The phosphorylation state of Ser-129in human α-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008,105(2):763-768.

[56] Ghanem S S, Majbour N K, Vaikath N N, et al. α-Synuclein phosphorylation at serine 129occurs after initial protein deposition and inhibits seeded fibril formation and toxicity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022,119(15):e2109617119.

[57] Fayyad M, Majbour N K, Vaikath N N, et al. Generation of monoclonal antibodies against phosphorylated α-Synuclein at serine 129: Research tools for synucleinopathies [J]. Neuroscience Letters, 2020,725:134899.

[58] Domico L M, Zeevalk G D, Bernard L P, et al. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction [J]. Neurotoxicology, 2006, 27(5):816-825.

[59] Zhang J, Fitsanakis V A, Gu G, et al. Manganese ethylene‐bis‐dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction [J]. Journal of Neurochemistry, 2003,84(2):336-346.

[60] Ahn E H, Lei K, Kang S S, et al. Mitochondrial dysfunction triggers the pathogenesis of Parkinson's disease in neuronal C/EBPβ transgenic mice [J]. Molecular Psychiatry, 2021,26(12):7838-7850.

[61] Lei K, Kang S S, Ahn E H, et al. C/EBPβ/AEP signaling regulates the oxidative stress in malignant cancers, stimulating the metastasis [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2021,20(9):1640-1652.

[62] Patel S, Singh K, Singh S, et al. Gene expression profiles of mouse striatum in control and maneb+ paraquat-induced Parkinson's disease phenotype: validation of differentially expressed energy metabolizing transcripts [J]. Molecular Biotechnology, 2008,40:59-68.

作者简介：章智冰(2001-),女,江西上饶人,中南财经政法大学硕士研究生,主要研究方向为环境毒理与健康.发表论文 3 篇.zzbing@stu.zuel.edu.cn.